

図1 再生歯胚を用いた歯の再生戦略

器官原基法によって上皮細胞と間葉細胞を再構築して作製した再生歯胚，ならびに再生歯胚から完成した歯の構造体として作製した再生歯ユニットを移植することによって，成体内で歯を再生する戦略が考えられる。

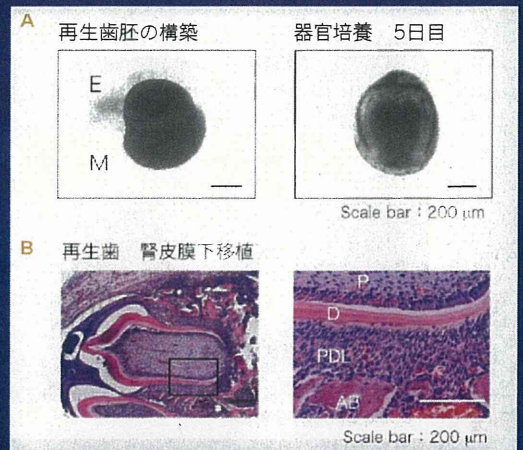


図2 器官原基法による再生歯胚の作製

A：器官原基法による再生歯胚の作製（左）と器官培養像（右）。E：上皮細胞凝集塊，M：間葉細胞凝集塊

B：再生歯胚を腎皮膜下に移植することにより発生した再生歯の組織像（左）と拡大像（右）。D：象牙質，P：歯髄，AB：歯槽骨，PDL：歯根膜

しかしながらこれまでに，再生器官原基から即時機能可能な成熟再生器官を作製し，生体内で機能させた報告はなく，器官再生医療の技術開発における大きな課題と考えられてきた。

1) 再生歯ユニットの作製

歯は，歯そのものを構成する硬組織とその産生細胞に加えて，歯を支持する歯根膜や歯槽骨を含めた1つの機能的なユニットとしてみなすことができ，これらの細胞や組織はすべて歯胚から発生，分化することが知られている。

そこで筆者らは，再生歯胚から再生歯ユニットを作製する技術開発に取り組んだ。現在のところ，器官原基を生体外で発生させ，器官を培養する技術は存在しないことから，マウスの腎臓皮膜下に異所的に再生歯胚を発生させることにより，歯ばかりでなく，歯根周囲に歯根膜・歯槽骨を伴う組織学的に正常な再生歯ユニットの作製が可能であった（図4）。

さらに再生歯の長さを制御するデバイスを開発し，発生させることにより，移植に適した再生歯ユニットの作製を可能とした。またこのデバイスに複数の再生歯胚を入れて発生させることにより，複数本の再生歯が1つの歯槽骨に存在する多数歯ユニットをつくり出すことが可能であった（図4A右）。

2) 再生歯ユニットの生着と咬合機能

再生歯ユニットが移植部位に生着して咬合機能することを明らかとするために，成体マウスの歯の喪失部位の歯槽骨に移植窩を作製し，再生歯ユニットを移植した（図5A）。再生歯ユニットは，移植直後から対合歯と咬合関係にあるばかりでなく，再生歯の硬度

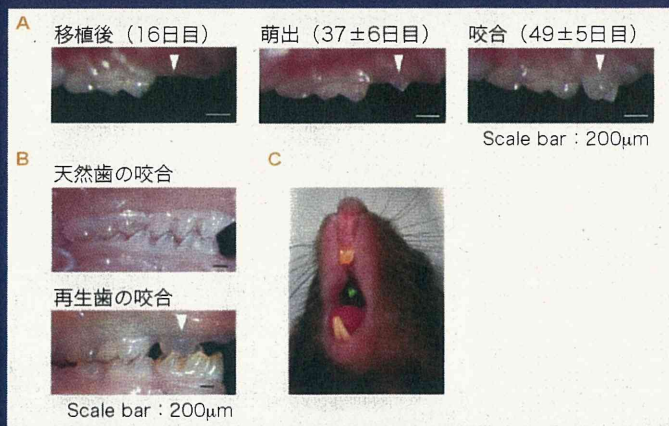


図3 成体マウス口腔内で発生・萌出した再生歯
A : 再生歯胚移植後の再生歯の萌出と成長過程 (矢頭: 再生歯)
B : 天然歯 (上) および再生歯 (下, 矢頭: 再生歯) における咬合状態の口腔内写真
C : GFP 標識された再生歯の口腔内写真 (緑色に光る歯)

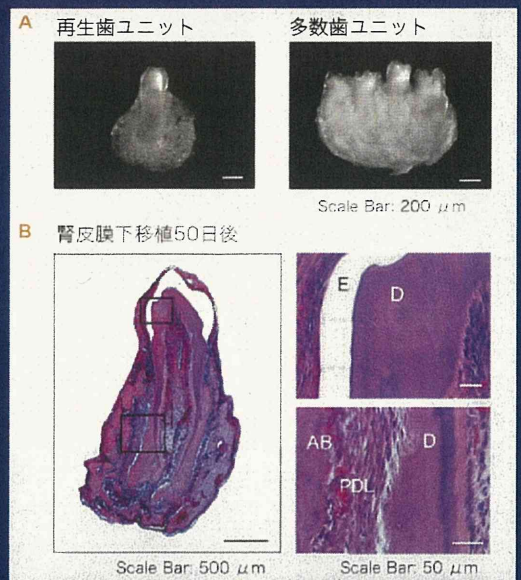


図4 再生歯ユニットの作製
A : 再生歯胚から作製した再生歯ユニット (左) と, 複数の再生歯胚から作製した多数歯ユニット (右)
B : 再生歯ユニットの組織像 (左: 全体像, 右: 拡大像). E: エナメル質, D: 象牙質, AB: 歯槽骨, PDL: 歯根膜

は成体マウスの天然歯とほぼ同等であることから, 咀嚼可能な再生歯であることが判明した. 再生歯ユニットの歯槽骨は, 移植期間に伴ってレシピエント歯槽骨と骨性結合により生着し, 再生歯と天然歯の間の歯槽骨は, 両者の歯根膜を介して一塊の骨組織として観察されることから, 再生歯には歯根膜が維持されていることが示された (図 5B).

実際に生着した再生歯に矯正力を与えると, 天然歯と同様に骨のリモデリングが誘導されることから, 正常な機能を有する歯根膜により周囲組織と連携機能していることが明らかになった.

3) 再生歯の神経機能

歯は, 外部からの侵害刺激を中枢へ伝達する神経機能を有することから, 顎骨に生着した再生歯が天然歯と同等の神経機能を有するかについて解析を行った. 腎臓皮下で作製した再生歯ユニットには神経線維が認められないものの, 顎骨に生着した再生歯の歯髄や歯根膜には, 交感神経や知覚神経といった複数種類の神経線維が血管とともに侵入していた (図 6A).

そこで, 再生歯に矯正力や露髄による侵害刺激を与えると, 三叉神経脊髄路核の神経線維で痛み の伝達に関与する c-Fos タンパク質の産生が天然歯と同様に認められることから, 再生歯には外部侵害刺激を中枢に伝達可能な神経機能が回復していることが判明した (図 6B).

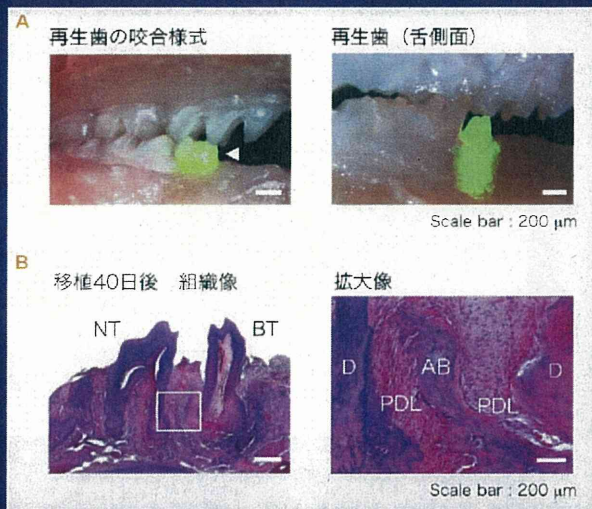


図5 再生歯ユニットの生着と咬合機能
A: 蛍光色素を沈着させた再生歯ユニットの咬合様式 (左, 矢頭: 再生歯) と再生歯の舌側面観 (右)
B: 移植40日後の顎骨に生着した再生歯ユニットの組織像 (左) と拡大像 (右). NT: 天然歯, BT: 再生歯, D: 象牙質, AB: 歯槽骨, PDL: 歯根膜

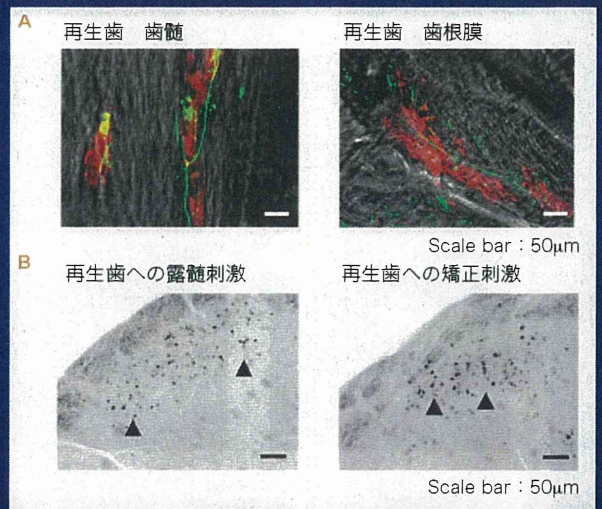


図6 顎骨に生着した再生歯の神経機能
A: 顎骨に生着した再生歯の歯髄, 歯根膜内に侵入した神経線維の免疫染色像. 緑: 神経, 赤: 血管
B: 顎骨に生着した再生歯に対して露髄および矯正刺激を与えた際の三叉神経脊髄路核のc-Fos発現像. 矢頭: c-Fos発現部位

4) 再生歯ユニット移植による歯槽骨再生

歯を喪失すると、喪失部位では歯槽骨の吸収が起こり、インプラントや自家歯牙移植などの移植治療が困難になることが大きな問題だと考えられている^{10,11)}。現在では、自家骨移植や骨補填材による骨再生療法が取り組まれているものの、より骨再生効果が高い治療技術の開発が期待されている¹²⁾。

再生歯ユニットには歯槽骨が付随しているため、このユニットを歯槽骨吸収が起きている歯の喪失部位に移植することにより、骨回復を伴う再生歯の生着が可能であると考え、解析を行った。成体マウス下顎骨の第一臼歯を抜歯し、歯槽骨を取り除いた広範性骨欠損モデル (図7A) に再生歯ユニットを移植すると、再生歯が生着するとともに、垂直的な歯槽骨の再生が認められた (図7B)。このことから、再生歯ユニットを移植することにより、歯ばかりでなく歯槽骨の再生も可能であることが示された。

歯科再生治療の実現化に向けた今後の課題

これらの研究成果から、三次元的な細胞操作による再生歯胚の作製や、再生歯胚の移植治療技術に加え、歯の喪失部位に再生歯胚から作製した再生歯ユニットを移植する、歯と歯周組織の包括的な再生治療のコンセプトを実証できたものと考えられる^{5,8,9)}。しかしながら、これらの治療法を実用化するにはいまだ解決すべき課題が残されている。

ヒトの歯の再生を実現するためには、免疫学的な拒絶反応を避けるため、患者に由来する細胞を用いて歯胚を再生する必要がある。この細胞シーズの探索研究は世界中で進

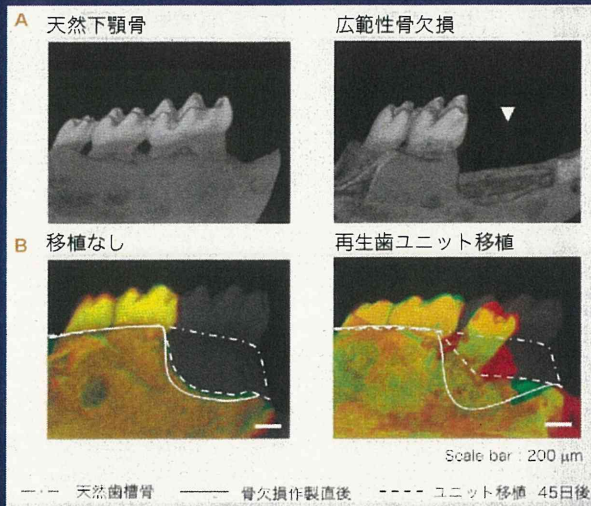


図7 再生歯ユニット移植による歯槽骨再生効果

A: 成体マウスの天然下顎骨 (左) と、広範性骨欠損モデル (右, 矢頭: 欠損部)
 B: 広範性骨欠損モデルに再生歯を移植して45日後のCT像の重ね合わせ, 正常な歯槽骨レベル (---), 広範性骨欠損モデル作製時の骨レベル (—), 再生歯ユニットの非移植群と移植群の骨の回復レベル (.....)

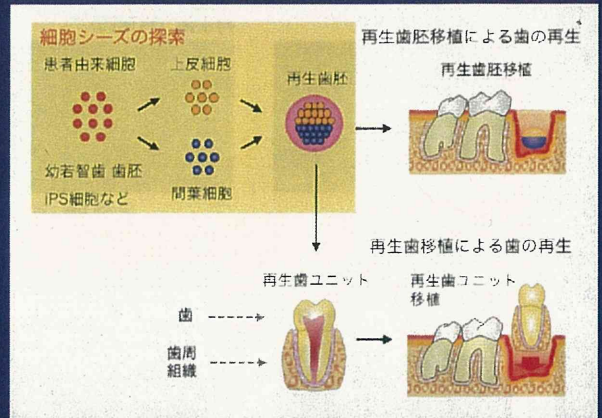


図8 歯科再生治療の実現に向けた今後の課題

ヒトの歯の再生の実現に向けて, 患者由来の歯胚誘導能をもつ幹細胞や, iPSC細胞からの歯胚誘導などの細胞シーズの探索研究が必要とされている

められており, 胎児期の歯胚誘導能をもつ幹細胞や, 患者由来の iPSC 細胞からの歯胚誘導などの研究開発が期待されている (図8)¹⁾。

また, 再生歯胚からヒトの歯を再生するには数年の期間が必要であるため, 再生歯ユニットを移植する治療技術の開発が期待される。そのためには, 再生歯胚を生体外で培養し, 短期間で移植可能な再生歯を製造する技術開発も必要である。現在のところ, 細胞凝集塊や組織, 器官を培養可能なシステムの開発は十分ではなく, 三次元的な血管ネットワークシステムを利用した培養システムの開発などを連携させることにより, その実現が図れるものと考えられる。今後, 再生基盤技術の開発と臨床応用化研究の推進により歯科再生治療の実現が期待されるとともに, 臓器置換再生医療の先駆けとして幅広い臓器・器官の再生研究への応用が望まれる^{1,3)}。

文献

- Ikeda E, Tsuji T. Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther.* 2008; **8**(6): 735-744.
- Gurtner GC, et al. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; **453**(7193): 314-321.
- Sharpe PT, Young CS. Test-tube teeth. *Sci Am.* 2005; **293**(2): 34-41.
- Yelick PC, Vacanti JP. Bioengineered teeth from tooth bud cells. *Dent Clin North Am.* 2006; **50**(2): 191-203, viii.
- Yen AH, Sharpe PT. Regeneration of teeth using stem cell-based tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther.* 2006; **6**(1): 9-16.
- Nakao K, et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods.* 2007; **4**(3): 227-230.
- Ishida K, et al. The regulation of tooth morphogenesis is associated with epithelial cell proliferation and the expression of Sonic hedgehog through epithelial-mesenchymal interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; **405**(3): 455-461.
- Ikeda E, et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; **106**(32): 13475-13480.
- Oshima M, et al. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS One.* 2011; **6**(7): e21531.
- Van der Weijden F, et al. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2009; **36**(12): 1048-1058.
- Kallu R, et al. Tooth transplantations: a descriptive retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; **34**(7): 745-755.
- Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; **5**(12): 685-697.



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～



1) 2) 3)

大島 正充¹⁾
齋藤 正寛²⁾
辻 孝³⁾

おおしま まさみつ

●東京理科大学総合研究機構助教、博士(歯学)。2005年岡山大学歯学部卒業。05～09年岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士後期課程。09～11年東京理科大学総合研究機構ポスドクトラル研究員、11年東京理科大学総合研究機構助教。1980年12月生まれ、香川県出身。研究テーマ：次世代の歯科再生医療の臨床実用化に向けての口腔組織や臓器の再生治療技術の開発

さいとう まさひろ

●東京理科大学基礎工学部生物工学科准教授、博士(歯学)。1989年神奈川県立歯科大学歯学部卒業。04年神奈川県立歯科大学歯科保存学講座講師。06年大阪大学大学院歯学研究科生化学教室講師。09年東京理科大学基礎工学部生物工学科准教授。11年現在に至る。1965年1月生まれ、米国ニューヨーク州ロチェスター出身。研究テーマ：歯および歯周組織の再生医療の実現化に向けての基盤となる分子メカニズムの研究、など

つじ たかし

●東京理科大学総合研究機構教授、同大学院基礎工学研究科教授兼務、博士(理学)。株式会社オーカンテクノロジー研究所所属。1986年新潟大学大学院理学研究科生物学専攻修了。山之内製薬(当時)研究員、日本たばこ産業(株)医薬探索研究所主任研究員等を経て、01年より東京理科大学基礎工学部助教、07年より教授、09年より現職。1962年1月生まれ、岐阜県出身。研究テーマ：21世紀型医療システムである再生医療の実現を目指す臓器再生技術の研究。歯や毛包、唾液腺、涙腺などをモデルとして細胞操作や器官デザイン、三次元的な血管の構築、器官培養の研究

●日歯ホームページメンバーズルーム内「オンデマンド配信サービス」および「Eシステム(会員用研修教材)」に掲載する本論文の写真・図表(の一部)はカラー扱いとなりますのでご参照ください。

要約

口腔機能は、健康や生活の質の維持、向上に重要な役割を果たしている。齲蝕や歯周病などの疾患に対する治療として、人工物による代替治療だけではなく、天然歯が有する生理機能を本質的に回復させる歯科再生治療の研究が進められており、21世紀の新たな治療システムとしての歯科治療へと発展することが期待されている。本稿では、歯科再生医療に関わる技術開発の現状について、組織修復治療と歯をまるごと再生する治療とに分類して解説する。

1. 歯科再生治療のコンセプト

咀嚼や発音などの口腔機能は、健康や生活の質の維持、向上に重要な役割を果たしている。歯と歯周組織は、上皮・間葉相互作用によって誘導される歯胚から発生し、象牙質、エナメル質、セメント質や歯槽骨などの硬組織と、歯髄や歯根膜といった軟組織からなる特徴的な構造を有している¹⁾²⁾。そのため多様な疾患が起こりやすく、齲蝕や歯周疾患による歯の実質欠損や喪失は、発音や咀嚼、咬合などの口腔機能に重大な問題を引き起こし、全身の健康状態に影響を及ぼすことが知られている¹⁾。

これらの疾患に対する歯科治療として、入れ歯やブリッジ、歯科用インプラントなどを用いた歯の機能代替治療が行われてきた³⁾。これらの人工物による代替治療は機能回復において有効であるとされているものの、骨リモデリングを介した歯の移動能や、侵害刺激

キーワード

歯科再生治療/再生歯胚/幹細胞

に対する応答能といった機能的咬合系の回復に必要な生理的機能を有していないことが問題とされており、天然歯が有する生理機能の回復を目指した生物学的な歯の治療の技術開発が期待されている。

最近の発生生物学、幹細胞生物学、組織工学的技術の進歩により、次世代を担う再生医療技術の研究開発が進められている。組織や臓器の部分的な損傷に対する治療として、幹細胞移入療法や、組織幹・前駆細胞の活性化と分化を誘導するサイトカインを用いた療法は、歯においても臨床応用が期待される魅力的な治療コンセプトとされている¹⁾。またこれまでに歯の発生や分化、それを制御する分子のやり取りについて数多く報告がされており、これらの知見は、将来の歯髄や歯周組織、歯槽骨の再生に向けて応用が期待される(図1)。

再生医療の最終的な目標は、疾患や外傷、加齢に伴う臓器や器官の損傷や障害を、機能的に完全な再生臓器・器官で置き換える臓器置換再生医療であり²⁾、歯科領域においても審美的・生理的・機能的に高いレベルの治療ニーズを満たす新しい治療技術として、近い将来に確立されることが期待されている³⁾。

これまでに、喪失歯に対する機能的な歯の再生治療技術の開発が過去30年にわたって進められてきた⁴⁾。最近、私たちは歯の喪失部位に再生した歯胚を移植することにより、正常な組織配置と咀嚼機能ばかりでな

く、周囲組織と連携機能する歯根膜機能と中枢と連結した神経機能を有する機能的に完全な歯の再生を達成した⁵⁾。

さらに幹細胞から作製した再生歯だけでなく、歯胚に由来する歯と歯周組織をひとつの機能ユニットとして創り出して移植するという、将来の臓器置換再生医療の実現可能性を示す歯の再生治療のコンセプトも提唱した。

本稿では、歯の組織修復や歯の置換再生治療の実現に向けたこれまでの技術開発についてまとめると共に、私たちの研究成果を中心に最近の進展について解説する。

2. 歯の発生

歯や毛、乳腺、腎臓などの器官は、胎児期の局所的な上皮細胞と間葉細胞の相互作用によって誘導される器官原基から発生する。歯は、胎仔期の未分化な上皮・間葉組織の相互作用によって誘導された「歯胚」から発生する(図2)。

歯の発生は、マウスでは胎齢10日目に歯の発生予定領域の上皮細胞が肥厚することで始まり、その後、間葉細胞側に陥入をはじめ、胎齢13日目にはその陥入領域に接する間葉細胞が密集して蕾状期歯胚となる。胎齢14日目には、上皮細胞がさらに陥入して間葉細胞を包

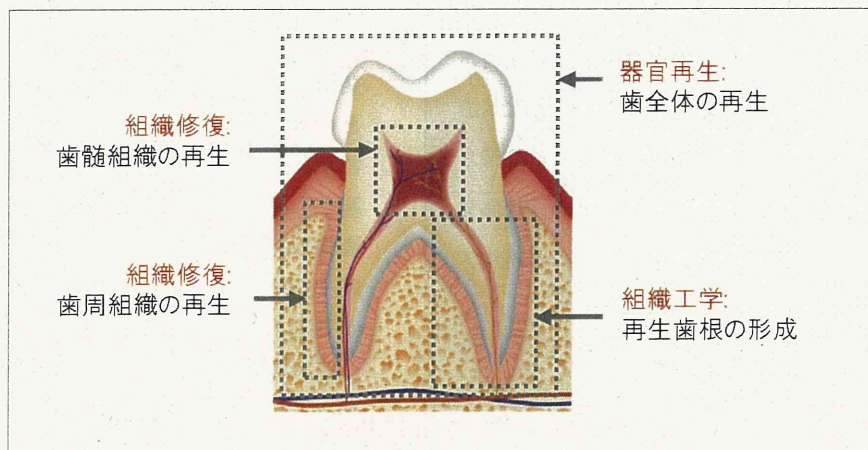


図1 歯科再生治療のコンセプト
歯の組織修復、組織工学による部分的な再生、歯全体の再生による歯科再生治療技術の開発戦略を示す。

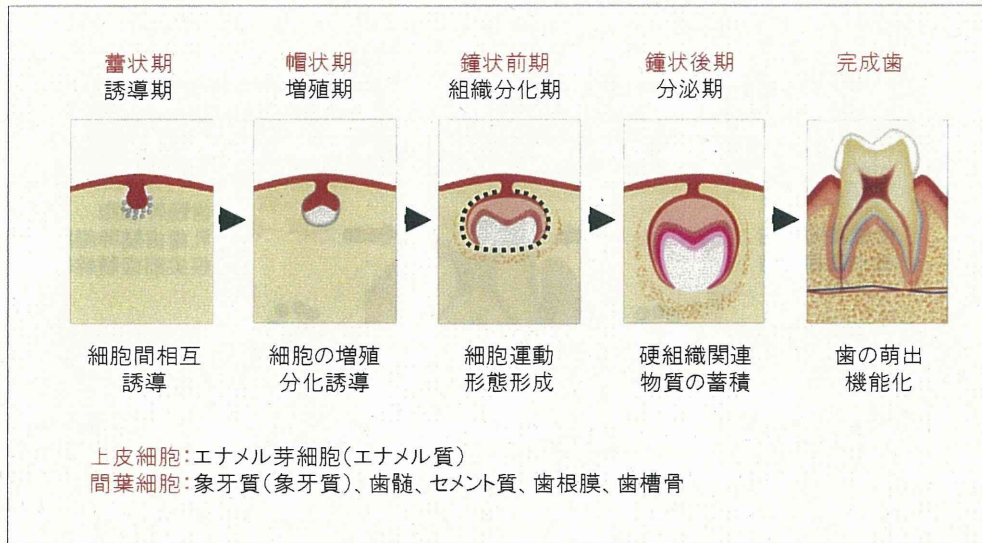


図2 歯の発生過程

歯の発生は口腔上皮の肥厚による間葉細胞側への陥入に始まり、歯原性上皮と歯原性間葉の相互作用により発生する。その後、蕾状期、帽状期および鐘状期の過程を経て、歯原性上皮からエナメル質、歯原性間葉から象牙質、歯髄、歯周組織を形成する。

み込むようになり（帽状期）、胎齢15日には上皮組織と間葉組織それぞれの組織から境界面に向けて、エナメル質と象牙質が分泌されるようになり、硬組織形成が始まる（鐘状後期）。また、歯胚由来間葉細胞から生み出される歯小嚢細胞はセメント質、歯根膜、歯槽骨からなる歯周組織に分化する。

その後、歯は垂直方向に伸長して歯根を形成すると共に、歯根部位では歯根膜などの歯周組織が形成されて歯槽骨と連結され、歯が口腔内に萌出して対合歯と咬合するようになると歯の成長は停止する。歯胚発生が終了した完成歯においても、歯の組織を構成する細胞に分化することが可能な成体組織幹細胞が存在することが知られており、その後の組織修復に寄与すると考えられている。

3. 歯組織由来幹細胞やサイトカインによる歯の組織修復治療

これまでに幹細胞研究の進展により、象牙質や歯髄、歯根膜、セメント質、歯槽骨などの形成に寄与する歯組織由来幹細胞の同定が進められ、細胞の分化能

をはじめとする性質が明らかにされつつある。

歯科治療においても、幹細胞を単離し、歯の組織を修復するための細胞移植治療に応用することが歯科再生医療の重要なコンセプトのひとつと考えられている（図3-A）。

1) 象牙質ならびに歯髄再生のための幹細胞による再生治療

歯乳頭から発生する歯髄は象牙質内部の結合組織成分であり、血管や神経、線維芽細胞、象牙芽細胞が存在する。その歯髄組織の中から、歯髄幹細胞と乳歯幹細胞が同定され、高い増殖能と象牙芽細胞や脂肪細胞、神経細胞への多分化能を有する歯の組織幹細胞であることが報告されている⁸⁷⁻¹⁰⁰。また、歯根形成途中の根尖部位に存在する根尖部歯乳頭組織にも根尖部歯乳頭幹細胞と呼ばれる幹細胞が存在し、高い未分化性の維持能力と旺盛な増殖能を有すると共に、象牙芽細胞や歯髄細胞への分化能を有する¹⁰¹。

罹患率の最も高い歯科疾患である齲蝕に対する治療として、一般的に人工材料による修復治療が行われている。歯科再生医療では、これらの組織幹細胞を齲蝕

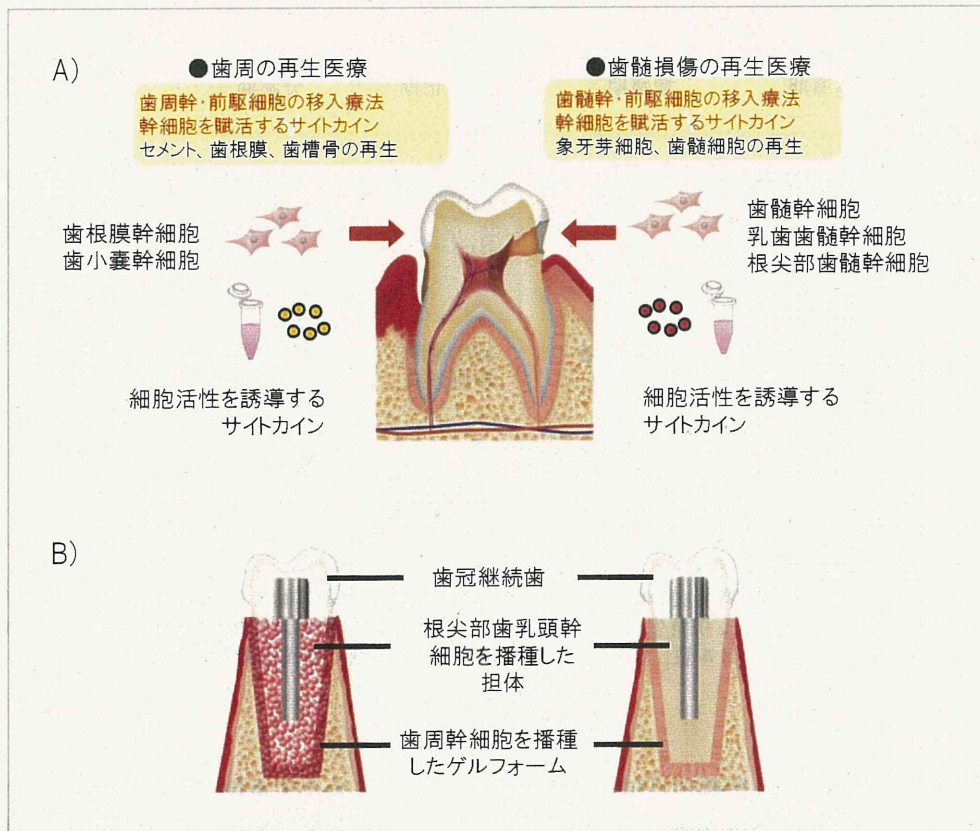


図3 歯の組織修復と組織工学（歯髄損傷、歯周疾患に対する歯の組織修復療法）

- A) 齶蝕や歯周疾患による組織傷害を修復するアプローチとして、歯組織由来の幹細胞を移入する治療法と、細胞活性を誘導するサイトカイン療法が開発されている。
- B) 組織工学による歯根の再生に向けて、歯根の形に成型したハイドロキシアパタイト製の担体に歯髄幹細胞を播種し、その上から歯周幹細胞を含むゲルフォームを巻きつけ、そこへ歯冠継続歯を装着する。この再生歯根は、歯槽骨内へ移植することによって再生歯根の周囲に象牙質と歯根膜を再生し、正常な歯の機能を果たすことが期待される。

部位に移入することで、象牙質や歯髄の組織修復を行うことを目指している（図3-A）。また最近では、組織に存在する幹細胞の賦活化による歯髄再生を目的として、歯髄幹細胞の増殖や、象牙芽細胞、歯髄細胞への分化を誘導するサイトカインによる治療技術の開発も進められている（図3-A）。

2) 歯周組織再生のための歯周組織および歯小囊に由来する幹細胞による再生治療

セメント質、歯根膜、歯槽骨からなる歯周組織は、咬合力を緩衝する結合組織である。歯周組織は歯周炎による長期間の炎症反応により、自然治療不可能な損

傷を受ける場合が多く、失われた歯周組織を再生する確実な治療技術は未だ確立されていないことから、組織再生が可能な幹細胞移入療法やサイトカインの応用が期待されている。

歯周組織を構成する細胞に分化可能な幹細胞としては、歯根表面に存在する歯小囊幹細胞や、成人の歯周組織に存在する歯根膜幹細胞が知られており、歯周組織再生治療のための細胞シースとして期待されている¹¹⁾。

これらの幹細胞移入療法に加えて、歯根膜細胞シート¹²⁾の技術開発や、歯周組織の再生を促進するためのサイトカイン療法¹³⁾の開発も進められており、歯周組織再

生の新たなアプローチになることが期待される (図3-A)。

3) 幹細胞と組織工学技術による再生歯根の形成

最近、歯の喪失に対するブリッジや入れ歯による歯科治療に代わって、歯槽骨に直接埋入する歯科用インプラントが有効な治療技術として急速に広まっている。歯科用インプラントの有用性は確立されているものの、インプラントには歯根膜機能が存在しないため、加齢成長に伴う歯の移動が起こらないという問題点が指摘されている。そのため、歯の生理的機能も回復させる治療法として、幹細胞を組織工学的に利用した歯根再生が進められている (図3-B)。

歯根の形態に成型したハイドロキシアパタイト (HA/TCP) の担体に根尖部歯乳頭幹細胞を播種し、その上から歯根膜幹細胞を播種したゲルフォームを巻きつけることによって歯根様構造物を形成し、その上に人工的な歯冠継続歯を装着することによって、歯の生理的機能が回復することが報告されている¹⁰⁾。この組織工学的手法は、歯根と歯周組織を結合させることで生理的かつ機能的な歯根を再生する方法であり、幹細胞による組織再生技術と、現在の人工材料による補綴治療を統合した再生医療技術の一つになることが期待される。

4. 臓器置換再生医療としての歯の再生

幹細胞移入療法により、部分的な組織修復の可能性は示されているものの、現在の再生工学技術では、高度に複雑化した臓器・器官を再構築するという最終目標には到達していない。これまでに、機能不全に陥った臓器・器官を機能的な代替臓器・器官と置換する技術開発が数多く試みられてきており、機械製の人工臓器や、細胞と人工材料を用いたハイブリッド型人工臓器の研究開発が進められてきた。

さらに、歯や毛のような外胚葉性器官の再生では、未分化な幹細胞から三次元的な細胞操作によって再生器官原基を作製し、上皮・間葉相互作用による胎児期

の器官形成を再現させることによって、機能的に完全な再生器官を発生させるアプローチが考えられている¹¹⁾。歯をまるごと再生する治療技術の開発では、上皮細胞と間葉細胞を用いて再生歯胚を再生する三次元的な細胞操作技術が進められている。

1) 生分解性スキャフォールドを用いた歯胚の再生

天然材料ならびに人工ポリマーで作製した分解性のスキャフォールドを用いる方法では、任意の形態を有する組織を再生することが可能である。この技術は、均一な細胞配置を有する三次元的組織を形成する技術として高い有効性が示されており、骨や軟骨の再生治療に向けた臨床応用化が進められている。これまでに、歯の形に成型した人工材料にブタ第三大臼歯、またはラット蓄状期歯胚の上皮細胞と間葉細胞を播種することによって、小さな歯組織を形成できることが報告されている⁵⁾。

このようにスキャフォールド法は、再生歯の形や大きさの制御に有望な技術であるものの、歯の発生頻度が低く、天然歯と同等の組織構造を有する再生歯を形成させることが困難とされてきた。

2) 細胞凝集法を用いた再生歯胚の形成

細胞凝集法は、器官原基を再構築することによって、器官形成における上皮・間葉相互作用を再現する再生工学的手法のひとつである¹²⁾。これまでに遠心分離により上皮細胞と間葉細胞を沈殿させ、貼り合わせた人為的な歯胚から、完全な歯の形成が可能であること、さらに臼歯歯胚から単離した上皮細胞と間葉細胞を混合した細胞凝集体からも、正常な組織構造を有する歯が形成されることが報告されている¹³⁾。

私たちは、新しい技術として、高細胞密度の上皮細胞と間葉細胞を三次元的な細胞操作技術により区画化して再配置する「器官原基法」を開発した⁴⁾ (図4-A)。この方法により再生された歯胚は、高頻度に、組織構造を有する歯を再生するばかりでなく (図4-B)、毛包の再生にも応用可能な、幅広い器官再生の研究に道を拓いた (図4-C)。

さらに本技術において、上皮細胞と間葉細胞の接触

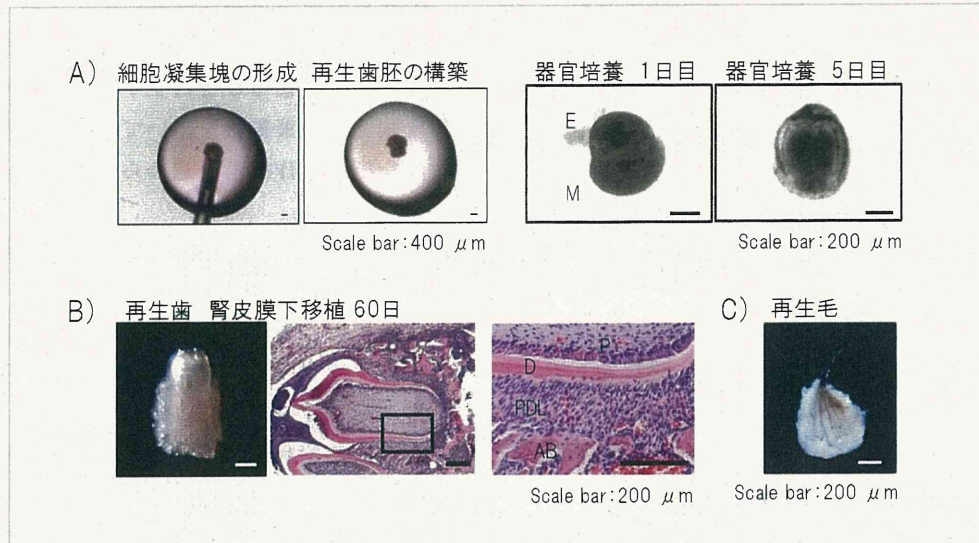


図4 器官原基法による再生歯胚の作製

- A) 器官原基法による再生歯胚の作製と器官培養像。
 E：上皮細胞凝集塊，M：間葉細胞凝集塊。
 B) 再生歯胚を腎皮膜下に移植することにより発生した再生歯の実体像（左図）と組織像（中図，右図）。P：歯髄，D：象牙質，PDL：歯根膜，AB：歯槽骨。
 C) 器官原基法により作製した毛包原基から作製した再生毛。

面積を調節することによって、歯の太さと咬頭の数を制御することを可能とし、従来技術と比較して技術レベルの高い細胞操作技術であることを示した¹²⁾ (図5)。

5. 成体内における機能的な歯の再生

将来の実用化に向けた歯の再生治療を考えると、再生した歯が組織学的に正常であることだけでなく、レシピエントの周囲環境や神経系と連携機能することにより、喪失した機能を完全に補うことが期待されている。歯科再生治療としては、再生歯胚を歯の喪失部位に移植をして萌出、機能させる方法と (図6 - 上段)、再生歯胚から成熟した歯の構造体である再生歯ユニットを作製し、口腔内に移植、生着させる方法とが考えられる (図6 - 下段)。

咀嚼や発音、審美性といった口腔機能は、歯や咀嚼筋、顎関節が中枢神経系の制御下において協調して機能することにより成立している (図7)。このことから再生歯においても、顎顔面領域における咬合機能

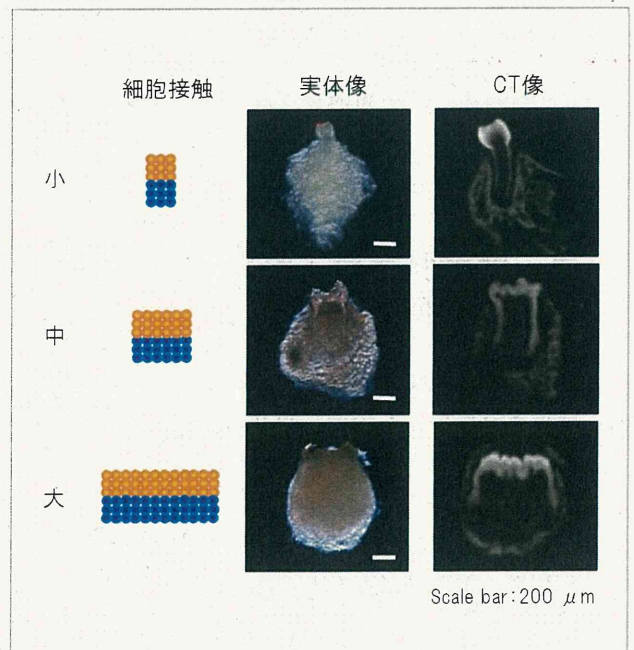


図5 細胞の接触距離における歯冠幅と咬頭数の解析
 器官原基法による歯胚再構成において、上皮細胞と間葉細胞の接触距離を変えることにより、形成される再生歯の歯冠幅が拡大し、形成される咬頭数が増加している。

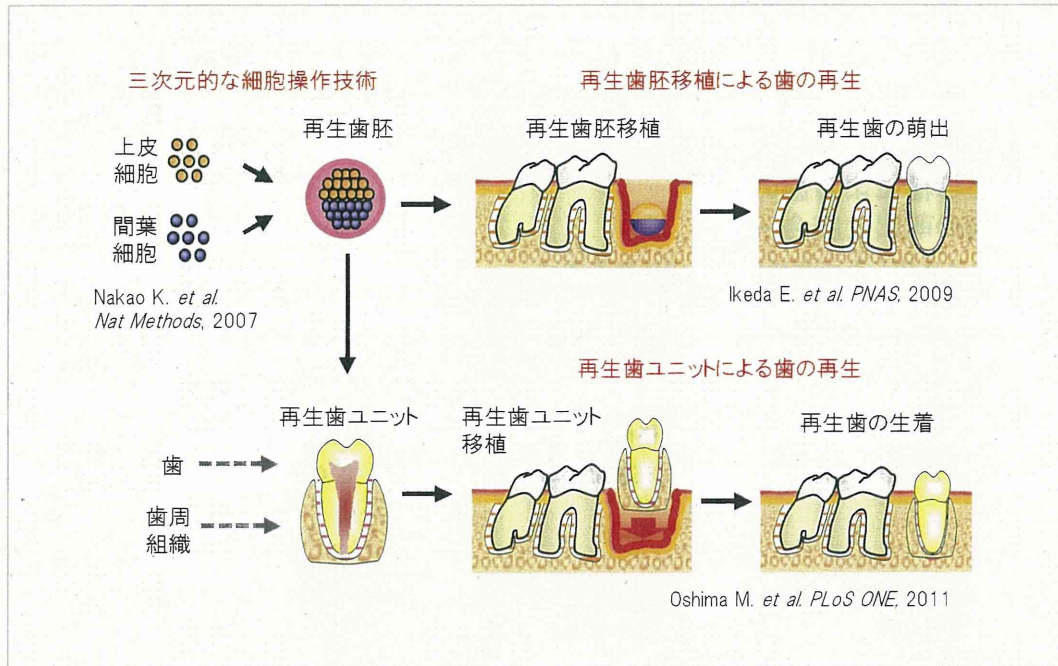


図6 再生歯胚を用いた歯の再生戦略
 器官原基法によって上皮細胞と間葉細胞を再構築して作製した再生歯胚，ならびに再生歯胚から完成した歯の構造体として作製した再生歯ユニットを移植することによって，成体内で歯を再生する戦略が考えられる。

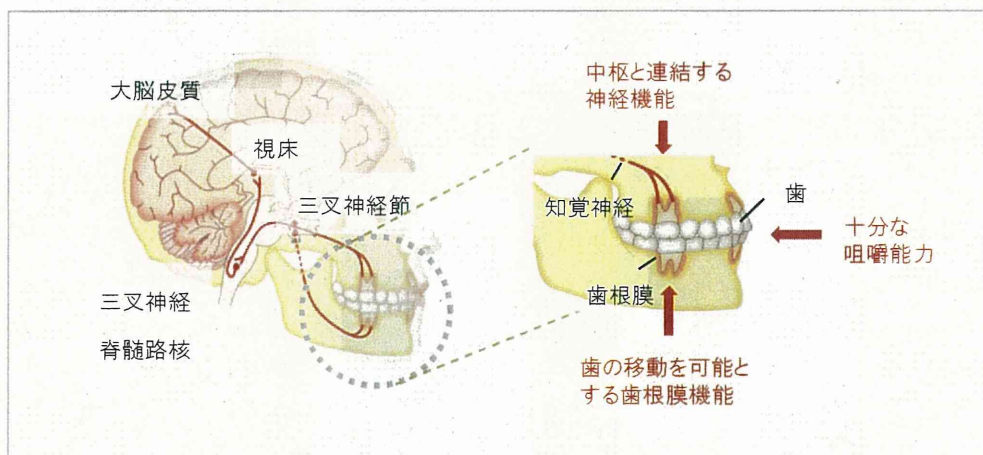


図7 顎顔面領域における口腔機能の調和
 咀嚼や発音，審美性などの口腔機能は，咀嚼筋と顎関節が中枢神経系によって制御されることにより協調的に機能する。歯には対合歯との咬合における十分な咀嚼機能，顎顔面領域の組織と共に機械的外力と侵害刺激に対して応答する歯根膜機能，さらには歯に対する侵害刺激を歯髄や歯根膜の知覚神経が受容し，三叉神経脊髓路核へ刺激を伝達する神経機能を有している。

や、機械的外力に反応する歯根膜機能、侵害刺激の伝達が可能の中樞と連結した神経機能を有する、機能的に完全な歯を再生することが望まれている。

1) 再生歯胚移植による歯の再生 —再生歯の萌出と咬合—

歯の喪失部位に移植した再生歯胚が、成体顎骨内で発生して萌出して対合歯と咬合することは、歯科再生医療に向けた重要な課題のひとつである。

私たちは、再生歯胚による歯の再生を解析するため、まずマウスの歯欠損に対する再生歯胚移植モデルを構築した⁷⁾。マウス第一臼歯を抜歯し、3週間かけ

て抜歯窩を治癒させた後、ドリルを用いて欠損部歯槽骨に移植窩を形成して再生歯胚を移植した。移植後37日目には、約80%の頻度で再生歯が萌出し、49日目には対合歯と咬合するまで成長した(図8-A)。

萌出した再生歯を経時的に観察してみると、再生歯は対合歯との咬合面に到達すると成長が停止し、生理的に移動しながら咬頭(歯の咬合面の突起)が対合歯の小窩とかみ合って、天然歯と同様に咬頭嵌合を確立することが判明した(図8-B, C)。また再生歯は、エナメル質や象牙質、歯髄、歯根膜、歯槽骨が天然歯と同等の組織構造を有していることが判明した(図8-D)。さらに緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現

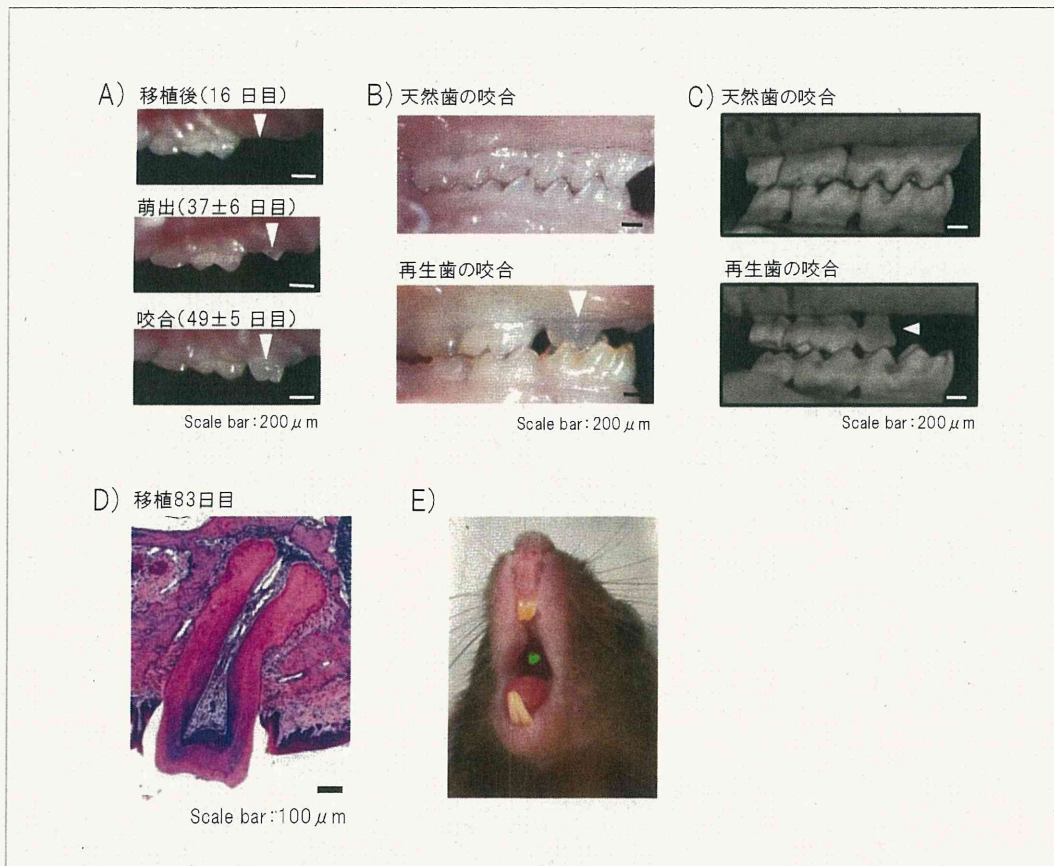


図8 成体マウス口腔内で発生・萌出した再生歯

- A) 再生歯胚移植後の再生歯の萌出と成長過程(矢頭:再生歯)。
- B) 天然歯(上図)および再生歯(下図, 矢頭:再生歯)における咬合状態の口腔内写真。
- C) 天然歯(上図)および再生歯(下図, 矢頭:再生歯)における咬合状態のCT像。
- D) 口腔内に萌出した再生歯の組織像。
- E) GFP標識された再生歯の口腔内写真。

しているマウスに由来する再生歯胚の移植実験から、再生歯胚由来の細胞により歯が再生し、萌出したことが証明された(図8-E)。

このことから、再生歯胚を移植することによって成体口腔内に再生歯が萌出し、天然歯と同等の咀嚼機能を回復させる可能性が示された⁷⁾。

2) 再生歯ユニット移植による歯の再生 —再生歯の顎骨生着と咬合—

器官原基移植による治療では成熟器官への発育、機能化には期間が必要である。機能不全の臓器に対する移植治療では、即時・早期の機能化が要求されることから、臓器置換再生医療をより実現可能なものとするには、再生した器官原基から成熟器官にまで成長させた再生器官を移植して、即時・早期に機能させることであると考えられる。そのため、歯科再生治療における理想的な治療技術は、完成された再生歯を移植してインプラントや自家歯牙移植のように即時利用を可能とすることである。

歯は、歯とそれを支持する歯根膜や歯槽骨を含めてひとつの機能ユニットとしてみなすことができ、これらの組織はすべて歯胚から発生・分化することが知られている⁸⁾。最近、私たちは、再生歯胚から歯と、歯の周囲に歯根膜・歯槽骨を伴う1本ならびに複数本の再生歯ユニットをつくりだすことに成功した。再生歯ユニットはひとつの歯槽骨の中、1本から複数本の再生歯を創ることが可能である(図9-A, B)。この再生歯ユニットを対合歯と咬合関係を成立させて移植をすると、移植40日目には再生歯周囲の歯槽骨の結合が認められ、再生歯ユニットが骨性結合を介してレシピエント歯槽骨に生着し、機能することが示された(図10-A, B)。

一方、歯の喪失部位では歯槽骨の吸収が起こり、インプラントや自家歯牙移植などの移植治療が困難になることが知られている。このような症例では、自家骨移植や骨補填材による骨再生療法後にインプラントを移植する治療が取り組まれているものの、より骨再生効果が高い治療技術の開発が期待されている。

私たちは、再生歯ユニットが歯槽骨を有して骨欠損部位に移植できることから、歯のみならず歯槽骨を含

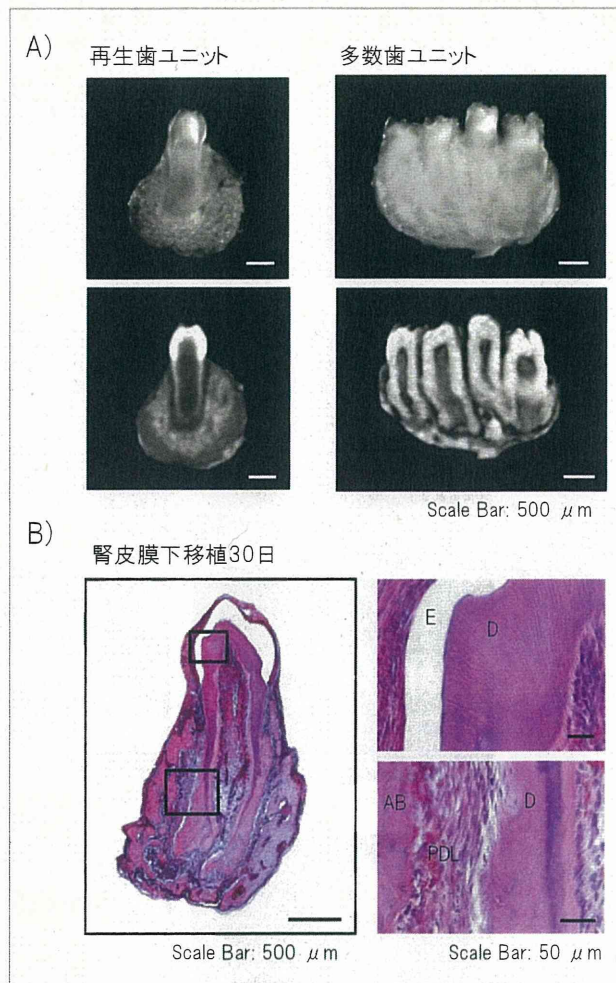


図9 再生歯ユニットの作製

- A) 再生歯胚から作製した再生歯ユニット(左図)と、複数の再生歯胚から作製した多数歯ユニット(右図)の実態像(上段)とCT断層像(下図)。
B) 再生歯ユニットの組織像(左図:全体像, 右図:拡大像)。E:エナメル質, D:象牙質, AB:歯槽骨, PDL:歯根膜。

めた包括的な再生が可能であると考え、研究を行った。成体マウス下顎骨の第一臼歯を抜歯し、歯槽骨を取り除いた広範性骨欠損モデル(図10-C)に再生歯ユニットを移植すると、再生歯が生着すると共に、垂直的な歯槽骨の再生が認められた(図10-D)。

このことから、再生歯ユニットを移植することにより、歯と歯周組織を包括的に再生する歯科再生治療になる可能性が示された¹³⁾。

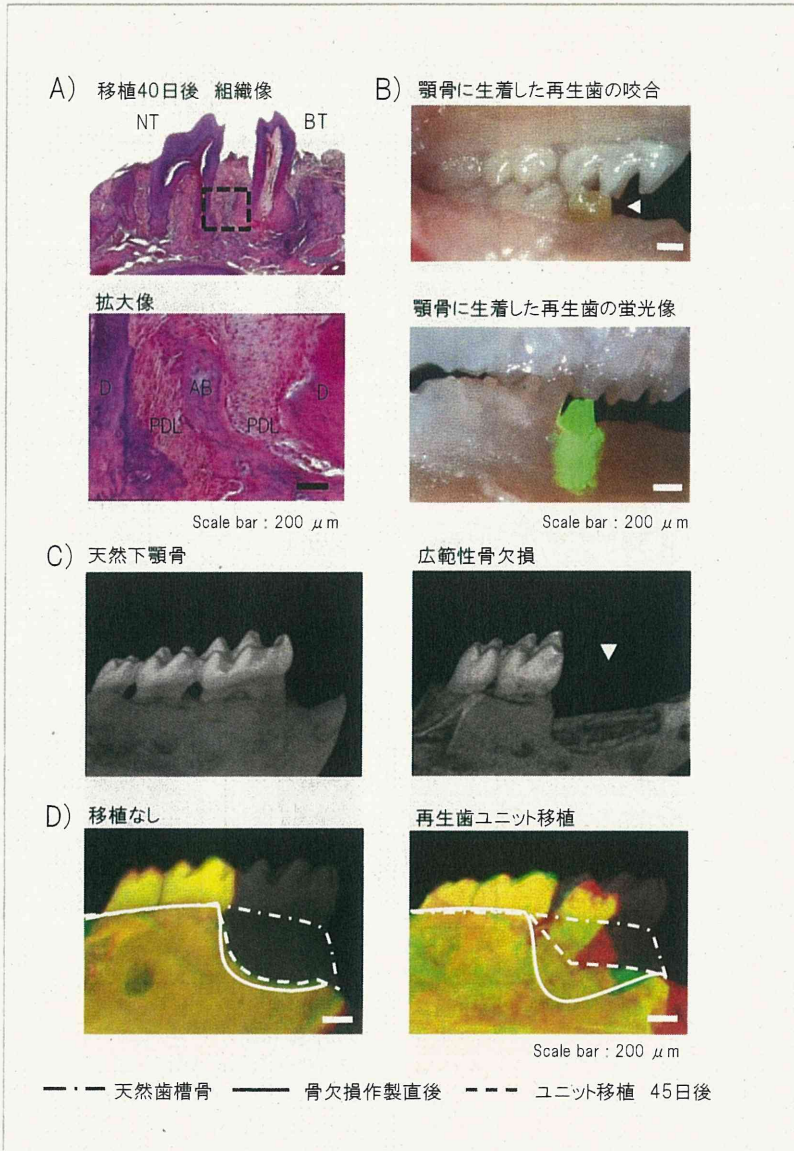


図10 再生歯ユニットの生着と歯槽骨回復効果

- A) 移植40日後の顎骨に生着した再生歯ユニットの組織像。
 NT: 天然歯, BT: 再生歯, D: 象牙質, AB: 歯槽骨, PDL: 歯根膜。
- B) 顎骨に骨性結合をした再生歯ユニット (上図) と蛍光色素を沈着させた再生歯の蛍光画像 (下図)。
- C) 成体マウスの天然下顎骨 (左図) と、広範性骨欠損モデル (右図, 矢頭: 欠損部)。
- D) 広範性骨欠損モデルに再生歯を移植して45日後のCT像の重ね合わせ。正常な歯槽骨レベル (一点鎖線: - · - · -), 広範性骨欠損モデル作成時の骨レベル (実線: ———), 再生歯ユニットの非移植群, 移植群の骨の回復レベル (点線: ·····)。

3) 再生歯の機械的外力への応答

歯根膜は、過剰な機械的外力に対する緩衝能を有するばかりでなく、歯科矯正治療における歯槽骨のリモデリングを介した歯の移動において重要な役割を果たすことが知られている (図11 - A)。そこで、再生歯胚移植によって萌出した再生歯に実験的矯正を加えると矯正6日目には歯周囲の歯根膜の形態が変化すると共に、牽引側では骨形成が起こり、逆に圧迫側では骨吸収が認められ、矯正17日目には再生歯が天然歯と同様に移動することが判明した (図11 - B)。また、再生歯ユニット移植によって生着した再生歯によっても同様の結果が認められた。

これらのことから、再生歯は顎顔面領域の連携機能を修復することにより、歯根膜を介した歯の生理的機能を再生することが示された^{7,13)}。

4) 再生歯の知覚神経機能

末梢神経系は、胎児期において発生している器官からの誘引と中枢神経との連結によって確立され、臓器機能の発現制御や侵害刺激の中枢への伝達に重要な役割を果たすことが知られている。歯には知覚性の三叉神経が侵入しており、歯の正常な機能発現と保護に重要であることから、知覚性の神経機能を回復させる歯科再生治療が期待されている。

最近、私たちは再生歯胚を移植することにより、萌出した再生歯の歯髓と歯根膜に交感神経や知覚神経などの神経線維が侵入していることを明らかにすると共に (図12)、それらが正常に侵害刺激を受容して中枢神経系に伝達することを実証した⁷⁾。さらに完成歯である再生歯ユニット移植においても

同様に、神経線維の侵入、ならびに中枢神経系への刺激伝達が可能であることを明らかにした¹³⁾。

これらの結果から、再生歯による歯全体の再生治療は、咀嚼や機械的外力に対する応答だけではなく、侵害刺激を中枢に伝達するという歯の機能も再生できる可能性が示された^{7,13)}。

6. 結び

この数年間の間に、歯科再生医療の技術開発は大きな進展を見せ、組織修復療法のみならず、歯をまるごと再生するための治療法として再生歯胚の移植治療や

再生歯ユニットを用いた歯周組織を含めた包括的な治療法の概念が示された。今後、これらの治療法を実用化するには未だ解決すべき課題が残されている。

組織修復療法は、治療に必要な幹細胞はほぼ特定されており、患者本人の細胞を利用した臨床研究が進められている。またヒトサイトカインもその作用機序も明らかにされつつあり、今後、再生治療用医薬品としての臨床開発が加速されることが期待される。一方、歯をまるごと再生する治療の実現には、免疫学的な拒絶反応を避けるため、患者に由来する細胞を用いて歯胚を再生する必要がある。この細胞シーズの探索研究は、現在、世界中で進められており、組織修復のため

の組織幹細胞では歯胚再生の細胞シーズとしては不十分であり、胎児期の歯胚誘導を再現しうる能力をもつ幹細胞や、多能性のiPS細胞からの歯胚誘導などの研究開発が期待される。

また、歯をまるごと再生するための治療法としては、ヒトの場合には再生歯胚から歯を再生するには数年の期間が必要であるため、再生歯ユニットを移植する治療技術の開発が期待される。そのためには、再生歯胚を生体外で培養し、短期間で移植可能な再生歯を製造する技術開発も必要である。現在のところ、細胞凝集塊や組織、器官を培養可能なシステムの開発は十分ではなく、三次元的な培養システムや、それを三次元的な血管ネットワークシステムを利用した培養システムの開発などに連携させることにより、その実現が図れるものと考えられる。

今後、歯科再生治療に向けた基盤技術開発と臨床応用化研究を推進することによって、歯科再生治療を実現することが期待されると共に、歯科再生治療が臓器置換再

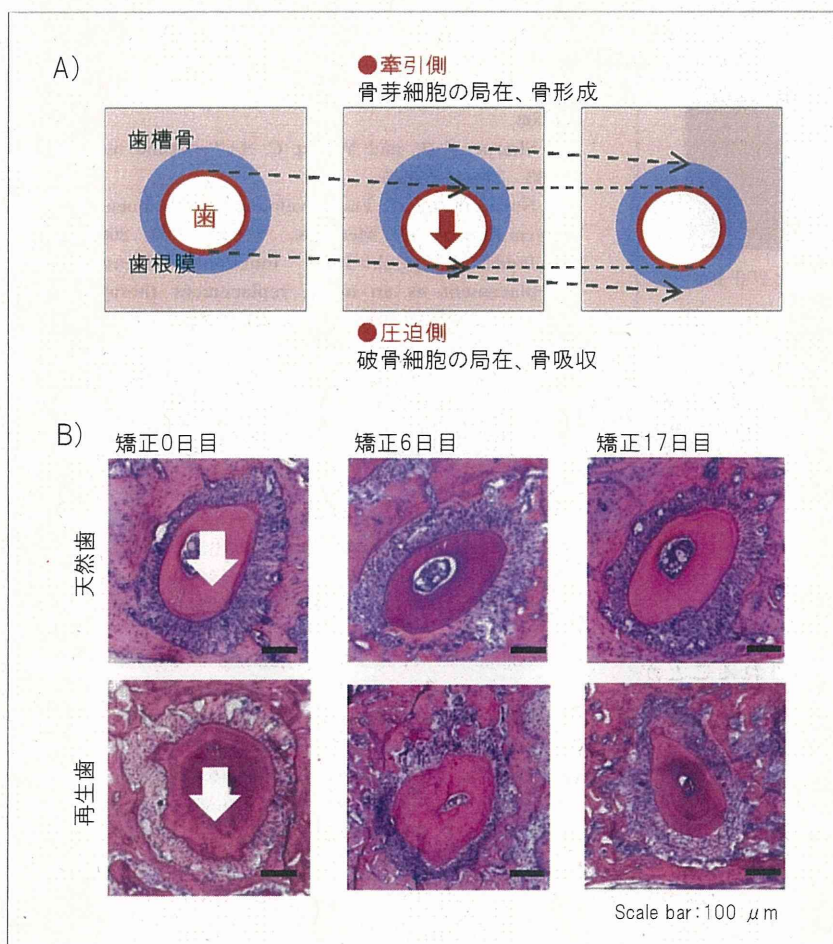


図11 再生歯歯根膜の骨リモデリング能

A) 矯正力を加えた場合の歯の移動の模式図。

B) 天然歯(上段)ならびに再生歯(下段)における矯正0日目、6日目、17日目の組織像。

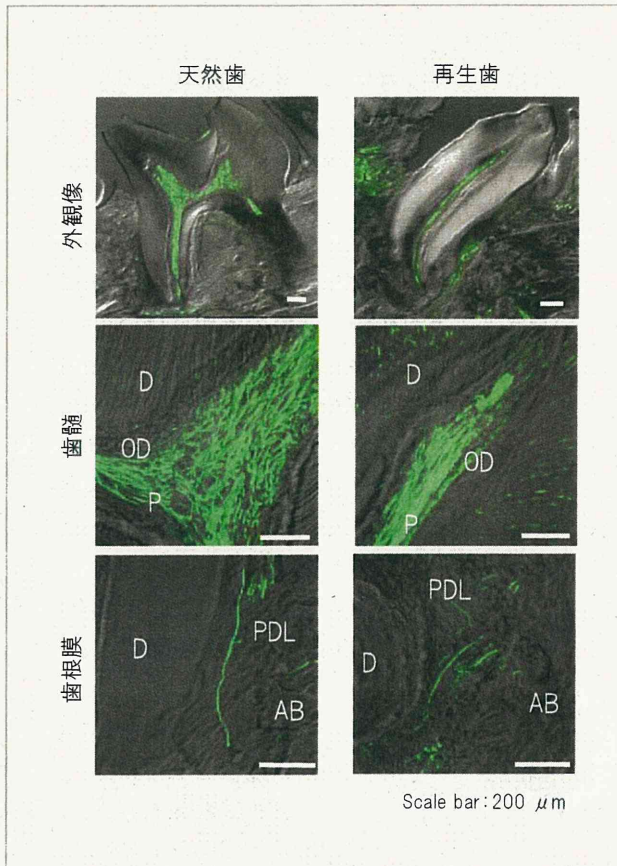


図12 再生歯の神経機能

天然歯および再生歯の歯髄ならびに歯根膜の神経線維の分布。D：象牙質，OD：象牙芽細胞，P：歯髄，AB：歯槽骨，PDL：歯根膜。

生医療の最先端のフィジビリティスタディモデルとして、幅広い臓器・器官再生研究に応用されることが期待される^{1,5)}。

<謝辞>

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金・再生医療実用

化研究事業（H21～23年度，代表：東京医科歯科大学・山口朗教授），文部科学省・特定領域研究「マルチスケール操作によるシステム細胞工学」（H17～21年度，代表：名古屋大学・福田敏男教授），文部科学省・科学研究費補助金・基盤研究A（H20～22年度，代表：辻孝），同・若手研究B（H22～23年度，代表：大島正充），株式会社オーガテクノロジーズ共同研究費などの研究費により行われました。

参考文献

- 1) Ikeda, E. and Tsuji, T.: Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 8 : 735~744, 2008.
- 2) Pispas, J. and Theisell, I.: Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev. Biol.*, 262 : 195~205, 2003.
- 3) Brenemark PI, Zarb, G. A., Albrektsson, T.: *Osseointegration in clinical dentistry*. Quintessence, 1985.
- 4) Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. and Longaker, M. T.: Wound repair and regeneration. *Nature*, 453 : 314~321, 2008.
- 5) Sharpe, P. T. and Young, C. S.: Test-tube teeth. *Sci. Am.*, 293 : 34~41, 2005.
- 6) Nakao, K. et al.: The development of a bioengineered organ germ method. *Nat. Methods*, 4 : 227~230, 2007.
- 7) Ikeda, E. et al.: Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106 : 13475~13480, 2009.
- 8) Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. and Shi, S.: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97 : 13625~13630, 2000.
- 9) Miura, M. et al.: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100 : 5807~5812, 2003.
- 10) Sonoyama, W. et al.: Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE*, 1 : e79, 2006.
- 11) Seo, B. M. et al.: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 361 : 149~155, 2004.
- 12) Ishida, K. et al.: The regulation of tooth morphogenesis is associated with epithelial cell proliferation and the expression of sonic hedgehog through epithelial-mesenchymal interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 405 : 455~461, 2011.
- 13) Oshima, M. et al.: Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE*, 6 (7) : e21531, 2011.

東京理科大学 科学教養誌

ISSN 1346-1206

理 科学フォーラム

特集 / 世界遺産と建築工学

産学官連携と実用化への挑戦

層状ケイ酸塩を用いたスクワランの非加熱精製法の確立と
新産業創出の可能性

プラネタリウムで見るハヤブサ7年間の軌跡

南極体験 無人飛行機による観測

役に立つiPadアプリの作成技術とその応用

落下運動の世界



2011.6

(通巻 324号)

蘇る臓器， 再生医療の実現化への挑戦

基礎工学部 生物工学科 准教授 齋藤 正寛
総合研究機構 社会連携部 教授 辻 孝

はじめに

私たちの研究室では、再生医療を中心とする「革新的な医療」の創出につながる技術開発を目指した研究活動を行っています。そのために、生命科学の領域のなかでも、「器官再生」と「糖タンパク質工学」の分野を重点研究プロジェクトとした研究活動を推進しています（図1）。器官再生プロジェクトでは、人工臓器を作製し、病気で働かなくなった臓器を取り換える臓器置換再生医療、また臓器を生きた状態で長期間維持する臓器培養の技術開発を行っています。このプロジェクトで、歯および毛の再生医療、また臓器培養装置の開発研究を推進しています。糖タンパク質工学プロジェクトでは糖タンパク質医薬品の開発による革新的バイオ医薬品の創造を目指しています。私たちの研究室では、これらの研究活動を通じて、「学術への貢献」「社会への貢献」「人材の成長への貢献」の理念

のもとに大学での教育に取り組んでいます。

本稿では上述の研究活動の中でも、歯と毛をモデルとした臓器置換再生医療の研究成果に関して紹介させていただきます。

人工臓器の作製と臓器置換再生医療

一般的に臓器の再生と発生は同じ機構で制御されています。例えば、イモリは目の水晶体を取り除いても再生することが知られています。この場合は虹彩の中に存在する幹細胞が失われた水晶体部分へ移動し、水晶体の発生を再現して再生します。再生医療とは、幹細胞を利用して、病気により働かなくなった臓器を機能回復させる治療技術のことです。再生医療は、ドナー不足などの多くの問題を抱えている「臓器移植」を必要とする病気に苦しむ人を助ける新たな治療技術として期待されています。

ほとんどの臓器は、その発生過程で上皮と間葉由来の幹細胞の集合体から成る器官原基と呼ばれる種のような組織から形成されます。私たちは、この器官原基に着目し、細胞操作により人工的に器官原基を形成し臓器を再生させる「器官原基法」の開発を試みました。この「器官原基法」は、次世代の再生医療技術として、生体外で人工的に再生した臓器と置換する臓器置換再生医療への発展が期待されています。

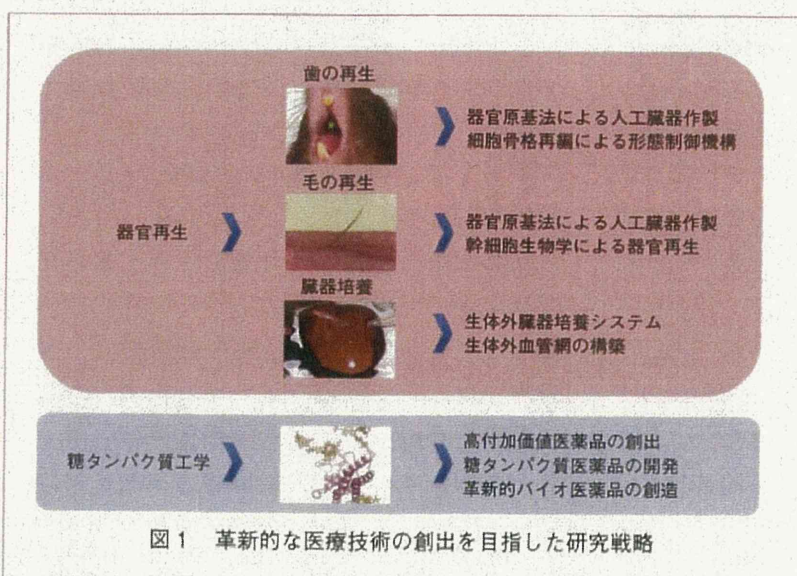


図1 革新的な医療技術の創出を目指した研究戦略

臓器置換再生医療のモデルとしての歯と毛

臓器置換再生医療の実現化を目指すため、私たちの研究室では歯と毛をモデルに人工臓器である“再生歯”ならびに“再生毛”作製の技術を開発しました。図2に、器官原基法を用いて歯と毛を再生させた実施例を示しています。歯の場合、器官原基は歯胚と呼ばれ、上皮と間葉から構成され、これら二つの細胞がお互いに作用しながら歯を形成します。そこで私たちはマウス胎児より歯胚を取り出し、酵素処理によって歯胚の上皮と間葉の単一化細胞を得た後に、コラーゲンゲル内でこれらの細胞を高細胞密度で区画化して再構築することにより、歯胚を再構成（再生歯胚）しました。この再生歯胚をマウス顎骨に移植すると、再生歯として萌出することが分かりました。再生歯の萌出過程を観察すると、歯胚の発生成長を再現していることが確認され、また自然の歯と同じく周囲の骨と靭帯を介して強固に結合していることが分かりました。さらに緑色蛍光タンパク質（GFP）で標識した再生歯胚を移植するとGFP陽性の再生歯を形成したことから、再生歯は移植した再生歯胚により形成されたことが証明されました。

同様の技術を用いて毛の器官原基である毛包原基を用いて再生毛を作製しました。電子顕微鏡で再生毛を分析すると、自然の毛と同様に中心に毛髄、周囲に毛皮質が確認されました。また再生毛は自然の毛と同様に成長後に抜け、新たに生え変わる毛周期を繰り返すことが観察されるばかりでなく、その周囲には「立毛筋」と呼ばれる筋肉が付いており、自然の毛と同様に寒冷刺激で再生した毛も立つことが判明しました。さらに色素細胞を含めて再生毛包を培養すると黒い毛になること

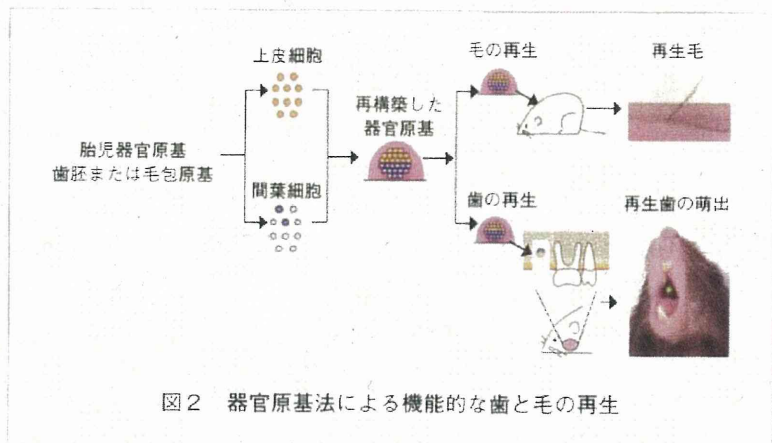


図2 器官原基法による機能的な歯と毛の再生

も分かりました。

このように歯と毛をモデルとした研究成果により、器官原基法を用いれば機能臓器は再生できることが示されました。今後の臓器置換再生医療が実現化するための課題としては、器官原基法による三次元的な細胞操作に加えて、人為的な血管網の作製を含む、器官原基を育成する培養技術開発が必要になります。そのため、わたしたちの研究室では、生体から臓器を摘出し、生体外で培養する技術開発に取り組んでいます。この技術開発は、将来の器官原基育成とともに、移植医療のための臓器を長期間維持する移植医療の基盤技術として発展することが期待されます。

おわりに

本稿では、器官再生を中心に、私たちが取り組んでいる研究内容の一部を紹介させて頂きました。冒頭でも述べましたように、私たちの研究室では、再生医療技術の開発以外に糖鎖生物学、細胞生物学を中心とした基礎的研究で、再生に必要な生命現象を理解する研究活動も進めております。これらの研究活動を通じて学術的に価値ある成果をあげ、社会に貢献する長期的展望に立った幅広い知識と視野、そして研究開発能力が養うことのできる、次の世代を担う学生へと成長するような人材育成を目指しています。

認識有關「牙齒再生」之幹細胞發展的基本專有名詞

■ 蘇志鵬¹ / 李勝揚² / 辻孝³

隨著科技發展的突飛猛進與幹細胞研究的一日千里，再生醫學 (regenerative medicine) 已逐漸成熟地將組織再生 (tissue regeneration) 的研究推展至器官再生 (organ regeneration，如心臟、牙齒等) 的重要階段。此突破性的里程碑，在牙醫學上，將可使人類與生俱有的乳齒列期 (primary dentition) 及永久齒列期 (permanent dentition)，再進階至牙齒再生齒列期 (tooth regeneration dentition)。

不久的將來，若牙齒再生的人體試驗可順利成功時，人工植體 (artificial implant) 將會被幹細胞所培養出來的齒胚種植 (tooth germ implant) 所取代；牙齒擁擠的病例，亦可以拔除更多顆牙齒並植入數顆人工齒胚，等這些牙齒萌出後再做簡單的排整，即可完成昔日複雜的矯正治療。此震撼性的發展，將造成今後臨床牙醫治療觀念與方式的革命性改變。

此次，經由東北大學山本照子教授的介紹，有幸邀請到國際知名之牙齒再生研究的先驅者 - 日本東京理科學的辻孝教授，蒞臨台灣口腔矯正醫學會 2011 年之年度大會講演「牙齒再生的最新發」。而本篇報告的目的即是在簡述有關「牙齒再生」之幹細胞發展的基本專有名詞，讓臨床牙醫師與研究幹細胞之入門者能在

聆聽辻教授演講時，能立即「融會貫通」而不虛此行。

1. 再生醫學 (Regenerative medicine)：結合細胞學、基因學、組織工程學等之知識與技術，達成對患者受損或罹病 (damaged or diseased) 組織與器官的再生、修復或置換 (repair or replacement) 之醫學。
2. 幹細胞 (Stem cell)：人體是由很多的細胞 (成人約有 60 兆個細胞及 200 種以上的種類) 組成。而其中，若能夠「孕育出細胞」的細胞稱為幹細胞。幹細胞具有基本之兩大特性 - (1) 它可自我更新，亦即幹細胞可以自我分裂為幹細胞 (2) 它也可分化為成熟細胞，以產生、補充或修復各部位的組織。故又被稱為「細胞種子 (seed of cells)」(表一)(圖一)。

[表 1] 幹細胞的其他特性：

- 1) 位於各別組織的特定部位
- 2) 在人體的整體細胞中，僅少數存在
- 3) 幹細胞內具有大型的核，小器官較少，形態上沒有什麼特徵
- 4) 具多能性
- 5) 雖是慢慢分裂，但亦會因刺激而激化分裂
- 6) 具有較個體長壽的能力
- 7) 周圍的微小環境，對幹細胞的維持與分化是重要的
- 8) 多數的癌是由幹細胞或幹細胞稍為分化的細胞所發生