

平成21年5月8日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2005～2008

課題番号：17209062

研究課題名（和文） 上皮間葉相互作用を模倣した歯胚再生モデルに関する研究

研究課題名（英文） Establishment of Information Basis for Tooth Regeneration

研究代表者

窪木 拓男（KUBOKI TAKUO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

研究成果の概要：マウスの歯の発生時に認められる遺伝子を検索し、従来報告のなかった 28 個の遺伝子を同定した。エナメル質形成細胞の成熟は、周囲に存在する細胞が制御していることを証明した。高脂血症治療薬（スタチン）は、象牙質の形成を促進し、歯科治療薬として応用しうことを示した。顎骨に存在する細胞は、手足の骨の細胞とは異なる性質を有していること、また、顎骨の再生促進に成長因子（結合組織成長因子、塩基性線維芽細胞増殖因子）が応用可能であることを確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	18,600,000	5,580,000	24,180,000
2006 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
総計	37,600,000	11,280,000	48,880,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯科・補綴系歯学

キーワード：歯胚再生、上皮間葉相互作用、発生・分化、マスターキー遺伝子、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

歯の再生は歯科リハビリテーション医学にとって究極の目標である。本研究課題は歯の包括的な器官としての再生を目的に計画された。以下に、本研究課題を構成する小項目を挙げる。

(1) 歯胚発生関連遺伝子の検索について

BMPs、MSX、Shhなど歯の発生や形態形成に関連する因子はこれまで多く研究されてきた。これらの知見を基礎として、齧歯類の歯の再生技術は著しい進展を遂げ、ヒトへの応用が期待されている。し

かしながら、これらの齧歯類での報告においても再生された歯の形態や大きさの制御は達成されておらず、将来的なヒトへの臨床応用に向けて解決すべき課題として残されている。すなわち、歯の形態形成、サイズ・方向性を制御する因子の同定と、そのメカニズムの解明が待たれている。

(2) 歯髓幹細胞の分化制御について

歯髓を構成する細胞を、分化・増殖因子を用いて活性化し、象牙質を再生もしくは修復象牙質の形成を促進させようとする試みがこれまでの多くなされてきた。中には

高い象牙質形成促進効果が報告されているものもあるが、これらの分化・増殖因子を用いる手法はその安全性や生産コストが問題となっており、いまだ臨床応用には至っていない。一方、高脂血症治療薬であるスタチンは、コレステロール産生を抑制するだけでなく、BMP-2 経路を介して、骨芽細胞や間葉系幹細胞の骨系分化促進効果を持つことが知られている。しかしながら、スタチンが象牙質形成細胞に与える影響はいまだ明らかとなっていない。

(3) エナメル質の再生（エナメル芽細胞の検索）について

器官としての歯の再生を考えた場合、歯冠部を構成するエナメル質の再生は必須である。そのため、培養レベルでエナメル芽細胞を分離することが期待されている。齧歯類ではその発生学的特徴から、成体からもエナメル芽細胞やその前駆細胞を分離することが可能であり、多くの基礎研究が行われてきた。しかし、ヒトのエナメル芽細胞は、歯の萌出後に消失することから、その培養は困難を極め、これまでに詳細な検討は行われていない。

(4) 歯槽骨再生について

機能単位としての歯の再生のためには、再生した歯そのものを維持するための歯槽骨が必要となる。神経堤由来の歯槽骨は、中胚葉由来の骨と発生学的に異なることから、再生に対するアプローチも異なる可能性がある。これまで、長管骨の再生研究は数多く行われてきた。しかし、歯槽骨を中心に、その発生学的差異を考慮したうえで、骨再生を検討した報告はほとんどない。

2. 研究の目的

(1) 歯胚発生関連遺伝子の検索について

歯の発生は、シグナル分子や転写因子をはじめとした、多くの遺伝子によって緻密な制御を受けており、なかでも転写因子は重要な役割を担っていることがヒトやマウスの研究で明らかとなっている。しかし、歯の発生メカニズムの全貌はいまだ不明な点を多く残しており、その背景には未解明の分子機構や未報告の遺伝子が存在していることが原因のひとつとなっていると推測されている。そこで、転写因子を中心としたマウス遺伝子発現データベースを利用し、これまで歯の発生期に発現していることの報告のない因子を網羅的にスクリーニングすることとした。

(2) 歯髓幹細胞の分化制御について

象牙質形成能を有することで知られている歯髓幹細胞 (Dental Pulp Stem Cells; DPSCs) をヒトから分離し、代表的なスタチンであるシンバスタチンが本細胞の細胞動態へ与える影響を *in vitro*、*in vivo* で検討することとした。

(3) エナメル質の再生（エナメル芽細胞の検索）について

ヒトの組織から、エナメル芽細胞、もしくはその前駆細胞を分離すること、ならびにその分化を制御するメカニズムを検討することを目的とした。

(4) 歯槽骨再生について

これまで中胚葉由来の長管骨などで検討されてきた成長因子を応用した骨形成・骨再生促進が、神経堤由来の歯槽骨においても有効かを検討する。並行して、発生学的な由来を異にする歯槽骨と長管骨の骨芽細胞のキャラクターの違いを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯胚発生関連遺伝子の検索について

① 候補因子の抽出: 発生期歯胚で発現する候補因子は、国立成育医療センター研究所で構築されたマウス遺伝子発現データベース「EMBRY」から抽出した。すなわち、本データベースに収容されている転写制御因子 1520 因子の中から、胎生 11.5 日胚の上顎突起あるいは下顎弓に発現している因子をすべて抽出した。

② 歯胚での発現の検証: マウス胎生 13.5 ならびに 14.5 日胚の前頭断組織切片を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて全ての候補因子の歯胚での発現の有無を検証した。そのうち、歯胚での発現を確認できた因子については、胎生 16.5 および 18.5 日胚においても同様に発現パターンを検証した。

(2) 歯髓幹細胞の分化制御について

岡山大学倫理委員会の許可を得て、ヒト DPSCs を分離・培養し、以下の項目に対するスタチンの効果を検討した。

① *in vitro* 解析（細胞数解析、細胞周期解析、象牙芽細胞分化関連遺伝子発現）

② *in vivo* 解析（免疫不全マウスへの細胞移植実験）

(3) エナメル質の再生（エナメル芽細胞の検索）について

ヒトの歯の発生パターンから、歯冠形成期の歯小囊には外エナメル上皮を中心とした、上皮細胞組織が付着していることが明らかである。したがって、この歯小囊組織から、酵素処理によって上皮細胞を分離・培養し、その遺伝子発現プロファイルや増殖特性を検討した。同時に、初期のエナメル芽細胞メーカー遺伝子であるアメロゲンinを指標として、その上皮細胞の分化に与える間葉細胞の影響を検討した。

(4) 歯槽骨再生について

ウサギの下顎骨ならびに脛骨から骨髄を分離し、間葉細胞と破骨細胞を得た。間葉細胞はそれぞれ塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic Fibroblast Growth Factor; bFGF) を添加した培地で培養し、その増殖や骨系分化に与える影響を検討した。また、その破骨細胞形成支持能を確認するため、脾臓細胞との共培養を行った。in vivo では下顎骨ならびに脛骨骨髄に直接 bFGF を注入し、4 週後の骨形成誘導効果を組織学的に検討した。

次いで、結合組織成長因子 (connective tissue growth factor; CTGF) の骨形成誘導効果を検討した。具体的には、多孔性ハイドロキシアパタイトスカホードに CTGF を含浸させ、ウサギの下顎骨に作製した骨欠損部に移植した。4 週後のスカホード内部への骨形成状況を組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 歯胚発生関連遺伝子の検索について

歯胚で発現する未報告遺伝子 28 因子を同定した。28 因子のうち、15 因子が DNA 結合ドメインを有する転写因子、13 因子が転写コファクターなどその他の転写関連因子であった。15 の転写因子の中には、胎生期の体軸のパターン形成に関わる Hox 遺伝子である *Hoxb6* (図 1) や *Hoxc12*、同じファミリーに属する遺伝子が歯胚発生に重要であることが報告されている *Pitx3* などが含まれていた。また、ヒトでの変異により先天的な歯数不足を呈する事が報告されている *Tcfap2b* も含まれていた。その他の転写関連因子の中には、基本転写因子 TFIIID の複合体に含まれ、転写コファクターとして働く *Taf10* などの因子があった。本研究は、当初の推測通り、歯の発生に関わる未報告の遺伝子が多数存在する事を明らかにした。

今後これらの因子の歯胚発生における機能を解析することで、歯の発生メカニズムの解明に多大な貢献をするものと考えられ

る。また、これらの発生学的知見は歯の再生技術の進展にも貢献するものと期待できる。

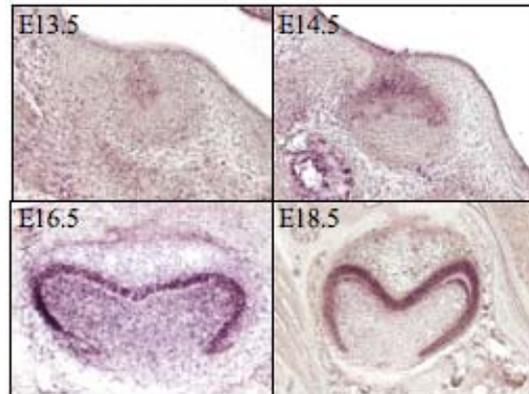


図 1. in situ hybridizationの結果の一例 (*Hoxb6*の発現パターン)

(2) 歯髄幹細胞の分化制御について

スタチンを 1 mM の濃度で作用させると、アポトーシスを誘導することなく、DPSCs の増殖は抑制された。この効果は、スタチンがメバロン酸-Rho 経路を介して、細胞周期を制御することによるものであることを確認した。また同濃度のスタチンは in vitro で、dentin sialophosphoprotein (*dspp*) とオステオカルシン (*ocn*) の遺伝子発現を強力に促進した。免疫不全マウスへの細胞移植実験では、強い硬組織形成促進能を有していることを確認した (図 2)。この効果は象牙質形成促進効果を有していることが知られている BMP-2 と同等か、さらに強力なものであった。

安価で安全性の確認されているスタチンが象牙質形成促進効果を有するならば、生物学的に象牙質形成を促進する新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

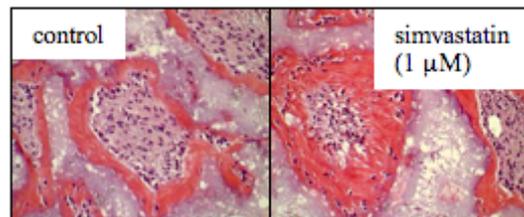


図 2. 細胞移植実験の結果
スタチンを作用させたDPSCsを免疫不全マウス背部皮下に移植したところ、コントロールと比較して多量の硬組織形成を認めた。

(3) エナメル質の再生 (エナメル芽細胞の検索) について

歯小囊組織からは典型的な上皮細胞の形態を持ち、上皮細胞マーカーであるサイト

ケラチンと、初期のエナメル芽細胞マーカーであるアメロゲン遺伝子を発現している細胞が得られた(図3)。コントロールとして使用した歯肉上皮細胞は、アメロゲン陰性で、歯小囊上皮細胞と比較しても分裂可能回数が少ないものであった。また、歯小囊上皮細胞におけるアメロゲン遺伝子の発現は、歯乳頭間葉細胞と混合共培養することで強く促進された。この遺伝子発現促進効果、すなわち分化促進効果は、チャンバーを利用した分離共培養では認めないことから、歯小囊上皮細胞と間葉細胞の直接的な接触を介して行われていると推測された。また、歯小囊上皮細胞と常に接している歯小囊間葉細胞の分化促進効果は、歯乳頭間葉細胞と比較してたいへん低く、本上皮細胞の分化は周囲の間葉細胞によって巧妙に制御されていることが明らかとなった。

今後は、本上皮細胞の分化を制御するメカニズムをさらに詳細に解析するとともに、エナメル質再生への応用可能性を検討する予定である。

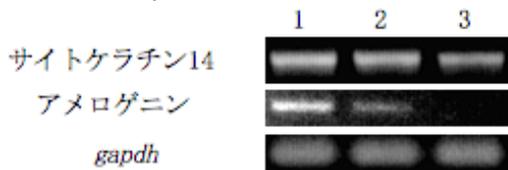


図3. 培養上皮細胞における遺伝子発現プロファイル
歯小囊上皮細胞はアメロゲン陽性だが、歯肉上皮細胞は陰性であった。(1レーン；歯小囊上皮細胞P0、2レーン；歯小囊上皮細胞P5、3レーン；歯肉上皮細胞)

(4) 歯槽骨再生について

骨髄へのbFGF局所注入4週後の骨を組織学的に評価すると、下顎骨では明らかな新生骨形成を認めたが、脛骨では認めなかった。下顎骨ならびに脛骨骨髄から分離した骨髄間質細胞において、神経堤由来の下顎骨由来細胞は、中胚葉由来の骨由来細胞とは明らかに異なる性質を有していた。すなわち、増殖能、遊走能は下顎骨骨髄間質細胞が最も高く、骨芽細胞分化能、破骨細胞形成支持能は脛骨骨髄間質細胞が最も高かった。

また、CTGFはインテグリン $\alpha_v\beta_3$ -p38 MAPK経路を活性化することで、骨髄間葉細胞の細胞接着を亢進すること、細胞の増殖や遊走を亢進することを確認した。CTGFを含む浸させたハイドロキシアパタイトスカホードへの下顎骨への移植実験では、CTGFはスカ

ホード深部への細胞誘導促進効果を有していることを明らかにした。

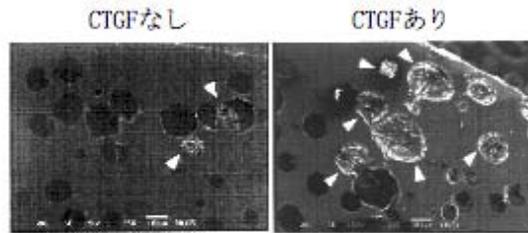


図4. CTGFによるスカホード内部への細胞誘導効果
CTGFなしではスカホード内部の孔への細胞の進入はほとんど認められないが、CTGFを含浸させると、より深部までの細胞の誘導を認めた。

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6件)

- ① Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Y. Okamoto, W. Sonoyama, M. Ono, K. Akiyama, T. Fujisawa, M. Oshima, Y. Tsuchimoto, Y. Matsuka, T. Yasuda, S. Shi, T. Kuboki. Journal of Endodontics, 35(3), 367-372, 2009 (査読あり)
- ② 発生期歯胚において発現する新規遺伝子群の同定とその発現パターン解析. 内部健太. 岡山歯学会雑誌, 28, 2009, 印刷中 (査読あり)
- ③ bFGF局所投与による下顎骨骨質改善効果の検討 - 神経堤由来骨髄細胞と中胚葉由来骨髄細胞の骨芽細胞分化ならびに破骨細胞分化の相違と bFGF への反応性 -. 大島正充. 岡山歯学会雑誌, 28, 2009, 印刷中 (査読あり)
- ④ Promotion of hydroxyapatite-associated, stem cells-based bone regeneration by CCN2. M. Ono, S. Kubota, T. Fujisawa, W. Sonoyama, H. Kawaki, K. Akiyama, K. Shimono, M. Oshima, T. Nishida, Y. Yoshida, K. Suzuki, M. Takigawa, T. Kuboki. Cell Transplantation, 17(1-2): 231-240, 2008 (査読あり)
- ⑤ Promotion of attachment of human bone marrow stromal cells by CCN2. M. Ono, S. Kubota, T. Fujisawa, W. Sonoyama, H. Kawaki, K. Akiyama, M. Oshima, T. Nishida, Y. Yoshida, K. Suzuki, M. Takigawa, T. Kuboki. Biochemical and Biophysical

Research Communications, 357(1): 20-25, 2007 (査読あり)

- ⑥ 歯科治療における再生医療のニーズと現時点での研究動向. 窪木拓男. 岡山歯学会雑誌, 26: 1-14, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Simvastatin enhances differentiation of human dental pulp stem cells. Y. Okamoto, W. Sonoyama, M. Ono, K. Akiyama, T. Fujisawa, M. Oshima, Y. Tsuchimoto, Y. Matsuka, T. Yasuda, S. Shi, T. Kuboki. 第 56 回 JADR 総会・学術大会 2008 年 11 月 29 日 (名古屋)
- ② Improvement of alveolar bone quality by local bFGF injection - histological and cellular biological analysis in a rabbit model -. M. Oshima, W. Sonoyama, M. Ono, K. Shimono, T. Hikasa, Y. Okamoto, Y. Tsuchimoto, Y. Matsuka, T. Kuboki. ASBMR 30th Annual Meeting 2008 年 9 月 13 日 (Montreal, Quebec, Canada)
- ③ Characterization of putative amelogenic cells isolated from human dental follicle. Y. Tsuchimoto, W. Sonoyama, Y. Okamoto, M. Oshima, Y. Matsuka, T. Kuboki. 86th General Session & Exhibition of the IADR 2008 年 7 月 3 日 (Toronto, Ontario, Canada)
- ④ Sonic hedgehog signaling regulates odontoblast proliferation and differentiation in vitro. M. Kanyama, K. Shimono, M. Ono, Y. Matsuka, T. Kuboki. 86th General Session & Exhibition of the IADR 2008 年 7 月 3 日 (Toronto, Ontario, Canada)
- ⑤ Identification of genes involved in tooth development. K. Uchibe, S. Yokoyama, M. Hashimoto, H. Shimizu, T. Kuboki, H. Asahara. The 1st International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama 2008 年 2 月 1 日 (岡山)
- ⑥ Basic gelatin hydrogels promoted bone regeneration by mutant BMP-2. K. Shimono, M. Ono, Y. Kimura, M. Kanyama, W. Sebald, T. Kuboki. 12th Meeting of the International College of Prosthodontics 2007 年 9 月 6 日 (Fukuoka, Japan)
- ⑦ 根未完成永久歯における新規間葉系幹細胞の同定. 園山 亘, 窪木拓男, Songtao Shi. 第 115 回日本補綴歯科学会学術大会 2006

年 7 月 9 日 (札幌)

- ⑧ Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) enhanced human bone marrow stromal cell attachment in vitro and migration and survival of the cells in a hydroxyapatite scaffold in vivo. M. Ono, W. Sonoyama, K. Akiyama, T. Fujisawa, T. Nishida, M. Takigawa, T. Kuboki. The ASBMR 27th annual meeting 2005 年 9 月 24 日 (Nashville, TN, USA)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 2 件)

- ① 「象牙質形成促進剤および象牙質形成覆髄材」窪木拓男, 大野充昭, 園山 亘, 藤澤拓生, 下野賢吾, 大島正充, 岡本洋介 (出願人; 岡山大学) 国際特許出願 PCT/JP2008/56008 (2008 年 3 月 28 日)
- ② 「象牙質形成促進剤および象牙質形成覆髄材」窪木拓男, 大野充昭, 園山 亘, 藤澤拓生, 下野賢吾, 大島正充 (出願人; 岡山大学) 国内特許出願 2007-94213 (2007 年 3 月 30 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 00225195

(2) 研究分担者

上田 実 (UEDA MINORU)

名古屋大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00151803

完山 学 (KANYAMA MANABU)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 90294420

高柴 正悟 (TAKASHIBA SYOGO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 50226768

辻 孝 (TSUJI TAKASHI)

東京理科大学・大学院基礎工学科生物工学専攻・教授

研究者番号: 50339131

滝川 正春 (TAKIGAWA MASA HARU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 20112063

浅原 弘嗣 (ASA HAR HIROSHI)

成育医療センター研究所・移植外科研究部・部長

研究者番号: 70294460

土本 洋平 (TUCHIMOTO YOUHEI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20423311
園山 亘 (SONOYAMA WATARU)
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：40325121

(3)連携研究者

田川 陽一 (TAGAWA YOUICHI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准
教授
研究者番号：70262079