

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06423

研究課題名(和文)四肢および歯の発生におけるBMPシグナリングの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of BMP signaling on tooth and limb development

研究代表者

早野 暁 (Hayano, Satoru)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20633712

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)：本研究では、歯および四肢発生時の形態形成におけるBMPシグナリングの役割について検討を行った。歯および四肢発生時にプログラム細胞死が生じる部位にBMPリガンド、リン酸化SMADの発現が亢進することが分かった。さらに、胎生期マウスから単離した歯および四肢をp53細胞死経路阻害薬と共に器官培養し、分子レベルでの解析を行った結果、p53細胞死経路が歯および四肢発生時の形態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the BMP signaling function on tooth and limb formation during their development. We found that BMP ligands and phospho-SMADs were expressed in the area where programmed cell death occurs. Further, tooth and limb bud organ culture with p53 inhibitor revealed that p53 pathway plays important role in tooth and limb formation.

研究分野：矯正歯科

キーワード：細胞死 発生 歯 四肢

1. 研究開始当初の背景

四肢の形状は種によって大きな違いが見られる。一例として、アヒルの足には水かきがあるが、ニワトリの足には無い。後者の場合、水かきに当たる細胞が発生の過程で細胞死を起こすためである。哺乳類の四肢発生においても同様の現象が見られる。発生初期の胎児には指間部に水かき様組織が見られるが、発生が進むに従って指間組織がプログラム細胞死を起こし、消失する。これまでに多くの研究がなされ、指間部において BMP リガンドおよび BMP-Smad シグナリングの標的遺伝子発現が亢進すること、また、この BMP シグナリングの亢進が細胞増殖を阻害する、あるいは、細胞死を誘導することにより、合指症・多指症をはじめとした様々な四肢の形態異常に関与することが報告されている。しかし、その分子学的メカニズムについては未だ不明な点が多い。

歯の発生においても同様の現象が見られる。歯の発生過程において歯原性上皮組織の一部に細胞死および細胞周期進行の停止がおこる。しかし、その周辺の細胞は成長を続けるためエナメル上皮の一部に凹みが形成される。この部分がエナメルノットと呼ばれる構造で、歯の咬頭形成に重要である。この帽状期および鐘状期のエナメルノットにおいて、DNA の分断を伴う細胞死の亢進、G1 期における細胞周期進行の調節因子として知られる p21 発現と細胞増殖の低下が報告されている。同時期のエナメルノットでは Bmps、Shh、Fgfs、Wnts が発現することから、これらのサイトカインが細胞死および p21 を介した細胞増殖阻害に関与する可能性が考えられる。しかし、どの因子により調節されるか、またその分子学的メカニズムは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

脊椎動物、無脊椎動物に関わらず、プログラ

ム細胞死は生物の発生および形態形成において必要不可欠なプロセスである。Bone morphogenetic protein (BMP) は、肢芽形成の初期から骨格形成に至る様々な場面で多様な発現パターンを示し、BMP シグナリングの変異が様々な組織の形態異常を起こすことから、形態形成におけるプログラム細胞死に深く関わっていることが示唆されている。特に歯や四肢の形態形成に BMP が深く関わっていることが報告されている。本研究では、四肢および歯の発生において BMP シグナリングがどのように細胞死あるいは細胞周期進行の停止を誘発し、これらの形態形成を制御するか、その分子学的メカニズムを検証する。これらの研究結果は、指(合指症・多指症等)や歯(象牙質及びエナメル質形成不全・結節等)の形態異常を症状とする疾患の原因や、特異的な治療法の確立にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

四肢および歯の発生において認められる細胞死あるいは細胞増殖の抑制が BMP-Smad シグナリングを介した p53 経路の活性に由来するかどうかを明らかにする。

申請者は予備実験において p53 特異的阻害薬である Pifithrin- が肢芽の発生に影響を与えることを発見した。これらの結果から、BMP シグナリングを介した p53 経路の活性が四肢の形態形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

これを証明するために、本実験では野生型マウス胎仔の肢芽の切片を作成し、免疫組織化学染色法を用いて、上皮組織における pSMAD1/5 および p53 の発現を検出する。マウス胎仔の歯胚においても同様の実験を行った。

次に遺伝子変異マウスにおける BMP シグナリングの亢進が四肢および歯の発生に及ぼす影響を検討した。申請者は過去に

caBmpr1a マウスを用いて、頭蓋顔面の軟骨における BMP シグナリングが p53 経路を介した細胞死を亢進することを発見した。本研究では、四肢および歯の発生においても同様に BMP シグナリングを介した細胞死が関与しているかどうかを検討した。申請者は顎顔面領域で BMP I 型受容体を亢進させた caBmpr1a:P0-Cre mouse の組織を用い、免疫染色を行うことにより BMP シグナリングの亢進が歯の形態に及ぼす影響を対照群と比較した。

特異的阻害剤を用いた BMP-Smad シグナリングあるいは p53 経路の抑制が四肢および歯の発生に与える影響を明らかにする。

四肢の形成については古くから BMP シグナリングによる細胞死の亢進が、指間部組織のみならず指の形態形成に影響を与えたと考えられてきた。BMP4 を染み込ませたビーズをニワトリ胚芽に埋入した実験では、ビーズ周囲組織で細胞死が亢進し、合指が起こることが報告されている。同様に、歯胚を用いた器官培養実験でも BMP2 あるいは BMP4 を染み込ませたビーズが歯源性上皮組織において p21 の発現を亢進することが報告されている。

申請者はこれまでに、肢芽および歯胚の器官培養を行い、これら組織の形態形成を観察してきた。さらに、BMP-Smad シグナリング特異的阻害剤である LDN11)、あるいは p53 特異的阻害薬である Pifithrin- を用いて、caBmpr1a:P0-Cre マウスの頭蓋顔面にみられる形態異常を改善することに成功した。本研究においても同様にマウスの肢芽および歯胚の器官培養を行い、LDN および Pifithrin- を用いて BMP シグナリングの亢進により認められる四肢および歯の形態形成の改善を試みた。

4. 研究成果

本研究の予備実験として p53 阻害薬である

Pifithrin- 存在下で胎生 12 日目野生型マウスの前肢の器官培養を行った。その結果培養 6 日目に対照群では指の形成が見られたが、Pifithrin- 作用群肢芽では正常な指の形態形成が阻害されることを発見した。

次に野生型マウス胎生 14 日目・16 日目・18 日目の下顎臼歯を用いた p53 細胞死経路の活性化について調べた。胎生 14 日目・16 日目・18 日目野生型マウス胎児から下顎骨を単離し、実験群として、p53 の特異的阻害薬である Pifithrin- を添加した培養液を用いた器官培養を行った。その後、Pifithrin- 非添加群である対照群と実験群の歯冠形態を比較した。この結果、胎生 14 日目の実験群では歯冠形態の異常が見られた。しかし、胎生 16 日目・18 日目ではその差が僅かであった。また、その形態異常の程度は一定ではなく、個体間で差があった。

次に、この形態異常が p53 細胞死経路の抑制によるものであることを調べるために、器官培養後の組織を用いて分子レベルでの解析を行った。方法としては、6 日間器官培養した胎生 14 日目の下顎臼歯から mRNA を抽出し、逆転写法を用いて mRNA から DNA を精製した後、リアルタイム PCR 法を用いて p53 細胞死経路の活性化に関わる遺伝子の発現量を実験群と対照群とで比較した。その結果、Pifithrin- 添加群では p53 細胞死経路の活性化が優位に抑制されることが分かった。これらの結果から、p53 経路を介した細胞死が肢芽の発生に重要な役割を果たすことが示唆された。

次に、BMP シグナリングと p53 細胞死経路の関係を調べるため、遺伝子改変マウスの組織を用いた実験を行った。方法としては、神経堤細胞特異的に BMP シグナリングを亢進させたコンディショナルノックインマウス (caBmpr1a:P0-Cre mouse) 歯胚、および、同腹子コントロールマウス歯胚のパラフィン切片を作成した。我々の仮説に反して遺伝子

改変マウスと対照群では下顎臼歯の形態に大きな差は認められなかった。しかし、免疫染色法を用いて p53 細胞死経路の活性に関わる分子の産生量を両者で比較した。その結果、発生中の caBmpr1a:P0-Cre mouse マウス歯胚において、p53 細胞死経路に関わるタンパクの産生が亢進している傾向が見られた。

上記の器官培養法を用いて BMP シグナリング阻害薬である LDN を用いて、BMP シグナリングの減少が組織の形態形成に与える影響を検討した。この結果、Pifithrin- 作用群と同様に LDN 添加群では、胎生マウス前肢の形態形成に異常が見られた。さらに、LDN 添加群器官培養組織を用いて分子レベルでの解析を行った結果、Pifithrin- 添加時と同様に対照群と比較して p53 細胞死経路の活性化が優位に抑制されることが分かった。これらのことから BMP-p53 経路を介した細胞死が枝芽の発生に重要な役割を果たすことが示唆された。

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 4 件)

Ono M, Oshima M, Ogawa M, Sonoyama W, Hara ES, Oida Y, Shinkawa S, Nakajima R, Mine A, Hayano S, Fukumoto S, Kasugai S, Yamaguchi A, Tsuji T, Kuboki T: Practical whole-tooth restoration utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a postnatal canine model. *Sci Rep*, 査読有り, 7, 1-11, 2017.

DOI: 10.1038/srep44522

早野暁, 星島光博, 石川崇典, 上岡寛: 歯科矯正用アンカースクリューおよび

オクルーザルスプリントを用いて咬合再構築を行った成人開咬症例. *中・四矯歯誌*, 査読有り, 28(1), 95-103, 2016.

URL:

<http://chu-shikoku.orthodontic.jp/jimukyoku.html>

Wang Z, Odagaki N, Tanaka T, Hashimoto M, Nakamura M, Hayano S, Ishihara Y, Kawanabe N, Kamioka H: Alternation in the gap-junctional intercellular communication capacity during the maturation of osteocytes in the embryonic chick calvaria. *Bone*, 査読有り, 91, 20-29, 2016.

DOI: 10.1016/j.bone.2016.06.016

Graf D, Malik Z, Hayano S, Mishina Y: Common mechanisms in development and disease: BMP signaling in craniofacial development. *Cytokine Growth Factor Rev*, 査読有り, 27, 129-139. 2015.

DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.11.004

[学会発表](計 3 件)

早野暁, 川邊紀章, 福井裕子, 上岡寛. 下歯槽神経切断によるラット下顎切歯の形態形成と歯原性間葉系幹細胞の減少. 第75回日本矯正歯科学会. 2016年11月7-9日, 徳島県徳島市.

Hayano S. Augmented BMP signaling in the neural crest inhibits nasal cartilage morphogenesis by inducing p53-mediated apoptosis. *International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases*. Desember 10-11, 2015, Osaka,

Japan.

早野暁, 小松義広, 藩海春, 三品裕司.
神経堤における BMP-Smad シグナリン
グの亢進が顎顔面の軟骨発生に与える
影響. 第 74 回日本矯正歯科学会. 2015
年 11 月 18-20 日, 福岡県福岡市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早野 暁 (HAYANO, Satoru)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号: 20633712

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し