

200906009A

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

**歯科再生医療拠点を活用した  
次世代型歯周組織再生療法の開発**

平成21年度 総括研究報告書

**主任研究者 村上 伸也**

平成22(2010)年 5月

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

# 歯科再生医療拠点を活用した 次世代型歯周組織再生療法の開発

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 村上 伸也

平成22(2010)年 5月

# 目次

I. 総括研究報告 .....	1
脂肪組織由来幹細胞の移植による歯周組織再生に関する研究 .....	2
村上 伸也	
II. 分担研究報告 .....	10
1. 歯科再生医療拠点を活用した次世代型歯周組織再生療法の安全性 評価のための生物統計学的デザインに関する研究 .....	11
大門 貴志	
2. ヒト脂肪組織由来幹細胞の硬組織形成能力の解析に関する研究 .....	18
齋藤 正寛	
3. 歯周組織再生療法の評価法に関する研究、ヒト脂肪組織由来幹細胞を 歯周組織細胞へ分化誘導する因子の探索 .....	21
松下 健二	
4. ヒト脂肪組織由来細胞の分化能と安全性に関する解析 .....	25
阿久津 英憲	
III. 研究成果に関する一覧 .....	28
IV. 研究成果の刊行物・別冊 .....	35

## I. 総括研究報告

脂肪組織由来幹細胞の移植による歯周組織再生に関する研究

村上 伸也

脂肪組織由来幹細胞の移植による歯周組織再生に関する研究

研究代表者 村上 伸也

大阪大学大学院歯学研究科

口腔分子免疫制御学講座・教授

**研究要旨** 重度歯周炎患者を対象にした次世代の歯周組織再生療法を樹立する目的で、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞(ADSC)と至適足場材の移入による新規歯周組織再生療法の確立を目指す。本研究では脂肪組織中に含まれる間葉系幹細胞 ADSC を新規歯周組織再生療法確立のための新たな細胞源として着目し、*in vitro*においてヒト ADSC の特性の検討を行うと共に、ビーグル犬の歯周組織欠損モデルを用いた ADSC 移植による歯周組織再生効果の検討を行った。その結果、ヒト ADSC は歯根膜細胞および硬組織形成細胞への分化能を有すること、継代 1 4 代目まで染色体の異常を示すことなく増殖可能であること、ビーグル犬歯周病モデルにおいてフィブリングルと共に ADSC を移植することにより歯周組織再生を誘導し得ることが明らかとなった。

**研究分担者**

澤 芳樹

大阪大学医学部附属病院未来医療センター  
教授

李 千萬

大阪大学大学院医学研究科  
医療経済産業政策学講座  
特任准教授

橋川 智子

大阪大学大学院歯学研究科  
口腔分子免疫制御学講座  
助教

山田 聡

大阪大学歯学部附属病院  
講師

北村 正博

大阪大学大学院歯学研究科  
口腔分子免疫制御学講座・准教授

**A. 研究目的**

本研究では、「口と歯の機能」を脅かす重度歯周病に対応できる、次世代型歯周組織再生療法の開発を目指す。平成 20 年度再生医療推進基盤整備事業の支援により本学歯学部附属病院内に設置された Cell Processing Center(CPC)を活用し、脂肪組織由来間葉系体性幹細胞 (ADSC) と足場材料を組み合わせた新規歯周組織再生療法を樹立する。

我々は既に、ヒト皮下脂肪組織より単離した ADSC が骨芽細胞、セメント芽細胞 lineage への分化能を有することを確認している。さらに、ビーグル犬を用いた、根分岐部病変・2 壁性骨欠損の歯周病モデルにおいて、ADSC 移植の有用性を示唆する結果を得ている。(特願 2006-259717PCT)。しかし重度の歯周組織破壊に対しては、歯周組織再生治療用にカスタマイズされた効果的な再生誘導用足場材料を歯周組織の幹細胞と組み合

わせることが必須である。

本研究期間においては、ADSC の有用性と安全性の確認を行い、ビーグル犬重度歯周病モデルを用いて、適切な足場材候補の選定を行うと共に、同足場材と ADSC の移入による歯周組織再生誘導実験を行い、本治療の安全性・有効性を検討・確認することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. ヒト ADSC における細胞表面抗原の発現解析

フローサイトメトリーを用いて、ADSC の各種表面抗原の解析を行った。

### 2. ヒト ADSC におけるアルカリフォスファターゼ活性の測定および石灰化ノジュール形成の解析

ADSC を 24well plate に播種 ( $6.0 \times 10^4$ /well) 後、硬組織誘導培地 (デキサメタゾン含有あるいは非含有の、10mM  $\beta$ -グリセロリン酸、50 $\mu$ g/ml アスコルビン酸、10%FCS 添加 D-MEM) にて長期培養を行った際の ALPase 活性を経時的に測定し、また、石灰化ノジュールの形成をアリザリン染色を用いて解析した。

### 3. ヒト ADSC における硬組織誘導関連遺伝子の解析

ADSC を 6well plate に播種 ( $3.0 \times 10^5$ /well) 後、硬組織誘導培地にて長期培養を行った際の経時変化を realtime-PCR 法および RT-PCR 法にて解析した。

4. ヒト ADSC における細胞増殖能の解析  
増殖能は、増殖曲線により解析し、さらに増殖能が消失するまで継代を続けた後、

G-band 法および SKY 法にて染色体検査を行った。

### 5. ヒト ADSC の長期培養による染色体異常の有無の解析

継代 4 代目および増殖能がほぼ消失した継代 1 4 代目の ADSC の染色体検査を、G-Band 法および SKY 法を用いて行った。

### 6. ビーグル犬脂肪組織からの ADSC 単離

ビーグル犬の腹部大網より脂肪組織を採取、細断し、1時間のコラゲナーゼ処理を行った。得られた細胞より ficoll を用いた比重遠心により赤血球を除去し播種、培養プレートに付着した細胞を 3 代継代後、得られた細胞を ADSC とした。

### 7. フィブリンゲル作成

ADSC 移植のための足場としてのフィブリンゲルは、ヒト血漿由来フィブリノゲンに ADSC を添加し、ヒト血漿由来トロンビンと混合した後、37 $^{\circ}$ C にて 30 分間培養することにより作製した。

### 8. ビーグル犬を用いた実験的歯周病モデルの作製および ADSC の移植

ビーグル犬 5 頭を用い、左右両側の下顎第四前臼歯を抜歯し、約 3 ヶ月間の治癒期間を経た後に第一後臼歯の近心部の歯槽骨を削除し同上欠損を作製した。作製した骨欠損は、頬舌径 3 mm、近遠心径 5 mm、高さ 4 mm となるように規格化を行った。作成した左右両側の人工的垂直性骨欠損のうち一側を被験部位として、ADSC+フィブリンを移入した。一方、対照部位にはフィブリンのみを移植した。移植後 6 週目に屠殺し下顎骨を採取した。

### 9. マイクロ CT 断層撮影および解析

採取した下顎骨をマイクロ CT にて断層撮影を行い、新生骨体積の画像解析を行った。

#### 10. 組織標本作製および組織学的解析

採取した下顎骨を4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて浸漬固定を行い10%ギ酸クエン酸ナトリウムにて脱灰の後、凍結切片法により切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色を行い、新生骨面積、骨欠損作製最下端部と歯肉上皮下端間距離、新生セメント質を認めた根面の長さについて画像解析を行った。

#### (倫理面への配慮)

動物実験に関しては、厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行うとともに、大阪大学大学院歯学研究科の動物実験委員会の承認を得ている。

また、本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究を行っているため、機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行している。

### C. 研究結果

#### 1. ヒト ADSC における細胞表面抗原の発現解析

継代4代目のヒト ADSC における細胞表面抗原の発現についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った。その結果、間葉系幹細胞マーカーである CD44、CD73、CD105、CD166、SSEA4 の発現が認められた。また、造血幹細胞マーカーである CD133、

間葉系幹細胞マーカーの一つである STRO-1、血球系マーカーの CD34、CD45 の発現は認められなかった。

#### 2. ヒト ADSC における硬組織形成細胞への分化能の解析

ヒト ADSC の分化能を検討するために、ヒト ADSC を石灰化誘導培地にて長期培養を行い、培養後 0、7、14、21、28 日目に硬組織誘導関連遺伝子の発現、ALPase 活性、石灰化ノジュール形成について解析した。それぞれの時点において RNA を回収し、硬組織形成細胞への分化誘導における硬組織形成のマスター遺伝子である *RUNX-2* および歯根膜特異的マーカーである *PLAP-1* mRNA の発現を Real time PCR にて解析した。その結果、*RUNX-2* の発現は経時的に上昇することが明らかとなった。*PLAP-1* においても経時的な発現上昇が認められ、ADSC が歯根膜細胞および硬組織形成細胞への分化能を有することが示唆された。ALPase 活性は石灰化誘導開始直後から増加し、培養 14 日目をピークに高い ALPase 活性が認められ、その後徐々に減少した。石灰化ノジュール形成はアルカリフォスファターゼ活性がピークを迎えた培養 14 日以降に、アリザリンレッド染色陽性の石灰化ノジュール形成が認められるようになり、培養 28 日目には強いアリザリン陽性像が確認された。

#### 3. ヒト ADSC における増殖能および安全性の検討

ヒト ADSC の増殖能は、ヒト ADSC の継代培養を繰り返し、Population doubling 法により評価した。その結果、ヒト ADSC の継代を繰り返した際、継代 8 代目まで ADSC は高い増殖能を示した。さらに継代培養を

続けたとき継代 14 代目まで増殖可能であることが明らかとなった。

次にヒト ADSC の染色体異常の有無を確認するために、継代 4 代目および継代培養を続けたとき増殖しなくなる継代 14 代目のヒト ADSC の染色体数および構造異常を G-band 法にて検討した。その結果、継代 4 代目および継代 14 代目のそれぞれの細胞において染色体数の異常や染め分けられた染色体間での転座や欠失などの構造異常は認められなかった。さらに、G-band 法では同定不可能な微細な異常を検出するため SKY 法を用いて検討を行った結果、転座などの染色体異常が生じた時に認める色の混在などは認められず、継代 4 代目および継代 14 代目の染色体に異常は認められなかった。

#### 4. ビーグル犬重度歯周病モデルを用いた ADSC 移植による歯周組織再生誘導の効果

ビーグル犬 5 頭を用い、実験的 2 壁性骨欠損モデルを作製し、実験群として ADSC 含有フィブリングルを移植し、対照群にはフィブリングルのみを移植した。移植 6 週後のマイクロ CT 断層撮影による 3 次元構築像において、ADSC 移植側では作製した骨欠損範囲に骨様像の添加が認められた。3 次元解析により作製した骨欠損範囲における骨様不透過像を抽出し、新生骨体積の解析を行なった結果、5 頭による平均値の比較において ADSC 移植群の方が高い値を示し、ADSC 移植による歯槽骨新生傾向が認められた。

さらに組織学的に評価するために、移植 6 週後におけるヘマトキシリン・エオジン染色を行った。その結果、対照側では既存

骨と新生骨の境界が不明瞭で、歯槽骨の破壊はむしろなだらかに拡大しており、新生骨の添加はわずかにとどまったのに対し、ADSC 移植側においては、既存骨と新生骨の境界は明瞭であり、明らかな新生骨の増加が認められた。ADSC 移植側においては、新生骨の添加に加えて歯肉上皮の下方増殖の抑制が観察された。一方、対照側では明らかな歯肉上皮の下方増殖が観察された。また ADSC 移植側の根面において新生セメント質の添加が認められた。新生したセメント質の詳細を確認するためアザン染色を行った結果、歯槽骨、セメント質の新生に加えて新生骨と新生セメント質にはコラーゲン線維束の埋入を伴うことが明らかとなった。

さらに、画像解析により組織学的計測を行い ADSC 移植による歯周組織再生誘導効果について解析した結果、作製した骨欠損範囲における新生骨の面積は、ADSC 移植群の方が高い値を示し、新生骨体積と同様に ADSC 移植群において歯槽骨の新生傾向が確認された。新生セメント質を認めた根面の長さを組織学的に計測し比較した結果、対照群ではほとんどセメント質新生は認められず ADSC 移植群において有意に高い値が示され、ADSC 移植による有意なセメント質新生が明らかとなった。さらに、Notch から歯肉上皮下端の距離を計測することで歯肉上皮下方増殖の抑制を評価した結果、ADSC 移植群では歯肉上皮下方増殖の有意な抑制が示された。

#### D. 考察

歯周組織再生は、歯周病により失われた歯周組織の解剖学的構造と機能を、再生組



織によって破壊される前の状態に再構築することを最終目標としている。しかし、現在行われている歯周組織再生療法では、十分な歯周組織再生効果を期待できる適応症には制限がある。そのため、新たな試みとして、ヒト型サイトカインを局所投与する治療法に加えて歯根膜細胞シートや骨髄由来幹細胞を用いた細胞治療による歯周組織再生誘導の可能性が検討されている。本研究においては、幹細胞移植による歯周組織再生療法を実施するための新たな細胞源として ADSC を利用することの有用性を *in vitro* および *in vivo* の実験を通じて検討を行った。その結果、ADSC を石灰化誘導培地中にて硬組織形成細胞へと分化誘導したところ、硬組織形成細胞への分化に関するマスター遺伝子である *RUNX-2* mRNA の経時的な発現上昇に加えて、歯根膜特異的遺伝子である *PLAP-1* mRNA の発現上昇も明らかとなった。さらに培養 14 日目をピークに ALPase 活性の増加を認め、同培養 14 日目以降には著明な石灰化ノジュール形成が確認された。以上のことから、ADSC は骨芽細胞やセメント芽細胞等の硬組織形成能のみならず歯根膜細胞への分化能を有することが示唆され、ADSC が歯周組織再生療法用の幹細胞の一つとして活用し得るものと期待された。

ヒト体性幹細胞は寿命が限定されていることがいくつかの報告により示されている。幹細胞は細胞周期制御因子による細胞老化とテロメアの短縮によるクライシスにて細胞停止に至ると考えられており、培養後期においては染色体異常が生じることや、長期培養により形質転換するといった報告がある。一方、通法の培養期間で

の形質転換の可能性を否定する報告もある。今回の研究では、ADSC の長期培養により継代培養を重ねた際、継代 14 代目において細胞の増殖停止が明らかとなった。培養初期に当たる継代 4 代目と培養後期にあたる継代 14 代目の ADSC において、カリオタイプを比較した結果、継代を重ねても染色体には異常は認められず、ADSC の安全性が確認された。また今回行ったビーグル犬を用いた移植実験においても、全ての ADSC 移植部位で、組織の腫瘍化は認められなかった。体性幹細胞の安全性についての見解は未だ統一を見ないが、少なくとも *in vitro* において培養後期での染色体異常の報告が存在する限り、移植に使用する幹細胞の継代数や培養条件には細心の注意が必要である。将来のヒトへの応用を考えた場合、今後も継続して検討していく必要のある課題であると考えられる。

細胞移植に際しての足場材としては、 $\beta$ -TCP、乳酸グリコール酸共重合体 (Poly lactic-co-glycolic acid: PLGA)、フィブリンなど、いくつかの候補材料があげられる。本年度研究では、手術時の出血防止や縫合困難な部位に対する縫合用接着剤として用いられるなど、既に多くの臨床実績を有し、将来のヒトへの臨床応用に際しても使用しやすいと考えられることから、フィブリンを足場材として選定した。一般的に再生療法における足場には生体吸収性のものが望ましいとされているが、フィブリンは生体における創傷治癒の過程において治癒に必要な細胞の増殖や遊走のための足場となった後、線維素溶解系により分解、吸収されることがよく知られている。しかしながら、フィブリンが ADSC を用い

た細胞治療にとって最適の足場材か否かについてはまだ十分な検討がなされているとは言い難い。今後、 $\beta$ -TCP のような骨伝導性足場材を含め、いくつかの足場材を用いた比較検討が必要であると考えている。

ビーグル犬の実験的歯周組織欠損モデルを用いて、ADSC 移植による歯周組織再生誘導促進の可能性について検討した。本研究では、作製する骨欠損の規格化が容易に行うことができ、一度に安定して多くの骨欠損を作製することができることから、実験的2壁性骨欠損モデルを用いた検討を行った。その結果、移植6週後のマイクロCT断層撮影および組織学的解析結果から新生骨体積、および新生骨面積においてADSC移植による歯槽骨の新生傾向が確認された。さらに組織学的解析により、セメント質の有意な新生および新生セメント質へのコラーゲン線維束の埋入、歯肉上皮下方増殖の有意な抑制が明らかにされた。さらに全てのADSC移植部位において骨性癒着や歯根吸収等の異常治癒所見は観察されず、理想的な治癒形態での歯周組織再生が明らかとなった。ADSC移植部位に有意なセメント質新生と、歯肉上皮の下方増殖が抑制されていることから、さらに経過を追うことにより、歯周組織再生にかかわるすべてのパラメーターについて有意な変化が期待できるものと考えられる。

本研究は歯周組織再生研究分野での新たな「細胞治療」の可能性を提示したものである。しかしながら、将来の臨床応用を考えたときには、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に準拠したCPCにてADSCの単離培養、回収を行う必要がある。また

前述したとおり、一壁性骨欠損や水平性骨吸収など、より大きく複雑な歯槽骨欠損を有する重度の歯周組織欠損に対して十分な歯周組織再生効果を得るためには、ADSC至適再生誘導足場材の選定が必須である。さらに、PDGF-BB や FGF-2 といったシグナル分子を「ADSC-足場材複合体」と有機的に融合することが可能になれば、その時に理想的な Periodontal tissue engineering が創生されるものと期待される。

## E. 結論

1. ヒトADSCにはCD44、CD73、CD105、CD166、SSEA4の発現を認め、CD133、STRO-1、CD34、CD45の発現は認めなかった。
2. ヒトADSCを硬組織形成細胞へと分化誘導した際に*RUNX-2*および*PLAP-1* mRNA発現が経時的に増加した。
3. ヒトADSCを硬組織形成細胞へと分化誘導した際にALPase活性の上昇、著明な石灰化ノジュール形成を認めた。
4. ヒトADSCは継代8代目まで高い増殖能を示し、さらに継代を重ねると継代14代目まで培養可能であった。
5. ヒトADSCは継代14代目においても染色体に異常は認めなかった。
7. イヌ2壁性骨欠損においてADSC移植側に歯槽骨の新生、有意なセメント質新生を認め、同セメント質にはコラーゲン線維束の埋入を認めた。
8. イヌ2壁性骨欠損においてADSC移植側に歯肉上皮下方増殖の有意な抑制を認めた。

以上の結果より、今回の手法で単離されたADSCが歯周組織構成細胞への高い分化能を有し、同ADSCの移植により歯槽骨、

セメント質の新生、および歯肉上皮下方増殖の抑制を含む歯周組織再生が誘導され得ることが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 村上伸也. 細胞増殖因子 進歩する歯周組織再生治療の分類と臨床 (編集; 和泉雄一) 季刊・歯科医療、第一歯科出版、24-28、2009
2. RT. Kao, S. Murakami, OR. Beirne. The use of Biologic Mediators and Tissue Engineering in Dentistry  
Peridontology 2000, 50:127-153, 2009
3. M. Yanagita, R. Kobayashi, S. Murakami  
Nicotine can skew the characterization of the macrophage type-1 (MU1) phenotype differentiated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to the MU2 phenotype Biochem. Biophys. Res. Commun, 2009, 388:91-95.
4. Y. Shimabukuro, M. Ueda, M. Ozasa, J. Anzai, M. Takedachi, Manabu Yanagita, T. Hashikawa, S. Yamada, S. Murakami.  
Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells. J Endod, 35: 1529-1535, 2009
5. Komoda H, Okura H, Lee CM, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto A, Ichinose A, Murakami S, Sawa Y, Matsuyama A. Reduction of Neu5GC Xenoantigen on Human ADSC

/MSCs lead to Them as Safer and More Useful Cell Sources for Realizing Various Stem Cell Therapies. Tissue Eng Part A, 16: 1143-1155, 2009

6. Hoashi T, Matsumiya G, Miyagawa S, Ichikawa H, Ueno T, Ono M, Saito A, Shimizu T, Okano T, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y. Skeletal myoblast sheet transplantation improves the diastolic function of a pressure-overloaded right heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 138:460-467, 2009

### 2. 学会発表

1. 橋川智子、小笹匡雄、岩山智明、北村正博、島袋善夫、松山晃文、菰田弘、李 千萬、澤 芳樹、村上伸也：脂肪組織由来幹細胞移植による歯周組織再生誘導の解析。第9回日本再生医療学会総会。平成22年3月18日
2. 岩山智明、橋川智子、島袋善夫、小笹匡雄、村上伸也、柴田恭子、安孫子宣光：脂肪組織由来間葉系幹細胞の分化能および安全性に関する解析。第131回日本歯科保存学会秋季学会。平成21年10月29日、仙台
3. T. Hashikawa, M. Ozasa, T. Iwayama, J. Anzai, Y. Shimabukuro, S. Murakami: Periodontal Regeneration by Transplantation of Human Adipose Tissue Derived Stem Cells. 8th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting. Aug. 29,

2009. Singapore
4. 村上伸也：塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を用いた新規歯周組織再生療法の確立。第27回日本ヒト細胞学会学術集会。平成21年8月22日、東京
  5. S. Murakami: Periodontal Tissue Regeneration using FGF-2. Chinese Society of Periodontology. Aug. 20, 2009. Nanning, China
  6. 村上伸也：歯周組織再生療法の現状と未来。第27回日本骨代謝学会学術集会。平成21年7月23日、大阪
  7. T. Iwayama, T. Hashikawa, Y. Shimabukuro, Y. Ozasa, Y. Shibata, Y. Abiko, H. Komoda, A. Matsuyama, Y. Sawa, S. Murakami: Possible Application of Adipose Tissue-derived Stem Cells for Periodontal Regenerative Cell Therapy. The 9th World Congress on Inflammation. Jul. 8, 2009. Tokyo, Japan
  8. 岩山智明、橋川智子、島袋善夫、菱川 祥郎、小笹匡雄、柴田恭子、安孫子宜光、村上伸也：ヒト血清を用いた脂肪組織由来間葉系幹細胞の硬組織分化能の解析。第52回春季日本歯周病学会学術大会。平成21年5月16日、岡山
  9. 村上伸也：歯周組織再生療法の近未来を展望する。第47回日本小児歯科学会大会。平成21年5月15日、大阪
  10. M. Ozasa, T. Hashikawa, Y. Shimabukuro, T. Iwayama, H. Komoda, A. Matsuyama, Y. Sawa, S. Murakami: Enhanced Periodontal Regeneration by Transplantation of Adipose Tissue-derived Stem Cells. 87th General Session of the International Association for Dental Research. Apr. 3, 2009. Miami, Florida, USA
  11. S. Yamada, T. Tauchi, C. Fujihara, T. Kajikawa, Y. Ozawa, M. Kitamura, S. Murakami: Periodontal Ligament-specific Periostin Positively Regulates Mineralization of Periodontal Ligament Cells. 87th General Session of the International Association for Dental Research. Apr. 1, 2009. Miami, Florida, USA

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特願2006-259717PCT：「硬組織複合体再生誘導移植材」出願中

## Ⅱ. 分担研究報告

1. 歯科再生医療拠点を活用した次世代型歯周組織再生療法の安全性評価のための生物統計学的デザインに関する研究  
大門 貴志
2. ヒト脂肪組織由来幹細胞の硬組織形成能力の解析に関する研究  
齋藤 正寛
3. 歯周組織再生療法の評価法に関する研究、ヒト脂肪組織由来幹細胞を歯周組織細胞へ分化誘導する因子の探索  
松下 健二
4. ヒト脂肪組織由来細胞の分化能と安全性に関する解析  
阿久津 英憲

厚生労働省科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
分担研究報告書（平成 21 年度）

歯科再生医療拠点を活用した次世代型歯周組織再生療法の  
安全性評価のための生物統計学的デザインに関する研究

研究分担者 大門 貴志 兵庫医科大学 医学部 数学教室 講師

研究要旨

分化間葉系幹細胞 (ADSC) と至適足場材の移入による新規歯周組織再生療法の開発が進められている。本研究では、この新規歯周組織再生療法の開発に係わる臨床研究の実施計画書の作成に参画し、そのデータ管理の基盤を整備するとともに、実施可能性、安全性、有効性に関する適切な生物統計学的評価のためのデザインに関する方法論を従来の統計科学の流れから考察した。また、辺縁性歯周炎患者を対象としたフラップ手術施行時の自己脂肪組織由来幹細胞移植に関する研究にそれらの方法論を適用した。これらの方法論は、歯科再生医療領域の諸種の臨床研究に必要な生物統計学的的安全性評価の過程に大きく寄与することが示唆された。

A. 研究目的

歯周病は日本の成人の約 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。現在の歯周病治療の原則は、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が、それだけでは歯周病の進行により失われた歯周組織の再生は達成できない。GTR 膜やエムドゲインゲル (エナメルマトリックスタンパク) を用いた歯周組織再生療法の臨床応用以外に、種々のサイトカインを用いた次世代型歯周組織再生療法の可能性が示唆されている。内在性の歯根膜組織由来幹細胞のもつ自己修復力を scaffold やサイトカインなどで活性化することにより歯周組織再生を図るアプローチが進められている一方、造血幹細胞、間葉

系幹細胞、ES 細胞 (多能性幹細胞) をはじめとする幹細胞を移入する再生療法もまた注目を集めている。このような背景に鑑みて、医学領域と同様に歯学領域における再生療法の臨床評価過程における統計的方法論の開発が急務であるが、1) その多くの臨床評価過程では諸種の動物実験を経た直後の first-in-man 試験であるため症例数が少数 (せいぜい数例～十数例) に限られ、統計的検討を組み込みにくいこと、2) 医薬品・医療機器の臨床評価過程と異なり、自己組織由来の細胞の患者様への投与だけでなく、そこに辿りつくまでにその細胞の採取・分離・培養といった治療法の安全性・有効性に影響を及ぼす諸種の要因が存在し、少数例のなかでそれらの影響を評価することが相応に困難であること、等の理由で、定型

的な統計的方法論は確立されにくい背景があった。また、とくに、歯学領域にあてはまることが多いが、それらの統計的方法論の活用に先立ち、患者様から獲得され、それらの統計的方法論を適用するデータの信頼性を保持するためのデータ管理の方法論・システムも未整備の現状がある。

したがって、本研究では、分化間葉系幹細胞 (ADSC) と至適足場材の移入による新規歯周組織再生療法の開発に係わる臨床試験の実施計画書の作成に参画するなかで、1) 本試験実施後に獲得されるデータの信頼性を保持するために、医薬品・医療機器開発では通常実施されているデータ管理のためのシステム及び環境を整備し、2) 歯学領域における再生療法の臨床評価過程における定型的な統計的方法論の確立に寄与すべく、頻度流の統計的推測方式に基づく統計的デザインの方法論を提示することを目的としている。

## B. 研究方法

本研究は、分化間葉系幹細胞 (ADSC) と至適足場材の移入による新規歯周組織再生療法のなかでも、辺縁性歯周炎患者を対象としたフラップ手術施行時の自己脂肪組織由来幹細胞移植術の臨床試験の実施計画書作成を基盤にして行った。手順は以下の通りである。

【データ管理の基盤整備 1：歯科再生医療の臨床試験に特化した症例報告書様式の開発】

歯学データには、通常の臨床検査値などの他に、新生歯槽骨の増加率、臨床的アタッチメントの獲得量、歯周組織検査値（ブ

ローピングデプス、歯肉出血指数、歯肉炎指数、歯の動揺度、プラーク指数、角化歯肉幅、辺縁歯肉の退縮量）といった歯科領域特有のデータを含む。さらには、再生医療の視点からみると細胞の採取・分離・培養に関するデータを含む。これらのデータの収集を円滑に実施するためには、歯科再生医療特有の症例報告書様式を設計することが必要である。本研究では、大阪大学医学部附属病院未来医療センターで開発された、主に医学領域の再生療法の臨床試験のための症例報告書雛型を基盤にして、歯学研究者らとともに歯科再生医療特有の症例報告書様式を設計・作成した。

【データ管理の基盤整備 2：データ管理システムの開発】

患者様の個人情報を守るために、本研究に特化したデータ管理システムが必要である。また、データの信頼性確保の観点からみても、医薬品・医療機器の治験及び臨床試験では、データ管理システムが導入され、そのシステムに基づいてデータ管理が実施される。本研究では、これと同等のシステムを構築すべく、大阪大学医学部附属病院未来医療センター内に、Microsoft Access を用いて、歯科再生医療特有の症例報告書様式に基づいてデータ入力のための画面を作成し、データベースを構築した。

【データ管理のための基盤整備 3：データ管理の方法論の適用】

データの質および信頼性を確保するための標準業務手順書を整備した。また、上記システムに関連する書類も整備した。

## 【安全性・有効性評価のための生物統計学的デザインの方法論の整備】

本研究では、多くの臨床試験と同様に、再生療法の実験においても、実施可能性、安全性、有効性の評価の鍵を握るのは、目標症例数の設計である。したがって、本研究では、統計的デザインの方法論のなかでも、とくに目標症例数の設計の方法論を整備することに焦点を絞った。

ヒトでの脂肪組織由来未分化間葉系細胞を用いた次世代型歯周組織再生療法の Proof of Concept (POC) の獲得を意図した場合、先述のように、1) 症例数が限られ、2) 治療法の安全性、有効性及び実施可能性を評価することを目的としており、first-in-man 試験であることが多いため、そのなかでとくに安全性評価に重点をおく必要がある。このような状況から、有効性評価項目のパラメータに対する推定精度又は統計的検定に基づく定型的な例数設計の方法論で目標症例数を規定することは困難であることが多い。したがって、本研究では、まず、症例集積可能性の観点から症例数がすでに設定されているもとで、その症例数が安全性・有効性評価に及ぼす影響あるいはそれらに対する限界について根拠付ける方法論を考察した。

また、複数の仮説の探索を含意する臨床研究に関しては、新しい治療法の安全性及び効果に及ぼす影響要因（患者基礎情報に関する要因、疾患要因、治療に関する要因等）を整理・把握し、臨床研究シミュレーション（Clinical Study Simulation）に基づいて、当該試験を実施することで獲得される結果を予測し、後続の臨床研究への橋渡しの可能性に関して議論することは有効な場

合が多い。したがって、辺縁性歯周炎患者を対象としたフラップ手術施行時の自己脂肪組織由来幹細胞移植術の臨床試験を題材として、従来より品質管理の場面で適用されている「特性要因図」を駆使して、新しい治療法の安全性及び有効性に及ぼす影響要因を整理する方法論を提示した。

### （倫理面への配慮）

データ管理においては、個人情報のお取り扱いに関する各種法令・告示・通知・倫理指針を遵守する。例えば、当該臨床研究から得られた患者のデータは、連結不可能匿名化等の適切な手段を通じて、本研究に必要な個人を識別できるデータは切り捨てられた状態で研究分担者の手に渡るようになっている。また、本研究で考察・提示する統計的デザイン（とくに、目標症例数の根拠付け）のための方法論は、患者様から直接に得られた現実データを必要とせず、倫理面への配慮は必要ないと考える。

## C. 研究結果

### 【安全性の視点】

症例集積可能性の観点から症例数が 12 例とすでに設定されているとすると、任意の一つの有害事象がプロトコル治療中もしくは観察期間中に 1 患者につき 1 回発現し、その発現割合の真値を  $\pi$  と仮定したとき、12 例のうち少なくとも 1 例以上に当該有害事象を観測する確率  $p$  を表 1 に示した。



表 1. 有害事象の発現割合の真値及び当該有害事象を観測する確率.

$\pi$	$p$
0.05	0.460
0.1	0.718
0.15	0.858
0.2	0.931
0.25	0.968
0.3	0.986

表 2. 検出力

$\Delta$ の 標準偏差	$\Delta$					
	10	20	30	40	50	60
30	0.28	0.69	0.94	0.99	0.99	0.99
40	0.20	0.49	0.78	0.94	0.99	0.99
50	0.16	0.34	0.61	0.82	0.94	0.98

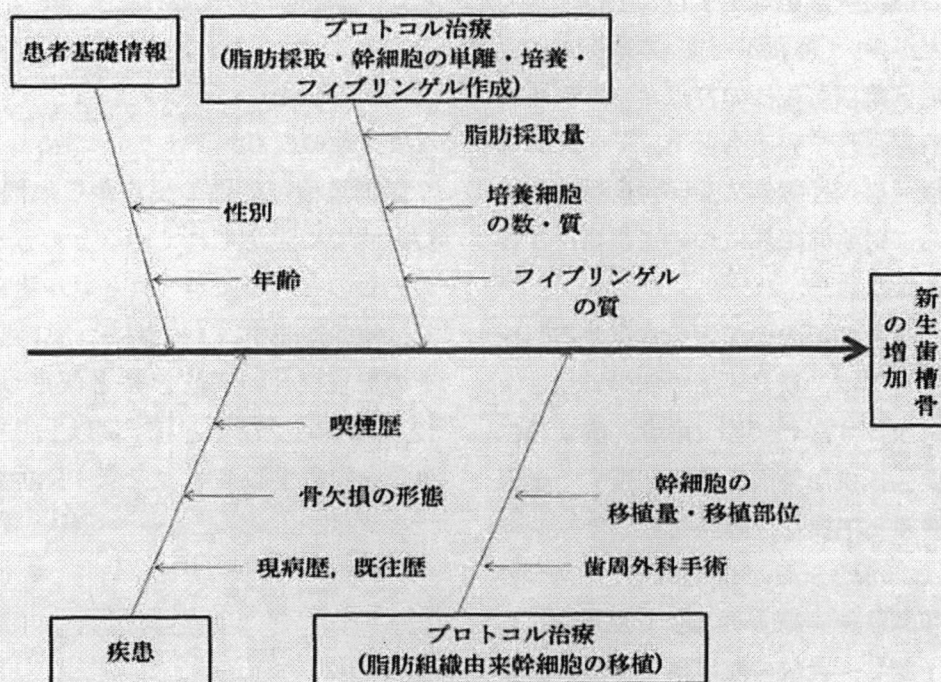


図. 歯科再生領域における要因関連図の例

表1に示されるように、12例の目標症例数では、発現割合のパラメータの値が0.1以下であれば、少なくとも1例以上に有害事象を観測する確率は80%を下回る。逆に、発現割合のパラメータの真値が0.15以上であれば、少なくとも1症例以上有害事象を観測する確率は80%を上回る。ここで示されるように統計的方法を用いれば、統計的に、症例集積可能性の視点から得られた目標症例数から得られる知見とその限界を臨床試験実施前に把握することが可能である。

#### 【有効性の視点】

有効性評価にも関心があれば、有効性評価項目のパラメータに対する推定精度又は統計的検定に基づく定型的な例数設計の方法論を適用することも可能である。既存の有効性の評価項目の一つとして、例えば、移植後のある時点での新生歯槽骨の増加率に注目し、本研究における12例全員がプロトコル治療を完遂し、移植後のある時点まで観察できたと仮定し、1標本のt検定において有意水準 $\alpha=0.05$ で帰無仮説「移植後の当該時点とベースラインの時点の新生歯槽骨の増加率の差がゼロである」に対して対立仮説「移植後の当該時点とベースラインの時点の新生歯槽骨の増加率の差が $\Delta$  ( $>0$ )である」を検出する確率を計算した。 $\Delta$ の値の水準は10, 20, 30, 40, 50, 60とし、 $\Delta$ の標準偏差の値の水準は30, 40, 50とした。この結果を表2に示した。

表2に示されるように、他の影響要因を無視してよいことを前提とすると、例えば、新生歯槽骨の増加率が40%以上ならば、12例という目標症例数は、上記の対立仮説を

0.80以上の確率で検出可能な症例数であることがわかる。

また、安全性・有効性評価の視点での影響要因の整理方法としての(従来より品質管理の場で用いられている)特性要因図の一例を図に提示する。特性要因図とは、特性(ここでは安全性あるいは有効性に関する評価項目)と、それに影響を及ぼすと思われる要因(特性に影響を与えるあるいは原因となりえる、例えば、プロトコル治療)との関係を図に整理したものである。図に示されるように、安全性・有効性評価に及ぼす影響要因を系統的かつ網羅的に把握でき、この図は統計的デザインの基盤を与え、将来的な臨床試験シミュレーションにも活用できそうである。

#### D. 考察

再生医療に関する多くの臨床研究は、諸種の動物実験を経た直後のfirst-in-man試験であり、症例数は少数であることが多い。このような場合の統計的デザイン(とくに、目標症例数の設計)は、これまで症例集積可能性の視点から設定されることが多かった。本研究では、統計的なデザインから解析までの臨床評価過程を意識して、症例集積可能性の視点から症例数が設定されたもとの、安全性・有効性評価の視点からその設定の根拠付けを行う方法論を考察した。ここで提示された方法論を用いることで、症例集積可能性の視点から得られた目標症例数から得られる知見とその限界を臨床試験実施前に把握することが可能である。

また、本研究では、従来より品質管理で用いられてきた特性要因図を歯科領域の再

生医療の臨床評価開発の場面へ適用した。この方法論は、安全性・有効性評価項目に影響を及ぼす諸要因を整理することができ、臨床家との深遠な議論を後押しする。また、最近になって話題になっていっている臨床試験シミュレーションの設計にも役立ち得る。

## E. 結論

本研究で提示した統計的デザイン（とくに、目標症例数の根拠付け）のための方法論は、既存の頻度流に基づく統計的方法論を活用したものである。最近では、米国 Food and Drug Administration (FDA) より医療機器の臨床試験における Bayes 流統計学の使用に関する指針 “Guidance for the Use of Bayesian Statistics in Medical Device Clinical Trials” が提示されており、再生医療に関する臨床試験のように探索的色合いの強い臨床試験における Bayes 流統計的推測方式が海外では注目・実践されている。次年度以降は、我が国における適切な臨床評価の基盤の確立、その結果の患者様への還元の見点から、Bayes 流の統計的デザインの方法論の開発も実施したい。

## F. 健康危機情報

該当せず

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nanno, K., Sugiyasu, K., Daimon, T., Yoshikawa, H. and Myoui, A. (2009). Synthetic alginate is a carrier of OP-1 for bone induction. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 467(12), 3149-3155.

- 2) Hayashi, H., Fujimaki, C., Daimon, T., Tsuboi, S., Matsuyama, T. and Itoh, K. (2009). Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes as a possible marker for predicting the outcome of methotrexate therapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 34, 355-361.

### 2. 学会発表

- 1) Daimon, T., Zohar, S., and O'Quigley, J. (2009). Prior-adaptive continual reassessment method in dose-finding studies. Proceedings of the 30th Annual Conference of the International Society for Clinical Biostatistics, 70, Prague, Czech Republic, August 23-27.
- 2) Daimon, T., Zohar, S., and O'Quigley, J. (2009). Prior-adaptive continual reassessment method in dose-finding studies. Proceedings of the 6th International Meeting of Statistical Methods in Biopharmacy, Paris, France, September 21-22.
- 3) Nakagaki, S., Tsuji, D., Daimon, T., Ikematsu Y., Maeda, M., Kimura, M., Furuta, M., Takagi, M., Hiroyoshi, M., and KIM, Y-I. (2009). A double-blind randomized controlled trial comparing 3 mg and 1 mg of Granisetron for the control of chemotherapy-induced acute emesis. Proceedings of The Joint 15th Congress of the European Cancer Organisation (ECCO15) and 34th Congress of the European Society for Medical Oncology (ESMO34), P-3080 (*European Journal of Cancer Supplements*, 7(2), September 2009,

p.198), Berlin, German, September 20-24.

- 4) Takano, H., Hiramatsu, M., Horiguchi, K., Torikai, K., Watanabe, K., Ishida, M., Nakamura, T., Daimon, T. (2009). Is tricuspid annular dilatation a reliable indicator for tricuspid valve surgery in patients undergoing mitral valve surgery? Proceedings of the 23rd Annual Meeting of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, Vienna, Austria, October 17-21.
- 5) 辻大樹・中垣繁・大門貴志・池松禎人・前田賢人・木村正幸・古田隆久・高木正和・廣吉基己・金 容孝 (2009). がん化学療法による急性悪心嘔吐に対するグラニセトロン3mgと1mgのランダム化比較試験. 日本癌治療学会第47回学術集会, 横浜, 2009年10月22-24日.
- 6) 辻大樹・中垣繁・大門貴志・池松禎人・前田賢人・木村正幸・古田隆久・高木正和・廣吉基己・金 容孝 (2009). がん化学療法による急性悪心・嘔吐に対するグラニセトロン3mgと1mgのランダム化二重盲検比較試験. 日本肺癌学会第50回総会, 東京, 2009年11月12-13日.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得  
該当せず.
2. 実用新案登録  
該当せず.
3. その他  
該当せず.