

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11957

研究課題名(和文) 過剰歯から考える歯種決定のメカニズム

研究課題名(英文) Understanding of tooth morphogenesis by studying supernumerary teeth

研究代表者

齊藤 陽子 (Saito, Yoko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30404487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒトにおける過剰歯を分子生物学的手法と形態学的手法を用いて解析することが特徴である。形態学的アプローチとしてマイクロCTによる解析を行い、過剰歯の内部構造を主体に解析するために歯髄腔のみを硬組織構造より分離、抽出して解析することに成功した。
一方、分子生物学的手法による解析結果では、ヒト過剰歯の咬頭数はマウスの場合とは異なる遺伝子による制御の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯種決定にまつわる遺伝子の検索はマウスで数多く報告されているが、ヒトではほんの数例であり、また、マウスで起こる事象がヒトに当てはまるかが不明であった。本研究では小児歯科臨床において遭遇する機会が多く、しかも治療方針として抜歯を選択する機会が多い「ヒトの過剰歯」を実験材料に用いる点が特色であり、新たな侵襲を必要とすることなく、歯胚の解析を行うことができた。今回、ヒトにおいてはマウスの場合とは異なる遺伝子による制御の可能性が示唆され、歯種決定のメカニズムを解明するためには、ヒトの歯を用いて更に詳細な解析が必要であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The feature of this study is to analyze human supernumerary teeth by both a combination of the molecular biological technique and the morphological technique.
First we succeeded to separate only a chamber of the dental pulp and then pick out and analyze it by micro CT as morphological approach. On the other hand, an analysis result by molecular biological technique suggested the possibility that cusp number of a human supernumerary tooth was controlled by different gene in mouse.

研究分野：小児歯科学

キーワード：過剰歯 歯学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児歯科臨床でしばしば遭遇する歯牙硬組織の異常は、形態的に齲蝕の好発部位となり得ること、形態・大きさの観点から歯列・咬合を乱す原因となり得ることなどが問題となる。歯牙硬組織の異常の中でもとりわけ過剰歯については、何らかの処置が必要となることが多いため、日常臨床において遭遇する機会が非常に多い。少子化と齲蝕罹患者率の減少という社会背景もあり、歯列咬合への影響をも引き起こす可能性のある過剰歯を主訴として受診する患者の割合は、我々が診療を行う大学病院では増加している。他施設(大学病院小児歯科)における過剰歯の実態調査によると、過剰歯の存在する部位としては、上顎切歯部が大多数を占めていた。

上顎前歯部過剰歯を形態学的に分類すると、円錐形切歯と類似形多咬頭形の三種に大別される。このことから、同じ前歯部に存在しながらその歯数・形態が異なるという点から、過剰歯を解析することで歯数・歯の形態をコントロールする要因、ひいては歯の形成メカニズムの解明につながるのでは、と考えるに至った。

一方、このような「歯牙硬組織の異常」に関し、臨床的観点からの報告は多数存在しているものの、発生メカニズムの解明など基礎的な研究は、ヒトではほとんど行われていないのが現状である。近年、歯の形成メカニズムについては発生学のみならず再生医学の分野でも脚光を浴びているが、いずれもマウスを用いた研究ばかりである。歯の形態形成において表面の凹凸を構成する要素としては、咬頭・結節・隆線・突起・歯帯・エナメル滴といった凸部と、溝・小窩といった凹部に分けることができ、これらの数・配置・大きさが決まることにより歯の形態、ひいては歯種が決定されることになる。我々はマウスを用いた先行研究から、前歯の上皮には LIM ホメオドメインを持つ転写因子 Insulin gene enhancer protein(Islet1)遺伝子が発現するが、生涯を通して臼歯の歯胚に発現する事はなく、逆に臼歯の間葉には homeobox 転写因子 Bar subclass である Barx homeobox 1(Barx1)遺伝子が発現するが、生涯を通して前歯の歯胚には発現しないことを明らかにした。

歯は様々な遺伝子の発現制御により形成されるが、遺伝子のいくつかは特定の歯種に限定して発現し、他の種類の歯に発現する事は無い。このような遺伝子は、特定の歯種を規定する「マーカー分子」として利用する事ができる。また、過剰歯に関しては、家族性にも出現することも多いことから、ヒトにおいてもマウスと同様の事象が起こり得るかを明らかにすることで、過剰歯の咬頭数の違いが遺伝子発現パターンの違いを反映し、かつ様々なパターンを比較することで、ヒトでの歯種決定のメカニズムを明らかに出来る可能性があると考えた。

2. 研究の目的

歯の発生メカニズム理解を大きな目標に見据え、ヒトの過剰歯の咬頭数の違いにおける遺伝子発現パターンを解析することにより、歯種決定のメカニズムを解明することを目標とする。具体的には、以下の点を明らかにする。

1) ヒト過剰歯における「既知マーカー分子の遺伝子発現」について解析を行い、歯種決定メカニズムとの関連を探る

2) ヒト過剰歯の形態の違いを利用し、新たな「歯種決定における誘導因子」の同定を行う

3) ヒト過剰歯の出現に関し、家族性および非家族性の比較により、新たな「歯種決定におけるマーカー分子」の同定の可能性を探る

歯の発生に関わる遺伝子解析にヒト歯胚を用いることは、試料採取の点から困難が伴う。本研究では小児歯科臨床において遭遇する機会が多く、しかも治療方針として抜歯を選択する機会が多い「ヒトの過剰歯」を実験材料に用いる点が特色である。過剰歯は歯根が完成する前に抜歯される場合が多く、「歯胚」の状態ですり取りが可能である。また、抜歯された歯が試料の対象であるため、新たな侵襲を必要としない。その結果、飛躍的にサンプル数を増やすことができ、従来のマウス歯胚を用いた研究と比べても大きな優位性がある。

歯種決定にまつわる遺伝子の検索はマウスで数多く報告されているが、ヒトではほんの数例であり、また、マウスで起こる事象がヒトに当てはまるかは不明である。そもそも、マウスは乳歯と永久歯の区別がなく、前歯は終生生え続けるため歯冠・歯根の区別がない。更にヒトと異なり、側切歯・小臼歯・犬歯がない。したがって、歯種決定のメカニズムの研究には、ヒト歯を用いることが重要であり、本研究ではそれに焦点を絞った点も学術的特色である。

3. 研究の方法

(1) マイクロ CT による歯冠・歯根の形態と歯髓腔との関連性の解析

本申請においては、過剰歯の形態の判定が重要な要素である。歯は複雑な形態をしており、前述のように凸部は咬頭のみならず、結節・隆線・突起・歯帯・エナメル滴の可能性もあるため、特に咬頭の有無の判定、咬頭の位置、咬頭の大きさには注意が必要となる。そこで、歯冠の外見だけでなく歯根との関係や歯髓腔との連動性の観察が必要となるが、本研究の遂行のためには観察のための切断は行えない。したがって、過剰歯を実験動物用マイクロ CT(RIGAKU R_mCT GX/FX)にてスキャンし、歯の内部構造も含めて過剰歯の形態を把握し、総合的に判断することで咬頭数を判定した。

(2) 凍結切片からのレーザーマイクロダイセクションによる遺伝子発現解析

過剰歯の中には多咬頭と判定するか否か、判断に難渋するものも存在した。そういった場合、

(1)のような形態からのみの判定には限界があるため、分子レベルでの検索を咬頭判定に加え

た。河本法にて過剰歯の非脱灰凍結切片を作成し、顕微鏡下で組織切片を観察しながら標的となる組織をレーザーマイクロダイセクション(Leica; LMD6500/7000)によって切り出し、採取、回収した。RNAを抽出した後、マイクロアレイにて遺伝子の発現を検索し、さらにRT-PCRでの解析や in situ hybridization、免疫染色等の手法を用い、その発現部位を組織学的に検討した。

《円錐形・切歯と類似形過剰歯と多咬頭過剰歯の比較》

咬頭の形成にはエナメル結節が大きな役割を果たすことが知られており、エナメル結節の機能不全は、そのまま、咬頭形成不全へつながると考えられる。エナメル結節には SHH、EDAR、FGF4、BMP4 など様々な分子が発現し、特に二次エナメル結節は鐘状期の後期まで存在することから、鐘状期後期の歯胚であれば、咬頭存在を SHH、EDAR、FGF4、BMP4 などの発現で確認することが可能となる。そこで、既知のマーカー分子である SHH、EDAR、FGF4、BMP4 と共に、多咬頭過剰歯で認められた BARX1、認められなかった ISLET1 の発現を RT-PCR で検索した。また、in situ hybridization や免疫染色を用い、その発現部位を組織学的に検討した。

加えて、円錐形・切歯と類似形の過剰歯における遺伝子発現と多咬頭過剰歯における遺伝子発現の違いをマイクロアレイにて比較検討した。

4. 研究成果

今回の研究対象である過剰歯を精査する際、分子生物学的手法と形態学的手法を用いることを計画し、まずは形態学的アプローチとしてマイクロCTによる解析を行った。解析に際し、従来のソフトでは摘出した過剰歯を丸ごと解析するという方法を取らざるを得ず、過剰歯の咬頭の有無を判定する際に外形からの判断が先行してしまう傾向にあり、咬頭などの歯冠形態と歯髓腔の形態を連動して検索する事が困難であった。本課題での形態学的解析においては外形よりもむしろ過剰歯の内部構造を主体に解析することが重要になると考え、解析に必要な部分、すなわち、歯髓腔のみを硬組織構造より分離、抽出することが解析の第一段階になることが判明した。

そこで既に所有していた研究機器であるマイクロCTに付随していたソフトではなく、解析に有利なソフトの使用を再検討した。従来より骨の形態計測に使用されているソフトである Analyze 12.0(Analyze Direct 社)を本研究に応用することで解析を試みたところ、歯髓腔のみを分離・抽出することに成功した。したがって今後は、外形から見る歯冠・歯根の形態に加え、歯髓腔の形態も解析することが可能となり、形態学的解析精度が大きく向上すると考えられる。

一方、分子生物学的手法に関しては河本法を用いることを計画していたが、河本法は骨で使用される事が多く、抜去歯、それもヒトの抜去歯のような大きいサンプルへの応用例は少ない。そこで、ヒトの新鮮第3大臼歯への応用を試み、成功した。これにより、今後、顕微鏡下で組織切片を観察しながら標的となる組織をレーザーマイクロダイセクション、RNA抽出、マイクロアレイ等を用いて遺伝子発現を検索し、さらにRT-PCRでの解析や in situ hybridization、免疫染色等の手法を用いてその発現部位を組織学的に検討する道筋が可能となった。

その一方、サンプル数確保の問題が本研究の進捗状況に大きく影響を与える課題として挙げられた。本研究では前歯部付近における複数の咬頭を有する過剰歯や、臼歯部付近における単一の咬頭を有する過剰歯の存在が必要となる。さらに、分子生物学的手法による解析も行うためには細胞獲得のために萌出前かつ形成途中の過剰歯、または抜歯の際の損傷の少ない過剰歯ということが条件として挙げられる。これらの条件を満たすサンプルのみの解析では研究の目的を遂行するには困難であることが予想されたため、別のアプローチも同時に推進することとした。具体的には、臨床で得られる過剰歯のCT画像データを用いて解析する手法である。この場合、摘出した過剰歯を解析対象としないため、より多くのサンプル数を確保することができた。

分子生物学的手法による解析結果では、前歯部に位置しながらも形態的には臼歯の様相を示す多咬頭形過剰歯について解析を行ったところ、上顎前歯部に生じた過剰歯で多咬頭を持つ歯(単根)には BARX1 の発現を認め、ISLET1 の発現を認めなかった。つまり、ヒト過剰歯では前歯部に発生した歯であるにも関わらず、歯髓内の遺伝子発現は臼歯の特徴を示すという興味深い知見を得た。しかし、引き続いて解析した円錐形過剰歯についても BARX1 の発現を認め、ヒト過剰歯の咬頭数はマウスの場合とは異なる遺伝子による制御の可能性が示唆され、当初の仮説は棄却された。

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 Inada Emi, Saitoh Issei, Kubota Naoko, Iwase Yoko, Kiyokawa Yuki, Shibasaki Shinji, Noguchi Hirofumi, Yamasaki Youichi, Sato Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 piggyBac Transposon-Based immortalization of human deciduous tooth dental pulp cells with multipotency and non-tumorigenic potential	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4904 ~ 4904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20194904	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 Inada Emi, Saitoh Issei, Kubota Naoko, Iwase Yoko, Murakami Tomoya, Sawami Tadashi, Yamasaki Youichi, Sato Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Increased Expression of Cell Surface SSEA-1 is Closely Associated with Naive-Like Conversion from Human Deciduous Teeth Dental Pulp Cells-Derived iPS Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1651 ~ 1651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20071651	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 Soda Miki, Saitoh Issei, Murakami Tomoya, Inada Emi, Iwase Yoko, Noguchi Hirofumi, Shibasaki Shinji, Kurosawa Mie, Sawami Tadashi, Terunuma Miho, Kubota Naoko, Terao Yutaka, Ohshima Hayato, Hayasaki Haruaki, Sato Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Repeated human deciduous tooth-derived dental pulp cell reprogramming factor transfection yields multipotent intermediate cells with enhanced iPS cell formation capability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37291-2	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0件

〔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
研究分担者	齊藤 一誠 (Saitoh Issei) (90404540)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	大峽 淳 (Ohazama Atsushi) (40266169)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	佐藤 正宏 (Masahiro Sato) (30287099)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授 (17701)	