

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861791

研究課題名(和文) ShhシグナルとBMP・Wntシグナルのクロストークが導くエナメル質再生の新展開

研究課題名(英文) Induction of enamel regeneration by cross-talk between Shh signaling and BMP/Wnt signaling

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Sonic hedgehog(Shh)は、エナメル芽細胞の分化に重要な働きを担っているが、エナメル芽細胞の分化においては、ShhシグナルとWntシグナルおよびBMPシグナルのクロストークがエナメル芽細胞の分化を制御している可能性が推察される。本プロジェクトにおいて、エナメル芽細胞分化においてこれらシグナルのクロストークを検討したところ、Shh下流の転写調節因子Gli1の強制発現はWntおよびBMPシグナルを増強し、Wntシグナルの抑制はエナメル芽細胞の石灰化を抑制した。エナメル芽細胞分化におけるそれらのシグナルのクロストークが重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sonic hedgehog (Shh) is an essential factor for ameloblast differentiation, but crosstalk between Shh signaling and Wnt or BMP signaling may regulate the ameloblast differentiation. In this project, enhanced expression of Gli1, which is a major transcriptional factor of Shh signaling, induced increase of Wnt and BMP signals, and suppression of Wnt signaling blocked the mineralization of ameloblast-like cells (ALCs). These results suggest the importance of crosstalk among Shh, Wnt and BMPs in ameloblast differentiation.

研究分野：歯内療法学

キーワード：エナメル芽細胞 Shh Bmp Wnt シグナルネットワーク 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

申請者は、Shh が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ともに、そのシグナルは主に Gli1 を介していることが明らかにした[1]。また、エナメルマトリックスの発現は Gli1 が直接誘導していることも明らかにした[1]。この所見は Shh がエナメル芽細胞分化において中心的な働きを担っていることを示唆している。しかし、最終的な目標である歯の再生を行う上で、エナメル芽細胞への分化がコミットされていないさらに未熟な細胞からエナメル芽細胞を誘導する手法を確立しなくてはならない。すなわち多分化能を有する幹細胞をエナメル芽細胞へ分化させるにはどのようにすればよいのかについて検討を行う必要がある。Shh はエナメル芽細胞分化のごく初期より発現しており、Shh シグナルがエナメル芽細胞分化において中心的な働きを担っている可能性は高い。しかし、エナメル芽細胞分化に方向付ける上で Shh と共役的に働く因子が存在するはずである。

2. 研究の目的

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、その機能の詳細ははまだ不明である。これまで申請者は、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。本研究では、エナメル芽細胞分化における Shh シグナルと Bmp および Wnt シグナ

ルの相互作用について検討する。

3. 研究の方法

(1) 株化エナメル芽細胞 ALC における Shh シグナルの共役因子の解明

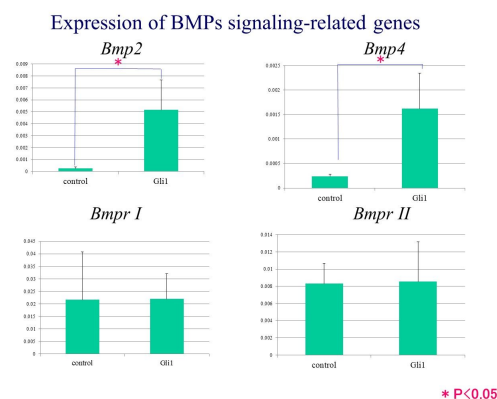
Shh シグナルと Bmp および Wnt との関連について検討する。そのために、Shh 下流の転写調節因子 Gli1 の ALC における強制発現を行う。すなわち、Gli1 ORF を組み込んだタンパク発現ベクターを ALC にトランスフェクションし、BMP、Wnt タンパクの発現を rPCR にて検討する。

(2) Wnt シグナルとエナメル芽細胞分化 Wnt シグナル阻害薬にて Wnt シグナルをブロックした場合におけるエナメル芽細胞分化について検討する。

4. 研究成果

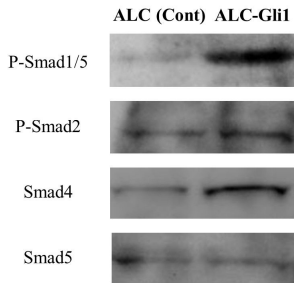
(1) Gli1 による Bmp・Wnt 発現

Gli1 の強制発現により *Bmp2* および *Bmp4* mRNA 発現の有意な増加が認められた。



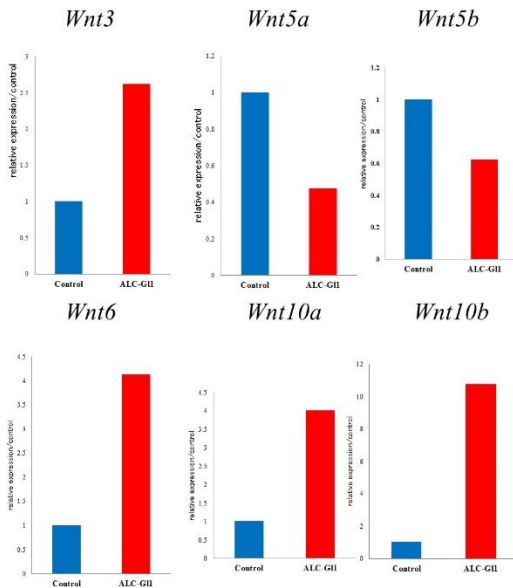
さらに、Bmp 特異的シグナルである Smad1/5 のリン酸化、Tgfb と共通のシグナルである Smad4 のリン酸化の亢進が認められた。

Expression of Smads and Phospho-Smads in constitutive Gli1



Gli1 の強制発現は *Wnt3*, *6*, *10a*, *10b* の mRNA 発現を増加させた。

Expression of Wnts genes

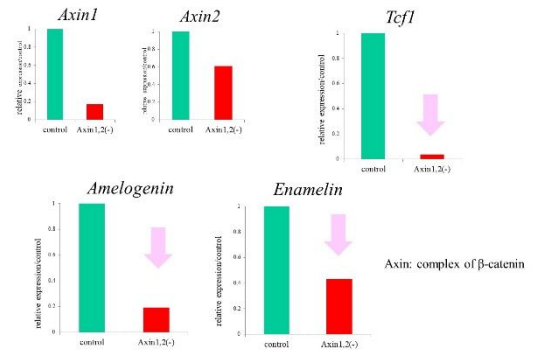


以上の結果より、Shh シグナルは Bmp 産生および Wnt 産生を誘導することが明らかになった。産生された、Bmp は Bmp 下流のシグナルである Smad のリン酸化を誘導していることも確認された。Shh シグナルにより誘導された Bmp および Wnt は、Shh とともにエナメル芽細胞分化を誘導している可能性が示唆された。

(2) Wnt 阻害薬とエナメル芽細胞分化

Wnt シグナルを Axin1/2 発現の抑制によりブロックした結果、エナメル芽細胞分化が抑制された。

The expression of ameloblast specific genes in Axin1 & 2 KO ALCs



さらに、エナメル芽細胞における硬組織形成を Wnt シグナル阻害薬である IWR および Y27632 は抑制した (Data not shown)。以上の結果は、Wnt シグナルのエナメル芽細胞分化における重要な役割を有していることを示唆している。エナメル芽細胞分化においては、Shh、Bmp および Wnt シグナルが相互に関与していることが明らかになった。なお、Bmp および Wnt により Shh 発現の亢進は認められなかった (Data not shown)。

今回、Shh シグナルが Bmp、Wnt シグナルとともにエナメル芽細胞分化を誘導していることが明らかになった。これらの因子を用いることで、エナメル質再生を誘導することが可能になるものと期待される。

< 引用文献 >

S . Takahashi, N. Kawashima, K. Sakamoto, A. Nakata, T. Kameda, T. Sugiyama, K. Katsube, H. Suda, Differentiation of an

ameloblast-lineage cell line (ALC) is induced by Sonic hedgehog signaling, BBRC 353(2007) 405-411

A. Ohazama, S.A.C. Modino, I. Miletich, P.T. Sharpe, Stem-cell-based Tissue Engineering Murine Teeth, J. Dent. Res. 83(7)(2004), 518-522

K. Nakano, R. Morita, Y. Saji, K. Ishida, Y. Tomita, M. Ogawa, M. Saitoh, Y. Tomooka, T. Tsuji, The development of bioengineered organ germ method, Nat. Methods 4(2007) 227-230

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 里美 (TAKAHASHI Satomi)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤
講師

研究者番号 : 40451918