

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：22501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11730

研究課題名(和文) 歯の発生過程におけるShhシグナルによる静的幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms maintaining quiescent stem cells by Shh signaling in the apical bud of incisors and developing molars in mice

研究代表者

石川 裕子 (Ishikawa, Yuko)

千葉県立保健医療大学・健康科学部・教授

研究者番号：40401757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 臼歯では、強い蛍光のH2B-GFP-LRCs陽性細胞が生後1日から2週まで歯髄中央部に分布し3週で減少した。また象牙芽細胞下層において生後2週で増加した。Gli1およびPtch1陽性細胞は、成長過程を通してエナメル器と象牙芽細胞層と象牙芽細胞下層を含む歯髄に分布していた。切歯では、apical bud内にH2B-GFP-LRCs陽性細胞、Gli1およびPtch1陽性細胞が分布していた。培養ではShh阻害剤を添加すると、apical bud内でSox2陽性細胞数が減少した。以上より、Shh-Ptch-Gliシグナル伝達経路は、静的幹細胞を維持し象牙芽細胞の機能にも関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ShhレセプターであるPtch1・2の異なる発現パターンに着目し、Shhシグナルと静的幹細胞維持機構との関連を解明したことは、Shhの新たな役割の解明に繋がった。また、マウス切歯および臼歯発生過程における静的幹細胞維持とShhシグナルとの関連を解明したことから、静的幹細胞を用いた歯髄再生療法への展開に貢献できる。

研究成果の概要(英文)： In molars, dense H2B-GFP-label-retaining cells (H2B-GFP-LRCs) were densely distributed throughout the dental pulp during P1 to postnatal week 2 (P2W) and decreased in number by postnatal P3W, whereas the number of dense H2B-GFP-LRCs in the subodontoblastic layer increased in number at P2W. Gli1+ and Ptch1+ cells were distributed throughout the enamel organ and dental pulp, including the odontoblast and subodontoblastic layers. In incisors, the apical bud contained H2B-GFP-LRCs, Gli1+ cells, and Ptch1+ cells. The addition of Shh antibody to explants induced a decrease in the number of Sox2+ cells due to the increase in apoptotic cells in the apical bud. Thus, the Shh-Ptch-Gli signaling pathway plays a role in maintaining quiescent adult stem cells and regulating the function of odontoblasts.

研究分野： 歯科衛生士教育

キーワード： 歯髄 ソニック・ヘッジホッグシグナル 静的幹細胞 Gliタンパク Ptch1受容体 マウス 発生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ソニック・ヘッジホッグ (Shh) シグナルは、脊椎動物におけるヘッジホッグ伝達経路の一つであり、動物の様々な器官形態形成において鍵となるシグナルである。また、マウス臼歯発生においては、歯胚の形成や成長の調整を行うこと (Dev Biol 15: 364-386, 2001)、ヘルトビッチ上皮鞘 (HERS) の歯根形成機能に必須であること (J Dent Res 85: 427-431, 2006) が報告されている。一方、幹細胞には、細胞増殖周期から外れた「静的幹細胞」と活発な細胞増殖能のある一時的増幅細胞を持続的に供給する「動的幹細胞」の2種類が存在する (Science 327(5965): 542-545, 2000)。歯髄幹細胞は、通常はほとんど細胞増殖をせず歯の損傷の際に活発に増殖する静的幹細胞であるが、齧歯類の生涯伸び続ける常生歯である切歯の上皮形成端には静的幹細胞と動的幹細胞の二つが存在すると考えられている。

Shh シグナルと幹細胞の関係については、造血幹細胞、乳腺、神経系の一時的増幅細胞の増殖に Shh シグナルが関与すること (Nat Immunol 2: 172-180, 2001, Cancer Res 66: 6063-6071, 2006, Nature 437: 894-897, 2005) が報告されている。また、切歯の上皮形成端には Shh 反応性と非反応性の2種類の幹細胞が存在し、Shh シグナルは幹細胞の維持には必須ではないが、エナメル芽細胞分化には必須であることが報告されている (Development 137: 3753-3761, 2010)。しかし、これらの研究では動的幹細胞と静的幹細胞との区別がなく、Shh の2種類のレセプター Ptch1 と Ptch2 発現パターンとの関連については着目されていない。また、マウス切歯形成端の静的な間葉系幹細胞が Gli1 陽性を示し、Shh シグナルで維持されている可能性が報告されている (Cell Stem Cell 14: 160-173, 2014) が、Ptch1・2 との関連は着目されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、歯の発生過程における Shh シグナルと静的幹細胞維持機構、エナメル芽細胞分化との関係ならびに Shh シグナルの役割を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

DNA 合成期に核内に取り込まれる BrdU を妊娠マウス腹腔内に毎日1回 (150mg/kg) 3日間 (胎生 14~17日) 投与した後、一定期間置くと幹細胞をラベルすることができる胎生期ラベリング法を施した ICR マウスおよび胎生 14.5 日または 15.5 日にドキシサイクリン投与した TetOP-H2B-GFP マウスを使用して実験を行った。

(1) 胎生期ラベリング法を施した ICR マウスおよび TetOP-H2B-GFP マウスにおける3週齢切歯パラフィン切片を用いて、静的幹細胞と考えられる dense BrdU-LRCs および H2B-GFP-LRCs の局在、Shh シグナルに関しては、Shh 発現、Shh シグナルに関わる転写因子の Gli1 発現、Shh レセプターの Ptch1 および Ptch2 発現について免疫組織化学的に解析を行った。さらに、TetOP-H2B-GFP マウスにおける Shh および Ptch1 の mRNA 発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べた。

(2) TetOP-H2B-GFP マウス臼歯発生過程における静的幹細胞と考えられる H2B-GFP-LRCs の局在、Gli1 発現、Ptch1 発現について免疫組織化学的に解析した。また、H2B-GFP-LRCs, Gli1 および Ptch1 陽性細胞については、定量解析を行った。さらに、Shh および Ptch1 の mRNA 発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べた。

(3) 生後2日の野生型マウスおよび TetOP-H2B-GFP マウスの下顎切歯を取り出し Trowell 法にて Shh 阻害剤である 5E1 を培地に4日間添加 (26 µg/ml)・器官培養を行い、パラフィン切片を作製した。そして、Shh、歯胚上皮幹細胞マーカーである Sox2、増殖細胞をみる Ki67 発現を免疫組織化学で、ならびにアポトーシスを TUNEL 法にて解析し、さらに定量解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) マウス3週齢切歯における dense BrdU-LRCs, H2B-GFP-LRCs, Shh, Gli1, Ptch1 および Ptch2 発現

胎生期ラベリング法を施した ICR マウスでは、dense BrdU-LRCs は、歯乳頭と上皮形成端の外エナメル上皮に局在し、Gli1 を共発現していた。TetOP-H2B-GFP マウスでは、強い蛍光の H2B-GFP-LRCs は歯乳頭と上皮形成端の外エナメル上皮に局在し、Gli1 は上皮形成端全体および、上皮形成端直下の歯乳頭に、Ptch2 は成熟エナメル芽細胞に発現していた。

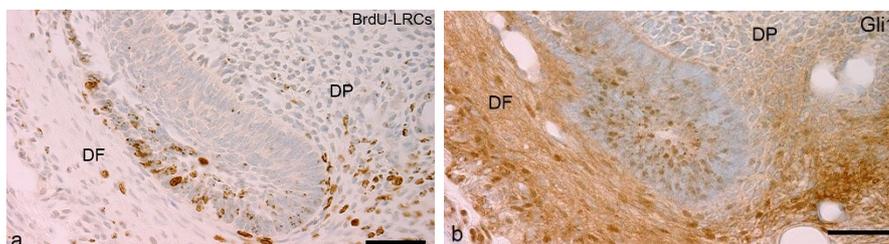


図1: 胎生期ラベリング法による3週齢切歯

a: BrdU-LRCs 染色、b: Gli1 染色。濃く染色されている dense BrdU-LRCs は、歯乳頭と上皮形成端の外エナメル上皮に局在し、Gli1 は共発現している。(DP: 歯髄、DF: 歯小囊)

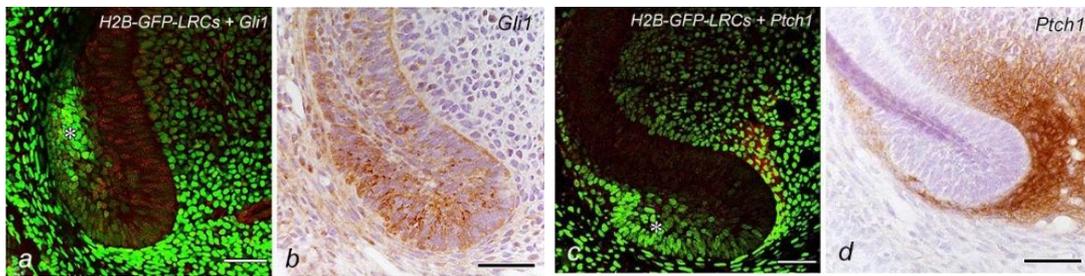


図 2 : TetOP-H2B マウスにおける 3 週齢切歯

a,c: 蛍光染色、b,d: 明視野による染色、a: 緑が H2B-GFP-LRCs、赤が Gli1、b: Gli1 染色、c: 緑が H2B-GFP-LRCs、赤が Ptch1、d: Ptch1 染色  
強い蛍光の H2B-GFP-LRCs は歯乳頭と上皮形成端の外エナメル上皮に局在し、Gli1 は上皮形成端全体および上皮形成端直下の歯乳頭に発現している。

(2) マウス臼歯発生過程における H2B-GFP-LRCs, Gli1 および Ptch1 発現

強い蛍光の H2B-GFP-LRCs 陽性細胞が生後 1 日から 2 週まで歯髄中央部に分布し、3 週で減少した。また象牙芽細胞下層において生後 2 週で増加した。弱い蛍光の H2B-GFP-LRCs 陽性細胞は、3 週において歯髄中央部で増加した。Gli1 陽性細胞および Ptch1 陽性細胞は、象牙芽細胞層および歯髄を含むエナメル器に分布していた。

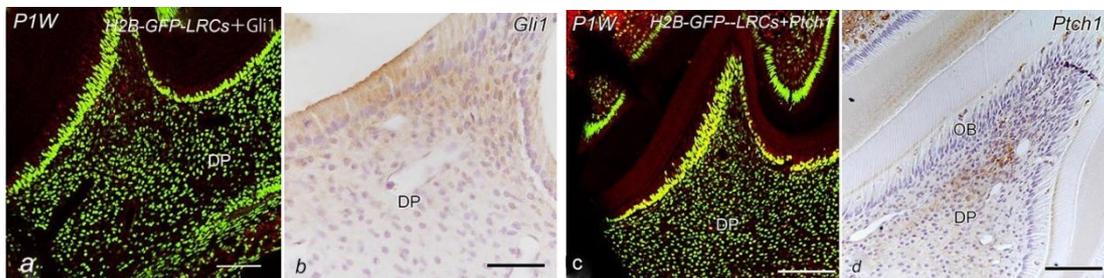


図 3 : TetOP-H2B マウスにおける 1 週齢臼歯

a,c: 蛍光染色、b,d: 明視野による染色、a: 緑が H2B-GFP-LRCs、赤が Gli1、b: Gli1 染色、c: 緑が H2B-GFP-LRCs、赤が Ptch1、d: Ptch1 染色、強い蛍光の H2B-GFP-LRCs 陽性細胞が歯髄中央部に、Gli 陽性細胞および Ptch1 陽性細胞は象牙芽細胞層および歯髄を含むエナメル器に発現している。(DP: 歯髄)

(3) Shh 阻害剤である 5E1 を使用した培養実験

野生型マウスでは、細胞アポトーシスは上皮形成端で有意に増加し、Sox2 陽性細胞が有意に減少した。TetOP-H2B-GFP マウスでは、Sox2 陽性細胞が有意に減少し、H2B-GFP-LRCs 陽性細胞は減少傾向がみられた。

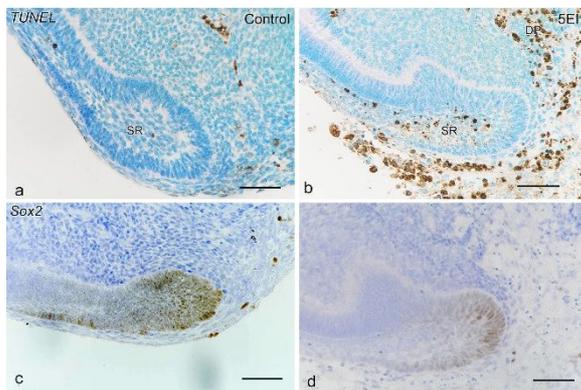


図 4 : 野生型マウスを使用した培養実験

a,b: TUNEL 法 c,d: Sox2 染色  
a,c: コントロール b,d: Shh 阻害剤の 5E1 を併用した  
Shh 阻害剤の 5E1 を併用することで細胞アポトーシスが星状網と歯乳頭で増加し、Sox2 陽性細胞が内エナメル上皮で減少している。

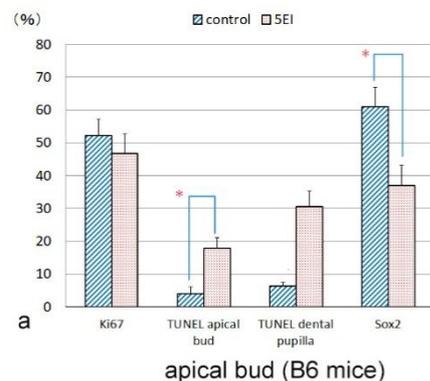


図 5 : 野生型マウスを使用した培養実験による細胞数の変化  
TUNEL 法によるアポトーシスは 5E1 を併用することで増加し、Sox2 陽性細胞も減少している。

(4) TetOP-H2B-GFP マウス切歯と発生過程における臼歯における *Shh* および *Ptch1* mRNA 発現  
 3週齢切歯では、*Shh*-mRNA 発現は内エナメル上皮に、*Ptch1*-mRNA 発現は上皮と間葉に発現していた。発生過程における臼歯では、*Shh*-mRNA 発現は生後1日でエナメル上皮に、生後1日から3週の間、エナメル芽細胞で強く発現していた。*Ptch1*-mRNA 発現は内エナメル上皮と歯髄に発現し、1週から3週で減少した。

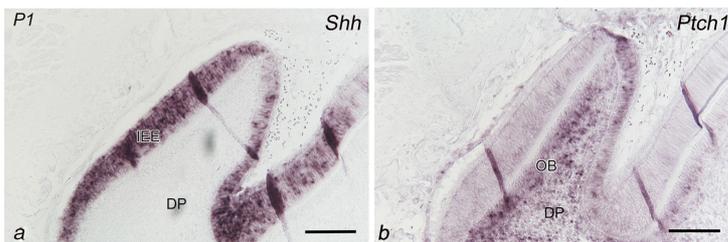


図6：生後1日 TetOP-H2B-GFP マウス臼歯 mRNA 発現

a: *Shh*, b: *ptch1*

*Shh* はエナメル上皮に、*Ptch1* は内エナメル上皮と歯髄に発現している。

#### (5) 研究成果の総括

(1)の結果より、3週齢切歯では、dense BrdU-LRCs と H2B-GFP-LRCs の分布は、歯小嚢部分以外は、同様の分布をしていた。これは、胎生15~17日に増殖していないH2B-GFP-LRCs が歯小嚢に残っていることを示している。また、(3)の結果から *Shh* を阻害することにより、細胞アポトーシス細胞の増加と、内エナメル上皮で *Sox2* 陽性細胞の減少を誘導していることが明らかとなった。さらに(2)~(4)の結果より、*Shh*-*Ptch*-*Gli* シグナル伝達経路は、静的幹細胞を維持し象牙芽細胞の機能にも関与していることが示唆された。

#### 5. 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

胎生期ラベリング法と TetOP-H2B-GFP マウスにおける実験結果を比較することにより、胎生15~17日に増殖しない細胞の分布が明らかとなった。また、*Shh* の阻害剤を使用した培養実験を行ったことで *Shh* シグナルが静的幹細胞維持機構に関与することが明らかとなったのは特筆される。

#### 6. 今後の展望

歯の損傷に対する象牙芽細胞層下層の応答を明らかにするために、TetOP-H2B-GFP マウスや nestin-enhanced GFP transgenic マウスを用いたさらなる実験的研究が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishikawa Y, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H	4. 巻 369
2. 論文標題 Quiescent adult stem cells in murine teeth are regulated by Shh signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 497-512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-017-2632-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakaki T, Nakakura-Ohshima K, Nakagawa E, Ishikawa Y, Saito K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H	4. 巻 60
2. 論文標題 Donor-host tissue interaction in the allogenic transplanted tooth germ with special reference to periodontal tissue	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 21-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2018.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Yuko, Ida-Yonemochi Hiroko, Saito Kotaro, Nakatomi Mitsushiro, Ohshima Hayato	4. 巻 2
2. 論文標題 The Sonic Hedgehog/Patched/Gli Signaling Pathway Maintains Dental Epithelial and Pulp Stem/Progenitor Cells and Regulates the Function of Odontoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Dental Medicine	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fdmed.2021.651334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川裕子, 依田浩子, 斎藤浩太郎, 中富満城, 大島勇人
2. 発表標題 歯胚上皮及び歯髄幹細胞・象牙芽細胞維持に関わるShh-Ptch-Gliシグナル経路
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川裕子, 依田浩子, 斎藤浩太郎, 中富満城, 大島勇人
2. 発表標題 マウス切歯・臼歯の静的幹細胞維持に関わるShhシグナルの役割
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中木哲朗, 大島邦子, 石川裕子, 斎藤浩太郎, 依田浩子, 大島勇人
2. 発表標題 他家歯胚移植におけるドナー・ホスト相互作用：歯周組織に着目して
3. 学会等名 新潟歯学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大島 勇人 (Ohshima Hayato)  (70251824)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究分担者	中富 満城 (Nakatomi Mitsushiro)  (10571771)	九州歯科大学・歯学部・講師  (27102)	
研究分担者	斎藤 浩太郎 (Saito Kotaro)  (10733719)	新潟大学・医歯学系・助教  (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	依田 浩子  (Ida-Yonemochi Hiroko)  (60293213)	新潟大学・医歯学系・准教授     (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関