

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893196

研究課題名(和文) 歯根膜遊走の誘導技術を応用した次世代歯周組織再生治療法の構築

研究課題名(英文) Periodontal regenerative effects by inhibition of Sprouty2 protein in periodontal ligament cells

研究代表者

田中 麗 (Tanaka, Urara)

九州大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50734993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Spry2siRNAを導入した1-17細胞にbFGF+EGF刺激を加えたところ、対照群と比べて有意に細胞増殖が亢進した。一方、Col1、ALP、BSP、Runx2のmRNA発現が著しく減少したため、ALP活性への影響を検討したところ、ALP活性は対照群に比べて有意に減少した。次に、Spry2の抑制が歯根膜細胞の遊走にどう影響するのかを検討したところ、対照群と比べて有意に細胞遊走が亢進した。また、Spry2siRNA細胞は対照群と比べて有意にRac1の活性化、AKT/PI3Kのリン酸化が亢進されていた。さらに、Fアクチンを蛍光染色してみるとアクチンの集積とラメリポディア形成の促進が確認された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated how Spry2 inhibition affects the cellular physiology of periodontal ligament (PDL) cells. ERK1/2 activation and proliferation of 1-17 PDL cells were significantly upregulated by the addition of Spry2 siRNA in the presence of bFGF and EGF. In addition, Spry2 siRNA reduced transcription of osteogenesis-related genes and ALP staining relative to control cells. Furthermore, it increased AKT/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) phosphorylation; consequently, Rac1 but not Cdc42 was activated, thereby promoting lamellipodia formation, cell proliferation, and migration after stimulation by bFGF and EGF. In conclusion, Spry2 combined with bFGF and EGF stimulation reduced PDL cell migration and proliferation with inducing osteoblastic differentiation. These in vitro findings may provide a molecular basis for novel therapeutic approaches for establishing periodontal tissue regeneration.

研究分野：periodontology

キーワード：Spry2 proliferation migration bFGF EGF periodontal regeneration

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病菌の感染で惹起される感染症であり、結果的に歯周組織が炎症的に破壊される。歯周治療の原則は、原因となる細菌バイオフィーム、壊死性セメント質の除去であるが、一旦進行した歯周病では失われたセメント質、歯槽骨の再生は起こらないため、歯周再生療法が行われる。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(Kitamura *et al.* 2008)。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。そのため、新しい歯周再生療法として、歯肉上皮、骨組織、歯根膜組織の細胞増殖、分化、遊走等をバランスよく調整し、広く適応できる理想的な歯周組織再生法の確立が期待されている。

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 Spry2 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) による活性化は抑制しない。(J. Biol. Chem. (2001) 276: 36804) しかしながら、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

Spry2 抑制による歯根膜細胞の遊走能亢進の機序をシグナル経路の観点から深く追求し、そのメカニズムを明らかにすると共に、最も効果的かつ安全性の高い Spry2 阻害法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、Spry2 阻害剤を局所適

用することで、歯周組織再生の起点となる歯根膜の遊走が誘導される新しい歯周組織再生治療法を開発し、その有用性を確立したいと考えている。

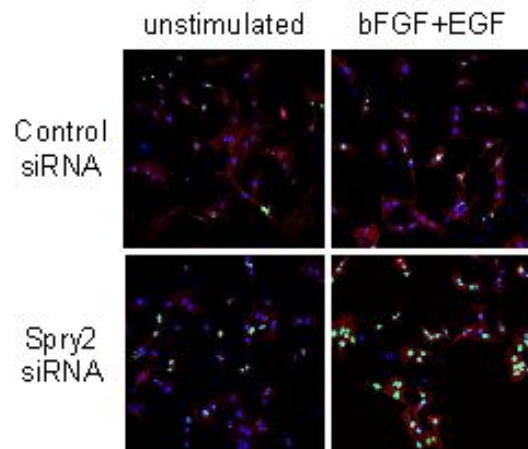
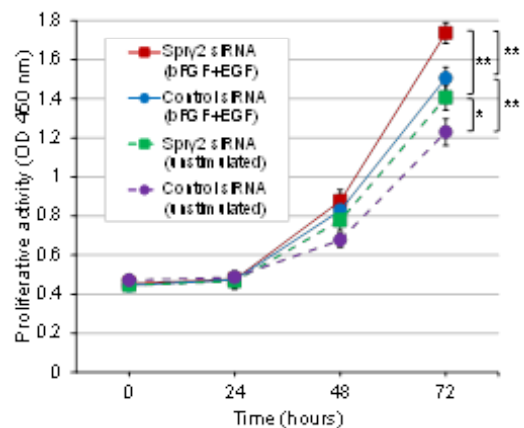
## 3. 研究の方法

ヒト歯根膜細胞株 1-17 細胞に Spry2 の siRNA を導入し、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、Spry2 が歯根膜細胞の機能に及ぼす影響について検証した。

## 4. 研究成果

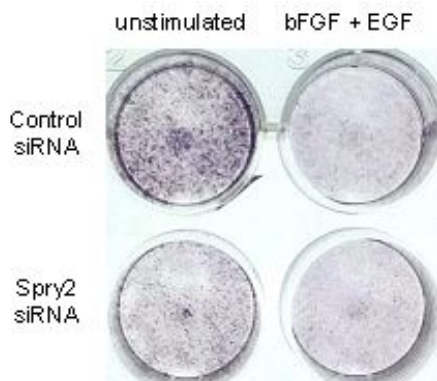
### Spry2siRNA 導入歯根膜細胞の細胞増殖に与える影響

Spry2 の抑制が歯根膜細胞の増殖にどう影響するのかを 1-17 細胞を用いて検討した。Spry2siRNA を導入した 1-17 細胞に bFGF + EGF 刺激を加えて、WST-8 アッセイおよび Ki67 アッセイを行ったところ、control と比べて有意に細胞増殖が亢進した。(図参照)



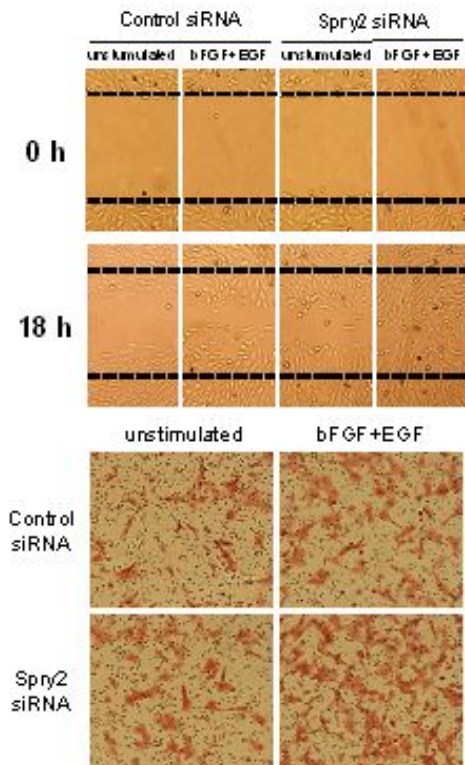
### Spry2siRNA 導入歯根膜細胞の骨芽細胞分化マーカーと ALP 活性への影響

Spry2 の siRNA を導入した 1-17 細胞に bFGF + EGF 刺激を加えると、CoI1、ALP、BSP、Runx2 の mRNA 発現が著しく減少したため、bFGF + EGF 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、Spry2 の siRNA を導入した 1-17 細胞に bFGF + EGF 刺激を行うと、ALP 活性は control に比べて有意に減少した。(図参照)



### Spry2siRNA 導入歯根膜細胞の細胞遊走に与える影響

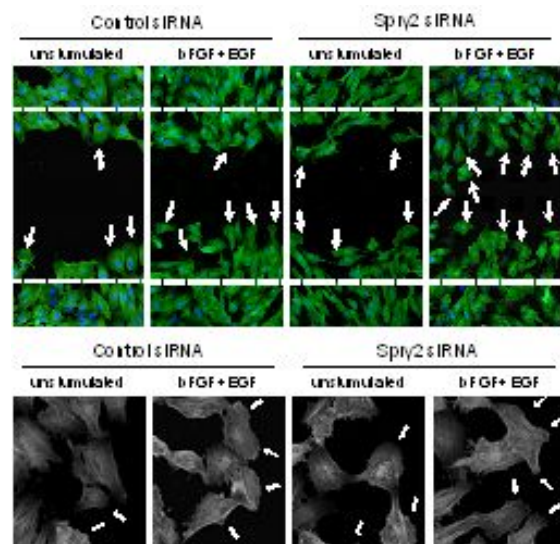
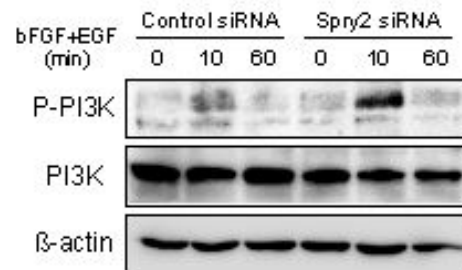
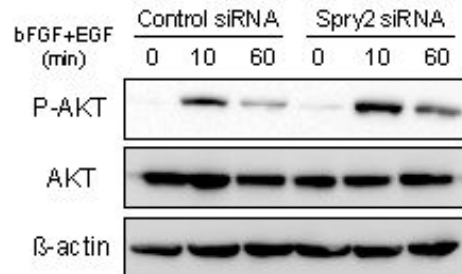
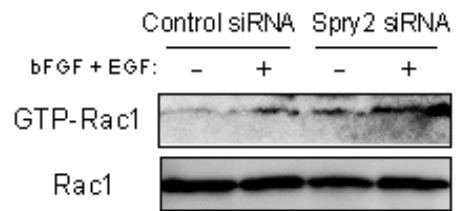
次に、Spry2 の抑制が歯根膜細胞の遊走にどう影響するのかをトランスウェルと Boyden chamber を使用して検討した。その結果、control と比べて有意に細胞遊走が亢進した。(図参照)



### Spry2siRNA 導入歯根膜細胞の細胞遊走における分子機構の解明

Spry2siRNA を導入した 1-17 細胞が bFGF + EGF 刺激で細胞遊走が亢進するメカニズムを解明するためにウェスタンブロッティング法を行ったところ、control と比べて有意に Rac1 の活性化、AKT/PI3K のリン酸化が亢進されていた。さらに、F アクチンを蛍光染色してみるとアクチンの集積とラメリポディア形成の促進が確認された。

(図参照)



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5件)

1. Sanui T, Fukuda T, Tanaka U, Toyoda K, Taketomi T, Nishimura F. 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* 2015; 2: e597.
2. Sanui T, Tanaka U, Fukuda T, Toyoda K, Taketomi T, Atomura R, 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. *Journal of Cellular Biochemistry* 2015; 116: 628-639.
3. Tanaka U, Sanui T, Fukuda T, Toyoda K, Atomura R, Yamamichi K, Maeda H, Nishimura F: Sprouty2 inhibition promotes proliferation and migration of periodontal ligament cells. *Oral Diseases* 2015; 21: 977-986.
4. Toyoda K, Fukuda T, Sanui T, Tanaka U, Yamamichi K, Atomura R, Maeda H, Tomokiyo A, Taketomi T, Uchiumi T, Nishimura F: Grp78 is critical for amelogenin-induced cell migration in a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. *Journal of Cellular Physiology* 2015; 231: 414-427.
5. Atomura R, Sanui T, Fukuda T, Tanaka U, Toyoda K, Taketomi T, Yamamichi K, Akiyama H, Nishimura F: Inhibition of Sprouty2 polarizes macrophages toward an M2 phenotype by stimulation with interferon and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Immunity, Inflammation and Disease* 2016; 4(1): 98-110.

〔学会発表〕(計16件)

1. 田中麗、豊田敬介、讃井彰一、福田隆男、後村亮、山道研介、西村英紀 Spry2 を標的とした歯周組織再生療法確立を目指す基礎研究 第57日本歯周病学会春季学術大会、長良川国際会議場、岐阜市、2014. 5. 22-24.
2. 豊田敬介、後村亮、福田隆男、讃井彰一、山道研介、田中麗、西村英紀 新規に同定したアメロジェニン会合分子GRP78がヒト歯根膜細胞機能に果たす役割の検討 第58日本歯周病学会秋季学術大会、神戸市国際展示場、神戸市、2014. 10.19.
3. 豊田敬介、後村亮、福田隆男、讃井彰一、山道研介、田中麗、西村英紀 アメロジェニンの生物学的活性の機序解明 平成26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、アクロス福岡、福岡市、2014.11.16.
4. Kyosuke Toyoda, Takao Fukuda, Ryo Atomura, Terukazu Sanui, Urara Tanaka, Takaharu Taketomi, Kensuke Yamamichi and Fusanori Nishimura Amelogenin induces cell migration via Grp78 in PDL cells. 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, KKR ホテル大阪、大阪市、2014. 12. 4-5.
5. Terukazu Sanui, Urara Tanaka, Kyosuke Toyoda, Ryo Atomura, Takao Fukuda, Takaharu Taketomi, Kensuke Yamamichi and Fusanori Nishimura 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, KKR ホテル大阪、大阪市、2014. 12. 4-5.
6. Urara Tanaka, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Kyosuke Toyoda, Ryo Atomura, Kensuke Yamamichi, and Fusanori Nishimura Sprouty2 Regulates Cell Proliferation and Migration in Periodontal Ligament Cells. 頭脳循環 Kick Off Symposium、2015年2月27日、福岡リーセントホテル、福岡市
  7. Kyosuke Toyoda, Takao Fukuda, Terukazu Sanui, Urara Tanaka, Ryo Atomura, Kensuke Yamamichi, and Fusanori Nishimura Grp78 is critical for amelogenin-induced cell migration in a human periodontal ligament stem/progenitor cell line. Kyudai Oral Bioscience (KOB) 2015、2015年2月28日、福岡リーセントホテル、福岡市
  8. T. Sanui, R. Atomura, U. Tanaka, T. Fukuda, K. Toyoda, K. Yamamichi, T. Taketomi, F. Nishimura The Effects of Spry2 in Osteoblasts and Gingival Epithelial Cells. 93rd General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research 2015年3月13日 Haynes Convention Center, Boston, USA
  9. Urara Tanaka, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Kyosuke Toyoda, Takaharu Taketomi, Ryo Atomura, Kensuke Yamamichi and Fusanori Nishimura Sprouty2 regulates cell proliferation and migration in periodontal ligament cells 93rd General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research 2015年3月13日 Haynes Convention Center, Boston, USA
  10. T. Fukuda, R. Atomura, T. Kyosuke, K. Yamamichi, U. Tanaka, T. Sanui, T. Taketomi, F. Nishimura Grp78 is Essential for Amelogenin-Induced Cell Migration in PDLSCs. 93rd General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research 2015年3月13日 Haynes Convention Center, Boston, USA
  11. 豊田敬介、福田隆男、讃井彰一、後村亮、山道研介、田中麗、西村英紀新規に同定したアメロジェニン会合蛋白 Grp78 がヒト歯根膜幹細胞/前駆細胞株の機能に及ぼす役割の検討平成 27 年度 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会幕張メッセ国際会議場・国際展示場 ホール 72015年5月16日
  12. Takao Fukuda, Kyosuke Toyoda, Terukazu Sanui, Urara Tanaka, Kensuke Yamamichi, Ryo Atomura, Takaharu Taketomi, Fusanori Nishimura Grp78 is critical for amelogenin-induced cell migration in PDL cells Penn Periodontal Conference 2015 Penn Dental Medicine in Philadelphia, Pennsylvania 2015.6.29
  13. Urara Tanaka, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Kyosuke Toyoda, Ryo Atomura, Kensuke Yamamichi, Fusanori Nishimura Inhibition of Sprouty2 Regulates Cell Functions in Periodontal Ligament Cells Penn Periodontal Conference 2015 Penn Dental Medicine in Philadelphia, Pennsylvania
  14. Takao Fukuda, Kyosuke Toyoda, Terukazu Sanui, Urara Tanaka, Kensuke Yamamichi, Ryo Atomura, Takaharu Taketomi, Fusanori Nishimura Grp78 Is Critical For Amelogenin-induced Cell Migration In PDLSCs The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research 福岡国際会議場 2015. 10. 30
  15. 山道研介、福田隆男、讃井彰一、豊田敬

介、後村亮、秋山元、田中麗、西村英紀  
アメロジェニンが有する抗炎症効果の  
機序解明 平成 27 年度日本臨床歯周病学  
会九州支部・日本歯周病学会九州五大学  
合同研修会 アクロス福岡 2015. 11. 8

16. Takao Fukuda, Terukazu Sanui, Kyosuke  
Toyoda, Urara Tanaka, Kensuke  
Yamamichi, Ryo Atomura, Hajime  
Akiyama, Fusanori Nishimura Molecular  
basis of amelogenin-induced  
periodontal tissue regeneration 口腔  
から健康長寿を支えるプロジェクト推  
進に向けた研究拠点構築プログラム 2nd  
Symposium 福岡リーセントホテル  
2016.2.28

〔その他〕

ホームページ等

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

田中 麗 (TANAKA URARA)

九州大学・歯学研究員・特別研究員

研究者番号：50734993