

## 【EST データベースを用いた歯根膜発生機構の解析】

齋藤正寛 Masahiro Saito

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座生化学分野 / E-mail:mssaito@dent.osaka-u.ac.jp

歯根膜は歯周病により重篤な炎症性崩壊を受けると、機能的・生体力学的に十分に再生させることはきわめて困難である。しかしながら、歯根膜発生・再生に関わる機能分子が同定されていないため、これまで歯根膜再生を誘導できる創薬の開発は困難をきわめていた。そこでわれわれは、歯根膜再生機構を明らかにするため、慶応義塾大学医学部清水研究室と共同で Expressed sequence tag (EST) 法と呼ばれる手法を用いて、ヒト歯根膜形成に関わる遺伝子のデータベース化を試みた (図1)。

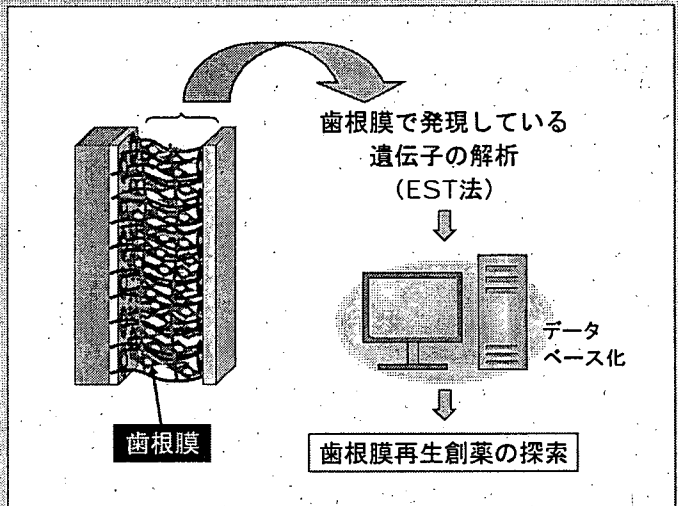


図1 ヒト 歯根膜形成遺伝子のデータベース化

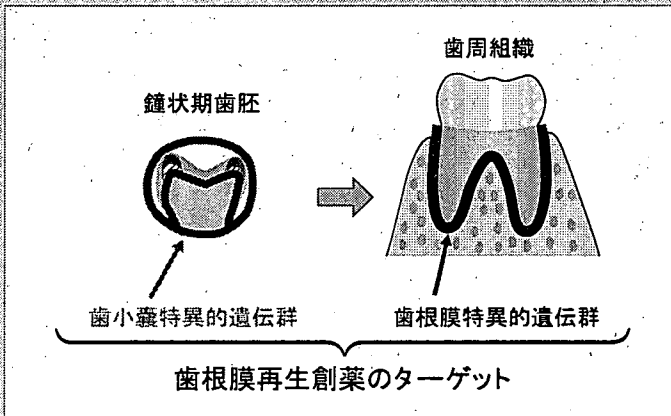


図2 歯根膜再生創薬のターゲットが含まれている?

このデータベースを構築した結果、興味深いことに歯根膜の原器である歯小囊に特異的な遺伝子群と、成熟した歯根膜で特異的に発現する遺伝子群が存在することが判明した (図2)。現在これらの遺伝子群の機能を解析中であるが、このような歯根膜発生に関わる遺伝子群のなかに、歯根膜再生創薬のターゲットが含まれている可能性が示唆された。

### この知見、どう読めばよい?

本研究の注目すべき点は、歯根膜で発現している遺伝子群を解析し、歯小囊に発現している遺伝子群と歯根膜に発現している遺伝子群をスクリーニングしたことです。さらに解析が進むことにより、歯根膜がつくられる時期に促進的に働くシグナルが明らかになり、歯根膜再生創薬の開発に繋がることが予想されます。将来、歯周組織再生手術の際に、この歯根膜再生創薬を作用させることにより、効率的に歯周組織が再生されることになるでしょう。

## 【歯冠形成から歯根形成に移行するメカニズム】

原田英光 Hidemitsu Harada

(岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座 / E-mail:hideha@iwate-med.ac.jp)

ヘルトビッチの上皮鞘 (HERS) が内エナメル上皮 (IEE) と外エナメル上皮 (OEE) の二重層であるという記載については、実は実験的に検証されていない。細胞増殖のマーカである BrdU と Ki67 を使って詳細に細胞の動きを観察した結果、HERS には主に OEE が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

われわれの提唱する HERS 形成過程についての仮説——歯乳頭側から分泌される細胞増殖因子が減少すると IEE の細胞分裂は停止する。一方、OEE は歯小囊からの細胞増殖因子によって細胞は分裂を続けて、サービカルループ下方に HERS が形成される——この仮説に基づいて、歯胚を FGF10 徐放性ゼラチンシートで挟み込んで培養すると、OEE は増殖を活発にしてサービカルループを越えてゼラチンシートの表層を遊走した。それに伴い、歯乳頭細胞がエナメル器に囲まれている領域をこえてコラーゲンゲル内に誘導されていくことが観察された。このように OEE をコントロールすることで歯根の発生や成長を誘導する可能性を示すことができた (図 1)。

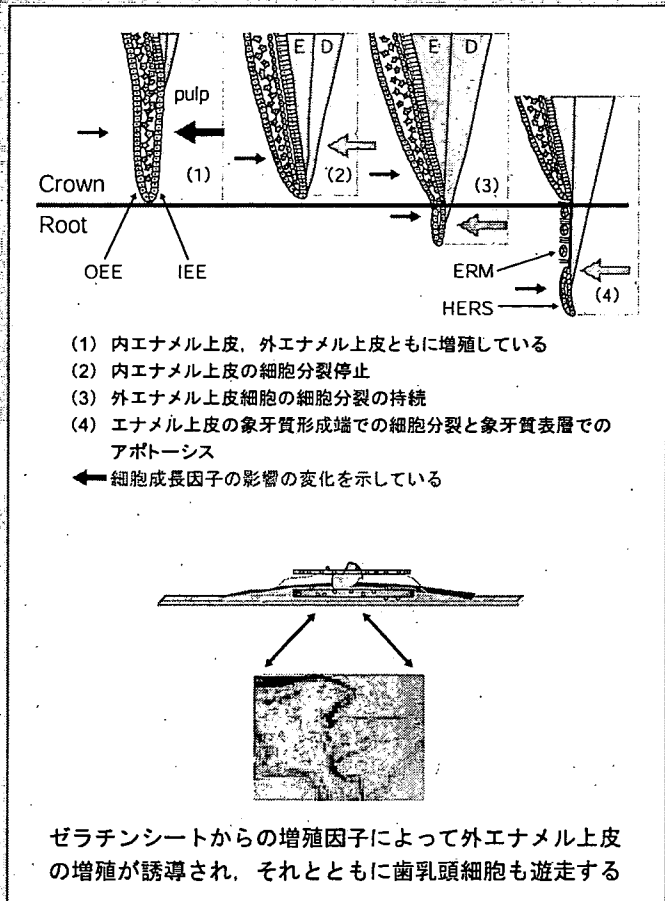


図 1 HERS 形成の仮説

ゼラチンシートからの増殖因子によって、外エナメル上皮の増殖が誘導され、それとともに歯乳頭細胞も遊走する

### この知見、どう読めばよい?

本研究の注目すべき点は、「FGFシグナルが消失すると歯冠形成から歯根形成に移行する」という結果から「HERSがIEEとOEEの二重層である」という概念を修正する仮説を提唱したことです。歯が作られる時期にFGFシグナルを調節することで、歯根の長い歯や短い歯をつくることが可能になることを示しています。

大島 勇人 Hayato Oshima

新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座硬組織形態学分野 E-mail:histoman@dent.niigata-u.ac.jp

動物の体が外傷や切断などで傷を受けると、その傷を受けた場所に依りて修復する現象を再生といい、私たちの「からだ」は見かけ上変化がなくても、各器官や組織を構成している細胞は絶えずつくられては壊されています。このように、再生とは、生物のもつ最も生物らしい現象であり、再生の場には、その場所に依りた幹細胞が維持されています。う蝕、咬耗・摩耗、切削などの歯の損傷に対して歯髄内に象牙質がつくられる現象も、幹細胞が歯髄内に存在することを示していると言えます。

現在の歯の再生の一つの方向性は、「からだ」から歯の幹細胞を取り出して、組織工学的に歯を再生させることです。これまでも、永久歯や乳歯の歯髄や歯周組織に幹細胞が存在するという報告がある一方で、血液をつくる骨髄の幹細胞や万能細胞と呼ばれる胚性幹細胞(ES細胞)から歯をつくる試みもあります。歯の幹細胞は歯の再生と修復に必要なソースであることは間違いありませんが、「からだ」のどこに歯の幹細胞が潜んでいるのか？ 幹細胞がどのようなメカニズムで維持されているのか？ どのようにして「からだ」から幹細胞を取り出すのか？ など、幹細胞に関する未解決の課題は山積していると言えるでしょう。

歯の発生における上皮間葉相互作用において、「歯の誘導」という現象があります。蕾状期歯胚より前では上皮に歯の誘導能があり、蕾状期歯胚以降は間葉に歯の誘導能が移るという事実です。たとえば、蕾状期以降では、歯胚の間葉と皮膚の上皮を一緒にすると歯ができるという現象です。このような歯の誘導現

象を利用した歯の再生研究も行われています。

また、歯が生えなくなるヒト遺伝病も歯のつくられるメカニズムの理解に役に立つことが知られています。たとえば、Ectodysplasinという遺伝子がおかしくなると無汗性外胚葉異形成症<sup>119)</sup>という病気になり、歯の数が減少します。ネズミでこの遺伝子を過剰に発現させると歯の数が増加するというのです。たった一つの遺伝子の操作で歯がつくられるという事実はたいへん興味深いことです。

一方、一生涯生え続けるネズミの切歯にも歯の幹細胞が存在することが明らかになっています。ネズミの切歯の根っこ先には歯の幹細胞が存在し、幹細胞が維持されているというのです。ネズミの切歯を使って歯の幹細胞が維持されているメカニズムを解明することも、歯の再生研究の一つの方向性です。

歯科再生医療を実現するためには、上述のように歯根がつくられるメカニズムの解明が重要になりますが、本企画でそれぞれの先生方が明らかにしたように、いろいろなシグナルが重要な役割を担っており、それらが相互に関係していることが予想されます。また、歯の発生における上皮間葉相互作用のメカニズムの解明だけではなく、幹細胞についても理解を深めなければなりません。さらに、「組織工学的歯の再生」技術の向上も重要であり、私たちが超えなければならないハードルは数多く残っていると言えるでしょう。

<sup>119)</sup> 先天的に毛、歯、汗腺などの外胚葉性組織に形成異常を示す疾患

4)村上伸也、橋川智子

歯周組織再生の現状と将来の展望

再生医学のいま —基礎研究から臨床への展開に向けて-、治療、90: 609-616, 2008

1)村上伸也

塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) による歯周組織再生、249-255 : 17、歯科と骨粗鬆症、Clinical Calcium、編集：米田俊之、2007

# 臓器置換技術を応用した次世代 歯科再生医療技術の開発

齋藤正寛<sup>1)</sup> + 辻孝<sup>2, 3)</sup>

Masahiro SAITO

Takashi TSUJI

1) 大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室

2) 東京理科大学基礎工学部 生物工学科 3) 東京理科大学 文部科学省・学術フロンティア再生工学研究センター

再生医療とは、臓器不全に陥った臓器に幹細胞と呼ばれる多分化能を有する細胞を移植して、機能回復する治療技術である。このような幹細胞移植治療の研究開発が展開されているなかで、次世代の再生医療技術として、生体外で人工的に作製した臓器と置換する臓器置換再生医療の基礎研究開発が行われている。筆者らは、歯科再生医療を目指して人工歯胚作製技術を開発し、新聞報道をはじめ社会的に大きな関心を集めた。この技術では、細胞操作により作製した人工歯胚を用いて、完全な歯を再生するばかりでなく、抜歯窩へ移植し、成長させることにも成功した。また、毛の再生にも応用可能であることから、本技術が次世代の再生医療の基盤技術として期待されている。本稿では、人工歯胚技術について概要を説明し、歯科領域における応用と課題点について述べる。

## はじめに

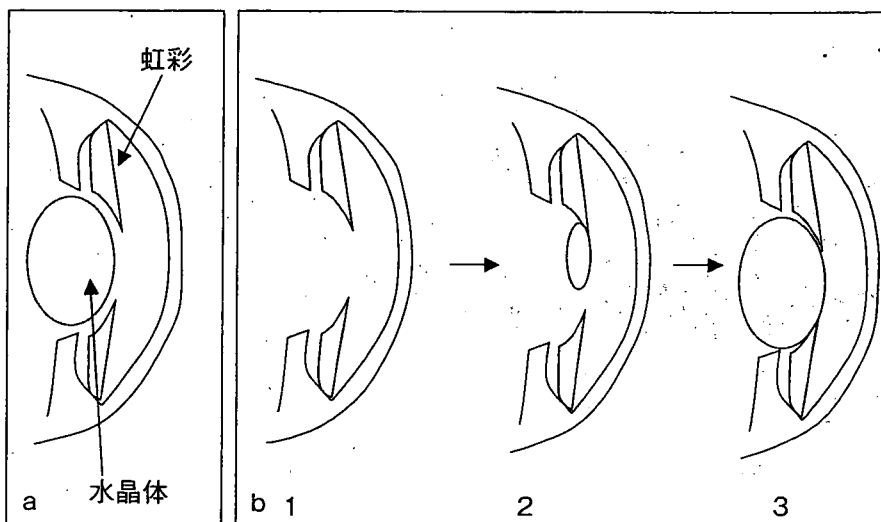
歯科の再生医療の歴史は長く、古くはゴーマンらのGTR法の開発に始まり、最近ではエムドゲインや塩基性線維芽細胞増殖因子といった生理活性物質を用いて歯周組織を再建する治療技術まで開発されている。このように歯科領域では、早期より再生医療の臨床応用が開始され、これらの治

療技術は3壁性骨欠損を有する歯周病の治療において有効性が示されている。しかし、水平性骨欠損を伴う歯周病など広範囲に崩壊した歯周組織、あるいはう蝕により影響を受けた歯髄を、包括的に再生させる治療技術は開発されていない。その理由として、歯および歯周組織の再生機構が不明な点が最大の要因として挙げられる。

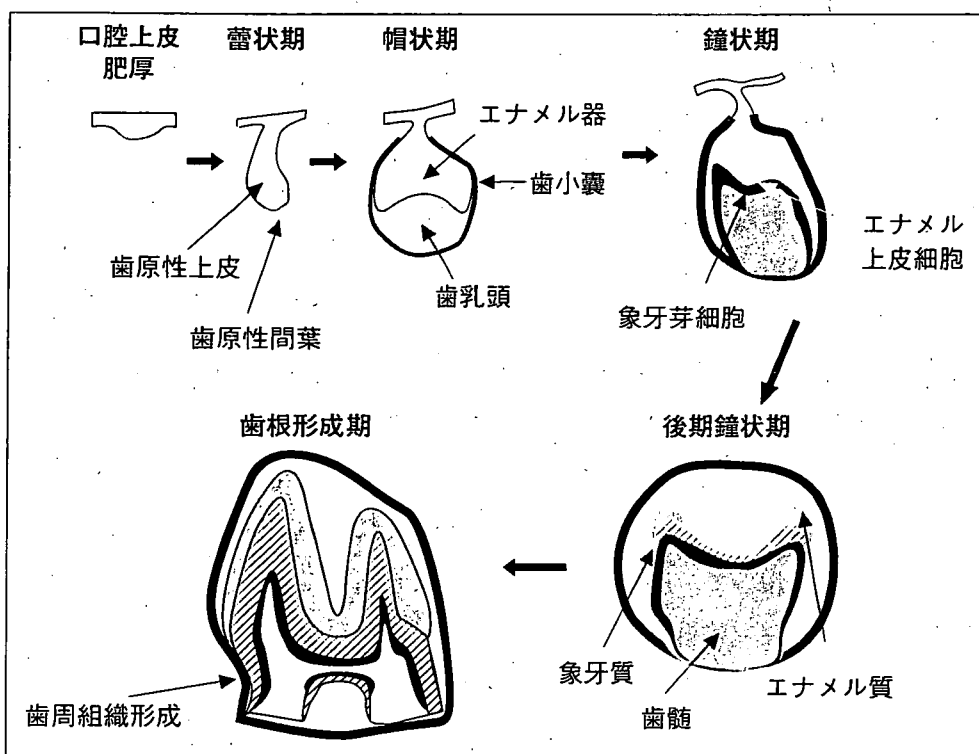
一般的に組織の再生と発生は同じ機構で制御されていると考えられている。たとえば、イモリは目の水晶体を取り除いても再生することが知られている。この現象は「Wolffian再生」と呼ばれ、虹彩のなかに存在する幹細胞が、失われた水晶体部分へ移動し、水晶体を構成する細胞へ分化して再生すると考えられている(図1)<sup>1)</sup>。つまり組織再生は、創傷治癒時に活性化された幹細胞が、発生過程を忠実に再現することにより達成されるといえる。したがって、組織再生を理解するためには、臓器固有の発生機構を解明することが重要になる。そこで、まず人工歯胚技術の説明を始める前に、歯の発生機構のあらましを述べる。

## 歯の発生の分子メカニズム

図2はマウス歯胚の発生過程を示している。歯の発生は、胎生期(胎生10日齢)に歯が形成され



図① a、b イモリの水晶体再生 (Wolffian 再生)。a: イモリの目の構造。b: 水晶体を取り除くと、虹彩から幹細胞が移動し、水晶体を再生する

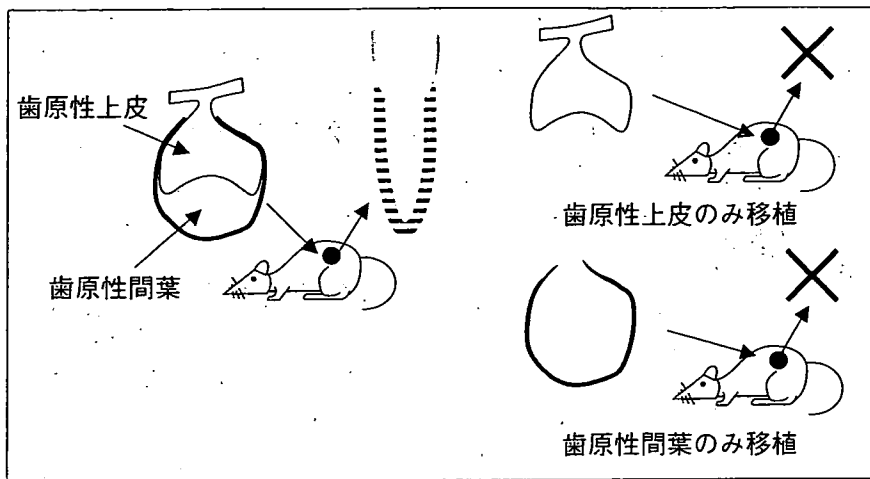


図② 歯の発生過程。歯の発生は口腔上皮の肥厚に始まり、上皮・間葉系の相互作用により発生が進行する。その後、蕾状期、帽状期および鐘状期の過程を経て、歯を形成する

る部位で、口腔上皮が肥厚するところから始まる。次に、肥厚した上皮周辺に間葉系細胞が集積し、胎生12日齢になると蕾状期歯胚を形成する。この時期の歯胚は、歯原性上皮と歯原性間葉という2つの由来の異なる組織から構成される。これらの組織は歯胚内で区画化して存在し、各々のなか将来歯を形成する未熟な細胞が集合している。

胎生15日齢の帽状期歯胚になると、歯原性間葉の細胞は歯乳頭細胞と歯小囊、歯原性上皮の細胞はエナメル器を形成する細胞へと分化する。この

帽状期歯胚を構成する組織は、前駆体と呼ばれる細胞運命の決定した細胞集団から構成されている。歯乳頭中には象牙芽前駆体と歯髓前駆体が存在し、これらは後期鐘状期になると、象牙芽細胞および歯髓細胞へと分化する。エナメル器内の細胞はエナメル上皮細胞になり、同じく後期鐘状期でエナメル芽細胞へと分化する。そして、生後の歯根形成期歯胚になると、歯小囊は歯根膜細胞、セメント芽細胞および歯槽骨芽細胞へと分化して、歯周組織を形成する。このように歯胚発生は、未熟



図③ 歯胚の移植実験。マウス歯胚は腎皮膜下へ移植すると歯を形成するが、歯原性上皮と歯原性間葉に分けて各々移植しても、歯は形成されない

な細胞から前駆体細胞の過程を経て、歯を形成する機能細胞へ分化していく。

では、これらの過程はどのように制御されているだろうか。歯は上皮付属器官に属し、肺、腎臓、毛、乳腺といった臓器と同様に、上皮組織と間葉組織の相互作用により、発生過程が進行する。たとえば、胎生期のマウス歯胚をマウスの腎皮膜下へ移植すると歯を形成するが、歯胚より歯原性間葉を取り除き、歯原性上皮細胞だけ移植を行っても歯は形成されない。逆の組み合わせでも結果は同じである(図3)。

また、蕾状期の歯胚より分離した歯原性間葉組織を非歯原性(歯を形成しない組織)の上皮細胞と組み合わせても歯は形成され、逆の組み合わせでも同じ結果が起こる。最近の発生生物学の進歩により、これらの現象はシグナル分子と呼ばれる蛋白質が中心的な役割を担っていることが明らかにされた。シグナル分子はスイッチのような働きをしており、細胞表面上の受容体と結合すると、細胞質内の情報伝達機構を刺激して、細胞分化に必要な遺伝子群の発現を誘導する作用を有している。したがって、歯原性間葉の分泌するシグナル分子は、歯原性上皮中の未熟な細胞を刺激して前駆体へと導き、逆に歯原性上皮から分泌されるシグナル分子で歯原性間葉中の未熟な細胞が刺激され、前駆体細胞になる。

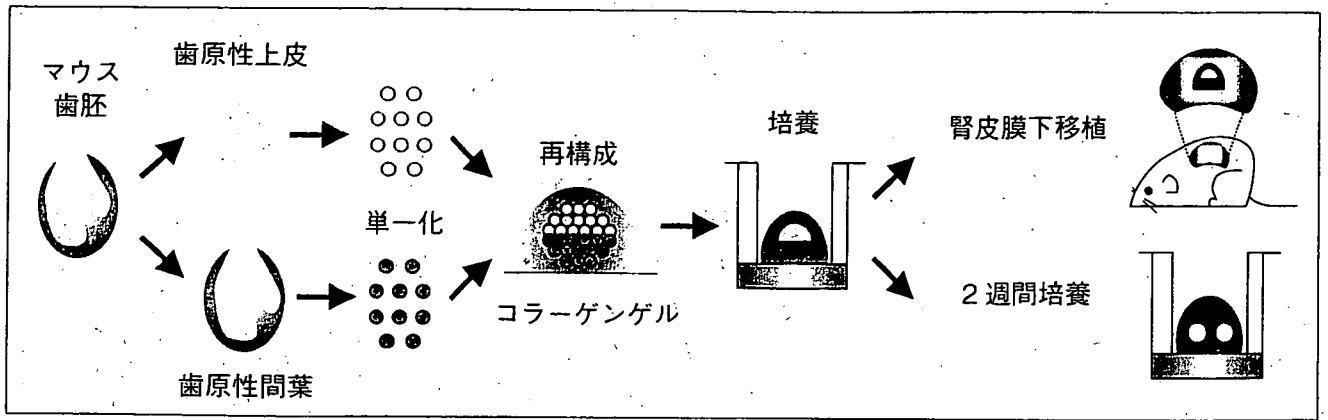
また、シグナル分子は前駆体細胞から機能細胞への分化にも関わる。このシグナル分子による上皮・間葉細胞の相互作用が正確に伝わらないと、正常な歯は形成されないことから、歯の発生はシグナル分子を介した上皮と間葉の相互作用により制御されていると考えられている<sup>2)</sup>。現在、多種類のシグナル分子が歯胚発生に関わることが報告されているものの、各シグナル分子の役割は不明な点が多く残されている。



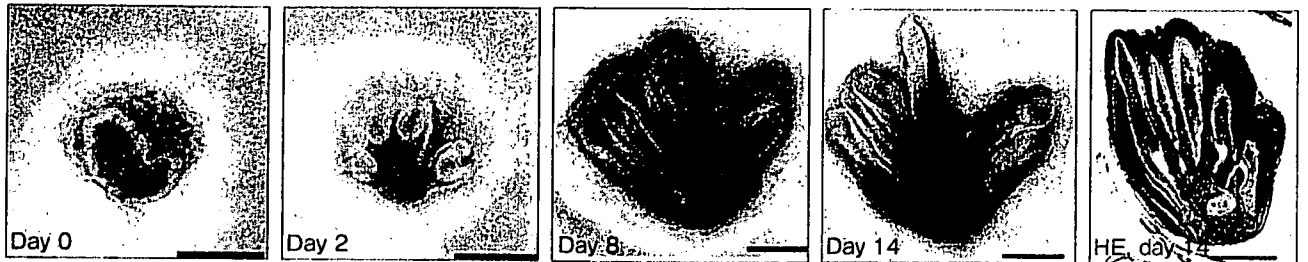
### 再構成法による歯の再生

再構成法とは、上皮・間葉組織より酵素消化法を用いて単離した細胞を、遠心分離して再集合体を形成させ、器官原基を再構築させる方法のことである。これまで網膜および毛包が再構成法を用いて再構築できることが報告されている。そのメカニズムは、細胞を単一化することで細胞内の情報がリセットされ、発生初期の状態に戻ると考えられており、再度集合体を形成することによって発生過程が再現され、臓器再構築が導かれると考えられている<sup>3)</sup>。

この再構成法を用いた歯の再生は2002年にForsyth研究所のYelick博士(現Tufts大学)らにより報告され、以後数多くの研究グループにより歯の再生機構、ならびに組織工学技術の開発を目的とした研究に利用されてきた<sup>4)</sup>。その方法は、



a : 人工歯胚の製作方法



b : 培養操作による人工歯胚の成長過程



c : 腎皮膜下移植による歯の再生。歯周組織を含む歯の完全な再生が観察される (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、BV : 血管、P : 歯髄、B : 歯槽骨、PDL : 歯根膜)

図4 a~c 人工歯胚を用いた歯の再生

①歯胚を取り出し、歯原性上皮組織と歯原性間葉組織を分離し、②各々の組織を酵素処理により単一化し、③再集合体を形成する方法である。

前述のごとく歯の発生は、歯原性間葉と歯原性上皮組織による相互作用により制御されている。したがって、再構成法により上皮・間葉系の相互作用を再現させれば、正常な歯の発生を人為的に誘導できることは容易に予想できる。実際に、再構成法を用いて数多くのグループで歯の再生に成功していることから、この方法論が歯の再生機構の解明に有効であることは間違いない。しかし、同技術を用いて歯の再生を人為的に誘導できるも

の、その成功率、生物学的メカニズムおよび再生した歯を顎骨内に戻せるか、などの問題点が残されていた。



### 人工歯胚作製技術の開発

上述の問題点を乗り越えるため、筆者らは再構成法を用いた歯の再生技術の改良を試みた<sup>5)</sup>。その方法を図4 a に示す。

まず、胎生14.5日齢の帽状期マウス切歯歯胚を取り出し、歯原性上皮と歯原性間葉に分離して単一化して得られた上皮・間葉細胞を、コラーゲンゲル内で高密度に区画化して再構築させ、3次元





a : 抜歯窩の組織像      b : 人工歯胚を移植した組織像      c : 腎皮膜下で形成した歯を移植した組織像

図5 a～c 人工歯胚の抜歯窩での成長。抜歯窩へ移植後14日経過した組織像

的に培養する方法である。この器官原基再構成法で作製した歯胚を人工歯胚と名づけ、歯の形成能力を解析した。図4 bに示すように、人工歯胚は日を追うごとに成長し、歯冠を形成することが観察された。そして人工歯胚をマウス腎皮膜下へ移植すると、歯根および歯周組織（歯根膜、セメント質、歯槽骨）を含む完全な歯を形成した（図4 c）。

この方法では100%の人工歯胚が完全な歯を形成し、従来の方法を上回る形成頻度で歯を形成させることが可能である。さらに人工歯胚、あるいは腎皮膜下で移植して形成した歯を成体マウスの抜歯窩に移植すると、生着して成長するばかりでなく、歯髄内に末梢神経および毛細血管の侵入が認められた（図5）。これらのことから、少なくとも成体の顎骨内で人工歯胚が成長することが証明された。現在、人工歯胚が萌出するところまで成長するかどうかの検討を進めている。

## 今後の展開

今回の研究成果より、実験室で人工歯胚を人為的に作製することは可能であり、成体の顎骨内へ移植して発生可能であることが判明した。また、同技術を用いて毛（頬髭）の再生にも成功していることから、冒頭に述べた臓器置換再生医療の基盤技術になるといえるであろう。このように再構成法による人工歯胚技術は、歯を失った人のみならず、

抜髄処置で歯髄を失った人にも夢を与えるものであるが、人への実用化には乗り越えなければならないいくつかの課題がある。

まず、今回使用したのは胎児由来の細胞なので、臨床応用することは倫理的に問題があるため、患者本人から入手可能な幹細胞を用いて治療ができる技術開発が必要である。また、長期的な歯の発生を解析し、歯根や歯周組織が完全に再生できることを明らかにすべきであろう。これらの研究開発を進めていくことにより、歯の再生医療の実現をもたらすことが期待される。

## 【参考文献】

- 1) Scot Gilbert: Developmental biology sixth edition. Sinauer Associate, Inc, 83-84, 2000.
- 2) Thesleff I: Epithelial-mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. Journal of Cell Science. 116: 1647-1648, 2003.
- 3) 山本 仁: 歯の再生 (歯の発生生物学から歯の再生研究まで). 真興交易 (株) 医書出版部, 東京, 2006: 168-173.
- 4) Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC: Tissue Engineering of Complex Tooth Structures on Biodegradable Polymer Scaffolds. J Dent Res, 81(10): 695-700, 2002.
- 5) K. Nakao, R. Morita, Y. Saji, K. Ishida, Y. Tomita, M. Ogawa, M. Saito, Y. Tomooka, T. Tsuji: 2007 The development of a bioengineered organ germ method. Nature Method, 227-230, 2007.

## 歯周組織再生の現状と将来の展望

村上伸也\* 橋川智子

大阪大学大学院歯学研究科歯周病分子病理学・歯周病診断制御学 教授

### Summary

歯周病は、歯を支えている歯周組織が慢性炎症的に破壊されていく疾患である。近年、歯根周囲の靭帯組織（歯根膜）に未分化間葉系幹細胞が成人になってもリザーブされていることが明らかにされ、同細胞を種々の方法で活性化することにより、失われた歯周組織を再生しようとする試みがなされている。GTR法やエナメルマトリクスタンパクを用いた既存の治療法に加えて、FGF-2などのサイトカインの局所投与や脂肪組織由来幹細胞の移入により、歯周組織再生誘導を図ろうとする臨床研究が推進されている。

## I 歯周組織再生療法の現状

### 1 歯周病と歯周組織再生療法

われわれの歯は、2種類の硬組織（セメント質、歯槽骨）と2種類の軟組織（歯肉、歯根膜）からなる歯周組織により、顎骨に強固に支持されている。歯周病は細菌バイオフィーム（プラーク）に起因する感染症であり、疾患の進行に伴い、歯の支持組織である歯周組織が慢性炎症的に破壊される（図1）。歯周病は成人が歯を失う最大の原因であり、成人の約80%が罹患している「口」の生活習慣病としても位置づけられている。歯周治療の原則は、原因である細菌バイオフィームを歯根表面の壊死セメント質とともに機械的に除去することであるが、それだけでは創傷治癒の場にいち早く到

達する歯肉上皮により治癒が完了してしまい、セメント質や歯槽骨の新生を伴った真の歯周組織再生は望めない。したがって、中高年者、高齢者のQOLの維持・増進を考えたとき、予知性の高い新規歯周組織再生療法の開発は社会的急務であるといえる。

これまでの研究成果より、歯根周囲の靭帯組織である歯根膜組織のなかに骨芽細胞やセメント芽細胞へ分化し得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<sup>1)</sup>、歯根膜に存在するこのような細胞の機能を十分に発揮させる工夫をすることにより、従来の歯周治療では不可能と考えられてきた歯周組織の再生を誘導することが歯科医学的に可能であると現在では考えられている（図2）。

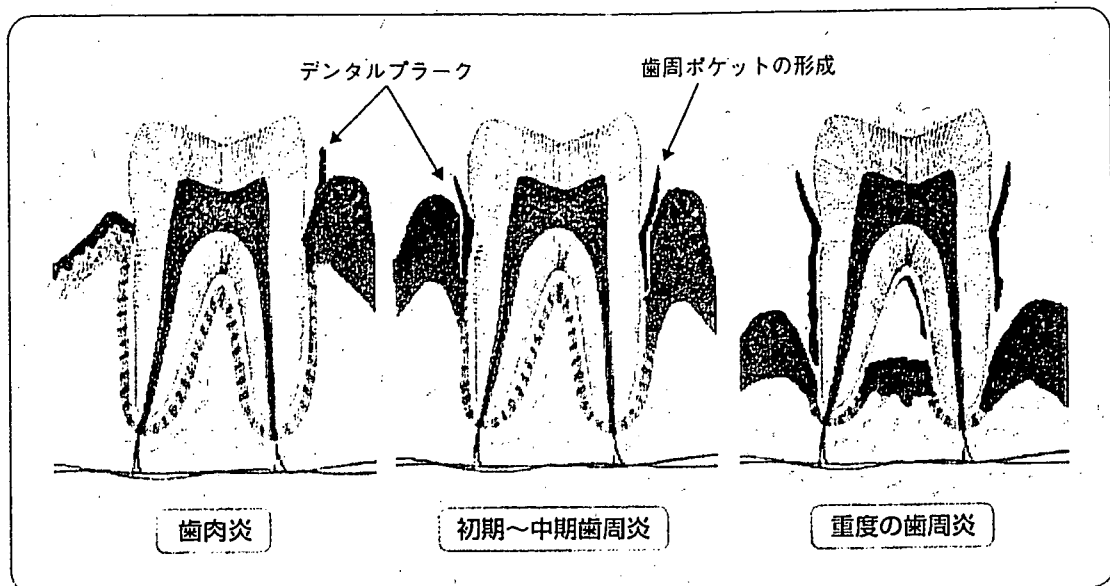


図1 歯周組織と歯周病  
 歯は歯周組織(歯肉・歯根膜・セメント質・歯槽骨)により顎骨に支持されている。そして歯周病は、デンタルプラーク中の細菌の影響により歯周組織が慢性炎症的に破壊されてゆく疾患である。

ここでいう歯周組織の再生というのは、①歯周組織欠損部に面する歯根面に歯根膜由来細胞が選択的、優先的に誘導され、②これら歯根膜由来細胞中に含まれる未分化間葉系幹細胞(歯周組織幹細胞)が分化能を保有したまま増殖し、硬組織形成細胞(骨芽細胞やセメント芽細胞)や歯根膜線維芽細胞として部位特異的な分化を遂げ、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歯と歯槽骨間に線維性の結合(いわゆる新付着)が再生されることを意味している。

## 2 歯周組織再生療法の現状

現在臨床応用されている歯周組織再生療法は、患歯の歯根膜組織に内在するいわゆる「歯周組織幹細胞」を幹細胞源に用いたものである。歴史の長いものとしては「骨移植」があげられる。これは患者の顎骨を一部採取・粉碎して得られた自家骨やアパタイトのような人工骨を歯周組織欠損部に充填することにより、同部の骨再生を促そうとす

### 歯周組織幹細胞の保管庫としての歯根膜組織

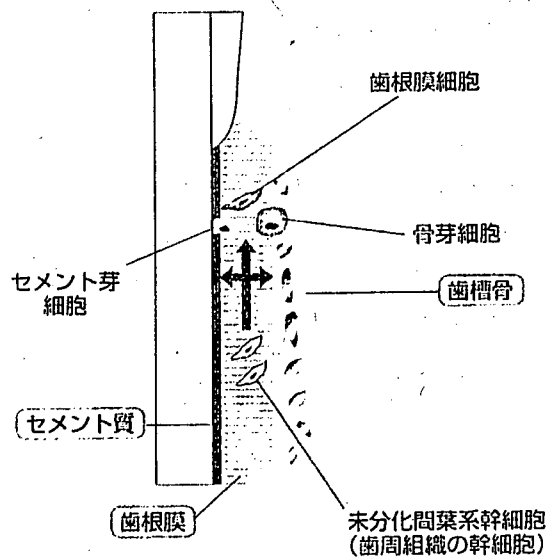


図2 「歯周組織幹細胞」としての未分化間葉系幹細胞が存在する歯根膜組織の概念図

歯根膜中にはセメント芽細胞、骨芽細胞、歯根膜細胞などへ分化する能力を保持しているいわゆる「歯周組織幹細胞」が、成人になっても存在している。

るものである。1980年代に入り、「guided tissue regeneration (GTR) 法」が臨床応用されるよう

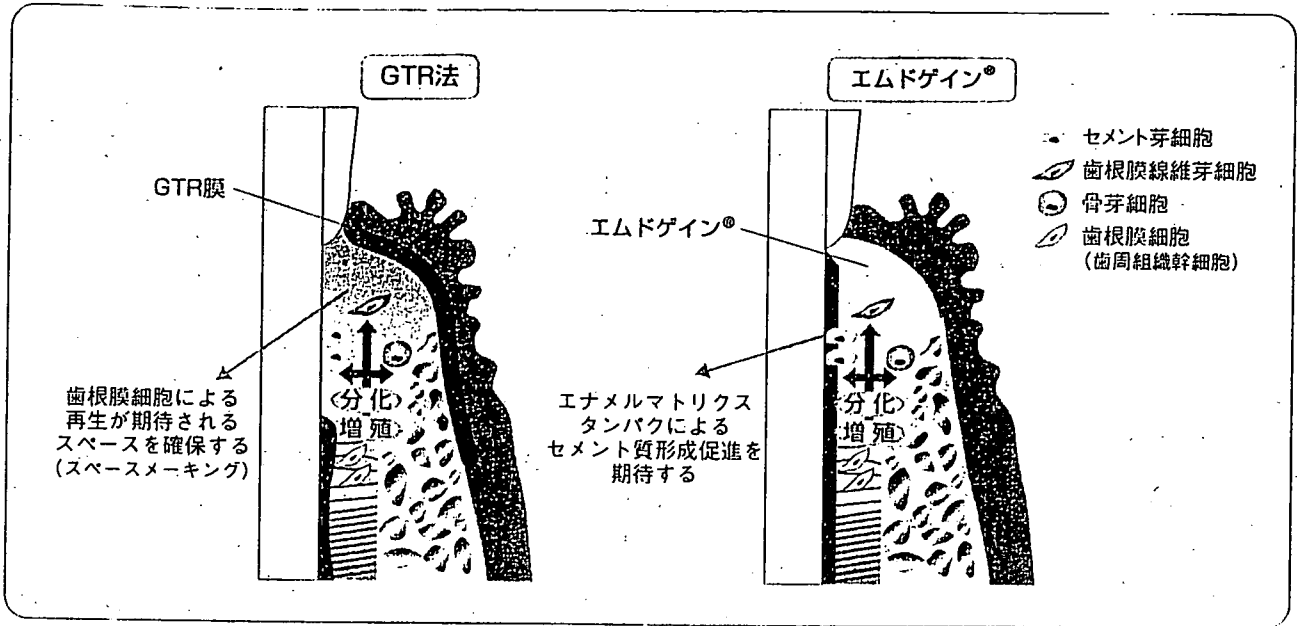


図3 現行の歯周組織再生療法

現在、GTR法とエムドゲイン®による歯周組織再生療法が臨床応用されており、ともに臨床の場で一定の成果をあげている。これらとともに、歯根膜中に存在する内在性「歯周組織幹細胞」の潜在能力を引き起こすことにより、歯周組織再生を誘導しようとするものである。

なった(図3)。これは、歯周組織欠損部を生体親和性のGTR膜で覆うことにより、歯肉上皮由来および歯肉結合組織由来の細胞が同上欠損部へ侵入するのを防ぎ、歯根膜由来細胞を同上欠損部へ到達させることにより、歯周組織再生を誘導しようとする治療法である。その後1990年代に入り、「エナメルマトリクスタンパク(EMD)：エムドゲイン®」が臨床応用されるようになる(図3)。この

タンパクは歯の発生期にヘルトヴィッヒ上皮鞘(Hertwig's epithelial sheath)から分泌されるタンパクでセメント質の形成を促す作用を有しているといわれている。6ヵ月齢ブタの下顎骨歯胚から生成されたEMDが現在臨床応用されており、EMDを歯周外科時に歯周組織欠損部へ投与することによりセメント質形成が、ひいては歯周組織再生が誘導されると考えられている。

## II 歯周組織再生療法の将来展望

### 1 サイトカイン療法による歯周組織再生誘導

先に述べた現行の歯周組織再生療法は、臨床の場で一定の成果をあげているものの、適応症・予知性などにつき、改善されるべき点があることが指摘されている。そこで、I-1で述べた歯周組織再生の過程をサイトカインの局所投与により活性化し、歯周組織再生を積極的に促進しようとする新

たな治療法の確立が試みられている。表1にはこれまでに動物実験などでその有効性が報告されているサイトカインを示している。このうち、PDGF-BBとβ-TCPを組み合わせたものが歯周組織再生誘導用のdeviceとして米国FDAの承認を受け、現在米国にて臨床応用が開始されている<sup>2)</sup>。

筆者らの研究室では、強力な血管新生作用と間葉系細胞の増殖誘導能を有する塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor :

表1 サイトカインによる歯周組織再生誘導

① PDGF-BB (platelet-derived growth factor)	+	IGF-I (insulin-like growth factor-I)
② BMP-2 (bone morphogenetic protein-2)		
③ TGF- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )		
④ OP-1 (BMP-7) (osteogenic protein-1)		
⑤ BDNF (brain-derived neurotrophic factor)		
⑥ VEGF (vascular endothelial growth factor)		
⑦ PDGF-BB (platelet-derived growth factor)	+	$\beta$ -TCP (GEM21S®) ( $\beta$ -tricalcium phosphate)
⑧ FGF-2 (bFGF) (basic fibroblast growth factor)		

bFGF (FGF-2)]に着目し、FGF-2を歯周外科時に歯槽骨欠損部に局所投与することにより、歯周病により失われた歯周組織の再生を人為的に誘導・促進する、新しい歯周組織再生療法の開発に取り

組んできた。

#### a. 動物実験における塩基性線維芽細胞増殖因子

##### FGF-2の歯周組織再生誘導効果の検討

筆者らは、FGF-2が実際に歯周組織再生を促進するか否かを以下の動物実験により検証した<sup>3,4)</sup>。ビーグル犬およびカニクイザルの下顎臼歯部複根歯に歯周病モデル(2級根分岐部病変)を作製し、架橋ゼラチンを基剤としたFGF-2を実験側の歯周組織欠損部に填入し、対照側には同基剤のみを填入した。そして、FGF-2投与後それぞれ6週および8週経過した後に、FGF-2投与部位に歯周組織の再生が誘導されているか否かを検討した。その結果、FGF-2投与側では、肉眼的にも明らかな骨の新生が認められた(図4)<sup>3,4)</sup>。そして、組織学的にも新生歯槽骨、新生歯根膜、新生セメント質が観察され、統計学的にも有意な歯周組織再生が誘導、促進されているのが明らかにされた(表2)。これ以外の歯周組織欠損モデルに対しても同様の



図4 FGF-2投与によりビーグル犬の根分岐部病変に誘導された歯周組織再生  
0.1%FGF-2投与前a, 投与6週後bの2級根分岐部病変における歯槽骨の新生(骨充填)の様子を示す。  
(村上伸也, 高山真一: bFGFの現状と将来展望. 歯界展望, 医歯薬出版, 536, 2002.)  
(文献3)より)

表2 ビーグル犬およびカニクイザルに作製した実験的2級根分岐部病変に対するFGF-2の歯周組織再生誘導効果

a	ビーグル犬(%)	対照側(n=6)	FGF-2側(n=6)
	新生骨形成率	35.4±8.9	83.6±14.3*
	新生骨梁形成率	16.6±6.2	44.1±9.5*
	新生セメント質形成率	37.2±15.1	97.0±7.5*
*: p<0.01 (文献3)より改変)			
b	カニクイザル(%)	対照側(n=6)	FGF-2側(n=6)
	新生骨形成率	54.3±8.0	71.3±13.5*
	新生骨梁形成率	31.6±3.5	48.7±8.9**
	新生セメント質形成率	38.8±8.6	72.2±14.4**

\*: p<0.05 \*\* : p<0.01

FGF-2投与時の欠損量を100%とし、6週後aおよび8週後bに新生が確認された骨・骨梁・セメント質量をそれぞれ百分率で表している。対照側には基剤のみを投与した。

(文献4)より改変)

処置を行い、そのすべてにおいて、歯肉上皮の下方増殖・骨性癒着・歯根吸収などの異常な治癒形態を生じない、統計学的に有意な歯周組織再生が誘導されてくることを確認している。

#### b. 臨床治験におけるFGF-2の歯周組織再生誘導効果

2001年よりFGF-2の歯周組織再生誘導効果ならびに安全性の検討を目的として、多施設参加の第II相臨床治験(プラセボを含む用量反応同時対照による二重盲検試験)が行われた。その結果、ヒトの2壁性および3壁性歯槽骨欠損に対し、0.3% FGF-2含有ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)製剤の局所投与がX線写真上で統計学的に有意な歯槽骨新生を誘導し得ることが確認されている。また、同治験期間中には安全性上問題になるような事例は認められなかったと報告されている。FGF-2のヒトに対する安全性および歯周組織再生誘導に対する有効性についてのさらなる検討のために、2005年8月より後期第II相の臨床治験(プラセボを含む二重盲検・並行群間比較用量反応試験)が展開されている。

## 2 細胞移植による歯周組織再生療法の開発

### a. 細胞移植による歯周組織再生療法の必要性

先に述べたGTR膜、EMDおよびサイトカインを用いた歯周組織再生療法は、すべて内在性の歯根膜組織由来幹細胞のもつ自己修復力を活性化することにより歯周組織再生を図るアプローチと捉えることができる。一方、生体内の幹細胞数は加齢とともに減少することが知られている。したがって、歯周組織再生に関しても、高齢者の方や、重度歯周病の場合には内在性の歯根膜細胞の活用だけでは十分な再生量が期待できないことが危惧される。そのような場合には、ほかの組織より採取した間葉系幹細胞を歯周組織欠損部へ移植することにより、歯周組織再生を促すことが必要になるものと考えられる。

### b. 移植細胞の選択

#### —脂肪組織由来幹細胞の可能性—

従来、再生医療のための幹細胞源としては、骨髓より採取したものが広く使用されている。しかしながら、骨髓からの幹細胞の採取は、身体への侵襲が大きく、また採取できる細胞数も限定される。そこで、筆者らの研究室では、採取に際して患者への負担がより少なく、安全性も高いと考えられる脂肪組織中に存在する未分化間葉系幹細胞に着目した。すでに*in vitro*において、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞(ADSC)が、脂肪、骨、軟骨、筋肉など中胚葉性の細胞へ分化することが報告されており、ADSCがmultipotentな細胞であることが明らかにされている<sup>5)</sup>。筆者らの研究室でも、ヒト脂肪組織より単離したADSCが骨芽細胞lineageへの分化能を有していることを*in vitro*にて確認している。そこで、ビーグル犬を用いた歯周病モデルを用いて、ADSC移植による歯周組

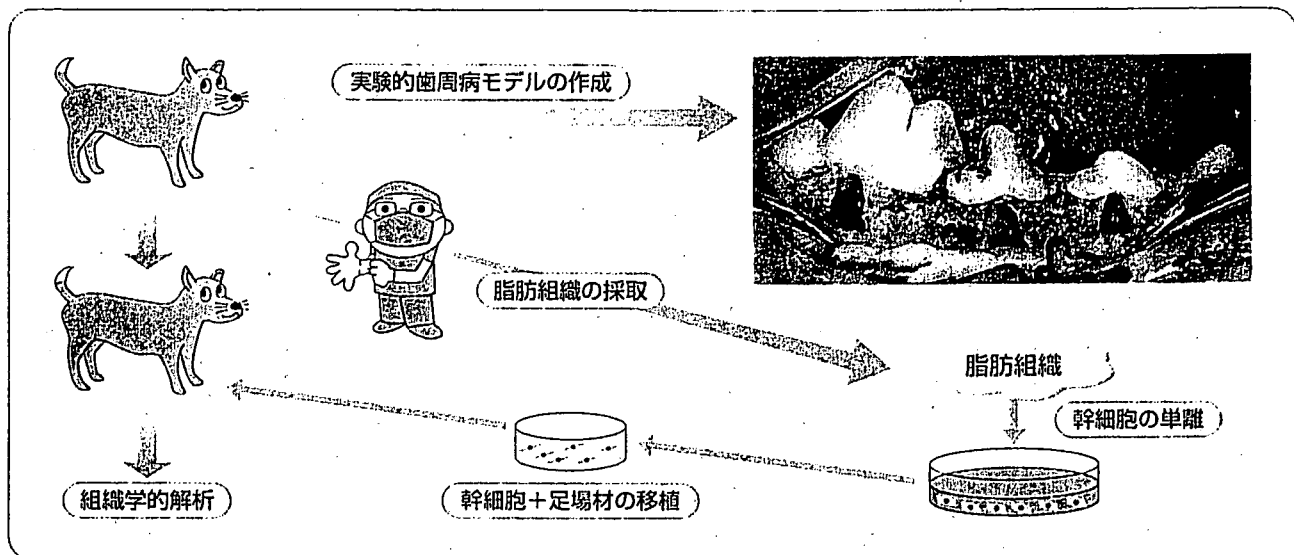


図5 ビーグル犬を用いたADSC移入による歯周組織再生誘導実験  
 ビーグル犬の下顎臼歯頬側分岐部に人工的2級分岐部病変を作製し、同部に同一ビーグル犬の腹部大網脂肪組織より分離したADSCを、足場材としてのフィブリンゲルとともに移植する。

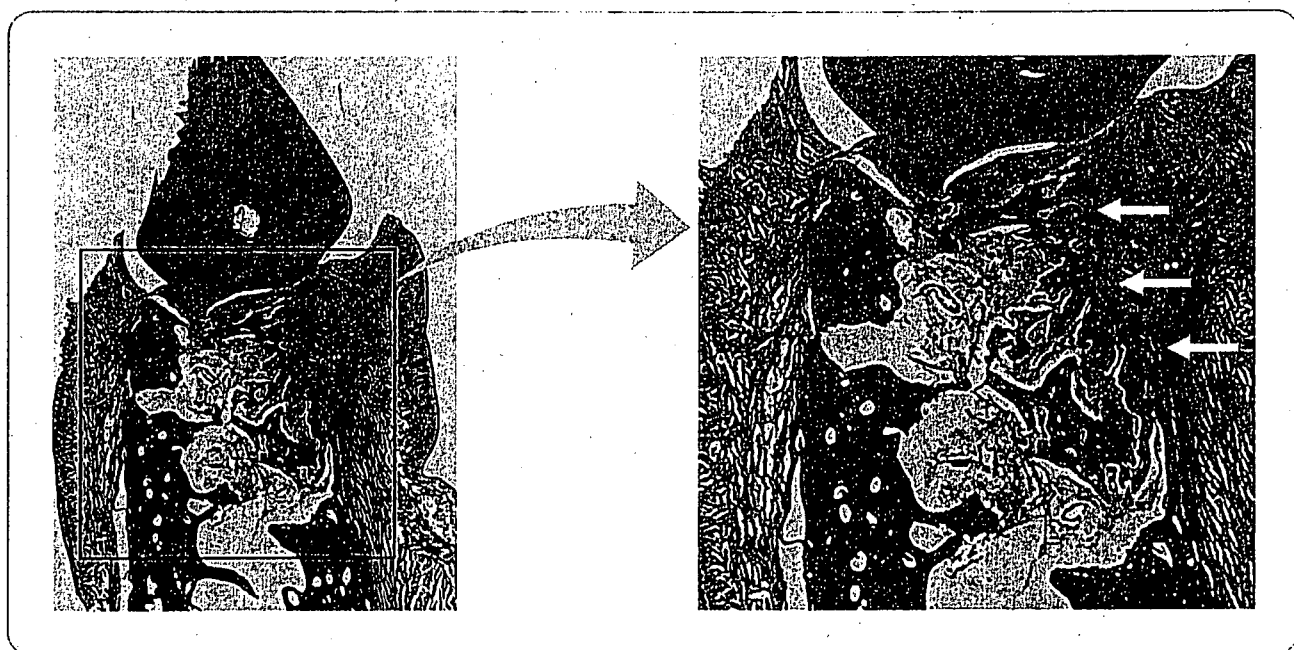


図6 ビーグル犬へのADSC移入による歯周組織再生  
 作成した左右両側の人工的骨欠損のうち一側を被験部位として、ADSC+フィブリンゲルを移植した。一方、対照部位にはフィブリンのみを移植した。移植後6週目に屠殺し、組織切片を作成して組織学的に歯周組織再生効果を評価した。ADSC移植後6週目の組織学的解析を示す。矢印部に著明な骨の新生を伴う歯周組織再生が認められた。

織再生誘導効果について検討を行った(図5)。ビーグル犬の第四前臼歯分岐部に人工的歯周組織欠損(2級分岐部病変)を作成し、腹部より採取した脂肪より単離したADSCをフィブリンゲルとともに同欠損部へ移植した結果を図6に示してい

る。組織学的解析を行った結果から、移植部には著明な新生骨が確認されている。このように、生体内に豊富に存在し採取も簡便かつ安全に行える脂肪組織は、歯周組織再生療法において、有用な幹細胞源となり得ることが強く示唆されている。

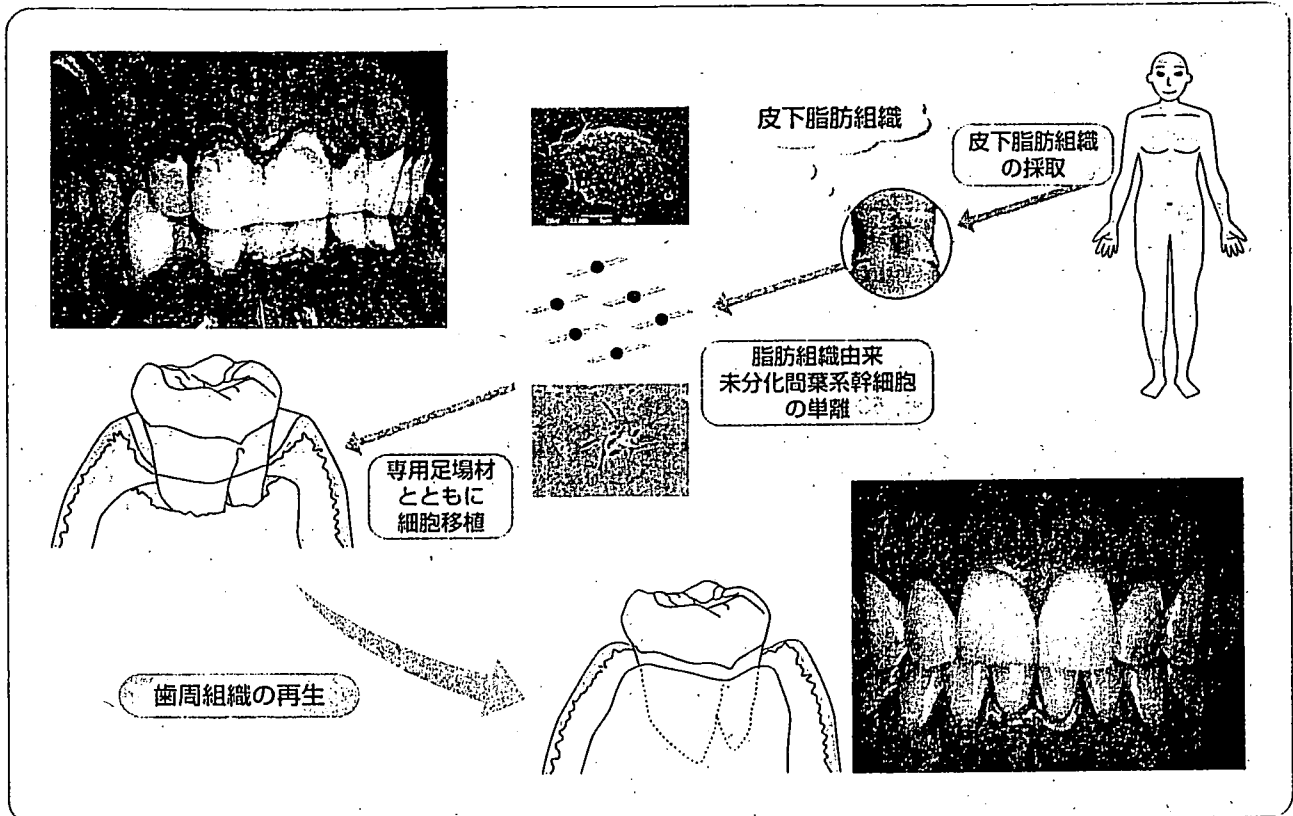


図7. ADSC 移入による次世代型歯周組織再生療法の開発

患者から皮下脂肪を採取し、そこからADSCを分離した後、適切な足場材とともに同細胞を歯周組織欠損部に移入することにより、同部の歯周組織再生を促そうとするものである。

### c. 至適足場材の選定

上述したような中等度歯周病の症例においては、レシピエント由来フィブリンを足場材として使用することにより細胞を移植することが可能であるが、より重度の歯周組織破壊を伴う症例においては、組織工学的な工夫を加味することが必要とされる。すなわち、組織再生を期待する場(スペース)を保持するスペースメイキング能力を有し、かつ、適度の賦形性とさらには骨伝導性を有するような適切な歯周組織再生誘導用足場材の開発が期待される。しかしながら、現時点では、ヒドロキシアパタイト、乳酸・グリコール酸共重合体など足場材候補となる既存の製品が数種類存在するが、重度歯周病再生治療用にカスタマイズされた効果的な足場材の報告はきわめて少なく、至適足場材の開発および選定は今後の重要な課題と

して残されている。

### d. 幹細胞移植を用いた歯周組織再生療法の今後の展望

歯周組織は、歯槽骨・セメント質・歯根膜・歯肉から構成される複雑な組織であり、各組織を歯周組織破壊の度合いに応じて自由自在に再生させることが最終目標である。今後、安全性が担保されており、かつ幹細胞の遊走・増殖、さらには骨芽細胞やセメント芽細胞への分化を支える至適足場材を選定することにより、細胞移入による歯周組織再生療法の適応症例はおおいに拡大するものと思われる(図7)。そして近未来には、サイトカイン・幹細胞・足場材の3要素を最適条件で融合させた、真のオーダーメイド歯周組織再生療法の確立が強く望まれる。





## 参考文献

- 1) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364 : 149-155, 2004.
- 2) Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, et al : Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain : Results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol*, 76 : 2205-2215, 2005.
- 3) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, et al : Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodont Res*, 38 : 97-103, 2003.
- 4) Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, et al : Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res*, 80 : 2075-2079, 2001.
- 5) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH : Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13 : 4279-4295, 2002.

## 歯周組織再生医療と DDS 技術に 期待するもの

Periodontal regeneration and DDS

### Keywords

歯周病  
歯周組織再生  
塩基性線維芽細胞増殖因子  
歯根膜細胞

村上 伸也 島袋 善夫  
北村 正博 山田 聡

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座  
歯周病分子病態学・歯周病診断制御学

### Summary

In order to enhance periodontal tissue regeneration, we have been investigating the biological activities of basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2). Intraosseous bony defects were surgically created in beagle dogs and non-human primates, and recombinant FGF-2 was topically applied to those defects. Six or eight weeks after application, in all sites where FGF-2 was applied, significant periodontal ligament (PDL) formation with new cementum and new bone formation was observed in amounts greater than in the control sites. No instances of epithelial down-growth, ankylosis, or root resorption were observed in the FGF-2 sites. Based on the data of *in vitro* analysis, we speculate that FGF-2 plays important roles in wound healing by promoting angiogenesis, regulating production of extracellular matrices, and inducing the growth of immature PDL cells, and in turn accelerates periodontal regeneration. Introducing DDS, which enables controlled release of plural cytokines, may enhance the potential of cytokine therapy in the fields of not only periodontal regeneration but also craniofacial medicine.

### 歯周病と歯周治療

歯周病はデンタルプラーク（細菌バイオフィルム）に起因する感染症であり、疾患の進行に伴い歯の支持組織である歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患である（図1）。世界中において依然罹患率の高い疾患の一つであり、成人が歯を失う最大の原因に挙げられている。日本においても成人の約80%が罹患している「口」の生活習慣病として位置づけられている。歯周治療の原則は、原因であるデンタルプラークを歯根表面の壊死セメント質とともに機械的に除去することである。しかしながら、それだけでは創傷治癒の場にいち早く到達する歯肉上皮により創傷治癒が完了してしまい、歯周病の進行により失われたセメント質や歯槽骨の新生を伴った歯周組織再生は達成できない。中高年者、高齢者において「口」と「歯」が支えるQOLが歯

Murakami, Shinya / Shimabukuro, Yoshio / Kitamura, Masahiro / Yamada, Satoru

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry  
E-mail: ips@shinya@dent.osaka-u.ac.jp

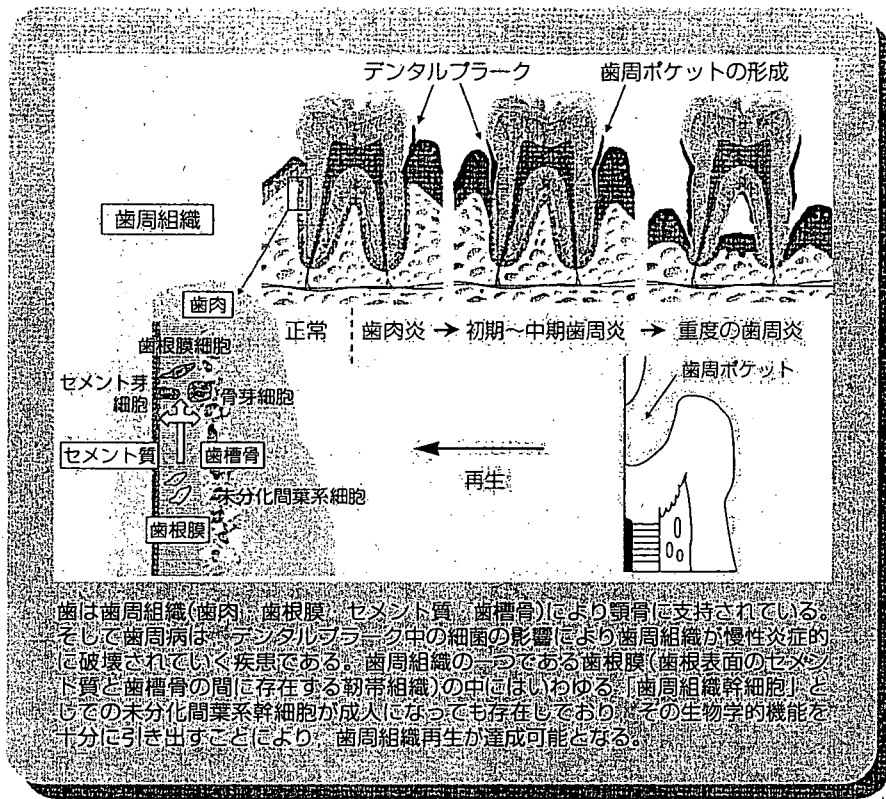


図1 歯周組織と歯周病

周病の蔓延により脅かされている現状を考えると、予知性の高い新規歯周組織再生療法の開発は社会的急務であるといえる。

### 歯周組織の再生は可能か？

はたして、歯周組織の再生は医学的・生物学的に可能なのであろうか？我々の歯は、2種類の硬組織(セメント質、歯槽骨)と2種類の軟組織(歯肉、歯根膜)からなる歯周組織により、顎骨に強固に支持されている。具体的には、歯根膜線維芽細胞により産生されるコラーゲン線維束の端がセメント

質と歯槽骨に埋入されることにより、歯と歯槽骨は強固に連結されている。近年、歯根周囲の靭帯組織であるこの歯根膜組織の中に骨芽細胞やセメント芽細胞へ分化し得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、歯根膜に存在するこのような細胞の生物学的活性を十分に引き出すことにより、従来の原因除去治療のみでは不可能と考えられてきた歯周組織の再生を誘導することが歯科医学的に可能であると現在では考えられている(図1)。

理想的な歯周組織の再生誘導を考えた場合、①歯周組織欠損部に面する歯

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これら歯根膜由来細胞中に含まれる未分化間葉系幹細胞(歯周組織幹細胞)が分化能を保持したまま増殖した後、骨芽細胞やセメント芽細胞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歯と歯槽骨間に線維性の結合が再生されること、が必要となる。

### 歯周組織再生療法開発の現状

このような歯周組織再生誘導に際し必要とされる過程を少なくとも部分的に活性化することにより、歯周組織再生誘導を果たそうとする試みがすでに臨床応用されている。たとえば、組織誘導再生法(GTR法)は、歯肉上皮の下方増殖を抑制し、歯周組織欠損部へ歯根膜細胞の選択的・優先的な誘導を果たすことにより歯周組織再生を誘導するものである。また、セメント質新生を誘導すると考えられているエナメル基質蛋白を歯周組織欠損部に投与することにより歯周組織再生を促進しようとする治療法もすでに臨床応用されており、これらの治療法はともに一定の成果を挙げている。

近年、歯周組織欠損部への歯根膜細胞の遊走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ある種のサイトカインを局所投与す

1	PDGF	(platelet-derived growth factor)	IGF-1	(insulinlike growth factor-1)
2	BMP-2	(bone morphogenetic protein-2)		
3	TGF-β	(transforming growth factor-β)		
4	OP-1 (BMP-7)	(osteogenic protein-1)		
5	VEGF	(vascular endothelial growth factor)		
6	BDNF	(brain-derived neurotrophic factor)		
7	PDGF	(platelet-derived growth factor)	β-TCP	(β-tricalcium phosphate)
8	FGF-2 (bFGF)	(basic fibroblast growth factor)		

表1 サイトカインによる歯周組織再生誘導

ビーグル犬 (n=6)	対照側 (n=6)	FGF-2側 (n=6)
新生骨形成率 (%)	35.4 ± 8.9	48.6 ± 14.3
新生骨形成率 (%)	16.6 ± 6.2	44.1 ± 9.5
新生セメント質形成率 (%)	37.2 ± 15.1	97.0 ± 7.5

FGF-2投与時の欠損量を100%とし、6週後に新生骨質を骨質と新生セメント質をそれぞれ百分率で表している。対照側には基剤(架橋ゼラチン)のみを投与した。\* p < 0.01 (表2より引用)

表2 ビーグル犬に作製した実験的2級根分岐部病変に対するFGF-2の歯周組織再生誘導効果

ることにより活性化し、歯周組織再生を促進しようとする新たな治療法の確立が試みられている。表1に示すすべてのサイトカインは、少なくとも動物実験において歯周組織再生誘導効果が確認されているものである。このうち、PDGF-BBとβ-TCPの合剤<sup>1)</sup>は歯周組織再生誘導用deviceとして2006年米国にてFDAの承認がとられている。

一方、我々の研究室では、強力な血管新生作用と間葉系細胞の増殖誘導能を有する塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF; FGF-2)に着目し、FGF-2を歯周外科時に歯槽骨欠損部に局所投与することにより、歯周病により失われた歯周組織の再生を人為的に誘導・促進する、新しい歯周組織再生療法の開発

に取り組んでいる。

**塩基性線維芽細胞増殖因子による歯周組織再生誘導**

我々は、FGF-2の局所投与が歯周組織再生を促進するかどうかをビーグル犬モデルを用いて検証した<sup>2)</sup>。まず、下顎臼歯部複根歯に歯槽骨欠損(2級根分岐部病変)を作製した。シリコン印象材を同欠損部に充填した状態で、一度歯肉弁を復位・縫合し、同上歯槽骨欠損部に炎症反応を惹起した。4週後に再手術し、印象材を除去後、通常の歯周外科手術に準じて骨欠損部および露出歯根面の十分な搔爬を行い、歯槽骨欠損底部を印記しておく目的で歯科用ドリルを用いて根面にノッチを付与した。その後、架橋ゼラチンを基剤としたFGF-2を実験側の歯周組織欠損部に填入し、対照側には、同基剤のみを填入した。そして、FGF-2投与後6週経過した後に、FGF-2投与部位に歯周組織の再生が誘導されているかどうかを組織学的計測により検討した。その結果、FGF-2投与側では、肉眼的にも明らかな骨の新生が認められた(図2)。そして、組織学的にも新生歯槽骨、新生歯根膜、新生セメント質が観察され、統計学的にも有意な歯周組織再生が誘導・促進されているのが確認された(表2、図3)。これ以外のモデルとして、ビーグル犬の歯槽骨に作製した2・3壁性骨欠損や、カニクイザルにおける根分岐部病変にFGF-2を局所投与した場合<sup>3)</sup>においても、歯肉上皮の下方増殖・骨性癒着・歯根吸収などの