

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26253088

研究課題名(和文) 歯胚発生プログラムの解明・応用に基づく歯の再生技術の開発

研究課題名(英文) Development of tooth regeneration technology based on the clarification of mechanism of tooth development.

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) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯の喪失に対して、生理的活性を有した完全な歯を再生することに大きな期待が寄せられている。近年我々は、細胞を三次元に配置することで器官の原基を再生することが可能な器官原基法の開発に成功した。しかし、未だ歯の発生に関わる遺伝子の解明にはつながっていない。そこで、我々は、歯の発生に関わる遺伝子の探索を目的に解析を行った。その結果、いくつかの歯の発生および発生の時間軸に関わる候補遺伝子を絞り込むことに成功した。今後、これらの遺伝子の機能解析を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Whole-tooth regeneration therapy has great potential for the replacement of lost teeth. Recently, our group have been reported an in vitro three-dimensional cell manipulation method called the bioengineered organ germ method. However, it is unclear the mechanism of tooth development. Therefore, we performed the comprehensive analysis and could narrow down the several candidate genes. In the future, we are planning to perform the functional analysis of these candidate genes.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯の再生 器官原基法

## 1. 研究開始当初の背景

現在の歯科治療では、人工材料を用いた欠損の修復処置が行われている。なかでも、口腔インプラント治療は、人工歯根が直接歯槽骨や顎骨と結合することにより、患者に高いQoLを安定して提供することに成功した。また、口腔インプラント治療は自立型補綴物であるが故に、従来の歯科医療が抱えていた「隣在歯への侵襲」という問題を抜本的に改革した。しかし、口腔インプラント義歯の人工歯根が歯根膜を持たないことにより生じる問題点、すなわち、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が、解決されるべき問題として残されている。

近年、研究分担者である辻らは、歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞を用いて、細胞操作技術により上皮間葉相互作用を生じさせることにより再生歯胚を創りだす「器官原基法」を開発した (*Nature Methods*, 2007)。この再生歯胚は、成体顎骨内にて正常な発生・萌出が可能ばかりでなく、完全な歯の生理機能を有している (*PNAS*, 2009)。また、本申請者の教室から辻研究室に派遣された大島らは、このようにして再生させた歯・歯根膜・歯槽骨からなる「再生歯ユニット」を欠損部に移植することによって、抜歯により生じた歯根膜や歯槽骨欠損を丸ごと生物学的に補綴する「ユニット移植」の概念を世界に先駆けて実証した (*PLoS ONE*, 2011)。これは口腔インプラントが長年なし得なかった辺縁歯槽骨の安定維持を、歯と歯周組織という臓器をそのまま移植することにより可能にした。さらに、本申請グループは、本器官原基法が大型動物(イヌ)の永久歯胚由来細胞においても適応可能であることを明らかにした。すなわち、出生後のイヌの幼弱永久歯胚から上皮組織と間葉細胞を採取し、器官原基法により再生歯胚を作製、自家口腔内で再生歯を発生・萌出させることに成功したのである。これまでの器官原基法の成果は、マウス等を対象にしたものであり、採取した細胞も胎生 10 日～15 日の大変幼弱な歯原性細胞であったことを考えるとこの成果が如何に秀でたものかがわかる。つまり、生後の大型動物においても、何らかの条件を整えれば歯胚の再生が可能となるのである。

一方で、本研究により、臨床応用に向けて解決すべき問題も明らかになった。すなわち、上皮間葉相互作用が活発な時期の細胞でし

か歯胚の誘導が起こらないのである。

例えば、マウスでは、胎生 12.5 日～13.5 日のものは旺盛な歯胚誘導能があるが、それを超えると急激に歯胚誘導能が低下する。また、細胞シーズの探索に成功しても、イヌの歯のように発生期間があまりに長いようであれば、欠損補綴として臨床現場で受け入れられるのは難しい。したがって、臨床的に可能な方法でこの未分化な歯原性上皮細胞や間葉細胞を得る方法や、再生歯の発生・成熟に要する期間の短縮化を目指した方法の開発が急務となった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的を以下に示す。

- (1) 生後のヒト由来の組織や細胞を用い、器官原基法を応用することで歯胚を再生することが可能かを明らかにする。
- (2) レーザーマイクロダイゼクション法およびRNA-Seqを用い、歯胚発生に関わる転写因子の網羅的解析を行い、歯胚発生に関わるマスター遺伝子の探索を行う。
- (3) 歯胚発生の時間軸制御に関わる因子の探索を行う。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒトの発育途上永久歯根尖相当部の容易に分離できる軟組織から、未分化な間葉系幹細胞が単離可能なことから、岡山大学倫理委員会承認のもと、同意の得られた若年者から、矯正治療等の理由で抜歯した第三大臼歯歯胚を得た。本抜去歯から、ヒト歯胚由来間葉系幹細胞 (SCAP) を得た。上皮組織はすでに石灰化していることから、胎生期のマウス歯胚由来上皮細胞とヒト SCAP を用いて、器官原基法にて歯胚を構築し、免疫不全マウスの腎皮下に移植した。移植 4 週後に回収し、組織学的評価を実施した。
- (2) 30日齢のイヌより、帽状期の永久歯歯胚を摘出し、凍結包埋を行い、凍結切片を作成した。そして、レーザーマイクロダイゼクション法にて、発生期の歯胚から未分化な細胞及び分化誘導された細胞を特異的に回収した。その後、RNeasy Mini kitを用い、total RNAを精製した。そして、次世代シーケンサーを用い、歯胚発生に関

わる因子の網羅的探索を実施し、歯胚発生に関わる因子の抽出を行った。

また、マウス歯胚への遺伝子導入法の検討を行った。

- (3) 再生歯の発生・成熟期間の短縮を目的に、組織発生の時間軸制御に関わる因子の探索を行った。実際には、発生速度の全く異なる乳歯（乳臼歯）および永久歯（第一大臼歯）歯胚を30日齢のイヌ下顎骨より採取した。これらの組織を酵素処理により、上皮組織および間葉組織に分離後、RNeasy Mini kitを用いてtotal RNAを精製した。そして、cDNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、両者の比較による歯胚発生の時間軸制御に関わる因子の探索を行った。また、抽出された因子に関しては、リコンビナントタンパク質を購入し、歯胚発生に与える影響を器官培養実験にて確認した。

#### 4. 研究成果

- (1) ヒトの发育途上永久歯根尖相当部から分離した hSCAP と胎生期のマウス歯胚由来上皮細胞とヒト SCAP を用いて、器官原基法にて歯胚を構築し、免疫不全マウスの腎皮下に移植した。4週後に組織を回収し、組織学的に評価した。その結果、エナメル質、象牙質等の組織が再生されている像が観察された（図1）。本結果は、出生後のヒトにおいても歯を再生可能な細胞が存在することを示している。しかし、この時期の歯胚のヒト上皮細胞はす

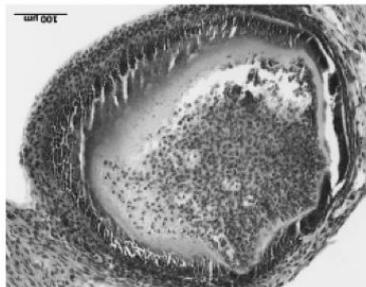


図1. 胎生期マウス歯胚由来上皮細胞およびヒトSCAPを用いた歯胚再生

で分化しており、歯を再生する能力は有していなかった。今後は、歯を再生することが可能な上皮細胞を探索することが必要不可欠であると考えられる。

- (2) 30日齢のイヌ帽状期の永久歯歯胚をからレーザーマイクロダイゼクション法にて、未分化な細胞及び分化誘導された細胞を特異的に回収した。その後、RNeasy Mini kitを用い、total RNAを精製した。そして、次世代シーケンサーを用い、歯胚発生に関わる因子の網羅的探索を実施し、歯胚発生に関わる因子に成功した。

次に、これらの遺伝子を歯胚に遺伝子導

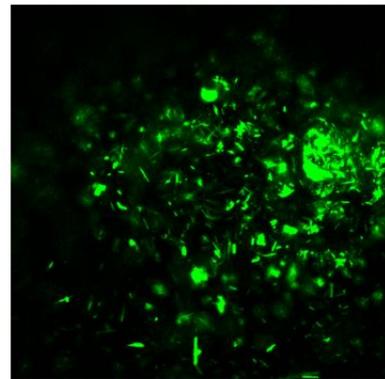


図2. 歯胚にGFP発現ベクターをエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、48時間後に共焦点顕微鏡にて観察した像を示す。

入し、歯の発生に与える影響を検討する必要がある、組織に遺伝子導入する方法の確立が必要不可欠である。そこで、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入系、

NEPA21によるエレクトロポレーションを用いた遺伝子導入系、マイクロインジェクターを用いて直接レンチウイルスを組織内に注入する系の3つの方法を試みた。のレンチウイルスを感染させる実験系では、組織の内部まで遺伝子が導入されなかった。一方、のエレクトロポレーション法、のマイクロインジェクション法を用いることで、組織内部まで遺伝子が導入されている像が観察された（図2）。

(3) 発生時間軸制御に関わる候補遺伝子の発現解析として、乳歯歯胚と永久歯歯胚の遺伝子発現の差異をcDNA マイクロアレイにて解析した。ヒートマップを図3に示す。

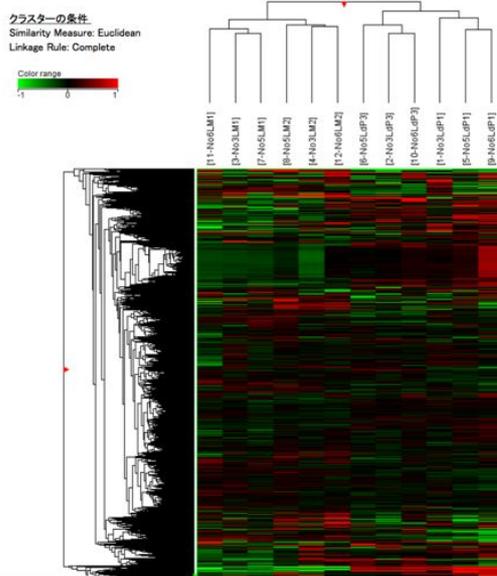


図3. 乳歯歯胚と永久歯歯胚のcDNAマイクロアレイ解析のHeat mapを示す。

本解析結果から抽出された因子の中で、永久歯歯胚にて高発現する遺伝子 X と、乳歯歯胚に高発現する遺伝子 Y を見出した。これらの分子の発現局在を確認するため、in situ hybridization 解析を行ったところ、遺伝子 X は歯胚上皮幹細胞のニッチであるサーヒカルループ領域の上皮細胞に遺伝子発現が集積していた。一方で遺伝子 Y は歯冠部のエナ

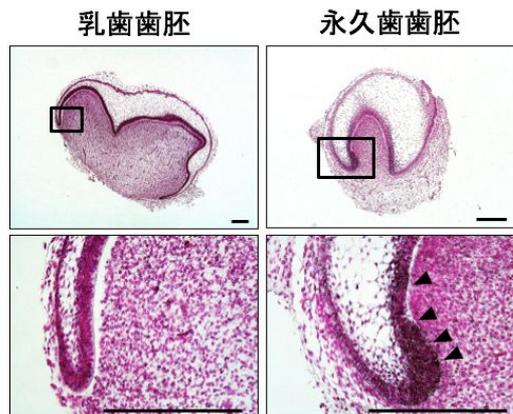


図4. 遺伝子Xの乳歯歯胚と永久歯歯胚のin situ hybridization解析の結果を示す。

メル芽細胞の領域にて発現集積が認められた(図4)。これらの結果より、抽出された2つの候補遺伝子は歯胚上皮細胞の未分化性維持や分化促進に影響している可能性が示唆された。

次に、歯胚の器官培養系における抽出され

た遺伝子 X のリコンヒナントタンパク質の添加により歯胚発生に変化が生じた。

本申請研究にて、歯胚発生および発生の時間軸制御に関与している遺伝子が抽出された。今後、本研究で抽出された歯胚発生に関わる遺伝子および歯胚発生の時間軸制御に関わる遺伝子に関して、機能解析も含め詳細に検討していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

- (1) Komori T, Ono M, Hara ES, Ueda J, Nguyen HTT, Nguyen HT, Yonezawa T, Maeba T, Ono A, Takarada T, Momota R, Maekawa K, Kuboki T, Ohashi T, Type IV collagen 6 chain is a regulator of keratin 10 in keratinization of oral mucosal epithelium, *Scientific Reports*, in press. (査読有)
- (2) Ono M, Masaki A, Maeda A, Kilts TM, Hara ES, Komori T, Pham H, Kuboki T, Young MF. CCN4/WISP1 controls cutaneous wound healing by modulating proliferation, migration and ECM expression in dermal fibroblasts via 5 1 and TNF . *Matrix Biol.*, 17: 30400-6, 2018. (査読有)
- (3) Ono M, Oshima M, Ogawa M, Sonoyama W, Hara ES, Oida Y, Shinkawa S, Nakajima R, Mine A, Hayano S, Fukumoto S, Kasugai S, Yamaguchi A, Tsuji T, Kuboki T. Practical whole-tooth restoration utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a postnatal canine model. *Scientific Reports*, 7: 44522. doi: 10.1038/srep44522., 2017. (査読有)
- (4) Farahat M, Sathi GA, Hara ES, Taketa H, Kuboki T, Matsumoto T. MSCs feeder layers induce SMG self-organization and branching morphogenesis. *PLoS One*, 12(4):e0176453.doi:10.1371/journal.pone.0176453., 2017. (査読有)
- (5) Sathi GA, Farahat M, Hara ES, Taketa H, Nagatsuka H, Kuboki T, Matsumoto T. MCSF orchestrates branching morphogenesis in developing submandibular gland tissue. *J. Cell Sci.*, 130(9): 1559-1569, 2017. (査読有)
- (6) Hara ES, Ono M, Yoshioka Y, Ueda J, Hazebara Y, Pham HT, Matsumoto T, Kuboki T. Antagonistic effects of insulin and

- TGF- 3 during chondrogenic differentiation of human BMSCs under a minimal amount of factors. *Cells Tissues Organs*, 201(2): 88-96, 2016. (査読有)
- (7) Yoshioka Y, Ono M, Maeda A, Kilts TM, Hara ES, Khattab H, Ueda J, Aoyama E, Oohashi T, Takigawa M, Young MF, Kuboki T. CCN4/WISP-1 positively regulates chondrogenesis by controlling TGF- 3 function. *Bone*, 83: 162-170, 2015. (査読有)
- (8) Hara ES, Ono M, Pham HT, Sonoyama W, Kubota S, Takigawa M, Matsumoto T, Young MF, Olsen BR, Kuboki T. Fluocinonide Is a Potent Synergistic Factor of TGF- 3-Associated Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Articular Surface Regeneration. *J. Bone Miner. Res.*, 30(9): 1585-1596, 2015. (査読有)
- (9) Ono M, Sonoyama W, Yamamoto K, Oida Y, Akiyama K, Shinkawa S, Nakajima R, Pham HT, Hara ES, Kuboki T. Efficient bone formation in a swine socket lift model using Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 adsorbed in -tricalcium phosphate. *Cells Tissues Organs*, 199(4): 249-255, 2014. (査読有)
- (10) Khattab HM, Ono M, Sonoyama W, Oida Y, Shinkawa S, Yoshioka Y, Maekawa K, Tabata Y, Sugama K, Sebald W, Kuboki T. The BMP2 antagonist inhibitor L51P enhances the osteogenic potential of BMP2 by simultaneous and delayed synergism. *Bone*, 69: 165-173, 2014. (査読有)
- (11) Nakajima R, Ono M, Hara ES, Oida Y, Shinkawa S, Pham HT, Akiyama K, Sonoyama W, Maekawa K, Kuboki T. Mesenchymal stem/progenitor cell isolation from tooth extraction sockets. *Journal of Dental Research*, 93(11): 1133-1140, 2014. (査読有)
- [学会発表](計 12 件)
- (1) 窪木拓男. 生物学的配慮と臨床事実に基づいた口腔リハビリテーション医学を構築するために - 臨床疫学, バイオメカニクス, そしてバイオロジーへ -, 徳島大学特別講義. 徳島, 日本. 2014.5.28. 発表日 2014.5.28.
- (2) 窪木拓男. 骨バイオサイエンスと幹細胞科学の融合. 第 5 回骨バイオサイエンス研究会. 岡山, 日本. 2014.6.28. 発表日 2014.6.28.
- (3) 窪木拓男. 欠損補綴のパラダイムシフトと口腔インプラント - 口腔インプラントは善か悪か - 岡山市歯科医師会 第 204 回学術臨床放談会. 岡山, 日本. 2014.10.4-5. 発表日 2014.10.4.
- (4) Hara ES, Ono M, Eguchi T, Pham HT, Tajima S, Calderwood SK, Matsumoto T, Kuboki T. miR-720 regulates the stem cell phenotype and differentiation of human dental pulp-derived mesenchymal stromal cells. 25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science. (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems), Nagoya, Japan. 2014.11.10-12. 発表日 2014.11.11.
- (5) 大野充昭, 大島正充, 園山 亘, 小川美帆, 笈田育尚, Hara ES, 新川重彦, 中島隆, 辻 孝, 窪木拓男. 出生後のイヌ永久歯胚組織を用いた器官原基法による完全な臓器としての歯の再生. 公益社団法人日本補綴歯科学会 第 123 回学術大会. 仙台, 日本. 2014.5.23-25. 発表日 2014.5.24.
- (6) 大島正充, 水野光政, 小川美帆, 窪木拓男, 山本照子, 春日井昌平, 齋藤正寛, 辻 孝. 再生歯ユニットによる歯・歯周組織の包括的再生. 第 5 回骨バイオサイエンス研究会. 岡山, 日本. 2014.6.28.
- (7) 大島正充, 辻 孝, 窪木拓男. 歯槽骨吸収に対する歯・歯周組織の包括的再生技術の開発. 第 7 回骨バイオサイエンス研究会. 岡山, 日本. 2016.6.4. 発表日 2016.6.4.
- (8) 大島正充, 窪木拓男, 辻 孝. 歯周組織を有するバイオハイブリッドインプラントの開発. 第 36 回公益社団法人日本口腔インプラント学会中国・四国支部学術大会. 高松, 日本. 2016.11.4-5. 発表日 2016.11.4.
- (9) Kuboki T. Biological regenerative medicine in prosthodontic practice - to attain reliable and sophisticated dental implant therapy. SNU Graduate School of Dentistry, Special Lecture. Seoul, Korea. 2017.10.16. 発表日 2017.10.16.

- (10) Kuboki T. Collaboration between soft tissue management and oral implant therapy to attain optimum esthetic results. The International Odonto-Stomatology Conference 2017. Hanoi, Vietnam. 2017.11.6-8. 発表日 2017.11.7.
- (11) Aung KT, Akiyama K, Maekawa K, Kuboki T. Older periodontitis model mice showed severer bone defects and sparser mesenchymal stem cells distribution in the periodontal defects. The 65th Annual Meeting of JADR. Tokyo, Japan. 2017.11.18-19. 発表日 2017.11.18. The 65th Annual Meeting of JADR PROGRAM AND ABSTRACTS OF PAPERS;21,2017.
- (12) Nguyen HT, Ono M, Komori T, Oohashi T, Kuboki T. BMP antagonist inhibitor L51P regulates the chondrogenesis and osteoarthritis. The 65th Annual Meeting of JADR. Tokyo, Japan 2017.11.18-19. 発表日 2017.11.19.

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 歯科再生医療の実現に向けた大型動物モデルにおける機能的な歯の再生. 大島正充, 大野充昭, 辻 孝, 窪木拓男. Bio Industry, 34 巻, 1-11, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪木 拓男 (KUBOKI Takuo)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
インプラント再生補綴学分野・教授  
研究者番号：00225195

(2) 研究分担者

辻 孝 (TUJI Takashi)  
国立研究開発法人理化学研究所  
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

浅原 弘嗣 (ASAHARA Hiroshi)  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
システム発生・再医学分野・教授  
研究者番号：70294460

秋山 謙太郎 (AKIYAMA Kentaro)  
岡山大学・大学病院  
クラウン・ブリッジ補綴科・講師  
研究者番号：70423291

大野 充昭 (ONO Mitsuaki)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
分子医化学分野・助教  
研究者番号：60613156

大島 正充 (OSHIMA Masamitsu)  
徳島大学大学院医歯薬学研究部  
顎機能咬合再建学分野・准教授  
研究者番号：00548307

内部 健太 (Uchibe Kenta)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
口腔形態学分野・助教  
研究者番号：20584618

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし