

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間： 2008～2009

課題番号：20890161

研究課題名（和文） 増殖シグナル制御分子 Sprouty を標的とした歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文） Suppression of Sprouty2 Induces Periodontal Tissue Regeneration.

研究代表者

讃井 彰一（SANUI TERUKAZU）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70507780

研究成果の概要（和文）： Sprouty2 は種を超えて広く保存されており、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る。この研究は Sprouty2 が歯周組織再生への新しい標的となり得るかを調査することを目的としている。その結果、Sprouty2 を抑制することで骨芽細胞株の細胞増殖と ALP が活性化することが判明した。一方、歯肉上皮細胞株の増殖能の低下が認められた。言い換えると、歯周病による歯槽骨の吸収部位に Sprouty2 活性を抑えることで、歯肉上皮の嵌入を妨げながら効率的に骨の再生が誘導されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Sprouty was identified as an inhibitor of fibroblast growth factor (FGF) receptor in *Drosophila*. In mammals, four Sproutys have been identified, and specifically Sprouty2 functions as a negative regulator of receptor tyrosine kinases (RTKs) signaling. The purpose of this study was to investigate whether Sprouty2 could be new therapeutic targets for periodontal tissue regeneration. Suppression of Sprouty2 induced cell proliferation and bone mineralization of osteoblastic cells, while it diminished cell proliferation of gingival epithelial cells. In other words, inhibition of Sprouty2 may effectively allow alveolar bone to grow, with blocking the ingrowth of gingival epithelial cells toward bony defects, as well as an effect of guided tissue regeneration (GTR) methods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
平成 21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

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：歯周組織再生・Sprouty2・骨芽細胞・上皮細胞・bFGF・EGF

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年における歯周組織再生療法の実状

歯周病（辺縁性歯周炎）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、歯槽骨の吸収により 40 歳以上の成人が歯を喪失する疾患として認識されている。現在では、失われた歯槽骨を取り戻すために組織誘導再生法(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)は線維芽細胞のみならず血管内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、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ぐ治療法であるが、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、増殖因子のみならず再生の空間を供給するスペースメイキングもまた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。

(2) Sprouty とは

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 と Sprouty4 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どころか逆に増強することが明らかになっている。

2. 研究の目的

Sprouty2 ドミナントネガティブ変異体を、歯周組織の再生時に遊走、分化、活性化すると予想される細胞群に遺伝子導入(トランスフェクション)し、Sprouty 分子を抑制することによって起こるさまざまな現象を調査し、Sprouty が再生にどう影響するのかを明らかにする。究極的にはそれらのデータをもとに、歯周組織破壊が起きた部位に Sprouty inhibitor を局所適用した歯周組織再生療法を開発し、その有用性を確立したいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞への Sprouty2 ドミナントネガティブ変異体遺伝子導入

本研究では骨芽細胞株(MC3T3-E1)と歯肉上皮細胞株(GE1)に Sprouty2 ドミナントネガティブ変異体遺伝子のトランスフェクションを行った。

(2) トランスフェクタントのシグナル伝達経路の解明

イムノプロテイング法により bFGF または

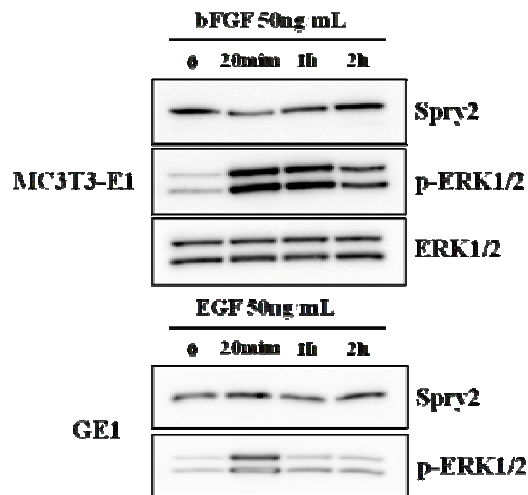
EGFにて刺激した変異体導入細胞のタンパクを様々なシグナル伝達分子の抗体で検出した。

(3) . トランスフェクタントの機能解析

bFGFまたはEGFにて刺激した変異体導入細胞の細胞増殖能を検討するため MTT アッセイを採用し、Alcaline phosphatase (ALP)アッセイにより骨芽細胞の ALP 活性を測定した。

4 . 研究成果

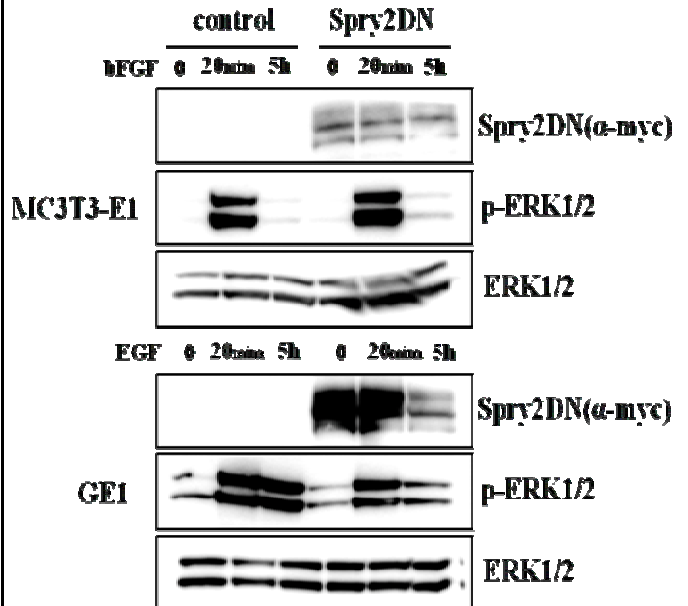
まずは、骨芽細胞株と歯肉上皮細胞株における Sprouty2 の発現の有無とその経時変化、ERK の活性を検討した。その結果、骨芽細胞株 (MC3T3-E1) を bFGF で刺激した場合、Sprouty2 は恒常的に発現が認められ、古典的 MAP キナーゼである ERK のリン酸化の活性化が 20 分をピークに認められた。同様の傾向が、歯肉上皮細胞株 (GE1) に EGF 刺激を行うところ認められた。



次に Sprouty2 ドミナントネガティブ変異体の遺伝子導入を行った結果、ERK のリン酸化は、コントロールと比較して MC3T3-E1 では増強、GE1 では抑制を受けていた。

さらに、MTT アッセイを行った結果、MC3T3-E1 において、ERK のリン酸化に比例して細胞増殖能が活性化を受けて、GE1 では抑

制を受けていた。また、骨芽細胞株において ALP 活性を測定すると Sprouty のドミナントネガティブ変異体は有意に活性化を示していた。これらの結果を再検証するため、RNAi を利用して同様の実験を試みたが、いずれも上記と同傾向の結果を得ることができた。



以上のことから、Sprouty2 を抑制することにより、上皮の増殖を妨げつつ、効率よく歯周病にて歯槽骨吸収が生じた部位の再生が誘導されると考えられる。

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 1件)

Terukazu Sanui and Richard L Gregory
Analysis of *Streptococcus mutans* Biofilm Proteins Recognized by Salivary IgA.
Oral Microbiology and Immunology
査読有、2009、24 : 361-368

[学会発表](計 1件)

Analysis of *Streptococcus mutans* Biofilm

Proteins Recognized by Salivary IgA.
2009 International Association for Dental
Research General Session
Terukazu Sanui
2009年4月3日
Miami Beach Convention Center

6. 研究組織

(1) 研究代表者

讃井 彰一 (SANUI TERUKAZU)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：70507780

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：