

Saito and **Takashi Tsuji**. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE*, **6(7)**:e21531, 2011.

Masahiro Saito, Misaki Kurokawa, Masahito Oda, Masamitsu Oshima, Ko Tsutsui, Kazutaka Kosaka, Kazuhisa Nakao, Miho Ogawa, Ri-ichiroh Manabe, Naoto Suda, Ganburged Ganjargal, Yasunobu Hada, Toshihide Noguchi, Toshio Teranaka, Kiyotoshi Sekiguchi, Toshiyuki Yoneda and **Takashi Tsuji**. ADAMTSL6& $\beta$  rescues fibrillin-1 microfibril disorder in Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. *Journal of Biological Chemistry*, **286(44)**,38602-38613, 2011.

Masahiro Saito, **Takashi Tsuji**. Extracellular matrix administration as a potential therapeutic strategy for periodontal ligament regeneration. *Expert Opin Biol Ther*, Mar; **12(3)**: 299-309, 2012.

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.

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

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.

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.

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.

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ャーズ)*、**72(1)**、9-11、2012.

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.

## 2. 学会発表

### 1) 招待講演(国際)

Masahiro Saito and **Takashi Tsuji**. The forefront of regeneration therapy for periodontal ligament, ISBB Taipei Workshop, Taipei, Taiwan, July 8, 2011.

**Takashi Tsuji**. Tooth Regenerative Therapy as a Future Organ Replacement Regenerative Therapy, Taiwan Orthodontic Society 2011 Annual Session, Taipei, Taiwan, August 13, 2011.

**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.

### 2) 招待講演(国内)

**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

**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

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

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

辻 孝、未来の歯科治療としての歯科再生医療、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

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

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センター平成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

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

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

### 3) 学会発表 (国際学会)

該当なし。

### 4) 学会発表 (国内学会)

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

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

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

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着生の解析、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

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

黒河みさ紀、荻野光明、齋藤正寛、辻 孝、ADAMTSL6β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

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 ADAMTSL6β、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

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

### 3. その他（報道発表）

#### 3) 国内報道

##### ① 新聞（主要新聞、地方新聞）

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）

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

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

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)

#### 4) 国外報道

##### ① WEB（国外190サイト以上）

【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. 実用新案登録**

該当なし

**3. その他**

該当なし。

**② テレビ報道**

【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**

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

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

研究分担者 窪木 拓男 岡山大学医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：本研究は、マウスにおいて確立されている器官原基法による再構成歯胚の移植ならびに機能回復を、大型動物であるビーグル犬にも適応できる移植モデルを作成するために計画された。つまり、ビーグル犬胎仔ならびに仔犬から硬組織の形成直前のステージである歯胚を摘出し、顎骨への他家移植および自家移植を行って、継続的な発生・萌出が達成される手技・条件を確立することを目的としている。

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口腔機能を十分に回復することが困難な場合が多い。本研究では、実験的再生歯の臨床応用の基盤技術開発を目的に、マウスにおいて確立されている器官原基法による再構成歯胚の移植・機能回復を、大型動物であるビーグル犬にも適応できるモデル作成を試みた。すなわち、再構成歯胚の移植・萌出モデルの確立を目指し、ビーグル犬胎仔ならびに仔犬から発生期にある歯胚を摘出し、顎骨への他家移植および自家移植を行って、継続的な発生・萌出が達成される手技・条件を確立することを目的とした。

B. 研究方法

本報告書に記載の実験は、すべて本学動

物実験管理委員会の許可を受けて行った。

1. 他家歯胚移植モデルの確立

前年度から、胎生55日齢の胎仔第二小臼歯歯胚が硬組織の形成直前のステージであり、萌出モデルの検討に適した歯胚であることから、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日齢の胎仔第二小臼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日齢の胎仔第二小臼歯歯胚を他家移植した。

2. 自家歯胚移植モデルの確立

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小臼歯 (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。

## C. 研究結果

### 1. 他家歯胚移植モデルの確立

免疫抑制対策として、FK506とプレドニゾロンの併用による一日二回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日齢の胎仔第二小臼歯歯胚を他家移植した。約2ヶ月後に顎骨を摘出し、マイクロCTにて解析を行ったが、歯胚の発生は認められなかった。

### 2. 自家歯胚移植モデルの確立

免疫反応を回避するため、自家歯胚移植を行った。つまり、30日齢の子犬の下顎第2, 3, 4乳臼歯を抜歯し、顎骨から下顎第2, 3, 4小臼歯 (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、通常の子犬の小臼歯の歯根は2根性であるが、自

他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。

## D. 考察

### 1. 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髄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。

### 2. 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のスピードより早く、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、中枢へ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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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. *Journal of Oral Rehabilitation*;39(1):63-72, 2012.

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 Biomaterialia*; 8(3):1260-6, 2012.

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. *Clinical Oral Investigations*;16(1):101-8, 2012.

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. *Dental Materials Journal*; 31(1):86-91, 2012.

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. *Journal of Oral Rehabilitation*; 39(1):44-54, 2012.

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. *Journal of Oral Rehabilitation*; in press.

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. *Journal of Sleep and Breathing*; in press.

##### 2. 学会発表

・ **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.

・ 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.

・ 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.

該当無し

・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.

・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**. 歯髄細胞のリプログラミングに対する TNF- $\alpha$  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.

・**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ー臨床疫学, バイオメカニクス, そしてバイオロジーへー. 新潟大学歯学部大学院セミナー. 新潟, 日本, 発表日 2012.03.16.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

・**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.

・**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.

・**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.

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他



厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

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

研究分担者 福本 敏 東北大学大学院歯学研究科教授

研究要旨：再生歯作成の為に細胞シーズとして、iPS 細胞から歯原性上皮および間葉組織の誘導法の開発を行う。また、歯髄細胞から歯髄幹細胞へリプログラミングを行なうケミカルコンパウンドのスクリーニングを行い、単一薬剤による簡便な幹細胞大量調整法の開発を行う。さらに歯の大きさや形態形成に関わる分子機能を明らかにし、人為的な歯冠形態のコントロールを行なう。

A. 究の目的

歯の再生においては既に器官原基法などを用いた再生技術の開発が行なわれ、小型動物では歯の再生が可能となってきた。その一方で、大型動物において再生歯を作成する為には、その細胞シーズの探索と短期間で大きな歯を作製する為の方策が必要と考えられる。そこで本研究では、iPS 細胞から歯原性上皮細胞あるいは歯原性間葉細胞を作成するための分化誘導法の開発を試みる。また、歯髄中に含まれる歯髄細胞は、象牙質形成のみならず、神経再生や骨の再生にも有用と考えられる。そこで歯髄中に 0.5%程度しか存在しない歯髄幹細胞を、ケミカルコンパウンドで人為的に作製する手法の開発を試みる。さらに、再生歯の形態のコントロールや、組織の形態形成メカニズムの理解の為に、特に歯の縦幅、横幅と、

大きさ制御機構の解明を目指す。

B. 研究方法

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ラスチンの過剰発現や、リコンビナントアメロ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、アメロラスチン以外に分化誘導に必要な分子の同定を試みた。

また単一のケミカルコンパウンドを利用し、分化した歯髄細胞から歯髄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。

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。

### C. 研究結果

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。

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。

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）の為には、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。

#### D. 考察

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問題を回避できたと考えられる。また、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。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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危機情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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.* 2012, 287(13):10590-10601.

2) 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.* 2012, 21(7):1156-1164.

3) 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.* 2012, 91(1):78-83.

4) 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.* 2012, 22(1):55-63.

5) 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.* 2011, 193(7):1257-1274.

##### 2. 学会発表

1) 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ー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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

イヌモデル組織工学的的人工再生歯根技術の開発に関する研究

研究分担者 園山 亘 岡山大学病院 助教

研究要旨：本研究は、前臨床モデルとしての基礎研究において汎用性の高いビーグル犬を用いて、組織工学的な人工再生歯根技術を開発・確立するために計画された。つまり、ハイドロキシアパタイトなどのスキヤフォールドと組織幹細胞である歯髄組織由来間葉系幹細胞および歯根膜組織由来間葉系幹細胞を応用することで、歯根膜の機能を有した人工歯根を、大型動物であるビーグル犬で再生することを目的としている。

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口腔機能を十分に回復することが困難な場合が多い。本研究では、ミニブタモデルでの報告がある組織幹細胞を用いた組織工学的的人工再生歯根技術を、前臨床モデルとしての基礎研究において汎用性の高いビーグル犬において実施し、その技術を開発・確立することを目的とした。

B. 研究方法

本報告書に記載の実験は、すべて本学動物実験管理委員会の許可を受けて行った。

1. 再生歯根膜の機能的評価

これまで、歯髄細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆した多孔性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力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。

2. 人工歯根に適したチタン表面性状の選定 (*in vitro*)

これまでに、人工歯根の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髄幹細胞を播種し、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、歯髄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)の表面上での歯髄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。

## C. 研究結果

### 1. 再生歯根膜の機能的評価

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、歯髄細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆した多孔性HAを犬顎骨に埋植した。3ヶ月の治癒期間の後、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、周囲骨は歯根膜の付着レベルを維持したまま垂直的に増生できるという仮説のもと、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。

### 2. 人工歯根に適したチタン表面性状の選定(*in vitro*)

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。

## D. 考察

### 1. 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。

## 2. 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。

## E. 結論

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が確認させた。しかし、今回用いたポーラス構造を有したハイドロキシアパタイトの強度的な問題を解決するため、ポーラスの構造、気孔率を再度検討する必要がある。また、実験(2)で用い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。今後は、このハイドロキシアパタイトを析出させたチタンの有用性を *in vivo* で検討していく予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

・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.

・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.

・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.

・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.

・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.

・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. 歯髄細胞のリプログラミングに対する TNF- $\alpha$  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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

・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.

・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.

・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.

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし



# Functional Tooth Regeneration Using a Bioengineered Tooth Unit as a Mature Organ Replacement Regenerative Therapy

Masamitsu Oshima<sup>1,3</sup>, Mitsumasa Mizuno<sup>1,2,3</sup>, Aya Imamura<sup>3</sup>, Miho Ogawa<sup>1,4</sup>, Masato Yasukawa<sup>3</sup>, Hiromichi Yamazaki<sup>3</sup>, Ritsuko Morita<sup>1</sup>, Etsuko Ikeda<sup>2</sup>, Kazuhisa Nakao<sup>1</sup>, Teruko Takano-Yamamoto<sup>2</sup>, Shohei Kasugai<sup>5</sup>, Masahiro Saito<sup>1,3</sup>, Takashi Tsuji<sup>1,3,4\*</sup>

**1** Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science, Noda, Chiba, Japan, **2** Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Graduate School of Dentistry, Tohoku University, Sendai, Miyagi, Japan, **3** Department of Biological Science and Technology, Graduate School of Industrial Science and Technology, Tokyo University of Science, Noda, Chiba, Japan, **4** Organ Technologies Inc., Tokyo, Japan, **5** Oral Implantology and Regenerative Dental Medicine Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

## Abstract

Donor organ transplantation is currently an essential therapeutic approach to the replacement of a dysfunctional organ as a result of disease, injury or aging *in vivo*. Recent progress in the area of regenerative therapy has the potential to lead to bioengineered mature organ replacement in the future. In this proof of concept study, we here report a further development in this regard in which a bioengineered tooth unit comprising mature tooth, periodontal ligament and alveolar bone, was successfully transplanted into a properly-sized bony hole in the alveolar bone through bone integration by recipient bone remodeling in a murine transplantation model system. The bioengineered tooth unit restored enough the alveolar bone in a vertical direction into an extensive bone defect of murine lower jaw. Engrafted bioengineered tooth displayed physiological tooth functions such as mastication, periodontal ligament function for bone remodeling and responsiveness to noxious stimulations. This study thus represents a substantial advance and demonstrates the real potential for bioengineered mature organ replacement as a next generation regenerative therapy.

**Citation:** Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, et al. (2011) Functional Tooth Regeneration Using a Bioengineered Tooth Unit as a Mature Organ Replacement Regenerative Therapy. PLoS ONE 6(7): e21531. doi:10.1371/journal.pone.0021531

**Editor:** Wei-Chun Chin, University of California, Merced, United States of America

**Received:** April 8, 2011; **Accepted:** May 30, 2011; **Published:** July 12, 2011

**Copyright:** © 2011 Oshima et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was partially supported by Health and Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labour, and Welfare (No. 21040101) to T.T., a Grant-in Aid for Scientific Research in Priority Areas (No. 50339131) to T.T., a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) to T.T. and a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) to M. Oshima from Ministry of Education, Culture, Sports and Technology, Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: t-tsuji@rs.noda.tus.ac.jp

‡ These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Donor organ transplantation is currently essential to replace a dysfunctional organ and to restore organ function *in vivo* [1,2]. This approach is problematic for clinicians however as donor organs are constantly in short supply [2,3]. An attractive new concept in current regenerative therapy that may possibly replace conventional transplantation in the future is stem cell transplantation therapy [4,5] or a two-dimensional uniform cell sheet technique [6,7] to repair the local sites of the damaged tissues and organs [8]. The ultimate goal of regenerative therapy in the future is to develop organ replacement regenerative therapies that will restore lost or damaged tissues following disease, injury, or aging with a fully functioning bioengineered organ [9,10,11]. To construct a bioengineered organ, one of two major concepts is to construct fully functional artificial organs using three-dimensional tissue-engineering technology, involving biodegradable materials and various cell types, that can immediately function after transplantation *in vivo* [12,13,14]. However, further technological developments are required to create such artificial organs which can immediately function [15].

For the regeneration of ectodermal organs such as a tooth, hair follicle or salivary gland [16,17], a further concept has been proposed in which a bioengineered organ is developed from bioengineered organ germ by reproducing the developmental processes that take place during organogenesis [11,18]. Tooth regenerative therapy is thought to be a very useful study model for organ replacement therapies [11,19,20]. The loss of a tooth causes fundamental problems in terms of oral functions, which are achieved in harmony with the teeth, masticatory muscles and the temporomandibular joint under the control of the central nervous system [21]. It has been anticipated that a bioengineered tooth could restore oral and physiological tooth functions [19]. We have previously developed a three-dimensional cell manipulation method, designated the organ germ method, for the reconstitution of bioengineered organ germ, such as a tooth or whisker follicle [22]. This bioengineered tooth erupted with the correct structure, occluded at the lost tooth region in an adult mouse. It also showed sufficient masticatory performance, periodontal functions for bone remodeling and the proper responsiveness to noxious stimulations [20]. This previous study thus provided a proof of concept that

successful replacement of an entire and fully functioning organ could be achieved through the transplantation of bioengineered organ germ i.e. a successful organ replacement regenerative therapy [20].

Transplantation of a bioengineered mature organ will lead to immediately perform of the full functions *in vivo* and have a profound impact on the survival outcomes of many diseases [2,9]. Transplanted bioengineered organs are also expected to be viable over the long-term and achieve the continuous production of various functional cells and their progenitors from stem cells as efficiently as the natural organ *in vivo* [23,24]. It has also been proposed that mature organs can be developed from bioengineered organ germ by faithfully reproducing *in vivo* developmental processes. In the dental treatment, it has been expected to transplant of a bioengineered tooth unit comprising mature tooth, periodontal ligament (PDL) and alveolar bone into the tooth loss region through bone integration, which is connected between recipient bone and bioengineered alveolar bone in a bioengineered tooth unit [25]. Transplantation of a bioengineered tooth unit has also been proposed as a viable option to repair the large resorption defects in the alveolar bone after tooth loss [26]. However, there are currently no published reports describing successful transplantation or replacement using a bioengineered tooth [10,27].

In our current study, we have generated a bioengineered tooth unit, which was controlled for length and shape and report a successful tooth replacement by transplantation of a bioengineered tooth unit into the tooth loss region, followed by successful bone integration, and restoration of tooth physiological functions such as mastication, PDL function and an appropriate responsiveness to noxious stimulations. This transplantation of a bioengineered tooth unit could also regenerate alveolar bone formation in a vertical direction. Our results thus further demonstrate the potential for bioengineered tooth replacement as a future regenerative therapy.

## Results

### Generation of a Bioengineered Tooth Unit

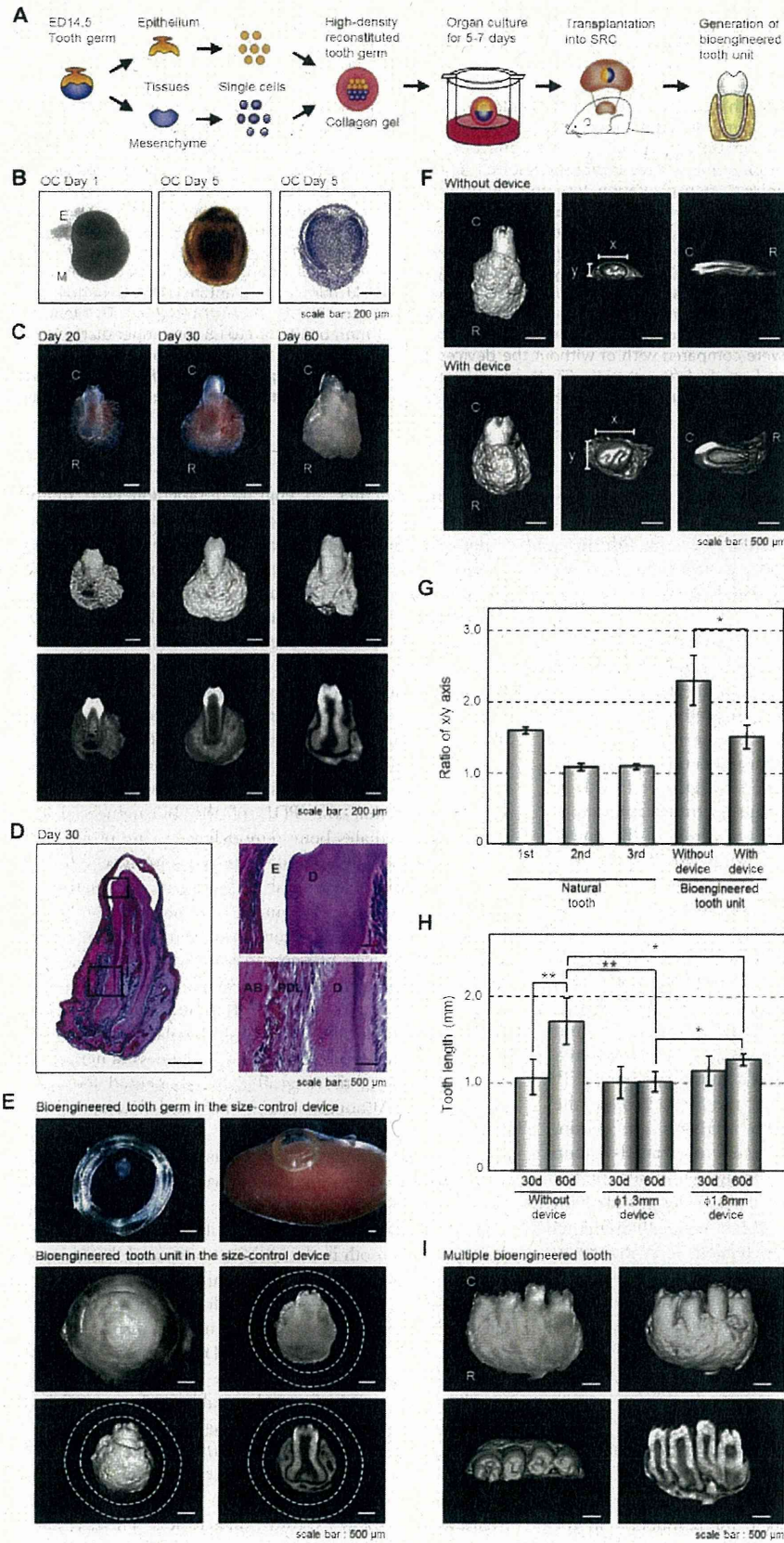
We have previously reported that bioengineered tooth germ can successfully develop a bioengineered tooth that by subrenal capsule transplantation can restore a mature tooth, including periodontal tissue and alveolar bone [22]. Because a three-dimensional *in vivo* organ culture has not yet been developed, we employed a strategy involving a bioengineered tooth unit, which has the necessary tissues to restore tooth functions, to investigation and advance the future potential of bioengineered tooth replacement (figure 1A). The bioengineered molar tooth germ was developed to a stage equivalent to the early bell stage of natural tooth germ for 5–7 days in an *in vitro* organ culture (figure 1B). Although we have previously reported that multiple bioengineered teeth have been formed from a bioengineered tooth germ reconstituted by our organ germ method [22], we recently developed a method to generate a single and width-controlled bioengineered tooth [28]. The bioengineered tooth germ gradually accumulated hard tissue, root extension, and an increased alveolar bone volume, depending on transplantation periods, and could successfully generate a tooth unit with the correct structure of a whole molar, and the proper formation of periodontal tissue and surrounding alveolar bone (figure 1C, D). However, the shape (x vs. y axis) of the bioengineered tooth unit was flattened by the pressure of the outer membrane of the subrenal capsule (figure 1F, G). The length of the tooth also showed continuous root elongation depending on the transplantation periods without occlusional mechanical stress (figure 1C, F, H).

To generate the shape- and length-controlled bioengineered tooth unit so that a suitable size was obtained for intraoral transplantation, the tooth germ was inserted into a ring-shaped size-control device and then transplanted into a subrenal capsule (figure 1E). The crown widths, calculated from the x/y axis ratios, of natural first, second and third molars of 9-week-old adult mice were  $1.61 \pm 0.05$  mm,  $1.09 \pm 0.04$  mm,  $1.12 \pm 0.04$  mm, respectively (each  $n = 5$ , figure 1G). The crown width of the bioengineered tooth units grown in the size-control device, which had a 1.8 mm inside diameter and 1.3 mm thickness, was  $1.46 \pm 0.16$  mm whereas when grown outside of the device the size was  $2.30 \pm 0.35$  mm (each  $n = 5$ , figure 1G). The device thus successfully generated a size-controlled bioengineered tooth so that it was similar to a natural tooth (figure 1F, G). This device could avoid the pressure by the subrenal capsule membrane, and reserve the three-dimensional space for developing a bioengineered tooth germ normally. We next evaluated the length of a bioengineered tooth unit generated in the size-control device (figure 1E). After 30 or 60 days, the lengths of the teeth transplanted without the devices were  $1.07 \pm 0.20$  mm and  $1.70 \pm 0.26$  mm, respectively, which was significantly associated with the transplantation period (each  $n = 5$ , figure 1H, figure S1A). Although the length of the bioengineered tooth transplanted without the devices was  $1.70 \pm 0.26$  mm after 60 days transplantation, bioengineered teeth transplanted in devices of 1.3 or 1.8 mm in diameter, was significantly regulated at  $1.02 \pm 0.11$  or  $1.27 \pm 0.06$  mm, respectively (each  $n = 5$ , figure 1H). The shape and length of the bioengineered tooth unit can therefore be controlled in three-dimensions using a specialized device.

Multiple bioengineered tooth units surrounded by alveolar bone could be also generated by the transplantation of several tooth germs into a single size-control device (figure 1I, figure S1B). Each resulting tooth had the correct structure including pulp cavities and partitioned periodontal spaces (figure 1I, figure S1C). Hence, multiple tooth replacements can be achieved with this regenerative transplantation method.

### Transplantation of a Bioengineered Tooth Unit into a Tooth Loss Region *in Vivo*

We next investigated whether a bioengineered tooth unit could be engrafted via the integration between the alveolar bone of this unit and that of the host recipient and then function appropriately by occlusion with an opposing tooth (figure 2A). The bioengineered tooth unit, which was generated by transplantation in a device of a 2.5 mm inside diameter for 50–60 days and labeled by the administration of calcein reagent into recipient mouse (figure 2B), was transplanted with the correct orientation into a properly-sized bony hole in the lower first molar region of the alveolar bone in a 4-week-old mouse (figure 2C). Briefly, in this mouse model, the lower first molar had been extracted, and the resulting gingival wounds had been allowed to heal for 4–6 days (figure S2A). When the bioengineered tooth unit was transplanted, it was located at a position reaching the occlusal plane with the opposing upper first molar (figure 2C, figure S2A). Partial bone integration was observed at 14 days after transplantation, and full bone integration around a bioengineered tooth root was seen at 30 days after transplantation (figure 2C). In the calcein-labeled alveolar bone of bioengineered tooth unit, resorption was partially observed at the surface at 30 days post-transplantation (figure 2D, figure S2B). The calcein-labeled bone finally disappeared and the recipient bone around the bioengineered tooth root replaced it completely at 40 days after transplantation at a frequency of 66/83 (79.5%; figure 2C, D, figure S2B). There have been many previously reported clinical cases of multiple tooth loss, the most serious condition being edentulism [29]. It is possible that a





**Figure 1. Generation of a bioengineered tooth unit.** (A) Schematic representation of the generative technology of bioengineered tooth unit. (B) Phase construct imagery of a bioengineered tooth germ on day 1 (left) and 5 (center) and HE staining (right) of an organ culture on day 5. Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ . E, epithelium; M, mesenchyme. (C) Photographs (upper) and micro-CT images of the external surface area (middle) and cross section (lower) of a bioengineered tooth unit. Images were captured at 20 days (left), 30 days (center) and 60 days (right) after subrenal capsule transplantation (SRC). Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ . C, tooth crown side; R, tooth root side. (D) Histological analysis of the bioengineered tooth unit on day 30 after SRC transplantation (left). (Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ ). Higher magnification images of crown area (upper right) and the periodontal tissue area (lower right) are also shown. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . E, enamel; D, dentin; AB, alveolar bone; PDL, periodontal ligament. (E) Photographs of the developmental processes occurring in bioengineered tooth germ in a subrenal capsule (SRC) using a size-control device. Images were captured of bioengineered tooth germ orientated in the device (top left), transplantation into the SRC (top right), and the bioengineered tooth at 50–60 days after transplantation in the SRC (middle). Micro-CT images of the external surface area (bottom left) and cross section (bottom right) are also shown. The dotted lines indicate the outlines of the device. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ . (F) Micro-CT images of a bioengineered tooth unit transplanted into the SRC for 30 days with (lower column) or without (upper column) the size-control device at an external (left), axial (center) or cross section (right) view. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ . x, x-axis of the crown; y, y-axis of the crown. (G) X-axis versus y-axis ratios (x/y) of the crowns of bioengineered tooth units at 30 days post transplantation into an SRC, and also of natural first, second and third molars from 9-week-old mice. Transplantations were performed with or without the 1.3 mm thickness size-control device. Error bars show the standard deviation ( $n=5$ ). \* $P<0.001$  (t-test). (H) The lengths of the bioengineered tooth units generated using size-control devices, which were of a 1.3 mm ( $\phi 1.3$  mm) or 1.8 mm ( $\phi 1.8$  mm) inner diameter, at 30 and 60 days post transplantation into an SRC were compared with or without the devices. Error bars show the standard deviation ( $n=5$ ). \* $P<0.01$  and \*\* $P<0.001$  (t-test). (I) Photograph (first figure from the left) and micro-CT images showing external (second figure), axial (third figure) and cross section (fourth figure) views of a multiple bioengineered tooth units, in which four teeth were contained in one alveolar bone, after 60 days transplantation into the SRC. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ . doi:10.1371/journal.pone.0021531.g001

bioengineered teeth unit could be transplanted into an edentulous jaw (figure S2E, F). Our current findings suggest that bioengineered teeth can be engrafted into regions of tooth loss through bone integration, which involves resorption of the alveolar bone of the bioengineered tooth unit through natural bone remodeling in the recipient.

The engrafted bioengineered tooth was found to be aligned appropriately and occlude with the opposing upper first molar (figure 2E, figure S2C). Micro-CT analysis also revealed that no root elongation was evident for the bioengineered tooth and that the apical foramen of the engrafted bioengineered tooth root significantly narrowed at 40 days after transplantation (each  $n=9$ , figure S2D). These results suggest that the bioengineered tooth in the tooth unit isolated from subrenal capsule transplantation is immature tooth, which has the potential to narrow of the apical foramen after the oral transplantation and would have the physiological ability to recapitulate mechanical stress by occlusion.

Masticatory potential is essential for proper tooth function and we next performed a Knoop hardness test, an important measure of masticatory functions, on bioengineered teeth including both the dentin and the enamel components. The Knoop hardness numbers (KHN) of the enamel and dentin in the natural teeth of 11-week-old adult mice were measured at  $404.2\pm 78.2$  and  $81.0\pm 11.5$ , respectively (each  $n=5$ , figure 2F). The bioengineered teeth generated in a subrenal capsule (SRC) and in jaw bone (TP) showed similar KHN values at  $179.6\pm 49.2$  and  $319.6\pm 78.3$  in the enamel, and  $80.7\pm 11.5$  and  $76.8\pm 13.6$  KHN in the dentin, respectively (each  $n=5$ , figure 2F). The value of enamel Knoop hardness of natural tooth increase in according to postnatal period [20]. Although the enamel hardness of the bioengineered tooth generated in a SRC showed low KHN values, the enamel hardness of the engrafted bioengineered teeth (TP) increased to the high KHN value in according to the period after the transplantation into jaw bone. Therefore, the hardness of the dentin in the engrafted bioengineered teeth was in the normal range. These findings indicate that the hardness of the enamel and dentin in the engrafted bioengineered teeth were in the normal range.

### Functional Analysis of the Periodontal Ligament and Neurons of the Engrafted Bioengineered Teeth

Previously, it had been demonstrated that the bioengineered tooth germ can recapitulate physiological tooth function in the adult murine oral environment [20]. In our present study, we next

investigated whether an engrafted bioengineered mature tooth unit can also restore physiological tooth functions *in vivo* such as the response to mechanical stress and the perceptive potential for noxious stimulations. It is essential for tooth functions that the engrafted bioengineered tooth in recipient has the cooperation with the oral and maxillofacial regions through the PDL. The response of the PDL to mechanical stress, such as orthodontic movements, induces alveolar bone remodeling, which is indicated by the localization of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-osteoclasts and osteocalcin (*Ocn*) mRNA-positive osteoblasts [20]. During experimental tooth movement, TRAP-positive osteoclasts and *Ocn* mRNA-positive osteoblasts were observed on the compression and tension sides, respectively (figure 3A). This demonstrated that the PDL of the bioengineered tooth unit successfully mediates bone remodeling via the proper localization of osteoclasts and osteoblasts in response to mechanical stress.

The perceptive potential for noxious stimulation including mechanical stress and pain, are important for proper tooth function [30]. Trigeminal ganglionic neurons, which innervate the pulp and PDL, can respond to these stimulations and transduce the perceptions to the central nervous system. Blood vessels that are detected in the pulp and PDL, maintain dental tissues such as odontoblasts, pulp, the PDL and alveolar bone. In our current experiments, we evaluated the responsiveness of nerve fibers in the pulp and PDL of the engrafted bioengineered tooth to noxious stimulations. Although von Willebrand Factor (vWF)-positive blood vessels were observed in the pulp and PDL of the bioengineered tooth generated in a subrenal capsule, anti-neurofilament (NF)-immunoreactive nerve fibers could not be detected (figure 3B, figure S3A, B). However, NF-positive nerve fibers could be detected in the pulp and PDL of the engrafted bioengineered tooth in the recipient bone and the neurons merged with vWF-positive blood vessels (figure 3B). Neuropeptide Y (NPY) and calcitonin gene-related peptide (CGRP), which are synthesized in sympathetic and sensory nerves, respectively, were also detected in both the pulp and PDL neurons (figure 3B, figure S3C–F). We found in our current analyses that c-Fos immunoreactive neurons, which are detectable in the superficial layers of the medullary dorsal horn following noxious stimulations such as mechanical and chemical stimulation of the intraoral receptive fields, were present in both normal and bioengineered teeth and drastically increased in number at two hours after orthodontic treatment and pulp exposure (figure 3C). These results indicate that an engrafted bioengineered tooth unit can indeed restore the