

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792334

研究課題名(和文) bFGFシグナル伝達のアンタゴニストを標的とした歯周組織再生治療薬の創薬

研究課題名(英文) Inhibition of Spry2 Induces Proliferation and Differentiation of Osteoblasts through bFGF and EGF Stimulation but Inhibits Proliferation of Gingival Epithelial Cells.

研究代表者

讃井 彰一 (Sanui, Terukazu)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70507780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Spry2が歯周組織の再生において新しい治療標的となり得るのかどうかについて、骨芽細胞、歯肉上皮細胞、歯根膜細胞を用いて検討を行った。骨芽細胞では、Spry2を抑制しbFGFとEGFの同時刺激を行うことで、ERKの活性、細胞増殖が亢進するとともに、ALP活性、Runx2の発現が上昇し、骨分化も促進された。歯肉上皮細胞では、骨芽細胞とは逆にERKの活性、および細胞増殖が低下した。その原因としてSpry2の抑制が、EGF受容体のユビキチン化およびプロテアソームでの分解を誘導していることが示唆された。一方、歯根膜細胞においては細胞増殖、細胞遊走が亢進したが、骨分化能は抑制された。

研究成果の概要(英文)：Transduction of a dominant-negative mutant of Spry2 (Y55A-Spry2) enhanced basic fibroblast growth factor (bFGF)- and epidermal growth factor (EGF)-induced ERK activation in MC3T3-E1 osteoblastic cells. In contrast, it decreased their activation in GE1 cells. Consistent with these observations, Y55A-Spry2 increased osteoblast proliferation with bFGF and EGF stimulation, whereas the proliferation of Y55A-Spry2-introduced GE1 cells was decreased via the ubiquitination and degradation of EGF receptors (EGFRs). In addition, Y55A-Spry2 caused upregulation of Runx2 expression and downregulation of Twist, a negative regulator of Runx2, with treatment of bFGF and EGF, resulting in enhanced osteoblastogenesis accompanied by alkaline phosphatase activation and osteocalcin expression in MC3T3-E1 cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：Spry2 歯周組織再生 bFGF EGF

1. 研究開始当初の背景

歯周病は特定の歯周病細菌によって引き起こされる慢性炎症で、ギネスブックに世界で最も多くの人々が罹患している疾病として登録されており、歯槽骨の吸収により歯を喪失する疾患として認識されている。現在では、組織誘導再生法 (guided tissue regeneration: GTR) やエナメル基質タンパク質 (enamel matrix derivative: 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。その中でも塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) は線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、上皮細胞などさまざまな細胞の増殖を誘導することが知られており、日本国内で臨床試験が進められ新しい再生療法として期待されている。一方、GTR法とは増殖の早い歯肉上皮細胞による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、空間確保に基づいた治療法であるが、サイトカイン療法と比較しても同等の組織再生効果をもつ。このことから、増殖因子だけでなく骨再生の空間を保持するスペースメイキングもまた歯周組織再生を成功に導く要因の一つであることが理解できる。しかしながら、これらの再生治療はいずれも、狭く深い2-3壁性の垂直性骨欠損が対象であるなど適応症が限られている。

Sprouty 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 Sprouty には少なくとも 4 種類のホモログが存在する。特に Sprouty2 は古典的 MAP (mitogen-activated protein) キナーゼである ERK (extracellular regulated kinase) 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ことが明らかになっている (Sasaki ら *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 36804-08)。

2. 研究の目的

近年の研究により Spry2 がさまざまな組織の再生に対して治療標的になる可能性が見出されている。しかし、歯周組織再生に関して、Spry2 がどのような影響を及ぼすのかについては不明である。本研究では歯周組織に対して Spry2 がどのような影響を及ぼすのか、また歯周組織の再生において、新しい治療標的となり得るかどうかについて、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞、マウス歯肉上皮細胞株 GE1 細胞、ヒト歯根膜細胞株 1-17 細胞を用いて、*in vitro* における検討を行った。

3. 研究の方法

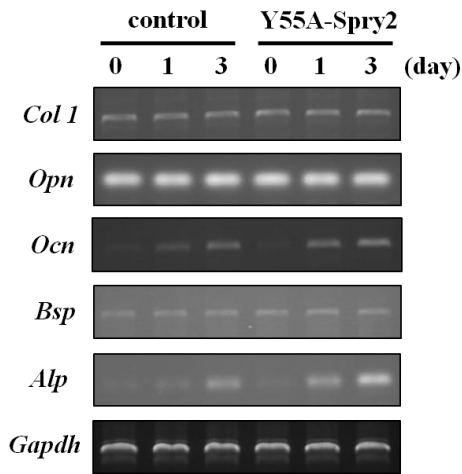
マウス Sprouty2 のドミナントネガティブ変異体を作製し、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株である MC3T3-E1 およびマウス歯肉上皮細胞株である GE1 に遺伝子導入し、ヒト歯根膜細胞株 1-17 細胞には Sprouty2 の siRNA を導入した。それぞれを bFGF・EGF・bFGF+EGF にて刺激を行った後、細胞内シグナル伝達経路をウエスタンブロット法により解析した。また、Sprouty2 が細胞機能に及ぼす影響について検証した。

4. 研究成果

Spry2 の骨芽細胞の骨芽細胞分化マーカーの発現への影響

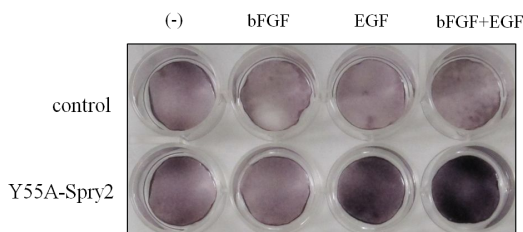
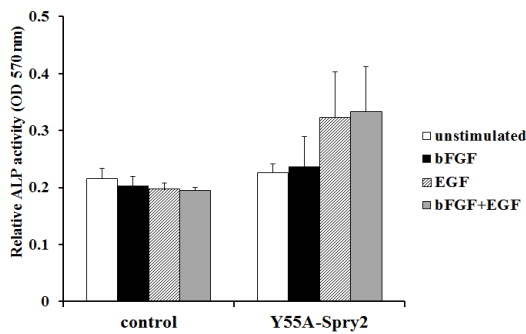
次に、Spry2 の抑制が骨芽細胞の分化にどう影響するのかを MC3T3E-1 細胞を用いて検討した。Col 1、Bsp、Alp は初期の骨分化マーカーである。Y55A-Spry2 を導入した MC3T3-E1 細胞に bFGF + EGF 刺激を加えると、Col 1、BSP 遺伝子発現に対しては影響がなかったが、石灰化誘導培地での培養3日目の Alp の mRNA 発現が上昇した。また、Ocn、Opn は後期の骨分化マーカーである。Y55A-Spry2 を導入した MC3T3-E1 細胞に bFGF + EGF 刺激を加えると、Opn 遺伝子発現に対しては影響がなかったが、石灰化誘導培地での培養3日目の Ocn 遺伝子の mRNA 発現がやや上昇した。

(図参照)



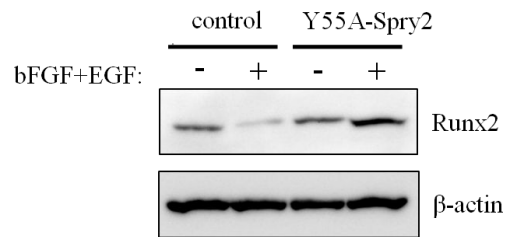
Spry2 優性阻害変異体を導入した骨芽細胞の ALP 活性への影響

Y55A-Spry2 を導入した MC3T3-E1 細胞に bFGF + EGF 刺激を加えると、ALP の mRNA 発現が上昇したため、bFGF、EGF、bFGF + EGF の各刺激における ALP 活性への影響を検討した。図に示すように、Y55A-Spry2 を導入した MC3T3-E1 細胞に EGF、bFGF + EGF 刺激を行うと、3 日目の ALP 活性は control に比べて有意に増加した。また、図に示すように、ALP 染色でも同様に、Y55A-Spry2 を導入した MC3T3-E1 細胞に EGF、bFGF + EGF 刺激を行うと、ALP 活性が亢進した。(図参照)



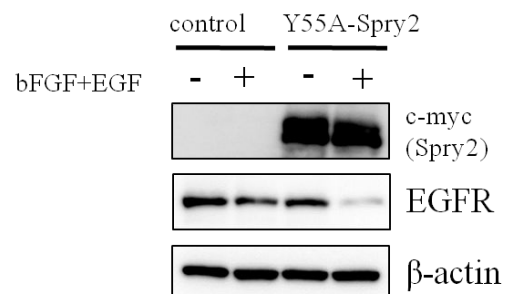
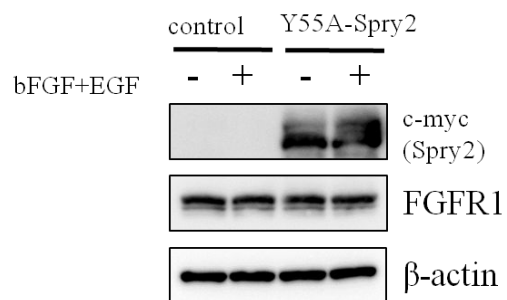
Spry2 優性阻害変異体を導入した骨芽細胞の Runx2 発現への影響

Y55A-Spry2 を導入した MC3T3-E1 細胞に bFGF + EGF 刺激を加えると ALP 活性が亢進したことから、次に、Runx2 の蛋白質発現への影響を検討した。control に bFGF + EGF 刺激を行うと、無刺激と比較して Runx2 発現の減少が確認されたのに対し、Y55A-Spry2 を導入した MC3T3-E1 細胞においては bFGF + EGF 刺激を与えた方に Runx2 発現の増加が認められた。(図参照)



Spry2 優性阻害変異体を導入した歯肉上皮細胞における受容体の発現への影響

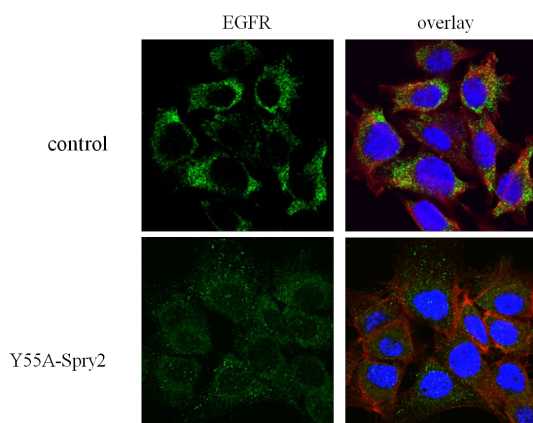
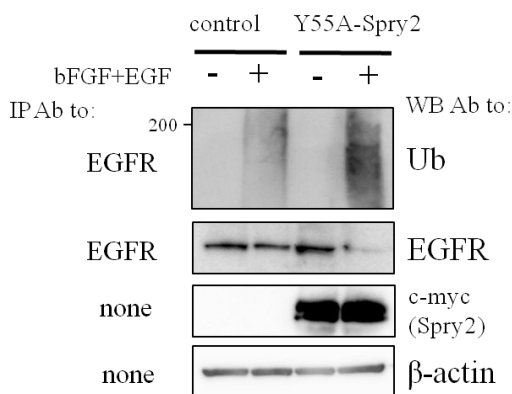
bFGF + EGF にて刺激した時、Y55A-Spry2 を導入した GE1 細胞では ERK の活性及び細胞増殖能が低下したため、GE1 細胞の FGF 受容体 (FGFR) と EGF 受容体 (EGFR) の両受容体の発現について検討を行った。その結果、図に示すように、Y55A-Spry2 を導入した GE1 細胞では、FGFR1 の発現量に対しては変化が認められなかったが、EGFR の発現量が減少していることが確認された。(図参照)



Spry2 優性阻害変異体を導入した歯肉上皮細胞における EGF 受容体減少のメカニズムの解析

EGF 刺激が入った EGFR は通常、ユビキチン化され、インターナリゼーションを起こし細胞内へ取り込まれ、プロテアソームにより分解され、再び受容体として利用される。

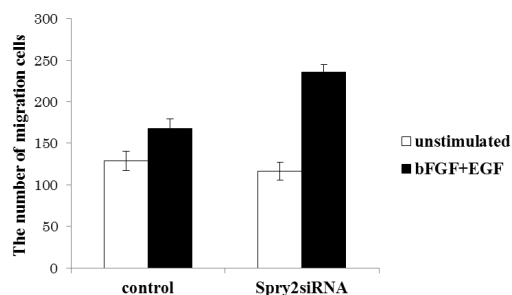
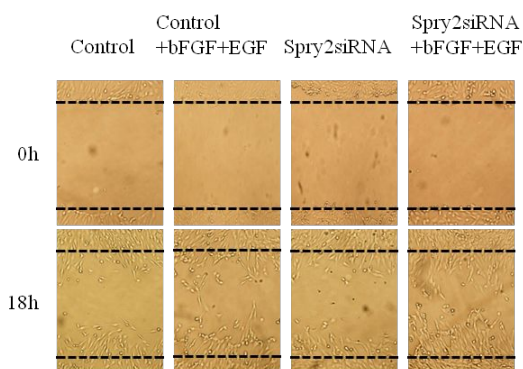
Y55A-Spry2 を導入し、bFGF + EGF 刺激を加えた GE1 細胞では EGFR の発現が減少していたため、まずその EGFR のユビキチン化の亢進に着目した。GE1 細胞抽出液を抗 EGFR 抗体で免疫沈降し、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行ったところ、Y55A-Spry2 を導入し、bFGF + EGF 刺激を加えた GE1 細胞ではユビキチン化が亢進していることが確認された(図参照)。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ユビキチン化された EGFR の細胞内分布を確認したところ、Y55A-Spry2 を導入し、bFGF + EGF 刺激を加えた GE1 細胞の EGFR はインターナリゼーションが誘導され、細胞内部に集積している EGF 受容体が著しく減少していた(図参照)。つまり、control と比較して EGFR の分解が亢進されていることが明らかとなった。



Spry2siRNA 歯根膜細胞への刺激による遊走活性への影響

歯根膜組織は硬組織形成能を有することがわかっており、歯周組織の再生の起点となっている。そこで、次に歯根膜細胞に対する Spry2 の影響を検討するために遊走活性に及ぼす影響を検討した。

図に示すとおり、Spry2 を抑制することで細胞増殖が亢進し、bFGF + EGF 刺激を加えることでさらにその効果が増強された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fukuda T, Sanui T*, Toyoda K, Tanaka U, Taketomi T, Uchiimi T and Nishimura F. Identification of novel amelogenin-binding proteins by proteomics analysis. *PLoS ONE*, 2013(8)10:e78129

〔学会発表〕(計 3 0 件)(招待講演 1 件)(うち筆頭演者 8 件)

1. 讚井 彰一, 田中麗, 豊田敬介, 福田隆男, 後村亮, 山道研介, 西村 英紀, 根分岐部病変を伴う慢性歯周炎患者に対し歯根分離および自然挺出にて対応した一症例, 第 56 回 秋季日本歯周病学会学術大会, 2013.09.22.

2. Sanui Terukazu, Tanaka Urara, Toyoda Kyosuke, Fukuda Takao, Atomura Ryo, Yamamichi Kensuke, Nishimura Fusanori, Inhibition of Spry2 decreased EGF receptors in gingival epithelial cells.,10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting,2013.09.03.
3. Sanui Terukazu, Tanaka Urara, Toyoda Kyosuke, Fukuda Takao, Takaharu Taketomi, Atomura Ryo, Nishimura Fusanori, Sprouty2 regulates degradation of EGF receptors in gingival epithelial cells.,2nd meeting of IADR-APR,2013.08.21.
4. Sanui Terukazu, Tanaka Urara, Toyoda Kyosuke, Fukuda Takao, Takaharu Taketomi, Atomura Ryo, Hamachi Takafumi, Maeda Katsumasa, Sprouty2 regulates osteoblastogenesis via Runx2 signaling.,91nd General Session & Exhibition of the IADR,2013.03.23.
5. Terukazu Sanui, Urara Tanaka, Kyosuke Toyoda, Takao Fukuda, Ryo Atomura, Takafumi Hamachi, and Katsumasa Maeda, Inhibition of Sprouty2 Polarizes Macrophages toward M2 Phenotype in Periodontitis, Kyudai Oral Bioscience 2013 -7th International Symposium -,2013.03.09.
6. 讚井彰一、田中麗、福田隆男、豊田敬介、後村亮、濱地貴文、前田勝正, bFGF シグナルのアンタゴニストを標的とした歯周組織再生療法の開発, 第 22 回日本歯科医学会総会, 2012.11.10.
7. Terukazu Sanui, Kyosuke Toyoda, Takao Fukuda, Urara Tanaka, Ryo Atomura, Takafumi Hamachi, Katsumasa Maeda, YB-1 regulates cell proliferation and differentiation in osteoblasts., 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, 2012.09.29.
8. T. SANUI, U. TANAKA, T. FUKUDA, K. TOYODA, T. TAKETOMI, R. ATOMURA, T. HAMACHI, and K. MAEDA, Periodontal Regenerative Effect by Inhibition of Sprouty2 Protein., Pan Europe Region / International Association for Dental Research (PER/IADR) Meeting, 2012.09.14.

〔図書〕(計 3件)

1. 讚井彰一、田中麗、豊田敬介、福田隆男、後村亮、濱地貴文、前田勝正「bFGF シグナルのアンタゴニストを標的とした歯周組織再生療法の開発」 歯界展望 特別号 2013

2. 福田 隆男, 田中 麗, 豊田 敬介, 讚井彰一, 武富 孝治, 後村 亮, 濱地 貴文, 前田 勝正, 西村 英紀 「Y-box 結合タンパク質の骨芽細胞における動態解析」 歯界展望 特別号 2013
3. 田中 麗, 豊田 敬介, 福田 隆男, 讚井彰一, 後村 亮, 濱地 貴文, 前田 勝正 「歯周組織細胞群における新規アメリロジェニン結合タンパク質のプロテオーム解析」 歯界展望 特別号 2013

〔その他〕

ホームページ等

九州大学研究者情報

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>

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>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

讚井 彰一 (SANUI TERUKAZU)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70507780