

平成21年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890072

研究課題名（和文） Shhシグナルを軸とした歯の再構築

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

研究代表者

高橋 里美（TAKAHASHI SATOMI）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40451918

研究成果の概要：

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。また、ShhシグナルとBmp (Bone morphogenetic protein)シグナルは協調して働くことが肢芽発生および歯の発生において報告されているが、その機能の詳細はいまだ不明である。本研究において、申請者は、Shhシグナルが直接的にあるいは間接的にBmpシグナルを誘導および活性化している可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

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、Bone morphogenetic protein、Gli、Smad

1. 研究開始当初の背景

近年、歯の再生を目指す報告が目立っている。喪失した歯を再生し、再び機能させるのは歯科医の長年の夢であった。そのために、どの発生時期の上皮あるいは間葉細胞を用いる必要があるのか、どのキャリアーが良いのか、またどのような因子を添加すると良い結果が得られるのか、といった点において現在検討が進められている。

ところで、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直接誘導できる可能性が示唆される。また、Shh シグナルと Bmp (Bone morphogenetic protein) シグナルは協調して各シグナルを増強するといわれているが、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は誘導されることを確認している。

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) エナメル芽細胞における Shh シグナルと Bmp シグナルのクロストークの解明とそのエナメル芽細胞分化への関与
- (2) 歯の再生における Shh および Bmp の有用性の検討
- (3) 臨床における歯の再生に向けての準備

2 . 研究の目的

- (1) エナメル芽細胞における Shh シグナルと Bmp シグナルのクロストークの解明とそのエナメル芽細胞分化への関与
- (2) 歯の再生における Shh および Bmp の有用性の検討
- (3) 臨床における歯の再生に向けての準備

3 . 研究の方法

- (1) エナメル芽細胞における Shh シグナルと Bmp シグナルのクロストークの解明とそのエナメル芽細胞分化への関与
Shh により Bmp 産生は増強される。逆に Bmp により Shh シグナルの増強があるのかについて検討する。また、エナメルマトリックスの発現上昇において Shh および Bmp 両者が協調して作用しているのか否かについて明らかにする。

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 :

BMP2, 4,

Smad1, 5, 8, 4

BMPR type 1, II

機能誘導因子 :

Gli1 発現ベクター

Mouse recombinant Shh

Human recombinant BMPs

解析手法 :

RT-PCR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) 歯の再生における Shh および Bmp の有用性の検討

1 において Shh と Bmp の両者が協調してエナメル芽細胞分化を誘導することが確認できたならば、歯の再生モデルに Shh および Bmp の適用を検討する。適用する濃度、期間、時期などについて至適条件を決定する。なお、歯の再生においてはエナメル質のみならず象牙質および歯髄組織分化の誘導も図る必要がある。Shh シグナルのリセプターである Patched (Ptc) は歯小嚢間葉細胞にも発現しており、Shh が歯髄組織構築においてポジティブに作用する可能性は高い。

- (3) 歯の再生に向けての準備

歯の再構築においては、鐘状期歯胚を上皮と間葉に分け、さらに細胞レベルまで分離した後、コラーゲンマトリックス内に細胞を分散し、腎皮下にて培養する手法にて行う。

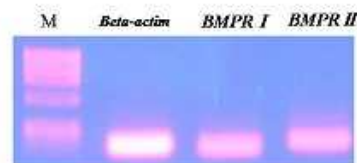
4 . 研究成果

- (1) エナメル芽細胞における Shh シグナルと Bmp シグナルのクロストークの解明とそのエナメル芽細胞分化への関与

ALC における *Bmp Receptor type* , の発現を RT-PCR 法にて確認

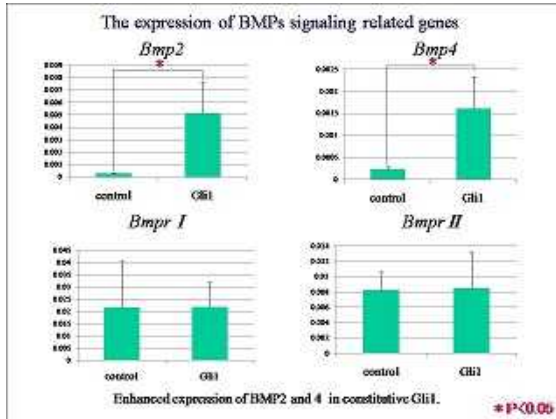
(下図参照)

The expression of BMP signaling related genes in ALC

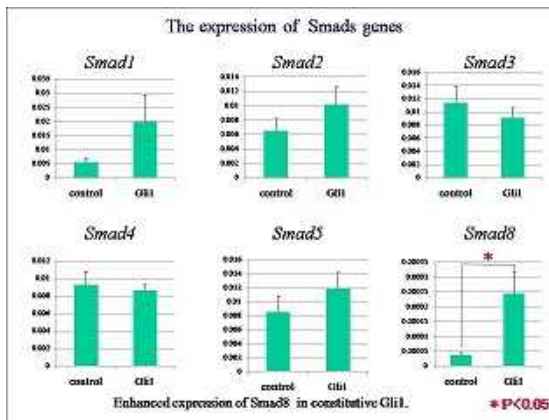


Expression of *BMPR I* and *II* observed in non-treated ALC.

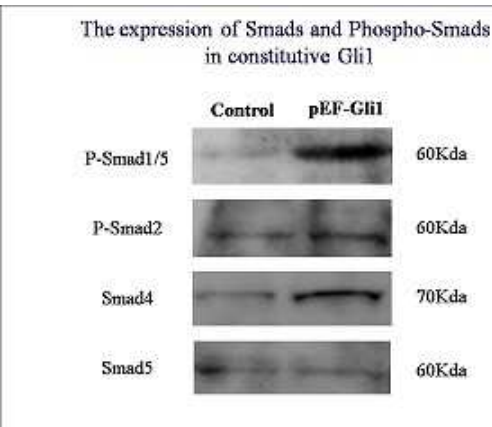
ALCにShhの転写調節因子であるGli1を強制発現させ、リアルタイムPCR法にて*Bmp*関連因子の発現を確認。
*Bmp2*および*Bmp4*の発現の増強が認められた。



同様に*Bmp*の転写調節因子である*Smads*の発現をリアルタイムPCR法にて確認。
*Smad8*の発現の増加が認められた。

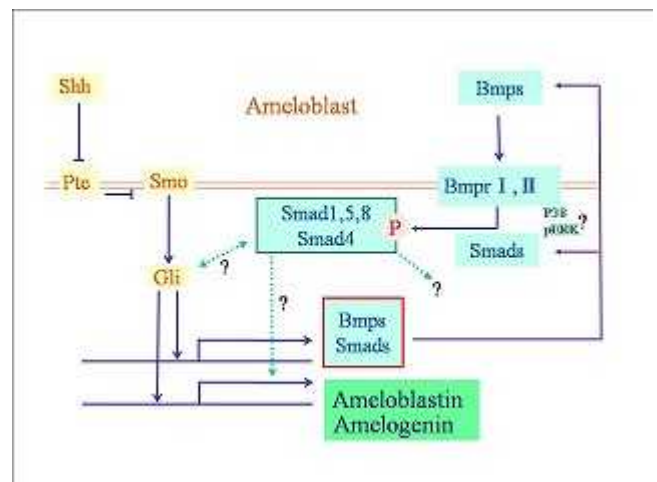


リン酸化*Smad*の発現をウェスタンブロッティング法にて確認。Gli1を強制発現させたALCにおいて、リン酸化*Smad1/5*およびリン酸化*Smad2*の発現の増加が認められた。



結果のまとめ

- 未分化エナメル芽細胞株 ALC において BMP リセプターが発現していたことから、ALC において BMP シグナルが重要な役割を担っている可能性が示唆された。
- ALC に Gli1 を強制発現すると、*Bmp2* および 4 の発現が増加した。すなわち、Shh シグナルにより *Bmp* 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、*Bmp* シグナルにおいて重要な働きを担っている *Smad5* のリン酸化が亢進していたことから、Shh シグナルが *Bmp* シグナルを増強していることが明らかになった。
- *Smad* のリン酸化の一部は産生が増強された *Bmp* により惹起された可能性が高いが、Gli1 あるいは Gli2 が直接関与している可能性も否定できない。今後、Shh および *Bmp* シグナル間での共役システムについて検討を進める。
- さらに、より効率的にエナメル芽細胞の分化を誘導するため、Shh および *Bmp* を同時に作用させることも検討する。その結果を踏まえ歯の再構築について具体的な方策について考える。



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 1 件)

Sun H, Kawashima N, Xu J, Takahashi S, Suda H

Expression of Notch-Signalling-related Genes in Normal and Differentiating Rat Dental Pulp Cells

査読有

Australian Endodontic Journal
2009 in press

[学会発表] (計 2 件)

S Takahashi

Shh Signaling Is Related to BMP Signaling in Ameloblast Differentiation
International association for dental research

2008年7月3日

Metro Toronto convention centre,
Canada

N KAWASHIMA, S TAKAHASHI, H SUDA,
Notch Signaling in the Dental Pulp
International association for dental research

2008年7月3日

Metro Toronto convention centre,
Canada

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 歯学部附属病院 医員

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 歯学部附属病院 助教

研究者番号: 66172605