

Figure 1 Expression of *Runx3*, *Osterix*, *Runx2* and *Bmp2* by *in situ* hybridization during tooth development in mouse

(A–D) *Runx3* was progressively restricted to the odontoblastic layer of tooth germ starting from the bell stage (17.0 days post coitum) to the differentiation stage (P1) during terminal differentiation of odontoblasts. (E–H) *Osterix* was first detected weakly in the odontoblastic layer at 17.0 days post coitum, and was more pronounced at P1, overlapping with *Runx3* expression. (I–L) *Runx2* was not expressed in odontoblast layer after P1. (M–P) *Bmp2* was strongly expressed in the odontoblasts at P1. Arrowheads indicate the positive signals in the odontoblastic layer. dp, dental papilla; ol, odontoblast layer. Scale bar = 200  $\mu$ m.

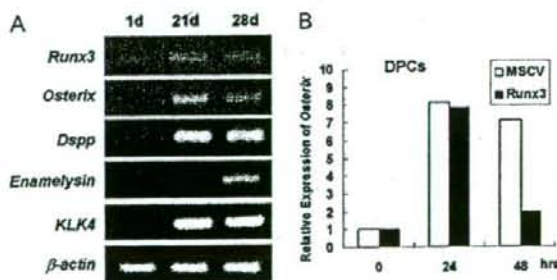


Figure 2 Down-regulation of *Osterix* expression by *Runx3* in mouse DPCs *in vitro*

(A) mRNA expression levels for *Runx3*, *Osterix*, and for the differentiation markers of odontoblasts, *Dspp*, *enamelysin* and *KLK4* in mouse DPCs in cell culture. (B) *Osterix* expression was down-regulated in mouse DPCs at 48 h after *Runx3* transfection. The experiment was repeated twice with similar results.

viability was nearly 70%, as determined with Trypan Blue staining, and the efficiency was nearly 35%, as estimated by fluorescence microscopy. Real-time RT-PCR showed that the expression of *Runx3* mRNA was enhanced approx. 3-fold in DPCs transfected with MSCV-EGFP-Flag-*Runx3* compared with control DPCs transfected with MSCV-EGFP after 24 h (result not shown). *Runx3* mRNA expression levels, however, were reduced to almost the same level as the control 48 h after transfection. On the other hand, *Osterix* expression was reduced by 48 h after transfection with MSCV-EGFP-Flag-*Runx3* compared with control transfections (Figure 2B). These results suggest that *Runx3* negatively regulates *Osterix* expression in the DPCs.

#### *Runx3* down-regulates the *Osterix* promoter activity in HEK-293 cells

A recent study has shown that *Runx2* specifically up-regulates *Osterix* promoter activity in C3H10T1/2 and ATDC5 cells, which are mesenchymal cell lines from bone and cartilage respectively.

[19]. There has, so far, been no report concerning *Osterix* regulation by Runx3. Runx3 shares highly conserved DNA-binding domains with Runx2. Both the *Runx2* and the *Runx3* promoters have putative Runx-binding sites that are fully conserved in sequence and location [24], therefore cross-regulation between Runx2 and Runx3 might be plausible. To avoid this possible endogenous effect, HEK-293 cells, in which neither Runx2 nor Runx3 are expressed (Figure 3A), were used to examine transcriptional activity induced by Runx3.

Three putative Runx-binding sites were identified at positions -1823 to -1817 bp (site 1, ACCACA), -1776 to -1771 bp (site 2, ACCACT) and -713 to -707 bp (site 3, AGTGGTT) relative to the cap site by computer analysis of the *Osterix* promoter (Figure 3B). A wild-type luciferase reporter plasmid containing all the three putative Runx-binding sites was compared with the *Osterix* promoter containing five different mutations (M1–M5), in which some of the three putative sites were mutated (Figure 3B). Cells in which the wild-type reporter plasmid was co-transfected with Runx3 reduced the *Osterix* promoter activity to approx. 55%. Transfection of the mutant reporters in which site 1 and/or site 2 were mutated resulted in almost the same reduced activity as that of the wild-type promoter. In contrast, in the mutant reporters in which site 3 was mutated (M4 and M5), only a weak repression (approx. 90% activity) was detected (Figure 3B). These results suggest that site 3 is essential for *Osterix* promoter activity. To confirm this, shorter wild-type and mutant plasmids containing only site 3 were used. The *Osterix* promoter activity was significantly reduced in cells transfected with the wild-type construct, whereas the cells transfected with the mutant construct were unaffected (Figure 3C). These results suggest that site 3 is essential for *Osterix* promoter activity.

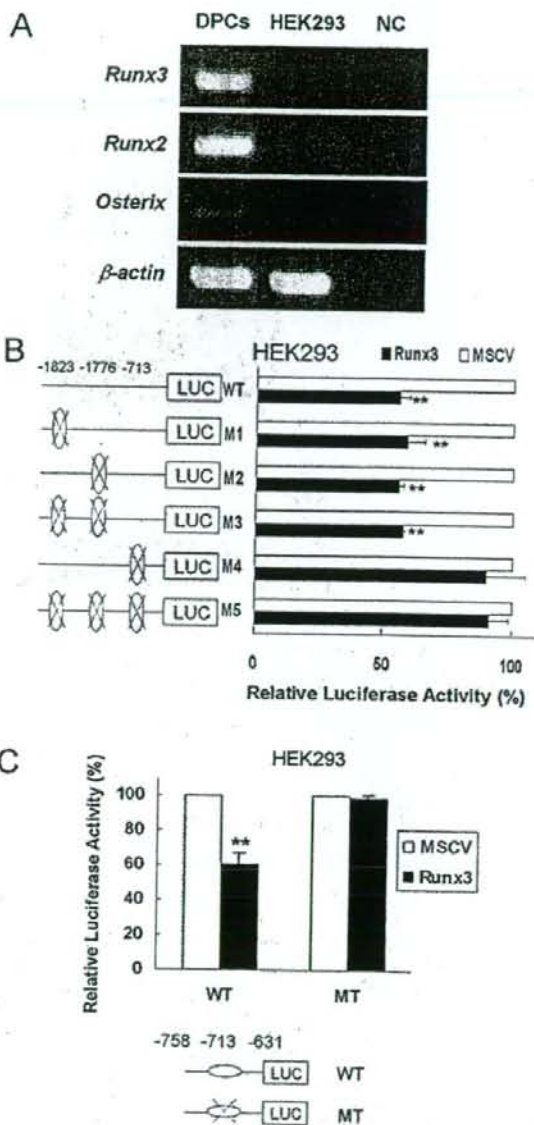
### Characterization of Runx3 binding to site 3

To determine whether transcriptional repression of *Osterix* is due to direct binding of Runx3 to site 3, EMSAs using nuclear extracts from the mouse DPCs were performed. As shown in Figure 4(A), 38 bp end-labelled oligonucleotide containing the site 3 (-713 to -707 bp) of the *Osterix* promoter formed a DNA-protein complex (Figure 4A, lane 2, arrowhead). The complex was competed out completely by a 125-fold excess of unlabelled wild-type oligonucleotide (Figure 4A, lane 3). An oligonucleotide in which site 3 was mutated did not affect this binding (Figure 4A, lane 4). Furthermore, an anti-Runx3 antibody bound to the DNA-protein complex (Figure 4A, lane 5, arrow), indicating the specificity of the DNA-protein complex. No band could be detected when only nuclear extract was loaded (Figure 4A, lane 6).

Next, we performed ChIP assays to test if Runx3 binds specifically to the putative response element *in vivo*. Using mouse DPCs, proteins were cross-linked on to chromatin and immunoprecipitated with an anti-Runx3 antibody. The presence of the *Osterix* promoter DNA was detected by PCR using primers flanking site 3 (-713 to -707 bp) (Figure 4B), indicating that Runx3 binds to site 3 of *Osterix* promoter both specifically and functionally. The use of an anti-Runx2 antibody resulted in a similar result (Figure 4B), suggesting that both Runx3 and Runx2 are able to bind site 3 *in vivo*.

### DISCUSSION

During a systematic *in situ* hybridization study of tooth development, *Osterix* mRNA was first detected in terminally differentiating odontoblasts and showed co-localization with Runx3, suggesting a potential role for both genes in odontoblast differentiation. Runx3 overexpression resulted in down-regulation

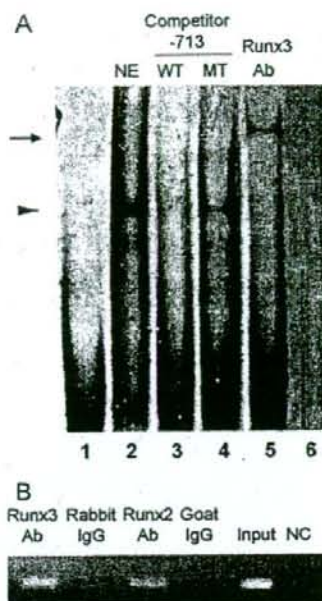


**Figure 3** Down-regulation of *Osterix* promoter activity by Runx3 in HEK-293 cells

(A) Determination of endogenous expression levels of *Runx3*, *Runx2* and *Osterix* in mouse DPCs and HEK-293 cells. (B) Wild-type (WT) and mutant (MT) *Osterix* promoter plasmids were analysed 48 h after co-transfection with MSCV-EGFP-Flag-Runx3 into HEK293 cells. (C) Shortened wild-type (WT) or mutant (MT) *Osterix* promoter plasmids containing only site 3 (-713 to -707) were co-transfected with MSCV-EGFP-Flag-Runx3 into HEK-293 cells. The activities were determined after 48 h and normalized against the co-transfected internal control plasmid (pRL-SV40). The values represent means  $\pm$  S.D. for four individual samples. The experiment was repeated twice with similar results. \*\*,  $P < 0.01$  compared with the empty MSCV plasmid. NC, negative control.

of *Osterix* in the mouse DPCs. This suggests that *Osterix* might be a downstream target of Runx3 in tooth development. *Osterix* null mice [18] have a similar phenotype to the *Runx2* null mice [9, 10], in which both intramembranous and endochondral bone are not





**Figure 4** Characterization of Runx3 binding to the *Osterix* promoter by EMSA and ChIP assay

(A) Interaction of nuclear extract (NE) of mouse DPCs with *Osterix* promoter -713 to -707 bp sequence (site 3) in EMSA. The arrowhead indicates the retarded protein-DNA complexes. The arrow indicates the super-shift band in the reaction with the addition of an anti-Runx3 antibody (lane 5). Lane 2 is a control reaction with no protein. Lane 3 and 4 represent competition reactions with wild-type (WT) or mutated (MT) unlabelled oligonucleotides. Lane 6, nuclear extract only. (B) ChIP assays were performed to investigate whether both Runx3 and Runx2 could bind to the *Osterix* promoter *in vivo*. A 120-bp band could be detected by PCR in both anti-Runx3 and anti-Runx2 antibody treated samples, but not in anti-rabbit or anti-goat IgG treated samples. Ab, antibody; NC, negative control.

formed due to the lack of osteoblast differentiation. Whereas *Osterix* is not expressed in the *Runx2* null mutants, *Runx2* expression is not changed in the *Osterix* null mutants [18]. These genetic studies have placed *Osterix* downstream of *Runx2* [18]. The precise regulatory role of *Runx2* in *Osterix* expression is not clear. A recent study has shown that a 737 bp fragment of the *Osterix* promoter is up-regulated upon *Runx2* overexpression in ATDC5 chondrogenitor cells, and the function of the 737 bp fragment was confirmed by site-directed mutagenesis experiments [19]. Furthermore, this functional binding site is conserved among mouse, rat and human, showing conservation of the DNA-binding site [19]. However, no information is available on the regulation of *Osterix* expression by Runx3. Therefore, we have performed transient co-transfection, EMSAs and ChIP assays to investigate the relationship between Runx3 and *Osterix* in DPCs. Structural dissection of the proximal promoter of the *Osterix* gene revealed the presence of three putative Runx-binding sites. Only site 3 (-713 to -707 bp) of the identified sites was preferentially and functionally occupied by Runx3. The disruption of site 3 leads to increased *Osterix* promoter activity in HEK-293 cells, in which both Runx2 and Runx3 are not expressed endogenously. These results indicate that *Osterix* expression is negatively regulated by Runx3. Furthermore, our EMSAs and ChIP assays confirmed that Runx3 directly down-regulates *Osterix* expression in DPCs prior to terminal differentiation into odontoblasts. It is noteworthy that Runx3 negatively regulates *CD36* expression in myeloid cells

[25] and suppresses gastric epithelial cell growth [26], implying a general role for Runx3 in transcriptional repression.

The distinct roles of Runx2 and Runx3 in odontoblast differentiation are not clear. Previous research indicated that development was disrupted in the cap/early bell stages of *Runx2* null mice and no overt differentiation of odontoblasts was observed [11,27]. There was no conspicuous phenotype in *Runx3* null mice [17]. In *Runx2* null mice, *Runx3* expression was enhanced dramatically in the mesenchyme of upper jaw and they differentiated into odontoblasts [27]. Our EMSA and ChIP assays have shown that not only Runx2, but also Runx3 binds to site 3 of the *Osterix* promoter. *Runx3* overexpression resulted in down-regulation of *Osterix* in DPCs. The *Osterix* promoter activity was down-regulated by *Runx3* transfection in HEK-293 cells. These results suggest that *Osterix* expression is co-operatively regulated by Runx2 and that Runx3 is at the same binding site on the *Osterix* promoter. Thus, Runx3 might co-operate with Runx2 to regulate *Osterix* expression during odontoblast differentiation. The role of *Osterix* in odontoblast development is not clear. In skeletal development, Runx2, Runx3, and *Osterix* play pivotal roles in osteoblast differentiation and hypertrophic chondrocyte maturation [28,29]. *Osterix* may play a role in segregation of osteoblast and chondrocyte lineages [29,30]. *Runx2* and *Runx3* are co-expressed in the early stages of tooth development. There is overlapping expression of Runx2 with *Runx3*, but not with *Runx2* in terminal differentiating odontoblasts. Therefore *Osterix* may play a role in lineage commitment of odontoblasts in tooth development. The diverse transcriptional outcomes of Runx activity are dependent on co-factors [1]. The Runx family members act as organizing factors for promoters of target genes, where they associate with co-activators and other DNA-binding transcription factors, including Runx3 [1]. Repression of *Osterix* by Runx3 in DPCs is an example of context-dependent regulation of lineage commitment. Thus, there might be co-operative interactions among BMPs, Smads, Runx2, and Runx3 in the regulation of *Osterix* expression during odontoblast differentiation into odontoblasts.

We thank Professor A. Akamine (Department of Dental Science, Faculty of Dental Kyushu University, Fukuoka, Japan) for his help. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan, #17390509 and #18-06588.

## REFERENCES

- Durst, K. L. and Hiebert, S. W. (2004) Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing. *Oncogene* **23**, 4220-4224.
- Ito, Y. (2004) Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene* **23**, 4198-4208.
- van Wijnen, A. J., Stein, G. S., Gergen, J. P., Groner, Y., Hiebert, S. W., Ito, Y., Liu, J. C., Ohki, M. and Speck, N. (2004) Nomenclature for Runx-related (RUNX) proteins. *Oncogene* **23**, 4209-4210.
- Bangswow, C., Rubins, N., Glusman, G., Bernstein, Y., Negreanu, V., Goldenberg, Lotem, J., Ben-Asher, E., Lancet, D., Levanon, D. and Groner, Y. (2001) The *Runx3* gene—sequence, structure and regulated expression. *Gene* **279**, 221-232.
- Levanon, D., Glusman, G., Bangswow, T., Ben-Asher, E., Male, D. A., Avidan, N., Bangswow, C., Hattori, M., Taylor, T. D., Taudien, S. et al. (2001) Architecture and evolution of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene* **262**, 23-33.
- Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., Inuzuka, M., Lu, J., Satake, M., Shiga, T. and Ito, Y. (1993) PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human *AML1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6859-6863.
- Thirunavukarasu, K., Mahajan, M., McLaren, K. W., Stifani, S. and Karsenty, G. (2004) Two domains unique to osteoblast-specific transcription factor *Ost2/Cbfa1* control its transactivation function and its inability to heterodimerize with *Cbfa1*. *Mol. Cell* **18**, 4197-4208.

- 8 Komori, T. (2005) Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J. Cell. Biochem.* **95**, 445–453
- 9 Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M. et al. (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764
- 10 Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R. et al. (1997) *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765–771
- 11 D'Souza, R. N., Aberg, T., Gaikwad, J., Cavender, A., Owen, M., Karsenty, G. and Thesleff, I. (1999) *Cbfa1* is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* **126**, 2911–2920
- 12 Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. and Karsenty, G. (1997) *Ost2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**, 747–754
- 13 Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J. B., Aylsworth, A. S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W. G., Henn, W., Knoll, J. H. et al. (1997) Mutations involving the transcription factor *CBFA1* cause cleidocranial dysplasia. *Cell* **89**, 773–779
- 14 Li, Q. L., Ito, K., Sakakura, C., Fukumachi, H., Inoue, K., Chi, X. Z., Lee, K. Y., Nomura, S., Lee, C. W., Han, S. B. et al. (2002) Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* **109**, 113–124
- 15 Levanon, D., Bettoun, D., Harris-Cerruti, C., Woolf, E., Negreanu, V., Eilam, R., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Xiao, C., Fliegau, M. et al. (2002) The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *EMBO J.* **21**, 3454–3463
- 16 Brenner, O., Levanon, D., Negreanu, V., Golubkov, O., Fainaru, O., Woolf, E. and Groner, Y. (2004) Loss of Runx3 function in leukocytes is associated with spontaneously developed colitis and gastric mucosal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 16016–16021
- 17 Yamashiro, T., Aberg, T., Levanon, D., Groner, Y. and Thesleff, I. (2002) Expression of Runx1, -2 and -3 during tooth, palate and craniofacial bone development. *Mech. Dev.* **119** (Suppl. 1), S107–S110
- 18 Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor *Osterix* is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17–29
- 19 Nishio, Y., Dong, Y., Paris, M., O'Keefe, R. J., Schwarz, E. M. and Drissi, H. (2006) Runx2-mediated regulation of the zinc finger *Osterix/Sp7* gene. *Gene* **372**, 62–70
- 20 Platt, K. A., Michaud, J. and Joyner, A. L. (1997) Expression of the mouse *Gli3* and *Ptc* genes is adjacent to embryonic sources of hedgehog signals suggesting a conservation of pathways between flies and mice. *Mech. Dev.* **62**, 121–135
- 21 Iohara, K., Zheng, L., Ito, M., Tomokyo, A., Matsushita, K. and Nakashima, M. (2006) Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells* **24**, 2493–2503
- 22 Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. and Schaffner, W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts' prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419
- 23 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- 24 Drissi, H., Luc, Q., Shakoori, R., Chuva De Sousa Lopes, S., Choi, J. Y., Terry, A., Hu, M., Jones, S., Neil, J. C., Lian, J. B. et al. (2000) Transcriptional autoregulation of the bone related *CBFA1/RUNX2* gene. *J. Cell Physiol* **184**, 341–350
- 25 Puig-Kroger, A., Dominguez-Soto, A., Martínez-Munoz, L., Serrano-Gomez, D., Lopez-Bravo, M., Sierra-Filardi, E., Fernandez-Ruiz, E., Ruiz-Velasco, N., Ardavin, C., Groner, Y. et al. (2006) RUNX3 negatively regulates CD36 expression in myeloid cell lines. *J. Immunol.* **177**, 2107–2114
- 26 Chi, X. Z., Yang, J. O., Lee, K. Y., Ito, K., Sakakura, C., Li, Q. L., Kim, H. R., Cha, E. J., Lee, Y. H., Kaneda, A. et al. (2005) RUNX3 suppresses gastric epithelial cell growth by inducing p21<sup>WAF1/Cip1</sup> expression in cooperation with transforming growth factor  $\beta$ -activated SMAD. *Mol. Cell Biol.* **25**, 8097–8107
- 27 Aberg, T., Cavender, A., Gaikwad, J. S., Bronckers, A. L., Wang, X., Waltimo-Siren, J., Thesleff, I. and D'Souza, R. N. (2004) Phenotypic changes in dentition of Runx2 homozygote-null mutant mice. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 131–139
- 28 Yoshida, C. A. and Komori, T. (2005) Role of Runx proteins in chondrogenesis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **15**, 243–254
- 29 Komori, T. (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J. Cell. Biochem.* **99**, 1233–1239
- 30 Nakashima, K. and de Crombrughe, B. (2003) Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.* **19**, 458–466

Received 18 January 2007/19 February 2007; accepted 13 March 2007

Published as BJ Immediate Publication 13 March 2007, doi:10.1042/BJ20070104



# HERS

## ● 歯科再生医療はどこまで到達し、どこへ向かうのか？

● 歯根再生のキーワードとしての「HERS」のメカニズムに迫る

大島勇人<sup>1)</sup>・藤原尚樹<sup>2)</sup>・Han-Sung Jung<sup>3)</sup>・太田正人<sup>4)</sup>・齋藤正寛<sup>5)</sup>・原田英光<sup>6)</sup>

歯科再生医療研究は、何がどこまで進んでいて、今後どのような展開が待っているのだろうか？

第49回歯科基礎医学会学術大会・サテライトシンポジウム「ヘルトビッチの上皮鞘（HERS）と歯根発生のバイオロジー」では、歯科再生医療では、補綴処置が可能な歯冠の再生以上に、歯根の再生を視野に入れる必要があり、そこでは「ヘルトビッチの上皮鞘（HERS）」形成のメカニズムの解明がキーワードになることが示された。

本特別企画では、当日のシンポジストによる最新知見の報告をダイジェストにてお届けするとともに、歯科再生医療の現状と今後の展開について俯瞰していただく。（編集部）

<sup>1)</sup> 新潟大学大学院医歯学総合研究科歯科歯面再生学講座歯根形成学分子  
〒951-8514 新潟市中央区学校町4-5274

TEL:025-227-2812 E-mail:hiyori@dent.niigata-u.ac.jp

<sup>2)</sup> 新潟大学大学院医歯学総合研究科歯科歯面再生学講座

<sup>3)</sup> 延世大学校医歯学大学院生物医学工学歯科学分子 (Division in Anatomy and Developmental Biology, Department of Oral Biology, Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, Brain Korea 21 Project, Yonsei University, College of Dentistry, Seoul, Korea)

<sup>4)</sup> 東京医科歯科大学大学院歯学研究科歯面再生学講座歯根形成学講座部分再生学分子

<sup>5)</sup> 大阪大学大学院歯学研究科歯面再生学講座歯根形成学講座部分再生学分子



大島 勇人 Hayato Oshima

新潟大学大学院歯学総合研究科顎顔面再建学講座硬組織形態学分野 E-mail:histoman@dent.niigata-u.ac.jp

### ● 歯科再生医療のこれまでと、現状での到達点

歯がつくられる過程(歯の発生)は、腎臓や肺などがつくられるのと同じように、上皮<sup>①)</sup>と間葉<sup>②)</sup>間の相互作用(上皮間葉相互作用<sup>③)</sup>)で進行します。この過程で、顎の特定の場所に歯がつくられ始め、切歯・犬歯・臼歯など、その場に応じた歯が形づくられた後に、硬い歯の組織(象牙質やエナメル質)がつくられます。この上皮間葉相互作用において、ツールキット遺伝子<sup>④)</sup>と呼ばれるシグナルがとても重要な役割を果たすことが明らかになっています。

現在、歯の再生に向けてどのような取り組みがなされているかという、「からだ」から歯をつくる種となる細胞(幹細胞)を取り出して、「からだ」に馴染みやすい材料の助けで、取り出した細胞を歯の細胞に誘導し歯をつくる試み(組織工学的歯の再生)です。現在、生まれる前のネズミの歯胚<sup>⑤)</sup>や生後のブタの親知らずの細胞を使った歯の再生が成功しており、歯をつくる細胞さえ入手できれば、ヒトでも歯の再生が可能であることを示しています。

### ● 歯冠再生なのか？ 歯根再生なのか？

歯胚から取り出した細胞を使って組織工学的に歯を再生させることは可能になりましたが、歯の再生に向けて克服しなければならぬ問題が数多く残されています。問題点の一つとして、再生歯の形をどうつくるかがあげられます。組織工学的歯の再生においては、

しばしば歯牙腫<sup>⑥)</sup>様の再生歯が形成され、再生歯の形や数をコントロールすることが難しいのが現状です。歯の形や数の制御が可能になったとしても、歯は、食事をしたり、声を出したりするだけでなく、審美的な要求にも応えなければなりませんので、補綴処置などの従来からの歯科医療技術の助けが必要になります。このことは、歯の数のコントロールは克服しなければならぬませんが、歯の形の問題は歯科医療技術の助けで解決できると言えるでしょう。一方、歯が口の中で機能するためには、歯周組織の再生が必要となります。言い換えれば、歯冠再生が実現しても、歯根再生を実現しなければ、歯の再生技術が歯科医療に応用できないこととなります。

### ● なぜ「HERS」が注目されるのか？

歯の発生は上皮間葉相互作用により進行しますが、この過程は特定の場所に歯の芽がつくられ(誘導)、歯胚が形づくられ(形態形成)、硬い組織になる(細胞分化と基質形成)というステップを踏んで歯冠がつけられます(図1)。

歯の芽がつくられる前には、顎には馬蹄形の上皮の高まり(歯堤)がつくられ、その後特定の場所に歯の芽である歯胚がつけられます。歯胚の上皮は蕾状、帽子状、釣り鐘状を呈し、それぞれ蕾状期歯胚、帽状期歯胚、鐘状期歯胚と呼ばれます。引き続き、将来の咬頭頂となる部分から歯が硬くなり始めます(象牙芽細胞とエナメル芽細胞への分化と象牙質とエナメル質の形成)。

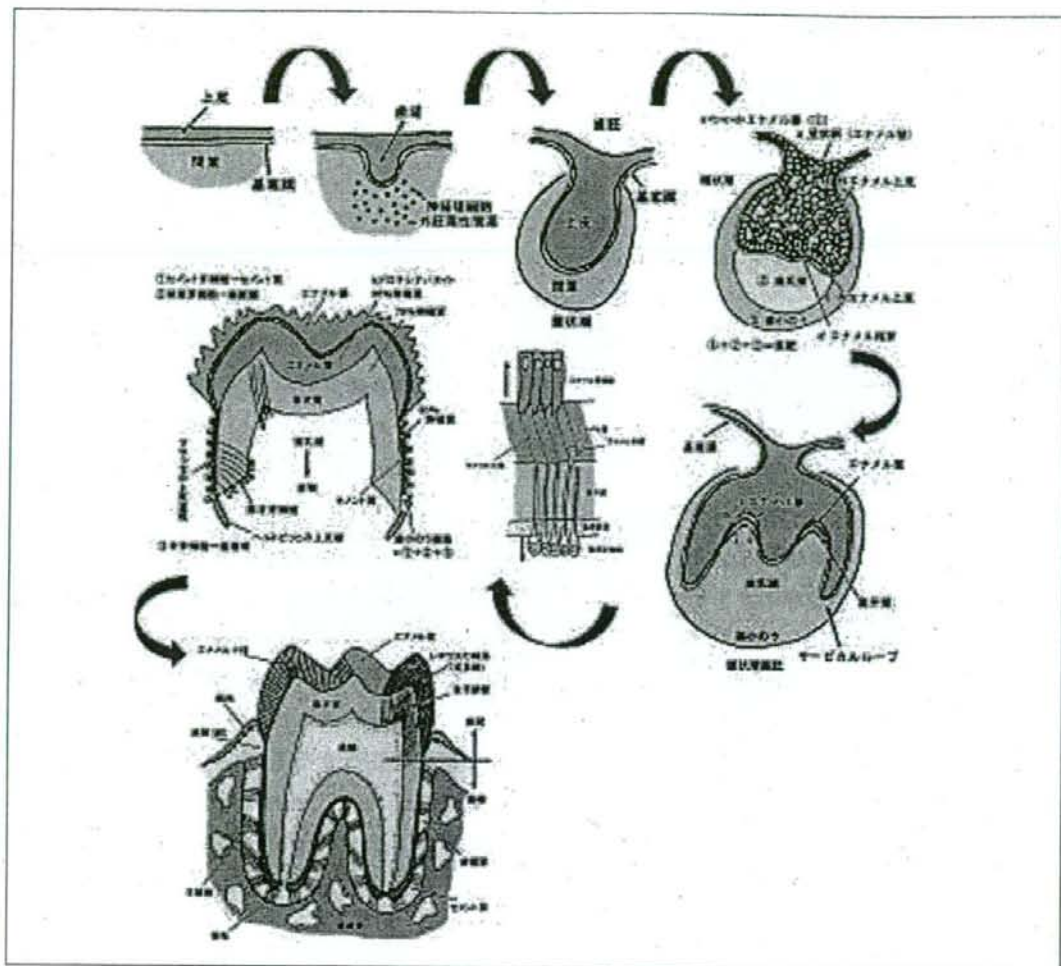


図1 歯の発生過程

歯の発生は上皮間葉相互作用で進行するが、上皮と間葉の間には基底膜が存在する。顎には馬蹄形の上皮の高まり（歯堤）がつくられ、その後に特定の場所に歯の芽である歯胚がつくられる。歯胚は上皮（エナメル器）と神経堤（7）由来の間葉（歯乳頭と歯小嚢）から構成され、上皮の折れ返りの部分をサービカルループと呼ぶ。歯胚は蕾状期、帽状期、鐘状期を経て、将来の咬頭頂となる部分から歯が硬くなり始める（象牙芽細胞とエナメル芽細胞への分化と象牙質とエナメル質の形成）。歯冠が完成すると、サービカルループがヘルトビッヒの上皮鞘（HERS）となり、歯根がつくられ始める。HERSが断裂すると、歯小嚢細胞がセメント芽細胞となりセメント質を形成し、歯根膜、歯槽骨を含めた歯周組織の形成が進行する。断裂したHERSはマラッセの上皮遺残として歯根膜中に残存する。歯が萌出すると、上皮と歯肉が繋がりが、エナメル質の形成細胞は消失する。

歯冠が完成すると歯根がつくられ始めますが、この歯根がつくられる過程で重要な役割を果たすのがヘルトビッヒの上皮鞘（Hertwig's epithelial root sheath, HERS）と呼ばれる上皮の存在です。歯冠がつくられる時期には、上皮と間葉の間に象牙質とエナメ

ル質がつくられますが、その後エナメル質はつくられなくなります。このエナメル質をつくらぬ上皮をHERSと呼びます。つまり、HERSと間葉の相互作用により歯根がつかれるとともに、セメント質や歯根膜などの歯周組織がつくられ始めるのです（図1）。



しかしながら、HERSがどのようにつくられるのか？ HERSがどのような役割を担っているのか？ そしてHERSの運命はどうなるのか？ については、よくわかっていないのが現状です。

しかしながら、2005年以降、歯根発生に関する重要な論文が日本・韓国から発信されています。そこで本企画では、これらの論文の執筆者の先生方に、独自の研究手法を用いたHERSや歯根発生についてのデータを紹介していただき、HERSや歯根発生メカニズムに関する最新の知見を紹介するとともに、今後の再生医療の方向性について俯瞰することとしたい。藤原尚樹先生と Han-Sung Jung 先生からは器官培養系を用いた研究成果について、それぞれHERSの分化と形成へのEGFとIGF-Iの役割、上皮間葉相互作用の観点から見た歯根形成におけるBMPの役割についての知見を紹介していただきます。太田正人先生からは遺伝子変異マウスを用いた研究成果をもとに、歯根形成におけるShhシグナル経路について概説していただきます。また、斎藤正寛先生からはヒト歯根膜形成に関わる遺伝子データベースの結果について、原田英光先生からは歯冠形成から歯根形成に移行するメカニズムの仮説について紹介していただきます。

### ●最新知見の意味するもの

歯根がつけられる過程のメカニズムの研究が立ち後れている原因は、研究手法に制限があるからです。歯の発生を機能の側面から研究するために、「ある機能が失われるとどうなるか？(機能喪失)」と「ない機能を得るとどうなるか？(機能獲得)」の実験を行います。「機能喪失」とは、遺伝子レベルまたはタンパ

ク質レベルで機能を働かなくする手法であり、「機能獲得」とは、通常は発現しない、もしくは発現が低い遺伝子を強く発現させたり、またはタンパク質をたくさん作用させたりする手法です。このような手法は、細胞レベルから動物固体レベルまで機能を調べることができですが、培養実験を確立したり遺伝子改変動物をつくらしたりして、どのような異常が起こるかを解析することが必要になります。ツールキット遺伝子欠損動物の解析では、動物が生後にすぐに死んでしまうものが多く、生後に始まる歯根形成の解析を難しくしています。また、歯根形成は周囲の歯槽骨形成と連動して進行するため、歯周組織形成を培養実験系で確立する必要があります。

本企画で紹介する各研究は、上記の問題を解決するために、独自の手法を駆使して歯根発生メカニズムの解析に成功している研究であり、世界からも注目を浴びている研究成果です。

- 21) 上皮とは、体表・体腔・管腔構造をつくる組織で、通常細胞同士が敷石状に密に接触し合う特徴をもつ
- 22) 上皮以外の組織を間葉といい、細胞間が広く開いた構造を示すのが特徴である
- 23) 上皮と間葉間の時間的・空間的相互作用を上皮間葉相互作用という
- 24) 生物種にかかわらず、形づくりには複数の遺伝子が入ったセットとして働くことから、この共通の「遺伝子という工具箱(ツールキット)」をツールキット遺伝子と呼ぶ。骨形態形成因子(BMP)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、ウィント(Wnt)、ソニックヘッジホッグ(Shh)、腫瘍壊死因子(TNF)などが知られている
- 25) 将来歯となる歯の芽を歯胚といい、上皮と間葉からなる
- 26) さまざまな変形した歯が形成される腫瘍の一種
- 27) 脳や脊髄の原基である神経管がつけられる時に、神経管になる上皮と皮膚になる上皮の境界にある細胞群を神経堤細胞と呼び、間葉へ遊走し歯をつくる間葉細胞となる



## 【器官培養系を用いた歯根形成メカニズムの解明】

藤原尚樹 Naoki Fujiwara

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座 / E-mail: naokif@iwate-med.ac.jp

歯冠形成から歯根形成へ移行する際、エナメル器の下端では星状網 (SR) が消失し、内エナメル上皮 (IEE) と外エナメル上皮 (OEE) の二層からなるヘルトヴィッヒの上皮鞘 (HERS) が分化する。この過程でサービカループから上皮成長因子 (EGF) 受容体の発現が免疫組織学的に消失する一方で、インスリン様成長因子 (IGF) -I 受容体は HERS に発現することが判明した。

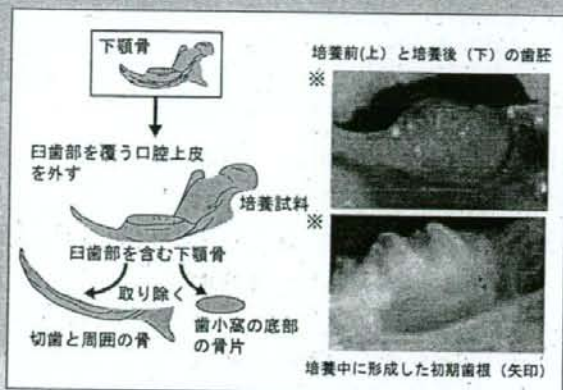


図1 生後臼歯歯胚の器官培養

われわれが考案した器官培養系 (図1) は、歯胚の他に歯根膜と骨も保持しており、生後マウス臼歯歯胚の発達を観察することができる。この系を用いた実験 (図2) から、このSRの消失にはEGFが調節因子として関わっており、IGF-IはHERSのOEEの細胞増殖活性を促進することで、HERSの伸長を促進することがわかった。これまで不明であったHERSの分化と形成にEGFとIGF-Iが、それぞれ時期特異的に重要な役割を果たすことが示された。

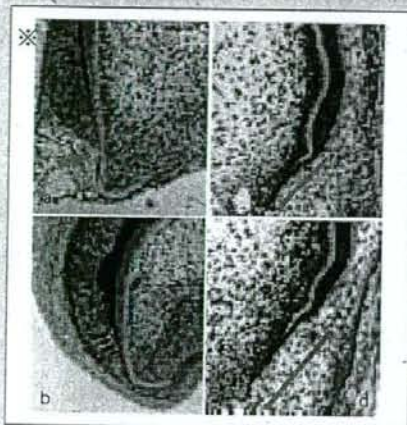


図2 器官培養における歯胚への成長因子の影響

a, b: 生後3日齢臼歯歯胚2週間培養。a-対照群, b-EGF添加群。

対照群ではHERSが断裂し (矢印), 初期歯根形成がみられるが、EGF添加群では星状網 (※) が消失せず、エナメル質形成が継続している。

c, d: 生後5日齢臼歯歯胚4日間培養。c-対照群, d-IGF-1添加群。対照群のHERS (ライン) は発達するが短いに対し、IGF-1添加群ではHERSが伸長し、歯根形成が促進されている。

### この知見、どう読めばよい?

本研究の注目すべき点は、歯根形成メカニズムを解析するためのエレガントな実験系を確立したことです。この実験系を使って、歯冠形成から歯根形成に移行するタイミングが二種類の成長因子 (EGFとIGF-I) の発現を切り替えることによって決定されることを明らかにしています。歯がつくられている時期、に二種類の成長因子を「からだ」に時期を変えて投与することにより、歯冠と歯根の長さを調節するようなことが、将来実現できるかも知れません。



## 【Epithelial-mesenchymal interaction of Hertwig's epithelial root sheath during root formation】

Han-Sung Jung

Division in Anatomy and Developmental Biology, Department of Oral Biology, Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, Brain Korea 21 Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea / E-mail:hsjung@yumc.yonsei.ac.kr

歯冠形成過程において上皮間葉相互作用が重要な役割をもつことはよく知られているが、歯根形成期においてもHERSと歯乳頭および歯小囊間に相互作用が存在すると考えられる。個体発生において多様な機能をもつBMP4は、歯冠形成期ではサービカルループ周囲に局在しないが(図1a)、歯根形成期になるとHERS周囲の間葉細胞で局在を示している(図1b)。

そこでわれわれは、HERS形成におけるBMP4の役割を検討する目的で、BMP4およびBMP阻害作用をもつNogginピーズを歯根形成期のマウス歯乳頭に移植した。移植48時間後、BMP4群において有意にHERSの伸張およびPCNA陽性細胞数の増加が認められた。またNoggin群ではHERSの発育は抑制された(図2)ことから、HERS周囲の間葉細胞が分泌するBMP4は、HERSの成長を促進する可能性が示された。したがって、BMP4は歯根形成を正に調節する因子として、再生工学における応用が期待される。

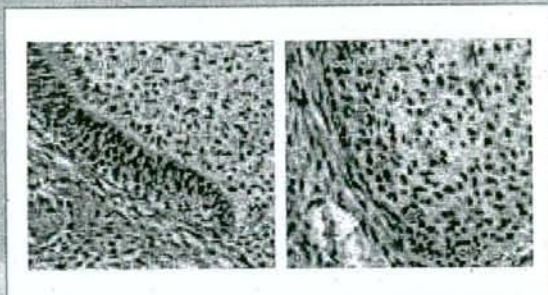


図1 歯冠形成期(a)および歯根形成期(b)におけるHERS周囲のBMP4局在の有無

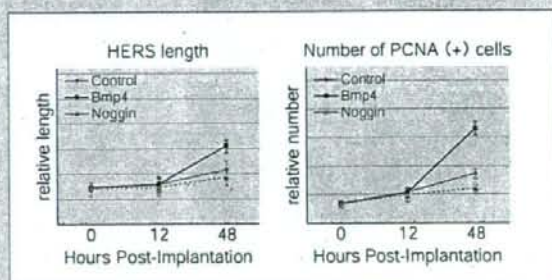


図2 HERS形成におけるBMP4の役割

### この知見、どう読めばよい？

本研究で注目すべき点は、器官培養系にピーズ実験<sup>※)</sup>を応用することにより、BMPの役割を解明したことです。ここでは、BMPがアクセル、Nogginがブレーキの役割をしているので、二種類のタンパク質のアクセルとブレーキの作用をうまく利用できれば、歯根の長さを自由に調節できるようになるのも夢ではありません。

※) タンパク質を溶みこませたピーズを器官培養系に作用させることにより、タンパク質の機能獲得の条件をつくり出せる。また逆に、タンパク質の阻害薬を作用させると機能喪失の条件をつくり出せる



## 【歯根発生におけるソニックヘッジホッグ (Shh) 経路の役割】

太田正人 Masato Ota

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎顔面機構制御学講座分子発生学分野 / E-mail: seijin.emb@tmd.ac.jp

脊椎動物の「体づくり」の過程で重要な役割を果たすソニックヘッジホッグ (Shh) 経路は、胎生期の歯胚上皮においても細胞増殖や細胞死を制御し、臼歯の歯冠形態を決定する (図1)。

この Shh シグナル経路が歯根の形態形成にも関与する可能性を検証するため、マウス臼歯の歯根形成過程における Shh シグナル経路遺伝子の発現パターンを調べた結果、歯根発生に重要な HERS や周囲の歯乳頭増殖帯で遺伝子発現を観察した。次に Shh 受容体の Patched1 (Ptc1) 遺伝子に変異をもち Shh シグナル経路に異常のある Ptc1 mes 遺伝子変異マウスを解析した。Ptc1 mes では、生後1週齢で HERS 周囲の増殖帯での増殖活性の低下、また生後4週齢で臼歯の萌出遅延と歯根伸長不全 (図2a)、さらに FGF-2、FGF-18 の発現低下が観察された (図2b)。現在、このように FGFs を介した Shh による臼歯の歯根発生の制御機構が明らかにされつつある。

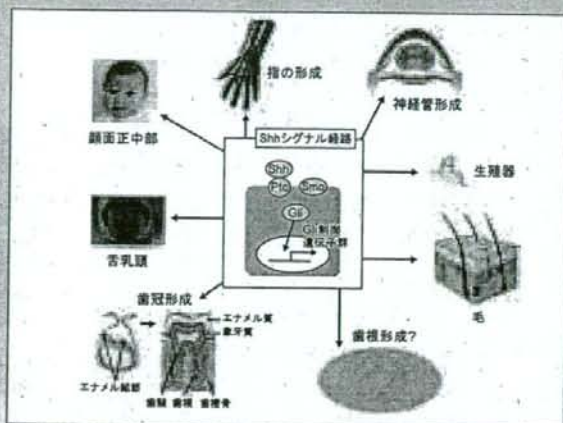


図1 「からだ」づくりにおける shh 経路

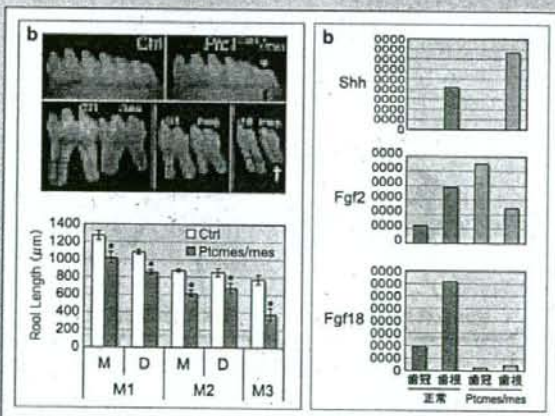


図2 歯根形成過程における shh シグナル経路遺伝子発現パターン

### この知見、どう読めばよい?

本研究の注目すべき点は、歯冠形成で重要な働きをする Shh の歯根形成における役割を示したことです。Shh がうまく働かないと、萌出が遅れ歯根が短くなることから、歯根形成に Shh が重要な役割を果たすことが示されています。Shh がうまく働かないと、連動して他のシグナル (FGF) が抑制されるように、「からだ」では一つのシグナルがおかしくなると、関連したシグナルにも影響することがわかります。将来の歯根の長さや数の調整には、Shh シグナルをうまく操れるようになることが必要であると言えます。

## 【EST データベースを用いた歯根膜発生機構の解析】

齋藤正寛 Masahiro Saito

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座生化学分野 / E-mail:mssaito@dent.osaka-u.ac.jp

歯根膜は歯周病により重篤な炎症性崩壊を受けると、機能的・生体力学的に十分に再生させることはきわめて困難である。しかしながら、歯根膜発生・再生に関わる機能分子が同定されていないため、これまで歯根膜再生を誘導できる創薬の開発は困難をきわめていた。そこでわれわれは、歯根膜再生機構を明らかにするため、慶応義塾大学医学部清水研究室と共同で Expressed sequence tag (EST) 法と呼ばれる手法を用いて、ヒト歯根膜形成に関わる遺伝子のデータベース化を試みた (図1)。

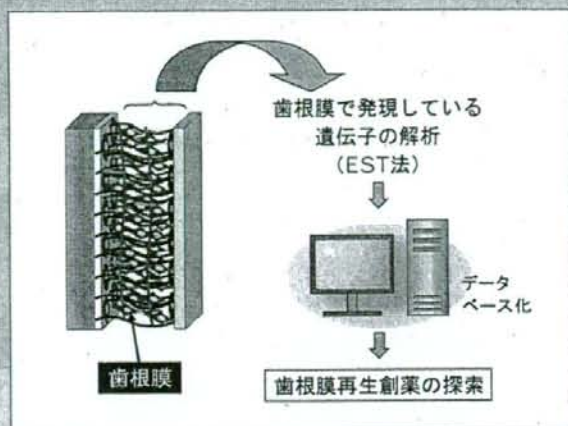


図1 ヒト 歯根膜形成遺伝子のデータベース化

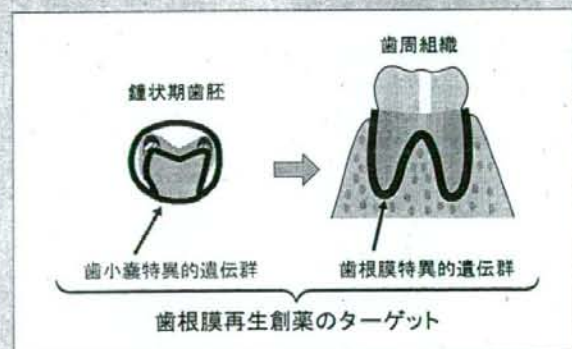


図2 歯根膜再生創薬のターゲットが含まれている?

このデータベースを構築した結果、興味深いことに歯根膜の原器である歯小囊に特異的な遺伝子群と、成熟した歯根膜で特異的に発現する遺伝子群が存在することが判明した (図2)。現在これらの遺伝子群の機能を解析中であるが、このような歯根膜発生に関わる遺伝子群のなかに、歯根膜再生創薬のターゲットが含まれている可能性が示唆された。

### この知見、どう読めばよい?

本研究の注目すべき点は、歯根膜で発現している遺伝子群を解析し、歯小囊に発現している遺伝子群と歯根膜に発現している遺伝子群をスクリーニングしたことです。さらに解析が進むことにより、歯根膜が作られる時期に促進的に働くシグナルが明らかになり、歯根膜再生創薬の開発に繋がることが予想されます。将来、歯周組織再生手術の際に、この歯根膜再生創薬を作用させることにより、効率的に歯周組織が再生されることになるでしょう。



## 【歯冠形成から歯根形成に移行するメカニズム】

原田英光 Hidemitsu Harada

(岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座 / E-mail:hideha@wate-med.ac.jp)

ヘルトビッチの上皮鞘 (HERS) が内エナメル上皮 (IEE) と外エナメル上皮 (OEE) の二重層であるという記載については、実は実験的に検証されていない。細胞増殖のマーカである BrdU と Ki67 を使って詳細に細胞の動きを観察した結果、HERSには主にOEEが重要な役割を担っていることが明らかとなった。

われわれの提唱するHERS形成過程についての仮説——歯乳頭側から分泌される細胞増殖因子が減少するとIEEの細胞分裂は停止する。一方、OEEは歯小囊からの細胞増殖因子によって細胞は分裂を続けて、サービカルループ下方にHERSが形成される——この仮説に基づいて、歯胚をFGF10徐放性ゼラチンシートで挟み込んで培養すると、OEEは増殖を活発にしてサービカルループを越えてゼラチンシートの表層を遊走した。それに伴い、歯乳頭細胞がエナメル器に囲まれている領域をこえてコラーゲンゲル内に誘導されていくことが観察された。このようにOEEをコントロールすることで歯根の発生や成長を誘導する可能性を示すことができた (図1)。

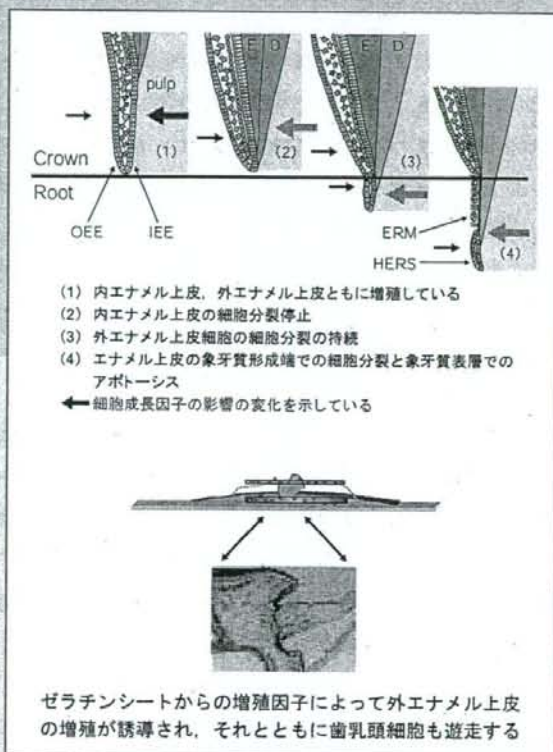


図1 HERS形成の仮説

ゼラチンシートからの増殖因子によって、外エナメル上皮の増殖が誘導され、それとともに歯乳頭細胞も遊走する

### この知見、どう読めばよい?

本研究の注目すべき点は、「FGFシグナルが消失すると歯冠形成から歯根形成に移行する」という結果から「HERSがIEEとOEEの二重層である」という概念を修正する仮説を提唱したことです。歯がつくられる時期にFGFシグナルを調節することで、歯根の長い歯や短い歯をつくることが可能になることを示しています。

大島 勇人 Hayato Oshima

新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座硬組織形態学分野 E-mail:histoman@dent.niigata-u.ac.jp

動物の体が外傷や切断などで傷を受けると、その傷を受けた場所に依じて修復する現象を再生といい、私たちの「からだ」は見かけ上変化がなくても、各器官や組織を構成している細胞は絶えずつくられては壊されています。このように、再生とは、生物のもつ最も生物らしい現象であり、再生の場には、その場所に依じた幹細胞が維持されています。う蝕、咬耗・摩耗、切削などの歯の損傷に対して歯髄内に象牙質が作られる現象も、幹細胞が歯髄内に存在することを示していると言えます。

現在の歯の再生の一つの方向性は、「からだ」から歯の幹細胞を取り出して、組織工学的に歯を再生させることです。これまでも、永久歯や乳歯の歯髄や歯周組織に幹細胞が存在するという報告がある一方で、血液をつくる骨髄の幹細胞や万能細胞と呼ばれる胚性幹細胞(ES細胞)から歯をつくる試みもあります。歯の幹細胞は歯の再生と修復に必要なソースであることは間違いありませんが、「からだ」のどこに歯の幹細胞が潜んでいるのか？ 幹細胞がどのようなメカニズムで維持されているのか？ どのようにして「からだ」から幹細胞を取り出すのか？ など、幹細胞に関する未解決の課題は山積していると言えるでしょう。

歯の発生における上皮間葉相互作用において、「歯の誘導」という現象があります。蕾状期歯胚より前では上皮に歯の誘導能があり、蕾状期歯胚以降は間葉に歯の誘導能が移るといふ事実です。たとえば、蕾状期以降では、歯胚の間葉と皮膚の上皮を一緒にすると歯ができるという現象です。このような歯の誘導現

象を利用した歯の再生研究も行われています。

また、歯が生えなくなるヒト遺伝病も歯のつくられるメカニズムの理解に役に立つことが知られています。たとえば、Ectodysplasinという遺伝子がおかしくなると無汗性外胚葉異形成症<sup>49)</sup>という病気になり、歯の数が減少します。ネズミでこの遺伝子を過剰に発現させると歯の数が増加するというのです。たった一つの遺伝子の操作で歯が作られるという事実はたいへん興味深いことです。

一方、一生生え続けるネズミの切歯にも歯の幹細胞が存在することが明らかになっています。ネズミの切歯の根っこ先には歯の幹細胞が存在し、幹細胞が維持されているというのです。ネズミの切歯を使って歯の幹細胞が維持されているメカニズムを解明することも、歯の再生研究の一つの方向性です。

歯科再生医療を実現するためには、上述のように歯根が作られるメカニズムの解明が重要になりますが、本企画でそれぞれの先生方が明らかにしたように、いろいろなシグナルが重要な役割を担っており、それらが相互に関係していることが予想されます。また、歯の発生における上皮間葉相互作用のメカニズムの解明だけではなく、幹細胞についても理解を深めなければなりません。さらに、「組織工学的歯の再生」技術の向上も重要であり、私たちが超えなければならないハードルは数多く残っているとと言えるでしょう。

<sup>49)</sup> 先天的に毛、歯、汗腺などの外胚葉性組織に形成異常を示す疾患



4)村上伸也、橋川智子

歯周組織再生の現状と将来の展望

再生医学のいま —基礎研究から臨床への展開に向けて-、治療、90: 609-616, 2008

1)村上伸也

塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) による歯周組織再生、249-255 : 17、歯科と骨粗鬆症、  
Clinical Calcium、編集：米田俊之、2007

# 臓器置換技術を応用した次世代 歯科再生医療技術の開発

齋藤正寛<sup>1)</sup> + 辻孝<sup>2,3)</sup>

Masahiro SAITO

Takashi TSUJI

1) 大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室

2) 東京理科大学基礎工学部 生物工学科 3) 東京理科大学 文部科学省・学術フロンティア再生工学研究センター

再生医療とは、臓器不全に陥った臓器に幹細胞と呼ばれる多分化能を有する細胞を移植して、機能回復する治療技術である。このような幹細胞移植治療の研究開発が展開されているなかで、次世代の再生医療技術として、生体外で人工的に作製した臓器と置換する臓器置換再生医療の基礎研究開発が行われている。筆者らは、歯科再生医療を目指して人工歯胚作製技術を開発し、新聞報道をはじめ社会的に大きな関心を集めた。この技術では、細胞操作により作製した人工歯胚を用いて、完全な歯を再生するばかりでなく、抜歯窩へ移植し、成長させることにも成功した。また、毛の再生にも応用可能であることから、本技術が次世代の再生医療の基盤技術として期待されている。本稿では、人工歯胚技術について概要を説明し、歯科領域における応用と課題点について述べる。

## はじめに

歯科の再生医療の歴史は長く、古くはニーマンらのGTR法の開発に始まり、最近ではエムドゲインや塩基性線維芽細胞増殖因子といった生理活性物質を用いて歯周組織を再建する治療技術まで開発されている。このように歯科領域では、早期より再生医療の臨床応用が開始され、これらの治

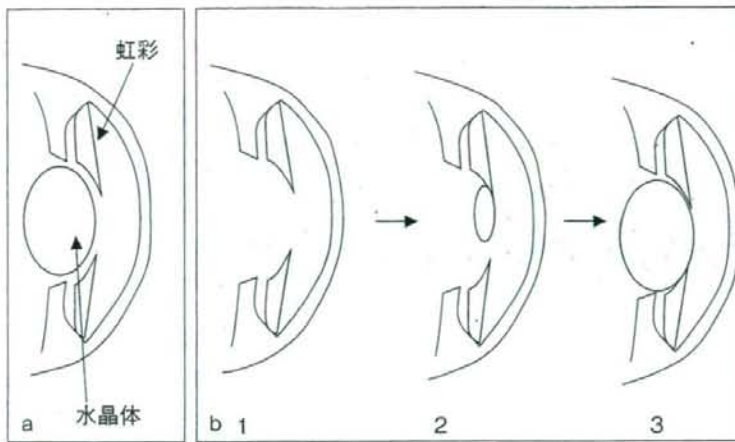
療技術は3壁性骨欠損を有する歯周病の治療において有効性が示されている。しかし、水平性骨欠損を伴う歯周病など広範囲に崩壊した歯周組織、あるいはう蝕により影響を受けた歯髄を、包括的に再生させる治療技術は開発されていない。その理由として、歯および歯周組織の再生機構が不明な点が最大の要因として挙げられる。

一般的に組織の再生と発生は同じ機構で制御されていると考えられている。たとえば、イモリは目の水晶体を取り除いても再生することが知られている。この現象は「Wolffian再生」と呼ばれ、虹彩のなかに存在する幹細胞が、失われた水晶体部分へ移動し、水晶体を構成する細胞へ分化して再生すると考えられている(図1)<sup>1)</sup>。つまり組織再生は、創傷治癒時に活性化された幹細胞が、発生過程を忠実に再現することにより達成されるといえる。したがって、組織再生を理解するためには、臓器固有の発生機構を解明することが重要になる。そこで、まず人工歯胚技術の説明を始める前に、歯の発生機構のあらましを述べる。

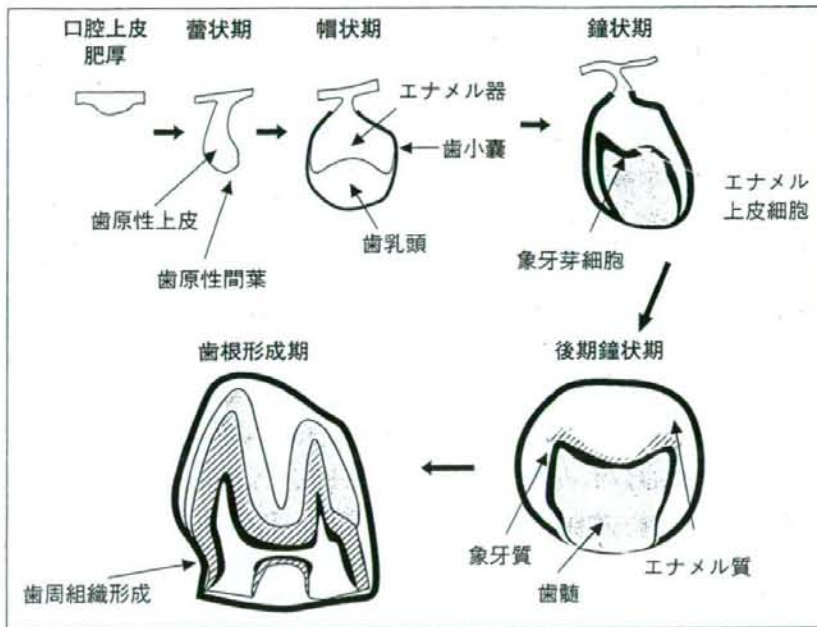
## 歯の発生の分子メカニズム

図2はマウス歯胚の発生過程を示している。歯の発生は、胎生期(胎生10日齢)に歯が形成され





図① a、b イモリの水晶体再生 (Wolffian 再生)。a : イモリの目の構造。b : 水晶体を取り除くと、虹彩から幹細胞が移動し、水晶体を再生する



図② 歯の発生過程。歯の発生は口腔上皮の肥厚に始まり、上皮・間葉系の相互作用により発生が進行する。その後、蕾状期、帽状期および鐘状期の過程を経て、歯を形成する

る部位で、口腔上皮が肥厚するところから始まる。次に、肥厚した上皮周辺に間葉系細胞が集積し、胎生12日齢になると蕾状期歯胚を形成する。この時期の歯胚は、歯原性上皮と歯原性間葉という2つの由来の異なる組織から構成される。これらの組織は歯管内で区画化して存在し、各々のなかに将来歯を形成する未熟な細胞が集合している。

胎生15日齢の帽状期歯胚になると、歯原性間葉の細胞は歯乳頭細胞と歯小囊、歯原性上皮の細胞はエナメル器を形成する細胞へと分化する。この

帽状期歯胚を構成する組織は、前駆体と呼ばれる細胞運命の決定した細胞集団から構成されている。歯乳頭中には象牙芽前駆体と歯髄前駆体が存在し、これらは後期鐘状期になると、象牙芽細胞および歯髄細胞へと分化する。エナメル器内の細胞はエナメル上皮細胞になり、同じく後期鐘状期でエナメル芽細胞へと分化する。そして、生後の歯根形成期歯胚になると、歯小囊は歯根膜細胞、セメント芽細胞および歯槽骨骨芽細胞へと分化して、歯周組織を形成する。このように歯胚発生は、未熟

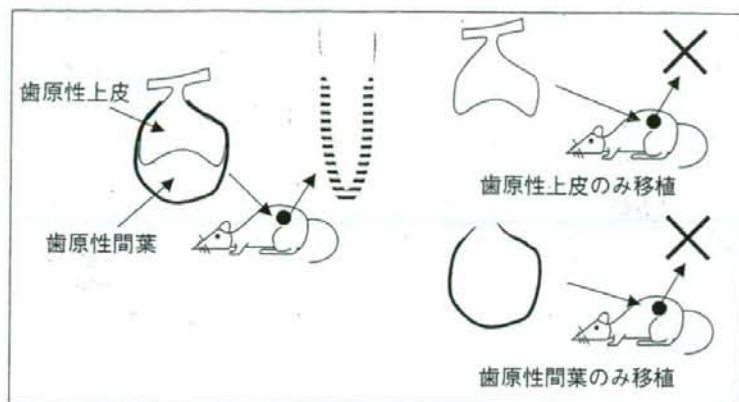


図6 歯胚の移植実験。マウス歯胚は腎皮膜下へ移植すると歯を形成するが、歯原性上皮と歯原性間葉に分けて各々移植しても、歯は形成されない

な細胞から前駆体細胞の過程を経て、歯を形成する機能細胞へ分化していく。

では、これらの過程はどのように制御されているだろうか。歯は上皮付属器官に属し、肺、腎臓、毛、乳腺といった臓器と同様に、上皮組織と間葉組織の相互作用により、発生過程が進行する。たとえば、胎生期のマウス歯胚をマウスの腎皮膜下へ移植すると歯を形成するが、歯胚より歯原性間葉を取り除き、歯原性上皮細胞だけ移植を行っても歯は形成されない。逆の組み合わせでも結果は同じである(図3)。

また、蓄状期の歯胚より分離した歯原性間葉組織を非歯原性(歯を形成しない組織)の上皮細胞と組み合わせても歯は形成され、逆の組み合わせでも同じ結果が起こる。最近の発生生物学の進歩により、これらの現象はシグナル分子と呼ばれる蛋白質が中心的な役割を担っていることが明らかにされた。シグナル分子はスイッチのような働きをしており、細胞表面上の受容体と結合すると、細胞質内の情報伝達機構を刺激して、細胞分化に必要な遺伝子群の発現を誘導する作用を有している。したがって、歯原性間葉の分泌するシグナル分子は、歯原性上皮中の未熟な細胞を刺激して前駆体へと導き、逆に歯原性上皮から分泌されるシグナル分子で歯原性間葉中の未熟な細胞が刺激され、前駆体細胞になる。

また、シグナル分子は前駆体細胞から機能細胞への分化にも関わる。このシグナル分子による上皮・間葉細胞の相互作用が正確に伝わらないと、正常な歯は形成されないことから、歯の発生はシグナル分子を介した上皮と間葉の相互作用により制御されていると考えられている<sup>2)</sup>。現在、多種類のシグナル分子が歯胚発生に関わることが報告されているものの、各シグナル分子の役割は不明な点が多く残されている。

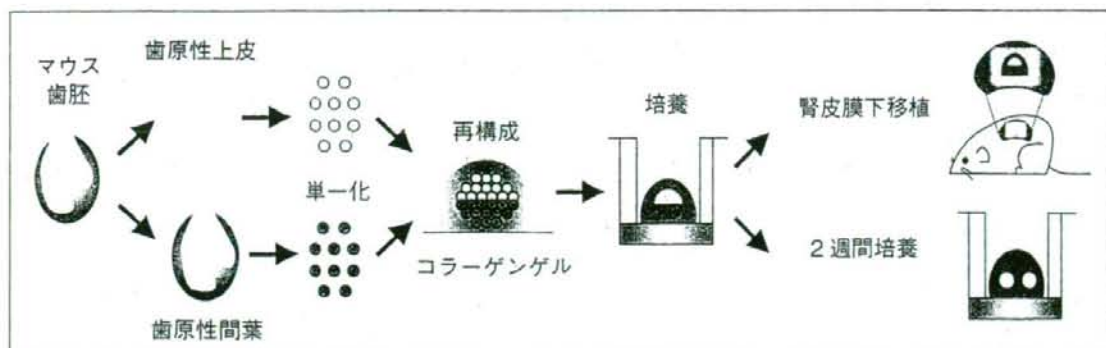


### 再構成法による歯の再生

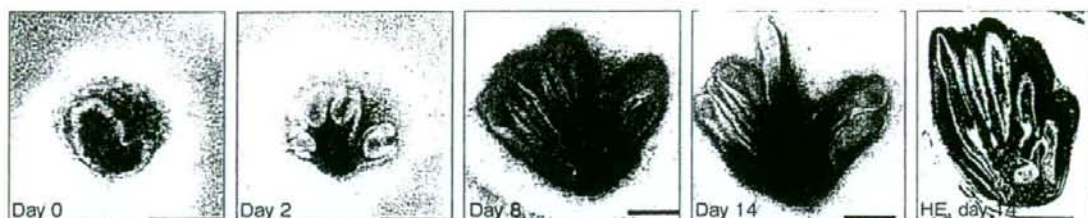
再構成法とは、上皮・間葉組織より酵素消化法を用いて単離した細胞を、遠心分離して再集合体を形成させ、器官原基を再構築させる方法のことである。これまで網膜および毛包が再構成法を用いて再構築できることが報告されている。そのメカニズムは、細胞を単一化することで細胞内の情報がリセットされ、発生初期の状態に戻ると考えられており、再度集合体を形成することによって発生過程が再現され、臓器再構築が導かれると考えられている<sup>3)</sup>。

この再構成法を用いた歯の再生は2002年に Forsyth 研究所の Yelick 博士(現 Tufts 大学)らにより報告され、以後数多くの研究グループにより歯の再生機構、ならびに組織工学技術の開発を目的とした研究に利用されてきた<sup>4)</sup>。その方法は、





a: 人工歯胚の製作方法



b: 培養操作による人工歯胚の成長過程



c: 腎皮膜下移植による歯の再生。歯周組織を含む歯の完全な再生が観察される (OD: 象牙芽細胞、PD: 象牙前質、D: 象牙質、E: エナメル質、AM: エナメル芽細胞、BV: 血管、P: 歯髄、B: 歯槽骨、PDL: 歯根膜)

図4 a~c 人工歯胚を用いた歯の再生

①歯胚を取り出し、歯原性上皮組織と歯原性間葉組織を分離し、②各々の組織を酵素処理により単一化し、③再集合体を形成する方法である。

前述のごとく歯の発生は、歯原性間葉と歯原性上皮組織による相互作用により制御されている。したがって、再構成法により上皮・間葉系の相互作用を再現させれば、正常な歯の発生を人為的に誘導できることは容易に予想できる。実際に、再構成法を用いて数多くのグループで歯の再生に成功していることから、この方法論が歯の再生機構の解明に有効であることは間違いない。しかし、同技術を用いて歯の再生を人為的に誘導できるも

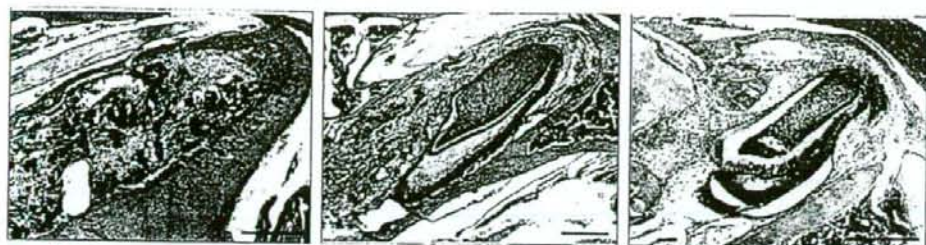
の、その成功率、生物学的メカニズムおよび再生した歯を顎骨内に戻せるか、などの問題点が残されていた。



### 人工歯胚作製技術の開発

上述の問題点を乗り越えるため、筆者らは再構成法を用いた歯の再生技術の改良を試みた<sup>5)</sup>。その方法を図4 aに示す。

まず、胎生14.5日齢の帽状期マウス切歯歯胚を取り出し、歯原性上皮と歯原性間葉に分離して単一化して得られた上皮・間葉細胞を、コラーゲンゲル内で高密度に区画化して再構築させ、3次元



a : 抜歯窩の組織像      b : 人工歯胚を移植した組織像      c : 腎皮膜下で形成した歯を移植した組織像

図6 a~c 人工歯胚の抜歯窩での成長。抜歯窩へ移植後14日経過した組織像

的に培養する方法である。この器官原基再構成法で作製した歯胚を人工歯胚と名づけ、歯の形成能力を解析した。図4 bに示すように、人工歯胚は日を追うごとに成長し、歯冠を形成することが観察された。そして人工歯胚をマウス腎皮膜下へ移植すると、歯根および歯周組織（歯根膜、セメント質、歯槽骨）を含む完全な歯を形成した（図4 c）。

この方法では100%の人工歯胚が完全な歯を形成し、従来の方法を上回る形成頻度で歯を形成させることが可能である。さらに人工歯胚、あるいは腎皮膜下で移植して形成した歯を成体マウスの抜歯窩に移植すると、着生して成長するばかりでなく、歯髄内に末梢神経および毛細血管の侵入が認められた（図5）。これらのことから、少なくとも成体の顎骨内で人工歯胚が成長することが証明された。現在、人工歯胚が萌出するところまで成長するかどうかの検討を進めている。

## 今後の展開

今回の研究成果より、実験室で人工歯胚を人為的に作製することは可能であり、成体の顎骨内へ移植して発生可能であることが判明した。また、同技術を用いて毛（頬髭）の再生にも成功していることから、冒頭に述べた臓器置換再生医療の基盤技術になるといえるであろう。このように再構成法による人工歯胚技術は、歯を失った人のみならず、

抜髄処置で歯髄を失った人にも夢を与えるものであるが、人への実用化には乗り越えなければならないいくつかの課題がある。

まず、今回使用したのは胎児由来の細胞なので、臨床応用することは倫理的に問題があるため、患者本人から入手可能な幹細胞を用いて治療ができる技術開発が必要である。また、長期的な歯の発生を解析し、歯根や歯周組織が完全に再生できることを明らかにすべきであろう。これらの研究開発を進めていくことにより、歯の再生医療の実現をもたらすことが期待される。

## 【参考文献】

- 1) Scot Gilbert: Developmental biology sixth edition. Sinauer Associate, Inc, 83-84, 2000.
- 2) Thesleff I: Epithelial-mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. Journal of Cell Science. 116: 1647-1648, 2003.
- 3) 山本 仁: 歯の再生（歯の発生生物学から歯の再生研究まで）。真興交易（株）医書出版部、東京、2006: 168-173.
- 4) Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC: Tissue Engineering of Complex Tooth Structures on Biodegradable Polymer Scaffolds. J Dent Res, 81(10): 695-700, 2002.
- 5) K. Nakao, R. Morita, Y. Saji, K. Ishida, Y. Tomita, M. Ogawa, M. Saito, Y. Tomooka, T. Tsuji: 2007 The development of a bioengineered organ germ method. Nature Method, 227-230, 2007.