

次世代再生医療としての歯の再生

Tooth Regeneration as a Next Generation of Organ Replacement Regenerative Therapies

小川 美帆^a, 大島 正充^b, 辻 孝^{a, b, c}

Miho Ogawa, Masamitsu Oshima and Takashi Tsuji

^a(株)オーガンテクノロジーズ

^b東京理科大学・総合研究機構

^c東京理科大学・基礎工学研究科

要 旨 21世紀の医療システムとして再生医療が期待されている。再生医療は幹・前駆細胞を傷害部位に移入する移植療法から臨床応用化研究が始まりつつある。さらに次世代の再生医療として、機能を喪失した臓器・器官を人為的に創り出した再生器官と置き換える「臓器置換再生医療」の開発が期待されている。歯科領域は、ブリッジやインプラントなど歯の喪失に対する人工的な治療法が確立しており、さらに喪失した歯を再生した歯により取り戻す「歯の再生治療」に向けた研究が、他の器官に先駆けて進められている。本稿では歯科再生医療の研究開発戦略を概説すると共に、私たちの研究成果を中心に歯科再生治療の現状と課題を解説する。

キーワード：歯科再生医療，器官原基法，臓器置換再生療法，再生歯胚，細胞操作技術

1. はじめに

再生医学は、生物学的な発生・再生の仕組みや幹細胞生物学、組織工学を融合させ、21世紀の新しい学問的な体系として確立されつつある¹⁻³⁾。さらにこの学問を医療に応用した再生医療が、21世紀の新たな医療システムとして期待されている。現在の再生医療では、部分的に傷害を受けた組織や器官の修復を目的として、生体から採取した幹細胞を移入する「幹細胞移入療法」を中心に、白血病における造血幹細胞移植や心筋梗塞をはじめ、歯科領域のう蝕や歯周病治療など、幅広い疾患において臨床応用化研究が進められている⁴⁻⁸⁾。

一方、重篤な疾患や損傷によって不可逆的な傷害を受けた臓器・器官に対する有効な治療法は臓器移植であるものの、移植を望む患者に対して提供可能な臓器の不足が大きな社会問題になっている。再生医療の大きな目標のひとつは、この臓器不足の解決に向けて、機能不全に陥った臓器を再生した臓器とまるごと置き換える「臓器置換再生医療」の確立である。歯科領域は、ブリッジやインプラントなど歯の喪失に対する人工的な治療法が確立しているため、喪失した歯を再生により取り戻す「歯の再生治療」は臓器置換再生医療の中でも他の器官に先駆けたモデルケースとして期待されている^{9,10)}。最近、私たちは胎仔期に形成される歯の原基である歯胚を三次元的な細胞操作によって再生し、成体マウスの歯

の欠損部位に移植することで、再生歯胚から生理的機能を有する再生歯へと成長しうることを示した^{11,12)}。本稿では、臓器置換再生医療のモデルとして歯科再生医療の現状について私たちの研究成果を中心に解説すると共に、実用化に向けた課題を述べたい。

2. 歯科における再生医療のニーズ

歯は外胚葉性器官のひとつであり、咀嚼や発音などに伴う咬合と顎の運動機能に重要な役割を果たすと共に、外部からの刺激を受容する一種の知覚器官としての役割も果たしている¹³⁾。歯は頭蓋・顎顔面と連携してこれらの生理的機能を発現していると考えられており¹⁴⁾、歯そのものの欠損や咬合を支持する歯根膜、顎関節機能のいずれの機能に問題が発生しても生理的機能に悪影響が及ぼされ、機能障害がおこると考えられている^{15,16)}。

歯科医療において、歯の喪失に対する咬合機能の回復を目指してブリッジや義歯（入れ歯）による人工的な器官の機能代替治療が進められてきた^{17,18)}。さらに最近では、チタンやアパタイト製のインプラントが歯槽骨と結合する性質を利用して、口腔インプラント治療が確立し、普及しつつある¹⁹⁻²¹⁾。しかしながらインプラント体には歯根膜が存在しないため、咬合緩衝能や移動能を有しないことが問題となっており、最近の国民の健康感の向上に伴って、より生理的かつ機能的な歯科治療が期待されている。

一方、歯の欠損に対する生物学的な治療として、歯の自家移植が行われている²²⁾。歯の自家移植は、自己口腔内の非機

^a 〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

TEL: 04-7124-1501 (内線 4427)

2010年12月7日受付

能歯を欠損部に移植・生着させるため、歯根膜による歯の生理的機能を回復させることが可能であり、機能的な咬合を大きく回復させることができる。しかしながら、移植可能な自家歯が必要であることなどの治療適応に制限がある。そのため、より生物学的で、かつ生理的機能の回復が可能となる「歯の再生治療」が期待されるようになった。歯科治療では、歯そのもの、すなわち器官の喪失に対する代替治療が確立しているため、従来の歯科治療と再生治療との連携や応用も可能であり、臓器置換再生医療に向けた技術開発のフィージビリティスタディとしてよいモデルであると期待されている。

3. 器官発生システムを利用した歯の再生に向けた戦略

臓器・器官は複数種類の細胞からなる機能的な単位であり、その組織構造は高効率な機能発現に適した三次元的に複雑な構造を有している。現在の生命科学技術では、複数種の細胞を機能的な臓器に組み立てる技術も、組み立てた臓器を培養する方法も確立していない。そのため、歯を再生するといっても、歯を構成する細胞をすべて用意して、3次元的に適切な組織配置をとらせて、機能的な歯を再生することは現在の再生技術では確立されていない。

外胚葉性器官である歯をはじめとするほとんどの臓器・器官は、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る「器官原基」から発生する。歯の発生は、ヒトでは妊娠6～7週、マウスでは胎齢10日目に歯の発生予定領域の上皮組織が肥厚することで始まる(図1A)。その後、間葉組織側に陥入をはじめ、胎齢11日目にはその陥入領域に接する間葉細胞が密集して「歯胚」を形成する(蕾状期)。胎齢13～14日には、上皮細胞が凝集した間葉細胞を包み込むように伸長し(帽状期)、胎齢15～18日には上皮組織と間葉組織それぞれの組織から分化したエナメル芽細胞と象牙芽細胞が境界面に向けて、エナメル質と象牙質を分泌するよ

うになり、硬組織形成が始まる(鐘状後期)(図1A)。その後、歯は硬組織の成熟とともに垂直方向に伸長して歯根を形成する(図1B)。歯根周囲では歯小囊由来の細胞から、セメント質、歯根膜、歯槽骨といった歯周組織が形成されて顎骨と連結される。歯根伸長に伴って歯は口腔内に萌出し、対合歯と咬合するようになると歯の成長は停止する(図1B)。

このように複数種の細胞や硬組織、神経、血管などが高度に組織化される歯をひとつの器官再生のモデルとして、器官原基を人為的に作製して臓器発生の生物プログラムを利用して器官をつくりだすアプローチが進められるようになった。具体的には歯を再生するために、未分化な上皮・間葉細胞の2種類のみから歯胚を再生し、歯の欠損部位へ移植するという戦略であり、乳歯、永久歯に続く第三の歯を生やす「再生歯胚からの歯の再生」が提唱されるようになった。

4. 歯胚再生のための三次元的な細胞操作技術、「器官原基法」の開発

再生歯胚による歯の再生を実現するためには、「三次元的な細胞操作によって歯胚を再生する技術開発」が必要である。この技術開発を組織工学的に分類すると、任意の大きさや形に成形した担体に細胞を播種することによって歯胚をつくりだす方法²³⁾と、上皮細胞と間葉細胞の凝集体を作製し、胎仔期の歯胚を再現する方法が代表的である²⁴⁾。これまでに、これらの方法によって正常な組織構造を有する歯ができることの報告はあるものの、その頻度は低く、また歯の形態に異常が見られるなどの問題点を有しており、安定して再生歯をつくりだす方法の開発が期待されていた。

そこで私たちは、歯の発生を再現する歯胚を再生するには、細胞間相互作用が可能となるような高い細胞密度で上皮細胞と間葉細胞が区画化して配置されていることが重要と考え、2007年に「器官原基法」を開発した¹¹⁾。この方法では、胎

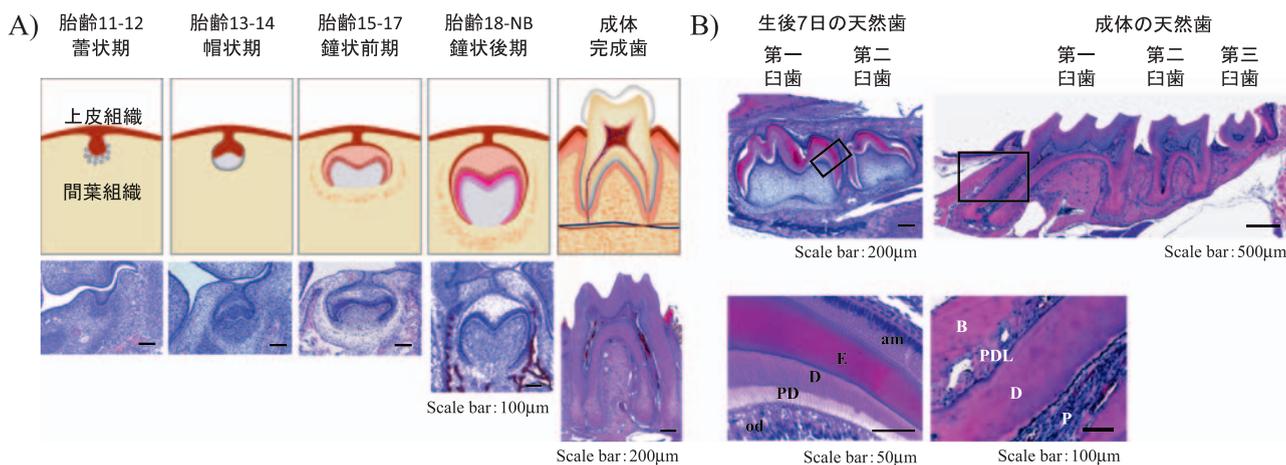


図1 歯の発生過程

A) 歯の各発生段階における模式図と HE 染色像を示す。

B) 生後7日(左図)ならびに成体(右図)の下顎骨における歯の HE 染色像、および歯冠部(左下図)および歯根部(右下図)の拡大像を示す。od: 象牙芽細胞, PD: 象牙前質, D: 象牙質, E: エナメル質, am: エナメル芽細胞, P: 歯髄, B: 歯槽骨, PDL: 歯根膜

齢 14.5 日のマウス胎仔歯胚に由来する単一化した上皮細胞と間葉細胞から高細胞密度の細胞懸濁液を調製し、これらの細胞を互いに接触するようにコラーゲン溶液の内部に配置し、コラーゲン溶液をゲル化させることによって再生歯胚を作製した (図 2A)。再生歯胚をマウス腎被膜下に移植して異所的に発生させると、すべての再生歯胚が正常な歯胚発生過程を再現し、歯胚上皮細胞に由来するエナメル芽細胞やエナメル質、歯胚間葉細胞に由来する象牙芽細胞や象牙質、歯髓細胞、歯周組織を形成するセメント質、歯根膜、歯槽骨など、歯胚に由来するすべての構成要素が正常な組織配置を有して発生することが明らかになった (図 2B)。またこの方法は、歯胚以外に毛包原基の再生にも利用可能であることから (図 2C)、単一化細胞から高効率に器官原基を再生するための細胞操作法として有用性が高いと考えられる。

5. 生理的機能を有する歯の再生

歯の再生治療の実用化には、再生歯が組織学的に正常であることだけでなく、成体口腔内で成長し、歯としての正常な機能を有するかどうかが重要である。歯は咀嚼や発音といったクオリティーオブライフに関わる審美性などの重要な口腔機能を担っている。これらの口腔機能は、歯、咀嚼筋、顎関節が中枢神経系の制御下において協調機能することにより成り立っている¹⁴⁾。したがって、歯科再生治療の確立には成体

口腔内の歯の喪失部位で萌出すると共に、顎顔面領域における咀嚼、神経を介した中枢への侵害刺激の伝達を果たしうる機能的な歯を再生することが必要である。そこで私たちは、再生歯胚の成体口腔内での発生・萌出を解析すると共に、再生歯の機能解析として、咬合機能、並びに外部侵害刺激にตอบสนองしうる神経機能について解析した¹²⁾。

5.1 再生歯の萌出と咬合

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¹²⁾。マウス上顎第一臼歯を抜去し、3週間かけて抜歯窩を治癒させた後、再び歯の欠損部位に歯科用エンジンドリルを用いて移植窩を形成して再生歯胚を移植した (図 3A)。移植後 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 (図 3B)。また再生歯は、エナメル質や象牙質、歯髓、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 3C)。さらに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現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 3D)。

一方、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、歯根膜機能によって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咬頭嵌合を確立することが判明した (図 3E)。これらのことから、再生歯は天然歯と同等の組織構造を有すると共に、歯根膜を介した咬合の確立と維持する機能を有した機能的な歯へと成長することが明らかになった。

5.2 再生歯の神経機能の解析

歯は口腔内の重要な知覚器官であり、歯髓や歯根膜の末梢神経が咬合圧や痛みなどの感覚受容器として機能している (図 4A)。そのため、機能的な歯の再生には末梢神経の侵入と中枢神経系との連絡が重要と考えられる。再生歯の歯髓や歯根膜には正常な歯と同様に末梢神経の侵入が認められ、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 4B)。中枢における痛みの反応は、延髄の三叉神経脊髄路核の神経の一部が c-Fos タンパク質を産生して応答することが知られている^{25,26)}。そこで再生歯に矯正力および露髄刺激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 4C)。

6. 歯科再生医療の実現に向けての課題

これまでの研究成果から、生体外における三次元的な細胞操作技術である器官原基法の開発、並びに再生歯胚の移植による機能的に完全な歯の再生が可能であることから歯科再生医療の実現可能性が示されたものと考えられる。しかしながら、その実用化を現実のものにするには未だ解決すべき課題が残されている。

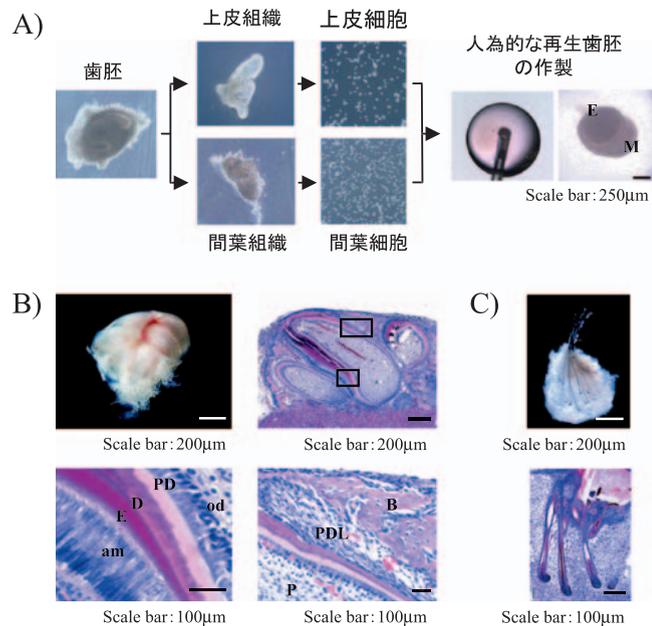


図 2 再生歯胚作製のための器官原基法

A) 再生歯胚の作製方法を示す。E: 上皮細胞凝集体, M: 間葉細胞凝集体

B) 腎被膜下に再生歯胚を移植後 14 日目において発生した再生歯の実体像 (左上図) と HE 染色像 (右上図), および歯冠側 (左下図), 歯根側 (右下図) の拡大像を示す。od: 象牙芽細胞, PD: 象牙前質, D: 象牙質, E: エナメル質, am: エナメル芽細胞, P: 歯髓, B: 歯槽骨, PDL: 歯根膜

C) 腎被膜下で発生した毛髪の実体像 (上図) と HE 染色像 (下図) を示す。

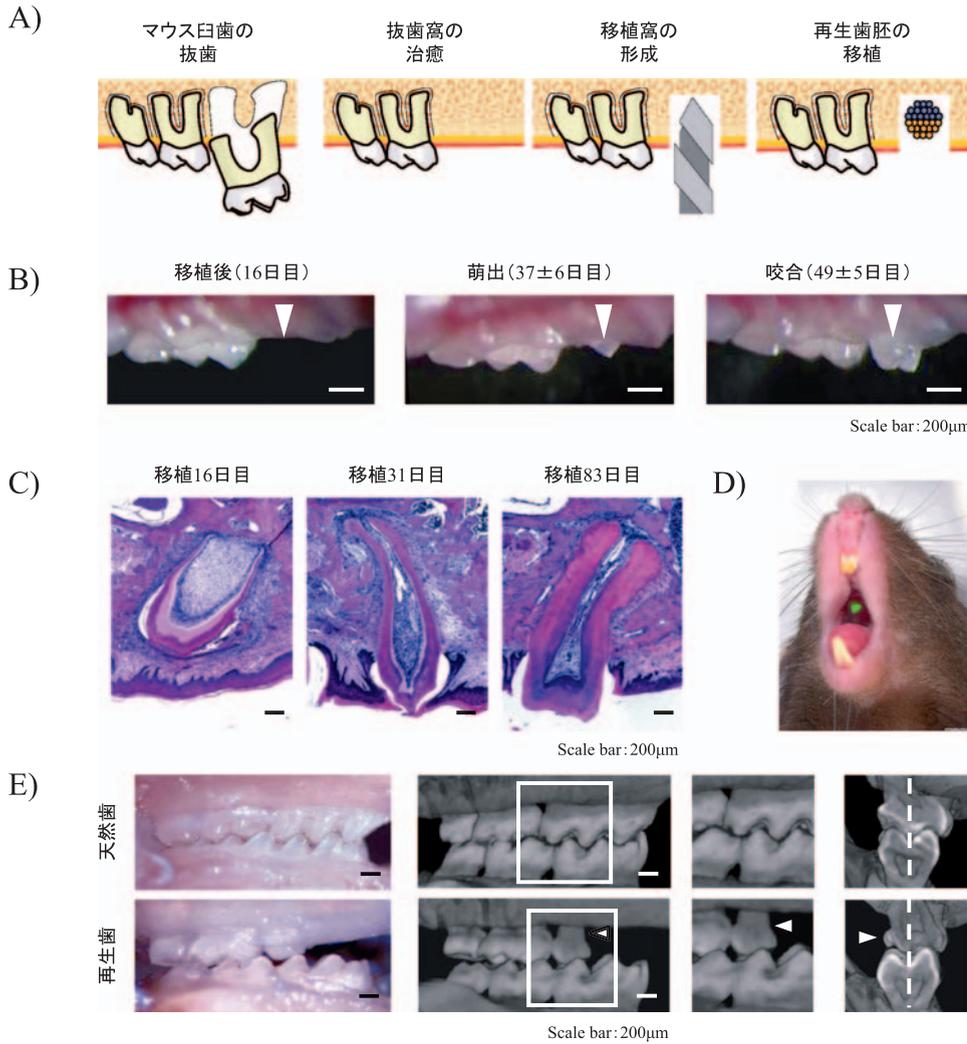
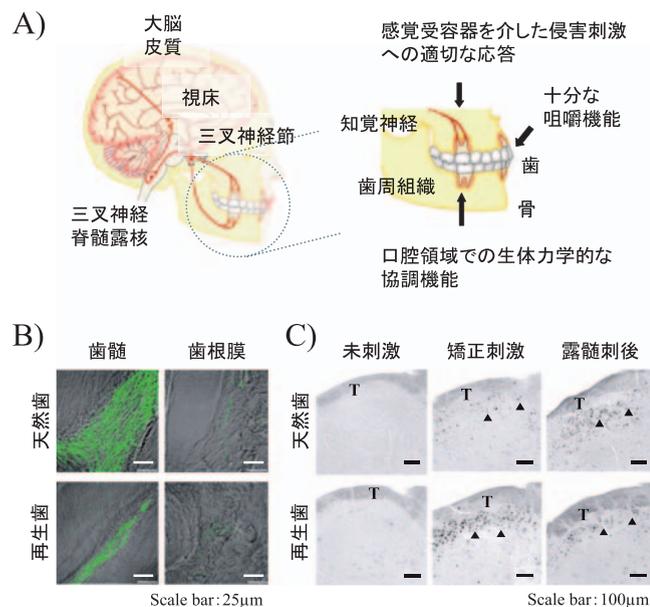


図3 成体マウス口腔内で発生・萌出した再生歯

A) 再生歯胚の口腔内移植方法の概略図を示す。
 B) 再生歯が成体口腔内で発生し、萌出・成長する過程を示す。△：再生歯
 C) 成体マウス口腔内で発生・萌出した再生歯の HE 染色像を示す。
 D) GFP 標識された再生歯の口腔内写真を示す。
 E) 天然歯および再生歯における咬合状態の口腔内写真 (左図), CT 像 (左中央図), および CT 拡大像 (右中央図: 矢状面, 右図: 前頭断面) を示す。△: 再生歯



ヒトの歯の再生を実現するためには、移植免疫による拒絶反応を回避するため、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。これまでにヒトの歯に由来する組織幹細胞として歯髄幹細胞、乳歯歯髄幹細胞、歯根膜幹細胞、歯乳頭由来幹細胞が存在し^{27~30)}、象牙質や歯根膜組織を形成することが報告されている。これらの細胞は、歯科再生医療のための細胞シーズがヒト成体の歯の組織に存在する可能性を示すものではあるものの、いずれも部分的な歯の組織の再生に留まり、歯全体の再生には至っていない。完全な歯の再生には、胎仔期の歯胚誘導を再現しうる遺伝子や、誘導能のあ

図4 再生歯の神経機能

A) 歯に侵入する神経と顎顔面領域における歯の機能についての概略図を示す。
 B) 天然歯と再生歯の歯髄 (左図) および歯根膜 (右図) に侵入する Neurofilament 陽性神経線維 (緑) の免疫染色像を示す。
 C) 天然歯および再生歯に矯正力負荷 (中央図) および露髄刺激後 (右図) を加えた際の三叉神経脊髄路核における c-Fos タンパク質の免疫染色像を示す。T: 三叉神経脊髄路核, ▲: c-Fos 陽性核

る上皮・間葉細胞が必要であると考えられる。

またヒトの場合には、再生歯胚から萌出、咬合までにかかる時間は長期間であるため、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期待される。現在のところ、三次元的に細胞凝集塊や組織、器官を培養できる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構築を含む培養システムの開発が、臓器置換再生医療の実現には必須であると考えられる。

7. おわりに

本稿では、再生歯胚からの歯の再生を中心に、最近の研究成果の進展について解説した。歯の再生治療には、幹細胞による歯髄再生や歯周再生のような傷害部位に応じた組織治療も含まれ、これらは現在、臨床応用化が進められている幹細胞移入や、サイトカインによる組織幹細胞の賦活療法として早い実用化が期待される。このような再生治療の実現に向けた技術開発は、従来の人工材料による歯科治療から、歯の生理的機能を生物学的に回復させる歯科再生治療の実現に向けた研究として期待されると共に、臓器置換再生医療の先駆けとして幅広い臓器・器官再生のモデルとなることが期待される。

文 献

- 1) Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S. and Mori, H.: *Nat. Med.*, 12, 459–465 (2006)
- 2) Sekine, H., Shimizu, T., Yang, J. and Okano, T.: *Circulation*, 114, 187–193 (2006)
- 3) Yang, J., Yamato, M., Nishida, K., Ohki, T., Kanzaki, M., Sekine, H., Shimizu, T. and Okano, T.: *J. Control Release*, 116, 193–203 (2006)
- 4) Appelbaum, F.R.: *Nature*, 411, 385–389 (2001)
- 5) Kim, J.H., Auerbach, J.M. and Rodríguez-Gómez, J.A.: *Nature*, 418, 50–56 (2002)
- 6) Amado, L.C., Saliaris, A.P., Schuleri, K.H., John, M.S., Xie, J., Cattaneo, G., Durand, D.J., Fitton, T., Kuang, J.Q., Stewart, G., Lehrke, S., Baumgartner, W.W., Martin, B.J., Heldman, A.W. and Hare, J.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11474–11479 (2005)
- 7) Rimondini, L. and Mele, S.: *Minerva Stomatol*, 58(10), 483–500, (2009)
- 8) Hasegawa, N., Kawaguchi, H., Hirachi, A., Takeda, K., Mizuno, N., Nishimura, M., Koike, C., Tsuji, K., Ida, H., Kato, Y. and Kurihara, H.: *J. Periodontol*, 77(6), 1003–1007 (2006)
- 9) PT シャープ, CS ヤング: 日経サイエンス, 11, 41–49 (2005)
- 10) 辻 孝: 日本歯科医師会雑誌, 60(7), 635–646 (2007)
- 11) Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M., Saitoh, M., Tomooka, Y. and Tsuji, T.: *Nat. Methods*, 4(3), 227–230 (2007)
- 12) Ikeda, E., Morita, R., Nakao, K., Ishida, K., Nakamura, T., Takano-Yamamoto, T., Ogawa, M., Mizuno, M., Kasugai, S. and Tsuji, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(32), 13475–13480 (2009)
- 13) James, K.A.: *Oral Development and Histology*, Second Edition, Thieme Medical Publishers, 94–109 (1994)
- 14) Proffit, W.R.: *Contemporary Orthodontics*, Mosby (2007)
- 15) Nickel, J.C., Iwasaki, L.R., Walker, R.D., McLachlan, K.R. and McCall, W.D.: *J. Dent. Res.*, 82, 212–217 (2003)
- 16) Dawson, P.E.: *Functional Occlusion from TMJ to Smile Design*, Mosby (2006)
- 17) Pokorny, P.H., Wiens, J.P. and Litvak, H.: *J. Prosthet. Dent.*, 99(4), 299–313 (2008)
- 18) Cooper, L.F.: *J. Prosthodont*, 18(2), 116–122 (2009)
- 19) Brånemark, P.I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B.O., Lindstrom, J. and Ohlsson, A.: *J. Plast. Reconstr. Surg.*, 3, 81–100 (1969)
- 20) Linder, L., Albrektsson, T., Brånemark, P.I., Hansson, H.A., Ivarsson, B., Jonsson, U. and Lundstrom, I.: *Acta. Orthop. Scand.*, 54, 45–52 (1983)
- 21) Albrektsson, T. and Sennerby, L.: *Int. J. Prosthodont*, 3, 30–41 (1990)
- 22) Cohen, A.S., Shen, T.C. and Pogrel, M.A.: *J. Am. Dent. Assoc.*, 126, 481–485 (1995)
- 23) Honda, M.J., Sumita, Y., Kagami, H. and Ueda, M.: *Arch. Histol. Cytol.*, 68, 89–101 (2005)
- 24) Hu, B., Nadiri, A., Kuchler-Bopp, S., Perrin-Schmitt, F., Peters, H. and Lesot, H.: *Tissue Eng.*, 12, 2069–2075 (2006)
- 25) Byers, M.R. and Narhi, M.V.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 10, 4–39 (1999)
- 26) Deguchi, T., Takeshita, N., Balam, T.A., Fujiyoshi, Y. and Takano-Yamamoto, T.: *J. Dent. Res.*, 82, 677–681 (2003)
- 27) Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G. and Shi, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(25), 13625–13630 (2000)
- 28) Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G. and Shi, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(10), 5807–5812 (2003)
- 29) Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Barhim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y. and Shi, S.: *Lancet*, 364(9429), 149–155 (2004)
- 30) Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.M., Zang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.Y., Shi, S. and Wang, S.: *PLoS. One*, 1, e79 (2006)