

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09578

研究課題名（和文）歯肉増殖症の病態解明～spock1による蓄積と分解抑制のシナジー効果の観点から

研究課題名（英文）The elucidation of the pathophysiology of gingival overgrowth.

研究代表者

山下 明子（Yamashita, Akiko）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70511319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、歯肉増殖症の発生・進展の機序を明らかにし、将来的な発症予防や治療法確立へ繋げることを目指すものであり、研究期間中に以下を明らかにした。カルシウム拮抗薬によって誘発された歯肉増殖症におけるSPOCK1、TGF- β 1、およびMMP-9の発現が、非増殖組織における発現よりも高いことを明らかにした。Spock1を過剰発現するトランスジェニックマウスは、明らかな歯肉増殖症と線維症の表現型を発症し、EMTの変化と正の相関があることを示した。さらにin vitroデータによってSPOCK1、TGF- β 1、およびMMP-9間の三方向の相互作用が歯肉増殖を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに癌領域におけるSPOCK1の機能に関しては、比較的多くの報告があるものの、非癌性疾患においてはほとんど報告されていなかった。本研究において、非癌性疾患におけるSPOCK1のアップレギュレーションと、歯肉増殖症におけるSPOCK1によって誘発されるEMTが、いくつかの潜在的なシグナル伝達経路間のクロストークを介して発生することを明らかにした点に意義がある。SPOCK1は歯肉増殖症の新しい治療標的となり得る可能性を示し、その発現は癌性病変におけるEMT誘導の潜在的なリスクであると考えられ、今後の癌領域研究においてメカニズム解明の一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：SPOCK1 is an extracellular proteoglycan that induces epithelial to mesenchymal transition (EMT) in several cancer cell lines and exhibits protease-inhibitory activity. However, the role of SPOCK1 in non-cancerous diseases such as DIGO has not been well-addressed. We demonstrated that the expression of SPOCK1, TGF- β 1, and MMP-9 in calcium channel blocker-induced gingival overgrowth is higher than that in non-overgrowth tissues. Transgenic mice overexpressing Spock1 developed obvious gingival-overgrowth and fibrosis phenotypes, and positively correlated with EMT-like changes. Furthermore, in vitro data indicated a tri-directional interaction between SPOCK1, TGF- β 1, and MMP-9 that led to gingival overgrowth. Our study shows that SPOCK1 up-regulation in a noncancerous disease and SPOCK1-induced EMT in gingival overgrowth occurs via cooperation and crosstalk between several potential signaling pathways.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯肉増殖症 SPOCK1

1. 研究開始当初の背景

ニフェジピンに代表されるカルシウム拮抗薬は、血管平滑筋のカルシウムチャネルの機能阻害により血管拡張作用を発揮させ収縮を抑制することを期待する薬剤であり、本邦における降圧薬として最も使用頻度が高い。近年、世界レベルで生活習慣や食生活の欧米化に伴う肥満や糖尿病患者の増加が著しい。さらに高齢化が重なり、高血圧の総患者数は増加することはあっても減少することはない。さらに本薬剤は高血圧症に対する治療としてのみだけでなく、将来的な心血管イベント発生を予防することを目的として用いられることも多い。以上の理由により処方を受ける患者数は急速に高まっている。

本薬剤の代表的な慢性副作用の一つが、薬剤性歯肉増殖症である。一般に本薬剤が歯肉増殖を引き起こす頻度は 20%強と報告されているが、仮に増殖が認められなくとも高度な線維化によって歯肉が硬化することは臨床的にしばしば経験する。すなわち、歯肉増殖症が問題となるのは単に審美的障害のみでなく、既存の歯周病を難治性にするためといえる。とりわけ、全身への影響が懸念される成人以降の患者で大きな問題となる。

申請者らは、歯肉増殖症はカテプシンの活性低下により病変が惹起される一種のライソゾーム蓄積病の一亜型であるとの仮説のもと検証を継続している。これまでにカテプシン-Lの活性が、薬物性歯肉増殖症の原因薬剤を作用させることで低下すること、カテプシン-L 遺伝子欠損マウスで歯肉増殖症に類似の歯肉病変が惹起され、その組織像がヒト歯肉増殖症のそれと酷似していることを報告した。また、先行研究においてカテプシン-L、カテプシン-Bを比較するとカテプシン-Lが、より強く歯肉増殖症に影響を及ぼす可能性があることを明らかにした。これを受けて、このカテプシン-L活性を抑制する働きをもち、近年発見された Spock1 に注目し、本分子を生体で過剰発現させることで、歯肉増殖が惹起されると仮定した。

2. 研究の目的

本研究は、歯肉増殖症の発生・進展の機序を明らかにし、将来的な発症予防や治療法確立へ繋げることを目的に計画した。Spock1 は近年発見された分子であり、細胞間、細胞と基質との相互作用に関与する。プロテアーゼ阻害作用を持ち、特にカテプシン-Lを強力に阻害する作用を有する (Bocock JP. et al., *Eur J Biochem.*, 2003) ことが報告されているが、機能の大部分は未だ不明である。また、これまでに Spock1 と歯肉増殖症の関連や、他の口腔疾患との関連を報告している研究成果はなく、カテプシンに加え抑制分子である本分子に着目した点に新規性や学術的独自性がある。歯肉増殖症の発症機序を間接的なカテプシン活性の低下に求めるという創造性に富む。Spock1 はプロテオグリカン的一种でもあることから、その発現亢進はカテプシン活性の低下に伴う基質分解能の低下に加え、基質の蓄積をも促進することで病変の確立に関与する可能性が考えられる。Spock1 による dual effect (蓄積と分解抑制のシナジー) であるとの仮説に基づく斬新な発想に創造性がある。

3. 研究の方法

各種歯肉線維芽細胞に歯肉増殖症誘導薬剤を添加した際に影響を受ける、基質合成・基質分解に関わる酵素遺伝子群を解析した。ヒト・マウスそれぞれの歯肉線維芽細胞を培養し、歯肉増殖症発生の副作用をもつ代表的な薬剤である、シクロスポリン A、フェニトイン、ニフェジピンを作用させた。カテプシン-L、Spock1 の他、歯肉増殖への関与が示唆されている TGF- β 、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 などの分子動態を遺伝子レベル、タンパクレベルで解析した (リアルタイム PCR、ウェスタンブロットング)。TGF- β は Spock1 の上流分子であると報告されている (Li-Ching Fan. et al., *PLoS One*, 2016) が、詳細に関しては明らかになっていない。故に、pathway におけるシグナル伝達レベルについても詳細な解析を行った。各種薬剤刺激時間にタイムコースを設定し、経時的な変化に関しても観察した。

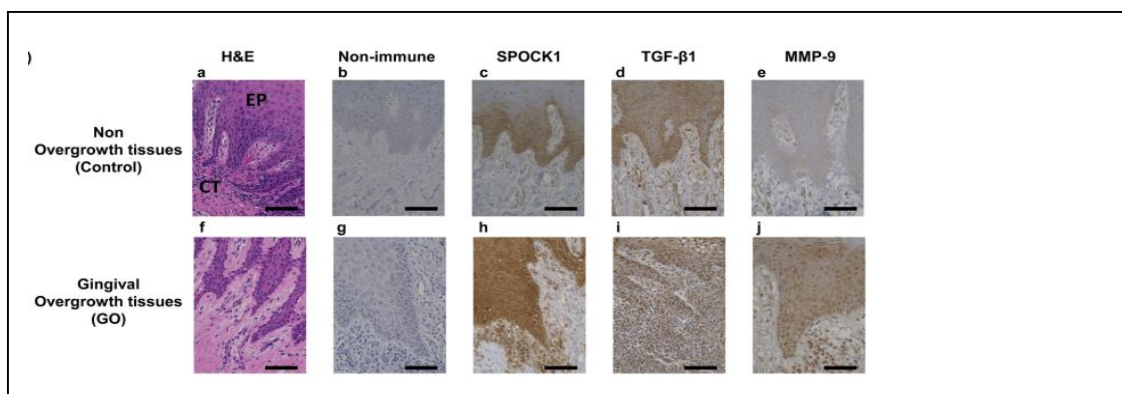
Spock1 過剰発現マウスにおける歯肉組織を観察し病変の有無を確認し、歯肉増殖症の発生メカニズムを解析した。Spock1 過剰発現マウスを用い、歯肉増殖が惹起されているかどうか口腔内の観察を行った。その後マウス下顎を分離する。実体顕微鏡で形態学的組織観察を行い、歯肉組織を 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した後、EDTA 脱灰を行った。その後パラフィン包埋、組織切片を作製、組織形態確認を実施した。マウス歯肉を採取し、Spock1 やカテプシン-L 等の遺伝子レベル、タンパクレベルでの発現確認を行った。

Spock1 過剰発現マウス歯肉の組織切片を用いて、歯肉や角化上皮に存在するプロテオグリカン、フィブロネクチンやコラーゲンなどの免疫染色を行い、基質の細胞内外における蓄積を解析した。さらに Spock1 過剰発現マウス歯周組織をホモジナイズし、基質タンパクをウェスタンブロットング解析し、大型分子としての基質の分解の程度を明らかにした。

4. 研究成果

(1) カルシウム拮抗薬であるニフェジピン(NFD)誘導性ヒト歯肉増殖症の組織中の SPOCK1, TGF- β 1, MMP-9 の発現レベル

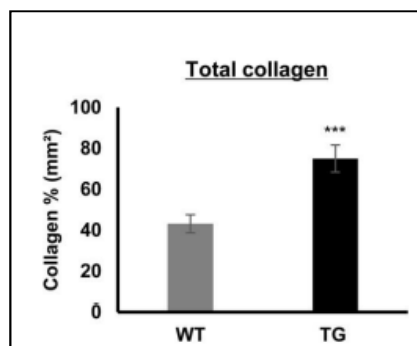
NFD 誘導性ヒト歯肉増殖組織の Spock1, TGF- β 1, MMP-9 は通常歯肉組織と比較して有意に mRNA 発現、タンパク産生量が亢進することが示された。免疫組織化学(IHC)と免疫染色(IF)解析した結果、Spock1 は歯肉増殖組織の上皮組織、特に基底層に強く発現したが、結合組織では、発現が少なかった。一方、TGF- β 1 は通常歯肉組織の結合組織と比較して、NFD 誘導性歯肉増殖組織の結合組織で強い発現があった。さらに MMP-9 は歯肉増殖組織では結合組織より上皮組織において多く発現したが、通常歯肉組織では、発現をほとんど確認できなかった。



(2) Spock1 過剰発現マウスの歯肉結合組織内の組織学的解析

Spock1 過剰発現 (TG)マウスの歯肉結合組織内においてコラーゲンの蓄積と上皮脚進展を伴う増殖を示し、コラーゲンIV発現減少がみられる組織切片においての複数個所での基底膜の欠落が観察された。

TG マウスでは野生型 (WT)マウスと比較して、下顎臼歯部付近に明らかな歯肉増殖があった。WT マウスと比較してTG マウスにおいてHE 染色で結合組織内への上皮脚の進展があり、コラーゲン線維が密に配置されていることが示された。Masson Trichrome 染色の結果、コラーゲンは、TG マウスにおいて歯肉、特に上皮結合組織で有意に多量に存在していた。



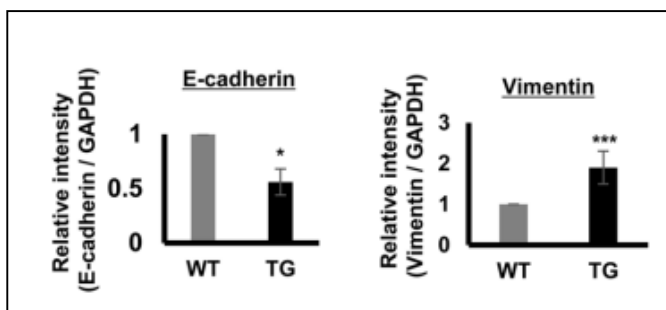
上皮間葉転換 (EMT)の過程において、基底膜の分解は

不可欠であるが、WT マウスにおいて歯肉基底膜は均一な形状、TG マウスにおいては複数個所の基底膜の欠損が観察された。コラーゲンIVはTG マウス歯肉組織の基底膜で一部弱い発現あるいは発現が観察されなかったが、WT マウスの基底膜では連続的に発現した。

(3) TG マウスの歯肉における組織学および分子レベルでの EMT 様の変化

EMT 過程に関連する分子である

E-cadherin, α E-catenin, vimentin のタンパク発現を、マウス歯肉組織で解析した。TG マウスの歯肉では、WT マウスの歯肉に比べ、上皮マーカーである E-cadherin の発現量が有意に低下し、間葉系マーカーの vimentin の発現量が有意に増加していた。IF 解析では、E-cadherin と α E-catenin は、WT マウス歯肉では主に上皮に局在していたが、TG マウス歯肉ではその発現量が低下していた。また、結合組織内の細胞や上皮基底層の一部の細胞では、vimentin が多く発現していた。PAS 染色により基底膜の破壊を検出し、コラーゲン IV の発現低下があったため、コラーゲン IV を含む基底膜の分解に関与する主要な酵素である MMP-9 と MMP-2 の発現を調べた。

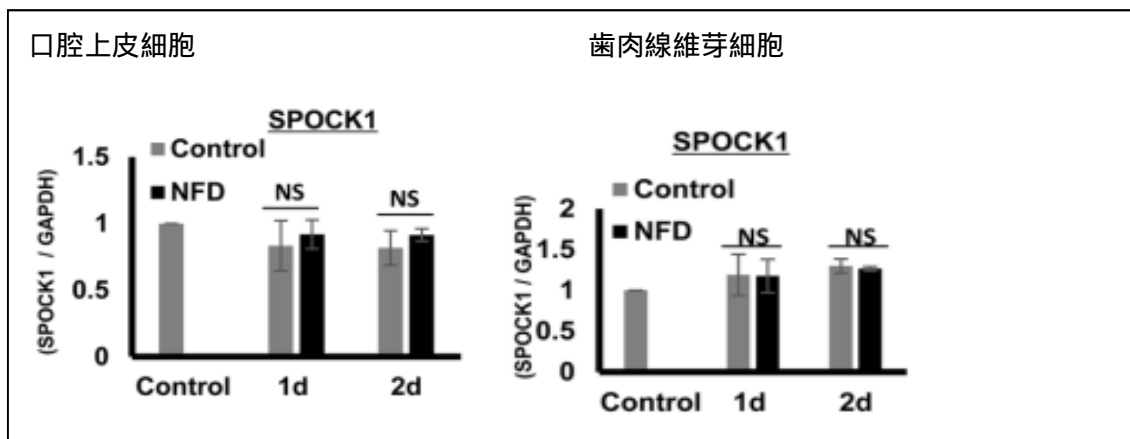


TG マウスの歯肉組織では、活性型 MMP-9 と MMP-2 の発現量が WT マウスに比べて増加していたが、これら 2 つの酵素前駆体には有意な差はなかった。TGF- β 1 は EMT の強力な誘導因子であり、その下流分子である CTGF は細胞外マトリックス産生の誘導因子である。両分子の活性型は、WT マウスと比較して TG マウス歯肉で有意に発現が増加した。E-cadherin 抑制に関わ

る転写因子 SLUG の発現を調べたところ、TG マウスの歯肉組織では WT マウスと比較して発現が上昇した。

(4) ヒト口腔上皮細胞・歯肉線維芽細胞における Spock1、TGF-β1 および MMP-9 の発現量に対する NFD の影響

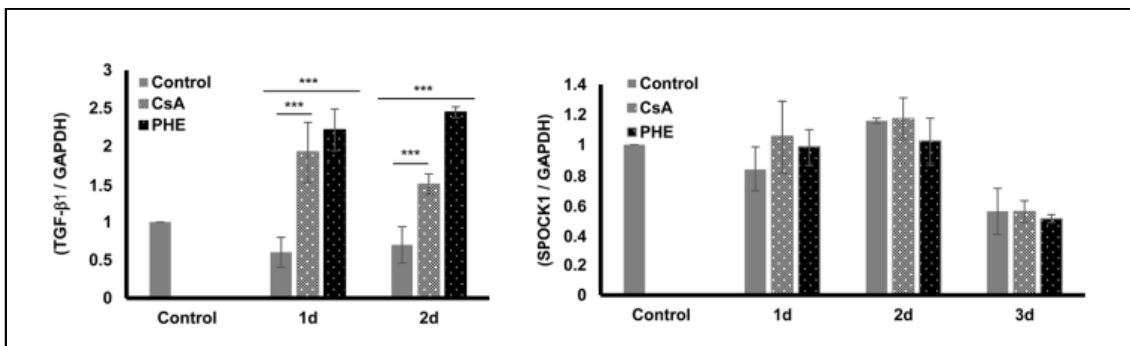
NFD 誘導性歯肉増殖症の患者の組織切片では、Spock1、TGF-β1、MMP-9 の発現量の増加は、上皮、結合組織のいずれか、または両方で検出された。そこで、NFD がこれらの分子に対して同様の影響を及ぼすかどうかを検討した。ヒト口腔上皮細胞 (MOE1a) とヒト primary 歯肉線維芽細胞 (HGF) を NFD で約 2 日間刺激した結果、SPOCK1 の mRNA およびタンパク発現量に有意な差はなかった。MOE1a では latent TGF-β1 の mRNA およびタンパクの発現量には有意な差はなかったが、HGF では NFD 刺激 2 日目に mRNA とタンパクの発現量が無刺激群と比較して有意に増加した。MOE1a では刺激後 3 日目に活性型 MMP-9 の mRNA およびタンパク発現量が有意に上昇したが、HGF 細胞では活性型 MMP-9 の mRNA およびタンパク発現量に無刺激群との有意差はなかった。



(5) HGF におけるサイクロスポリン (CsA) とフェニトイン (PHE) の TGF-β1 および Spock1 発現に対する影響

上皮細胞において、TGF-β1 は EMT の強力な誘導因子である。MOE1a で TGF-β1 刺激群では未刺激群と比較して、E-cadherin mRNA の発現は有意に抑制し、vimentin, MMP-2, MMP-9, SLUG の発現は有意に亢進した。NFD は HGF の latent TGF-β1 の発現を上昇させることが判明したため、歯肉増殖を誘導する薬剤として知られる CsA と PHE が TGF-β1 の発現に同様の影響を与えるかどうかを検討した。HGF を 200ng/mL CsA および 20μg/mL PHE で 1 日および 2 日間刺激した結果、両条件刺激によって latent TGF-β1 mRNA とタンパクレベルが未刺激群と比較して有意に発現亢進した。

HGF を NFD で刺激した場合、Spock1 の発現に直接的な影響は見られなかったことから、HGF を CsA や PHE で刺激した場合にも、同様の結果が得られるかを検討した。そこで、Spock1 の遺伝子とその発現を調べ、これらの薬物によって Spock1 発現量が変化しないことが示された。

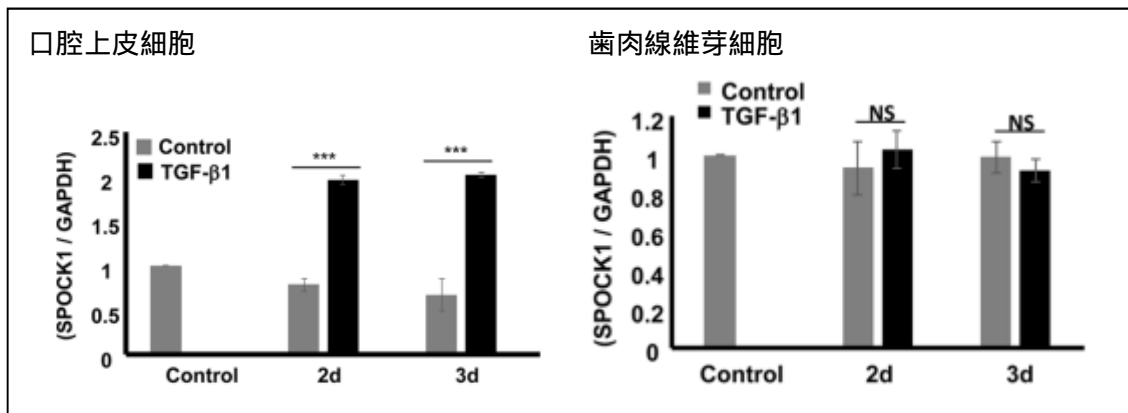


(6) ヒト口腔上皮細胞・歯肉線維芽細胞に対する TGF-β1 の影響

NFD 誘導性歯肉増殖組織では SPOCK1 の発現が増加していたが、*in vitro* では NFD、CsA、PHE は Spock1 の発現に直接的な影響を与えなかった。したがって、これらの薬剤が Spock1 の発現に間接的な影響を及ぼしていると考えた。

Spock1 は TGF-β1 の下流ターゲットであることから、MOE1a および primary HGF において

TGF- β 1 が Spock1 の発現に及ぼす影響について検討した。MOE1a では Spock1 の mRNA およびタンパク質レベルが有意に上昇していたが、HGF では Spock1 の mRNA 発現は亢進するが、タンパク発現量には影響がないことが示された。TGF- β 1 が Spock1 の遺伝子とタンパクの発現レベルを誘導することはよく知られているが、この効果はケラチノサイトにのみ限定されるようであった。



今回の *in vitro* および *in vivo* のデータから、Spock1 は翻訳制御経路とシグナル伝達経路の協調・クロストークを通じて、薬剤性歯肉増殖症の誘導に重要な役割を担っていることが強く示唆された。まず、Spock1 による SLUG 誘導が、E-cadherin の発現を抑制することで、細胞が移動性の表現型を獲得する主なスイッチとなる可能性がある。第二に、PI3K/AKT 経路の誘導は、上皮細胞において抗アポトーシス効果を持つだけでなく SLUG などの転写因子の発現を上昇させることにより、EMT の過程を誘導する。第三に、TGF- β 1 経路の誘導とそれに続く Connective tissue growth factor の産生は、結合組織内の細胞外基質 (ECM) 産生を増加させる。第四に、結合組織内の Spock1 は、カテプシン L などのプロテアーゼに対してプロテアーゼ阻害効果を発揮し、結合組織内の ECM 分解を抑制している可能性がある。

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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 林大翔、岩下未咲、西村優輝、新城尊徳、瀬々起朗、佐野朋美、山下明子、西村英紀 |
| 2. 発表標題 脂肪細胞CCL19が脂肪組織炎症および脂質代謝に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第63回春季歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西村優輝、岩下未咲、林大翔、新城尊徳、佐野朋美、山下明子、西村英紀 |
| 2. 発表標題 膵細胞Xaf1が膵島機能および糖尿病発症に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会春季学術大会 |
| 4. 発表年 2020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 SPOCK1 is a novel epithelial mesenchymal transition (EMT) inducer in calcium channel blocker-induced gingival overgrowth. |
| 3. 学会等名 2019 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center Joint International Symposium |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 眞田大樹、佐野朋美、松永紘明、岩下未咲、山下明子、Rehab Alshargabi、兼松隆、西村英紀 |
| 2. 発表標題 脂肪・歯周組織で発現誘導されるmiRNAによる抗炎症効果の検討 |
| 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 Rehab Alshargabi, Tomomi Sano, Akiko Yamashita, Taiki Sanada, Takao Fukuda, Misaki Iwashita, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura |
| 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 林大翔、岩下未咲、西村優輝、佐野朋美、山下明子、西村英紀 |
| 2. 発表標題 脂肪細胞に発現するCCL19が脂肪組織炎症および代謝制御に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sano T, Sanada T, Rehab A, Sotomaru Y, Iwashita M, Yamashita A, Nishimura F |
| 2. 発表標題 identification of micro RNAs involved in adipose tissue inflammation. |
| 3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting. |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 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 induces 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 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回秋季日本歯科保存学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018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 | 西村 英紀 | 九州大学・歯学研究院・教授 | |
| | (Nishimura Fusanori) | | |
| | (80208222) | (17102) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 岩下 未咲 (Iwashita Misaki) (80611326) | 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 |
|---------|---------|
| | |