

戦略と展開一, 第 186 回生命科学フォーラム, 東京・日本記者クラブ, 2010 年 7 月 28 日

辻 孝, 歯科再生治療の実現を目指した「歯の再生」研究の戦略と展開, 第 30 回昭和歯学会総会, 東京・昭和大学歯科病院, 2010 年 7 月 3 日

辻 孝, 次世代歯科治療としての歯の再生, 鶴見大学 大学院・研究者セミナー, 神奈川・鶴見大学, 2010 年 6 月 29 日

辻 孝, 歯の機能的な再生を目指した基盤技術の開発, 第 64 回日本口腔科学会学術集会, 札幌・札幌プリンスホテル国際館パミール, 2010 年 6 月 24 日

辻 孝, 歯科再生治療の実現に向けた研究戦略と展開, 第 11 回九州臨床再生歯科研究会 講演会, 福岡・福岡県歯科医師会館, 2010 年 6 月 20 日

辻 孝, 未来の歯科治療としての歯科再生医療, 日本歯科企業協議会 第 39 回年次総会, 東京・ホテルグランドパレス, 2010 年 6 月 15 日

中尾一久, 辻 孝, 臓器置換再生医療に向けた歯の再生の現状と課題, 日本組織培養学会第 83 回大会, 岡山, 岡山大学創立 50 周年記念館, 2010 年 5 月 21 日

辻 孝, 歯の再生に向けた研究の現状とその未来像, 東京都中央区京橋歯科医師会学術講演会, 東京, 京橋プラザ, 2010 年 5 月 19 日

辻 孝, 未来の歯科医療としての歯科再生医療, 東京歯科大学創立 120 周年記念学術講演会, 東京, 東京国際フォーラム, 2010 年 5 月 8 日

辻 孝, 再生歯胚移植による歯の機能的な再生, 第 8 回日本歯科骨粗鬆症研究会一歯科再生医療と骨粗鬆症一, 東京, 東京医科歯科大学, 2010 年 4 月 4 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

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

#### 84) 学会発表 (国際学会)

Masahiro Saito and Takashi Tsuji, The forefront of regeneration therapy for tooth, The 4<sup>th</sup> Conference of Asian International Association of Dental Traumatology, Beijing, China, November 1, 2009.

Kazuhisa Nakao, Mayumi Murofushi, Miho Ogawa and Takashi Tsuji, Regulations of size and shape of the bioengineered tooth by a cell manipulation method, MHS2009 & Micro-Nano Global COE, Nagoya, Japan, November 10, 2009.

#### 85) 学会発表 (国内学会)

池田悦子、森田梨津子、中尾一久、石田研太郎、仲村崇、水野光政、山本照子、春日井昇平、辻 孝、再生歯胚の成体口腔内における萌出および咬合機能の解析、第 63 回日本口腔外科学会学術集会、浜松、2009 年 4 月 16 日

池田悦子、森田梨津子、中尾一久、石田研太郎、水野光政、小川美帆、山本照子、春日井昇平、辻 孝、成体顎骨内における再生歯の萌出と口腔機能の解析、第 6 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、仙台、2009 年 6 月 16 日

森田梨津子、野本洋平、福田隆一、中尾一久、辻 孝、器官原基法による再生歯胚の

発生解析、日本バイオイメージング学会、岡山、就実大学、2009 年 9 月 4 日

中尾一久、室伏真由美、小川美帆、辻 孝、細胞操作による再生歯の形態制御技術の開発、第 7 回日本再生歯科医学会学術大会・総会、福岡、九州歯科大学、2009 年 9 月 12 日

森田梨津子、池田悦子、中尾一久、石田研太郎、山本照子、小川美帆、水野光政、春日井昇平、辻 孝、成体口腔内に萌出した再生歯の長期安定性と機能の解析、第 7 回日本再生歯科医学会学術大会・総会、福岡、九州歯科大学、2009 年 9 月 12 日

池田悦子、中尾一久、小川美帆、山本照子、辻 孝、再生歯の顎連携機能と侵害刺激応答能の解析、第 54 回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、北海道、札幌コンベンションセンター、2009 年 10 月 10 日

池田悦子、中尾一久、森田梨津子、石田研太郎、辻 孝、再生歯の成体口腔内における萌出および咬合機能の解析、第 54 回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、北海道、札幌コンベンションセンター、2009 年 10 月 10 日

池田悦子、中尾一久、小川美帆、水野光政、春日井昇平、山本照子、辻 孝、成体口腔内における再生歯の萌出の解析および歯根膜機能の解析、第 68 回日本矯正歯科学会大会、福岡、マリンメッセ福岡、2009 年 11 月 17 日

池田悦子、森田梨津子、中尾一久、小川美帆、水野光政、山本照子、辻孝、再生歯における神経線維の侵入とメカニカルストレスに対する刺激応答能の解析、第68回日本矯正歯科学会大会、福岡、マリンメッセ福岡、2009年11月17日

Ritsuko Morita, Etsuko Ikeda, Kazuhisa Nakao, Kentaro Ishida, Teruko Takano-Yamamoto, Miho Ogawa, Mitsumasa Mizuno, Syohei Kasugai & Takashi Tsuji, Analysis of long-term stability and function of a bioengineered tooth regenerated in adult oral environment, 第32回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2009年12月12日

Kazuhisa Nakao, Mayumi Murofushi, Miho Ogawa, Takashi Tsuji, Regulations of size and shape of a bioengineered tooth by organ germ method, 第32回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2009年12月12日

Kentaro Ishida, Kazuhisa Nakao, Masato Yasukawa, Takashi Sasaki, Takashi Tsuji, Investigation of molecular mechanisms of development of regenerated tooth germ in bioengineered organ germ method, 第32回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2009年12月12日

森田梨津子、池田悦子、中尾一久、石田研太郎、山本照子、小川美穂、水野光政、春日井昇平、辻孝、成体口腔内で成長した再生歯の長期的な機能安定性の解析、第9回日本再生医療学会総会、広島、広島国際

会議場、2010年3月18日

齋藤正寛、織田真史、筒井仰、関口清俊、羽田康叙、大島正充、中尾一久、辻孝、Adamtsl5b はマイクロフィブリル再生を介してマルファン症候群の歯根膜形成不全を回復させる、第9回日本再生医療学会総会、広島、広島国際会議場、2010年3月19日

中尾一久、室伏真由美、小川美帆、辻孝、歯科再生医療を目指した再生歯の形態制御技術の開発、第9回日本再生医療学会総会、広島、広島国際会議場、2010年3月19日

水野光政、大島正充、小川美帆、山崎大道、中尾一久、山本照子、齋藤正寛、辻孝、再生歯による移植システムの開発 (I) - 再生歯ユニットの作製と成体顎骨への生着の解析 -、第10回日本再生医療学会総会、東京・京王プラザホテル、2011年3月2日

大島正充、水野光政、今村 彩、森田梨津子、小川美帆、山崎大道、山本照子、齋藤正寛、辻孝、再生歯による移植システムの開発 (II) - 再生歯ユニットによる歯槽骨と歯の生理機能の回復 -、第10回日本再生医療学会総会、東京・京王プラザホテル、2011年3月2日

大島正充、水野光政、今村 彩、小川美帆、山崎大道、中尾一久、山本照子、齋藤正寛、辻孝、歯の機能的な再生 (I) : 再生歯ユニットの作製と成体顎骨への生着の解析: 第33回日本分子生物学会年会、神戸・神戸ポートアイランド、2010年12月10日

今村彩、大島正充、水野光政、森田梨津子、小川美帆、山崎大道、山本照子、齋藤正寛、辻孝、歯の機能的な再生 (II) : 再生歯ユ

ニット移植による歯の生理的機能の再生:  
第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸・神戸  
ポートアイランド, 2010 年 12 月 10 日

中村友美、石田研太郎、花岡麻伊、弓削洋  
平、小川美帆、齋藤正寛、辻孝, 器官原  
基法を応用した器官発生における遺伝子機  
能解析システムの構築: 第 33 回日本分子  
生物学会年会, 神戸・神戸ポートアイラン  
ド, 2010 年 12 月 7 日

花岡麻伊、石田研太郎、弓削洋平、中村友  
美、安川真人、齋藤正寛、辻孝, SMAD6  
は歯胚発生過程において歯原性上皮の発生  
を抑制的に制御する: 第 33 回日本分子生  
物学会年会, 神戸・神戸ポートアイランド,  
2010 年 12 月 7 日

野本洋平、森田梨津子、紀平望帆、小川美  
帆、齋藤正寛、辻孝, 器官原基の形態形  
成と細胞動態の解析: 第 33 回日本分子生  
物学会年会, 神戸・神戸ポートアイランド,  
2010 年 12 月 7 日

石田研太郎、室伏真由美、中尾一久、森田  
梨津子、小川美帆、齋藤正寛、辻孝, 歯  
胚発生における細胞増殖による歯冠幅制御  
機構の解析: 第 33 回日本分子生物学会年  
会, 神戸・神戸ポートアイランド, 2010 年  
12 月 7 日

森田梨津子、野本洋平、小川美帆、大橋一  
正、水野健作、辻孝, 細胞骨格再編成を  
介した器官形態の制御メカニズムの解析:  
第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸・神戸  
ポートアイランド, 2010 年 12 月 7 日

水野光政、大島正充、今村彩、小川美帆、  
中尾一久、山崎大道、山本照子、齋藤正寛、  
辻孝, 機能的な歯の再生(I): 機能的な歯  
の構造体: 再生歯ユニットの作製技術の開  
発, 第 8 回日本再生歯科医学会学術大会・  
総会, 名古屋・愛知学院大学, 2010 年 10 月

30 日

大島正充、水野光政、今村彩、小川美帆、  
山崎大道、中尾一久、山本照子、齋藤正寛、  
辻孝, 機能的な歯の再生(II): 再生歯ユニ  
ット移植による生体顎骨への生着と歯槽骨  
再生, 第 8 回日本再生歯科医学会学術大  
会・総会, 名古屋・愛知学院大学, 2010 年  
10 月 30 日

山崎大道、大島正充、水野光政、今村彩、  
小川美帆、山本照子、齋藤正寛、辻孝, 機  
能的な歯の再生(III): 再生歯ユニット移植  
による歯の生理的機能の再生, 第 8 回日本  
再生歯科医学会学術大会・総会, 名古屋・  
愛知学院大学, 2010 年 10 月 30 日

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

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、ADAMTSL6 $\beta$ によるTGF- $\beta$ 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 ADAMTSL6 $\beta$ 、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）

日本経済新聞（H21/8/4、1面）、読売新聞（H21/8/4、2面）、毎日新聞（H21/8/4、2面）、朝日新聞（H21/8/4、29面）、東京新聞（H21/8/4、1面）、日経産業新聞（H21/8/4、11面）、日刊工業新聞（H21/8/4、24面）、西日本新聞（H21/8/9 夕刊、1面）、日本歯科新聞（H21/8/5、1面）、産経新聞（H21/8/4、3面）、Fuji Sankei Business i.（H21/8/4、12

面）、北海道新聞（H21/8/4、26面）、中日新聞（H21/8/4、25面）、共同通信（H21/8/4）、時事通信（H21/8/4）、釧路新聞（H21/8/4）、岩手日日新聞（H21/8/4）、河北新報（H21/8/4）、上毛新聞（H21/8/4）、山梨日日新聞（H21/8/4）、長野日報（H21/8/4）、信濃毎日新聞（H21/8/4、1面）、静岡新聞（H21/8/4）、岐阜新聞（H21/8/4）、新潟日報（H21/8/4）、北日本新聞（H21/8/4）、富山新聞（H21/8/4）、北國新聞（H21/8/4）、北陸中日新聞（H21/8/4）、福井新聞（H21/8/4）、日刊県民福井（H21/8/4）、伊勢新聞（H21/8/4）、京都新聞（H21/8/4）、神戸新聞（H21/8/4）、山口新聞（H21/8/4）、四国新聞（H21/8/4、3面）、徳島新聞（H21/8/4）、高知新聞（H21/8/4）、愛媛新聞（H21/8/4）、佐賀新聞（H21/8/4、2面）、八重山毎日新聞（H21/8/5）、THE DAILY YOMIURI（H21/8/7）、夕刊フジ（H21/8/8）、琉球新報（H21/8/10）、奈良日日新聞（H21/8/11）、沖縄タイムス（H21/8/12、16面）、THE NIKKEI WEEKLY（H21/8/17）、室蘭民報（H21/8/24）、十勝毎日新聞（H21/8/4）、夕刊デイリー（H21/8/4）、THE JAPAN TIMES（H21/8/4）、SANKEI EXPRESS（H21/8/4）、化学工業日報（H21/8/4、8面）、日本農業新聞（H21/8/4）、聖教新聞（H21/8/4）、公明新聞（H21/8/4）毎日新聞（H23/7/13）、日本経済新聞（H23/7/13）、産経新聞（H23/7/13）、SANKEI EXPRESS（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

日本経済新聞(H21/8/4)、毎日新聞(H21/8/4)、読売新聞(H21/8/4)、朝日新聞(H21/8/4)、河北新報(H21/8/4)、四国新聞(H21/8/4)、京都新聞(H21/8/4)、神戸新聞(H21/8/4)、静岡新聞(H21/8/4)、中国新聞(H21/8/4)、中日新聞(H21/8/4)、長崎新聞(H21/8/4)、西日本新聞(H21/8/4)、東奥日報(H21/8/4)、財経新聞(H21/8/4)、時事ドットコム(H21/8/4)、など  
歯科会員制ポータルサイト DentWave、2011年2月24日河合塾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

テレビ東京「NEWS FINE」(H21/8/4)、J-WAVE「TOKYO MORNING RADIO」(H21/8/5)、NHK国際放送局「Radio Japan Focus - Restoring lost teeth and hair」(H22/3/1)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

## ④ 雑誌

辻孝、歯科雑誌「日本歯科評論」4月号、2011年3月23日

辻孝、歯科専門誌 Quintessence「クイント494号」、2011年2月24日

辻孝、阪急コミュニケーションズ「Pen with new attitude」2010年11月15日

辻孝、独立行政法人 日本学術振興会「2010 VOL.2 科研費 NEWS」2010年11月

辻孝、朝日新聞社・メディカル朝日2010年4月1日

## 4) 国外報道

### ① WEB

#### ① WEB (国外 180 サイト以上)

【米国】PNAS(H21/8/3)、Reuters(H21/8/3)、AAAS(H21/8/3)、Forbes(H21/8/3)、WORLD SCIENCE(H21/8/3)、National Geographic(H21/8/4)、

The Money Times(H21/8/4)、THE WALL STREET JOURNAL(H21/8/10)、FOX NEWS(H21/8/25)

【カナダ】CBC News(H21/8/4)

【イギリス】BBC News(H21/8/4)、Times(H21/8/4)、guardian.co.uk(H21/8/4)、Telegraph.(H21/8/4)

【ドイツ】FOCUS Online(H21/8/4)、Augsburger Allgemeine(H21/8/4)

【フランス】Le Figaro(H21/8/4)、FRANCE24(H21/8/4)、Futura-Sante(H21/8/4)、TV5MONDE(H21/8/4)

【イタリア】Messaggero(H21/8/4)、ANSA(H21/8/4)、asca(H21/8/4)、DELFI(H21/8/4)、

【ロシア】Medinfo (H21/8/4), NEWSru.com (H21/8/4), GEATA (H21/8/4), E-NEWS (H21/8/5)

【オーストラリア】ABC news (H21/8/4), Herald Sun (H21/8/4), The Australian (H21/8/4), Tweed Daily News (H21/8/4), World News (H21/8/4)

【ニュージーランド】TVNZ (H21/8/4)

【中国】China Daily (H21/8/4), CNETNews (H21/8/4), 大紀元 (H21/8/4), 中国科学院 (H21/8/4)

【スイス】Le Matin (H21/8/4), NZZ Online (H21/8/4)

【オランダ】Foknews (H21/8/4)

【アイルランド】IRISHTIMES.COM (H21/8/4)

【スペイン】El Diario Montanes (H21/8/4), IBLNEWS (H21/8/4), Publico (H21/8/4)

【インド】MedIndia (H21/8/4)

【南アフリカ】The Times (H21/8/4), DailyNews (H21/8/4)

【メキシコ】ELECONOMISTA.COM.MX (H21/8/4), gentebien (H21/8/4)

【ブラジル】terra (H21/8/4), TV Canal13 (H21/8/4)

【アルゼンチン】Primera Edicion (H21/8/4)

【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

【米国】Reuters テレビジョン (H21/8/1), AFP テレビジョン (H21/11/9)

【中国】New Tang Dynasty Television (H21/8/24)

【フランス】NTDFrench (H21/9/7)

【ロシア】Вести (H23/7/28)

## ③ 雑誌

【米国】JAMA 302(11), 1161 (H21/9)

【フランス】BIOFUTUR 303, 11 (H21/10), SCIENCE & VIE 17, 16-17 (H21/10), La Recherche 436, 28-29 (H21/12)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

辻孝、池田悦子、朝井洋明 (出願人: オーガンテクノロジーズ): 歯欠損部の修復方法: 外国特許出願 PCTJP2009/064509、平成

21年8月19日

辻 孝、中尾一久（出願人：オーガンテクノロジー）：歯の製造方法：外国特許出願 PCTJP2010/000180、平成22年1月14日

辻 孝、中尾一久、大島正充（出願人：オーガンテクノロジー）：再生歯ユニットの製造方法：特願2010-196009、平成22年9月1日

辻 孝、中尾一久、大島正充（出願人：オーガンテクノロジー）：再生歯ユニットの移植による歯槽骨の回復方法：特願

2010-196016、平成22年9月1日

辻 孝、池田悦子、朝井洋明（出願人：オーガンテクノロジー）：歯欠損部の修復方法及び修復材料の製造方法：特願2010-525698、平成22年12月28日

## 2. 実用新案登録

該当なし。

## 3. その他

該当なし。



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. 移植対象部位及び移植対象歯の検討

ビーグル成犬を用い、その解剖学的特徴を文献的に検討した。そのうえで、適切と判断したビーグル成犬の下顎小臼歯部を対象とし、全身麻酔下で抜歯を行い、その後の治療をレントゲンの的に検討した。また、移植窩洞形成にあたり、障害となりうる下歯槽管との距離を解剖学的、レントゲンの的に検討した。

移植対象歯は文献的考察と、9週齢ビーグル犬ならびに胎仔ビーグル犬の解剖学的所見をあわせて検討した。

2. 他家歯胚移植モデルの確立

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を確認し、他家移植モデル確立にはこの歯胚を用いた。歯胚移植には以下の3点について気を使い行なった。

1) 移植後の拒絶反応を抑えるため、サイクロスポリンの筋肉注射、または、FK506とプレドニゾロンの併用による経口投与を行なった。

2) 移植窩洞形成による移植時の強い急性炎症反応による負の可能性を考え、移植3日前に前もって移植窩洞を形成し、急性炎症反応の軽減を図った。

3) 移植歯胚の継続的な発生・発達よりも、顎骨内移植窩内の骨再生が早く、移植歯胚の発生スペースが確保できない可能性を考え、移植窩洞への骨再生を一定期間抑制することを目的に、歯科用吸収性遮断膜（GTRメンブレン）を用い発生スペースを一定期間確保できるようにしたうえで、移植を行った。

またこれら実験には免疫抑制剤なしのコントロール群を設定した。

### 3. 自家歯胚移植モデルの確立

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. 移植対象部位及び移植対象歯の検討

抜歯による生体への過度の侵襲を避け、その後のレントゲンの評価、組織切片作成の容易さから下顎小臼歯部を対象部位とし

た。すなわち、下顎小臼歯4本であれば全身麻酔下で分割抜歯を行うことで、残存歯槽骨への過度な侵襲を避けることができ、経時的なレントゲン撮影も顎骨形態に比較的妨げられにくいことが確認できた。また、抜歯後3か月で抜歯窩の十分な骨性の治癒が得られることが確認できた。さらには、下歯槽管との垂直的距離は、おおよそ12ミリ程度であることが多く、8ミリまでの移植窩洞であれば、術中の多量の出血や、術後の神経損傷を避けうることが確認できた。

これまでの文献的情報と、本事業の研究分担者である東京理科大学辻教授との情報交換から、マウスにおける移植・萌出モデルは、硬組織形成前の歯胚の移植によるのみ達成されると考えられた。そのため、9週齢ビーグル幼犬の下顎骨をレントゲンの・解剖学的に評価したところ、乳歯・永久歯を含め、すべての歯は硬組織形成期にあり、移植歯としては不適切であることを確認した。そこで、対象を胎仔とし、妊娠ビーグル犬を購入、胎仔を摘出した。実体顕微鏡下で胎仔から歯胚を摘出し、観察したところ、胎生55-60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を確認した。

また、自家歯胚移植には生かした状態で歯胚を摘出する必要がある。そのため、手術に耐えうることのできる生後30日齢の仔犬を用いることとした。そして、生後30日齢の仔犬の第2, 3, 4小臼歯永久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を確認した。

### 2. 他家歯胚移植モデルの確立

胎生55-60日齢の胎仔第二小臼歯歯胚を摘出し、二日間の器官培養後、免疫抑制剤非

投与下にて、成犬の顎骨に形成した移植窩に他家歯胚移植を行い、移植から90日間経時的にレントゲン撮影を行ったが、顎骨内で歯冠形成像を確認する事ができなかった。同時に行った、胎仔第二小白歯歯胚のSCIDマウス腎被膜下移植実験では、継続的な歯胚の発生（硬組織形成）が確認出来ていることから、顎骨への移植では何らかの原因で歯胚の継続的な発生が生じていないと考えられた。はじめに、用いている実験系（摘出胎仔歯胚の移植）故に、他家移植とせざるを得ないことから、その原因には、免疫拒絶反応が関与していると考察した。また、移植窩洞形成による移植時の強い急性炎症反応による負の可能性を考え、移植3日前に前もって移植窩洞を形成し、急性炎症反応の軽減を図った。さらに、移植歯胚の継続的な発生・発達よりも、顎骨内移植窩内の骨再生が早く、移植歯胚の発生スペースが確保できなかったためと考え、移植窩洞への骨再生を一定期間抑制するため、歯科用吸収性遮断膜を用い発生スペースを一定期間確保できるようにしたうえで、移植を行った。

移植後、経時的にレントゲン撮影を行うとともに、3か月後には移植部顎骨組織を摘出し、マイクロCT撮影を行い、歯胚の継続発生が生じているかを検討した。しかし、歯胚の継続的な発生（硬組織形成）は確認できなかった。さらに、発生ステージの異なる歯胚（具体的にはより分化の進んだ硬組織化しつつある歯胚）が顎骨内で継続分化・成長しうるかを検討するため、第2大臼歯歯胚も顎骨移植窩洞に同様の手法で移植した。しかし、歯胚の継続的な発生は確認できなかった。

そこで次に、免疫抑制剤の種類、投与方法を変え、実験を行なった。つまり、FK506とプレドニゾロンの併用による一日二回投与下にて、急性炎症反応の軽減を目的とし移植

窩洞の前形成を行い、移植時にその移植窩洞をGTRメンブレンにて覆うことで移植歯胚の発生スペースの確保を行った窩洞に、胎生55日齢の胎仔第二小白歯歯胚を他家移植した。しかし、顎骨内での発生頻度は1/6と低く、さらに天然歯と比べ発生速度は遅く、発生した歯の形態に不整を認めた。免疫抑制のコントロールができていない可能性を考え、FK506とプレドニゾロンの通常量の4倍量投与下にて、胎生55日齢の胎仔第二小白歯歯胚を他家移植した。しかし、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小白歯（P2, P3, P4）の歯胚を摘出し、二日間の器官培養後、抜歯窩へ自家歯胚移植を行い、歯科用コンビームCTを用い経時的に経過を追った。その結果、移植2ヶ月後には顎骨内にて石灰化している像が観察された。更に、移植4ヶ月後には歯根が成長し、咬頭の一部が歯肉から萌出している像が観察された。しかし、根尖の閉鎖は認められなかった。移植6ヶ月後において、根尖は完全に閉鎖され、歯髓腔が観察され、歯根と歯槽骨の間には歯根膜腔様の一層のX線透過像を認めた。しかし、通常のイヌの小白歯の歯根は2根性であるが、自家歯胚移植によって発生した歯牙はすべて単根性であった。

## D. 考察

### 1. 移植対象部位及び移植対象歯の検討

ビーグル成犬顎骨の他部位についても検討を行った。ビーグル犬の場合、上顎では鼻腔が広く存在しており、一定の深さを持

った移植窩洞の形成が困難であることから、移植対象部位として不適切であった。また、下顎大臼歯は抜歯が極めて困難であることと、移植後の経時的な評価に必要なレントゲン撮影が困難であることを確認した。さらには、下顎前歯部はその顎骨形態から平行法によるレントゲン撮影が困難であった。したがって、下顎小臼歯部を移植対象部位とした。

## 2. 他家歯胚移植モデルの確立

サイクロスポリンやFK506とプレドニゾロンの併用による免疫抑制、急性炎症反応の軽減、GTRメンブレンによる移植歯胚の発生スペースの確保等を行ってきたが、歯胚の発生頻度はかなり低かった。この原因としてやはり、免疫抑制の問題が考えられる。我々が使用してきた免疫抑制剤の濃度は心臓移植、肺移植時に使用される濃度であるため、免疫抑制剤の濃度を振って移植実験を再度行なったが、歯胚発生は認められなかった。免疫細胞の多くは骨髓内で産生されるため、異物に対する免疫反応は明らかに他の臓器と比べ敏感であることが推測され、歯胚の他家移植モデルは困難である可能性が示唆された。

## 3. 自家歯胚移植モデルの確立

免疫反応を回避するため、自家歯胚移植を行った結果、歯胚の発生が認められ、移植6ヶ月後には根尖も閉鎖し、完全に歯冠が萌出している像が観察された。しかし、通常、イヌの小臼歯は2根性であるが、移植歯胚はすべて単根性を示した。歯胚は器官培養2日後に乳臼歯の抜歯窩に移植しており、移植窩内の骨再生が歯胚発生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つたため、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、骨髓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

・ Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Sonoyama W, Kamioka H, Yamashiro T, **Kuboki T**, Oguma K. Botulinum toxin type a (150 kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal ganglion neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infraorbital nerve constriction. *Neuroscience*. 2009 Apr 10;159(4):1422-9.

・ Okamoto Y, Sonoyama W, Ono M, Akiyama K, Fujisawa T, Oshima M,

- Tsuchimoto Y, Matsuka Y, Yasuda T, Shi S, **Kuboki T**: Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Endodontics* 35: 367-372,2009
- Maekawa K, Shimono K, Oshima M, Yoshida Y, Van Meerbeek B, Suzuki K, **Kuboki T**. Polyphosphoric acid treatment promotes bone regeneration around titanium implants. *J Oral Rehabil.* 2009 May;36(5):362-7.
  - Maeda A, Nishida T, Aoyama E, Kubota S, Lyons KM, **Kuboki T**, Takigawa M. CCN family 2/connective tissue growth factor modulates BMP signalling as a signal conductor, which action regulates the proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Biochem.* Feb;145(2):207-16, 2009.
  - Inoue E, Maekawa K, Minakuchi H, Nagamatsu-Sakaguchi C, Ono T, Matsuka Y, Clark GT, **Kuboki T**. The relationship between temporomandibular joint pathosis and muscle tenderness in the orofacial and neck/shoulder region. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Jan;109(1):86-90, 2010.
  - Ono T, Maekawa K, Sonoyama W, Kojima S, Tanaka T, Clark GT, **Kuboki T**. Gene expression profile of mouse masseter muscle after repetitive electrical stimulation. *J Prosthodont Res.* Jan;54(1):36-41,2010.
  - Mine A, De Munck J, Van Ende A, Cardoso MV, **Kuboki T**, Yoshida Y, Van Meerbeek B. TEM characterization of a silorane composite bonded to enamel/dentin. *Dental Materials*; 26(6): 524-532, 2010.
  - Takiguchi S, Maekawa K, Ono T, Sasai N, Kaji M, Clark GT, **Kuboki T**. Relationship between a chronically painful trapezius muscle and its metabolic state analyzed with PET/CT. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 110(1): 54-61, 2010.
  - Kawahara D, Mine A, De Munck J, **Kuboki T**, Yoshida Y, Suzuki K, Van Meerbeek B, Yatani H. The quasi-three-dimensional marginal leakage of full-coverage crowns: resin coating versus sodium hypochlorite treatment. *International Journal of Prosthodontics*; 23(5): 406-409, 2010.
  - Ueda M, Mine A, De Munck J, Hakogi T, VAN Meerbeek B, **Kuboki T**. The effect of clinical experience on dentine bonding effectiveness: students versus trained dentists. *Journal of Oral Rehabilitation*; 37(9): 653-657, 2010.
  - Mine A, De Munck J, Cardoso MV, Van Landuyt KL, Poitevin A, **Kuboki T**, Yoshida Y, Suzuki K, Van Meerbeek B. Enamel-smear compromises bonding by mild self-etch adhesives. *Journal of Dental Research*; 89(12): 1505-1509, 2010.
  - Hikasa T, Matsuka Y, Mine A, Minakuchi H, Hara ES, Van Meerbeek B, Yatani H, **Kuboki T**. A 15-year clinical comparative study of the cumulative survival rate of cast metal post-and-core and resin core restorations luted with adhesive resin cement. *International Journal of Prosthodontics*; 23(5): 397-405, 2010.
  - 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*; 2010.
  - Shimono K, Oshima M, Arakawa H, Kimura A,

Nawachi K, **Kuboki T**. The effect of growth factors for bone augmentation to enable dental implant placement. A systematic review. Japanese Dental Science Review; 46(1): 43-53, 2010.

• 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. Intra dermal 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, Sono 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

• Tsuchimoto Y, Sonoyama W, Shinkawa S, Okamoto Y, Oshima M, Ueda M, Oida Y, Matsuka Y, **Kuboki T**: Characterization of putative amelo-genic cells isolated from human dental follicle. 6th Biennial Congress of Asian Academy of Prosthodontics (Abstract 146-147) . Seoul, Korea. 発表日 2009. 4. 25.

• Oida Y, Ono M, Sonoyama W, Inkson C, **Kuboki T**, Young M: Vitamin D3 Modulates the Expression of CCN4/WISP-1 in Osteogenic Cells. The 2nd International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama (Abstract 94) . Okayama, Japan. 発表日 2009. 5. 17.

• Uchibe K, Shimizu H, Yokoyama S, Sonoyama W, **Kuboki T**, Asahara H: Identification of transcription- regulating genes expressed during murine molar development. The 2nd International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama (Abstract 89) . Okayama, Japan. 発表日 2009. 5. 17.

• 岡本洋介, 園山 亘, 大野充昭, 秋山謙太郎, 藤澤拓生, 大島正充, 土本洋平, 松香芳三, **窪木拓男**: シンバスタチンによるヒト歯髄幹細胞の増殖制御と硬組織形成促進. 社団法人日本補綴歯科学会 第118

回学術大会(抄録集78). 京都,日本. 発表日 2009. 6. 6.

・ Shimono K, Ono M, Sonoyama W, Kanyama M, Oshima M, Wakabayashi M, Sebald W, Sugama K, **Kuboki T**: Genetically modified recombinant human BMP-2 with additional heparin binding domain enhanced bone formation around titanium dental implant: 5th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration (Abstract 47) . Bali, Indonesia. 発表日 2009. 11. 21.

・ 内部健太, 浅原弘嗣, **窪木拓男**: 発生期歯胚において発現する新規遺伝子群の同定とその発現パターン解析. 歯科補綴ウインタースクール淡路2009(抄録集30). 淡路島,日本. 発表日 2009. 11. 14.

・ 園山 亘, **窪木拓男**. Functional Regeneration of Oral Tissue -Transfer of in vitro Results with Cultured Stem/Progenitor Cells to in vivo-. 日本組織培養学会 第83回大会. 岡山, 日本. 発表日 2010. 5. 21.

・ 新川重彦, 園山 亘, 大野充昭, **窪木拓男**. ヒト歯胚関連組織から分離した上皮細胞の分化を制御する因子の検索. 歯の発生・再生に関する研究セミナー. 岡山, 日本. 発表日 2010. 8. 24.

・ Sonoyama W, Ono M, **Kuboki T**. Biological Researches for Regenerative Dentistry in our Department. Kotsanos seminar. Okayama, Japan. 発表日 2010. 10. 26.

・ **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, そしてバイオロジーへ-. 昭和大学歯学部大学院セミナー. 東京, 日本, 発表日 2011. 02. 04.

・ **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.

・ 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-臨床疫学, バイオメカニクス, そしてバイオロジーへ-. 新潟大学歯学部大学院セミナー. 新潟, 日本, 発表日 2012. 03. 16.

#### 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



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 細胞からのエナメル芽細胞、象牙芽細胞の分化誘導法と、組織幹細胞の大量調整法としてケミカルコンパウンドを用いた人為的幹細胞作製法の開発を行なう。また、機能的な形態を有する歯の再生の為に、歯冠形態形成メカニズムの解明と、その制御法の開発を行なう。

A. 研究の目的

これまで歯の再生に関しては、東京理科大の辻教授のグループが、器官原基法という新しい手法の開発により、小型動物での歯の再生が可能となっている。この技術は、歯と同様の発生過程を示す毛や線組織などの再生に応用可能が技術として期待されている。その一方で、現時点では再生歯を作製する為には、胎児由来の細胞を用いているため、ヒトに応用する為には倫理的問題を回避しなければならず、またヒトに応用できるような大きな歯を作製するためには、再生歯にもちいる細胞の大量調整と、細胞シーズの探索が必要と考えられてきた。

また、歯はそれぞれに固有の形態と機能を有しており、前歯は食物を切断し、臼歯はそれを粉砕するという異なった機能を有する。そのため、機能的な歯の再

生の為には、欠損した個々の歯に適した形態を付与しなければならず、また欠損部分の大きさに合わせた歯の大きさのコントロールが必要であろうと考えられる。そこで本研究では、1) iPS 細胞などの多能性幹細胞から歯胚関連細胞の誘導法の確立、2) 歯髄中に存在する歯髄幹細胞を大量調整するための新しい手法の立案、3) 歯の形と大きさを決定する分子メカニズムの解明を試みた。(3)の項目に関しては、本研究期間中に、最先端・次世代研究開発支援プログラム「かたちに関わる疾患解明を目指した歯の形態形成メカニズムの理解とその制御法開発」へと移行)。

B. 研究方法

歯の再生のための細胞シーズとして、iPS 細胞からエナメル芽細胞および象牙芽細胞の分化誘導法の開発については、

ラット由来の歯原性上皮細胞株 SF2 細胞を作製し、この細胞と iPS 細胞との共培養により歯原性上皮への分化誘導が可能かどうかを検討した。

歯髄幹細胞などの組織幹細胞は、歯髄細胞の中の約 0.5%程度しか存在しない為、本細胞が再生医療への応用が期待されているにもかかわらず、その大量調整法の開発が大きな課題であった。そこで、FDA が認証しているケミカルコンパウンドライブラリーを利用し、単一のコンパウンドにより、分化した歯髄細胞からリプログラミングにより歯髄幹細胞を誘導できる薬剤のスクリーニングを試みた。

歯の形態形成メカニズムの解明に関しては、歯の大きさやかたちに異常を示す外胚葉異形成症をモデル都市、類似の歯の形成異常を示す疾患モデルマウスを解析することで、歯の形態形成メカニズムを明らかにすることとした。さらに短時間で大きな人工歯胚を形成する為に必要と考えられる、歯胚の大きさ決定メカニズムについて、バイオインフォマティクスな手法を用いて新しい分子制御機構の探索を試みた。

### 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 (SF2) との共培養により、約 6 日後より iPS 細胞塊の周辺から細胞間結合が明瞭な細胞集団が出現し、10 日目には上皮細胞様の細胞集団へと形態学的に変化した。遺伝子発現を

検討した結果、上皮様の細胞集団は上皮細胞マーカーである CK14 や p63 を発現し、エナメル芽細胞マーカーであるアメロブラスチン、エナメリンの発現が確認できた。このことから、iPS 細胞はエナメル芽細胞へと分化したことが明らかとなった。この分化過程において、共培養で用いた SF2 細胞のアメロブラスチンの発現程度に依存していることが判明した。さらに、SF2 細胞細胞の培養上清のみでも iPS 細胞をエナメル芽細胞に分化誘導でき、この培養液中に含まれる神経成長因子 NT-4 と BMP が、エナメル芽細胞分化には必須の分子であることが明らかになった。

次に、歯髄さいぼうから歯髄幹細胞を分化誘導する為に、コンパウンドスクリーニングを行なった結果、GSK3b-inhibitor IX を歯髄細胞に加えると、幹細胞マーカーである Oct4 や Klf4 の発現を誘導し、骨芽細胞や象牙芽細胞に分化しうる細胞に変化することを見いだした。このことから、単一のコンパウンドで、人為的に歯髄幹細胞を誘導することが可能となり、組織幹細胞の大量調整が可能となった。

歯の形態形成機構の解明については、外胚葉異形成症の原因遺伝子である EDA に関連した分子機能の解明を目指した。EDA はその受容体である EDAR の結合し、主に NFkB 経路を活性化する。この経路の中で、p50 と NIK が存在するが、この 2 つを欠損したマウスを作製し

たところ、歯の横幅のみが減少する結果が得られた。歯の横幅が減少するメカニズムを明らかにする目的で、欠損マウスにおける包括的遺伝子スクリーニングを行った結果、Wntファミリー分子の中でもWnt7bが歯胚上皮の舌側に発現し、その結果上皮におけるshhの発現抑制により歯胚の横方向への成長を阻害したことが明らかとなった。次に、歯の大きさの決定機構で、特にこれまで知られていない分子経路を探索するため、バイオインフォマティックな手法を用いて検討した。その結果、歯胚の大きさ決定因子として、Hippo経路に関わるMst1、Mst2が重要である可能性が考えられた。そこで、Mstファミリーの発現抑制をsiRNAをもちいて行なった結果、Mst抑制細胞では、歯原性上皮の細胞増殖が亢進した。また、Mstの下流分子であるYapの局在を検討した結果、細胞増殖期にYapは細胞質に存在し、細胞増殖の停止期に核に移行する結果が得られた。このことから、Mstファミリー分子の発現抑制やYapの核移行制御により、歯胚上皮の細胞増殖を亢進させ、短期間に歯胚の大きさをコントロールできる可能性が示された。

#### D. 考察

歯の再生をヒトに応用する為、再生歯胚を作製する細胞シーズをどこに求めるかということが大きな課題であった。この問題を解決する方法としては、ES細胞やiPS細胞などの万能細胞からの関連細胞の誘導、あるいは歯胚に存在する組

織幹細胞を人為的に大量調整する方法の2つが考えられていた。我々の研究成果から、この2つの方法を可能とし、細胞ソースに関する問題解決はできたと考えられる。また、iPS細胞をどこの組織から作製するかという課題に関しても、従来は皮膚の線維芽細胞から作製されていたが、近年のiPS研究の進展により、iPS細胞の細胞供給源として歯髄細胞が注目されてきた。それは、iPS細胞の誘導効率が、他の組織細胞と比較して高いこと（組織幹細胞がリッチであること）、また乳歯の歯髄を用いれば、ほぼ非侵襲的に細胞を採取できるメリットがある。我々の研究グループによるコンパンドによる人為的な歯髄幹細胞誘導法を併用すれば、さらにiPS細胞の誘導効率が増すことが期待できる。これらの成果をもとに、我々は、全国の大学歯学部、あるいは歯科大学の小児歯科において、永久歯との交換による脱落した乳歯から歯髄細胞を培養し、効率よく歯髄幹細胞を得る自習トレーニングを実施し、9割以上の大学で歯髄幹細胞を培養可能な体制を構築できた。これらは、本研究領域に多くの研究者が参画できるようになるとともに、詳細の再生医療の実現化に大きな進展をもたらすことが期待できる。また、単に歯を再生させるのみならず、将来機能的な歯の再生において必要とされる形態と大きさのコントロールに関わる分子メカニズムを解明することができ、これらの知見は歯の再生のみならず、全身の臓器や器官

の再生に応用できる知見として多大な貢献をもたらすものと期待できる。

#### E. 結論

本研究の成果から、iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化誘導が可能となり、また歯原性間葉細胞の作成にも成功した。全身のどこの細胞からも歯をつくりだせる可能性が示された。神経再生などへ直接応用が期待されている歯髄幹細胞は、分化は髄細胞から、単一のコンパウンドを用いて誘導することが可能となった。歯の形態形成に関しては、歯の横幅の決定機構が明らかとなり、また縦幅を規定する分子の同定にも成功した（未発表）。さらに、歯胚を短期間で大きくするための候補遺伝子として Hippo 関連分子の同定に成功した。これらの成果を複合し、効率的でかつ機能的な歯の再生を目指す。

#### F. 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.

6) Iwamoto T, Yamada A, Arakaki M, Sugawara Y, Ono M, Futaki M, Yoshizaki K, Fukumoto E, Nakamura T, Fukumoto S.: Expression and functions of neurotrophic factors in tooth development. *J Oral Biosci.* 2011, 53(1):13-21

7) Nakamura T, Yamada Y, Fukumoto S.: Divers function of epiprofin in tooth