

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2014

課題番号：24890026

研究課題名(和文) IGF-Iによる歯の形態制御に関する研究

研究課題名(英文) Role of insulin like growth factor-I on tooth morphogenesis

研究代表者

金原 正敬 (KINBARA, MASAYUKI)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00637960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、IGF-I投与の妖精症患者で歯のサイズが増大することが報告されているが、歯の形態形成に及ぼすIGF-Iの役割は不明であった。本研究では、歯の形態形成におけるIGF-Iの機能について検討した。発生歯胚、再生歯胚、腎皮膜下移植再生歯胚のいずれにおいても、IGF-I添加群においてサイズの有意な増大が認められた。また、IGF-Iを添加して作製した再生歯胚をマウス顎骨内に移植したところ、サイズの増大した再生歯が口腔粘膜より萌出することが判明した。以上より、IGF-I添加によって、サイズを増大させた再生歯の作製が可能となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that the tooth size is extremely large in a patient with leprechaunism treated with insulin like growth factor-I (IGF-I), but the role of IGF-I on tooth morphogenesis remains unclear. In this study, we examined the function of IGF-I in the tooth morphogenesis. In both natural and bioengineered tooth germs, the size of the IGF-I-treated tooth germs was significantly larger than that of the control tooth germs. Moreover, the bioengineered tooth germs treated with IGF-I were increased in size, when they developed into teeth in the renal subcapsular layer of mice. Furthermore, larger teeth were erupted from the oral mucosa, when the bioengineered tooth germs treated with IGF-I were transplanted into the space of maxillae of mice. These findings suggest that IGF-I treatment technique allows for the generation of bioengineered teeth with increased size.

研究分野：医歯薬学

キーワード：IGF-I 歯の形態制御 再生医療

1. 研究開始当初の背景

種々の不正咬合のなかで叢生の発現頻度は最も高く、矯正歯科に来院する患者の90%以上に叢生が認められる。叢生は顎骨と歯のサイズの不調和によってもたらされることから、歯の大きさを制御できれば、叢生の発現を抑制することが可能となり、ひいては叢生が誘因となる齲蝕や歯周病の発現抑制にもつながる。

一方、近年、歯の喪失や損傷に対する次世代の歯科治療として、再生歯の研究が盛んに行われてきており、患者自身の細胞を三次元的に再構築し、歯全体を再生させる歯科再生医療の実現化が期待されている。さまざまな外胚葉系器官と同様に、歯の発生は多数の遺伝子とその産物が空間的・時間的に順序立って連鎖的に作用して生じ、外胚葉性間葉組織と上皮組織との上皮間葉相互作用により遂行される。歯の再生研究は、細胞の足場となる生体吸収性の担体を歯の形態に成形し、細胞を播種して再構築する組織工学的な方法と、上皮細胞と間葉細胞の凝集体を作製し、胎児期の発生プログラムを模倣して歯胚を再構築する方法で主に進められてきたが、最近、上皮細胞と間葉細胞を高密度で区画化して再構築する器官原基法が開発され、成体顎骨内においても機能しうる再生歯が作製可能となった。これにより、「歯の再生」の実用化に向けた細胞操作技術の開発は大いに進展したが、現段階の課題として再生歯のサイズの矮小や形態の不揃いが挙げられている。歯の担う役割の一つに咀嚼があり、完全な機能を有する再生歯の構築には、歯冠咬頭を含む精密な形態形成は重要な課題である。

Insulin like growth factor-I (IGF-I) は、肝臓を主要産生臓器とするインシュリンに類似した構造・機能を有する増殖因子であり、胎生期および生後における種々の臓器の発生・成長に重要な作用をもつこと

が知られている。歯の発生期のエナメル芽細胞、象牙芽細胞等において、IGF-I またはその受容体が発現することが報告されており、IGF-I は歯の発生過程においても関与することが示唆されているが、その詳細については未だ不明である。インスリン受容体の変異を原因とし、高度なインスリン抵抗性と妖精様の特異な顔貌を特徴とする疾患に妖精症があり、この患者では IGF-I 等による治療が行われるが、近年、IGF-I 長期投与によりコントロールされている妖精症患者において歯のサイズの増大がみられることが報告されている。また、マウスを用いた *in vitro* の研究で、IGF-I 存在下で6日間培養した歯胚において歯胚体積の増加がみられることも報告されている。これらの報告から、IGF-I は歯の形態制御においても重要に関わることが予測されるが、歯の形態形成に及ぼす IGF-I の役割については全く明らかにされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、IGF-I が歯の形態形成において、特に歯のサイズの制御に関わる重要な因子であることを予測し、歯の形態制御における IGF-I の関与について検討した。

3. 研究の方法

(1) 歯胚の摘出および器官培養

マウス胎仔の下顎臼歯歯胚を外科的に摘出した。ディッシュ上にコラーゲンをドロップ状に形成し、摘出歯胚をゲル中に位置づけた。IGF-I 添加群には IGF-I を含むゲルを用いた。FBS、ascorbic acid、L-glutamine を添加した Dulbecco 's modified eagle medium 培地を用いる器官培養系にて器官培養し、IGF-I 添加群ではこれらの培地に IGF-I を添加した。歯胚の歯冠部における最大径を幅径、幅径と直交す

る歯胚の最大径を長径、幅径と直交する歯冠部の最大径を歯冠長径とし、位相差顕微鏡像を用いて、これらの長さを計測した。

(2) 単一化細胞からの再生歯胚の作製および器官培養

マウス胎仔の下顎臼歯歯胚を Dispase と DNase により酵素処理した後、上皮組織と間葉組織に分離した。Trypsin、Collagenase、DNase を用いたさらなる酵素処理によって単一化細胞を得た後、上皮細胞と間葉細胞の高密度細胞懸濁液を調製した。ディッシュ上にコラーゲンをドロップ状に形成し、間葉細胞の高密度細胞懸濁液をゲル内に注入することにより、間葉細胞の凝集体を作製した。続いて上皮細胞懸濁液を間葉細胞の凝集体に接合させるようにして注入し、上皮細胞と間葉細胞が高密度で区画化された再生歯胚を作製した。IGF-1 添加群には IGF-1 を含むゲルを用いて再生歯胚を作製した。器官培養後、位相差顕微鏡像を用いて、再生歯胚の長径と幅径を計測した。

(3) 腎皮膜下移植

再生歯胚の対照群と IGF-1 添加群について、腎皮膜下移植を行った。スパーサーを作製し、内部にコラーゲンを満たして使用した。コラーゲンは IGF-1 添加群と対照群で再生歯胚作製時と同様のものをそれぞれ使用した。全身麻酔下にて、マウスの腎皮膜下に再生歯胚を含むスパーサーを移植した。その後、再生歯胚を摘出し、マイクロ CT 撮影を行い、画像データの解析を行った。

(4) 再生歯の萌出モデルの作製

マウスの上顎第一臼歯を抜歯し、治癒期間後、同部の歯肉切開・剥離を行い、歯科用マイクロモーターを用いて歯槽骨を切削し、移植窩を形成した。器官培養した再生歯胚を顎骨移植窩に埋入し、歯肉縫合した。その後、マイクロ CT 撮影および画像データの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 発生歯胚に対する IGF-1 の影響

発生歯胚に対する IGF-1 の影響を解析するため、マウス胎仔臼歯歯胚を器官培養し、発生歯胚の長径、幅径、歯冠長径を位相差顕微鏡像にて解析した。長径および歯冠長径に関しては、対照群と比較して、IGF-1 添加群で有意な増大が認められた。また、幅径に関しては、いずれも IGF-1 添加群と対照群で有意差は認められなかった。これらの結果から、発生歯胚は IGF-1 を添加することで長径および歯冠長径が増大することが示唆された。

(2) 再生歯胚に対する IGF-1 の影響

器官原基法によって作製された再生歯胚に対する IGF-1 の影響を解析するため、マウス胎仔臼歯歯胚細胞を用いて再生歯胚を作製した。位相差顕微鏡像を用いて、再生歯胚の長径と幅径を解析したところ、長径および幅径に関して、対照群と比較して、IGF-1 添加群で有意な増大が認められた。これらの結果から、再生歯胚の作製過程で IGF-1 を添加することによって再生歯胚の長径および幅径の増大が起こることが示唆された。

(3) 腎皮膜下移植再生歯胚に対する IGF-1 の影響

一般に、腎皮膜下移植は、生体外で培養不可能な移植片を組織学的に正常な組織に形成させる目的で、広く用いられている移植法である。器官培養後の再生歯胚 (IGF-1 添加群または対照群) を腎皮膜下に移植し、その後の再生歯の形態をマイクロ CT 撮影、および三次元的な画像構築にて解析した。長径に関して、IGF-1 添加の再生歯胚における腎皮膜移植後の長径は対照群と比較して有意に増大していることが認められた。幅径に関しては、IGF-1 添加群と対照群で有意差は認められなかった。

(4) IGF-1 添加再生歯の萌出

IGF-1 を添加して作製した再生歯が成体マ

ウス口腔内でサイズの増大を維持して萌出するかどうかを解析した。再生歯胚を成体マウス顎骨に移植したところ、IGF-I-添加群、対照群ともに萌出し咬合平面まで到達した。また、これらの萌出歯をマイクロ CT を用いて解析したところ、IGF-I を添加して作製した再生歯ではサイズの増大が認められた。

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 3 件)

Bando K, Takahashi H, Kinbara M, Tanaka Y, Kuroishi T, Sasaki K, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y: Resin monomers act as adjuvants in Ni-induced allergic dermatitis in vivo. J Dent Res, 93(11), 1101-7, 2014, 査読有, doi: 10.1177/0022034514552674

金原正敬、清流正弘、山本照子: 左右非対称な抜歯を伴う矯正歯科治療における歯科矯正用アンカースクリューの有用性. 東北歯誌, 33(1)、7-15、2014、査読有 Hosoya H, Kitaura H, Hashimoto T, Ito M, Kinbara M, Deguchi T, Irokawa T, Ohisa N, Ogawa H, Takano-Yamamoto T: Relationship between sleep bruxism and sleep respiratory events in patients with obstructive sleep apnea syndrome. Sleep Breath, 18(4), 837-44, 2014, 査読有, doi: 10.1007/s11325-014-0953-5

[学会発表](計 2 件)

金原正敬、黒石智誠、白石大祐、谷内一彦、大津 浩、山本照子、遠藤康男、菅原俊二、マウス金属アレルギーへのヒスタミンの関与、第 16 回日本ヒスタミン学会、2012 年 10 月 19-20 日、岡山

金原正敬、黒石智誠、山本照子、菅原俊

二、遠藤康男、マウス金属アレルギーへのヒスタミンの関与、第 54 回歯科基礎医学会、2012 年 9 月 14-16 日、郡山

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金原正敬 (KINBARA MASAYUKI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 00637960