

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：平成 20 年度～平成 22 年度

課題番号：20249078

研究課題名（和文）

歯の再生医療システムに向けた基盤技術の開発

研究課題名（英文）

Development of the basic technology for tooth regenerative therapy system

研究代表者

辻 孝 (TSUJI TAKASHI)

東京理科大学・総合研究機構・助教

研究者番号：50339131

研究成果の概要（和文）： 人為的な細胞操作技術によって歯の器官原基である再生歯胚を作製し、歯の喪失部位に移植することにより、成体の口腔内で発生・萌出し、咬合機能、歯根膜機能、神経機能を有する機能的な歯が再生することを示した。さらに、再生歯胚から歯と歯周組織にて構成される完成した再生歯を作製して移植することにより、生着ならびに機能することが明らかとなった。これらのことから、再生歯胚ならびに再生歯の移植による機能的な歯の再生医療の実現可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： In current research on whole-tooth regenerative therapy, a basic strategy is being pursued in which a bioengineered tooth germ is induced to develop into a fully functional tooth. We developed a three-dimensional organ-germ culture method for the reconstitution a bioengineered organ germ. We successfully demonstrated that our bioengineered tooth germ could develop a fully functioning tooth, which has hardness for masticatory potential, the functional responsibility against a mechanical stress, and perceptive potentials of neural fibers. Furthermore, we demonstrated 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. These results showed that the bioengineered tooth germ and mature tooth unit could regenerate a fully functioning tooth and an organ replacement regenerative therapy might be feasible.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
2009 年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2010 年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
年度			
年度			
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生、歯、再生医療、幹細胞、歯胚

1. 研究開始当初の背景

歯の再生医療は、喪失した歯の治療法として次世代の歯科治療システムへと発展、実用化されることが期待されており、「複数種の

細胞を三次元的に配置して臓器や器官を組み立てて傷害臓器と置き換える臓器置換再生医療」のモデルケースとして、再生医学全体から見ても重要な研究課題に位置づけら

れている。喪失歯の治療方法としては、オッセオインテグレートドインプラント治療が行われており、予後が十分に信頼される有効な治療方法として確立している。歯の再生医療システムの開発は、歯そのものを元通りに再生できる生物学的な新たな治療法となりうると共に、従来のインプラント治療と組み合わせた次世代型インプラントとして改良することによって、生物学的かつ効果的な治療システムとして発展することが期待され、21世紀型の歯科治療システムの構築において重要な課題である。歯の完全な再生に向けて、器官原基である「歯胚」を人為的な細胞操作によって組み立てて歯の喪失部位に移植し、乳歯、永久歯に続く「第3の歯」を発生させるという戦略から研究が進められている。歯胚の再構築のための細胞操作技術の開発は既に40年にわたり研究が進められてきたが、達成には至っていなかった。本研究グループは、発生生物学的な観点から、誘導期歯胚の再構築には、上皮細胞と間葉細胞を高細胞密度で区画化して細胞凝集塊を作製する「器官原基法」を開発した(Nakao K et al., Nature Methods 4: 227 - 230, 2007)。この人工的な歯胚は、正常な歯胚の発生メカニズムを再現しており、生体内移植や生体外器官培養において100%の頻度で、正常な組織構造を有する再生歯を作製することを可能とし、長きにわたる細胞操作技術を完成させた。

2. 研究の目的

本研究課題では、器官原基法を基盤技術とし、歯の再生医療システムの構築に向けた基盤技術を開発することを目指すために下記の項目を遂行し、歯の再生の実用化に向けたシステムとなる基盤技術開発を推進した。

1) 人工的な歯胚を作製するための成体内細胞シーズの探索

将来の臨床応用化においては、患者由来の細胞を用いることが必要である。本研究グループが開発した器官原基法は、高効率に歯の形成を誘導できる唯一の評価方法であり、定量的に歯の形成能を評価することが可能である。この評価系を利用し、歯を形成する能力を有する細胞を探索すると共に、多能性幹細胞から歯原性上皮・間葉細胞を分化誘導し、歯の再生に応用できるシステムを動物モデルにて構築することを目的とした。

2) 人工歯胚・再生歯の移植システムの開発

ヒトの歯の再生に向けたシステム開発にお

いて、確実に機能しうる歯を口腔内に生着させるシステムを構築することが必要である。本項目では、再生歯胚、並びに歯周組織を有する完成歯にまで成長させた再生歯ユニットを成体口腔内に移植し、その生着と再生歯の機能的な解析を進めることにより、歯の再生医療に適した移植システムを構築する。

3) 次世代ハイブリッド型インプラントと歯周病治療法の開発

喪失した歯周組織の再生および歯根膜を有する次世代ハイブリッド型インプラント開発に向けて、本項目では、器官原基法により提供される歯根膜形成細胞をハイドロキシアパタイト (HA) の周囲に配置し、顎骨に埋入することより歯根膜形成に適した細胞を同定する。

4) 歯胚形成誘導遺伝子を用いた歯の再生医療システムの構築に向けた探索研究

胎児期の歯胚誘導を制御する遺伝子を歯の喪失部位で発現させることによる歯の再生医療システムを構築するために、誘導期の歯胚に発現する遺伝子をスクリーニングし、歯胚発生に関わる遺伝子の同定を行う。

3. 研究の方法

1) 人工的な歯胚を作製するための成体内細胞シーズの探索

マウスおよびヒトの口腔由来の組織幹細胞や各種組織から樹立した株化細胞、さらには多能性幹細胞を誘導して作製した上皮・間葉細胞を用いて、器官原基法により歯形成能を有する細胞の同定を行った。

2) 人工歯胚・再生歯の移植システムの開発

再生歯胚は胎齢 14.5 日マウス歯胚を用いて、既報(Nature Methods, 4, 227-130, 2007)に従って作製した。

(1) 再生歯胚ならびに再生歯の移植

再生歯胚からの再生歯の萌出、並びにその機能を解析するために、まず成体マウスにおける歯牙喪失動物モデルを開発した。成体マウス上顎第一臼歯を抜歯して歯の欠損部を治癒させた後、直径 1.0 mm の移植窩を形成して、再生歯胚を移植した。移植後、経時的に再生歯の萌出と咬合をマイクロ CT 撮影、口腔内観察、および組織学的に評価した。一方、完成した再生歯を移植して、顎骨に生着機能することを明らかとするために、再生歯胚から歯と歯周組織を有する再生歯ユニットを作製する方法、ならびに成体マウスにおける動物移植モデルを開発した。再生歯胚

を、3次元的な空間を確保するデバイス内に包埋してマウス腎皮膜下に移植を行い、移植に適した再生歯ユニットを作製可能であるか評価を行った。さらに、成体マウスの下顎第一臼歯を抜歯して歯肉治癒をさせた後、直径 1.0 mm の移植窩を形成し、再生歯ユニットを移植した。移植後、経時的な再生歯の生着をマイクロ CT 撮影および組織学的にて評価した。

(2) 歯の硬度の測定

口腔内に萌出および顎骨生着した再生歯およびが、咬合に耐えうる機能的な歯の硬さを有するかを明らかとするため、常法に従い、再生歯のエナメル質と象牙質におけるヌーブ硬度測定を行った。

(3) 歯根膜機能の解析

再生歯が歯根膜を介した歯槽骨のリモデリング能を有するかを解析するために、直径 0.010~0.012 インチの矯正用ワイヤーを用いて、再生歯に 10~15g の実験的矯正力を負荷し、6 日後における骨吸収、骨形成マーカーの組織学的評価を行った。

(4) 神経機能の解析

再生歯が、侵害刺激を中枢へ伝達しうる神経機能を有するかを解析するために、再生歯の歯髄・歯根膜における末梢神経線維を免疫染色にて検出し、さらに矯正による歯根膜の圧迫ならびに露髄刺激を与え、延髄の三叉神経脊髄路核において、中枢における痛みの指標である c-Fos タンパク質を発現するかを解析した。

(5) 歯槽骨再生効果の解析

歯槽骨を有して発生する再生歯ユニットを広範性の骨欠損部位に移植することにより、歯槽骨の回復を伴う再生歯の生着が可能であるかを解析するために、マウス下顎骨に広範性骨欠損モデル（近遠心径 1.5mm、頬舌径 1.2mm、高さ 0.6mm）を作製し、その部位に再生歯ユニットを移植して、経時的な歯槽骨の回復と再生歯の生着をマイクロ CT 撮影および組織学的にて評価した。

3) 次世代ハイブリッド型インプラントと歯周病治療法の開発

次世代ハイブリッド型インプラントに応用可能な歯周組織を形成しうる細胞シース探索のために、様々な発生段階の歯胚、歯周組織に由来する組織・細胞をHA上に付与して、マウス腎皮膜下に移植することで、形成される組織を評価した。

4) 歯胚形成誘導遺伝子を用いた歯の再生医療システムの構築に向けた探索研究

歯胚形成が誘導可能な遺伝子の同定に向けて、天然歯胚の誘導に関わる遺伝子の網羅的な解析を行った。天然歯胚の誘導と形成が認められる胎齢 11.5 日、12.5 日、14.5 日、16.5 日、18.5 日のマウス胎児から摘出した下顎臼歯歯胚の total RNA を、定法により抽出した。Agilent 4 x 44K Whole Mouse Genome を用いてマイクロアレイ解析を行い、時間経過に伴う遺伝子発現の変動パターンを Gene Spring software を用いて解析し、歯胚の誘導が起こる胎齢 11.5~14.5 日の天然歯胚において高発現する遺伝子を選別した。これらの遺伝子の誘導期歯胚における遺伝子発現を明らかにするため、定法により特異的な RNA プロブを合成し、*in situ* hybridization 法を用いて胎齢 12.5~14.5 日の天然歯胚における遺伝子発現のデータベース化を行った。

4. 研究成果

1) 人工的な歯胚を作製するための成体内細胞シースの探索

歯形成能を有する上皮・間葉細胞を探索する目的で、p53欠損マウスと天然マウス (C57BL/6) の歯胚、口腔粘膜、歯肉、歯髄、歯根膜より各種初代培養細胞、ならびに株化細胞を取得した。これらの細胞において、器官原基法により歯形成能を評価したところ、p53欠損マウスより樹立した胎仔歯胚由来上皮系細胞株、および間葉系細胞株がエナメル芽細胞・象牙芽細胞マーカーを発現し、歯形成能を有することを明らかにした。さらにヒト若齢歯胚組織を免疫不全マウスに移植することにより、象牙質、セメント質、歯根膜を形成可能な細胞が存在することを示した。

2) 人工歯胚・再生歯の移植システムの開発

(1) 再生歯胚ならびに再生歯の移植

再生歯胚を成体マウスの歯喪失部位に移植したところ、移植 37 日目には、約 60% 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。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 1)。一方、完成した歯の構造体である再生歯ユニットを作製するために、器官原基法によって再生歯胚を空間確保が可能なデバイス内に位置して腎皮膜下移植を行った。その結果、成熟した歯・歯根膜・歯槽骨が一体となった歯の構造体である再生歯ユニットを作製可能であり、歯冠の厚み、ならびに歯の長さが規定された移植に適した形態を有していた。腎皮膜下で形成される再生歯ユニットは歯を構成する組織構造も天然歯と同等であった (図 2)。再生歯ユニットを歯牙喪失モ

デルに移植したところ、移植 40 日目には再生歯ユニット由来の歯槽骨の吸収とともに再生歯歯根周囲の歯槽骨の形成・緻密化が認められた。同時期における CT 像および組織像の解析から、約 80% の頻度で再生歯ユニットが骨結合を介して生着していることが示された (図 3)。

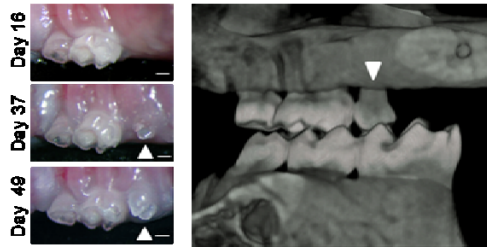


図 1: 成体顎骨内での再生歯の萌出と咬合
Arrow head: 再生歯

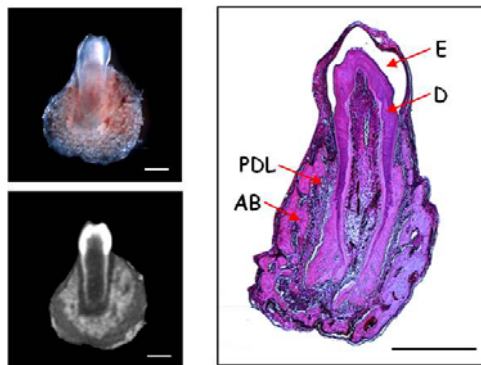


図 2: 腎臓皮膜下で発生した再生歯ユニット
E: エナメル質、D: 象牙質、AB: 歯槽骨、PDL: 歯根膜
Scale Bar: 500 μ m

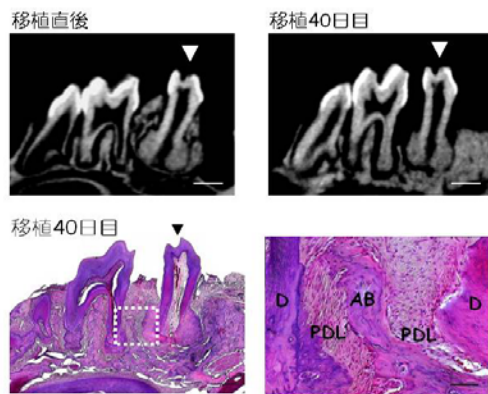


図 3: 顎骨に骨性生着した再生歯ユニット
D: 象牙質、AB: 歯槽骨、PDL: 歯根膜 Scale Bar: 500 μ m

(2) 歯の硬度の測定

歯の咀嚼機能には、歯の硬組織の硬度が重要であるため、口腔内に萌出した再生歯のヌープ硬度を測定したところ、移植11週目の再生歯のエナメル質、象牙質の硬度は、いずれも9週齢の成体マウス天然歯の硬さと同等であった。一方、腎臓皮膜下で発生した再生歯ユニット、および顎骨に生着した再生歯のヌ

ープ硬度を測定したところ、腎臓皮膜下で発生した再生歯のエナメル質の硬度は天然歯と比較して低いものの、顎骨移植40日後の再生歯のエナメル質の硬度は有意に上昇していた。また象牙質の硬度は、いずれも11週齢の成体マウス天然歯の硬さと同等であった。これらのことから、口腔内で萌出した再生歯、ならびに再生歯ユニットは咀嚼可能な機能的な歯の硬度を有することが明らかになった。

(3) 歯根膜機能の解析

口腔内に萌出した再生歯、ならびに顎骨に生着した再生歯が、天然歯と同等の生理的機能を有するかを明らかとするために、歯根膜機能および神経機能について解析を行った。歯根膜を介する歯の移動能を実験的矯正により解析すると、矯正開始後6日目には歯周囲の歯根膜の形態が変化すると共に、牽引側では骨形成を示すOsteocalcinのmRNAの発現が認められ、逆に圧迫側では骨吸収を示すTRAP陽性の破骨細胞が認められた。このことから、歯根膜を介した歯槽骨のリモデリングにより、再生歯が天然歯と同等の歯根膜機能を有することが判明した。

(4) 神経機能の解析

口腔内に萌出した再生歯、ならびに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侵入しており、天然歯と同様に外部侵害刺激を中枢神経へ伝達できる可能性が示された (図 4a)。

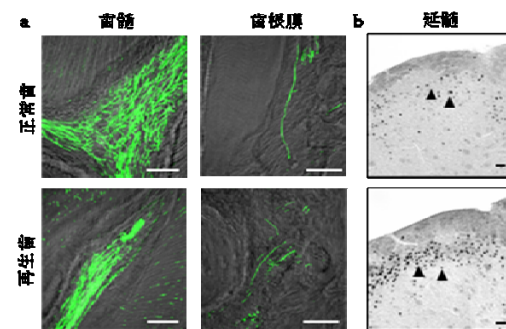


図 4: 正常歯と再生歯に侵入する神経
(a) 歯髄・歯根膜に侵入する神経 Scale bar: 25 μ m
(b) 正常歯と再生歯の矯正後の三叉神経脊髄路核における c-Fos 陽性神経核の免疫組織化学染色像。
Arrow head: c-Fos 陽性神経核、Scale bar: 50 μ m

さらに、再生歯に矯正力および露髄による侵害刺激を与えると、天然歯を刺激したものと同様に、三叉神経脊髄路核の一部の神経線維でc-Fosタンパク質の産生が認められることから、再生歯の神経線維は外部侵害刺激を中枢に伝達していることが判明した (図4b)。

(5) 歯槽骨再生効果の解析

歯槽骨を有した再生歯ユニットを歯槽骨が吸収した歯の喪失部位に移植することにより、歯槽骨の回復を伴う再生歯の生着が可能であるかを解析するために、広範性骨欠損モデルに再生歯ユニットを移植したところ、移植45日目には頬側歯槽骨の垂直的な回復が認められた。このことから、深刻な骨欠損を伴う歯の喪失部位に対して再生歯ユニットを移植することにより、歯槽骨の回復を伴う生着が可能であることが示された(図5)。

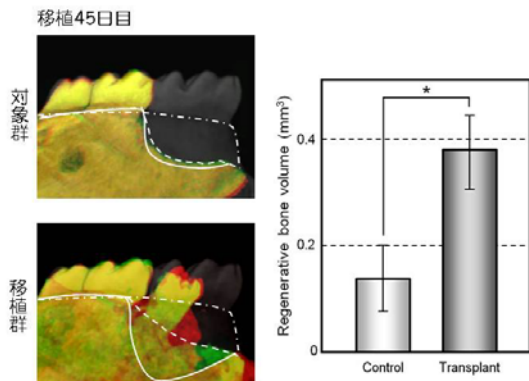


図5: 再生歯ユニット移植による歯槽骨回復効果。天然歯抜去前(灰色)、骨欠損作製(再生歯ユニット移植)直後(赤色)、45日経過後(緑色)のCT画像の重ね合わせ像(左図)。各時点での頬側歯槽骨頂をそれぞれ一点鎖線、実線、破線にて示す。移植後の再生した歯槽骨量を示す(右グラフ)。

3) 次世代ハイブリッド型インプラントと歯周病治療法の開発

次世代ハイブリッド型インプラントのモデルとして、臨床で用いられる HA インプラントと同等の高結晶型の HA チップを足場材料として選択した。また、歯周組織を形成しうる細胞シード探索を実施し、歯の発生段階におけるマウス胎齢 18 日の歯小囊組織が歯根膜損傷部位に移植することにより、歯周組織再生を促進すること、さらに同歯小囊組織を HA 周囲に配置して腎皮膜下移植することにより HA 表層に歯周組織を形成可能であることを明らかにした。

4) 歯胚形成誘導遺伝子を用いた歯の再生医療システムの構築に向けた探索研究

歯胚形成誘導遺伝子の同定のために、マウス胎齢11.5~14.5日におけるtotal RNAを用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、歯胚形成誘導期に高発現する76遺伝子をスクリーニングした。これらの76遺伝子の遺伝子発現領域を同定するため、各歯胚発生過程を*in situ hybridization*にて発現パターン解析を行ったところ、候補遺伝子のうち20遺伝子が帽状期歯胚においてシグナルセンターの役割を

果たすエナメルノット、ならびに象牙質、歯髄、歯周組織の発生源である歯原性間葉に対して特異的に発現する遺伝子群であることが判明した。

次に、候補遺伝子の歯胚発生過程における機能を解析するために、遺伝子導入型歯胚作製技術の確立を行った。歯胚細胞へ遺伝子導入可能なアデノウイルス発現系を用いて歯胚に遺伝子導入し、器官培養により発生に及ぼす影響をモニターすることで、候補遺伝子の機能を解析する実験システムの検討を行った。Bmp シグナルを抑制する SMAD6 と Noggin アデノウイルスを用いて検討したところ、歯胚発生が抑制されたことから、本実験システムは歯胚発生を制御する候補遺伝子の同定と機能の解明が可能であることが示された。

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]

査読有論文 計 37 件、総説・解説等 14 件

(代表的論文)

- 1 Kentaro Ishida, Mayumi Murofushi, Kazuhisa Nakao, Ritsuko Morita, Miho Ogawa and Takashi Tsuji. 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.* 査読有. 405(3),2011, 455-461.
- 2 Etsuko Ikeda, Ritsuko Morita, Kazuhisa Nakao, Kentaro Ishida, Takashi Nakamura, Teruko Takano-Yamamoto, Miho Ogawa, Mitsumasa Mizuno, Shohei Kasugai and Takashi Tsuji. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 査読有. 106(32),2009. 13475-13480.
- 3 Kazuhisa Nakao and Takashi Tsuji. Tooth Regeneration from Bioengineered Organ Tooth Germ by *in vitro* Cell Manipulation. *Japanese Dental Science Review.* 査読有. 44.2008.70-75.
- 4 Etsuko Ikeda and Takashi Tsuji. Growing Bioengineered Teeth from Single Cells: Potential for Dental Regenerative Medicine. *Expert Opin. Biol. Ther.* 査読有. 8.2008.7 35-744.

[学会発表]

招待講演：34 件、一般学会発表：144 件
(代表的発表)

- 1 Masahiro Saito and Takashi Tsuji, Fully functional bioengineered tooth replacement as a future tooth regenerative therapy, First Annual Weintraub Center Retreat (招待講演)、2010年4月17日、ロサンゼルス、アメリカ
- 2 Takashi Tsuji, Fully functional bioengineered tooth replacement as a future tooth regenerative therapy, The All-Russia Scientific Summit, (招待講演)、2010年2月8日、ロシア、モスクワ
- 3 Takashi Tsuji, Tooth Regenerative Therapy as a Future Organ Replacement Regenerative Therapy, 東京医科歯科大学 GCOE講演会、2010年2月22日、日本、茨城
- 4 Masahiro Saito and Takashi Tsuji, Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy, JAPAN-ISRAEL “STEM CELLS” WORKSHOP 22-26.2.2010, (招待講演)、2010年2月23日、イスラエル
- 5 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 (招待講演)、2010年5月8日、東京、東京国際フォーラム
- 6 辻 孝, 臓器置換再生医療の実現を目指してー歯や毛髪再生からアプローチした研究戦略と展開ー、第186回生命科学フォーラム (招待講演)、2010年7月28日、東京・日本記者クラブ
- 7 辻 孝, 次世代再生医療である臓器置換再生医療の実現に向けた先端基盤技術の開発、特許庁先端技術研修 (招待講演)、2010年11月19日、東京・経済産業省別館1階
- 8 辻 孝, 未来の歯科治療を創造する歯科再生医療ー研究の現状と将来展望ー、愛知学院大学歯学部創立50年記念講演会 (招待講演)、2010年11月27日、愛知・名古屋観光ホテル

[図書] (計3件)

(代表的図書)

- 1 春日井昇平, 永末書店、MI時代の歯科知識、2009、p144

[産業財産権]

○出願状況 (計7件)

(代表的出願)

1. 名称：再生歯ユニットの製造方法
発明者：辻 孝, 中尾一久, 大島正充
権利者：(株) オーガンテクノロジー
種類：特願
番号：2010-196009
出願年月日：平成22年9月1日
国内外の別：国内

2. 名称：歯欠損部の修復方法及び修復材料の製造方法
発明者：辻 孝, 池田悦子, 朝井洋明
権利者：(株) オーガンテクノロジー
種類：特願
番号：2010-525698
出願年月日：平成22年12月28日
国内外の別：国内
3. 名称：歯欠損部の修復方法
発明者：辻 孝, 池田悦子, 朝井洋明
権利者：(株) オーガンテクノロジー
種類：外国特許出願
番号：PCTJP2009/064509
出願年月日：平成21年8月19日
国内外の別：外国

[その他]

ホームページ <http://www.tsuji-lab.com/>

新聞報道 国内 計56件

雑誌 国内 計11件

国外 計4件

WEB報道 国内 計40サイト以上、

国外 計180サイト以上

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 孝 (TSUJI TAKASHI)

東京理科大・総合研究機構、教授

研究者番号：50339131

(2)研究分担者

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大・院・医歯薬学、教授

研究者番号：00225195

春日井 昇平 (KASUGAI SHOHEI)

東京医歯大・院・医歯薬学、教授

研究者番号：70161049

友岡 康弘 (TOMOOKA YASUHIRO)

東京理科大・基礎工学部、教授

(3)連携研究者

山本 照子 (YAMAMOTO TERUKO)

東北大・院・歯学、教授

研究者番号：00127250

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)

岡山大・医・歯学部附属病院、助教

研究者番号：40325121

齋藤 正寛 (SAITO MASAHIRO)

東京理科大・基礎工学部、准教授

研究者番号：40215562