



人工的に歯のエナメル質を形成することに成功

～次世代のむし歯の治療や歯の再生への応用が期待～

【概要】

国立大学法人東北大学は、歯の発生やかたちの制御に関わる分子の役割を解明する過程で、エナメル質の形成のマスター遺伝子の同定と機能解析に成功し、どのように歯のエナメルが作られ、また、歯のかたちを制御しているのかを明らかにしました。

本研究は東北大学歯学研究科歯科薬理学分野の中村卓史准教授、小児発達歯科学分野の福本敏教授らと、米国国立衛生研究所との共同研究による成果です。

私たちの歯の最外層はエナメル質という構造で守られており、体の中で最も硬い組織です。骨や軟骨などの硬組織と異なり、歯のエナメル質は皮膚の上皮細胞や毛や爪と同じ歯原性上皮細胞とよばれる上皮細胞によって形成されます。また、歯の生える場所に応じて変化する歯の歯冠や歯根のかたちは、この歯原性上皮細胞が制御しています。

本研究では、転写因子の 1 つであるエピプロフィン Maus の全身の上皮細胞に発現するような遺伝子操作したマウス (K5-Epfn マウス) を作製し解析しました。そのマウスの歯を解析してみると、野生型 (通常のマウス) ではエナメル質を形成しない場所にエナメル質を形成していることが明らかとなりました。また、K5-Epfn マウスの臼歯は、歯のかみ合わせの咬頭や歯根などの歯のかたちにも異常が認められました。この原因は、エピプロフィンが歯の発生過程において上皮間葉組織間で組織間で展開される相互作用に、増殖因子 FGF9 や SHH の発現を誘導することにより介入し、歯の象牙質形成に関与する歯原性間葉細胞の増殖を促進させる事であることが明らかとなりました。

本研究成果は、米国の科学雑誌「*Journal of Bone and Mineral Research*」電子版に掲載されました。

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業、基盤 B・挑戦的萌芽研究の支援を受けて行われました。

【背景】

歯はエナメル質^{注1}、象牙質、セメント質の 3 つの硬い組織から構成されます (図 1)。この中でエナメル質は、生体内で最も硬い組織であり、人が食生活を営む上で極めて重要な役割を持ちます。永久歯である 6 歳臼歯や前歯 (中切歯) の場合、まだお母さんのおなかの中にいる妊娠後期には、これらの歯の歯冠が既に作られており、1 歳になるまでの間に石灰化が進行していきます。つまり、妊娠後期から授乳中のお母さんのミネラルバランスは、赤ちゃんの永久歯の石灰化に非常に重要であることがわか

ります。その後、これらの歯は6年もの時間をかけて石灰化し、強度なアパタイト構造を完成させ萌出してきます。むし歯（齲蝕）は、このエナメル質が口腔内の細菌が産生する酸などで破壊されることにより進行していきます。エナメル質をつくる歯原性上皮細胞はエナメル芽細胞^{注1}とよばれ、歯が完成してしまうと消失してしまい、体の中には存在しない細胞となってしまいます。つまり、歯のエナメル質は一旦破壊されてしまうと再生させることは不可能であり、金属やレジンなどの人工物による修復しかできません。そこで、物理的にも化学的にもすばらしい強度があるエナメル質をつくるエナメル芽細胞の培養や、その分化制御法の開発が望まれておりました。

また、歯は歯胚と呼ばれる小さな原基から形成されますが、この歯胚は歯原性上皮細胞と、神経堤由来の間葉細胞である歯原性間葉細胞との相互作用（上皮-間葉相互作用^{注2}）により、エナメル質をつくる細胞や象牙質をつくる細胞の分化をコントロールし、また同時に歯のかたち作りを制御していることが知られております。そこで、我々は、歯の発生メカニズムを解明する過程で、この歯原性上皮細胞に発現しているエピプロフィン^{注3}が、エナメル質形成や歯の形態形成にどのような役割があるかを解明する目的に研究を開始しました。

【研究成果】

全身の上皮細胞にはケラチン5という分子が発現しています。このケラチン5が発現している上皮細胞に、我々が同定し転写因子^{注4}エピプロフィン（Epiprofin, Epfn）を強制的に発現させるよう遺伝子操作したマウス（K5-Epfn マウス）を作製しました（図2）。野生型と K5-Epfn マウスでのエピプロフィンの発現細胞とエナメル質形成が認められる領域通常わん曲して伸びる野生型マウスの切歯（前歯）と比較し、直線的に、そしてらせん状に伸びてきます（図3）。野生型マウスの切歯では、唇側だけがエナメル質でカバーされています。硬い組織が白い像で確認できるエックス線解析の結果、野生型マウスの切歯の唇側に厚いエナメル質（図3*印）が確認できます（図3）。K5-Epfn マウスの切歯は、直線状に形成され、また、唇側だけでなく舌側にも白いエナメル質が形成しているのが分かります（図3 矢頭）。さらに、野生型マウスの臼歯（奥歯）と比較し、K5-Epfn マウスの臼歯のかみ合わせの咬頭のかたちや歯根（歯の根っこ）の異常も認めます。臼歯の数も野生型マウスでは3本形成されているのに対し、K5-Epfn マウスでは上下それぞれ2本ずつしか形成されていません（図3）。

組織学的に確認してみると、唇側の上皮では、野生型も K5-Epfn マウスも象牙質形成を担う象牙芽細胞（ob）の層直下にエナメル質形成を担うエナメル芽細胞（ab）の層が存在します（図3）。エナメル芽細胞は、赤く染色されるエナメル基質^{注1}を分泌しています。一方、舌側の上皮を観察してみると、野生型ではエナメル質の形成を行わない歯原性上皮細胞（ode）が観察されます（図4）。この ode は歯原性上皮細胞ではありますが、エピプロフィンは通常発現していません。しかし、K5-Epfn マウスではこの ode 細胞にもエピプロフィンを強制的に発現させています。この結果、K5-Epfn マウスの舌側側の ode 細胞がエナメル芽細胞（ab）に異所性に分化し、エナメル基質タンパク質を分泌しています（図3）。このことにより、K5-Epfn マウスでは唇側、舌側の両側にエピプロフィンを発現させることにより、異所性にエナメル質を形成していることが明らかとなりました（図4）。

臼歯のかたちを観察してみると、野生型の臼歯咬頭は前方方向に傾斜していること

が観察される（図 5）が、K5-Epfn マウスでは前後軸形成が障害を受け、まっすぐ上方へ咬頭が形成されているのが認められる（図 5）。歯の副径を計測してみると、頬舌径はほとんど差がないが、K5-Epfn 臼歯では有意に前後径が減少していることが明らかとなりました（図 5）。

本研究とこれまでの研究成果をまとめたものを図 6 に示します。エピプロフィンは、歯の発生過程の上皮に継続して発現しています。歯胚の発生の初期と後期にエピプロフィンは、それぞれ異なった機能を発揮していることが明らかとなりました。歯の発生初期においてエピプロフィンは、歯原性上皮細胞に発現し、Shh や FGF9 の発現誘導を行うことにより、未分化な歯原性間葉細胞（Nestin 陽性細胞）の増殖を促進させ、歯胚の成長に重要な役割を演じていることが分かりました。また、発生後期では歯原性上皮に発現しているエピプロフィンは、Shh の発現を誘導し、歯冠や歯根の形態形成を制御していることが明らかとなりました。また、エピプロフィンは歯原性上皮細胞をエナメル芽細胞に分化誘導し、エナメル基質であるアメロブラスチン（Ambn）発現を促進させ、エナメル質の形成を行っていることが解明されました。また、エピプロフィンは発生後期には上皮が発現する BMP4 によって歯原性間葉細胞に発現誘導され、象牙質形成にも関与していることが示唆されました。

【今後の展開】

本研究において歯原性上皮細胞にエピプロフィンを強制発現させることにより、エナメル芽細胞を異所性に誘導し、エナメル質の形成に成功しました。しかしながら、皮膚や毛根などの上皮細胞は、エナメル芽細胞には分化せず、エナメル質の形成も認められませんでした。皮膚や毛根などの上皮細胞にもエピプロフィンは発現していることを我々は報告していますが、その役割は異なっております。つまり皮膚や毛根の上皮細胞は、独自の方法で歯原性上皮細胞に分化しない制御があるものと考えられます。皮膚や毛根の上皮細胞と歯原性上皮細胞の違いを明らかにすることは、人工的にエナメル芽細胞を作製するための重要なポイントとなると考えられます。将来歯の再生を考えた場合、本研究をさらに発展させ、皮膚から得られた上皮細胞を歯原性上皮細胞に人工的に誘導し、その細胞にエピプロフィンを発現させることで、齲蝕などで失ったエナメル質の再生や歯冠や歯根のかたちまでも制御できる技術開発に応用する研究を行っていきたいと考えております。

【用語説明】

注 1 エナメル質、エナメル芽細胞、エナメル基質：

外胚葉由来である未熟な歯原性上皮細胞の一部がエナメル芽細胞へと分化し、エナメル基質を分泌する。エナメル基質が分解後石灰化を経てエナメル質となる。エナメル基質は、エナメル質の形成に関わる細胞外基質（マトリックス）の総称である。代表的な分子として、アメロジェニン、アメロブラスチン、エナメルリンなどがある。

注 2 上皮－間葉相互作用：

多くの器官は、上皮細胞と間葉細胞との相互作用により形成される。この相互作用は、おもに相互の細胞から分泌される細胞増殖因子や基質によりおこなわれ、器官の概形や大きさの決定重要であると考えられている。歯以外にも唾液腺、毛、乳腺、

爪などが上皮-間葉相互作用により形成され、また類似の発生は肺や腎臓でも認められる。

注3 エピプロフィン (Epiprofin, Epfn) :

基本転写因子である SP/KLF ファミリーに属する。カルボキシル基側に 3 つ zinc-finger モチーフが存在し、ゲノム DNA との結合に関係していると考えられている。アミノ基側は、他のタンパク質と相互作用するモチーフが存在していることが予想されている。SP/KLF ファミリーには、ユビキタスに発現する転写因子と組織特異的に発現する転写因子に体分される。Osterix/Sp7 も このファミリーに属し、骨芽細胞分化に必須のマスター遺伝子として同定されている。また、iPS 細胞の作成に関わる 4 つの中山ファクターの一つの KLF4 も同じファミリーとなる。Epfn は歯の cDNA マイクロアレーを用いて発生歯胚に強く発現している分子として同定された (Nakamura et al. 2004 JBC)。Epfn 遺伝子欠損マウスでは、過剰歯形成、エナメル欠損、毛根 形成阻害、上皮肥厚などの表現型を呈する。特に歯の発生過程ではエナメル質形成に必要なエナメル芽細胞に強く発現し Epfn 遺伝子欠損マウスでは、エナメル芽細胞分化が完全に阻害されるため、エナメル芽細胞のマスター遺伝子と考えられている (Nakamura et al. 2008 JBC, Nakamura et al. 2014 JCS)。

注4 転写因子 :

転写因子は遺伝子のプロモーター領域に結合し、遺伝子の転写に必要なタンパク質である。生 体現象に必要なタンパク質はゲノム DNA 上に書き込まれた遺伝情報を読み取り転写されメッセンジャーRNA が作られる。メッセンジャーRNA を翻訳することによりタンパク質が合成されていく。タンパク質に翻訳されるべきコードが書かれているゲノム DNA 上の特定領域を遺伝子とよび、その遺伝子の読み取り開始点が記された領域はプロモーターと呼ばれている。転写因子自身もタンパク質であるが、遺伝子のプロモーター領域に結合して、特定の遺伝子のメッセンジャーRNA の転写を制御する働きがある。

【論文題目】

Epiprofin regulates enamel formation and tooth morphogenesis by controlling epithelial-mesenchymal interactions during tooth development.

「歯の発生過程においてエピプロフィンは、歯原性上皮-間葉相互作用を調節することにより、エナメル形成と歯の形態形成を制御している」

Nakamura T*, Jimenez-Rojas L, Koyama E, Pacifici M, de Vega S, Iwamoto M, Fukumoto S, Unda F, Yamada Y. (*Corresponding author)

Journal of Bone and Mineral Research, doi: 10.1002/jbmr.3024.

【問い合わせ先】

東北大学大学院歯学研究科歯科薬理学分野

担当：准教授 中村 卓史 (なかむら たかし)

電話：022-717-8311、022-717-8312

E-mail : taka@dent.tohoku.ac.jp

【図および説明】

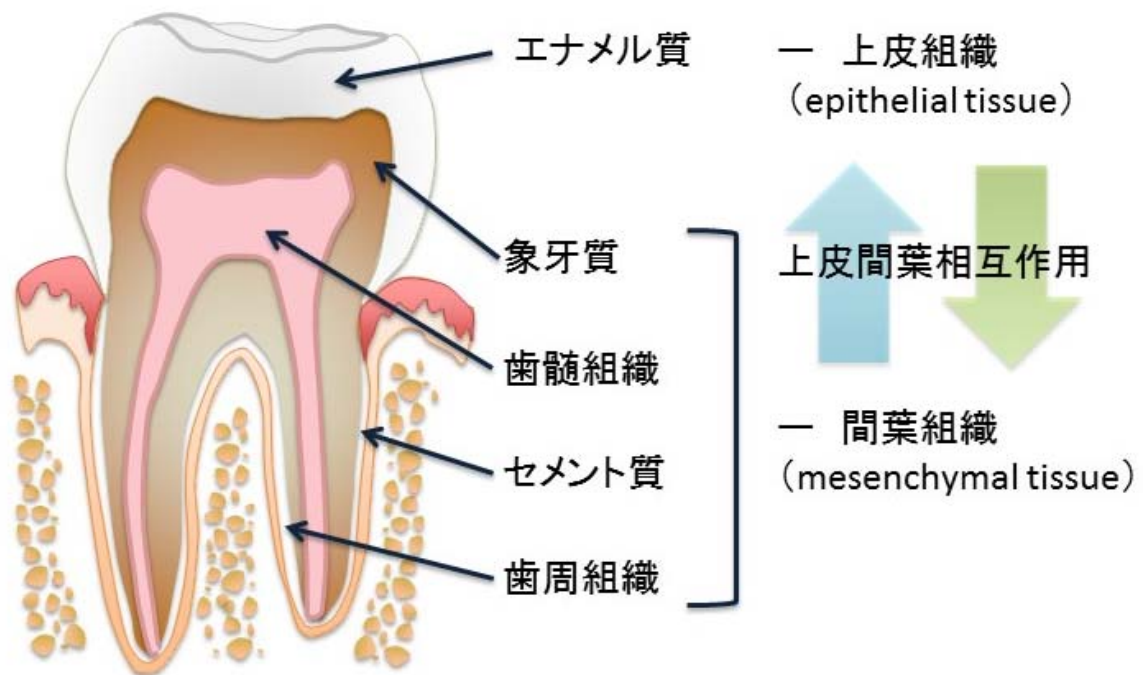


図1 歯の構造

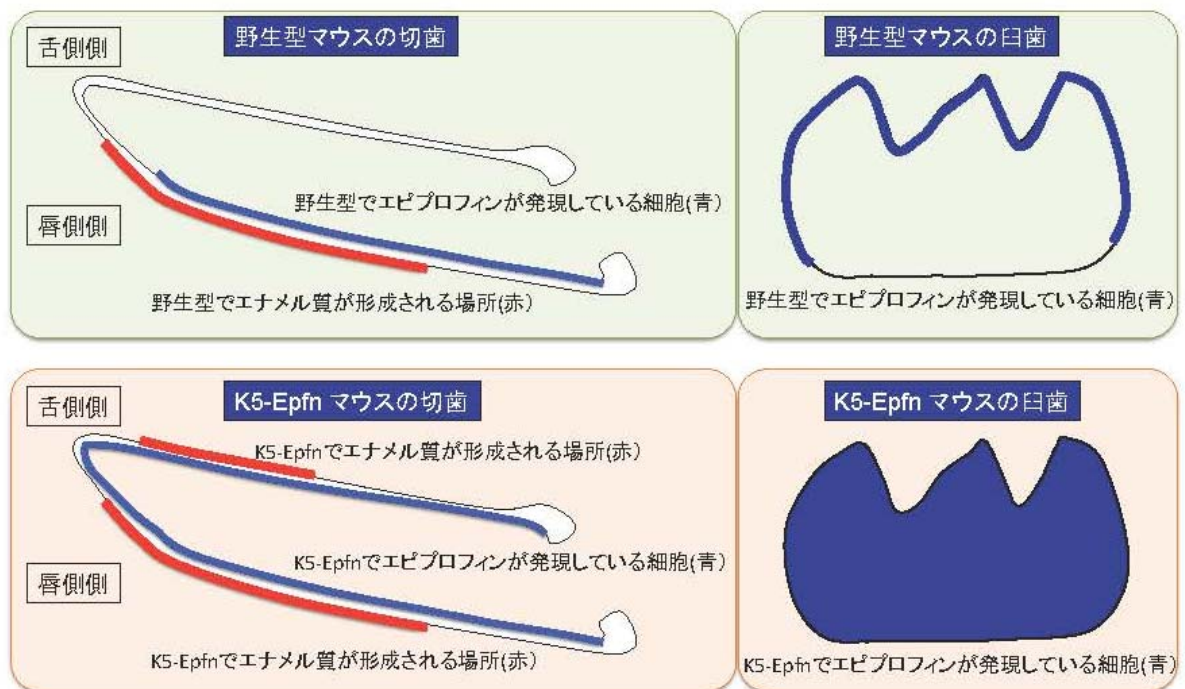


図2 野生型と K5-Epfn マウスの切歯・臼歯でのエピプロフィン発現とエナメル質形成領域

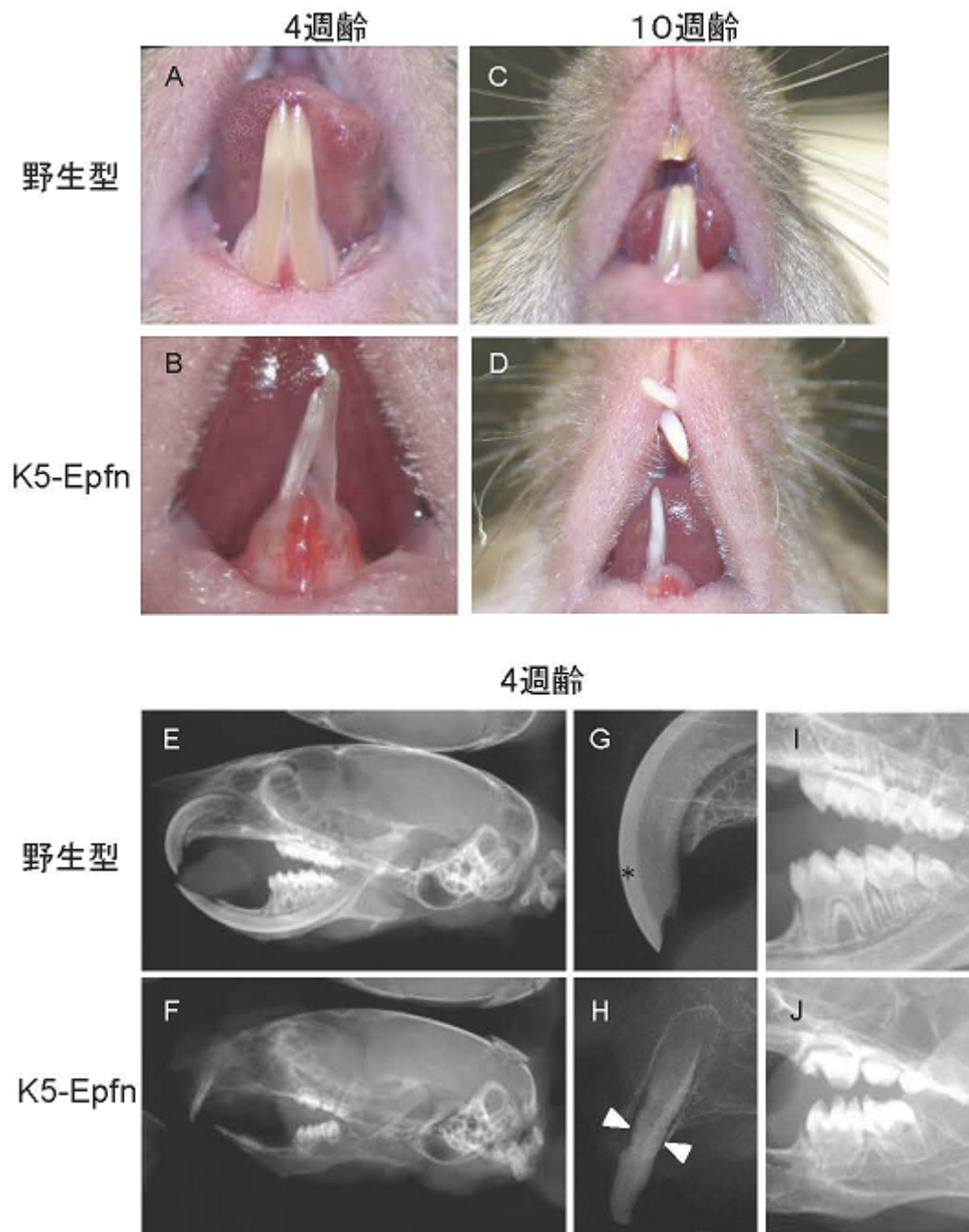


図3 野生型と K5-Epfn マウスの歯とエックス線像

4 週齢と 10 週齢マウスの野生型 (A と C) と K5-Epfn マウス (B と D) の歯。K5-Epfn マウスの切歯がらせん状に形成されている。エックス線像で緩いわん曲を描いて野生型の切歯が形成されている (E) のに対し、K5-Epfn では直線状に形成されている (F)。野生型切歯部の拡大像では、わん曲した外側 (唇側) にのみ白いエナメル質の形成が認められる (G、*)。一方、K5-Epfn の切歯では、直線上の切歯の唇側だけでなく、内側の舌側にもエナメル質の形成が認められる (H、矢頭)。また、通常上下 3 本ずつ臼歯が形成される (I) が、K5-Epfn の下顎では 2 本しか形成されておらず、歯冠や歯根の形態形成に異常を認める (J)。

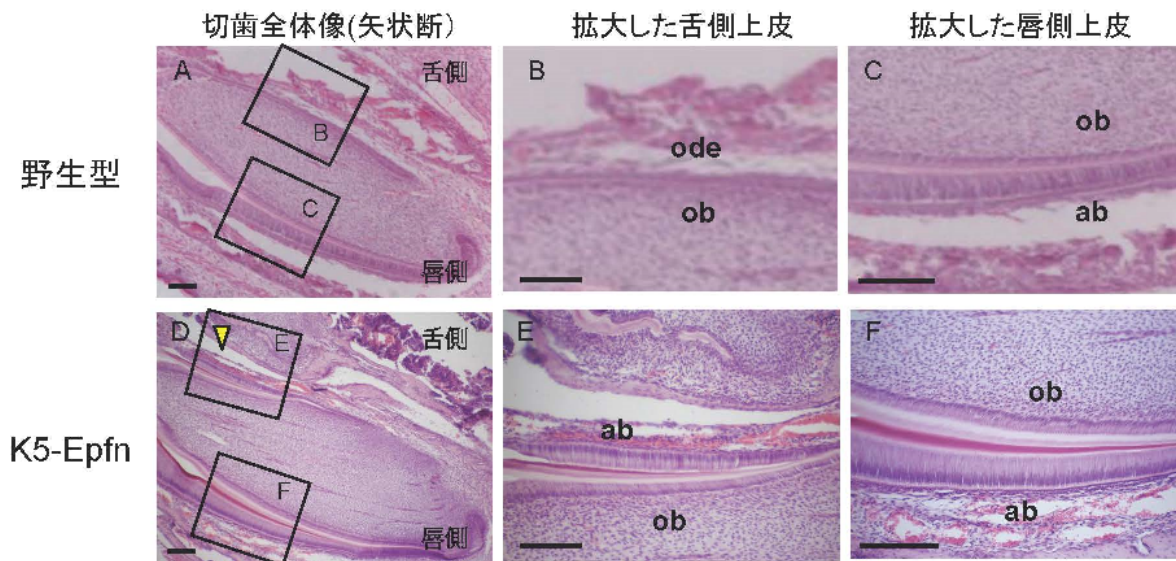


図4 野生型と K5-Epfn マウスの切歯組織像 (HE 染色)

野生型 (A, B, C) と K5-Epfn マウス (D, E, F) の切歯矢状断組織像。野生型、K5-Epfn マウスの切歯の唇型上皮は、象牙芽細胞 (ob) に直下の歯原性上皮が共にエナメル芽細胞 (ab) に分化し、エナメル質が形成されているのが観察できる (A, B, D, F)。野生型の舌側上皮は、通常エピプロフィンが発現していないため、エナメル芽細胞には分化せず、エナメル質を形成できない上皮 (ode) となる (A, B)。しかしながら、K5-Epfn マウスの舌側上皮には、エピプロフィンが発現しているため、エナメル芽細胞 (ab) へと分化し、エナメルを形成しているのが認められる。(D, E) bar: 100 um

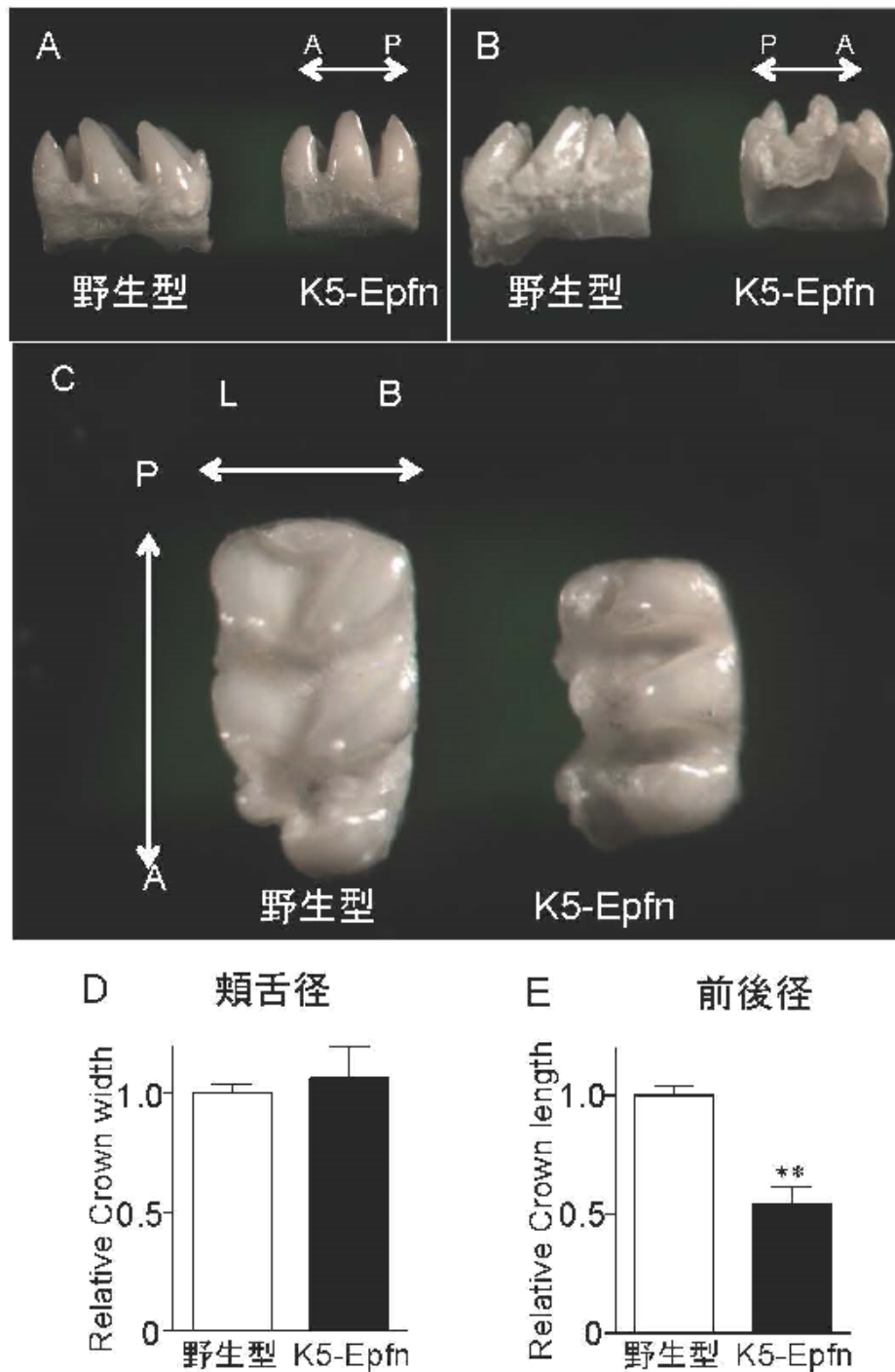


図5 野生型と K5-Epfn マウスの臼歯像

野生型と K5-Epfn マウスの臼歯の形態の比較、唇側面観 (A)、舌側面観 (B)、咬合面観 (C)。野生型の臼歯咬頭は前方方向に傾斜しているのが観察される (A, B) が、K5-Epfn マウスでは前後軸形成が阻害され、まっすぐ上方へ咬頭が形成されているのが認められる (A, B)。歯の幅径を計測してみると、頬舌径はほとんど差がないが、K5-Epfn 臼歯では、前後径が有意に減少していた (D, E)。** $P < 0.01$

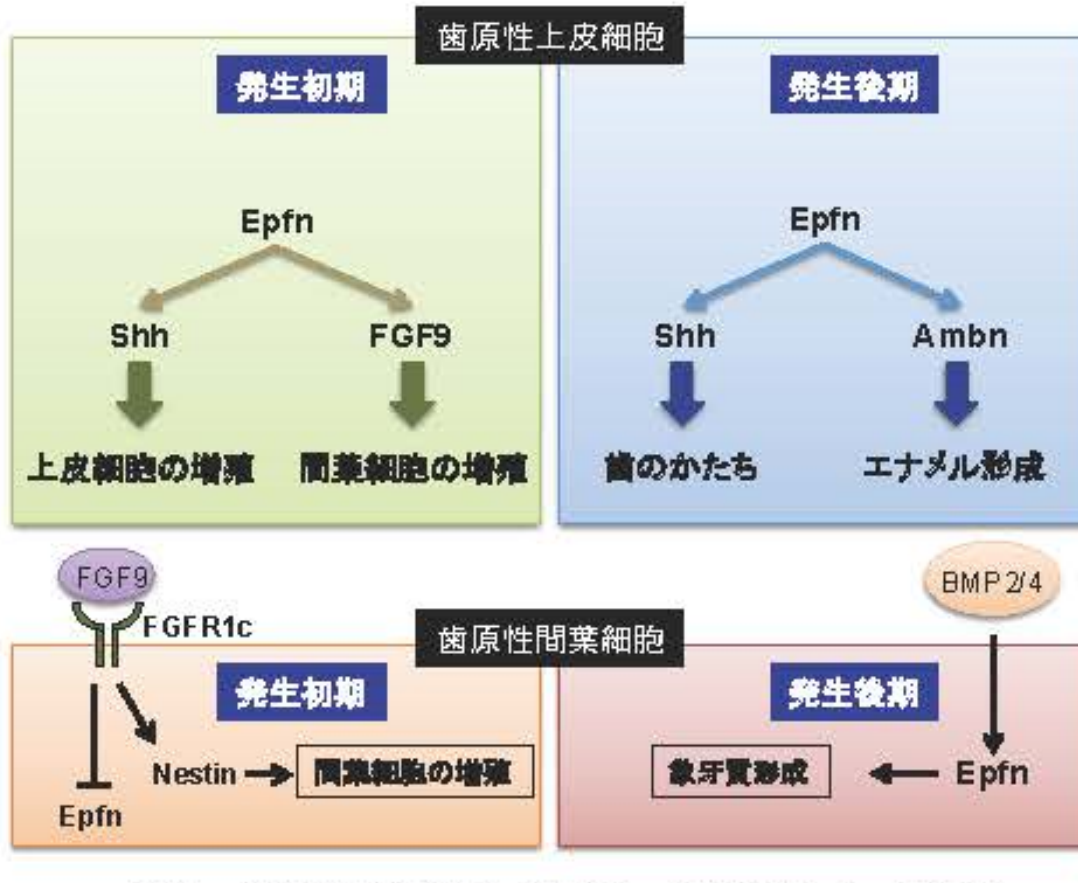


図6 歯の発生過程におけるエピプロフィンの役割

本研究とこれまでの研究成果をまとめると、エピプロフィンは、歯の発生過程の初期と後期に異なった機能を発揮していることが明らかとなりました。歯の発生初期においてエピプロフィンは、歯原性上皮細胞に発現し、Shh や FGF9 の発現誘導を行うことにより、未分化な歯原性間葉細胞（Nestin 陽性細胞）の増殖を促進させ、歯胚の成長に重要な役割を演じていることが分かりました。

また、発生後期では歯原性上皮に発現しているエピプロフィンは、Shh の発現を誘導し、歯冠や歯根の形態形成を制御していることが明らかとなりました。また、エピプロフィンは歯原性上皮細胞をエナメル芽細胞に分化誘導し、エナメル基質タンパク質であるアメロブラスチン（Ambn）発現を促進させ、エナメル質の形成を行っていることが解明されました。さらに、エピプロフィンは発生後期には歯原性間葉細胞に BMP4 によって発現誘導され、象牙質形成にも関与していることが示唆されました。