

201106002A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 口 朗

平成24(2012)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 . . . . .	24
(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 . . . . .	32
辻 孝	
3. 歯根再生法の開発と再生歯の評価 . . . . .	43
(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 . . . . .	47
福本 敏	
5. 歯根再生法の開発と再生歯の評価 . . . . .	51
(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 . . . . .	55



厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
総括研究報告書

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小型動物モデルにおいて、完成歯の構造体である再生歯ユニットを移植することにより、歯の喪失に対する歯・歯周組織の包括的再生が可能であることを示した。さらには、大型動物（イヌ）における臓器置換型再生歯の実現可能性のエビデンスを示した。②様々な免疫抑制剤を用い他家歯胚移植モデルの確立を試みたが、成功率が低かった。一方、自家歯胚を移植することにより、イヌ歯胚移植モデルの基本的手法を確立できた。③ビーグル成犬抜去歯から採取した歯髄細胞が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。④iPS細胞からエナメル芽細胞の作成が行なえるようになり、また分化した歯髄細胞から、歯髄幹細胞を大量調整することが可能となった。また、歯の形態形成に関しては、歯の横幅を決めるメカニズムが判明し、さらに歯胚の大きさをコントロールする為の候補分子の同定に成功した。⑤ビーグル成犬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。本結果により、口腔粘膜由来線維芽細胞が骨再生の細胞移植療法に有用である可能性を示した。⑥E-GBR に使用する膜としてシリコン膜の代わりに、本研究で我々が開発した (CHP)- nanogel 膜や架橋ゼラチン膜を使用することで、さらに効率良く骨を造成できる可能性を示した。

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

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。

**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

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, PLoS ONE 6: 21531, 2011) 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

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. 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発 (辻)

#### 1) 細胞シーズの探索

前臨床段階を目指した大型動物モデルにおける細胞シー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。また、これらの歯胚を用いて再生歯胚を作製して免疫不全マウスへ移植することにより、歯胚発生が可能であるかを解析した。

#### 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)

完成した再生歯の移植による機能的な歯の再生技術の開発に向けて、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構築した。2010 年度の報告において、再生歯胚を 3 次元的な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ことを実証しており、今年度は複数本の歯牙欠損にも対応可能な多数再生歯ユニットの作製技術を開発した。長径 2.5mm、短径 1.5mm、高さ 1.5mm の筒状のデバイス内に複数個の再生歯胚を配置し、マウスの腎臓皮膜下に移植を行い、移植 50~60 日後の多数再生歯ユニットの発生をマイクロ CT 撮影および組織学的解析にて評価した。

さらに成体マウスの下顎骨において、すべての天然歯を抜歯した無歯顎モデルを作製し、無歯顎部の歯槽骨に、近遠心径 3.0mm、頬舌径 1.2mm、深さ 0.8mm の移植窩を形成し、その部位に多数再生歯ユニットを移植するモデル構築を行った。

### 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)

大型動物における歯の再生の実現可能性を明らかにするために、岡山大学と共同でイヌ自家歯胚を用いた移植モデルの開発を行った。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小白歯部の第 2、第 3、第 4 永久歯歯胚を摘出し、ディスパーゼ酵素処理により上皮組織と間葉組織に分離した後、間葉組織はコラゲナーゼとトリプシンによる酵素処理によって単一化した間葉細胞を取得した。これらの間葉細胞を上皮組織と歯胚再構成を行い、器官培養を 2 日間行って細胞を凝集させて再生歯胚を作製した。

次に再生歯胚が成体の顎環境下で発生し、口腔内に萌出・機能化するかどうかを明らかにするために、歯胚移植モデルの構築を行った。昨年度の

報告より、高等生物であるイヌは他家の歯胚移植による免疫学的拒絶が確認されたことから、自家の天然歯胚、ならびに自家再生歯胚を用いた移植モデルを構築し、経時的な歯胚発生をマイクロCTにて解析した。

#### 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)

これまでに胎齢 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に、各歯胚発生過程を *in situ hybridization* にて発現パターンニングを解析したところ、候補遺伝子のうち 20 遺伝子が帽状期歯胚において、歯胚発生のシグナルセンターの役割を果たすエナメルノットや象牙質、歯髄、歯周組織の由来とな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を明らかとした。

今年度は、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、遺伝子導入型歯胚の作製技術の確立を行った。歯胚細胞へ導入可能なアデノウイルス発現系を用いて歯胚に候補遺伝子を導入し、器官培養により発生に及ぼす影響をモニタリングすることで、候補遺伝子の機能を解析する実験システムの構築を行った。

#### 5) 歯の数、大きさ、形態の制御機構の解明 (辻)

項目①-3にてスクリーニングを実施した歯胚発生に関わる遺伝子群の中で歯胚の形態形成に関与する遺伝子を見出してきた。その中で、エナメルノット特異的に発現する Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma (Gadd45g) について着目し、Gadd45g 遺伝子導入による歯冠幅制御に関わる分子機構の解析を行うと共に、Gadd45g ノックアウトマウスにおける歯冠幅の解析をマイクロCTならびに組織学的解析により実施した。

#### 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、小動物用マイクロCTを用いて、生存したままマウス腎皮膜下において歯胚発生を評価する方法を構築した。また、イヌ顎骨における歯胚発生解析においては、ヒト用マイクロCTを用いて発生過程を経時的に解析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。

#### 2. ヒト由来細胞を利用した再生歯開発への基盤研究 (辻)

8 ~ 13 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CT評価ならびに組織学的解析を行った。

#### 3. 他家歯胚移植モデルの確立 (窪木)

前年度から、胎生55日齢の胎仔第二小白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から、FK506とプレドニゾロンの併用による一日二回投与による免疫抑制状態において、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日齢の胎仔第二小白歯歯胚を他家移植した。しかし、顎骨内での発生頻度は1/6と低く、免疫抑制のコントロールができていない可能性を考えた。そこで、FK506とプレドニゾロンの通常量の4倍量投与下にて、胎生55日齢の胎仔第二小白歯歯胚を他家移植した。

#### 4. 自家歯胚移植モデルの確立 (窪木)

昨年度に引き続き、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、萌出モデルの検討に適した胎生30日齢の下顎第2, 3, 4小白歯 (P2, P3, P4) の歯胚に注目し、30日齢の子犬の下顎第2, 3, 4乳

臼歯を抜歯後、顎骨からP2, P3, P4の歯胚を摘出し、抜歯窩へ自家歯胚移植を行った。移植後、定期的に歯科用コンビームCTを用い、歯胚の発生の有無を評価した。

## 5. 歯根膜の機能的評価 (園山)

これまで、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ハイドロキシアパタイト(HA)をイヌ下顎骨に埋入窩に移植することで、多孔性HA周囲に歯根膜様組織が形成されること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。

そこで今年度は昨年度に引き続き、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、検討した。

また、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、今年度も挺出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。

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。

## 6. 人工歯根に適したチタン表面性状の選定 (*in vitro*) (園山)

これまでに、人工歯根の歯根膜組織の成熟には機能性の負荷が必要であると考え歯冠補綴物を装着し咬合の負荷をかけたが、多孔性HAの強度的な問題からHAの破折による補綴物の脱離が認められた。そこで、このキャリアの強度の問題を解決するため、既製のチタン表面に歯髓幹細胞を播種し、象牙質基質を形成させ、その周囲に歯根膜幹細胞を応用することでインプラント体に強固に結合する歯周組織が再生できないか

と考えた。そこでまず、歯髓幹細胞の象牙質基質形成に適した生体材料の選定を目的に、#600研磨紙で研磨した純チタン(研磨チタン)、サンドブラストならびに酸処理により表面を粗造化した純チタン(粗造化チタン)、粗造化チタン表面にHAを析出させたチタン(HAチタン)の表面上での歯髓幹細胞の細胞動態を*in vitro*で形態学的、分子生物学的に検討した。

## 7. iPS細胞から歯牙関連細胞への分化能の解析 (福本)

これまでの研究成果により、iPS細胞からエナメル上皮細胞への誘導が可能となり、その過程においてエナメルマトリックスの1つであるアメロブラスチンが必須の分子であることを同定した。しかしながら、iPS細胞への遺伝子導入によるアメロブラスチンの過剰発現や、リコンビナントアメロブラスチンの添加のみでは、iPS細胞からエナメル芽細胞を誘導することができなかった。そこで、アメロブラスチン以外に分化誘導に必要な分子の同定を試みた。

## 8. ケミカルコンパウンドによる歯髓細胞の分化能制御 (福本)

また単一の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誘導できたが、この細胞において*in vitro*の石灰化誘導能の検討と、未分化状態への誘導過程における包括的な遺伝子発現解析を行った。

## 9. 歯の形態形成機構の解析 (福本)

歯の形態形成機能の解明については、歯の縦幅、横幅の決定機構については、これまで実施してきたNIK/p50遺伝子変異マウスの解析と、歯の大きさ決定機構に関しては、Hippo経路に着目し、歯胚上皮細胞の増殖制御に関する新しい分子メカニズムの同定を試みた。

## 10. 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)

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 $\mu$ g付着させた $\beta$ -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。

### 1.1. 新規ナノゲルの骨再生への応用

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)用の膜を作製した。ラット頭部に直径5mmの骨欠損部を作成し、この骨欠損部を作製したGBR膜で被覆した。その後、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。また、(CHP)-nanogel膜あるいはコラーゲン膜を、ヒトの血清でインキュベートし、インキュベート前と後において、血清中のPDGF量をELISA法を用いて定量した。

ウサギの頭部の皮膚と骨膜を切開剥離し、長方形のチタンメッシュを骨膜下に挿入し、チタンメッシュの一边を2本の小さいチタン製ネジを用いて固定し、骨膜と皮膚を縫合閉鎖した。術後7日後に、固定した辺と反対側のチタンメッシュの中

央部に小径のチタン製ネジを接続し、チタンメッシュを一日約1mmの速度で挙上した。骨膜の挙上後、経時的にウサギを屠殺し、骨膜挙上部を放射線学および組織学的に検討した。

ウサギの頭部の皮膚と骨膜を切開剥離し、骨膜下にシリコンの薄膜を挿入し、その薄膜の下にチタンの薄い板を入れた。さらに、シリコン薄膜の周囲を円形のプラスチックリムとチタンの小径ネジで骨面に固定した。術後7日後に、固定した辺と反対側のチタンメッシュの中央部に小径のチタン製ネジを接続し、チタンメッシュを一日約1mmの速度で挙上した。シリコン膜を挙上後、経時的にウサギを屠殺し、放射線学および組織学的に検討をおこなった。

## C. 研究結果

### 1. 器官原基法による臓器置換型再生歯の開発 (辻)

#### 1) 細胞サイズの探索

イヌ再生歯胚作製のための細胞サイズを探索し、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)

昨年度報告した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技術を応用して、複数本の再生歯からなる多数再生歯ユニットの作製を試みた。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 50~60 日間移植を行った。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複数個の再生歯胚を並列に位置して移植を行った。その結果、複数本の成熟した再生歯が一つの歯槽骨に包含された多数再生歯ユニットの作製が可能であった。この多数再生歯ユニットは、各々が独立した歯の組織構造を有しており、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構造は天然歯と同等であった。

さらに成体マウスの無歯顎モデルに多数歯ユニットを移植したところ、即時咬合が可能な位置に移植が可能であることが示された。これらの結果より、多数再生歯ユニット移植による無歯顎欠損への生着と咬合機能の回復が認められたことから、臨床における重篤な歯科疾患症例に対しても応用可能な歯と歯周組織を包括的に再生しうる歯科再生治療技術となることが示唆された。

(Oshima M *et al.*, *PLoS ONE*, 6(7):e21531, 2011)

### 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、生後 30 日のビーグル犬顎骨から帽状期に該当する第 2、第 3、第 4 小臼歯部の永久歯歯胚の摘出し、器官原基法を用いてこれらの歯胚から再生歯胚を作製する技術を確立した。このイヌ再生歯胚を免疫不全マウスの腎臓皮膜下に移植を行うことにより、経時的に歯胚発生による歯冠硬組織の形成を認め、組織学的にも天然歯胚の発生と同等であることが示された。

さらにイヌ再生歯胚が成体の顎環境下で発生し、口腔内に萌出・機能化するかどうかを明らかにするために、自家歯胚移植モデルを構築した。生後 30 日のビーグル犬から採取した天然歯胚を歯の喪失部位に自家移植を行うことにより、移植 40 日目には顎骨内における歯胚発生が認められ、移植 120 日目には口腔内に移植歯が萌出すること

が示された。同様に、人為的に作製した再生歯胚を用いて自家歯胚移植を行ったところ、マイクロ CT 解析により顎骨内における歯胚発生が認められ、移植 120 日目には口腔内への萌出が明らかとなった。発生した再生歯は、歯根周囲の歯槽骨と歯根膜腔を介して生着していることが示されており、移植して発生・萌出した天然歯と同等の歯の構造を有していることが明らかとなった。さらに口腔内に萌出した再生歯は、脱落等はなく長期間維持されており、日常の食事に耐えうる咬合機能を有していることが示された。

以上の結果より、生後の個体から採取可能な永久歯歯胚を用いて、再生歯胚を作製することが可能であり、成体の口腔内にて発生・萌出し、咬合機能を果たし得ることから、大型動物であるイヌモデルにおける機能的な歯の再生の実現可能性が示された。

### 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

候補遺伝子の歯胚発生過程における機能の解析に向けて、遺伝子導入型歯胚の作製技術の確立を行った。まずアデノウイルス発現系を用いて歯胚に候補遺伝子を導入可能であるかを解析するために、歯胚発生において重要なシグナル経路である BMP シグナルの抑制因子である *Noggin* と *Smad6* をアデノウイルスによって過剰発現させた再生歯胚を作製し、その表現型を解析したところ、*Noggin* を上皮もしくは間葉で過剰発現した再生歯胚はいずれも歯が形成されなかった。また、*Smad6* を上皮に過剰発現させた再生歯胚は、歯胚発生が遅延し、内エナメル上皮の細胞極性に異常が生じた。これらの結果から、前回までに構築した遺伝子機能解析を用いることによって、候補遺伝子の歯胚発生における機能解析ができることが示唆された。

この遺伝子導入型歯胚技術を用いて、候補遺伝子の過剰発現およびノックダウンを行い、歯胚発生に影響を及ぼす遺伝子群の組織形態学的解析



を実施しており、歯胚発生や形態形成制御、ならびに細胞分化の運命決定に関わる遺伝子群の同定を進めている。

#### 5) 歯の数、大きさ、形態の制御機構の解明

ることが判明した。鐘状期臼歯歯胚における p21 の発現部位を解析したところ、細胞増殖が停止する咬合面上皮細胞で発現することから、Gadd45g は p21 による上皮細胞の増殖抑制を介して、歯冠幅の制御に関与している可能性が示された。

さらに Gadd45g は、免疫系細胞などにおいて p38 経路を活性化することが報告されており、歯胚発生において p38 経路が活性化することが報告されているものの、そのメカニズムは解析されていない。臼歯上皮細胞株 emtg2 細胞に Gadd45g を遺伝子導入したところ、p21 や Shh の遺伝子発現が誘導されるとともに、p38 のリン酸化が誘導された。そこで、p38 阻害剤で処理したところ、Gadd45g による p21 の発現上昇が抑制された。これらの結果から、Gadd45g は p38 経路を介して p21 の遺伝子発現を促進し、上皮細胞の増殖を制御することが示唆された。

また、Gadd45g が歯の発生や形態形成に必須の役割を持っているかを解析するため、Gadd45g ノックアウトマウス (Gadd45<sup>-/-</sup>) における歯胚発生について解析した。生後 2 週齢マウスの歯冠完成歯では、大きさや形態に異常は見られないものの、鐘状期の臼歯の大きさが有意に減少することから、Gadd45<sup>-/-</sup> では発生段階の歯の大きさが減少することが判明した。

以上の結果から、Gadd45g は歯胚上皮組織においてエナメルノットの形成に関与する可能性があると共に、p38 MAPK 経路の活性化を介した p21 の発現制御によって、咬頭面の上皮細胞の増殖を抑制し、歯冠幅の決定に寄与している可能性が考えられる。これらのことから、Gadd45g は細胞増殖と遺伝子発現の制御を介して歯胚の発生と形態形成に関与する一因子であることが実証され

再生歯の大きさ、形態の制御機構の解明に向けて、エナメルノット特異的に発現する Gadd45g について着目し、Gadd45g 遺伝子導入による歯冠幅制御に関わる分子機構の解析を行った。Gadd45g は細胞増殖の抑制、細胞の初期分化を制、たと共に、この遺伝子発現解析システムを応用することにより、候補遺伝子による歯の大きさや形態形成への影響を解析可能であることが示された。

#### 6) 実験的再生歯の機能評価

再生歯の形態評価として、小動物用ならびにヒト用マイクロ 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方法を構築した。これらの CT データを画像解析ソフト (Imaris, Carl Zeiss MicroImaging, Germany) を用いることにより、天然歯ならびに再生歯の歯冠幅や大きさ、さらに歯冠の咬頭数や咬頭間距離などの解析が可能となった。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過程における 3 次元的な細胞動態、ならびに歯胚の形態形成を数日間にわたり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、エナメル質や象牙質の硬度 (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が可能である。

#### 2. ヒト由来細胞を利用した再生歯開発への基盤研究 (辻)

8~13 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の皮下、ならびに腎臓皮膜下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。さらに上記組織から Out growth 法により細胞を

取得し、効果的な細胞培養、ならびに継代を行うことが可能となり、歯乳頭細胞からは象牙質が形成され、歯小囊細胞からは歯根膜線維とセメント質が形成されることを明らかとした。このことから、歯の組織再生に利用可能な細胞シーズの取得が可能であることが示された。

### 3. 他家歯胚移植モデルの確立 (窪田)

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4倍量投与下にて、急性炎症反応の軽減を目的とし移植窩洞の前形成を行い、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日齢の胎仔第二小白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にて解析を行ったが、歯胚の発生は認められなかった。

### 4. 自家歯胚移植モデルの確立 (窪田)

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2, 3, 4乳臼歯を抜歯し、顎骨から下顎第2, 3, 4小白歯 (P2, P3, P4)の歯胚を摘出し、二日間の器官培養後、抜歯窩へ自家歯胚移植を行い、歯科用コンビームCTを用い経時的に経過を追った。その結果、移植2ヶ月後には顎骨内にて石灰化している像が観察された。更に、移植4ヶ月後には歯根が成長し、咬頭の一部が歯肉から萌出している像が観察された。しかし、根尖の閉鎖は認められなかった。移植6ヶ月後において、根尖は完全に閉鎖され、歯髓腔が観察され、歯根と歯槽骨の間には歯根膜腔様の一層のX線透過像を認めた。しかし、通常のイヌの小白歯の歯根は2根性であるが、自家歯胚移植によって発生した歯牙はすべて単根性であった。

### 5. 再生歯根膜の機能的評価 (園山)

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多孔性HAを犬顎骨に埋植した。3ヶ月の治療期間の後、HAに歯冠補綴物の維持孔

を形成し、歯冠補綴装置を装着し、負荷をかけたが、装着7日目に脱離した。そこで組織を回収しマイクロCT撮影を行った。その結果、HAに歯冠補綴物の維持孔を形成した際、パーフォレーションしている事が確認された。そのため次のlotでは、移植前に多孔性HAに維持孔を形成し、イヌ顎骨に埋植を行った。3ヶ月後に歯冠補綴物作製のため印象採得を行ったが、維持孔形成による多孔性HAの強度の低下が原因のためかHAの上部が崩壊していた。

挺出方向の矯正力に対して、周囲骨は歯根膜の附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、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、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。しかし、感染、HAの菲薄化による強度的な問題からうまく挺出するには至らなかった。

### 6. 人工歯根に適したチタン表面性状の選定 (in vitro) (園山)

研磨チタン、粗造化チタン、HAチタンのチタン表面を走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察した結果、研磨チタン表面は滑拓な表面構造を呈していたが、粗造化チタンはマイクロ及びマクロな二重凹凸構造を有し、さらにHAチタンはその凹凸構造の周囲に微小な凹凸構造が観察された。次に、それぞれのチタン表面に細胞を播種し、細胞播種1日後に、それぞれのチタン表面上に付着した細胞の形態をSEMにて観察したところ、すべてのチタン表面で、細胞が伸展している像が観察された。また細胞播種7日後には、研磨チタン群において、単層に細胞が増殖している像が観察される一方、粗造化チタン、HAチタン群において、細胞が層状に重なり合うように増殖し、それぞれの細胞が多数の突起を出し、チタン表面に接着している像が観察された。最後に、これらの細胞からRNAを回収し、石灰化のマーカーであるオステオポンチンの遺伝子

発現を定量性RT-PCR法にて確認した結果、研磨チタンと比べ粗造化チタンで約3.5倍、HAチタンで約7.5倍その発現量は促進された。

## 7. iPS細胞から歯牙関連細胞への分化能の解析 (福本)

iPS細胞からエナメル上皮への誘導においては、マウス iPS細胞と、ラット由来の歯原性上皮細胞との共培養により、アメロブラスチン陽性の歯原性上皮細胞誘導に成功した。この過程において、分化誘導に使用するラット由来の歯原性上皮細胞は、アメロブラスチン高発現細胞が有効であり、低発現細胞株ではその分化誘導能が低いことが明らかとなり、アメロブラスチンが、エナメル芽細胞分化誘導に必須の分子であることが示唆された。しかしながら、マウス iPS細胞にアメロブラスチン遺伝子を過剰発現させたり、あるいは培養液中にリコンビナントアメロブラスチンを添加しても、エナメル芽細胞分化を誘導することができないことから、アメロブラスチン以外に第2、3の因子が必要であることが予想された。そこで、我々は、マウス iPS細胞と、ラット由来の歯原性上皮細胞との共培養ではなく、iPS細胞にラット由来歯原性上皮細胞の培養上清を添加することで、エナメル芽細胞に分化誘導するシステムを開発し、この実験系において、エナメル芽細胞分化誘導に必要な因子同定を試みた。この過程において、エナメル芽細胞分化には、アメロブラスチン以外に、神経成長因子 NT-4 および BMP が必要であることを見いだした。

## 8. ケミカルコンパウンドによる歯髄細胞の分化能制御 (福本)

ケミカルコンパウンドによる歯髄さいぼうから、歯髄幹細胞への分化誘導研究については、コンパウンド添加群と非添加群における *in vitro* の石灰化能について Von Kossa 染色を用いて評価した。コンパウンド添加群では、添加後2日で Oct4 陽性の幹細胞へと未分化誘導され、コンパウンド除去

により骨誘導培地に置換せずとも、Von Kossa 陽性の石灰化物を認めた。また BMP2 による骨誘導過程において、コンパウンド非添加群に Von Kossa 陽性の石灰化物を認めたが、コンパウンドによる前処理群においては、非添加群と比較して 10 倍以上の石灰化を認めた。包括的な遺伝子解析から、コンパウンド処理細胞は、Smad7 の発現が亢進し、BMP 受容体の発現が減少していた。このことは、コンパウンドが存在する状態では、未分化状態を維持する為に、BMP などの刺激による分化誘導を抑制している可能性が示唆された。

歯冠の形態形成機構については、外胚葉異形成症モデルとして、NIK/p50 遺伝子変異マウスをもちいた。本マウスは、歯の縦幅は変化しないが、横幅減少することを見だし、それが *shh* の歯胚での発現局在の異常によって生じることを明らかにしていた。しかしながら、*shh* の発現がどのようにして阻害されるか不明であった。我々は包括的な遺伝子スクリーニングから、*shh* の発現制御に Wnt ファミリー分子が関わっていることを発見した。そこで歯胚に発現する Wnt ファミリー分子を検討した結果、歯胚上皮細胞では Wnt7b が非常に強く発現しており、他の Wnt 分子の発現は少なかった。そこで、Wnt7b による *shh* の発現制御機構を検討した結果、Wnt7b が外胚葉異形成症の原因分子である EDA による *shh* の発現誘導を負に制御していることを発見した。

## 9. 歯の形態形成機構の解析 (福本)

歯の大きさ制御に関しては、組織特異的な増殖制御が行なわれていることを考えた。そこで、四肢や臓器の大きさ形成に関わる Hippo 関連分子の中でも、Mst1、Mst2 およびその下流分子の Yap について検討を行った。Mst1、Mst2 は歯胚上皮に発現し、この両者の遺伝子発現抑制を行なうと、歯原性上皮細胞において細胞増殖を促進することが分かった。またその下流分子の Yap は、細胞増殖が盛んなときは、細胞質内に局在し、細胞増殖が停止すると核内に移動した。このことから歯胚

の大きさ制御（特に歯を大きくする）の為に、Mst1およびMst2の発現抑制によりコントロールできる可能性が示唆された。

#### 10. 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）

培養したイヌ口腔粘膜線維芽細胞へレトロウイルスベクターを用いて GFP 遺伝子を導入したところ、約 90%の細胞で GFP を発現していることが確認できた。また、移植前のイヌ口腔粘膜線維芽細胞と BMP-2/ゼラチンハイドロゲル複合体でも多くの GFP 陽性細胞が確認できた。

GFP 遺伝子を導入した口腔粘膜線維芽細胞を種々の濃度の rhBMP-2 で3日間培養すると、500ng/ml 添加で有意に ALP 活性が上昇した。さらに同様な条件で6日間培養すると、rhBMP2の濃度依存的に ALP 陽性細胞が増加した。また BMP-2 (500 ng/ml)を添加して培養したイヌ口腔粘膜線維芽細胞では、BMP-2 非添加の場合に比べて骨芽細胞分化マーカーである *Osteocalcin*, *Runx2*, *Osterix* の mRNA の発現が有意に上昇した。

イヌの口腔粘膜線維芽細胞を BMP-2 と共に移植すると、形成された骨組織の周囲に GFP 陽性細胞が散見され、その一部は ALP 陽性の骨芽細胞様細胞に分化していた。BMP-2 の移植により誘導された異所性骨形成部の細胞を計測すると、GFP 陽性細胞の約 17.1%が ALP 陽性であった。

*In vitro* の実験より、イヌ口腔粘膜線維芽細胞は BMP-2 の作用により、骨芽細胞へ分化できることが示唆された。さらに *in vivo* の実験では、BMP-2 添加群で誘導された異所性骨組織において、ALP 陽性/GFP 陽性細胞が確認された。この結果は、移植したイヌ口腔粘膜線維芽細胞は生体内でも ALP 陽性の骨芽細胞様細胞に分化できることを示している。しかし、骨梁表面に ALP 陽性/GFP 陽性細胞は認められず、ALP 陽性/GFP 陽性細胞は骨梁表面から離れた部位に存在していた。これらの結果より、移植した口腔粘膜

線維芽細胞は ALP 陽性の骨芽細胞前駆細胞または前骨芽細胞に分化することが可能であるが、成熟した骨表面の骨芽細胞へは分化できないことが示唆された。(Anat Rec: in press)

また、レトロウイルスを用いて human BMP-2 遺伝子を導入したイヌ口腔粘膜線維芽細胞は BMP-2 遺伝子非導入群に比べて有意に *Osteocalcin*, *Runx2* mRNA や ALP 活性を上昇させたので、現在、これらの細胞の移植実験を行っている。

#### 11. 新規ナノゲルの骨再生への応用（春日井）

(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は著しく促進されており、4週後において骨欠損部は骨に満たされていた。また、コラーゲン膜に比較して、これら二つの GBR 膜の下に形成された新生骨は、均一な構造をした成熟した骨であり、骨欠損部周囲の既存骨と構造的差異が見られなかった。

(CHP)-nanogel 膜あるいはコラーゲン膜を、ヒトの血清中でインキュベートし、インキュベート前と後において、血清中の PDGF 量を測定した。この実験において、(CHP)-nanogel を血清中でインキュベートした場合には、血清中の PDGF 量が著しく減少したが、コラーゲン膜を血清中でインキュベートした場合には血清中の PDGF 量が減少しなかった。

骨膜下に外科的にチタンメッシュを挿入し、このチタンメッシュを徐々に挙上する骨膜挙上法によって、チタンメッシュの下に骨が形成された。我々が考案した装置は、チタンメッシュ板の一方がスクリューで固定されており、その固定部から遠い部位が回転して挙上する構造になっている。したがって、一定のスピードでネジを回転させることで、チタンメッシュは斜めに挙上される。チタンメッシュの各部位において、チタンメッシュを骨に固定したネジからの距離が異なることに



よって、異なるスピードで骨膜が挙上される。組織学的解析結果から、一日約 0.35mm のスピードで骨膜を挙上すると骨形成が効率良く起きるが、それ以上のスピードでの挙上ではチタンメッシュの下に軟組織の占める割合が増加することが明らかになった。

骨膜挙上に使用した装置に改良を加えて、チタンメッシュをシリコンの薄膜で覆い、そのシリコン膜の周囲をプラスチックのリムで骨面に固定し、チタンメッシュを徐々に挙上した。すると、骨膜挙上法に比較して、垂直的な骨形成がさらに促進されることが明らかとなった。

#### 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、再生歯ユニットならびに多数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、2009 年に報告した再生歯胚移植と共に生理的機能を有する臓器置換型再生歯による歯科再生治療のコンセプトが示された。また大型動物であるイヌモデルにおいても、再生歯胚の作製技術の開発、ならびに成体口腔内における機能的な再生歯の発生・萌出が実証された。イヌモデルによる再生歯においては、生後の永久歯歯胚から取得した細胞を用いて作製されたものであり、ヒトにおける第3大臼歯の応用も視野に入れた前臨床研究としてのエビデンスを創出するものである。今後は、再生歯胚を作製可能なヒト細胞シーズの探索や実用化検討を進めることにより、歯の再生医療の実現可能性が拓かれるものと考えられる。

##### 2. 他家歯胚移植モデルの確立

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。この原因としてやはり、免疫抑制の問題が考えられる。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

る濃度であるため、免疫抑制剤の濃度を振って移植実験を再度行なったが、歯胚発生は認められなかった。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ることが推測され、歯胚の他家移植モデルは困難である可能性が示唆された。

##### 3. 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結果、歯胚の発生が認められ、移植6ヶ月後には根尖も閉鎖し、完全に歯冠が萌出している像が観察された。しかし、通常、イヌの小臼歯は2根性であるが、移植歯胚はすべて単根性を示した。歯胚は器官培養2日後に乳臼歯の抜歯窩に移植しており、移植窩内の骨再生が歯胚発生スピードより早く、移植歯胚の発生スペースが確保できなかったため、単根性に発生した可能性が考えられる。

現在、発生した歯牙に機能性を有した歯根膜組織が形成されているかを検討するため、歯科矯正力をかけ歯根周囲の骨吸収と添加による歯の移動が起きるか確認するための準備を行なっている。また、発生した歯牙の歯髓組織が正常に発生し、中枢ヘシグナルが伝達されているかを確認するため、歯髓神経を電気刺激後、三叉神経脊髄路核を摘出し、c-Fosの発現を免疫組織化学染色にて確認する予定である。

##### 4. 再生歯根膜の機能的評価

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、強度の問題を解決するため既製のチタンインプラントの表面性状の選定を実験(2)で行なった。

##### 5. 人工歯根に適したチタン表面性状の選定 (*in vitro*)

粗造化したチタン表面で歯髄幹細胞を培養することで、細胞は三次元的な立体構造を持ちつつ増殖し、かつ象牙芽細胞分化に関連するマーカーの発現が促進されることを確認した。さらに、粗造化したチタン表面にHAを析出させることで、遺伝子発現レベルから見た歯髄幹細胞の分化が促進されていた。

## 6. iPS細胞から歯牙関連細胞への分化能の解析

これまで、人工的な歯胚の作成するためには、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、全身のどここの細胞からも歯を作る細胞を作製できる可能性が示された。特に口腔領域においては、乳歯などの歯髄や治癒の早い口腔粘膜を利用することで、侵襲の少ない細胞採取が行なえ、かつ胎児を使用する倫理的な問題を回避できたと考えられる。

## 7. ケミカルコンパウンドによる歯髄細胞の分化能制御

ケミカルコンパウンドを用いた組織幹細胞誘導に関しては、これまで困難であった幹細胞の大量調整と、未分化維持の為の分子機能解析に有用なモデルであることが示された。次に疾患モデルを利用した歯の形態形成メカニズムの解明においては、歯の横幅を決定する分子メカニズムの詳細が明らかとなり、これらの情報を応用することで、歯の欠損部分の大きさに適した形態を有する歯の再生に応用可能となるかもしれない。また、疾患発症の分子機能が明らかになることで、歯の再生のみならず、疾患の診断や直接治療に応用できる可能性が生まれたと言える。

## 8. 歯の形態形成機構の解析

歯の大きさの決定機構に関しては、これまで遺伝子導入や遺伝子欠損マウスの解析から、ほとんどのケースで歯の大きさが小さくなり、実際の再生医療には直接応用しにくい情報でしかなかった

が、今回我々が着目したHippo分子は、組織が大きくなるのを負に制御する分子であり、これらの遺伝子発現を抑制することで、大きな歯胚を形成することが可能となる。これまで歯の再生技術の中で課題であった、大型動物への応用を考えた際、歯胚を如何に短期間で大きくするかが重要であったが、Hippo経路の中でもMst1およびMst2の発現抑制法は、この問題を解決できる新しい知見と言える。

## 9. 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

*In vitro*の実験より、イヌ口腔粘膜線維芽細胞はBMP-2の作用により、骨芽細胞へ分化できることが示唆された。さらに*in vivo*の実験では、BMP-2添加群で誘導された異所性骨組織において、ALP陽性/GFP陽性細胞が確認された。この結果は、移植したイヌ口腔粘膜線維芽細胞は生体内でもALP陽性の骨芽細胞様細胞に分化できることを示している。しかし、骨梁表面にALP陽性/GFP陽性細胞は認められず、ALP陽性/GFP陽性細胞は骨梁表面から離れた部位に存在していた。これらの結果より、移植した口腔粘膜線維芽細胞はALP陽性の骨芽細胞前駆細胞または前骨芽細胞に分化することが可能であるが、成熟した骨表面の骨芽細胞へは分化できないことが示唆された。

我々は、BMP-2を過剰発現するGFPトランスジェニックマウス由来皮膚線維芽細胞は自ら骨形成を誘導し、細胞移植による骨再生療法に有効であることを既に報告した。この場合は、移植した皮膚線維芽細胞にBMP-2遺伝子を導入していたが、本研究ではイヌ口腔粘膜線維芽細胞が外因性のBMP-2に応答して骨芽細胞様細胞に分化できるかを明確にするために、BMP-2遺伝子を導入していない細胞を用いた。その結果、口腔粘膜線維芽細胞が外因性のBMP-2に応答して骨芽細胞様細胞に分化したが、成熟骨芽細胞へは分化できなかった。そのため、口腔粘膜線維芽細胞を骨

再生能を有する成熟骨芽細胞へ効率的に誘導するためには *BMP-2* 遺伝子の導入が必要であることが示唆された。現在、*BMP* 遺伝子を過剰発現したイヌ口腔粘膜線維芽細胞の移植実験を行っており、この実験により、より明確な結論に得られるであろう。

## 10. 新規ナノゲルの骨再生への応用

本研究において開発した2種類のGBR膜は、*BMP* や *FGF* 等のシグナル分子を含ませて、組織再生部位へ適用するのに適した材料であると考えている。今後は、開発した2つのGBR膜と、*BMP* あるいは *FGF* 等のシグナル分子を組み合わせ、本実験で用いた骨欠損モデルを用いて、骨再生に対する効果を検討する予定である。

様々な骨造成法が臨床でおこなわれているが、現在垂直的な骨造成は極めて困難である。古典的な方法であるが、現在においても有効な手法として、自家骨のオンレー移植がおこなわれている。しかし、採取骨量に限度があることと、骨採取部の炎症が避けられないことが大きな問題である。

組織再生には、その組織を構成する細胞に分化可能な「前駆細胞」あるいは「幹細胞」と、細胞の増殖あるいはまた分化を調節する「シグナル分子」、さらに細胞が接着して、その細胞の増殖と分化を支持する「足場」材料の3要素が必要であると考えられている。そして、これらの3つの要素の全て、あるいは一部を組み合わせ、組織欠損部に適用する組織工学的手法が近年注目を集めている。

臨床上的問題点の解決策として、我々は骨膜挙上法を考案した。骨膜挙上装置は最近他の研究グループによっても報告されているが、我々が考案した骨膜挙上装置は、装置が簡便であり、容易に骨膜下に挿入可能な点において優れている。また、チタンメッシュの代わりに、生体内で分解する *PLGA* を主材料とするメッシュを使用して、同様に骨造成が可能であることを確認している。そのような生体内で分解する材料を使用すれば、骨造成

後に材料の摘出手術をおこなう必要が無くなるので、侵襲性を減らすことが可能となる。口腔内で使用するためには、更に装置を改良する必要があるが、この手法を応用することで、臨床現場において垂直的骨造成が容易になることが期待できる。

骨膜挙上法において、骨の形成が最も効率良く起きる挙上スピードは一日約0.35mmであることが明らかになった。仮骨延長法においては、一日約1mmの速度で骨端を離して骨が形成されることが報告されている。骨膜挙上法においては、新生骨を形成する細胞は骨面から供給されており、既存骨の表面から骨が形成されること、またチタンメッシュで挙上した骨膜組織そして骨膜の細胞は新生骨の形成に関与していない可能性が、組織学的観察から推測された。

そこで、骨膜の骨形成への関与を全く排除するために、骨膜下にシリコンの薄膜を置き、その下にチタン板を層状に置いて、チタン板を挙上することでシリコン薄膜を挙上して、膜の下に骨再生のためのスペースを徐々に作る *Expansible GBR* (*E-GBR*) を考案した。我々が予想したように、骨膜挙上法に比較して *E-GBR* 法を用いると、極めて効率良く垂直的に骨を造成できることが明らかになった。口腔内に応用するためには、装置の改良が必要であるが、将来 *E-GBR* を臨床応用することで、垂直的骨造成を容易におこなえる可能性は高い。

骨膜挙上法あるいは *E-GBR* においては、骨だけでなく、軟組織（粘膜、皮膚、骨膜）も造成できる点は、大きな利点である。これら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適していると考えている。

## E. 結論

- 1) 小型動物モデルにおいて、完成歯の構造体である再生歯ユニットを移植することにより、歯の喪失に対する歯・歯周組織の包括的再生が可能であることが示された。さらには、大型動物

における臓器置換型再生歯の実現可能性のエビデンスが得られたと共に、今後の歯の喪失に対する再生医療への応用が期待される。

- 2) 様々な免疫抑制剤を用い他家歯胚移植モデルの確立を試みたが、骨髄内の免疫反応のコントロールが難しく、なかなかうまくいかない。一方、自家歯胚移植モデルにおいて、発生した歯牙が単根性であり二根性の天然歯とは違いはあるが、イヌ歯胚移植モデルの確立に成功したといっても過言ではない。
- 3) ビーグル成犬抜去歯から採取した歯髄細胞が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。今後、ポーラスの構造、気孔率を再度検討する必要がある。また、チタンの粗造化とその表面へのハイドロキシアパタイトの析出は、歯髄幹細胞による象牙質基質形成に適した表面改質法である可能性が示唆された。
- 4) 本研究の成果から、iPS 細胞からエナメル芽細胞の作成が行なえるようになり、また分化した歯髄細胞から、歯髄幹細胞を大量調整することが可能となった。また、歯の形態形成に関しては、歯の横幅を決めるメカニズムが判明し、さらに歯胚の大きさをコントロールする為の候補分子の同定に成功した。
- 5) ビーグル成犬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。本結果により、口腔粘膜由来線維芽細胞が骨再生の細胞移植療法に有用である可能性を示した。
- 6) E-GBR に使用する膜としてシリコン膜の代わりに、本研究で我々が開発した (CHP)-nanogel 膜や架橋ゼラチン膜を使用することで、さらに効率良く骨を造成できる可能性を示した。
- 7) 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. Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Kasugai S, Saito M, **Tsuji T**. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE*, 6:e21531, 2011.
2. Saito M, Kurokawa M, Oda M, Oshima M, Tsutsui K, Kosaka K, Nakao K, Ogawa M, Manabe, Suda N, Ganjargal G, Hada Y, Noguchi T, Teranaka T, Sekiguchi K, Yoneda T, **Tsuji T**. ADAMTSL6& $\beta$  rescues fibrillin-1 microfibril disorder in Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. *J Biol Chem* 286,38602-38613, 2011.
3. Saito M, **Tsuji T**. Extracellular matrix administration as a potential therapeutic strategy for periodontal ligament regeneration. *Expert Opin Biol Ther*, 12: 299-309, 2012.
4. Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Maruhama K, Yamamoto Y, Neubert JK, Noland TA, Watanabe K, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, **Kuboki T**, Oguma K. Intradermal injection of botulinum toxin type A alleviates infraorbital nerve constriction-induced thermal hyperalgesia in an operant assay. *J Oral Rehabil* 39:63-72, 2012.
5. Hirata I, Yoshida Y, Nagaoka N, Hiasa K, Abe Y, Maekawa K, **Kuboki T**, Akagawa Y, Suzuki K, Meerbeek BV, Messersmith PB, Okazaki M. Real time assessment of surface interactions with a



- titanium passivation layer by surface plasmon resonance. *Acta Biomater* 8:1260-1266, 2012.
6. 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* 16:101-108, 2012.
  7. Kumada A, Matsuka Y, Mine A, Ono M, Uehara J, Sonoi N, Ito T, Takashiba S, **Kuboki T**. Influence of resin coating materials on porphyromonas gingivalis attachment. *Dent Mater J* 31:86-91, 2012.
  8. Kimura A, Arakawa H, Noda K, Yamazaki S, Hara E, Mino T, Matsuka Y, Mulligan R, **Kuboki T**. Response shift in oral health-related quality of life measurement in patients with partial edentulism. *J Oral Rehabil* 39:44-54, 2012.
  9. Takahashi N, Kikutani T, Tamura F, Groher M, **Kuboki T**. Videoendoscopic assessment of swallowing function to predict the future incidence of pneumonia of the elderly. *J Oral Rehabil* (in press)
  10. Minakuchi H, Hara ES, Sakaguchi C, Maekawa K, Matsuka Y, Clark GT, **Kuboki T**. Multiple night data collected using a self-contained EMG detector/analyzer system in asymptomatic healthy subjects. *J Sleep Breathing* (in press).
  11. Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, **Fukumoto S**. I: Role of epithelial-stem cell interaction during dental cell differentiation. *J Biol Chem.* 287:10590-10601, 2012.
  12. Otsu K, Kishigami R, Oikawa-Sasaki A, **Fukumoto S**, Yamada A, Fujiwara N, Ishizeki K, Harada H.: Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. *Stem Cells Dev.* 21:1156-1164,2012.
  13. Kamasaki Y, Nakamura T, Yoshizaki K, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Maruya Y, Iwabuchi K, Furukawa K, Fujiwara T, **Fukumoto S**.: Glycosphingolipids regulate ameloblastin expression in dental epithelial cells. *J Dent Res.* 91:78-83,2012.
  14. Yamada A, Iwamoto T, Fukumoto E, Arakaki M, Miyamoto R, Sugawara Y, Komatsu H, Nakamura T, **Fukumoto S**.: Epithelial-mesenchymal interaction reduces inhibitory effects of fluoride on proliferation and enamel matrix expression in dental epithelial cells. *Ped Dent J.* 22:55-63,2012
  15. Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, **Fukumoto S**, Yamada Y.: Pannexin3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol.* 193:1257-1274,2011
  16. 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
  17. Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Tamamura S, Komori T, **Yamaguchi A**: Comparative morphology of osteocytes in aquatic and land vertebrates. *J Bone Miner Metab* 29:662-670, 2011
  18. Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, **Yamaguchi A**, Miyazawa K, Miyazono K, Saitoh M: TGF- $\beta$  drives epithelial-mesenchymal transition through  $\delta$ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2011.493.
  19. Himeno-Ando A, Izumi Y, **Yamaguchi A**, Iimura T: Structural differences in the osteocyte network between the calvaria and long bone revealed by three-dimensional fluorescence morphometry,

- possibly reflecting distinct mechano-adaptations and sensitivities. *Biochem Bioph Res Commun* 417:765-770,2011
20. Sakamoto K, Fujii T, Kawachi H, Miki Y, Omura K, Morita K, Kayamori K, Khanom R, Katsube K, **Yamaguchi A**: Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms. *Lob Invest* 92:688-702:2012
  21. Khanom R, Sakamoto K, Pal SK, Shimada Y, Morita K-i, Omura K, Miki Y, **Yamaguchi A**: Expression of basal cell keratin 15 and keratin 19 in oral squamous cell carcinoma represent diverse pathophysiologies. *Histol Histopathol* (in press)
  22. Umehara K, Iimura T, Sakamoto K, Lin Z, **Kasugai S**, Igarashi Y, **Yamaguchi A**: Canine oral mucosal fibroblasts differentiate into osteoblastic cells in response to BMP-2. *Anat Rec* (in press)
  23. Aizawa R, Yamada A, Suzuki D, Iimura T, Kassai H, Harada T, Tsukasaki M, Yamamoto G, Tachikawa T, Nakao K, Yamamoto M, **Yamaguchi A**, Aiba A, Kamijo R: Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development. *Mech Dev* (in press)
  24. Michikawa C, Uzawa N, Kayamori K, Sonoda I, Ohya Y, Okada N, **Yamaguchi A**, Amagasa T: Clinical significance of lymphatic and blood vessel invasion in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 48:320-324,2012
  25. Sakamoto K, Khanom R, Hamagaki M, **Yamaguchi A**: Ectopic production of hair keratin constitutes Rushton's hyaline bodies in association with hematogenous deposits. *J Oral Pathol Med* (in press)
  26. Miyahara T, Nyan M, Shimoda A, Yamamoto Y, Kuroda S, Shiota M, Akiyoshi K, **Kasugai S**: Exploitation of a novel polysaccharide nanogel cross-linking membrane for guided bone regeneration (GBR). *J Tissue Engineering Regener Med* (in press)
  27. Zakaria O, Kon K, **Kasugai S**: Evaluation of a biodegradable novel periosteal distractor. *J Biomed Mater Res Part B - Applied Biomaterials* (in press)
  28. Rungsiyanont S, Dhanesuan N, Swadison 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. *J Biomater Appl* (in press)
  29. Zakaria O, Madi M, **Kasugai S**: Induced osteogenesis using a new periosteal distractor. *J Oral Maxillofac Surg* 70:e225-34, 2012
  30. Date Y, Yokoyama Y, Kondo H, Kuroda S, Ohya K, Ota MS, Iseki S, **Kasugai S**: Restricted expression of chromatin remodeling associated factor Chd3 during tooth root development. *J Periodont Res* 47:180-7, 2012
  31. Nyan M, Tsutsumi Y, Oya K, Doi H, Momura N, **Kasugai S**, Hanawa T: Synthesis of novel oxide layers on titanium by combination of sputter deposition and micro-arc oxidation techniques. *Dent Mater J* 30:754-61, 2011
  32. Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Takano-Yamamoto T, **Kasugai S**, Saito M, Tsuji T: Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE*. 6:e21531, 2011
  33. Bakry AS, Tamura Y, Otsuki M, **Kasugai S**, Ohya K, Tagami J: Cytotoxicity of 45S5 bioglass paste used for dentine hypersensitivity treatment. *J Dent* 39:599-603, 2011
  34. Rojbani H, Nyan M, Ohya K, **Kasugai S**: Evaluation of the osteoconductivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and

- hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res: Part B - Applied Biomaterials* 98:488-98, 2011
35. 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* 22:1489-99, 2011
36. Hudieb MI, Wakabayashi N, **Kasugai S**. Magnitude and direction of mechanical stress at the osseointegrated interface of the microthread implant. *J Periodontol* 82:1061-70, 2011
37. 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. *J Oral Rehabil* 38:525-32, 2011
38. Rodriguez R, Kondo H, Nyan M, Hao J, Miyahara T, Ohya K, **Kasugai S**. Implantation of green tea catechin  $\alpha$ -tricalcium phosphate combination enhances bone repair in rat skull defects. *J Biomed Mater Res: Part B 98B-Applied Biomaterials*: 263-71, 2011
39. Noritake K, Kuroda S, Nyan M, Ohya K, Tabata Y, **Kasugai S**. Development of a new barrier membrane for guided bone regeneration: an in vitro and in vivo study. *J Oral Tissue Engineering* 9:53-63, 2011
40. Hudieb M, **Kasugai S**. Biomechanical effect of crestal bone osteoplasty before implant placement: a three-dimensional finite element analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40:200-6, 2011
- 著書
1. 春日井昇平、藤森達也. ミューワンHAインプラントシステム. インプラントYEAR BOOK 2001 g(クインテッセンス編)、クインテッセンス出版株式会社、pp269-276, 2011
- 総説
1. 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
2. Iimura T, Nakane A, Sugiyama M, Sato H, Makino Y, Watanabe T, Takagi Y, Numano R, **Yamaguchi A**: A fluorescence spotlight on the clockwork development and metabolism of bone. *J Bone Miner Metab.* 2011 Jul 16. [Epub ahead of print]
3. 齋藤正寛、**辻孝**: <総説>蘇る臓器,再生医療の実現化への挑戦、科学フォーラム2011年6月号(東京理科大学)、28(6)、34-35、2011.
4. 大島正充、齋藤正寛、**辻孝**: <総説>次世代の歯科治療システムとしての歯科再生治療～組織修復再生治療と臓器置換再生治療としての歯の再生～、日本歯科医師会雑誌、64(5)、23-34、2011年8月10日
5. 大島正充、**辻孝**: <総説>次世代の歯科再生治療の実現に向けて、歯界展望(医歯薬出版株式会社)、118(5)、774-778、2011.
6. 大島正充、**辻孝**: <総説>歯の再生治療の実現に向けて、臨床麻酔(真興交易(株)医書出版部)、35(11)、1623-1632、2011.
7. 齋藤正寛、**辻孝**: <総説>マルファン症候群における歯根膜治癒不全の回復機構、CLINICAL CALCIUM(医薬ジャーナル社)、22(1)、35-42、2012.
8. 大島正充、**辻孝**: <総説>歯の再生治療から臓器置換再生医療の実現へ、日本歯科評論(ヒョーロンパブリッシングズ)、72(1)、9-11、2012.
9. 蘇志鵬, 李勝揚, **辻孝**, 認識有關「牙齒再生」之幹細胞發展的基本專有名詞, *Journal of Taiwan Orthodontic Society August 2011*, 3(4), 73-80, 2011.
10. 飯村忠浩、中根綾子、姫野彰子、杉山真由、**山口 朗**: 骨の形態的解析法の進歩; 骨の In vivo 蛍光イメージングの現状と展望. *骨形態計測学会雑誌* 21:17-24,2011
11. 中根綾子、沼野利佳、佐藤博己、高木裕三、**山口 朗**、飯村忠浩: 骨の成長と代謝における概日リズムの働きー蛍光イメージングによるアプローチと展望-. *骨形態計測学会雑誌*

21:41-50,2011

12. 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
13. 飯村忠浩、杉山真由、牧野佑司、中野綾子、山口 朗: 脊椎動物の発生におけるライブイメージング、*Cytometry Research* 21:57-63,2011
14. 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

## 2. 学会発表

### 招待講演 (国際)

1. Masahiro Saito and **Takashi Tsuji**, The forefront of regeneration therapy for periodontal ligament, ISBB Taipei Workshop, Taipei, Taiwan, July 8, 2011.
2. **Takashi Tsuji**, Tooth Regenerative Therapy as a Future Organ Replacement Regenerative Therapy, Taiwan Orthodontic Society 2011 Annual Session, Taipei, Taiwan, August 13, 2011.
3. **Takashi Tsuji**, Fully Functional Bioengineered Tooth Replacement as a Future Tooth Regenerative Therapy, Program for 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 広島・広島国際会議場, October 9, 2011.
4. **Kuboki T.** Biological regenerative medicine in prosthodontic practice - to attain reliable and sophisticated dental implant therapy -. CPS-JPS-KAP Joint meeting. Shanghai, China. 発表日 2011.10.28.
5. **Yamaguchi A:** Molecular mechanism of bone destruction by oral squamous cells carcinoma, The First international Oral Pathology Update Symposium, Taipei, 2011, Mar 27
6. **Yamaguchi A:** Histopathological characteristics of bisphosphonate-related osteomyelitis (osteonecrosis) of jaw. Keynote Lecture. 5<sup>th</sup> Meeting of Asian Society of Oral and Maxillofacial Pathology. Fukuoka, August 24, 2011

7. **Yamaguchi A:** Role of BMP, Notch, and CCN3 in osteoblast differentiation and bone regeneration. Lecture. International Summer Program 2011, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, August 30, 2011
8. **Yamaguchi A:** Bone destruction by oral cancer, The 6<sup>th</sup> Global COE international Symposium at TMDU, 2012 Jan. 22 (Tokyo)
9. **Kasugai S.** Keys for bone augmentation. Tri-University Consortium on Oral Science and Education 2011.8.4-5 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
10. **Kasugai S.** Key for bone augmentation: Making regenerative space and encouraging endogenous key players. International Society of Blood-derived Biomaterials (ISBB) Taipei Workshop 2011.7.7-8 Yang-Ming University, Taipei, Taiwan
11. **Kasugai S.** Bone augmentation in dental implant treatment: What is really required for bone augmentation? Korean Academy of Periodontology 2011.5.21 Kyongpook National University, Daegu, Korea

### 招待講演 (国内)

1. **辻 孝**、未来の歯科治療としての歯科再生医療研究の現状と展望、鶴見大学歯学部口腔病理学講座セミナー、神奈川・鶴見大学、2011年5月24日
2. **辻 孝**、未来の歯科治療としての歯科再生医療研究の現状と将来展望、長田中央研究所講演、東京・長田中央研究所、2011年6月2日
3. **辻 孝**、未来の歯科治療としての歯の再生、九州大学創立百周年記念講演会、福岡・九州大学、2011年7月23日
4. 齋藤正寛, **辻 孝**、失った臓器を元に戻せ! ~歯の再生医療の衝撃~、キラメキトキメキサイエンス、千葉・東京理科大学 野田キャンパス、2011年8月8日
5. **辻 孝**、未来の歯科治療としての歯科再生医