

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

齋藤正寛\*<sup>1</sup>  
Masahiro Saito

池田悦子\*<sup>2</sup>  
Etsuko Ikeda

中尾一久\*<sup>2</sup>  
Kazuhisa Nakao

辻 孝\*<sup>2,3</sup>  
Takashi Tsuji

\*<sup>1</sup> 東京理科大学 基礎工学部 生物工学科

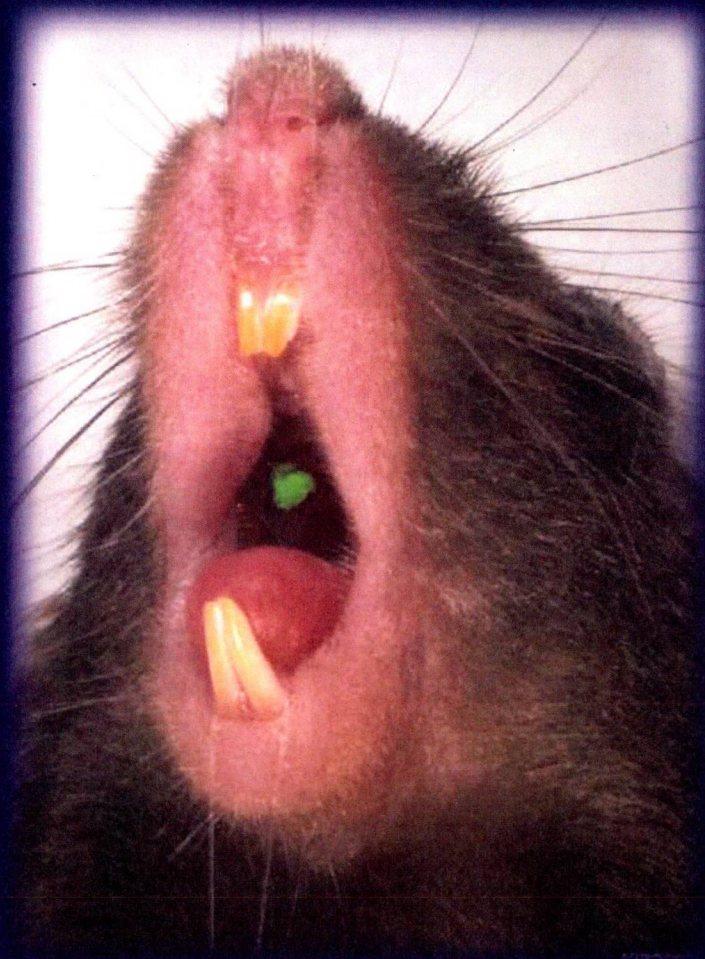
\*<sup>2</sup> 東京理科大学 総合研究機構

\*<sup>3</sup> 株式会社オーガンテクノロジー

歯は「噛む」という咀嚼機能ばかりでなく、咀嚼刺激を中枢へ伝える感覚受容器的な役割も演じている。そのため歯を再生するには、単に噛めるだけの人工物ではなく、生理的に機能する再生歯をつくりだすことが期待されている。

私たちはこの課題にアプローチするため、細胞操作により作製した「再生歯胚」から歯を再生する再生歯胚技術を開発した。再生歯胚は歯周組織を含む完全な歯の再生能力を有する。この再生歯胚を歯欠損部の顎骨に移植すると、再生歯胚は再生歯として萌出・咬合するばかりでなく、機械的外力に応答した歯槽骨のリモデリング能や、外部侵害刺激を中枢へ伝達する能力を有しており、天然歯と同じ生理機能を有する再生歯を形成できることが示された。

本技術が、口腔機能を再生する次世代の歯科再生医療の基盤技術として発展することが期待される。



## はじめに

21世紀の新たな治療システムとして「再生医療」が期待されている。

私たちは、齲蝕や傷害、歯周疾患などで喪失した歯を再生する治療技術開発に向けて、三次元的な細胞操作により歯胚を再生させる「器官原基法」を開発した<sup>1)</sup>。

また、最近では、この「再生歯胚」を成体顎骨内

に移植して生理的に機能する「再生歯」へと成長することを明らかにした。これらの技術開発から、歯欠損部を再生歯で置き換える次世代再生医療の実現可能性が示された<sup>2)</sup>。

そこで本稿では、再生歯胚を作製する細胞操作技術と再生歯の機能を概説し、臨床応用に向けた課題を述べたい。

## 歯の発生の分子機構

筆者らは、歯の再生の技術開発にあたり、歯の発生を再現することによって歯を再生する技術開発を目指した。

マウスの歯の発生の分子機構を図1に示した。歯の発生は、蕾状期歯胚から帽状期歯胚にかけて形成される歯原性上皮と歯原性間葉から始まる。帽状期歯胚になると、歯原性間葉は歯乳頭と歯小嚢を形成し、歯原性上皮からはエナメル器を形成する。鐘状期歯胚以降では、歯乳頭から歯髄と象牙質、歯小嚢からは歯周組織が形成されるとともに、エナメル

器からはエナメル質が形成される。

これらのことから歯の発生は、歯原性上皮と歯原性間葉の連続した上皮・間葉相互作用によって、歯を構成する細胞が生まだされていくと考えられている。

したがって、歯原性上皮と歯原性間葉の相互作用を生体外で再現できれば、歯の発生を人為的に誘導することが可能であり、再生歯胚より歯を再生できるのではないかと考えられ、筆者らもこの戦略から歯の再生研究にアプローチした<sup>3)</sup>。

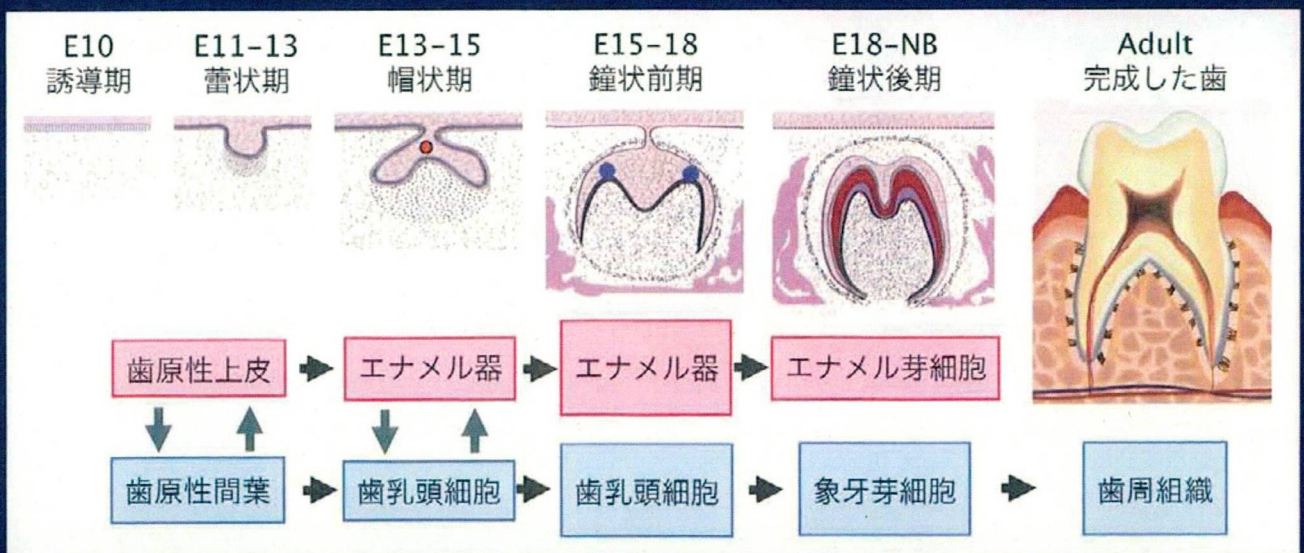


図1 歯の発生過程。歯の発生は口腔上皮の肥厚に始まり、歯原性上皮と歯原性間葉の相互作用により発生が進行する。その後、蕾状期、帽状期および鐘状期の過程を経て、歯原性上皮からエナメル質、歯原性間葉から象牙質、歯髄、歯周組織を形成する。

を中枢神経へ伝達できる可能性が示された。そこで、再生歯に矯正力を負荷させ、その刺激が歯根膜中の末梢神経を介して中枢へ伝達されているかを解析した。その結果、矯正力を負荷して2時間後および48時間後に、顎顔面の傷害刺激を伝える三叉神経

脊髄路において、神経刺激で反応する c-Fos の発現上昇が天然歯と同様に再生歯でも観察された (図 7B)。

これらの結果から、再生歯に付随する末梢神経は生理的刺激を中枢へ伝達できることが証明された。

## 今後の展開

今回の研究成果より、筆者らが開発した器官原基法で作製した再生歯胚は、天然歯と同様に生理的に機能する歯として再生することが証明された。このような再生歯胚移植による歯の再生医療技術は、歯を失った人達に歯を元通りに再生できるという夢を与えられるのではないかと期待されている。

今後、歯の再生医療技術を実用化するためには、乗り越えなければいけない課題がまだ残されている。まず、これまでの研究で利用されているのは胎児由来の細胞であるため、臨床応用に利用することは倫理的に問題がある。その解決のためには、患者自身から入手可能な幹細胞や患者由来の iPS 細胞を用いて、再生歯胚を作製する技術開発が必要である。

また、現在のところ再生歯の大きさは制御できていないため、移植部位に適した歯の大きさに制御す

る技術開発も必要だと考えられる。

今後、さらなる研究の推進によって、これらの技術的な問題が解決され、「生理的に機能する歯の再生医療の実現」へと展開することが期待される。

## 謝 辞

本研究は、文部科学省・科学研究費補助金「基盤研究 (A) (平成 20-22 年度)」, 同・特定領域研究「バイオ操作 (平成 18-21 年度)」, 厚生労働省科学研究費補助金・厚生労働科研費「再生医療実用化研究事業 (平成 21-23 年度)」, (株) オーガンテクノロジー共同研究費などの研究費により推進されたものです。ここに記して感謝いたします。

## 文 献

- 1) Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods*. 2007; **4**(3): 227-230.
- 2) 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 Acad Sci USA*. 2009; **106**(32): 13475-13480.
- 3) Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*. 2003; **116**(Pt 9): 1647-1648.
- 4) Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*. 2002; **81**(10): 695-700.

結果、生後9週齢のマウス天然歯の硬さに相当していた(図5)。

次に、再生歯の歯周組織の機械的外力に対する応答性を検証するため、再生歯に矯正処置を施した。図6Aに示すように、成体マウス口腔内に矯正装置を設置し、再生歯を頬側へ移動した。6日間矯正移動させたところ、再生歯では牽引側と圧迫側の歯根

膜周辺の形態が変化するとともに、牽引側では骨造成が起こり、逆に圧迫側では骨吸収されていることが認められた。その後、17日目には再生歯の歯根膜の構造は、天然歯と同様に元の状態に戻ることが観察された。これらのことから、再生歯の歯周組織は機械的外力に応答し、歯槽骨の修復を誘導できることが示された(図6B)。

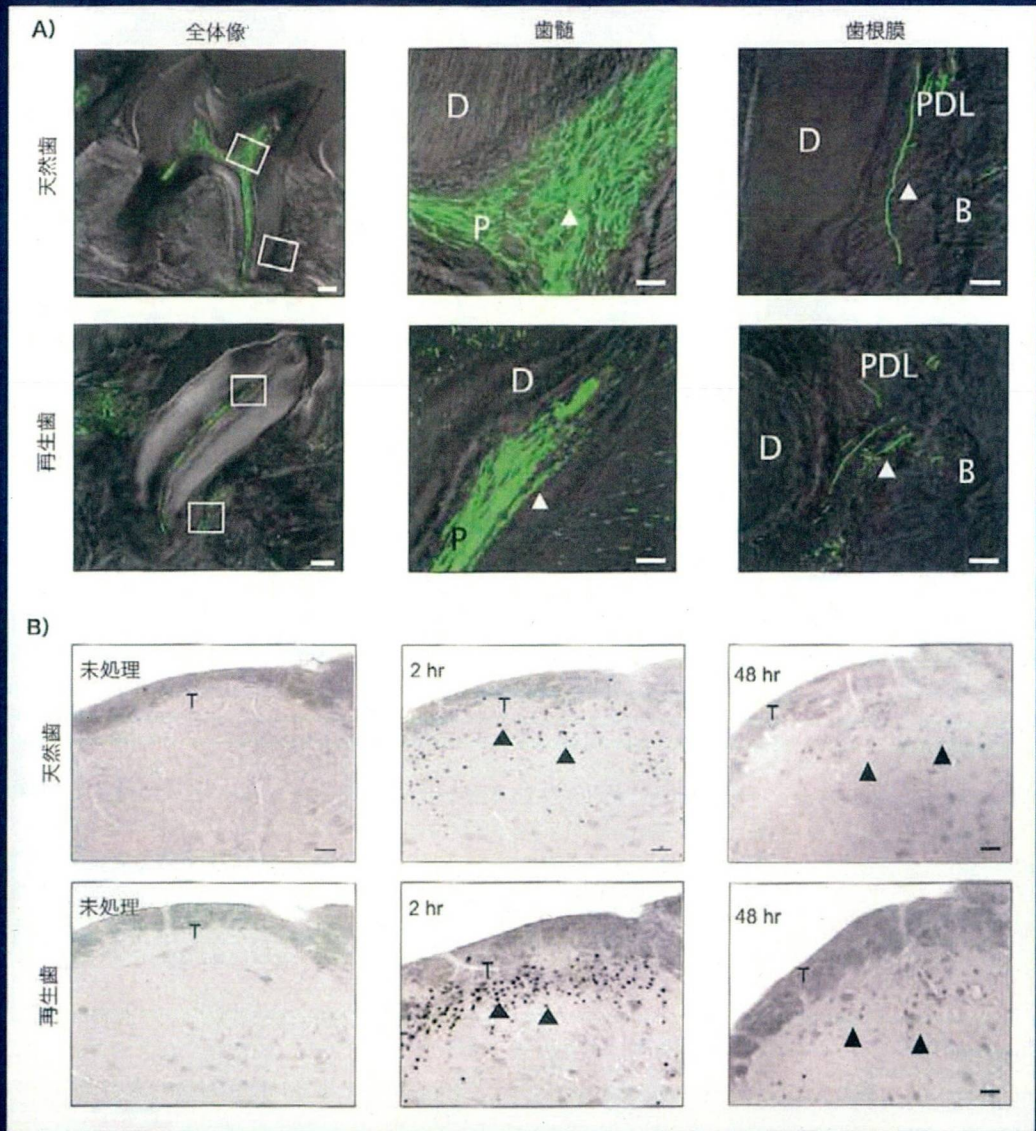
## 再生歯の中樞神経伝達能力

歯が冷温疼痛や機械的外力などの生理的刺激を中枢に伝達することは、歯の生理機能として重要な役割である。

顎骨内で萌出した再生歯の末梢神経分布を調べると、天然歯と同様に歯髄ならびに歯根膜に末梢神経の存在が認められ(図7A)、再生歯が生理的刺激

図7 再生歯の刺激伝達能力

- A) 再生歯内の神経線維：免疫染色にて末梢神経線維の分布を天然歯と再生歯で比較解析した像を示す。スケールバー：50 $\mu$ m, D：象牙質, P：歯髄, PDL：歯根膜, B：歯槽骨
- B) 再生歯の刺激伝達能力：再生歯あるいは天然歯に矯正力負荷を加え、その刺激が三叉神経脊髄路核へ伝達されているかを解析した。刺激後2時間および48時間で三叉神経脊髄路核にc-Fos陽性核が検出された像を示す。スケールバー：50 $\mu$ m, T：三叉神経脊髄路核, ▲：c-Fos陽性核



## 再生歯の硬度と機械的外力への応答能

再生歯が天然歯と同様に生理的な機能を果たすためには、

- ① 硬組織（象牙質とエナメル質）の機械的強さ
- ② 歯周組織の機械的外力に対する応答能

が必要であると考えられる。そこで再生歯の硬さを

ヌーブ硬度により測定した。

マウス天然歯のヌーブ硬度を測定すると、エナメル質および象牙質は生後3週齢より9週齢のほうが硬い値を示した（図5）。移植後11週の再生歯のエナメル質および象牙質のヌーブ硬度を解析した

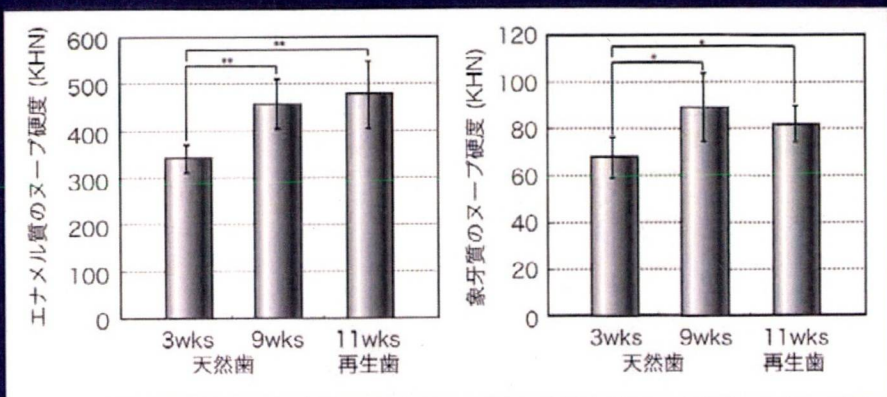


図5 再生歯の硬さ

天然歯ならびに移植11週間後(11wks)の再生歯の硬さをヌーブ硬度で計測した。再生歯のエナメル質(左)ならびに象牙質(右)は、3週齢(3wks)マウス天然歯よりも硬く、9週齢(9wks)と同等であった。

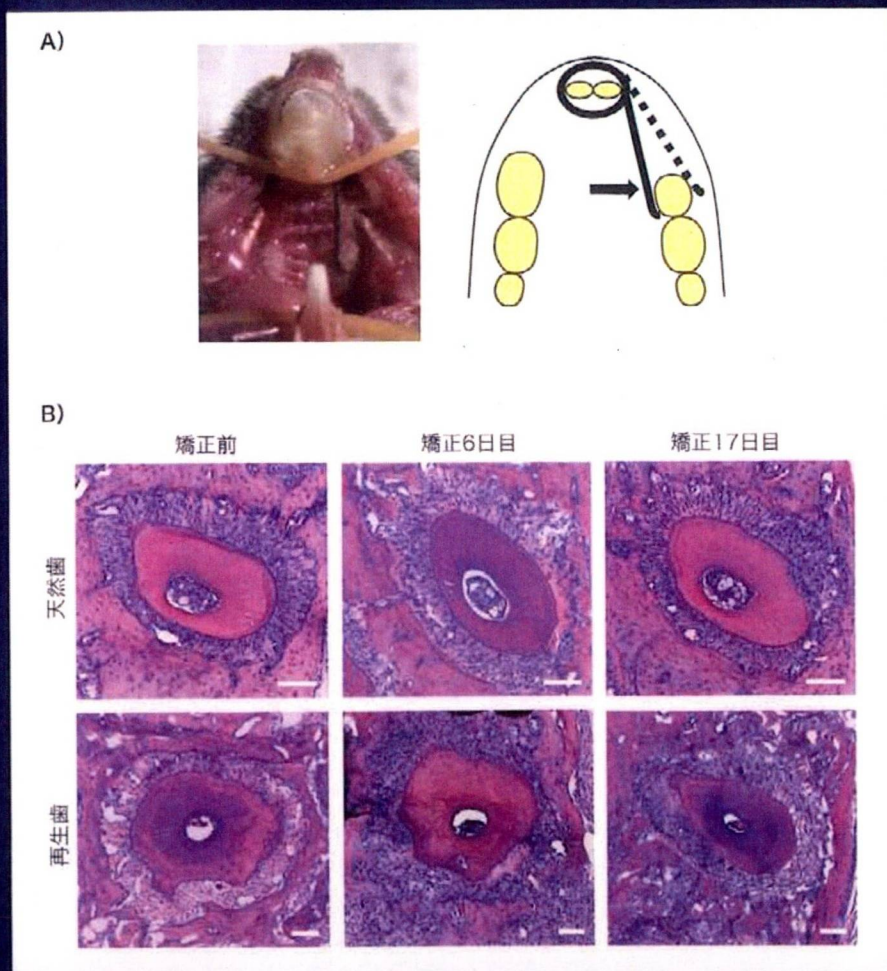


図6 再生歯の矯正移動

A) 再生歯の矯正装置：切歯に固定装置を装着し（左側）、頬側方向（右側）へ移動させた。

B) 矯正した再生歯の組織像：矯正前、矯正後6日目、17日目の圧迫側（右側）と牽引側（左側）における形態変化を、天然歯と再生歯で比較観察している像を示す。スケールバー：100μm

日で咬合面に到達して対合歯と咬合した (図 3C).

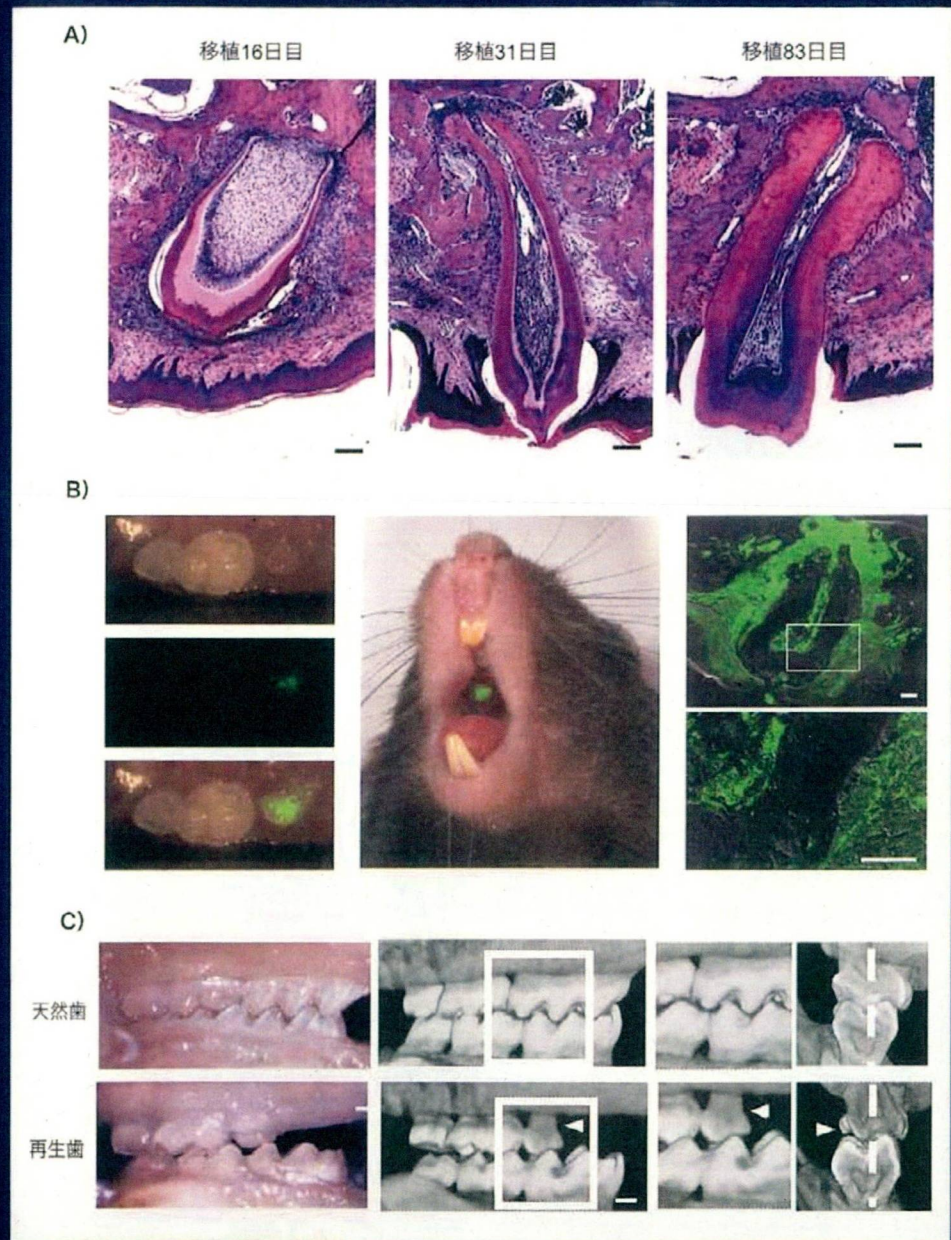
再生歯の萌出過程を観察すると、発生成長とともに再生歯周囲の歯周組織も修復され、最終的に再生歯は歯根膜を介して周囲の歯槽骨と結合することが組織学的に確認された (図 4A). これらの構造物が再生歯に由来するかどうかを調べるため、緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識した再生歯胚を移植し再生歯を形成させた. その結果、再生歯内部の歯髄細胞や象牙芽細胞、歯根膜細胞、セメント芽細胞は

GFP 陽性反応を示したことから、再生歯は移植した再生歯胚により形成されたことが証明された (図 4B).

さらに、再生歯の咬合状態をマイクロ CT で解析したところ、再生歯は対合歯の歯軸と同方向に萌出し、咬合面を介して接触していることが判明した. この結果より、再生歯は萌出過程で適正な位置に移動し、対合歯と咬合を成立させたことが予測された (図 4C).

図 4 再生歯の成長過程と咬合状態

- A) 再生歯の成長過程：移植後 16 日目, 31 日目, 83 日目までの再生歯の成長と歯周組織修復の過程を示す. スケールバー：200  $\mu$ m
- B) 再生歯の GFP 標識：GFP 標識された再生歯の口腔内写真 (左, 中央) ならびに GFP 陽性の歯髄および歯根膜を示す (右). スケールバー：200  $\mu$ m
- C) 再生の咬合状態：再生歯と天然歯の咬合状態 (左) とマイクロ CT で比較解析した像を示す (中央左, 中央右, 右). スケールバー：200  $\mu$ m



## 再生歯の萌出と咬合回復

再生歯胚を用いた歯の再生治療の実用化を考えると、再生歯が組織学的に正常であることだけでなく、再生歯胚が成体口腔内で顎顔面の生理機能と連携する再生歯となりうるかどうか重要な課題となる。そこで、再生歯胚を成体マウスの顎骨内に移植した場合に、再生歯が萌出し、咬合が回復するかを解析した。

再生歯胚の顎骨移植プロトコルの概略図を図3Aに示した。マウス第一臼歯を抜歯後、鐘状期歯胚まで成長させた再生歯胚を咬頭部から根尖部の方向性を維持した状態で移植し、経過観察した(図3B)。その結果、移植後16日で移植床の治癒が確認され、37±6日で59.6%の頻度で再生歯の萌出が認められた。さらにこれらの再生歯は、49±5

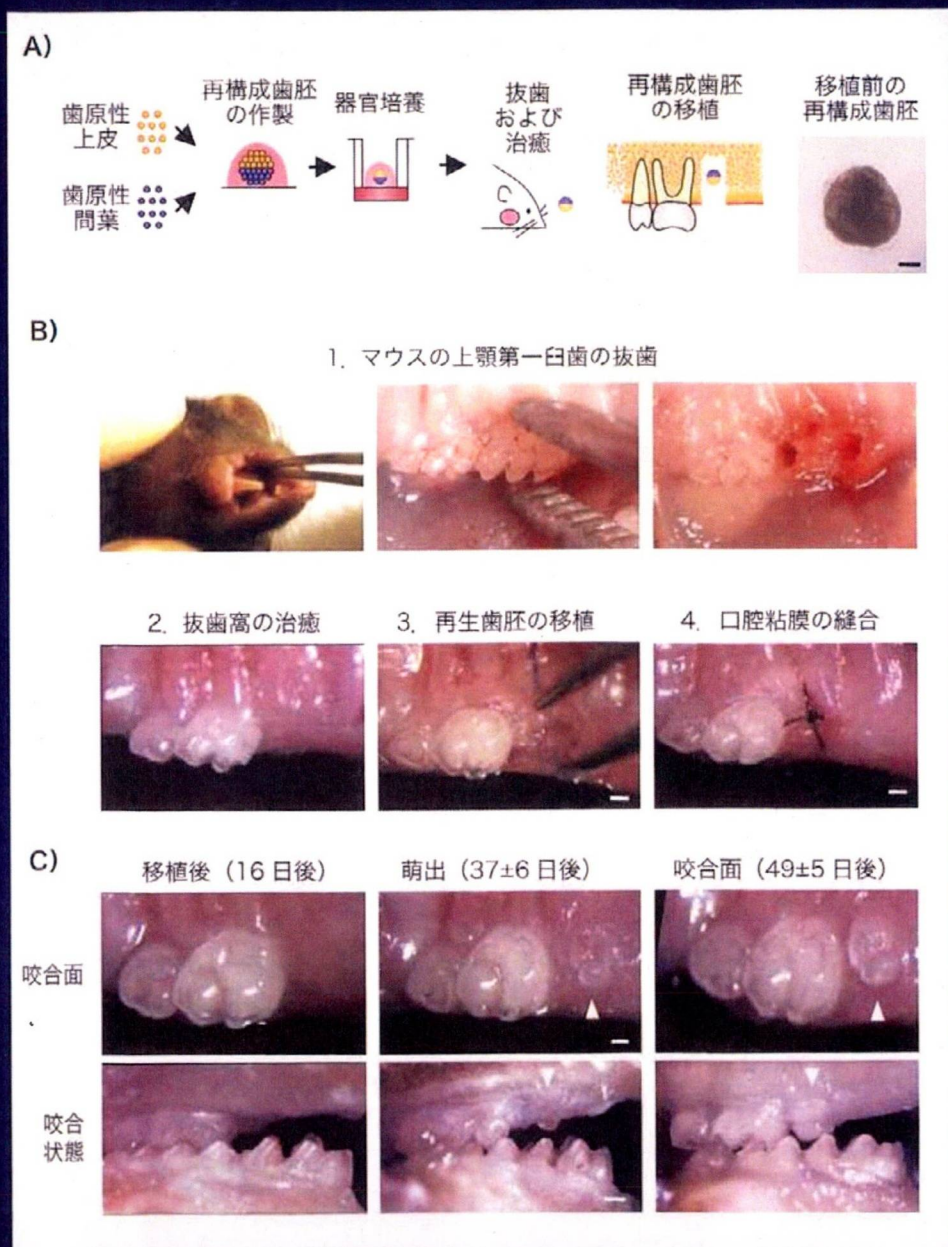


図3 再生歯の移植方法と再生歯の萌出

- A) 再構成歯胚の移植方法の概略図  
 B) 再構成歯胚の移植方法の実際：マウス上顎第一臼歯を抜歯し、治癒後に移植窩を形成し、再構成歯胚を顎骨内に移植した。スケールバー：200μm  
 C) 再生歯の萌出：再生歯が萌出し、対合歯と咬合するまでの過程を示す。矢印は萌出した再生歯を示す。スケールバー：200μm

## 再構成法による歯の再生

再構成法とは、組織より単離した細胞から再集合体を形成させ、組織を再構築させる方法のことである。2002年にForsyth研究所のYelick博士（現タフト大学）らは、歯原性間葉細胞と歯原性上皮細胞を細胞の足場となる担体に播種して再構成することにより、部分的に歯が再生できることを報告した<sup>4)</sup>。

これまでに、この研究を含めて数多くの再構成法が報告されているものの、安定して正常な歯へと発生する再構成法は確立されていなかった。そこで筆者らは、新たな細胞操作技術としての再構成法の開発に取り組み、2007年に100%の頻度で再生歯に発生可能な再生歯胚を作製する「器官原基法」を開

発した<sup>1)</sup>。

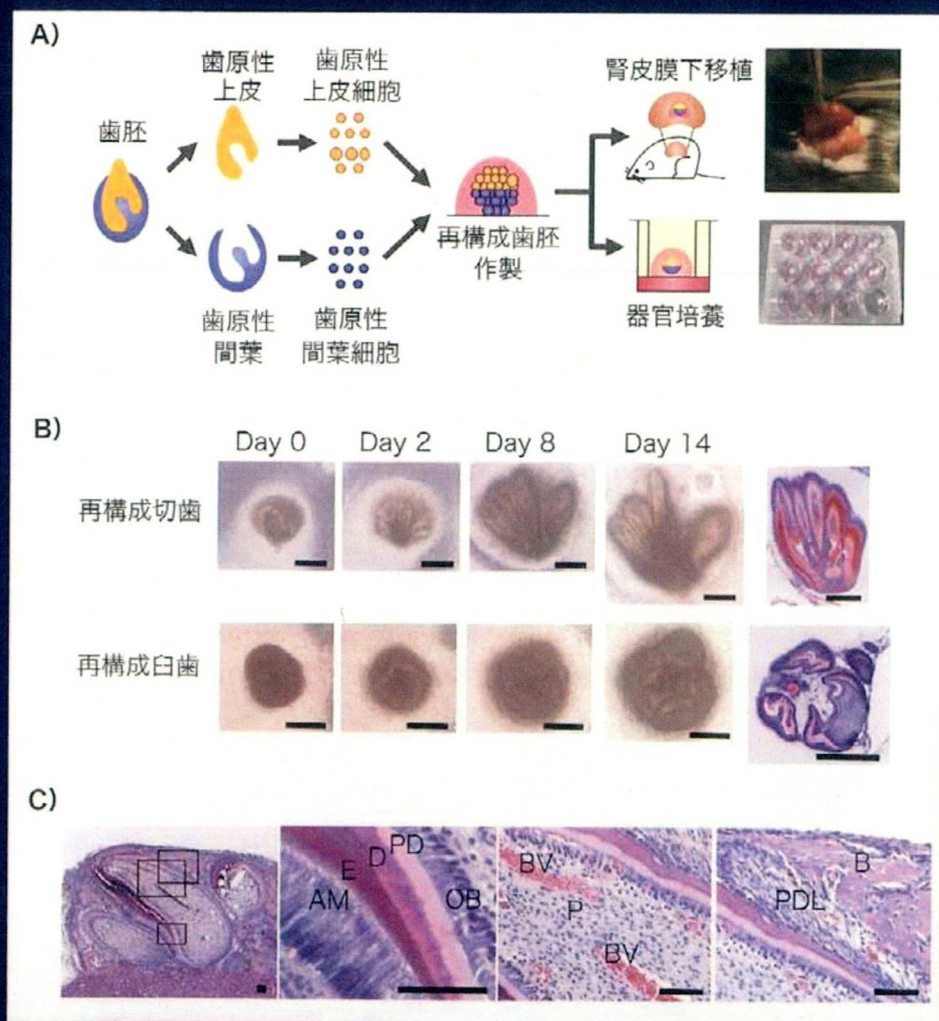
まず、マウス帽状期歯胚を取り出し、酵素処理によって単一の歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞に分離し、コラーゲンゲル内でこれらの細胞を高細胞密度で区画化して再構築することにより再生歯胚を作製した（図2A）。再生歯胚は、切歯歯胚ならびに臼歯歯胚から作製することが可能であり、これらの再生歯胚を生体外で培養すると、由来する歯胚の形態を有した再生歯へと成長した（図2B）。この再生歯胚をマウス腎皮膜下へ移植して異所的に発生させると、歯根および歯周組織（歯根膜、セメント質、歯槽骨）を含む完全な再生歯へと発生した（図2C）。

図2 再構成歯胚を用いた歯の再生

A) 再構成歯胚の作製方法：発生期歯胚より採取した歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞を組み合わせることで作製した

B) 再構成歯胚の成長過程：切歯歯胚ならびに臼歯歯胚より採取した細胞で形成させた再構成歯胚の成長過程を示す。スケールバー：200 μm

C) 腎皮膜下移植による歯の再生：歯周組織を含む歯の完全な再生が観察される(左)。歯冠部(中央左)、歯髄(中央右)および歯周組織(右)の拡大図を示す。OB：象牙芽細胞、PD：象牙前質、D：象牙質、E：エナメル質、AM：エナメル芽細胞、BV：血管、P：歯髄、B：歯槽骨、PDL：歯根膜、スケールバー：100 μm





## 歯の再生研究の進展と課題

*The strategy and development of the research for tooth regenerative therapy  
as a future organ replacement regenerative therapy*

### Keywords

歯科再生医療  
器官原基法  
臓器置換再生療法  
再生歯胚  
細胞操作技術

大島 正充<sup>1)</sup> 辻 孝<sup>1)2)3)</sup>

1) 東京理科大学 基礎工学研究科 生物工学専攻

2) 東京理科大学 総合研究機構

3) 株式会社オーガンテクノロジーズ

### Summary

To restore the partial loss of organ function, stem cell transplantation therapy has been developed as a cure for various diseases. The ultimate goal of regenerative therapy is to develop fully functioning bioengineered organs that can replace lost or damaged organs after disease, injury or aging. In current research on whole-tooth regenerative therapy, a basic strategy is being pursued in which a bioengineered tooth germ is induced to develop into a fully functional tooth. Previously, we developed a three-dimensional organ-germ culture method for the reconstitution a bioengineered organ germ. Recently, we successfully demonstrated that our bioengineered tooth germ could develop a fully functioning tooth, which has hardness for masticatory potential, the functional responsibility against a mechanical stress, and perceptive potentials of neural fibers. These results showed that the bioengineered tooth germ could develop a fully functioning regenerated tooth and an organ replacement regenerative therapy using a bioengineered organ germ might be feasible.

### はじめに

再生医学は、生体内に存在する幹細胞と組織工学技術を融合させ、生物学的な発生・再生の原理に基づいて新しい学問的な体系として確立されつつある<sup>1)-3)</sup>。さらにこの学問を応用し、21世紀の新たな医療技術へと発展することが期待されている。現在の再生医療では、部分的に傷害を受けた組織や器官の修復に向けて、生体内に存在する幹細胞を移入する「幹細胞移入療法」の臨床応用化が幅広い疾患において進められている<sup>4)-6)</sup>。歯科の領域においても、う蝕や歯周病による部分的な組織のダメージの修復のために、歯髄や歯周を再生しうる幹細胞の補充療法や賦活療法の開発が進められている<sup>7)8)</sup>。

一方、再生医療の大きな目標は、機能を喪失した器官を再生により作り出した再生器官と置き換える臓器置換再生医療技術の確立である。歯科領域に

Oshima, Masamitsu<sup>1)</sup> / Tsuji, Takashi<sup>1)2)3)</sup>

1) Department of Biological Science and Technology, Faculty of Industrial Science and Technology, Tokyo University of Science

2) Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science

3) Organ Technologies Inc.

E-mail : t-tsuji@rs.noda.tus.ac.jp

においても、喪失した歯を再生により取り戻す「歯の再生治療」の研究が進められており、臓器置換再生医療のモデルケースとして期待されている<sup>9) 10)</sup>。最近、私たちは胎児期に形成される歯の原基である歯胚を三次元的な細胞操作によって再生し、成体マウスの歯の欠損部位に移植し、再生歯胚から生理的機能を有する再生歯へと成長しうることを示した<sup>11) 12)</sup>。本稿では、臓器置換再生医療のモデルとして歯科再生医療の現状について、私たちの研究成果を中心に解説すると共に、実用化に向けた課題を述べたい。

### 歯科における再生医療のニーズ

歯は外胚葉性器官の1つであり、咀嚼や発音などに伴う咬合と顎の運動機能に重要な役割を果たすと共に、外部からの刺激を受容する一種の知覚器官としての役割も果たしている<sup>13)</sup>。これらの役割は、歯における機能的咬合系の確立のために、互いに連携して生理機能を発現していると考えられており<sup>14)</sup>、歯そのものの欠損や咬合を支持する歯根膜、顎関節機能のいずれの機能が障害されても機能的咬合系に悪影響を及ぼし、咬合運動に障害が発生すると考えられている<sup>14) 15)</sup>。これまで歯科医療においては、歯の欠損に対する咬合機能の回復を目指して固定性架工義歯(ブリッジ)や可撤性床義歯(入れ歯)による人工的な機能代替治療が進められてきた<sup>16) 17)</sup>。一方、チタンやアパタイト製のインプラントが歯槽骨と

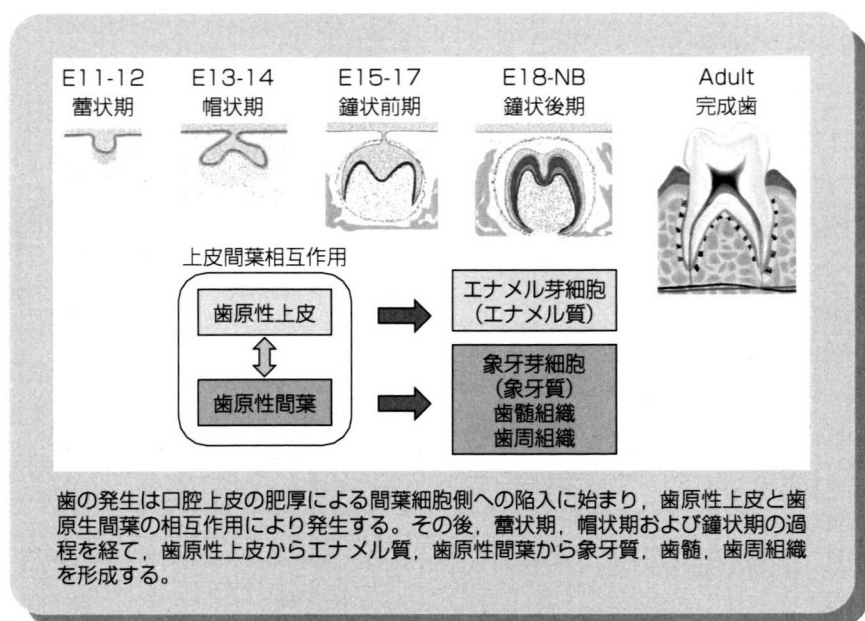


図1 歯の発生過程

骨結合する性質を有することが明らかになり、口腔インプラント治療が開発された<sup>18)~20)</sup>。口腔インプラント治療は健全歯に侵襲を与えることなく咬合機能や長期的予後の安定に寄与することから、歯の欠損に起因する障害のリハビリテーションに応用され、これまでの歯科医療の抜本的な改革に貢献した。しかしながら、これらの治療法は歯根膜が存在しないため、機能的咬合系を完全に回復させることは不可能である。

歯の欠損に対する生物学的な治療として、歯の自家移植が行われている<sup>21)</sup>。この治療方法は、臓器移植と同じ概念に含まれる治療方法である。歯の自家移植は自己口腔内の非機能歯を欠損部に移植・生着させるため、歯根膜による歯の生理的機能を回復させることが

可能であることから、機能的咬合系を大きく回復させることができる<sup>22) 23)</sup>。しかしながら、移植可能な自家歯が必須であることなど治療適応に制限がある。このような背景から、歯の自家移植のような機能的咬合系の生物学的な回復が可能である「歯の再生治療」が期待されるようになった。さらに歯科治療では歯、すなわち器官の欠損に対する代替治療が確立しているため、従来の歯科治療と再生治療との連携や応用も可能であり、臓器置換再生医療に向けた技術開発のフィージビリティスタディとしてよいモデルであると期待される。

### 器官発生システムを利用した歯の再生に向けた戦略

臓器・器官は複数種類の細胞からな

る機能的な単位であり、その組織構造は高効率な機能発現に適した三次元的な構造をしている。外胚葉性器官である歯も同様に、複数種の細胞や硬組織、神経、血管などが高度に組織化された器官である。歯を再生するといっても歯を構成する細胞をすべて用意して機能的な歯を三次元的に再生する技術は開発されていない。

歯は、胎仔期の未分化な上皮・間葉組織の相互作用によって誘導された「歯胚」から発生する(図1)。歯の発生は、マウスでは胎齢10日目に歯の発生予定領域の上皮細胞が肥厚することで始まり、その後、間葉細胞側に陥入を始め、胎齢13日目にはその陥入領域に接する間葉細胞が密集して蕾状期歯胚となる。胎齢14日には、上皮細胞がさらに陥入して間葉細胞を包み込むようになり(帽状期)、胎齢15日目には上皮組織と間葉組織それぞれの組織から境界面に向けて、エナメル質と象牙質が分泌されるようになり、硬組織形成が始まる(鐘状後期)。その後、歯は垂直方向に伸長して歯根を形成すると共に、歯根部位では歯根膜などの歯周組織が形成されて歯槽骨と連結され、歯が口腔内に萌出して対合歯と咬合するようになると歯の成長は停止する。

歯の個数や歯の生えかわりの回数は、胎児期に誘導される歯胚の数によって決定される。そのため歯を再生するための戦略として、未分化な上皮・間葉細胞の2種類のみからなるサイズの小さな歯胚を再生し、歯

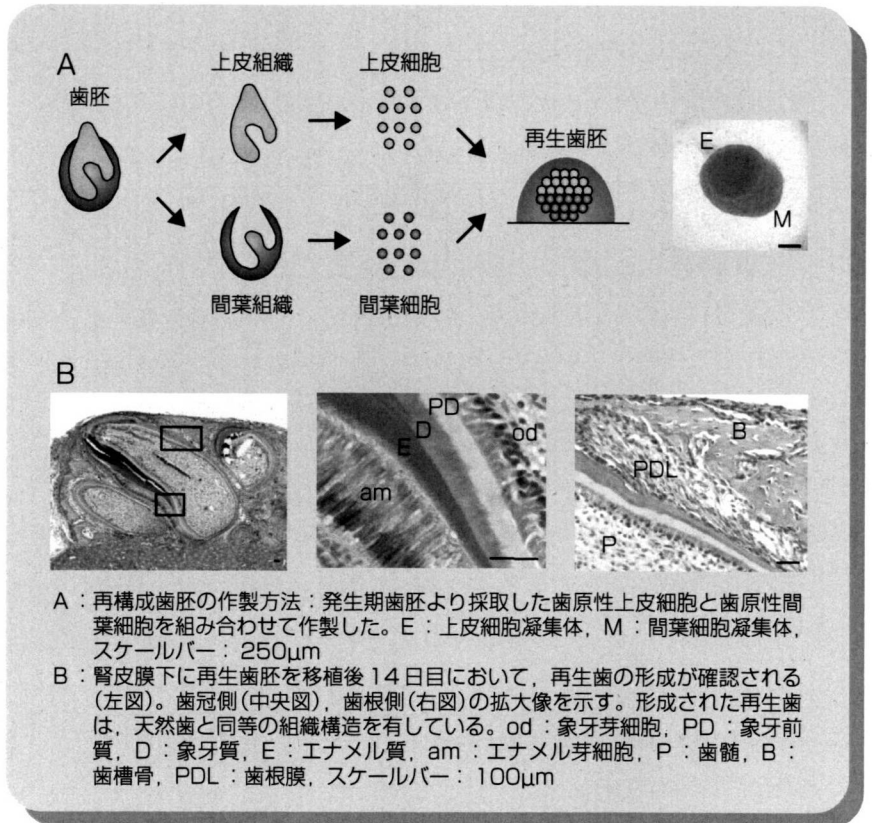


図2 再生歯胚作製のための器官原基法(→巻頭Color Gravure参照)

の欠損部位へ移植することにより、乳歯、永久歯に続く第三の歯を生やす、「再生歯胚からの歯の再生」が提唱されるようになった。

### 歯胚再生のための三次元的な細胞操作技術、「器官原基法」の開発

再生歯胚からの歯の再生を実現するには、単一化された上皮・間葉細胞から再生歯胚を作るための三次元的な細胞操作技術の開発や、再生歯胚が成体の顎骨内環境で発生・成長して機能的な再生歯となりうるかどうか、免疫学

的な拒絶を回避するため患者自身の細胞から歯胚を作るための細胞シーズの探索、再生歯胚から再生歯を作るための生体外培養システムの開発などの戦略的な課題があげられる。これらの課題の中で、まず再生歯胚を作るための三次元的な細胞技術の開発に向けて、すでに30年以上にわたり研究開発が進められてきたものの、安定した技術開発はなされていなかった。

歯胚を再構築するための研究開発は、細胞の足場となる担体を用いて形態が制御された歯を再生する組織工学によるアプローチ<sup>24)</sup>と、上皮細胞と間

葉細胞の再凝集によって再生する細胞凝集法からのアプローチが代表的である<sup>25)</sup>。これまでに、これらの方法によって正常の組織構造を有する歯ができるとの報告はあるものの、正常な構造の歯を作る頻度が低く、歯の形態に異常がみられるなどの問題点を有しており、安定して再生歯を作り出す方法の開発が期待されていた。

私たちは、歯の発生を再現する歯胚を再生するには、上皮細胞と間葉細胞が細胞間相互作用できる高い細胞密度で、区画化して配置されていることが重要だと考え、2007年に「器官原基法」を開発した<sup>10)</sup>。この方法では、胎齢14.5日のマウス胎児歯胚に由来する単一化した上皮細胞と間葉細胞から高細胞密度の細胞懸濁液を調製し、これらの細胞を互いに接触するようにコラーゲン溶液の内部に配置し、コラーゲン溶液をゲル化させることによって再生歯胚を作製した(図2A)。再生歯胚をマウス腎皮膜下に移植して異所的に発生させると、すべての再生歯胚が正常な歯胚発生過程を再現し、歯胚上皮細胞に由来するエナメル芽細胞やエナメル質、歯胚間葉細胞に由来する象牙芽細胞や象牙質、歯髓細胞、歯周組織を形成するセメント質、歯根膜、歯槽骨など、歯胚に由来するすべての構成要素が正常な組織配置を有して発生することが明らかになった(図2B)。またこの方法は、歯胚以外に毛包原基の再生にも利用可能であることから、単一化細胞から高効率に器官原基を再生するための細胞操作法として有用性

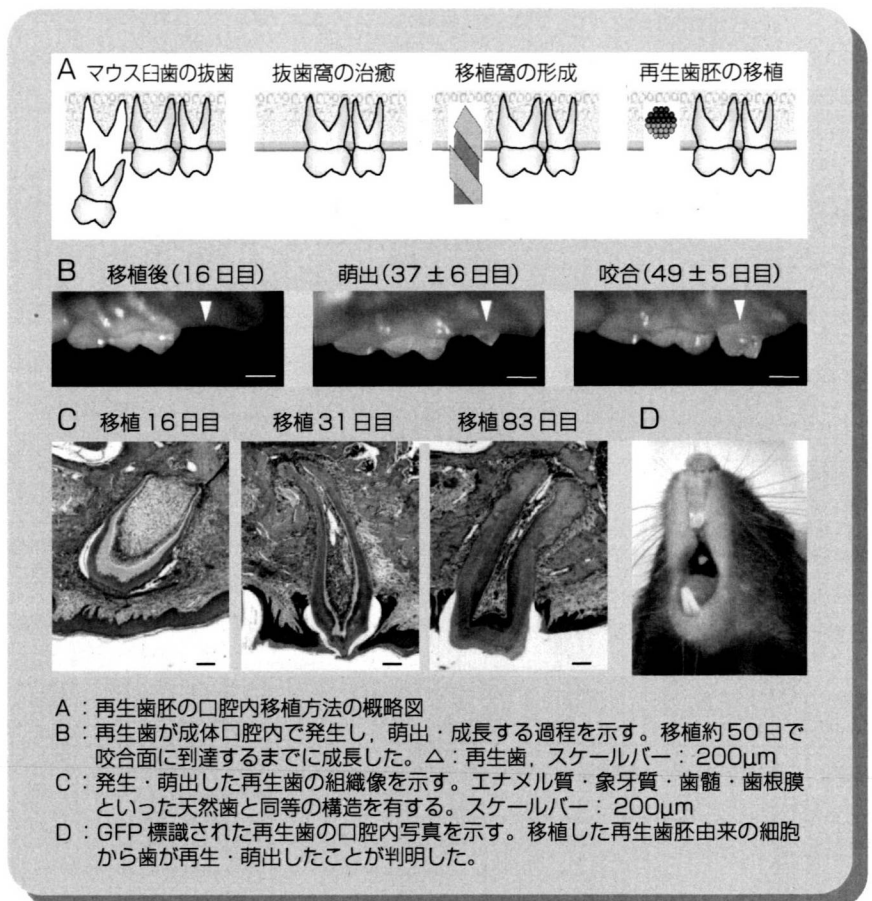


図3 成体マウス口腔内で発生・萌出した再生歯(→巻頭Color Gravure 参照)

が高いと考えられる。

### 機能的な歯の再生

歯の再生治療の実用化には、再生歯が組織学的に正常であることだけでなく、成体口腔内で機能的咬合系を回復して顎顔面と連携機能することが重要である。成体の顎の環境は、歯胚が発生・成長する胎児期や発育期の顎の環境と大きく異なると予測されており、再生歯胚が成体の顎環境内で発生しう

るかどうかは明らかにされていない。そこで私たちは、再生歯胚の成体口腔内での発生・萌出を解析すると共に、再生歯の機能解析として咬合機能、ならびに歯根膜による周囲歯槽骨のリモデリング能、外部侵害刺激に应答する神経機能について解析した<sup>12)</sup>。

#### 1. 再生歯の萌出と硬度

私たちは、再生歯胚による歯の再生を解析するため、まずマウスの歯欠損に対する再生歯胚移植モデルを構築し

た<sup>12)</sup>。マウス第一臼歯を抜歯し、3週間かけて抜歯窩を治癒させた後、ドリルを用いて欠損部歯槽骨に移植窩を形成して再生歯胚を移植した(図3A)。移植後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(図3B)。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(図3C)。さらに緑色蛍光蛋白質(GFP)を発現しているマウスに由来する再生歯胚の移植実験から、再生歯胚由来の細胞により歯が再生し、萌出したことが証明された(図3D)。一方、歯の咀嚼機能には、歯の硬組織の硬度が重要である。そこで再生歯のヌープ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(Data not shown)。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。

## 2. 再生歯の咬合と顎との連携機能

歯は成長や加齢による変化に伴って、生理的に移動しながら対合歯との適切な咬合を確立し、維持されている<sup>15)</sup>。歯は、歯根膜を介した歯槽骨のリモデリングにより移動することが知られており、現在では矯正治療として歯の審美治療にも利用されている。

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

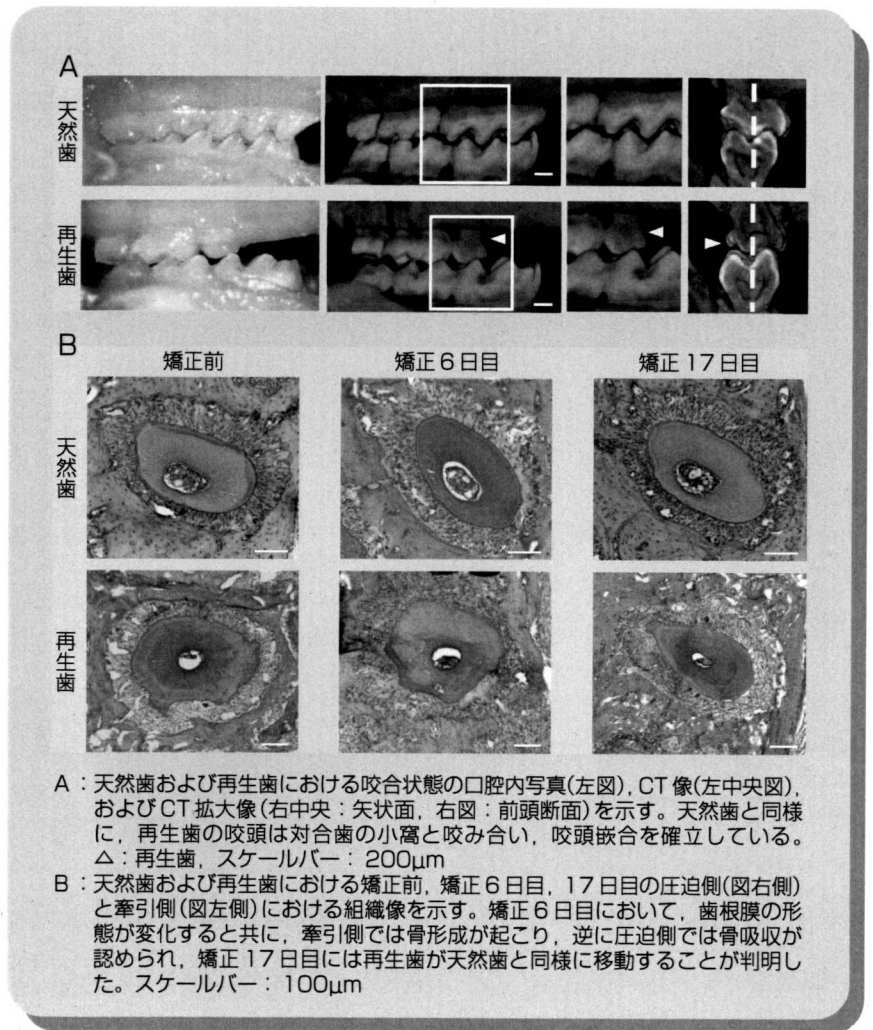


図4 再生歯の咬合と顎骨との連携機能(→巻頭Color Gravure参照)

到達すると成長が停止し、生理的に移動しながら咬頭(歯の咬合面の突起)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(図4A)。

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、牽引側では骨形成が起こり、逆に圧迫側では骨吸収

が認められ、矯正17日目には再生歯が天然歯と同様に移動することが判明した(図4B)。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。

## 3. 再生歯の神経機能の解析

歯は口腔内の重要な知覚器官でもあ

り、歯髄や歯根膜の末梢神経が咬合圧や痛みなどの感覚受容器として機能している。そのため、機能的な歯の再生には、末梢神経の侵入と中枢神経系との連絡が重要だと考えられる。再生歯の歯髄や歯根膜には、正常な歯と同様に末梢神経の侵入が認められ、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(図5 A)。中枢における痛みの反応は、延髄の三叉神経脊髄路核の神経の一部がc-Fos蛋白質を産生して応答することが知られている<sup>26) 27)</sup>。そこで再生歯に矯正力および露髄刺激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蛋白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へ伝達していることが判明した(図5 B)。

### 歯科再生医療の実現に向けての課題

これまでの研究成果から、生体外における三次元的な細胞操作技術である器官原基法の開発、ならびに再生歯胚の移植による機能的に完全な歯の再生が可能であることから歯科再生医療の実現可能性が示されたものと考えられる。しかしながら、その実用化を現実のものにするにはいまだ解決すべき課題が残されている。

ヒトの歯の再生を実現するためには、移植免疫学の観点から患者に由来する細胞を用いて歯胚を再生する必要があるだろう。再生のための細胞シーズの探索研究は世界中で進められてお

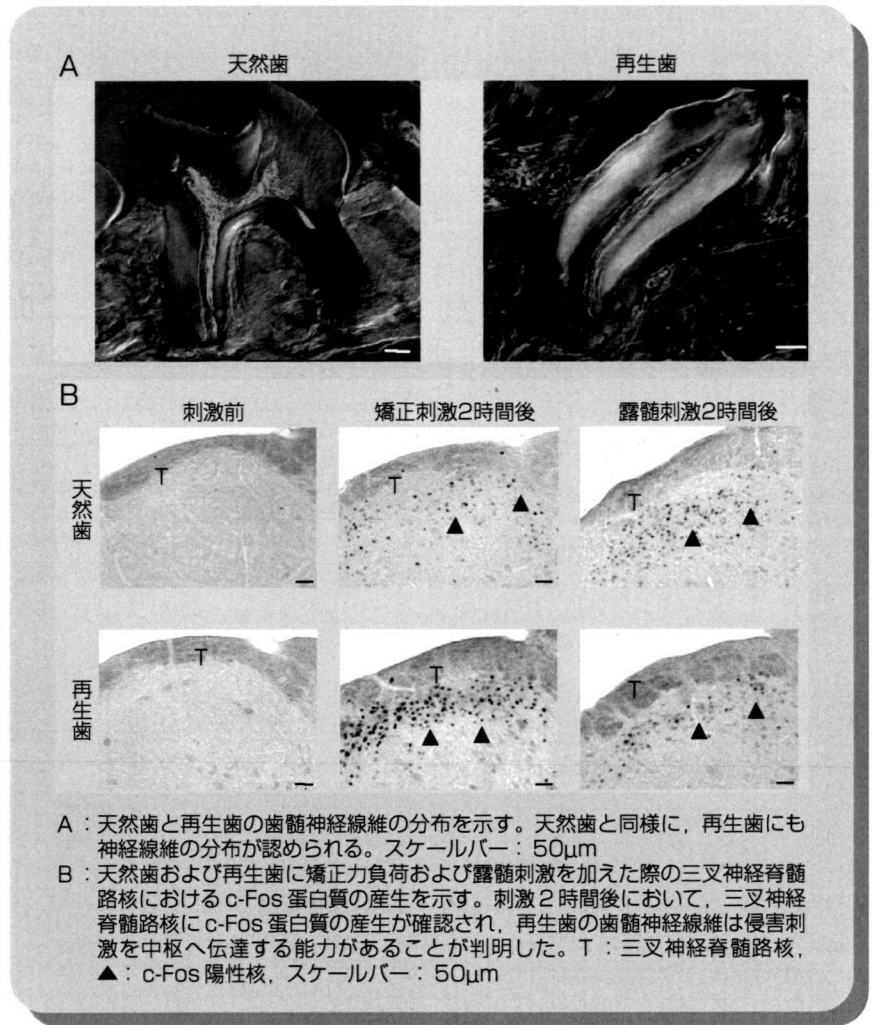


図5 再生歯の神経機能(→巻頭Color Gravure参照)

り、これまでにヒトの歯に由来する組織幹細胞として歯髄幹細胞、乳歯歯髄幹細胞、歯根膜幹細胞、歯乳頭由来幹細胞が報告されている<sup>28) -31)</sup>。これらの細胞は、ハイドロキシアパタイトと混合して免疫不全マウス皮下へ移植すると、象牙質や歯根膜組織を形成することが報告されている。これらの細胞は、歯科再生医療のための細胞シーズがヒ

ト成体の歯の組織に存在する可能性を示すものではあるものの、いずれも部分的な歯の組織の再生に留まり、歯全体を再生することはできていない。これら組織幹細胞のみでは歯胚再生の細胞シーズとしては不十分であり、完全な歯の再生を目指すためには、胎児期の歯胚誘導を再現しうる遺伝子や、誘導能のある上皮・間葉細胞が必要であ

ると考えられる。

またヒトの場合には、再生歯胚から萌出、咬合までにかかる時間は長期間であるため、再生歯胚を生体外で培養し、短期間で移植可能な再生歯を製造する技術開発も期待される。現在のところ、細胞凝集塊や組織、器官を培養可能なシステムの開発は十分ではなく、三次元的な培養システムや、それを三次元的な血管ネットワークシステムを利用した培養システムの開発などが連携して臓器置換再生医療システムの実現が図れるものと考えられる。

## おわりに

本稿では、再生歯胚からの歯の再生を中心に、最近の研究成果の進展について解説した。歯の再生治療には、幹細胞による歯髄再生や歯周再生のような傷害部位に応じた組織治療も含まれ、これらは現在、臨床応用化が進められている幹細胞移入・賦活療法として早い実用化が期待される。歯をまるごと再生することは欠損歯に対する歯科治療として理想的な治療ではあるものの、より早期の実現を考えるならば、歯全体というよりも天然歯と同じ組織構造を有する歯根を再生し、歯冠部は歯科補綴技術を利用する歯根再生であろう。Sonoyamaらは、組織工学的にヒト歯乳頭由来幹細胞と歯根膜幹細胞をハイドロキシアパタイト周囲に配置することにより歯根様構造物を再生した。さらに、この歯根様構造物に人工の上部構造を装着して咬合負荷を与

え、機能することを報告している<sup>31)</sup>。こうした多様な歯科治療法の開発は、現在の歯科治療から機能的咬合系の完全な回復を目指した生物学的な歯科再生医療への橋渡しとなる技術として大いに期待される。今後、さらに歯科再生治療に向けた基盤技術と臨床応用化研究を推進することによって、歯科再生治療を実現することが期待されると共に、臓器置換再生医療のフィージビリティースタディーとして幅広い臓器・器官再生のモデルとなることが期待される。

## ●文献

- 1) Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al : Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* **12** : 459-465, 2006
- 2) Sekine H, Shimizu T, Yang J, et al : Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering. *Circulation* **114** : 187-193, 2006
- 3) Yang J, Yamato M, Nishida K, et al : Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach. *J Control Release* **116** : 193-203, 2006
- 4) Appelbaum FR : Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* **411** : 385-389, 2001
- 5) Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA : Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418** : 50-56, 2002
- 6) Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al : Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 11474-11479, 2005
- 7) Rimondini L, Mele S : Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol* **58** : 483-500, 2009
- 8) Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, et al : Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* **77** : 1003-1007, 2006
- 9) PT シャープ, CS ヤング : 現実味を帯びる歯の再生. *日経サイエンス* **11** : 41-49, 2005
- 10) 辻 孝 : 次世代歯科治療としての歯の再生. *日本歯科医師会雑誌* **60** : 635-646, 2007
- 11) Nakao K, Morita R, Saji Y, et al : The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* **4** : 227-230, 2007
- 12) Ikeda E, Morita R, Nakao K, et al : Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 13475-13480, 2009
- 13) James KA : *Oral Development and Histology Second Edition*, New York, Thieme Medical Publisher, Inc., 94-109, 1994
- 14) 河村洋二郎 : 咬合の生理. *歯界展望/別冊(咬合を考える)*, 11-31, 1973
- 15) Proffit WR (高田健治訳) : *Contemporary orthodontics (新版 プロフィットの現代歯科矯正学)*, 東京, クインテッセンス出版, 78-83, 2004
- 16) Pokorny PH, Wiens JP, Litvak H : Occlusion for fixed prosthodontics: a historical perspective of the gnathological influence. *J Prosthet Dent* **99** : 299-313, 2008
- 17) Cooper LF : The current and future treatment of edentulism. *J Prosthet Dent* **18** : 116-122, 2009
- 18) Brånemark PI, Breine U, Adell U, et al :

- Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* **3** : 81-100, 1969
- 19) Linder L, Albrektsson T, Brånemark PI, et al : Electron microscopic analysis of the bone-titanium interface. *Acta Orthop Scand* **54** : 45-52, 1983
- 20) Albrektsson T, Sennerby L : Direct bone anchorage of oral implants ; clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *Int J Prosthodont* **3** : 30-41, 1990
- 21) Cohen AS, Shen TC, Pogrel MA : Transplanting teeth successfully : autografts and allografts that work. *J Am Dent Assoc* **126** : 481-485, 1995
- 22) Andreasen JO, Paulsen HU, Yu Z, et al : A long-term study of 370 autotransplanted premolars. Part II. Tooth survival and pulp healing subsequent to transplantation. *Eur J Orthod* **12** : 14-24, 1990
- 23) Andreasen JO, Paulsen HU, Yu Z, et al : A long-term study of 370 autotransplanted premolars. Part III. Periodontal healing subsequent to transplantation. *Eur J Orthod* **12** : 25-37, 1990
- 24) Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, et al : Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol* **68** : 89-101, 2005
- 25) Hu B, Nadiri A, Kuchler-Bopp S, et al : Tissue Engineering of Tooth Crown, Root, and Periodontium. *Tissue Eng* **12** : 2069-2075, 2006
- 26) Byers MR, Narhi MV : Dental injury models : Experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med* **10** : 4-39, 1999
- 27) Deguchi T, Takeshita N, Balam TA, et al : Galanin-immunoreactive nerve fibers in the periodontal ligament during experimental tooth movement. *J Dent Res* **82** : 677-681, 2003
- 28) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al : Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** : 13625-13630, 2000
- 29) Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al : SHED : stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : 5807-5812, 2003
- 30) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364** : 149-155, 2004
- 31) Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al : Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* **1** : e79, 2006



## 2. 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—

東京理科大学総合研究機構 教授 辻 孝

#### ◆◆ シンポジウム 6 「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—

###### モデレーター

栗原 英見（広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授＜先進医療開発科学講座 歯周病態学分野＞）

###### シンポジスト

辻 孝（東京理科大学基礎工学部生物工学科教授）

「歯科再生治療の実現に向けた研究戦略と展開」

栗原 英見（広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授＜先進医療開発科学講座 歯周病態学分野＞）

「歯周組織の再生」

高戸 毅（東京大学大学院医学系研究科教授＜感覚・運動機能医学講座 口腔外科学分野＞）

「軟骨の再生」

斎藤 隆史（北海道医療大学歯学部教授＜う蝕制御治療学講座＞）

「象牙質の再生」

※所属は第 21 回日本歯科医学会総会時点のもの

## 発表内容の詳細と今後の展開

### 歯科再生治療の位置づけ

次世代歯科治療として、「歯科再生治療」が期待されている。現在、歯科再生治療に向けて、う蝕や歯周病による部分的な組織のダメージを修復するために、歯髄や歯周を再生しうる幹細胞の補充療法や賦活療法によって歯髄再生や歯周再生をしようという臨床応用化研究が進められている。さらに歯科再生医療における大きな目標として、喪失した歯を再生により取り戻す「歯の再生治療」の研究が世界中で進められている。歯の再生治療は、疾患や傷害を受けた臓器や器官を、生体外で人工的に作製した器官と置換する「臓器置換再生医療」に該当し、再生治療として技術レベルが非常に高いものとして位置づけられている。歯科治療では、すでに喪失した歯の機能を補助するために、ブリッジやインプラントなどの人工的な治療方法が確立しているほか、臓器移植に該当する「歯の移植治療」も試みられている。そのため「歯の再生治療」は、従来技術との連携や応用も可能であり、臓器置換再生医療に向けた技術開発のフィージビリティスタディとしてよいモデルであると期待されている。

### 歯の発生

外胚葉性器官のひとつである歯は、胎児期の上皮・間葉相互作用によって誘導された歯胚から発生する。歯は、歯や歯周組織を構成する複数種の細胞や硬組織、神経、血管などが高度に組織化された器官

である。現在までに、三次元的な臓器や器官を人為的に再構築する技術開発は実現していないことから、歯を再生するには人為的な細胞操作によって歯胚を再生し、生物の発生システムを利用して再生歯を創り出す戦略からアプローチされている。

### 歯の再生に向けた戦略

これまでの歯の再生に向けた取り組みを含めて、歯科領域において歯の再生を実現するためのハードルとして、1) 再生歯胚を作製するための三次元的な細胞操作技術の確立、2) 再生歯胚が成体の顎環境の中で成長し、機能的な再生歯に発生するかどうかの解析、3) 患者さんに由来する再生歯胚を作製するための細胞シーズの探索、4) 再生歯胚を生体外で形態や大きさを制御可能な生育技術の確立などの課題が考えられており、すでに 30 年以上にわたり研究開発が進められてきたものの、生体外で再生歯胚を作製するための三次元的な細胞操作技術も安定したものは開発されていなかった。

### 器官再生に向けた細胞操作技術、器官原基法の開発

2007 年に私たちは、生体外で三次元的な細胞操作によって、正常な構造を有する再生歯や再生毛を高頻度で発生させる「器官原基法」を開発し、人為的な細胞操作によって器官原基を再生できることを示した (図 1、Nature Methods, 2007)。この方法は、コラーゲンゲル内に、胎児期の歯胚に由来する上皮細胞と間葉細胞を生体内と同等の細胞密度で区画化して再配置することが特徴であり、従来技術と比較して、安定的に再現性高く、再生歯へと発生させることを可能とした。器官原基法の開発により、歯や毛包の再生をはじめ、幅広い器官再生の研究に道を拓いた。

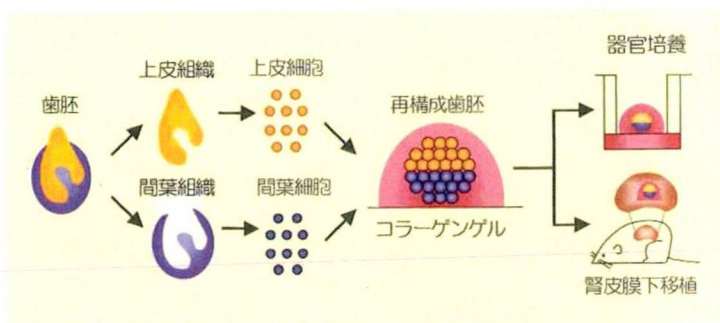


図 1 再生歯胚作製のための器官原基法

### 機能的な歯の再生

将来の実用化に向けて歯の再生治療を考えると、再生歯が組織学的に正常であることだけでなく、再生歯胚が成体口腔内で顎顔面と連携機能する再生歯となりうるかどうかが重要な課題である。そこで私たちは、臼歯再生歯胚を成体の歯喪失部位へ移植し、その発生と機能的な解析を行った (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009)。再生歯胚を歯の喪失部位へ移植して約 37 日目には再生歯が萌出し、約 50 日目には正常な歯と同等の硬度を有する再生歯が対合歯と咬合することを明らかにした (図 2)。

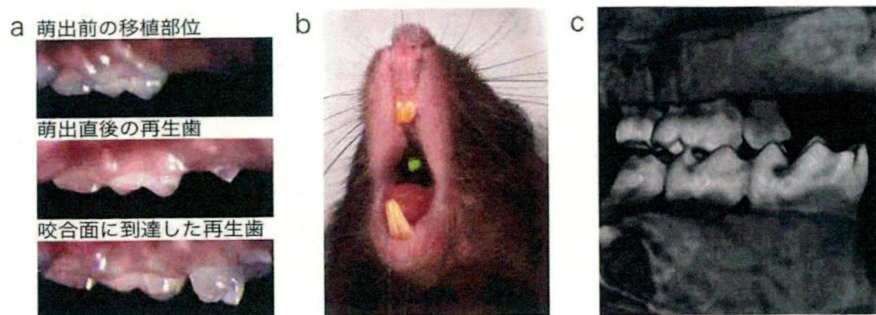


図 2 成体口腔内で発生・萌出した再生歯

- (a) 成体口腔内で発生し萌出・成長する再生歯。
- (b) 人為的な再生歯胚に由来する光る再生歯。
- (c) 対合歯咬合する再生歯。

さらに再生歯は正常と同等の歯周組織が存在することから、歯根膜を介した骨のリモデリング能を実験的矯正により解析した。その結果、再生歯は矯正により骨のリモデリングを介して移動する能力を有することが判明した。このことから、再生歯は歯根膜を介して顎顔面と連携機能することが示された。

さらに歯の機能として、外部侵害刺激を中枢に伝達する神経機能が重要である。再生歯の歯髄と歯周領域には、正常な歯と同様に神経線維が侵入していた。そこで再生歯に矯正や露髄によって侵害刺激を与えると、中枢の三叉神経脊髄露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。これらのことから再生歯胚を移植することによって、歯としての機能を完全に有する歯の再生が可能であることが明らかになった。これらの成果から歯科再生医療は実現可能性があると共に、この技術は上皮・間葉相互作用によって発生する幅広い臓器・器官に応用されることが期待される。

## 今後の展開

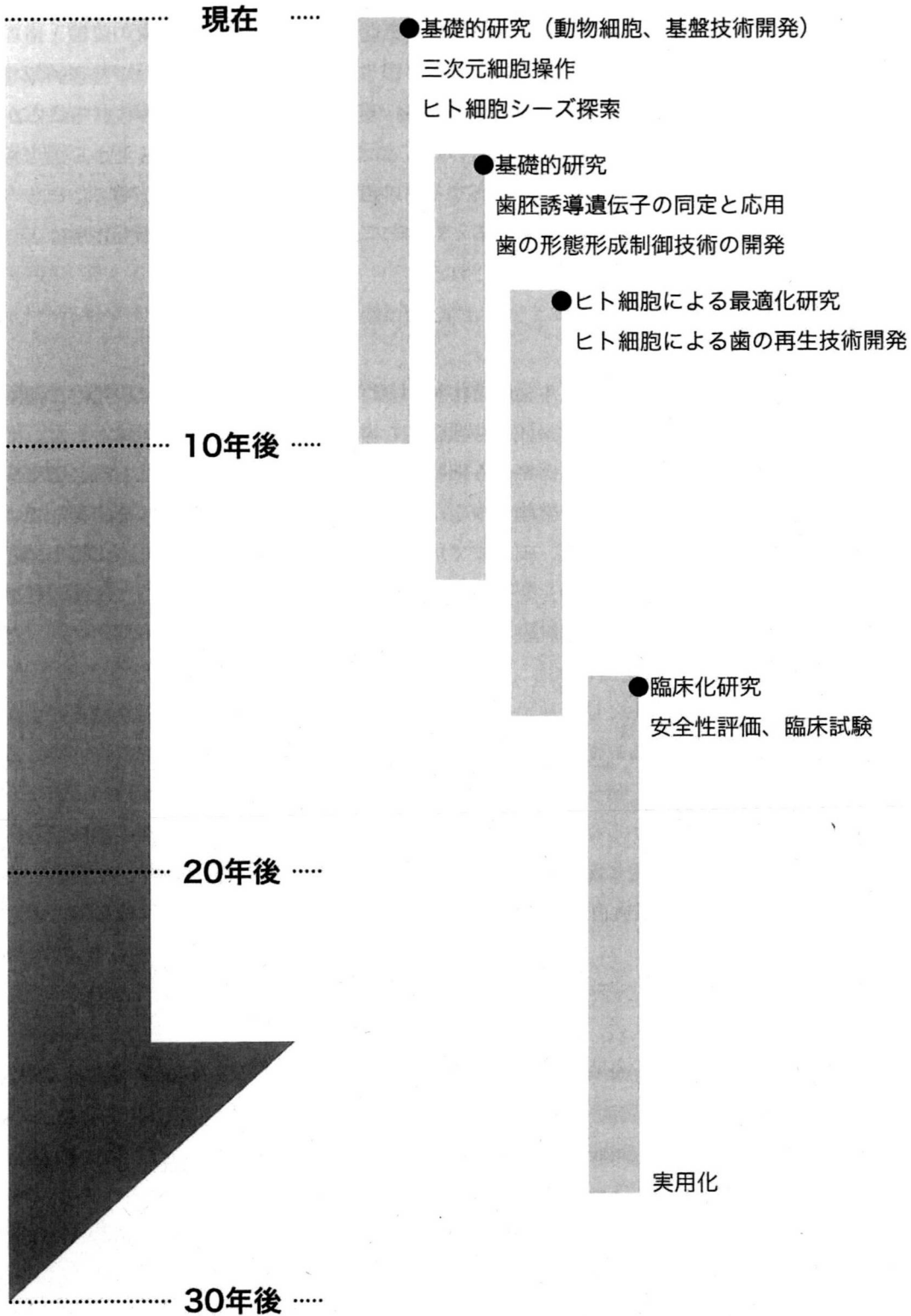
私たちは、歯の再生に関わる課題として、再生歯胚を作製するための生体外における三次元的な細胞操作技術である器官原基法を開発し、この再生歯胚から機能的な歯を再生させることを可能とした。歯の再生治療をヒトで実現するには、患者さんに由来する細胞から歯の再生を可能とすることが必要であり、現在、ヒトの歯に関連する組織や口腔内の細胞を中心に再生に利用可能な細胞シーズを探索している。さらに、ヒトの場合には再生歯胚から萌出、咬合までにかかる時間は長期間であるため、再生歯胚を生体外で培養し、短期間で移植可能な再生歯を製造する技術開発も期待される。こうした技術開発を成功させるための期間やヒトでの最適化、臨床試験、安全性の評価を進めるとなると、実用化にはまだ10-20年以上の期間が必要であろうと推測される。

またはじめに述べたように、歯の再生には、歯髄の再生や歯周の再生のような部分的な組織治療も含まれ、これらの臨床応用化研究は進められていることから、これらの実用化はより現実的なものであろう。また喪失歯に対する治療としても、歯を丸ごと再生することは理想的な治療であるものの、より現実レベルに近づけるとすれば、象牙質からなる歯根を歯根膜を介して歯槽骨と連携機能させる歯根の再生であろう。このようないくつかの段階にある再生治療を臨床応用化していくことにより、歯科再生治療として確立していくと共に、「臓器置換再生医療」としての完全な歯の再生を確立できるものと考えている。

## References :

1. Ikeda, E. et al., Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**(32), 13475-13480, 2009.
2. Ikeda, E. & Tsuji, T., Growing bioengineered teeth from single cells:potential for dental regenerative medicine., *Expert Opinion on Biological Therapy* **8**, 1-10, 2008.
3. Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M., Saitoh, M., Tomooka, Y. & Tsuji, T.: The development of a bioengineered organ germ method, *Nature Methods* **4**, 227-230, 2007.

## 臨床現場への応用に向けたタイムスケジュール



上記スケジュールは、「歯を丸ごと再生」するための研究課題の遂行によって予測される期間である。象牙質からなる「天然型の歯根を再生」する課題の場合には、臨床応用化の実現までの期間は短縮できると考えられる。