

文 献

- 1) MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, et al : Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 33 : 1-7, 1995
- 2) Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, et al : Cell attachment activity of cementum : bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontal Res* 26 : 10-16, 1991
- 3) Slavkin HC, Bringas P Jr, Bessem C, et al : Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontal Res* 24 : 28-40, 1989
- 4) Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ : The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. *J Periodontol* 72 : 679-687, 2001
- 5) Bosshardt DD, Nanci A : Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 46 : 135-142, 1998
- 6) Fong CD, Hammarstrom L : Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90 : 218-223, 2000
- 7) Hatakeyama J, Sreenath T, Hatakeyama Y, et al : Rankl-mediated osteoclastogenic pathway is elevated in amelogenin null mice {micro}. *J Biol Chem* 8 : 8, 2003
- 8) Fukumoto S, Kiba T, Hall B, et al : Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* 167 : 973-983, 2004
- 9) Wu D, Ikezawa K, Parker T, et al : Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 11 : 686-692, 1996
- 10) Saito M, Narayana AS : Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 14 : 65-72, 1999
- 11) Saito M, Iwase M, Maslan S, et al : Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 29 : 242-248, 2001
- 12) Handa K, Saito M, Yamauchi M, et al : Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone* 31 : 606-611,

2002

- 13) Kiyono T, Foster SA, Koop JI, et al : Both Rb/p16ink4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396 : 84-88, 1998
- 14) Saito M, Handa H, Kiyono T, et al : Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and Tert. *J Bone Miner Res* 20 : 50-57, 2005 (epub 2004 Oct 18)

3

歯周組織

1. 歯根膜解析の新しいアプローチ

歯周組織は歯の周囲に存在する歯の支持組織で、セメント質、歯根膜、歯槽骨および歯肉によって構成されている。近年の研究から、歯周組織のなかでも歯根膜は、歯周組織の恒常性維持および、歯周病によって破壊された歯周組織の修復・再生に中心的な役割を果たす最も重要な組織の1つであることが明らかとなっている。

ヒトの歯根膜は、歯と歯槽骨という2つの硬組織の間に存在する、コラーゲン線維に富む非石灰化の結合組織であり、線維性付着により歯を歯槽骨に保持するという役目を担いながら、咬合時の感覚受容器としても機能している。また、歯根膜は、100~250 μm の幅を保ちながら、咬合力、矯正力といったメカニカルストレスに反応して歯槽骨、セメント質および結合組織のリモデリングを行い、歯周組織の動的平衡を保っていると考えられている¹⁾。

近年の研究により歯根膜は、石灰化関連分子やサイトカインを自ら産生することにより歯周組織の再生をもたらすこと、また、歯根膜組織は歯周組織の再生を可能ならしめる未分化間葉系細胞群のリザーバーとなっている重要な組織であることなどが明らかとなってきた²⁾。また、歯根膜由来の培養細胞を用いた数々の研究により、歯根膜由来の線維芽細胞は歯肉由来の線維芽細胞と比較して高い石灰化能を有し、硬組織形成に関与する分子の発現が高いことも明らかにされている³⁾。このように生体内において重要かつユニーク

な組織である歯根膜組織については、これまで形態的・機能的な特徴についての研究が中心になされてきたが、遺伝子レベルでの特徴については十分に解明されているとは言い難い。

ヒトの身体は、約60兆個のさまざまな形態や機能を有する細胞が相互に協調しながら形作られている。約60兆個のすべての細胞は、共通のゲノム30億塩基対をその核の中に含有し、そのゲノムは、約2万数千個あるといわれているすべての遺伝子を発現し機能するポテンシャルを有している。しかしながら、実際には、すべての組織・細胞において、すべての遺伝子が常に発現し機能しているわけではなく、各々の組織・細胞において、異なった遺伝子発現の組み合わせが存在し、その組み合わせのパターンこそが組織・細胞の多岐にわたる形態や機能といった特異性を導き、身体を形作っているといえる。たとえば、目の網膜には、網膜特有の遺伝子発現パターンが、髪の毛根には、毛根特有の遺伝子発現パターンが存在する。このようなヒト身体の各組織・細胞における特有の遺伝子発現パターンを大規模・網羅的に解析することにより、各々の組織・細胞における遺伝子発現の組み合わせを解明し、分子生物学的な側面からその組織・細胞の特徴や特有の機能を明らかにしようとする組織遺伝子発現プロファイル解析の試みがなされるようになっていく。

Okuboらの方法では、解析したい組織・細胞から3'末端cDNAライブラリーを構築する⁴⁾。この3'末端cDNAライブラリーは、各cDNAクローンのインサートサイズが、3'末端のpoly Aから上流の最初のMboIサイトまでの平均250塩基対となっており、逆転写酵素の効率やクローニング効率といったさまざまな二次的な影響を受けにくいことが特徴となっている。したがって、ライブラリー中のcDNAクローンの存在比率は、ソースとなった組織・細胞でのmRNA構成を正確に再現しているものと考えられる。このライブラリーから無作為にクローンを抜き取り解析することにより、実際の組織・細胞における構成遺伝子の割合を正確に再現した「絶対的な」遺伝子発現量

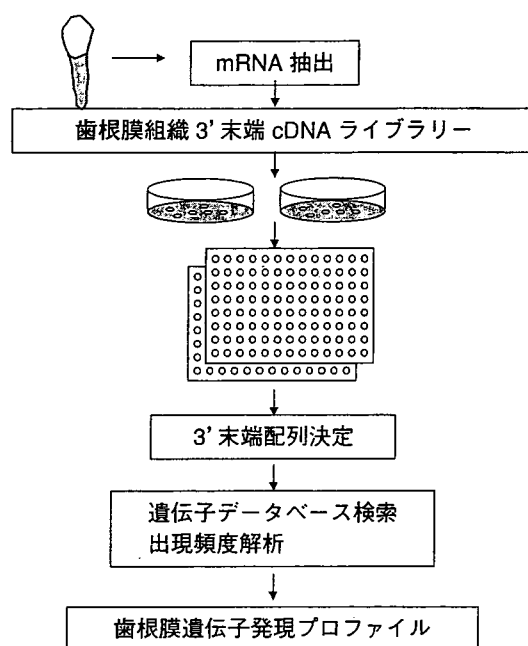


図 1 ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル解析

を示すプロファイリングが可能となる。さらに、同様の手法を用いて作成された身体各組織・細胞の遺伝子発現プロファイルデータを集積しデータベース化することにより (BodyMap プロジェクト), 各組織・細胞の遺伝子発現プロファイルを BodyMap データベース上で比較検討し, 組織・細胞特異的な遺伝子発現パターンを捉え, さらには特異的に発現する遺伝子を単離・同定することを可能にしている。

2. 歯根膜の遺伝子発現プロファイル解析

われわれは, この手法を用いて歯根膜組織における遺伝子発現プロファイ

表1 ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル

遺伝子名	発現頻度
<i>collagen type I α-2</i>	46
<i>collagen type I α-1</i>	45
<i>collagen type III α-1</i>	30
オステオネクチン	22
<i>collagen type I α-2 partial exon 1</i>	17
<i>collagen type III α-2</i>	17
<i>ribosomal protein L21</i>	12
ペリオスチン	8
<i>ribosomal protein S18</i>	8
<i>ribosomal protein L13a</i>	7
unknown (PLAP-1)	7
<i>ribosomal protein L30</i>	6
<i>translationally-controlled I</i>	6
<i>28S ribosomal RNA</i>	6

ル解析 (歯根膜の BodyMap) を行うことを試みた⁵⁾。図1に示すように、矯正治療中の患者より便宜抜去された歯の歯根膜組織から得られた mRNA より歯根膜組織 3'末端 cDNA ライブラリーを構築した。前述のように、このライブラリー中の cDNA クローンの存在比率は *in vivo* 歯根膜組織での恒常的な mRNA 構成を正確に再現しているものと考えられる。次に無作為に選択した 1,752 個の cDNA クローンの塩基配列を DNA シークエンサーにて解読し、コンピュータ解析による出現頻度および遺伝子バンクへの相同性検索を行い、歯根膜組織遺伝子発現プロファイルを作成した (頻度 6 以上を表1に示す)。

歯根膜組織は形態的にコラーゲン線維に富んだ結合組織であり、そのコラーゲン線維を構成する主要な成分は I 型および III 型コラーゲンである。ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイル解析の結果、*collagen type I α -2*、*collagen type I α -1* および *collagen type III α -1* 遺伝子などの高発現を認め、歯根膜組織の特徴を遺伝子発現の側面からも裏付けた。また、*ribosomal*

protein 遺伝子の高い発現を認めており、歯根膜組織ではコラーゲンの生合成がさかに行われ、結合組織のリモデリングが恒常的に行われていることが推測される。次いで高い発現を認めるオステオネクチン(*osteonectin*)遺伝子のコードする蛋白は、骨において豊富に見られる非コラーゲン性の基質蛋白であり、骨芽細胞から分泌され、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた系において石灰化ノジュールの形成にあわせてその発現が上昇するとの報告がある⁶⁾。また、歯根膜細胞においては、オステオネクチン蛋白の発現上昇が matrix metalloproteinases (MMPs) の産生を亢進させる結果、MMPs が細胞外基質を分解し、細胞外の微小環境を変化させ、歯根膜細胞の増殖を促進していると考えられている⁷⁾。これらの知見よりオステオネクチンは歯根膜組織のリモデリングを調整すると同時に硬組織形成に関与する分子であると考えられる。

また、ペリオスチン(*periostin*) 遺伝子の高い発現も同時に認められた。ペリオスチン遺伝子は MC3T3-E1 のライブラリーより単離・同定された遺伝子であり、骨膜表面と歯根膜組織に局在し、骨芽細胞の前駆細胞を遊走させ、歯槽骨および歯根膜組織のリモデリングを行っていると考えられている⁸⁾。このオステオネクチンおよびペリオスチン遺伝子の高発現は、ヒト歯根膜組織の硬組織形成能を裏付けるものと考えられる。ヒト歯根膜組織遺伝子発現プロファイル解析により、新陳代謝の活発な線維性結合組織でありながら高い硬組織形成能を持つ歯根膜の組織特異性を、遺伝子発現状況の側面から忠実に再現することができた。

3. 新規歯根膜特異的細胞外基質 PLAP-1

歯根膜組織遺伝子発現プロファイルの中に、出現頻度 7 という高発現を示すにもかかわらず、遺伝子バンクにも登録されていない全く未知の新規 3'末端配列が発見された(表 1)。全長 cDNA クローニングの結果、この遺伝子は

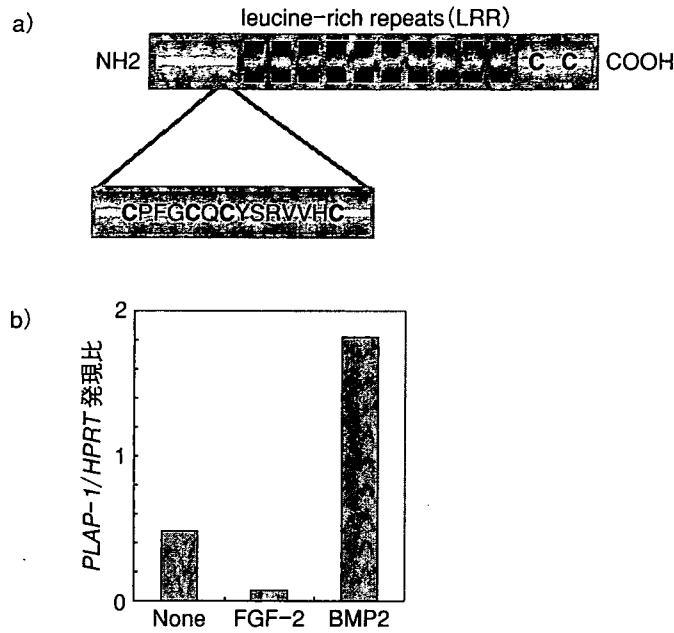


図 2 歯根膜特異的細胞外基質 PLAP-1

- a) PLAP-1 蛋白の構造. 中央部に 10 個の LRR, N 末端および C 末端にシステインモチーフを有し, small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) ファミリーに属する.
- b) FGF-2 および BMP2 による *PLAP-1* 遺伝子発現制御 (文献 6 より改変). 各サイトカインにてヒト歯根膜細胞を 48 時間刺激した際の *PLAP-1* 遺伝子発現を, *HPRT* 遺伝子発現を基準とした real-time PCR により解析した.

全長 2.5 kbp で, 382 アミノ酸をコードする新規の遺伝子であることが明らかとなった (図 2 a). われわれは, この遺伝子を *PLAP-1* (periodontal ligament associated protein-1) と命名し, 予想される蛋白質をプロテインデータベースにて検索したところ, 興味深いことに, プロテオグリカンであるデコリン (decorin) およびバイグリカン (biglycan) に対して非常に高い相同性を有する分子であることが明らかとなった⁵⁾. デコリンおよびバイグリ

カンは、これまで骨の形成や形態維持に重要な役割を果たしていることが報告されている。一方、ヒトの身体を構成する各組織より作成した臓器別遺伝子発現プロファイルをデータベース化した東大医科研 BodyMap データベースを遺伝子検索した結果、*PLAP-1* 遺伝子は、わずかに心臓結合組織および表皮乳頭状組織においてのみ、それぞれ1回の発現頻度でしか検出されなかった。これらの結果より、*PLAP-1* 遺伝子は歯根膜組織に特徴的に発現されており、その遺伝子産物である PLAP-1 蛋白は細胞外基質として、歯根膜における硬組織形成に関与している可能性が示唆された⁵⁾。

そこで、生体内における PLAP-1 の発現を解析するために、マウス歯周組織において *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、*PLAP-1* 遺伝子は、歯根膜に特異的に発現しており、歯肉や口腔上皮、歯槽骨、骨膜などには全くその発現が認められないことが明らかとなった。歯根膜での詳細な発現を解析してみると、*PLAP-1* 遺伝子は歯根膜中央部に強く発現しており、セメント質および歯槽骨側での発現は弱いことが明らかとなり、PLAP-1 は、歯根膜組織内でもその発現分布があることが示された。

次に、硬組織形成を誘導した歯根膜細胞において *PLAP-1* 遺伝子の発現を解析したところ、硬組織形成に伴ってその遺伝子発現が亢進することが示された。さらに、各種増殖因子による *PLAP-1* 遺伝子発現への影響を検討したところ、骨形成誘導能を持つ骨形成因子 (bone morphogenetic protein : BMP)2 および BMP4 によって、PLAP-1 の発現が誘導され、塩基性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor-2 : FGF-2) 添加により *PLAP-1* 遺伝子の発現が著明に抑制された(図 2 b)。すなわち *PLAP-1* 遺伝子は硬組織形成の過程でそれらサイトカインにより発現制御を受けている可能性が示唆された⁹⁾。

次に *in vitro* において *PLAP-1* 遺伝子を歯根膜細胞に強発現させ、その分化過程に及ぼす影響を検討した。興味深いことに、歯根膜細胞において PLAP-1 を強発現させることによりアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

の上昇および石灰化ノジュール形成が抑制され、BMP2 刺激によって誘導される ALP 活性の上昇も抑制された。一方、RNAi (RNA interference : RNA 干渉) 法により歯根膜細胞の内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現を抑制したところ、*PLAP-1* を強発現させた場合とは逆に、BMP2 刺激によって誘導される ALP 活性がより増強された。以上の結果から、*PLAP-1* は、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化および硬組織形成を負に制御する分子であることが示され、その作用機序の一部は、BMP シグナルを抑制することにより担われている可能性が示唆された (投稿準備中)。

以上から、新規の細胞外基質蛋白である *PLAP-1* は、硬組織形成に対して抑制的に作用し、硬組織形成能を有しながらも石灰化せず、線維性の結合組織として機能する歯根膜組織の恒常性維持に重要な因子であることが示唆された。

歯周組織の恒常性維持および歯周組織の再生・修復において中心的な役割を果たしている歯根膜について、われわれがこれまでに進めてきたトランスクリプトーム解析を中心とした研究を紹介した。興味深いことに、他の複数の研究グループが、われわれと同時期に相次いで *PLAP-1* と同一の遺伝子を心臓または膝軟骨からクローニングし、アスポリン (asporin) と名づけている^{10,11)}。最近、アスポリンが変形性関節症の原因遺伝子であり、TGF- β の作用を阻害することにより関節軟骨の再生・修復を制御していることも明らかとなっている¹²⁾。関節軟骨は、細胞外基質が豊富で関節に加わるメカニカルストレスを緩和するクッションとしての機能も有し、歯根膜との形態的・機能的な類似性が高い組織と思われることから、*PLAP-1*/アスポリンが、歯根膜あるいは関節軟骨といった特殊な組織において、組織恒常性の維持や再生・修復の中心的な役割を果たしている重要な因子の1つであることが示唆される。今後は、歯周病と *PLAP-1*/アスポリンとの関連性についても解明してい

くことが必要であろう。

(山田 聡・村上 伸也)

文 献

- 1) Beertse W, McCulloch CA, Sodek J : The periodontal ligament : a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontology* 2000 13 : 20-40, 1997
- 2) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364 : 149-155, 2004
- 3) Somerman MJ, Archr SY, Imm GR, et al : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblast in vitro. *J Dent Res* 67 : 66-70, 1988
- 4) Okubo K, Hori N, Matoba R, et al : Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet* 2 : 173-179, 1992
- 5) Yamada S, Murakami S, Matoba R, et al : Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene* 275 : 279-286, 2001
- 6) Kelm RJ Jr, Swords NA, Orfeo T, et al : Osteonectin in matrix remodeling. a plasminogen-osteonectin-collagen complex. *J Biol Chem* 269 : 30147-30153, 1994
- 7) Fujita T, Shiba H, Sakata M, et al : Effects of transforming growth factor-beta 1 and fibronectin on SPARC expression in cultures of human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int* 26 : 1065-1072, 2002
- 8) Wilde J, Yonezaki M, Terai K, et al : The divergent expression of periostin mRNA in the periodontal ligament during experimental tooth movement. *Cell Tissue Res* 312 : 345-351, 2003
- 9) Yamada S, Ozawa Y, Tomoeda M, et al : Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. *J Dent Res* 85 : 447-451, 2006
- 10) Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, et al : Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem* 276 : 12212-12221, 2001
- 11) Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, et al : Identification and characterization of asporin, a novel member of the leucine-rich

- repeat protein family closely related to decorin and biglycan. J Biol Chem 276 : 12201-12211, 2001
- 12) Kizawa H, Kou I, Iida A, et al : An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increase susceptibility to osteoarthritis. Nature Genet 37 : 138-144, 2005

到達目標

1. 再生医療の概念を説明できる
2. ティッシュエンジニアリングの三大因子について説明できる
3. 現行の歯周治療の問題点を説明できる
4. 歯周組織再生療法について概説できる

A 再生医療

今世紀の医学・生物学の分野におけるキーワードの1つに「再生医療」があげられる。疾患や外傷により一度失った組織・臓器の形態と機能を、あたかもプラナリアやイモリの四肢のように、もう一度みずからの細胞の働きにより再生させるということはほとんど不可能なことから従来考えられてきた。いまどうして「再生」ということばが脚光を浴びるようになったのであろうか。日本再生医療学会によると、再生医療とは「機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器に対して、細胞を積極的に利用して、その機能の再生をはかるもの」と定義されている。「細胞を積極的に利用」するとは、具体的にどのような医療をさすのであろうか。

1 再建医療・移植医療の問題点

今日に至るまで、種々の疾患あるいは外傷により薬剤などでは治療できないほど大きな組織や臓器の欠損が生じた場合には、人工臓器を中心とした再建外科医療によって治療されてきた。しかしながら、人工臓器は人工材料であるがゆえの生体異物反応や、その代行機能の経時的低下などの欠点がある。他方、臓器移植により対応されるケースも考えられる。しかしながら、慢性的なドナー不足の問題や脳死判定の問題などもあり、わが国で臓器移植法が施行されてからの経緯をみても、その恩恵にあずかれるのはまだまだまれなケースといわざるを得ない⁴⁾。

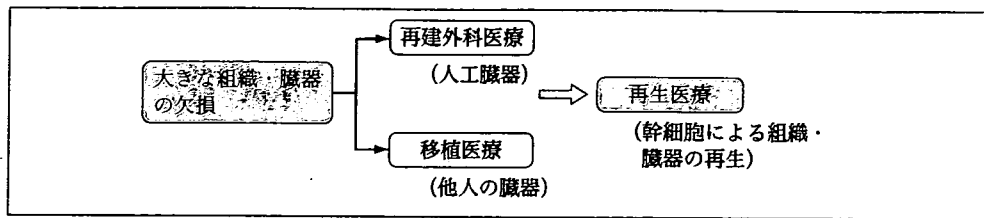


図 2-71 大きな組織・臓器欠損を対象とした医療

現在、大きな組織・臓器の欠損が生じた場合には人工臓器を中心とした再建外科医療、あるいは適当なドナーが見つければ臓器移植を対象とした移植医療が施される。これらの方法は医療上あるいは倫理上の問題を有しており、幹細胞の潜在能力を引き出すことによる再生医療の発展が期待されている。

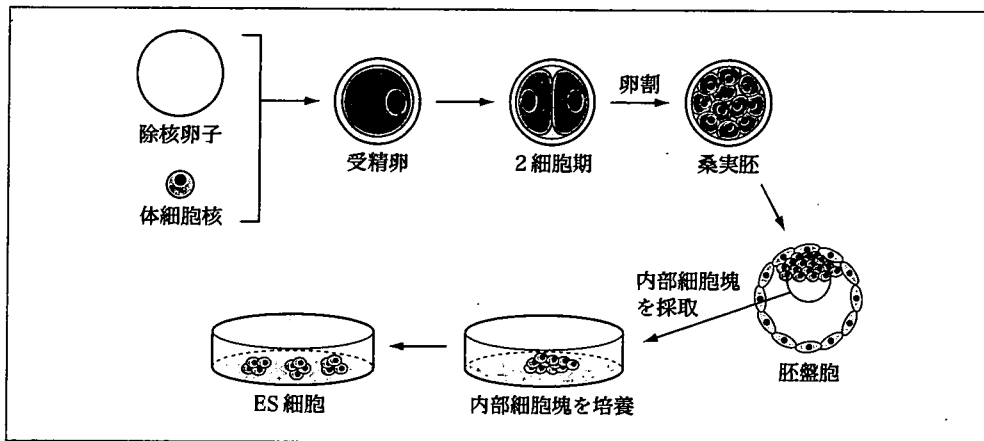


図 2-72 ES 細胞の樹立

除核卵子に体細胞核を移植することにより受精卵をつくり、これを培養すると細胞分裂の結果、胚盤胞が形成される。この胚盤胞内にある内部細胞塊を取出して培養することにより ES 細胞株が得られる。

2 幹細胞, 前駆細胞

近年、成人の生体組織のなかにも多分化能を保有した幹細胞 stem cells や、特定の成熟細胞への分化能を保有した前駆細胞が、成人になっても存在し続けていることが証明された。さらに、個体がいかに発生するか、創傷治癒の過程において個々の細胞がどのように集合体を形成して組織・臓器を形づくるかといった研究が分子レベルで進められた結果、これらの情報を活用し、組織再生を人為的に促進しようとする再生医療に対するさまざまな試みが始められるようになった (図 2-71)。

3 胚性幹細胞の樹立

このような時代背景のなか、1998 年には多分化能を保有するヒト胚性幹細胞 (ES 細胞 embryonic stem cell) が樹立された。ES 細胞は、受精卵が胎児になる前に胚盤胞から内部細胞塊を取り出して、その細胞を株化したものである。ヒト由来 ES 細胞は拒絶反応を起こせない免疫不全マウスに移入されると、骨、軟骨、筋肉、消化管など、人体のあらゆる組織に成熟、分化する能力を備えていることが認められ、このことより多能性細胞とよばれている (図 2-72)。この ES 細胞を試験管内にて神経前駆細胞にまで分化させた細

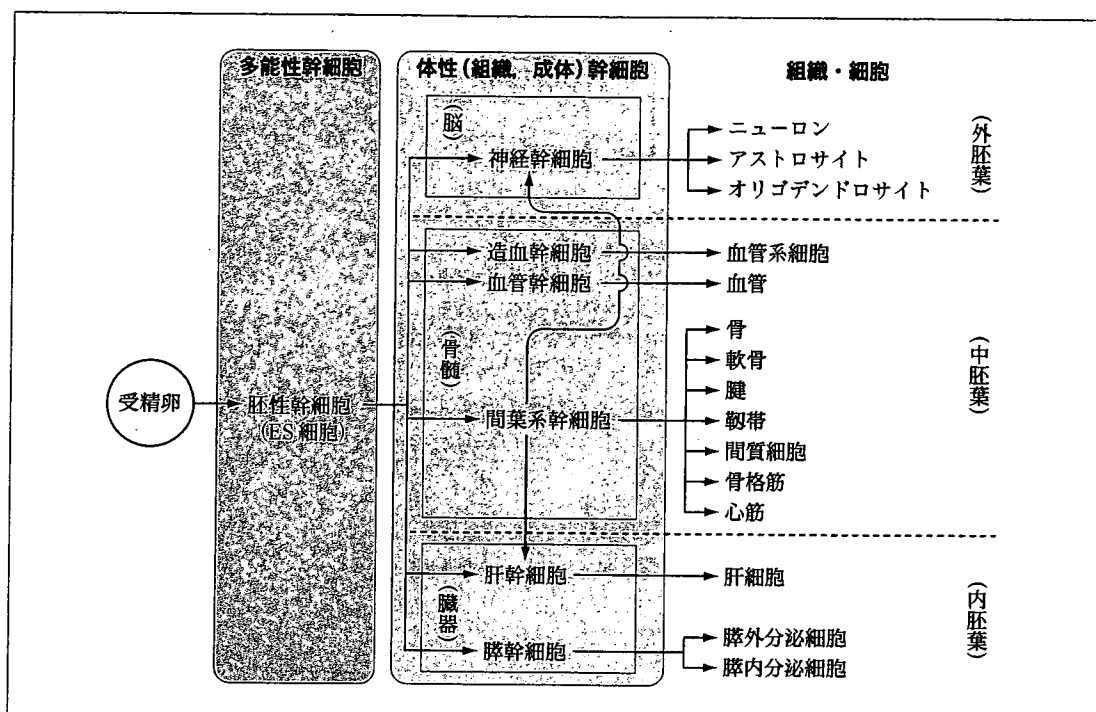


図 2-73 幹細胞の分類と階層

受精卵に端を発する多能性幹細胞からさまざまな体性幹細胞となり、さらに分化を遂げることによって外胚葉、中胚葉、内胚葉といった身体のあらゆる組織細胞が形成される。

胞を移入することにより Parkinson 病や Alzheimer 病の治療に応用することが想定されている。このように考えると、あらゆる細胞に分化して望みの組織・臓器を形成することが可能な多能性幹細胞としての ES 細胞は、再生医療にとって夢の細胞といえるであろう。しかしながら、ヒトの ES 細胞はヒトの受精卵つまり胚由来であり、倫理上の問題が存在するのみならず、非自己細胞であるがゆえに免疫学的拒絶反応をいかに抑制するかという医学的な問題も残されている。

4 体性幹細胞の利用

幹細胞には大きく分類して 2 種類あり、多能性細胞としての胚性幹細胞 (ES 細胞) のほかに分化の程度が進んで、特定の組織・臓器を再構築する能力を有する体性 (組織、成体) 幹細胞が存在する (図 2-73)。

体性幹細胞は、生体における組織・臓器の恒常性の維持や損傷時の再生を可能にするために成人の生体内にもなお存在する細胞である。体性幹細胞のうち骨髄中には造血幹細胞のみならず間葉系幹細胞が存在することも明らかにされている。このことは患者本人の骨髄から幹細胞を得ることにより、拒絶反応の問題、倫理的問題を克服した再生療法が実現可能であることを示唆している。

このように、種々の組織の再生を可能にする幹細胞の情報や単離技術が近年急速に進歩している。そして、これらの幹細胞に加えて、種々の生体材料をも研究対象として取り入

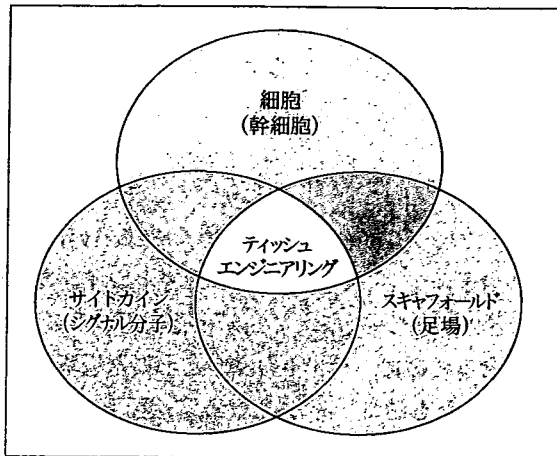


図 2-74 生体組織工学における三大因子
生体組織工学は、三大因子である細胞（幹細胞）、スキャフォールド（足場）およびサイトカイン（シグナル分子）を用いて、損なわれた組織・臓器の形態と機能を再生し、維持し、改善することを目的とする学問である。

れた再生医学に支えられた再生医療は、一躍 21 世紀の夢の医療技術として、医学的のみならず社会的関心をも集めるに至っている。

B ティッシュエンジニアリング

1 ティッシュエンジニアリングの三大因子

成人の体内にも種々の体性幹細胞が存在していることは先にも紹介したが、生体の自然な治癒にすべてをゆだねると、幹細胞の働きを十分に引き出すことができず、理想的な組織再生は果たされない。

幹細胞を十分に機能させ組織・臓器を生体内で再生、あるいは生体外で再構築するためティッシュエンジニアリング tissue engineering（生体組織工学）を用いた治療法が研究されている。ティッシュエンジニアリングとは「工学と医学・生物学の原理を統合することによって、損なわれた組織・臓器の形態と機能を再生し、維持し、改善することを目的とする学問」と定義される。ティッシュエンジニアリングは、①組織を再生するための「幹細胞 stem cells」、②幹細胞が三次元的に遊走・増殖・分化するための「スキャフォールド scaffold（足場）」、および③幹細胞の増殖・分化を制御する「サイトカイン cytokine（シグナル分子）」の三大因子により構成されている（図 2-74）。

2 足場としての細胞外マトリックス

血球細胞を除くすべての正常細胞は、何らかの物質表面に接着することにより分裂するため、細胞の増殖には接着するための“足場”が必要となる。通常、生体内において足場の機能を果たすのは細胞外マトリックスである。大きな組織欠損がある場合には細胞成分のみならず足場までもが失われているため、幹細胞のみの移植では組織の再生は見込めない。そこで、生体細胞がみずから細胞外マトリックスのネットワークを再構築するようになるまで、生体内の環境を模倣し細胞を望みどおりの三次元的立体構造に配置して（すな

わち、再生を期待する組織・臓器の形態を幹細胞に伝え、その増殖・分化を誘導するための人工的な足場を欠損部に提供する必要がある。さらに、この足場は適当な時期に生体組織と置き換わる生体吸収性を有することが求められる。

3 サイトカインと薬物配送システム

幹細胞自身の再生誘導能を高めるために、幹細胞の遊走、増殖、あるいは分化を促進する刺激（サイトカイン、シグナル分子）が必要となる。どのサイトカインを用いるかは、どの組織・臓器を再生誘導するのにかよって最も適切なものが選択されることになる。また、組織再生効果を維持・向上させるために、サイトカインを必要な場所で必要な期間、有効濃度を保持させる必要が生じることもある。その際には、増殖因子の基剤（キャリア）やスキャフォールドに薬物配送システム（DDS）の技術を導入することも必要となるかもしれない。また、近年では興味深いことに細胞外マトリックスの量的および質的变化によっても細胞の分化・増殖が制御されることも示唆されており、スキャフォールドとしての細胞外マトリックス自身がシグナル分子としても機能しうるものと考えられている。



ティッシュエンジニアリングによる歯周組織の再生

1 原因除去療法の限界

検査・診断→歯周基本治療→再評価→メンテナンスまたはサポータティブペリオドンタルセラピーと続く歯周治療の流れに従って、スケーリング・ルートプレーニングを中心とした原因除去療法を的確に施行することにより、歯周病の進行を阻止し、歯周組織の治癒を促すことができる。しかしながら、重度の歯槽骨吸収を伴った歯周炎の場合には、原因除去療法後にも歯周ポケットが残存したり、たとえ歯周ポケットが消失しても、著しい歯肉退縮を伴った審美的にも機能的にも好ましくない治療形態をとることがある。すなわち、通常の原因除去療法や歯周外科治療を行っても、歯槽骨やセメント質の新生を伴った歯周組織の再生は望めない。そこでティッシュエンジニアリングを用いた再生療法 tissue regenerative therapy に大きな期待が寄せられている。

2 GTR 法とエナメルマトリックスタンパク質応用の意味

近年、歯根膜組織中に骨芽細胞やセメント芽細胞へ分化しうる間葉系幹細胞が成人になっても存在することが示され、歯根膜組織の生物学的機能を十分に発揮させることにより、歯周組織の再生を誘導することが生物学的に可能であることが明らかにされている。現在、臨床応用されている GTR 法（組織再生誘導法）（☞ 第 3 編第 2 章）や、エナメルマトリックスタンパク質（エムドゲイン®）（☞ 第 3 編第 3 章）もこの理論に基づき歯根膜組織のなかに存在する歯周組織の幹細胞を積極的に活用することにより、組織再生を果たそうとした歯周組織再生療法と位置づけることができる。

GTR 法に用いられる GTR 膜は、歯周組織を構成する細胞の遊走をコントロールする

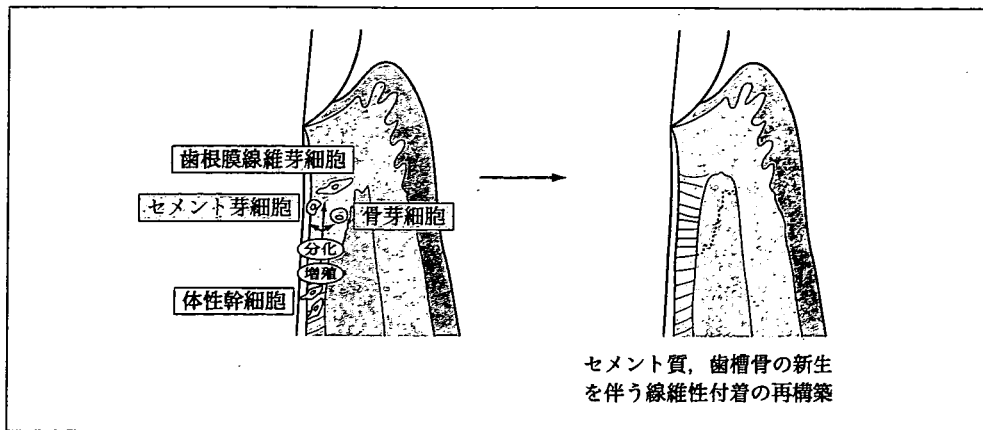


図 2-75 歯周組織再生療法の基本概念

歯根膜組織にはセメント芽細胞，骨芽細胞，歯根膜線維芽細胞に分化しうる体性幹細胞が大人になっても存在しており，体性幹細胞の生物学的可能性を最大限に引き出すことにより線維性付着を再構築した歯周組織再生が理論上可能と考えられている。

ことで歯周組織の再生を促しているという観点からティッシュエンジニアリングの三大因子のスキファールド（足場）に分類される。また，エムドゲイン®はセメント芽細胞への分化を促進するタンパク質を含有した医療材料であると考えれば三大因子のシグナル分子に分類することができ，これらの歯周組織再生療法は今日の臨床の場において一定の成果をあげている。

再生医療全般の歴史を振り返ってみると，1982年にヒトに応用されたGTR法に関する論文発表がなされて以来，歯科医療は他分野に遅れることなく（臨床応用という点ではむしろ他分野に先んじて）再生療法に取り組んできたといえる。しかしながら，現行の歯周組織再生療法にも，①部分的な再生しか期待できない，②術式が困難，③適応症が限られている，④十分な予知性に欠けるなど，克服されるべき問題点が残されている。

3 サイトカイン療法

われわれの生体を構成している細胞から産生され，産生した細胞を含めてその周囲の細胞に増殖・分化などの制御に関する種々のシグナルを伝達するタンパク質をサイトカインとよぶ。近年，次世代の歯周組織再生療法としてサイトカインを用いた治療法（サイトカイン療法）の研究が進んでいる。歯周組織の再生誘導を考えると，①歯周組織欠損部の歯根面に歯根膜由来細胞が選択的，優先的に誘導されること，②歯根膜由来細胞中に含まれる未分化間葉系細胞 undifferentiated mesenchymal cell が多分化能を保有したまま増殖し，硬組織形成細胞（骨芽細胞 osteoblast やセメント芽細胞 cementoblast）や歯根膜線維芽細胞として部位特異的な分化を遂げること，③歯根膜線維芽細胞によって産生されたコラーゲン線維束が骨芽細胞やセメント芽細胞により新生された骨組織，セメント質に埋入され，新付着が獲得されること，が必要となる（図 2-75）。

サイトカイン療法とは歯周組織欠損部への歯根膜細胞の遊走・定着や，同欠損部における細胞増殖および硬組織形成細胞への分化の過程を種々のサイトカインを局所投与す

表 2-23 サイトカインによる歯周組織再生誘導

以下は、動物実験において有意な歯周組織再生を誘導することができると報告されているサイトカインである。

1. 血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor ; PDGF) + インスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor-I ; IGF-I)
2. 骨形成タンパク-2 (bone morphogenetic protein-2 ; BMP-2)
3. トランスフォーミング増殖因子-β (transforming growth factor-β ; TGF-β)
4. 骨形成タンパク-7 (bone morphogenetic protein-7 ; BMP-7, osteogenic protein-1 ; OP-1)
5. 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor ; FGF-2, bFGF)
6. 脳由来神経栄養因子 (brain-derived newrotrophic factor ; NGF)
7. 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF)

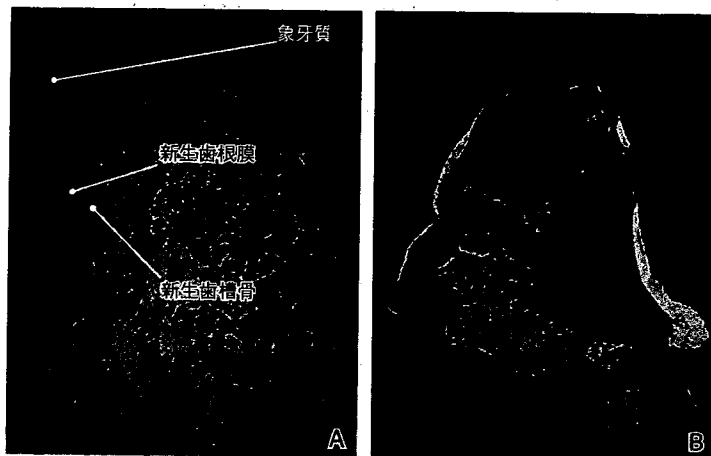


図 2-76 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を投与したビーグル犬 2 級根分岐部病変に認められた歯周組織再生
ビーグル犬の下顎臼歯に実験的に作製した 2 級根分岐部病変に FGF-2 を投与後、6 週目の組織学的観察結果 (アザン染色) を示す。FGF-2 投与側 (A) では、新生歯槽骨、新生歯根膜、新生セメント質の再生が確認されるが、対照側 (B) では、歯肉上皮の下方増殖が生じており、歯槽骨の再生は限定的である。また、FGF-2 投与側では骨性癒着や歯根吸収は認められない。

ることによって活性化し、歯周組織の再生を積極的に促進するものである。現在までに、実験動物に作製された人工的歯槽骨欠損部に表 2-23 に示すようなサイトカインを局所投与することにより、同部の歯周組織再生が誘導、促進されたとの報告がなされており、次世代の歯周組織再生療法を担う有望な選択肢の一つとして大いに期待されている (図 2-76)。

4 幹細胞とスキャフォールドの組合せ

先に述べたようにヒト骨髓中に間葉系幹細胞が存在していることが明らかになっていることから、骨髓から幹細胞を採取して (場合によっては生体外でその数を増やし)、スキャフォールドとともに歯槽骨欠損部へ細胞移植することにより、歯周組織再生を促す試みも始まっている (第 3 編第 5 章)。また、シート状に細胞外マトリックスを加工したスキャフォールドのなかで歯根膜細胞を増殖させ、歯周組織再生を期待する部位にその細胞シートを移植する試みもなされている。このような治療法は生体組織工学の三大因子の幹細胞とスキャフォールドを組み合わせたものと考えられ、大きな歯周組織欠損に対応する再生療法の一つとして期待されている。

5 再生療法の夢多き課題

歯周治療の最も理想的なゴールは、歯周病の進行によって失われた歯周組織を元どおり

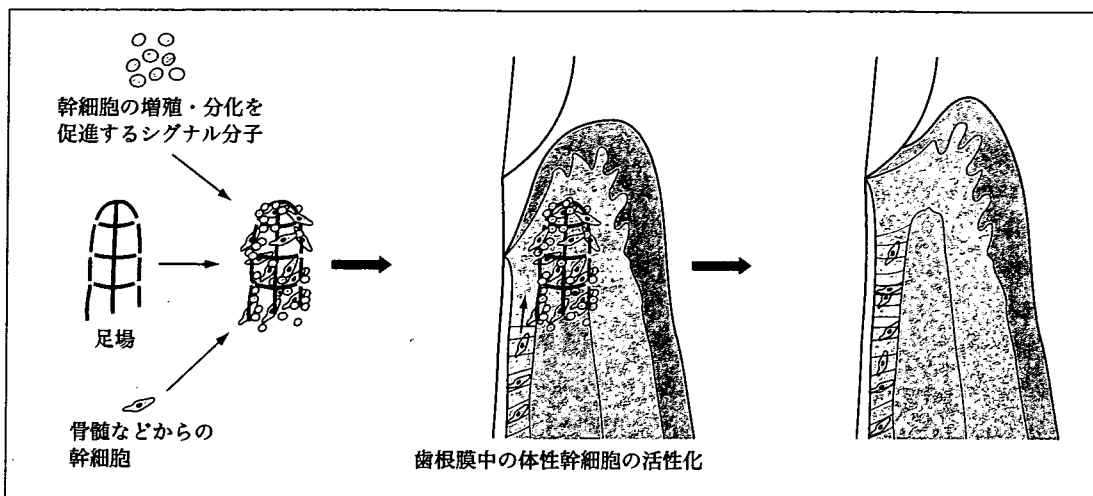


図 2-77 生体組織工学に基づく歯周組織再生療法

歯根膜に内在する体性幹細胞と他部位の骨髄などから採取された間葉系幹細胞，そしてそれら幹細胞のセメント芽細胞，骨芽細胞，歯根膜線維芽細胞への増殖，分化を誘導するサイトカイン（シグナル分子），さらに歯周組織再生を期待する空間を保持（スペースメイキング）し，その形態を伝える能力を有したスキャフォールドを組み合わせることにより理想的な歯周組織再生が達成される。

に再生することであろう。その目的に向かって，ティッシュエンジニアリングの考え方を導入した新しい歯周組織再生療法の開発が現在積極的に行われている。しかしながら，生体組織工学の三大因子のすべてを最良の条件で組み合わせた歯周組織再生療法はいまだに確立されていない（図 2-77）。このことは，21 世紀初頭の歯周治療分野における大きな，そして夢多き課題として残されているのである。

- チェック項目
1. 胚性幹細胞と体性幹細胞について述べよ
 2. ティッシュエンジニアリングの目的を述べよ
 3. ティッシュエンジニアリングの三大因子を説明せよ
 4. 歯周組織再生療法の理論を説明せよ
 5. 現行の歯周組織再生療法の問題点について述べよ
 6. 歯周組織再生におけるサイトカイン療法について述べよ
 7. 生体組織工学に基づく歯周組織再生療法について述べよ