

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19592136

研究課題名 (和文) 歯髄形成過程における Wnt シグナル制御機構の時空的解析

研究課題名 (英文) Spatial and temporal analysis of regulatory mechanism by Wnt signaling pathway during dental pulp development.

研究代表者 春原 正隆 (SUNOHARA MASATAKA)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：70287770

研究成果の概要 (和文)：近年幹細胞の自己複製制御に Wnt シグナルが関与していることが注目されているが、歯胚形成過程における Wnt シグナル制御機構を詳細に解析している研究は国内外において見当たらない。歯胚形成過程における Wnt シグナルの関与に関して詳細に検討するため、免疫染色法により beta-catenin タンパク質の局在について解析を行った結果、beta-catenin タンパク質は歯胚の全領域で検出され、エナメルノットの細胞質には強い発現が認められた。さらにエナメルノット直下の歯髄間葉細胞においては、核に明瞭なシグナルが認められる細胞が多数確認された。また、in situ hybridization 法にて *beta-catenin* 遺伝子発現状況を解析した結果、上下顎の切歯歯胚および大白歯歯胚において *beta-catenin* 遺伝子の発現が認められた。

また、*Wnt* 遺伝子は、in situ hybridization 法による解析の結果、エナメルノットおよびエナメル器直下の歯乳頭に発現が認められ、免疫染色法による解析の結果においても、エナメルノットおよびエナメル器直下の歯乳頭において Wnt タンパク質の発現が確認された。

他方、Wnt シグナルに関与するシグナルの一つとして PKC が同定されているが、免疫染色法による解析の結果、歯乳頭間葉細胞において PKC-isoform タンパク質の発現が認められ、beta-catenin タンパク質の発現状況とほぼ一致した結果が得られた。さらに in situ hybridization 法による解析においても、エナメル器直下の歯乳頭およびエナメルノットにおいて *PKC-isoform* 遺伝子の発現が確認された。

以上の結果より、エナメルノットおよび歯髄間葉細胞において、Wnt、beta-catenin、PKC の共発現が認められたことから、canonical および non-canonical Wnt signaling pathway がエナメル器および歯髄形成過程に関与している可能性が示唆されたものと考えられる。

研究成果の概要 (英文) : Purpose: Wnt signaling has many critical roles in development and also Protein kinase C (PKC) family plays key roles in the signal transduction pathways within the cell. The function of both Wnt and PKC signaling during tooth development remains unknown. Wnt is known to activate some different pathways and PKC is thought to be involved in the Wnt signaling pathway. In this study, we examined both Wnt and PKC signaling pathway involved in tooth germ development. Methods: We stained serial paraffin sections with an antibody against Wnt gene family, beta-catenin and PKC isoforms by using immunohistochemical methods and we performed in situ hybridization by using Wnt genes and beta-catenin as probes. Results: In mouse embryo at days 16.5 post-coitum, we observed Wnt proteins, beta-catenin and PKC isoforms were expressed in tooth germ by immunohistochemical analysis. Beta-catenin was localized in tooth germ and also the localization of beta-catenin transcript was overlapped with that of Wnt genes. Conclusions: Thus this study clearly indicates that Wnt/protein kinase C signaling pathway are involved in tooth germ development in mice. \*This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (No. 19592136) .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：(1)歯学 (2)歯髄

(3)Wntシグナル (4)遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

生体の様々な組織において「幹細胞」の存在が確認されている。口腔領域では、近年歯槽骨内で歯を支える繊維質で網状の腱である歯周靭帯から幹細胞が単離されたという報告があるものの (Lancet 2004, 364: 149-155, Seo BM et al.)、歯髄形成能を有する幹細胞の分化制御機構を解明するには至っていない。Wntシグナルが幹細胞の自己複製を制御していることは、ごく最近の幹細胞研究の話題の中心の一つであり、歯髄形成におけるWntシグナル制御機構を時空的かつ詳細に解析している研究は国内外において見当たらず、本研究においてWntシグナル制御機構の解析を基盤とした、歯髄形成機構の詳細な解明を行い、歯髄の再生療法への可能性を詳細に検討することは、多くの新規知見と臨床応用の可能性を含んだ極めて重要な研究であると考えられる。申請者は千葉大学大学院医学研究科在籍中より、歯胚発生過程における遺伝子発現状況の解析に従事しており、歯胚発生過程において歯髄幹細胞の発現に関与することが予想される遺伝子に関する基本的な情報を既に得ており (Expression patterns of Raf-1 suggest multiple roles in tooth development. *Calcif Tissue Int.* 1996, 58: 60-64, Sunohara M et al.)、また、歯髄においては既に数種類のWntファミリー遺伝子の発現を確認しており、歯髄幹細胞にWntシグナル制御機構が働いている可能性が極めて高いと考えている。

他方、Wntシグナルに関与するシグナル因子の一つとして、プロテインキナーゼC(PKC)が同定されており、近年、dental follicleにおいてtumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )の発現を濃度依存的に誘導し、歯の形態形成に関与する因子として報告されている (Arch. Oral. Biol. 2003, 48: 643-648)。また、早期鐘状期における内エナメル上皮では、PKC $\beta$  I、PKC $\beta$  IIの発現量の増加が認められ、歯胚発生過程におけるエナメル上皮の分化にPKCが関与するとの報告もある (Expression of Protein Kinases C $\beta$  I,  $\beta$  II, and VEGF during the Differentiation of Enamel Epithelium in Tooth Development. *J Dent Res* 2005, 84:234-239)。申請者が共同研究を行っていた千葉大学医学部小児科と国立感染症研究所の研究グループは、世界で初めてヒト巨核球系細胞株CMKの樹立に成功し、申請者はこの細胞を用いて血小板造血機構におけるPKCの機能解析を詳細に行い成果を挙げている (Cell. Mol. Biol. 2003, 49: 393-398, Sunohara M et al.)。また、ドイツ・Heidelberg大学医学部・解剖学・細胞生物学教室およびMax Planck Institute for Molecular Geneticsとの共同研究において細胞の高次機能・形態変化機構の解析においてはすでに実績を挙げている (FASEB J, 2002, 16: 1850-1852, Sunohara M et al.)。

従って、歯髄形成過程におけるPKCの機能解析と細胞の高次機能・形態変化機構の

解析を詳細に行うことは、歯髄再生のメカニズム解明の糸口となる新たな知見を得る上で非常に重要であると考えられる。

以上より、本研究において、歯髄幹細胞における時空間的な Wnt シグナル制御機構の解析を基盤とした、歯髄形成機構の詳細な解明を行い、歯髄の再生療法への可能性を詳細に検討することは極めて独創的な研究であり、歯髄再生医療の具現化の基盤となるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

生体の各組織における「幹細胞」および幹細胞を取り巻く微小環境である「幹細胞ニッチ」における分化制御機構解明に関する研究が、再生医療の確立に向け脚光を浴びている。歯科領域においては、歯の再生を目指した数多くの研究が行われているものの、歯胚の発生制御機構を解明するには至っていない。歯胚の発生には「幹細胞」、「増殖・分化制御因子」、「足場」の相互作用が不可欠であるため、上記各要素を明らかにするとともに、各要素間相互作用のメカニズムを解明することが歯の再生医療実現に向け急務であると考えられる。近年、多様な分化能を有する歯髄幹細胞の存在が報告されており、歯髄幹細胞の未分化性を維持する分化制御機構の解明は、歯髄再生医療具現化の基盤となる重要な情報を提供するものと考えられる。

申請者らは、本研究により歯髄幹細胞における時空間的な Wnt シグナル制御機構の解明を基盤とした、歯髄再生の臨床応用の可能性を詳細に検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

歯の再生医療の確立に向け、歯胚発生の分子機構に関する多くの研究が行われているが、そのメカニズムは未だ解明されるに至っておらず、*in vitro*での歯の再生は実現されていない。従って、歯胚の発生時期に発現し、歯の形態形成に関与する遺伝子の探索は、歯胚発生の分子機構の解明にあたり急務であると考えられる。また、最近、歯の形態形成にプロテインキナーゼ C (PKC) が関与しているという非常に興味深い報告がある。申請者はヒト巨核球系 CMK 細胞を用いて PKC の役割および細胞の高次機能と形態変化について解析を行い成果を挙げている (Cell. Mol. Biol. 2003, 49: 393-398, Sunohara M et al.)。そこで本研究において、歯髄

再生機構解明の糸口となる新規知見を得るため、歯髄幹細胞における PKC の機能解析を行うとともに、ごく最近、幹細胞で重要な制御因子として注目されてきた Wnt シグナル、Notch シグナルと歯髄形成の分子メカニズムとの関連性を明らかにするため、遺伝子発現解析法およびプロモーターアッセイ法を行い、さらに、歯髄幹細胞とニッチ細胞間相互作用に関する分子メカニズムについて解明するため、遺伝子発現解析法を用いて解析を行う研究計画を立案した。

## 4. 研究成果

近年幹細胞の自己複製制御に Wnt シグナルが関与していることが注目されているが、歯胚形成過程における Wnt シグナル制御機構を詳細に解析した報告はない。そこで歯胚形成過程における Wnt シグナルに関し詳細に検討するため、免疫染色法により beta-catenin タンパク質の局在を解析した結果、beta-catenin タンパク質は歯胚の全領域で検出され、特にエナメルノットの細胞質においては強い発現が認められた。さらにエナメルノット直下の歯髄間葉細胞においては、核に明瞭なシグナルが認められる細胞が多数検出された。また、*in situ* hybridization (ISH) 法にて *beta-catenin* 遺伝子の発現状況を解析した結果、上下顎の切歯歯胚および大白歯歯胚において *beta-catenin* 遺伝子の発現が認められた。

また、*Wnt* 遺伝子は、ISH 法にてエナメルノットおよびエナメル器直下の歯乳頭に発現が認められ、免疫染色法を用いた解析結果においても、エナメルノットおよびエナメル器直下の歯乳頭において *Wnt* タンパクの発現が確認された。

他方、*Wnt* シグナルに関与するシグナルの一つとして PKC が同定されているが、免疫染色法による解析の結果、歯乳頭間葉細胞において PKC-isoform タンパクの発現が認められ、beta-catenin タンパクの発現状況とほぼ一致した結果が得られた。さらに ISH 法による解析においても、エナメル器直下の歯乳頭およびエナメルノットにおいて *PKC-isoform* 遺伝子の発現が確認された。

以上より、エナメル器および歯髄形成過程において canonical および non-canonical Wnt signaling pathway が共に関与するとともに重要な役割を果たしている可能性が高いことが示唆されたと考えられる。

本研究により得られた知見は、歯髄における高次血管構築制御機構の解明、さらには、他の生体各組織の高次構造および機能

維持機構の解明に向け、多大な貢献が期待できると考えられ、今後継続したさらなる詳細な解析が必要であると考えられる。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

① M. SUNOHARA[発表者(代表)]

Regulatory mechanism of tooth development by intracellular signal transduction pathway.

39th Annual meeting & exhibition of the AADR, #1139, 5 March, 2010, Washington, DC, USA

② M. SUNOHARA[発表者(代表)]

Role of the intracellular signal transduction molecules involved in tooth development.

Acta Anatomica Niponica, Volume85, Supplement, 176, 3P-014, 30 March 2010, Morioka

③ M. SUNOHARA[発表者(代表)]

Analysis of signaling pathway involved in tooth germ development.

Acta Anatomica Niponica, Volume84, Supplement, 190, P1-101, 28 March, 2009, Okayama

④ M. SUNOHARA[発表者(代表)]

Expression patterns of the intracellular signal transduction molecules involved in tooth development.

The 32nd Annual meeting of the Molecular Biology Society Japan, 507, 4P-0586, 12 Dec. 2009, Yokohama

⑤ M. SUNOHARA[発表者(代表)]

Regulation of blood vessels formation by Wnt signaling pathway during tooth development.

Acta Anatomica Niponica, Volume83, Supplement, 219, P2-081, 28 March, 2008

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者:

春原 正隆 (SUNOHARA MASATAKA)  
日本歯科大学・生命歯学部・准教授  
研究者番号: 70287770

##### (2) 研究分担者

宮戸真美 (MIYADO MAMI)  
日本歯科大学・生命歯学部・助教  
研究者番号: 00386252  
(H19→H20: 連携研究者)

##### 研究協力者

村田英崇 (MURATA HIDETAKA)  
日本歯科大学・大学院生命歯学研究科・大学院生