

### III. 研究成果に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
齋藤正寛	歯小嚢細胞の発生機構	本田正規	歯の再生, 歯の発生生物学から歯の再生研究まで	真興貿易(株) 医書出版部	東京	2006	P75-82
齋藤正寛	セメント質の発生・再生機構	本田正規	歯の再生, 歯の発生生物学から歯の再生研究まで	真興貿易(株) 医書出版部	東京	2006	P200-208
村上伸也	歯周組織	本田正規	歯の再生, 歯の発生生物学から歯の再生研究まで	真興貿易(株) 医書出版部	東京	2006	127-136
村上伸也	ティッシュエンジニアリング	吉江弘正 伊藤公一 村上伸也 申基詰	臨床歯周病学	医歯薬出版	東京	2007	242-249

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saito M., Y. Tomooka, T. Tsuji	The development of a bioengineered organ germ method.	Nature Method	4(3)	227-230	2007
Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M., Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T, Thesleff I.	Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis.	Differentiation			in press
Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, Tsubakimoto T, Harada H, Eto K, Noguchi T, Teranaka T	Establishment of Immortalized Dental Follicle Cells for Generating Periodontal Ligament <i>In Vivo</i> .	Cell and Tissue Research	327(2)	301-311	2006

Nishida E, Saito M, Yokoi T, Tsubakimoto T, Kosaka K, Aino M, Teranaka T	Establishment of gene expression profiling database from human periodontal ligament.	The Bulletin of Kanagawa Dental College	34(2)	109-111	2006
Kosaka K, Yokoi T, Saito M, Nishida E, Tsubakimoto T, Aino M, Teranaka T	Establishment of dental follicle cells culture system that generating periodontal ligament in vivo.	The Bulletin of Kanagawa Dental College	34(2)	112-114	2006
Yamada S, Ozawa Y, Tomoeda M, Matoba R., Matsubara K., Murakami S.	Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells.	J Dent Res	85(5)	447-451	2006
Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A	Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells	Mol. Biol. Cell,			in press.
Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A.	Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells.	Exp Cell Res.			in press.
Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A.	Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts.	J. Cell Biochem.			in press.
Umezawa A, Toyoda M.	MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells.	Inflammation and Regeneration	27(1)	28-36.	2007
Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ.	A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells.	Stem Cells.	24-10	Aug-70	2006
Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, Umezawa A	Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL) cells and colony-forming units in spleen (CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification.	J. Cellular Physiology	208	188-194.	2006
Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K.	Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells.	Endocrinology	147-9	4104-11.	2006
Hashimoto N, Kiyono T, Wada M R, Shimizu S, Yasumoto S, Inagawa M	Immortalization of human myogenic progenitor cell clone retaining multipotentiality	Biochem Biophys Res Commun	348	1383-1388	2006

Yamashita Y, Tsurumi T, Mori N Kiyono T	Immortalization of Epstein-Barr virus-negative human B lymphocytes with minimal chromosomal instability	Pathol Int	56	659-667	2006
Ito Y, Hasauda H, Kitajima T Kiyono T	<i>Ex vivo</i> expansion of human cord blood hematopoietic progenitor cells using glutaraldehyde-fixed human bone marrow stromal cells	J. Biosci. Bioeng	102	467-469	2006
Zheng L, Iohara K, Ishikawa M, Into T, Takano-Yamamoto T, Matsushita K, Nakashima M.	Runx3 negatively regulates Osterix expression in dental pulp cells.	Biochem J.			in press.
Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M.	Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis.	Stem Cells.	24 -11	2493- 2503	2006
Sato T, Watanabe K, Masuhara M, Hada N, Hakeda Y	Production of IL-7 is increased in ovariectomized mice, but not RANKL mRNA expression by osteoblasts/stromal cells in bone, and IL-7 enhances generation of osteoclast precursors in vitro.	J. Bone. Miner. Metab.	25 卷	19-27	2007
村上伸也 島袋善夫 北村正博 山田 聡	歯周組織再生医療と DDS 技術に期待するもの	再生医療(日本再生医療学会雑誌)	6(1)	32-37	2007
温川恭至、清野 透	解明が進むヒトパピローマウイルスによる子宮頸癌の発症機構	実験医学	24	2958-29 64	2006
清野 透	子宮頸癌の発がん分子機構に関する overview	産科と婦人科	17	169-178	2006
斎藤真子、清野 透	HPV による発がん機構	細胞	38	522-526	2006

#### IV. 研究成果の刊行物・別冊

# 4

## 歯小囊細胞の発生機構

歯小囊細胞は歯胚外周に形成される間葉系組織で、歯周組織の発生起源になる。生後の歯根形成期における歯周組織発生過程で、歯小囊細胞中に存在する頭頸部神経堤細胞由来の前駆体細胞集団が、歯根膜細胞、セメント芽細胞および歯槽骨細胞へ分化して歯周組織を構成する。このように歯小囊細胞中には歯周組織形成能力を有する前駆体細胞集団が存在することから、古くから歯周組織発生・再生機構の解析に用いられてきた。最近では培養歯小囊細胞から前駆体細胞を分離することも可能になり、これらの細胞を用いて歯根膜細胞およびセメント芽細胞への分化誘導も可能になりつつある。

そこで本項では、歯小囊細胞の発生機構を中心に、同細胞の特性および歯周組織発生・再生機構について論じてみたい。

### 1. 歯周組織の発生

歯の詳細な発生過程に関しては、第1章を参照していただき、本項では胎生期の歯胚発生期から生後の歯根形成期における歯小囊発生過程を述べる。

歯小囊は、胎生期の歯胚発生において帽状期歯胚の外周に形成される(図1)。この時期の歯胚は歯原性間葉細胞と歯原性上皮細胞からなり、歯原性間葉細胞においては歯小囊細胞と歯乳頭細胞へと、2つの異なる細胞系列へ運命決定する時期でもある。帽状期から鐘状期へと胎生期歯胚発生過程が進行する過程で、歯乳頭細胞は象牙芽細胞へ分化し、歯冠象牙質形成が開始され、歯胚の形態はダイナミックに変化する(詳しくは第1章を参照されたい)。一

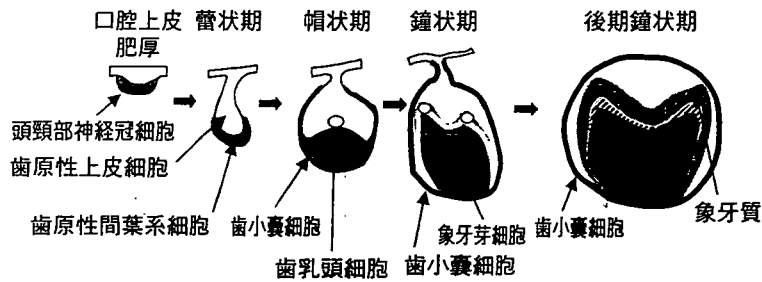


図1 歯小囊の発生

歯小囊細胞は頭部神経冠由来外葉性間葉系細胞に由来し、歯原性間葉系細胞の過程を経て、胎生15日における帽状期歯胚の周囲に形成される。図には胎生期の歯胚発生過程を示すが、この過程において歯小囊細胞に顕著な変化は見られない。

方、歯小囊細胞はこの時期では顕著な変化は見られない。しかし歯冠象牙質が完成し歯根象牙質形成が開始する時期に、歯小囊細胞の分化が始まる(図2)。その過程は、最初にヘルトヴィッヒ上皮鞘周辺の歯乳頭細胞が象牙芽細胞へ分化し、歯根象牙質を形成する。歯根象牙質が完成すると、ヘルトヴィッヒ上皮鞘は断裂しマラッセ上皮遺残を形成する。次に、その隙間を沿うように歯小囊細胞は歯根象牙質上へ遊走される。歯根象牙質上へ遊走された歯小囊細胞はセメント芽細胞へと分化し、歯根象牙質上にセメント質を形成し、そしてシャーピー線維が埋入される。セメント質形成が開始されると同時に、歯小囊細胞は歯根膜細胞へ分化し、腱/靭帯様構造を主体とする結合組織を形成する。

歯根膜細胞への分化が始まると、細胞は規則正しく整列するようになり、歯根に対して垂直方向に走行する弾性線維の形成が始まる。また歯小囊細胞は歯槽骨細胞へも分化し、固有歯槽骨側へもコラーゲン線維を埋入させる。そして最終的にセメント質、歯根膜、歯槽骨中で形成された線維が結合し、強靭な歯周組織が形成される。

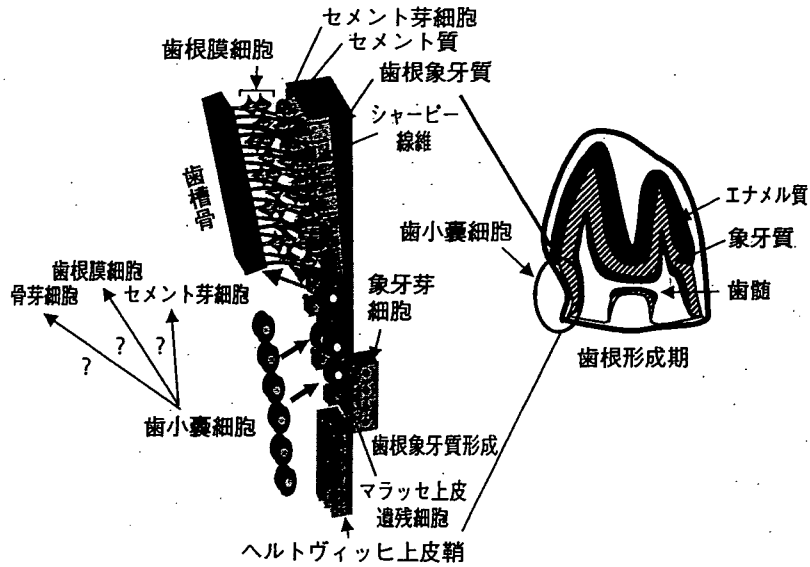


図 2 歯周組織の発生機構

歯小囊細胞は歯根象牙質へ遊走した後には歯槽骨細胞、歯根膜細胞、セメント芽細胞へ分化し歯周組織を形成する。このように歯小囊細胞は歯小囊前駆体細胞とも呼ばれているが、歯周組織構成細胞への分化制御機構は不明である。

## 2. 歯小囊発生に関わる機能分子群

上述のごとく歯根形成過程で歯小囊から3系列の前駆体細胞へ運命決定し、機能細胞へと分化する。歯小囊細胞からセメント芽細胞への分化機構は第4章を参照していただき、本項では歯根膜細胞への分化機構に焦点を絞って述べる。

歯根膜は歯根と歯槽骨の硬組織を介在する靭帯様結合組織であり、関節などで見られる腱/靭帯と解剖学的に構造が類似している。そのため腱/靭帯形成に関わる分子群が歯小囊発生に関わることも示唆されている。たとえば腱/



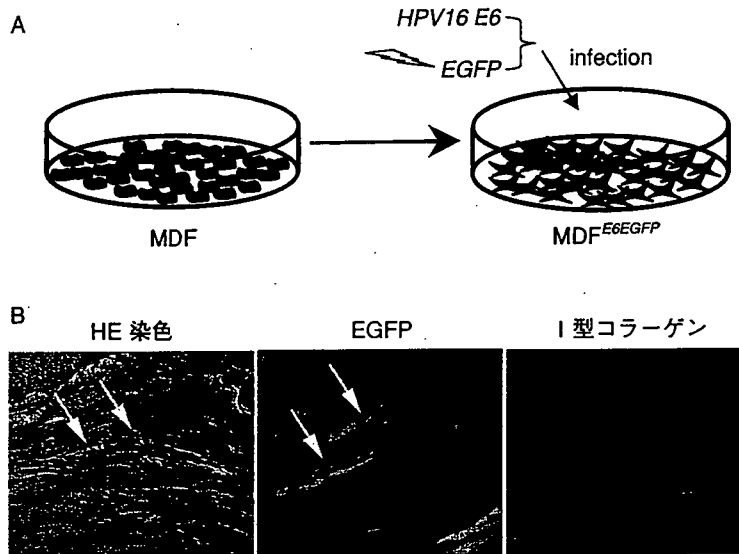


図3 マウス歯小囊細胞：MDF<sup>EGFP</sup>の採取方法

- A) マウス歯小囊細胞を分離培養し、HPV16 E6 を遺伝子導入して寿命延長を行い、その後 EGFP を遺伝子導入を行い蛍光観察を可能にした。
- B) MDF<sup>EGFP</sup> の特性：MDF<sup>EGFP</sup> は移植することにより歯根膜線維様構造物を形成する。
- HPV：ヒトパピローマウイルス

### 3. 歯小囊前駆体細胞について

前述のごとく、歯小囊細胞には歯周組織構成細胞の前駆体細胞すなわちセメント芽細胞前駆体、歯根膜細胞前駆体そして歯槽骨細胞前駆体が存在し、これらが最終分化して歯周組織を形成すると考えられている。ではどのような機構で歯小囊から各前駆体細胞へ同調するのだろうか？ おそらく歯小囊中に存在する歯原性間葉系細胞と類似した未分化な細胞集団から前駆体細胞が供給される仮説が有力と思われる。しかし、これまでの歯小囊細胞に関する

靭帯で高発現する細胞外マトリックス（基質）であるXII型コラーゲンは、歯根形成期において歯小囊細胞から歯根膜細胞への分化過程で発現が増強する<sup>1)</sup>。XII型コラーゲンは fibril associated collagen with interrupted triple helices (FACIT) に属するコラーゲンで、腱・靭帯および骨膜などの密な結合組織形成に関与する<sup>2)</sup>。他にも腱/靭帯前駆体細胞のマーカーである、Bmpファミリーに属する growth and differentiation factor 5 (GDF-5) と、bHLH型転写因子である scleraxis が歯小囊細胞と歯根膜細胞で発現することも報告されている<sup>3-6)</sup>。これらの発現パターン解析から推測すると、腱/靭帯形成と共通のシステムで歯小囊細胞から歯根膜細胞への分化が制御されている可能性が考えられる。

現在までに歯根膜特異的のマーカー分子は同定されていないが、非コラーゲン性細胞外基質である periostin が歯根膜形成に関わることが報告されている<sup>7)</sup>。Periostin は、歯胚発生過程において帽状期歯胚の歯小囊細胞で発現が始まり、歯根形成過程になると歯根膜細胞に局限して高発現する<sup>8)</sup>。Periostin 遺伝子欠損マウスの歯周組織を解析すると、生後9週以降で歯根膜細胞の崩壊が観察され、早期発症型歯周病と類似した症状を示すことが明らかにされた<sup>9)</sup>。この結果から periostin が不足すると歯根膜の恒常的機能に支障をきたし、歯根膜が咀嚼圧に耐えられなくなるため、早期に歯周病が発症することが示唆された。しかし periostin 遺伝子欠損マウスでは歯根膜形成に異常は観察されないことから、他の歯根膜特異的分子が歯根膜形成を補償している可能性が考えられた。

このように歯小囊細胞から歯根膜細胞への発生過程では、腱/靭帯形成に関わる分子群と、歯小囊に特異的に発現する細胞外基質因子が中心的な役割を果たしている可能性が考えられる。今後はこれらの分子群の機能解析が、歯周組織発生機構解明の重要課題になるであろう。

る解析は組織学的手法による解析によるもので、実際に前駆体細胞が存在するか否かは証明されていなかった。

そこで筆者らは歯小囊細胞の分離培養を試み、同細胞の分化能力を検証した。歯小囊細胞 (mouse dental follicle cells : MDP<sup>EGEGFP</sup>) はマウス歯胚より分離培養し、また安定した培養システムを確立するためヒトパピローマウイルス E6 を遺伝子導入して不死化した (図 3 A)。MDP<sup>EGEGFP</sup> の特性を調べたところ、骨芽細胞および線維芽細胞と比較して scleraxis, GDF-5 を高発現していることが確認された。次に、MDP<sup>EGEGFP</sup> の歯根膜細胞への分化能力を解析するために、免疫不全マウスへ移植実験を行うと、歯根膜組織で見られるような規則正しい I 型コラーゲン線維束の形成と periostin, XII 型コラーゲンを高発現する歯根膜様構造物を形成することが観察された (図 3 B)。これらの結果より、MDP<sup>EGEGFP</sup> 内には歯根膜形成能力を有する歯根膜前駆体細胞が存在することが明らかとなった<sup>9)</sup>。このような特徴は、マウスアキレス腱より採取した腱細胞株と類似していたため、MDP<sup>EGEGFP</sup> に存在する歯根膜前駆体細胞は腱/靭帯細胞と類似した特性を有している可能性が考えられた<sup>10)</sup>。

Seo らは成人歯根膜細胞よりセメント芽細胞、歯根膜細胞および脂肪細胞への分化能力を有する歯根膜幹細胞の同定に成功している<sup>11)</sup>。前述の結果と合わせて考えると、歯根膜前駆体細胞は成人歯根膜細胞でも維持されている可能性が高い。また、このような細胞が歯根膜の発生・再生あるいは恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。現在のところ免疫不全マウスを用いた移植実験で人為的に歯根膜前駆体細胞から歯根膜細胞へ分化誘導できることが確認されているが、どのような因子が分化を誘導するかは不明である。また、歯根膜前駆体細胞を見分けるためのマーカー分子も同定されていないため、同細胞を完全に単離する方法も確立できていない。

したがって、今後はマーカー分子を用いた歯根膜前駆体細胞分離技術と、同細胞の *in vitro* 分化誘導システムの開発が歯根膜発生・再生機構解明の鍵になるであろう。今後のマーカー分子と分化誘導シグナル分子の同定が待た

れるところである。

以上述べてきたように、歯小囊には歯周組織形成能力を有する前駆体細胞集団が存在する。この発生過程で、腱/靭帯形成因子および歯小囊に特異的な細胞外基質因子が歯根膜細胞への運命決定機構に関わる可能性が考えられた。

今後、非可逆性の炎症性崩壊を伴う重篤な歯周病の再生医療の開発のためには、歯小囊細胞を中心とする歯周組織発生機構の全貌を明らかにすることが必須になるであろう。

(齋藤 正寛)

#### 文 献

- 1) MacNeil RL, Berry JE, Strayhorn CL, et al : Expression of type I and xii collagen during development of the periodontal ligament in the mouse. Arch Oral Biol 43 : 779-787, 1998
- 2) Oh SP, Griffith CM, Hay ED, et al : Tissue-specific expression of type xii collagen during mouse embryonic development. Dev Dyn 196 : 37-46, 1993
- 3) Francis-West PH, Parish J, Lee K, et al : Bmp/Gdf-signalling interactions during synovial joint development. Cell Tissue Res 296 : 111-119, 1999
- 4) Sena K, Morotome Y, Baba O, et al : Gene expression of growth differentiation factors in the developing periodontium of rat molars. J Dent Res 82 : 166-171, 2003
- 5) Morotome Y, Goseki-Sone M, Ishikawa I, et al : Gene expression of growth and differentiation factors-5, -6, and -7 in developing bovine tooth at the root forming stage [erratum in Biochem Biophys Res Commun 246 : 925, 1998]. Biochem Biophys Res Commun 244 : 85-90, 1998
- 6) Yokoi T, Saito M, Kiyono T, et al : Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. Cell Tissue Res : 2006 (in press)

- 7) Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, et al : Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res* 14 : 1239-1249, 1999
- 8) Kruzynska-Freitag A, Wang J, Maeda M, et al : Periostin is expressed within the developing teeth at the sites of epithelial-mesenchymal interaction. *Dev Dyn* 229 : 857-868, 2004
- 9) Rios H, Koushik SV, Wang H, et al : Periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol* 25 : 11131-11144, 2005
- 10) Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, et al : Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 287 : 289-300, 2003
- 11) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364 : 149-155, 2004

# 8

## セメント質の発生・再生機構

セメント質は歯根象牙質外周に形成される硬組織で、歯根と歯根膜を繋ぎ合わせるための重要な石灰化組織である。またセメント質の再生は、歯周組織再生における結合組織性再付着を獲得するために必須の過程になる。したがって、セメント質の発生・再生機構の解明は歯周病再生医療の開発のため重要な研究項目とされている。これまでのセメント質発生研究は、セメント芽細胞が培養不可能であることと、セメント質のマーカー分子が同定されていないため、十分に理解されてこなかった。最近では歯小囊細胞の培養が可能になり、これらの細胞を用いてセメント芽細胞へ分化誘導できるようになった。

そこで、本項では歯小囊細胞を中心としたセメント質発生機構を述べ、そしてセメント質再生の可能性について論じる。

### 1. セメント質の発生機構

第2章で述べたようにセメント質の発生起源は歯小囊細胞であり、歯根象牙質完成後に歯小囊細胞が歯根象牙質上に遊走、そして接着してからセメント芽細胞へ分化する。現在、セメント質の特異マーカー遺伝子は同定されていないが、この過程においてセメント芽細胞に分化すると骨シアロ蛋白 (bone sialoprotein : BSP)、オステオカルシン (osteocalcin) とオステオポンチン (osteopontin) などの骨基質蛋白を発現することが報告されている<sup>1)</sup>。これらの骨基質蛋白は、石灰化物の形成以外にセメント芽細胞を歯根面への

遊走および接着を制御していると考えられている。たとえば BSP および骨  
 ステオポンチンはハイドロキシアパタイトへの結合能力を有し、なお細胞  
 インテグリンを介して細胞接着および遊走活性を有している<sup>2)</sup>。おそらくセ  
 メント芽細胞はオートクライン的に BSP およびオステオポンチンを分泌し、  
 歯根面上に強固に接着し、セメント質マトリックス (基質) 成分を歯根表面に  
 沈着することが考えられる。このようにセメント芽細胞は骨芽細胞と類似し  
 た表現型を示し、また骨基質蛋白はセメント質形成においても重要な役割を  
 果たす。

では、セメント芽細胞と骨芽細胞は同じ機構で細胞分化が制御されてい  
 るのであろうか? 第2章で述べたように、骨芽細胞と異なりセメント芽細胞  
 の発生には歯小囊細胞とマラッセ残存上皮細胞による上皮-間葉系細胞の相  
 互作用が関わる。そしてこの時期に発現するエナメル上皮由来の特異的分  
 泌蛋白質 (エナメル蛋白) がセメント芽細胞分化を制御することが古くから  
 示唆されてきた<sup>3)</sup>。実際にエナメル蛋白の主成分であるアメロブラスチン  
 (ameloblastin) およびアメロジェニン (amelogenin) がヘルトヴィン酸  
 鞘で発現しており、またアメロジェニンを含むエナメル蛋白の粗精製画分を  
 歯小囊細胞で作用させると、オステオカルシンを発現するセメント芽細胞  
 分化誘導可能であることが報告された<sup>4-6)</sup>。

これらの報告より、アメロジェニンを中心とするエナメル蛋白がセメント  
 芽細胞分化能力を有することが示唆されてきた。しかし最近のアメロブ  
 ラスチンおよびアメロジェニンの遺伝子欠損マウスの解析結果より、これらの  
 マウスではエナメル質形成不全症が引き起こされるが、セメント質形成には影  
 響がないことが報告された<sup>7,8)</sup>。これらの報告より、おそらくアメロブ  
 ラスチンおよびアメロジェニンの働きを補償してしまう他のエナメル蛋白が存在  
 し、これらがセメント質形成を制御する可能性が考えられた。

このようにセメント質発生機構は不明な点が多く残されているが、おそら  
 くセメント芽細胞分化を制御する特殊な細胞外環境因子が存在する可能性が

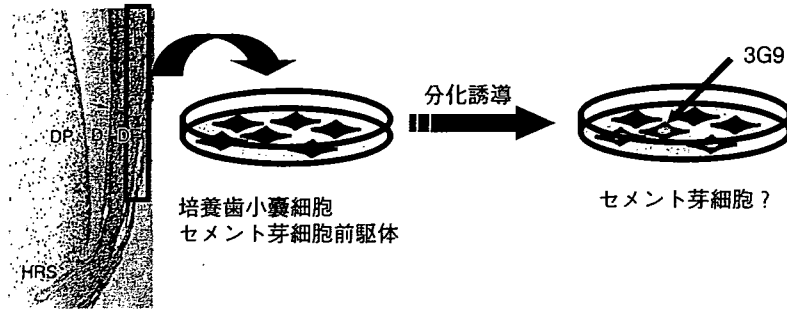


図1 抗セメント質抗体とセメント質形成機構の解析

抗CAP抗体(3G9)はウシセメント質およびセメント芽細胞を特異的に染色する(矢印)。そこで歯小囊細胞が3G9陽性のセメント芽細胞への分化能力を有するかを検証した。CAP:セメント質由来細胞接着因子, DP:歯乳頭細胞, DF:歯小囊細胞, HRS:ヘルトヴィッヒ上皮鞘。

考えられる。

## 2. セメント質由来接着因子

上述のごとく、セメント質と骨は構造が類似していることから、その判別は困難を極めている。筆者らはこの難題にアプローチするため、セメント質よりマーカー分子の精製を試みた。ウシセメント質脱灰抽出画分よりセメント質に特異的に存在する細胞外基質因子をカラムクロマトグラフィにて精製を進めたところ、セメント質由来細胞接着因子(cementum derived attachment protein: CAP)が候補分子として精製された<sup>9)</sup>。

CAPは線維芽細胞に対して細胞接着活性を示し、そして $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介してMAP kinase経路を活性化する特徴を有していた<sup>10)</sup>。このような特徴を有するCAPがセメント質に特異的に存在するかを調べるために、抗CAPモノクローナル抗体(3G9)を作製し、免疫組織学的にCAPの特異性を解析した。セメント質形成期の歯胚を用いて免疫染色を行った結果、3G9は



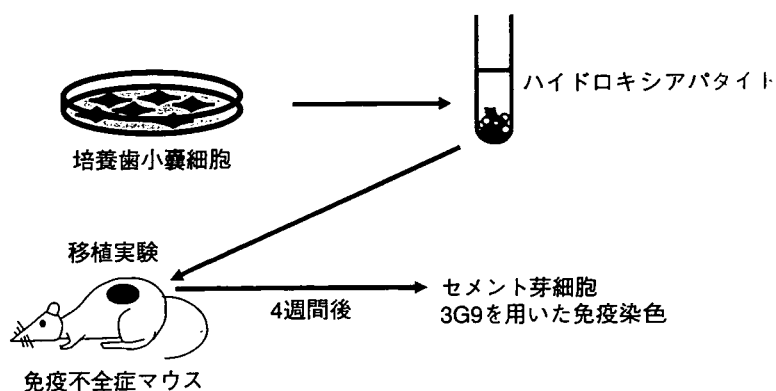


図2 生体内分化誘導法を用いたセメント質形成解析システム  
培養歯小囊細胞をハイドロキシアパタイトと混ぜ、免疫不全症マウスへ皮下移植する。4週間後に移植片を摘出し、セメント芽細胞分化を3G9を用いた免疫染色で解析した。

セメント質を特異的に認識することが観察され、CAPがセメント質特有の細胞外基質因子であることが確認された<sup>11)</sup>。興味深いことに、3G9はセメント芽細胞にも特異的に反応するため、同抗体がセメント芽細胞のマーカーとして使用できることも確認された(図1)。

### 3. セメント芽細胞前駆体の採取

上述のごとく3G9がセメント芽細胞のマーカーとして使用できることから、もし歯小囊細胞中にセメント芽細胞前駆体が存在すれば、分化誘導により3G9陽性のセメント芽細胞に分化する仮説を立てた(図1)。この仮説を立証するために、図1に示すように歯根形成期の歯胚より歯小囊細胞を分離培養した。そして図2に示すように、同細胞をハイドロキシアパタイトと混ぜて培養した後に免疫不全マウスへ移植し、セメント芽細胞への分化能力を検討した。結果は、歯小囊細胞移植片内で3G9陽性のセメント芽細胞に分化し

ることから、同細胞中にセメント芽細胞前駆体が存在することが判明した<sup>12)</sup>。そこで歯小囊細胞を不死化させ、セメント芽細胞を分離することを試みた。

初代培養した細胞集団より特定の細胞を分離するのに、細胞不死化は最も有効な手段である。細胞不死化の分子機構に関しては、清野らがヒト細胞の寿命延長に  $p16^{ink4a}$ -網膜線維芽腫蛋白質 (retinoblastoma protein: Rb) 経路の不活化とテロメラーゼの活性化が必要になることを報告している<sup>13)</sup>。これまで  $p16^{ink4a}$ -Rb 経路の不活化には SV-40T 抗原あるいはヒトパピローマウイルス (human papilloma virus) E6E7 などのウイルス由来のがん遺伝子を使用されてきた。しかしこれらは、細胞の寿命延長には効果的だが、細胞分化にも影響を与えることも少なくはない。そこでより特異的に  $p16^{ink4a}$ -Rb 経路を不活化するため、 $p16^{ink4a}$  の転写抑制因子である Bmi-1 と、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素サブユニット (hTERT) を遺伝子導入し、歯小囊細胞の不死化を試みた。

不死化した歯小囊細胞の寿命は延長され、さらに同細胞よりセメント芽細胞前駆体細胞の株化に成功した (図 3 A)<sup>14)</sup>。興味深いことにセメント芽細胞前駆体は *in vitro* では未分化状態を維持するが、免疫不全マウスへ移植することにより 3G9 陽性のセメント芽細胞に分化する特性を有していた。さらにセメント芽細胞前駆体により形成されたセメント質内にシャープー線維による投錨構造を示すことから、機能的なセメント質を形成したことが確認された (図 3 B)。

#### 4. 組織工学的手法を用いた歯科再生医療技術の開発

前述のごとく、セメント芽細胞前駆体の分離に不死化技術が有効であることが示された。したがって、不死化技術を利用すれば、抜歯歯牙より幹細胞あるいは前駆体を採取し、歯周病再生医療に必要な細胞数を生体外増幅することも可能になる。このような技術が可能になれば、歯周病で部分的に崩壊

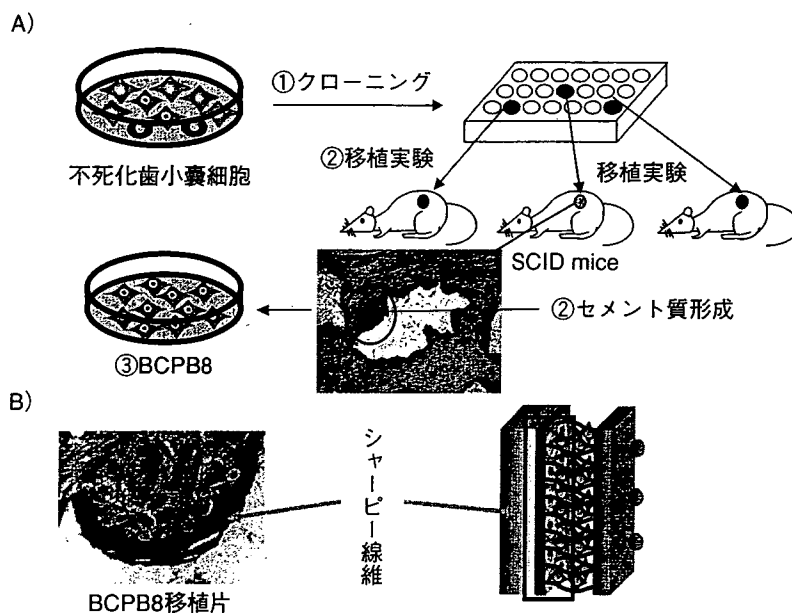


図3 セメント芽細胞前駆体株 BCPB8 の採取方法とその特性

A) セメント芽細胞前駆体細胞株の樹立方法：不死化歯小囊細胞より単細胞クローンを樹立し①，移植実験にてセメント質形成を有するクローンをスクリーニングし②，セメント芽細胞前駆体細胞株(bovine cementoblast progenitor: BCPB8)を樹立した③。B) BCPB8の特性：BCPB8は移植することにより生体内でシャーピー線維様構造物を形成した。

を受けた組織に対して，組織工学的手法を用いた再生医療技術により対応できるようにするであろう。このような組織工学的手法を用いた新規歯周病再生療法の可能性について，その概略を図4に示した。

この戦略では，試験管内でセメント芽細胞前駆体を生体吸収性材料に付着させる。そしてこの生体材料を，歯周病治療では再生の必要な部位へ挿入して歯周組織の再生を促す。インプラント（人工歯根）治療ではこの生体材料をインプラント担体に付着させ，表面上にセメント質を形成させ，最終的には歯根膜付インプラントを生体内で形成することを目指している。

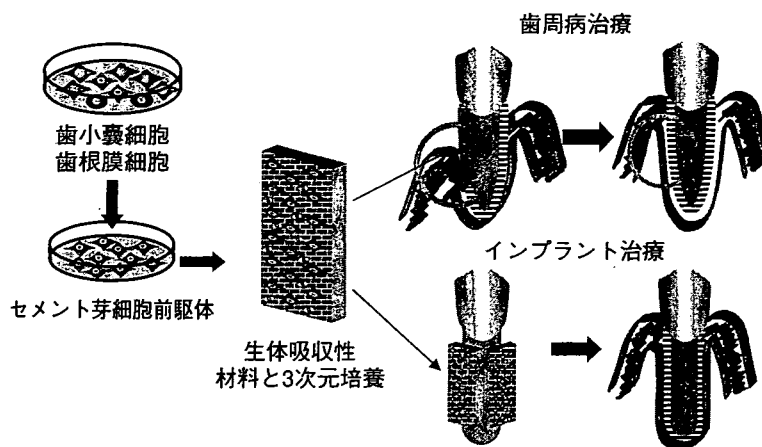


図4 組織工学を応用した新規歯周病再生医療

セメント芽細胞前駆体を分離培養し、これらを生体吸収性材料上で3次元培養を行いハイブリッド型生体材料を作製する。歯周病再生医療の場合は、この生体材料を歯周病罹患部位へ移植して結合組織性再附着を導く。インプラント治療の場合は、インプラント担体にハイブリッド型生体材料を附着させ歯根膜附着型インプラントの作製を目指す。

以上述べてきたように、セメント質形成機構に関しては不明な点が多く残されているが、セメント芽細胞前駆体を用いればセメント質形成を人為的に誘導できることが明らかとなった。第2章で述べたように成人歯根膜中にも幹細胞が存在することが明らかになったことから、幹細胞移植によるセメント質再生療法の開発も近い将来可能になるであろう。そのためには、歯および歯周組織中に存在する幹細胞あるいはセメント芽細胞前駆体のマーカーの同定、および分化の調節メカニズムの解明が今後の重要な研究分野となっていくと考えられる。このような基礎的な研究成果の蓄積が、近い将来有望なセメント質再生の現実化へ導くであろう。

(齋藤 正寛)