

次世代の歯科治療としての 歯の再生

大島正充¹⁾ 辻 孝^{1)*、2、3)}

1) 東京理科大学総合研究機構 *教授

2) 東京理科大学大学院基礎工学研究科 教授

3) (株)オーガンテクノロジーズ

Summary

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・前駆細胞を傷害部位に移入する移植療法から臨床応用化研究が始まりつつあり、さらに次世代の再生医療として機能を喪失した臓器・器官を人為的に作り出した再生器官と置き換える「臓器置換再生医療」の開発が期待されている。歯科領域においても同様に、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いる。本稿では歯科再生治療の研究開発戦略を概説するとともに、筆者らの研究成果を中心にその現状と課題を解説する。

はじめに

再生医学は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た新たな学問体系として確立されつつある。さらに再生医学を応用し、再生医療へと発展、実用化されることが期待されている。現在、部分的に傷害を受けた組織や臓器を再生するための治療法として、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。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と考えられている。歯科領域においても、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^{1,2)}。

最近、筆者らは、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する技術を開発した³⁾。さらに、この再生歯胚を成体マウスの歯の欠損部位に移植することによって、生理的機能を有する再生歯へと成長し得ることを明らかとした⁴⁾。これらの技術開発は、歯の欠損部を再生歯で置換する歯科再生医療の実現可能性を示すものとして期待されている。本稿では筆者らの研究成果を中心に、歯科再生医療の実現に向けた研究の現状を解説するとともに、実用化に向けた課題を述べたい。

I 歯科再生医療に向けた変遷と期待

歯は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ともに、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⁵。歯はこれらの役割を担うことにより、頭蓋・顎顔面の構造と互いに連携して生理的機能を発現していると考えられており⁶、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咬合運動などの生理的機能に悪影響を及ぼし、障害が発生すると考えられている^{6,7}。これまで歯科医療においては、固定性架工義歯(ブリッジ)や可撤性床義歯(入れ歯)などの人工物による機能的代替治療が中心となって進められてきた。一方、純チタン材料やアパタイト表面処理を施したインプラントが歯槽骨と骨結合する性質を応用した、口腔インプラント治療が開発されるようになった。口腔インプラント治療は顎骨内に単独植立が可能であり、隣在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。このことから口腔インプラントは、歯の欠損に起因する障害のリハビリテーションに広く応用され、「隣在歯への侵襲」というこれまでの歯科医療が抱えていた問題の抜本的な改革に貢献した。

しかしながら最近では、国民の健康感の向上に伴って、より生理的かつ機能的な歯科治療が期待されている。インプラントは直接歯槽骨と結合することから歯根膜機能組織が欠落しており、咬合緩衝能や歯の移動能を有しないことが問題となっている。このような背景から、より生物学的であり、さらには生理的機能の回復が可能となるような「歯の再生治療」が期待されるようになった。従来の歯科治療は、歯の欠損、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、再生治療との連携や応用も十分可能であり、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適したモデルであると期待されている。

II 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」から発生し、成熟した歯へと成長する。上皮細胞からはエナメル質を分泌するエナメル芽細胞が、間葉細胞からは象牙質を分泌する象牙芽細胞や歯髓細胞、歯根膜やセメント質に関連する歯周細胞、歯槽骨などに分

化することが明らかにされている。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、胎児期に誘導される未分化な上皮・間葉細胞からなる歯胚を再生し、歯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。

再生歯胚からの歯の再生を実現するには、大きく分けて4つの戦略課題を越えなければならないと考えられている(図1)。すなわち、単一化された上皮・間葉細胞から再生歯胚をつくるための三次元的な細胞操作技術の開発(戦略課題1)、再生歯胚が成体の顎骨内環境で発生・成長して機能的

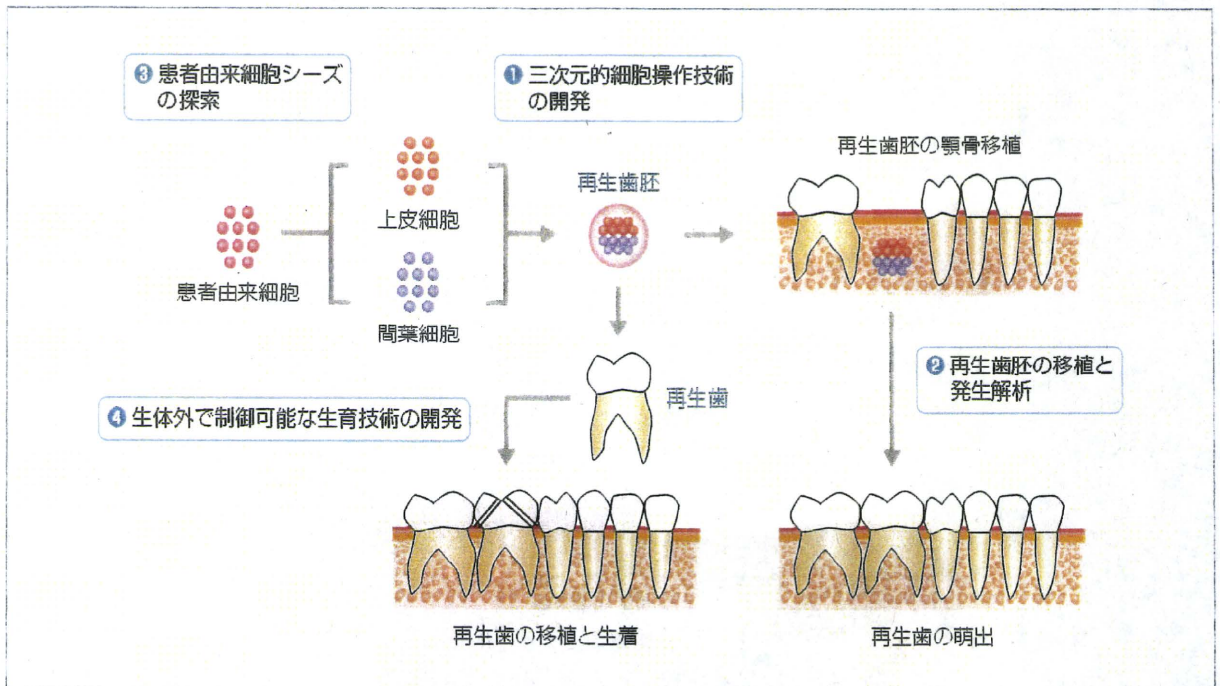


図1 歯の再生に向けた戦略

ヒトにおける再生歯胚からの歯の再生を実現するために必要な解析および技術開発を示す。

- ① 再生歯胚作製のための三次元的細胞操作技術の開発。
- ② 再生歯胚の顎骨移植システムの開発と成体の顎骨内環境での発生解析。
- ③ 免疫学的拒絶を回避するための患者由来細胞シーズの探索。
- ④ 再生歯胚から再生歯をつくるための生体外で制御可能な生育技術の開発。

な再生歯となり得るかどうかの実証(戦略課題2)、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つくるための細胞シーズの探索(戦略課題3)、再生歯胚から再生歯へと人為的に生育するための生体外培養システムの開発(戦略課題4)などの課題である。

これまでに世界中の研究機関において、再生歯胚をつくるための三次元的な細胞技術の開発(戦略課題1)が進められてきた。歯胚を再構築するた

めの研究開発は、組織工学的に分類すると、形態を制御するために細胞の足場となる担体を用いる方法⁸⁾と、上皮細胞と間葉細胞の凝集体を作製する方法が代表的である⁹⁾。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、正常な構造の歯をつくる頻度は低く、また歯の形態に異常が見られるなどの問題点を有しており、安定して再生歯をつくり出す方法の開発が期待されていた。

Ⅲ 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

そこで筆者らは、生物学的な発生の観点から、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を有し、かつ上皮細胞と間葉細胞が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³⁾。この方法では、胎齢14.5日のマウス胎

仔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、これらの細胞種が互いに接触するようにコラーゲン溶液の内部に配置した後、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)。この再生歯胚をマウス腎皮膜下に移植して異所的に

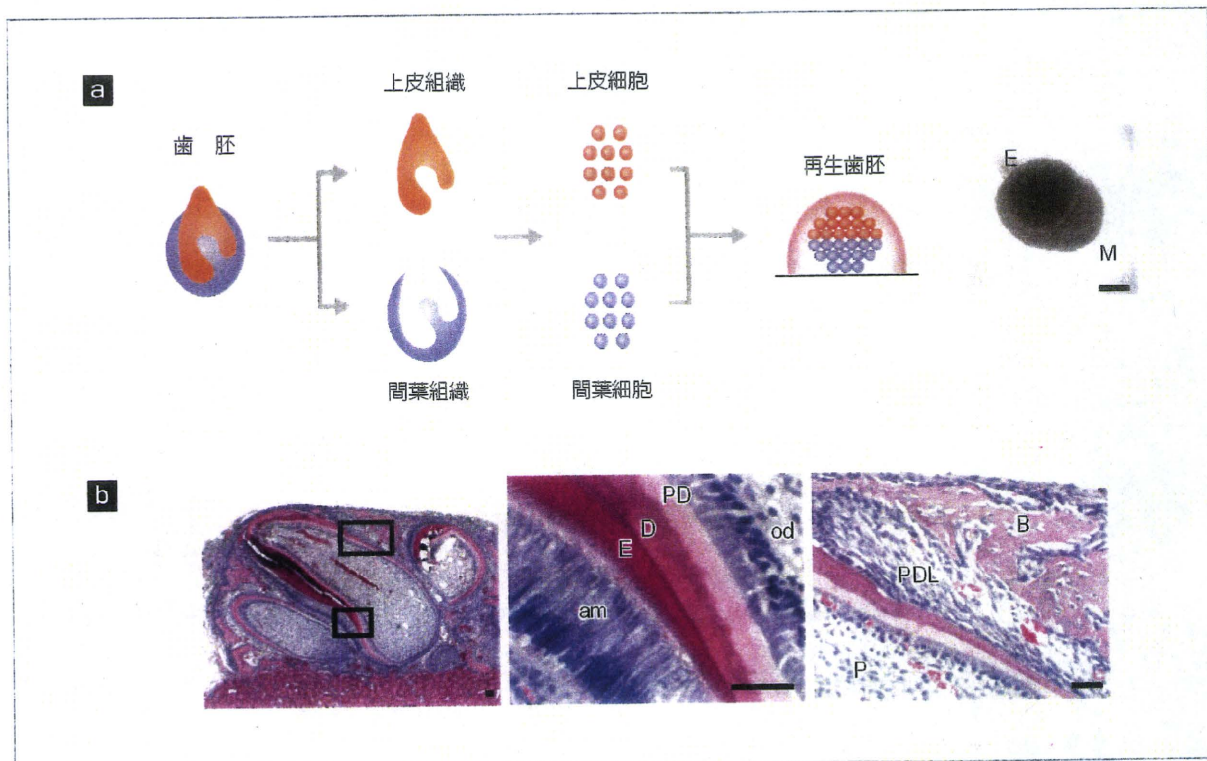


図2 再生歯胚作製のための器官原基法

a: 再生歯胚の作製方法を示す。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コラーゲンゲル内で高密度・区画化して作製した。E: 上皮細胞凝集体, M: 間葉細胞凝集体, スケールバー: 250 μm。
 b: 腎皮膜下に再生歯胚を移植後14日目において、再生歯の形成が確認される(左)。歯冠側(中央)、歯根側(右)の拡大像を示す。形成された再生歯は、天然歯と同等の組織構造を有している。od: 象牙芽細胞, PD: 象牙質, D: 象牙質, E: エナメル質, am: エナメル芽細胞, P: 歯髄, B: 歯槽骨, PDL: 歯根膜, スケールバー: 100 μm。

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、歯髄細胞、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)。

IV 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、成体口腔内で顎顔面と連携して、歯としての機能を有することが重要である(図3)。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っていると考えられており、再生歯胚が成体の顎環境内で発生し得るかどうか(戦略課題2)については不明なままであった。そこで筆者らは、成体口腔内での再生歯胚の発生・萌出を解析すると

ともに、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、外部侵害刺激に応答する神経機能について解析した⁴⁾。

1 再生歯の萌出と硬度

筆者らは、初めに再生歯胚を口腔内へ移植して歯の再生を解析するためのモデルを構築した。成体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4a)。移植後37日目には、現在では約80%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に成長した(図4b)。また再生歯は、エナメル質や象牙質、歯髄、歯根膜、歯槽骨などの組織構造が天然歯と同等であるばかりでなく、萌出過程や各組織の成熟度も天然歯と同等であることが判明した(図4c)。さらに緑色蛍光タンパク質(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や歯周組織が再生し、萌出したことが証明された(図4d)。一方、歯の咀嚼機能には、歯の硬組織の硬度が

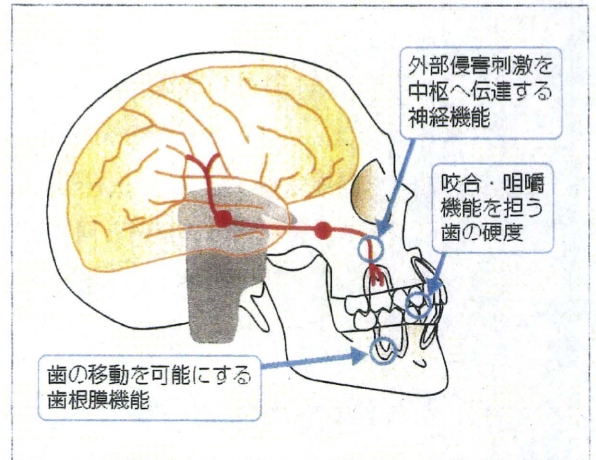


図3 機能的咬合系確立のために再生歯が具備すべき機能
成体において、機能的咬合系の確立のために歯が具備すべき機能を示す。歯の再生治療の実用化のためには、歯の硬度、歯根膜機能・神経機能の回復が必須であり、再生歯に期待される機能である。

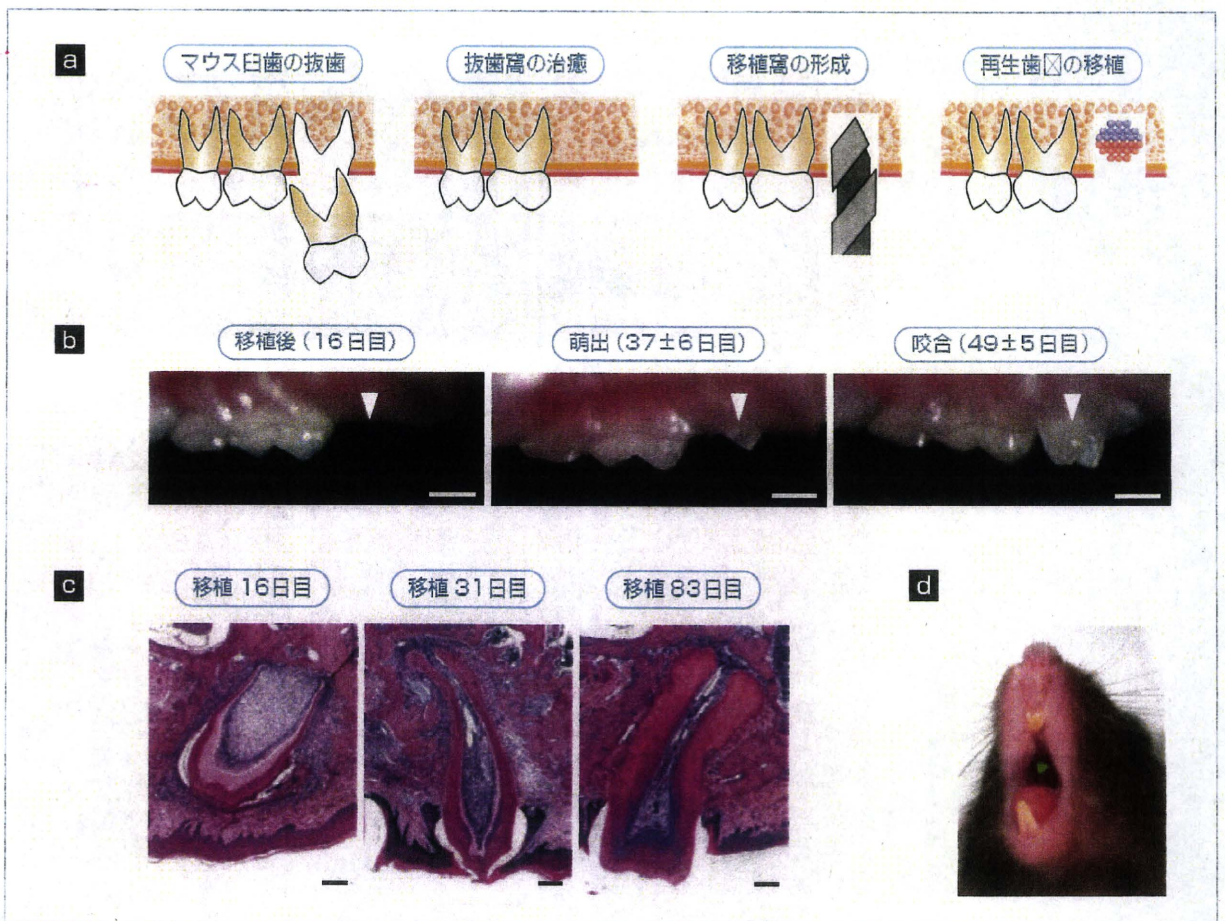


図4 成体マウス口腔内で発生・萌出した再生歯

- a: 再生歯胚の口腔内移植システムの概略図。
- b: 再生歯が成体口腔内で発生し、萌出・成長する過程を示す。移植約50日で対合歯と咬合するまで成長した。△: 再生歯、スケールバー: 200 μm。
- c: 成体マウス顎骨内で発生・萌出した再生歯の組織像を示す。天然歯と同等のエナメル質・象牙質・歯髄・歯根膜といった構造を有する。スケールバー: 200 μm。
- d: GFP標識された再生歯の口腔内写真を示す。移植した再生歯胚由来の細胞から歯が再生・萌出したことが明らかとなった。

重要である。そこで再生歯のヌーブ硬度を測定したところ、移植11週後の再生歯のエナメル質、象牙質の硬度は、いずれも9週齢の成体マウス天然歯の硬さと同等であった(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するとともに、咀嚼可能な硬さを有する機能的な歯へと成長することが明らかになった。

2 再生歯の咬合と骨のリモデリング能

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が確立し、維持されている⁷。この歯の咬合位の維持や移動

には歯根膜が重要な役割を果たしており、なかでも歯の移動は歯根膜を介した歯槽骨のリモデリングによることが知られており、歯の矯正治療に応用されている。筆者らは萌出した再生歯を経時的に観察し、再生歯が対合歯との咬合面に到達すると成長が停止すること、さらに生理的に移動しながら咬頭(歯の咬合面の突起)が対合歯の小窩と咬み合って、しだいに咬頭嵌合を確立することを見いだした(図5a)。この現象から、再生歯の歯根膜周囲に存在する歯根膜は、咬頭嵌合の形成をはじめとする歯の移動に伴う骨のリモデリング能を有していることが示唆された。

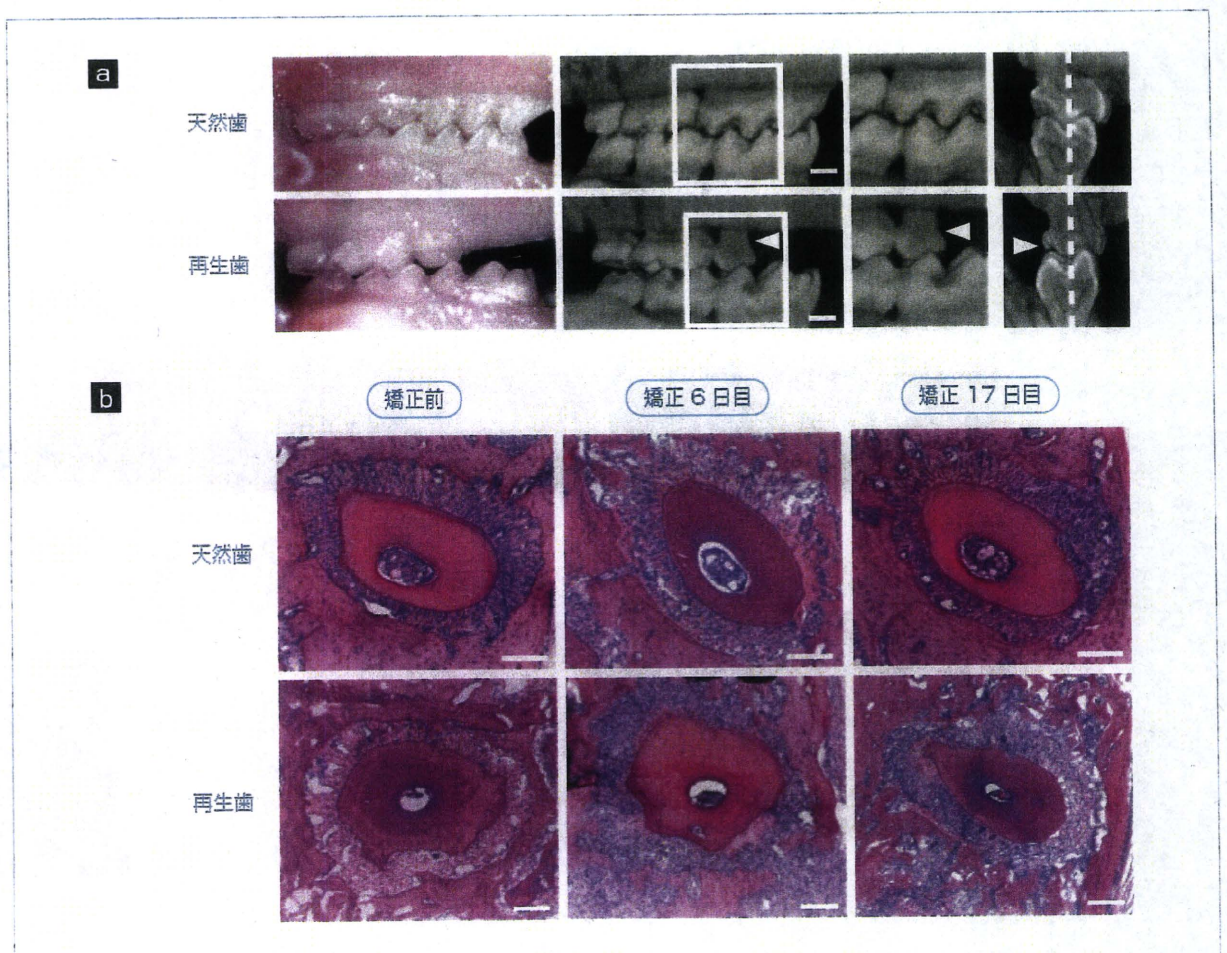


図5 再生歯の咬合と顎骨との連携機能

a: 天然歯および再生歯における咬合状態の口腔内写真(左), CT像(左中央)およびCT拡大像(右中央: 矢状面, 右: 前頭断面)を示す。天然歯と同様に、再生歯の咬頭は対合歯の小窩と咬み合い、咬頭嵌合を確立している。△: 再生歯, スケールバー: 200 μm。
b: 天然歯および再生歯における矯正前, 矯正6日目, 17日目の圧迫側(右側)と牽引側(左側)における組織像を示す。矯正6日目において、歯根膜の形態が変化するとともに、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。スケールバー: 100 μm。

そこで、歯根膜を介した歯槽骨のリモデリングを解析するため、再生歯に実験的矯正力を付与すると、矯正6日目には歯周囲の歯根膜の形態が変化するとともに、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日目には天然歯と同様に再生歯においても歯の移動が起こり得ることが判明した(図5b)。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

歯は口腔内の知覚器官として重要な役割を果たし、歯髄や歯根膜の末梢神経が咬合圧や痛みなどの外部侵害刺激を中枢へ伝達する機能を有してお

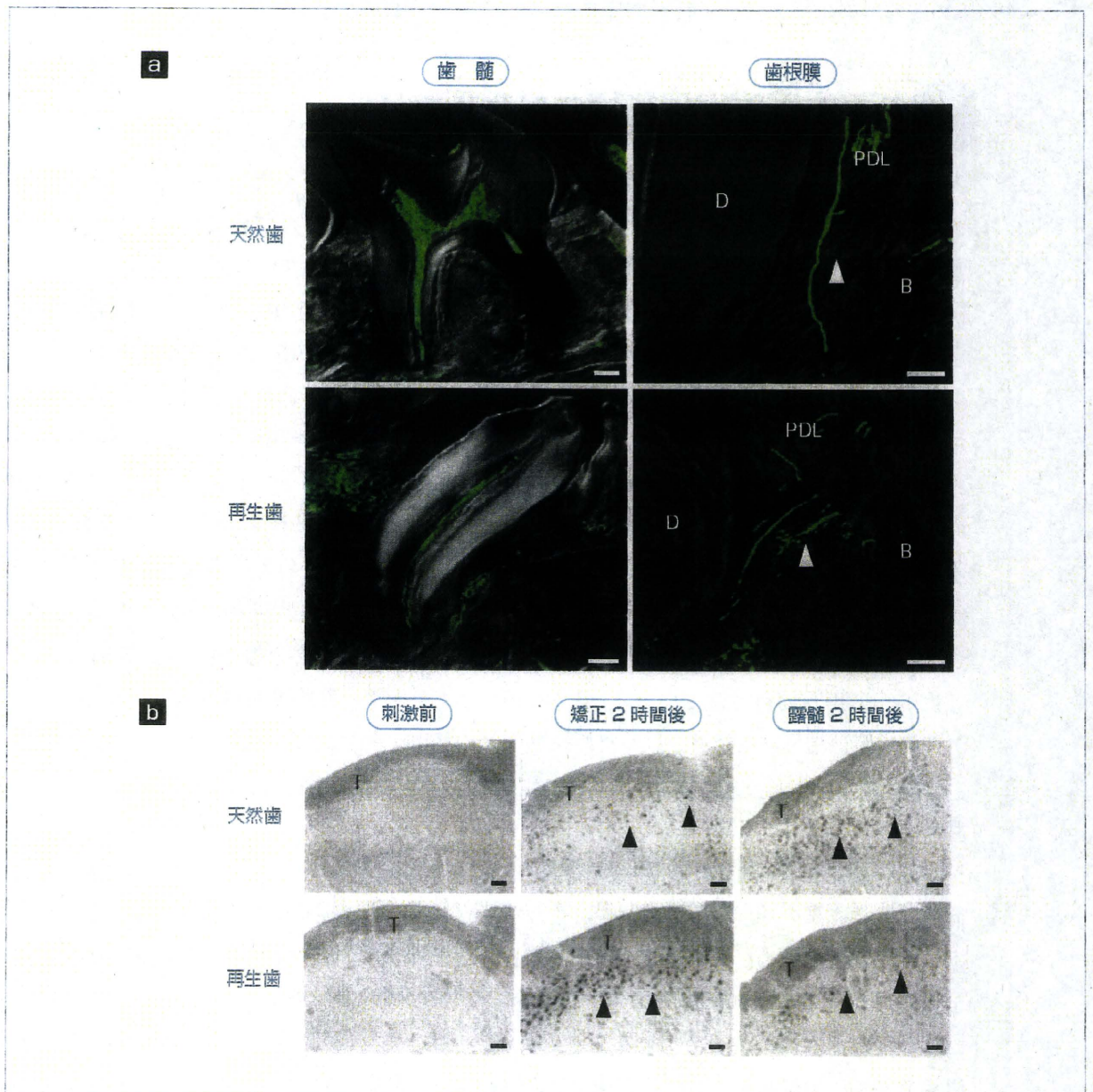


図6 再生歯の神経機能

- a: 天然歯および再生歯における歯髄・歯根膜神経線維の分布を示す。天然歯と同様に、再生歯にも神経線維の分布が認められる。D: 象牙質, PDL: 歯根膜, B: 歯槽骨, スケールバー: 50 μ m。
- b: 天然歯および再生歯に矯正力負荷および露髄刺激を加えた際の三叉神経脊髄路核におけるc-Fosタンパク質の産生を示す。刺激2時間後において、三叉神経脊髄路核にc-Fosタンパク質の産生が確認され、再生歯の歯髄神経線維は侵害刺激を中枢へ伝達する能力があることが判明した。T: 三叉神経脊髄路核, ▲: c-Fos陽性核, スケールバー: 50 μ m。

り、咬合感覚や生理的反射による咬合圧が調節される。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など神経の機能的な再生が重要と考えられる。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6a)。中枢における口腔内の痛みの応答は、延髄の三叉神経脊髄路核の一部の神

経がc-Fosタンパク質を産生することにより伝達されることが知られている。そこで再生歯に、矯正力や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タンパク質の産生が認められることから、再生歯に侵入している神経線維は、外部侵害刺激を中枢に伝達していることが判明した(図6b)。

V 歯の再生医療実現に残された課題

これまでの研究成果から、三次元的な細胞操作による再生歯胚の作製、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が示され、歯科再生医療の実現可能性が見えてきたといえる。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には、免疫学的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と考えられる(戦略課題3)。これまでにヒトの歯組織に存在する組織幹細胞が報告されており、象牙質や歯根膜組織の部分的な歯の組織再生への応用が期待されている¹⁰⁻¹³。しかしながら、歯胚は胎仔期に誘導されるため、胎仔期の

歯胚誘導を再現し得る遺伝子や上皮・間葉細胞を同定することが必要だと考えられ、世界中で研究が進められている。

また、歯の再生にかかる時間が大きな課題である。ヒトの歯の発生から考えると、再生歯胚を移植してから萌出・咬合までに数年以上の期間がかかることが予想される。再生治療にかかる時間を短期間とするには、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(戦略課題4)も必要であると考えられる。現在のところ、三次元的に細胞凝集塊や器官を培養する技術はなく、歯の再生治療への応用に留まらず、未来の臓器置換再生医療システムの実現に必須な技術だと考えられる。

おわりに

本稿では、再生歯胚からの歯の再生について、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再生治療も含まれ、これらは幹細胞移入療法や、サイトカインによる組織幹細胞の賦活療法として早い実用化が期待される。また、喪失歯に対する再生治療として、組織工学と歯の組織幹細胞を利用して歯根膜と象牙質からなる天然型の歯根再生も試みられており、より早期の臨床応用化が図れる可能性もあるだろ

う¹³。このような再生治療の実現に向けた技術開発は、従来の人工材料による歯科治療から、歯の生理機能を生物学的に回復させる歯科再生治療への発展を導く研究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が実現されることが期待されるとともに、臓器置換再生医療の先駆けとして幅広い臓器・器官再生のモデルとなることが期待される。

参考文献

- 1 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.
- 2 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 (7): 635-646. 2007.
- 3 Nakao K. et al: The development of a bioengineered organ germ method. Nat Methods. 4 (3): 227-230. 2007.
- 4 Ikeda E. et al: Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 106 (32): 13475-13480. 2009.
- 5 James KA: Oral Development and Histology. Second Edition. Thieme Medical Publisher, Inc., New York. 94-109. 1994.
- 6 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.
- 7 Proffit WR (著), 高田健治 (訳): 新版 プロフィットの現代歯科矯正学. クインテッセンス出版. 東京. 78-83. 2004.
- 8 Honda MJ. et al: Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. Arch Histol Cytol. 68: 89-101. 2005.
- 9 Hu B. et al: Tissue Engineering of Tooth Crown, Root, and Periodontium. Tissue Eng. 12: 2069-2075. 2006.
- 10 Gronthos S. et al: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA. 97 (25): 13625-13630. 2000.
- 11 Miura M. et al: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA. 100 (10): 5807-5812. 2003.
- 12 Seo BM. et al: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 364 (9429): 149-155. 2004.
- 13 Sonoyama W. et al: Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS One. 1: e79. 2006.

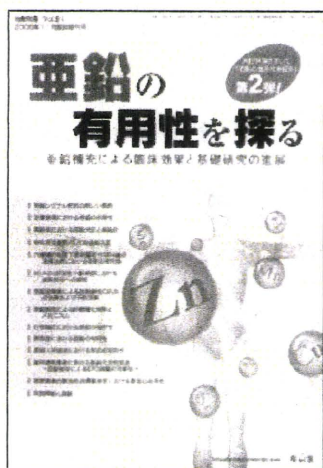
治療 2009年11月臨時増刊号

亜鉛の有用性を探る

—亜鉛補充による臨床効果と基礎研究の進展—

大好評頂きました
「亜鉛の有用性を探る」
第2弾!

監修 森山光彦 日本大学医学部内科学系消化器肝臓内科学分野教授



近年、基礎的研究の進展により新しい知見が多く、臨床分野で注目されている「亜鉛」を取り上げ、臨床現場において亜鉛補充による病態の改善の可能性を探ります。栄養管理における亜鉛、高齢者における亜鉛欠乏、産婦人科領域や透析患者への亜鉛の有用性など、日常診療における亜鉛代謝状態の把握と補充治療をまとめました。臨床に携わる全ての方々にとって必携の一冊です。

◎B5判 92頁 ◎定価1,890円(本体1,800円+税5%)



南山堂

〒113-0034 東京都文京区湯島4-1-11
TEL 03-5689-7855 FAX 03-5689-7857 (営業)URL <http://www.nanzando.com>
E-mail eigybu@nanzando.com

次世代再生医療の実現に向けた 研究の進展

東京理科大学 総合研究機構、東京理科大学大学院 基礎工学研究科 生物工学専攻
株式会社オーガンテクノロジーズ

中尾 一久
辻 孝

はじめに

21世紀の新たな医療システムとして再生医療が期待されています。再生医療の中でも最終的なゴールと考えられているのが、「器官（臓器）の再生」です。私たちは臓器再生のための技術を開発するため、「歯」や「毛」をモデルに研究に取り組んでいます。

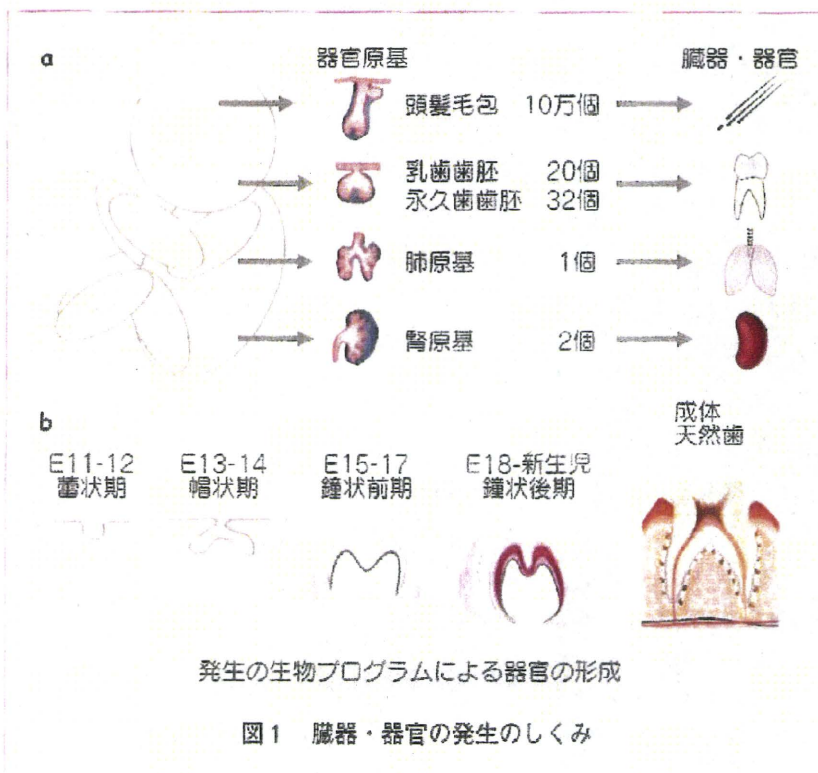
2007年に細胞を三次元的に組み立てて器官のもととなる器官原基をつくりだす細胞操作技術を開発し、学術雑誌「*Nature Methods*」に発表すると、世界中で報道され、大きな話題となりました。さらに私たちは、2009年に歯の器官原基を成体のマウスの歯を失った部位に移植をすることによって機能的に完全な

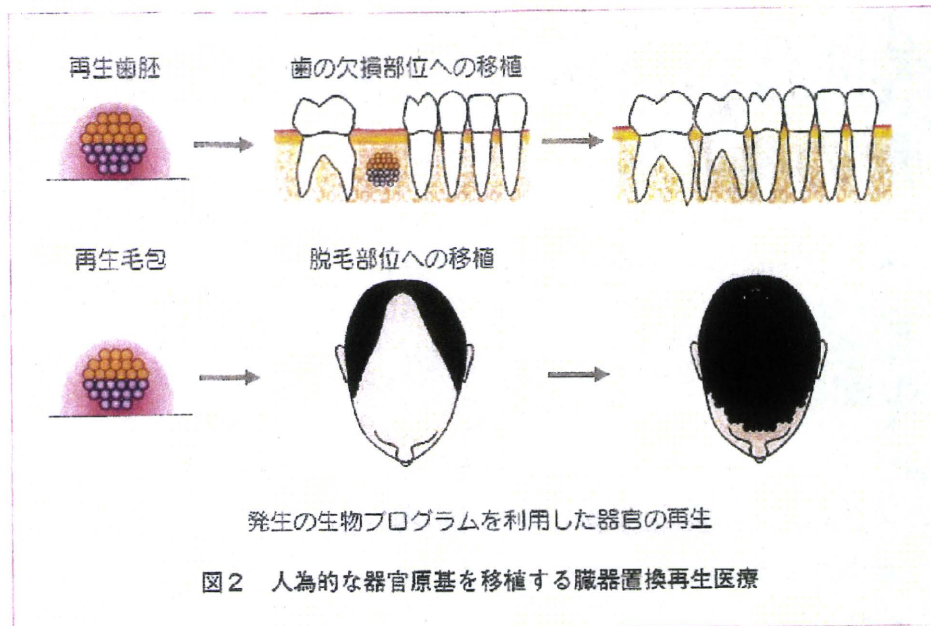
歯を再生できることを「米国科学アカデミー紀要 (PNAS)」に発表すると、その実現レベルの高さから再び世界中で大きな話題となりました。これは臓器置換再生医療が、高度先進医療である肝臓や腎臓の再生だけではなく、歯や毛のようにすべての国民が利益を享受できる「みんなの再生医療」であるという社会からの大きな期待の表れであろうと考えています。

本稿では、最近の再生医療研究の進展について、主に私たちの研究成果を中心に解説したいと思います。

再生医療とは

私たちのからだは、約200種類の細胞から構成されており、これらの細胞種は、「幹細胞」とよばれる未熟な細胞から分化して生み出されます。1990年代には、血液のがんである白血病の治療において「造血幹細胞」を移植して血液の細胞すべてを置き換える治療法が確立し、大きな成果をあげました。現在の再生医療は、この「幹細胞」を傷害部位へ移植する「幹細胞移入療法」を中心に進められています。幹細胞には造血幹細胞をはじめ、筋肉や骨をつくる「間葉系幹細胞」、神経をつくる「神経幹細胞」などが、からだの中にあることが明らかにされています。





再生医療では、細胞を移植する治療であるため免疫学的な拒絶が大きな問題であり、自分と免疫のタイプがあう提供者から細胞や臓器を譲り受ける必要があります。2006年、京都大学の山中伸弥教授のグループは、成体の皮膚の細胞からすべての細胞に分化する能力を持つiPS細胞をつくりだすことに成功しました。この技術は、治療に必要な幹細胞を自分自身の細胞からつくりだすことができる革新的な技術として期待されています。

再生医療のゴールは、正常な機能を失った「臓器や器官（一般に胸腔・腹腔に存在する器官を臓器というが、本稿では同義とする）」を、細胞から人為的につくりだした臓器や器官とまるごと入れ換える「臓器置換再生医療」です。臓器や器官は複数の細胞種が三次元的に高効率な機能発現をするように配置されており、複数の細胞種をどのように三次元的に配置するのか、機能的な臓器や器官までどのように育てるのかなど、その技術開発はほとんど進んでいませんでした。

臓器がつけられる仕組みを利用した歯の再生

臓器や器官は、複数種類の細胞が立体的に配置して機能的に統合され、臓器や器官固有

の機能を果たしています。例えば肝臓は成人体重の約2%の重量をもつ最も大きな臓器の1つで、主に肝実質細胞と毛細血管から構築されています。肝実質細胞は成人で約2,500億個と言われ、これだけの細胞をシャーレの中で培養すると、その面積は約100畳分にも及びます。私たちの肝臓の中には毛細血管がはりめぐらされており、それを肝実質細胞が一層で取り囲むという高度に組織化されて最も効率の良い組織配置をとっているため、非常にコンパクトなサイズでその機能を持続的に発揮することが可能になっています。ところが現在の生命科学では、複数種の細胞を機能的な臓器に組み立てる技術も、組み立てた臓器を培養する方法もありません。私たちは、まずこのように複雑な臓器がどのようにつくられるのかを知ることで、人為的に臓器を再生する足掛かりにしようと考えました。

すべての臓器は、上皮細胞と間葉細胞から構成される「器官原基」から発生し、決まった位置に決まった数だけつくられます(図1a)。器官原基の上皮細胞と間葉細胞はサイトカイン(液性の制御因子)を介して互いの遺伝子発現を制御しあいながら発生します。これを「上皮・間葉相互作用」といい、ほとんどすべての臓器や器官が発生するときに見ら

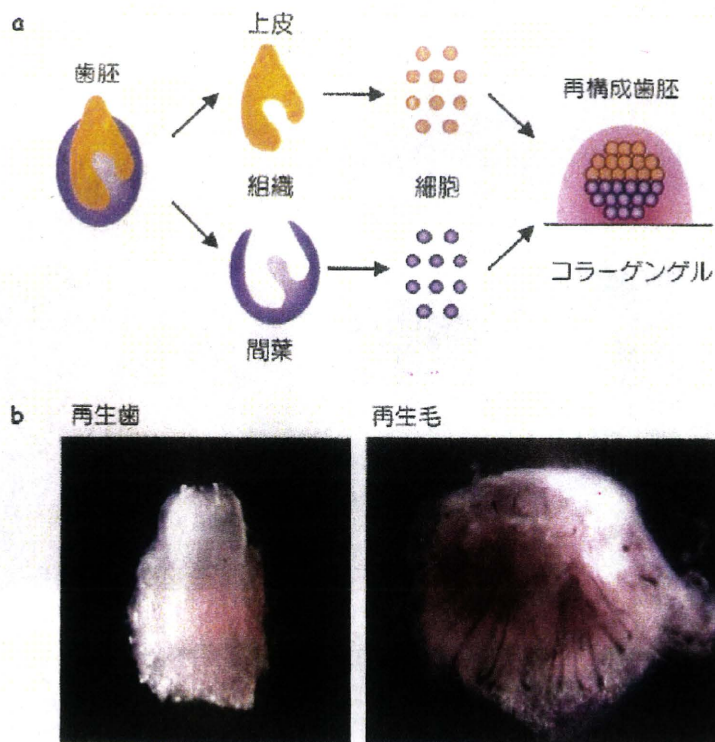


図3 器官原基法による再生歯と再生毛の形成

れるメカニズムだと考えられています。その結果、細胞の増殖や分化、運動に関わる遺伝子が時空間的に「発生の生物プログラム」によって制御されて複雑な臓器が出来上がります(図1b)。臓器をつくりだす再生医療の一つのアプローチとして、器官原基を人為的に作製して、臓器発生の生物プログラムを利用することによって臓器をつくりだす研究が、主として歯や毛の再生において進められています(図2)。

歯や毛の発生は、マウスでは胎齢10~14日目(マウスは受精後約20日で出生する)に、歯や毛ができる予定領域の上皮細胞と間葉細胞との相互作用により始まります。どちらも上皮細胞が間葉細胞を包み込むように伸長し、それぞれの器官原基である「歯胚」と「毛包」を形成します。歯胚の上皮からはエナメル質を産生するエナメル芽細胞が、間葉からは象牙質を産生する象牙芽細胞や歯髄、歯周組織が分化します。毛包の上皮からは毛を産生する毛母細胞が、間葉からは毛母細胞に発

毛シグナルを送る毛乳頭細胞が分化します。ヒトでは歯を含むすべての臓器は胎児期にしか器官原基が形成されません。ヒトにおいても毛だけは例外であり、ヒトの毛髪は7年に1回のサイクルで毛包の誘導を繰り返すため、毛髪が定期的に生え変わります。そのため私たちは、胎児期にしか器官原基の形成が起こらない歯と、成体でも形成が起こる毛の2つをモデルに研究を進めています。

2007年に私たちは、歯胚を一度ばらばらの細胞にまで分解し、それを三次元的に組み立てる細胞操作技術として「器官原基法」を開発しました。器官原基法は、上皮細胞と間葉細胞をそれぞれコラーゲンゲルの中で生体内と同等の高

密度で凝集させ、さらにそれぞれの凝集体が混ざりあわないように区画化して接触させる方法です(図3a)。この方法によって作製した「再生歯胚」は、正常な「発生の生物プログラム」を再現しながら成長することが明らかになりました(図3b)。さらに、器官原基法が「毛包」にも応用可能かを検討するために、マウス胎児から頬ひげの毛包を摘出し、同様に人為的な毛包を作製したところ、正常な毛が形成されることが明らかになりました(図3b)。これらの成果は、臓器置換再生医療に向けた細胞操作技術として大きなブレークスルーとなりました。

完全な機能を持つ歯を再生する

歯の再生治療の実用化のためには、再生歯胚が成体の口腔内で機能的な歯を再生できるかどうかを示すことが重要な課題だと考えられます。歯において重要な機能は、再生歯が歯を喪失した部位で発生、萌出(歯肉を破って口の中に生え出てくること)して咬合し、咀

嚼可能な硬さを有すること、また歯槽骨に歯根膜を介して結合して成長や加齢に伴う変化に対応すること、外部からの侵害刺激（圧迫や痛み）を感知できる知覚器官としての機能を有することです。歯に限らず、これまでに生体内で十分に機能しうる臓器や器官の再生はいまだ成功していません。

まず私たちは、再生歯胚の成体口腔内における発生と萌出を解析しました。再生歯胚による歯の再生を解析するため、マウスの上顎第一臼歯を抜歯し、その部位を完全に治癒させた後、

移植用の穴をあけて再生歯胚を移植する、再生歯胚移植モデルを構築しました。移植後37日目には約80%の頻度で再生歯が萌出し、49日目には下顎の向かい合う歯と咬合するまで成長しました（写真1a）。さらに、再生した歯が本当に移植した再生歯胚に由来するものであるのかを解析するために、緑色蛍光タンパク質（GFP）を全身で発現している遺伝子組換えマウスに由来する再生歯胚を通常のマウスに移植したところ、再生歯とその周囲からGFPが検出され、確かに再生歯胚から再生歯が発生したことが示されました（写真1b）。また再生歯の組織構造は天然歯と同等であるほか、咀嚼機能の発現に十分な歯の硬さがあることも判明しました。これらのことから、再生歯胚は天然歯と同様の組織構造や硬さを有する再生歯へと成長し、口腔内で咬合することが明らかになりました。

また、歯は成長や加齢によって顎の大きさが変化すると、顎骨の中を水平方向に移動しながら、向かい合う歯との適切な咬合を維持しています。これは歯と骨の間に存在する歯根膜が、歯の周囲にある骨をつくりなおす機能を持つためです。矯正治療とは、人工的な

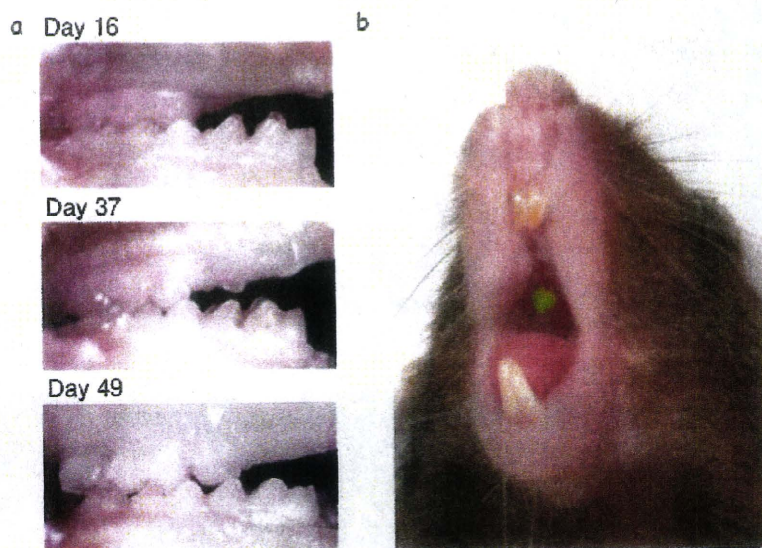


写真1 成体顎環境で発生した再生歯

力を歯にかけることで、歯根膜の骨の再構築能を利用して歯を動かし、歯並びを整える治療です。再生した歯に人為的に力を加えて実験的矯正を行うと、歯の移動方向では骨が溶かされ、移動方向と逆側では新たな骨が形成されることから、再生歯の歯根膜は天然歯と同様に、骨を再構築して咬合を維持する機能を有していることが明らかになりました。

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ます。そのため、機能的な歯の再生には、再生歯への末梢神経の侵入と中枢神経系との連絡が重要です。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（写真2）、外部侵害刺激を中枢神経へ伝達できる可能性が示されました。さらに、再生歯に実験的矯正および露髄（歯を削ること）による痛み刺激を与えると、中枢神経に痛みを感知した時と同じ反応が認められたことから、再生歯の神経線維は外部からの痛み刺激を中枢に伝達していることが判明しました。

これらの結果から、再生歯胚から発生した再生歯は完全に機能的な歯であることが明

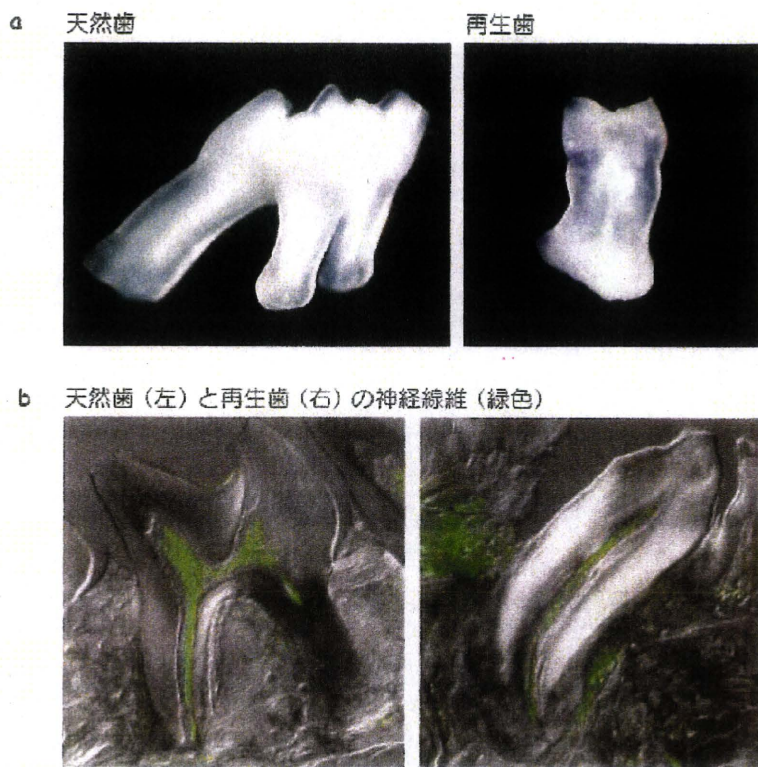


写真2 完全に機能的な歯の再生

かになりました。これまでに歯を含むすべての臓器で、器官原基を移植して人為的な臓器の置換に成功した例はなく、臓器置換再生医療の実現可能性を示す世界で初めての成果として国内外で高い評価をうけました。

臓器置換再生医療の実現に向けて

私たちのこれまでの研究成果により、ばらばらの細胞から器官原基を組み立てるための技術開発と、成体の目的の部位で人為的な器官原基が完全に機能的な臓器にまで発生することが明らかになりました。しかしながら、歯の再生医療の実用化にはいくつかの課題が残されています。

ひとつには、器官原基をつくりだすための細胞の問題です。ほとんどの器官原基は胎児期にしか誘導されないため、成体由来の細胞から器官原基を再生できるのかは不明のままです。臨床応用のためには、からだの中に存在する各種幹細胞や、歯科治療という点では

第三大臼歯（親知らず）や乳歯、口腔内の粘膜や歯肉などから歯が再生できれば理想的です。また自分自身の細胞からつくりだしたiPS細胞も免疫学的な拒絶がないことから候補のひとつになるでしょう。毛包の場合には、成体の毛包の中に毛包を再誘導できる幹細胞があることが知られており、成体由来の細胞から器官原基を再生できる可能性が期待されることから、現在、私たちは毛包の再生にも積極的に取り組んでいます。

また、歯は生えてくる場所によってかたちが大きく異なっていると同時に、臓器にはそれぞれ適した大きさがあることが知られており、再生した臓器や器官のかたちや大きさを制御する

技術開発が期待されています。さらに臓器や器官を生体外で培養して製造する技術開発も期待されています。歯や毛のように、その喪失によっても生死に直結しない器官の場合には器官原基を成体へ移植することは可能と考えられますが、肝臓や腎臓などでは十分に生体機能を維持しうる大きさの臓器を移植する必要があります。しかし現在のところ、器官原基を生体外で十分な機能発現をする臓器にまで育成可能な培養システムはなく、臓器培養・育成システムの開発が臓器置換再生医療の実現に向けた重要な課題になると考えられます。

再生医療は、臓器移植を待つ重度の患者のみならず、歯や毛など私たちの身近なところにも応用しうる治療システムです。私たちを含め世界中の研究者による再生医療の基盤技術の開発を通して、新たな治療システムへと展開されることが期待されます。

神奈川歯科大学学会
 第44回総会特別講演

歯科再生医療に向けた研究の現状とその実現可能性

辻 孝

東京理科大学・総合研究機構 教授

司会 大変お忙しいところを横須賀まで来ていただきましてありがとうございます。

辻先生の略歴をご紹介したいと思います。

辻先生は新潟大学大学院理学研究科修了、九州大学大学院理学研究科博士後期課程を満期退学され、その後、山之内製薬研究員、日本学術振興会特別研究員（平成3年）、平成6年から13年まで日本たばこ産業株式会社医薬探索研究所主任研究員を経まして、平成13年から東京理科大学基礎工学部助教授、平成19年に教授になられました。平成21年より東京理科大学総合研究機構の教授になられています。

先生はいろんな役職を兼任されていますので、少し紹介しますと、東京理科大学総合研究機構、再生工学研究部門とホリスケールテクノロジー研究センターの研究員を兼任、同じく社会連携部、大塚化学糖蛋白質工学研究プロジェクト代表、さらに社会連携部、オーガンテクノロジーズ器官再生工学プロジェクトの代表。さらに、株式会社オーガンテクノロジーズ研究開発担当取締役を兼任しておられます。

私は、少し前に辻先生の講演をお聞きして、現在、歯科ではインプラントがかなり主流となっていますが、先生の研究しておられる三次元的細胞操作技術による歯の再生というのは、明らかに次世代の歯科を担う治療方法であると感じました。

本日、先生には、「歯科再生医療に向けた研究の現状とその実現可能性」というタイトルでお話しいただきます。

それでは先生、よろしくお願ひします。

辻 本日は講演の機会をいただき、学会長の高橋先生、佐藤先生をはじめ、関係の先生方に厚くお礼を申し上げます。

本日、神奈川歯科大でこのように講演させていただくことを、私は大変うれしく思っただけで伺いました。紹介の中にもありましたように、私は基礎生物の研究者でありまして、再生医療研究は民間企業に在職中に造血幹細胞の生体外増幅を目指して研究を行ってござい

た、です。歯科領域に関する研究は、歯の再生研究を始めた7年前に初めて着手しました。そういった経緯から歯に関する知識を教えていただける先生を探して、現在、私の研究室の准教授の齋藤正寛君が神奈川歯科大学に在職しており、歯の解剖とか、細胞分化系譜をはじめ、いくつかの実験方法も、学生がこちらまで伺い、習ったことがございました。そのため、私どもの歯の再生研究は神奈川歯科大学と深いご縁をいただいています。

私たちは最終的には臓器を置きかえる再生医療を目標にして研究を進めております。その中でも歯科領域における歯の再生、それから皮膚科領域の毛包の再生という観点から、再生医療の実現化を目指しているところであります。

本日は駆け足になりますが、私どもの研究成果を中心に話しさせていただきます。

現在進められている再生医療の概念

皆様もご承知のように、幅広い領域で再生医療の研究開発が進んでおります。現在、臨床応用研究として進められている基本的な治療方法は「幹細胞移入療法」です。生体内の組織や臓器・器官が部分的な傷害を受けた患者さんに対して、傷害部位の細胞を生み出すことができる幹細胞をご本人、あるいは提供者の方からいただき、その幹細胞を傷害部位に移入するという幹細胞移入療法が、再生医療の臨床応用化の第一段階として進められています。

このコンセプトのモデルになった治療法が、すべての再生医学研究の雛型であります白血病に対する造血幹細胞移植、すなわち骨髄移植です。これ以外にも、例えばパーキンソン病・アルツハイマーなどの疾患に対しては、神経幹細胞を脳内に移入するという治療方法も試みられています。

また、心筋梗塞に対する間葉系幹細胞の移入療法も開発されています。心筋梗塞部位の近傍のところに心筋細胞を生み出すような間葉系幹細胞や、血管系の前駆細胞を移入をして修復をさせる治療方法が検討され

ています。

さらに最近では、1種類の細胞を組織化した細胞シートによる治療方法も臨床研究が進められています。皮膚の細胞シートや角膜上皮細胞シート、それから心筋細胞シートが開発されており、重度熱傷の患者さんの皮膚の傷害部位や、心筋梗塞部位あるいは拡張性心肥大の手術後の心筋に張りつけることによって組織の修復が試みられています。

歯科の領域では、2000年代になって米国のShi教授らのグループが、歯髄の中に象牙芽細胞や歯髄細胞に分化する幹細胞の存在を報告し、成体の細胞はDPSC、乳歯に由来する細胞はSHEDと名づけられました。さらに、根未完成歯のapical papillaの部分にはSCAPと呼ばれる象牙芽細胞へ分化可能な幹細胞が存在します。また、歯周の領域にはセメントや、歯根膜をつくるようなPDLSCと呼ばれる幹細胞が存在するという一群の報告が相次いでなされました。

これらの幹細胞を応用した再生治療としては、う蝕に対する治療方法として歯髄の中にある幹細胞・前駆細胞を賦活化して二次象牙質形成を誘導する象牙質-歯髄再生の研究が進められています。一方、歯周の再生医療として、歯周病の部位の感染巣を除去し、その部位へPDLSCを移植することによりセメント質や歯根膜、歯槽骨を再生する治療方法の開発に向けた研究が進められています。これらは、いずれも歯全体を治すのではなくて、部分的に傷害を受けた組織に対して、その場にいる細胞を賦活化、または細胞自体を補充するという治療方法です。

次世代再生医療としての臓器置換再生医療

再生医療の最終的なゴールと考えられておりましたが、現在の臓器移植に替わる再生臓器の移植治療です。機能不全に陥った臓器の場合には、臓器移植しか手だてがありません。現在のところ、提供臓器は慢性的に不足をしており、日本の場合には臓器移植の充足率はわずか数パーセントにも及びません。そのため、患者本人の細胞から必要な器官・臓器を作り出して、機能不全に陥った臓器と置きかえる治療方法の確立が期待されるようになりました。現在では、肝臓や膵臓などの腹部の実質臓器をはじめ、毛包や歯といった外胚葉性器官に対しても、この概念に基づく治療が適用できるのではないかと広く考えられるようになりました。

この臓器置換再生医療は再生医療の研究者だけが考えているわけではなく、既に数年前に出された文部科学省の未来技術予測において、「2019年に患者本人に由来する幹細胞からつくった臓器を移植できるように

なる」と予測されています。これは、再生臓器の基盤技術の確立に向けた研究開発への期待であろうと考えられますが、この概念につながる技術開発は、現在のところほとんど進んでいません。

歯科の領域における歯の機能を考えた場合に、1970年代に河村によって提唱された生理学的な基本要素としての機能的咬合系が重要であろうと考えられます。すなわち咀嚼筋や顎関節、歯根膜を介する歯の生着、そして咬合を示すものであり、これらは歯が機能的な役割を果たすために必須な生理学的な要件であると考えられます。これらの点から歯科治療では、歯の喪失に対する治療には機能的咬合系を回復させるために出来る限り生物学的な機能回復が将来の歯科治療として望まれることではないかと考えられるわけです。

ほかの器官や臓器と比較しましても、歯科というのは基礎の私どもから見ると大変魅力的な治療分野であります。動物は、歯の脱落によって直ちに生命に影響が及ぼされません。その結果として、研究モデル、すなわち動物モデルを組みやすいというメリットがあります。さらにこれまでの歯科治療というのは、部分的な修復のみならず、1個の器官が丸々機能不全に陥って脱落してしまったものに対する機能代替治療がこれほどまでに完成された治療領域はありません。ブリッジあるいは入れ歯などの人工的な歯科治療法や、最近ではオッセオインテグレーションに基づくインプラントなど、歯の欠損に対する機能代替治療が既に確立をしているという点では、歯科領域は非常に進んでいる治療分野ではないかと思えます。

しかしながら、先ほどの機能的咬合系の完全な回復という観点から見ると、既存の歯科治療ではいずれにおいても完全に達成されていないと考えられます。インプラントの生着様式はオッセオインテグレーションであり、歯根膜を介して骨の中に生着しているわけではありません。一方、入れ歯の場合は、歯根膜を介しているわけではありませので、咬合時には口腔内の粘膜を圧迫するということになります。すなわち、歯は歯根膜という組織を介して、噛んだ時の牽引力によって支えられているという考え方に基づけば、いずれも完全な機能的咬合系の回復には至っていないといえます。歯の喪失に対する機能的な咬合系の完全な回復としては、生物学的な治療としての移植治療である自己の歯の移植が理想的な治療のひとつとして考えられます。この治療法については、移植用の自己の歯が得られない場合などが課題であろうと考えられます。

現在は存在しませんが、次世代の歯科治療を考えた場合、例えばオッセオインテグレーションではなくて、インプラントを歯根膜が介する形で歯槽骨の中に埋入

すれば、生物学的な機能的回復に近づくのではないかと思います。しかしながら、こういった考え方の根底にあるのは、やはり生物学的な治療方法の方がより優れているのではないかとことです。

さらに最近、幹細胞と組織工学に基づく方法により、天然型の歯根を再生するという研究報告がされました。歯根型材料の内側に象牙質をつくる根尖歯髄の幹細胞を播種し、外側のゲルフォームの中に歯周組織をつくる歯根膜幹細胞を播種して巻き付けます。そしてこれを生体の抜歯窩に移植をすることによって、外側に歯根膜を形成させ、内側に象牙質を形成させた天然歯根と同等の組織構造を有した歯根を再生し、歯冠部に関しては人工補綴物によって修復するという方法です。この研究は、組織工学技術と現状の歯科治療を融合させた歯科再生治療技術のひとつになると考えられます。

器官発生システムを利用した歯の再生に向けた戦略

完全な歯をもう一度再生するという考え方は、古くから歯科の領域でなされておりました。歯胚をもう一度つくり直して、第3番目の歯胚を移植することによって3本目の歯を生やすという考え方は、30年以上も前から歯科領域において、基本的なコンセプトとして考えられていたわけです。つまりは歯胚をもう一度細胞から創り出し、それを生体内で発生させて萌出・咬合させる、あるいは、人工的に生体外で培養して再生歯を創り出して移植するという治療コンセプトであり、歯そのもの、器官そのものを丸ごとその場所で再生させるというものです。この治療は次世代再生医療として、傷害臓器を丸ごと置き換える「臓器置換再生医療」の概念に含まれる治療方法であります。

これを支える生物学的な背景は、器官原基から臓器は発生するという発生生物学における知見であります。ほとんどすべての臓器・器官というのは、胎児期に決まった位置で、決まった数だけ、特定の誘導メカニズムによって形成される器官原基に基づくわけです。それぞれの臓器・器官に該当する器官原基が形成されて、そして胎児の時期にこれが成長して、機能的な器官に発生します。歯の器官原基は歯胚であり、この歯胚を構成している細胞は歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞という、たった2種類の細胞から形成されており、上皮・間葉相互作用によって発生します。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ます。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す。しかしながら、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ません。そこで、複数種類の細胞を用意して、何層も積み重ねて立体的に構造を再現して作るのではなくて、生物学的にたった2種類の細胞だけを組み合わせることによって、器官発生そのものを再現することで、臓器・器官を再生しようというコンセプトが提唱されるようになりました。

歯の発生

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はじめ、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ります。胎齢14日目には、上皮細胞がさらに陥入して間葉細胞を包み込むような帽状期になり、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、硬組織形成が始まります。上皮細胞からはエナメル芽細胞、間葉細胞からは象牙芽細胞、歯髄、セメント質、歯根膜、歯槽骨といったエナメル芽細胞以外の歯のコンポーネントすべてが間葉細胞に由来しており、発生が進むにつれて硬組織が分泌して萌出してきます。このように歯における発生生物学のモレキュラーメカニズムも非常によく解析をされておりました。

歯の再生の実現に向けた研究課題

そういう中にありまして、歯胚を再構築して再生するというコンセプト、これは歯科領域の研究者が考えていることではありますが、もう一度人為的に再生歯胚をつくり出し、それを口腔内に移植することで、再生歯が萌出・咬合をとるかどうかが明らかとなっておりません。そこで歯の再生を実現するためには、大きく分けて4つの研究課題を実証していく必要があると考えておりました。

1つ目の課題は、歯胚を再構築するための細胞操作技術を確認することですが、これは2003年当時でも、まだ安定した技術開発はなされていませんでした。さらに普通は、歯胚が成長するのは胎児期も含め成長期であります。こういった歯牙欠損に対する治療が必要なのは成長期の子供だけではなく、むしろ大人(成体)において、このような治療方法を期待するわけです。しかしながら、顎環境が大きく違うことから、2つ目の課題として、成体口腔内で再生歯胚が果たして発生するのかという課題がございました。

3つ目の課題として、再生歯胚を創り出して移植することを考えれば、患者さん本人の細胞を使用しな

ければ、免疫学的な拒絶を受けるであろうということです。この課題については未だ解決したグループはありませんので、残念ながら、本日はこのお話をすることはできません。

ヒトの歯の発生は、私たちが研究に用いているマウスと比較して長期間を必要とするため、再生歯胚を移植してから萌出・咬合までに数年以上の期間がかかることが予想されます。これでは現実的な治療行為として難しいかもしれません。そこで4つ目の課題として、再生した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ます。

歯胚再生のための三次元的な細胞操作技術の開発

はじめに1つ目の研究課題である再生歯胚をつくり出すための細胞操作技術について、私たちの研究成果をご紹介します。私たちが材料として使用したのは、他のグループと同様に、胎仔期の歯胚を用いました。もちろん将来的には、患者さんに由来する成体の細胞を用いることができればいいのですが、成体内に胎児期の誘導性を有する歯胚というのは存在しません。これは他の臓器にも該当することであり、例えば肝臓の原基、あるいは腎臓の原基を創り出せる細胞というのは、基本的に存在しないと考えられています。

このことから、再生歯胚をつくるための細胞操作技術の開発のためには、既に歯になることが運命づけられたコミットメントを受けている細胞を正しく組み立てるという考え方を基盤として、世界中の研究者たちが歯胚を使って研究を進めているわけです。

私たちの研究材料はマウスの14.5日齢の切歯の歯胚を、また話の後半ではヒト型モデルとして臼歯の歯胚を使っております。直径450 μ m程度の帽状期の切歯歯胚をマウスから摘出して、酵素を用いて上皮組織と間葉組織にきれいに分けます。そして、各組織をさらに酵素で処理をしまして、完全に単一化した細胞の状態にして、これらの細胞を再構築します。使用している細胞は完璧であるので、組み立て方が正しければ正常に発生するわけですが、正常な構造を持った歯を安定してつくる技術は、当時はありませんでした。また、歯になることが運命づけられた細胞とはいえ、これらの上皮細胞、間葉細胞というのは、相互作用しないと歯には発生しません。上皮細胞だけを異所的に発生させても、皮膚様のケラチン化組織になり、間葉組織だけを発生させると骨になってしまいます。ですから、上皮・間葉の相互誘導がなければ、皮膚と骨になるということです。

これを一つの指標にしなが、私どもはいろんな三次元的な細胞の組み立て方を研究いたしました。まず、

上皮細胞と間葉細胞の2種類を、細胞の密度が薄い状態で動かないようにコラーゲンゲルで固めて再構築をしています。わずか3倍希釈程度の細胞濃度にした場合でも、細胞同士が相互作用できない程度の距離になると皮膚と骨ができます。ですから、適正な高細胞密度がなければ、歯をつくることはできません。

また、上皮細胞と間葉細胞は互いに混ざり合った、高密度でお互いが全部接している状態で再構成をいたしましても、少なくとも切歯は全く発生をいたしません。ですから、三次元的な細胞の区画化が発生にとっていかに重要であるかということが分かりました。

そこで私たちが行いました方法は、シリコンコートした培養皿の上に、コラーゲンの溶液を30 μ lドロップ状に落とします。そうすると非常にきれいな半球状のドロップができます。そのゲルの中に、先ほどの単一化した上皮・間葉細胞いずれかを、沈殿にして限りなく水分を除いた状態で0.2 μ lほどゲル内に注入します。この細胞凝集体は、生体内とほぼ同じ5 \times 10⁶ cells/mlという非常に高い細胞密度になっています。そしてもう一方の細胞を同量あるいは半量ぐらいを1つ目の細胞塊の隣に密着するようにして再構成歯胚を作成します。このように再構成された歯胚は、上皮細胞と間葉細胞が高密度で区画化をされています。そうすると上皮細胞が間葉細胞の中に徐々に陥入を始めます。そして、これを異所的に発生させる方法として、マウス腎皮膜下への移植を行うと、再構築した歯胚から再生歯が形成されました。当時は再構成歯胚が大体0.3~0.4 μ lと大きいため、歯が沢山形成されました。お示しする写真も歯が5本ありますけれども、それぞれの歯の周囲に歯槽骨を伴って発生しました。また、組織学的解析からエナメル芽細胞、エナメル質、象牙質、象牙芽細胞、歯髓、歯槽骨と歯根膜様の細胞の配置、ならびに天然歯と同様の組織構造が認められました。

再構成歯胚を腎皮膜下に移植すると多数の歯ができるということから、最近では三次元的細胞操作技術の一環として、上皮と間葉の細胞接触面積を様々な条件で変えていきますと、1本の歯が歯槽骨に包まれて発生します。これはまさしく歯として必要な一つのユニットであり、歯と歯根膜と歯槽骨というものを一つの構造体として作り出すことができるということを示しています。これらの所見から、細胞の接触面積を変えていくことで必要な歯の幅を任意に調節が可能ではないかと考え、私たちは臼歯の再構成歯胚を用いて解析したところ、歯の大きさに従って咬頭の数が変わってきます。このことから、歯の発生のメカニズムの解析、それから将来的に任意の形態の歯をつくるという技術開発に向けては、非常に意味があるのではないかと

と私たちは考えています。実際に再構成をした時の上皮細胞と間葉細胞の接触面積を変えていくと、歯の幅が大きくなっていきます。このように細胞の接触面積と歯の幅の関係は、非常に強い相関関係があるということが最近では分かってきています。

機能的な歯の再生

最近、私たちは、2つ目の研究課題として、この再生歯胚を成体の抜歯部位に移植をして、実際に再生歯が萌出して、そして機能的な歯になるということを明らかにしました。組織学的にきれいな歯をつくるという意味では、私たちが開発した細胞操作技術は正しかったといえるわけですが、歯の再生ということを考えれば、やはり咬合機能する歯を再生することを目指すべきと考えてきました。再生歯の機能として期待されることは、①目的の部位で萌出して咬合をとること、②咀嚼できる歯としての硬度があること、③咬合位を維持するために、歯根膜を介して周囲歯槽骨と連携機能する歯であること、④外部侵害刺激に反応する神経が再生されていることが重要であり、私たちが開発した再生歯胚の移植により、これらの課題のどこまでが再生により達成されるかということを解析いたしました。

これまでに、歯だけではなく他の器官・臓器すべてにおいて、生体内における機能的器官再生というエビデンスは証明されていないというのが実情であります。よって、こういった歯の再生におけるエビデンス創出は、すべての器官・臓器にあてはまるものとして示すことが出来るのではないかと考えています。

1. 再生歯の萌出と硬度

まず初めに、再生歯の萌出について解析をいたしました。歯科の教科書を見てみますと、歯の萌出というのは歯導帯の方向に向かって進行すると書かれているものがあります。私たちの再構成歯胚を移植する場合には、口腔内の粘膜の陥入によって発生した歯胚ではありませんので、後から再生歯胚を目的の部位に移植をしても、歯導帯が存在しないということになります。このことから、私たちがあの仕事を出した当時、世界中の研究者の何人かから、私たちが再生した歯は、歯の萌出路がないから、萌出しないだろうと言われました。

そこで私たちはヒトのモデルとして白歯の再構成歯胚を使って、成体顎骨への移植を試みました。1本の再生歯胚を作り、これを数日間培養して少し発生を進ませます。ここで歯胚発生を生体外で進ませているのは、萌出の方向を正しい向きにして入れるためであ

り、上皮を粘膜の方向に向けて移植する技術を作りました。

実際の移植手技としましては、まずマウス上顎第一白歯を抜歯します。そして約1カ月間かけて、抜歯窩の骨と口腔粘膜を治癒させます。その部位にメスで切開を入れまして、0.8mmのドリルで歯槽骨に穴をあけて、そこに歯胚を埋め込んで縫合します。話してしまうと30秒ぐらいの内容ですが、この実験系をつくるのに1年半ぐらいかかりました。

実際に再生歯胚を移植してみますと、2週間ちょっとでは何も変化がないのですが、37日後には歯肉から咬頭が萌出てきます。そして約50日で咬合面に到達するように歯が萌出してまいります。この論文を書いた当時は、萌出する割合が約50%でしたが、これは移植の技術的な問題だけであり、現在では80%程度の確率で歯が萌出してまいります。しかしながら、約5%は萌出せずに埋伏歯の状態で止まるケースもあります。埋伏歯の場合は、表面に少し切開を入れると正常に萌出てきますので、実際には何もしなくても約80%以上の歯が自分自身で生えてくることが分かりました。

これは緑色に光る蛍光蛋白を発現させたマウスの歯胚を使って再生した歯ですが、特定の波長の光を当てると、口の中で緑色に光ります。こちらは間葉細胞の部分に緑色に光るマウス由来の細胞で再構成し、発生した再生歯を見ておりますが、歯周の領域、それから歯髓の領域がすべて移植片に由来する間葉細胞、すなわち緑色に光る細胞から構成されることが分かりました。

これは天然歯の第一白歯、第二白歯、第三白歯を示し、形態的に徐々に小さくなっているのが分かります。一方、再生歯ですが、私たちの細胞操作技術では、完全に大きな歯を創ることが出来るわけではないので、大体、第二白歯ぐらいの大きさの歯になります。そして形成される咬頭はランダムであり、歯の太さに依存して咬頭の数も多く形成されます。

また、再生歯において非常に特徴的なのは、単根であることです。大きい歯をつくっても、複根になることはこれまで一度もありませんでした。このことから、歯根形成のメカニズムというのは、私たちが使っている歯胚発生のステージよりも後期に制御されているのではないかと思います。しかしながら、天然第一白歯歯胚を腎臓の皮膜下に入れると、歯根は3本に分かれます。このように天然歯胚をそのまま腎臓の中で発生させた場合、歯根は決まった数になりますので、顎環境だけが歯根の数を決めているわけでは無いだろうということも私たちが分かっています。しかしながら、

詳しいメカニズムは今のところ不明です。

これは実際に生えてくる過程の切片でありますけれども、細胞性の成分のみで構成されていたものから、徐々に象牙質、それからエナメル質が形成され、周囲の組織構造は歯胚発生そのものでした。歯胚の発生が進むに従って、徐々に象牙質の硬組織化・成熟が進み、そして萌出の時に口腔粘膜を切って口腔内へ萌出をしてきます。再生歯周囲の構造、つまりは歯根膜、歯槽骨の関係、それから歯肉線維の完成度も天然歯とほとんど変わらないことが明らかとなりました。

歯が萌出してくる過程では、萌出路で colony stimulating factor 1 (Csf-1) が発現し、これに反応する破骨細胞の前駆細胞が集まってきます。この細胞は Parathyroid hormone receptor 1 (Pthr-1) を発現しており、Parathyroid hormone によって破骨細胞へと成熟し、その結果、進行方向に存在する骨が吸収されて歯が萌出してきます。この過程が歯の萌出のメカニズムとして従来言われていました。これを天然歯、それから再生歯において確認しますと、確かに天然歯胚の萌出過程において、歯胚上部の骨の部分で Pthr-1 の発現が *in situ* hybridization で認められ、また Csf-1 もほぼ同じ位置で認められます。

次に再生歯について見てみますと、歯胚上部の骨が完全に修復はしていないのですが、やはり骨様の組織が歯胚上部に認められまして、その場所で天然歯と同様に Pthr-1 それから Csf-1 の発現が認められることから、上部進行方向に存在する歯槽骨のリモデリングについては天然歯と変わらないこと、歯根成長に伴う垂直方向の力のかかり方も天然歯と同様であるということが分かりました。

萌出した再生歯は咬合に耐えうる機能的な硬さを有するかということで、ヌーフ硬度という典型的な硬度を測定する方法を用いました。天然歯におきまして、生後3週間から9週間にかけてエナメル質・象牙質ともに徐々に硬度が増していきます。一方、萌出から11週経過した再生歯のヌーフ硬度を測定しますと、エナメル質も象牙質も天然歯とほぼ同じ硬さであることが分かりました。このことから、再生歯は咀嚼に十分耐え得る硬度を有していることが示されました。

2. 再生歯の咬合と歯根膜を介した骨リモデリング能

次に咬合に関してですが、上顎第一臼歯を抜去した部位に再生歯胚に由来する歯が生えてきております。萌出している再生歯は、対合歯とぶつかると歯の成長が止まり、一度成長が止まりますと、それ以上伸長することはありませんでした。また前頭断CT画像を見ると、天然歯と同じように上下の歯で咬頭嵌合が

認められます。この時の再生歯は、咬頭を制御したわけではないのですが、非常にきれいに咬頭嵌合しています。この理由を知るために、萌出した何本かの再生歯を長期的に観察したところ、萌出した再生歯が伸長し、咬合位まで達した後、徐々に歯が動いて咬頭嵌合に至りました。このことから、機械的な力に対して一番安定するところまで歯が動いているのではないかと私達は考えました。

咬合位を維持するには、骨のリモデリングを介して適切な位置に歯を移動させているのではないかということを考えて、東北大学の山本照子先生にご協力を頂き、マウスモデルで歯の矯正を行いました。ご承知のように、矯正力による歯の移動によって、歯根膜が圧迫された側で破骨細胞、牽引された側で骨芽細胞の局在が認められ、結果的として歯槽骨のリモデリングが起こります。これを誘導しているのが歯根膜であり、この歯根膜を介した骨のリモデリングが起きれば、顎との機能的連携を図れた再生歯であることが証明できると考え、ニッケルチタンワイヤーを切歯の部分に巻きつけて固定し、頰側方向に約20gの矯正力をかけました。

組織解析の結果から、矯正6日目では非常に強い力をかけ過ぎると圧迫側に硝子様変性が認められる場合がありますが、天然歯・再生歯ともに圧迫側と牽引側が確認されます。これが矯正17日目になりますと、骨のリモデリングが終了して、歯槽骨に対してちょうど中央部に歯が位置するということが分かりました。矯正6日目において、骨代謝にかかわる細胞がどのように局在化しているかを解析するために、TRAP染色にて破骨細胞を、それからオステオカルシンの発現にて骨芽細胞の局在を解析いたしました。圧迫側ではTRAP染色陽性の破骨細胞が天然歯・再生歯ともに認められ、牽引側近傍の歯槽骨・セメント質でオステオカルシンの発現が天然歯・再生歯ともに認められます。これらの結果は、骨をリモデリングする細胞の局在をコントロールすることによって歯が動いたのであろうと私たちは考えました。

ではこの矯正的な歯の移動が本当に骨リモデリングによるものかを解析するために、矯正力を付加中にカルセインとテトラサイクリンを交互に投与し、新生骨の形成をラベリングいたしました。矯正力をかけた再生歯において、新生骨の形成は圧迫側よりも牽引側のほうで強く認められ、テトラサイクリンとカルセインが層構造になっておりますので、投与した順番に従って標識が入っていることが示されており、骨新生を介して歯が移動したということが判明いたしました。