

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249064

研究課題名(和文) 発生メカニズムに立脚した生物学的歯根再生技術の開発

研究課題名(英文) The technological development of bioengineered regenerated tooth, based on the mechanism of development

研究代表者

窪木 拓男 (Kuboki, Takuo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円、(間接経費) 10,770,000円

研究成果の概要(和文)：歯の発生は歯科リハビリテーション学にとって究極の目標である。我々はヒトへの応用を考え、大型動物の胎生後の組織を用い、器官原基法を応用することで歯の発生しうるかを検討してきた。そして、世界ではじめて、胎生後の組織を用い、生理機能を有する歯を再生することに成功した。また、歯の発生メカニズムを明らかにするため、転写因子の一つであるHox遺伝子に注目し、いくつかのHox遺伝子が歯の発生に特異的に発現していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In the dental field, the regeneration of complete tooth is ultimate goal. First, we examined whether fully functional bioengineered tooth could regenerate utilizing an organ germ method with the permanent tooth bud tissue of the post-natal canine, we succeeded in it, for the first time in the world. Next, in order to understand the mechanism of tooth development, we performed the screening and clarified that several Hox gene specifically expressed in the development of tooth.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：再生歯

1. 研究開始当初の背景

現在の歯科医療では、人工材料を用いた欠損の修復処置が行われている。なかでも、口腔インプラント治療は、人工歯根が直接歯槽骨や顎骨と結合することにより、患者に高いQoLを安定して提供することに成功した。また、口腔インプラント治療は自立型補綴物であるが故に、従来の歯科医療が抱えていた「隣在歯への侵襲」という問題を抜本的に解決した。しかし、口腔インプラント義歯の人工歯根が歯根膜を持たないことにより生じる問題点、すなわち、辺縁歯槽骨の長期的維持が困難であること、骨結合した人工歯根が顎骨の成長を抑制すること、歯の移動能や知覚機能など天然歯が有する生理機能を持たないことなどが、解決されるべき問題として残されている。

近年、共同研究者である辻らは、歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞を用いて、細胞操作技術により上皮間葉相互作用を生じさせることにより再生歯胚を創りだす「器官原基法」を開発した。この再生歯胚は、成体顎骨内にて正常な発生・萌出が可能ばかりでなく、完全な歯の生理機能を有している。これは口腔インプラントが長年成し得なかった辺縁歯槽骨の安定維持を、歯と歯周組織という臓器をそのまま移植することにより可能にした。しかし、器官原基法を応用し、マウスの胎生期歯原性細胞以外を用いた系で成功した例はなく、ヒトへの応用を考慮した場合、大型動物での応用の可能性、出生後の組織から採取した組織や細胞での可能性に関しては未解決である。

一方、これらの研究に加えて、上皮間葉相互作用のキーファクターの検索も進めてきた。すでに、研究分担者の浅原らが構築した全転写因子および転写コファクターからなるマウス遺伝子発現データベース“EMBRYOS”から候補因子

を網羅的に抽出し、マウスの歯胚組織切片を用いた *in situ* hybridizationにより発現の有無を確認した。その結果、すでに報告されている遺伝子群に加えて、28個の関連未報告遺伝子を同定することに成功した。これらの情報を用いれば、器官原基法が成功する条件を突き止め、さらに成功率の高い歯胚の再生を可能とすることができる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、大型動物の出生後の生体から組織を採取し、器官原基法を応用することで、生理的機能を有する臓器としての歯を再生することが可能か検討することとした。さらに、これまで明らかにしてきた28個の関連未報告遺伝子に加え、新たな歯の発生関連遺伝子を同定し、歯の発生機序を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

a. イヌを用いた歯の再生に関する研究

岡山大学動物実験委員会承認（OKU-2012017, OKU-2012020）のもと、すべての動物実験を実施した。また、実験による動物への負担軽減を目的に、ケタミン・キシラジン混合液による全身麻酔下にてすべての動物実験を実施した。

生後30日齢のイヌの下顎第1, 2, 3乳臼歯を抜歯後、顎骨から永久歯である第2, 3, 4小臼歯（premolar: P）の歯胚を摘出した。歯胚組織からの細胞単一化、歯胚原基の再構成はNakaoらの器官原基法に準じ行なった。歯原性上皮間葉接合体は2日の器官培養を経て、全身麻酔下で、6週齢NOD-SCIDマウスの腎皮膜下もしくは皮下に移植した。移植12週後に摘出し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、組織学的評価を行った。

さらに、2日間の器官培養により発生した

歯胚は、全身、局所麻酔下にて同一個体のイヌ乳歯抜歯窩に自家移植し、緊密に歯肉を縫合した。その後、再生歯胚の顎骨内における発生をコンビームCTで経時的に評価した。また、再生歯に天然歯と同様の歯根膜機能が備わっているかを確認するため、実験的矯正力を歯に与え、歯の移動をコンビームCTにて解析した。

自家移植 120 日後に、組織を回収し、4% PFA にて固定後、マイクロ CT (Skyscan 1174) にて撮影を行った。その後、樹脂包埋し、研磨切片を作製し、組織学的評価を行った。また、10% ギ酸 クエン酸ナトリウム脱灰液にて脱灰後、パラフィン包埋し、切片を作製し、HE 染色および Toluidine blue 染色にて組織学的評価を行った。さらに、再生歯のエナメル質、象牙質の形態学的評価を行うため、リン酸にて 10 秒、次亜塩素酸ナトリウムにて 15 秒間処理し、通法に従い、試料を作製し、走査型顕微鏡 (SEM) にて観察、およびエネルギー分散型 X 線元素分析 (EDX) を行った。

b. 歯の発生メカニズムに関する研究

岡山大学動物実験委員会の承認 (OKU-2012338) のもと、すべての動物実験および細胞実験を行った。

通法に従い、ICR 系妊娠マウス妊娠 13.5, 14.5, 18.5 日の歯胚周囲の脱灰・パラフィン切片を作製し、全 39Hox 遺伝子に対し、*in situ* ハイブリダイゼーション法を実施した。使用した RNA プローブのうち、*Hoxa3, b2, b3, b9, c11, d8, d11* を除く 32 の遺伝子については、共同分担者である浅原らがすでに報告しているものを使用した。上記以外の 7 因子に関しては、通法に従い作製した。

4. 研究成果

a. イヌを用い歯の再生に関する研究

生後 30 日齢のイヌ下顎骨を X 線学的、組織学的に検討した結果、この時期の P2, P3, P4 の歯胚は帽状期であり、再生歯胚の細胞源として適したステージであった。また、乳臼歯の根分岐部に永久歯歯胚が位置していることが確認され、小臼歯の永久歯歯胚の組織切片を作製し、観察すると、歯胚は歯小嚢様組織で囲まれ、上皮組織の一部が石灰化している像が認められた。

次に、再生歯胚の発生の有無を検討するため、再生歯胚を作製し、NOD-SCID マウスの腎皮膜下に移植し、その発生をマイクロ CT を用い、経時的に解析した。その結果、時間経過と共に、歯冠が形成されていく像が観察されたが、移植後 12 週では歯根の形成は認められなかった。また、移植 12 週後に組織を回収し、切片を作製し、HE 染色を行った結果、エナメル質および象牙質様硬組織が形成されていることが確認された。

次に、この出生後の永久歯歯胚由来細胞を用いて作製した再生歯胚が顎骨内に生着し、発生できるかを検討するため、2 日間の器官培養後、再生歯胚を同一個体のイヌ乳歯抜歯窩に自家移植し、コンビーム CT にて経時的に解析した。その結果、天然歯歯胚移植群と同様、再生歯胚群においても移植 120 日後には歯根が形成され口腔内へ崩出している像が観察された。

また、これらの組織を回収し、マイクロ CT 解析を行なった結果、歯槽骨と再生歯との癒着は認めず、一定のスペースが存在することが確認された。興味深いことに、小臼歯の歯根は二根であるが、これらの歯胚を用いて作製された再生歯胚によって発生する再生歯はすべて一根であった。次に、組織切片を作製し組織学的検討を行なった。その結果、再生された歯牙には天然歯と組織学的に類似したエナメル質、象牙質、セメント質が形成

され、セメント質と歯槽骨の間にはシャープピーク様の組織が形成され、歯槽骨と再生されたセメント質に入り込んでいる像が観察された。

次に、再生された歯の構造解析を行うため、リン酸・次亜塩素酸ナトリウム処理後、SEMにて観察を行った。その結果、再生歯には天然歯と類似したエナメル小柱の緻密な配列が確認され、EDX 分析の結果、カルシウム、リン、炭素、酸素の存在が確認され、その構成比率は天然歯と類似していた。また、象牙質において、象牙細管が観察され、象牙質のカルシウム、リン、炭素、酸素の構成比率も天然歯と類似していた。

最後に、崩出した再生歯の生理的機能の評価するため、実験的矯正力を加えた。その結果、天然歯同様、矯正学的な歯の移動が生じた。

以上の結果より、世界ではじめて、出生後のイヌ永久歯歯胚組織を用いて器官原基法を応用することで完全な臓器としての歯の再生に成功した。

b. 歯の発生メカニズムに関する研究

マウス Hox 遺伝子全 39 因子について、胎生 13.5, 14.5, ならびに 18.5 日胚の前頭断組織切片上で、*in situ* ハイブリダイゼーション法により歯胚での発現を検証した。その結果、全 39 因子のうち 23 因子についてはいずれのステージにおいても発現を検出できなかったが、9 因子については歯胚での発現を確認できた。発現が確認できた 9 因子については、発現する発生ステージが限られているものや発生ステージによってその発現パターンに変化の見られるものなどがあつた。発現部位別に見ると、歯胚上皮特異的に発現が検出できたものが 3 因子、間葉組織のみで発現の認められた因子は無く、両方で発現していたものが 6 因子であつた。

今後は本遺伝子の遺伝子ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを製作し、歯の発生に与える影響を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Abd El Kader T, Kubota S, Janune D, Nishida T, Hattori T, Aoyama E, Perbal B, Kuboki T, and Takigawa M. Anti-fibrotic effect of CCN3 accompanied by altered gene expression profile of the CCN family. *Journal of Cell Communication and Signals*, 7(1):11-18, 2013. (査読有)
2. Eguchi T, Watanabe K, Hara ES, Ono M, Kuboki T and Calderwood SK. OsteoR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 8(3):e58796, 2013. (査読有)
3. Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Oida Y, Hattori T, Nishida T, Furumatsu T, Ozaki T, Takigawa M, Kuboki T: Novel chondrogenic and chondroprotective effects of the natural compound harmine. *Biochimie*, 95(2):374-381, 2013. (査読有)
4. Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Nakajima K, Hirayama M, Tachikawa T, and Tsuji T. Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nature Communications*, 4:2498, 2013. (査読有)
5. Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Ikeda K, Shimmura S, Kawakita T, Tsubota K, and Tsuji T. Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nature Communications*, 4:2497, 2013. (査読有)
6. Watanabe T, Oyama T, Asada M, Harada D, Ito Y, Inagawa M, Suzuki Y, Sugano S, Katsube K, Karsenty G, Komori T, Kitagawa M, Asahara H. MAML1 enhances the transcriptional activity of Runx2 and plays a role in bone development. *PLoS Genetics*. 9(1):e1003132, 2013. (査読有)
7. Hasegawa A, Nakahara H, Kinoshita M, Asahara H, Koziol J, Lotz MK. Cellular and extracellular matrix changes in anterior cruciate ligaments during human knee aging and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*.15(1):R29, 2013. (査読有)
8. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cell in dentistry—part I: stem cell sources., *Journal of Prosthodontic Research*, 56:151-165, 2012. (査読有)

9. Egusa H, Sonoyama W, Nishumura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cell in dentistry—part II: Clinical applications. *Journal of Prosthodontic Reserch*, 56:229-248, 2012. (査読有)
10. Kawanabe N, Murata S, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Yanagita E, Ono M, Kurosaka H, Kamioka H, Itoh T, Kuboki T, and Yamashiro T. Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. *Experimental Cell Research*, 318(5):453-463, 2012. (査読有)
11. Uchibe K, Shimizu H, Yokoyama S, Kuboki T, and Asahara H. Identification of novel transcription- regulating genes expressed during murine molar development. *Developmental Dynamics*, 241(7):1217-1226, 2012. (査読有)
12. Asakawa K, Toyoshima K, Ishibashi N, Tobe H, Iwadata A, Kanayama T, Hasegawa T, Nakao K, Toki H, Noguchi S, Ogawa M, Sato A, and Tsuji T. Hair organ regeneration via the bioengineered hair follicular unit transplantation. *Scientific Reports*, 2(424):DOI:10.1038/srep00424, 2012.(査読有)
13. Toyoshima K, Asakawa K, Ishibashi N, Toki H, Ogawa M, Hasegawa T, Irié T, Tachikawa T, Sato A, Takeda A, and Tsuji T. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nature Communications*, 3(784):doi:10.1038/ncomms1784, 2012. (査読有)
14. Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokoyama S, Sato T, Barrionuevo F, Akiyama H, Scherer G, Takada S, Asahara H. L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity. *J Biol Chem*. 287 (26), 22206-22215, 2012. (査読有)
15. Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nature Rev Rheumatol*. 8(9):543-52, 2012. (査読有)
16. Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Yamamoto TT, Kasugai S, Saito M and Tsuji T. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE*, 6(7):e21531, 2011. (査読有)
17. Hikasa T, Matsuka Y, Mine A, Minakuchi H, Hara ES, Van Meerbeek B, Yatani H, and Kuboki T. A 15-year clinical comparative study of the cumulative survival rate of cast metal core and resin core restorations luted with adhesive resin cement. *International Journal of Prosthodontics*, 23(5):397-405, 2010. (査読有)
18. Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, Asahara H. The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of ten don differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(23): 10538-10542, 2010. (査読有)
- 〔学会発表〕(計 12 件)
1. Kuboki T. Biological regenerative medicine in prosthodontics practice –to attain reliable and sophisticated dental implant therapy-. Meeting in Hanoi Medical University. 2013年11月25日～2013年11月27日, Hanoi, Vietnam
2. Shinkawa S, Uchibe K, Ono M, Sonoyama W, Hara ES, Yoshioka Y, Ueda J, Asahara H, Kuboki T. Expression Pattern of Hox Genes During Mouse Tooth Development. *岡山医療教育研究国際シンポジウム*:2013年9月22日～2013年9月23日, 岡山, 日本
3. 大野充昭, 前田あずさ, 正木明日香, 吉岡裕也, 園山 亘, 窪木拓男, Young MF. CCN4/WISP-1 の骨形成における役割. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013年9月23日, 岡山, 日本
4. Hara ES, Ono M, Sonoyama W, Eguchi T, Pham HT, Calderwood SK, Kuboki T. miRNA-720 controls stem cell phenotype, proliferation and differentiation of human dental pulp cells. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会:2013年9月20日～2013年9月23日, 岡山, 日本
5. Shinkawa S, Uchibe K, Ono M, Sonoyama W, Hara ES, Yoshioka Y, Ueda J, Asahara H, Kuboki T. Expression Pattern of Hox Genes During Mouse Tooth Development. 2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region. 2013年8月21日～2013年8月23日, Bangkok, Thailand
6. Sonoyama W. Biological Bone Augmentation/Regeneration around Dental Implants. Biennial Joint Congress of CPS-JPS-KAP. 2013年4月12日～2013年4月17日, Jeju, Korea
7. Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Masaki A, Miki H, Sonoyama W, Kuboki T. Human Dental Pulp Cells Increase Stem Cell-like Phenotype By TNF- α . 90th General Session & Exhibition of the IADR, 2012年6月24日, Iguacu Falls, Brazil
8. 上枝麻友, 藤澤拓生, 大野充昭, 正木明日香, 三木春奈, 園山 亘, 窪木拓男. 炎症環境による歯髓細胞の幹細胞化—歯髓細胞分化に与える TNF- α の影響—. 平成24年度社団法人日本補綴歯科学会第121回学術大会. 2012年5月26日, 横浜, 日本

9. 園山 亘 . 口腔機能の回復を目指した再生
歯科医療 . 九州歯科大学 最新生命科学 特
別講義 . 2011 年 12 月 20 日 , 小倉 , 日本

10. 上枝麻友 , 藤澤拓生 , 大野充昭 , 正木明
日香 , 三木春奈 , 園山 亘 , 窪木拓男 . 歯髓
細胞のリプログラミングに対する TNF- α の
効果 . 平成 23 年度社団法人日本補綴歯科学
会 中国・四国支部学術大会、2011 年 9 月 4
日 , 岡山 , 日本

11. 中島 隆 , 大野充昭 , 園山 亘 , 笈田育
尚 , Emilio S. Hara , 前川賢治 , 窪木拓男 . 抜
歯窩肉芽組織からの新規間葉系幹細胞の同
定 . 第 29 回日本骨代謝学会学術大会 , 2011
年 7 月 28 日 , 大阪 , 日本

12. 園山 亘 . 自己組織幹細胞による歯の機
能再生 . 社団法人日本補綴歯科学会第 120 回
記念学術大会 , 2011 年 5 月 21 日 , 広島 , 日
本

〔図書〕(計 0 件)

〔〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 新規間葉系幹細胞
発明者: 窪木拓男, 大野充昭, 園山 亘, 中
島 隆, 笈田育尚
出願人: 国立大学法人 岡山大学
種類及び番号: 特許第 4859078 号
出願: 2011 年 5 月 8 日
広報発行日: 2012 年 1 月 18 日
公開: 2012 年 12 月 10 日

取得状況(計 0 件)

〔その他〕特になし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

窪木 拓男 (Kuboki Takuo)
岡山大学医歯薬学総合研究科 教授
研究者番号 : 00225195

(2) 研究分担者

滝川 正春 (Takigawa Masaharu)
岡山大学医歯薬学総合研究科 教授
研究者番号 : 20112063

園山 亘 (Sonoyama Wataru)
岡山大学 大学病院 講師
研究者番号 : 40325121

辻 孝 (Tsuji Takashi)
東京理科大学 総合研究機構 教授
研究者番号 : 50339131

浅原 弘嗣 (Asahara Hiroshi)
東京医科歯科大学・医歯薬学総合研究科 教
授
研究者番号 : 70294460