

歯科再生治療の実現に向けた研究戦略と展開

■シンポジスト 辻 孝 東京理科大学基礎工学部生物工学科

21世紀型の医療システムである再生医療は、身体の中に存在する「幹細胞」を損傷した部位へ移植し、組織や器官の機能を修復する細胞移入療法として臨床応用化に近づきつつある。さらに次世代再生医療として、疾患や傷害を受けた臓器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」を目指した基盤技術開発が期待されている。しかしながら、多様な細胞種からなる立体的な臓器や器官を人為的に構築する技術開発はほとんど進んでいない。

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し、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。また、歯の喪失に対してインプラントなどの人工的な治療も確立している。それゆえ「歯の再生」に向けた基盤技術と臨床応用化の研究は、臓器置換再生医療のモデルケースとして理想的であるとともに、その実現の可能性が高い器官であろう。現在、「歯の再生」は、未分化な上皮細胞と間葉細胞からなる歯胚を細胞操作によって再構築し、歯が喪失した部位へ移植して、第三の歯を発生させる戦略からアプローチされている。歯科再生医療の実現には、歯胚を再構築するための細胞操作技術や人工的な歯胚構築のための細胞シーズの探索、歯の形態形成制御、歯根・歯周組織形成技術など、幅広い技術開発が必要である。

最近、われわれは、「歯の再生」に向けた技術開発の第一段階として、単一化細胞から細胞操作により器官原基を再構築するための「器官原基法」を開発した。この方法は、単一化した上皮細胞と間

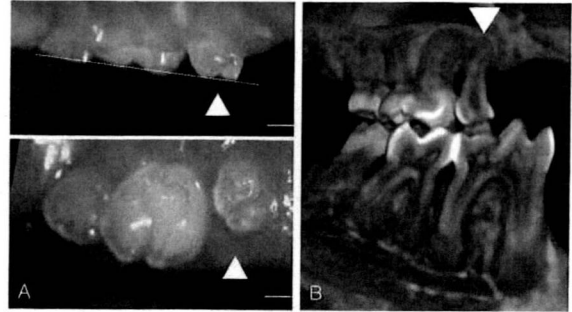


図 成体マウス口腔内移植モデルにより萌出、咬合した再生歯

再生歯胚を、成体マウス臼歯歯牙欠損モデルに移植した。移植後、約50日で萌出、咬合が認められた。A：再生歯(△)の外観(scale bar, 200 μ m)、B：再生歯のマイクロCTによる解析像(断面図)。

葉細胞をコラーゲンゲル内で高密度に区画化して立体的に配置することが特徴であり、正常な構造を有した再生歯を高頻度で発生させることを可能にした。さらにこの再生した臼歯歯胚を成体マウスへ移植すると、再生歯は萌出して咬合をとり、正常な歯と同様の硬度を有することが判明した。また再生歯は矯正が可能であるとともに、神経を介して中枢が侵害刺激を覚知していることから、再生歯は機能面な再生を果たしていることが明らかになった。これらの成果から、再生歯胚移植による歯科再生医療は実現可能性を有すると考えられる。

今後、歯科再生治療のための細胞シーズの探索や歯の形態制御技術の開発、生体外における再生歯の作製技術などを推進することにより、歯科再生医療の実現に向けた研究開発を推進していきたいと考えている。

次世代再生医療としての機能的な歯の再生

The Regeneration of Functional Tooth as an Organ Replacement Therapy

森田梨津子*¹ 辻 孝*²

21世紀の医療システムとして再生医療が期待されている。再生医療は、幹・前駆細胞を部分的な損傷部位へ移入する移植療法から、人為的に再生した臓器・器官と置き換える「臓器置換再生医療」へと技術開発のステージが移りつつある。本稿では、「歯の再生」をモデルとして、臓器・器官の再生に向けた研究戦略と最近の研究成果について解説する。

1. はじめに

発生・再生の研究によって、からだを構成するすべての細胞は「幹細胞」から生み出され、「幹細胞システム」によって生体の維持や組織修復が行われていることが明らかにされつつある。このような発生・再生における幹細胞システムや組織工学を医療に応用する「再生医療」が21世紀の新たな医療システムとして期待されている。再生医療は、臓器・器官や組織修復のための治療方法として、これまでの移植医療や人工的な臓器代替治療に代わる画期的な治療法に位置付けられ、厚生労働省によれば、再生医療産業は将来、世界規模で10兆円、我が国においても1兆円に及ぶ市場に成長すると予想されている¹⁾。

現在の再生医療は、組織や臓器・器官の部分的な損傷部位に幹細胞を移植して、生体の修復力によって治癒させる「幹細胞移入療法」を中心に臨床応用研究が進められている。一方、重篤な疾患や損傷によって不可逆的な傷害を受けた臓器・器

官に対する有効な治療法は、現在のところ臓器移植しかない。しかしながら、臓器移植を希望する患者に対する臓器充足率が低いことが大きな社会問題となっており、再生した臓器・器官を機能不全に陥った臓器と置き換える「臓器置換再生医療」の実現が期待されるようになった^{2,3)}。

筆者らは、臓器置換再生医療の実現を目指して、外胚葉性器官である「歯」や「毛包」をモデルとして研究開発を進めている。本稿では、「歯の再生」をモデルに、臓器・器官の再生に向けた研究戦略と研究の現状、今後の課題について解説したい。

2. 器官形成モデルとしての「歯」

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有している。そのため臓器・器官を再生するといっても、現在の生命科学の技術レベルでは、臓器・器官を構成するすべての細胞種を用意し、成体のからだのなかで十分

*¹Ritsuko Morita 東京理科大学 基礎工学研究科 生物工学専攻 博士後期課程

*²Takashi Tsuji 東京理科大学 総合研究機構 教授

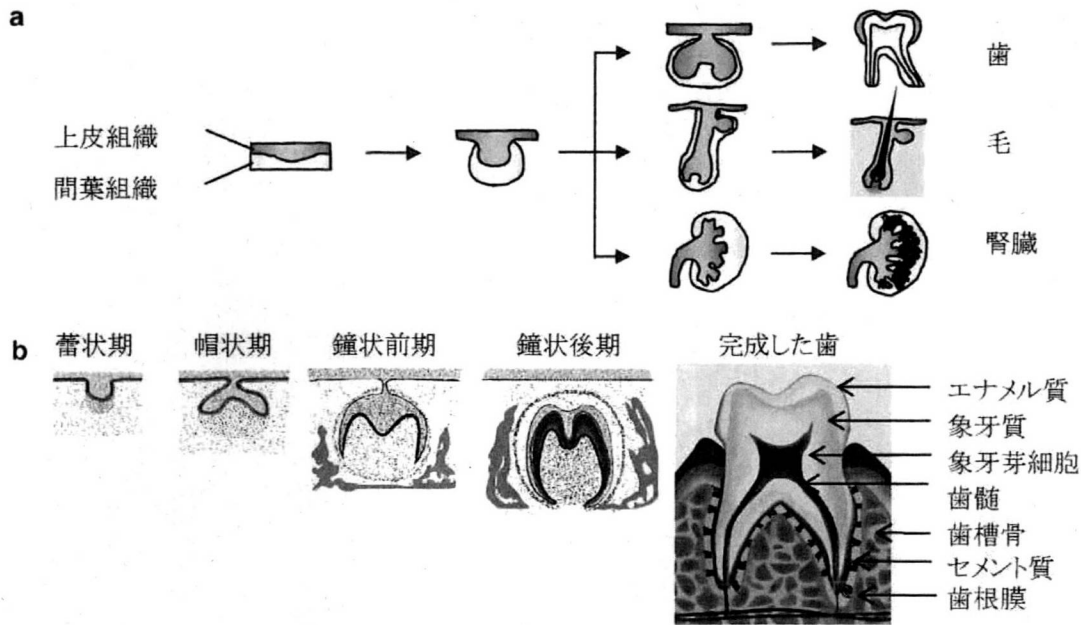


図1 臓器・器官の発生
a: 外胚葉性器官の発生, b: 歯の発生とその構造

に機能発現しうる三次元的な臓器・器官をつくりだすことはできない。ほとんどの臓器・器官は、胎児期に誘導される「器官原基」から発生することが知られている(図1a)。器官原基では、上皮・間葉相互作用によって互いの発生を制御し、最終的に多種類の細胞が機能的に配置された臓器・器官へと発生する。そのため、この発生過程における器官原基から臓器・器官形成を再現して成体の臓器・器官をつくりだすという新たな再生技術の概念が歯や毛包再生の領域で提唱された^{4~6)}。

歯の発生は、ヒトでは妊娠6~7週目、マウスでは胎齢10日目に歯の発生予定領域の上皮組織が肥厚することで始まる(図1b)。胎齢11日目には、上皮組織が間葉組織に向かって陥入を起こし、周囲の間葉組織が凝集する(蕾状期)。胎齢13~15日目になると、上皮組織が凝集した間葉細胞を包み込むように伸長して「歯胚」が形成される(帽状期)。胎齢15~18日目の歯胚では歯胚上皮組織はエナメル質を産生するエナメル芽細胞に、間葉組織は象牙質を分泌する象牙芽細胞や歯髓、歯周組織へと分化する(鐘状期)。その後、歯周組織からはセメント質や歯槽骨、歯根膜が形成され、最終的に機能的な歯が形成される(図1b)。

成熟した歯は、歯肉より上に露出している「歯冠部」と、歯肉に埋まっている「歯根部」から形成される。歯は、象牙質とエナメル質、歯根側を覆うセメント質という3つの硬組織から形成され、歯の内部には神経と血管が配向した歯髓が存在する。また歯は、歯と歯槽骨を接合する結合組織である歯根膜を介して周囲歯槽骨と連結されており、歯根膜は咀嚼においてショックアブソーバーとしての役割も果たしている。一方、歯根は歯冠形成後に垂直方向に伸長し、萌出後に対合歯と咬合するようになると完成する(図1b)。

歯の個数や歯の生え替わりの回数は、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、歯胚を再生して歯が欠損した部位へ移植をすれば、永久歯に続く第三の歯を生やすことが可能となるのではないかと考えられるようになった。

3. 三次元的な細胞操作技術としての「器官原基法」の開発

再生歯胚による歯の再生を実現するには、まず「三次元的な細胞操作によって歯胚を再生する技術開発」が必要である。この技術開発は、歯科領

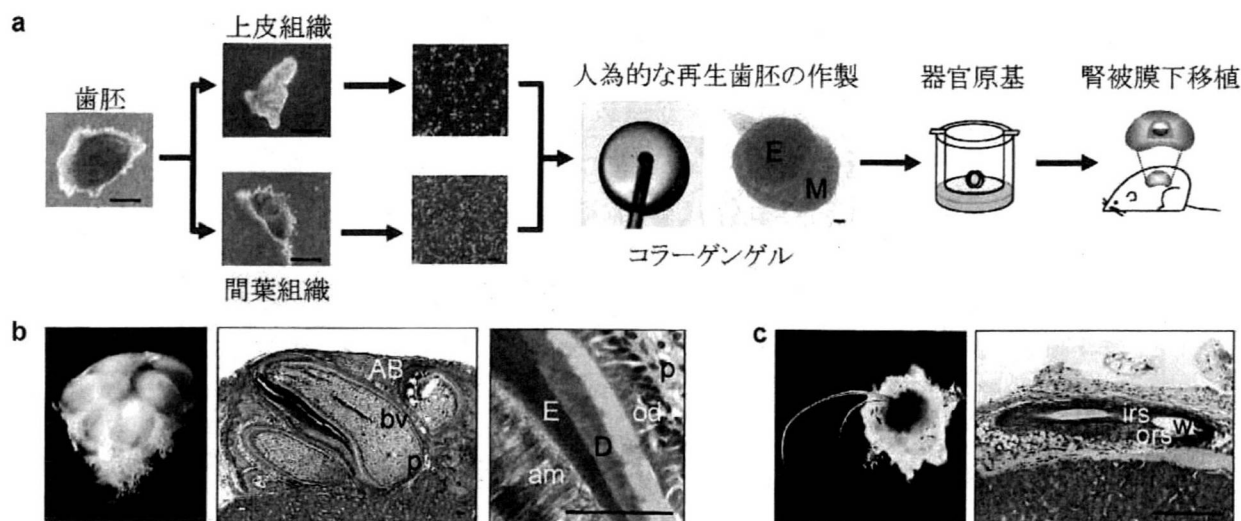


図2 「器官原基法」の開発

a: 「器官原基法」の概念図

b: 腎被膜下で発生した再生歯とその組織構造

am: エナメル芽細胞, AB: 歯槽骨, bv: 血管, D: 象牙質, E: エナメル質, od: 象牙芽細胞, p: 歯髄細胞, Scale bar: 50 μ m

c: 腎被膜下で発生した再生毛包とその組織構造

ws: 毛幹, irs: 内毛根鞘, ors: 外毛根鞘, Scale bar: 200 μ m

域においてすでに30年以上にわたり研究開発が進められてきた。

歯胚再生に向けた取り組みは、生分解性の担体に歯胚細胞を播種する組織工学技術と、歯胚細胞を再凝集させて歯胚を再生する技術に大別される⁷⁻¹²⁾。組織工学技術として、任意の大きさや形に成形した担体に細胞を播種することによって形態が制御された歯を再生できることが期待されるものの、これまでの技術では形態や組織構造の不完全さや再生頻度の低さなどの課題が残されている。一方、細胞凝集法による歯胚の誘導では、胎児期の歯胚発生における上皮間葉相互作用を再現する可能性が期待されているものの、小さな細胞凝集塊として安定して歯胚を再生する細胞操作技術は報告されていなかった。

筆者らは、生体内でおこる歯の発生を再現するには、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(図2a)¹³⁾。外科的に摘出した胎齢14.5日のマウス胎児の歯胚から酵素処理によって上皮細胞と間葉細胞を単一化し、遠心操作によって高細胞密度

の細胞懸濁液を調製する。この細胞を、器官原基法により、高細胞密度の上皮細胞と間葉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、溶液をゲル化させることによって再生歯胚を作製した。

この再生歯胚を生体内で異所的に発生させると、エナメル質や象牙質、エナメル芽細胞、象牙芽細胞、歯髄、歯根膜、歯槽骨を正しい組織配置で有する再生歯を、100%の頻度で発生させることができた(図2b)。さらに、同じ発生時期のマウス頬ひげの毛包原基から器官原基法により毛包を再生すると、正常な頬ひげと同じ組織構造を有する再生頬ひげが発生した(図2c)。これらのことから器官原基法は、歯だけではなく、幅広い臓器・器官の器官原基の再生にも応用できる可能性が示唆された¹³⁾。

4. 再生歯の成長と機能解析

再生歯胚が成体内で成長し、歯としての正常な機能を有するかどうか、将来の臓器置換再生医療の実現に向けた重要な課題であると考えられる。歯は、咀嚼や発音などに伴う咬合と顎の運動

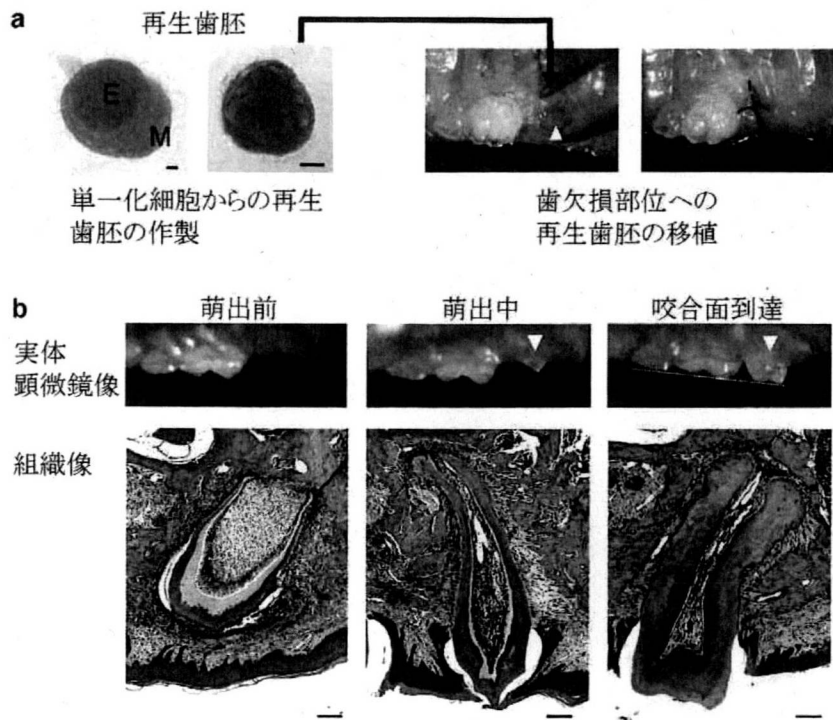


図3 成体顎骨内での再生歯胚の発生と萌出

a: 器官原基法により作製した再生歯胚の成体顎骨内への移植
 b: 再生歯胚移植後の経時的な実体顕微鏡による口腔内所見と再生歯の組織像
 Arrow head: 再生歯, 点線: 咬合面, Scale bar: 200 μm

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。そこで再生歯の成体内における成長と、これらの機能について解析した。

4.1 成体における再生歯の発生と萌出

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周囲組織との連携を回復しながら発生するかどうかは、再生歯胚からの歯の再生の実現化における大きな課題であると考えられていた。Ohazamaらは、マウスの切歯と臼歯の間の歯隙領域に、胎児から摘出した天然の臼歯歯胚を移植して歯が萌出する可能性を示した¹⁴⁾。しかしながら、再生歯胚が成体内で機能的な歯にまで発生しうるかどうかは不明のままであった。そこで筆者らは、再生歯胚の成体口腔内での発生・萌出を解析することとした(図3 a)¹⁵⁾。

まず歯欠損に対する再生歯胚移植モデルを開発した。マウスの第一大臼歯をピンセットで抜歯し、3週間程度で抜歯窩を自然治癒させ、再び歯の欠損部位にドリルで移植窩を開けて再生歯胚を移植し、縫合した。再生歯胚は、成体顎骨内で正常に発生して、移植後約37日目に再生歯が約60%の頻度で萌出すると共に、対合歯と咬合するまで伸長した(図3 b)。また、GFP標識した再生歯胚の移植実験から、再生歯と再生歯の歯周組織は移植した再生歯胚に由来することが明らかになった(Data not shown)。成体口腔内で発生した再生歯は、エナメル質や象牙質、これらを分泌する細胞種が正常な歯と同様に配置すると共に、再生歯と歯槽骨の間には線維状の歯根膜が形成されていることが認められた(図3 b)。エナメル質と象牙質は、成長に伴って成熟すると共に、これらの硬度を解析すると、移植11週後の再生歯と9週齢の成体マウスの正常歯とが同等の硬度を有していることが判明した。これらのことから再生歯は、

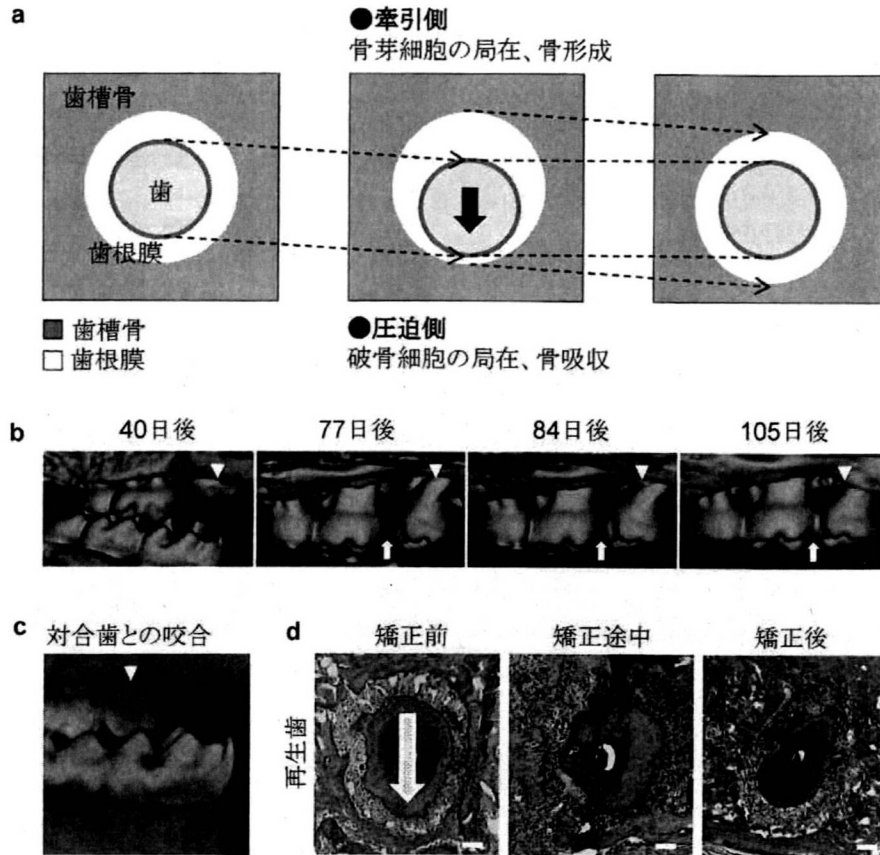


図4 歯根膜を介した歯と周囲組織との連携

- a: 歯根膜を介した周囲歯槽骨のリモデリングと歯の移動の概念図
歯に咬合や矯正による圧力が加わると周囲の歯根膜に圧迫と牽引が生じ、周囲歯槽骨のリモデリングが惹起される。
Arrow: 歯に加わる圧力
- b: 長期にわたる経時的な再生歯の MicroCT 解析像
再生歯が徐々に第二大臼歯（上顎の中央の歯）に近接する様子が観察され、生理的に顎骨内を移動することが示唆された。Arrow head: 再生歯, Arrow: 第二大臼歯と再生歯の歯間部
- c: 再生歯と対合歯との咬合の解析
- d: 矯正による歯周組織の経時変化の HE 染色像
矯正前は歯根膜を介して歯槽骨の中央に位置していた歯が、矯正途中では矯正方向に偏って位置し、周囲の歯根膜には圧迫と牽引が認められた。矯正後では再び歯は歯槽骨の中央に位置し、周囲の歯根膜に偏りは認められなかった。
Arrow: 矯正力, Scale bar: 100 μ m

天然歯と同じ組織構造を有して発生・萌出すると共に、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。

4.2 再生歯の咬合と周囲組織との連携機能

歯は、顎の成長・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、維持することが求められる¹⁶⁾。歯は、歯根膜を介して周辺の歯槽骨をリモデリング（骨の形成や吸

収によって骨の量や形を適切に調節すること）することにより生理的に移動する（図4 a¹⁷⁾。この機能は、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到達すると成長が停止し、生理的に移動しながら対合歯との適切な咬合を確立することが判明した（図4 b, c）。

さらに再生歯の歯根膜の機能を解析するため、

実験的な矯正を行うと、再生歯の歯根膜を介した周囲歯槽骨のリモデリングにより再生歯が移動した(図4 d)。これらの結果から、再生歯は、歯根膜を介して成体顎骨と連携機能すると共に、歯根膜による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。

4.3 再生歯への神経線維の侵入と刺激応答能の解析

成体の臓器や器官には、多数の末梢神経が侵入し、外部からの侵害刺激に反応すると共に、中枢神経系と連絡して体内の恒常性維持や周囲組織と

の連携に機能すると考えられている^{18,19)}。そのため、機能的な臓器・器官の再生には、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。

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味覚などの感覚受容器として機能している(図5 a)。再生歯の歯髄や歯根膜にも多くの神経が侵入し(図5 b)、天然歯と同様に交感神経と知覚神経が侵入していた(data not shown)。さらに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 タンパク質を産生して応答していると考え

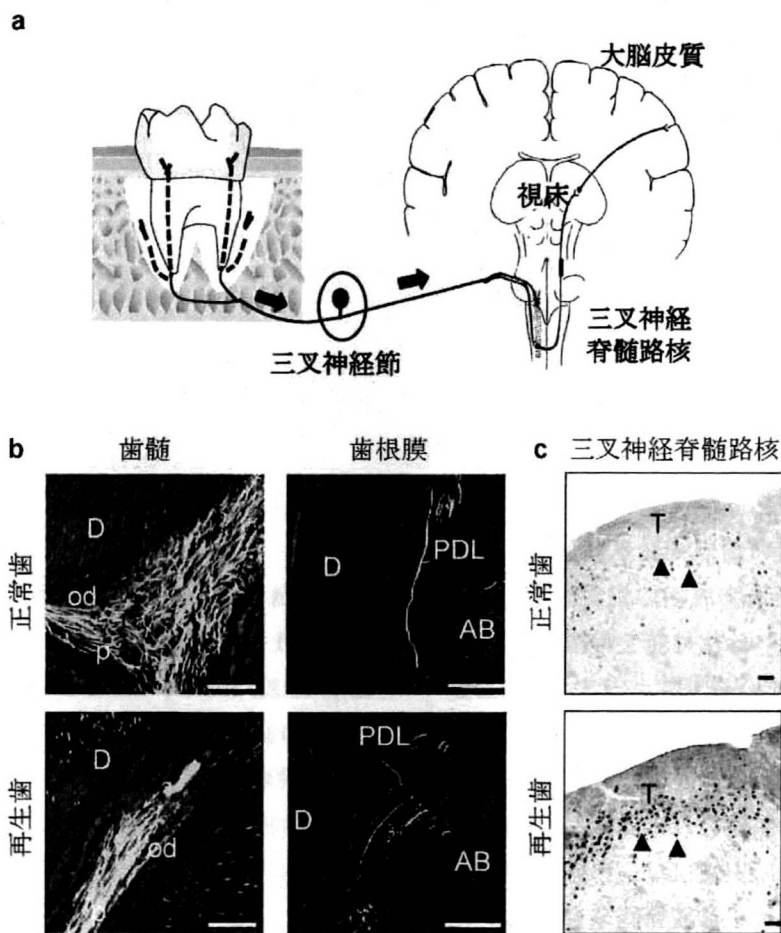


図5 再生歯組織における神経の解析

- a: 歯に侵入する神経の模式図
- b: 正常歯と再生歯に侵入する神経
AB: 歯槽骨, D: 象牙質, od: 象牙芽細胞, p: 歯髄細胞, PDL: 歯周組織, Scale bar: 25 μm
- c: 正常歯と再生歯の矯正後の三叉神経脊髄路核尾側亜核におけるc-Fos陽性神経核の免疫組織化学染色像
T: 三叉神経脊髄路, Arrow head: c-Fos陽性神経核, Scale bar: 50 μm

られている。再生歯に矯正や露髄などの痛みの刺激を与えると、中枢で c-Fos の発現が天然歯と同様に誘導されることから、再生歯が外部侵害刺激を受容する機能を有することが示された (図 5 c)。これらの結果は、器官原基の成体内移植によって中枢神経系による調節を受けうる臓器・器官を再生できる可能性を示した。

5. 歯の再生の臨床応用化に向けた課題

最近のこれらの研究によって、歯の再生治療の実現に向けた基盤技術が確立しつつある。しかしながら歯の再生治療の臨床応用を実現するためには、まだいくつかの大きな課題が残されている。

ひとつは移植免疫による拒絶反応の回避のため、再生歯胚を作製する能力を有する細胞シーズを患者体内から見つけることが必要である。発生生物学的には、歯胚を含め器官原基のほとんどが胎児期に誘導されるため、成体に器官誘導能を有する幹細胞が存在するかどうかは明らかにされていない。これまでにマウスにおいて口腔粘膜上皮組織や舌上皮組織から細胞株を取得し、歯胚間葉組織と組み合わせると歯が形成され、これらの上皮細胞はエナメル芽細胞に分化してエナメル質を形成することが報告されており、歯以外の組織に由来する細胞から歯胚を誘導する技術開発が期待される²⁰⁾。また永久歯の歯髄やヒト乳歯の歯髄、ヒト第三大臼歯の歯根未完成歯の根尖歯髄には、象牙芽細胞や歯髄細胞へ分化可能な幹細胞が存在することが報告されている^{21~24)}。また歯周領域にはセメント芽細胞や歯根膜を形成する幹細胞が同定されている²⁵⁾。これらの幹細胞を利用した歯の再生治療の可能性も期待される。

さらに歯の再生治療の実現には、再生歯の形態や大きさを生体外で制御する技術開発も必要であろう。歯には切歯や臼歯など形が異なる歯が存在すると共に、移植部位に応じた歯の大きさを制御する技術が必要になると考えられる。また再生歯胚移植による歯の再生だけでなく、生体外で再生歯にまで育成して移植できれば機能的な再生歯を利用できるまでの治療期間の短縮が予想され

る。しかしながら、歯の形態形成のメカニズムはまだまだ未解明な点も多く、さらなる基礎研究が求められる。

6. おわりに

筆者らの研究成果から、細胞操作によって人為的に再生した器官原基から生体内で正常機能する臓器・器官を再生できる可能性が示されると共に、機能不全に陥った臓器を再生臓器と置換する臓器置換再生医療の実現可能性が示された。

しかしながら器官原基からのアプローチは、歯や毛のように、生死に直接影響しないような器官では適用可能性を有するものの、肝臓や心臓のように機能不全が致死的である臓器・器官には適用することはできない。そのため、幅広い臓器・器官を対象とする臓器置換再生医療の実現には、生体外で機能的な臓器・器官を構築し、培養・維持できるようなシステムの開発が必要であると考えられる。なかでも、臓器・器官内部の血管経路を構築することにより、臓器・器官機能を発現可能な三次元的器官再生を実現できると考えられる。さらなる基盤技術の開発を推進すると共に、実現可能性のある領域から再生医療の臨床応用化研究が進められ、新しい医療システムとして発展することが期待される。

[謝辞] 本研究は、厚生労働省・厚生労働科学研究費補助金・「再生医療実用化研究事業 (代表: 山口朗東京医科歯科大教授)」(2009~2011 年度)、文部科学省・科学研究費補助金・基盤研究 (A) (2008~2010 年度)、同・特定領域研究「バイオ操作 (代表: 福田敏男名古屋大学教授)」(2008, 2009 年度)、(株)オーガンテクノロジー・共同研究費の研究助成により実施されました。ここに記して感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省の平成 22 年度研究事業に関する評価

- (案), http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/08/dl/s0826-1b_0017.pdf
- 2) A. Atala *et al.*, *Nat. Clin. Pract. Urol.*, **2**, 143-149 (2005)
 - 3) J. P. Brockes *et al.*, *Science.*, **310**, 1919-1923 (2005)
 - 4) E. Ikeda *et al.*, *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **8**, 735-744 (2008)
 - 5) S. E. Duailibi *et al.*, *Periodontol.*, **41**, 177-187 (2000)
 - 6) P. T. Sharpe *et al.*, *Sci. Am.*, **293**, 34-41 (2005)
 - 7) C. S. Young *et al.*, *J. Dent. Res.*, **81**, 695-700 (2002)
 - 8) M. T. Duailibi *et al.*, *J. Dent. Res.*, **83**, 523-528 (2004)
 - 9) M. J. Honda *et al.*, *Arch. Histol. Cytol.*, **68**, 89-101 (2005)
 - 10) Y. Sumita *et al.*, *Biomaterials*, **27**, 3238-3248 (2006)
 - 11) B. Iiu *et al.*, *Arch. Oral Biol.*, **50**, 131-136 (2005)
 - 12) Y. Song *et al.*, *Dev. Dyn.*, **235**, 1334-1344 (2006)
 - 13) K. Nakao *et al.*, *Nat. Methods*, **4**, 227-230 (2007)
 - 14) A. Ohazama *et al.*, *J. Dent. Res.*, **83**, 518-522 (2004)
 - 15) E. Ikeda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13475-13480 (2009)
 - 16) J. K. Avelyほか, 口腔組織・発生学, 第2版, p.151, 医歯薬出版 (2001)
 - 17) M. Shimono *et al.*, *Microsc. Res. Tech.*, **60**, 491-502 (2003)
 - 18) M. R. Byers *et al.*, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **10**, 4-39 (1999)
 - 19) H. J. Lenz *et al.*, *Z. Gastroenterol.*, **3**, 9-14 (1987)
 - 20) A. Komine *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 758-763 (2007)
 - 21) A. H. Yen *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **6**, 9-16 (2006)
 - 22) S. Gronthos *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13625-13630 (2000)
 - 23) M. Miura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5807-5812 (2003)
 - 24) W. Sonoyama *et al.*, *Plos. ONE*, **1**, e79 1-8 (2006)
 - 25) B. M. Seo *et al.*, *Lancet*, **364**, 149-155 (2004)

