

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態学・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¹⁾、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）。

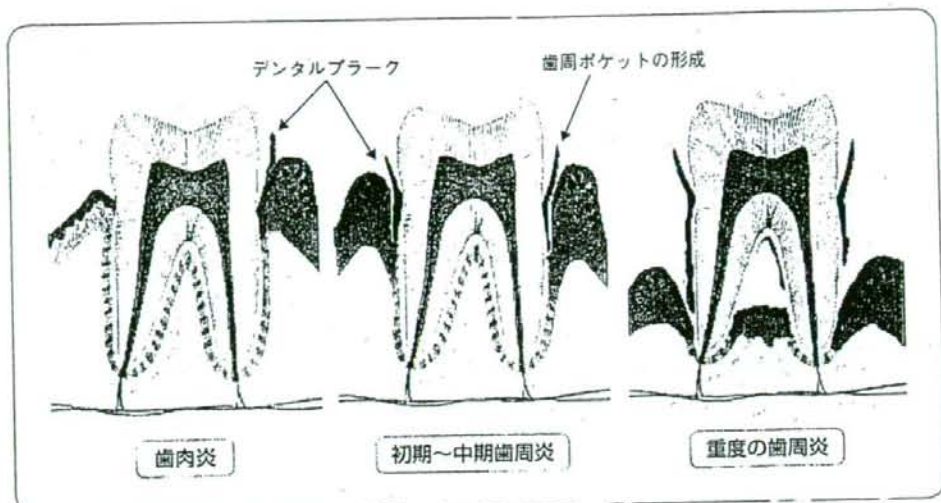


図1 歯周組織と歯周病
 歯は歯周組織(歯肉・歯根膜・セメント質・歯槽骨)により顎骨に支持されている。そして歯周病は、デンタルプラーク中の細菌の影響により歯周組織が慢性炎症的に破壊されてゆく疾患である。

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

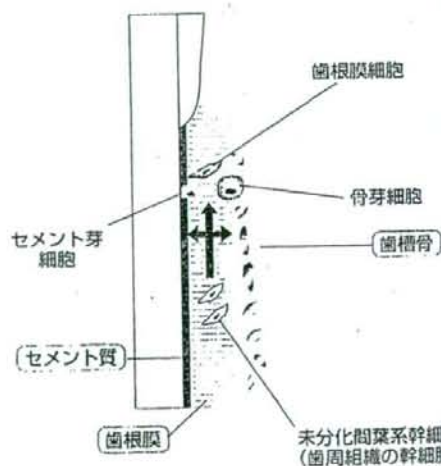


図2 「歯周組織幹細胞」としての未分化間葉系幹細胞存在する歯根膜組織の概念図
 歯根膜中にはセメント芽細胞、骨芽細胞、歯根膜細胞など分化する能力を保持しているいわゆる「歯周組織幹細胞」がいても存在している。

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

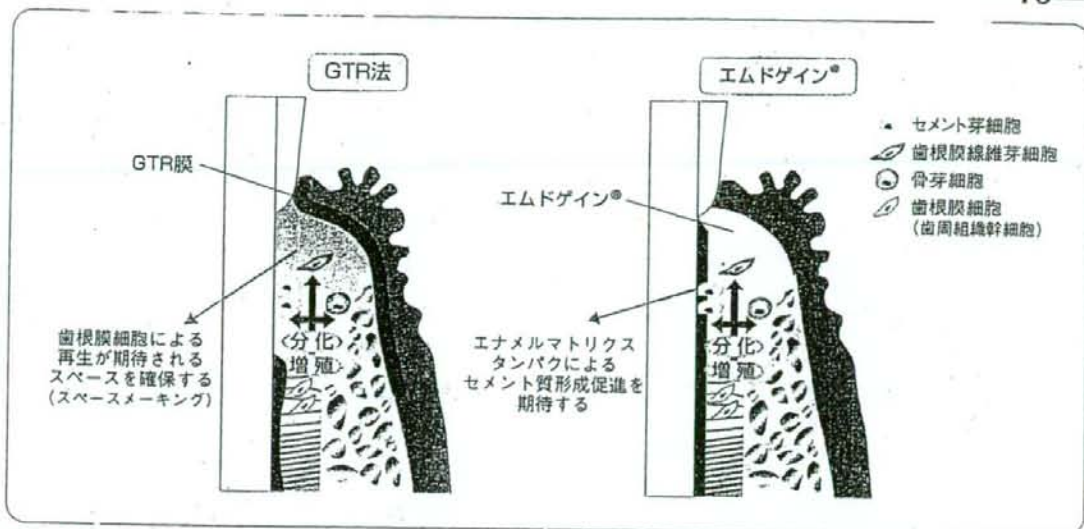


図3 現行の歯周組織再生療法

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。これらはともに、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²⁾。

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

①PDGF-BB (platelet-derived growth factor)	+	IGF-I (insulin-like growth factor-I)
②BMP-2 (bone morphogenetic protein-2)		
③TGF- β (transforming growth factor- β)		
④OP-1 (BMP-7) (osteogenic protein-1)		
⑤BDNF (brain-derived neurotrophic factor)		
⑥VEGF (vascular endothelial growth factor)		
⑦PDGF-BB (platelet-derived growth factor)	+	β -TCP (GEM21S*) (b-tricalcium phosphate)
⑧FGF-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^{3,4}. ビーグル犬およびパニクイザルの下顎臼歯部複歯に歯周病モデル(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新生が認められた(図4)^{3,4}. そして, 組織学にも新生歯槽骨, 新生歯根膜, 新生セメント質観察され, 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に

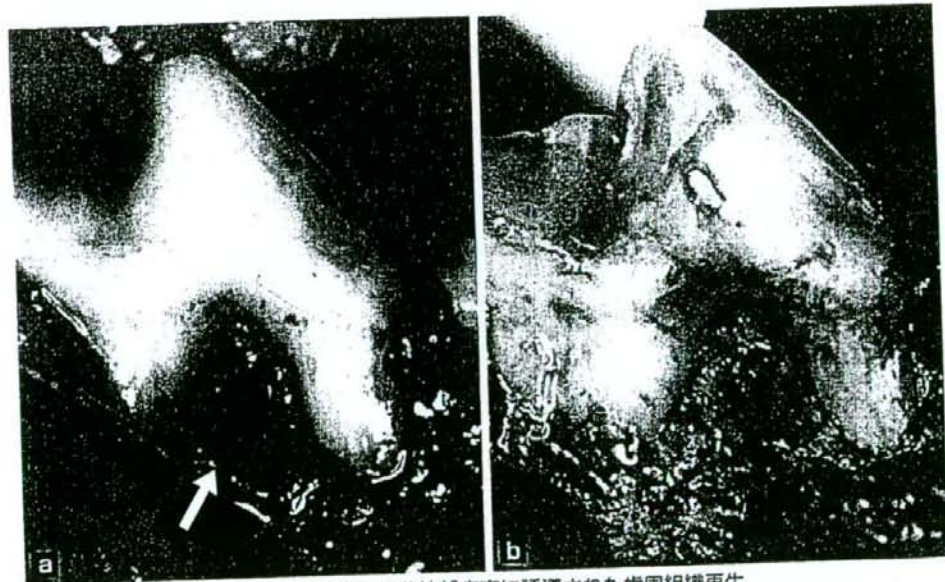


図4 FGF-2投与によりビーグル犬の根分岐部病変に誘導された歯周組織再生
0.1%FGF-2投与前a, 投与6週後bの2級根分岐部病変における歯槽骨の新生(骨充填)の様子を示す.
(村上伸也, 高山真一: bFGFの現状と将来展望. 歯界展望, 医歯薬出版, 536, 2002.)
(文献3)より)

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療形態を生じない、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⁵⁾。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

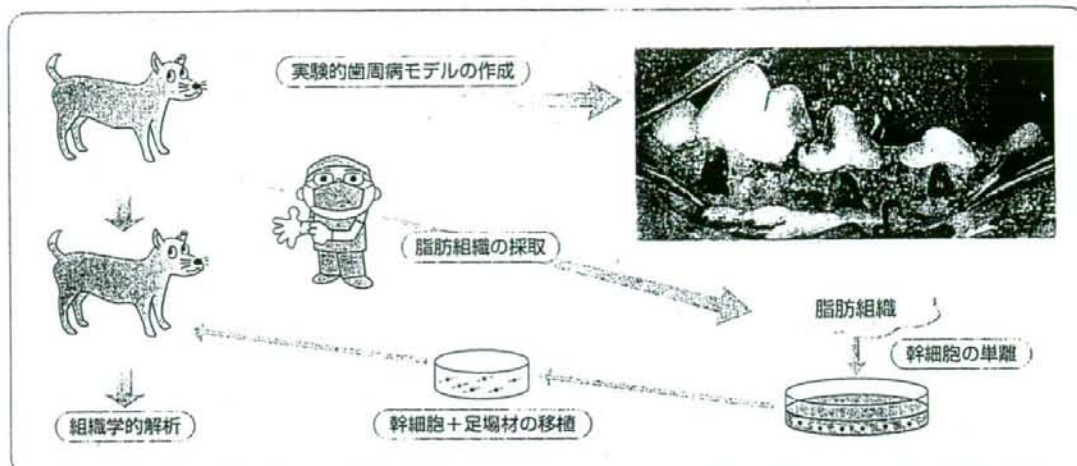


図5 ビーグル犬を用いたADSC移入による歯周組織再生誘導実験

ビーグル犬の下顎臼歯側分岐部に人工的2級分岐部病変を作成し、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。

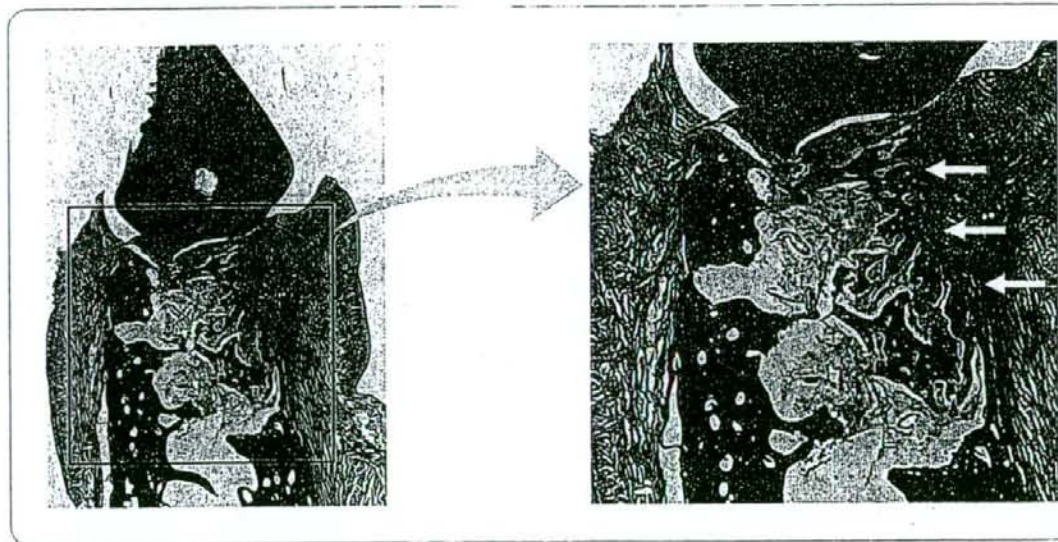


図6 ビーグル犬へのADSC移入による歯周組織再生

作成した左右両側の人工的骨欠損のうち一側を抜髄部位として、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ゲルのみを移植した。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。

組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、移植部に著明な新生骨が確認されている。このように、体内に豊富に存在し採取も簡便かつ安全に行え脂肪組織は、歯周組織再生療法において、有用幹細胞源となり得ることが強く示唆されている

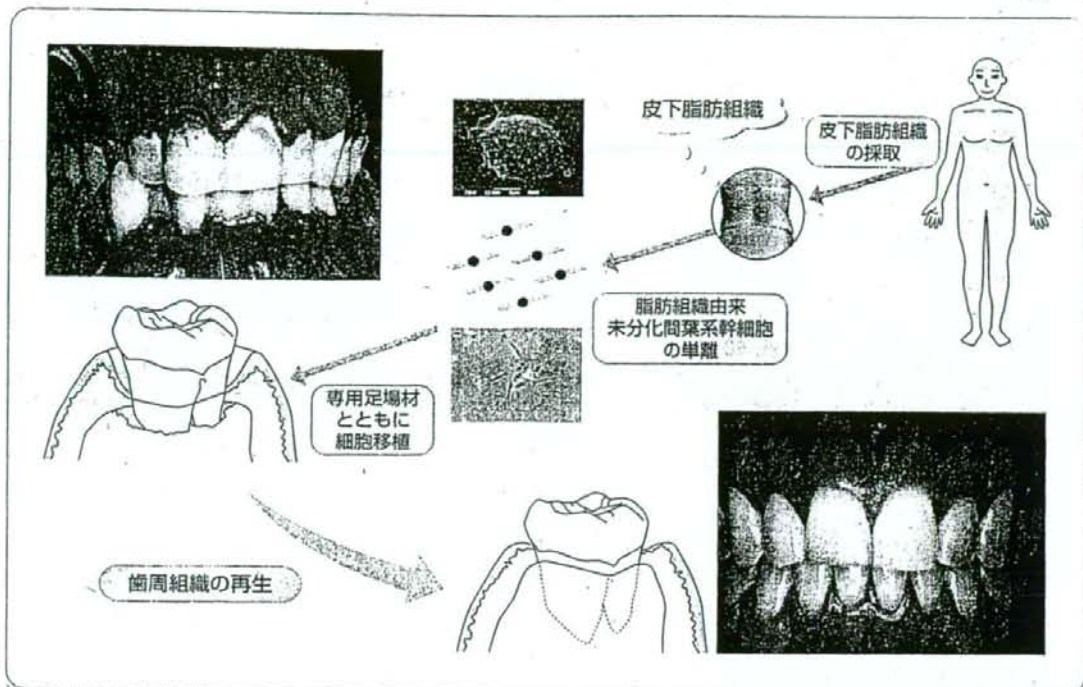


図7 ADSC移入による次世代型歯周組織再生療法の開発

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 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 Periodontol*, 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 JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim S, Hedrick MH : Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13 : 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

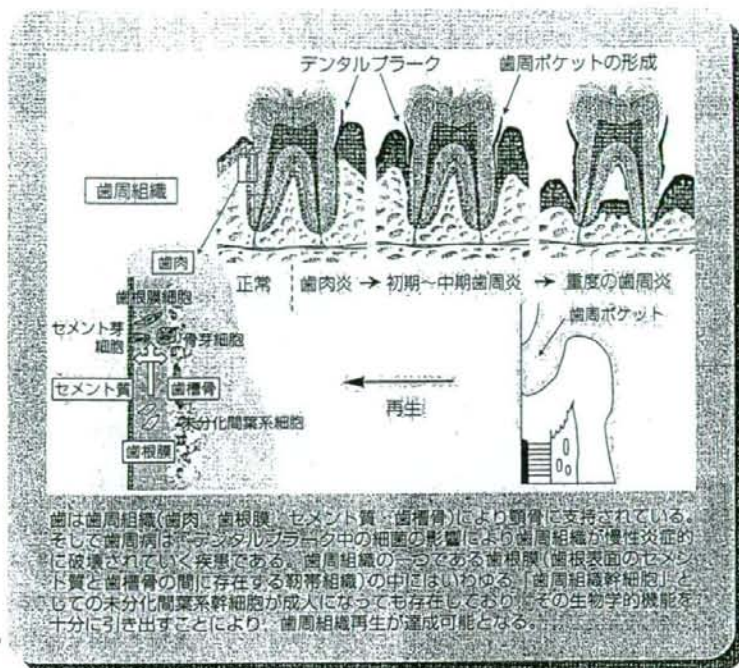
In order to enhance periodontal tissue regeneration, we have been investigating the biological activities of basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2). Intraosseous bony defects were surgically created in beagle dogs and non-human primates and recombinant FGF-2 was topically applied to those defects. 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: jpsshinya@dent.osaka-u.ac.jp



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いく疾患である。歯周組織の一つである歯根膜(歯根表面のセメント質と歯槽骨の間に存在する靭帯組織)の中にはいわゆる「歯周組織幹細胞」としての未分化間葉系幹細胞が成人になっても存在しており、その生物学的機能を十分に引き出すことにより、歯周組織再生が達成可能となる。

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)
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 + β-TCP (platelet-derived growth factor + 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=5) 対照側 (n=5)	FGF-2投与側 (n=5)
新生骨形成率 (%)	35.4 ± 8.9	83.6 ± 14.8
新生骨梁形成率 (%)	6.6 ± 6.2	44.5 ± 9.5
新生セメント質形成率 (%)	37.2 ± 15.7	67.6 ± 10.7

FGF-2投与時の欠損量を100%とし、6週後の新生骨形成率、新生骨梁形成率、新生セメント質形成率をそれぞれ百分率で表わしている。対照側は同基剤のみを投与した。

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²⁾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³⁾。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

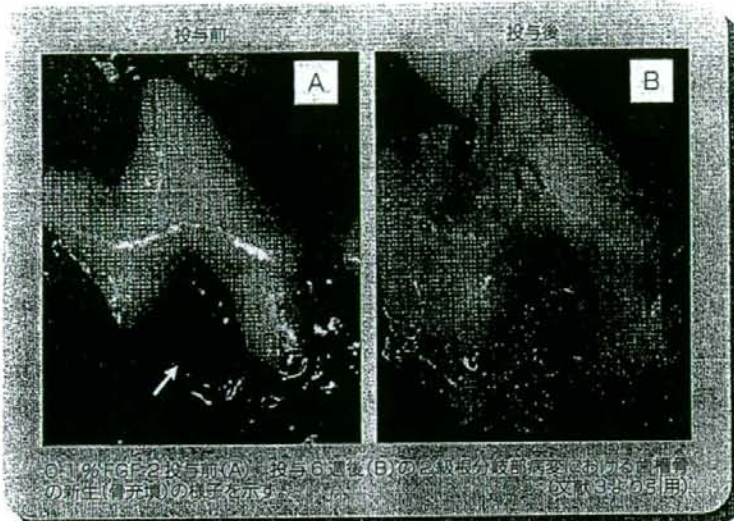


図2 FGF-2投与によりビーグル犬の根分岐部病変に誘導された歯槽骨再生
(→巻頭 Color Gravure 参照)

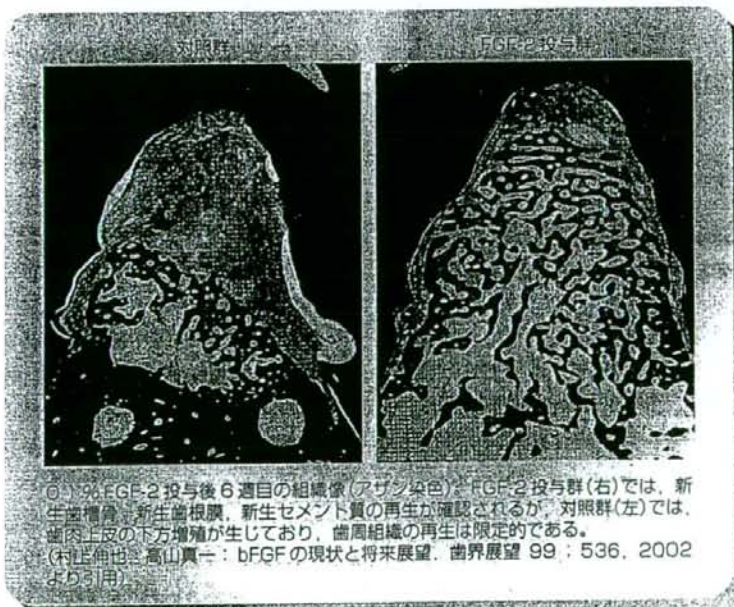


図3 FGF-2投与によりビーグル犬の根分岐部病変に誘導された歯周組織再生
(→巻頭 Color Gravure 参照)

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いることを確認している。また、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相臨床試験(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 含有ハイドロキシプロピルセルロース (HPC) 製剤の局所投与がレントゲン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、同試験期間中には安全性上大きな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 による歯周組織再生誘導のメカニズム

FGF-2 による歯周組織再生誘導の機序を知る一助として、培養ヒト歯根膜由来細胞 (HPDL) に対する FGF-2 の作用を、我々は詳細に検討している。その結果、FGF-2 は HPDL の増殖を濃度依存的に促進し、さらに血清中の何らかの因子と協調することにより HPDL の増殖を相乗的に促進することを確認した¹⁾。また、未成熟な HPDL のほうが FGF-2 に対するレセプターを数多く発現し、FGF-2 に対して高い反応性を示すことも明らかにしている²⁾。

次に、ヒト歯根膜細胞からの細胞外基質産生に及ぼす FGF-2 の作用について検討を加えた。その結果、FGF-2 は他のサイトカイン刺激に比し、特徴的

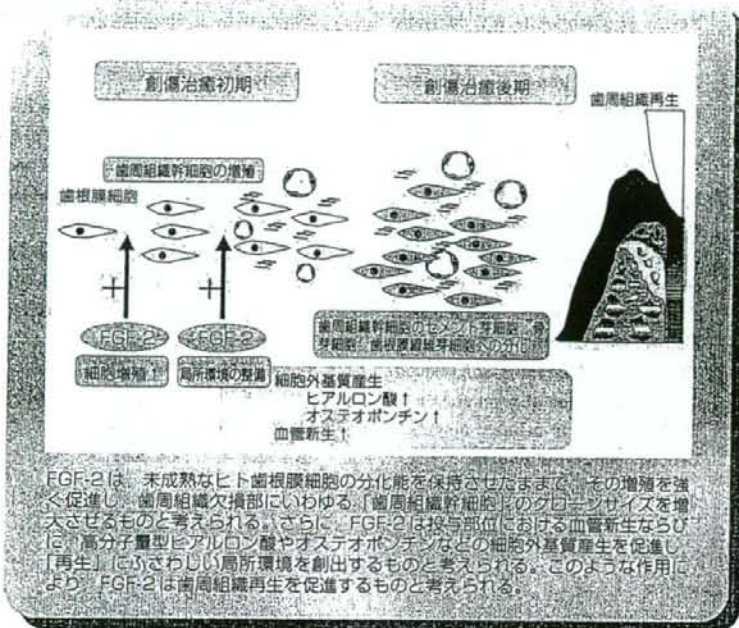


図4 歯周組織再生を誘導する FGF-2 の作用機序(仮説)

に高分子量型ヒアルロン酸の合成を促進することが明らかとなった⁷⁾。高分子量型ヒアルロン酸は、創傷治癒初期過程に重要な役割を演じている細胞外基質の一つと考えられている。また最近、FGF-2は細胞遊走活性を有するオステオポンチンの産生も HPDL より誘導することが確認されている(投稿準備中)。さらに FGF-2は投与部位において血管新生促進作用を発揮することもよく知られており、これらの作用を通じて、歯周組織再生にふさわしい環境が FGF-2の投与部位に創出されるものと考えられる(図4)。

すなわち、創傷治癒の初期段階にお

いて FGF-2は、①歯根膜細胞を未分化な状態に保ちつつ増殖を促進することにより治癒の場での歯根膜細胞の細胞密度を増加させる、そして、②血管新生促進・細胞外基質産生の制御を通じて歯周組織再生にふさわしい局所環境を整備する、ものと考えられる。そしてその結果として、歯槽骨、セメント質の新生を含む歯周組織再生が、FGF-2投与部位において量的、時間的に促進されることになるのであろう⁸⁾(図4)。

DDS 技術に期待するもの

組織・臓器の再生誘導を効率的に行うには、組織工学(tissue engineering) というシグナル分子(signaling molecule)の作用を至適条件で作用させることが必須であり、そのために Drug Delivery System (DDS) のコンセプトを導入することの意義が指摘されている。実際、今回紹介した動物実験においても、FGF-2の徐放が期待される架橋ゼラチンを用いている。しかしながら、どの濃度で、どの程度の期間 FGF-2を作用させることが、歯周組織再生誘導に関して最大の効果を生むのかに関しては、いまだ十分な検討はなされておらず、今後の検討課題の一つとして残されている。一方、FGF-2存在下においては歯根膜細胞の骨芽細胞・セメント芽細胞への分化が可逆的に抑制されることが知られている⁹⁾。したがって、しかるべき時期に FGF-2の活性が投与部位から消失することもまた、効果的な歯周組織再生誘導を考える上で重要な点となるであろう。一方、著明な骨誘導能を有する bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)の局所投与により歯周組織再生が促進されるが、その際、歯根と歯槽骨が部分的に骨性癒着(ankylosis)する可能性があることが指摘されている。これを回避するためには、創傷治癒の早期に BMP-2が放出されないようにする、もしくは、FGF-2のような増殖因子が早期に作用した後、BMP-2のような

分化因子が作用するよう工夫された DDS が有効かもしれない。このような DDS 機能を有したサイトカイン基剤が開発されれば、個々のサイトカインの作用がさらに高められ、単に歯周組織再生療法としてのサイトカインの適応が拡大されるのみならず、その適応は広く顎顔面領域の再建手術にも応用し得るようになるものと期待される。

●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) Takayama S, Murakami S, Miki Y, et al: Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 32 : 667-675, 1997
- 6) Takayama S, Murakami S, Nozaki T, et al: Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 33 : 315-322, 1998
- 7) Shimabukuro Y, Ichikawa T, Takayama S, et al: Fibroblast growth factor-2 regulates the synthesis of hyaluronan by human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 203 : 557-563, 2005
- 8) 村上伸也: 塩基性線維芽細胞増殖因子による歯周組織再生の試み. *大阪大学歯学雑誌* 47 : 75-84, 2003

4

歯小囊細胞の発生機構

歯小囊細胞は歯胚外周に形成される間葉系組織で、歯周組織の発生源となる。生後の歯根形成期における歯周組織発生過程で、歯小囊細胞中に存在する頭頸部神経堤細胞由来の前駆体細胞集団が、歯根膜細胞、セメント芽細胞および歯槽骨細胞へ分化して歯周組織を構成する。このように歯小囊細胞中には歯周組織形成能力を有する前駆体細胞集団が存在することから、古くから歯周組織発生・再生機構の解析に用いられてきた。最近では培養歯小囊細胞から前駆体細胞を分離することも可能になり、これらの細胞を用いて歯根膜細胞およびセメント芽細胞への分化誘導も可能になりつつある。

そこで本項では、歯小囊細胞の発生機構を中心に、同細胞の特性および歯周組織発生・再生機構について論じてみたい。

1. 歯周組織の発生

歯の詳細な発生過程に関しては、第1章を参照していただき、本項では胎生期の歯胚発生期から生後の歯根形成期における歯小囊発生過程を述べる。

歯小囊は、胎生期の歯胚発生において帽状期歯胚の外周に形成される(図1)。この時期の歯胚は歯原性間葉細胞と歯原性上皮細胞からなり、歯原性間葉細胞においては歯小囊細胞と歯乳頭細胞へと、2つの異なる細胞系列へ運命決定する時期でもある。帽状期から鐘状期へと胎生期歯胚発生過程が進行する過程で、歯乳頭細胞は象牙芽細胞へ分化し、歯冠象牙質形成が開始され、歯胚の形態はダイナミックに変化する(詳しくは第1章を参照されたい)。一



図1 歯小囊の発生

歯小囊細胞は頭部神経冠由来外葉性間葉系細胞に由来し、歯原性間葉系細胞の過程を経て、胎生15日における帽状期歯胚の周囲に形成される。図には胎生期の歯胚発生過程を示すが、この過程において歯小囊細胞に顕著な変化は見られない。

方、歯小囊細胞はこの時期では顕著な変化は見られない。しかし歯冠象牙質が完成し歯根象牙質形成が開始する時期に、歯小囊細胞の分化が始まる(図2)。その過程は、最初にヘルトヴィッヒ上皮鞘周辺の歯乳頭細胞が象牙芽細胞へ分化し、歯根象牙質を形成する。歯根象牙質が完成すると、ヘルトヴィッヒ上皮鞘は断裂しマラッセ上皮遺残を形成する。次に、その隙間を沿うように歯小囊細胞は歯根象牙質上へ遊走される。歯根象牙質上へ遊走された歯小囊細胞はセメント芽細胞へと分化し、歯根象牙質上にセメント質を形成し、そしてシャーピー線維が埋入される。セメント質形成が開始されると同時に、歯小囊細胞は歯根膜細胞へ分化し、腱/靭帯様構造を主体とする結合組織を形成する。

歯根膜細胞への分化が始まると、細胞は規則正しく整列するようになり、歯根に対して垂直方向に走行する弾性線維の形成が始まる。また歯小囊細胞は歯槽骨細胞へも分化し、固有歯槽骨側へもコラーゲン線維を埋入させる。そして最終的にセメント質、歯根膜、歯槽骨中で形成された線維が結合し、強靭な歯周組織が形成される。

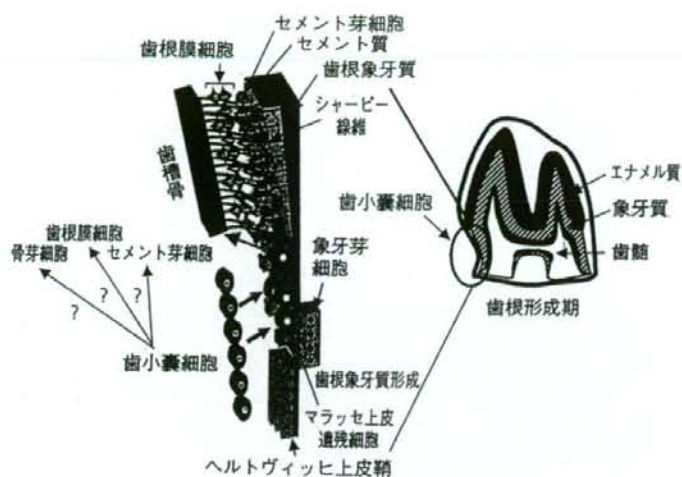


図2 歯周組織の発生機構

歯小囊細胞は歯根象牙質へ遊走した後に歯槽骨細胞、歯根膜細胞、セメント芽細胞へ分化し歯周組織を形成する。このように歯小囊細胞は歯小囊前駆体細胞とも呼ばれているが、歯周組織構成細胞への分化制御機構は不明である。

2. 歯小囊発生に関わる機能分子群

上述のごとく歯根形成過程で歯小囊から3系列の前駆体細胞へ運命決定し、機能細胞へと分化する。歯小囊細胞からセメント芽細胞への分化機構は第4章を参照していただき、本項では歯根膜細胞への分化機構に焦点を絞って述べる。

歯根膜は歯根と歯槽骨の硬組織を介する靭帯様結合組織であり、関節などで見られる腱/靭帯と解剖学的に構造が類似している。そのため腱/靭帯形成に関わる分子群が歯小囊発生に関わることも示唆されている。たとえば腱/

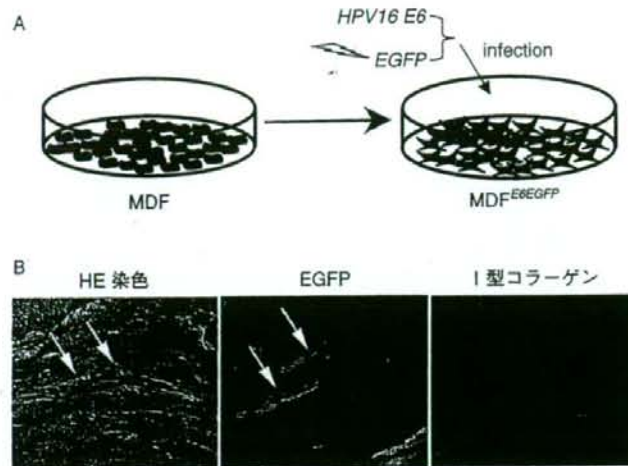


図3 マウス歯小囊細胞：MDF^{EGEGFP}の採取方法

A) マウス歯小囊細胞を分離培養し、HPV16 E6を遺伝子導入して寿命延長を行い、その後EGFPを遺伝子導入を行い蛍光観察を可能にした。

B) MDF^{EGEGFP}の特性：MDF^{EGEGFP}は移植することにより歯根膜線維様構造物を形成する。

HPV：ヒトパピローマウイルス

3. 歯小囊前駆体細胞について

前述のごとく、歯小囊細胞には歯周組織構成細胞の前駆体細胞すなわセメント芽細胞前駆体、歯根膜細胞前駆体そして歯槽骨細胞前駆体が存在し、これらが最終分化して歯周組織を形成すると考えられている。ではどのような機構で歯小囊から各前駆体細胞へ同調するのだろうか？ おそらく歯小囊中に存在する歯原性間葉系細胞と類似した未分化な細胞集団から前駆体細胞が供給される仮説が有力と思われる。しかし、これまでの歯小囊細胞に関する

靭帯で高発現する細胞外マトリックス（基質）であるⅫ型コラーゲンは、歯根形成期において歯小囊細胞から歯根膜細胞への分化過程で発現が増強する⁹⁾。Ⅻ型コラーゲンは fibril associated collagen with interrupted triple helices (FACIT) に属するコラーゲンで、腱・靭帯および骨膜などの密な結合組織形成に関与する⁹⁾。他にも腱/靭帯前駆体細胞のマーカーである、Bmpファミリーに属する growth and differentiation factor 5 (GDF-5) と、bHLH 型転写因子である scleraxis が歯小囊細胞と歯根膜細胞で発現することも報告されている¹⁰⁾。これらの発現パターン解析から推測すると、腱/靭帯形成と共通のシステムで歯小囊細胞から歯根膜細胞への分化が制御されている可能性が考えられる。

現在までに歯根膜特異的のマーカー分子は同定されていないが、非コラーゲン性細胞外基質である periostin が歯根膜形成に関わることが報告されている⁹⁾。Periostin は、歯胚発生過程において帽状期歯胚の歯小囊細胞で発現が始まり、歯根形成過程になると歯根膜細胞に局限して高発現する⁹⁾。Periostin 遺伝子欠損マウスの歯周組織を解析すると、生後9週以降で歯根膜細胞の崩壊が観察され、早期発症型歯周病と類似した症状を示すことが明らかにされた⁹⁾。この結果から periostin が不足すると歯根膜の恒常的機能に支障をきたし、歯根膜が咀嚼圧に耐えられなくなるため、早期に歯周病が発症することが示唆された。しかし periostin 遺伝子欠損マウスでは歯根膜形成に異常は観察されないことから、他の歯根膜特異的分子が歯根膜形成を補償している可能性が考えられた。

このように歯小囊細胞から歯根膜細胞への発生過程では、腱/靭帯形成に関わる分子群と、歯小囊に特異的に発現する細胞外基質因子が中心的な役割を果たしている可能性が考えられる。今後はこれらの分子群の機能解析が、歯周組織発生機構解明の重要課題になるであろう。

る解析は組織学的手法による解析によるもので、実際に前駆体細胞が存在するか否かは証明されていなかった。

そこで筆者らは歯小囊細胞の分離培養を試み、同細胞の分化能力を検証した。歯小囊細胞 (mouse dental follicle cells: MDP^{EGFP}) はマウス歯胚より分離培養し、また安定した培養システムを確立するためヒトパピローマウイルス E6 を遺伝子導入して不死化した (図 3 A)。MDP^{EGFP} の特性を調べたところ、骨芽細胞および線維芽細胞と比較して scleraxis, GDF-5 を高発現していることが確認された。次に、MDP^{EGFP} の歯根膜細胞への分化能力を解析するために、免疫不全マウスへ移植実験を行うと、歯根膜組織で見られるような規則正しい I 型コラーゲン線維束の形成と periostin, XII 型コラーゲンを高発現する歯根膜様構造物を形成することが観察された (図 3 B)。これらの結果より、MDP^{EGFP} 内には歯根膜形成能力を有する歯根膜前駆体細胞が存在することが明らかとなった⁹⁾。このような特徴は、マウスアキレス腱より採取した腱細胞株と類似していたため、MDP^{EGFP} に存在する歯根膜前駆体細胞は腱/靭帯細胞と類似した特性を有している可能性が考えられた¹⁰⁾。

Seo らは成人歯根膜細胞よりセメント芽細胞、歯根膜細胞および脂肪細胞への分化能力を有する歯根膜幹細胞の同定に成功している¹¹⁾。前述の結果と合わせて考えると、歯根膜前駆体細胞は成人歯根膜細胞でも維持されている可能性が高い。また、このような細胞が歯根膜の発生・再生あるいは恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。現在のところ免疫不全マウスを用いた移植実験で人為的に歯根膜前駆体細胞から歯根膜細胞へ分化誘導できることが確認されているが、どのような因子が分化を誘導するかは不明である。また、歯根膜前駆体細胞を見分けるためのマーカー分子も同定されていないため、同細胞を完全に単離する方法も確立できていない。

したがって、今後はマーカー分子を用いた歯根膜前駆体細胞分離技術と、同細胞の *in vitro* 分化誘導システムの開発が歯根膜発生・再生機構解明の鍵になるであろう。今後のマーカー分子と分化誘導シグナル分子の同定が待た