

200906010A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

実験的再生歯の臨床応用に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 口 朗

平成22(2010)年5月

目 次

I. 総括研究報告

実験的再生歯の臨床応用に関する研究 1

山口 朗

II. 分担研究報告

1. 口腔領域の軟組織および骨組織の再生に関する研究 26

春日井昇平

2. 臓器置換型再生歯の開発と再生歯の評価 34

辻 孝

3. 歯根再生法の開発と再生歯の評価 42

(イヌでの移植歯胚の発生・萌出モデルの開発)

窪木 拓男

4. 再生歯作成のための新たな細胞シーズの探索と歯の形態制御

機構の解析 47

福本 敏

5. 歯根再生法の開発と再生歯の評価 51

(イヌモデル組織工学的人工再生歯根技術の開発)

園山 亘

III. 研究成果の刊行物・別刷 56

実験的再生歯の臨床応用に関する研究

研究代表者 山口 朗 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 教授

研究要旨

歯・骨の発生メカニズムの理解を基盤とした優れた実験的再生歯の作成法をマウス、イヌで確立し、臨床応用に必要なエビデンスを創出することを目的として研究を行い、以下の結果を得た。①マウス歯胚を利用した器官原基法により形態学的及び機能的に天然歯に極めて近い臓器置換型再生歯の作成に成功した。②ビーグル犬胎仔の発生期歯胚を成犬の顎骨に移植し、臓器置換型再生歯を作成するために必要な移植部位を決定し、移植歯萌出モデルの検討を行った。③ヒト第3大臼歯幼若歯胚を免疫不全マウスの腎皮膜下に移植し、これらの歯胚が歯関連硬組織形成能を有していることを明らかにした。④ビーグル成犬から歯に関連した細胞を分離し、組織工学的な人工再生歯根技術の開発基盤を構築した。⑤再生歯作成に必要な新たな細胞シーズの探索として、iPS細胞から歯関連細胞誘導法と、歯髄幹細胞の大量調整法の開発を行った。⑥再生歯に機能的な形態付与を行うために必要な歯の形態形成メカニズムの分子機構の一部を明らかにした。⑦顎骨造成法に必要な骨形成と骨再生の分子基盤を構築した。⑧ビーグル成犬の類粘膜線維芽細胞が細胞移植による骨再生療法に有効であることを示唆する所見を得た。⑨有効な骨造成法として、新規ナノゲル、繊維性のハイドロキシアパタイト材料、プラスミドベクターを用いた遺伝子導入法、吸収性のalpha-TCPとシンバスタチンを組み合わせた骨補填材などを開発した。以上の結果より、歯根・歯の再生に加えて顎骨の再生も含めた統合的な「歯の再生医療」技術を開発し、臨床応用に必要なエビデンスを創出する基盤を構築することができた。

研究分担者氏名・所属・職名

春日井昇平・東京医科歯科大学大学院

医歯学総合研究科・教授

辻 孝・東京理科大学総合研究機構・教授

窪木拓男・岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科・教授

福本 敏・東北大学大学院歯学研究科・教授

園山 亘・岡山大学病院・助教

A. 研究目的

歯の欠損は、摂食障害、発音障害、審美障

害などを引き起こし、患者のQOLを低下させる。現在の歯科治療は、義歯やインプラントなどの人工材料を用いて喪失した歯の機能回復を図っている。しかし、これらの治療法では咬合力緩衝能、生理的反射・感覚機構、顎口腔環境の変化に応じた生理的な歯の移動能などの機能を十分に回復することが困難である。これらの点を克服するために、国内外で「歯の再生医療」の技術開発が試みられてきたが、実用化可能な技術の開発には至っていなかった。これは、複雑な歯・骨の発生メカニズムの理解を基盤とした研究が十分に構築されて

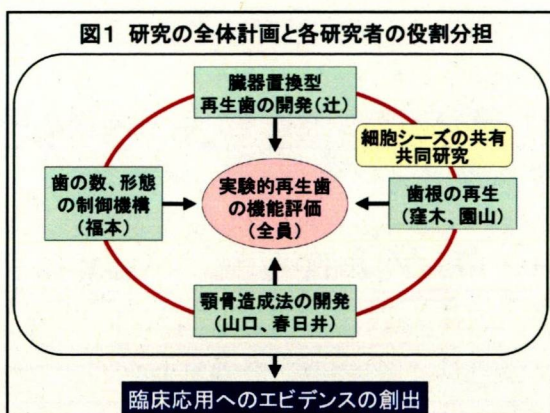
いなかったためと思われる。

最近、研究分担者の園山はミニブタの歯由来幹細胞を利用して機能的再生歯根 (PLoS ONE 1:e79,2006)の開発に成功した。さらに辻は、小型動物で再生歯胚移植による臓器置換型再生歯 (辻、Nature Methods 4: 227,2007)の作製技術を開発した。これらの実験的再生歯は、歯の特性を分子・細胞レベルで統合的に理解した研究成果で、ヒトでの実用化を想定しうる革新的な技術開発といえる。そのため本研究では、これらの技術を基盤として、歯根・歯の再生に加えて顎骨の再生も含めた統合的な「歯の再生医療」技術を開発し、臨床応用に必要なエビデンスを創出することを目的とする。

B. 研究方法

1. 研究全体の計画 (図1)

本研究では、1) 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発 (辻)、2) 歯根再生法の開発 (窪木、園山)、3) 歯の数、大きさ、形態の制御機構の解析 (福本)、4) 歯の再生に適した顎骨造成法の開発 (山口、春日井)、5) 実験的再生歯の機能評価 (全員)、6) ヒト由来細胞を利用した再生歯開発の基盤研究 (全員) を実施する。本研究では、1) ~6) の課題により歯の再生医療の実用化に向けた基盤技術開発を進めると共に、6) によりヒト由来細胞を利用した臨床応用へ向けた基盤研究を構築する。これらの研究は、上記担当者が中心と



なって推進するが、各研究者間で緊密な連携を取り、有機的な共同研究を展開する。特に各研究で利用する細胞シーズに関しては細胞の供与、技術的情報を含めた緊密なネットワークを構築する。

2. 具体的な研究方法

本研究における動物実験は各研究施設の動物実験委員会と組換え DNA 実験委員会の承認を得て、動物実験の基本指針と組換え DNA 実験基本指針を遵守して行われた。また、ヒト材料を用いた基礎研究及び臨床研究に関しては、各施設における倫理委員会の承認のもとで行った。

1) 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発 (辻、福本、園山)

① マウスモデルの開発と評価法の開発 (辻) : 再生歯胚からの再生歯の萌出、並びにその機能を解析するために、まず成体マウスにおける歯牙喪失動物モデルを開発した。成体マウス上顎第一臼歯を抜歯して歯の欠損部を治癒させた後、直径 1.0 mm の移植窩を形成し、胎齢 14.5 日のマウス臼歯歯胚から作製した再生歯胚を移植した。

移植後、経時的に再生歯の萌出と咬合をマイクロ CT 撮影、口腔内観察、および組織学的に評価した。

また萌出した再生歯が、咬合に耐えうる機能的な歯の硬さを有するかを明らかにするため、常法に従い、再生歯のエナメル質と象牙質におけるヌーブ硬度測定を行った。

次に、再生歯が歯根膜を介した歯槽骨のリモデリング能を有するかを解析するために、直径 0.012 インチの矯正用ワイヤーを用いて、再生歯に 10 ~ 15 g の実験的矯正力を負荷し、6 日後・17 日後における組織学的評価を行った。また矯正による圧迫側の骨吸収マーカー (TRAP)、ならびに牽引側の骨形成マーカー (Osteocalcin) の検出を行った。

さらに再生歯が、侵害刺激を中枢へ伝達しうる神経機能を有するかを解析するために、再

生歯の歯髄・歯根膜における末梢神経線維や神経伝達物質を免疫染色にて検出した。また、再生歯に矯正による歯根膜の圧迫ならびに露髄刺激を与え、延髄の三叉神経脊髄路核の神経線維が、中枢における痛みの指標である c-Fos タンパク質を発現するかを確認し、中枢への神経伝達能について解析した。

②イヌモデルの開発（窪木、園山、辻）

a) 移植対象部位の検討

ビーグル成犬を用い、その解剖学的特徴を文献的に検討した。そのうえで、適切と判断したビーグル成犬の下顎小白歯部を対象とし、全身麻酔下で拔牙を行い、その後の治癒をレントゲンの的に検討した。また、移植窩洞形成にあたり、障害となりうる下歯槽管との距離を解剖学的、レントゲンの的に検討した。

b) 移植歯の萌出モデルの検討と評価

移植対象歯は文献的考察と、9週齢ビーグル犬ならびに胎仔ビーグル犬の解剖学的所見をあわせて検討した。

ビーグル成犬の下顎小白歯部に作成した無歯顎部に移植窩洞を形成し、対象とした歯を移植した。移植後はレントゲンの的に硬組織の形成を経時的に観察した。

2) 歯根再生法の開発（園山、窪木）

①ビーグル成犬拔牙歯からの細胞の分離と組織形成能の評価

はじめに、ビーグル成犬から歯に関連した細胞を分離し、その培養法の検討と組織形成能を検討した。

対象は、顎顔面部に奇形の無いビーグル成犬とし、全身麻酔下で下顎小白歯を拔牙した。拔牙後、歯根表面から歯根膜組織を分離した。その後、歯を歯科用タービンで分割し、歯髄組織を分離した。分離した歯髄組織と歯根膜組織は、ヒトの組織間細胞分離プロトコールに則り、単一細胞化を行った。すなわち、分離した組織をメスで細断し、I型コラゲナーゼ（3 mg/ml）

とディスパーゼII（4 mg/ml）で約1時間処理した。その後、セルストレイナーを通過させることで結合組織残渣を除去し、単一細胞溶液を調整した。本細胞を各種培地で培養し、その後の細胞の出現と増殖を評価した。

分離した細胞のin vitroでの石灰化能は、デキサメタゾンとKH₂PO₄を含む石灰化誘導培地で長期培養することで評価した。In vivoでの硬組織形成能はキャリアと共に免疫不全マウス背部皮下へ移植し、組織学的に評価した。

②歯根型スキャホードの選択

イヌから分離した細胞をイヌ顎骨に移植する際のキャリアと歯根型付与のためのスキャホードを兼ねる材料を検索した。歯根型とするための賦形性と埋入時の強度、生体親和性の観点から市販の各種材料を検討した。

③移植モデルの開発と評価

選択したスキャホードを歯根形態を模した長さ8ミリ、直径4ミリの円柱状に調整し、一晚培地中に保存することで培地と馴染ませた。その後、歯髄から分離した細胞を含む培地中に浸漬し、37℃で転倒混和し、スキャホード中に細胞を取り込ませた。さらに、歯根膜細胞を温度感受性培養ディッシュ上で培養した後、細胞シートを作成し、上記の歯髄細胞を取り込んだ歯根型スキャホードを多層に被覆させた。

細胞分離のために下顎小白歯拔牙を行ったビーグル成犬の拔牙後の顎骨の治癒を3カ月待ち、顎骨に歯科用ドリルで移植窩洞を形成した。それぞれの顎骨の近心部には内部に歯髄細胞を取り込ませた歯根型スキャホードを移植、遠心部には内部に歯髄細胞を取り込ませた歯根型スキャホード表面を歯根膜細胞シートで被覆したものを移植した。

移植後は粘膜弁を縫合し、閉鎖創とした。移植体の評価は、移植後、経時的にレントゲン撮影を行うことと、12週後に灌流固定のうえで屠殺し、顎骨ごとサンプリングしたものを組織学的に評価した。

なお、本移植実験は免疫学的な拒絶の可能性を排除するため、細胞はイヌの個体別に培養し、細胞を分離した個体と同一の個体に細胞を移植する自家細胞移植とした。

3) 歯の数、大きさ、形態の制御機構の解析 (福本)

歯の形態形成メカニズムの解明の為、外胚葉異形成症における矮小歯形成機構を明らかにする目的で、その原因遺伝子 EDA の下流シグナル分子の同定と、その機能解明を、遺伝子欠損マウス、分子機能阻害剤を用いた解析を実施した。

4) 歯の再生に適した顎骨造成法の開発 (山口、春日井)

① 骨芽細胞分化及び骨再生の分子メカニズムの解析 (山口)

a) 骨再生過程における Latexin の役割の解析

我々は独自に樹立した Runx2 欠損細胞株 (RD-C2, RD-C6 細胞) に BMP-2 を添加すると骨芽細胞分化が誘導されることを明らかにし、これらの細胞を BMP-2 未処理と処理した場合の細胞での遺伝子発現をマイクロアレイで網羅的に解析した結果、BMP-2 処理で carboxypeptidase A inhibitor である Latexin の発現が強力に誘導されることを見いだした (Liu et. J Cell Physiol 211:728-735,2007)。そのため、本研究では骨芽細胞、軟骨細胞の分化及び骨再生における Latexin の作用を解析した。

b) 骨芽細胞分化及び骨再生における Notch シグナルの役割の解析

骨芽細胞分化及び骨再生における Notch シグナルの役割を in vivo で解析するために、以下の4つの遺伝子改変マウスを作成し、骨格の phenotype を解析中である。

i) OB NICD Tg: 骨芽細胞特異的に Notch 細胞内活性化ドメイン (NICD) を過剰発現するトランスジェニックマウス (2.3 kb Coll

promoter を使用)。

ii) OB dnNICD Tg: 骨芽細胞特異的に dominant negative Notch を過剰発現するトランスジェニックマウス (2.3 kb Coll1 promoter を使用)。

iii) Ox NICD Tg: 骨細胞特異的に NICD を過剰発現するトランスジェニックマウス (DMP1 promoter を使用)。

iv) OB RBPJk cKO: Notch シグナルの重要な転写因子である RBPJk flox マウスと 2.3 kb Coll1 cre マウスの交配により骨芽細胞で特異的に RBPJk を欠失した conditional knockout mouse (cKO) を作成した。

c) 骨芽細胞分化と骨再生における CCN3 の役割の解析

8 週齢雄性 C57BL6 マウスの大腿骨に直径 0.8 mm の円形骨欠損を作成し、骨再生過程における CCN3, BMP, NICD の発現を解析した。さらに、2.3 kb Coll1 promoter を用いて骨芽細胞特異的に CCN3 を過剰発現するトランスジェニックマウス (OB CCN3 Tg) と CCN3 ノックアウトマウス (CCN3 KO) の骨の phenotype を解析した。

② 細胞移植による骨再生療法開発の基盤構築 (山口)

細胞移植による骨再生療法を確立するには骨欠損部に移植した細胞の運命を明らかにしておくことが重要である。我々は Green fluorescence protein (GFP) 導入細胞を利用することにより、移植細胞の骨再生過程における動態を解析できる実験系を確立した (BONE 32:502,2003, 34:993,2004)。

現在、腸骨骨髓から採取した間葉系細胞を用いた骨再生療法が行われているが、歯科医師が腸骨骨髓から間葉系細胞を採取することができない。我々は、BMP-2 を過剰発現する皮膚線維芽細胞をマウスの頭蓋冠骨欠損部に移植することにより、効率よく骨再生を誘導できることを明らかにした (BONE 32:502)。この方法

を用いれば、将来的にヒト口腔粘膜から採取した線維芽細胞を用いた骨再生医療の開発が可能と考えられる。そのため、本年度はイヌの頬粘膜から採取した線維芽細胞を用いた骨再生医療の基盤を構築するために、以下の実験を行った。

a) イヌ頬粘膜からの線維芽細胞の採取：12ヶ月の雄性ビーグル犬より頬粘膜を無菌的に採取し、トリプシン-EDTA 溶液による酵素消化法または皮膚組織片から outgrowth 法により採取した線維芽細胞を 10% FBS、抗生物質を含む α MEM 培地で培養した。細胞は3回まで継代培養したものを用いた。

b) ウイルスベクターの作成：レトロウイルスベクターに GFP 単独(pLNCX-GFP)または GFP と BMP-2(pLNCX-GFP-BMP-2)を組み込んだものを作成した。

c) 担体及び担体の移植法：直径 8mm×厚さ 2mm の β -TCP 強化型ゼラチンスポンジ (Med Gel 社製) を担体として用いた。この担体に pLNCX-GFP を感染させたイヌ線維芽細胞 (5×10^5 個/担体) を浸漬させ、3及び24時間放置し、GFP をマーカーとして細胞の付着を検討した。さらに、担体に大腸菌で作成した rhBMP-2 ($2 \mu\text{g}$) を添加し、凍結乾燥したものに同様にイヌ線維芽細胞を付着させてものをヌードマウスの背部筋膜下に移植した。2週間後に摘出し、組織標本作製し、GFP をトレーサーとしてイヌ線維芽細胞が骨芽細胞に分化しているか検証した。

d) pLNCX-GFP-BMP-2 を感染させたイヌ線維芽細胞を上記担体に付着させヌードマウスに移植し、GFP をトレーサーとしてイヌ線維芽細胞の動態を組織学的に解析した。

③ ナノゲルを利用した骨再生法の開発 (春日井)

コレステロールを共有結合したプルランから成るナノゲル [cholesterol-bearing pullulan nanogels, (CHP)-nanogels] は、成長因子や薬物の

DDS に有用な材料であると考えられている。ラットの背部に皮膚欠損を作成し、プロスタグランディン E1 (PGE 1) を含む (CHP)-nanogel、PGE1 の軟膏、そして対照群の皮膚欠損部には何も適用しなかった。経時的に皮膚欠損部を写真撮影し、組織学的に比較した。次に、Guided Bone Regeneration (GBR) 用の膜を (CHP)-nanogel で作成し、ラット頭部の直径 5mm の骨欠損部の上部に置き、ラットを経時的に屠殺して、骨欠損部を放射線学的、組織学的に検討した。

④ 繊維性ハイドロキシアパタイトの骨再生への応用 (春日井)

直径 5-15 マイクロメートルの繊維性のハイドロキシアパタイト材料 (HAF) を作成し、ウサギ脛骨およびラット下顎切歯抜歯窩に適用し、経時的に屠殺して、骨欠損部を放射線学的、組織学的に検討した。また HAF と骨を誘導する BMP-2 の発現プラスミドを組み合わせ、ラットの皮下に移植し、経時的に屠殺して、移植部を放射線学的、組織学的に検討した。

⑤ シンバスタチンが骨再生に及ぼす作用の検討 (春日井)

吸収性の骨補填材である alpha-TCP とコレステロール合成阻害薬であり骨芽細胞の BMP2 発現を上昇させるシンバスタチンを組み合わせた顆粒状の材料を作成し、ラット頭部の直径 5mm の骨欠損部の上部に置き、ラットを経時的に屠殺して、骨欠損部を放射線学的、組織学的に検討した。さらに、骨欠損部を含む骨組織から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を用いて各種の遺伝子発現の経時変化を定量した。同様の骨補填材を、口腔領域に骨欠損があり、同意を得られた 12 名の被験者に適用して、放射線学的に検討した。そのうち 5 症例においては、適用部位にインプラントを埋入した。また、上顎洞底をこの骨補填材を用いて挙上した 1 症例においては、インプラント埋入時に組織を採取して、組織学的に検討した。なお、本研究は、東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の承認のもとで行われた (承認番号 223 号)。なお、本

研究では、インフォームドコンセントに関して、対象患者に口頭及び書面で研究協力の同意の任意性と撤回の自由、研究計画、利益と不利益、個人情報保護、研究終了後のデータの取扱い等について、分かりやすく説明し、対象患者が研究内容等を十分に理解した上で、研究に協力する場合は「同意書」に署名を求めた。

5) 実験的再生歯の機能評価

再生歯及び顎骨の造成に関する評価法は各研究項目に記載した。

6) ヒト由来細胞を利用した再生歯開発への基礎研究 (辻、窪木、園山)

9～12歳児の第3大臼歯幼若歯胚から歯乳頭組織ならびに歯小囊組織を採取し、免疫不全マウス腎皮膜下に移植することで、歯関連組織形成能について組織学的評価を行った。

(ヒト材料使用に関する倫理面への配慮)

本研究内容に関しては、岡山大学倫理委員会(承認番号;418号)、ならびに東京理科大学ヒト材料研究及び遺伝子解析研究に係る倫理委員会(承認番号;07012号)の承認のもとで行われた。また、提供者を選ぶ際の方針、インフォームドコンセントの手続き及び方法、個人情報の保護の方法に関しては、研究分担者である辻 孝の分担研究報告書に詳細に記載した内容を遵守して研究を推進した。

C. 研究結果

1) 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発: (辻、窪木、園山)

①マウスモデルの開発 (辻)

再生歯胚を成体マウスの歯喪失部位に移植したところ、移植37日目には、約60%の頻度で再生歯が萌出し、49日目には対合歯と咬合するまで成長した。また再生歯は、エナメル質や象牙質、歯髄、歯根膜、歯槽骨が天然歯と同等の組織構造を有していることが判明した。一方、歯の咀嚼機

能には、歯の硬組織の硬度が重要であるため、再生歯のヌーブ硬度を測定したところ、移植11週後の再生歯のエナメル質、象牙質の硬度は、いずれも9週齢の成体マウス天然歯の硬さと同等であった。これらのことから、再生歯は天然歯と同じ組織構造を有して発生すると共に、咀嚼可能な機能的な歯へと成長することが明らかになった。

萌出した再生歯を経時的に観察してみると、再生歯は対合歯との咬合面に到達すると成長が停止し、生理的に移動しながら咬頭が対合歯の小窩とかみ合って咬頭嵌合を確立することが判明した。さらに歯根膜を介する骨のリモデリング能を実験的矯正により解析すると、矯正開始後6日目には歯周囲の歯根膜の形態が変化すると共に、牽引側では骨形成を示す *Osteocalcin mRNA* の発現が認められ、逆に圧迫側では骨吸収を示す *TRAP* 陽性の破骨細胞が認められた。矯正開始後17日目になると、歯根膜を介した歯槽骨のリモデリングが完了し、再生歯が天然歯と同等の歯根膜機能を有することが判明した。これらの結果から、再生歯は歯根膜を介した咬合の確立と維持する機能を有していることが明らかになった。

また再生歯の歯髄や歯根膜には、交感神経や知覚神経といった複数種類の神経線維が侵入しており、天然歯と同様に外部侵害刺激を中枢神経へ伝達できる可能性が示された。さらに、再生歯に矯正力および露髄による侵害刺激を与えると、天然歯を刺激したものと同様に、三叉神経脊髄路核の一部の神経線維で *c-Fos* タンパク質の産生が認められることから、再生歯の神経線維は外部侵害刺激を中枢に伝達していることが判明した。

これらの結果より、成体マウスの顎骨内において、再生歯胚に由来する機能的に完全な再生歯を創り出すことが可能であることを明らかとした (PNAS USA, 106(32), 13475-13480, 2009)。

②イヌモデルの開発 (窪木、園山、辻)

1. 移植対象部位の検討

抜歯による生体への過度の侵襲を避け、その後

のレントゲンの評価、組織切片作成の容易さから下顎小白歯部を対象部位とした。すなわち、下顎小白歯4本であれば全身麻酔下で分割抜歯を行うことで、残存歯槽骨への過度な侵襲を避けることができ、経時的なレントゲン撮影も顎骨形態に比較的妨げられにくいことが確認できた。また、抜歯後3か月で抜歯窩の十分な骨性の治癒が得られることが確認できた。さらには、下歯槽管との垂直的距離は、おおよそ12ミリ程度であることが多く、8ミリまでの移植窩洞であれば、術中の多量の出血や、術後の神経損傷を避けうることが確認できた。

2. 移植歯の萌出モデルの検討（窪木、園山、辻）

これまでの文献的情報と、我々の現在までに研究結果より、マウスにおける移植・萌出モデルは、硬組織形成前の歯胚の移植によってのみ達成されると考えられた。そのため、9週齢ビーグル幼犬の下顎骨をレントゲンの・解剖学的に評価したところ、乳歯・永久歯を含め、すべての歯は硬組織形成期にあり、移植歯としては不適切であることを確認した。そこで、対象を胎仔とし、妊娠ビーグル犬を購入、胎仔を摘出した。実体顕微鏡下で胎仔から歯胚を摘出し、観察したところ、胎生55-60日齢の胎仔第二小白歯歯胚が硬組織の形成直前のステージであり、萌出モデルの検討に適した歯胚であることを確認した。

移植から90日間経時的にレントゲン撮影を行ったが、顎骨内で歯冠形成像を確認する事ができなかった。同時に行った、胎仔第二小白歯歯胚のSCIDマウス腎被膜下移植実験では、継続的な歯胚の発生（硬組織形成）が確認出来ていることから、顎骨への移植では何らかの原因で歯胚の継続的な発生が生じていないと考えられた。用いている実験系（摘出胎仔歯胚の移植）故に、他家移植とせざるを得ないことから、その原因には、免疫拒絶反応が関与していると考察した。そのため、免疫抑制剤の投与により免疫抑制状態とした成犬に胎仔歯胚移植を行うこととした。

具体的には、サイクロスポリンを毎日筋肉注射することで、免疫抑制状態としたビーグル成犬下顎骨に移植窩洞を形成し、他個体の胎仔第二小白歯歯胚を移植した。移植後、経時的にレントゲン撮影を行い、3か月後に移植部顎骨組織を摘出し、マイクロCT撮影を行い、歯胚の継続発生が生じているかを検討した。しかし、歯胚の継続的な発生（硬組織形成）は確認できなかった。免疫抑制効果が得られていないため、移植歯胚が吸収された可能性を排除するため、サイクロスポリンによる免疫抑制効果を評価した。すなわち、他個体の完全に硬組織化している歯根膜付きの歯根をビーグル成犬顎骨内に移植し、3か月後にマイクロCTで、吸収や癒着の有無を評価した。その結果、癒着や吸収等の像は認められず顎骨に生着していることを確認できたために、サイクロスポリンによる免疫抑制効果があったと考える。

以上の結果から、歯胚発生が起きなかった原因は、移植歯胚の継続的な発生・発達よりも、顎骨内移植窩内の骨再生が早く、移植歯胚の発生スペースが確保できなかったためと現時点では考えている。そこで、移植窩洞への骨再生を一定期間抑制するため、歯科用吸収性遮断膜（GTRメンブレン）を用い発生スペースを一定期間確保できるようにしたうえで、移植を行うこととした。すなわち、サイクロスポリンで免疫抑制状態においたビーグル成犬顎骨に移植窩洞を形成した後、コラーゲン製遮断膜で窩洞内壁を被覆し、その内側に他個体から摘出した胎仔小白歯を移植した。さらには、発生ステージの異なる歯胚（具体的にはより分化の進んだ硬組織化しつつある歯胚）が顎骨内で継続分化・成長しうるかを検討するため、第2大臼歯歯胚も顎骨移植窩洞に同様の手法で移植した。現在、レントゲン撮影を行い、歯胚の継続発生を経時的に評価している。

③器官原基法による臓器置換型再生歯における遺伝子発現の解析（辻）

再生歯胚および天然歯胚の誘導時期に高発現する遺伝子をマイクロアレイで網羅的に解析したところ、歯胚が誘導される器官培養10~20時

間後の再構成歯胚で高発現する 76 遺伝子、胎齢 11.5~14.5 日の天然歯胚で高発現する 185 遺伝子が得られた。これらの遺伝子に対する特異的な RNA プロブを用いて、胎齢 11.5 ~ 14.5 日の天然歯胚における遺伝子発現を *in situ* hybridization 法によって解析したところ、胎齢 11.5 ~ 12.5 日の歯胚で発現する 7 個の遺伝子、胎齢 14.5 日の歯胚で発現する 15 個の遺伝子、胎齢 11.5 ~ 14.5 日の歯胚で発現する 21 個の遺伝子を同定した。さらに、これらの遺伝子の中には、歯胚のシグナルセンターであるエナメルノットで特異的に発現する遺伝子や、非歯胚由来細胞を歯に誘導する能力を有する胎齢 11.5 ~ 12.5 日の歯胚上皮組織および胎齢 12.5 ~ 14.5 日の歯胚間葉組織で高発現する遺伝子が多く含まれることが明らかになった。これらの成果より、歯胚の誘導への関与が示唆される 43 個の候補遺伝子が明らかになった。

2) 歯根再生法の開発 (窪木、園山)

① ビーグル成犬抜去歯からの細胞の分離と組織形成能の評価

ビーグル成犬から抜去した下顎小白歯から分離した歯髄組織と歯根膜組織からは線維芽細胞形態を呈する細胞が問題なく分離できた。数種の組成の培地で培養し、本細胞の増殖を評価したところ、15%ウシ胎児血清を含む α MEMでの培養が適切であった。

本細胞を石灰化誘導培地で培養し、*in vitro*での石灰化能の検討を試みたが、ヒト細胞などで石灰化ノジュールを形成する2-3週間の長期培養中に、培養ディッシュから細胞層が剥離した。そのため、培養ディッシュをコラーゲン等でコーティングしての培養を試みたが、細胞層の剥離を防止することはできなかつたため、適切な評価を行うことは困難であった。

そこで、免疫不全マウス背部皮下へキャリアと共に細胞を移植することで、*in vivo*での組織形成能を評価した。キャリアとしては、ハイドロキシアパタイト (HA) と β 型第三リン酸カルシウム

(β TCP) 顆粒を用いた。移植から8週後に摘出し、パラフィン切片を作成、組織学的に評価したところ、歯髄細胞、歯根膜細胞ともともに硬組織形成能を有していることを確認した。また、HAよりも β TCPの方が硬組織形成は量的に良好であった。なお、ヒト抜去歯から分離した歯髄細胞と異なり、形成された硬組織は骨様の層板状構造を呈している部分があった。また、ヒト歯髄細胞の移植では基本的に認められない骨髄組織が確認された。

② 歯根型スキャホードの選択

スキャフォールドの材料として、賦形性と強度、生体親和性から β TCP (商品名オスフェリオン) と HA (商品名ネオボーン) を使用した。両者ともにトレフィンバーによる事前の調整で、ほぼ統一された規格の円柱状の形態とすることができた。

③ 移植モデルの開発と評価

これまでに3頭の個体で歯根型スキャホードと細胞の移植を行った。

第一個体では、 β TCPスキャホードを移植窩洞へ挿入する際に、スキャホード自体の軽度の崩壊があった。経時的なレントゲン評価から、崩壊のあった β TCPスキャホードは顎骨内では8週でレントゲンの確認できなくなった。また、吸収後の移植窩に硬組織像は認められなかった。HAスキャホードは移植窩洞内に確認できるものの、その内部における硬組織形成は確認できなかった。本個体は移植から12週後に屠殺の上で、下顎骨をサンプリングした。当初の予測よりも脱灰に時間を要しており、現時点でも脱灰操作中である。

第二個体では、第一個体で認められたスキャホードの挿入時の崩壊を予防するため、スキャホードの直径よりもさらに大きな窩洞を形成し、移植したところスキャホードの崩壊はなかった。レントゲン的には第一個体で認められた8週での β TCPスキャホードの吸収像が、第二個体では認められなかった。第一個体の結果から、脱灰に時間を要することが明らかであったため、第二個体の下顎骨サンプルは12週で摘出後、非脱灰切片作製を作成中である。

第三個体は、3月末に移植を行い、6月末に摘出

を予定している。

3) 歯の数、大きさ、形態の制御機構の解析

(福本)

外胚葉異形成症モデル動物においては、歯の外形全体が小さくなる。原因遺伝子 EDA およびその受容体 EDAR 遺伝子の変異によることが従来より報告されている。我々は EDA/EDAR の下流シグナル (主に 3 経路) をそれぞれ欠損したマウスの解析から、p50/NIK の 2 つの経路の阻害が歯の横幅を規程することを見いだしていた。そこで、器官培養系において、これらシグナルの阻害実験を行った結果、歯原性上皮細胞における shh の空間特異的な発現抑制により、歯の横幅が決定されていることが明らかとなった。

4) 歯の再生に適した顎骨造成法の開発 (山口、春日井)

① 骨芽細胞分化及び骨再生の分子メカニズムの解析 (山口)

a) 骨再生過程における Latexin の役割

Latexin は、免疫染色で増殖細胞層と前肥大軟骨層の軟骨細胞で発現しており、骨芽細胞では明らかな発現はみられなかった。さらに、骨再生の初期で軟骨細胞に Latexin の強い発現がみられた。これらの結果より、Latexin は軟骨細胞の分化を制御している可能性が考えられたため、C3H10T1/2 細胞にアデノウイルスで Latexin を過剰発現させると軟骨細胞の分化が促進された。また、BMP-2 は Sox9 の発現を上昇させ、Sox9 は Latexin promoter 活性を促進した。これらの結果より、Latexin は Sox9 を介して BMP-2 で制御されており、骨再生過程などで Runx2 非依存的に軟骨細胞の分化を制御していると考えられた。

b) 骨芽細胞分化及び骨再生における Notch シグナルの役割

骨芽細胞で特異的に NICD を過剰発現する

OB NICD Tg マウスでは、骨形成の低下による骨量減少が認められたため、Notch シグナルの骨芽細胞分化抑制作用が示唆された。さらに、NICD Tg マウスでは、あるホルモンが有意に増加していることを見いだした。また、骨芽細胞で RBPJk を特異的にノックアウトし、Notch シグナルを抑制した OB RBPJk cKO マウスでは、このホルモンの発現が低下していた。現在、骨組織におけるこのホルモンの制御メカニズムを解析中である。

OB dnNICD Tg マウスと Ox NICD Tg マウスに関しては、現在、それらの phenotype を解析中である。

c) 骨芽細胞分化及び骨再生における CCN3 の役割

我々が独自に作成した CCN3 特異的抗体を用いて、正常骨組織と骨再生における CCN3 の発現を解析した結果、正常骨組織では CCN3 の発現はほとんど検出できなかったが、骨再生 5-10 日目では CCN3 陽性の骨芽細胞が多数出現した。また、RT-PCR で CCN3 の発現を解析すると、正常骨組織に比べて骨再生 5-10 日目でその発現が顕著に上昇していた。さらに、骨から採取したサンプルを用いて Western blot 法で検討した結果、CCN3 の発現は正常骨ではほとんど検出できなかったが骨再生 5-10 日で明らかな発現が確認できた。以上の結果より、CCN3 は成長したマウスの骨組織での発現は弱いですが、骨再生過程で顕著に発現が上昇することが明らかとなった。さらに、興味あることに骨再過程における CCN3 タンパク質の経時的な発現プロファイルはリン酸化 Smad1/5/8 及び NICD と類似していた。この結果は、我々が既に *in vitro* の実験で明らかにした CCN3/BMP/Notch シグナルのクロストーク (BBRC 354:567-573,2007, 368: 808-814,2008) が骨再生過程でも存在していることを示唆している。

骨形成及び骨再生における CCN3 の役割を生体内で解析するために、骨芽細胞で特異的に CCN3 を過剰発現するトランスジェニックマウ

ス(OB CCN3 Tg)と CCN3 ノックアウトマウス(CCN3 KO)の解析を行った。両マウスとも出生し、維持が可能であった。骨形態計測の結果、OB CCN3 Tg マウスでは、野生型マウスに比べて骨形成が低下し、骨量減少を呈していた。一方、CCN KO マウスでは野生型マウスに比べて著明な変化は認められなかった。正常マウスでの CCN3 の発現が低いことより、CCN3 KO マウスの骨組織に変化がみられなかったと考えられた。CCN3 は骨再生過程で発現が上昇するために、現在、OB CCN3 Tg、CCN3 KO マウスにおける骨再生過程を解析中である。

②細胞移植による骨再生療法開発の基盤構築

(山口)

a) イヌ頬粘膜からの線維芽細胞の採取

トリプシン・EDAT 溶液を用いた酵素消化法と頬粘膜小組織片からの outgrowth 法の両方で十分な線維芽細胞を採取することができた。

b) ウイルスベクターの作成

レトロウイルスベクターに GFP のみを組み込んだもの(pLNCX-GFP)を作成した。このベクターをマウス MC3T3-E1 細胞及びイヌ頬粘膜線維芽細胞に感染させると約 90%の細胞が GFP を発現することが確認できた。

また、レトロウイルスベクターに GFP と BMP-2 遺伝子を組み込んだもの(pLNCX-GFP-BMP-2)も MC3T3-E1 細胞及びイヌ頬粘膜線維芽細胞に感染させると約 90%の細胞で GFP の発現が認められた。また、このウイルスベクターを感染させた MC3T3-E1 細胞では BMP-2 mRNA が過剰発現しており、ALP、osteocalcin、Runx2 mRNA の発現も上昇していることを RT-PCR で確認できた。また、このウイルスベクターを感染させたイヌ線維芽細胞では ALP 染色で陽性細胞が増加していた。これらの結果より、我々の作成したウイルスベクターにより GFP と BMP-2 の発現を誘導させることが可能と考えられた。

c) 担体及び担体/細胞複合体の移植実験

β -TCP 強化型ゼラチンスポンジに pLNCX-GFP を感染させたイヌ線維芽細胞 (5×10^5 個/担体)を浸漬させ、3 及び 24 時間放置し、細胞の担体への付着状況を観察した所、両時間とも付着した細胞の約 90%が GFP 陽性であった。さらに、担体に大腸菌で作成した rhBMP-2 (2 μ g)を添加し、凍結乾燥したものに pLNCX-GFP を感染させたイヌ線維芽細胞を付着後にヌードマウス筋膜下に移植した結果、2 週後に骨・軟骨が形成されたが、同部に GFP 陽性の骨芽細胞及び軟骨細胞が確認できた。この結果より、イヌ頬粘膜の線維芽細胞も BMP-2 の作用により骨芽細胞、軟骨細胞に分化できることが明らかとなった。現在、pLNCX-GFP-BMP-2 を感染させたイヌ線維芽細胞を担体に付着させ、ヌードマウスの筋膜下に移植する実験を行っている。

③ナノゲルを利用した骨再生法の開発 (春日井)

PGE1 を含む (CHP)-nanogel は、ラットの背部の皮膚欠損の修復を著しく促進した。興味深いことに、(CHP)-nanogel を単独で作用させた場合にも修復促進効果が観察された。同様に、(CHP)-nanogel 膜単独で、骨欠損部の骨形成を著しく促進し、4 週後において骨欠損部の周囲の骨と区別がつかない成熟した骨で骨欠損部は満たされていた。

④繊維性ハイドロキシアパタイトの骨再生への応用 (春日井)

ウサギ脛骨の骨欠損部およびラット切歯の抜歯窩に適用した HAF は、これらの骨欠損部の骨形成を阻害することなく、次第に新生骨と置換することが明らかになった。また BMP-2 遺伝子発現プラスミドを含む HAF は、異所性に骨を誘導し、発現プラスミドの量が増えると誘導された骨の量は増加した。

⑤シンバスタチンが骨再生に及ぼす作用の検討 (春日井)

alpha-TCP とシンバスタチンを組み合わせた顆粒状の材料は、ラット頭部の骨欠損の修復を

著しく促進するが、この作用は用量依存的であり、高用量では骨形成の抑制が起きた。適正な用量 (7 mg シンバスタチン/1g alpha-TCP) を用いた場合には、骨補填材の周囲において、未分化間葉系細胞の増殖が起き、また骨形態計測の結果から骨形成の促進が観察された。また、RT-PCR の結果から、この補填材を用いた場合には、TGF-beta と BMP-2 の遺伝子発現が上昇することが明らかになった。臨床試験の全て症例において時間の経過とともに補填材と周囲骨の境界は不明瞭となり、補填材の吸収と骨への置換が示唆された。また、一部の症例において、適用してから6ヶ月後に補填材適用部位のCT値の上昇が見られ、これからも骨補填材の新生骨への置換が推測された。また、骨補填材を適用した上顎洞の組織像においても、補填材の吸収と新生骨への置換が明らかであった。

5) ヒト由来細胞を利用した再生歯開発への基盤研究 (辻、窪木、園山)

9~12歳児の第3大臼歯歯胚を免疫不全マウスへ移植することにより、ヒト歯胚に由来するエナメル質と象牙質の硬組織形成および蓄積を認め、歯関連組織形成能を評価する移植モデルを構築することが可能であった。

D. 考察

1) 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発

①マウスモデルについて

マウスモデルにおいて再生歯胚移植による再生歯が臨床応用化に必要な機能的咬合系を回復させる機能をすべて有していることから、臓器置換型再生歯の実現可能性エビデンスが小型動物の研究により得られたものと考えられた。

②イヌモデルについて

本研究では、まずビーグル成犬における移植対象部位を検討した。ビーグル犬の場合、上顎では鼻腔が広く存在しており、一定の深さを持った移植窩洞の形成が困難であることから、移植対象部

位として不適切であった。また、下顎大臼歯は抜歯が極めて困難であることと、移植後の経時的な評価に必要なレントゲン撮影が困難であることを確認した。さらには、下顎前歯部はその顎骨形態から平行法によるレントゲン撮影が困難であった。以上の理由により、本研究では下顎小臼歯部を移植対象部位として実験を行った。

研究結果のなかで考察の一部は記述したが、歯胚移植を受けるビーグル成犬の免疫反応が最初のハードルとして存在したものと考える。免疫抑制剤であるサイクロスポリンの投与によって一定の免疫抑制効果がえられているものと考えているが、ビーグル犬の免疫状態を数値的に評価する手法が存在せず、確定は得られていない。今後は多面的な免疫状態の評価手法を検索する必要がある。

現状では、移植窩洞内の骨再生を一定期間抑制することを目的に、コラーゲン遮断膜を用いたスペースの確保を行った上での歯胚移植を行っている。この移植系では、対照として歯冠の硬組織化が開始している別部位の歯胚の移植も行っているため、移植歯胚の発達ステージが移植結果に与える影響も評価できる予定である。

イヌによる前臨床研究を進めるため、イヌ再生歯胚の発生頻度を上昇させる条件検討や、再生歯胚の顎骨移植モデルの確立を行う必要があると考えられる。今後は、現在の歯胚のみの移植ではなく、歯胚周囲の軟組織 (歯小囊等) も切離することなく一体として移植することや、摘出した歯胚を一定期間培養した後に移植する手法などを計画している。

2) 歯根再生法の開発

①ビーグル成犬抜去歯からの細胞の分離と組織形成能の評価について

各個体の抜去歯から歯髓細胞、歯根膜細胞を分離・培養することができた。しかし、歯根膜細胞の培養効率は、歯髓細胞と比較して良くなく、分離手技、培養手法の改良が必要と考えられた。

分離したイヌ歯髓細胞ならびに歯根膜細胞は基質産生が旺盛なため、*in vitro*での石灰化誘導は困難であったと考えられた。そのため、細胞自体の硬組織形成能は顎骨モデルでの歯根再生モデルでの検討を行うとともに、スキャホードと共に免疫不全マウス背部皮下へ移植する実験系で確認することとした。免疫不全マウスへの移植では、ヒト細胞の場合、歯髓細胞であれば象牙質様組織が、また歯根膜細胞であればセメント質様組織が形成されることが明らかとなっている。しかし、イヌ細胞の移植実験では、形成された硬組織の一部は骨様の層板状の構造を呈していた。この差異が動物種によるものか、培養過程によるものか、用いたキャリアの材質によるものか、今後検討する。HAよりも β TCPの方が硬組織形成は量的に良好であった。しかし、複数頭での顎骨での移植体の組織学的評価が行えるまではHAと β TCPの両方を使用する。

②歯根型スキャホードの選択について

β TCPとHAともに移植前の状態で歯根型の形態付与は可能であるが、 β TCPはHAと比較すると強度が低いため、形態付与後に培地に一致時間浸漬し、細胞を播種する必要があることを確認した。今後は、形態そのものの規定とともに、歯冠補綴物の装着のための維持機構を内蔵した歯根型スキャフォールドの作製を目指し、外部委託も考慮する。

さらには、 β TCPはHAと比較すると機械的強度が低く、移植窩への挿入時に形態が崩壊する危険性があること、崩壊した場合には早期に吸収が生じることを確認した。

③移植モデルの開発と評価について

イヌ顎骨へ移植した人工再生歯根の経時的な評価にはレントゲン写真が現時点では唯一の方法である。イヌの解剖学的特徴から第一小白歯部の撮影は困難なことから、第二小白歯部よりも後方への移植、埋植が適切であることを確認した。また、レントゲン写真の規格化を図る必要がある。

組織の評価に際して、脱灰操作にかなりの時間を

要することが明らかとなった。現在は、クエン酸・蟻酸脱灰液を使用しているが、より脱灰効率の良い脱灰液を検討している。また、時間短縮による実験効率を上げるため、第二個体から得たサンプルは、非脱灰切片とし、現在作製中である。

3) 歯の数、大きさ、形態の制御機構の解析について

本研究で、歯の横幅の決定メカニズムの一部が解明できたことから、関連シグナルおよび増殖因子の薬剂的な阻害あるいは活性化により、再生歯の形の制御が可能となることが示唆された。今後、歯の前後径を制御する分子シグナルを同定することで、歯の欠損部位に適切な大きさの歯を再生させる為の技術開発に応用できると考えられる。

4) 歯の再生に適した顎骨造成法の開発について

新たな有効な骨再医療を開発するためには、骨芽細胞の分化及び骨再生の分子メカニズムを十分に理解しておくことが重要である。さらに、これらの骨再医療を臨床応用するためには、「臨床的に有効であること」、「安全であること」、「簡便であること」、「妥当な価格であること」などの点を十分に考慮することも必要である。我々は、これらの点を配慮して、歯の再生に適した顎骨造成法の開発を目指している。

①骨芽細胞分化及び骨再生の分子メカニズム

優れた骨造成を開発するためには骨芽細胞の分化及び骨再生の制御メカニズムを十分に理解しておく必要がある。我々は先行研究により、BMP-2による骨芽細胞の分化過程や骨再生過程で発現が変動する遺伝子を同定していたので、本研究ではこれらの分子の役割を解析した。その結果、BMP-2で誘導される遺伝子であるLatexinはBMP-2/Sox9カスケードにより誘導され軟骨細胞分化に関与しているこ

とを明らかにした。また、**Latexin** が骨再生過程の軟骨細胞にも発現することも見いだした。これらの結果より、今後、骨再生過程における**Latexin** の役割を詳細に解析することが重要と考えられた。現在、**Laten** ノックアウトマウスの入手を検討しており、このマウスにおける骨再生を解析する予定である。

本研究により、**Notch** 及び **CCN3** は骨芽細胞分化や骨形成を抑制することが示された。我々は、これらの分子の発現は骨再生の初期に上昇することも確認している。そのため、骨再生過程では、初期から骨形成を抑制する因子が産生され、過剰な骨形成が生じることを防ぐためにネガティブフィードバック機構が作動していることが示唆された。そのため、このようなネガティブフィードバック機構を抑制することにより、より効率よく骨再生を促進することが可能となるかもしれない。この点をさらに検討するために、我々は現在、**Notch**、**CCN3** に関する種々の遺伝子改変マウスの骨再生過程を解析中である。

②細胞移植による骨再生療法開発の基盤構築

現在、骨髄間葉系細胞を利用した細胞移植による骨再生療法が整形外科領域で臨床応用されており、歯周組織の回復にも臨床応用されている。安全な細胞移植療法を開発するためには、移植された細胞の生体内での動態を明確にしておくことが極めて重要であるが、この点に関する十分な解析が行われずに、臨床応用されているのが現状である。この点に関して、我々は既にマウスで確立した **GFP** 発現細胞をトレースする実験系をイヌの細胞に応用した。その結果、**GFP** 発現レトロウイルスを用いることにより、ヌードマウスに移植したイヌの細胞を明確に同定できることを明らかにした。

臨床では、骨再生医療に用いる移植細胞は腸骨から採取した間葉系細胞が用いられている。この方法では、歯科医師が自ら腸骨から細胞を採取できないために、整形外科医などの協力を

必要とする。本研究では、この点を改善するために、口腔粘膜から採取した線維芽細胞を骨再生に利用できないか検討した。我々は、既に **BMP-2** 遺伝子を導入したマウス皮膚線維芽細胞をマウス骨欠損部に移植すると効率よく骨再生を誘導することを報告した。この研究成果を基盤として、本研究では **GFP** と **BMP-2** 遺伝子を発現するイヌ頬粘膜線維芽細胞を担体に付着させ、ヌードマウスの筋膜下に移植すると骨形成が誘導され、**GFP** 陽性の骨芽細胞（イヌ細胞由来）も認められることを明らかにした。この結果より、イヌ頬粘膜の線維芽細胞で骨形成を誘導することが可能と考えられた。現在、ヒトの口腔粘膜由来の線維芽細胞でも **BMP-2** 遺伝子を導入することにより、ヌードマウス内で骨形成を誘導できるか検討するために、東京医科歯科大学倫理委員会に研究計画を申請準備中である。

細胞移植による骨再生医療の臨床応用への期待は大きいですが、この方法が一般的な治療法となるためには、解決しなければならない多くの問題点が残されている。具体的には、安全な **BMP-2** 遺伝子導入法、臨床応用するための細胞培養設備の設置、移植細胞の安全性、治療のためにコストなどである。**rhBMP2** を用いる骨造成は、臨床効果、安全性、簡便性の3つの条件を満たしているが、価格が高いことが障害となっていた。しかし、最近、大腸菌で作製した **rhBMP-2** が比較的安い価額で入手可能となる可能性がでてきたので、これらの **rhBMP-2** による顎骨造成法の検討も必要である。

③ナノゲルを利用した骨再生法の開発

本研究で、**PGE1** を含む (**CHP**)-nanogel が、単独で軟組織および骨組織の再生を促進することを明らかにした。(**CHP**)-nanogel は成長因子や薬物の **DDS** 材料として適しており、この材料単独で組織再生を促進すること知られている。今後、骨形成に関連するシグナル分子を (**CHP**)-nanogel にトラップし、徐放することで

皮膚や骨の再生が促進された可能性が考えられる。

④繊維性ハイドロキシアパタイトの骨再生への応用

繊維性の HAF は、骨欠損部への適用が極めて簡便な補填材である。さらに、この補填材は吸収性で、新生骨と置換することも明らかになった。そのため、本材料は将来的にインプラント埋入を予定する部位へ使用する骨補填として適していると考えられた。また HAF は *in vivo* での遺伝子導入の材料としても適していた。従来、コラーゲンをプラスミドベクターのキャリアーとして用いる方法では、BMP-2 の発現ベクターを用いて異所性に骨を誘導することは困難であったが、HA から成る HAF はプラスミド DNA と親和性が極めて高いため、プラスミド DNA を安定した状態で局所に留めておくことが可能であると考えられる。その結果、少量の BMP-2 発現ベクターを使用したにも関わらず異所性に骨を誘導できたと推測できる。

⑤シンバスタチンが骨再生に及ぼす作用の検討

alpha-TCP も吸収性の骨と置換する補填材として、我々が以前より研究をおこなっている材料である。この材料と、骨芽細胞の BMP2 発現を誘導するシンバスタチンを組み合わせることで、骨形成を促進し、骨と置換する骨補填材を開発した。そして、この補填材の有効性と安全性を動物実験と臨床試験において確認した。シンバスタチンコレステロール合成阻害薬で、すでに臨床応用されている。そのため、シンバスタチンと alpha-TCP を組み合わせた我々が開発品は、「臨床的に有効であること」、「安全であること」、「簡便であること」、「妥当な価格であること」といったヒト再生医療応用に必要な条件を満たしている。今後、このような優れた開発品を臨床応用するためには、臨床試験において安全性と有効性を確認し、国からの承認を得ることである。厚生労働省は我々の開

発した製品について、「材料としてではなく薬剤としての治験をおこなうべきである」と決定した。材料として臨床治験をおこなう場合に比較して、薬剤として臨床治験をおこなう場合には莫大な費用と期間が必要とされるので、我々は臨床治験をおこなうことを断念した。

米国においては、rhPDGF と beta-TCP を組み合わせた製品、rhBMP2 とアテロコラーゲンを組み合わせた製品のいずれも材料 (Device) としての治験がおこなわれ、承認を受けている。再生医療に関連した製品が次々に承認され、臨床応用可能となっている米国の状況に比較して、我国の状況は絶望的である。このような状況は国民の健康と幸福を妨げていると同時に、医療産業の発展を阻害していることは明らかである。近年の再生医療の進歩は著しく、効果的で、安全性が高く、簡便で、低価格な新たな骨造成法の登場が期待される。それが臨床応用されるためには、我国の医薬品と医療器材の承認システムを大きく改善する必要がある。このような不合理な状況が早く打破されることを期待している。

5) 実験的マウス再生歯の形態及び機能評価法の開発

本研究では、研究代表者及び研究分担者が担当する研究において、各々が必要とする評価法を順調に開発することができた。具体的には、各研究分担者報告書に記載した。

6) ヒト由来細胞を利用した再生歯開発への基盤研究

本研究では、第3大臼歯歯胚を免疫不全マウスへ移植することにより、これらの歯胚がエナメル質と象牙質の硬組織形成能を有することを明らかにすることが可能であった。今後、さらに歯関連組織形成能を培養細胞などを用いて評価し、歯の再生に利用可能なヒト細胞シーズの探索を継続して推進していく予定である。

本研究で、イヌの頬粘膜由来線維芽細胞が骨形成能を有することを示すことができたので、今後、ヒト口腔粘膜由来線維芽細胞の骨形成能を本研究と同様な方法で評価する予定で、現在、研究計画を倫理委員会に申請する準備を進めている。

E. 結論

1. マウス歯胚を利用した器官原基法により形態学的及び機能的に天然歯に極めて近い臓器置換型再生歯の作成に成功した。
2. ビーグル犬胎仔の発生期の歯胚を成犬の顎骨に移植し、臓器置換型再生歯を作成するために必要な移植部位を決定し、移植歯萌出モデルの検討を行った。
3. ヒト第3大臼歯幼若歯胚を免疫不全マウスの腎皮膜下に移植することにより、これらの歯胚が歯関連硬組織形成能を有していることを明らかにした。
4. ビーグル成犬から歯に関連した細胞を分離し、組織工学的な人工再生歯根技術の開発基盤を構築した。
5. 再生歯作成に必要な新たな細胞シーズの探索として、iPS細胞から歯関連細胞誘導法と、歯髄幹細胞の大量調整法の開発を行った。
6. 再生歯に機能的な形態付与を行うために必要な歯の形態形成メカニズムの分子機構の一部を明らかにした。
7. 顎骨造成法に必要な骨形成と骨再生の分子基盤を構築した。
8. ビーグル成犬の頬粘膜線維芽細胞が細胞移植による骨再生療法に有効であることを支持する所見を得た。
9. 骨造成法として、新たなナノゲル、繊維製のハイドロキシアパタイト材料(HAF)、プラスミドベクターを用いた *in vivo* での遺伝子導入法、吸収性の α -TCP とシンバスタチンを組み合わせた骨補填材などを開発した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Etoh M, Yamaguchi A: Repetition of continuous PTH treatments followed by periodic withdrawals exerts anabolic effects on rat bone. *J Bone Miner Metab* (in press)
2. Sakamoto K, Aragaki T, Kawachi H, Katsube K, Miki Y, Takizawa T, Omura K, Morita K, Okada N, Yamaguchi A: Concurrent downregulation of keratin 4 and keratin 13 expression defines the neoplastic lesion of oral epithelium and serves as an ideal marker for oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia. *Histopathol* (in press)
3. Aragaki T, Michi Y, Katsube K, Uzawa N, Okada N, Akashi T, Amagasa T, Yamaguchi A, Sakamoto K: Comprehensive keratin profiling reveals distinctions between keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cyst. *Human Pathol* (in press)
4. Iimura T, Himeno A, Nakane A, Yamaguchi A: Hox genes, a molecular constraint for development and evolution of vertebrate body plan. *J Oral Biosci* (in press)
5. Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi T, Morita K, Omura K, Nguyen ST, Miki Y, Iimura T, Himeno A, Akashi T, Yamada-Okabe H, Ogata E, Yamaguchi A: Roles of IL-6 and PTHrP in osteoclast formation associated with oral cancers: The significance of IL-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. *Amer J Pathol* 176;968-980,2010
6. Kadouchi I, Sakamoto K, Liu T, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi A: Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 378;6000-6004,2009
7. Nakanishi S, Sakamoto K, Yoshitake H, Kino K,

- Amagasa T, Yamaguchi A: Bone morphogenetic proteins are involved in the pathobiology of synovial chondromatosis. *Biochem Biophys Res Commun* 379:914-919,2009
8. Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara T, Terai M, Lau LF, Tamamura Y, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A: CCN3 and bone marrow cells. *J Cell Commun Signal*. 3:135-145,2009
9. Katsube K, Sakamoto K, Tamamura Y, Yamaguchi A: Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development. *Dev Growth Differ* 51:55-67,2009
10. Ozeki M, Kuroda S, Kon K, Kasugai S: Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells into Osteoblasts in a Self-assembling Peptide Hydrogel: In Vitro and In Vivo Studies. *J Biomater Appl*. 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]
11. Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, Kasugai S: Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 93:65-73,2010
12. Maruo K, Sato D, Machida T, Kasugai S: Effects of alpha-tricalcium phosphate containing simvastatin on alveolar ridge augmentation. *J Oral Tissue Engineer* 7:143-152, 2010
13. Machida T, Nyan M, Kon K, Maruo K, Sato H, Kasugai S: Effect of hydroxyapatite fiber material on rat incisor socket healing. *J Oral Tissue Engineer* 7:153-162, 2010
14. Kon K, Shiota M, Ozeki M, Yamashita Y, Kasugai S: Bone augmentation ability of autogenous bone graft particles with different sizes: a histological and micro-computed tomography study. *Clin Oral Implants Res* 20:1240-1246,2009
15. Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S: Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 20:280-287,2009
16. Kobayashi H, Katakura O, Morimoto N, Akiyoshi K, Kasugai S: Effects of cholesterol-bearing pullulan (CHP)-nanogels in combination with prostaglandin E1 on wound healing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91:55-60,2009
17. Nakamura T, Shiota M, Kihara H, Yamashita Y, Kasugai S: Effects of granule size and surface properties of red algae-derived resorbable hydroxyapatite on new bone formation. *J Oral Tissue Engineer* 6:167-179, 2009
18. Okabayashi S, Takayama K, Kuroda S, Kanai T, Fujii S, Sato M, Kasugai S: Hydroxyapatite fiber material for bone tissue engineering *J Oral Tissue Engineer* 6:180-188, 2009
19. Kondo H, Amizuka N, Kihara H, Furuya J, Kuroda S, Ozawa S, Ohya K, Kasugai S: The target cells of parathyroid hormone (PTH) anabolic effect in bone are immature cells of osteoblastic lineage. *J Oral Tissue Engineer* 7:2-14,2009
20. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T: Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Aca. Sci USA* 106:3475-13480,2009
21. Nakao K, Murofushi M, Ogawa M, Tsuji T: Regulations of size and shape of the bioengineered tooth by a cell manipulation method. *Micro-Nano Mechatronics and Human Science 2009. MHS 2009*. International Symposium on. 123-126, 2009.
22. Nakao K, Tsuji T: Strategies underlying research in tooth regenerative therapy as a possible model for future organ replacement. *Interface Oral Health Science 2009*, 20-26, 2010.

23. Inoue E, Maekawa K, Minakuchi H, Nagamatsu-Sakaguchi C, Ono T, Matsuka Y, Clark GT, Kuboki T: The relationship between temporomandibular joint pathosis and muscle tenderness in the orofacial and neck/shoulder region. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109:86-90,2010
24. Ono T, Maekawa K, Sonoyama W, Kojima S, Tanaka T, Clark GT, Kuboki T: Gene expression profile of mouse masseter muscle after repetitive electrical stimulation. *J Prosthodont Res* 54:36-41,2010
25. Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Sonoyama W, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K: Botulinum toxin type a (150 kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal ganglion neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infraorbital nerve constriction. *Neuroscience* 159:1422-1429,2009
26. Okamoto Y, Sonoyama W, Ono M, Akiyama K, Fujisawa T, Oshima M, Tsuchimoto Y, Matsuka Y, Yasuda T, Shi S, Kuboki T: Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro* and *in vivo*. *J Endodont* 35: 367-372,2009
27. Maekawa K, Shimono K, Oshima M, Yoshida Y, Van Meerbeek B, Suzuki K, Kuboki T: Polyphosphoric acid treatment promotes bone regeneration around titanium implants. *J Oral Rehabil* 36:362-367,2009
28. Maeda A, Nishida T, Aoyama E, Kubota S, Lyons KM, Kuboki T, Takigawa M: CCN family 2/connective tissue growth factor modulates BMP signalling as a signal conductor, which action regulates the proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Biochem* 145:207-126,2009
29. Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Ishikawa M, de Vega S, Fukumoto S, Yamada Y: Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation. *J Biol Chem* 2010 Apr 19. [Epub ahead of print]
30. Iwamoto T, Yamada A, Yuasa K, Fukumoto E, Nakamura T, Fujiwara T, Fukumoto S: Influences of interferon-gamma on cell proliferation and interleukin-6 production in Down syndrome derived fibroblasts. *Arch Oral Biol* 54:963-969,2009
31. Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Nakajo K, Washio J, Mayanagi H, Fukumoto S, Takahashi N: Effects of alpha-amylase and its inhibitors on acid production from cooked starch by oral streptococci. *Caries Res* 43:17-24,2009
32. Wu N, Iwamoto T, Sugawara Y, Futaki M, Yoshizaki K, Yamamoto S, Yamada A, Nakamura T, Nonaka K, Fukumoto S: PDGFs regulate tooth germ proliferation and ameloblast differentiation. *Arch Oral Biol* 55:426-443,2010
33. Sonoda A, Iwamoto T, Nakamura T, Fukumoto E, Yoshizaki K, Yamada A, Arakaki M, Harada H, Nonaka K, Nakamura S, Yamada Y, Fukumoto S: Critical role of heparin binding domains of ameloblastin for dental epithelium cell adhesion and ameloblastoma proliferation. *J Biol Chem* 284:27176-27184,2009
34. Hatakeyama J, Fukumoto S, Nakamura T, HARUYAMA N, Suzuki S, Hatakeyama Y, Shum L, Gibson CW, Yamada Y, Kulkarni AB: Synergistic roles of amelogenin and ameloblastin. *J Dent Res* 88:318-322,2009
35. Sakaki Y, Satoh K, Hayasaki H, Fukumoto S, Fujiwara T, Nonaka K: The P561T polymorphism of the growth hormone receptor hene has an inhibitory effect on mandibular growth in young children. *Eur J Orthod* 31:536-541,2009

36. Nagata K, Matumoto K, Esumi G, Teshiba R, Yoshizaki K, Fukumoto S, Nonaka K, Taguchi T: Connexin43 plays an important role in lung development. *J Pediatr Surg* 44:2296-2301,2009
37. 山口 朗: 骨形成と骨再生. 59-68, 口腔外科ハンドマニュアル09 (日本口腔外科学会編), クインテッセンス出版株式会社, 2009
38. 飯村忠浩, 中根綾子, 姫野彰子, 杉山真由, 山口 朗: 骨の形態的解析法の進歩; 骨のIn vivo 蛍光イメージングの現状と展望. 骨形態計測学会雑誌 (印刷中)
39. 春日井昇平: 歯科領域での骨の再生の基礎と臨床: 歯科インプラント治療と骨造成 東京都歯科医師会雑誌 57:447-454, 2009
40. 齋藤正寛, 池田悦子, 中尾一久, **辻 肇**. 歯の再生医療の最前線「再生歯による歯欠損部の機能的な再生」 歯界展望 (医歯薬出版株式会社), **115**, 9-16,2010
41. 大島正充, **辻 肇**. 歯の再生研究の進展と課題、再生医療 (メディカルレビュー社), **9**, 76-83, 2010
42. **辻 肇**. 口腔組織 (歯、歯周組織、軟骨、象牙質) の再生 - 歯科再生治療の実現に向けた研究戦略と展開 -, 歯科医療の未来を創る (日本歯科医学会), 15-19, 2010
43. 森田梨津子, **辻 肇**. 次世代再生医療としての機能的な歯の再生、月刊バイオインダストリー (シーエムシー出版), **27**,44-51, 2010

著書

1. 春日井昇平: インプラント治療の現状と最近の進歩: 再生医療との関わり. Minimally Intervention 時代の歯科知識 (吉山昌宏、伊藤博夫、十河基文編)、永末書店、pp10-26、2009
 2. 春日井昇平: 細胞増殖のためのバイオマテリアルの利用 再生部位確保膜 歯周組織 (GTR). 患者まで届いている再生誘導治療 (田畑泰彦編)、株式会社メディカルドウ、pp81-84、2009
 3. 春日井昇平: インプラント手術をマスターするための関連機材マニュアル 診断機材からピエゾサージェリーまで (春日井昇平、古賀剛人、嶋田淳 編)、クインテッセンス出版、2009
- ## 2. 学会発表
- ### 招待講演
1. 山口 朗: 脊椎動物における骨格形成の変遷、第52回日本骨粗鬆症財団教育ゼミナール、持田製薬ルークホール、2009年6月5日
 2. 山口 朗: ビスフォスフォネート関連顎骨壊死の病理学的特徴. ワークショップ: ビスフォスフォネート系薬剤と顎骨壊死、第34回日本外科系連合学会学術集会、東京ドームホテル、2009年6月19日
 3. 山口 朗: ビスフォスフォネート関連顎骨壊死の病理学的所見 (招待講演)、ビスフォスフォネート関連顎骨壊死-現状と対策-、神奈川県臨床整形医会、2009年10月24日 (横浜ベイシエラトンホテル)
 4. Yamaguchi A: Role of Notch Signaling in Bone Formation. The 26th Naito Conference on Osteobiology. Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan. Nov 5, 2009
 5. 山口 朗: ビスフォスフォネート関連顎骨壊死の病理、北海道大学歯学部「BONE 講座」特別講演、札幌、2010年1月7日
 6. Yamaguchi A: Molecular mechanism of bone destruction by oral squamous cell carcinoma. International symposium on oral cancers, systemic diseases and bone. College of Dental Medicine, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan, Mar 36, 2010
 7. 春日井昇平: CAD/CAM はインプラント治療を大きく変えた. 特別講演 第1回歯科 CAD/CAM 学会 2010.03.27 都市センターホテル 東京
 8. Kasugai S, Takebayashi A, Furusawa K. Novel surgical guiding system with a laser beam. 25th