様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 ２２ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１１９８６

研究課題名（和文）炎症の収束と組織リモデリングを誘導する次世代歯周組織再生治療法の構築

研究課題名（英文）Development of a novel periodontal tissue regenarative therapy that induces resolution of inflammation and tissue remodeling

研究代表者
讃井　彰一（Sanui, Terukazu）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：７０５０７７８０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：当研究にてSprouty2（Spry2）が骨芽細胞の増殖と分化に与える影響を調査した。骨芽細胞におけるSpry2の発現を検討したところ、bFGF刺激によりSpry2が高発現に認められた。一方、Spry2を強発現させたところ、骨芽細胞の増殖は抑制された。また、Spry2はbFGF刺激後のERK1/2とBMP刺激後のSmad1/5/8のリン酸化を負に調整していた。さらにSpry2は骨分化マーカーであるOSXとALPとOCNの遺伝子発現とマトリックス石灰化を抑制した。以上より、Spry2はFGF誘導ERK1/2とBMP誘導Smadを不活化させて、骨芽細胞の増殖と分化を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
線維芽細胞増殖因子（FGF）と骨形成タンパク質（BMP）は分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ1/2（ERK1/2）とSmadのシグナル伝達経路を通して骨形成と骨芽細胞活性に関して重要な役割を担っている。Spryファミリーは FGFシグナル経路の細胞内抑制因子であり、哺乳類において４つのオルソログが同定され、特にSpry2は骨形成に関与すると言われている。当研究成果によって解明された骨芽細胞のメカニズムは歯周炎にて失われた歯槽骨を再生する治療法の開発の一助を担うと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the involvement of Sprouty2 (Spry2) in osteoblast proliferation and differentiation. We examined Spry2 expression in MC3T3-E1 cells, and found that high levels of Spry2 expression were induced by basic FGF stimulation. Overexpression of Spry2 in MC3T3-E1 cells resulted in suppressed proliferation compared with control cells. Sprouty2 negatively regulated the phosphorylation of ERK1/2 after basic FGF stimulation, and of Smad1/5/8 after BMP stimulation. Furthermore, Spry2 suppressed the expression of osterix, alkaline phosphatase, and osteocalcin mRNA, which are markers of osteoblast differentiation. Additionally, Spry2 inhibited osteoblast matrix mineralization. These results suggest that Spry2 is involved in the control of osteoblast proliferation and differentiation by downregulating the FGF-ERK1/2 and BMP-Smad pathways, and suppresses the induction of markers of osteoblast differentiation.

研究分野：歯学

キーワード：Spouty2　骨芽細胞　FGF　BMP　ERK1/2　Smad1/5/8

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

現在では、組織誘導再生法(GTR 法)やエナメル基質タンパク質(EMD)などを用いた歯周組織再生療法が臨床応用されている。GTR 法では増殖の早い歯肉上皮細胞の骨欠損部位への侵入を人工膜で防ぎ、骨の自己再生を誘導する方法であるが、術式が複雑であることからその成否は多分に術者の手技に依存する。一方、EMD 法は歯の発生期を模倣することで歯周組織再生を促すものであるが空間維持能力に乏しい、ブタ歯胚由来の異種タンパクであるなどの問題点もある。また、近年、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor: bFGF）が歯周組織再生に有効であるとの臨床試験結果が導き出されている。

Sprouty(Spry)はショウジョウバエの遺伝子解析により FGF シグナルを負に調節する分子として 1998 年に同定された。ショウジョウバエからほ乳類まで種を超えて広く保存され、ほ乳類の Spry には少なくとも 4 種類のホモログが存在する。特に Sprouty2 (Spry2)は古典的 MAPK である ERK により誘導されるネガティブフィードバック制御因子であり、FGF による ERK の活性を抑制する一方、上皮細胞増殖因子(epidermal growth factor: EGF)に対しては活性化を抑制しない (*Sasaki et al. J. Biol.Chem.*2001) 。しかし、Spry2 の詳細な作用メカニズムについては未だに不明な点が多く、見解も研究者間で異なっているのが現状である。

２．研究の目的

本研究の目的は、Spry2 が阻害される作用点をタンパク質構造解析より割り出し Spry2 阻害剤を開発することである。最終的に、歯周組織破壊が起きた部位に、創薬された Spry2 阻害剤を局所適用することで、炎症の終焉および速やかな骨造成が開始される新しい歯周組織再生療法を開発し、その有用性を確立したいと考えている。

３．研究の方法

MC3T3-E1 骨芽前駆細胞に Spry2 強発現変異体を遺伝子導入して、以下の解析を行なった。

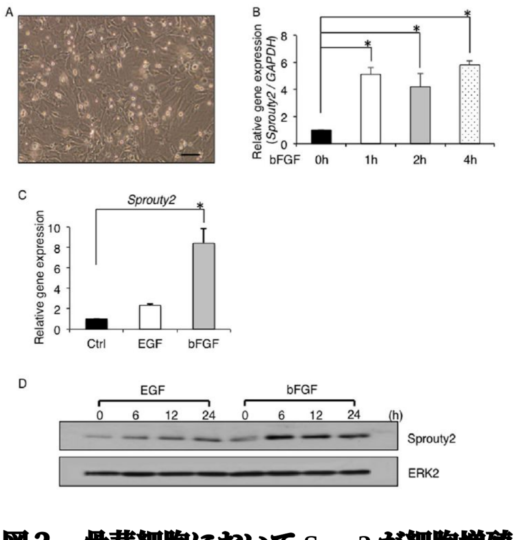
I. bFGF 刺激による Spry2 の遺伝子およびタンパク質発現の経時的変化について検討した。

II. bFGF 刺激における MC3T3-E1 細胞の ERK1/2 のリン酸化と細胞増殖能・骨分化能を、BMP 刺激における Smad1/5/8 のリン酸化と骨分化能を検証した。

III. bFGF または BMP 刺激における石灰化能を測定した。

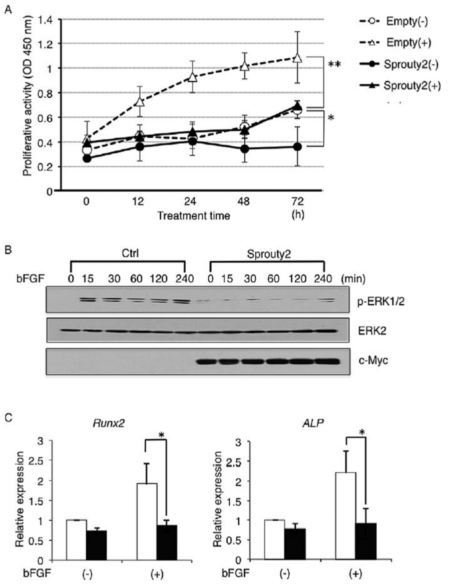
４．研究成果

図１．FGF 刺激は骨芽細胞において Spry2 を誘導する



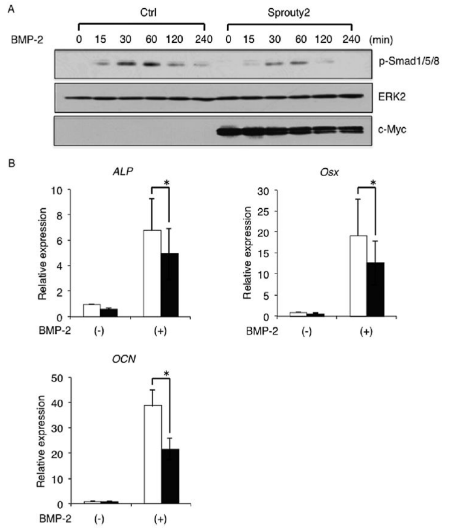
最初に、in vitro にて初代培養細胞における Spry2 発現の経時的変化を調査するために、マウスの頭蓋骨から骨芽細胞を単離した（図 1A）。リアルタイム PCR 解析の結果、bFGF 刺激後に Spry2 の遺伝子発現が亢進した（図 1B）。次に、MC3T3-E1 骨芽前駆細胞を使用して EGF および bFGF 刺激を行なったところ、遺伝子レベル（図 1C）でも蛋白質レベル（図 1D）でも EGF 刺激ではなく bFGF 刺激によって Spry2 が増強されることが明らかとなった。

図２．骨芽細胞において Spry2 が細胞増殖・骨分化および FGF シグナル経路に与える影響



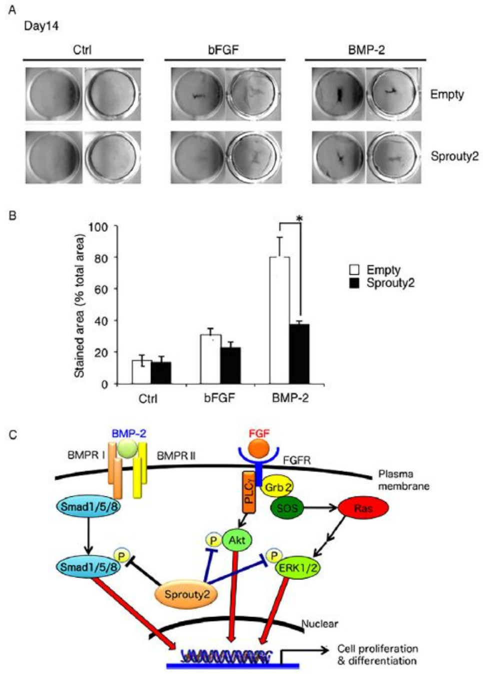
Spry2 が骨芽細胞の増殖に与える影響を検証するために WST-8 解析を行なった。bFGF で刺激した MC3T3-E1 細胞は対象群と比べて有意に増殖を促進したが、この増殖は Spry2 強発現遺伝子変異体を導入した細胞において抑制を受けていた（図 2A）。従って、Spry2 は骨芽細胞増殖において負に調整することが示唆された。次に、ERK1/2 の活性化に関してウェスタンブロット法にて解析したところ、bFGF 刺激後に Spry2 の強発現によって経時的に抑制されることが明らかとなった（図 2B）。さらに、Runx2 と ALP の遺伝子発現は bFGF 刺激により増加するが、Spry2 の強発現によって有意に減少した（図 2C）。

図３．骨芽細胞において Spry2 が BMP シグナル経路および骨分化に与える影響



今度は Spry2 が BMP シグナル経路に与える影響を検証するためにウェスタンブロット解析を行なった。BMP 刺激後に Spry2 の強発現によって Smad1/5/8 のリン酸化が経時的に抑制されることが明らかとなった（図 3A）。さらに、骨分化マーカーである ALP、OSX、OCN の遺伝子発現は BMP 刺激により増加したが、Spry2 の強発現によってこれらの発現がすべて有意に減少した（図 3B）。

図４．骨芽細胞において Spry2 が骨石灰化に与える影響



Spry2 の石灰化能を検討するために von Kossa 染色を行なったところ、Spry2 の強発現は bFAGF 刺激だけでなく BMP 刺激による石灰化を抑制した（図 4A, B）。結論として、当研究により Spry2 は FGF 誘導 ERK1/2 と BMP 誘導 Smad を不活化させて、骨芽細胞の増殖と分化を制御していることが示唆された（図 4C）。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計8件（うち査読付論文　8件／うち国際共著　8件／うちオープンアクセス　1件）

1．著者名 Nozoe Kohji、Sanui Terukazu、Takeshita Masaaki、Fukuda Takao、Haraguchi Akira、Aida Yoshitomi、Nishimura Fusanori	4．巻 441
2．論文標題 Innate immune-stimulatory activity of Porphyromonas gingivalis fimbriae is eliminated by phase separation using Triton X-114	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Journal of Immunological Methods	6．最初と最後の頁 31～38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jim.2016.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1．著者名 Takano Aiko、Fukuda Takao、Shinjo Takanori、Iwashita Misaki、Matsuzaki Etsuko、Yamamichi Kensuke、Takeshita Masaaki、Sanui Terukazu、Nishimura Fusanori	4．巻 69
2．論文標題 Angiopoietin-like protein 2 is a positive regulator of osteoblast differentiation	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Metabolism	6．最初と最後の頁 157～170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.metabol.2017.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1．著者名 Nishimura F, Sano T, Sanui T.	4．巻 7(2
2．論文標題 The influence of periodontal burden on metabolic control of diabetes - Myth or reality? From a nutritional perspective -	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Current Oral Health Reports	6．最初と最後の頁 107-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s.40496-017-0136-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1．著者名 Sanui Terukazu、Fukuda Takao、Yamamichi Kensuke、Toyoda Kyosuke、Tanaka Urara、Yotsumoto Karen、Taketomi Takaharu、Nishimura Fusanori	4．巻 7
2．論文標題 Microarray Analysis of the Effects of Amelogenin on U937 Monocytic Cells	5．発行年 2017年
3．雑誌名 American Journal of Molecular Biology	6．最初と最後の頁 107～122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/ajmb.2017.72009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 Sanui Terukazu、Takeshita Masaaki、Fukuda Takao、Tanaka Urara、Alshargabi Rehab、Aida Yoshitomi、Nishimura Fusanori	4．巻 222
2．論文標題 Adhesion attenuates respiratory burst induced by different modes of triggering in resting or LPS-primed neutrophils	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Immunobiology	6．最初と最後の頁 865～871

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.imbio.2017.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1．著者名 Sanui Terukazu、Takeshita Masaaki、Fukuda Takao、Tanaka Urara、Alshargabi Rehab、Aida Yoshitomi、Nishimura Fusanori	4．巻 50
2．論文標題 Roles of serum in innate immune responses of human leukocytes to synthetic lipopeptide	5．発行年 2017年
3．雑誌名 International Immunopharmacology	6．最初と最後の頁 61～68

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2017.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1．著者名 Yamamichi Kensuke、Fukuda Takao、Sanui Terukazu、Toyoda Kyosuke、Tanaka Urara、Nakao Yuki、Yotsumoto Karen、Yamato Hiroaki、Taketomi Takaharu、Uchiumi Takeshi、Nishimura Fusanori	4．巻 83
2．論文標題 Amelogenin induces M2 macrophage polarisation via PGE2/cAMP signalling pathway	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Archives of Oral Biology	6．最初と最後の頁 241～251

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2017.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1．著者名 Taketomi Takaharu、Onimura Tomohiro、Yoshiga Daigo、Muratsu Daichi、Sanui Terukazu、Fukuda Takao、Kusukawa Jingo、Nakamura Seiji	4．巻 42
2．論文標題 Sprouty2 is involved in the control of osteoblast proliferation and differentiation through the FGF and BMP signaling pathways	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Cell Biology International	6．最初と最後の頁 1106-1114

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbin.10876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計12件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

1．発表者名
Rehab Alshargabi, Aiko Takano, Akiko Yamashita, Misaki Iwashita, Takao Fukuda, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura

2．発表標題
The role of proteoglycans in the pathogenesis of drug induced gingival overgrowth (DIGO).

3．学会等名
第61回春季日本歯周病学会学術大会

4．発表年
2018年

1．発表者名
眞田大樹、佐野朋美、福田隆男、岩下未咲、山下明子、藤田剛、讃井彰一、栗原英見、西村英紀

2．発表標題
炎症脂肪/歯周組織における抗炎症分子の探索研究

3．学会等名
第148回日本歯科保存学会2018年度春季学術大会

4．発表年
2018年

1．発表者名
Urara Tanaka, Karen Yotsumoto, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Hiroaki Yamato, Yuki Nakao, Fusanori Nishimura

2．発表標題
Effect of amelogenin on antigen presentation in macrophages.

3．学会等名
96th General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）

4．発表年
2018年

1．発表者名
中尾雄紀，福田隆男，讃井彰一，田中麗，渡邊ゆかり，大和寛明，四本かれん，西村英紀

2．発表標題
歯肉幹細胞由来エクソソームによる抗炎症性マクロファージ誘導機序の検討

3．学会等名
第61回秋季日本歯周病学会学術大会

4．発表年
2018年

１．発表者名 Rehab Alshargabi, Tomomi Sano, Akiko Yamashita, Taiki Sanada, Takao Fukuda, Misaki Iwashita, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura
２．発表標題 The Role of Proteoglycans in Drug Induced Gingival Overgrowth (DIGO)
３．学会等名 第149回日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会
４．発表年 2018年

１．発表者名 中尾雄紀，福田隆男，讃井彰一，田中麗，渡邊ゆかり，大和寛明，四本かれん，西村英紀
２．発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソームによる抗炎症性マクロファージ誘導機序の検討　～間葉系幹細胞培養上清の有する抗炎症作用に注目して～
３．学会等名 平成30年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部・合同研修会
４．発表年 2018年

１．発表者名 讃井彰一，四本かれん，豊田敬介，福田隆男，田中麗，山道研介，西村英紀
２．発表標題 限局性侵襲性歯周炎患者にエナメルマトリックスデリバティブによる歯周組織再生療法を行った一症例
３．学会等名 第60回春季日本歯周病学会学術大会
４．発表年 2017年

１．発表者名 田中麗、讃井彰一、福田隆男、西村英紀
２．発表標題 歯周炎モデルマウスにおける歯槽骨吸収及び破骨細胞分化へのDecitabineの効果
３．学会等名 第146回日本歯科保存学会2017年度春季学術大会
４．発表年 2017年

1．発表者名
Urara Tanaka, Karen Yotsumoto, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Kyosuke Toyoda, Fusanori Nishimura

2．発表標題
Microarray analysis of U937 monocytic cells stimulated with amelogenin.

3．学会等名
Penn Periodontal Conference 2017（国際学会）

4．発表年
2017年

1．発表者名
福田隆男，中尾雄紀，讃井彰一，豊田敬介，田中麗，西村英紀

2．発表標題
広汎型侵襲性歯周炎患者に対し歯周組織再生療法を含む包括的治療を行った一症例

3．学会等名
日本歯周病学会60周年記念京都大会

4．発表年
2017年

1．発表者名
28.高野愛子、福田隆男、新城尊徳、岩下未咲、竹下正章、Rehab Alshargabi、讃井彰一、西村英紀

2．発表標題
アンジオポエチン様タンパク質2は骨芽細胞分化のpositive regulatorとして機能する。

3．学会等名
日本歯周病学会60周年記念京都大会

4．発表年
2017年

1．発表者名
29.Rehab Alshargabi、高野愛子、山下明子、豊田敬介、岩下未咲、佐野朋美、鶴田満大、松永紘明、眞田大樹、竹下正章、相田 宜利、讃井彰一、西村英紀

2．発表標題
The role of SPOCK-1 in Drug induced gingival overgrowth (DIGO)

3．学会等名
日本歯周病学会60周年記念京都大会

4．発表年
2017年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院　歯学研究院　口腔機能修復学講座　歯周病学分野
http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/perio/

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	福田　隆男 (Fukuda Takao) (80507781)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	西村　英紀 (Nishimura Fusanori) (80208222)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	武富　孝治 (Taketomi Takaharu) (10553290)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	