

歯延命化をめざす歯髄再生実用化の隘路解消

実施予定期間：平成 22 年度～平成 26 年度

総括責任者：大島 伸一（(独) 国立長寿医療研究センター）

研究代表者：中島 美砂子（(独) 国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部口腔機能再生研究室）

I. 概要

本研究は、歯の延命化に対して画期的・革命的解決法を与える、抜髄・感染根管歯における歯髄再生治療法の実用化のため、隘路解消を目的とする。まず、膜遊走分離法にて分取・増幅した自家歯髄幹細胞の、適切な品質規格、評価基準を設定し、安全性と安定性を効率的に確保し、適切な安全性・安定性の試験法を確立する。また、抜髄および感染根管治療後、自家歯髄幹細胞を根管内に移植して歯髄を再生させる治療法の有効性を示す指標を決定する。3年以内に、非臨床試験においてこれらの適切な方法を用いて安全性・有効性を確認する。その後、倫理・利益相反委員会承認、ヒト臨床研究・ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会承認を得て、4年以内に臨床研究を開始する。

1. 機関の現状

歯を失う原因の半分はう蝕である。歯髄は歯の機能維持に種々の重要な役割を有するが、現在の治療法では深いう蝕で歯髄が露出するあるいは歯髄炎で痛みが出ると抜髄せざるを得ない。その一方で抜髄治療に完璧な方法はなく、抜髄により歯の機能が低下し、歯が折れやすくなり、さらには根尖性歯周炎となり、最終的には歯を喪失する可能性が増大する。本研究は、スーパー特区研究のうち、歯髄再生による歯髄炎・根尖性歯周炎の新しい治療法の開発・実用化を促進するものである。歯髄再生は歯の延命化、口腔機能維持につながり、高齢者の歯を多く残す事により QOL を向上させ、自律神経や運動機能などの全身の恒常性維持や認知症の予防にも貢献できると考えられる。また、8020 運動達成者は医療費が 20% 低下し、要介護率も低下することが知られ、歯の延命化は医療・福祉経済の安定化にもつながる。よって、この特区研究は国立長寿医療研究センターの「高齢者の心と体の自立を促進し、健康長寿社会の構築に貢献するという」使命と方向性が一致するため、センターの全面的支援を得ている。具体的には、本年度の特区設備整備補助金により、GMP 準拠の細胞加工施設が完備し、さらに平成 23 年度には CPC を完備した臨床研究推進のための研究棟が設立される予定で、ヒト歯髄幹細胞の安全性試験を行えるヒト歯髄幹細胞分取・加工の環境整備が順調に進んでいる。また、イヌ動物実験施設を新たにラクオリア創薬株式会社の動物実験施設を借用・改築し使用可能となり、非臨床有効性試験の環境も整備された。さらに、平成 21 年度には臨床研究推進のための新しい組織として、臨床研究・治験推進部が設置された。よって、国立長寿医療研究センターにおける特区研究の臨床研究は、同部の臨床研究推進室により臨床研究のデザイン・企画、臨床研究支援、企業などとの情報交換、医療情報の管理と解析を全面的に支援できる臨床研究体制が整ってきている。また、特区研究の治験も、同部の治験推進室により、円滑な推進・管理、企画・実施の支援が得られると考えられる。

2. 計画構想の内容

a. 細胞動態：歯髄幹細胞（ 1×10^6 個）、GCSF およびコラーゲンをイヌの根管内に移植し DiI ラベルした細胞の動態を経時的に組織形態学的に検討する。特に生殖器への移行に注意する。

b. 歯髄再生の有効性の指標：イヌ再生歯髄組織への血管・神経の侵入、象牙質側壁の象牙芽細胞分化と象牙質形成、歯髄および根尖歯周組織の炎症・内部吸収・外部吸収がないことを形態学的に解析する。また、蛋白化学的解析として二次元電気泳動を行い、再生歯髄組織の蛋白質発現パターンを正常歯髄組織および歯根膜組織と比較し、さらにプロテオーム解析により、正常および再生歯髄に発現する特異的マーカーを同定し、抗体を作製し、歯髄再生の指標として用いる。イヌ再生歯髄組織の機能回復として、再生歯髄の歯冠部側より DiI をラベルし、三叉神経節に向かって神経線維がつながっていることを形態学的に証明し、さらに、その神経線維の末梢からの刺激が中枢に活動電位として伝達されることを電気生理学的に証明する。非侵襲性に歯髄再生を診断するための歯髄診断装置を開発し、臨床症状と画像との相関性を検討し、客観的歯髄診断の指標を作成する。

c. ヒト歯髄幹細胞の安全性試験：GMP 準拠の施設で膜遊走分離法にて分取した歯髄幹細胞に関して、感染性因子の混入リスク（無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験、ウイルス否定試験などによる）、製造工程由来不純物の混入リスク、継代による細胞形態変化・核型異型・生存率などを検討する。歯髄幹細胞の形質変化として、老化マーカー発現を検討し、再生に用いる歯髄幹細胞適合性指標を確立する。これにより、適切な品質規格、評価基準を設定する。

d. がん化リスク評価：スキッドマウス腎臓皮下にヒト歯髄幹細胞（ 1×10^6 個）を単味、あるいはコラーゲン scaffold および GCSF とともに移植し、造腫瘍性の有無を解析する。

e. 非臨床試験での抜髄後および感染根管治療後の歯髄再生の安全性に関する試験：幹細胞歯髄内単回移植試験を行い、投与後 4 週間の観察期間に一般状態、体重、眼科的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、期間重量、病理組織学的検査などの検査を行い、歯髄幹細胞の毒性を調べる。

f. 非臨床試験での抜髄・感染根管治療後の歯髄再生の有効性に関する試験：イヌ抜髄および感染根管治療後の細胞移植後の歯髄再生に関して、b のように、形態学的解析および分子あるいは蛋白マーカーを用いた解析、さらには歯髄診断装置を用いて客観的な試験を行う。

g. 臨床研究：まず、国立長寿医療研究センターにて調整した細胞を国立長寿医療研究センターあるいは愛知学院大学にて移植を行い、成功症例を得た後に、東京医科歯科大学、長崎大学にて、平行して臨床研究を行う。

3. 実施期間終了時における具体的な目標

臨床研究において、抜髄・感染根管歯における、歯髄幹細胞および再生歯科充填材を用いた歯髄再生治療法の安全性を確認し、5 症例以上の歯髄再生の有効症例を得る。非侵襲性歯髄診断装置を用いた歯髄画像診断に成功する。

4. 実施期間終了後の取組

確認申請を行い、製品の品質・安全性を確認する。その

後、企業主導での治験届け、治験、承認申請、薬事承認を取得する。実用化、医療としての普及を進めるために、より確実な治療技術と、より良い製品を安全で安価にベンチサイドに届ける必要がある。そのための生産体制、品質保証体制の確立、技術普及のための体制の確立を行う。臨床研究成果は歯科の国内外の各種学会や論文・雑誌などで広く公表し、歯科医師会や各歯科大学などで講習会を催し、新しい治療法の伝導に努める。また、歯科医師会及び歯科メーカーの協力を得て、市場調査・アンケートによる患者の意見の反映、歯髄細胞バンクの構築、生産・流通網の合理化、開かれた透明性のある治療体制の確立を目指す。平成30年には、歯髄再生は国内5%の普及率を目標とする。また、薬事認可後、海外にも進出する。歯髄・象牙質再生により歯の延命化に対して画期的・革命的解決法を与え、15年後の高齢者において8020運動達成者を現在の23%から2倍以上に増加させる。

5. 期待される波及効果

本支援プログラムにより、歯髄幹細胞の品質評価基準と安全性・安定性が確保され、歯髄再生の安全性・有効性の指標が確立され、臨床研究が成功すれば、他大学研究機関においても、歯科医師主導の先進医療として普及する可能性が大きい。また、歯髄再生の臨床研究成功により、歯髄バンクの有用性が実証され普及率が高まるものと考えられる。これにより、歯髄・象牙質再生が促進されるばかりでなく、他組織再生治療にも有用な細胞源として用いられる可能性が十分ある。

6. 生命倫理・安全面への配慮について

a. 厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針およびヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に従うことは当然のことである。また、本研究における患者への臨床研究においては当該施設の倫理・利益相反審査委員会に申請し、承認を得た上で行う。一方、該当患者に対しては書面および口頭で十分に説明し同意を得る。さらにこれら説明文、同意書については当該施設の倫理・利益相反審査委員会にて承認されたものを用いる。ヒト歯髄幹細胞を用いた動物モデルにおける血管新生、歯髄再生に関してはすでに研究機関での動物実験倫理委員会の承認を得ている。

b. 研究対象者に「研究に協力いただけるかを考慮頂くために十分なインフォームドコンセント」を研究前に行う。

- (1) 研究協力の任意性と撤回の自由
- (2) 研究の実施計画
- (3) 研究の目的
- (4) 研究協力の要請目的
- (5) 研究方法
- (6) 研究計画書の開示について
- (7) 研究に協力した対象者にとっての利益及び不利益
- (8) 個人情報の保護について
- (9) 研究結果の公表について

- (10) 研究から生ずる知的所有権について
- (11) 研究終了後の資料の取り扱いについて
- (12) 本研究の費用について
- (13) 問い合わせ・苦情の受付先について
- (14) 研究への協力の同意文書について
- (15) 研究への協力の同意撤回文書について

以下にこれらの要約を記載する。

(a) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮

希望により、個人情報や研究の独創性の保護を十分配慮し、研究計画の内容を開示することも可能である。研究の成果は、連結不可能匿名化した上で、学会や学術雑誌およびデータベースなどで公表する。採取資料は将来の有望な研究のための貴重な資料として、研究終了後も保管する。将来、このデータを歯科医学的研究に応用する場合には、改めて研究計画書を提出し、倫理・利益相反審査委員会の承認を受けることは当然のこととして扱う。

(b) 研究方法による研究対象者に対する不利益

本研究の結果が、研究対象者に直接利益および不利益となるような情報をもたらす可能性はないと考えられる。研究成果は、将来、ウ蝕・歯髄治療がより効果的に行われるようになることが期待され、新規治療法の開発により、治療方法は刷新され、歯科医学が発展することに役立つと思われる。

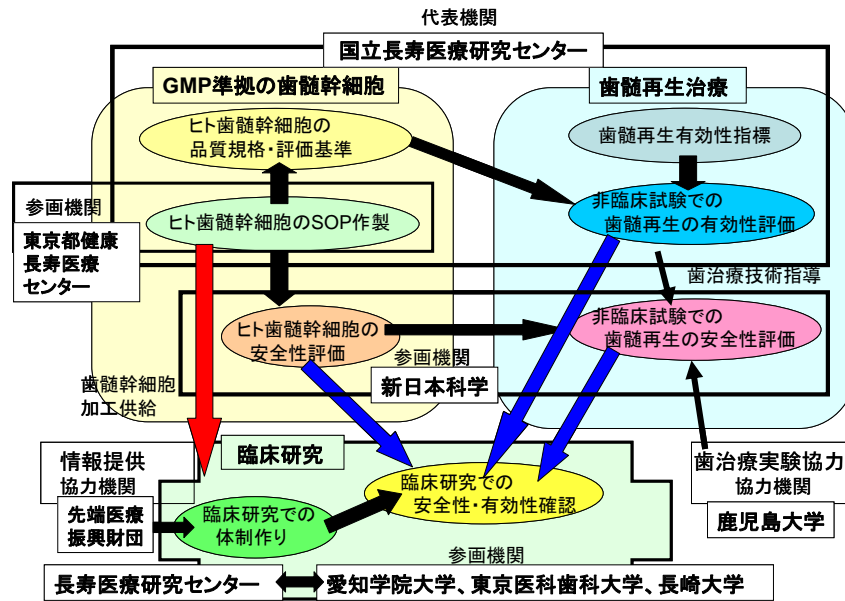
(c) 危険性の排除や説明と理解(インフォームドコンセント)に関わる状況

幹細胞の培養法は、骨髄幹細胞に対して用いられている手順書を応用して作製し、すでに安全性が確立された方法に準じて行い、厳密に分析・管理・維持された血清と培地、装置、施設などを利用する計画であるため問題はないと思われる。アテロコラーゲンは生体材料として広く用いられており、安全性は確立されている。術後に何らかの異常をきたす兆候が見られた場合には、直ちに治験を中止し、専門医を受診して頂き、誠意を持って対応するものとする。

c. 実験動物に対する動物愛護上の配慮

動物実験においては使用動物および使用方法に関して、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針および各関連附属動物実験施設のガイドラインに則り、動物倫理委員会の承認を得て、動物愛護精神をふまえ慣例を逸脱しないように配慮し、その定める規則に基づき実験を行う。細胞移植実験に伴う苦痛は、局所麻酔下でのヒトの抜歯あるいは歯の神経治療に相当する。苦痛をできる限り緩和するために十分な全身麻酔を行い、脈拍・血圧をモニターしながら人道的かつ生理的方法によりその時の生理の維持を確認しながら実験を行い、また蘇生には十分な回復が得られるような環境を与える。予後は随時モニターしながら予後不良とみなされた場合にはすぐに抜歯し、状態が悪ければ直ちに安楽死させる。よって、倫理面・安全対策面等において問題がないと考えられる。

7. 実施体制



氏名	所属部局・職名	当該構想における役割
大島 伸一	(独) 国立長寿医療研究センター・総長	総括
◎中島美砂子	(独) 国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部・室長	歯髄再生の有効性の指標設定、ヒト歯髄幹細胞のGMP準拠細胞加工施設でのSOP作成、ヒト歯髄幹細胞の品質規格・評価基準設定、非臨床試験での有効性試験
松下 健二	(独) 国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部・部長	ヒト歯髄幹細胞のGMP準拠細胞加工施設でのSOP作成
須田 英明	東京医科歯科大学大学院医歯薬学総合研究科歯髄生物学分野・教授	臨床研究
林 善彦	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授	臨床研究
中村 洋	愛知学院大学歯学部・教授	臨床研究
○豊田 雅士	(独) 東京都健康長寿医療センター老年病研究チーム血管医学研究・研究員	ヒト歯髄幹細胞のGMP準拠細胞加工施設でのSOP作成、多施設臨床研究のためのSOP作成
○徳田 雅行	鹿児島大学歯学部・准教授	非臨床研究での安全性試験
○洲加本 孝幸	㈱新日本科学安全性研究所・所長	非臨床研究での安全性試験
和泉 博之	㈱新日本科学安全性研究所実験動物研究部・部長	非臨床研究での安全性試験
庵原 耕一郎	(独) 国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・研究員	ヒト歯髄幹細胞の品質規格・評価基準設定、非臨床試験での有効性試験
梅澤 明弘	(独) 国立成育医療研究センター生殖・細胞医療研究部・部長	ヒト歯髄幹細胞のGMP準拠細胞加工施設でのSOP作成、多施設臨床研究のためのSOP作成
中村 隆広	㈱新日本科学安全性研究所研究3部・部長	ヒト歯髄幹細胞の安全性試験、がん化リスク評価、非臨床研究での安全性試験
松山 晃文	(財) 先端医療振興財団再生医療研究開発部門膝島肝臓再生研究グループ・チームリーダー	臨床研究のため体制作りと臨床
田邊 裕貴	旭川医科大学病院・旭川医科大学第三内科・外科医長	SOP作成アドバイス
中村 博幸	(独) 国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部研究員	SOP作成

古賀 豪	(独) 国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・研究員	歯髄診断マーカーの作成、非侵襲性歯髄診断装置の開発
細井 孝之	臨床研究・治験推進部・部長	SOP 作成
榊原 幸一	歯科口腔先進医療開発センター・再生歯科医療研究部・起業家コーディネータ	企業及び公的機関との折衝
山田 和正	歯科口腔先進医療開発センター・再生歯科医療研究部・プロジェクトマネージャー	開発事業全体の企画立案、フォローアップ
村上 真史	歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部・研究員	歯髄診断マーカーの作成、非侵襲性歯髄診断装置の開発

8. 各年度の計画と実績

a. 平成 22 年度 (実績)

1) ヒト歯髄幹細胞の SOP (標準作業手順書) の作成

イヌをモデルとして、抜去歯の輸送、歯髄幹細胞の分取・増殖・保存工程、細胞輸送、移植方法に至る一連の過程の SOP (第一版) を作成した。それを基に、ヒト歯髄幹細胞を用いた SOP のための試案を作成した。

①イヌモデルをシミュレーションとして SOP 作成

イヌ抜去歯から歯髄幹細胞の採取、品質検証から増殖・保存工程、移植に至る過程において東京都健康長寿医療センターの協力を得ながら現施設に応じた SOP を作成した。すなわち、イヌ歯髄幹細胞に関して、感染性因子の混入リスク (無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験、ウイルス否定試験などによる)、継代による細胞形態変化・核型異常・生存率などを検討し、その結果を反映させた、種々の行程における SOP を作成した。この SOP (第一版) を 23 年度以降クリーンルーム内 (無菌環境保持装置) での作業準備のための原案とした。

②イヌモデルをシミュレーションとして多施設臨床研究を想定した SOP 作成

国立長寿医療研究センターにおいて採取されたイヌ歯髄幹細胞および同一個体の血清を東京都健康長寿医療センターに輸送し、歯髄幹細胞の増殖・保存における多施設研究のための検証を依頼し、SOP 作成に反映させた。

③ヒト歯髄幹細胞の SOP の作成

①のイヌ歯髄幹細胞において作成された SOP を参照にして、イヌと同様に、ヒト抜去歯から歯髄幹細胞の採取、品質検証から増殖・保存工程、移植に至る過程の現施設に応じた SOP を東京都健康長寿医療センターの協力を得ながら作成を開始した。培養に必要な血清は、栄養状態を種々の Growth Factor を ELISA により検討し、増殖能との関連性を検討した。

④ヒト歯髄幹細胞の多施設臨床研究のための SOP の作成

②のイヌ歯髄幹細胞において作成された多施設臨床研究のための SOP を参照にして、イヌと同様に、国立長寿医療研究センターにおいて採取されたヒト歯髄幹細胞および同一個体の血清を東京都健康長寿医療センターに輸送しヒト歯髄幹細胞の多施設臨床研究のための SOP 作成を行うための準備を行った。

2) 自家歯髄幹細胞の適切な品質規格・評価基準の設定と分取・培養・保存・運搬のプロセスの一貫した品質管理システム

①特性解析

イヌおよびヒト歯髄幹細胞の細胞形態が扁平でないことを観察した。また、一部を用いて、フローサイトメトリーにより表面抗原を解析した (CD29, CD44 の陽性率がほぼ 100% で CD31 が陰性)。

②歯髄幹細胞遺伝子・蛋白質発現解析

イヌおよびヒト歯髄幹細胞が歯髄の特徴を有している目的の細胞であることに関して、歯髄マーカーの種類の候補を検索し、real-time RT-PCR による遺伝子発現により特異性を検討した。また、Western blot による蛋白質発現による検討のため、そのイヌ歯髄マーカーに対する抗体を作成した。

③遊走能・増殖能、血管・神経誘導能

イヌおよびヒト歯髄幹細胞が、高い遊走能・増殖能を有し、血管・神経誘導能に優れていることを明らかにした。

3) 安全性の効率的確保と適切な安全性の試験法の確立

新日本科学より輸送されてきたイヌの歯から、GMP 準拠細胞加工施設にて歯髄幹細胞を採取した。感染性因子の混入リスクを検査後、採取した歯髄幹細胞を新日本科学に輸送し、GLP での安全性試験のための特性試験、安全性試験、イヌ歯髄内埋移植試験を依頼した。

4) 歯髄再生治療法の有効性の形態学的・蛋白化学的および分子生物学的な効率的指標決定

①形態学的統計解析

イヌ自家歯髄幹細胞の根管内移植により再生された 3 ヶ月標本の歯髄組織の形態学的統計解析を行い、歯髄の体積%で評価したところ、90%以上であった。

②歯髄マーカーの同定

再生組織が歯髄であることを証明するために最も有用な歯髄マーカー (TRH-DE) の同定を行った。

③非侵襲性歯髄診断装置の開発

a) 歯髄診断マーカー作成

インドシアニン・グリーン (ICG) をラットの静脈から注入し、経時的に歯髄標本を作製し、高感度カメラ搭載実体顕微鏡にて集積変化を検討したところ、1 時間以内に衰退がみられた。4) の②の歯髄マーカーの抗体と ICG をリポソームに付着させ、効率よく歯髄内部に集積させる診断マーカーのデザインを検討した。

b) 高感度検出法の開発

イヌの抜去歯あるいは生体内で歯髄に直接的に ICG を注入し、赤外線カメラおよび半導体レーザーを使って、高感度に検出する方法を検討した。

b. 平成 23 年度

- ・歯髄再生の有効性の指標設定のための蛋白化学的・分子生物学的解析
- ・非臨床試験での抜髄後の歯髄再生の安全性・有効性確認
- ・ヒト歯髄幹細胞膜分離法による歯髄幹細胞の評価基準の設定
- ・ヒト歯髄幹細胞の安全性・安定性確認、ガン化リスクの無の証明
- ・多施設臨床研究のための実証研究

c. 平成 24 年度

- ・非臨床試験での感染根管治療後の歯髄再生の安全性・

有効性確認

- ・臨床研究審査手続き（倫理・利益相反委員会承認、ヒト臨床研究・
- ・ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会承認、厚生労働大臣の了承）

d. 平成 25 年度

- ・ヒト抜髄後・感染根管治療後の歯髄再生の臨床研究開始

e. 平成 26 年度

- ・歯髄再生成功例 5 症例以上
- ・非侵襲性歯髄診断装置を用いた歯髄画像診断に成功

9. 年次計画

取組内容	1年度目	2年度目	3年度目	4年度目	5年度目	実施期間終了後
歯髄再生の有効性の指標設定（代表機関：国立長寿医療研究センター）	歯髄特異的マーカー同定	蛋白化学的・分子生物学的解析				
ヒト歯髄幹細胞のSOP作成（代表機関：国立長寿医療研究センター、参画機関：東京都健康長寿医療センター）	非侵襲性歯髄診断装置開発	細胞の品質検証から増殖・保存工程、移植方法に至る過程のプロトコル確立		臨床症状・マーカー発現と連結した画像診断		
ヒト歯髄幹細胞の品質規格、評価基準の設定（代表機関：国立長寿医療研究センター）	多施設臨床研究のための実証研究	ヒト歯髄幹細胞のGMP準拠		細胞加工施設でのSOP作成		
ヒト歯髄幹細胞の安全性評価（参画機関：株式会社新日本科学）	細胞表面抗原解析、細胞形態分析、立体形状分析	分子マーカーによる発現プロファイル				
非臨床試験での歯髄再生の有効性（代表機関：国立長寿医療研究センター、参画機関：株式会社新日本科学、鹿児島大学）	細胞遊走能、血管誘導能	神経栄養因子・血管誘導因子などのELISA				
臨床研究のため体制作り（代表機関：国立長寿医療研究センター、参画機関：東京医科歯科大学、愛知学院大学、長崎大学、協力機関：国立先端医療振興財団）	マイコプラズマ、細菌、エンドトキシン、ウイルス検査	がん化検査				
臨床研究（代表機関：国立長寿医療研究センター、参画機関：東京医科歯科大学、愛知学院大学、長崎大学、協力機関：国立先端医療振興財団）	抜髄後歯髄再生の安全性	感染根管治療後歯髄再生の安全性				
	抜髄後歯髄再生の有効性	感染根管治療後歯髄再生の有効性				
		コーディネータの支援による臨床研究の企画				
		被験者の健康被害防止・救済の手順書、補償保険などの環境整備				
		倫理審査委員会設置				
		環境整備				
		臨床研究実施 計画書作成、承認				
				臨床研究での安全性・有効性の確認		歯髄診断装置を用いた有効性