

平成 30 年 5 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20515

研究課題名(和文) 第3歯堤の刺激による歯の再生に関する研究

研究課題名(英文) Study on regeneration of teeth by stimulation of the third dentition

研究代表者

喜早 ほのか (Honoka, Kiso)

京都大学・医学研究科・キャリア支援診療医

研究者番号：50748598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の歯には、通常は退化・消失する第3歯堤が存在する。通常の歯数よりも多く形成される歯を過剰歯といい、実際にヒトにおける第3歯堤由来と考えられる過剰歯症例を経験し、報告した。本研究では歯数の制御に着目し、機能を抑制することで歯数が増加する分子と、逆に機能を亢進することで歯数が増加する分子を標的とした。USAG-1とBMP-7は歯の形態形成と大きさに重要な役割を果たす可能性があることを報告した。さらにヒトの多発性過剰歯の発生由来として幹細胞が関与する可能性を報告した。また、CEBP/とRunx2の解析により、上皮間葉転換が離脱した歯原性上皮幹細胞に過剰歯を発生させることを報告した。

研究成果の概要(英文)：Some mammals has third dentition that degenerates and disappears before eruption. Tooth formed more than normal number of teeth is referred to as supernumerary tooth, and we experienced and reported cases actually thought to originate in the third dentition in humans. In this study, we focused on the control of the number of teeth, and targeted molecules that increase the number of teeth by suppressing functions, and conversely molecules that increase the number of teeth by enhancing functions. We reported that USAG-1 and BMP-7 may play an important role in tooth morphogenesis and size. We also reported the possibility that stem cells may be involved in the development of multiple supernumerary tooth in humans. Furthermore, analysis of CEBP / and Runx 2 reported that epithelial mesenchymal transition enabled disengaged odontogenic epithelial stem cells to develop supernumerary teeth.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：歯数制御 歯数増加

1. 研究開始当初の背景

(1) 爬虫類などの脊椎動物では同じ形の歯が生える同性歯性で、一生の間に何度も生え変わる多生歯性である。哺乳類の歯は他の脊椎動物とは異なり切歯、犬歯、小臼歯、大臼歯と形態が異なる異歯性であり、大臼歯を除いて1度だけ生えかわる2生歯性である。乳歯は歯の第1世代であり、大臼歯を除く永久歯は、第2世代に属している。近年、ヒトにおいて遺伝性に歯数が増加する遺伝子 (RUNX2) の変異や、遺伝子欠損マウスにおいて歯数が増加する遺伝子 (USAG-1, Spry2,4, Efn) など、1つの遺伝子の発現量、遺伝子変異で歯数が増加することが報告され、標的分子を局所で操作することによる歯の再生の可能性が示唆されている。

(2) これまでに申請者の所属機関において、BMP拮抗分子 USAG-1 遺伝子欠損マウスに歯数が増加する表現型を見出し報告してきた¹⁾。野生型マウスの痕跡的な乳切歯は胎生15日まで発生が進むが、以後退化・消失して行くのに対し、USAG-1 欠損マウスでは、USAG-1 欠損により BMP のシグナリングが増強したことにより、歯間葉細胞のアポトーシスが抑制され、胎生15日以降も発生が進み、本来は退化・消失するはずの痕跡的乳切歯が生き残った結果、過剰歯として萌出し、歯数が増加することが分かった²⁾。

一方、BMP-7 遺伝子欠損マウスにおいて上顎の歯の発生が停止することが報告されたため、上顎切歯の歯数増加に関わる BMP シグナリングは BMP-7 である可能性が示唆された。申請者はこれを検証し、マウスの上顎切歯部では、USAG-1 は BMP-7 に拮抗して痕跡的乳切歯を退化・消失させ、歯数制御に関与することを報告した³⁾。胎生15日の USAG-1 改変マウスの上顎切歯部切除片と BMP-7 を含浸させたゼラチンスポンジとを合わせて同種マウス腎皮膜下に移植し20日間成長させた結果、USAG-1 欠損マウスと USAG-1 ヘテロ接合体マウスにおいて過剰歯をみとめ、上顎切歯部では BMP-7 の添加により、USAG-1 ヘテロ接合体マウスにも過剰歯を形成することが実証された³⁾。野生型では過剰歯が認められなかったが、USAG-1 をある程度欠失させた状態で BMP-7 を投与することにより上顎切歯部では痕跡的乳切歯が成長する可能性が示唆された。

マウスと同じ哺乳類であるヒトにおいても、永久歯の後継歯 (第3生歯) を形成する潜在能力を持った、通常は退化・消失する痕跡的な第3歯堤が存在することが以前より報告され、その形成は出生後の永久歯の歯冠形成期とされている⁴⁾。ヒトの痕跡的な第3歯堤の形成は出生後であるため、同部へのアクセスは十分可能であり、局所での USAG-1 の機能抑制/BMP-7 の機能亢進により第3生歯を形成させることにより歯の再生を目指す本研究は重要なテーマと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では歯の形成過程において、特に歯数の制御に着目し、機能を抑制することで歯数が増加する分子 (USAG-1 など) と、逆に機能を亢進することで歯数が増加する分子 (BMP-7 など) を標的とする。これらの標的分子を第3歯堤の局所において機能抑制または機能亢進することにより、永久歯の次に萌出する第3の歯を形成させ、歯の再生を目指す。

(2) 本研究では歯数の制御に着目し、ヒトにおける過剰歯の解析によりその発生過程を明らかにし、将来的に歯数を増加させることによる歯の再生を目指す。過剰歯の発生原因には第3歯堤由来のものと上皮幹細胞由来のものなど、いくつか存在すると考えられる。第3歯堤由来の過剰歯には3つの特徴があるとされており、1つ目は過剰歯が舌・口蓋側に発生する点。2つ目は石灰化のスレーピングが永久歯より後である点。3つ目は先行永久歯と形態が類似している点である。上皮幹細胞由来の過剰歯にはその様な発生部位、形態に特徴はなく不規則であるとされている。これらの発生割合は明らかではなく、1症例あたり多数の過剰歯を認める場合には遺伝的要因が示唆されている。過去5年間の過剰歯症例について検討し、ヒトにおける第3歯堤由来の過剰歯について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 局所での標的分子の機能抑制/機能亢進による、in vitro での歯数増加システムの確立。歯胚の器官培養、マウス腎被膜下移植などの in vitro で歯の形成をおこす実験系を用いる。USAG-1 をはじめとする標的分子の機能抑制、または機能亢進を行い、in vitro で歯数を増加させるシステムを確立する。胎生15日の USAG-1 改変マウスの上顎切歯部切除片と BMP-7 を含浸させたゼラチンスポンジとを合わせて同種マウス腎皮膜下に移植し20日間成長させた結果、USAG-1 欠損マウスと USAG-1 ヘテロ接合体マウスにおいて過剰歯をみとめ、上顎切歯部では BMP-7 の添加により、USAG-1 ヘテロ接合体マウスにも過剰歯を形成することが実証された³⁾ (図1)。

この結果を踏まえ、胎生15日の野生型マウスの上顎切歯部切除片に USAG-1 の抑制物質をゼラチンスポンジに含浸させて投与することによって USAG-1 の機能を抑制し、さらに BMP-7 を投与することによって歯数が増加するかどうかを検討する。

上顎切歯部に対するBMP-7の投与

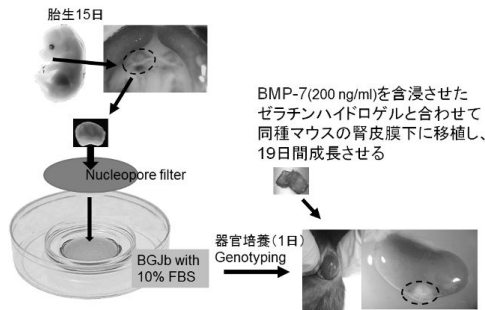


図 1

(2) ヒトにおける過剰歯症例の検討

2011年9月から2015年8月までの5年間に京都大学医学部附属病院歯科口腔外科の初診を受診し、パノラマX線写真撮影を施行された患者を対象とした。過剰歯についての調査項目は年齢、性別、発生部位、左右、本数、乳歯・永久歯、萌出・埋伏、順生・逆生、形態、歯根完成度、大きさ、頬舌的位置関係とした。パノラマX線写真を用いて歯科医師8名により過剰歯の有無を判定した。判定は「有」「無」「要検討」の3種類とし、「要検討」症例に関しては再度7人の歯科医師により「有」「無」の2種類の判定を行い過半数以上の歯科医師が「有」の判定をした例を検討した。

(3) すでに申請者の所属機関で解析を開始しているCEBP β 欠損マウス⁵⁾を利用し、もう1つのメカニズムである歯原上皮幹細胞の局所での上皮間葉誘導による歯の再生を目指した研究を行う。CEBP β 欠損マウスは上顎切歯周囲に複数の過剰歯を認め、その過剰歯は歯原上皮幹細胞に由来すると考えられる⁵⁾。

4. 研究成果

(1) USAG-1^{+/+}およびUSAG-1^{-/-}の上顎切歯歯胚に対してBMP-7を投与した切歯部切除片は、培養20日後にUSAG-1^{-/-}と同様の数の過剰歯が発生するが、USAG-1の野生型における培養移植片は正常な歯数を示した。これらの結果は、BMP-7が過剰歯形成を誘発する部分的な可能性を有することを示したが、BMP-7のみで過剰歯を誘導することは観察されなかった。

(2) 対象患者は15008例(男性6,365症例、女性8,643症例)だった。撮影されたパノラマX線写真15008例から過剰歯、過剰埋伏歯、歯牙腫、埋伏歯、半埋伏歯、埋伏智歯の診断を受けた3296例のうち、過剰歯「有」と判断された症例が195例、要検討が212例だった。要検討症例のうち「有」の判定は20例で、最終的に得られた過剰歯「有」症例の215例のうち、さらにCTを撮影している78例に関して過剰歯の発生割合と発生本数、発生部

位に関して検討を行った。

過剰歯「有」215例(男性125例、女性90例)

	過去の報告	自験例
性差	男性に多い ¹⁻³⁾	男性に多い
過剰歯の発生割合	1%前後 ^{2,4)}	1.4%
最多年齢分布	9歳以下(34.5%) ⁵⁾	9歳以下(12.3%)
1患者における最多本数	1本(73.7%) ⁵⁾	1本(77.7%)
最多発生部位	上顎正中部 ^{6,7)}	上顎正中部(51.1%)

今回の検討結果は、過去の報告の結果と類似していた。

1) 服部 1982
2) 前井 1955
3) 藤田 1959
4) McKibben 1971
5) 藤原 1987
6) 佐藤 1959
7) Stanfre 1930

CT撮影 78例(男性50例、女性28例)

第3歯堤由来と考えられる過剰歯症例について検討

過剰歯の好発部位は上顎前歯部(51.1%)で、次いで上顎大臼歯部(19.1%)であった。過剰歯を認めた症例は215症例(男性125症例、女性90症例)であり男性に多く認め、好発部位は上顎前歯部(51.1%)であった。過剰歯の存在割合は過去の報告では1%前後のものが多く、本研究においても1.4%であった。また、その他の検討項目に関しても先行研究と類似していた。

さらにCTを撮影した78例に対し、第3歯堤由来と考えられる過剰歯症例について検討したところ、第3歯堤由来と考えられる過剰歯は小臼歯部で多いことがわかった。さらに、男性で多く、3本以上のものは第3歯堤由来である可能性が高いことがわかった。過剰歯の発生由来には第3歯堤や上皮幹細胞など、複数存在すると考えられ、第3歯堤由来と考えられる過剰歯の存在が示唆され、第3歯堤の歯の再生への応用の可能性が示唆された。

(3) CEBP β 欠損マウスの上顎切歯歯胚において、CEBP β 欠損マウスは歯髄中のセメント質様硬組織、エナメル芽細胞の極性の消失、エナメル芽細胞層におけるエナメルマトリックスの発現および上皮間葉転換マーカーの発現の増加を示した。細胞株におけるRunx2ノックダウンは、同様の発現パターンを示した。上皮間葉転換は、離脱した歯原性上皮幹細胞に過剰歯を発生させることを可能にすることが明らかになった。細胞系におけるCEBP β とRunx2のノックダウンは、より高いピグリカンおよびデコリン発現、および歯根周囲領域におけるデコリン陽性染色を示し、過剰歯の形成に關与することを示した。CebpbとRunx2は、相乗的に作用し、前歯における過数歯の形成において重要な役割を果たすことが明らかになった。

<引用文献>

Murashima-Suginami A., Rudiment incisors survive and erupt as supernumerary teeth as a result of USAG-1 abrogation. Biochemical and biophysical research communications, 359, 2007, 549-555
Murashima-Suginami A., Enhanced BMP

signaling results in supernumerary tooth formation in USAG-1 deficient mouse. Biochemical and biophysical research communications, 369, 2008, 1012-1016
Kiso H., Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formations. PloS one, 9, 2014, e96938
Ooe T, Epithelial anlagen of human third dentition and their migrations in the mandible and maxilla. Okajimas folia anatomica japonica, 46, 1969, 243-251
Huang B, et al., Phenotypes of CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency: hyperdontia and elongated coronoid process. Oral diseases, 19, 2013, 144-150

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Honoka Kiso, Ando Ryokoh. Dentigerous cyst associated with a supernumerary tooth in the nasal cavity: A case report. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, 27, 2015, 33-37
DOI: 10.1016/j.ajoms.2013.06.002

Katsu Takahashi, Yumiko Togo, Kazuyuki Saito, Honoka Kiso, Boyen Huang, Hiroko Tsukamoto, Kazuma Fujimura, Kazuhisa Bessho. Two non-syndromic cases of multiple supernumerary teeth with different characteristics and a review of the literature. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, 28, 2016, 250-254
DOI: 10.1016/j.ajoms.2015.12.006

Yumiko Togo, Katsu Takahashi, Kazuyuki Saito, Honoka Kiso, Hiroko Tsukamoto, Boyen Huang, Motoko Yanagita, Manabu Sugai, Hidemitsu Harada, Toshihisa Komori, Akira Shimizu, Mary MacDougall, Kazuhisa Bessho. Antagonistic Functions of USAG-1 and RUNX2 during Tooth Development, PloS one, 査読有, 11, 2016, e0161067
DOI: 10.1371/journal.pone.0161067

Kazuyuki Saito, Katsu Takahashi, Masakazu Asahara, Honoka Kiso, Yumiko Togo, Hiroko Tsukamoto, Boyen Huang, Manabu Sugai, Akira Shimizu, Masaharu Motokawa, Harold C. Slavkin, Kazuhisa Bessho. Effects of Usag-1 and Bmp7 deficiencies on murine tooth morphogenesis, BMC Developmental Biology, 査読有, 16, 2016, 14
DOI: 10.1186/s12861-016-0117-x

Kazuyuki Saito, Katsu Takahashi, Boyen

Huang, Masakazu Asahara, Honoka Kiso, Yumiko Togo, Hiroko Tsukamoto, Sayaka Mishima, Masaki Nagata, Machiko Iida, Yoshihito Tokita, Masato Asai, Akira Shimizu, Toshihisa Komori, Hidemitsu Harada, Mary MacDougall, Manabu Sugai, Kazuhisa Bessho. Loss of Stemness, EMT, and Supernumerary Tooth Formation in *Cebpb^{-/-}Runx2^{+/-}* Murine Incisors, Scientific Reports, 査読有, 8, 2018
DOI: 10.1038/s41598-018-23515-y

〔学会発表〕(計5件)

Katsu Takahashi, Honoka Kiso, Kazuyuki Saito, Yumiko Togo, Hiroko Tsukamoto, Boyen Huang, Kazuhisa Bessho. Interactions between BMP-7 and USAG-1(uterine sensitization-Associated gene-1) regulate supernumerary maxillary incisor formations, International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery 2015, 2015

喜早 ほのか, 高橋 克、斎藤 和幸、東郷 由弥子、塚本 容子、別所 和久、歯の再生に向けたUSAG-1とBMP-7遺伝子変異マウスにおけるエナメル上皮幹細胞の解析、第36回日本炎症・再生医学会、2015

喜早 ほのか, 高橋 克、小口 修矢、西村 隆克、斎藤 和幸、三島 清香、別所 和久、歯の再生に向けたヒト非症候性多発性過剰歯の検討、第37回日本炎症・再生医学会、2016

喜早 ほのか, 高橋 克、西村 隆克、小口 修矢、懸野 安澄、斎藤 和幸、山崎 亨、浅井 啓太、三島 清香、別所 和久、歯の再生に向けた当科における過去5年間の過剰歯に関する検討、第61回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2016

高橋 克、斎藤 和幸、喜早 ほのか、三島 清香、杉並 亜希子、原田 英光、田畑 泰彦、別所 和久、分子標的治療による欠損歯の再生: 第2のシーズCEBPβ、第17回日本再生医療学会総会、2017

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

喜早 ほのか (KISO, Honoka)
京都大学・大学院医学研究科・キャリア支
援診療医
研究者番号：50748598

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

別所 和久 (BESSHO, Kazuhisa)
高橋 克 (TAKAHASHI, Katsu)