

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791467
 研究課題名 (和文) 新規培養システムによる歯・歯周組織-複合体の創製と移植法の
 新機軸
 研究課題名 (英文) Engineering a tooth/periodontal complex in vitro using a novel culture
 method for organ regeneration
 研究代表者
 中原 貴 (NAKAHARA TAKA)
 日本歯科大学・生命歯学部・准教授
 研究者番号：10366768

研究成果の概要：本研究は、一度失われた歯をもう一度再生させる技術と、再生歯による治療法の開発を最終目標としている。本研究期間において、将来の歯の再生医療の基盤となる技術「器官再生法」の開発に成功し、日本から発信する再生医療技術の権利を担保すべく特許出願を行った。我々の歯の再生技術は、従来の動物移植を介する再生法ではなく、完全な人工培養システムからなる、シャーレ上で歯の再生を可能にする新たな培養技術である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：再生医学、歯の再生、歯根再生、歯周組織の再生、細胞培養、生体材料、器官培養、バイオリアクター

1. 研究開始当初の背景

現在、歯の再生はきわめて注目を集める研究分野ではあるが、未だに小動物（マウスやラット）を用いた基礎実験に終始しており、私たちの歯科治療に還元できるようなヒトの歯を再生させる試みは皆無である。

従来の歯の再生研究は、実験動物の歯胚の細胞を用いて歯の原基（歯の種）を作り、これを血流によって酸素や栄養の供給が豊富な動物の体内に移植して、歯の成長を誘導してきた。しかし、こうした従来の歯の再生法は、ヒト歯胚の入手と動物移植が前提となる

再生アプローチであるため、歯胚を持たない成人には応用できず、さらに異種動物に由来する免疫拒絶やウイルス感染など、多くの危険性を抱えている。

また、従来の研究は、歯冠と歯根の両者を含めた歯の完全再生を試みる研究が主流であり、歯科用インプラントが急速に普及した社会的背景と歯科医師の臨床的ニーズからは、かけ離れた試みが行われていた。すなわち、補綴物で自在に修復可能な歯冠よりも、歯の機能を担う重要なパーツである**歯根膜を有する再生歯根**の実現が待望されてきた。

2. 研究の目的

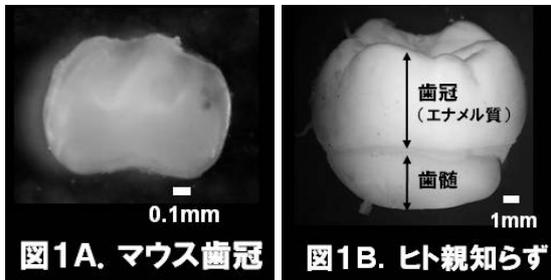
本研究は、真に臨床応用できる歯の再生技術を開発するため、動物移植を用いない“**生体外培養による歯の再生**”と、歯が機能する上で重要な組織である“**歯根の再生**”に着目した。そして、本研究によって開発に成功した再生医療技術は、将来の歯の再生医療の実現に向けた基盤技術となる。我々は、ヒト細胞・組織をモデルとして新たな再生技術を開発して、基礎研究に終始するのではなく、臨床医療に貢献できる歯の再生戦略を実践することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ヒト抜去歯の歯根部分から採取した歯根膜組織をカミソリを用いて細切、遠心分離した後、DMEM/F12+15% FBSを用いて継代培養を行い、継代数2～3の細胞がコンフルエントになるまで培養した。

(2) 生後5日齢のC57/BL6マウスの下顎第1臼歯(図1A)を摘出し、前記歯根膜細胞とコラーゲンスポンジ、そしてembryotrophic factors (ETFs) 含有の独自に開発した培養液にて器官培養を行った(器官再生法; 特許出願中)。ETFsは、ヒト子宮頸部の扁平上皮癌細胞株の培養上清を脱塩、凍結乾燥した添加物である。

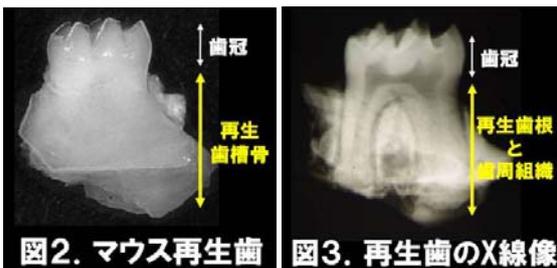
(3) 同様の手法により、13歳女性のヒト親知らず(図1B; 歯根が未形成で、歯冠と歯髄のみの歯)の器官再生法による器官培養を行った。



4. 研究成果

(1) 器官培養4週間後、マウス歯冠に連続して歯槽骨が観察された(図2, 実体顕微鏡像)。

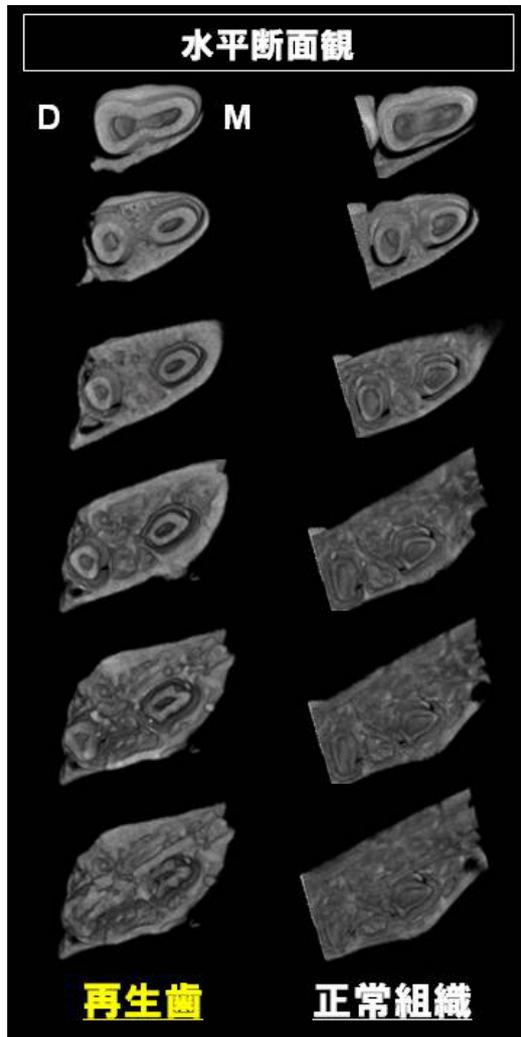
(2) エックス線学的に観察すると、歯槽骨内部には2つの歯根が形成されており、歯根の輪郭に沿って歯槽骨との間には一層の空隙(歯根膜腔)が観察された(図3, softex 像)。



(3) マイクロCTによる3D構築像およびスライス像の観察では、正常組織(下図、右列、成体マウス下顎骨μCT像の第1臼歯をデジタル処理により抽出)と比較すると、再生歯(下図、左列、M: 近心方向、D: 遠心方向を示す)においても正常組織と同等な歯根・歯槽骨が形成されていた。



(4) また、マイクロ CT による根尖方向からの連続的な水平断スライス像で観察すると、再生歯（下図、左列）は正常組織（下図、右列）と同様な歯根形態と歯槽骨の構造を有していた。



(5) 病理組織学的観察（図4）では、再生歯根の内部には血管を有する歯髄が存在し、再生歯根外部には歯根膜（PDL）が観察されて、歯根膜のコラーゲン線維束を埋入するセメント質（C）と歯槽骨（B）が形成されていた。さらに、歯根膜内の歯根面近傍には上皮細胞塊が存在しており、歯根形成の名残である Malassez 上皮残遺（矢印）も観察された。

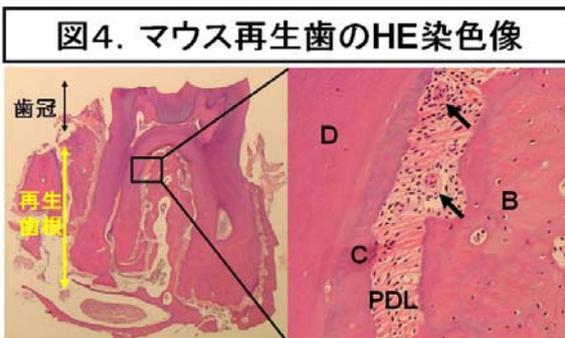


図4. マウス再生歯のHE染色像

(6) マウス再生歯と同様の手法により、ヒト親知らず（図1B）を器官培養して24週間後、歯冠のみだったヒト親知らずに歯根が形成されていた（下図、上段）。また、歯根を根尖方向から観察すると、歯髄組織（下図、下段、矢印）が確認されて根尖孔が閉じておらず、さらに歯根が伸長するものと思われた。

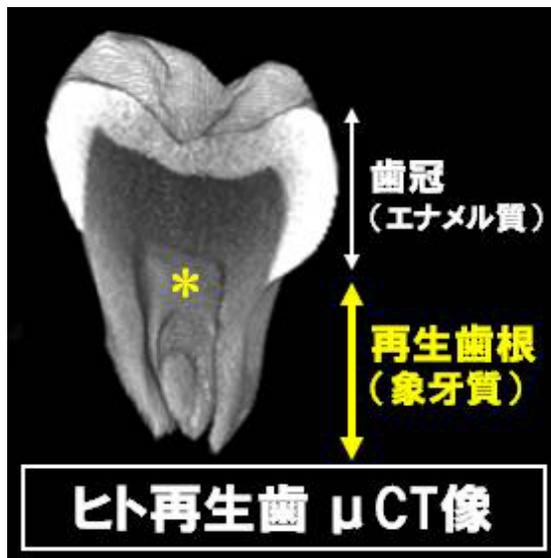


(7) エックス線学的観察により、ヒト親知らずの歯冠から歯髄腔（下図、*）を有する再生歯根の形成が確認された。



ヒト再生歯 softex像

(8) マイクロ CT によってヒト再生歯の中央部分をスライス像で観察すると、この再生歯根の内部には2つの歯根の歯髓腔が中央で連絡した正常な歯牙構造が観察された(下図、*)。



(9) 以上のように、我々の「器官再生法」は、マウス歯冠には歯根・歯周組織ユニットの完全再生を可能にした。さらに、マウス歯冠の10倍以上の大きさを有し、1センチを超える巨大なヒト親知らずでも、完全な歯根を形成することに成功した。過去に報告のある生体外培養法では、1ミリに満たないマウスの歯であっても、歯根や歯周組織の形成は不可能であったため、本研究の成果は、世界最初の成功例である。

(10) さらに本研究成果は、日常の歯科臨床から入手できる細胞・組織と生体材料を用いることによってヒト歯根の形成に成功したため、真に臨床応用できる技術開発に成功した点において、きわめて意義深い。

(11) 今後の展望は、以下のとおりである。

- ① マウスおよびヒト再生歯の移植実験による生着と機能評価。
- ② ヒト再生歯の新規灌流培養装置の開発。
- ③ 歯冠の再生技術の開発。
- ④ 上記、再生歯冠を用いて器官再生法による歯根・歯周組織ユニットの再生。これにより歯・歯周組織一複合体の完全再生が達成される。

(12) 歯と歯周組織は、密接に連携して機能するひとつの臓器・器官であるため、歯・歯周組織一複合体の再生は、歯・歯周組織の器官再生とすることができる。

(13) 以上のコンセプトに基づいて開発を進めてきた本研究成果は、我々の目指す歯の再生の最終ゴール、すなわち“test-tube teeth” (試験管内で作る歯)を可能とする新世代の再生医療技術である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

- ① 中原 貴、歯の再生研究の現状、そして近・未来、生存科学B、査読有、19、2009 (印刷中)
- ② Ide Y、Nakahara T (他6名)、Establishment and characterization of NEYS cell line derived from carcinosarcoma of human ovary special reference to the susceptibility test of the anticancer drugs、Human Cell、査読有、22、2009 (印刷中)
- ③ Harada M (17名中6番目)、FGF9 monomer-dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion、Nature Genetics、査読有、41、289-298、2009.
- ④ Yamashita S (7名中5番目)、Establishment and characterization of a cell line (IGSK-3) secreting human chorionic gonadotropin、adrenocorticotrophic hormone and parathyroid hormone-related protein derived from primary poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach、Human Cell、査読有、21、88-94、2008.
- ⑤ 中原 貴、井出吉昭、歯の再生—再生歯は再生臓器の第1号となりえるか?—、歯科臨床研究、査読無、5、90-97、2008.
- ⑥ 中原 貴、トピックス・歯の再生のホントのところ、日本歯科大学附属病院NEWS LETTER、査読無、65、7、2008.
- ⑦ 中原 貴、新世代の再生医療をめざして—歯の再生医療の可能性—、日本歯科大学校友会・歯学会会報、査読無、33、37、2008.
- ⑧ Ota MS、Vivatbutsin P、Nakahara T、Eto K、Tooth root development and the cell-based regenerative therapy、Journal of Oral Tissue Engineering、査読有、4、137-142、2007.
- ⑨ Nakahara T、Ide Y、Tooth regeneration: implications for the use of bioengineered organs in first-wave organ replacement、Human Cell、査読有、20、63-70、2007.
- ⑩ 中原 貴、ティッシュ・エンジニアリングによる歯周病治療法の新規開発の現状と将来、歯科臨床研究、査読無、4、77-84、2007.
- ⑪ 中原 貴、100周年記念グラント・再生医療の現状と展望、歯学春季特集号、

査読無、94、100-106、2007.

〔学会発表〕(計32件)

- ① 中原 貴、再生医療に向けた細胞ソースの探索～歯根膜に多能性幹細胞は存在するの？～、日本歯科大学100周年記念研究グラント・第10回歯科再生医療ミーティング、2009年3月12日、東京.
- ② 中原 貴、網膜再生のための新たな網膜構成細胞株の樹立—early ES細胞からの胚子様構造体の形成とその応用—、第8回日本再生医療学会、2009年3月5日、東京.
- ③ Ishkitiev N、Stem cell-like characteristics of dental pulp and bone marrow cells、56th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research、2008年11月29日、名古屋.
- ④ 中原 貴、歯の再生医療の実現に向けて—歯の再生研究の新たなアプローチ—、東京都日本歯科大学校友会芝支部学術講演会、2008年11月14日、東京.
- ⑤ Matsuno T、Acceleration of rat salivary gland tissue regeneration using Peptide-SVYGLR、The 8th Asian Congress on Oral and maxillofacial Surgery、2008年11月3日、台湾.
- ⑥ 中原 貴、歯の再生医療に向けた新たなアプローチ—歯の再生研究の新展開—、山形県日本歯科大学校友会学術講演会、2008年10月4日、山形.
- ⑦ 中原 貴、ヒト頬粘膜に発生した悪性黒色腫由来の細胞株の樹立とその性格、特に抗がん剤感受性について、第50回歯科基礎医学会学術大会、2008年9月23日、東京.
- ⑧ 井出吉昭、クラウン系ミニブタ下顎頬歯(臼歯)のエックス線解析、日本歯科大学歯学会研究推進フォーラム、2008年9月19日、東京.
- ⑨ 中原 貴、Test-tube teeth実現に向けた新たなアプローチ—歯の再生研究の新展開—、第6回日本再生歯科医学会学術大会、2008年9月13日、東京.
- ⑩ 中原 貴、ES細胞からの眼球原基形成と原基からの網膜構成細胞株の樹立、第6回日本再生歯科医学会学術大会、2008年9月13日、東京.
- ⑪ 富永徳子、ラット歯根膜からの各種細胞の分離法の検討、第6回日本再生歯科医学会学術大会、2008年9月13日、東京.
- ⑫ 那須優則、ミニブタ胎児の歯胚由来血管内皮細胞の生物学的特徴、第6回日本再生歯科医学会学術大会、2008年9月13日、東京.
- ⑬ 井出吉昭、クラウン系ミニブタ頬歯(臼歯)の歯列変化、第6回日本再生歯科医学会学術大会、2008年9月13日、東京.
- ⑭ 田部井功、ヒト羊膜由来組織幹細胞の肝組織への分化とその移植、そして機能評価、第6回日本再生歯科医学会学術大会、2008年9月13日、東京.
- ⑮ 井出吉昭、ヒト卵巣癌肉腫由来細胞株(NEYS)の樹立と特性(特に抗がん剤感受性)、第26回日本ヒト細胞学会学術集会、2008年8月30日、東京.
- ⑯ 大山晃弘、溶存酸素測定装置を用いて判定した各種抗がん剤の抗がん剤感受性とそのheterogeneity、第26回日本ヒト細胞学会学術集会、2008年8月30日、東京.
- ⑰ 石川 博、マウス early ES細胞の眼球原基への分化と網膜色素上皮細胞株ならびに網膜神経細胞株の樹立並びにそれらの性格、第26回日本ヒト細胞学会学術集会、2008年8月30日、東京.
- ⑱ Tabei I、Evaluation of an hepatocyte cell line derived from human amniotic stem cell、The XII International Congress of The Transplantation Society、2008年8月10日、オーストラリア.
- ⑲ 中原 貴、Test-tube teeth実現に向けて—歯の再生研究の新展開—、山梨県歯科医師会学術講演会、2008年6月22日、甲府.
- ⑳ 田部井功、ヒト羊膜細胞より肝細胞の作成と肝不全ラットへの移植によるその機能評価、第108回日本外科学会、2008年5月15日、長崎.
- 21 中原 貴、Early ES細胞を用いた胚子様モンスターの創製—組織幹細胞による歯の再生をめざして—、第7回日本再生医療学会、2008年3月14日、名古屋.
- 22 富永徳子、ラット歯根膜細胞からの多分化誘導法の確立と細胞株の樹立、第7回日本再生医療学会、2008年3月13日、名古屋.
- 23 那須優則、ミニブタ胎児の歯胚由来血管内皮細胞の再生医療に向けた血管新生評価、第7回日本再生医療学会、2008年3月13日、名古屋.
- 24 中原 貴、再生医療とアンチエイジング～これからの歯科医療はどのように変わるのか～、栃木県日本歯科大学校友会研修会、2008年3月2日、宇都宮.
- 25 中原 貴、新世代の再生医療をめざして～歯の再生医療の可能性～、学術フォーラム2008、2008年2月24日、東京.
- 26 Ota MS、Biological activity of FGF18 and its clinical potentialities for regenerative dentistry、BIO-Europe 2007、2007年11月12日、ドイツ.

- 27 中原 貴、再生歯科医療の最終ゴール～再生歯は再生臓器の第一号になりえるのか？～、第 34 回関東地区日本歯科大学校友会懇話会、2007 年 10 月 7 日、東京。
- 28 Ota MS、Biological activity of FGF18 and its clinical potentialities for regenerative dentistry、EuroBiOpartnering、2007 年 9 月 26 日、フランス。
- 29 Ota MS、Sonic Hedgehog and FGF signaling are important for tooth root development、European Cells and Materials、2007 年 9 月 4 日、スイス。
- 30 富永徳子、歯根膜由来細胞ライブラリー構築に向けたラット抜去歯からの種々の細胞株樹立の試み、第 49 回歯科基礎医学会学術大会、2007 年 8 月 30 日、札幌。
- 31 中原 貴、歯はよみがえるのか？－歯・歯周組織再生の最前線－、鹿児島県地区日本歯科大学校友会歯学研修会、2007 年 6 月 16 日、鹿児島。
- 32 中原 貴、再生歯は再生臓器の第一号となりえるか？、OMSTアカデミア学術講演、2007 年 4 月 14 日、東京。

[図書] (計 2 件)

- ① Nakahara T、Tooth/periodontal organ engineering: the ultimate goal of tooth regeneration、Tissue Engineering Research Trends、Nova Science Publishers、7-13、2008。
- ② 中原 貴、南山堂、臨床歯科エビデンス 顎・口腔領域の外傷、14、45、2007。

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

- ①
名称：歯根形成促進剤及び歯根形成促進方法
発明者：太田正人、川島伸之、中原 貴、井関祥子
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学
種類：特許権
番号：10-2008-7023030
出願年月日：2008 年 9 月 22 日
国内外の別：国外 (韓国)

- ②
名称：歯根・歯周組織ユニット形成方法、及び再生歯
発明者：中原 貴、石川 博、佐藤 聡、太田正人
権利者：学校法人日本歯科大学
種類：特許権

番号：特願 2008-228858
出願年月日：2008 年 9 月 5 日
国内外の別：国内

- ③
名称：歯根形成促進剤及び歯根形成促進方法
発明者：太田正人、川島伸之、中原 貴、井関祥子

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学
種類：特許権
番号：07737440.3
出願年月日：2008 年 9 月 2 日
国内外の別：国外 (EP)

- ④
名称：歯根形成促進剤及び歯根形成促進方法
発明者：太田正人、川島伸之、中原 貴、井関祥子

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学
種類：特許権
番号：12 / 229,786
出願年月日：2008 年 8 月 27 日
国内外の別：国外 (米国)

- ⑤
名称：歯根形成促進剤及び歯根形成促進方法
発明者：太田正人、川島伸之、中原 貴、井関祥子

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学
種類：特許権
番号：特願 2008-502798、PCT/JP2007/053638
出願年月日：2008 年 8 月 22 日
国内外の別：国内

- ⑥
名称：器官原基形成方法、及び器官原基
発明者：中原 貴、石川 博、佐藤 聡、太田正人

権利者：学校法人日本歯科大学
種類：特許権
番号：特願 2008-212593
出願年月日：2008 年 8 月 21 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等
<http://www.ndu.ac.jp/~t.nakahara/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 貴 (NAKAHARA TAKA)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授
研究者番号：10366768