

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670835

研究課題名(和文) 歯胚移植医療の発展に向けた革新的歯胚分割技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of the splitting tooth germ method for realization of tooth germ transplantation therapy.

研究代表者

辻 孝(TSUJI, TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号：50339131

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)：本研究課題では、免疫学および生物学的観点から現実的かつ有用な歯胚移植医療の適応拡大に向けて、移植歯胚の絶対数を増やすための革新的な歯胚分割技術を構築した。分割された歯胚は、生体内および口腔内で複数本の正常な成熟歯に発生することが明らかとなり、その分割メカニズムは、機械的外力による歯胚の形成領域の再領域化によるものと示唆された。さらに、口腔内にて発生したそれぞれの分割歯は、生理的な歯の移動が可能であると共に、中枢と連携した神経機能を有することが明らかとなった。本研究の推進により、器官原基の分割発生メカニズムの学問的知見の集積と共に、生物学的な歯科再生治療の実現可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Conventional dental therapies have been widely applied to correct tooth loss, further technological improvements based on biological findings are expected to also restore physiological tooth function. In this study, we developed a novel mechanical ligation method for splitting tooth germs through spatiotemporal regulation of the reaction-diffusion waves in the tooth-forming field. Each of the split tooth germs developed multiple underlying signalling centres and eventually developed into natural teeth. After transplantation, the split teeth successfully erupted into a region of tooth loss and restored physiological tooth functions, including mastication, periodontal ligament function and appropriate responses to noxious stimuli. This study represents a technological development based on biological mechanisms that can increase the number of available tooth germs for tooth germ transplantation.

研究分野：再生医工学

キーワード：再生医工学 歯 器官形成

1. 研究開始当初の背景

複数種の細胞を三次元的に再構築した再生器官を、機能不全に陥った器官と置き換える「器官再生医療」が期待されている。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(Etsuko Ikeda, Expert Opin. Biol. Ther. 8:735-744, 2008; 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、より生物学的な機能を付加し、周囲組織との連携機能する「歯科再生治療」へと発展させることが期待されている。先天的および後天的に歯の喪失を生じた患者に対して、幼若な発生段階の自家歯胚を移植する歯胚移植治療が臨床的に行われている。この治療法は生物学的な歯胚発生により、機能的な歯が再生可能であることばかりでなく、ヒトにおける歯の再生治療の実用化において、免疫学的観点からも現実的に有用な歯科再生治療として考えられている。しかしながら、歯胚の個数や発生時期から移植可能な歯胚は制限されるため、移植材料の絶対数を確保する試みが期待されている。本研究グループは器官原基を再構築し、再生器官原基の移植による機能的な器官再生研究を実証してきた (*Nature Methods* 4:227-230, 2007, *PNAS* 11:106, 13475-80, 2009, *Nature Commun.* 3, 784, 2012)。これまでのオリジナルな細胞操作技術や歯の再生の基盤技術を応用することにより、本研究課題は早期の臨床実用化が可能な治療技術開発へと発展することが大いに期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では、移植歯胚の絶対数の増加に向けて、発生期のマウス歯胚およびヒト歯胚から複数個の機能的な歯を創り出すための歯胚分割技術を構築し、分割操作を加えた器官発生過程におけるメカニズムの解析、および歯胚移植医療に応用可能な技術開発を行うことを目的とする。

1) 歯胚分割技術の構築

マウス胎仔歯胚を用いて、歯胚分割可能な加工技術を構築する。

2) 分割歯胚における歯形成能の検討

項目1において確立した技術を用いて、分割歯胚を生体内移植することにより、正常な歯形成能を維持しているか、またその分割歯の大きさや構造を評価する。

3) 分割歯胚分割における発生メカニズムの解析

分割操作により発生する歯胚における、歯の発生に関わる遺伝子発現や細胞動態を解析する。

4) 分割歯胚の口腔内発生の解析

マウス口腔内移植モデルを用いて、分割歯胚を口腔内に移植することにより、正常な歯の構造を有した分割歯の発生・萌出が可能であるかを解析する。

5) 分割歯の生理機能の解析

口腔内に萌出した分割歯に対して、実験的矯正や分割歯への神経侵入、中枢への侵害刺激の伝達能を解析することにより、歯の生理機能の評価を行う。

3. 研究の方法

1) 歯胚分割技術の構築

器官原基に分割操作を加えて、正常な組織構造を有した複数の器官を発生させるためには、単純な切断操作ばかりでなく、器官の発生・成長に伴った段階的分割方法が必要になる可能性がある。そこで、マウス胎仔歯胚を用いて、機械的切断による方法と歯胚の結紮による歯胚分割操作を行い、器官培養により歯胚発生を評価する。さらに、発生段階における分割の可否を明らかとするために、各歯胚発生時期のマウス胎仔歯胚に分割操作を加え、分割可能な歯の発生段階の解析を行う。

2) 分割歯胚における歯形成能の検討

分割操作を加えた歯胚が、生体内で発生・成長して天然歯と同等の組織構造を有することが重要である。また、分割操作により発生した歯において、歯冠および歯根のサイズや形態学的構造が正常であるかどうかを解析する必要がある。分割歯胚をマウス腎臓皮下に移植することにより、天然歯と同等の組織構造を有する分割歯が発生可能であるかどうかを経時的なマイクロCT解析、および組織学的解析により明らかにする。さらに、発生した分割歯の歯冠の大きさや咬頭数、形成歯根の数や長さをマイクロCTにて計測することにより、分割歯の構造解析を行う。

3) 歯胚分割における発生メカニズムの解析

分割操作による歯胚発生において、その発生に関わる遺伝子発現や細胞動態、組織形成を明らかとすることにより、最適な分割技術の開発や、分割歯のサイズ拡大や形態付与技術に繋がる可能性があることから、天然歯胚の発生と比較した発生メカニズム解析が必要である。そこで、歯の発生に重要な1stエナメルノットの形成や、咬頭形成に関わる2ndエナメルノットの形成、さらには歯冠サイズの大きさを決定する歯胚上皮の形態形成に関わる *FGF4*, *SHH* の発現を、段階的な分割過程の段階的な分割過程の歯胚を用いて *in situ* hybridization により解析する。また、歯胚上皮や歯小囊組織の細胞動態をライブイメージングにより解析することにより、分割面における各組織の分離・結合過程を明確

化し、総合的な分割発生メカニズム解析を行う。

4) 分割歯胚の口腔内発生の解析

臨床応用化に向けたモデルの実証には、分割操作を行った歯胚が顎骨内で発生・萌出することが重要である。そこで、分割歯胚を口腔内に移植することにより、正常な歯の構造を有した分割歯の発生・萌出が可能であることをマイクロCTならびに組織学的解析により実証する。

5) 分割歯の生理機能の解析

口腔内に発生・萌出した分割歯が組織学的に正常であるだけでなく、天然歯と同等の歯根膜機能や中枢と連携した連携機能などの生理機能が備わっていることが重要である。そこで、発生した分割歯に対して矯正力を付与し、歯根膜を介した生理的な骨リモデリングによる歯の移動がなされるかについて、移動量の測定および組織解析により評価する。さらに、分割歯の形成歯根膜内および歯髄内に神経侵入がなされているかを免疫組織学的解析により明らかとし、末梢から中枢への刺激伝達が可能であることを矯正学的実験、露髄実験による延髄における c-Fos タンパク質の発現検出により解析する。

4. 研究成果

1) 歯胚分割技術の構築

帽状期のマウス胎仔歯胚を用いて、機械的切断と結紮による歯胚分割方法を検討したところ、分割された2つの歯胚の初期発生が生じることが器官培養にて示された。また、これらの分割方法を歯胚の複数箇所に行うことにより、複数個の歯胚が発生することが明らかとなった。次に、各歯胚発生時期の歯胚に分割操作を加えた場合、帽状期および鐘状期前期の歯胚では機械的切断および結紮による方法にて分割可能であったのに対して、鐘状期後期になると機械的切断では正常に発生しないことを明らかとした。

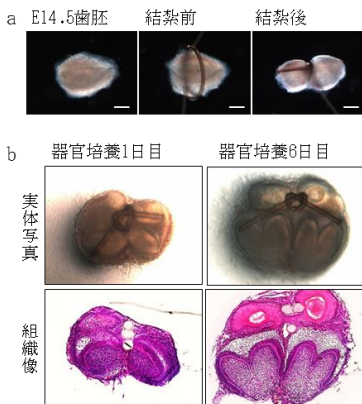


図1 (a) E14.5 歯胚結紮前後の実体写真
(b) 結紮により分割した2つの歯胚

2) 分割歯胚における歯形成能の検討

分割操作を行った歯胚を腎臓皮下に移

植することにより、天然歯と同等の組織構造を有する2つの分割歯の発生を認めた。生体内で発生した2つの分割歯は、各々独立した歯根と歯周組織を有しているばかりでなく、発生したそれぞれの分割歯は天然歯と比較して歯冠の大きさや咬頭数がほぼ半分になることを明らかとした。

腎臓皮下移植30日目

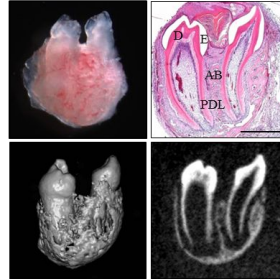


図2: 腎臓皮下で発生した分割歯
実体写真(左上図)、HE染色像(右上図)、CT像(下図)
E:エナメル質、D:象牙質、AB:歯槽骨、PDL:歯根膜

3) 分割歯胚分割における発生メカニズムの解析

結紮直後からの分割過程を時空間的に観察するため、G1/G0期の細胞が赤色蛍光を発する fucci596 マウスと染色体が緑色蛍光を発する H2B-GFP マウスを交配して得られたトランスジェニックマウスから歯胚を採取し、高感度共焦点顕微鏡にてタイムラプスイメージングを4日間取得し、細胞動態を解析したところ、結紮面の上皮細胞が嵌入して分断されることにより、2つの歯として発生していることが明らかとなった(図3)。また、歯の発生に重要な1st エナメルノットの形成や、咬頭形成に関わる2nd エナメルノットの形成、さらには歯冠サイズの大きさを決定する歯胚上皮の形態形成に関わる *Shh* および *Fgf4* の遺伝子発現を *in situ* hybridization により解析したところ、それぞれの分割歯胚には天然歯胚と同様の遺伝子発現を呈していたことが明らかとなった(図4)。さらに、歯の形成領域の決定に重要な *Lef1* および *Ectodin* の遺伝子発現を *in situ* hybridization により解析したところ、アクチベーターとしての *Lef1* はエナメルノットとその周囲の間葉に発現し、インヒビターとしての *Ectodin* は *Lef1* 領域を囲んで発現していた(図5)。分割歯胚においても分割された歯胚それぞれが天然歯と同様の遺伝子発現を呈しており、*Ectodin* が歯の形成領域を負に制御することによって歯胚を分割可能であったと考えられる。

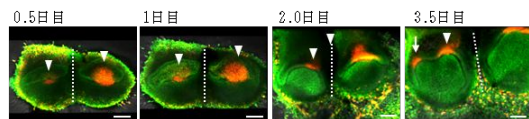


図3: トランスジェニックマウスを用いた分割過程の解析

矢頭: 1st エナメルノット、矢印: 2nd エナメルノット

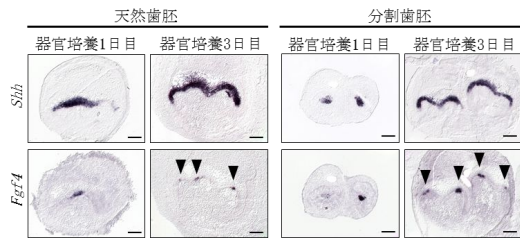


図 4：天然歯胚および分割歯胚における *Shh*、*Fgf4* の遺伝子発現解析

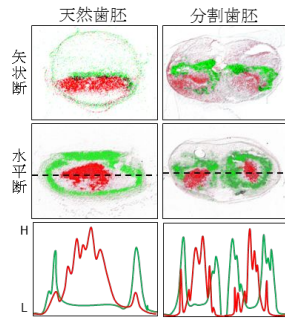


図 5：歯胚形成領域の決定に重要な *Lef1* (赤) および *Ectodin* (緑) の遺伝子発現解析および相対的発現強度のグラフ

4) 分割歯胚の口腔内発生の解析

分割操作を行った歯胚が顎骨内で発生・萌出することを明らかとするため、マウス顎骨における歯牙喪失モデルに分割歯胚を移植した。移植約 2 か月後には、天然歯と同様の組織構造を有した 2 本の分割歯が萌出し、対合歯との咬合を確立することがマイクロ CT にて確認された。

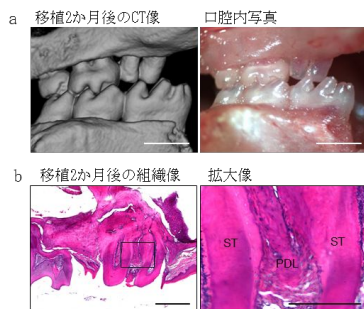


図 6：顎骨内で発生・萌出した分割歯
(a)顎骨内への移植 2 か月後の CT 像 (左図) と口腔内写真 (右図)
(b)移植 2 か月後の組織像 ST:分割歯、PDL:歯根膜

5) 分割歯の生理機能の解析

口腔内に萌出した分割歯に矯正力を付加したところ、6 日目には顕著な歯の移動がマイクロ CT にて観察され(図 7)、圧迫側には骨吸収を示す *Csf-1* の mRNA 陽性細胞、牽引側には骨形成を示す *Ocn* の発現が認められたことから、骨リモデリングを介した歯の移動が可能であることが示された。また、分割歯の歯髄および歯根膜に NF 陽性の神経組織が侵入していることを蛍光免疫染色にて確認した(図 8)。さらに、分割歯に矯正力や露髄刺激による侵害刺激を与えると、刺激 2 時間後の三叉神経脊髄路核の一部の神経細胞におい

て c-Fos タンパク質の産生が認められることから、分割歯に侵入している神経線維は、外部侵害刺激を中枢に伝達していることが示された(図 9)。

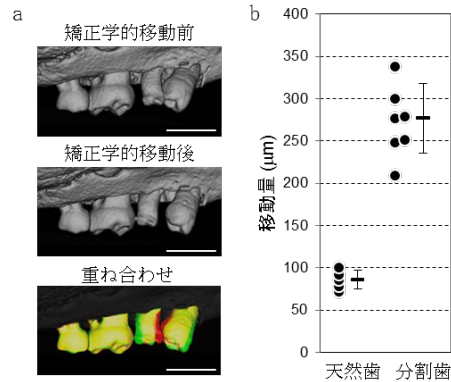


図 7：分割歯の矯正学的移動
(a)分割歯の矯正学的移動の前後 CT 像と重ね合わせ 赤：矯正前、緑：矯正後
(b)天然歯および分割歯の矯正学的移動量(μm)

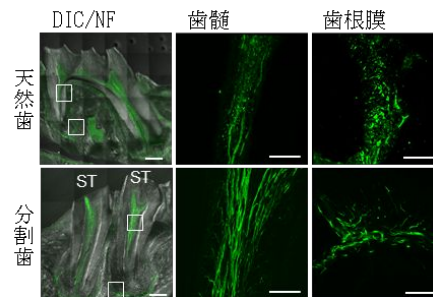


図 8：顎骨に生着した分割歯の神経機能の回復
顎骨に生着した分割歯の歯髄、歯根膜内に侵入した神経線維の蛍光免疫染色像 ST:分割歯

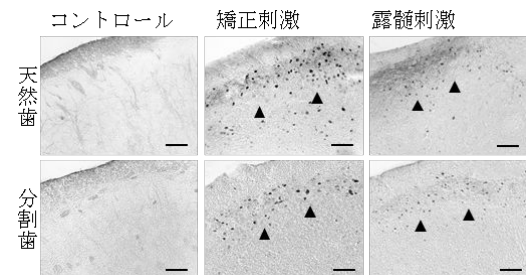


図 9：顎骨に生着した分割歯に対して矯正および露髄刺激を与えた際の三叉神経脊髄路核の c-Fos 発現像

以上の結果から、本研究の推進により、器官原基の分割発生メカニズムの学問的知見の集積と共に、生物学的な歯科再生治療の実現可能性が示された。

本研究課題は予定された研究期間内に、実施すべき研究実施項目を全て達成した。

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 4 件)

1. Masamitsu Oshima, Takashi Tsuji. Whole tooth regeneration as a future dental treatment. *Engineering Mineralized and Load Bearing Tissues, Springer Book*, in press, 2015.
2. Masamitsu Oshima, Takashi Tsuji. Functional tooth regenerative therapy: tooth tissue regeneration and whole-tooth replacement. *Review, Odontology* DOI 10.1007/s10266-014-0168-z, 2014.
3. Masamitsu Oshima and Takashi Tsuji. Whole tooth regeneration using a bioengineered tooth. *New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine - Official Book of the Japanese Society for Regenerative Medicine, Edited by Hideharu Hibi and Minoru Ueda, ISBN 978-953-51-1724-7, 130 pages, Publisher: InTech, Chapters published September 18, 2014 under CC BY 3.0 license, DOI: 10.5772/58896*
4. Kei Nakajima, Masamitsu Oshima, Takashi Tsuji. Whole Tooth Regenerative Therapy Using a Bioengineered Tooth Germ. *Current Oral Health Reports* 1(1), 43-49, DOI:10.1007/s40496-013-0004-5, 2014.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Naomi Yamamoto, Masamitsu Oshima, Keiji Moriyama, Takashi Tsuji, Multiplied Tooth Regeneration by Transplantation of a Cleaved Tooth Germ, 93rd IADR, 11-14.March.2015, Boston, USA
2. 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法の開発, 第73回日本矯正歯科学会大会, 2014年10月20-22日, 幕張メッセ, 千葉

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 1つの単離された歯胚から複数の歯を製造する方法

発明者: 辻孝、大島正充

権利者: 株式会社オーガンテクノロジーズ

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/052858

出願年月日: 2014年2月7日

国内外の別: 国内及び国外

取得状況(計 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

理研 多細胞システム形成研究センター 器
官誘導研究チーム 辻孝研究室

<http://www.cdb.riken.jp/org/topics/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻孝 (TAKASHI TSUJI)

理化学研究所、多細胞システム形成研究センター、チームリーダー

研究者番号: 50339131

(2)研究分担者

大島正充 (MASAMITSU OSHIMA)

岡山大学、医歯薬学総合研究科、助教

研究者番号: 00548307

(3)連携研究者

該当なし