

### 3. 再生歯の神経機能の解析

歯の圧迫や切削によって、歯根膜・歯髄の神経に対して侵害刺激が加わると、三叉神経節に存在する神経細胞が突起をそれぞれ両方に伸ばしており、口腔内で感知したものを延髄の三叉神経脊髄路核の神経細胞に伝達します。この三叉神経脊髄路核に伝わったものが視床を介して大脳皮質に投影されることによって、痛みを感知しているということが歯科の領域で既に研究されておりましたので、再生歯に侵害刺激を応答する神経が再生しているかを実際に確認いたしました。天然歯の歯髄それから歯根膜の領域には、ニューロフィラメント陽性の神経線維が確認され、歯髄に至っては非常に多くの神経が認められます。これに対して再生歯は、歯そのものが細いこともあり歯髄も細いのですが、歯髄の中にはニューロフィラメント陽性の神経線維が認められます。さらに歯根膜の領域にも神経の侵入が認められました。このことから、末梢神経が歯の内部、それから歯周の領域に侵入してきていることが分かりました。

歯の神経というのは、主として交感神経と知覚神経といった複数の神経から構成されていることから、果たして再生歯の中に入っている神経は複数種類の神経線維から構成されているかということを確認するために、神経伝達物質を免疫染色にて検出しました。ニューロフィラメントは天然歯・再生歯どちらにおいても、歯髄・歯根膜ともに神経線維全体に染まります。一方、交感神経を染めるニューロヘフチドYを観察してみますと、神経の一部において染色が確認されました。

次に、知覚神経で産生されるCGRPという神経伝達物質を同様に免疫染色で確認すると、天然歯・再生歯の両者において、歯髄および歯根膜にCGRP陽性の知覚神経が確認されました。この結果から、歯の内部それから歯周の領域に、交感神経と知覚神経は間違いなく侵入していることが分かりました。

歯髄・歯根膜において神経の存在は確認されたわけですが、それが末梢から中枢に侵害刺激を伝達する能力を有する機能的な神経であるかを明らかにする必要があります。これまでの研究で、矯正実験によって歯を圧迫すると、歯根膜の中に入り込んだ神経が圧迫刺激によってガラニンという伝達物質を末梢で出し、中枢では延髄にある三叉神経脊髄路核の神経でc-Fosというタンパク質の発現が確認されることが明らかになっています。このことから、c-Fosが確認されると脳が痛みを感じているという指標になります。そこで、矯正的圧迫による歯根膜神経の痛み、ならびに露髄による歯髄神経の痛みを、実際に中枢で感じている

かどうかを解析いたしました。まず天然歯に矯正を行いまして、歯根膜神経の神経伝達物質であるガラニンの発現を確認しました。矯正力をかけていない状態では、歯根膜領域に何も確認されませんが、矯正後48時間経過しますと、免疫染色によりガラニンが検出されます。実際に再生歯におきましても、圧迫刺激を与えますと、同様にガラニンが検出されます。さらに、矯正を行った天然歯における延髄のc-Fos発現を確認しますと、矯正2時間後にc-Fosタンパクの発現が強く確認され、48時間後も持続します。一方、再生歯においても同様に、矯正2時間後で非常に強い発現を認め、48時間後でもc-Fosの発現は持続することから、天然歯と同じように、矯正による圧迫痛を感じていることが示されました。では次に、露髄刺激により中枢に刺激が伝達されるかを解析したところ、天然歯では露髄2時間後にc-Fosの発現が上昇し、その後、速やかに消失します。再生歯においても同様に、露髄2時間後にはc-Fos発現が上昇し、速やかに消失するというように、天然歯と同様の反応する末梢神経が歯髄に侵入していることが明らかとなりました。

以上の結果から、私たちが再生歯の機能として期待していたすべての要件を満たすことから、顎顔面と連携機能する歯の再生は可能ではないかと考えております。これは将来、他の器官においても、器官原基を移植して発生させるという点では、同様の結果が得られることを示しており、臓器置換再生医療の実現可能性が十分にあることを私たちは明らかとしました。

これら一連の結果は、社会的な反響も非常に強く、日本国内だけではなく、海外においても取り上げられました。その反響は海外の方がむしろ大きいぐらいであり、経済誌のForbesであるとか、BBCニュースに非常に大きく取り上げられました。これは私たちの研究が優れているということだけではなく、肝臓や腎臓の再生治療とは異なり、歯科領域の再生治療がどれだけ社会的にインパクトがあるかということを表していると思います。高度先進医療ではなく、このような再生治療が実現化されることによって、ほとんどすべての人がその恩恵を被るという点で、社会的に非常に大きな関心を集めたのだと思います。そういう意味では歯科領域の再生研究あるいは再生治療の臨床応用研究というのは、他の器官再生に先駆けて実現してくるものだと私は信じています。

最近、日本経済新聞社がある一定期間ごとに技術トレンド調査を行ってしまっていて、私たちの研究成果が、民間企業も含めて総合順位で第5位にランクインいたしました。これはやはり、歯の再生医療が実現化に近づいていることを、国民の皆様が期待しているという

ことを表しています。

#### 今後の研究の展望

以上の結果をもちまして、再生歯胚を作り、そしてこの再生歯胚は成体の口腔内で萌出して機能するというところまで明らかとすることができました。しかしながら将来の実用化を考えれば、患者さん自身の細胞で歯を再生するということが重要です。考えなければいけないのは、どこの、どのような細胞を再生のための材料にすべきか、という問題です。私たちは歯学部の先生方と一緒に、細胞シースの探索研究を進めています。特に歯科臨床医は、口腔内に由来する細胞のほうがアクセスしやすいと思われるので、親知らずや、9歳児ぐらいの若い歯胚、その他には口腔内の粘膜あるいは歯肉から上皮細胞や間葉細胞が採取できないかということを考えております。しかし、歯の発生や器官発生から考えれば、上皮細胞と間葉細胞に加えて、歯をつくるための誘導シグナルが必要だと考えられています。これらの観点から私たちは、歯胚発生の初期段階の細胞を用いて、歯胚を誘導するシグナル遺伝子の探索についても、現在研究を進めています。

さらに可能であれば、生体外で歯胚を培養して、歯胚に由来する歯と歯根膜と骨のユニットを創り出して、これを丸ごと移植したいのですが、現在のところ5mm程度の細胞の塊を生体外で培養する技術は存在しません。現在のところ、再生歯胚を腎臓皮膜下に移植をすると、1本の白歯様構造を持った再生歯が歯周の領域を伴った状態で歯槽骨に包まれて発生します。何もこれは腎臓で歯を再生しようということではなく、あくまでもモデルとして、もしこういう形で再生歯ユニットが作製出来れば、移植治療に用いることができるのではないかと考えているわけです。

作製する再生歯ユニットは、形態・大きさを任意でコントロールできます。これを歯の喪失部位に移植すれば、再生歯ユニットの歯槽骨と顎骨とが骨性結合し、機能し得ることが可能ではないかと考えています。実際に再生歯ユニットを歯の周囲に歯槽骨がついた状態で移植をします。そうすると移植直後から大体30日ぐらいたちますと、非常にきれいにその周囲に骨が結合してきます。組織像を見てみると、隣の天然歯と移植した再生歯の間に存在する歯槽骨が一塊となっていることから、再生歯ユニットという構造物を作れば、骨と骨を介して結合させることが可能であり、ユニット側の歯根膜の残存も期待できます。

実際にこれが骨性結合したかどうかを解析するため、腎臓皮膜下で再生歯ユニットを作製する際に、カルセインで再生歯と骨をラベルしておいてから移植を

しました。移植30日後に組織像を観察しますと、再生歯が緑色に光っているだけでなく、その周囲の歯槽骨の部分に緑色の標識が認められました。この結果は、再生歯ユニットに付着している歯槽骨が残存して、移植先の歯槽骨と結合したことによるものであり、このような治療の概念も可能ではないかと考えています。今後の研究展開としては、患者さんの細胞を使って歯をつくること、それから生体外で培養して大きな歯を創るという目標に向かって研究を進めているところであります。

歯全体を再生するというのは、まだまだ先の長い研究だと思えます。ただ、我々のような基礎的研究者がこういった研究技術を作っていくことによって、新たなフェーズに移行できると信じています。私たちはもちろん、歯全体の再生を考えておりますが、直近で治療に使える技術はないかということを考えれば、やはり天然型歯根を再生し、上部は補綴物による既存治療を行う方法が挙げられます。こういった歯根を再生するという考え方は、やはり近未来の治療方法として有効であると期待されます。今後さらに継続的に研究を進めることにより、これらの技術開発の進展が期待されます。

#### 謝辞

これらの研究成果の多くは、東京理科大学で実施したものです。細胞操作に関しては助教の中尾君が、機能的な歯の再生に関しては、現在、東北大学歯学部にも所属する池田先生と理科大学の森田君が中心に進めた仕事であります。

矯正実験、痛みに関する解析においては東北大学の山本照子先生、再生歯の解析は東京医科歯科大の春日井昇平先生にご協力を頂き、これらの研究を進めることができましたことを感謝しております。

#### 講演に対する質疑応答

司会 辻先生、どうもありがとうございました。

質問 口腔科学研究所の木下と申します。きょうは大変興味あるプレゼンテーション、ありがとうございました。私は顎骨の再生と、現在、歯周組織の再生に携わっております。そういった面からも非常に興味深く、いろいろと教わる場所があるのですが、本日のお話の中で、歯胚原基を成体の顎骨に埋めて、それを萌出に導き、かつ、その歯が機能的にも正常に近い歯ができたということに関して、大変敬意を表して聞かせていただきました。

しかし、端的に申しまして、このような歯胚原基を顎骨に入れて歯を再生するというような再生医療は、

将来それが成り立つかどうかということについて大変疑問を持っており、むしろ可能性は低いのではないかと考えております。それは、いわゆる再生医療の本質を考えた場合、個体の誕生から成長、死に至るライフサイクルの中でバランスをとって考えるべきだろうと思います。ですから、特に歯の場合は、28本なり32本が独立した器官として生体に発生するわけですね。そして、そういうのは毛髪、毛根以外を除けば、非常に類を見ないわけです。それゆえに、私の考え方としては、自然に発生した28本の歯を、その人のライフサイクルの中で何とか生涯を全うさせたいと思っています。そういう意味では、再生医療については、少し抵抗感があります。

しかしながら、先生の研究は臨床においても大きな示唆を生むと思います。例えば私たちが臨床で、非常に希少な症例ですけれども、歯胚ができながら全く歯が生えていない人がいます。他に全く異常ないのですが、乳歯だけ生えて、大人になっても歯胚がずらりと並んでいる。そういった症例のメカニズムの原因を解明することに関しては有効かと思えます。先ほど、Pthr-1とCSF-1に関してお話がありました。それは萌出異常の原因究明、それらの治療といった面では大いに情報を提供してくれると思います。それから、歯原性腫瘍の発生にも非常に示唆に富む所見が出てくるだろうと思います。ぜひ聞きたいのは、ライフサイクルの短い齶歯類を用いて再生歯を萌出に導かれたのですが、これが霊長類でも可能性があるかどうか、歯周組織の再生に有効なグロースファクター、生理活性因子の候補を御存知でしたら、差し支えない程度にご教授いただければと思います。よろしく願います。

辻 貴重なコメントをありがとうございました。1つ目のご質問につきましては、齶歯類で行ったことが、霊長類で使えるかということでもありますけれども、原理原則は両方とも変わらないですから、マウスで示せた再生治療のコンセプトはヒトにおいても応用可能と考えます。ただし、その場合の問題は、「ゾウの時間ネズミの時間」という本にも書かれている概念として、生物の寿命と歯の萌出期間の関係は考慮する必要があります。私たちが研究しているマウスでは、再生歯が数日で生えていますが、実際にヒトで生やそうとすれば数年はかかるであろうと思います。

それから歯周領域の再生につきましては非常に難しいご質問であり、私もその分野を専門ではありませんが、やはり歯と骨を一体で再生することが必要であろうと感じています。例えば、既に歯がなくなっているところに骨を再生することや、既に歯周病で歯と歯槽

骨とが離れてしまっているような場合に、果たして細胞移入や増殖因子による治療で十分な治療ができるものかどうかは疑問です。できれば歯と歯周が同時に再生されるべきではないかと思っています。

司会 はい、どうぞ。

質問 すばらしいプレゼンテーションありがとうございました。私はエイジングの研究と活性酸素、酸化ストレスを研究しております。先生のコメントにもありましたが、成獣マウスで実験されたというところが非常におもしろいところだと思います。それに関連して、エイジディペンデントな歯の再生を確認されたことはありますでしょうか。

辻 ありません。移植例は、大体5週齢から10週齢ぐらいまでのマウスで実施しておりますので、マウスとしては成体になったばかりの動物です。

質問 臨床応用するとなると、歯がない患者さんを対象にすることになりますので、エイジングが進んだ患者さんに対して実際に行うことになるかと思いますが、そのような方に再生をすることは難しいのでしょうか。

辻 ご指摘の点に答えるとすれば、組織の修復や再生にかかる時間もありますので、マウスのような動物モデルではなくて、例えば霊長類であるサルなどの大型動物での研究でおさえていくべきだと考えています。現時点では、歯の再生としてのコンセプトの実現可能性であろうと思っています。

質問 ありがとうございます。

司会 先生、一つ教えて欲しいのですが、現在の先生の実験系で、歯の再生が可能なのは帽状期の上皮・間葉の相互作用ということでやっておりますが、もう少し発生の進んだ鐘状期ぐらいの細胞を用いて再構成されたことはありませんか。

辻 私たちも全く同じことを考えまして、どのステージの歯胚でなければならぬか、実験で試したことがあります。bell stageから上皮・間葉細胞を取り出して使うと、再生歯胚からの発生効率が下がりますので、分化段階は重要だと思います。これは、はじめのほうでお話ししたように、細胞操作のところで上皮細胞と間葉細胞が高密度に区画化されていなければなりません。bell stageの歯胚では、分化した細胞が再生歯胚の中に入ってくるために、未分化な幼弱な細胞同士の接着を妨げ、結果的に細胞密度が低下することとなり、それが再生歯の発生を妨げるのでであろうと考えられます。

ただし、歯胚の誘導がかかる未分化な歯原性上皮・歯原性間葉細胞の探索は、世界中でまだほとんど進んでおりませんので、bell stageや、Late bell stageの

歯胚の中に、上皮・間葉の相互作用ができるような未熟な細胞が存在するかどうかというのは、今のところ分かっておりません。私たちは、このような細胞を成体の歯根領域や根尖領域から見つけだして性状を解

析することによって、歯の再生に応用できないかと考えているところです。

司会 はい、ありがとうございました。

了

## 次世代再生医療としての歯の再生

### Tooth Regeneration as a Next Generation of Organ Replacement Regenerative Therapies

小川 美帆<sup>a</sup>, 大島 正充<sup>b</sup>, 辻 孝<sup>a, b, c</sup>

Miho Ogawa, Masamitsu Oshima and Takashi Tsuji

<sup>a</sup> 株式会社オーガテクノロジーズ

<sup>b</sup> 東京理科大学・総合研究機構

<sup>c</sup> 東京理科大学・基礎工学研究科

**要 旨** 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る。さらに次世代の再生医療として、機能を喪失した臓器・器官を人為的に創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。歯科領域は、ブリッジやインプラントなど歯の喪失に対する人工的な治療法が確立しており、さらに喪失した歯を再生した歯により取り戻す「歯の再生治療」に向けた研究が、他の器官に先駆けて進められている。本稿では歯科再生医療の研究開発戦略を概説すると共に、私たちの研究成果を中心に歯科再生治療の現状と課題を解説する。

**キーワード**：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

#### 1. はじめに

再生医学は、生物学的な発生・再生の仕組みや幹細胞生物学、組織工学を融合させ、21世紀の新しい学問的な体系として確立されつつある<sup>1-3)</sup>。さらにこの学問を医療に応用した再生医療が、21世紀の新たな医療システムとして期待されている。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を目的として、生体から採取した幹細胞を移入する「幹細胞移入療法」を中心に、白血病における造血幹細胞移植や心筋梗塞をはじめ、歯科領域のう蝕や歯周病治療など、幅広い疾患において臨床応用化研究が進められている<sup>4-8)</sup>。

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臓器移植であるものの、移植を望む患者に対して提供可能な臓器の不足が大きな社会問題になっている。再生医療の大きな目標のひとつは、この臓器不足の解決に向けて、機能不全に陥った臓器を再生した臓器とまるごと置き換える「臓器置換再生医療」の確立である。歯科領域は、ブリッジやインプラントなど歯の喪失に対する人工的な治療法が確立しているため、喪失した歯を再生により取り戻す「歯の再生治療」は臓器置換再生医療の中でも他の器官に先駆けたモデルケースとして期待されている<sup>9,10)</sup>。最近、私たちは胎仔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

の欠損部位に移植することで、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。

#### 2. 歯科における再生医療のニーズ

歯は外胚葉性器官のひとつであり、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>。歯は頭蓋・顎顔面と連携してこれらの生理的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に問題が発生しても生理的機能に悪影響が及ぼされ、機能障害がおこると考えられている<sup>15,16)</sup>。

歯科医療において、歯の喪失に対する咬合機能の回復を目指してブリッジや義歯（入れ歯）による人工的な器官の機能代替治療が進められてきた<sup>17,18)</sup>。さらに最近では、チタンやアパタイト製のインプラントが歯槽骨と結合する性質を利用して、口腔インプラント治療が確立し、普及しつつある<sup>19-21)</sup>。しかしながらインプラント体には歯根膜が存在しないため、咬合緩衝能や移動能を有しないことが問題となっており、最近の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。

一方、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>22)</sup>。歯の自家移植は、自己口腔内の非機

<sup>\*)</sup> 〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

TEL: 04-7124-1501 (内線 4427)

2010年12月7日受付



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り、機能的な咬合を大きく回復させることができる。しかしながら、移植可能な自家歯が必要であることなどの治療適応に制限がある。そのため、より生物学的で、かつ生理的機能の回復が可能となる「歯の再生治療」が期待されるようになった。歯科治療では、歯そのもの、すなわち器官の喪失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ている。

### 3. 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に複雑な構造を有している。現在の生命科学技術では、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確立していない。そのため、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、3次元に適切な組織配置をとらせて、機能的な歯を再生することは現在の再生技術では確立されていない。

外胚葉性器官である歯をはじめとするほとんどの臓器・器官は、胎仔期の未分化上皮・間葉組織の相互作用によって誘導される「器官原基」から発生する。歯の発生は、ヒトでは妊娠6～7週、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1A)。その後、間葉組織側に陥入をはじめ、胎齢11日目にはその陥入領域に接する間葉細胞が密集して「歯胚」を形成する(蕾状期)。胎齢13～14日には、上皮細胞が凝集した間葉細胞を包み込むように伸長し(帽状期)、胎齢15～18日には上皮組織と間葉組織それぞれの組織から分化したエナメル芽細胞と象牙芽細胞が境界面に向けて、エナメル質と象牙質を分泌するよ

うになり、硬組織形成が始まる(鐘状後期)(図1A)。その後、歯は硬組織の成熟とともに垂直方向に伸長して歯根を形成する(図1B)。歯根周囲では歯小囊由来の細胞から、セメント質、歯根膜、歯槽骨といった歯周組織が形成されて顎骨と連結される。歯根伸長に伴って歯は口腔内に萌出し、対合歯と咬合するようになると歯の成長は停止する(図1B)。

このよう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る歯をひとつの器官再生のモデルとして、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して器官をつくりだすアプローチが進められるようになった。具体的には歯を再生するために、未分化上皮・間葉細胞の2種類のみから歯胚を再生し、歯の欠損部位へ移植するという戦略であり、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。

### 4. 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

再生歯胚による歯の再生を実現するためには、「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。この技術開発を組織工学的に分類すると、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歯胚をつくりだす方法<sup>23)</sup>と、上皮細胞と間葉細胞の凝集体を作製し、胎仔期の歯胚を再現する方法が代表的である<sup>24)</sup>。これまでに、これらの方法によって正常な組織構造を有する歯ができるなどの報告はあるものの、その頻度は低く、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だす方法の開発が期待されていた。

そこで私たちは、歯の発生を再現する歯胚を再生するには、細胞間相互作用が可能となるような高い細胞密度で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と考え、2007年に「器官原基法」を開発した<sup>11)</sup>。この方法では、胎

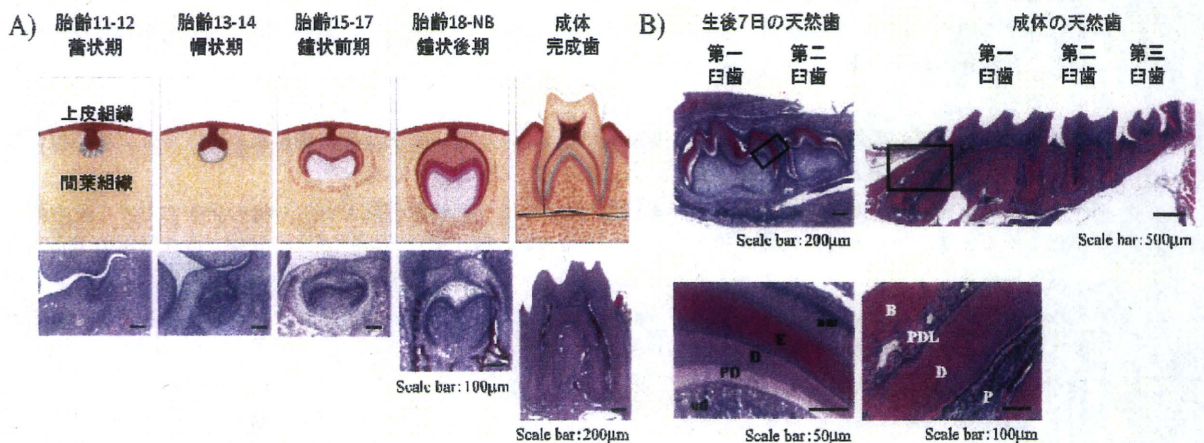


図1 歯の発生過程

A) 歯の各発生段階における模式図とHE染色像を示す。

B) 生後7日(左図)ならびに成体(右図)の下顎骨における歯のHE染色像、および歯冠部(左下図)および歯根部(右下図)の拡大像を示す。od: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, P:歯髄, B:歯槽骨, PDL:歯根膜



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被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 (図 2C)、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が高いと考えられる。

### 5. 生理的機能を有する歯の再生

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、成体口腔内で成長し、歯としての正常な機能を有するかどうかが重要である。歯は咀嚼や発音といったクオリティーオブライフに関わる審美性などの重要な口腔機能を担っている。これらの口腔機能は、歯、咀嚼筋、顎関節が中枢神経系の制御下において協調機能することにより成り立っている<sup>14)</sup>。したがって、歯科再生治療の確立には成体

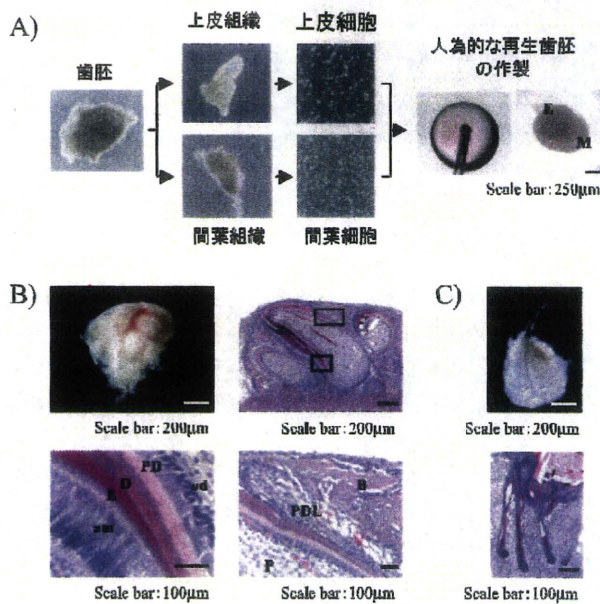


図 2 再生歯胚作製のための器官原基法

A) 再生歯胚の作製方法を示す。E: 上皮細胞凝集体, M: 間葉細胞凝集体

B) 腎被膜下に再生歯胚を移植後 14 日目において発生した再生歯の実体像 (左上図) と HE 染色像 (右上図)、および歯冠側 (左下図)、歯根側 (右下図) の拡大像を示す。od: 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, P: 歯髓, B: 歯槽骨, PDL: 歯根膜

C) 腎被膜下で発生した毛髪の実体像 (上図) と HE 染色像 (下図) を示す。

口腔内の歯の喪失部位で萌出すると共に、顎顔面領域における咀嚼、神経を介した中枢への侵害刺激の伝達を果たしうる機能的な歯を再生することが必要である。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、並びに外部侵害刺激にตอบสนองしうる神経機能について解析した<sup>12)</sup>。

### 5.1 再生歯の萌出と咬合

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>。マウス上顎第一臼歯を抜去し、3週間かけて抜歯窩を治癒させた後、再び歯の欠損部位に歯科用エンジンドリルを用いて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、歯髓、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が再生し、萌出したことが証明された (図 3D)。

一方、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、歯根膜機能によって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 3E)。これらのことから、再生歯は天然歯と同等の組織構造を有すると共に、歯根膜を介した咬合の確立と維持する機能を有した機能的な歯へと成長することが明らかになった。

### 5.2 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あり、歯髓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 (図 4A)。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と考えられる。再生歯の歯髓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 4B)。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することが知られている<sup>25,26)</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 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 (図 4C)。

### 6. 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、並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未だ解決すべき課題が残されている。



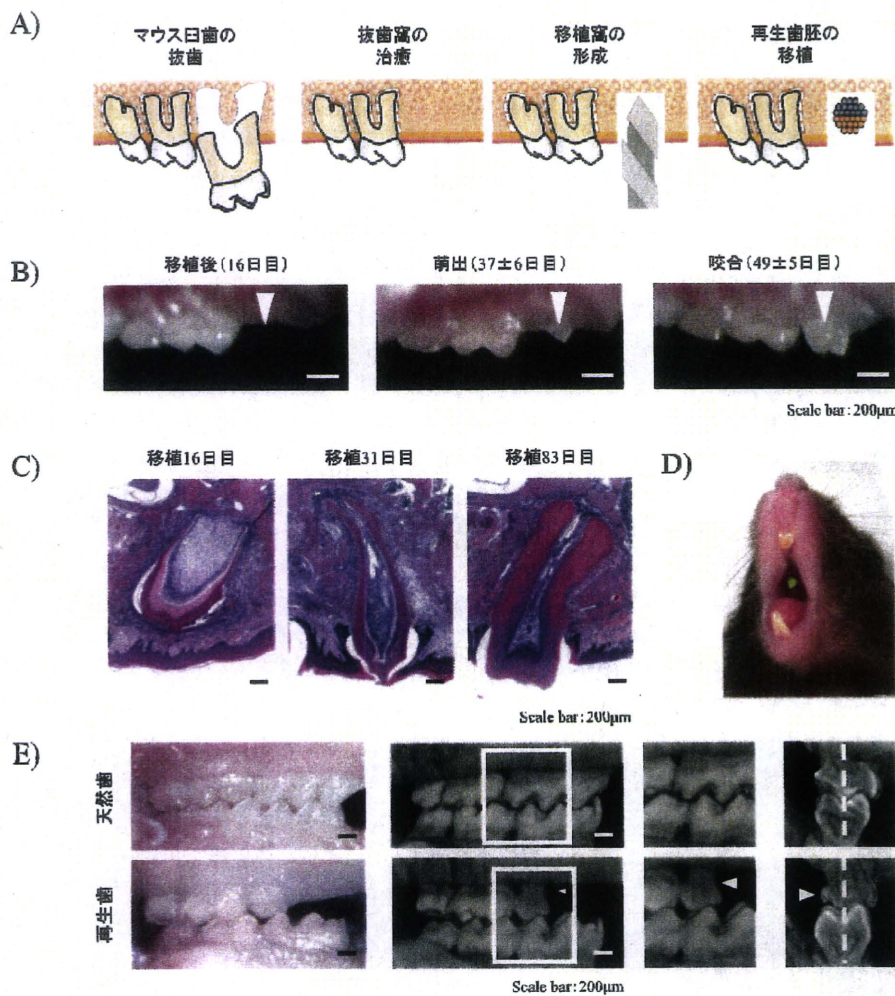
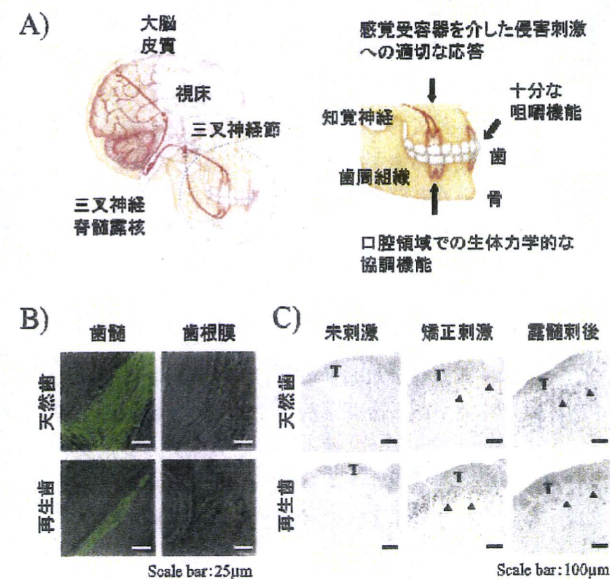


図3 成体マウス口腔内で発生・萌出した再生歯

A) 再生歯胚の口腔内移植方法の概略図を示す。  
 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。△：再生歯  
 C) 成体マウス口腔内で発生・萌出した再生歯のHE染色像を示す。  
 D) GFP標識された再生歯の口腔内写真を示す。  
 E) 天然歯および再生歯における咬合状態の口腔内写真（左図）、CT像（左中央図）、およびCT拡大像（右中央図：矢状面、右図：前頭断面）を示す。△：再生歯



ヒトの歯の再生を実現するためには、移植免疫による拒絶反応を回避するため、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。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存在し<sup>27-30</sup>、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ス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、歯全体の再生には至っていない。完全な歯の再生には、胎仔期の歯胚誘導を再現しうる遺伝子や、誘導能のあ

図4 再生歯の神経機能

A) 歯に侵入する神経と顎顔面領域における歯の機能についての概略図を示す。

B) 天然歯と再生歯の歯髄（左図）および歯根膜（右図）に侵入するNeurofilament陽性神経繊維（緑）の免疫染色像を示す。  
 C) 天然歯および再生歯に矯正力負荷（中央図）および露髄刺激後（右図）を加えた際の三叉神経脊髄路核におけるc-Fosタンパク質の免疫染色像を示す。T：三叉神経脊髄路核、▲：c-Fos陽性核



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、三次元的に細胞凝集塊や組織、器官を培養できるシステムの開発は十分ではなく、三次元的な血管ネットワーク構築を含む培養システムの開発が、臓器置換再生医療の実現には必須であると考えられる。

## 7. 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。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、歯の生理的機能を生物学的に回復させる歯科再生治療の実現に向けた研究として期待されると共に、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。

## 文 献

- 1) Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S. and Mori, H.: *Nat. Med.*, 12, 459-465 (2006)
- 2) Sekine, H., Shimizu, T., Yang, J. and Okano, T.: *Circulation*, 114, 187-193 (2006)
- 3) Yang, J., Yamato, M., Nishida, K., Ohki, T., Kanzaki, M., Sekine, H., Shimizu, T. and Okano, T.: *J. Control Release*, 116, 193-203 (2006)
- 4) Appelbaum, F.R.: *Nature*, 411, 385-389 (2001)
- 5) Kim, J.H., Auerbach, J.M. and Rodríguez-Gómez, J.A.: *Nature*, 418, 50-56 (2002)
- 6) Amado, L.C., Saliaris, A.P., Schuleri, K.H., John, M.S., Xie, J., Cattaneo, G., Durand, D.J., Fitton, T., Kuang, J.Q., Stewart, G., Lehrke, S., Baumgartner, W.W., Martin, B.J., Heldman, A.W. and Hare, J.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11474-11479 (2005)
- 7) Rimondini, L. and Mele, S.: *Minerva Stomatol*, 58(10), 483-500, (2009)
- 8) Hasegawa, N., Kawaguchi, H., Hirachi, A., Takeda, K., Mizuno, N., Nishimura, M., Koike, C., Tsuji, K., Ida, H., Kato, Y. and Kurihara, H.: *J. Periodontol*, 77(6), 1003-1007 (2006)
- 9) PT シャープ, CS ヤング: 日経サイエンス, 11, 41-49 (2005)
- 10) 辻 孝: 日本歯科医師会雑誌, 60(7), 635-646 (2007)
- 11) Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M., Saitoh, M., Tomooka, Y. and Tsuji, T.: *Nat. Methods*, 4(3), 227-230 (2007)
- 12) Ikeda, E., Morita, R., Nakao, K., Ishida, K., Nakamura, T., Takano-Yamamoto, T., Ogawa, M., Mizuno, M., Kasugai, S. and Tsuji, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(32), 13475-13480 (2009)
- 13) James, K.A.: *Oral Development and Histology*, Second Edition, Thieme Medical Publishers, 94-109 (1994)
- 14) Proffit, W.R.: *Contemporary Orthodontics*, Mosby (2007)
- 15) Nickel, J.C., Iwasaki, L.R., Walker, R.D., McLachlan, K.R. and McCall, W.D.: *J. Dent. Res.*, 82, 212-217 (2003)
- 16) Dawson, P.E.: *Functional Occlusion from TMJ to Smile Design*, Mosby (2006)
- 17) Pokorny, P.H., Wiens, J.P. and Litvak, H.: *J. Prosthet. Dent.*, 99(4), 299-313 (2008)
- 18) Cooper, L.F.: *J. Prosthodont*, 18(2), 116-122 (2009)
- 19) Brånemark, P.I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B.O., Lindstrom, J. and Ohlsson, A.: *J. Plast. Reconstr. Surg.*, 3, 81-100 (1969)
- 20) Linder, L., Albrektsson, T., Brånemark, P.I., Hansson, H.A., Ivarsson, B., Jonsson, U. and Lundstrom, I.: *Acta. Orthop. Scand.*, 54, 45-52 (1983)
- 21) Albrektsson, T. and Sennerby, L.: *Int. J. Prosthodont*, 3, 30-41 (1990)
- 22) Cohen, A.S., Shen, T.C. and Pogrel, M.A.: *J. Am. Dent. Assoc.*, 126, 481-485 (1995)
- 23) Honda, M.J., Sumita, Y., Kagami, H. and Ueda, M.: *Arch. Histol. Cytol.*, 68, 89-101 (2005)
- 24) Hu, B., Nadiiri, A., Kuchler-Bopp, S., Perrin-Schmitt, F., Peters, H. and Lesot, H.: *Tissue Eng.*, 12, 2069-2075 (2006)
- 25) Byers, M.R. and Narhi, M.V.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 10, 4-39 (1999)
- 26) Deguchi, T., Takeshita, N., Balam, T.A., Fujiyoshi, Y. and Takano-Yamamoto, T.: *J. Dent. Res.*, 82, 677-681 (2003)
- 27) Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G. and Shi, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(25), 13625-13630 (2000)
- 28) Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G. and Shi, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(10), 5807-5812 (2003)
- 29) Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Barhim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y. and Shi, S.: *Lancet*, 364(9429), 149-155 (2004)
- 30) Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.M., Zang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.Y., Shi, S. and Wang, S.: *PLoS. One*, 1, e79 (2006)

