

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15707

研究課題名(和文)再生器官の発生時間軸を制御するマスター遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of master genes for regulating developmental time in regenerated organs

研究代表者

大島 正充 (OSHIMA, Masamitsu)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00548307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、再生器官の発生に関わる時間軸・形態形成を制御するマスター遺伝子の探索を目的とした。生物種固有の発生メカニズムに基づく同一個体内の乳歯・永久歯の発生時間軸の違いに着目して、イヌ乳歯歯胚・永久歯歯胚の発現遺伝子をcDNAマイクロアレイにて比較検討したところ、FGF14およびFEZF2遺伝子を見出した。この中で、FGF14におけるマウスの歯胚発生に及ぼす影響を解析したところ、歯胚発生における上皮幹細胞やエナメル芽細胞に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to study the identification of master genes for regulating developmental time and morphogenesis in regenerated organs. We hypothesized that essential regulatory factors of developmental time and morphogenesis in tooth development could be identified by comparing the deciduous and permanent tooth germs harvested from an identical beagle dog. In this study, we identified the FGF14 and FEZF2 genes as candidates of the regulating factors by the cDNA microarray analysis. Furthermore, we analyzed the effects of these molecules on the murine tooth germ development. We have indicated that FGF14 promoted substantial elongation of the incisor tooth germ by acceleration of ameloblast proliferation. Further study to elucidate the molecular mechanism of FGF14 and FEZF2 on tooth development is necessary for the identification of the regulatory factors of developmental time and morphogenesis in tooth organogenesis.

研究分野：歯科補綴学、再生医学

キーワード：歯科補綴学一般 細胞生物学 発生・再生 歯

1. 研究開始当初の背景

次世代を担う再生医療として、複数種の細胞を三次元的に再構築した再生臓器・器官を機能不全に陥った臓器・器官と置き換える「器官再生医療」が期待されている。そのなかでも、歯は器官再生医療のモデルケースとして、特に重要な研究課題と位置付けられている(大島正充ら、*日本歯科医師会雑誌* **64**(5): 23-34, 2011)。現在、歯の喪失には人工物による代替治療が適用され、咀嚼機能の回復として有効な医療技術として確立したものの、国民の健康感の向上に伴って、生物学的かつ周囲組織との連携機能する「歯の再生治療」へと発展させることが期待されている。本研究グループは、マウスモデルを用いて人為的に再生器官原基を再構築し、成体動物への移植による機能的な器官再生研究を実証してきた(*PNAS* **11**:106, 13475-80, 2009, *PLoS ONE* **6**:106(32):e21531, 2011)。さらには、実用化に向けた前臨床研究として、生後の大型動物(イヌ)の永久歯歯胚細胞を用いた歯の再生治療の実現可能性も明らかとしてきた。その一方で、上記研究の達成により、臨床実用化に向けた解決すべき課題が明確となった。それは、器官発生・成熟に要する時間の短縮が絶対的に必要ということである。具体的には、マウス由来の再生歯は30日前後で完成歯にまで成熟するのに対して、イヌ由来の再生歯は発生・成熟までに約1年という長期間を要しており、これらの生物由来の時間軸を基礎とした発生・成熟期間の長期化現象は、本法を再生医療として臨床現場に応用するために解決すべき課題といえる。このように、ヒト細胞を利用した将来の再生歯胚移植医療を実現するためには、再生歯の発生・成熟に要する期間の短縮化を目指した技術開発が急務となった。

2. 研究の目的

本研究課題では、同一個体内の乳歯・永久歯の発生時間軸の違いに着目して、生物種固有の発生メカニズムに基づく器官発生・成熟に要する発生時間を短縮するための時間軸制御遺伝子の探索・解明を推進することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 乳歯歯胚・永久歯歯胚における発生時間軸の比較検証

乳歯・永久歯間における歯胚発生時間軸にどの程度の違いがあるかを検証するために、摘出した乳歯・永久歯歯胚を異所的に発生させることにより検証する。これらの乳歯歯胚・永久歯歯胚を摘出し、免疫不全動物の皮下に移植することによって、各移植期間における歯胚発生過程をマイクロCTならびに組織学的解析によって明らかにする。

2) 乳歯歯胚/永久歯歯胚細胞の細胞学的キャラクター

器官発生における時間軸因子を解析していくにあたり、歯胚を構成する上皮細胞や間葉細胞の細胞学的キャラクターは重要である。そこで、摘出した乳歯歯胚と永久歯歯胚から、酵素処理によって単一化された上皮細胞と間葉細胞を各々取得し、細胞増殖能やテロメア活性を評価する。さらには、細胞免疫染色によって未分化マーカーの発現程度の解析や、フローサイトメトリーを用いて細胞周期の分布を解析することにより、歯胚を構成する細胞の性質・挙動を明らかにする。

3) 発生時間軸制御に関わる候補遺伝子の探索

マイクロアレイおよび次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、乳歯歯胚と永久歯歯胚とを比較から発生時間軸制御に関わる候補遺伝子を抽出・絞り込みを行う。

4) 発生時間軸制御に関わる候補遺伝子の発現解析

歯胚発生における時間軸制御遺伝子の発現局在は、候補遺伝子の分子メカニズムの理解と導入技術の開発に重要である。そこで、研究項目3)にて抽出した候補遺伝子を用いて、マウス歯胚発生過程における時間軸制御遺伝子の発現ステージ(発生段階における特異的発現因子の場合を考慮する)と、発現局在を *in situ* hybridization により解析する

5) 時間軸制御因子による器官発生速度の変動解析

一生歯性であり、本来であれば発生速度が変動することのないマウス歯胚を用いて、候補遺伝子を導入することによる歯胚発生速度の変動を器官培養や腎臓皮下移植によって検証する。マウス歯胚およびマウス ES/iPS 細胞に対して、候補として抽出した時間軸制御遺伝子を導入し、実際に器官発生速度に変動が生じるかを解析する。

4. 研究成果

1) 乳歯歯胚・永久歯歯胚における発生時間軸の比較検証 および 2) 乳歯歯胚/永久歯歯胚細胞の細胞学的キャラクター

乳歯歯胚ならびに永久歯歯胚の発生時間軸を比較検討するために、発生期のイヌ顎骨のCT撮影、および組織学的解析を行ったところ、胎齢55日のイヌ胎仔顎骨には組織学的に発生段階の揃った乳歯歯胚・永久歯歯胚が存在することが判明した。これら胎齢55日イヌ胎児顎骨から採取した乳歯・永久歯歯胚を免疫不全マウスに移植したところ、乳歯歯胚は移植後60日程度で完成歯にまで発生した。一方で、永久歯歯胚は同移植期間においても歯冠形成期の途中であり、乳歯/永久歯の各々の歯胚細胞において発生速度に明らかな違いがあることが示された(次頁、上図)。

イヌ由来 乳歯歯胚と永久歯歯胚の抽出

胎齢55日イヌ顎骨から、乳歯歯胚と永久歯歯胚を抽出した

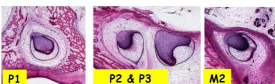
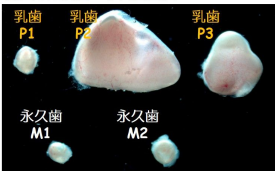
胎齢55日 イヌ



胎齢55日 イヌ顎骨



抽出した乳歯・永久歯歯胚



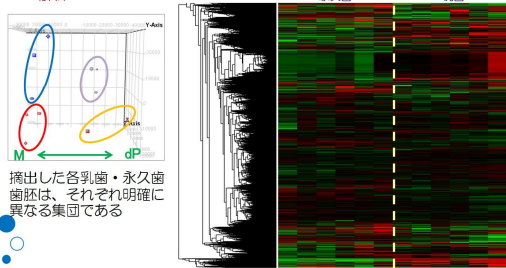
3) 発生時間軸制御に関わる候補遺伝子の探索

胎齢 55 日のイヌ乳歯・永久歯歯胚を用いて、cDNA マイクロアレイ解析を行い、Total 43,603 個の遺伝子群の中から乳歯に高発現している遺伝子 201 個、永久歯に高発現する遺伝子 84 個を抽出し、マイクロアレイの研究結果から抽出された因子の中で、永久歯歯胚にて高発現する FGF14 遺伝子と乳歯歯胚にて高発現する FEZF2 遺伝子を見出した(下図)。

乳歯歯胚と永久歯歯胚の発現遺伝子解析

胎齢55日イヌ乳歯歯胚と永久歯歯胚をマイクロアレイにて比較した

- 主成分 (POC) 解析
- クラスタ解析 (乳歯 vs 永久歯)



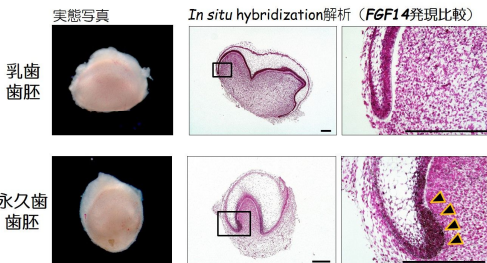
抽出した各乳歯・永久歯歯胚は、それぞれ明確に異なる集団である

4) 発生時間軸制御に関わる候補遺伝子の発現解析

研究項目 3)におけるマイクロアレイの研究結果から抽出された因子の中で、永久歯歯胚にて高発現する FGF14 遺伝子と乳歯歯胚にて高発現する FEZF2 遺伝子を抽出した。これらの分子を対象として、*in situ* hybridization

歯胚発生における機能未解明なFGFs

乳歯・永久歯歯胚を比較した遺伝子発現データベースから、歯胚発生における歯のサイズ・形態形成に関与が予測される候補遺伝子を抽出している



歯のサイズ・形態形成に関与が予測される機能未解明なFGFsを抽出

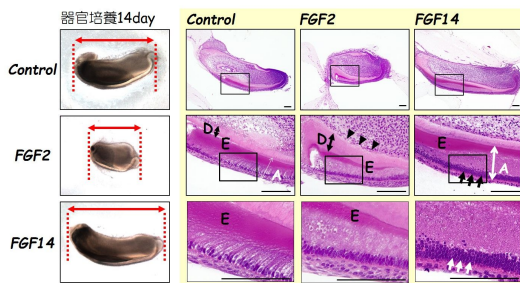
にてイヌ歯胚組織内における発現局在の解析を行ったところ、FGF14 は歯胚上皮幹細胞のニッチであるサービカルループ領域の上皮細胞に遺伝子発現が集積しており(図)、その一方で FEZF2 遺伝子は歯冠部のエナメル芽細胞の領域にて発現集積が認められた。これらの結果より、抽出された 2 つの候補遺伝子は歯胚上皮細胞の未分化性維持や分化促進に影響している可能性が示唆された。

5) 時間軸制御因子による器官発生速度の変動解析

一生歯性であり、本来であれば発生速度が変動することのないマウス歯胚を用いて、候補遺伝子を導入することによる歯胚発生速度・形態の変動を器官培養にて検証した。

FGFs添加による歯のサイズ・形態変化

サイズ・形態形成に影響を及ぼす可能性のあるFGFsを器官培養系に添加して、歯胚発生に及ぼす影響を解析した



FGFs添加により、歯の長さ・形態形成・組織構造的に変化を認める

マウス歯胚における遺伝子導入系は十分に機能しなかったことから、リコンビナントタンパクを用いて器官培養を行ったところ、リコンビナント FGF14 の添加によりマウス切歯歯胚の伸長が促進されるとともに、エナメル質形成領域の肥厚化やエナメル質の形成低下が認められた(上図)。これらの結果より、FGF14 は歯胚発生における上皮幹細胞やエナメル芽細胞に影響を与えていることが示唆された。

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 8 件)

1. Mitsuaki ONO*, Masamitsu OSHIMA*, Miho OGAWA, Wataru SONOYAMA, Emilio Satoshi HARA, Yasutaka OIDA, Shigehiko SHINKAWA, Ryu NAKAJIMA, Atsushi MINE, Satoru HAYANO, Satoshi FUKUMOTO, Shohei KASUGAI, Akira YAMAGUCHI, Takashi TSUJI & Takuo KUBOKI, Practical whole-tooth regenerative therapy utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a post-natal canine model., *Scientific Reports*, 7, 44522; doi: 10.1038/srep44522, 2017. 査読有
2. Kunimichi Niibe, Fumio Suehiro, Masamitsu

- Oshima**, Masahiro Nishimura, **Takuo Kuboki**, Hiroshi Egusa, Challenges for stem cell-based "regenerative prosthodontics". *Journal of Prosthodontic Research*, Volume 61, Issue 1, January 2017, Pages 3-5. 査読有
- Kei Nakajima, **Masamitsu Oshima**, Naomi Yamamoto, Chie Tanaka, Ryosuke Koitabashi, Takashi Inoue, Takashi Tsuji, Development of a functional bio-hybrid implant formed from periodontal tissue utilising bioengineering technology, *Tissue Engineering Part A.*, Volume 22, No.17, page 1108-1115, doi:10.1089/ten.TEA.2016.0130., 2016. 査読有
 - Ryoji Takagi, Junko Ishimaru, Ayaka Sugawara, Koh-ei Toyoshima, Kentaro Ishida, Miho Ogawa, Kei Sakakibara, Kyosuke Asakawa, Akitoshi Kashiwakura, **Masamitsu Oshima**, Ryohei Minamide, Akio Sato, Toshihiro Yoshitake, Akira Takeda, Hiroshi Egusa, Takashi Tsuji, Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an in vivo transplantation model. *Science Advances*. 01 Apr 2016: Vol. 2, no. 4, e1500887, DOI: 10.1126/sciadv.1500887. 2016. 査読有
 - Trang N. Nguyen Vo, Jia Hao, Josh Chou, **Masamitsu Oshima**, Kazuhiro Aoki, Shinji Kuroda, Boosana Kaboosaya, Shohei Kasugai, Ligature induced peri-implantitis: tissue destruction and inflammatory progression in a murine model., *Clin Oral Implants Res*. 2016 Jan 22. doi: 10.1111/clr.12770. 2016. 査読有
 - Naomi Yamamoto, **Masamitsu Oshima**, Chie Tanaka, Miho Ogawa, Kei Nakajima, Kentaro Ishida, Keiji Moriyama & Takashi Tsuji, Functional tooth restoration utilising split germs through re-regionalisation of the tooth-forming field. *Scientific Reports* | 5:18393 | DOI: 10.1038/srep18393. 2015. 査読有
 - Jun Ishikawa, **Masamitsu Oshima**, Fumitaka Iwasaki, Ryoji Suzuki, Joonhong Park, Kazuhisa Nakao, Yuki Matsuzawa-Adachi, Taro Mizutsuki, Ayaka Kobayashi, Yuta Abe, Eiji Kobayashi, Katsunari Tezuka & Takashi Tsuji, Hypothermic temperature effects on organ survival and restoration. *Scientific Reports* 5, Article number: 9563, doi:10.1038/srep09563, 2015. 査読有
 - N Okada, K Mizuta, **M Oshima**, N Yamada, Y Sanada, Y Ihara, T Urahashi, J Ishikawa, T Tsuji, S Hishikawa, T Teratani, and E Kobayashi, A Novel Split Liver Protocol Using the Subnormothermic Oxygenated Circuit System in a Porcine Model of a Marginal Donor Procedure, *Transplantation Proceedings* 47(2):419-426, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

〔招待講演〕

- 大島正充**, 未来の歯科再生医療の実現に向けた器官再生技術の開発、スタデ

ィグループ日曜会 第 300 回例会、大阪・つるやホール第 2 ビル、2017 年 3 月 5 日 .

- 大島正充**, 歯科再生技術が導く歯・歯周組織の包括的再生、第 124 回公益社団法人 日本補綴歯科学会学術大会イブニングセミナー、大宮・大宮ソニックスシティ、2015 年 5 月 29-31 日

〔一般講演〕

- 大島正充**, 窪木拓男, 辻孝. 歯周組織を有するバイオハイブリッドインプラントの開発. 第 36 回公益社団法人日本口腔インプラント学会、中国・四国支部学術大会, 香川・香川県社会福祉総合センター、2016 年 11 月 5-6 日 .
- 大島正充**, 辻孝, 窪木拓男. 歯槽骨吸収に対する歯・歯周組織の包括的再生技術の開発. 第 7 回骨バイオサイエンス研究会, 岡山・岡山コンベンションセンター, 2016 年 6 月 4 日 .
- 山本 直, **大島正充**, 森山啓司, 辻孝. 歯胚分割技術を用いた歯の再生治療の開発. 第 73 回日本矯正歯科学会, 千葉・幕張メッセ, 2015 年 10 月 20 日 ~ 22 日 .

〔図書〕(計3件)

- Masamitsu Oshima**, Takashi Tsuji. Plactical Implications of Stem Cell Technology: Functional Tooth Restoration Using Bioengineered Organ Regeneration and Bio-Hybrid Artificial Organ Replacement. *Horizontal Alveolar Ridge Augmentation in Implant Dentistry, A surgical manual*, edited by Len Tolstunov, Wiley Blackwell, p319-327, 2015. 査読有
- Masamitsu Oshima**, Takashi Tsuji. Whole tooth regeneration as a future dental treatment. *Engineering Mineralized and Load Bearing Tissues (Adv Exp. Medicine, Biology, Vol. 881)*, Springer Book, 2015. 査読有.
- 大島正充**, 辻孝: <総説> 器官再生医療としての機能的な歯科再生技術の開発、*歯科再生・修復医療と材料*(CMC出版)p86-93、2015 年 8 月. 査読無

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 歯科用インプラントデバイス
 発明者: 辻 孝, **大島正充**, 窪木拓男, 安藤嘉基, 小川美帆
 権利者: 同上
 種類: 特願
 番号: 2016-159745
 出願年月日: 2016/8/16
 国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/implant/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島正充 (OSHIMA Masamitsu)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00548307

(2) 研究分担者

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

秋山謙太郎 (AKIYAMA Kentaro)
岡山大学病院・講師
研究者番号：70423291

大野充昭 (ONO Mitsuaki)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60613156