

令和 2 年 5 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11832

研究課題名(和文) CEBP/ を標的分子とした分子標的治療による歯の再生

研究課題名(英文) regeneration of teeth by targeted therapy with cebpb as the target molecule

研究代表者

高橋 克 (takahashi, katsu)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90314202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは実際に臨床展開が可能な歯数制御の分子メカニズムに着目した分子標的治療による歯の再生研究に取り組んできた。Cebp とRunx2のダブル遺伝子改変マウスの表現型の解析を行った。Cebp が、エナメル上皮幹細胞のステムネスの維持や、上皮間葉転換が過剰歯の形成に関わることをin vivoで明らかにした。エナメル上皮幹細胞様株mHAT9d細胞を用いたin vitro実験系においても、同様の結果を得ることが出来た。更に、ヒトにおける過剰歯形成に対する歯原性上皮幹細胞の関与について検討し、歯原性上皮幹細胞は、第3歯堤が原因ではない場合の過剰歯形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の再生に関する研究は、これまで組織工学的な手法を用いた方法が数多く報告されてきたが、コストや安全性等の問題で、臨床応用まで至っていない。そのため、われわれは実際に臨床展開が可能な歯数制御の分子メカニズムに着目した分子標的治療による歯の再生研究に取り組んだ。将来的には国内に3000万人以上とされる欠損歯患者を対象にエナメル上皮幹細胞にCEBP/ の分子標的薬を局所投与することにより歯を再生する治療法を確立する。本研究が実用化されれば、歯科医療の抜本的改革に貢献できることに大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have been working on tooth regeneration research by molecular targeted therapy focusing on the molecular mechanism of tooth number control that can actually be applied clinically. The phenotype of double gene-modified mice of Cebp and Runx2 was analyzed. It was revealed in vivo that Cebp is involved in maintaining stemness of enamel epithelial stem cells and that epithelial-mesenchymal transition is involved in supernumerary tooth formation. Similar results were obtained in an in vitro experimental system using the enamel epithelial stem cell-like mHAT9d cells. Furthermore, the involvement of odontogenic epithelial stem cells in excess tooth formation in humans was examined, and it was suggested that odontogenic epithelial stem cells may be involved in excess tooth formation when the third ridge is not the cause.

研究分野：口腔外科

キーワード：歯の再生 エナメル上皮幹細胞 CEBP/ 分子標的治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯牙は、爬虫類以下は多生歯性であるのに対し、ヒトでは大臼歯が1生歯性以外は2生歯性で、歯数は厳密に制御されている。これまでにわれわれは歯数制御による歯の再生医療を目指し、過剰歯を有する種々の遺伝子欠損マウスの解析により、過剰歯の発症には少なくとも2つのメカニズムが存在することを明らかにしてきた。

- (1) 発生の過程で本来は退化消失していく歯胚が生き残り、発生が進んで形成される(図1)
- (2) 歯胚内に存在するエナメル上皮幹細胞が、局所で上皮間葉誘導を起こし形成される(図2)

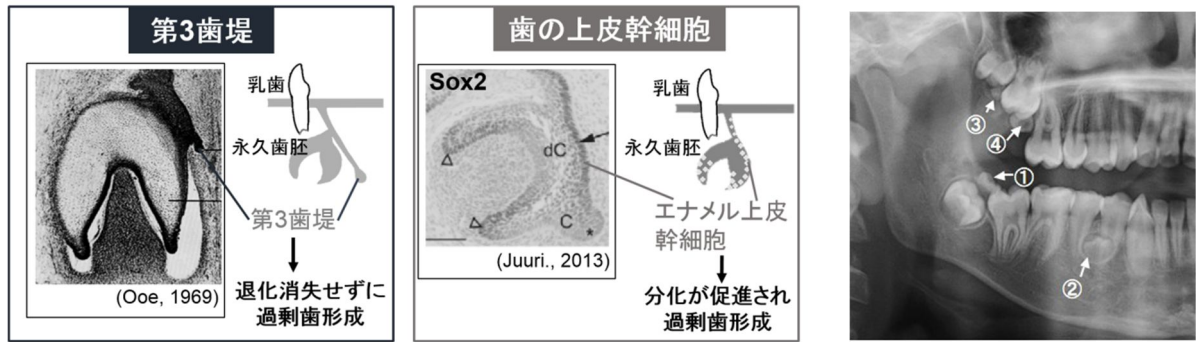


図1

図2

図3

われわれは BMP (骨形成タンパク質) のアンタゴニストである *USAG-1* の遺伝子欠損マウスにおいて、上記(1)の発症メカニズムが想定された過剰歯を認めることを報告した。更に、BMP-7 を局所投与することによって歯数を増加できる可能性を示し、1つの標的分子を局所で操作することにより器官である歯を形成することができる可能性を示した。鎖骨頭蓋異形成症の亜系においては、*RUNX2* 遺伝子の変異が先天性無歯症の原因となることが近年報告された (Calllea M, BMJ Case Rep, 2012)。そこで、先天性無歯症モデルマウス (*Runx2* 遺伝子欠損マウス) と過剰歯モデルマウス (*USAG-1* 遺伝子欠損マウス) を交配したところ、歯の形成が回復することを見出した。先天性無歯症の1つである無汗型外胚葉異形成は、その原因遺伝子として *EDA* (ectodysplasinA) 遺伝子が知られているが、近年そのモデル犬において、Eda 受容体のアゴニスト活性を持った抗体製剤を生後投与することによって、無歯症が完全に回復することが報告された。

これらのことは、分子標的薬による歯の再生が現実的になったことを意味する。現在、われわれは上記研究成果により日本医療研究開発機構 (AMED) の創薬支援推進事業に、「希少疾患先天性無歯症治療薬の開発研究-分子標的治療による欠損歯の再生」が歯科領域で唯一採択され、*USAG-1* を標的分子とした分子標的治療による欠損歯の再生を目指し、先天性無歯症治療薬の開発に取り組んでいる。

一方で、われわれは、*CEBP/* 遺伝子欠損マウスにおいて、上記(2)の過剰歯発症メカニズムが想定される過剰歯が形成されることを見出した。更に、ヒトにおいてもその大きさ、形態、位置、ステージが異なる多数の過剰歯を形成する(2)の過剰歯発症メカニズムが想定される非症候群性の多発性過剰歯の症例を見出している(図3)。以上より、先天性無歯症患者に対し *CEBP/* やその関連因子を標的分子として、その発現や、機能を抑制する低分子化合物や siRNA 等の分子標的薬を見出すことによって、先天性無歯症に対して、上記とは異なる有効性を持つ治療薬を開発できるのではないかとこの着想にいたった。

2. 研究の目的

ヒトでは大臼歯以外は1度だけ生え変わる2生歯性であり、歯数は厳密に制御されている。

これまでにわれわれは過剰歯について研究し、1つの分子により歯数が増加する事を明らかにしてきた。歯胚の発生が停止し、歯が形成されないために先天性無歯症となるが、発症を抑制することが出来ないのが現状である。そこで本研究では、無歯症モデルマウス (*Runx2*, *Eda*, *Pax9*, *Msx1* 遺伝子欠損マウス) と過剰歯モデルマウスである *CEBP/* 遺伝子欠損マウスとの交配により歯の形成が回復するかどうかの検討を行い、*CEBP/* やその関連因子を標的分子とした先天性無歯症の治療方法を開発する。さらに将来的には、その治療方法を歯の再生治療へ発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) In vitro 評価系の構築と低分子探索

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。上記で選定された原因遺伝子 (*Runx2*) の無歯症モデルマウスの歯胚の器官培養系において siRNA を用いて *C/EBP* の機能を抑制し、in vitro で歯数を回復・増加させるシステムを確立する。標的分子の発現または機能抑制および活性をもった低分子化合物の大規模スクリーニングを行うための低分子化合物のライブラリーの構築やシステムの製作などに関しては、京大薬学研究科の有する1万種以上の化合物のライブラリーにアクセス可能である。標的分子のプロモーターを利用したルシフェラーゼアッセイなど、同時に大量の低分子化合物のスクリーニング可能な細胞培養システムを用いて1万種ほどの化合物の中から標的分子の機能抑制および機能亢進の作用を示す5-10種類に絞り込む。その化合物を利用し、歯の形成をおこす実験系を用いて、局所での発現抑制/機能亢進により同様に歯数の回復・増加が再現できるシステムを確立する。

(2) In vivo 評価系の構築

in vitro で歯数を増加させることのできた標的分子の siRNA や低分子化合物を用いる。それらを無歯症モデルマウスの歯胚部へ局所導入し、効率的に歯数を回復・増加させることのできる時期と発現量、発現部位を検討する。化合物に関しては、局所注入に加えて腹腔内投与、静脈内投与、経口投与など歯胚の数を増加させる効率的な投与方法を検討する。

4. 研究成果

Cebp (129sv) と *Runx2* (C57BL/6) のダブル遺伝子改変マウスの表現型の解析を行った。その解析により、in vivo におけるエナメル上皮幹細胞のステムネスの維持や、上皮間葉転換に関わる機序の解析を試みた。*Cebp* KO のアダルトマウスでは、 μ CT にて切歯の形成端に不透過性病変を認め、エナメル質と象牙質の増生を認めた(13匹中4匹)。形成端そのものの大きさの縮小と形成端における、エナメル上皮幹細胞のマーカーである *Sox2* 陽性像の有意な減少を認めた。そのことより、*Cebp* がエナメル上皮幹細胞のステムネスの維持に関わることを示すことができた。胎生15日目の上顎切歯歯胚では *Runx2* Het と KO では、過剰歯胚と考えられている lingual bud が生じ、*Cebp* の KO も重なりと相加的にその頻度、大きさが増していた。出生後3ヶ月の *Cebp* KO *Runx2* Het では形成端に歯胚の形成 (12匹中4匹) を認めた。この結果より、過剰歯の形成に関して、*Cebp* と *Runx2* は、相加的に働き、また、aging の影響を受けることが明らかになった。*Cebp* KO マウスではエナメル芽細胞の極性の乱れとその周囲にエナメルマトリックスの小塊がみられた。また、*Runx2* Het マウスにおいてもエナメル芽細胞の極性の乱れが観察された。更に、上皮間葉転換のマーカーである N カドヘリンの陽性像を認めた。以上の結果より、*Cebp* と *Runx2* は、ともに上皮間葉転換の抑制に関わることが明らかとなった。以上の結果よ

り、エナメル上皮幹細胞のステムネスの維持や、上皮間葉転換が過剰歯の形成に関わることを *in vivo* で明らかにした。

エナメル上皮幹細胞における *Cebp* と *Runx2* の機能の詳細を *in vitro* で明らかにするために、エナメル上皮幹細胞様株 mHAT9d へ *Cebp* siRNA と *Runx2* siRNA を添加したノックダウンの解析を行った。最初に siRNA の mHAT9d 細胞への導入効率の最適化を検討した後に、効率的にターゲット遺伝子をノックダウンできるか検討した。mHAT9d 細胞において、*Cebp*、*Runx2* siRNA 添加のより、mRNA の発現低下を sqPCR にて、また蛋白質の発現低下を Western Blotting にてそれぞれ確認した。更に、*Runx2* type1 特異的にノックダウンできるかどうかを *Runx1*、*Runx2* isoforms、*Runx3* の mRNA の発現を、同様に sqPCR にて確認した。mHAT9d 細胞において、*Cebp* siRNA 添加にて、*Sox2* の発現低下を確認し、ステムネスが喪失する傾向を示したが、エナメル上皮細胞の特異的な分化マーカーであるアメロジェニン、アメロジェニンの発現は確認することはできなかった。mHAT9d 細胞を用いた *in vitro* 実験系においては、*Cebp* だけでは、ステムネス維持、エナメル上皮細胞の分化抑制に十分であるという結果は得ることが出来なかった。次に、mHAT9d 細胞において、*Runx2* siRNA 添加にて、上皮間葉転換が引き起こされるか検討したところ、そのマーカーである *Snai12* と間葉細胞のマーカーである *N-Cadherin* の発現上昇を確認した。同様に、*Cebp* siRNA 添加にて、*Snai12* の発現確認しを確認した。興味深いことに、*Runx2* siRNA 単独添加及び、*Runx2* siRNA と *Cebp* siRNA を同時に添加したところ、*Biglycan*、*Decorin*、*BMP4/6/7* の著明な発現上昇を認めた。更に、*in vivo* の *Cebp* と *Runx2* のダブル遺伝子改変マウスの上顎切歯形成端の過剰歯近傍の細胞にて *Decorin* の発現上昇を、免疫染色にて確認した。以上の結果より、mHAT9d 細胞を用いた *in vitro* 実験系においても、*Cebp* と *Runx2* が共調して、上皮間葉転換に関わるということが明らかとなり、*Cebp* が *Sox2* の発現維持に関連することも示された。

エナメル上皮幹細胞がヒトにおいて、歯数制御に関わるとともに歯数の増加に貢献することが出来ることはこれまで明らかにされていなかった。そのために、ヒトにおける過剰歯形成に対する歯原性上皮幹細胞の関与について検討した。過剰歯または乳歯抜歯症例 4 症例の歯牙組織周囲の歯嚢の免疫組織学的検討を行った。第 3 歯堤由来の過剰歯の定義として、1) 過剰歯が舌・口蓋側に発生する。2) 石灰化のスレーピングが永久歯より後である。3) 先行永久歯と形態が類似していることとした。症例 1 (21 歳) は第 3 歯堤由来と考えられる過剰歯、症例 2 (12 歳) と症例 3 (7 歳) は第 3 歯堤由来とは異なると考えられる過剰歯、症例 4 (7 歳) は乳歯の症例とした。歯原性上皮細胞のマーカーとして *CK15* および *CK17*、歯原性上皮幹細胞のマーカーとして *SOX2* の発現を検討した。本研究は京都大学医学研究科・医学部および医学部附属病院医の倫理委員会の承認を得た。各症例の上皮組織において *CK15* および *CK17* の発現を認めた。*SOX2* 陽性細胞は症例 2 の歯原性上皮のみで発現を認めた。症例 2 における *SOX2* と *CK17* の共発現を確認するために、同じセクションで二重免疫組織化学を実施し、歯原性上皮細胞での共発現を確認した。さらに、*SOX2* の発現が年齢または歯の種類に依存していたかどうかを検討するために、発達中の過剰歯と同様の年齢層の正常な乳歯の歯嚢を取り囲む上皮組織における *SOX2* の発現を調べたが、どちらの組織でもその発現を検出できなかった。歯原性上皮幹細胞は、第 3 歯堤が原因ではない場合の過剰歯形成に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kiso H., Takahashi K., Mishima S., Murashima-Suginami A., Kakeno A., Yamazaki T., Asai K., Tokita Y., Uozumi R., Sugai M., Harada H., Huang B., MacDougall M., Bessho K.	4. 巻 98
2. 論文標題 Third Dentition Is the Main Cause of Premolar Supernumerary Tooth Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 968 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1177/0022034519858282	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 該当する
1. 著者名 Saito Kazuyuki, Takahashi Katsu, Huang Boyen, Asahara Masakazu, Kiso Honoka, Togo Yumiko, Tsukamoto Hiroko, Mishima Sayaka, Nagata Masaki, Iida Machiko, Tokita Yoshihito, Asai Masato, Shimizu Akira, Komori Toshihisa, Harada Hidemitsu, MacDougall Mary, Sugai Manabu, Bessho Kazuhisa	4. 巻 8
2. 論文標題 Loss of Stemness, EMT, and Supernumerary Tooth Formation in Cebpb?/?Runx2+/? Murine Incisors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23515-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tabata Sanae, Kitago Yu, Fujii Yuki, Mihara Emiko, Tamura-Kawakami Keiko, Norioka Naoko, Takahashi Katsu, Kaneko Mika K., Kato Yukinari, Takagi Junichi	4. 巻 147
2. 論文標題 An anti-peptide monoclonal antibody recognizing the tobacco etch virus protease-cleavage sequence and its application to a tandem tagging system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 94 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2018.03.004	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 該当する
1. 著者名 Mishima Sayaka, Yamaguchi Takako, Watanabe Takuma, Komatani Toru, Nakao Kazumasa, Takahashi Katsu, Bessho Kazuhisa	4. 巻 29
2. 論文標題 Maxillary Hypoplasia With Congenital Oligodontia Treated by Maxillary Distraction Osteogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Craniofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 e411 ~ e414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SCS.0000000000004414	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 該当する

1. 著者名 Dahy Khaled, Takahashi Katsu, Saito Kazuyuki, Kiso Honoka, Rezk Ibrahim, Oga Toru, Uozumi Ryuji, Chin Kazuo, Bessho Kazuhisa	4. 巻 46
2. 論文標題 Gender differences in morphological and functional outcomes after mandibular setback surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 887 ~ 892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcms.2018.04.006	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 該当する

1. 著者名 Isobe Yu, Takahashi Katsu, Kiso Honoka, Nakao Kazumasa, Ikeno Masayuki, Koyama Noriaki, Sugai Manabu, Shimizu Akira, Haga Hironori, Bessho Kazuhisa	4. 巻 93
2. 論文標題 Direct evidence for the age-dependent demise of GNAS -mutated cells in oral fibrous dysplasia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 133 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2018.05.018	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 該当する

1. 著者名 Gotoh, H., J. Machida, J., Shibata, A., Tatematsu, T., Miyachi, H., Takahashi, K., Nakayama, A., Y. Higashi, Y., T. Nagao, T., Shimozato, K., Tokita, Y.	4. 巻 29
2. 論文標題 Novel RUNX2/CBFA1 mutation at the runt domain in a Japanese patient with cleidocranial dysplasia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Oral Maxillofac Surg Med Path	6. 最初と最後の頁 222-224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2016.10.009	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 Machida, J., Goto, H., Tatematsu, T., Shibata, A., Miyachi, H., Takahashi, K., Hiroto Izumi, H., Nakayama, A., Shimozato, S., Tokita, Y	4. 巻 4
2. 論文標題 WNT10A variants isolated from Japanese patients with congenital tooth agenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 17047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/hgv.2017.47	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋克、喜早ほのか、三島清香、杉並亜希子、時田義人、田畑泰彦、菅井学、別所和久
2. 発表標題 歯数制御による歯の再生治療薬の開発
3. 学会等名 第40回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 克
2. 発表標題 希少疾患先天性無歯症治療薬の開発研究 - Wntシグナル&BMPシグナルに関連する難治性疾患治療への展開 -
3. 学会等名 難治性疾患実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究事業 2019年度合同成果報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋克、喜早ほのか、斎藤和幸、東郷由弥子、塚本容子、三島清香、杉並
2. 発表標題 分子標的治療による欠損歯の再生
3. 学会等名 第16回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 斎藤和幸、高橋克、喜早ほのか、東郷由弥子、塚本容子、三島清香、Dahy Ahamed Khared Gamel、Marziyer Aghazadeh、菅井学、永田昌毅、原田英光、別所和久
2. 発表標題 マウス切歯体性幹細胞を用いた歯の再生モデル
3. 学会等名 第16回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋克、喜早ほのか、斎藤和幸、杉並亜希子、三島清香、田畑泰彦、別所和久
2. 発表標題 歯数制御による歯の再生治療薬の開発
3. 学会等名 第33回 日本DDS学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 喜早ほのか、高橋克、源健文、西村隆克、斎藤和幸、浅井啓太、三島清香、別所和久
2. 発表標題 ヒト非症候群性過剰歯の発生由来に関する免疫組織学的検討
3. 学会等名 第62回 日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村隆克、三島清香、懸野安澄、斎藤和幸、喜早ほのか、浅井啓太、高橋克、三島清香、別所和久
2. 発表標題 上顎前歯部における過剰歯の存在割合と存在部位に関する検討
3. 学会等名 第62回 日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 USAG-1を標的分子とした歯数制御による歯の再生治療薬（中和抗体）	発明者 高橋克、菅井学、時田義人、高木淳一、三原恵美子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-130153	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 USAG-1を標的とするRNA分子を含む歯の再生治療薬	発明者 高橋克、菅井学、時田義人、別所和久、田畑泰彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-028547	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	別所 和久 (Bessho Kazuhisa) (90229138)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	