

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463136

研究課題名(和文) M2マクロファージ転換技術を応用した新規歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) The effects of Spry2 on the differentiation of Pg LPS-stimulated macrophages.

研究代表者

讃井 彰一 (Terukazu, Sanui)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：通常、マクロファージは歯周病細菌である*P. gingivalis*のLPSとIFN- γ で刺激するとM1(炎症性)細胞の表現型を示すが、Spry2の抑制により、低分子量Gタンパク質Rac1の活性化を介してefferocytosis(アポトーシス細胞の認識と除去)が促進され、IL-10やbFGF, EGF, VEGF, PDGF等の成長因子を産生するM2(抗炎症性)細胞型に分化誘導されること、さらに、PI3K, AKTの活性化を介してI κ Bの分解とNF- κ Bの活性化が抑制されることにより、M1細胞型への分化が抑制されることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a chronic inflammatory disorder caused by specific bacteria residing in the biofilm, particularly *P. gingivalis* (Pg). In this study, we investigated the mechanisms through which Spry2 depletion by IFN γ and Pg LPS stimulation affected the physiology of macrophages in vitro. Transfection of macrophages with Spry2 siRNA promoted the expression of genes characteristic of M2 macrophages, IL-10 expression, and enhanced arginase activity, even in cells stimulated with IFN γ and Pg LPS. In addition, we found that PI3K and AKT activation by Spry2 downregulation enhanced efferocytosis of apoptotic cells by increasing Rac1 activation and decreasing NF κ B p65 phosphorylation. Collectively, our results suggested that topical administration of Spry2 inhibitors may efficiently resolve inflammation in periodontal disease as macrophage-based anti-inflammatory immunotherapy and may create a suitable environment for periodontal wound healing.

研究分野：歯周病学

キーワード：Spry2 M2 macrophage efferocytosis *P. gingivalis* LPS IFN- γ periodontal regeneration

1. 研究開始当初の背景

歯周病は複数の歯周病細菌によって惹起される慢性炎症で、歯槽骨など歯の支持組織の破壊により歯の喪失の原因となる疾患である。その炎症反応は好中球の流入により生体内の異物を排除する「初期過程」と、それに続くアポトーシス細胞や組織片を除去し組織を修復へと導く「収束過程」からなる。初期過程においては血管透過性亢進とそれに続く好中球の浸潤・活性化が起き、異物の迅速な除去が行われる。これに対して、収束過程においては好中球数が減少する一方でマクロファージの流入が増大し、損傷した組織片やアポトーシス好中球のクリアランスが起こる。また、初期過程では組織破壊を引き起こすM1(炎症性)マクロファージが主体となり、収束過程では組織修復を担うM2(抗炎症性)マクロファージが優位となる。すなわち、マクロファージは破壊と再生の両面に関与しており、炎症と組織再生のインターフェースにおいて重要な役割を担っている。

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(EGF)に対しては活性化を抑制しない。

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。私たちはこれまでの研究で、Spry2を抑制しbFGFとEGFの同時刺激を行うことで、歯肉上皮細胞の細胞増殖が抑制されるとともに、骨芽細胞の細胞増殖と骨分化が誘導され、さらに歯根膜細胞の細胞増殖と細胞遊走が亢進することを報告した。すなわち、歯周炎による歯槽骨吸収部位に対してSpry2阻害剤、bFGFとEGFを併用すると歯肉上皮のダウングロースが妨げられ、GTR法のように物理

的なバリアを用いることなく生物学的に再生の空間が確保されると同時に、歯槽骨の造成および歯根膜のアンキローシスを防ぎながらの根面遊走が誘導される可能性があることから、Spry2は新たな歯周組織再生療法を確立する上で標的分子となる可能性を見出した。

しかしながら、歯周組織の再生が開始されるためには炎症状態の収束が不可欠である。一方、M2マクロファージは組織修復において重要な役割を担っていることが知られている。本研究では、Spry2が炎症と再生を制御するマクロファージに及ぼす影響について、マウスマクロファージ様細胞株J774.1細胞を用いて、*in vitro*における検討を行った。

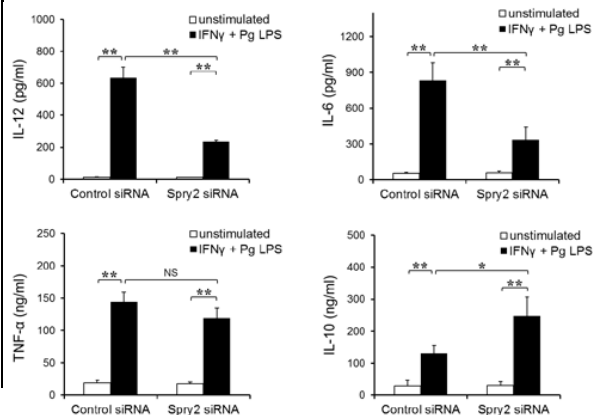
3. 研究の方法

マウスマクロファージ様細胞株J774.1細胞にSpry2のsiRNAを導入した。マクロファージを*P. gingivalis*のLPSとIFN- γ 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ング法により解析した。また、Spry2がマクロファージの細胞機能に及ぼす影響について検証した。

4. 研究成果

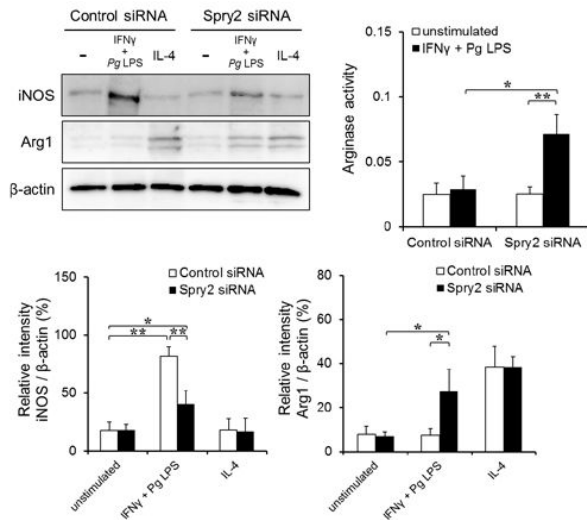
Spry2抑制による炎症性、抗炎症性サイトカインの産生量への影響

次に、J774.1細胞にSpry2 siRNAを導入しIFN- γ + *Pg* LPS刺激を行った場合の、炎症性サイトカインであるIL-12、IL-6および抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生量への影響について検討した。Spry2 siRNA群ではControl siRNA群よりもIL-12、IL-6の産生量は有意に減少し、IL-10の産生量は有意に増加した。



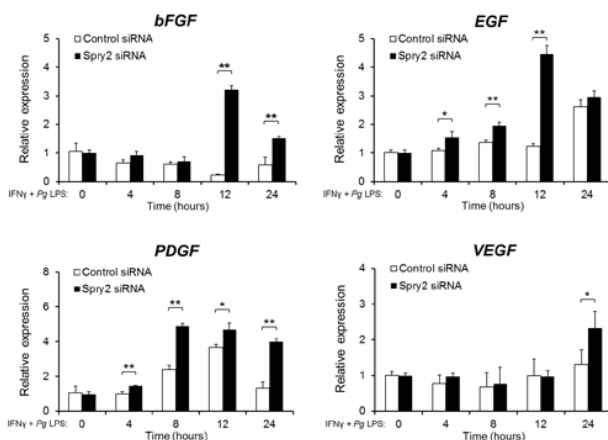
Spry2 抑制による iNOS、Arg1 のタンパク質発現への影響

続いて、J774.1 細胞に Spry2 siRNA を導入し IFN + Pg LPS 刺激を行った場合の、iNOS と M2 マーカーである Arg1 のタンパク質発現への影響について検討した。Spry2 siRNA 群では Control siRNA 群よりも iNOS のタンパク質発現は有意に抑制されたが、Arg1 のタンパク質発現は有意に亢進した。



Spry2 抑制による増殖因子の mRNA 発現への影響

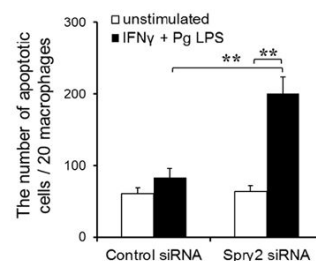
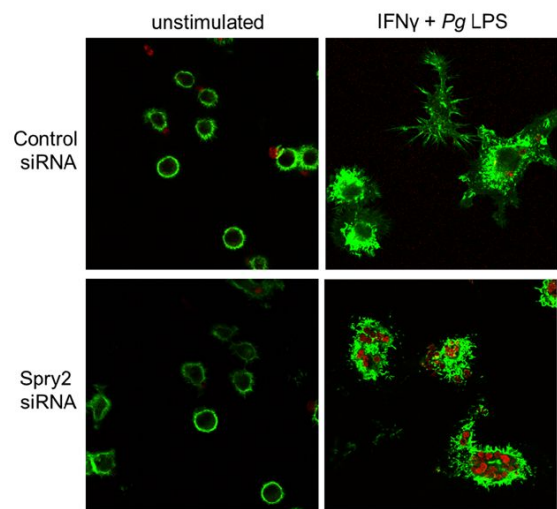
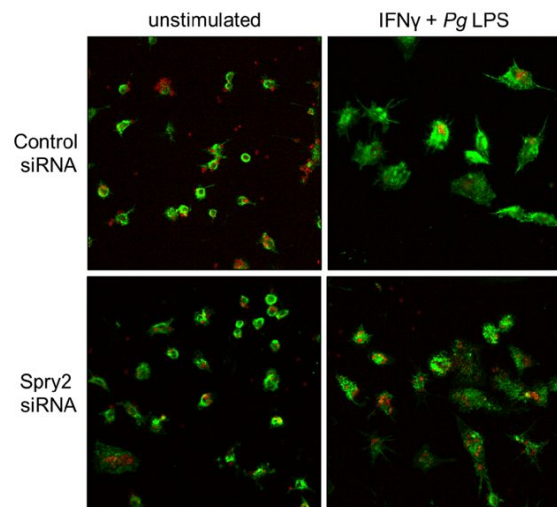
M2 マクロファージは増殖因子を産生する (Lamagna *et al.*, 2006)。そこで、J774.1 細胞に Spry2 siRNA を導入し IFN + Pg LPS 刺激を行った場合の、増殖因子である bFGF、EGF、PDGF、VEGF の mRNA 発現への影響について検討した。Spry2 siRNA 群では Control siRNA 群よりも bFGF、EGF、PDGF、VEGF の mRNA 発現が有意に上昇した。したがって、J774.1 細胞に Spry2 siRNA を導入し IFN + Pg LPS 刺激を行うと、M1 型に分化せず M2 型に分化



誘導される可能性が示唆された。

Spry2 抑制による efferocytosis への影響

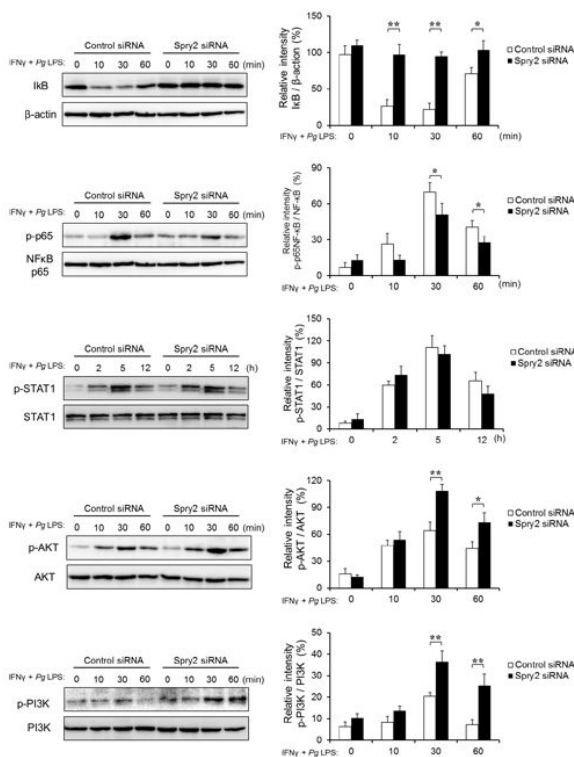
続いて、Spry2 抑制マクロファージに IFN + Pg LPS 刺激を行うと M2 型に分化誘導されるメカニズムを解析することとした。マクロファージがアポトーシス細胞を認識し、速やかに貪食・除去するプロセスを efferocytosis という。さまざまな病態において死細胞は生成されるが、マクロファージは efferocytosis によりアポトーシス細胞表面のホスファチジルセリン (eat me signal) を認識し、死細胞からの炎症性サイ



トカインの放出を防いでいる。アポトーシス細胞が細胞内に取り込まれると、arginaseの発現上昇、抗炎症性サイトカインの産生が誘導される (Ravichandran, 2010; Korn *et al.*, 2011)。そこで、J774.1細胞に Spry2 siRNAを導入し IFN + Pg LPS 刺激を行った場合の、efferocytosis への影響について共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。Spry2 siRNA 群では Control siRNA 群よりも efferocytosis の促進が確認された。

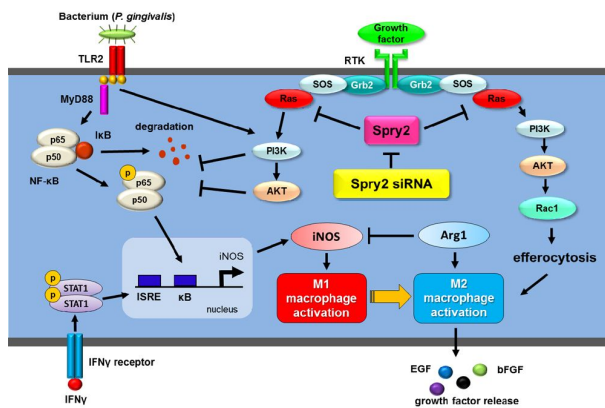
Spry2 抑制による PI3K、AKT の活性への影響

さらに、Spry2 抑制が I B の分解と NF- B p65 の活性を抑制するメカニズムを解明することとした。マクロファージにおける M1 型、M2 型への分化のシグナルにはさまざまなクロストークが存在する。PI3K、AKT は、増殖因子が RTK に結合することにより活性化するシグナル伝達分子であり、LPS により誘導される NF- B シグナルをクロストークにより抑制し、結果的に炎症性サイトカイン、NO の産生が減少するという報告がある (Liu *et al.*, 2013)。そこで、J774.1細胞に Spry2 siRNA を導入し IFN + Pg LPS 刺激を行った場合の、PI3K、AKT の活性への影響について検討した。Spry2 siRNA 群では Control siRNA 群よりも PI3K、AKT の活性は有意に亢進した。



Spry2 抑制による M1 分化の抑制および M2 分化の促進のモデル

Pg LPS および IFN がそれぞれの受容体に結合し、シグナル伝達経路が活性化されると、Spry2 の抑制は PI3K/AKT シグナルを構成するさまざまな分子を活性化させる。Spry2 抑制は増殖因子により誘導される Rac1 の活性を亢進させる。Spry2 抑制は M2 分化を促進させる efferocytosis を誘導する。Pg LPS 刺激は I B の分解と NF- B p65 のリン酸化を誘導する。リン酸化を受けた NF- B p65 が核移行して B に結合することにより転写が活性化される。一方、IFN 刺激は STAT1 をリン酸化させる。リン酸化を受けた STAT1 が核移行して ISRE に結合することにより転写活性化が行われる。これらの刺激はともに、iNOS の発現を亢進させ、M1 型への分化を誘導する。Spry2 抑制による PI3K、AKT の活性化は I B の分解と NF- B p65 のリン酸化を阻害し、



結果的に M1 型への分化を抑制する。

結論として、本研究より J774.1細胞に対して Spry2 siRNA を導入し IFN + Pg LPS 刺激を行うと、M1 型ではなく M2 型に分化誘導されることが判明した。臨床応用として、歯周炎による歯槽骨吸収部位に対してデブリドメントを行い、炎症性物質を可及的に減少させた後に Spry2 阻害剤を使用すると、M2 マクロファージへの分化誘導を経て、残存した炎症の抑制・創傷治癒が誘導されることにより歯周組織が効率的に再生される可能性が期待される。

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 17 件)

1. **Sanui T**, Takeshita M, **Fukuda T**, Tanaka U, Alshagabi R, Aida Y, **Nishimura F**. (2017), Adhesion attenuates respiratory burst induced by different modes of triggering in resting or LPS-primed neutrophils. *Immunobiology*, in press.
2. **Sanui T***, **Fukuda T**, Yamamichi K, Toyoda K, Tanaka U, Yotsumoto K, **Taketomi T**, **Nishimura F**. (2017), Microarray analysis of the effects of amelogenin on U937 monocytic cells. *American Journal of Molecular Biology*, 7(2): 107-122.
3. **Nishimura F**, Sano T, **Sanui T**. (2017), The influence of periodontal burden on metabolic control of diabetes - Myth or reality? From a nutritional perspective - *Current Oral Health Reports*, 4: 59-63.
4. Takano A, **Fukuda T**, Shinjo T, Iwashita M, Matsuzaki E, Yamamichi K, Takeshita M, **Sanui T**, **Nishimura F**. (2017), Angiopoietin-like protein 2 is a positive regulator of osteoblast differentiation. *Metabolism*, 69: 157-170.
5. Nozoe K, **Sanui T**, Takeshita M, **Fukuda T**, Haraguchi A, Aida Y, **Nishimura F**. (2017), Innate immune-stimulatory activity of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae is eliminated by phase separation using Triton X-114. *Journal of Immunological Methods*, 441: 31-38.
6. Sano T, Nagayasu S, Suzuki S, Iwashita M, Yamashita A, Shinjo T, **Sanui T**, Kushiya A, Kanematsu T, Asano T, **Nishimura F**. (2016), Epicatechin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease*, 27(3): 249-259.
7. **Sanui T**, Takeshita M, **Fukuda T**, Haraguchi A, Aida Y, **Nishimura F**. (2016), Anti-CD14 antibody-treated neutrophils respond to LPS: Possible involvement of CD14 upregulated by anti-CD14 antibody binding. *Immunological Investigations*, 46(2): 190-200.
8. Takeshita M, Haraguchi A, Miura M, Hamachi T, **Fukuda T**, **Sanui T**, Takano A, **Nishimura F**. (2017), Antibiotic effects against periodontal bacteria in organ cultured tissue. *Clinical and Experimental Dental Research*, 3(1): 5-12.
9. **Sanui T***, **Fukuda T**, Tanaka U, Toyoda K, Yamamichi K, **Taketomi T**, **Nishimura F**. (2016) Biological effects of Sprouty2 inhibition in periodontal ligament cells. *Journal of Cell Signaling*, 1: 117. doi:10.4172/jcs.1000117.
10. Shinjo T, Iwashita M, Yamashita A, Sano T, Tsuruta M, Matsunaga H, **Sanui T**, Asano T, **Nishimura F**. (2016), IL-17A synergistically enhances TNF α -induced IL-6 and CCL20 production in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 477(2): 241-246. 2016.06.049.
11. Nozoe K, Aida Y, **Fukuda T**, **Sanui T**, **Nishimura F**. (2016), Mechanisms of the macrolide-induced inhibition of superoxide generation by neutrophils. *Inflammation*, 39(3): 1039-1048.
12. Komatsu T, Aida Y, **Fukuda T**, **Sanui T**, Hiratsuka S, Pabst M, **Nishimura F**. (2016), Disaggregation of Lipopolysaccharide by Albumin, Hemoglobin, or High Density Lipoprotein, Forming Complexes that Prime Neutrophils for Enhanced Release of Superoxide. *Pathogens and Disease*, 74(3): pii: ftw003.
13. Atomura R, **Sanui T***, **Fukuda T**, Tanaka U, Toyoda K, **Taketomi T**, Yamamichi K, Akiyama H, **Nishimura F**. (2016), Inhibition of Sprouty2 polarizes macrophages toward an M2 phenotype by stimulation with interferon γ and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Immunity, Inflammation and Disease*, 4(1): 98-110.
14. Toyoda K, **Fukuda T**, **Sanui T***, Tanaka U, Yamamichi K, Atomura R, Maeda H, Tomokiyo A, **Taketomi T**, Uchiumi T, **Nishimura F**. (2016), Grp78 is critical for amelogenin-induced cell migration in a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. *Journal of Cellular Physiology*, 231:414-427.
15. Tanaka U, **Sanui T***, **Fukuda T**, Toyoda K, **Taketomi T**, Atomura R, Yamamichi K, Maeda H, **Nishimura F**. (2015), Sprouty2 inhibition promotes proliferation and migration of periodontal ligament cells. *Oral Diseases*, 21:977-986.
16. **Sanui T***, **Fukuda T**, Tanaka U, Toyoda K, **Taketomi T**, **Nishimura F** (2015), Spry2 is a novel therapeutic target for periodontal tissue regeneration through fibroblast growth factor

receptor signaling and epidermal growth factor signaling. *Receptors and Clinical Investigation*, 2: e597.

17. Sanui T*, Tanaka U, Fukuda T, Toyoda K, Taketomi T, Atomura R, Yamamichi K, Nishimura F. (2015), Mutation of Spry2 induces proliferation and differentiation of osteoblasts but inhibits proliferation of gingival epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116: 628-639.

〔学会発表〕(計30件)(招待講演1件)
(うち筆頭演者4件)

1. 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. (2017.05.13. 福岡市) 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. 第60回春季日本歯周病学会学術大会.
2. Terukazu Sanui, Hajime Akiyama, Takao Fukuda, Urara Tanaka, Kyosuke Toyoda, Takaharu Taketomi, Fusanori Nishimura: Spry2 Downregulation Shifts Macrophages Toward an M2 Phenotype by Stimulation with Interferon and *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide. 94th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Seoul, South Korea, 2016. 6. 22-25.
3. Terukazu Sanui: Spry2 is a new therapeutic target for periodontal tissue regeneration. The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2015. 10. 30、福岡
4. Sanui T, Toyoda K, Tanaka U, Atomura R, Fukuda T, Yamamichi K, Nishimura F. Tyrosine 55 Mutation of Spry2 Induces Proliferation and Differentiation of Osteoblasts through bFGF and EGF Stimulation but Inhibits Proliferation of Gingival Epithelial Cells: Implications for Novel Biological Approach to Periodontal Regeneration. 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Osaka, 2014. 12. 4-5.

〔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

讃井 彰一 (SANUI TERUKAZU)

九州大学病院・講師

研究者番号：70507780

(2) 研究分担者

福田 隆男 (FUKUDA TAKAO)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：80507781

(3) 研究分担者

西村 英紀 (NISHIMURA FUSAMORI)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：80208222

(4) 研究分担者

武富 孝治 (TAKETOMI TAKAHARU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10553290