

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22721

研究課題名(和文) SPOCK-1生体タンパクを応用した安全性に優れた革新的歯周病予防薬の開発

研究課題名(英文) Development of preventive strategy against periodontitis using SPOCK-1

研究代表者

西村 英紀(NISHIMURA, FUSANORI)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：80208222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬物性歯肉増殖症は一部降圧剤や免疫抑制剤の副作用で発症するが、既存の歯周炎に対して難治性に作用するため、高齢社会をむかえた今日、その対応は急務の課題である。申請者らはSPOCK1が単独で歯肉増殖症の発症に関わることを確認した。さらにこれに炎症性の歯周炎が合併することで病変がどのように変化するかを確認するため、SPOCK1 transgenic mice (TG)を作成し、実験的歯周炎を惹起した。結果、歯周炎の合併で歯肉肥厚は一層助長されたことから、この動物モデルはヒト歯周炎に薬物性歯肉増殖症が合併したモデルであると結論することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物性歯肉増殖症は既存の歯周炎を難治化すること、超高齢社会の到来で原因薬物の服用がさらに増加すると考えられることからその対策は急務の課題である。こうして重症化した歯周炎は糖尿病やその合併症の重症化を促進する。ただ、この病気の原因を解明する有用な動物モデルは存在しなかった。このたび、申請者らが開発したSPOCK1と呼ばれる遺伝子を過剰に発現したマウスに実験的歯周炎を惹起させたマウスは、ヒト歯周炎に歯肉増殖症が合併した病態を忠実に再現するものと判断されたことから、病態解明に有用なモデルと結論づけられた。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced gingival overgrowth (GIGO) is caused by some medications such as Ca-channel blocker or immunosuppressive reagent. The disease accelerates the progression of inflammatory periodontal disease, and hence, the effective prevention is very necessary. We previously reported that SPOCK1 was involved in the etiology of DIGO. In this study, we generated SPOCK1 transgenic mice and induced experimental periodontitis on this mice. Complication of periodontitis further enhanced gingival thickening, and therefore, this model appeared to well represent human periodontitis combined with DIGO.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯肉増殖症 SPOCK1 サイクロスポリン RANKL OPG サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

21世紀の歯科医療体系は、これまでの治療を中心としたものから予防を中心としたものに大きく変換すべきであると言われる。一方、この20年の間に歯周病因論研究が飛躍的に発展した結果、歯周炎による組織破壊は主として感染(irritant)の結果生体で惹起される炎症によって組織破壊がもたらされる(inflammatory tissue destruction)ことが明らかになった。つまり、歯周組織破壊予防の観点からは、感染源の制御に加え、宿主の破壊因子の制御(host modifying factor)が効果的と考えられる。しかしながら、炎症を過度に抑制することは超高齢社会を向ける今日、かえって感染を助長しかねないことから、組織破壊に直接関与する効果分子へのアプローチが有用な予防措置ではないかとの発想を抱いた。申請者らは薬物性歯肉増殖症の成因解明研究に継続的に取り組んでおり、その過程でcysteine proteaseであるcathepsin-L欠損マウスを用いた検討から、同lysosomal酵素の”complete loss of function”によって歯肉増殖症に酷似した病態を示す歯肉の肥厚性病変が惹起されることを報告した(Nishimura F et al. Am J Pathol, 2002)。しかしながら、本マウスの生育は正常マウスに比べ著しく劣ることから、原因薬剤のcathepsin-Lへの直接的影響によって病変が惹起される可能性は低いと思われた。そこで、cathepsin-L活性をおさえる生体分子を介した間接的影響の可能性について文献検索を加えたところ、sparc/osteonectinファミリー分子であるspock-1に特異的cathepsin-L活性阻害効果があることを知り得た。興味深いことにspock-1は複数のドメインから構成され、cysteine protease阻害ドメインに加え、membrane type 1 metalloproteinase抑制ドメイン、serine protease阻害ドメインが存在し、既存のsparcタンパクと異なり複数の酵素を阻害する。また、sparcやspock-1は生体において、脳組織、生殖器、骨組織、基底膜周囲で発現が観察されることから、細胞外基質の恒常性維持に重要な役割を担っていることも示唆されている(Bradshaw AD. Int J Biochem Cell Biol, 2012)。さらに組織中のspock-1自体の発現レベルは極めて低いこと、spock-2, 3の機能の代償効果からノックアウトマウスでは著明な表現型の変化が観察されないということであった。歯肉増殖症の病理組織の特徴は上皮脚(rete peg)が結合組織内に深く延伸(elongation)している点にある。Sparcファミリーは基底膜周囲に発現が認められる。そこで、申請者らは薬物性歯肉増殖症の病因にspock-1が関わる可能性を検討するため、spock-1 トランスジェニック(TG)マウスを作製した。その結果、①spock-1TGマウスは正常に繁殖すること、かつ②歯肉増殖症様の病変が惹起されること、③その組織像はヒト歯肉増殖症の病理組織像に酷似していることを明らかにした。前述したように、spock-1の基礎発現量は極めて低いことから、基質(プロテオグリカン)として蓄積することに加え、cathepsin-Lをはじめとした酵素の活性をおさえることで病変が惹起されたのではないかと考察した。Spock-1には複数の酵素活性阻害ドメインが存在する。歯肉増殖症の病変は高度の線維化による組織の硬化が特徴であり、組織分解酵素に対して抵抗性を示すのではないかと考えられる。以上の背景から、spock-1は歯周炎等の炎症性の組織破壊の対しては抑制的に作用する可能性はないかとの発想を抱いた。

## 2. 研究の目的

本申請は、①spock-1TGマウスにおいて実験的歯周炎や硬組織の吸収が抑制され、軟組織の治療が促進されるか否か、②spock-1組替えタンパクを作製し、同タンパクの局所投与によって同様の効果が得られるか否かについて検証を加え、超高齢社会において安全性に優れた独創的な予防薬の開発を探索しようとするものである。

## 3. 研究の方法

- 1) 10~12週齢の雄性 *Spock1-Tg* マウスに、麻酔下で6-0絹糸を上顎第2臼歯周囲に結紮し10日間維持することで実験的歯周炎モデルとした。対照群には同週齢で雄性の同腹仔野生型(WT)マウスを用いた。結紮2週間後に各マウスを安楽死させ、実体顕微鏡下で上顎臼歯部の咬合面・頬側面観の撮影を行い、Okanobuらの歯肉増殖定量法(Okanobu *et al.*, J Immunol Methods, 2017)を参考に、第2臼歯の近遠心幅径を基準とした頬側歯肉の厚みと高さについて定量を行った。次いで、上下顎臼歯部周囲歯肉を採取し、RNAおよびタンパクを抽出した。上顎の残余軟組織を、次亜塩素酸と過酸化水素水を用いて化学的に除去し、歯槽骨吸収を実体顕微鏡下で評価した。歯肉組織中のSPOCK1タンパクの発現レベルをウェスタンブロットティング(WB)法にて確認した。
- 2) 8週齢の雄性 *Spock1-Tg* マウスに、50mg/kg体重のシクロスポリン(CsA)の腹腔内(ip)投与を1日1回7日間行い、そこから上顎両側第2臼歯への6-0絹糸結紮による歯周炎を惹起した群

(Tg CsA+lig 群) と惹起しなかった群 (Tg CsA-lig 群) に分けた。絹糸結紮は 2 週間維持し、その間も毎日 50mg/kg 体重の CsA の ip 投与を 2 週間継続した。同時に、雄性の同腹仔野生型 (WT) マウスについても、同様に CsA の ip 投与と絹糸結紮を行い歯周炎群 (WT CsA+lig) および非歯周炎群 (WT CsA-lig) を設定した。の方法と同様に、結紮 2 週間後に各マウスを安楽死させ、実体顕微鏡下で上顎臼歯部の咬合面・頬側面観の撮影を行い、頬側歯肉の厚みと高さについて定量を行った。また、この定量結果を、CsA 非投与で絹糸結紮による歯周炎を惹起した WT・Tg マウス (WT lig+, Tg lig+) 群と、しなかった (WT lig-, Tg lig-) 群と比較した。その後、上顎の残余軟組織を除去し歯槽骨吸収量を実体顕微鏡下で評価・定量した。また、歯肉組織中の SPOCK1 タンパクの発現レベルをウェスタンブロッティング (WB) 法にて確認した。

3) チオグリコレートを *Spock1*-Tg および WT マウスに腹腔内投与し、腹腔マクロファージを得た。その後、10ng/ml *E.coli* LPS と 100ng/ml Pam3CSK4 で刺激を行い、TNF $\alpha$ ・IL-1 $\beta$  の遺伝子発現を qPCR 法にて検討した。

4) in vitro の検討として、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に 100ng/ml recombinant mouse (rm)RANKL を 100ng/ml rmSPOCK1 とともに 7 日間共刺激を行い、破骨細胞形成を TRAP 染色にて確認し、RANKL 単独刺激条件と比較した。

#### 4. 研究成果

*Spock1*-Tg マウスは WT マウスと比較して、結紮による歯肉肥厚が有意に増大する (Fig.1) とともに、歯槽骨吸収が有意に増悪した (Fig.2)。また、歯肉の肥厚度は歯肉中の SPOCK1 発現量に応じて増大する傾向が見られた。

Fig.1

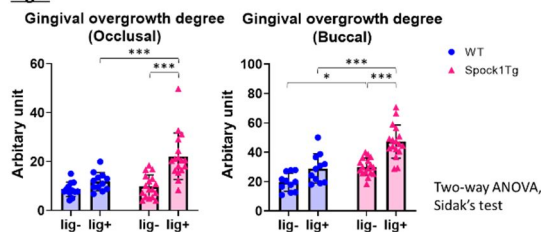
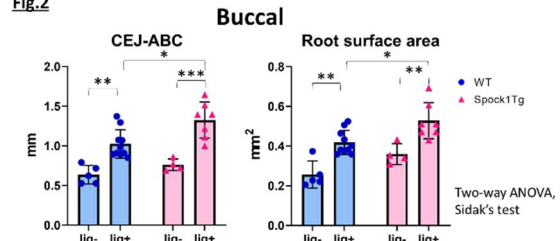
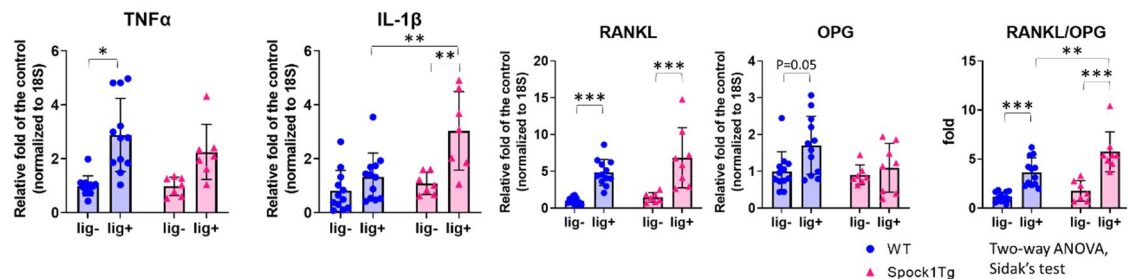


Fig.2



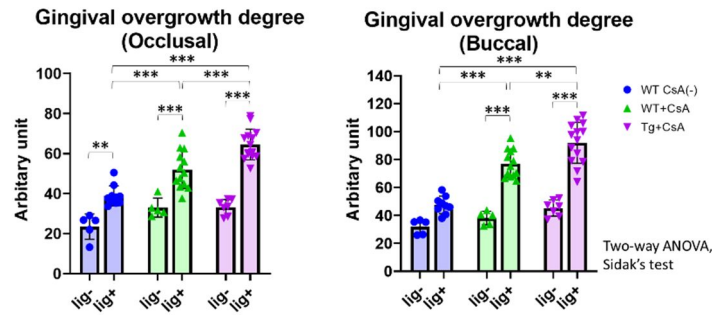
*Spock1*-Tg マウスは WT マウスと比較して、結紮 10 日目では IL-1 $\beta$  の遺伝子発現が有意に高く、RANKL/OPG 遺伝子発現比も有意に高値であった (Fig.3)。

Fig.3



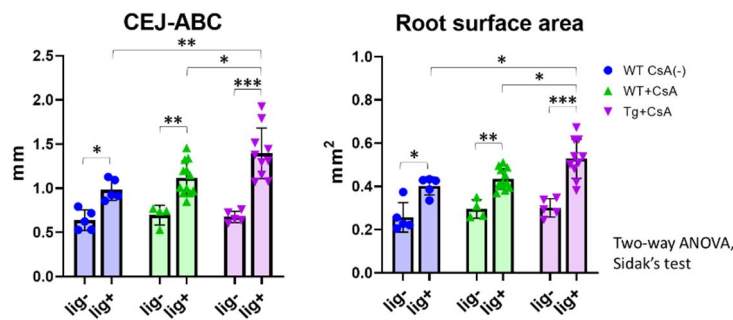
WT lig- および Tg lig- 群と比較して、WT CsA lig- および Tg CsA lig- 群ではともに咬合面・頬側面観の歯肉肥厚度は明らかに上昇していたが、WT と Tg 間では有意差は見られなかった。一方で、WT lig+ と比較して、WT CsA lig+ および Tg CsA lig+ 群では、咬合面・頬側面観ともに歯肉肥厚度は顕著に増大しており、Tg CsA lig+ マウスは WT CsA lig+ 群よりもなお有意な歯肉肥厚度の増加がみられた (Fig.4)。

Fig.4



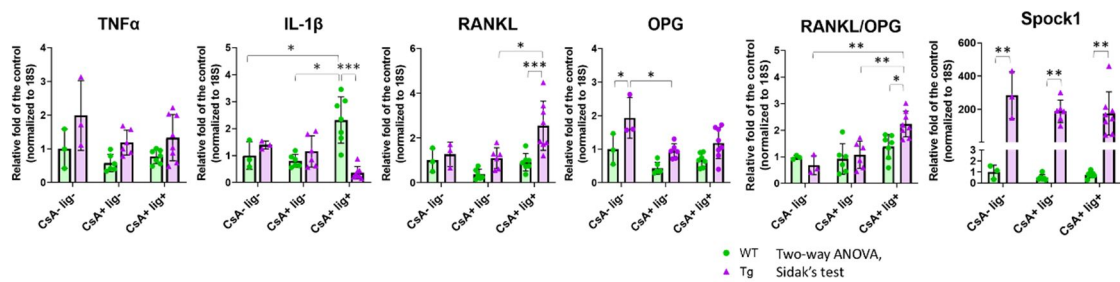
WT lig<sup>+</sup>と比較して WT CsA lig<sup>+</sup>群では、歯槽骨吸収は増加傾向にあった。Tg lig<sup>+</sup>と比較して Tg CsA lig<sup>+</sup>群でも、歯槽骨吸収は増加傾向にあった。また、WT lig<sup>+</sup>に対して Tg lig<sup>+</sup>群では有意な歯槽骨吸収の増大が見られていたが、WT CsA lig<sup>+</sup>に対して Tg CsA lig<sup>+</sup>群ではなお有意な歯槽骨吸収量の増大が見られた。

Fig.5



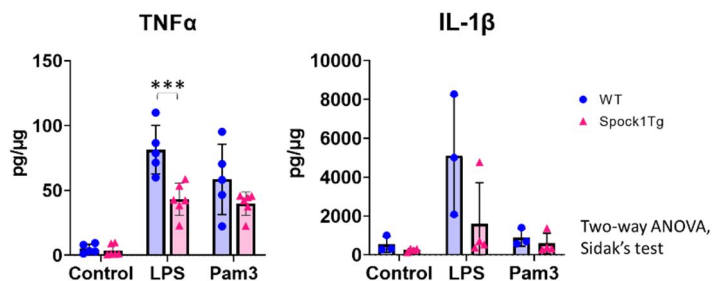
CsA 投与では、非結紮 WT マウスにおいて Spock1 の発現上昇は見られなかった。CsA 投与条件下での絹糸結紮 14 日後では、Tg マウスは WT マウスに比べて、IL-1 $\beta$  の発現は有意に減少し、逆に RANKL の発現が有意に高く、RANKL/OPG 遺伝子発現比は有意に増大していた (Fig.6)。

Fig.6



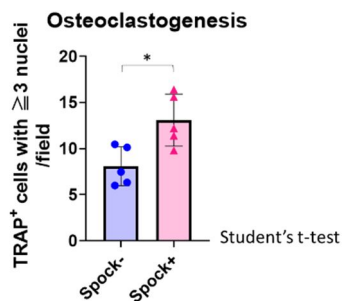
Spock1-Tg マウス由来腹腔マクロファージにおける LPS 誘導性 TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の産生量は、WT マウス由来細胞よりも有意に抑制されていた (Fig.5)。

Fig.5



RAW264.7 細胞の破骨細胞形成は、RANKL 単独刺激と比較して RANKL・SPOCK1 共刺激条件下で有意に増大した。

Fig.6



以上から、SPOCK1 はマクロファージの炎症反応に対しては抑制的に作用する一方で、破骨細胞形成については促進性に作用することで歯周炎における歯槽骨吸収を増大させることが分かった。つまり当初予想とは逆の結果となることを確認した。また、歯周炎症に応答した歯肉肥厚は *Spock1-Tg* マウスで大きく亢進することかたヒト病変を着実に再現するものと考えられた。CsA 投与下において、SPOCK1 は、歯周炎症に伴う歯肉肥厚と歯槽骨吸収を更に増大することが示唆された。すなわち、先行研究よりニフェジピンが歯肉上皮細胞において *Spock1* 発現を増大させることから、CsA とニフェジピンを併用していると歯肉肥厚がより顕著に増大するとともに歯周炎に伴う破骨細胞形成が亢進し、歯槽骨の破壊が増悪する可能性が示唆された。今後は、結紮に伴う炎症の影響について検討する予定である。結論として SPOCK1 にはサイトカイン産生の面から抗炎症作用はあるものの、骨吸収に関しては RAKL/OPG 比の上昇を介して促進的に作用する可能性があることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Alshargabi Rehab, Sano Tomomi, Yamashita Akiko, Takano Aiko, Sanada Taiki, Iwashita Misaki, Shinjo Takanori, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Kishida Shosei, Nishimura Fusanori	4. 巻 10
2. 論文標題 SPOCK1 is a novel inducer of epithelial to mesenchymal transition in drug-induced gingival overgrowth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66660-z	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 -

1. 著者名 Alshargabi Rehab, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamashita Akiko, Sano Tomomi, Nishimura Yuki, Hayashi Masato, Zeze Tatsuro, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Nishimura Fusanori	4. 巻 533
2. 論文標題 SPOCK1 induces adipose tissue maturation: New insights into the function of SPOCK1 in metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.129	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Alshargabi R et al.
2. 発表標題 SPOCK-1 upregulation is a novel epithelial mesenchymal transition (EMT) inducer in calcium channel blocker-induced gingival overgrowth.
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Alshargabi R et al.
2. 発表標題 SPOCK-1, a novel epithelial-mesenchymal transition (EMT) inducer in gingival overgrowth.
3. 学会等名 IADR Hatton Award Competition (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	自見 英治郎  (JIMI Eijiro)  (40276598)	九州大学・歯学研究院・教授   (17102)	
研究 分担者	佐野 朋美  (SANO Tomomi)  (50782075)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------