

総説

「ニワトリの歯」から第三成歯への道

上野直人

北海道大学 薬学部 〒060 札幌市北区北13条7丁目

(受理：平成7年12月20日)

はじめに

生体の器官の多くは上皮と間充織の相互作用によって形成されることが知られている。たとえば皮膚の誘導は主に外胚葉に由来する外側の表皮と中胚葉に由来する真皮の二つの組織からなっており、それらの二つの組織の相互作用の結果として毛や汗腺、乳腺などの皮膚に特徴的な構造が形成される。また歯の形成においても同様の上皮-間充織相互作用が必須である。上皮-間充織相互作用において間充織（中胚葉）は外胚葉に指令的に働き、そこには何らかのシグナル分子の介在が必要であると考えられていた。最近になって、細胞増殖因子がこれらの細胞間相互作用におけるシグナル分子として機能することが明らかにされた。実際に歯の発生過程では歯の間充織と歯上皮の相互作用を裏付けるように、TGF- β ファミリーに属する骨形成タンパク質（BMP）の遺伝子が発現することが示された。2種類のBMPの遺伝子発現が上皮、間充織において時間的・空間的な発現調節を受けているばかりでなく、BMPタンパク質は間充織に作用し、in vivoの歯の発生時にみられる特異的な遺伝子発現を誘導できることから、BMPは歯の発生におけるシグナル分子として極めて重要な役割を担っている可能性がある。

一方で、BMPは歯の形成以外にも初期発生における中胚葉誘導、背腹軸形成、四肢のパターン形成など形態形成においても重要であることがわかってきた。両生類やショウジョウバエなどの下等動物をモデルとした研究から、その遺伝子発現の調節機構やシグナル伝達経路の下流に位置する遺伝子についても情報が集積しつつある。これらの情報をもとにBMP誘導因子を過剰発現させ、BMP遺伝子の発現を誘起することができれば、歯の形成スイッチをONにすることも可能かもしれない。

「ニワトリの歯」とは1000万年もの間、歯を形成したことのないニワトリにマウスの臼歯の間充織の誘導によって歯を形成させたという実験であるが、この実験を分子レベルで再現する時期がきている。

上皮-間充織相互作用にかかわる役者たち

発生過程における一連の形態形成にはさまざまな因子が介在し、最終的に標的細胞の核において、特定遺伝子の発現を調節することによって複雑な細胞間相互作用を制御しているものと考えられる¹⁾。この現象を分子レベルで見た場合には、それぞれのステップに関わる因子を以下のように分類することができる。

- 1) 液性因子（細胞増殖因子、ホルモンなど）
- 2) 膜受容体（ホルモン受容体、増殖因子受容体など）
- 3) 細胞内因子（タンパク質リン酸化酵素など）
- 4) 転写調節因子（ホメオボックスタンパク質など）
- 5) 細胞外マトリックス（細胞接着分子、プロテオグリカンなど）

すなわち、これらの因子の連鎖的反応によって高次の

形態形成が遂行するのである。もちろんこれらの反応は見かけ上「クローズドサークル」であり、何が最初の引き金であるかは「ニワトリと卵」の議論になる。したがって本稿では便宜上、液性因子から始まると仮定する。

液性因子はその名のとおりに、血液などに運搬され標的器官へ到達し、その作用を発揮するホルモンなどの分子を指す。しかし近年、細胞間相互作用を調節するとして注目されている細胞増殖因子は、細胞外に分泌されることから液性因子に分類されていたものの、実際には産生細胞自身やそのごく近傍にとどまっていることが知られており、内分泌(endocrine)というよりむしろ、傍分泌(paracrine)あるいは自己分泌(autocrine)的に作用する因

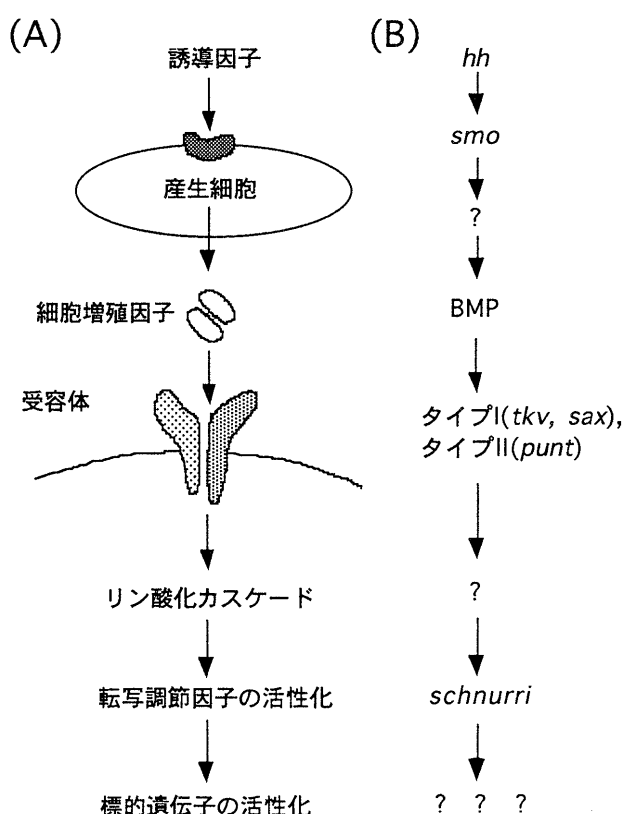


図1

子として認識されている。細胞増殖因子はその構造の類似性からいくつかのファミリーに分類されており、FGF（線維芽細胞増殖因子）ファミリー、EGF（上皮増殖因子）ファミリー、TGF- β （形質転換増殖因子ファミリー）などが知られている。これらの細胞増殖因子は細胞外へ分泌される、いわゆる「分泌タンパク質」であり、したがって多くの細胞増殖因子の最初の翻訳産物は、分泌されるために必要な疎水性アミノ酸からなる「シグナル配列(signal sequence)」をもつが、FGF1（酸性FGF）、FGF2（塩基性FGF）などはこのシグナル配列をもたず、分泌メカニズムに興味をもたれている。いずれにしても、何らかのメカニズムで細胞外に分泌された因子はどのような運命をたどるのであろうか。すでに述べたように、多くのホルモンのように血中を循環していることが確認されている増殖因子もあるが、FGFのように細胞外マトリックスに蓄積している増殖因子も多い。これらの観察結果から、細胞増殖因子は産生された細胞の近傍で機能する局所因子(local factor)として注目されるようになった。また活性型以外にも不活性な前駆体として存在するものも多く知られており、不活性な増殖因子が必要に応じて活性化されるメカニズムも存在するといわれている。とくにTGF- β ファミリー因子の場合、前駆体が酵素によってプロセッシングを受けることが

必須であり、この活性化が増殖因子の機能発現を厳密に調節しているといえる。したがって、上皮-間充織相互作用の調節においては接触する細胞層と細胞層の間でこのような調節が行われている可能性がある。

こうして活性化された増殖因子は初めてその機能を発揮することができるようになる。増殖因子は標的細胞の細胞膜に存在する特異的受容体に結合し、細胞増殖因子受容体はその細胞内領域の構造によって、大きく2つに分類することができる。ひとつは細胞内領域にチロシンリン酸化酵素（チロシンキナーゼ）を有するものと、セリン/スレオニンリン酸化酵素（セリン/スレオニンキナーゼ）を有するものである。FGFファミリーやEGFファミリーの受容体は前者であり、TGF- β ファミリーの場合、後者を受容体とする。受容体に結合したリガンド（増殖因子）は受容体の二量体化(dimerization)を引き起こし、受容体自身の細胞内領域をリン酸化する。この化学変化が受容体と次のシグナル伝達因子との親和性を高め、両者の直接の結合を促す。チロシンキナーゼ型受容体の場合、この受容体に結合するシグナル分子としてはGrb2(growth factor-binding protein 2)などが知られている。さらにMAP(mitogen-activated kinase)キナーゼなどいくつかの伝達分子を経て、細胞外からの情報は細胞の核へと伝えられていく。受容体から核に到達するまでの過程はブラックボックスであったが、最近急速にその情報伝達経路が明らかにされつつある。

核では増殖因子からの刺激に応じて「転写調節因子」が活性化され、DNAに直接結合し遺伝子の転写を活性化したり、あるいは逆に抑制したりする。この転写調節因子には、その一次構造によってホメオボックスタンパク質やZnフィンガータイプ、HLH（ヘリックスループ-ヘリックス）タイプなどに分類され、それぞれの転写調節因子によって調節を受ける標的遺伝子が決まっている。細胞接着分子なども細胞増殖因子によって制御される転写調節因子の標的の一つである。最終的にこの標的遺伝子の活性化あるいは抑制が、細胞増殖因子による細胞の変化、そして細胞の個性を決めていくといえよう。細胞間相互作用の分子レベルでの理解、および人工的な制御のためには、これら遺伝子発現調節に至るまでの一連の「カスケード」（図1, A）を理解することは避けては通れない。

注目されているヘッジホッグ・dppカスケード

細胞増殖因子は初期発生形態形成におけるさまざまな局面で、重要な調節因子として機能しているといわれている。TGF- β スーパーファミリーに属する骨形成タンパク質（BMP）は、骨や軟骨の形成を促進するタンパク質としてウシの長骨から精製された因子である。遺伝

子クローニングによって、BMPには金属酵素様構造をもつ分子量10万のBMP-1とTGF- β スーパーファミリーに属するBMP-2からBMP-8までのサブユニットの構造が明らかにされており、とくに、BMP-2とBMP-4は、成熟タンパク質部分のアミノ酸配列が98%と構造が酷似している。そもそも骨誘導因子として発見された因子も、その生物活性に意外な一面があった。アフリカツメガエルからもアクチビン関連遺伝子としてBMP-2、BMP-4、BMP-7の遺伝子が単離されており²⁾、これらBMPは個体発生の早い時期からmRNAあるいはタンパク質として存在していることから、BMPは骨形成以外の生理作用を有していること示唆していた。また初期発生における発現パターンはそれぞれ異なっており、個体発生においても各サブユニットは異なった役割を担っているものと考えられる。BMPの初期胚での機能についてはmRNAの初期胚への注入実験によって明らかにされている。BMP-4を受精後の4あるいは8細胞期に、将来背側になる割球に注入し過剰に発現させると、背側になるべき組織が腹側化することから、アクチビンが背側の形成に関わっているのに対して、BMP-4は腹側化因子であると予想された^{3, 4)}。このようにTGF- β スーパーファミリーに属するアクチビンやBMP（骨形成タンパク質）は両生類の初期胚の体軸、とくに中胚葉の背腹軸に添ったパターンの形成に関わっていることが明らかにされたのである。すなわち、われわれヒトを含めた動物は腹と背では分布する組織（臓器）が異なる。このパターンを形成するのに細胞増殖因子が一役買っているというわけである。たとえばBMPはそのほかにも、神経管の前後軸のパターン形成にも関わっているほか、その遺伝子はさまざまな臓器や皮膚でも発現していることが知られている。

興味深いことにこのBMPはショウジョウバエにも相

同な遺伝子dppが存在する⁶⁾。ショウジョウバエのdppは初期胚の背腹軸のパターン形成に以上のある突然変異の解析から見つかった遺伝子でBMP-2やBMP-4良く似たタンパク質をコードしていることが知られている。しかも、ハエ由来dppのリコンビナントタンパク質をマウスの筋肉中に埋植すると異所性に骨や軟骨を誘導し、逆にヒトBMP-4遺伝子をハエに遺伝子導入することによって、dpp変異による表現型を正常に回復（救助）することができる⁷⁾。この事実は哺乳動物のBMP-4とショウジョウバエのdpp遺伝子産物は構造的にも機能的にも相同であることを示しているといえよう。またショウジョウバエにはBMPタイプI受容体に相当するtkv(thick vein)、sax(saxophone)やタイプII受容体に相当するpuntなどが同定されており、ショウジョウバエを用いた研究の利点の一つである遺伝学的解析を駆使して最近、dpp(BMP) シグナルの下流に位置するZnフィンガータイプの新しい核内転写調節因子の遺伝子schurriが発見されている^{8, 9)}。動物種間で保存された遺伝子あるいは情報伝達系の解析における有利な点は、このようにさまざまなモデル動物を用いて得られた情報、概念を、そっくり他の動物に移して応用することが可能であることである。このschurriの哺乳動物における相同遺伝子は、骨形成などBMPのシグナル伝達に介在する因子として注目されている。またBMPはMsxやlab(labial)などのホメオボックス遺伝子を活性化することも知られており、とくにMsx-2は歯の形成にも関与しているらしい。

現在、BMP(dpp) の遺伝子発現を正に調節している因子として脚光を浴びている分子氏がヘッジホッグ(hedgehog, hh)である。ヘッジホッグもやはりショウジョウバエで見つかった遺伝子であるが、ショウジョウバエではdppの上流でdpp発現を支配する、細胞増殖因子様のタンパク質であると考えられている。脊椎動物にもhhは存在し、ニワトリ肢芽のパターン形成においてヘッジホッグは肢芽後部のZPA領域で発現し、同領域でのBMPの発現を誘導することによって指のパターンを決定するモルフォゲン(morphogen)として働いていることが示されている¹⁰⁾。hhにも特異的膜受容体が存在し、ショウジョウバエではsmo(smoothened)と呼ばれる遺伝子の産物であると考えられている。したがって、これらを統合すると図1, Bのようなカスケードが想定される。

歯の誘導におけるBMP

歯も上皮と間充織の相互作用によって形成される組織である。BMPが上皮で強く発現していることから、BMPは歯の形成にも関わっていると予想されていた。発生過程での顎のBMP-2あるいはBMP-4のmRNAをin situ hybridizationで調べると、発生が進むにつれてそれ

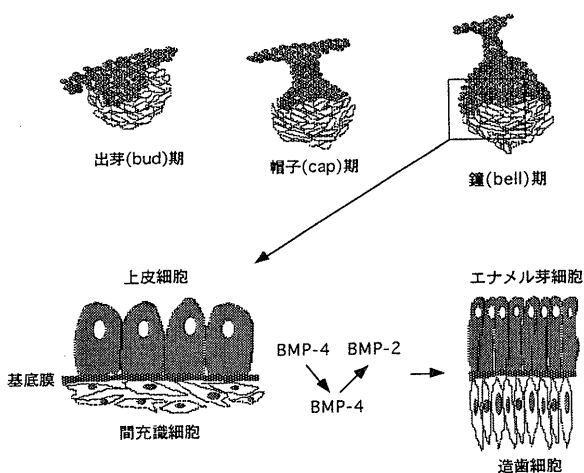


図2

らの遺伝子発現が時間的・空間的に刻々と変化していくことがわかった¹¹⁾。最初に上皮に発現したBMP-4は間充織にBMP-2の発現を誘導するといったように、BMPが細胞間相互作用のシグナル分子として働いていることを示唆している(図2)。また歯上皮(tooth epithelium)は歯胚(tooth germ)と呼ばれる中胚葉を、一見して透明な組織に分化させMsx-2などの転写調節因子の遺伝子を活性化するが、歯上皮のかわりにリコンビナントBMP-4を吸着させたビーズを接触させ培養しても、同様な分化が誘導されることが示された。歯の形成においてBMPは上皮間充織相互作用における重要な誘導シグナルを担っているらしい。また最近、ヘッジホッグが歯胚においても発現していることが示され、hh→BMPカスケードは歯の発生においても保存されていると考えられる。

さて、これらの事実が明らかにされつれ、このBMPカスケードを人工的に模倣することができれば、あらたに歯をつくるのが理論的には可能であるという気がしてくる。このカスケードを構成するさまざまな部品が作用点となりうる。活性型受容体、細胞内キナーゼ、転写調節因子の導入によって、BMPの非存在下でもBMPの歯を形成するために必要なシグナルを細胞に送ることができるのではないだろうか。しかし、これには一つの重要な前提がある。受け手(標的)となる細胞に核における遺伝子発現までの応答能(competence)が維持されていることが必要なのである。BMPシグナルを伝達するのに必要かつ十分な活性型キナーゼを導入しても、それ以降のシグナルの担い手となる例えばシグナル伝達因子が存在しなければ、BMP作用の最終点である歯の形成まではたどり着くことはできない。冒頭に述べた「ニワトリの歯」の実験が成功したのは、ニワトリ歯上皮に誘導物質に対する応答能があったからである。

おわりに

BMPと歯の形成に関する直接的な証拠はまだ得られているわけではない。BMP以外にもFGFがエナメル・ノット(歯の形態形成における形成中心)の形成に重要であることも示されており、複数の細胞増殖因子の相互作用も想定すべきである。また、歯の形成における単独の細胞増殖因子の機能を探るためには、マウスを用いて歯特異的発現を制御するプロモーター支配下でBMPシグナルを遮断する変異受容体(ドミナントネガティブ受容体)を発現させるなどの実験が行われるであろう。このように細胞増殖因子の種類を問わず、その情報伝達系の解析はさまざまなモデル動物を駆使して進んでいくものと期待される。

参考文献

- 1) Melton, D.A. et al. Cell 68, 257-270 (1992)
- 2) Nishimatsu, S. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186, 1487-1495 (1992)
- 3) Dale, L. et al. et al. Development 115, 573-585 (1993)
- 4) Jones, C.M. et al. Development 115, 639-647 (1993)
- 5) Graham, A. et al. Nature 372, 684-686 (1994).
- 6) Padgett, R.W., St Johnston, R.D. and Gelbert, W.M. Nature 325, 81-84 (1987)
- 7) Padgett, R.W., Wozney, J.M. and Gelbert, W.M. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 2905-2909 (1993)
- 8) Arora, K. et al. Cell 81, 781-790 (1995)
- 9) Grieder, N.C. et al. Cell 81, 791-800 (1995)
- 10) Riddle, R.D. et al. Cell 75, 1401-1416 (1993)
- 11) Vanio, S. et al. Cell 75, 45-58 (1993)