

- 療、日本学術会議歯学委員会シンポジウム、愛知・名古屋国際会議場、2011年10月18日
6. 辻 孝、未来の歯科治療としての歯科再生医療、新潟県歯科医学大会講演、新潟・新潟県歯科医師会館、2011年10月30日
 7. 辻 孝、器官原基再生からアプローチした機能的な器官再生、京都大学再生医科学研究所平成23年度学術講演会、京都・芝蘭会館稲森ホール、2011年12月26日
 8. 辻 孝、次世代再生医療としての機能的な器官再生、こうよう会近畿地域行事講演会、大阪大阪第一ホテル、2012年1月22日
 9. 辻 孝、歯の発生における細胞のダイナミクスと歯の再生、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨・山梨大学甲府キャンパス、2012年3月26日
 10. 窪木拓男、生物学的配慮と臨床事実に基づいた口腔リハビリテーション医学を構築するために—臨床疫学，バイオメカニクス，そしてバイロロジーへ—、新潟大学歯学部大学院セミナー、新潟、日本、発表日 2012.03.16.
 11. 福本敏、歯の形態形成を制御する細胞外環境のダイナミズム—歯原性上皮の分化における細胞外マトリックスの機能的役割（シンポジウム）、第53回歯科基礎医学会総会、岐阜、2011年9月
 12. 山口 朗：ビスホスホネート関連顎骨壊死（骨髄炎）、（シンポジウム：難治性骨髄炎の治療戦略）、第65回日本口腔科学会学術集会、2011年4月14日（東京）
 13. 山口 朗：骨再生の分子基盤（シンポジウム：骨の再生医療）、第65回日本口腔科学会学術集会、2011年4月15日（東京）
 14. 山口 朗：ビスホスホネート関連顎骨壊死（骨髄炎）の病理学的所見、シンポジウム、第31回日本骨形態計測学会、2011年5月20日（岐阜）
 15. 山口 朗：血管石灰化と骨・軟骨関連因子、シンポジウム：CDKにおける異所性石灰化：基礎と臨床、第56回日本透析医学会学術総会、2011年6月18日（横浜）
 16. 山口 朗：口腔癌による骨破壊の分子メカニズム、口腔三学会合同シンポジウム、第56回日本口腔外科学会総会、2011年10月22日（大阪）
 17. 山口 朗：口腔癌の骨破壊、第30回日本口腔腫瘍学会、教育講演、2012年1月27日（大宮）
 18. 山口 朗：オステオネットワークの維持と破壊：顎骨疾患の病態解明と新たな治療法の開発を目指して、第30回北海道医療大学歯学会、特別講演、2012年3月3日（札幌）
 19. 山口 朗：顎骨壊死の病態の最新知見、第10回日本歯科骨粗鬆症研究会、シンポジウム「ビスホスホネート製剤の長期治療による光と影—顎骨壊死は回避できるのか—」2012年3月18日（大阪）
 20. 春日井昇平、ミューワンHAインプラント：簡便で良好な予後、Implant CAD/CAM Meeting 2011.11.12 横浜パシフィコ、横浜
 21. 春日井昇平、歯科インプラント治療と再生医療の関わり、日本先端歯科研究所講演会 2011.9.10 日本先端歯科研究所、東京
 22. 春日井昇平、成功するインプラント治療：診査・診断・治療計画の重要性、東京都歯科医師会生涯研修 2011.7.31 東京医科歯科大学 東京
 23. 春日井昇平、骨造成に必要なもの シンポジウム「骨の再生医療」 第65回口腔科学会学術大会 2011.4.21-22 タワーホール船堀 東京
 24. 春日井昇平、Keys for bone augmentation、新潟大学 医歯学総合研究科大学院セミナー 2012.2.3

一般演題

1. 大島正充、水野光政、小川美帆、中尾一久、山本照子、春日井昇平、齋藤正寛、辻孝、機能的な歯の再生—再生歯ユニットによる歯・歯周組織の包括的再生と生理機能の回復—、社団法人日本補綴歯科学会 第 120 回記念学術大会、広島・広島国際会議場、2011 年 5 月 21 日
2. 紀平望帆、森田梨津子、野本洋平、中津洋輔、辻孝、歯胚発生をモデルとした時空間的な細胞動態の解析、第 20 回日本バイオイメージング学会学術集会、北海道・千歳科学技術大学、2011 年 09 月 02 日
3. 大島正充、水野光政、小川美帆、池田悦子、山本照子、春日井昇平、齋藤正寛、辻孝、機能的な歯の再生—再生歯ユニット移植による歯・歯周組織の包括的再生と生理的機能の回復—、第 59 回国際歯科学研究学会日本部会総会・学術大会、広島・広島国際会議場、2011 年 10 月 8 日
4. 水野光政、大島正充、小川美帆、中尾一久、池田悦子、山本照子、齋藤正寛、辻孝、再生歯ユニットの作製と成体顎骨への生着の解析、第 70 回日本矯正歯科学会大会&第 4 回国際会議、愛知・名古屋国際会議場、2011 年 10 月 19 日
5. 大島正充、水野光政、小川美帆、森田梨津子、池田悦子、山本照子、齋藤正寛、辻孝、再生歯ユニット移植による歯の生理的機能の再生、第 70 回日本矯正歯科学会大会&第 4 回国際会議、愛知・名古屋国際会議場、2011 年 10 月 19 日
6. 黒河みさ紀、荻野光明、齋藤正寛、辻孝、ADAMTSL6 β による TGF- β シグナル抑制効果に関する研究、第 135 回日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会、大阪・大阪国際交流センター、2011 年 10 月 21 日
7. 黒河みさ紀、荻野光明、星野伸太郎、齋藤正寛、辻孝、Analysis of microfibril assembly of aorta by ADAMTSL6 β 、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜・パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日
8. 森田梨津子、紀平望帆、中津洋輔、辻孝、器官形態形成におけるタイムラプス三次元細胞動態解析系の確立、文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」第四回領域班会議、名古屋・名古屋大学、2012 年 1 月 28 日 - 29 日
9. 笈田育尚、大野充昭、園山 亘、Hara Emilio Satoshi、窪木拓男、BMP-2 は骨髄腔内では骨形成を促進しない。第 29 回 日本骨代謝学会学術集会。大阪、日本。発表日 2011.7.28.
10. 中島 隆、大野充昭、園山 亘、笈田育尚、Hara Emilio Satoshi、窪木拓男、抜歯窩肉芽組織由来間葉系幹細胞の同定。第 29 回 日本骨代謝学会学術集会。大阪、日本。発表日 2011.7.28.
11. 正木明日香、大野充昭、園山 亘、Hara Emilio Satoshi、笈田育尚、久保田聡、前田あずさ、滝川正春、Young MF、窪木拓男、皮膚創傷治癒過程における CCN4/WISP-1 遺伝子の役割 第 4 回 日本 CCN ファミリー研究会 岡山、日本。発表日 2011.8.27.
12. 上枝麻友、藤澤拓生、大野充昭、正木明日香、三木春奈、園山 亘、窪木拓男、歯髓細胞のリプログラミングに対する TNF- α の効果。平成 23 年度社団法人日本補綴歯科学会 中国・四国支部学術大会。岡山、日本。発表日 2011.9.4.
13. 園山 亘、自己組織幹細胞による歯の機能再生。社団法人日本補綴歯科学会第 120 回記念学術大会。広島、日本。2011.5.20-22。発表日 2011.5.21.
14. 園山 亘、基礎生物学的観点から見た組織再生・増生。岡山大学病院認定口腔インプラント講習会 2011 インフ「ラントセミナー。岡山、日本。発表日 2011.6.16.

15. Khanom Rumana、坂本 啓、山口 朗 : Expression of keratin (K)15 and K19 in oral squamous neoplasms represents diverse phthophysiologicals. 第101回日本病理学会総会、2012年4月26日、東京
16. Samir Pal、坂本 啓、山口 朗: TSP1 in stroma promotes invasion of oral cancer. 第101回日本病理学会総会、2012年4月26日、東京
17. 坂本 啓、山口 朗: Rushton の硝子体の起源、第101回日本病理学会総会、2012年4月26日、東京
18. 佐藤潔、坂本啓、栢森高、山口朗 : 口腔扁平上皮癌による骨破壊予防治療法の開発 (優秀ポスター賞)、第53回歯科基礎医学会学術大会、2011年9月30日、長良川国際会議場、岐阜
19. 松本 力、飯村忠浩、山口 朗 : 強制力による歯の移動における骨細胞の役割、第31回日本骨形態計測学会、2011年5月20日、長良川国際会議場、岐阜
20. 渡部 高、天笠光雄、山口 朗、飯村忠浩 : 定量的 in situ 蛍光イメージングによる骨芽細胞特異的転写因子の骨組織内での分布と細胞内局在の変化の観察、第31回日本骨形態計測学会、2011年5月21日、長良川国際会議場、岐阜
21. 宗像 源博、立川 敬子、能村 嘉一、栢森 高、春日井 昇平. ポリ乳酸メッシュプレートを用いた移植材を併用しない上顎洞底挙上術の検討. 第30回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012.2.11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
22. 作山 葵、淵上 慧、宗像 源博、立川 敬子、春日井 昇平. インプラント周囲細菌叢の比較検討. 第30回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012.2.11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
23. 金井 亨、宗像 源博、岡田 常次、佐藤 大輔、春日井 昇平. ポケットプロービング圧力測定による新しいインプラント周囲組織検査法. 第30回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012.2.11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
24. 山口 葉子、塩田 真、春日井昇平. インプラント体埋入時のトルク-時間曲線の解析. 第30回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012.2.11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
25. 秋野 徳雄、立川 敬子、高宅 花織、春日井 昇平. 多孔性ハイドロキシアパタイト/ポリ-DL-乳酸複合体材料を用いた垂直的骨造成. 第30回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012.2.11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
26. 金 ユキョン、佐藤 大輔、宗像 源博、春日井 昇平. 全顎的なインプラント治療開始後II型糖尿病に改善が見られた一例. 第30回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012.2.11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
27. 古市祥子、眞野喜洋、立川敬子、春日井昇平. 新規口腔内洗浄用オゾンナノバブル水(OZNB)-歯科インプラント分野における有効性比較評価. 第60回日本口腔衛生学会・総会 2011.10.08-10 日本大学松戸歯学部千葉
28. 淵上慧、宗像源博、立川敬子、作山葵、春日井昇平. インプラント周囲骨吸収に対する臨床的検討. 日本口腔インプラント学会第41回学術大会 2011.9.16-18 名古屋国際会議場名古屋
29. 湯川 健、立川 敬子、中田秀美、宗像 源博、春日井 昇平. 当科に来院したインプラント治療経験を持つ患者の検討. 日本口腔インプラント学会第41回学術大会 2011.9.16-18 名古屋国際会議場 名古屋
30. 永山 友子、立川 敬子、春日井 昇平. 線維芽細胞増殖因子 (FGF) 18 の胎児マウス頭蓋冠

形成に与える影響. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部 学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.

31. 武山 秀子, 塩田 真, 今北 千春, 黒田 真司, 春日井 昇平. 臼歯中間欠損に対するインプラント補綴による咬合力変化に関する研究. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部 学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
32. 古市 祥子, 立川 敬子, 小林 裕史, 眞野 嘉洋, 春日井 昇平. 新規口腔洗浄用オゾン水の有効性評価. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部 学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
33. 佐藤 成実, 宗像 源博, 立川 敬子, 岡田 常次, 春日井 昇平. 上顎洞底挙上術に用いた β -TCP の経時的体積変化の X 線 CT 画像による検討. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部 学術大会 京王プラザホテル新宿 2012. 2. 11-12 東京
34. 永山 友子, 立川 敬子, 春日井 昇平. 線維芽細胞増殖因子 (FGF) 18 の胎児マウス頭蓋冠形成に与える影響. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部 学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
35. 武山 秀子, 塩田 真, 今北 千春, 黒田 真司, 春日井 昇平. 臼歯中間欠損に対するインプラント補綴による咬合力変化に関する研究. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部 学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
36. 古市 祥子, 立川 敬子, 小林 裕史, 眞野 嘉洋, 春日井 昇平. 新規口腔洗浄用オゾン水の有効性評価. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部 学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
37. 佐藤 成実, 宗像 源博, 立川 敬子, 岡田 常次, 春日井 昇平. 上顎洞底挙上術に用いた β -TCP の経時的体積変化の X 線 CT 画像による

検討. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部 学術大会 京王プラザホテル新宿 2012. 2. 11-12 東京

3. その他 (報道発表)

1) 国内報道

① 新聞 (主要新聞、地方新聞) (辻)

毎日新聞(H23/7/13)、日本経済新聞(H23/7/13)、産経新聞(H23/7/13)、SANKEI EXPRES(H23/7/13)、日経産業新聞(H23/7/13)、朝日新聞 (夕刊) (H23/7/13)、読売新聞 (夕刊) (H23/7/13)、東京新聞(H23/7/13)、千葉日報(H23/7/13)、四国新聞(H23/7/13)、福井新聞(H23/7/13)、北海道新聞(H23/7/13)、新潟日報(H23/7/13)、信濃毎日新聞(H23/7/13)、福島民報(H23/7/13)、富山新聞(H23/7/13)、長野日報(H23/7/13)、聖教新聞(H23/7/13)、静岡新聞(H23/7/13)、宮古毎日新聞(H23/7/13)、朝日新聞 (H23/10/29)、日本歯科新聞 (H23/11/1)、日経産業新聞 (H24/1/5、1面)

② WEB (国内 40 サイト以上) (辻)

河合塾 web「わくわく☆キャッチ！」(H23/6/27)、Asahi.com (H23/7/13)、YOMIURI ONLINE (H23/7/13)、毎日 jp (H23/7/13)、時事ドットコム (H23/7/13)、東京新聞 (H23/7/13) など、Asahi.com (H23/10/29)、jij.com (H23/10/29)、日経バイオテク (H23/10/29) など

③ テレビ・ラジオ報道 (辻)

NHK E テレ (教育テレビ) 「ここが聞きたい! 名医に Q」番組内コーナー「カラハシ未来研究所」(H23/10/1)

④ 雑誌 (辻)

MAIL EXPRESS 8 月第 4 週号 (H23/8/22)、ニュートンプレス「科学雑誌 Newton (H23/8/25)、日本歯科評論 10 月号 (23/9/11)、歯界展望 (H23/9/15)、Rikejo 理系女子応援マガジン (H23/9)、TMDC MATE (H23/11/1)、日本歯技 (H23/11/20)

2) 国外報道

① WEB (国外 190 サイト以上) (辻)

【米国】REUTERS (H23/7/13) , AFP (H23/7/13)
 【カナダ】canada.com (H23/7/13) , Global NEWS (H23/7/13)
 【イギリス】Daily Mail (H23/7/13)
 【ドイツ】n-tv.de NACHRICHTEN (H23/7/13)
 【フランス】French Tribune (H23/7/13) , RTLinfo.be (H23/7/13)
 【イタリア】Unita (H23/7/13) , Salute (H23/7/13)
 【ロシア】Новостной проект INFOX.ru (H23/7/13)
 【オーストラリア】ABC News (H23/7/13) , Canberra Times (H23/7/13)
 【ニュージーランド】yahoo! New Zealand (H23/7/13)
 【中国】中國經濟網 (H23/7/13) , 香港新浪網 (H23/7/13) , 新華網 (H23/7/14)
 【オランダ】WHTC (H23/7/13)
 【スペイン】La voz de asturias (H23/7/13)
 【インド】Times of India (H23/7/13)
 【南アフリカ】Health24.com (H23/7/13)
 【ブラジル】Revista Época (H23/7/13)
 【アルゼンチン】infoTigre (H23/7/13)

② テレビ報道 (辻)

【ロシア】Вести (H23/7/28)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

- 1) 窪木拓男, エミリオ サトシ ハラ, 大野充昭, 園山 亘, 滝川正春: 特許の名称「軟骨再生促進剤」特願2011-037932.
- 2) 窪木拓男, 大野充昭, 園山 亘, 中島 隆, 笈田育尚: 特許の名称「新規間葉系幹細胞」特願

2011-111873.

- 3) 窪木拓男, 園山 亘, 大野充昭, 笈田育尚, 山本克史: 特許の名称「人工骨膜」特願2011-113498.
- 4) 骨造成器具. 特許出願2011-198355 (2011.09.12)
 特許出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学 発明者: 春日井昇平、オサマ ザカリア

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

顎骨造成法の開発

研究分担者 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

要旨

本研究の目的は、口腔領域の軟組織および骨の有効な再生法を開発することである。骨の表面に人工の膜を置いて骨組織再生のためのスペースを確保することで、骨を造成する方法(Guided Bone Regeneration, GBR)は、臨床的に有効な手法である。生体内で吸収性されて膜の除去手術を必要としないコラーゲンあるいは PLGA 等の人工合成した高分子材料が、現在 GBR 膜として臨床で使用されている。そこで、さらに積極的に骨再生を促進するために、細胞の増殖あるいは分化を促進するシグナル分子を局所に作用することが可能な GBR 膜の開発を試みた。多糖のプルランにコレステロール基を付加した CHP ナノゲル、あるいはゼラチンを架橋した材料を用いて 2 種類の異なる GBR 膜を作製した。これら 2 種類の開発した GBR 膜を、ラット頭部に作成した骨欠損部の上部に適用し、骨再生に及ぼす効果を検討した。我々が開発した 2 種類の GBR 膜は、現在臨床で使用されているコラーゲン膜に比較して、欠損部の骨再生を著しく促進した。この新規に開発した 2 種類の GBR 膜は、BMP や FGF 等のシグナル分子のキャリアーとして適しているため、さらにこれらのシグナル分子を組み合わせることで骨再生の促進が期待できる。一方、歯科臨床において骨を造成するために様々な手法が用いられているが、どの手法を用いても垂直的骨造成は極めて困難である。この問題を解決するために、骨膜下にメッシュを置いて骨膜を徐々に挙上する骨膜挙上法を考案し、この手法を用いることで垂直的な骨造成が可能であることを報告した。この骨膜挙上法をさらに発展させ、骨膜下に遮断膜を挿入し、この遮断膜を徐々に挙上する Expansible Guided Bone Regeneration (E-GBR) を考案した。ウサギを用いた動物実験において、この E-GBR を用いることで、骨膜挙上法に比較してさらに効果的に垂直的骨造成が可能となることを明らかにした。

研究目的

歯が欠損した場合の治療法として歯科インプラント（以下インプラント）を用いた治療は、義歯をしっかりと固定でき、残存歯に対して負担をかけること無しに口腔機能を回復できる利点がある。現在インプラント治療は急速に普及しているが、インプラント埋入予定部位に骨と軟組織が不足する場合、インプラント治療は困難となる。インプラント治療は確実な治療法となっているが、天然歯と比較してインプラント周囲粘膜との結合は強固でないため、インプラント周囲の感染が起きやすい。また、インプラントは歯根膜組織を欠いているため、咬合の長期的変化に天然歯のように適用できないこと、また天然歯と比較して感覚閾値が高い（感覚が鈍い）問題がある。インプラント治療に続く次世代の歯の欠損治療法として、再生歯の臨床応用への期待は高い。本研究の目的は、口腔領域の軟組織および骨の有効な再生法を開発することである。軟組織および骨の再生に関する研究は、現在のインプラント治

療にとって必要な研究であり、再生歯の臨床応用にとっても有用な研究であると考えられる。

研究方法

本研究における動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を受けておこなわれた。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の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、放射線学のおよび組織学的に検討をおこなった。

研究結果

(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ーンで固定されており、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。

考察

(CHP)-nanogel 膜あるいはゼラチン架橋膜が、材料単独で骨欠損部の骨組織再生を促進した。(CHP)-nanogel 膜あるいはゼラチン架橋膜は成長因子や薬物のDDS材料として適していると考えられるが、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産生され作用している。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、徐放することで骨の再生が促進された可能性が考えられる。(CHP)-nanogel 膜をヒトの血清中でインキュベートすると、血清中のPDGF量が減少した。この実験結果は、間接的ではあるが、(CHP)-nanogel 膜が、PDGFを膜内にトラップする能力があることを示唆している。ゼラチン架橋膜も同様の機能があると考えられるが、この点については同様の実験をおこなって、検討する必要がある。

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。仮骨延長法は、骨を離断してその離断部に骨を形成させながら両骨端を一定のスピードで離す方法であり、本来長管骨の延長のために使用された手法である。現在歯科領域において、仮骨延長法が垂直的骨造成の目的で使用されている。しかし、口腔内への装置の取り付けが困難であり、骨造成の成否が術者の技術に大きく依存することは問題であり、簡便で確実な垂直的骨造成法とは言い難い。臨床においては、効果的で、簡便で、侵襲が少ない垂直的な骨造成法の開発が求められている。

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。

骨造成を必要とする整形外科そして歯科領域においては、骨芽細胞に分化可能な骨髄の間葉系幹細胞と足場材料を組み合わせた骨造成、BMP2と吸収性の足場材料であるコラーゲンを組み合わせた骨造成、PDGFと吸収性のリン酸カルシウム系材料であるbeta-TCPを組み合わせた骨補填材の臨床

応用が、米国あるいはヨーロッパで既におこなわれており、我が国においても臨床試験がおこなわれている。しかし、これらの材料あるいは手法を用いても、垂直的な骨造成が困難な状況は解決されていない。何らかの移植材を骨表面に適用した場合、その移植材を粘膜で被覆する必要がある。しかし、移植材を被覆するための粘膜の量が不足しているため、術後に移植材の露出と感染がかなりの高頻度で起き、臨床的に大きな問題となっている。

遮断膜を用いて骨表面に骨再生のためのスペースを確保するGBR法においては、上記の組織再生に必要な3要素の全てが、内因性に供給されている。膜は再生のスペースを確保しており、膜の下の骨形成は生体が本来保持している再生能力が活性化された結果であることは明らかである。このようなGBR法の原理については、組織再生の観点からもっと注目されて然るべきべきであると我々は考えている。GBR法は垂直的な骨造成法として有用であることは良く知られている。しかし、他の手法と同様に、骨再生のためのスペースを確保するために置いた遮断膜の露出頻度が高いことが、臨床における大きな問題である。

そのような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、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なくなるので、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。

組織再生の 3 要素である「幹細胞」、「シグナル分子」、「足場」を組み合わせ、再生の場に適用する手法が、様々な領域で試みられており、現在これが再生医療のトレンドとなっている。一方で、我々が本研究で研究した骨膜挙上法および E-GBR は、骨再生のためのスペースを徐々に作り、生体が本来保持している骨再生能力を活性化する手法である点に大きな特徴がある。我々が考案した方法は、近い将来臨床応用が比較的簡単に可能な方法であると考えられる。

E-GBR に使用する膜としてシリコンの薄膜を使用した。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は高い。また、E-GBR によって作成されたスペースに、BMP, FGF, VEGF 等のシグナル分子を外

部から少量注射して適用することで、さらに骨造成を促進することも可能かもしれない。

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。

研究発表

論文発表

- 1 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). Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine *in press*
- 2 Zakaria O, Kon K, Kasugai S. Evaluation of a biodegradable novel periosteal distractor. Journal of Biomedical and Material Research Part B - Applied Biomaterials *in press*
- 3 Rungsiyanont S, Dhanesuan 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*
- 4 Zakaria O, Madi M, Kasugai S. Induced osteogenesis using a new periosteal distractor. Journal of Oral Maxillofacial Surgery 70(3):e225-34, 2012
- 5 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. Journal of Periodontal Research 47(2):180-7, 2012

- 6 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. *Dental Material Journal* 30(5):754-61, 2011
- 7 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(7):e21531, 2011
- 8 Bakry AS, Tamura Y, Otsuki M, Kasugai S, Ohya K, Tagami J. Cytotoxicity of 45S5 bioglass paste used for dentine hypersensitivity treatment. *Journal of Dentistry* 39(9):599-603, 2011
- 9 Rojbani H, 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* 98(4):488-98, 2011
- 10 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 Material Sciences and Materials in Medicine* 22(6):1489-99, 2011
- 11 Hudieb MI, Wakabayashi N, Kasugai S. Magnitude and direction of mechanical stress at the osseointegrated interface of the microthread implant. *Journal of Periodontology* 82(7):1061-70, 2011
- 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* 38(7):525-32, 2011
- 13 Rodriguez R, Kondo H, Nyan M, Hao J, Miyahara T, Ohya K, Kasugai S. Implantation of green tea catechin α -tricalcium phosphate combination enhances bone repair in rat skull defects. *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials* 98B(2):263-71, 2011
- 14 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. *Journal of Oral Tissue Engineering* 9(2):53-63, 2011
- 15 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
- 著書
- 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. 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
- 学会発表
- 1 宗像 源博, 立川 敬子, 能村 嘉一, 柏森 高, 春日井 昇平. ポリ乳酸メッシュプレートを用いた移植材を併用しない上顎洞底挙上術の検討. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 2 作山 葵、淵上 慧、宗像 源博、立川 敬子、春日井 昇平. インプラント周囲細菌叢の比較検討. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 3 金井 亨, 宗像 源博, 岡田 常次, 佐藤 大輔, 春日井 昇平. ポケットプロービング圧力測

- 定による新しいインプラント周囲組織検査法. 第 30 回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 4 山口 葉子, 塩田 真, 春日井昇平. インプラント体埋入時のトルク-時間曲線の解析. 第 30 回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 5 秋野 徳雄, 立川 敬子, 高宅 花織, 春日井 昇平. 多孔性ハイドロキシアパタイト/ポリ- DL-乳酸複合体材料を用いた垂直的骨造成. 第 30 回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 6 金 ユキョン, 佐藤 大輔, 宗像 源博, 春日井 昇平. 全顎的なインプラント治療開始後 II 型糖尿病に改善が見られた一例. 第 30 回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 7 永山 友子, 立川 敬子, 春日井 昇平. 線維芽細胞増殖因子 (FGF) 18 の胎児マウス頭蓋冠形成に与える影響. 第 30 回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 8 武山 秀子, 塩田 真, 今北 千春, 黒田 真司, 春日井 昇平. 臼歯中間欠損に対するインプラント補綴による咬合力変化に関する研究. 第 30 回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 9 古市 祥子, 立川 敬子, 小林 裕史, 眞野 嘉洋, 春日井 昇平. 新規口腔洗浄用オゾン水の有効性評価. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 10 佐藤 成実, 宗像 源博, 立川 敬子, 岡田 常次, 春日井 昇平. 上顎洞底挙上術に用いた β - TCP の経時的体積変化の X 線 CT 画像による検討. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部学術大会 京王プラザホテル新宿 2012. 2. 11-12 東京
- 11 春日井昇平. 骨造成への新しいアプローチ: 骨再生のための鍵を考える. 玉川歯科医師会 2012. 2. 4
- 12 春日井昇平. Keys for bone augmentation. 新潟大学 医歯学総合研究科大学院セミナー 2012. 2. 3
- 13 Hao J, Kuroda S, Kasugai S. Bacterial adhesion behavior and bone formation effect of Zoledronic Acid (ZOL) immobilized hydroxyapatite implants. 第 2 回バイオインテグレーション学会 2012.1.29 東京医科歯科大学 東京
- 14 Madi M, Zakarina O, Noritake K, Fujii M, Kasugai S. Ligature-induced periimplantitis surrounding thin sputtered HA-coated implants. An experimental study in dogs. Clinical and radiographic evaluations. 第 2 回バイオインテグレーション学会 2012.1.29 東京医科歯科大学 東京
- 15 永山 友子, 立川 敬子, 春日井 昇平. 線維芽細胞増殖因子 (FGF) 18 の胎児マウス頭蓋冠形成に与える影響. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 16 武山 秀子, 塩田 真, 今北 千春, 黒田 真司, 春日井 昇平. 臼歯中間欠損に対するインプラント補綴による咬合力変化に関する研究. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.
- 17 古市 祥子, 立川 敬子, 小林 裕史, 眞野 嘉洋, 春日井 昇平. 新規口腔洗浄用オゾン水の有効性評価. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部学術大会 2012. 2. 11-12 京王プラザホテル新宿 東京.

- 18 佐藤 成実, 宗像 源博, 立川 敬子, 岡田 常次, 春日井 昇平. 上顎洞底挙上術に用いた β -TCP の経時的体積変化の X線 CT 画像による検討. 第 30 回日本口腔インプラント学会 関東甲信越支部学術大会 京王プラザホテル新宿 2012. 2. 11-12 東京
- 19 Kasugai S. Keys for bone augmentation: Respecting endogenous key players and space for regeneration. Korean Association of Dental Sciences 2011.11.24 Yonsei University, Seoul, Korea
- 20 春日井昇平. ミューワン HA インプラント: 簡便で良好な予後. Implant CAD/CAM Meeting 2011. 11. 12 横浜パシフィコ、横浜
- 21 Miyahara T. Pluemsakunthai W. Nyan M. Shimoda A. Kobayashi H. Shimizu Y. Fujimori T. Shiota M. Akiyoshi K. Kasugai S Novel exploitation of polysaccharide nanogel cross-linking membrane for GBR. European Association for Osseointegration 20th Annual Scientific Meeting 2011.10.12-15 Skalkotas Hall Athens Greece
- 22 Yamamoto M. Shiota M. Kon K. Munakata M. Fuchigami K. Kasugai S. Dimensional assessment of crestal approached sinus augmentation with composite graft. European Association for Osseointegration 20th Annual Scientific Meeting 2011.10.12-15 Skalkotas Hall Athens Greece
- 23 Kon K. Takahashi E. Ozeki M. Shimogisi M. Shiota M. Kasugai S. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with dental implant; A single case report. European Association for Osseointegration 20th Annual Scientific Meeting 2011.10.12-15 Skalkotas Hall Athens Greece
- 24 Pluemsakunthai W. Kuroda S. Shimokawa H. Noritake K. Hao J. Miyahara T. Lin Z. Kasugai S. Platelet-rich fibrin evaluation for osteogenesis. European Association for Osseointegration 20th Annual Scientific Meeting 2011.10.12-15 Skalkotas Hall Athens Greece
- 25 Nakata H. Kuroda S. Hao J. Yamamoto M. Kasugai S. Modification of culture into osteogenic or keratogenic differentiation from subcutaneous adipose-derived stem cells in vitro. European Association for Osseointegration 20th Annual Scientific Meeting 2011.10.12-15 Skalkotas Hall Athens Greece
- 26 古市祥子、眞野喜洋、立川敬子、春日井昇平. 新規口腔内洗浄用オゾンナノバブル水 (OZNB)-歯科インプラント分野における有効性比較評価. 第 60 回日本口腔衛生学会・総会 2011. 10. 08-10 日本大学松戸歯学部 千葉
- 27 淵上慧、宗像源博、立川敬子、作山葵、春日井昇平. インプラント周囲骨吸収に対する臨床的検討. 日本口腔インプラント学会第 41 回学術大会 2011. 9. 16-18 名古屋国際会議場 名古屋
- 28 湯川 健、立川 敬子、中田秀美、宗像 源博、春日井 昇平. 当科に来院したインプラント治療経験を持つ患者の検討. 日本口腔インプラント学会第 41 回学術大会 2011. 9. 16-18 名古屋国際会議場 名古屋
- 29 楠本雄生、立川敬子、宗像源博、近藤尚知、春日井昇平顎骨再建症例におけるインプラント喪失原因に関する臨床的検討. 日本口腔インプラント学会第 41 回学術大会 2011. 9. 16-18 名古屋国際会議場 名古屋
- 30 井上一彦、塩田真、寺山雄三、関孝史、宮内陸行、春日井昇平. インプラントを用いたテレスコープ型可撤式全顎補綴装置の補綴設計と作製方法について. 日本口腔インプラント学会第 41 回学術大会 2011. 9. 16-18 名古屋国際会議場 名古屋
- 31 渡邊 武、塩田 真、山本麻衣子、高 尚、春日井昇平 後上歯槽動脈の欠損形態別分

- 布の検証. 日本口腔インプラント学会第41回学術大会 2011.9.16-18 名古屋国際会議場 名古屋
- 32 則武 加奈子 黒田 真司 春日井 昇平
ラット頭蓋骨欠損部における、rhbFGF含有新規生体親和性ゼラチンGBR膜が骨新生に与える効果 第9回日本再生歯科医学会 学術大会・総会 2011.9.10 大阪国際会議場 大阪
- 33 春日井昇平. 歯科インプラント治療と再生医療の関わり. 日本先端歯科研究所講演会 2011.9.10 日本先端歯科研究所、東京
- 34 春日井昇平. インプラントにおける再生医療について. 嵌植義歯研究所講演会 2011.8.28 嵌植義歯研究所、仙台
- 35 Kasugai S. Keys for bone augmentation. Tri-University Consortium on Oral Science and Education 2011.8.4-5 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
- 36 Pluemsakunthai W, Kuroda S, Shimokawa H, Kasugai S. New analysis of platelet rich fibrin resorption and platelet derived growth factor extraction. Tri-University Consortium on Oral Science and Education 2011.8.4-5 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
- 37 春日井昇平. 成功するインプラント治療: 診査・診断・治療計画の重要性. 東京都歯科医師会生涯研修 2011.7.31 東京医科歯科大学 東京
- 38 Kasugai S. Key for bone augmentation: Making regenerative space and encouraging endogenous key players. Internation Society of Blood-derived Biomaterials (ISBB) Taipei Workshop 2011.7.7-8 Yang-Ming University, Taipei, Taiwan
- 39 Pluemsakunthai W, Kuroda S, Shimokawa H, Kasugai S. New analysis of platelet-rich fibrin resorption and platelet derived growth factor extraction. Tri-University Consortium, 2011.6.3-6 Bangkok, Thailand
- 40 則武加奈子、黒田真司、厚澤雄二、春日井昇平. rhbFGF含有新規生体親和性ゼラチンGBR膜の頭蓋骨欠損部における骨新生への効果. 第32回日本炎症・再生医学会 2011.6.2-3 国立京都国際会館 京都
- 41 Yamaguchi Y, Shiota M, Ahn K, Nagao H, Kasugai S. Analysis of abutment fracture on the single standing implant. International Dental Materials Congress 2011 2011.5.27-29 Eun-Myung Auditorium, Yonsei Univ. Seoul, Korea
- 42 宗像源博、作山葵、立川敬子、竹内康雄、石渡正浩、和泉雄一、春日井昇平. インプラント周囲炎を生じた患者に対する細菌学的検討. 第54回日本歯周病学会春季学術大会 2011.5.27-28 福岡
- 43 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
- 44 乙丸貴史、隅田由香、小坂 萌、宗像源博、立川敬子、春日井昇平、谷口 尚. 血管柄付腓骨皮弁にて再建された両側性上顎切除患者にインプラントを応用した顎義歯を装着した1症例. 日本補綴歯科学会 120回学術大会. 2011.5.20-22. 広島国際会議場 広島
- 45 春日井昇平. 骨造成に必要なもの シンポジウム「骨の再生医療」 第65回口腔科学会学術大会 2011.4.21-22 タワーホール船堀 東京

特許出願

- 1 骨造成器具. 特許出願 2011-198355 (2011.09.12) 特許出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学 発明者: 春日井昇平、オサマ ザカリア

臓器置換型再生歯の開発と再生歯の評価

分担研究者 辻 孝 東京理科大学 総合研究機構・教授

研究要旨

歯の再生医療の臨床応用化に必要なエビデンス創出に向けて、再生歯胚を作製する器官原基法の技術を応用して、マウスモデルならびにイヌモデルにおける歯の再生技術システムの構築を行った。マウス歯胚を用いて作製した完成再生歯を移植して即時機能化させる再生歯ユニット移植による歯の再生技術を確認すると共に、生後の仔犬から摘出した永久歯歯胚を用いて、イヌ再生歯胚を作製する方法を開発した。さらに岡山大学グループと共同で、歯牙喪失イヌ顎骨への自家歯胚移植モデルを確認し、再生歯が口腔内に萌出して咬合機能を果たすことを実証した。これらの研究成果により、臓器置換型再生歯を用いた臨床応用の実現可能性が示された。

A. 研究目的

本分担研究では、再生歯胚移植による臓器置換再生歯（*Nature Methods* 4, 227-230, 2007）の作製技術を基盤として、「歯の再生医療」の技術開発を行い、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。2009 度に報告した再生歯胚移植による機能的な歯の再生（*PNAS USA*, 106(32), 13475-13480, 2009）に引き続き、本年度は再生した完成歯を移植して機能させる新たな歯の再生基盤技術の確立を目指した。さらにイヌモデルを用いた再生歯胚の作製技術、ならびに自家歯胚移植モデルの開発を進め、再生歯の萌出、咬合解析による前臨床研究へと展開する。さらに遺伝子機能を利用して、非歯胚由来細胞から再生歯胚を誘導する遺伝子治療への応用化を目指すと共に、ヒト材料を用いた再生歯胚作製の技術開発を行い、臨床応用化への実用性を検証する。

B. 研究方法

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（研究計画項目①-1)

1)

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。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）（研究計画項目①-2)

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) (研究計画項目①-2)

大型動物における歯の再生の実現可能性を明らかとするために、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

かとするために、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 (研究計画項目①-3)

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 (研究計画項目③-2)

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 (研究計画項目⑤)

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。

7) ヒト由来細胞を利用した再生歯開発への基盤研究 (研究計画項目⑥-1)

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。

(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 8~13 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・コンセントの手続及び方法

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。

2. 動物実験研究

また、本研究課題におけるすべての動物実験は、東京理科大学動物実験委員会の承認を受けた上で、その規則にしたがって実験を実施した（動物実験承認番号；N11003号）。マウスは日本エスエルシー株式会社（静岡）より購入し、米国国立衛生研究所の定める動物実験のガイドラインにしたがって飼育した。実験による動物への負担軽減のため、施術は5 mg/ml ペントバルビタールを腹腔内注射による全身麻酔下で行った。口腔内施術を行ったマウスは粉末飼料（CE-2、日本クレア、東京）ならびに調製粉乳（ステップ、明治乳業（株）、東京）にて飼育した。

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：細胞シーズの探索（研究計画項目①-1)

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 ヶ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 ヶ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）（研究計画項目①-2)

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）（研究計画

項目①-2)

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とするために、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（研究計画項目①-3）

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（研究計画項目③-2）

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御する分子として報告されており、歯胚発生における細胞増殖、遺伝子発現への関与が示唆される分子である。そこで Gadd45g がエナメルノットの形成に関与しているかどうかを解析するため、臼歯上皮組織に遺伝子導入したところ、Shh、Fgf4、Wnt10b、p21、Lef1 の発現が誘導されることが判明した。これらの遺伝子群はエナメルノットで発現する歯の発生に必須な遺伝子群であることから、Gadd45g は歯の発生制御に関与する可能性が考えられると共に、エナメルノット遺伝子の発現誘導を介してエナメルノット形成を誘導する可能性が示された。次に、臼歯上皮組織の増殖に及ぼす Gadd45g の影響を解析するため、Gadd45g を遺伝子導入し、その細胞増殖を Ki67 の免疫染色によって解析したところ、Gadd45g は歯胚上皮組織の細胞増殖を抑制することが判明した。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^{-/-}) 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^{-/-} 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 (研究計画項目⑤)

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 (ヌーブ硬度) 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。

7) ヒト由来細胞を利用した再生歯開発への基盤研究 (研究計画項目⑥-1)

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。

D. 考察

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 度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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Masamitsu Oshima, Mitsumasa Mizuno, Aya Imamura, Miho Ogawa, Masato Yasukawa, Hiromichi Yamazaki, Ritsuko Morita, Etsuko Ikeda, Kazuhisa Nakao, Teruko Takano-Yamamoto, Shohei Kasugai, Masahiro