

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02991

研究課題名(和文) iPS干渉法を応用した歯胚発生メカニズムの理解と歯の再生技術への応用

研究課題名(英文) Understanding of molecular mechanisms of tooth development using iPS interference and application to tooth regeneration techniques

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：生理機能を有した完全な歯を再生することは歯科界の究極の目標であり、本研究では、歯胚形成期歯原性上皮細胞と間葉細胞を特徴付けているマスター転写因子群を同定し、これらの誘導方法を開発することを目的とした。最初に、胎生期マウス歯胚および歯原性幹細胞の一つであるヒト歯乳頭由来間葉系幹細胞(以下、hSCAP)のRNA-seq解析を行い、歯原性間葉細胞に特異的な転写因子を抽出した。次にiPS干渉法にてスクリーニングを行い候補転写因子を絞り込んだ。最後に、候補転写因子を皮膚線維芽細胞に遺伝子導入した結果、歯原性間葉細胞に類似した細胞へと誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の再生医療は歯科疾患に対する究極の治療法として次世代歯科治療に位置づけられる重要な課題である。歯の再生医療の技術開発は、基礎研究としての高い価値を有するだけでなく、臨床応用化に向けたトランスレーショナルな面も持つ研究であり、本研究は歯科の変革に留まらず、上皮間葉相互作用で形成される全身臓器の再生医療の創成という国民の期待に応える国策にも値する重要な意義を有している。

研究成果の概要(英文)：Whole-tooth regeneration is ultimate goal in dental field and the goal of this study is to identify the master transcription factors that characterize tooth germ derived epithelial and mesenchymal cells and develop method to generate those cells. First, we analyzed the mouse embryonic tooth germ and human stem cell from the apical papilla (hSCAP) by RNA-Seq and performed iPS interference to identify the potential transcription factors. Finally, candidate transcription factors were overexpressed in human adult dermal fibroblast (hADF), resulting that hADF was induced into the cells similar to tooth germ derived mesenchymal cells.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯の再生 転写因子 iPS干渉

1. 研究開始当初の背景

臓器としての完全な歯の再生は、歯科界にとって究極の目標である。なぜなら、口腔インプラントの予後が十分信頼できるようになった現在でも、インプラント体が歯根膜を持たないため、インプラント体の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、解決すべき問題が多々残されている。しかし、健全な象牙質、セメント質、歯根膜をもつ臓器としての歯の再生が可能となればこの状況は一変する。

多くの臓器は、上皮細胞と間葉細胞の相互作用により器官原基が発生し、臓器が形成される。これまでに、我々は、マウス胎生期の歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞を高密度に付き合わせることで歯の原基である歯胚を再構成し(以下、器官原基法)、顎骨に移植することで生理的機能を有した歯を再構成可能であることを報告した。さらに、2017年には、世界で初めて大型動物であるイヌの出生後の生体から自己幼弱永久歯胚を採取、器官原基法を応用して生理的機能を有した臓器としての歯の再構成に成功した。本成果は、大型動物においても適切な時期の歯原性上皮細胞と間葉細胞を得ることができれば臓器としての歯の再生が可能になることを示しており、ヒトにおける生理的機能を有した完全な歯の再生が可能な時代に一歩近づいたと大きな注目を浴びたところである。

ところが、現時点では、この技術を用いた歯の再構築は、マウスの胎生 10 日～15 日の歯原性上皮細胞と間葉細胞の突き合わせか、非常に限られたタイミングの幼弱なイヌ永久歯胚の上皮細胞と間葉細胞の組み合わせ以外では安定して成功しない。従って、通常の歯科治療として利用可能な歯の再生をヒトで具現化するためには、自己、もしくは主要組織適合性抗原をマッチさせた多能性幹細胞等から、これらの胎生期の幼若な歯原性上皮細胞や間葉細胞を分化誘導するか、歯の構成要素を作る力がある歯乳頭細胞や歯髄細胞等を Direct Reprogramming することにより歯胚誘導可能な幼若な細胞ソースを得て、これらを用いて器官原基法により再生歯胚を得る必要がある。しかし、それを実現するために必要な上皮間葉相互作用の分子メカニズム、歯原性上皮細胞や間葉細胞のマスター遺伝子や転写因子群を含めた分子細胞生物学的な基礎的理解が不足しているのが現状である。

2. 研究の目的

本申請研究では、補綴治療の究極の目標である「臓器としての歯の再生」に必要な基盤技術を開発することを最終目的としている。具体的には、エナメル芽細胞および象牙芽細胞の前駆細胞もしくはその系譜上にある類縁細胞と思われ、上皮間葉相互作用を活発に生じるマウスの胎生 10 日～15 日齢の歯胚形成期歯原性上皮細胞と間葉細胞を特徴付けているマスター遺伝子や転写因子群を同定し、これらの誘導方法を開発する。

3. 研究の方法

1. 細胞間比較による遺伝子発現解析

これまでに、高密度のヒト歯乳頭由来間葉系幹細胞 (以下、hSCAP) と高密度のマウスの E14.5 の歯胚由来上皮細胞を突き合わせて器官培養した結果、歯胚が発生することを確認してきた。本結果は、hSCAP が歯胚を再生可能な間葉系細胞であることを意味している。そこで、hSCAP と間葉系幹細胞ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (以下、hBMSC)、ヒト成人皮膚由来線維芽細胞 (以下、

hADF)から RNA を精製し, RNA sequence(RNA-Seq)解析を行い, hSCAP に特異的に発現している転写因子を抽出した.

2. 歯胚発生過程の遺伝子発現解析

胎生 11.5, 12.5, 14.5, 18.5 のマウス下顎第一大臼歯の歯胚を顕微鏡下にて採取し, 酵素処理により上皮組織と間葉組織に分離した. その後, TAKARA の Smart-seq V4 kit にて, ライブラリーの作製を行い, RNA-Seq 解析を行った.

3. iPS 干渉法による転写因子の絞り込み

近年, Hikichi, Masui らにより, 特定の細胞へ分化するために必要な転写因子を同定する手法として, 「iPS 干渉法」が開発された. 具体的には, 目的の細胞に *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* の山中 4 因子と同時に目的の細胞の運命決定を司る転写因子 1 つを導入し, iPS 化効率を評価する. 結果として, 細胞の運命決定を司る転写因子を同時に導入した時のみ, iPS 干渉が起き iPS 化効率が減少する. 本現象を利用し候補転写因子の絞り込みを行った.

4. hADF から hSCAP へのダイレクトリプログラミングの試み

hADF から hSCAP へのダイレクトリプログラミングを目的とし, 実験 2 で抽出された 18 転写因子, および, 実験 3 で抽出された 13 転写因子を hADF に遺伝子導入した. hADF は骨芽細胞分化能を有さないが, hSCAP は骨芽細胞分化能を有していることから, 遺伝子導入 14 日後に, 骨芽細胞誘導培地に交換し, 骨芽細胞へと分化誘導した. 分化誘導 14, 21 日後に RNA を回収し, 骨芽細胞マーカーの一つであるオステオポンチンの遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法にて計測した. また, 骨分化や石灰化した細胞に沈着したカルシウムをアリザリンレッド S にて染色した.

4. 研究成果

1. 細胞間比較による遺伝子発現解析

転写因子に関する過去の文献, および, 分化制御に関わる転写因子に関する過去の文献を参考に, 細胞分化に関わる転写因子を抽出した. そして, 以下の条件で各細胞の RPKM 値の平均値を比較し, hSCAP に高発現している転写因子を抽出した. . hSCAP と hBMSC の RPKM 値を比較して hSCAP が 2 倍以上発現しており, なおかつ hSCAP の RPKM 値が 3 以上の転写因子, . hSCAP と hADF の RPKM 値を比較して hSCAP が 2 倍以上発現しており, なおかつ hSCAP の RPKM 値が 3 以上の転写因子を抽出した.

2. 歯胚発生過程の遺伝子発現解析

RNA-Seq 解析の結果から, 歯胚発生初期に発現している転写因子を抽出した. そして, 実験 1 にて抽出された転写因子と照らし合わせ, 歯胚由来間葉細胞に特異的に発現している転写因子の絞り込みを行い, 18 転写因子を抽出した.

3. iPS 干渉法による転写因子の絞り込み

iPS 干渉法を用いて, hSCAP に山中 4 因子と候補転写因子を 1 つずつ共導入し, iPS 細胞への誘導を行った. 誘導開始 26 日後にコロニーが形成を認め, 遺伝子導入開始 30 日後に ALP 染色を行い, iPS 細胞のコロニー数を計測した. その結果, 山中 4 因子のみ導入群と比較して, コロニーの数が減少させた転写因子が 13 転写因子存在した.

4.hADF から hSCAP へのダイレクトリプログラミングの試み

抽出した転写因子を hADF に遺伝子導入し、骨芽細胞へと分化誘導した。その結果、候補因子を遺伝子導入した hADF のオステオポンチンの遺伝子発現量は、対照群の hADF と比較し著しく上昇し、アリザリンレッド S の染色性も向上した。

本結果は、今回抽出した転写因子セットの中に、歯の再生能力を有した歯胚由来間葉系細胞に必須な転写因子が含まれている可能性を示唆しており、今後さらなる絞り込みを行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomura Y, Hara E.S, Yoshioka Y, Nguyen H.T, Noshio S, Komori T, Ishibashi K, Oohashi T, Ono M, Kuboki T.	4. 巻 207
2. 論文標題 DNA Methylation-Based Regulation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Chondrogenic Differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells Tissues Organs	6. 最初と最後の頁 115-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000502885. Epub 2019 Oct 1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nguyen Ha Thi, Ono Mitsuaki, Oida Yasutaka, Hara Emilio Satoshi, Komori Taishi, Akiyama Kentaro, Nguyen Ha Thi Thu, Aung Kyaw Thu, Pham Hai Thanh, Tosa Ikue, Takarada Takeshi, Matsuo Koichi, Mizoguchi Toshihide, Oohashi Toshitaka, Kuboki Takuo	4. 巻 34
2. 論文標題 Bone Marrow Cells Inhibit BMP-2-Induced Osteoblast Activity in the Marrow Environment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 327 ~ 332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbmr.3598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuboki T, Ichikawa T, Baba K, Fujisawa M, Sato H, Aita H, Koyama S, Hideshima M, Sato Y, Wake H, Kimura-Ono A, Nagao K, Kodaira-Ueda Y, Tamaki K, Sadamori S, Tsuga K, Nishi Y, Sawase T, Koshino H, Masumi SI, Sakurai K, Ishibashi K, Ohyama T, Akagawa Y, Hirai T, Sasaki K, Koyano K, Yatani H, Matsumura H	4. 巻 62(2)
2. 論文標題 A multi-centered epidemiological study evaluating the validity of the treatment difficulty indices developed by the Japan Prosthodontic Society.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Reserach	6. 最初と最後の頁 162-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 枝松 緑, 小川美帆, 井出亮太郎, 窪木拓男, 大橋俊孝, 辻 孝, 大野充昭
2. 発表標題 scRNA-Seq解析を応用したマウス歯胚発生メカニズムの解明の試み
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kuboki T
2. 発表標題 Biological Regenerative Medicine in Dental Practice -to Attain Reliable and Sophisticated Dental Therapy-.
3. 学会等名 Special Invited Lecture in ACTA 2018. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuboki T
2. 発表標題 Collaboration between Soft Tissue Management and Oral Implant Therapy to Attain Optium Esthetic Result.
3. 学会等名 Special Lecture in Haiphong 2018. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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	大野 充昭 (Ono Mitsuaki) (60613156)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	
研究分担者	辻 孝 (Tsuji Takashi) (50339131)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	
研究分担者	渡辺 亮 (Watanabe Akira) (60506765)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宝田 剛志 (Takarada Takeshi) (30377428)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	ハラ エミリオ・サトシ (Hara Emilio Satoshi) (40779443)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・研究准教授 (15301)	

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