

回再生医療の実用化に関するニーズ発表会、兵庫、神戸臨床研究情報センター、2010年2月26日

12. **辻 肇**、歯科再生治療の実現に向けた研究戦略と展開、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター運営委員会承認学術集会、埼玉、埼玉医科大学、2010年3月2日

13. **辻 肇**、三次元的な細胞操作による機能的な歯の再生、マルチスケール操作によるシステム細胞工学(バイオ操作)第8回公開シンポジウム、福岡、九州大学、2010年3月11日

14. **辻 肇**、次世代再生医療としての「歯の再生」の戦略と展開、第9回日本再生医療学会総会、広島、広島国際会議場、2010年3月19日

3) 学会発表(国際学会)

1. Masahiro Saito and **Takashi Tsuji**, The forefront of regeneration therapy for tooth, The 4th Conference of Asian International Association of Dental Traumatology, Beijing, China, November 1, 2009.

2. Kazuhisa Nakao, Mayumi Murofushi, Miho Ogawa and **Takashi Tsuji**, Regulations of size and shape of the bioengineered tooth by a cell manipulation method, MHS2009 & Micro-Nano Global COE, Nagoya, Japan, November 10, 2009.

4) 学会発表(国内学会)

1. 池田悦子、森田梨津子、中尾一久、石田研太郎、仲村崇、水野光政、山本照子、春日井昇平、**辻 肇**、再生歯胚の成体口腔内における萌出および咬合機能の解析、第63回日本口腔科学会学術集会、浜松、2009年4月16日

2. 池田悦子、森田梨津子、中尾一久、石田研太郎、水野光政、小川美帆、山本照子、春日井昇平、**辻 肇**、成体顎骨内における再生歯の萌出と口腔機能の解析、第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、仙台、2009年6月16日

3. 森田梨津子、野本洋平、福田隆一、中尾一久、**辻 肇**、器官原基法による再生歯胚の発生解析、日本バイオイメージング学会、岡山、就実大学、2009年9月4日

4. 中尾一久、室伏真由美、小川美帆、**辻 肇**、細胞操作による再生歯の形態制御技術の開発、第7回日本再生歯科医学会学術大会・総会、福岡、九州歯科大学、2009年9月12日

5. 森田梨津子、池田悦子、中尾一久、石田研太郎、山本照子、小川美帆、水野光政、春日井正平、**辻 肇**、成体口腔内に萌出した再生歯の長期安定性と機能の解析、第7回日本再生歯科医学会学術大会・総会、福岡、九州歯科大学、2009年9月12日

6. 池田悦子、中尾一久、小川美帆、山本照子、**辻 肇**、再生歯の顎連携機能と侵害刺激応答能の解析、第54回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、北海道、札幌コンベンションセンター、2009年10月10日

7. 池田悦子、中尾一久、森田梨津子、石田研太郎、**辻 肇**、再生歯の成体口腔内における萌出および咬合機能の解析、第54回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、北海道、札幌コンベンションセンター、2009年10月10日

8. 池田悦子、中尾一久、小川美帆、水野光政、春日井昇平、山本照子、**辻 肇**、成体口腔内における再生歯の萌出の解析および歯根膜機能の解析、第68回日本矯正歯科学会大会、福岡、マリンメッセ福岡、2009年11月17日

9. 池田悦子、森田梨津子、中尾一久、小川美帆、水野光政、山本照子、**辻 肇**、再生歯における神経線維の侵入とメカニカルストレスに対する刺激応答能の解析、第68回日本矯正歯科学会大会、福岡、マリンメッセ福岡、2009年11月17日

10. Ritsuko Morita, Etsuko Ikeda, Kazuhisa Nakao, Kentaro Ishida, Teruko Takano-Yamamoto, Miho Ogawa, Mitsumasa Mizuno, Syohei Kasugai & **Takashi Tsuji**, Analysis of long-term stability and function of a bioengineered tooth regenerated in adult oral environment, 第32回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2009年12月12日

11. Kazuhisa Nakao, Mayumi Murofushi, Miho Ogawa, **Takashi Tsuji**, Regulations of size and shape of a bioengineered tooth by organ germ method, 第32回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2009年12月12日
12. Kentaro Ishida, Kazuhisa Nakao, Masato Yasukawa, Takashi Sasaki, **Takashi Tsuji**, Investigation of molecular mechanisms of development of regenerated tooth germ in bioengineered organ germ method, 第32回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2009年12月12日
13. 森田梨津子、池田悦子、中尾一久、石田研太郎、山本照子、小川美穂、水野光政、春日井昇平、**辻 肇**、成体口腔内で成長した再生歯の長期的な機能安定性の解析、第9回日本再生医療学会総会、広島、広島国際会議場、2010年3月18日
14. 齋藤正寛、織田真史、筒井仰、関口清俊、羽田康叙、大島正充、中尾一久、**辻 肇**、Adamts15bはマイクロフィブリル再生を介してマルファン症候群の歯根膜形成不全を回復させる、第9回日本再生医療学会総会、広島、広島国際会議場、2010年3月19日
15. 中尾一久、室伏真由美、小川美帆、**辻 肇**、歯科再生医療を目指した再生歯の形態制御技術の開発、第9回日本再生医療学会総会、広島、広島国際会議場、2010年3月19日

3. その他（報道発表）

3) 国内報道

① 新聞（主要新聞、地方新聞）

日本経済新聞(H21/8/4、1面)、読売新聞(H21/8/4、2面)、毎日新聞(H21/8/4、2面)、朝日新聞(H21/8/4、29面)、東京新聞(H21/8/4、1面)、日経産業新聞(H21/8/4、11面)、日刊工業新聞(H21/8/4、24面)、西日本新聞(H21/8/9 夕刊、1面)、日本歯科新聞(H21/8/5、1面)、産経新聞(H21/8/4、3面)、Fuji Sankei Business i. (H21/8/4、12面)、

北海道新聞(H21/8/4、26面)、中日新聞(H21/8/4、25面)、共同通信(H21/8/4)、時事通信(H21/8/4)、釧路新聞(H21/8/4)、岩手日日新聞(H21/8/4)、河北新報(H21/8/4)、上毛新聞(H21/8/4)、山梨日日新聞(H21/8/4)、長野日報(H21/8/4)、信濃毎日新聞(H21/8/4、1面)、静岡新聞(H21/8/4)、岐阜新聞(H21/8/4)、新潟日報(H21/8/4)、北日本新聞(H21/8/4)、富山新聞(H21/8/4)、北國新聞(H21/8/4)、北陸中日新聞(H21/8/4)、福井新聞(H21/8/4)、日刊県民福井(H21/8/4)、伊勢新聞(H21/8/4)、京都新聞(H21/8/4)、神戸新聞(H21/8/4)、山口新聞(H21/8/4)、四国新聞(H21/8/4、3面)、徳島新聞(H21/8/4)、高知新聞(H21/8/4)、愛媛新聞(H21/8/4)、佐賀新聞(H21/8/4、2面)、八重山毎日新聞(H21/8/5)、THE DAILY YOMIURI(H21/8/7)、夕刊フジ(H21/8/8)、琉球新報(H21/8/10)、奈良日日新聞(H21/8/11)、沖縄タイムス(H21/8/12、16面)、THE NIKKEI WEEKLY(H21/8/17)、室蘭民報(H21/8/24)、十勝毎日新聞(H21/8/4)、夕刊デイリー(H21/8/4)、THE JAPAN TIMES(H21/8/4)、SANKEI EXPRESS(H21/8/4)、化学工業日報(H21/8/4、8面)、日本農業新聞(H21/8/4)、聖教新聞(H21/8/4)、公明新聞(H21/8/4)

② WEB（国内40サイト以上）

日本経済新聞(H21/8/4)、毎日新聞(H21/8/4)、読売新聞(H21/8/4)、朝日新聞(H21/8/4)、河北新報(H21/8/4)、四国新聞(H21/8/4)、京都新聞(H21/8/4)、神戸新聞(H21/8/4)、静岡新聞(H21/8/4)、中国新聞(H21/8/4)、中日新聞(H21/8/4)、長崎新聞(H21/8/4)、西日本新聞(H21/8/4)、東奥日報(H21/8/4)、財經新聞(H21/8/4)、時事ドットコム(H21/8/4)、など

③ テレビ・ラジオ報道

テレビ東京「NEWS FINE」(H21/8/4)、J-WAVE「TOKYO MORNING RADIO」(H21/8/5)、NHK国際放送局「Radio Japan Focus - Restoring lost teeth and hair」(H22/3/1)

④ 雑誌

Mail Express (H21/8)、小田原歯会報 (H21/9)、
月刊ジュニアエラ 44 (H21/10)、歯界展望 114、
636 (H21/10)、月刊ビジネスアスキー388、58-59
(H21/11)、メディカル朝日 4月号、73-75 (H22/4)

4) 国外報道

① WEB (国外 180 サイト以上)

【米国】PNAS (H21/8/3)、Reuters (H21/8/3)、
AAAS (H21/8/3)、Forbes (H21/8/3)、WORLD
SCIENCE (H21/8/3)、National Geographic (H21/8/4)、
The Money Times (H21/8/4)、THE WALL
STREET JOURNAL (H21/8/10)、FOX NEWS
(H21/8/25)

【カナダ】CBC News (H21/8/4)

【イギリス】BBC News (H21/8/4)、Times
(H21/8/4)、guardian.co.uk (H21/8/4)、Telegraph.
(H21/8/4)

【ドイツ】FOCUS Online (H21/8/4)、Augsburger
Allgemeine (H21/8/4)

【フランス】Le Figaro (H21/8/4)、FRANCE24
(H21/8/4)、Futura-Sante (H21/8/4)、TV5MONDE
(H21/8/4)

【イタリア】Messaggero (H21/8/4)、ANSA
(H21/8/4)、asca (H21/8/4)、DELFI (H21/8/4)、

【ロシア】Medinfo (H21/8/4)、NEWSru.com
(H21/8/4)、GEATA (H21/8/4)、E-NEWS (H21/8/5)

【オーストラリア】ABC news (H21/8/4)、Herald
Sun (H21/8/4)、The Australian (H21/8/4)、Tweed
Daily News (H21/8/4)、World News (H21/8/4)

【ニュージーランド】TVNZ (H21/8/4)

【中国】China Daily (H21/8/4)、CNETNews
(H21/8/4)、大紀元 (H21/8/4)、中国科学院
(H21/8/4)

【スイス】Le Matin (H21/8/4)、NZZ Online
(H21/8/4)

【オランダ】Foknews (H21/8/4)

【アイルランド】IRISHTIMES.COM (H21/8/4)

【スペイン】El Diario Montanes (H21/8/4)、
IBLNEWS (H21/8/4)、Publico (H21/8/4)

【インド】MedIndia (H21/8/4)

【南アフリカ】The Times (H21/8/4)、DailyNews
(H21/8/4)

【メキシコ】ELECONOMISTA.COM.MX
(H21/8/4)、gentebien (H21/8/4)

【ブラジル】terra (H21/8/4)、TV Canal13 (H21/8/4)

【アルゼンチン】Primera Edicion (H21/8/4)

② テレビ報道

【米国】Reuters テレビジョン (H21/8/1)、AFP テ
レビジョン (H21/11/9)

【中国】New Tang Dynasty Television (H21/8/24)

【フランス】NTDFrench (H21/9/7)

③ 雑誌

【米国】JAMA 302(11)、1161 (H21/9)

【フランス】BIOFUTUR 303、11 (H21/10)、
SCIENCE & VIE 17、16-17 (H21/10)、La Recherche
436、28-29 (H21/12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

社 掌、池田悦子、朝井洋明 (出願人：オーガン
テクノロジーズ)：歯欠損部の修復方法：外国特
許出願 PCTJP2009/064509、平成 21 年 8 月 19 日

社 掌、中尾一久 (出願人：オーガンテクノロジー
ズ)：歯の製造方法：外国特許出願
PCTJP2010/000180、平成 22 年 1 月 14 日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

歯根再生法の開発と再生歯の評価
（イヌでの移植歯胚の発生・萌出モデルの開発）

研究分担者 窪木 拓男 岡山大学医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：マウスにおいて確立されている器官原基法による再構成歯胚の移植・機能回復を、大型動物であるビーグル犬にも適応できるモデルを作成するため、ビーグル犬胎仔から発生期にある歯胚を摘出し、顎骨への他家移植を行って、継続的な発生・萌出が達成される手技・条件を確立する。

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口腔機能を十分に回復することが困難な場合が多い。本研究では、実験的再生歯の臨床応用の基盤技術開発を目的に、マウスにおいて確立されている器官原基法による再構成歯胚の移植・機能回復を、大型動物であるビーグル犬にも適応できるモデル作成を試みた。すなわち、再構成歯胚の移植・萌出モデルの確立を目指し、ビーグル犬胎仔から発生期にある歯胚を摘出し、顎骨への他家移植を行って、継続的な発生・萌出が達成される手技・条件を確立することを目的とした。

B. 研究方法

本報告書に記載の実験は、すべて本学動

物実験管理委員会の許可を受けて行った。

1. 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、全身麻酔下で抜歯を行い、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。

2. 移植歯の萌出モデルの検討

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。

C. 研究結果

1. 移植対象部位の検討

拔牙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拔牙を行うことで、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、拔牙後3か月で拔牙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ということが確認できた。

2. 移植歯の萌出モデルの検討

これまでの文献の情報と、本事業の研究分担者である東京理科大学辻教授との情報交換から、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。そこで、今後の移植実験には免疫抑制剤の投与を行い、免疫抑制状態としたうえで胎仔歯胚移植を行うこととした。

すなわち、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うとともに、3か月後には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した。すなわち、サイクロスポリンの免疫抑制効果は得られているものとする。

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。

D. 考察

1. 移植対象部位の検討について

ビーグル成犬顎骨の他部位についても検討を行った。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。したがって、下顎小白歯部を移植対象部位とした。

2. 移植歯の萌出モデルの検討について

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ので、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。

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（歯小嚢等）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。

E. 結論

ビーグル成犬への移植対象部位は、下顎小白歯4本を抜歯後3か月経過した部位とした。

ビーグル犬胎仔から摘出した歯胚の別個体ビーグル成犬への移植では、免疫反応や移植窩洞の骨の治癒速度を考慮した上で行う必要があることが確認された。さらには、移植する歯や歯胚の発達ステージが移植結果に影響を及ぼす可能性もあり、今後のさらなる検討が必要であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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. 2010 Jan;109(1):86-90.
2. 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.* 2010 Jan;54(1):36-41.
3. 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.* 2009 Apr 10;159(4):1422-9.
 4. 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*. *Journal of Endodontics* 35: 367-372,2009
 5. 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.* 2009 May;36(5):362-7.
 6. 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.* 2009 Feb;145(2):207-16.
- Okamoto Y, Oshima M, Ueda M, Oida Y, Matsuka Y, Kuboki T: Characterization of putative amelo- genic cells isolated from human dental follicle. 6th Biennial Congress of Asian Academy of Prosthodontics (Abstract 146-147) (2009年4月25日, Seoul, Korea)
2. Oida Y, Ono M, Sonoyama W, Inkson C, Kuboki T, Young M: Vitamin D3 Modulates the Expression of CCN4/WISP-1 in Osteogenic Cells. The 2nd International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama (Abstract 94) (2009年5月17日, Okayama, Japan)
 3. Uchibe K, Shimizu H, Yokoyama S, Sonoyama W, Kuboki T, Asahara H: Identification of transcription- regulating genes expressed during murine molar development. The 2nd International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama (Abstract 89) (2009年5月17日, Okayama, Japan)
 4. 岡本洋介, 園山 亘, 大野充昭, 秋山謙太郎, 藤澤拓生, 大島正充, 土本洋平, 松香芳三, 窪木拓男: シンバスタチンによるヒト歯髄幹細胞の増殖制御と硬組織形成促進. 社団法人日本補綴歯科学会 第118回学術大会 (抄録集78) (2009年6月6日, 京都)
 5. Shimono K, Ono M, Sonoyama W, Kanyama M, Oshima M, Wakabayashi M, Sebald W, Sugama K, Kuboki T: Genetically modified recombinant human BMP-2 with additional heparin binding domain enhanced bone formation around titanium dental implant: 5th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration (Abstract 47)(2009年11月

学会発表

1. Tsuchimoto Y, Sonoyama W, Shinkawa S,

21日, Bali, Indonesia)

6. 内部健太, 浅原弘嗣, 窪木拓男: 発生期歯胚において発現する新規遺伝子群の同定とその発現パターン解析. 歯科補綴ウインタースクール淡路2009 (抄録集30) (2009年11月14日, 淡路)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

研究分担者 福本 敏 東北大学大学院歯学研究科教授

研究要旨：再生歯作成の為の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う。またこれら細胞を用いて、歯関連細胞への分化過程における時空間的遺伝子発現を明らかにし、より簡便で安全な細胞調整法開発を目指す。また、再生歯における機能的な形態付与を目的とした、歯の形態形成メカニズムの分子機構とその制御法を明らかにする。

A. 研究の目的

歯の再生には、器官原基法などを用いた再生技術の開発や、再生歯を作成する為の細胞シーズの探索が必要である。そこで本研究では、iPS 細胞や歯髄中に存在する歯髄幹細胞の利用を考え、これら細胞から歯の構築に必要な細胞群の分化誘導システムの構築を目的とする。また、再生歯に機能的な形態形成を付与する為に、歯の大きさや咬頭-溝形成に関わる分子機構を明らかにする。

B. 研究方法

本報告書に記載の実験は、すべて本学動物実験管理委員会の許可を受けて行った。

今回、歯の構築に必要な細胞群の大量調整法の開発のため、上皮系細胞として 1) iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化誘導、2) 間葉系細胞として歯髄幹細胞の

分離法の開発を試みた。iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化誘導システムの開発の為に、ラット由来歯原性上皮細胞との共培養による誘導法をおこなった。歯髄幹細胞については、歯髄細胞と歯髄幹細胞の形態や遺伝子発現パターンを明らかにし、分化した細胞集団からパーシャルリプログラミングにより、歯髄幹細胞を誘導するようなケミカルコンパウンドの同定を試みた。

また、歯の形態形成メカニズムの解明の為に、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。

C. 研究結果

iPS 細胞から歯髄細胞を誘導する方法と

して、ラット由来の歯原性上皮細胞とマウス由来 iPS 細胞の共培養を行った。iPS 細胞は約 1 週間で、細胞間が明瞭な細胞に変化し、10 日後には上皮細胞様の細胞形態を有する細胞へと変化した。混合培養後 14 日目の iPS 細胞において、エナメル上皮のマーカであるアメロブラステンの遺伝子発現を解析した結果、その発現が新たに生じているのが明らかとなった。この結果から、我々の混合培養システムを用いることで、効率よく iPS 細胞をエナメル芽細胞に分化誘導することが可能となった。現在、本細胞を用いて、人工的なエナメル質形成が可能かどうか検討を行っている。

さらに我々は、FDA で臨床応用が可能で、かつ機能の不明な薬剤のスクリーニングから、分化した歯髓細胞から、歯髓幹細胞へリプログラミングさせる薬剤の同定に成功した。本薬剤を分化した歯髓細胞に添加することで、約 48 時間後には未分化マーカーである Oct4 や Nanog の発現を上昇させることを確認した。また、細胞形態も上述の歯髓幹細胞株と類似していた。また、本薬剤を培養液から取り除くと、細胞自身の分化能が回復した。異常の結果から、本薬剤を用いることで、幹細胞を自在に作出できる可能性が出てきた。現在、本薬剤の分子機能と、本薬剤を用いて作製した細胞の多分化能について検討を行っている。

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。

D. 考察

iPS 細胞からエナメル芽細胞へ分化誘導が可能となったことから、分化誘導過程における遺伝子発現の時空間的な変化を詳細にすることで、より簡便な分かつ誘導法開発への手がかりになると考えられた。また、今まで胎児由来の細胞を利用していた実験的再生歯作成において、iPS 細胞を使用することが可能となり、人への応用に近づくものと考えられた。歯髓細胞中のわずか 0.5-1% 程度しか存在しない歯髓幹細胞について、単一薬剤により歯髓細胞から歯髓幹細胞を作成できたことから、幹細胞の分離精製過程を必要とせず、簡便にかつ大量に歯髓幹細胞を利用できるようになった。このことは、歯の再生のみならず、神経変性疾患や骨再生にも利用可能な、大変有用な技術となりうる。

また、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、歯の前後径を規程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。

E. 結論

本研究の成果から、iPS 細胞から歯原性上皮細胞（エナメル芽細胞）へ、また分化した歯髓細胞から歯髓幹細胞へ分化誘導できるシステムの構築が可能となった。また、歯の横幅の決定に関わる分子機能を明らかにすることができた。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 2009;54(10):963-9
2. 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.

2009;43(1):17-24

3. 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. 2010;55(6):426-43
4. 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. 2009;284(40):27176-84
5. 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. 2009;88(4):318-22.
6. Sakaki Y, Satoh K, Hayasaki H, Fukumoto S, Fujiwara T, Nonaka K.: The P561T polymorphism of the growth hormone receptor gene has an inhibitory effect on mandibular growth in young children. Eur J Orthod. 2009;31(5):536-41.
7. 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. 2009;44(12):2296-301.

2. 学会発表

1. 福本敏、子どもの発育と「むし歯」について一乳歯の大切さについて一、宮城県県民公開講座(主催：宮城県歯科医会)、仙台市、2010年3月
2. 歯のかたちづくりの分子制御、QOL再生工学分野ミニシンポジウム「発生プロセスをふまえた組織再生の可能性と課題」、徳島市、2010年1月
3. 福本敏、iPS細胞から歯の再生への挑戦、第8回産学連携フォーラム(主催：歯科再生医療産学連携会議)、東京、2009年12月
4. 福本敏、Identification of tooth specific genes、3rd Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry、広島市、2009年11月
5. 福本敏、Possible role of functional restorative and preventive materials in Pediatric Dentistry、Special Lecture: Korea academy of Pediatric Dentistry、韓国、2009年10月
6. 福本敏、最新の小児歯科医療、教育講演：第27回日本小児歯科学会北日本地方会大会および総会、石巻市、2009年10月
7. 福本敏、エナメル質形成に関わる新規分子機構の解明、サテライトシンポジウム：第51回歯科基礎医学会学術大会、新潟市、2009年10月
8. 福本敏、エナメル質形成の分子制御機構、ミニシンポジウム3 歯と歯周組織、骨の再生：第27回日本骨代謝学会学術集会、大阪市、2009年7月
9. 福本敏、歯の数や形はどのように決まるのかー一ヒト疾患から分かる歯の形成メカニズムー、基礎講演：第47回日本小児歯科学会大会および総会、大阪市、2009年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

歯根再生法の開発と再生歯の評価

（イヌモデル組織工学的な人工再生歯根技術の開発）

研究分担者 園山 亘 岡山大学病院 助教

研究要旨：前臨床モデルとしての基礎研究において汎用性の高いビーグル犬を用いて、組織工学的な人工再生歯根技術を開発・確立する。

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口腔機能を十分に回復することが困難な場合が多い。本研究では、ミニブタモデルでの報告がある組織幹細胞を用いた組織工学的な人工再生歯根技術を、前臨床モデルとしての基礎研究において汎用性の高いビーグル犬において実施し、その技術を開発・確立することを目的とした。

B. 研究方法

本報告書に記載の実験は、すべて本学動物実験管理委員会の許可を受けて行った。

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

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抜歯した。抜歯後、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、歯髓組織を分離した。分離した歯髓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）とデイスパーゼ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 KH_2PO_4 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°C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抜歯を行ったビーグル成犬の抜歯後の顎骨の治癒を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。

C. 研究結果

1. ビーグル成犬抜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ったため、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。レントゲンの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。

D. 考察

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

各個体の抜去歯から歯髄細胞、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、歯髄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である。

分離したイヌ歯髄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、歯髄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

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ホードの作製を目指し、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

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臼歯部の撮影は困難なことから、第二小臼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。

E. 結論

ビーグル成犬抜去歯から得た歯髄組織ならびに歯根膜組織より、硬組織形成能を有する細胞を分離することが可能であった。

歯根型スキャホードとしては、現時点ではβ TCPとHAが適切であると考えられた。

ビーグル顎骨へ、歯根型スキャホードとともに歯髄細胞、歯根膜細胞を自家移植することができた。現在、組織学的な解析準備中である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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.* 2010 Jan;54(1):36-41.
2. 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.* 2009 Apr 10;159(4):1422-9.

3. 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*. *Journal of Endodontics* 35: 367-372,2009

学会発表

1. Tsuchimoto Y, Sonoyama W, Shinkawa S, Okamoto Y, Oshima M, Ueda M, Oida Y, Matsuka Y, Kuboki T: Characterization of putative amelo- genic cells isolated from human dental follicle. 6th Biennial Congress of Asian Academy of Prosthodontics (Abstract 146-147) (2009年4月25日, Seoul, Korea)
2. Oida Y, Ono M, Sonoyama W, Inkson C, Kuboki T, Young M: Vitamin D3 Modulates the Expression of CCN4/WISP-1 in Osteogenic Cells. The 2nd International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama (Abstract 94) (2009年5月17日, Okayama, Japan)
3. Uchibe K, Shimizu H, Yokoyama S, Sonoyama W, Kuboki T, Asahara H: Identification of transcription- regulating genes expressed during murine molar development. The 2nd International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama (Abstract 89) (2009年5月17日, Okayama, Japan)
4. 岡本洋介, 園山 亘, 大野充昭, 秋山謙太郎, 藤澤拓生, 大島正充, 土本洋

平, 松香芳三, 窪木拓男: シンバスタチンによるヒト歯髄幹細胞の増殖制御と硬組織形成促進. 社団法人日本補綴歯科学会 第118回学術大会 (抄録集78) (2009年6月6日, 京都)

5. Shimono K, Ono M, Sonoyama W, Kanyama M, Oshima M, Wakabayashi M, Sebald W, Sugama K, Kuboki T: Genetically modified recombinant human BMP-2 with additional heparin binding domain enhanced bone formation around titanium dental implant: 5th Scientific Meeting of the Asian Academy of

Osseointegration (Abstract 47)(2009年11月21日, Bali, Indonesia)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Repetition of continuous PTH treatments followed by periodic withdrawals exerts anabolic effects on rat bone

Masaya Etoh · Akira Yamaguchi

Received: 10 January 2010 / Accepted: 7 March 2010
© The Japanese Society for Bone and Mineral Research and Springer 2010

Abstract Various animal experiments and human studies have shown that intermittent injections of parathyroid hormone (PTH) exert anabolic effects on bone, whereas continuous PTH treatment decreases the bone mass and causes hypercalcemia in animals. However, limited data are available with regard to the effects of a repetitive regimen of continuous treatments of PTH followed by periodic withdrawals on the bone metabolism. We investigated the effects of this regimen by comparing the findings of intermittent and continuous PTH treatments in rats. Infusions of PTH for 24 h followed by 6-day withdrawal periods from PTH transiently increased the serum calcium levels on day 1, but these levels were within the normocalcemic range. The repetition of 4 cycles of continuous PTH infusions followed by PTH withdrawals as well as intermittent PTH treatment increased the trabecular bone thickness, osteoblast surface, and bone formation rate. Continuous PTH infusions followed by PTH withdrawals also increased the cortical thickness of the femoral diaphysis and the osteoid volume in trabecular bones, whereas the continuous treatment failed to induce these changes. These findings suggest that continuous PTH treatment followed by PTH withdrawal is a potential regimen that

can induce the anabolic effects of PTH in bone metabolism without inducing hypercalcemia.

Keywords Parathyroid hormone · Bone mineral density · Mechanical properties · Intermittent treatment · Continuous treatment

Introduction

Parathyroid hormone (PTH) regulates bone remodeling through its action on bone formation as well as bone resorption. Studies using serum biochemical markers and bone histomorphometric analysis have shown that both intermittent and continuous PTH treatments stimulate bone turnover in trabecular and cortical bones [1–3].

Intermittent PTH treatment, which is administered via daily injections or daily short-time infusions, increases trabecular and cortical bone mass in not only normal rats [4, 5], but also ovariectomized rats [6]. These studies revealed that the optimal exposure time and frequency required to induce anabolic effects through intermittent PTH treatment are 1 h and 1–3 times per day, respectively [5, 7]. Many human studies with intermittent PTH injections also showed apparent anabolic effects on bone mass and prevention of bone fractures [8]. Although the recommended dose regimen of Forteo, a potent Food and Drug Administration (FDA)-approved drug for the treatment of osteoporosis, is once a day by self-administered injections, compliance with this regimen is moderate because of high cost and adverse effects such as pain at the injection sites [9].

To avoid these adverse events, new suitable therapeutic regimens are required. One possible regimen is extension of the interval of intermittent PTH injection, but it has not been

M. Etoh · A. Yamaguchi (✉)
Section of Oral Pathology, Tokyo Medical and Dental University
Graduate School, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549,
Japan
e-mail: akira.mpa@tmd.ac.jp

A. Yamaguchi
Global Center of Excellence Program, International Research
Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases,
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

clearly understood whether the elongated injection interval of PTH treatment induces similar anabolic action with daily PTH injection under the same total dose of PTH [10]. A possible alternative regimen is short-term continuous PTH treatment associated with a long-term withdrawal period. In this context, continuous PTH exposure by using osmotic pumps in rats results in hypercalcemia and decreased bone mass. However, various parameters of PTH treatment regimens, such as the exposure time in the continuous treatment and periodic withdrawals, have not been well documented. If continuous PTH treatment in combination with a relatively long-term withdrawal period is found to induce an anabolic effect in bones, an alternative clinical dosing regimen can be established on the basis of these findings. For example, daily subcutaneous injections of PTH could be replaced by a weekly injection of sustained controlled release PTH. This regimen can decrease the number of injections and may prevent patients from discontinuing the treatment. Furthermore, sustained pharmacokinetics may be more acceptable in the oral administration of PTH-mimicking peptides by using a drug delivery system [11].

In the present study, we conducted experiments to investigate a new therapeutic regimen of PTH administration that induces anabolic effects on bone metabolism that are comparable with those of classical intermittent PTH administration. We compared the effects of three regimens: intermittent PTH treatment, continuous PTH treatment, and repetition of continuous PTH treatments followed by periodic withdrawals. Here, we show that continuous PTH administration with periodic withdrawals exerts an anabolic effect on the bone metabolism in rats.

Materials and methods

Chemicals

Synthetic human PTH (1–34) was purchased from the Peptide Institute (Osaka, Japan) and prepared at an appropriate dose in a vehicle (10 mM acetic acid, 2% heat-inactivated rat serum in sterile PBS). Calcein was purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Animals

Nine-week-old female Sprague-Dawley rats (Charles River, Kanagawa, Japan) were used in this study. They were maintained under 12:12 h light/dark cycles with unrestricted access to tap water and a standard diet containing 1.2% Ca, 0.9% P, 22% protein, and 6.2 IU vitamin D3 per gram (CRF-1; Oriental Yeast, Tokyo, Japan). The animals were allowed to acclimatize for 12 days before the start of the experiment. The animal studies were performed in compliance with the

standards mentioned in the Care and Management of Laboratory Animals and Relief of Pain (Notice no. 88 of the Japanese Ministry of Environment, 2006).

Experimental groups

As shown in Table 1, the rats were divided into three groups (intermittent PTH treatment group, continuous PTH treatment group, and continuous PTH treatment with withdrawal group) with equal body weight distributions. Intermittent PTH treatments were administered by subcutaneous injections of PTH with a total dose of 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$. This group comprised three regimens: PTH injection (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) once a week (I \times 1-PTH), PTH injection (13.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 3 times a week (I \times 3-PTH), and vehicle injection 3 times a week (I-CON). Continuous PTH treatment was conducted by subcutaneous implantation of Alzet micro-osmotic pumps (Model 1007D; Durect Corp., CA), which constantly deliver a fluid for 7 days. The Alzet pumps were aseptically filled with appropriate amounts of PTH or the vehicle, and the pumps were replaced every week. This group also comprised three regimens. The first regimen was continuous PTH treatment with a dose of 0.24 $\mu\text{g}/\text{kg}/0.5 \mu\text{l}/\text{h}$ (C40-PTH), in which the total dose of PTH supplement (40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$) was administered. The second regimen was continuous PTH treatment with a dose of 1.67 $\mu\text{g}/\text{kg}/0.5 \mu\text{l}/\text{h}$ (C280-PTH), in which the total dose of PTH 280 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ was administered. This regimen was used as a positive control for PTH-induced hypercalcemia. The third regimen of this group was continuous treatment with the vehicle (C-CON). Continuous PTH treatment with withdrawal (PTH-WD) was conducted by continuous PTH treatment for 24 h through the subcutaneously implanted Alzet micro-osmotic pumps (Model

Table 1 Experimental design

Experimental group	Total dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$)	Abbreviations
Intermittent		
Control	0	I-CON
PTH 40 $\mu\text{g}/\text{kg} \times 1$ injection/week	40	I \times 1-PTH
PTH 13.3 $\mu\text{g}/\text{kg} \times 3$ injections/week	40	I \times 3-PTH
Continuous		
Control	0	C-CON
PTH 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$	40	C40-PTH
PTH 280 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$	280	C280-PTH
Continuous-withdrawal		
Control	0	CON-WD
PTH 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/24 \text{ h}$ 6-day withdrawal	40	PTH-WD

1003D), which were removed from the animals 24 h after the implantation, followed by withdrawal of PTH treatment for 6 days. In this regimen, the dose of PTH was 1.67 $\mu\text{g}/\text{kg}/0.9 \mu\text{l}/\text{h}$, which is equivalent to 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/24 \text{ h}$. Each osmotic pump was filled up more than 6 h before implantation and stored in sterile saline at 37°C so that pumping could be initiated immediately after implantation. The total amount of PTH administered was identical for all the injection and infusion groups (40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$), except for the C280-PTH group (280 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$).

Serum calcium levels were measured for 1 week during the various PTH treatments described above. All of the PTH treatments induced no significant differences in body weight gain as compared with the control rats (data not shown).

Measurement of serum calcium

Under ether anesthesia, approximately 200 μl of blood was obtained from the subclavian vein immediately before and 24, 48, 72, and 168 h after implantation or the first injection of PTH. The blood was centrifuged, and the serum was stored at -80°C . Total serum calcium was determined using an automated analyzer (Super Z818; MC Medical, Tokyo, Japan) and the Calcium E-HA test Wako (Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Tokyo, Japan).

Preparation of bone samples

Calcein (10 mg/kg) was subcutaneously administered to all rats on the 10th and 3rd days before death. At the end of the experiment, the animals were anesthetized with diethyl ether and killed by cardiectomy. The right and left femurs and the right tibia were removed. The right and left femurs were stored at -20°C , and the right femurs were analyzed using dual energy X-ray absorptiometry (DXA) and micro-computed tomography (μCT), and left femurs were used for mechanical properties analysis. For bone histomorphometry, the tibiae were fixed for 24 h in 10% phosphate-buffered formalin, which was subsequently replaced with 70% ethanol. Histological sections were obtained as described below.

Measurement of bone mineral density

The bone mineral density (BMD; mg/cm^2) of the right femur was measured using DXA (DCS-600EX-IIIR; Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan) with a scan pitch of 1 mm and a scan speed of 25 mm/s.

μCT analysis

For cortical bone analysis, the midpoint of the femur diaphysis was scanned at a voxel size of $12.5 \times 12.5 \times$

$12.5 \mu\text{m}^3$ by using μCT (Scan Xmate-RB090SS150; ComscanTechno, Kanagawa, Japan) with an X-ray source of 70 kV/100 μA . The obtained images were reconstructed and processed using 3D image analysis software (TRI/3D-BON; RATOC System Engineering, Tokyo Japan). Four slices (thickness, 50 μm) of bone were examined, and the mean cortical thickness (μm) was measured.

Analyses of the mechanical properties of bones

The cantilever bending strength of the femoral neck was measured according to a previously described method [12] by using a mechanical testing machine (EZ-L-1kN; Shimadzu, Kyoto, Japan); subsequent data were analyzed using this machine's enclosed software package. Before performing the femoral neck compression test, the femora were thawed at room temperature. For the test, the femur was cut at the midpoint of its diaphysis. The proximal part of each specimen was mounted in methacrylate resin (OSTRON-II; GC Dental Products Co., Aichi, Japan) to fix the specimen to the fixation device. The specimen was then placed on the test apparatus, and a vertical load was applied to the top of the femoral head by using a stainless steel cylinder equipped with a small, concave steel cup at its end. The loading was directed parallel to the femoral shaft. On the basis of the load-deformation curve, the maximum load (N), stiffness (N/mm), and energy to fracture (N mm) were recorded.

Bone histomorphometry

The right proximal tibiae were kept in 70% ethanol and prestained with Villanueva bone stain for 72 h. After dehydration, they were embedded in methyl methacrylate (MMA). Frontal sections of the distal tibia (thickness, 5 μm) were obtained using a microtome. Histomorphometric analyses of metaphyseal trabecular bone were performed using the histomorphometric system for trabecular bone (BONE; System Supply, Nagano, Japan). The bone marrow cavity located 620–1240 μm from the growth plate closest to the diaphysis and 310 μm from both sides of the endosteum of the cortical bone was examined (field of view, 310×310 ; magnification, 320).

The following parameters were analyzed according to standard formulae and nomenclature [13]: bone volume/tissue volume (BV/TV [%]), trabecular thickness (Tb.Th [μm]), trabecular number (Tb.N [N/mm]), osteoblast surface/bone surface (Ob.S/BS [%]), number of osteoclasts/bone surface (N.Oc/BS [N/mm]), bone formation rate/bone surface (BFR/BS [$\text{mm}^3/\text{mm}^2/\text{year}$]), osteoid volume/bone volume (OV/BV [%]), and mineralization lag time (Mlt [days]).