

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09920

研究課題名（和文）歯原性間葉系幹細胞誘導因子の同定と歯の再生への応用

研究課題名（英文）Identification of odontogenic mesenchymal stem cell-inducing factors and application to tooth regeneration

研究代表者

和田 裕子（Wada, Hiroko）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70380706

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、器官原器法による歯の再生に有用な歯原性幹細胞を安定して獲得するために微量RNA-seq解析を用いて歯原性間葉系幹細胞の候補誘導因子を同定し、歯の形態形成にどのように関わっているかを明らかにすることを目的とした。その結果、歯乳頭細胞に高発現する因子のSmoc1と歯小嚢細胞に高発現する因子のTmem100とIgfbp3を検出した。それらの因子はマウス歯胚発生過程の下顎第一臼歯において、それぞれ時期特異的な発現パターンを示した。また、Smoc1はマウス歯髄間葉細胞株とマウス下顎臼歯部歯胚の器官培養において、象牙芽細胞の分化に関わる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

本研究により、歯原性間葉細胞に高発現する因子の同定とそれらの因子から選出したSmoc1とTmem100およびIgfbp3が歯の形態形成に深く関わっていることを明らかにした。特に、Smoc1が象牙芽細胞の分化に関与するという報告は、今までになく生物学的な意義があるだけでなく、器官原器法による歯の再生治療を含めた新規治療法の開発が期待され、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, to stably obtain odontogenic stem cells useful for tooth regeneration using the organ germ method, we aimed to identify candidate inducers of odontogenic mesenchymal stem cells using microRNA-seq analysis and to clarify how they are involved in tooth morphogenesis. As a result, we detected Smoc1, a factor highly expressed in dental papilla cells, and Tmem100 and Igfbp3, factors highly expressed in dental follicle cells. These factors showed stage-specific temporal and spatial expression patterns in the mouse tooth germ development. In addition, we indicated that Smoc1 might be involved in differentiation of odontoblasts in both mouse dental pulpal cell line and mouse tooth germ.

研究分野：口腔病理学分野

キーワード：歯の再生 器官培養 間葉細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

すべての臓器や器官は上皮間葉相互作用によって構成されており、歯の発生においても上皮間葉相互作用が極めて重要なステップであることが明らかになっている。「歯の再生」は、マウス歯胚から分離した上皮細胞と間葉細胞を *in vitro* で再構築し、歯のもととなる器官（器官原基）の作製後にマウス腎被膜下に移植すること（器官原器法）で可能であることが報告された（Nakao K et al., 2007）。しかし、ヒト歯胚を採取することは倫理的に困難であるため、器官原基法を用いた歯の再生において有用な上皮系と間葉系の歯原性幹細胞の樹立および獲得方法の確立が求められているが実現に至っていない。

我々はこれまでに歯の発生初期において差異的に発現する網羅的検出において、Thymosin beta 4 (Tb4) というアクチン重合の調節に関わり細胞運動や細胞骨格を制御するポリペプチドを同定した（Yamaza H et al., 2001）。Tb4 は、歯の発生において歯胚上皮細胞やエナメル芽細胞に発現し、Tb4 発現 vector をヒト皮膚表皮由来の HaCaT 細胞へ導入し石灰化誘導を行うと、エナメル質分化マーカーの発現を認める石灰化物の形成が見られ、皮膚細胞からエナメル芽細胞の性格を有する細胞の作製に成功し（Kiyoshima T et al., 2014）、上皮系の歯原性幹細胞を誘導する重要な因子であると考えられる。

一方、器官原器法に必要な間葉系の歯原性幹細胞については、これまでにヒト歯髓組織に幹細胞が存在し、象牙芽細胞への分化能などの報告がある（Gronthos et al., 2000）が、歯髓幹細胞は抜去歯の歯髓組織より分離することから、「歯の再生」のための器官原器法に用いるには量的・質的に安定した獲得が困難である。したがって、歯胚間葉由来の象牙質や歯根膜の発生に関わる特異的な因子の同定には至っていない。

そこで、間葉系の歯原性幹細胞をより安定して供給するには、間葉系の歯原性幹細胞に特異的な誘導因子の同定が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、器官原器法による歯の再生に有用な歯原性幹細胞を安定して獲得するために微量 RNA seq 解析を用いて歯原性間葉系幹細胞の候補誘導因子を同定し、歯の形態形成にどのように関わっているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 歯髓・象牙芽細胞の分化に重要な候補誘導因子の検出と同定

歯乳頭細胞において強発現する遺伝子の微量 RNA seq 解析
細胞株の樹立
候補因子の発現様式の解析

2) 細胞株を用いた各候補因子の発現抑制による歯原性タンパク発現への影響

マウス歯髓間葉細胞株 (mDP) と樹立した歯原性間葉細胞株に siRNA を応用し各候補因子の発現抑制を行い、Dentin matrix protein 1 (DMP1) などの歯原性因子の基質分化マーカー発現について定量解析を行った。

3) 器官培養法を用いた候補因子の発現抑制による歯胚形成への影響

歯胚を器官培養し、各候補因子に対する siRNA を用いて mRNA 発現を抑制し、歯胚形成への影響をみるために、歯原性因子の基質分化マーカーの発現について定量解析を行った。

4. 研究成果

1) 歯髓・象牙芽細胞の分化に重要な候補誘導因子の検出と同定

歯乳頭細胞および歯小囊細胞において強発現する遺伝子の微量 RNA seq 解析

胎生 18 日齢マウス臼歯歯胚 (E18 歯胚) で歯乳頭、歯小囊および歯胚上皮組織を分離回収後、RNA サンプルを作製した。各々の組織に特異的なマーカー (E-cadherin, Vimentin 等) の発現の検討により、組織の分離精度が高いことを確認後、それらのサンプルを用いて微量 RNA-seq 解析により、上皮と歯乳頭および歯小囊に高発現の遺伝子群を検出した。それらの遺伝子群の中からいくつかの検索因子について、それぞれ E18 歯胚上皮細胞と歯乳頭細胞および歯小囊細胞に発現しているかを real-time PCR にて確認したところ、遺伝子スクリーニングの結果と一致してそれぞれ E18 歯胚上皮組織と歯乳頭組織および歯小囊細胞に高発現を認めた。

細胞株の樹立

in vitro での解析に用いる細胞株を樹立する目的で、歯胚の上皮細胞株と歯乳頭細胞株および歯小囊細胞株の作製を試みたところ、E14 歯胚の間葉細胞株と E18 歯胚の歯小囊細胞株の樹立に成功した。そこで両細胞株を用いて、*in vitro* 実験を行った。

候補因子の発現様式

マウス歯胚発生過程における Smoc1 と Tmem100 および Igfbp3 の発現様式

まず、これらのスクリーニングにより同定した新規因子の中で、上皮と歯乳頭を比較して歯乳頭に有意に高発現を認める Smoc1 に注目した。Smoc1 は、未分化間葉系幹細胞の硬組織形成細胞への分化過程に関与している可能性があることが報告されている。そこで、Smoc1 のマウス歯胚発生過程における帽状期 (E15 歯胚)、鐘状期前期 (E18 歯胚)、鐘状期後期 (P2 歯胚)、歯冠形成期 (P7)、歯根形成期 (P14) の発現について検討したところ、免疫組織学的に胎生期には歯乳頭の血管内皮細胞に強く発現を認め、生後の歯胚では象牙芽細胞と歯髓の血管内皮細胞に発現を認めた。これらの結果より、Smoc1 は象牙芽細胞の形成に関わる可能性が示唆された。

一方で、歯乳頭と歯小嚢を比較して歯小嚢に有意に高発現を認める Tmem100 と Igfbp3 についても、免疫組織学的検索を行った。興味深いことに胎生期の歯小嚢に特異的に強く発現が認められ、生後の歯胚では歯根膜だけでなく歯髓や象牙芽細胞にも発現を認めた。以上より、Tmem100 と Igfbp3 においても、歯の形態形成に重要な因子である可能性が示唆された。

2) 細胞株を用いた各候補因子の発現抑制による歯原性タンパク発現への影響

mDP を用いて Smoc1 siRNA の効果の検討を行い、歯乳頭に発現する因子への影響を検索したところ、骨芽細胞や象牙芽細胞の分化に関わる因子である Runx2 の発現が有意に抑制された。加えて、我々が樹立したマウス胎生 14 日齢の歯原性間葉細胞株において siRNA を用いて Smoc1 の発現を抑制したところ、象牙芽細胞の分化に関わる因子である ALP と DMP1 の発現が有意に抑制された。これらの結果より Smoc1 が象牙芽細胞の分化に関わる可能性が示唆された。

3) 器官培養法を用いた候補因子の発現抑制による歯胚形成への影響

歯胚における Smoc1 の機能を明らかにするために、帽状期のマウスの下顎臼歯部歯胚の器官培養において siRNA を用いて Smoc1 の発現抑制を行い 8 日間器官培養したところ、siRNA 導入群で ALP および DMP1 の発現が有意に抑制された。これらの結果より、Smoc1 は歯の発生過程において、象牙芽細胞の分化に関わる可能性が示唆された。

また、歯小嚢に有意に高発現を認める Igfbp3 についても、同様に帽状期のマウスの下顎臼歯部歯胚の器官培養を用いて機能解析を進め、胎生期に歯根膜に特異的に発現していた因子 Igfbp3 は、siRNA を用いて発現抑制を行い 8 日間器官培養したところ、siRNA 導入群で歯根膜関連因子の発現が有意に抑制され歯根膜組織の形態形成に重要な役割を示す可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	清島 保 (Kiyoshima Tamotsu) (20264054)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	藤井 慎介 (Fujii Shinsuke) (60452786)	九州大学・歯学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	長谷川 佳那 (Hasegawa Kana) (30793989)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関