

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10220

研究課題名(和文) 歯胚再生実現化へ向けた歯原性間葉細胞のHDAC3阻害による歯根長制御の試み

研究課題名(英文) Challenge of controlling tooth root length by HDAC3 inhibition of dental mesenchym

研究代表者

新部 邦透(Niibe, Kunimichi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：50468500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、HDAC3阻害剤が歯根長制御に有効な薬剤となり得るか明らかにし、歯胚再生の実現化へ向け、歯根長を人為的に操作する技術基盤を確立することを目的としている。我々が開発した神経堤様MSCスフェアにおいて、エピジェネティクス関連PCRアレイ解析よりHDAC9, 11の高発現、ESCO1, ESCO2, AURKA, AURKBの発現抑制を確認し、細胞増殖や分化関連遺伝子への転写抑制が示唆された。胎児由来歯原性細胞採取し、神経堤様MSCスフェアと結合することで、歯胚構造を作製することに成功した。今後、さらなるHDAC3阻害剤の歯根長制御性を検証していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの永久歯は中切歯、側切歯から第2大臼歯までと一般的には智歯も含めると32本存在するが、形態や大きさはそれぞれの歯種ではば一定である。現在、歯の再生は実現化に至っていないが、器官原基法を応用可能であった場合、歯の形態や大きさ制御は困難な現状にあり、技術構築が必須となる。我々が発見したHDAC3の発現抑制は、歯の内部や歯根の成長に関わる象牙質の成長を抑制する働きがあることが示唆され、今後歯の再生技術が構築された際、任意の大きさに成長させた歯胚の成長をストップさせる技術へつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to control tooth root by inhibiting HDAC3 of dental mesenchyme.

Our MSC-spheroids which showed neural crest stem cell like phenotype highly expressed HDAC9, HDAC11 and down regulated ESCO2, AURKA, and AURKB by analyzing PCR array. Our experiments suggested that the epigenetic change of MSC-spheroids was related to the gene expression of cell proliferation and differentiation. In addition, we performed tooth organ germ method by using MSC-spheroid and fetal dental epithelium. We successfully generate tooth organ using our MSC-spheroids. The next step, we will use HDAC inhibitor to organ germ to make clear whether HDAC inhibitor can control tooth root length.

研究分野：歯科補綴学、再生歯学

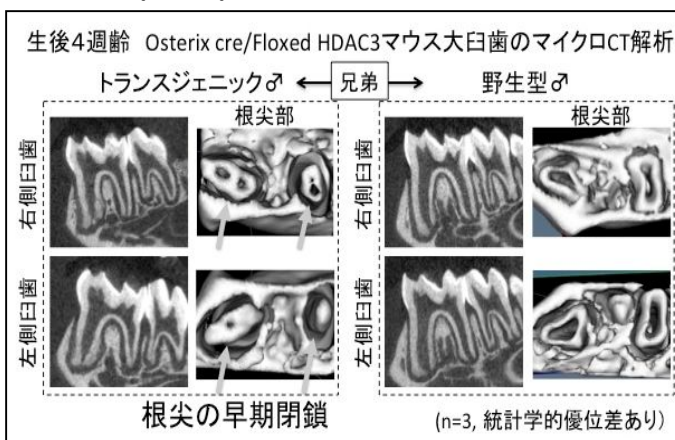
キーワード：間葉系幹細胞 歯胚再生 エピジェネティクス HDAC3 歯根成長制御

### 1. 研究開始当初の背景

“エピジェネティクス”はDNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現や表現型として知られ、近年では人為的に幹細胞のエピジェネティクスを操作することで分化の方向性が制御できる可能性に注目が集まっている。しかしながら、歯原性組織の発生におけるエピジェネティクスの関与は情報が乏しい現状にある。

申請者は、歯原性細胞のエピジェネティクス操作による分化制御の可能性に着目し、国際共同研究事業の一環としてこの分野の第一人者である米国 Mayo Clinic 整形外科の Westendorf 研究室との共同研究を行っている。現在、HDAC3 遺伝子を Osterix 発現細胞で特異的に欠失させる遺伝子改変 (Osterix-cre/Floxed-Hdac3) マウス (Razidlo et al. *PLoS one*, 2010) の研究に従事しており、このマウスの顔面頭蓋領域を  $\mu$ CT にて解析した結果、下顎骨に骨幅減少が表れるだけでなく、歯に関連した表現形として根尖の早期閉鎖を示す興味深い解析結果を得ることができた (右図)。

この根尖の早期閉鎖は、HDAC3 の欠失によるエピジェネティクスの変化が、歯胚の発生から成長期における象牙質やセメント質の成長に何らかの影響を及ぼしたことを暗示している。さらにこの CT データから、野生型マウスと比較した形態計測を行ったところ、統計学的有意差をもって遺伝子改変マウスの大臼歯歯根長が短いことが明らかとなった。



そこで申請者は、これら遺伝子改変マウスを用いた結果から、歯原性間葉組織のうち特に象牙質やセメント質といった硬組織が HDAC3 を介したエピジェネティクス制御の標的細胞となり得る可能性を着想し、歯原性間葉系細胞への HDAC3 阻害剤添加が歯根の成長を早期に停止させる可能性があると仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究は、HDAC3 阻害剤が将来的に歯根長制御に有効な薬剤となり得るか明らかにし、歯胚再生の実現化へ向け、歯根長を人為的に操作する技術基盤を確立することを目的としている。

### 3. 研究の方法

HDAC3 阻害剤の影響を受ける歯原性間葉細胞の *in vitro* での同定

ヒストン修飾を受ける標的細胞の *in vivo* での表現系解析

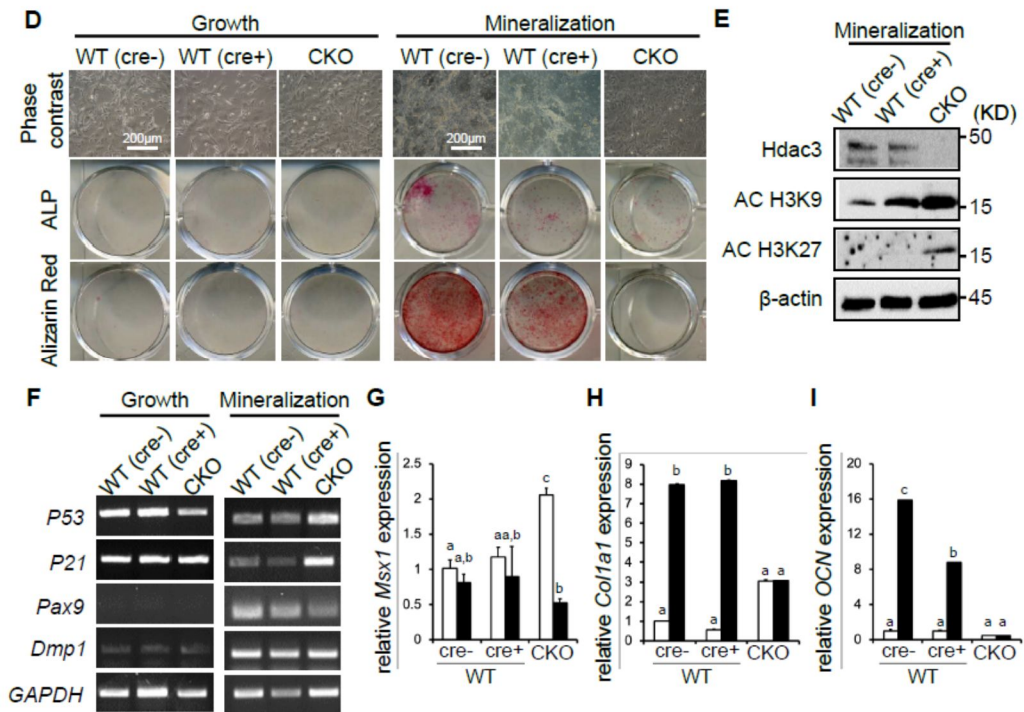
HDAC3 阻害剤のエナメル芽細胞への影響の検証

HDAC3 阻害剤の歯根形成制御性の検証

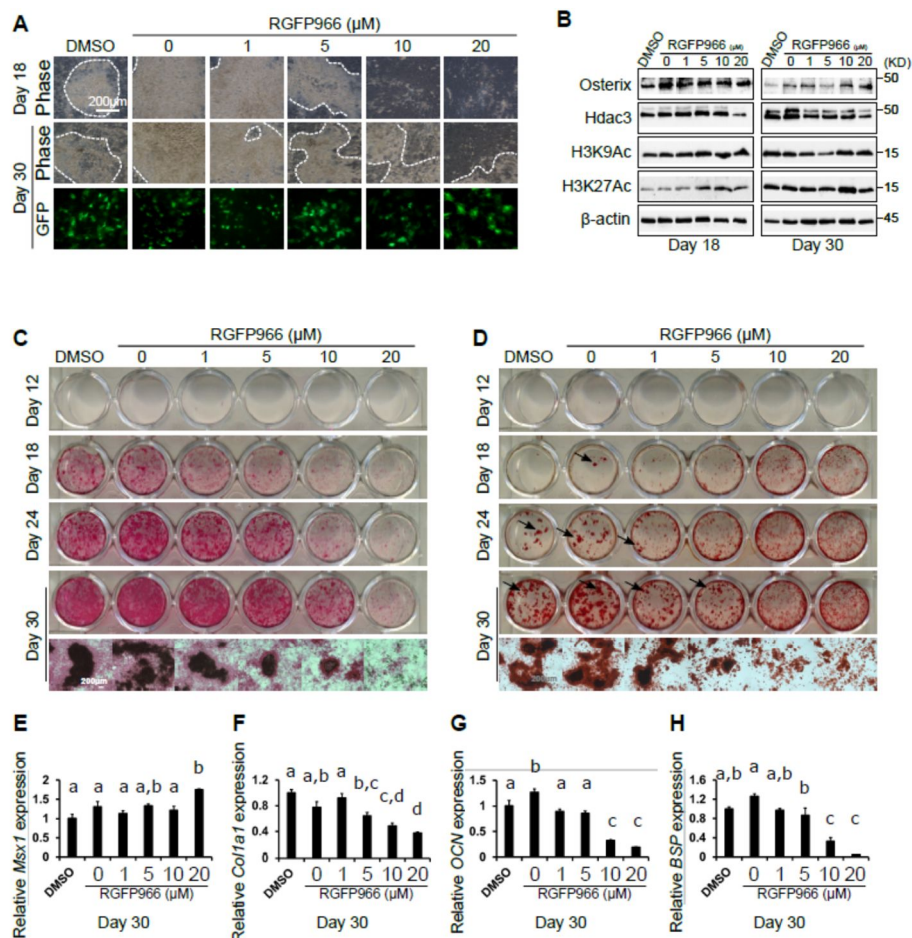
### 4. 研究成果

HDAC3 阻害剤の影響を受ける歯原性間葉細胞の *in vitro* での同定を予定していた。遺伝子改変 (Osterix-cre/Floxed-Hdac3) マウスの組織学的、形態学的解析から大臼歯の象牙質もしくはセメント質が HDAC3 阻害の影響を受けやすい可能性が示されている。そこで、歯原性間葉細胞 (歯髄細胞・象牙芽細胞・セメント芽細胞) への HDAC3 阻害剤添加が、分化能及び細胞増殖・細胞老化に影響を及ぼすかを解析した。本遺伝子改変マウスの歯髄幹細胞

胞を分取、石灰化能を解析したところ、遺伝子改変マウスでは、石灰化度が低下していることが明らかとなった。



さらに、セメント芽細胞(CM-6:Kerafast 社)を入手、同様の解析を行った結果、象牙芽細胞同様に分化を抑制する可能性が示唆された。

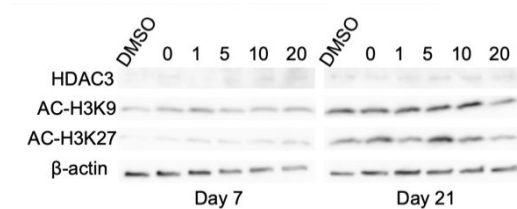
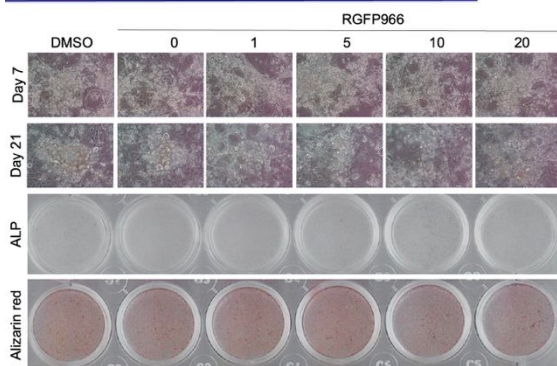


一方で、上皮系細胞へ HDAC3 阻害剤の影響が生じた場合、歯冠形態へ影響が生じてしまう危険性があるため、エナメル芽細胞への影響の検証を行った。エナメル芽細胞は、ラッ



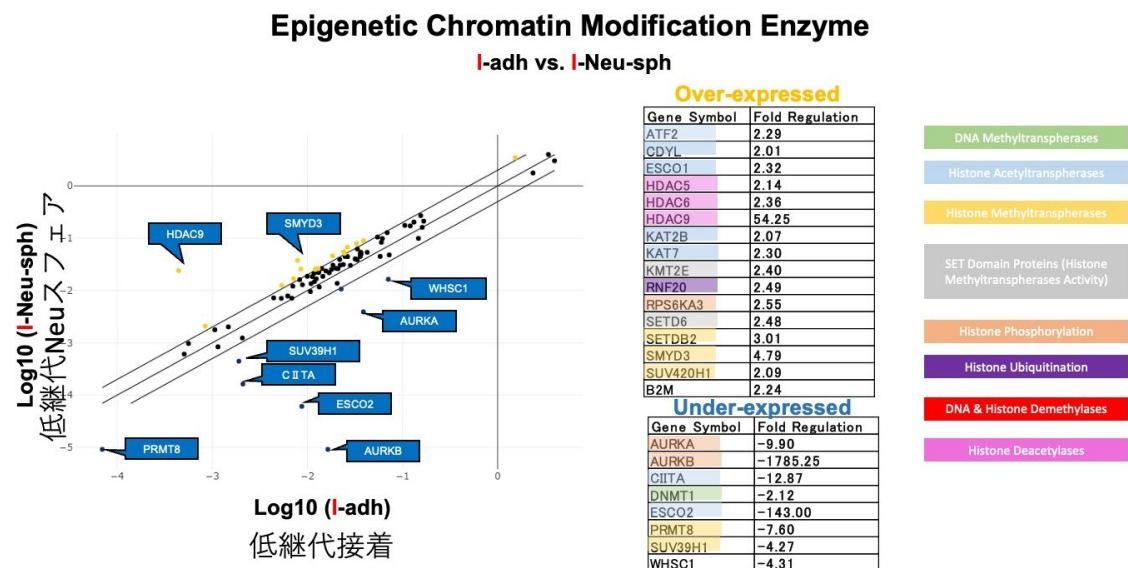
トから採取したエナメル芽細胞ライン (SF-2 細胞) を用い、RGFP966 の添加実験を行った。面白いことに、象牙芽細胞やセメント芽細胞とは異なり、分化抑制効果は確認できなかった。

Ameloblast cell line: Rat SF2 cells  
Mineralization medium



これらの結果から、歯胚を構成する上皮細胞と間葉細胞のうち、HDAC3 阻害は間葉細胞である歯原性間葉 (象牙芽細胞、セメント芽細胞) が影響を受け、分化に抑制がかかることが示唆されている。

さらに、エピジェネティクス関連 PCR アレイ解析より我々が骨髄間葉系幹細胞 (MSC) から独自に開発した神経堤様 MSC スフェロイド (歯原性間葉の元) において、HDAC9,11 の高発現、ESCO1, ESCO2, AURKA, AURKB の発現抑制を確認し、細胞増殖や分化関連遺伝子への転写抑制が示唆された。(図は一部データのみ)



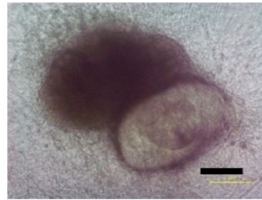
一方、歯胚再生研究として、神経堤様 MSC スフェロイドの歯原性間葉としての能力の有無を検証するため、器官原器法を応用した実験を進めた。上皮系細胞を胎児由来歯原性上皮より採取し、歯原性間葉に骨髄由来神経堤様 MSC スフェロイドを用い、*in vitro* にて上

皮と間葉を結合させ、*in vivo*で歯胚様構造が再生されることを確認した。

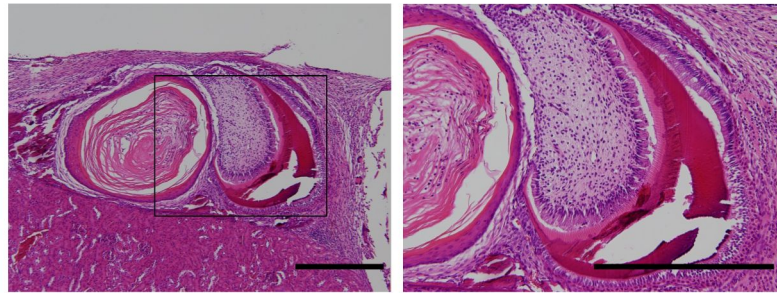
## 器官原基法

(歯源性上皮+ マウスOricell 神経堤様MSCスフェア振盪2週)

*In vitro* day 7



*In vivo*  
腎皮膜下移植 2週間



Bars: 200  $\mu$ m

残念ながら COVID-19 の影響で予定していた歯根長の制御性の解明までは辿り着けなかったが、HDAC3 の抑制が歯原生上皮には影響せず、歯原生間葉の石灰化や細胞増殖に影響する可能性が示唆された。今後、歯根長の制御性についてさらなる解析を行っていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Niibe Kunimichi, Ohori-Morita Yumi, Zhang Maolin, Mabuchi Yo, Matsuzaki Yumi, Egusa Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 A Shaking-Culture Method for Generating Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Spheroids With Enhanced Multipotency in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 590332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2020.590332	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ohori-Morita Y, Niibe K, Egusa H
2. 発表標題 Long-term shaking culture maintains multipotency and anti-inflammatory property of mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ohori-Morita Y, Niibe K, Egusa H
2. 発表標題 Generating MSC spheroids recovers stemness characteristics for cortical bone formation.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Niibe K
2. 発表標題 13. Novel spheroid culture of mesenchymal stem cells for bone regeneration.
3. 学会等名 IADR-APR 3rd Young Researchers Forum,（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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	江草 宏  (Egusa Hiroshi)  (30379078)	東北大学・歯学研究科・教授   (11301)	

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
---------	---------