

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792092

研究課題名（和文） Sprouty 阻害剤を分子標的薬とした歯周組織再生療法の発明

研究課題名（英文） Periodontal regenerative effect by inhibition of Sprout2 protein.

研究代表者

讃井 彰一（SANJI 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(Spry2)は FGF による ERK 活性の抑制分子として同定された。Spry2 が歯周組織に関連した細胞群に与える影響を調査した結果、Spry2 を抑制すると歯肉上皮細胞の増殖は抑えられ、骨芽細胞においては増殖・骨分化が誘導されることが示唆された。つまり、歯槽骨吸収部位に対して Spry2 阻害剤を使用すると、歯肉上皮の侵入が妨げられ、同時に骨芽細胞による石灰化が誘導されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

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 differentiation 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
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

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、日本の成人の約8割が罹患しており、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)は線維芽細胞だけでなく血管内皮細胞、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、増殖因子のみならず骨再生の空間を保持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。

一方、Sproutyと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 のドミナントネガティブ変異体とドミナントアクティブ変異体を、歯周組織

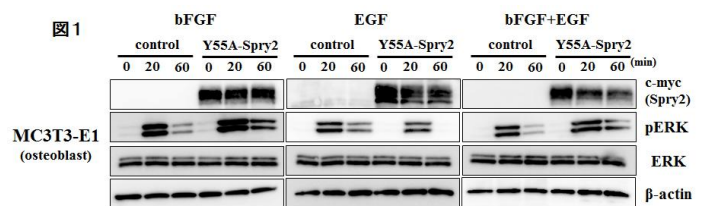
の再生時に遊走、分化、活性化する複数の細胞株に遺伝子導入し、Sprouty2を抑制することによって起こるさまざまな現象を調査した。そして、究極的にはこれらのデータをもとに、歯周組織破壊が起きた部位に最も効果的かつ安全性の高いSprouty阻害剤を局所適用した歯周組織再生療法を開発し、その有用性を確立したいと考えている。

3. 研究の方法

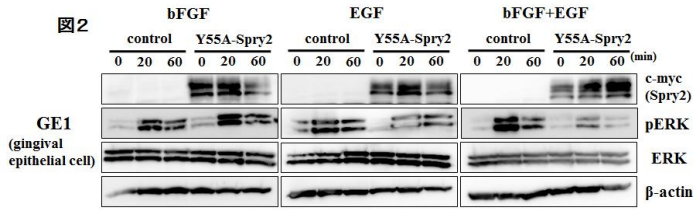
マウス Sprouty2 のドミナントネガティブ変異体を作製し、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株である MC3T3-E1 およびマウス歯肉上皮細胞株である GE1 に遺伝子導入を行った。それぞれを bFGF・EGF・血清等にて刺激を行った後、細胞内シグナル伝達経路をウエスタンブロット法により解析した。また、Sprouty2 が細胞増殖や骨分化に及ぼす影響について、それぞれ MTT assay と ALP assay を用いて検証した。

4. 研究成果

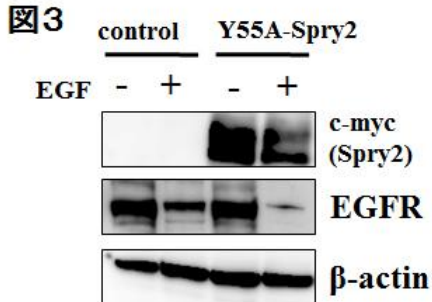
- (1). MC3T3-E1 細胞においては bFGF・EGF・血清刺激により ERK の活性化が生じ、Sprouty2 優性阻害変異体を導入することで bFGF・血清刺激による ERK の活性化はさらに増強された。(図 1 参照)



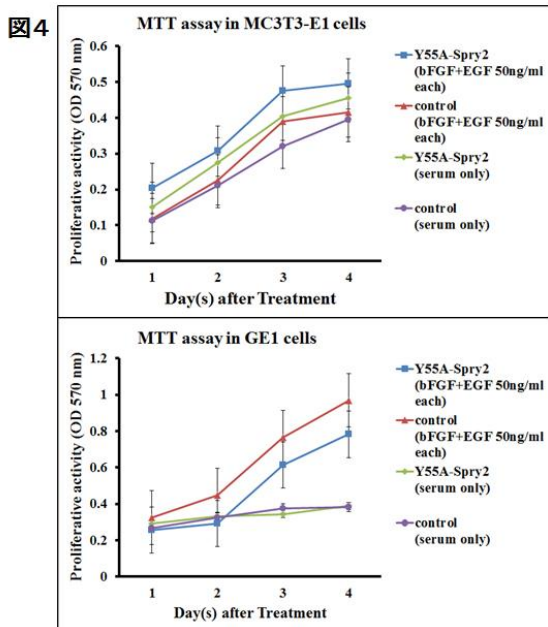
- (2). GE1 細胞においても同様の刺激により ERK の活性化が生じたが、Sprouty2 を変異体にて抑制させると、逆に EGF・血清刺激によってさらに ERK の活性が減少した。(図 2 参照)



(3). Sprouty2 を抑制した GE1 細胞において、EGF 刺激により EGF 受容体の減少が確認された。(図 3 参照)

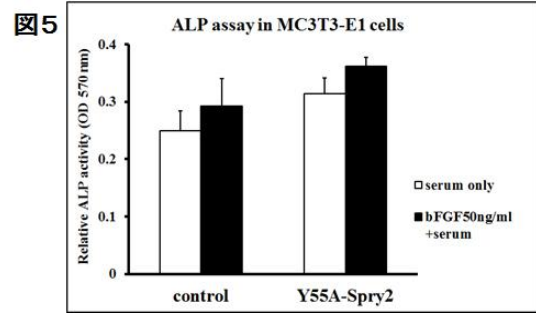


(4). 血清で刺激した場合、Sprouty2 抑制 MC3T3-E1 細胞の細胞増殖能はやや亢進しており、逆に Sprouty2 抑制 GE1 細胞の細胞増殖能は抑えられていた。(図 4 参照)



(5). Sprouty2 優性阻害 MC3T3-E1 細胞は対照群と比較して ALP 活性が亢進していた。

(図 5 参照)



これらの結果より、Sprouty2 を抑制することで歯肉上皮細胞の増殖は抑えられ、骨芽細胞においては増殖、骨分化が誘導されることが示唆された。つまり、歯周病による歯槽骨吸収部位に対して Sprouty2 阻害剤を使用することによって、歯肉上皮の侵入が妨げられ、再生の空間が維持され、同時に骨芽細胞による石灰化が誘導されることが期待される。近年、Sprouty2 の活性化・不活性化機構が徐々に明らかになっており、これらを利用することで Sprouty2 が治療標的となる可能性が考えられる。

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 2 件)

1. Matsumura K, Taketomi T, Yoshizaki K, Arai S, Sanui T, Yoshiga D, Yoshimura A, Nakamura S
Sprouty2 controls proliferation of palate mesenchymal cells via fibroblast growth factor signaling. *Biochemical Biophysical Research Communications*
査読有
404(4): 1076-1082, 2011

2. 讃井彰一・前田勝正
研究プロジェクトの精鋭たち/わが医局のエース
ザ・クインテッセンス
査読無
30 巻、2011 年、200-201 頁

[学会発表] (計 8 件)

1. 田中麗

- Sprouty2分子を標的とした歯周組織再生の可能性
平成 23 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
2011. 11. 20
長崎県歯科医師会会館
2. 福田隆男
ヒト Y-box 結合タンパク (YB-1) の骨芽細胞における細胞動態解析
第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会
2011 年 9 月 24 日
海峡メッセ下関
3. K. MATSUMURA
Sprouty2 controls the palate mesenchymal cell proliferation via FGF signaling.
The 89th General Session and Exhibition of the IADR
2011. 03. 17
San Diego
4. Takao Fukuda
Characterization of the amelogenin binding proteins.
96th AAP annual meeting
2010. 11. 01
Hawaii
5. T. SANUI
Suppression of Sprouty2 Induces Periodontal Tissue Regeneration
The 88th General Session and Exhibition of the IADR
2010. 7. 16
Barcelona
6. T. FUKUDA
YB-1 is important for amelogenin induced periodontal regeneration.
The 88th General Session and Exhibition of the IADR
2010. 7. 16
Barcelona
7. T. TAKETOMI
Sprouty2 accelerates the growth of ameloblastoma with EGF stimulation.
The 88th General Session and Exhibition of the IADR
2010. 7. 16
Barcelona
8. K. MATSUMURA
Spry2 deficient mice exhibit cleft

palate.
The 88th General Session and Exhibition of the IADR
2010. 7. 16
Barcelona

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/perio/>

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