

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17090

研究課題名(和文)ポリコム群タンパク質Bmi1による骨芽細胞分化促進メカニズムの解明と歯槽骨再生

研究課題名(英文)Clarification of osteoblast differentiation promotion mechanism by polycomb group protein Bmi1 and alveolar bone regeneration

研究代表者

建部 廣明(TAKEBE, Hiroaki)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：40638293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Bmi1は発生過程における分化関連遺伝子の発現を調節すると考えられている。これまでに本研究者は、このBmi1が骨芽細胞で発現し、株骨芽細胞への遺伝子導入により骨形成能が上昇することを予備実験的に明らかにしている。そこで本研究では軟骨内骨化過程におけるBmi1ならびにその関連因子であるSonic hedgehog(Shh)の局在を検索するために脛骨発生モデルおよび、脛骨骨折モデルを用いて実験を行った。Bmi1は脛骨発生過程と骨折修復過程で陽性反応がみられた。さらに骨折修復過程ではShhの局在がみられた。以上の結果から軟骨内骨化や骨折修復過程にBmi1やShhが関連していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞の分化には、BMPs2をはじめとする転写調節因子などの関与が重要であると考えられている。しかし、骨再生時において骨形成を促進する遺伝子については、どの分子が重要であるのかは不明である。近年、Bmi1遺伝子を全身性に欠損したマウスに骨および歯の成長遅延が認められることが報告された。しかし、これまで硬組織形成過程におけるBmi1陽性細胞の局在は報告されておらず、成長遅延は間葉系幹細胞の機能不全に由来すると考えられてきた。本研究では免疫組織化学的手法よりBmi1が骨芽細胞分化に関連していることが明らかとなった。これらの結果は再生歯科医学に有用なツールになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bmi1 is thought to regulate the expression of differentiation-related genes during development. So far, the present investigators have clarified experimentally that Bmi1 is expressed in osteoblasts and that osteogenic ability is increased by gene transfer into established osteoblasts. Therefore, in this study, in order to search the localization of Bmi1 and its related factor, Sonic hedgehog (Shh) in the endochondral ossification process, experiments were conducted using a tibial development model and a tibial fracture model. Bmi1 showed positive reactions during the tibial development and fracture repair processes. Furthermore, Shh was localized during the fracture repair process. These results indicate that Bmi1 and Shh are involved in endochondral ossification and fracture repair process.

研究分野：組織学

キーワード：骨芽細胞 Bmi1 Shh

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎え、口腔疾患の予防と Quality of Life (QOL) の向上を目指した歯科医療が望まれており、歯科医療に対するニーズも高度化、多様化している。このような状況下では、咬合機能を維持することが益々重要であるためインプラント体を歯槽骨に埋入する口腔インプラント治療が広く臨床応用されている。しかし歯槽骨の高度萎縮により、インプラント埋入が不可能な症例も数多く存在するため、歯槽骨の形成促進・再生法の開発が急務となっている。本研究で注目したポリコム群タンパク Bmi1 は、幹細胞マーカーの一つとして、多くの分化関連遺伝子の発現を調節していることが知られている。近年、この Bmi1 遺伝子を欠損したマウスは出生後早期に死亡するが、骨および歯の成長遅延が認められることが報告された (Zhang et al., J Bone Miner Res 25:640-652, 2010; Biehs et al., Nat Cell Biol 15:846-52, 2013)。これまでに本研究者は、骨組織において、Bmi1 が骨芽細胞で発現し、株化骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) における強制発現で石灰化が亢進することを予備実験的に見いだしている。これらは、Bmi1 は幹細胞だけでなく分化の進んだ骨芽細胞においても、機能していることを示唆する所見である。Bmi1 は骨芽細胞の骨形成能を促進していることが予想される。しかし、Bmi1 が調節する下流因子や骨形成促進メカニズムは未だ不明であり、これを解明することは失われた歯槽骨を再生する治療法の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、軟骨内骨化過程のどの段階において Bmi1 の陽性反応が出現するかについて実験動物を用いて比較検討する。Bmi1 はポリコム群タンパクであるため、骨芽細胞分化過程における標的因子を明らかにすることで調節メカニズムが理解できる。また、Bmi1 の上流因子である Sonic hedgehog (Shh) は個体発生における必須因子であることが知られており、本研究者は Shh の下流因子である Gli1 が骨芽細胞分化に関係していることを予備実験的に示してきた。しかし、軟骨内骨化過程における Shh の局在は知られていない。Shh の軟骨内骨化過程における局在を知ることにより、Shh が個体発生だけでなく、骨芽細胞分化にも影響を及ぼしていることを証明する。

3. 研究の方法

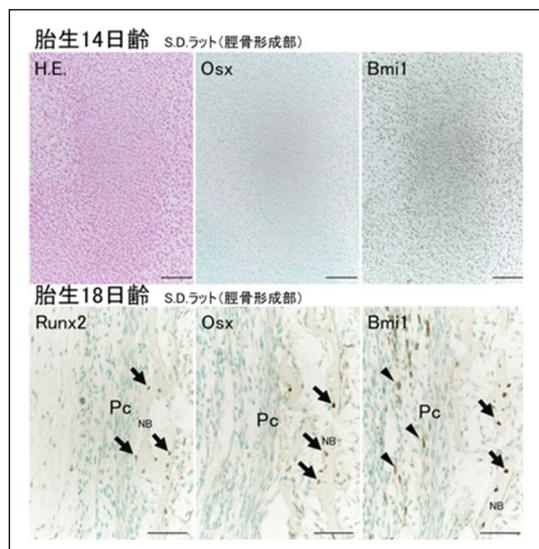
(1) 胎生 14 日、16 日、18 日および生後 21 日の Sprague-Dawley (SD) ラット脛骨のパラフィン切片を作製する。Bmi1 ならびに骨芽細胞分化マーカーとして Osterix (Osx) および Runx2 による免疫組織化学染色にて、軟骨内骨化の骨芽細胞分化過程における Bmi1 の局在を検討する。また、Bmi1 と骨芽細胞分化マーカーの局在範囲の違いについても比較、検討する。

(2) 4 週齢の雄性 SD ラット右側第 8 肋骨を骨折させた。肋骨骨折後 4 日、11 日および、42 日における肋骨骨折部のパラフィン切片を作製する。Bmi1 ならびに骨芽細胞分化マーカーとして Osx および Runx2 の免疫局在を検索する。

(3) Gli1-CreER^{T2}; tdTomato マウスの右側第 8 肋骨を骨折させた。骨折部における Gli1 の局在および、Osx の陽性局在を比較検討する。Gli1 と Osx の局在の検索により、骨折修復家庭でも Shh-Gli1 シグナリングが関連していることが明らかになる。次に 4 週齢の雄性 SD ラット右側第 8 肋骨を骨折させた。肋骨骨折後 1 日、7 日および 14 日における肋骨骨折部のパラフィン切片を作製する。骨折部の Shh および、Osx および Runx2 による免疫組織化学染色を施し、陽性局在を比較、検討する。

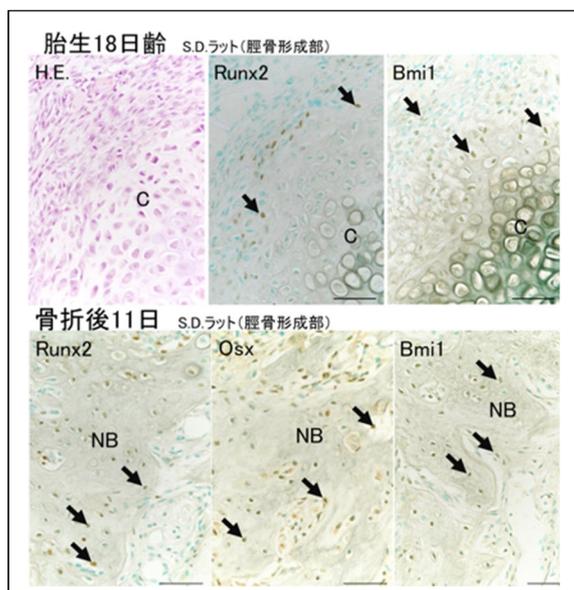
4. 研究成果

(1) ラット脛骨発生時における Bmi1 の局在の検索で、胎生 14 日では、将来脛骨が形成される部位に間葉細胞の凝集を認め、その内部および、周囲の細胞で散在性に Bmi1 の陽性反応がみられた。胎生 18 日になると、肥大化した軟骨細胞と bone collar を形成する骨芽細胞および、その近傍の細胞に Bmi1 と Osx の反応が認められた。一方、骨膜中の細胞も Bmi1 陽性を示したが、Osx の免疫反応は認められなかった。胎生 20 日では厚い骨基質が形成され、Osx 陽性を示す骨芽細胞ならびに前骨芽細胞で Bmi1 の局在が認められた。脛骨形成初期から Bmi1 陽性反応がみられ、脛骨が成熟するにつれて、陽性局在範囲の減少を認めことから、Bmi1 は軟骨内骨化初期の骨芽細胞分化過程に関連している可能性があることが示唆された。これらの結果から Bmi1 が骨芽細胞分化過程に関連していることが示唆された。本研究成果は、第 61 回歯科基礎医学会学術大会 (2019、

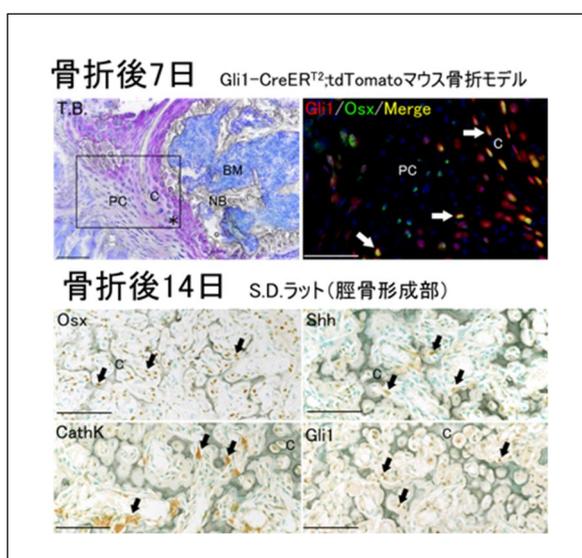


東京)にて発表した。

(2)ラット肋骨骨折後 4 日では骨折部に軟骨形成がみられ、軟骨周囲組織には Runx2 や Osx 陽性反応がみられた。骨折後 11 日では、骨折部に形成された軟骨が吸収し、新生骨形成がみられた。新生骨形成部では、新生骨表面およびその周囲に Osx、Runx2 陽性局在がみられた。一方、骨折後 4 日の Bmi1 陽性反応は骨折部に形成された軟骨周囲にみられた。骨折後 11 日の軟骨吸収部における Bmi1 陽性局在範囲は Osx や Runx2 と同じ範囲にみられた。さらに、骨折後 42 日では、新生骨形成部の骨芽細胞および、骨細胞に Bmi1 陽性反応がみられたが、既存骨においては、陽性反応がわずかであった。これらの所見では、Bmi1 が骨発生過程だけでなく骨折の治癒過程にも関係していることが示唆される。本研究成果は、第 61 回歯科基礎医学会学術大会(2019、東京)にて発表した。



(3) Gli1-CreER^{T2};tdTomato マウス骨折モデルにおいて、骨折部の軟骨周囲では、Osx 陽性細胞がみられ、Gli1 陽性細胞は Osx 陽性細胞と共局在を示した。これらの結果は Shh の上流因子である Gli1 が前骨芽細胞でも発現していることが示唆される。以上から、骨折の治癒過程でも、Shh-Gli1 シグナリングが関連していることが明らかとなった。ラット肋骨骨折モデルでは、骨折後 1 日で、骨折部で Shh、Runx2 および、Osx の局在がみられた。骨折部および骨折部以外の部分における Shh、Gli1 陽性細胞数は、骨折部における Shh、Gli1 陽性細胞数が骨折部以外の部位に比べて有意に多かった。骨折後 7、14 日では、骨折部に Osx、Runx2 の局在がみられた。さらに Osx、Runx2 と同じ局在範囲に Shh、Gli1 の陽性局在もみられた。以上の結果は、骨折治癒過程での骨芽細胞分化に Shh が関連していることを示唆している。本研究成果は、国際誌にて発表した (Takebe et al., Int. J. Mol. Sci., 2020)。



<引用文献>

Zhang HW., et al. Defects in mesenchymal stem cell self renewal and cell fate determination lead to an osteopenic phenotype in Bmi 1 null mice. Journal of Bone and Mineral Research 25,2010, 640-652.
 Biehs, B., et al. BMI1 represses Ink4a/Arf and Hox genes to regulate stem cells in the rodent incisor. Nature Cell Biology 15,2013, 846-852.

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 Shimo Tsuyoshi, Takebe Hiroaki, Okui Tatsuo, Kunisada Yuki, Ibaragi Soichiro, Obata Kyoichi, Kurio Naito, Shamsoun Karnoon, Fujii Saki, Hosoya Akihiro, Irie Kazuharu, Sasaki Akira, Iwamoto Masahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Expression and Role of IL-1 Signaling in Chondrocytes Associated with Retinoid Signaling during Fracture Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2365 ~ 2365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072365	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 Hosoya Akihiro, Shalehin Nazmus, Takebe Hiroaki, Shimo Tsuyoshi, Irie Kazuharu	4. 巻 21
2. 論文標題 Sonic Hedgehog Signaling and Tooth Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051587	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 Takebe Hiroaki, Shalehin Nazmus, Hosoya Akihiro, Shimo Tsuyoshi, Irie Kazuharu	4. 巻 21
2. 論文標題 Sonic Hedgehog Regulates Bone Fracture Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 677 ~ 677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020677	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 Nazmus SHALEHIN, Akihiro HOSOYA, Hiroaki TAKEBE, Md Riasat HASAN, Kazuharu IRIE
2. 発表標題 Osteogenic potential of Gli1-positive cells in periodontal ligament
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 建部廣明、細矢明宏、Nazmus Shalehin、MD Riasat Hasan、入江一元
2. 発表標題 軟骨内骨化過程におけるポリコーム群タンパク質Bmi1の局在
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 建部廣明，細矢明宏，Nazmus Shalehin，入江一元
2. 発表標題 軟骨内骨化過程における ポリコーム群タンパク質Bmi1の局在
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

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----