

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11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791838

研究課題名（和文） エナメル芽細胞における Shh および Bmp シグナルのクロストークと歯の再生への展望

研究課題名（英文） Shh signaling is related to Bmp signaling in ameloblast differentiation and tooth reconstruction

研究代表者

高橋 里美 (TAKAHASHI SATOMI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40451918

研究成果の概要（和文）：

Shh (Sonic hedgehog)は、歯の発生過程において、シグナルセンターであるエナメルノットに強く発現しており、エナメル芽細胞分化において重要な働きを担っていると考えられているが、その機能の詳細はいまだ不明である。申請者は、未分化エナメル芽細胞株 ALC を用いて、Shh によりエナメル芽細胞の分化を直接誘導できる可能性を示唆した。また、申請者はエナメル芽細胞において Shh シグナルが Bmp 産生を誘導すること、Bmp によってもエナメル芽細胞分化が誘導されることを確認した。さらに、歯の発生過程において重要な因子の一つである Wnt シグナルがエナメル芽細胞の分化を誘導していることも確認した。

研究成果の概要（英文）：

Tooth development is regulated by various intercellular signaling molecules, such as sonic hedgehog (Shh), bone morphogenetic proteins (BMPs), Wnts and fibroblasts growth factors. These molecules are also essential for ameloblast differentiation. We reported that Shh signaling was indispensable for ameloblast development. In ameloblast, Shh, BMPs and Wnts expressions are observed in their early stage of development, along with their receptor molecules. These observations suggest the involvement of Shh, BMPs and Wnts signaling in the differentiation of ameloblasts. We revealed that Shh induced the expression of BMPs and Wnts, suggesting that Shh may play a central role to activate the signaling network in ameloblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1800000	540000	2340000
2010年度	700000	210000	910000
2011年度	700000	210000	910000
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯の発生、エナメル芽細胞、Sonic hedgehog、Gli、Bone morphogenetic protein、Smad、Wnt

1. 研究開始当初の背景

sonic hedgehog (Shh)は、歯の発生過程

において、シグナルセンターであるエナメルノットに強く発現しており、エナメル芽細胞分化において重要な働きを担っていると考えられているが、その機能の詳細はいまだ不明である。申請者は、未分化エナメル芽細胞株 ALC に Shh を作用させることによりアメロジェニン、アメロプラスチンなどのエナメルマトリックス発現が増加することを認め、さらにエナメルマトリックス発現の上昇が、Shh シグナルにおける主要な転写調節因子である Gli1 を介する直接的な作用であることを明らかにした。すなわち、Shh を用いることによりエナメル芽細胞の分化を誘導できる可能性が推察される。また、Shh シグナルにより Bmp シグナル発現が増加し、Gli1 強制発現により Bmp シグナル下流の Smad の発現が亢進したことから、Bmp シグナルもエナメル芽細胞分化に関与している可能性を示唆した。さらに今後は、歯の発生過程において、Shh と並んで重要な Wnt シグナルが ALC において発現していることから、Shh シグナル、Bmp シグナルと Wnt シグナルのクロストークについて検討を行った。

以上の背景を踏まえ申請者は以下の項目について研究を行う。

- (1) Wnt シグナルとエナメル芽細胞分化
- (2) WntシグナルとShhシグナルのエナメル芽細胞分化におけるクロストーク

2. 研究の目的

- (1) Wnt シグナルとエナメル芽細胞分化
- (2) WntシグナルとShhシグナルのエナメル芽細胞分化におけるクロストーク

3. 研究の方法

- (1) Wnt シグナルとエナメル芽細胞分化株化エナメル芽細胞ALC (Ameloblast-lineage-cell)においてどのようなWntシグナルが発現しているのかを検討する。

サンプル：

マウス由来の未分化エナメル芽細胞株 (ALC)

発現動態解析ターゲット：

Wnt3, 5a, 5b, 6, 10a, 10b

機能誘導因子：

Gli1発現ベクター

解析手法：

定量的リアルタイムPCR法

ウェスタンブロッティング法

- (2) WntシグナルとShhシグナルのエナメル芽細胞分化におけるクロストーク

ALC における Wnt シグナルと Shh シグナルのクロストークとエナメル芽細胞分化の方向性について検討する。Wnt シグナルにより Shh シグナルがどう変動するのか、逆に Shh により Wnt シグナルがどう変動するのか、またそのクロストークがエナメル芽細胞にどう影響するのかについて検討を行う。

サンプル：

マウス由来の未分化エナメル芽細胞株 (ALC)

発現動態解析ターゲット：

Amelogenin, Enamelin

機能誘導因子：

Gli1発現ベクター

Axin1,2 siRNA

IWR

Y27632

解析手法：

定量的リアルタイムPCR法

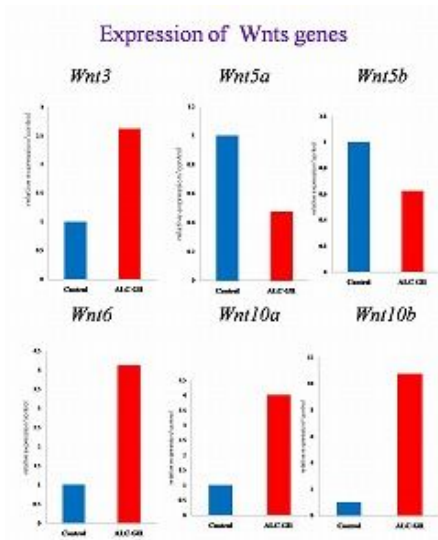
石灰化誘導

4. 研究成果

- (1) Wnt シグナルとエナメル芽細胞分化

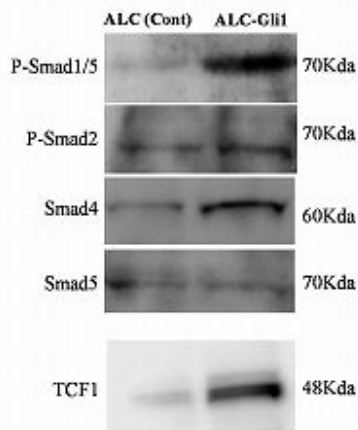
ALC に Shh の転写調節因子である Gli1 を強制発現させ、リアルタイム PCR 法にて *Wnts* の発現を確認。

Wnt3、*Wnt6*、*Wnt10a* および *Wnt10b* の発現の増強が認められた(下図参照)。



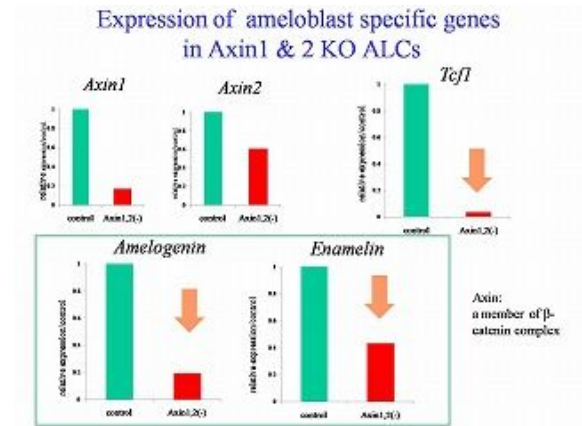
同様に Bmp の転写調節因子である Smad とリン酸化 Smad の発現をウエスタンブロッティング法にて確認。Gli1 を強制発現させた ALC において、リン酸化 Smad1/5 およびリン酸化 Smad2 の発現の増加が認められた。さらに Wnt シグナル関連遺伝子の一つである TCF1 の発現の増加が認められた。

Expression of Smads, Phospho-Smads and TCF1 in constitutive Gli1



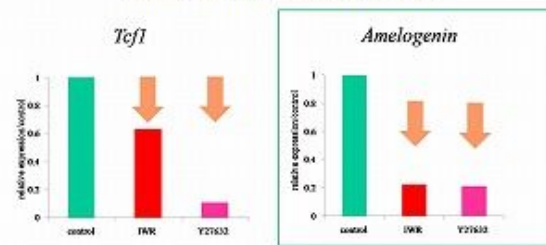
(2) WntシグナルとShhシグナルのエナメル芽細胞分化におけるクロストーク

Wnt シグナル経路における β カテニンと複合体を形成する Axin1 および Axin2 をノックアウトした ALC において、リアルタイム PCR 法において *Amelogenin* および *Enamelin* の発現を確認。どちらも発現の低下が認められた。



Wnt シグナル経路の一つである β カテニン経路の阻害剤である IWR および PCP 経路の阻害剤である Y27632 を ALC に作用させたところ *Amelogenin* の発現の低下が確認された。

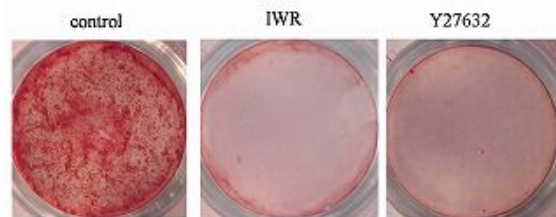
Effects of Wnt inhibitors on amelogenin expression in ALC



IWR: Inhibitor of Wnt response, blocking a cell-based Wnt/ β -catenin pathway
Y27632: Inhibitor of Rho-associated protein kinases

ALC の培養液中に、石灰化を誘導するアスコルビン酸と β グリセロリン酸を添加。IWR および Y27632 により ALC の石灰化の阻害が確認された。

Effects of Wnt inhibitors on mineralization of ALC



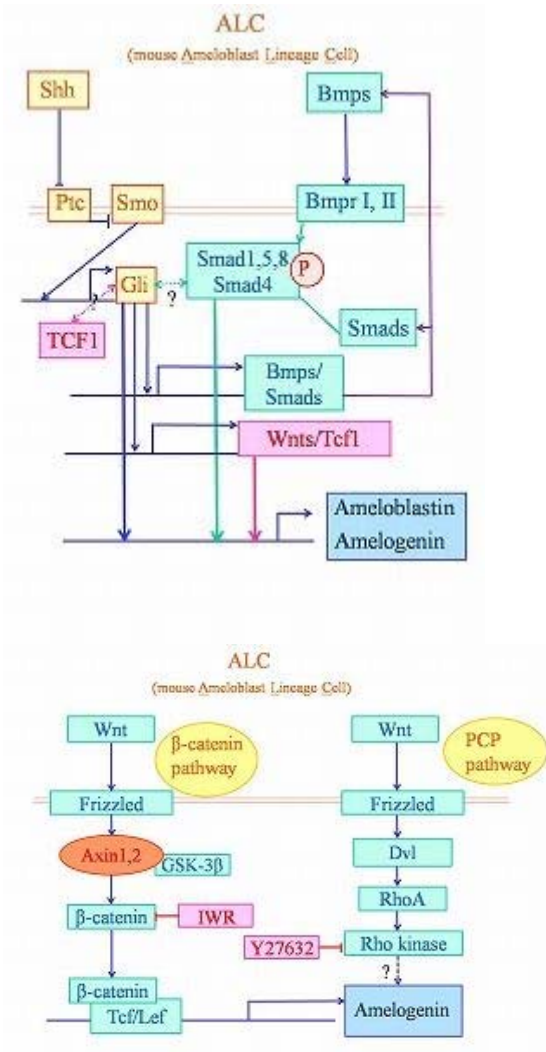
Cultured in the mineralization inducing medium (DMEM with ascorbic acid, beta glycerophosphate and 10%FBS) for 10 days

結果のまとめ

- ALC に Gli1 を強制発現すると、*Wnt3*、*Wnt6*、*Wnt10a* および *Wnt10b* の発現が増加した。すなわち、Shh シグナルにより Wnt 発現が誘導された。
- さらに、Gli1 を強制発現した ALC においては、Wnt シグナルにおいて重要な働きを担っている TCF1 の発現が増加してい

たことから、Shh シグナルが Wnt シグナルを増強していることが明らかになった。

- Wnt シグナルの阻害剤である IWR および Y27632 を ALC に添加することによりエナメルマトリックスであるアメロジェニンやエナメリンの発現の低下および石灰化の抑制が確認されたことから、Wnt シグナルにより、エナメル芽細胞は正の方向に誘導されている可能性が示唆された。



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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①Satomi Takahashi

Shh Signaling is Related to BMP and Wnt Signaling in Ameloblast Differentiation
International Federation of

Endodontic Associations

2010年10月7日

ギリシャ アテネ

②Satomi Takahashi

In Vitro Ameloblast Differentiation Affected by Wnt Signaling

European Society of Endodontology

2011年9月15日

イタリア ローマ

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 里美 (Satomi Takahashi)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

非常勤講師

研究者番号: 40451918

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

川島伸之 (Nobuyuki Kawashima)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

助教

研究者番号: 66172605