

201006008A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 口 朗

平成23(2011)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. 顎骨造成法の開発 25
(口腔領域の軟組織および骨組織の再生に関する研究)
春日井 昇平
2. 臓器置換型再生歯の開発と再生歯の評価 33
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・萌出モデルの作成に関する研究)
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 46
福本 敏
5. 歯根再生法の開発と再生歯の評価 49
(イヌモデル組織工学的人工再生歯根技術の開発に関する研究)
園山 亘

- III. 研究成果の刊行物・別刷 54

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マウスモデルにおいて再生歯胚から成熟した歯の構造体である再生歯ユニットを作製し、成体マウス顎骨内に移植することにより、歯・歯周組織の包括的再生を可能とする機能的な歯の再生技術を構築した。②マウスで構築した臓器置換型再生歯の技術を前臨床研究へ展開するため、器官原基法によるイヌ再生歯胚および再生歯ユニットの作製条件の検討及び歯牙喪失イヌモデルの開発を行った。③9～12歳児の第3大臼歯歯胚から採取した歯乳頭組織、および歯小囊組織を免疫不全マウスに移植し、ヒト歯胚に由来するエナメル質、象牙質、セメント質、歯根膜が形成されることを確認した。④ビーグル犬胎仔及び仔犬から硬組織形成直前のステージである歯胚を摘出し、顎骨への他家移植および自家移植を行って、継続的な発生・萌出が達成される手技・条件を検討した。⑤ビーグル成犬抜去歯から得た歯髓組織ならびに歯根膜組織より、幹細胞を含む細胞群が採取可能であることを確認した。⑥ビーグル成犬抜去歯から得た歯髓細胞は歯根型スキャホードのポーラス内部に象牙質様硬組織を再生させるのに有用であること、歯根膜細胞シートは歯根型スキャホードの周囲に歯根膜様組織の形成を促し、周囲組織との癒合を防止する役割を果たすことを確認した。⑦iPS細胞および分化した歯髓細胞から、歯の再生に必要な細胞集団の作成が可能となった。⑧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あるいは架橋ゼラチン膜が、骨欠損部の再生を促進することを組織学的に確認した。⑨骨芽細胞のBMP2発現を促進するシンバスタチンを組み合わせて骨補填材の臨床試験を継続しておこない、インプラント治療に有用であることを明らかにした。⑩天然化合物であるacerogeninがBMP-2の作用を介して骨芽細胞分化を促進することを明らかにした。⑪イヌ頬粘膜由来の線維芽細胞はBMP-2の作用により、invitro及びinvivoで骨芽細胞に分化可能であることを明らかにした。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した

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

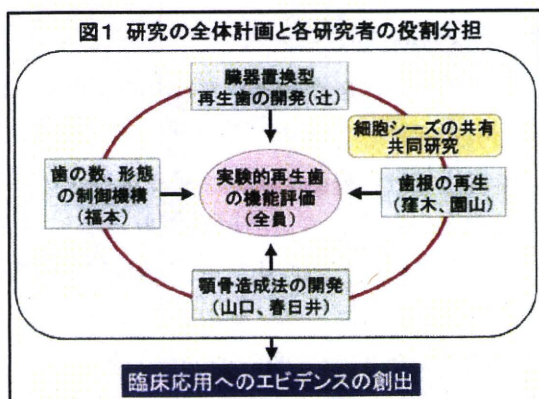
ことが困難である。これらの点を克服するために、国内外で「歯の再生医療」の技術開発が試みられてきたが、実用化可能な技術の開発には至っていなかった。これは、複雑な歯・骨の発生メカニズムの理解を基盤とした研究が十分に構築されていなかったためと思われる。

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 (Nature Methods 4: 227, 2007, Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 13475-1380, 2009) 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。また、本年度は、前臨床研究へと展開することを目的として、イヌを用いた細胞操作、並びに移植モデルの開発を重点的に進めた。

B. 研究方法

1. 研究全体の計画 (図1)

本研究では、1) 器官原器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サイ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。



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サイ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) 臓器置換型再生歯の開発

① 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発：細胞サイズの探索 (辻)

前臨床段階を目指した大型動物モデルにおける細胞サイズを探索するために、胎齢 55 日齢および生後 30 日齢のイヌ顎骨から、帽状期ならびに鐘状期の乳歯・永久歯歯胚を摘出する方法を検討した。

② 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発：移植モデルの開発 (マウス) (辻)

完成した再生歯を歯の喪失部位に移植して、顎骨に生着機能することを明らかとするために、再生歯胚から歯と歯周組織からなる完成した歯の構造体である再生歯ユニットを作製する方法、ならびに成体マウスにおける動物移植モデルを開発した。人為的に作製した再生歯胚を、3 次元空間を確保するデバイス内に包埋してマウス腎皮膜下に移植を行い、移植に適した再生歯ユニットを作製可能であるか評価を行った。さらに、成体マウスの下顎第一臼歯を抜歯して歯肉治癒

をさせた後、直径 1.0 mm の移植窩を形成し、再生歯ユニットを移植した。移植後、経時的な再生歯の生着をマイクロ CT 撮影および組織学的にて評価した。

また腎皮膜下で発生、ならびに顎骨に生着した再生歯ユニットが、咬合に耐えうる機能的な歯の硬さを有するかを明らかとするため、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、顎骨に生着した再生歯ユニット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 0.010 インチの矯正用ワイヤーを用いて、顎骨に生着した再生歯に 10~15 g の実験的矯正力を負荷し、6 日後における骨吸収、骨形成マーカーの組織学的評価を行った。

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を免疫染色にて検出し、さら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において、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解析した。

また、歯槽骨を有して発生する再生歯ユニットを広範性の骨欠損部位に移植することにより、歯槽骨の回復を伴う再生歯の生着が可能であるかを解析するために、マウス下顎骨に広範性骨欠損モデル（近遠心径 1.5mm、頬舌径 1.2mm、高さ 0.6mm）を作製し、その部位に再生歯ユニットを移植して、経時的な歯槽骨の回復と再生歯の生着をマイクロ CT 撮影および組織学的にて評価した。

③ 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発：

移植モデルの開発（イヌ）（辻）

岡山大学と共同で、イヌ自家および他家歯胚を用いた移植モデルの開発を実施中であり、本分担研究者はイヌ再生歯胚の作製と発生を進めている。胎齢 55 日、ならびに生後 30 日齢のビーグル犬顎骨から、帽状期および鐘状期歯胚と考えられる永久歯歯胚を摘出し、再生歯胚の作製と発生を解析した。

④ 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発：

遺伝子解析（辻）

非歯胚由来細胞を歯胚形成細胞に誘導しうる遺伝子の探索を目的として、天然歯胚の誘導に関わる遺伝子の網羅的な解析を行った。天然歯胚の誘導と形成が認められる胎齢 11.5 日、12.5 日、14.5 日、16.5 日、18.5 日のマウス胎児から摘出した下顎臼歯歯胚の total RNA を、定法により抽出した。Agilent 4 x 44K Whole Mouse Genome を用いてマイクロアレイ解析を行い、時間経過に伴う遺伝子発現の変動パターンを Gene Spring software を用いて解析し、歯胚の誘導が起こる胎齢 11.5~14.5 日の天然歯胚において高発現する遺伝子を選別した。これらの遺伝子の誘導期歯胚における遺伝子発現を明らかにするため、定法により特異的な RNA プローブを合成し、*in situ hybridization* 法を用いて胎齢 12.5~14.5 日の天然歯胚における遺伝子発現のデータベース化を行った。

⑤ 歯の数、大きさ、形態の制御機構の解明（辻）

器官原基法を用い再生歯の数、大きさをコントロールする技術開発として、歯胚再構成における細胞の接触面積を調整することにより、形成される再生歯の歯冠幅の制御とその分子機構の解明をマイクロ CT および *in situ hybridization* にて解析を行った。

⑥ 実験的再生歯の機能評価（辻）

実験的再生歯の形態評価を行うために、マイクロ CT を用いて、イヌ顎骨内およびマウス腎皮膜下における歯胚発生を評価する方法を構築した。さらに実験的再生歯の機能評価として、歯の硬度、矯正実験による歯根膜機能の評価、神経機能解析方法の検討を行った。

⑦ 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。

（倫理面への配慮）

1. ヒト材料研究

研究方法の項目⑥における9～12歳児の第3大臼歯幼若歯胚を得るにあたり、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、以下の点を遵守した。

(1) 提供者を選ぶ際の方針

岡山大学医学部・歯学部附属病院口腔外科(病態系)、歯周科、および矯正歯科、岡山市なんば歯科医院を受診した患者(8～50歳)で、本研究計画の意義・目的や、偶発症・不利益について十分に理解を得た上で、ボランティアとして参加いただける患者を対象とした。具体的には、智歯周囲炎、う蝕、歯周病の診断を受け、抜歯適応となった歯を持つ患者、ならびに歯科矯正治療上の便宜抜歯を行うこととなった患者を対象とした。

(2) インフォームド・コンセントの方法及び方法

試料採取を行う施設(岡山大学、なんば歯科医院)において「提供者に対する説明文書」を試料提供者に手渡し、これに基づき同意の任意性と撤回の自由、研究計画、利益と不利益、個人情報の保護、研究終了後の試料の取扱い等について、分かりやすく説明する。試料提供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。

(3) 個人情報の保護の方法

匿名化の方法については、下記の方法にて施行した。まず試料を採取する施設において、患者の年齢と性別のみを記録し、新たなID番号を付与した。試料から得た細胞の保存に際しては、ID番号と年齢、性別、レントゲン写真の対応表を作成し、この対応表からは提供者個人が特定できないよう配慮を行った。東京理科大学では、岡山大学において付与された患者年齢と性別、ID番号の情報と、ID番号の付与された試料を受領し、実験に使用した。必要に応じて、ID番号と研究より得られたデータを保管、あるいは岡山大学へ提

供した。

⑧ 他家歯胚移植モデルの確立(窪木)

前年度から、胎生55日齢の胎仔第二小臼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、サイクロスポリン投与による免疫抑制状態において、他家歯胚移植を行い、歯胚発生の有無をマイクロCTにて評価してきた。しかし、歯胚発生は認められず、その原因として、1)サイクロスポリンによる免疫抑制効果が不十分である可能性、2)移植窩洞形成による移植時の強い急性炎症反応による負の作用の可能性、3)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可能性を考えた。そこで、1)に免疫抑制剤の有効血中濃度を保つためには、一日二回投与が望ましいが、これまでは手技的な問題から筋肉注射による一日一回投与を行ってきた。この問題を解決するため、FK506とプレドニゾロンの併用による経口投与に変更し、一日二回食事と混合し投与することとした。2)の問題を解決するため、移植3日前に前もって移植窩洞を形成し、急性炎症反応の軽減を図ることとした。3)の問題を解決するため、移植窩洞への骨再生を一定期間抑制することを目的に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、移植を行った。またこれら実験には免疫抑制剤なしのコントロール群を設定した。

⑨ 自家歯胚移植モデルの確立(窪木)

免疫反応による負の因子を排除するため、自家歯胚移植による歯胚の発生の有無を検討した。つまり、これまでの文献的情報から、萌出モデルの検討に適した胎生30日齢の下顎第3、4小臼歯(P3、P4)の歯胚に注目し、30日齢の子犬の下顎第3、4小臼歯を抜歯後、顎骨からP3、P4の歯胚を摘出し、抜歯窩へ自家歯胚移植を行った。移植2ヶ月後に下顎骨ごと摘出し、マイクロCTにて解析を行った。

2) 歯根再生法の開発(園山)

① イヌ歯髓細胞、歯根膜細胞の幹細胞マーカー発現の解析ならびに多分化能の検討

前年度、イヌ歯髓組織から歯髓細胞、歯周組織から歯根膜細胞の単離に成功し、これらの細胞が硬組織形成能を有していることを確認した。今年度は、まずこれらの細胞が幹細胞マーカーを発現しているかを確認するため、CD34, CD45, CD29, CD44, CD90, CD271の細胞表面マーカーの発現について、フローサイトメトリーを用い、骨髓由来幹細胞と比較検討した。また、多分化能を有しているか確認するため、脂肪分化誘導培地で長期間培養し、オイルレッドO染色にて脂肪分化の有無を確認した。

② 歯髓細胞、歯根膜細胞評価

歯髓細胞の象牙質形成能、歯根膜細胞の歯周組織形成能を確認するため、多孔性ハイドロキシアパタイト(HA:ネオボーン, エム・エム・ティー)に歯髓細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆して、SCIDマウス背部皮下に移植し、8週後に回収し、組織学的に評価した。

③ 人工歯根に適したキャリアの選定

前年度から歯根膜細胞シートを多層に被覆した、歯髓細胞を含む歯根型多孔性HAおよび多孔性β-TCP(オスフェリオン、オリンパステルモバイオマテリアル株式会社)を細胞分離のために下顎小臼歯抜歯を行ったビーグル犬の抜歯後3ヶ月の治癒を待った顎骨に埋入窩を形成し、移植した。移植12週後に灌流固定のうえ屠殺し、研磨切片を作製後、組織学的検討を行った。

④ 再生歯根膜の機能的評価

歯根膜細胞シートにより正常な歯根膜組織が再生されれば、挺出方向の矯正力に対して周囲骨は歯根膜の付着レベルを維持したまま垂直方向に増生されると推測される。この仮説を検証するために、挺出装装置付きの再生人工歯根を顎骨へ埋植し、2-3ヶ月後に矯正力を加え、人工歯根並びに周囲組織の移動量をX線学的、肉眼的に評価した。

また、歯根膜組織の成熟には機能力の負荷が必

要であると考えられるため、歯髓細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆したHAに歯冠補綴物装着のためのポスト(維持孔)を形成した。その後、歯冠補綴物作製のための印象採得を行い、歯冠補綴装置の作製、装着を行い、負荷をかけた。

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) 細胞シーズの開発(福本)

昨年の研究成果により、iPS細胞からエナメル上皮細胞への誘導が可能となり、またケミカルコンパウンドを利用し、分化した歯髓細胞から、歯髓幹細胞を大量に調整する方法を見いだした。そこで、iPS細胞から歯関連細胞への分化誘導に必要な分子の同定を試みた。また、ケミカルコンパウンドで誘導した歯髓幹細胞の細胞分化能について検討を行った。さらに、新たなFDA認可ケミカルコンパウンドライブラリーと天然コンパウンドライブラリーを使用し、幹細胞を人為的に誘導する薬剤同定を試みた。ルコンパウンドライブラリーと天然コンパウンドライブラリーを使用し、幹細胞を人為的に誘導する薬剤同定を試みた。

4) 顎骨造成法の開発

① イヌ口腔粘膜由来線維芽細胞を利用した骨造成法の開発(山口)

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困難である。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。

全身的に健康な生後12月齢の雄性ビーグル犬の口腔粘膜からOutgrowth法にて線維芽細胞を培養した。これらの細胞を用いてIn vitroの実験ではALP染色及び骨芽細胞分化マーカー (Runx2, Osterix, Osteocalcin) のmRNAの発現をリアルタイムRT-PCR法で解析した。

さらにIn vivoでの骨芽細胞分化能を検討するために、口腔粘膜線維芽細胞にレトロウイルスベクターpLP-LNCXでGFP遺伝子を導入したものをヌードマウス後背筋筋膜下に移植し、細胞動態を追跡した。実験群としてはrhBMP-2 (Osteogenetics GmbH社製) を2 μ g付着させた β -TCP強化型ゼラチンハイドロゲル (メドジェル社製) とGFP遺伝子を導入した細胞の複合体を用いた。コントロール群としてはrhBMP-2を含まないゼラチンハイドロゲルと細胞の複合体を用いた。移植後、1週及び2週後に経時的に屠殺し、軟X線解析、組織学的解析、形態計測的解析を行った。

② 骨形成を促進する天然化合物の探索 (山口)

骨形成を促進する天然化合物の候補として、今年度はacerogenin 類縁体 (ACE) の骨芽細胞分化に及ぼす作用を検討した。

3種の培養細胞を用いた (骨芽細胞様細胞株であるMC3T3-E1細胞、本研究室で樹立したRunx2欠損細胞であるRD-C6細胞及びマウス新生仔の頭蓋冠初代培養細胞)。これらの細胞にアセロゲニン (中部大学 禹 濟泰教授より供与) を添加して培養後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定及び骨芽細胞分化関連 mRNA の発現を Real time RT-PCR 法で解析し、骨芽細胞分化に及ぼす作用を評価した。また、ACE の作用メカニズムを検討するために、BMP のアンタゴニストであるNogginを添加して、その作用も解析した。

③ 骨造成に有用なDDS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] あるいはゼラチンを熱架橋した材料は、成長因子や薬物のDrug

Delivery System (DDS) に有用な材料であると考えられている。そこでこれらの材料を用いて Guided Bone Regeneration (GBR) 用の膜を作成し、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。

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た。この骨補填材を、口腔領域に骨欠損があり、同意を得られた被験者に適用して、放射線学的に検討し、その部位にインプラントを埋入した被験者を継続して観察した。

alpha-TCP, beta-TCP, HA (ハイドロキシアパタイト) にシンバスタチンを含有させ、ラット頭部の直径5mmの骨欠損部に適用し、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。

C. 研究結果

1) 臓器置換型再生歯の開発

① 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発 : 細胞シーズの探索

イヌ再生歯胚作製のための細胞シーズを探索し、胎齢55日の帽状期および鐘状期のイヌ乳歯、並びに永久歯歯胚を摘出する手技を確立した。さらに、それら歯胚上皮組織・間葉組織を用いた歯胚再構成によって歯胚発生が認められたことから、イヌ歯胚においても歯胚誘導を再現することが可能であることを明らかとした。作製したイヌ再生歯胚の発生には長期間の培養が必要であるため、免疫不全マウスの腎皮膜下に移植して生体内で生育させた。その結果、移植後1ヵ月において歯冠硬組織形成を伴う歯胚発生が確認され、移植後2ヵ月では形成された歯冠硬組織量の増加を認め、歯胚発生が進行していることが判明した。

② 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発 : 移植モデルの開発 (マウス)

人為的に作製した再生歯胚から、完成した歯の構造体である再生歯ユニットを作製するために、器官原基法によって再生歯胚を鐘状期まで発生させたのち、腎皮膜下に移植を行った。腎皮膜下移植において皮膜の圧力の影響を回避する目的で、空間確保が可能なデバイス内に歯胚を位置して移植を行った。その結果、成熟した歯・歯根膜・歯槽骨が一体となった歯の構造体である再生歯ユニットを作製可能であり、歯冠の厚み、ならびに歯の長さが規定された移植に適した形態を有していた。腎皮膜下で形成される再生歯ユニットは移植期間に伴って歯冠・歯根部、および歯槽骨の成熟を認め、エナメル質、象牙質、歯髄、歯根膜、歯槽骨といった歯を構成する組織構造も天然歯と同等であった。

歯槽骨を有して発生する再生歯ユニットが、骨性結合を介して顎骨内に生着可能であることを明らかとするため、マウス下顎骨における歯牙喪失モデルに再生歯ユニットを移植・固定して歯肉を縫合した。移植 40 日目には再生歯ユニット由来の歯槽骨の吸収とともに再生歯歯根周囲の歯槽骨の形成・緻密化が認められた。同時期における CT 像および組織像の解析から、再生歯と下顎第二臼歯との槽間中隔歯槽骨が一塊の骨組織として認められ、再生歯ユニットが骨結合を介してレシピエント歯槽骨に生着していることが示された（生着率 79.5%）。また、レシピエント顎骨に生着した再生歯ユニットは、天然歯列内に正常に位置しており、対合歯との咬合を認めた。一方、歯の咬合機能には歯の硬組織の硬度が重要であるため、腎臓皮膜下で発生した再生歯ユニット、および顎骨に生着した再生歯のヌープ硬度を測定した。腎臓皮膜下で発生した再生歯のエナメル質の硬度は天然歯と比較して低いものの、顎骨移植 40 日後の再生歯のエナメル質の硬度は有意に上昇していた。また象牙質の硬度は、いずれも 11 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、再生歯ユニットは咀嚼可能な機能的な歯の硬度を有することが明らかになっ

た。

顎骨に生着した再生歯が、天然歯と同等の生理的機能を有するかを明らかとするために、歯根膜機能および神経機能について解析を行った。歯根膜を介する歯の移動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* の 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。このことから、歯根膜を介した歯槽骨のリモデリングにより、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。また顎骨に生着し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。

歯槽骨を有した再生歯ユニットを歯槽骨が吸収した歯の喪失部位に移植することにより、歯槽骨の回復を伴う再生歯の生着が可能であるかを解析するために、広範性骨欠損モデルに再生歯ユニットを移植したところ、天然歯の歯槽骨レベルには至らないものの、移植 15 日目には頰側歯槽骨の垂直的な回復が認められた。このことから、深刻な骨欠損を伴う歯の喪失部位に対して再生歯ユニットを移植することにより、歯槽骨の回復を伴う生着が可能であることが示された。

これらの結果より、再生歯胚から完成した歯の構造体である再生歯ユニットを作製可能であり、その再生歯ユニットを移植することにより、歯と歯周組織を包括的に再生可能な機能的な歯の再生技術になりうることを明らかとした (Oshima *M et al.*, *PLoS ONE*, *under submission*)。

③ 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発：

移植モデルの開発 (イヌ)

辻、窪木、園山の共同で、イヌ自家および他家歯胚を用いた移植モデルを構築中であり、胎仔期ならびに若齢期イヌ顎骨から歯胚を摘出する手技を確立すると共にその歯胚を用いたイヌ移植モデルを検討中である。

④ 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発： 遺伝子解析

歯胚形成誘導遺伝子の同定のために、胎齢11.5～14.5日におけるtotal RNAを用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、歯胚形成誘導期に高発現する76遺伝子をスクリーニングした。これらの76遺伝子の遺伝子発現領域を同定するため、各歯胚発生過程をin situ hybridizationにて発現パターンを解析したところ、候補遺伝子のうち20遺伝子が帽状期歯胚においてシグナルセンターの役割を果たすエナメルノット、ならびに象牙質、歯髄、歯周組織の元基である歯原性間葉に対して特異的に発現する遺伝子群であることが判明した。エナメルノットは歯胚の形態形成、分化に必要な分子を産生する領域であり、また歯原性間葉は将来歯を構成する象牙質、歯髄、歯周組織の前駆細胞を提供する。今回同定された遺伝子は、このような場所で特異的に発現することから、歯胚発生に関与する可能性が強く示唆された。

次に、候補遺伝子の歯胚発生過程における機能を解析するために、遺伝子導入型歯胚作製技術の確立を行った。歯胚細胞へ遺伝子導入可能なアデノウイルス発現系を用いて歯胚に遺伝子導入し、器官培養により発生に及ぼす影響をモニターすることで、候補遺伝子の機能を解析する実験システムの構築を目指した。Bmpシグナルを抑制するSMAD6とNogginアデノウイルスを用いて検討した結果、歯胚発生を抑制したことから、本実験システムは歯胚発生を制御する候補遺伝子の同定と機能の解明に適した実験系であることが示された。

⑤ 歯の数、大きさ、形態の制御機構の解明

再生歯の大きさを制御するために、器官原基法

における歯胚上皮細胞と間葉細胞の接触面積を調整することにより、細胞の接着面積に依存して、形成される歯冠幅が増大することが示された。歯の形態形成は、歯胚発生過程の上皮・間葉組織の細胞増殖や運動の統合的な調節により制御されていることから、歯胚の遺伝子発現と細胞増殖部位の解析を実施した。Sonic hedgehog (*Shh*)は帽状期のEnamel knotで局所的に発現し、その後、内エナメル上皮において歯冠の幅に相当する領域で発現することが判明した。そこで、歯胚の歯冠幅と*Shh*の発現部位の関係を解析するために、歯冠幅の異なる再生歯胚を器官原基法によって作製し、*Shh*の発現部位を解析したところ、*Shh*発現領域の幅が再生歯胚の歯冠幅と相関した。さらに、*Shh*発現領域と歯冠幅の制御機構との関連を明らかにするため、*Shh*の発現部位とKi67の発現からみた細胞増殖領域を解析したところ、Enamel knotが形成される帽状期と鐘状期のいずれにおいても、内エナメル上皮細胞が*Shh*を発現している領域において細胞増殖の停止が認められた。その一方で、*Shh*の発現を認めない上皮形態の先端部では、内エナメル上皮細胞の細胞増殖が認められたことから、歯胚発生における歯冠幅の決定には内エナメル上皮における細胞増殖の部位特異的制御が示唆された (Ishida K *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 405: 455-461, 2011)。

⑥ 実験的再生歯の機能評価

再生歯の形態評価として、マイクロCTを用いることにより、イヌ顎骨内およびマウス腎皮膜下における歯胚発生を3次元的に解析・評価する方法を構築することが可能であった。さらには共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 780, Carl Zeiss MicroImaging, Germany)を用いることにより、歯胚発生における3次元的な細胞動態、ならびに形態形成を経時的に解析することを可能とした。

また再生歯の機能評価として、歯の硬度 (ヌープ硬度) や矯正実験による歯根膜機能の評価、さらには神経機能の解析方法についてはマウスモ

デルにおいて確立されており、イヌモデルにおける解析を検討中である。

⑦ ヒト由来細胞を利用した再生歯開発への基盤研究

9～12歳児の第3大臼歯歯胚から採取される歯乳頭組織、および歯小囊組織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やセメント質、歯根膜といった歯の組織形成を認めたことから、歯組織形成能を有することを明らかとした。

⑧ 他家歯胚移植モデルの確立

免疫抑制対策として、FK506とプレドニゾロンの併用による一日二回投与下にて、急性炎症反応の軽減を目的とし移植窩洞の前形成し、移植時にその移植窩洞をGTRメンブレンにて覆うことで移植歯胚の発生スペースの確保を行った窩洞に、胎生55日齢の胎仔第二小臼歯歯胚を他家移植した。約2ヶ月後に顎骨を摘出し、マイクロCTにて解析を行った結果、FK506/プレドニゾロン一日二回投与群において、顎骨内での天然歯胚の発生が認められた。しかし、顎骨内での発生頻度は1/6と低かったため、免疫抑制剤の投与量、投与方法のさらなる検討が必要である。

⑨ 自家歯胚移植モデルの確立

免疫反応を回避するため、自家歯胚移植を行った。つまり、30日齢の子犬の下顎第3、第4乳臼歯を抜歯し、顎骨から下顎第3、4小臼歯 (P3, P4)の歯胚を摘出し、抜歯窩へ自家歯胚移植を行った。2ヶ月後に摘出し、マイクロCTにて解析を行ったが歯胚発生は認められなかった。発生しなかった理由として、歯胚摘出の際、歯胚周囲に傷を付けている可能性が考えられた。そこで、次の実験では、歯胚を傷つけないように歯胚周囲の骨ごと歯胚を摘出し、抜歯窩へ自家移植を行った。移植一ヶ月後にレントゲンにて確認した結果、歯胚発生がおこっていることを確認した。現在レントゲンにて経過を追っている。

2) 歯根再生法の開発

① イヌ歯髓細胞、歯根膜細胞の幹細胞マーカー

発現の解析ならびに多分化能の検討

歯髓細胞、歯根膜細胞の表面抗原発現動態の評価を行った結果、CD29 (歯髓細胞: 28.6%, 歯根膜細胞: 22.8%), CD44 (100%, 100%), CD90 (41.9%, 15.9%), CD271 (17.4%, 8.18%)陽性, CD34, CD45陰性な細胞群であり、骨髄由来間葉系幹細胞と同様の表面抗原発現動態を示した。また、これらの細胞を脂肪細胞誘導培地で長期間培養し、オイルレッドO染色を行った結果、脂肪滴の貯留が確認された。

② 歯髓細胞、歯根膜細胞評価

歯根型多孔性HAに歯髓細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆して、SCIDマウス背部皮下に移植し、8週後に回収し、H. E. 染色にて評価した。

歯髓細胞を使用しなければHA内部に硬組織形成は認められないこと、歯根膜細胞シートを使用しない場合は周囲のマウス由来と考えられる脂肪細胞と直接接しているが、歯根膜細胞シートを使用すれば脂肪組織との間には線維性の組織が介在することを確認した。

③ 人工歯根に適したキャリアの選定

前年度に摘出した再生歯根サンプルの非脱灰切片の作製し、組織学的な検討を行った結果、キャリアにHAを用いたサンプルにおいては、その中心部においても硬組織の形成が確認された。一方、 β -TCPを用いたサンプルにおいては、HAと比べ硬組織形成が低調であり、キャリア中心部では硬組織の形成が確認されなかった。この原因の一つとして、二つのポーラスサイズの違いが考えられる。すなわち、今回キャリアに用いた β -TCPはHAと比べてポーラスサイズが明らかに小さく、内部まで十分な細胞の拡散が行われなかった事、また十分な栄養供給がされなかったため、硬組織が形成されなかったものと考えられる。これらの結果から、今後の研究にはキャリアとしてHAを使用する予定とした。

④ 再生歯根膜の機能的評価

初めに、歯根膜細胞シートでの被覆の効果を検討するため、歯髓細胞を含浸させ、歯根膜細胞シ

ートで被覆した多孔性HA、被覆しなかった多孔性HAを、イヌ下顎骨に埋入窩を形成し、移植した。8週後に下顎骨ごと回収し、マイクロCT撮影を行い骨と多孔性HAとの関係を3次的に評価した。その結果、細胞シートあり群と比べ、細胞シートなし群では骨とHAとの間の空間が狭く、細胞シートなし群においてのみ移植先の骨が多孔性HAの内部に進展し、骨癒着している像が一部観察された。また、組織切片を作製し評価したところ、歯根膜シートあり群では、歯根膜様組織像が観察され、一部で既存骨とキャリアの間をつなぐ線維の配列が確認されたが、正常歯根膜のような均一な線維の配列は認められなかった。

そこで次に、歯根膜組織や線維の成熟には機能性に負荷が必要であると考え、歯冠補綴装置を作製し、咬合力を付与するモデルを作製して検討した。つまり、歯髄細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆した多孔性HAをイヌ顎骨に埋植し、3ヶ月の治癒期間の後、歯冠補綴装置を装着した。装着後レントゲンにて経過を追っていたが、装着7日目に脱離したため組織を回収し組織切片を作製した。その結果、歯根膜シートなし群は骨との癒着がみられたが、歯根膜シートあり群ではHA周囲は歯根膜様組織で覆われていた。

現在、長期間人工歯根を口腔内で機能させるため、これまでの方法でHAをイヌ顎骨に埋入した。埋入3ヶ月後に再度補綴物を装着し、経過を追う予定である。

挺出方向の矯正力に対して、周囲骨は歯根膜の付着レベルを維持したまま垂直的に増生できるという仮説のもとに挺出装置付きの再生人工歯根を顎骨へ埋植し、3ヶ月後に矯正力（挺出力）を加えたが、HAに接着させた矯正用のワイヤーの脱離、またHAの矯正力による破折が認められ、継続的な挺出力を加えることが出来なかった。これらの失敗を改善するために、HAに接着させるワイヤーの形態および接着方法を改良し埋植を行った。現在経時的に矯正力を加え、X線学的、肉眼的に検討を行なっている。

3) 細胞シーズの開発

iPS細胞からエナメル上皮への誘導には、ラット由来の歯原性上皮を用いたとも培養系を用いて行った。この共培養法では、iPS分化に関わる要素として、細胞同士の直接的な相互作用、細胞増殖因子などの液性因子による採用、細胞外マトリックスの関与などが示唆された。そこで、ラット由来の歯原性上皮細胞を、4%パラホルムアルデヒド処理したもの、アンモニア処理により細胞外マトリックスだけにしたものなどを作製し、これらとの相互作用によりiPSの分化について検討した。その結果、マトリックス単独や、液性因子の分泌作用を有しない細胞では、エナメル上皮への分化誘導が認められなかった。また、ラット由来歯原性上皮細胞の培養上清をiPS細胞に添加することで、エナメル上皮への分化が誘導された。この結果から、何らかの液性因子が、エナメル上皮への分化に重要であることが示唆された。そこで、エナメル上皮分化に必須の分子であるアメロブラスチンの発現の高いラット由来上皮細胞と、iPS細胞を共培養すると、iPS細胞からエナメル上皮への分化が促進され、逆にアメロブラスチン低発現細胞を用いた実験では、分化誘導が抑制された。このことから、アメロブラスチンが、直性iPS細胞からエナメル上皮への分化に重要であることが示唆された。一方、分化した歯髄細胞から、歯髄幹細胞の人工的な誘導に関しては、新たに5種類のコンパウンドのスクリーニングに成功した。これらの成果から、歯の再生に必要な歯原性上皮はiPS細胞から、間葉細胞は分化した歯髄細胞から調整できるようになった。

4) 歯の再生に適した顎骨造成法の開発

① イヌ口腔粘膜由来線維芽細胞を利用した骨造成法の開発（山口）

In vitroの実験の結果、イヌの口腔粘膜線維芽細胞はrhBMP-2の刺激により、ALP活性の上昇やOsteocalcin mRNAの発現上昇などが誘導され、骨芽細胞様細胞への分化能を有することが確認で

きた。

In vivo の実験により、GFP 標識したイヌ頬粘膜線維芽細胞の一部が BMP-2 で誘導された異所性骨形成の近辺に局在していることが明らかとなった。また、異所性骨形成近辺にみられる GFP 陽性細胞の約 20%が ALP 陽性細胞であったが、骨表面には GFP 陽性細胞の局在はみられなかった。

以上の結果より口腔粘膜線維芽細胞が BMP-2 による骨再生の細胞ソースとなる可能性が示唆された（これらの研究成果は現在、論文投稿中）。

② 骨形成を促進する天然化合物の探索（山口）

Acerogenin (ACE)は培養 9 日目以降で、全ての細胞の ALP 活性と骨芽細胞分化関連 mRNA の発現を上昇させた。さらに、MC3T3-E1 細胞に ACE と同時に Noggin を添加すると、ALP 活性と骨芽細胞分化関連 mRNA の発現はコントロールレベルに低下した。これらの結果より、ACE は BMP を介して骨芽細胞分化を促進していることが示唆された。さらに、ACE は Runx2 欠損細胞である RD-C6 細胞の骨芽細胞分化も促進したために、Runx2 非依存的経路によっても骨芽細胞分化を促進していることが示唆された。以上の結果より、ACE は骨芽細胞分化を促進する有力な骨形成、骨再生促進薬となりえることが示された。これらの研究成果は Biochem Bioph Res Commun 誌(406:211-217, 2011)に報告した。

③ 骨造成に有用な DDS の開発

(CHP)-nanogel およびゼラチン架橋膜は、共に骨欠損部の骨形成を著しく促進した。臨床で使用されているコラーゲン膜に比較して骨形成の促進は著しく、4 週間後において骨欠損部は骨に満たされていた。

alpha-TCP とシンバスタチンを組み合わせた顆粒状の材料を適応した臨床試験の全て症例を継続して観察した。全ての症例において、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。

D. 考察

1) 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発

マウスモデルにおいて、再生歯ユニット移植による機能的な歯・歯周組織の包括的再生の可能性が示されたことから、昨年度に報告した再生歯胚移植と共に機能的咬合系を回復させる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る。これらのエビデンスを基盤として、大型動物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向上させる条件検討や、再生歯胚・再生歯ユニット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。さらには、ヒト幼若智歯歯胚組織で確認された歯関連組織再生能を細胞レベルにて評価を行い、歯の再生医療の実現化にむけた前臨床研究を推進していく予定である。

また、他家歯胚移植モデルの確立のために FK506 とプレドニゾロンの併用による免疫抑制、急性炎症反応の軽減、GTRメンブレンによる移植歯胚の発生スペースの確保等を行ってきたが、歯胚の発生頻度はかなり低かった。この原因としては、免疫抑制の影響が考えられる。我々が使用してきた免疫抑制剤の濃度は心臓移植、肺移植時に使用される濃度である。しかし我々は顎骨骨髓内に発生途中の歯胚を移植しており明らかに条件が異なる。免疫細胞の多くは骨髓内で産生されるため、異物に対する免疫反応は明らかに他の臓器と比べ敏感であろう。また、移植体も発生途中の組織であり、成熟した臓器と比べ周囲の刺激に対し敏感であり、今回のケースでは綿密な免疫、炎症のコントロールが必要不可欠と考えられる。

さらに、自家歯胚移植モデルにより免疫反応を回避するために自家歯胚移植を行ってきたが、胚発生は認められなかった。しかし、歯胚周囲の組織ごと摘出した自家歯胚移植においては顎骨内で歯胚の発生が確認された。このことは、歯胚周囲の組織

が歯胚発生のスペースメイキングなど重要な役割を果たしていることを示している。しかし、現在歯胚移植に使用している歯胚は永久歯歯胚であり、歯胚の発生スピードは乳歯歯胚と比べ明らかに遅く、歯胚が発生し萌出するまでにはかなりの時間を要するであろう。

2) 歯根再生法の開発

① イヌ歯髓細胞、歯根膜細胞の幹細胞マーカー発現の解析ならびに多分化能の検討について

イヌ抜去歯から単離した歯髓細胞、歯根膜細胞は *in vivo*において硬組織形成能を有していること、*in vitro*において脂肪分化能を有していることが明らかとなった。また、幹細胞マーカーをフローサイトメトリーで確認したところ、骨髓由来間葉系幹細胞と類似した表現型を有していた。これらの結果から、今回単離した細胞群は間葉系の幹細胞を含む細胞群であることが明らかとなった。

② 歯髓細胞、歯根膜細胞評価について

SCIDマウス背部皮下移植実験の結果から、歯髓細胞がないとHA内部に硬組織形成は認められないこと、また、歯根膜細胞シートの使用が移植体と周囲組織との癒合を防止する役割を果たしていることが明らかとなった。

③ 人工歯根に適したキャリアの選定について

SCIDマウス背部皮下移植実験においてはβ-TCPはHAと比べてポーラス内部に硬組織形成が誘導されていたが、イヌ顎骨移植モデルにおいては明らかにβ-TCP内部に硬組織は形成されていなかった。これはSCIDマウス移植実験とイヌ顎骨移植実験に用いたキャリアの形状が異なったためと考えられる。つまり、SCIDマウス移植実験には多孔質形状を有した顆粒状のスキヤフォールドを使用したのに対し、イヌ移植実験には歯根形態の多孔質形状を有したブロックを使用したため、ポーラスサイズの小さなβ-TCPブロックにおいて、内部まで細胞の進展、栄養供給がなされなかったためと考えられる。

④ 再生歯根膜の機能的評価について

歯根膜の機能評価を行うため、歯冠補綴装置を装着し咬合機能させる事による評価、矯正力を負荷する事による評価をこれまで行ってきたが、補綴物脱離、矯正装置の脱離などのトラブルによりなかなか前進していないのが現状である。現在、補綴物の作製、接着方法変更し、再度試みている。

3) 細胞シーズの開発

これまで、再構成歯胚の作成には、胎児由来の細胞を大量に使用する以外に方法はなかったが、iPS細胞を利用することで、成人から得られた細胞を利用できるようになった。これにより、胎児を使用する倫理的問題を回避できたと考えられる。また、分化した歯髓細胞から歯髓幹細胞を、単一のコンパウンドを用いることで、短時間に作製する手法は、歯の再生のみならず、全身のすべての組織再生に応用できる技術と考えられる。

4) 歯の再生に適した顎骨造成法の開発について

① 口腔粘膜由来線維芽細胞を利用した骨造成法の開発

現在までに骨再生を目的とした細胞移植療法に用いる細胞ソースとして種々の細胞が用いられている。しかし歯科における臨床応用を考えた場合、歯科領域内で採取が簡便な細胞ソースを検討する必要がある。そこで我々は口腔粘膜線維芽細胞に注目した。口腔粘膜線維芽細胞は皮膚線維芽細胞と比較して、細胞増殖が速く、採取部の治癒も良好であり、種々の増殖因子に対する反応性も優れていることなどが報告されている。さらに我々歯科医師にとって、皮膚線維芽細胞は法的にも採取が困難であるが、口腔粘膜線維芽細胞は日常臨床での採取が可能であることも利点となる。

口腔粘膜線維芽細胞を骨芽細胞へ分化誘導する因子としてはBMP-2が挙げられる。その適応方法については、ウイルスを用いた遺伝子導入が多数報告されているが、抗原性及び副作用の可能性

が否定できない。将来的な臨床応用を目的とした際に、リコンビナントタンパクの方が安全性の面で優れていると考えられる。

今年度の研究により、イヌ頬粘膜由来の線維芽細胞は *in vitro* と *in vivo* の実験で骨芽細胞へ分化できることが明らかとなったので、現在、イヌ頬粘膜由来の線維芽細胞に hBMP-2 遺伝子を導入した細胞系を準備中で、これらの細胞を用いる事により、より効率的に骨形成を誘導できると考えられる。

② 骨形成を促進する天然化合物の探索

植物から抽出された天然成分の中には、ヒトの骨代謝に影響を与えるものがあることが知られている。メグスリノキは、その樹皮の抽出物が民間療法薬として使用されてきた。その代表的な薬効成分としてアセロゲニン類縁体 (ACE) が挙げられる。ACE は、近年その薬理作用の解明が盛んに行われ、新薬として期待される天然成分の一つである。しかしながら ACE が骨代謝に与える影響についての報告はいまだにない。そこで我々は、ACE が骨芽細胞分化に与える影響について研究を行った。

今年度の研究より、ACE は骨芽細胞分化を促進する作用を有していることが明らかとなり、その作用メカニズムは BMP を介していることが示唆された。今後、ACE の *in vivo* にける骨形成促進作用を検討する必要がある、現在、我々の研究室で検討している。

③ 骨造成に有用な DDS の開発

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が明らかとなった。(CHP)-nanogel は成長因子や薬物の DDS 材料として適しているが、この材料単独で組織再生を促進することは興味深い。皮膚や骨の欠損部の修復過程において様々な内因性のシグナル分子が作用している。そのような内因性のシグナル分子を材料内にトラップし、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。

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。この補填材は、吸収性であり、新生骨と置換することが明らかになった。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。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、BMP2 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。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 BMP2 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。

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。

再生医療を含めて新規開発された治療法が、多くの臨床医によって応用されるようになるためには、以下の4つの条件を満たす必要があると私は考えている。第1に「臨床的に有効であること」、第2に「安全であること」、第3に「簡便であること」、第4に「妥当な価格であること」である。細胞を用いる再生医療への期待は大きいですが、細胞を用いる再生医療が歯科領域での一般的な治療法となるためには、解決されなくてはならない問題が多い。細胞を採取し、細胞を培養して増やし、その細胞を再生医療に用いるためには、培養をおこなうための特別な設備と機器、培養操作をおこなう人手、再生医療に使用する細胞の安全性を確認するための検査が必要である。これらのコストを低く抑えることが求められている。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る。

コレステロール合成阻害薬であるシンバスタチンと、alpha-TCPを組み合わせた我々が開発品は上記の4条件を満たしていると考えられる。しかし、この製品が市販され多くの臨床医に使用されるようになるためには、もう一つ大きなハードルを越えなくてはならない。そのハードルとは、この製品の安全性と有効性を証明するための臨床治験をおこない、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。

骨の造成は比較的簡単におこなうことが可能であり、既に臨床で様々な手法が応用されている。しかし、骨造成する場合には造成部位を軟組織で覆うことが難しい場合が多い。一方、仮骨延長法は骨と軟組織の両方を造成できる画期的な手法であるが、装置を口腔内に入れることが難しいこと、骨を離断する必要がある、症例によっては適用が難しいことが欠点である。これらの問題を解

決する手法として、骨膜のみを挙上して骨を造成する手法が近年試みられている。我々も新たに装置を開発して実験をおこない、この手法の有効性を確認し興味深い実験結果を得ている。平成22年度は、骨組織と軟組織の両方を同時に造成する手法の開発をおこなっている。この手法によって造成された組織は、再生歯の移植部位としても適していることが予想される。

E. 結論

- 1) マウスモデルにおいて再生歯胚から成熟した歯の構造体である再生歯ユニットを作製し、成体マウス顎骨内に移植することにより、歯・歯周組織の包括的再生を可能とする機能的な歯の再生技術を構築した。
- 2) 臓器置換型再生歯の技術を前臨床研究へ展開するため、器官原基法によるイヌ再生歯胚および再生歯ユニットの作製条件の検討及び歯牙喪失イヌモデルの開発を行った。
- 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) ビーグル犬胎仔ならびに仔犬から硬組織の形成直前のステージである歯胚を摘出し、顎骨への他家移植および自家移植を行って、継続的な発生・萌出が達成される手技・条件を設定した。
- 5) ビーグル成犬抜去歯から得た歯髓組織ならびに歯根膜組織より、幹細胞を含む細胞群が採取可能であることを確認した。
- 6) 歯髓細胞は歯根型スキャホードのポーラス内部に象牙質様硬組織を再生させるのに有用であること、歯根膜細胞シートは歯根型スキャホードの周囲に歯根膜様組織の形成を促し、周囲組織との癒合を防止する役割を果たすことを確認した。
- 7) iPS細胞および分化した歯髓細胞から、歯の再生に必要な細胞集団の作成が可能となった。
- 8) 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(CHP)-nanogelあるいは架橋ゼラチ

ン膜が骨欠損部の再生を促進することを組織学的に確認した。

- 9) 骨芽細胞の BMP2 発現を促進するシンバスタチンを組み合わせて骨補填材の臨床試験を継続しておこない、インプラント治療に有用であることを明らかにした。
- 10) 天然化合物である acerogenin が BMP-2 の作用を介して骨芽細胞分化を促進することを明らかにした。
- 11) イヌ頬粘膜由来の線維芽細胞は BMP-2 の作用により、in vitro 及び in vivo で骨芽細胞に分化可能であることを明らかにした。
- 12) 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した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kihara K, Ichikawa S, Yonezawa T, Lee JW, Akihisa T, Woo JT, Michi Y, Amagasa T, Yamaguchi A: Acerogenin A, a natural compound isolated from *Acer nikoense* Maxim, stimulates osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein action. *Biochem Bioph Res Commun* 406:211-217,2011
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* 58:531-542,2011
3. Nishikawa K, Isogai M, Nakashima T, Takeda S, Michito, Hamada M, Kimura A, Kodama T, Yamaguchi A, Owen MJ, Takahashi S, Takayanagi H: Maf mediates the age-related switch in mesenchymal cell. *J Clin Invest* 120:3455-3465, 2010
4. Hoshino A, Iimura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, Suzuki K, Imai T, Ito M, Manome Y, Yasuhara M, Kirino T, Yamaguchi A, Matsushima K, Yamamoto K: Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. *J Biol Chem* 285:28826-28837,2010
5. Etoh M, Yamaguchi A: Repetition of continuous PTH treatments followed by periodic withdrawals exerts anabolic effects on rat bone. *J Bone Miner Metab* 28:641-649,2010
6. 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* 42:1718-1725,2010
7. Hisham R, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of α -tricalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials in press*
8. Hao J, Kuroda S, Ohya K, Bartakova S, Aoki H, Kasugai S. Enhanced osteoblast and osteoclast responses to a thin film sputtered hydroxyapatite coating. *J Mater Sci Mater Med. in press*
9. Rungsiyanont S, Dhaneuan N, Swasdison S, Kasugai S. Evaluation of biomimetic scaffold of gelatin-hydroxyapatite crosslink as a novel scaffold for tissue engineering: Biocompatibility evaluation with human PDL Fibroblasts, human mesenchymal stromal cells, and primary bone cells. *Journal of Biomaterials Applications in press*
10. Murakami I, Murakami Y, Clifford DK, Palacci P, Kasugai S. Panoramic implant notation system - A method to denote implant position and prosthodontic modalities. *Journal of Prosthodontic Research in press*
11. Hudieb MI, Wakabayashi N, Kasugai S. Magnitude and Direction of Mechanical Stress at the

- Osseointegrated Interface of the Microthread Implant. *Journal of Periodontology* *in press*
12. Fueki K, Igarashi Y, Maeda Y, Baba K, Koyano K, Akagawa Y, Sasaki K, Kuboki T, Kasugai S, Garrett NR. Factors related to prosthetic restoration in patients with shortened dental arches: a multicentre study. *Journal of Oral Rehabilitation* *in press*
 13. Rodriguez R, Kondo H, Nyan M, Hao J, Miyahara T, Ohya K, Kasugai S. Bone regeneration by combination of green tea catechin and α -tricalcium phosphate. *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials* *in press*
 14. Hudieb M, Kasugai S. Biomechanical effect of crestal bone osteoplasty before implant placement: a three-dimensional finite element analysis. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 40(2):200-6, 2011
 15. Kuroda S, Goto N, Suzuki M, Kaneda K, Ohya K, Shimokawa H, Kasugai S. Regeneration of bone and tendon/ligament-like tissue induced by gene transfer of bone morphogenetic protein-12 in a rat bone defect. *Journal of Tissue Engineering* Apr 15;2010:891049, 2010
 16. 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* 25(7):663-84, 2011
 17. Hudieb M, Wakabayashi N, Suzuki T, Kasugai S. Morphologic classification and stress analysis of the mandibular bone in the premolar region for implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 25(3):482-90, 2010
 18. 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. *Journal of Biomedical Materials Research Part B; Applied Biomaterials* 93(1):65-73, 2010
 19. Maruo K, Sato D, Machida T, Kasugai S. Effects of alpha-tricalcium phosphate containing simvastatin on alveolar ridge augmentation. *J Oral Tissue Engin* 7(3):143-152, 2010
 20. 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 Engin* 7(3):153-162, 2010
 21. Kentaro Ishida, Mayumi Murofushi, Kazuhisa Nakao, Ritsuko Morita, Miho Ogawa and Takashi Tsuji. The regulation of tooth morphogenesis is associated with epithelial cell proliferation and the expression of Sonic hedgehog through epithelial-mesenchymal interactions. *Biochem Bioph Res Commun* 405, 455-461, 2011.
 22. Mine A, De Munck J, Van Ende A, Cardoso MV, Kuboki T, Yoshida Y, Van Meerbeek B. TEM characterization of a silorane composite bonded to enamel/dentin. *Dental Materials* 26: 524-532, 2010.
 23. Takiguchi S, Maekawa K, Ono T, Sasai N, Kaji M, Clark GT, Kuboki T. Relationship between a chronically painful trapezius muscle and its metabolic state analyzed with PET/CT. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110: 54-61, 2010.
 24. Kawahara D, Mine A, De Munck J, Kuboki T, Yoshida Y, Suzuki K, Van Meerbeek B, Yatani H. The quasi-three-dimensional marginal leakage of full-coverage crowns: resin coating versus sodium hypochlorite treatment. *International J Prosthodont* 23: 406-409, 2010.
 25. Ueda M, Mine A, De Munck J, Hakogi T, VAN Meerbeek B, Kuboki T. The effect of clinical experience on dentine bonding effectiveness: students versus trained dentists. *J Oral Rehabil* 37: 653-657, 2010.
 26. Mine A, De Munck J, Cardoso MV, Van Landuyt KL, Poitevin A, Kuboki T, Yoshida Y, Suzuki K, Van Meerbeek B. Enamel-smear compromises bonding by mild self-etch adhesives. *J Dent Res* 89: 1505-1509, 2010.
 27. Hikasa T, Matsuka Y, Mine A, Minakuchi H, Hara ES, Van Meerbeek B, Yatani H, Kuboki T. A 15-year clinical comparative study of the cumulative survival rate of cast metal post-and-core and resin core restorations luted with adhesive resin cement. *Int J*

- Prosthodont* 23: 397-405, 2010.
28. Nagamatsu-Sakaguchi C, Maekawa K, Ono T, Yanagi Y, Minakuchi H, Miyawaki S, Asaumi J, Takano-Yamamoto T, Clark GT, Kuboki T. Test-retest reliability of MRI-based disk position diagnosis of the temporomandibular joint. *Clin Oral Invest* 2010.
 29. Shimono K, Oshima M, Arakawa H, Kimura A, Nawachi K, Kuboki T. The effect of growth factors for bone augmentation to enable dental implant placement. A systematic review. *J Dent Sci Rev* 46: 43-53, 2010.
 30. Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y. Pannexin3 promotes osteoblast differentiation through its function as an endoplasmic reticulum(ER)Ca²⁺ channel, a hemichannel and a gap junction. *J Cell Biol* 2011 in press.
 31. Iwamoto T, Yamada A, Arakaki M, Sugawara Y, Ono M, Futaki M, Yoshizaki K, Fukumoto E, Nakamura T, Fukumoto S: Expression and functions of neurotrophic factors in tooth development. *J Oral Biosci* 53:13-21,2011
 32. Nakamura T, Yamada Y, Fukumoto S. Divers function of epiprofin in tooth development. *J Oral Biosci* 53:22-30,2011
 33. Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Ishikawa M, de Vega S, Fukumoto S, Yamada Y. Pannexin3 regulates intracellular ATO/camp levels and promotes chondrocyte differentiation. *J Biol Chem* 285:18948-18958,2010
 34. 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* 55:426-434,2010
1. Iimura T, Himeno A, Nakane A, Yamaguchi A: Hox genes, a molecular constraint for development and evolution of vertebrate body plan. *J Oral Biosci* 52:155-163,2010
 2. Iimura T, Sugiyama M, Makino Y, Nakane A, Watanabe T, Yamaguchi A: Illumination of vertebrate development by fluorescence live imaging. *Cytometry Research* 21: 57-63,2011
 3. 佐藤 潔, 栢森 高, 小村 健, 山口 朗: IL-6 の骨代謝に対する作用, **骨粗鬆症治療** 10:20-24,2011
 4. 春日井昇平. 移植材を用いない上顎洞底挙上術. 日本歯科評論 71(5):103-112, 2011
 5. 大島正充, 辻 孝: 次世代の歯科治療としての歯の再生, **治療** 2010年7月号(南山堂), 92:1873-1881, 2010
 6. 中尾一久, 辻 孝: 次世代再生医療の実現に向けた研究の進展, **科学フォーラム** 2010年7月号(東京理科大学), 27, 38-42, 2010
 7. 辻 孝: 歯の再生に関する研究の動向と実用化について, **日本歯科評論** (株ヒョーロン・パブリッシャーズ), 70, 13-15, 2010
 8. 辻 孝: 歯科再生医療に向けた研究の現状とその実現可能性, **神奈川歯科大学学会雑誌** (神奈川歯科大学), 45, 69-78, 2010
 9. 小川美帆, 大島正充, 辻 孝: 次世代再生医療としての歯の再生, **顕微鏡** (社団法人日本顕微鏡学会), 46, 50-54, 2011

2. 学会発表

招待講演

1. 山口 朗: ビスフォスフォネート関連顎骨壊死の病理、東京都臨床整形外科医会統合研修会(招待講演)、東京カンファレンスセンター品川、2010年5月15日
2. 山口 朗: 再生医療「骨再生」—そのメカニズムと応用—、平成22年日本歯科医師会生涯研修セミナー、水戸、2010年5月23日
3. 山口 朗: 再生医療「骨再生」—そのメカニズムと応用—、平成22年日本歯科医師会生涯研修セミナー、津、2010年6月27日
4. 山口 朗: ビスフォスフォネート関連顎骨壊死(骨髄炎)の病理、市民公開シンポジウム「ビ

著書

1. 和泉雄一, 春日井昇平, 荒川真一. インプラント周囲炎とは. インプラント周囲炎を治療する(和泉雄一, 吉野敏郎編)、医学情報社、pp6-11, 2010

総説

- スフォスフォネート系製剤に起因した顎骨骨髄炎・顎骨壊死の現状と対策」、日本学術会議主催、第64回日本口腔科学会学術集会共催、札幌、2010年6月25日
5. 山口 朗: 口腔癌の顎骨浸潤メカニズム、九州歯科大学大学院セミナー、小倉、2010年7月3日
 6. 山口 朗: 再生医療「骨再生」—そのメカニズムと応用—、平成22年日本歯科医師会生涯研修セミナー、高松、2010年7月4日
 7. 山口 朗: 骨形成と血管石灰化の共通点と相違点、シンポジウム「Bone and Vascular Calcification」、第28回日本骨代謝学会学術集会、東京(京王プラザホテル)、2010年7月21日
 8. 山口 朗: 歯科領域における再生研究の現状: 骨・歯の再生を中心に、第24回東京医科歯科大学大学院セミナー、2010年7月26日
 9. 山口 朗: 再生医療「骨再生」—そのメカニズムと応用—、平成22年日本歯科医師会生涯研修セミナー、東京、2010年9月23日
 10. 山口 朗: オステオネットワークの維持と破綻: 顎顔面骨疾患の病態解明を目指して、教育講演、第58回NPO法人日本口腔科学会中国・四国地方部会、広島、2010年11月6日
 11. 山口 朗: 骨代謝の基礎と骨再生、特別講演、平成22年度日本小児歯科学会秋期大会、郡山市民文化センター、2010年12月2日
 12. 山口 朗: 骨再生のメカニズムと骨再生療法、招待講演、DENTISTRY, QUO VADIS?、東京(野口英世記念会館)、2010年12月5日
 13. 山口 朗: オステオネットワークの維持と破綻: 骨再生の分子基盤を中心として、第11回産学連携フォーラム、東京(日本大学歯学部)、2011年2月28日
 14. Yamaguchi A: Molecular mechanism of bone destruction by oral squamous cells carcinoma, The First international Oral Pathology Update Symposium, Taipei, Mar 27, 2011
 15. 春日井昇平. 歯科領域で使用する骨補填材. 第1回バイオインテグレーション学会 2011.01.24 東京医科歯科大学MDタワー大講堂 東京
 16. 春日井昇平. 骨欠損を伴うインプラント治療の現状: 骨造成に必要なものは何か? Dentistry, Quo Vadis? 2010.12.04-05 野口記念会館 東京
 17. 春日井昇平. インプラント臨床の世界的潮流. Dentistry, Quo Vadis? 2010.12.04-05 野口記念会館 東京
 18. Kasugai S. Challenge to treat atrophied posterior maxilla: Are there evidences to support your decision? Bagkok Implant Syposium 2010.11.30-12.3 Pullman Bagkok King Power & Theatre Bagkok Thailand
 19. Kasugai S. What we really need for bone augmentation? 17th Alexandria International Dental Congress 2010.11.2-4 Hilton Alexandria Green Plaza, Alexandria, Egypt
 20. 春日井昇平. 骨粗鬆症患者へのインプラント治療における注意点. シンポジウム 第8回日本歯科骨粗鬆症研究会 2010.4.4 東京医科歯科大学 東京
 21. Masahiro Saito, Takashi Tsuji: Fully functional bioengineered tooth replacement as a future tooth regenerative therapy, First Annual Weintraub Center Retreat, Los Angeles, USA, April 17, 2010.
 22. 辻 孝: 未来の歯科治療としての歯科再生医療の実現を目指して、筑紫歯科医師会講演、福岡・筑紫歯科医師会館、2011年3月20日
 23. 辻 孝: 未来の歯科治療としての歯科再生医療、日本歯科産業学会春期講演会、東京・東京医科歯科大学、2011年2月20日
 24. 辻 孝: 歯の再生研究の現状と将来、東京歯科大学講義、東京・東京歯科大学、2011年1月24日
 25. 辻 孝: 未来の歯科治療としての歯科再生医療の実現を目指して、九州大学歯学研究院講義、福岡・九州大学、2010年12月3日
 26. 辻 孝: 未来の歯科治療を創造する歯科再生医療—研究の現状と将来展望—、愛知学院大学歯学部創立50年記念講演会、愛知・名古屋観光ホテル、2010年11月27日