

201006007A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 伸也

平成 23 (2011) 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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 伸也

平成 23 (2011) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告	1
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	11
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有効性 評価のための被験者数設計に関する研究	12
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	21
齋藤正寛	
3. 歯周組織を温存することによる全身の健康増進への寄与に関する 調査研究	23
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	27
阿久津英憲	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
IV. 研究成果の刊行物・別冊	36
V. 参考資料	390

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

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

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。本年度は、平成 23 年度に開始予定のトランスレーショナルリサーチの実施に向け、ビーグル犬重度歯周病モデルを用いて、ADSC と併用する適切な足場材を決定するとともに、その足場材と ADSC の併用時の歯周組織再生誘導効果と安全性を検討した。その結果、ADSC と併用する足場材としてフィブリン製剤であるボルヒール®が有効であることが明らかとなり、ボルヒール®を足場材とした ADSC 含有移植材が歯周組織再生を効果的に誘導する可能性が示唆された。

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系研究科
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、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞 (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目的で、平成 20 年度再生医療推進基盤整備事業の支援により大阪大学歯学部附属病院内に設置された Cell Processing Center (CPC) を活用し、「口と歯の機能」を脅かす重度歯周炎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 21 年度には、ヒト ADSC の歯周組織再生を誘導するポテンシャルとその安全性の検討に加え、その臨床応用に向け、ADSC と併用する足場材の検討や臨床効果の予測を行う動物モデルとして、ビーグル犬を用いた重度歯周組織欠損モデルの確立を行った。すなわち、ヒト ADSC が CD44 や CD73 などの間葉系幹細胞マーカーを発現することに加え、その分化過程において硬組織形成細胞への分化に必須の *RUNX-2* および歯根膜特異的マーカーである *PLAP-1* mRNA の発現上昇が認められ、ADSC が

骨芽細胞、セメント芽細胞および歯根膜細胞への分化能を有することを明らかとした。また、ヒト ADSC は、継代 14 代目まで増殖可能で、継代したヒト ADSC に染色体数の異常や、転座や欠失などの染色体の構造異常は認められなかった。さらに、ビーグル犬を用いた 2 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、ADSC 含有フィブリングルが歯周組織欠損部に歯槽骨やセメント質の添加を誘導する可能性が明らかとなった。

本年度は、平成 23 年度に開始予定のトランスレーショナルリサーチの実施に向け、ビーグル犬重度歯周病モデルを用いて、ADSC と併用する適切な足場材を決定するとともに、その足場材と ADSC の併用時の歯周組織再生誘導効果と安全性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. ビーグル犬脂肪組織からの ADSC 単離

ペントバルビタールの静脈内投与による全身麻酔下で、ビーグル犬の腹部大網より脂肪組織を採取し、細断後、1 時間のコラゲナーゼ処理を行った。そして、ficoll を用いた比重遠心により赤血球を除去し得られた細胞を培養プレートに播種し、プレートに付着した細胞を 3 代継代して得られた細胞を ADSC とした。

2. ビーグル犬の歯周組織欠損モデルを用いた ADSC と併用する足場材の検討

整形外科領域で広く使用されている骨補填剤である多孔性リン酸三カルシウム (β -tricalcium phosphate; β -TCP と、これまでに我々が塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; FGF-2) を用いた歯周組織再生実験において足場材としての使用実績を有するフィブリングルを ADSC と併

用する足場材の候補として、ビーグル犬の歯周組織欠損モデルを用いて、ADSC と併用する足場材としての有用性を検討した。すなわち、ビーグル犬の下顎左右側第 4 前臼歯を抜去し、約 3 ヶ月経過した治癒後に、下顎左右側第 1 後臼歯近心部に頬舌径 3 mm、近遠心径 5 mm、深さ 4 mm の 2 壁性歯周組織欠損を作成した。そして、一側を試験側として ADSC を含有した β -TCP あるいはフィブリングルを、他側は対照側として β -TCP あるいはフィブリングルを単独で欠損部に投与した。そしてその後、試験側と対照側の歯周組織欠損部の治癒状態を経時的に観察した。なお、 β -TCP は気孔率 75% のブロック体を使用し、ADSC と併用する場合は陰圧下で ADSC をブロックに吸引・封入した。また、フィブリングルはヒト血漿由来フィブリノゲンとヒト血漿由来トロンビンを混和したものを使用し、ADSC 含有フィブリングルは、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°C にて 30 分間培養することにより作製した。

3. ボルヒール®の歯周外科処置後の創傷治癒に及ぼす影響の検討

人への臨床応用が認められている唯一のフィブリン製剤であるボルヒール®の歯周外科処置後の創傷治癒に及ぼす影響をビーグル犬歯周組織欠損モデルを用いて検討した。すなわち、6 頭のビーグル犬の下顎第 4 前臼歯を抜去し治癒後に、第 1 後臼歯の近心部と第 3 前臼歯遠心部に、それぞれ頬舌径 3 mm、近遠心径 4 mm、深さ 3 mm および頬舌径 2 mm、近遠心径 4 mm、深さ 3 mm の 3 壁性歯周組織欠損を作成した。そして、欠損部にフィブリノゲン液 (A 液) とトロンビン (B 液) を等量混合し作成したボルヒール®を投与し、術後の治癒状態を観察した。その後、3 頭はボルヒール®

投与1週後に、残りの3頭は投与4週後に屠殺し下顎骨を採取した。そして、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、凍結切片法により欠損部を含む組織切片を作製した。そして、ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色を行い、歯周外科処置後の創傷治癒過程に及ぶボルヒール®の影響を組織学的に評価した。

4. ADSC と併用する足場材として用いる場合のボルヒール®の調整法の検討

ボルヒール®は、フィブリノゲン液 (A液) とトロンビン (B液) を等量混合して生体組織の接着に使用する。しかしながら、生体組織接着剤として開発されたボルヒール®は、歯周組織再生用の足場材としては固く賦形性に乏しい。そこで、ボルヒール®のA液とB液を様々な量のリン酸緩衝液 (PBS) で希釈し、その後、A液とB液を混合し、ボルヒール®希釈倍率と硬化状態や硬化時間との関連性を検討して、歯周組織欠損部に用いる足場材に適したボルヒール®の調整法を探索した。

5. ADSC 含有移植材と対照移植材の作成法

ADSC を PBS で 4.2×10^7 個/mL に調整した細胞懸濁液とボルヒール®のA液あるいはB液を、5:1の割合で混和した。そして、調整したADSC含有A液とADSC含有B液を1:1の割合で混合し、37°Cにて30分間インキュベートして硬化させたものをADSC含有移植材とした。また、ADSC細胞懸濁液の代わりに、PBSとA液あるいはB液を5:1の割合で混和し、その後同様に、等量を混合し硬化させたものを対照移植材とした。

6. ビーグル犬の実験的歯周病モデルを用

いたADSC含有移植材の歯周組織再生効果の検討

6頭のビーグル犬の下顎左右側第4前臼歯を抜去し、約3ヶ月間の治癒期間を経た後に、下顎両側第1後臼歯近心部に頬舌径3mm、近遠心径5mm、深さ4mmの2壁性歯周組織欠損を作成した。作製した歯周組織欠損の一侧は試験側としてボルヒール®を足場材としたADSC含有移植材を、他側は対照側としてボルヒール®を欠損部に投与した。その後、試験側と対照側の歯周組織欠損部の治癒状態を経時的に観察し、投与6週後に屠殺し下顎骨を採取した。そして、歯周組織欠損部の軟X-ray写真撮影およびマイクロCT断層撮影を行った後、組織標本作製して組織学的解析を実施した。

7. 軟X-ray写真撮影およびその解析

採取した下顎骨の歯周組織欠損部の軟X-ray写真撮影を行い、新生骨塩量の計測を行った。

8. マイクロCT断層撮影およびその解析

採取した下顎骨をマイクロCTにて断層撮影を行い、専用ソフトを用いて新生骨体積等の画像解析を行った。

9. 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、凍結切片法により欠損部を含む組織切片を作製した。そして、ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色を行い、試験側と対照側の新生骨、新生セメント質、新生歯根膜を観察・比較し、ADSC含有移植材の歯周組織再生能を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、厚生労働省および文部科学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、生命倫理および安全管理に関して厳重に審査を受け、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。さらに本研究は、ヒト体性幹細胞であるADSCを用いたトランスレーショナルリサーチを最終目標としていることから、本学のヒト幹細胞倫理審査委員会の承認を受け、厚生労働省への臨床研究申請手続きを本年度に完了させている。

C. 研究結果

1. ADSC と併用する足場材の選定

β -TCP のブロック体とフィブリンゲルのADSC と併用する足場材としての有用性を、ビーグル犬の2壁性歯周組織欠損モデルを用いて検討した。その結果、ビーグル犬の2壁性歯周組織欠損に β -TCPを投与した部位では、ADSCの含有に関わらず、歯肉が陥凹した状態で治癒するが多かった。一方、フィブリンゲルあるいはADSC含有フィブリンゲルを投与した部位では、術後1週間程度は通常の歯周外科処置を実施した場合と同程度の炎症反応を認めたが、治癒後は歯肉退縮等の異常所見は認められなかった。

2. ボルヒール®の歯周外科処置後の創傷治癒に及ぼす影響

ビーグル犬3壁性歯周組織欠損モデルを用いてボルヒール®の歯周外科処置後の創傷治癒過程に及ぼす影響を臨床的および組織学的

に検討した。その結果、ボルヒール®投与4週後までに、投与部位に臨床的に異常な治癒所見は観察されなかった。また、組織学的な検索結果では、ボルヒール®投与1週間後には、すべての症例でボルヒール®の残存が認められたが、投与4週間後にはすべての症例でボルヒール®は消失し、6例中4例において欠損部の歯槽骨の回復が認められた。

3. ADSC と併用する足場材として用いる場合のボルヒール®の調整法

ボルヒール®のA液とB液をPBSで希釈しADSCと混合したところ、希釈倍率に比例しての硬度が減少し賦形性が向上したが、希釈倍率が6倍を超えると十分硬化しないことが明らかとなった。そして、ボルヒール®のA液とB液をADSCのPBS懸濁液を用いて6倍に希釈した場合も、硬化することが確認された。以上の結果から、ボルヒール®のA液とB液をADSCのPBS懸濁液でそれぞれ6倍に希釈することにより、足場材として賦形性やスペースメーカー機能を保持したまま足場材中のADSC量を増加させることが可能であることが明らかとなった。

4. ビーグル犬の実験的歯周病モデルを用いたADSC含有移植材の歯周組織再生効果の効果

ビーグル犬6頭を用い、下顎両側第1後臼歯近心部に実験的2壁性骨欠損モデルを作製し、試験側にはボルヒール®を足場材としたADSC含有移植材を、対照側にはボルヒール®を欠損部に投与した。投与6週間後のソフトX-ray写真による解析では、ADSC含有移植材を投与した部位（試験側）は、足場材であるボルヒール®を投与した部位（対照側）に比べて新生骨塩量が多い傾向が認められた。そして、マイクロCT断層撮影による解析でも、投与6週間後の3次元構築像において、ADSC含有

移植材を投与した試験側は、対照側に比べて作製した骨欠損範囲における新生骨量が多い傾向が認められた。

ADSC 含有移植材の歯周組織再生効果の組織学的検索では、ADSC 含有移植材を投与した試験側では、投与 6 週間後において欠損部に新生骨が観察されることが多かった。一方、足場材であるボルヒール®を単独で投与した対照側では、欠損部の新生骨の添加はわずかにとどまっていることが多かった。また、歯肉上皮の根尖方向への増殖に関しては、ADSC 含有移植材を投与した試験側に比べ、対照側において著明に観察される傾向が認められた。一方、セメント質の新生に関しては、ADSC 含有移植材を投与した試験側の根面において新生セメント質の添加が認められたが、ボルヒール®を単独で投与した対照側ではセメント質の新生は認められなかった。

D. 考察

歯周組織再生療法の最終的な目標は、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、破壊される前の健全な状態に再構築することである。しかしながら、現在行われている GTR 法や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では、十分な歯周組織再生効果を期待できる適応症には限界がある。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や骨髄由来幹細胞など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、歯周組織再生療法に用いる幹細胞として ADSC を利用した新規歯周組織再生療法の開発に平成 21 年度から取り組んできた。その結果、平成 21 年度には、ヒト ADSC の歯周組織再生を誘導するポテンシャルとそ

の安全性を確認するとともに、ビーグル犬歯周組織欠損モデルを用いた探索的研究において、ADSC が歯周組織再生を誘導する可能性が明らかにしてきた。そこで、本厚生労働科学研究補助金（再生医療実用化研究事業）の最終年度である来年（平成 23 年）度に開始予定のトランスレーショナルリサーチの実施に向け、本年度は、ビーグル犬重度歯周病モデルを用いて、ADSC と併用する適切な足場材を決定するとともに、その足場材と ADSC の併用時の歯周組織再生誘導効果と安全性を検討した。

細胞移植に際しての足場材としては、 β -TCP、ハイドロキシアパタイト、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。ハイドロキシアパタイトが生体内で吸収・置換されることがないのに対して、整伝導能を有し骨補填剤として整形外科領域で広く使用されている β -TCP は、投与後、時間の経過とともに生体内で骨に置換される。また、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。歯肉や歯根膜といった軟組織とセメント質や歯槽骨といった硬組織が複雑な立体構造を示す歯周組織の再生に用いる足場材は、適度な賦形性とスペースメイキングに必要な強度を有し、 β -TCP やフィブリンのように生体内の生理的環境で吸収され、本来の組織に置換されることが望ましい。さらに、 β -TCP やフィブリンゲルに関しては、これまでに我々が FGF-2 を用いた歯周組織再生実験の足場材としての使用実績を有していることから、本研究では、ADSC と併用する足場材の候補として、適度の賦形性と強度を持ち生体吸収性を有す

るβ-TCPのブロック体とフィブリンゲルを選択し、ビーグル犬の歯周組織欠損モデルを用いて、ADSCと併用する足場材としての有用性を検討した。その結果、β-TCPを投与した部位では、ADSCの含有に関わらず、歯肉が陥凹した状態で治癒するが多かった。そして、この経過を詳細に観察すると、投与1週間程度で欠損部を被覆する歯肉が白濁し、その後、歯肉が陥凹することから、β-TCPのブロック体を投与した部位では血行障害により歯肉が壊死して、ブロック体が脱落するのではないかと推察された。一方、フィブリンゲルあるいはADSC含有フィブリンゲルを投与した部位では、術後の治癒に異常所見が認められなかったことから、フィブリンゲルがADSCと併用する足場材としての有用であると考えられた。

このように、フィブリンゲルがADSCと併用する足場材としての有用であると考えられたため、トランスレーショナルリサーチでの使用を考慮し、人への臨床応用が認められている唯一のフィブリン製剤であるボルヒール®のADSCと併用する足場材としての安全性および調整法を検討した。国内献血由来の生体組織接着剤として開発されたボルヒール®は、フィブリンゲン、血液凝固第XIII因子、トロンビン、塩化カルシウム水和物およびアプロチニンの5つの成分から構成され、血液凝固の最終段階で形成されるフィブリンの作用を利用して組織の接着・閉鎖を行うものである。ボルヒール®の原材料は国内の健康な献血者の血漿が使用され、HBs抗原、抗HCV抗体、抗HIV-1抗体、抗HIV-2抗体および抗HTLV-I抗体陰性で、かつALT(GPT)値でスクリーニングを実施されている。そして、プールした試験血漿についても、HIV、HBVおよびHCVについて核酸増幅検査を実施し、適合した血漿が製

造に使用されている。さらに、混入の可能性のあるHIV、サイトメガロウイルス等は製造過程の乾燥加熱処理により不活化される事が確認され、ウイルス等の感染性を完全には否定できないものの、その可能性が現時点では最小限に押さえられていることから、人への臨床応用が認められている。

本研究では、ボルヒール®の歯周組織欠損部への投与の安全性をビーグル犬歯周組織欠損モデルを用いて検討した。その結果、歯周組織欠損部へのボルヒール®を投与により、投与部位に異常な治癒所見は臨床的にも組織学的にも観察されず、歯周組織欠損部へのボルヒール®投与の安全性が明らかとなった。

通常、ボルヒール®は、フィブリンゲン凍結乾燥粉末(バイアル1)とフィブリンゲン溶解液(バイアル2)を混和し、激しく震盪・攪拌し溶解して作成したフィブリンゲン液(A液)と、トロンビン凍結乾燥粉末(バイアル3)をトロンビン溶解液(バイアル4)で溶解し調整したトロンビン(B液)を等容混合して生体組織の接着に使用する。しかしながら、生体組織接着剤として開発されたボルヒール®は、足場材としては固く賦形性に乏しく、混入できるADSC量も制限される。また、ADSCによる歯周組織再生量は歯周組織欠損部に投与するADSC量に依存すると考えられることから、混合できるADSC量を増やし、かつ足場材として適度の賦形性と強度を保持するボルヒール®のA液とB液の希釈倍率を検討した。その結果、ボルヒール®のA液とB液をそれぞれ6倍希釈し混合した場合に、足場材として賦形性やスペースメイキング機能を保持したままADSC量の増加が可能であることが明らかとなった。

ボルヒール®を6倍希釈して調整したADSC含有移植材の歯周組織再生能を、ビーグル犬2

壁性骨欠損モデルを用いて検討した。その結果、ADSC含有移植材投与部位（試験側）は、ボルヒール®を単独投与部位（対照側）に比べて、新生骨の形成量が多い傾向がX線のおよび組織学的解析に認められた。そして、ADSC含有移植材投与部位では、歯肉上皮の根尖方向への増殖が対照側に比べて少ない傾向が認められた。これらの結果は、ボルヒール®を足場材とした含有移植材が歯周組織再生に有効に作用していることを示唆している。しかしながら、セメント質の新生に関しては、ボルヒール®と同じフィブリンを主成分とするフィブリンゲルを用いた同様の実験系では有意なセメント質の添加が認められた（平成21年度に報告）が、ボルヒール®を足場材としたADSC含有移植材ではセメント質の添加は限定的であった。この点に関しては、その後、歯周組織欠損の作製法の厳密化や歯肉弁の切開位置や縫合法などに改良を加えて実施したビーグル犬歯周病モデルでは、ADSC含有移植材投与部位において、対照側に比べて有意な新生骨の形成を認めており、今後このケースを用いて詳細な組織学的検索を進める予定である。

本研究は歯周組織再生研究分野で、トランスレーショナルリサーチの実施に向けた新たな「細胞治療」の可能性を提示したものである。今後、本年度に有用性が明らかとなったボルヒール®を足場材としたADSC含有移植材を、ビーグル犬の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モデルに応用し、重度の歯周組織欠損に対する有用性を検討する予定である。そして、トランスレーショナルリサーチの実施に先立ち、実際にCPCにてヒト脂肪組織からADSCの単離、培養、回収を行うコールドランを実施し、将来の臨床研究へ邁進したいと考えている。さら

に、FGF-2や血小板由来増殖因子（PDGF-BB）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、さらに適応範囲が広く有効なPeriodontal tissue engineeringが創生されるものと期待される。

E. 結論

1. ADSC含有フィブリンゲルを投与した部位では、術後の治癒に異常所見が認められなかったことから、フィブリンゲルがADSCと併用する足場材としての有用であると考えられた。
2. ビーグル犬歯周組織欠損モデルにおいて、歯周組織欠損部へのボルヒール®投与により、臨床的にも組織学的にも異常な治癒所見は観察されなかったことから、歯周組織欠損部へのボルヒール®投与の安全性が明らかとなった。
3. ボルヒール®のA液とB液をそれぞれ6倍希釈し混合した場合に、足場材として適度な賦形性やスペースメーカー機能を保持したまま含有ADSC量の増加が可能であることが明らかとなった。
4. ビーグル犬2壁性歯周組織欠損モデルにおいて、ボルヒール®を足場材としたADSC含有移植材投与部位は、ボルヒール®単独投与部位に比べて、新生骨の形成が多い傾向が認められた。
5. ビーグル犬2壁性歯周組織欠損モデルにおいて、ADSC含有移植材投与部位では、歯肉上皮の根尖方向への増殖が対照側に比べて少ない傾向が認められた

以上の結果より、ADSCと併用する足場材としてフィブリン製剤であるボルヒール®が有

効であることが明らかとなり、ボルヒール®を足場材としたADSC含有移植材が歯周組織再生を効果的に誘導する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakami S. Periodontal Tissue Regeneration by signalling molecule(s)- What role dose basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy?, *Periodontology* 2000, 56: 188-208, 2010
2. Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Kido J, Nagata T, Kurihara H, Takashiba S, Shibutani T, Fukuda M, Noguchi T, Yamazaki K, Yoshie H, Ioroi K, Arai T, Nakagawa T, Ito K, Oda S, Izumi Y, Ogata Y, Yamada S, Shimauchi H, Kunimatsu K, Kawanami M, Fujii T, Furuichi Y, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Omae M, Yamada S, Watanuki M, Murakami S. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: Results of a multi-center randomized clinical trial *J Dent Res*, 90(1): 35-40, 2011
3. Komoda H, Okura H, C.M. Lee, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Ichinose A, Murakami S, Sawa Y, Matsuyama A. Reduction of N-glycolylneuraminic acid xenoantigen on human adipose tissue-derived stromal cells/mesenchymal stem cells leads to safer and more useful cell sources for various stem cell therapies., 16(4): 1143-1155, 2010.
4. Yanagita M, Kojima Y, Kawahara T, Kajikawa T, Oohara H, Takedachi M, Yamada S, Murakami S. Suppressive effects of nicotine on the cytodifferentiation of murine periodontal ligament cells. *Oral Diseases*, 16: 812-817, 2010.
5. Fujihara C, Yamada S, Ozaki N, Takeshita N, Kawaki H, Takano-Yamamoto T, Murakami S. Role of Mechanical stress-induced glutamate signaling-associated molecules in cytodifferentiation of periodontal ligament cells. *J Biol Chem*, 285(36):28286-28297, 2010
6. Shimabukuro Y, Terashima H, Takedachi M, Maeda K, Nakamura T, Sawada K, Kobashi M, Awata T, Oohara H, Kawahara T, Iwayama T, Hashikawa T, Yanagita M, Yamada S, Murakami S. Fibroblast growth factor-2 stimulates directed migration of periodontal ligament cells via PI3/Akt signaling and CD44/hyaluronan interaction. *J. Cell. Physiol*, 226: 809-821, 2010
7. Anzai J, Kitamura M, Nozaki T, Nagayasu T, Terashima A, Asano T, Murakami S. Effects of concomitant use of fibroblast growth factor (FGF)-2 with beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on the beagle dog 1-wall periodontal defect model. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 403: 345-350, 2010

2. 学会発表

1. 村上伸也：(特別講演) FGF-2 による歯周組織再生 -現状と将来展望- 第8回歯科骨粗鬆症研究会、2010年4月4日、東京
2. Murakami S: (特別講演) Periodontal tissue regeneration by basic fibroblast growth factor (FGF-2). 第12回台湾歯周病学会、2010年10月16日、高雄(台湾)
3. 村上伸也：(特別講演) 歯周治療の近未来 -その理論と臨床- 第62回近畿北陸地区歯科医学大会、2010年11月7日、大阪
4. Murakami S: (シンポジウム) Periodontal regeneration by FGF-2. , Joint Symposium of University Leeds and Osaka University, July 5, 2010, Leeds, UK.
5. 村上伸也：(シンポジウム) 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
6. 岩山 智明、橋川 智子、北村 正博、島袋 善夫、村上 伸也：歯肉線維芽細胞におけるアディポネクチン受容体1を介した炎症制御、第53回春季日本歯周病学会学術大会、2010年5月14日、盛岡
7. Hashikawa T, Ozasa M, Iwayama T, Anzai J, Shimabukuro Y, Kitamura M, Matsuyama A, Lee C, Sawa Y and Murakami S: Possible application of human adipose tissue derived stem cells for periodontal regeneration. ISSCR 8th Annual Meeting, June 17, 2010, San Francisco, USA.
8. Iwayama T, Hashikawa T, Shimabukuro Y, Ozasa M, Lee C, Matsuyama A, Sawa Y, Murakami S.: Adipose tissue-derived stem cells for periodontal regenerative cell therapy. 88th International Association of Dental Research. July 15, 2010, Barcelona, Spain.
9. 河原 貴展, 山下 元三, 橋本 悠平, 梶川 哲宏, 中村 友美, 前田 憲一郎, 山田 聡, 北村 正博, 村上 伸也：歯根膜細胞において FGF-2 は MAPK 依存性に BMP シグナルを抑制する 第53回秋季日本歯周病学会学術大会、2010年9月19日、高松
10. Hashikawa T, Ozasa M, Iwayama T, Anzai J, Shimabukuro Y, Murakami S: Periodontal regeneration by transplantation of human adipose tissue derived stem cells. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, November 1, 2010, Honolulu, 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有効性
評価のための被験者数設計に関する研究
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. 歯周組織を温存することによる全身の健康増進への寄与に関する
調査研究
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 22 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
有効性評価のための被験者数設計に関する研究

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、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臨床研究のデザインを基盤にして、有効性に関する適切な生物統計学的評価のための被験者数設計に関する方法論を提示し、シミュレーションでその性能を評価した。開発した方法論は、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な有効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 試験であるため被験者数が少数 (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。

本研究では、これらの背景に鑑みて、統計的方法論のなかでも、有効性に関する適切な評価の基盤を与える目標被験者数設計の方法論を開発し、その性能をシミュレー

ションで評価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。先述のように、

1) 被験者数が限られ、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とは確かであるが、プロトコル治療の安全性が確立されたもとで期待されるのは相応の有効性である。

一般に、歯学領域における有効性に関する評価項目は、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（プロービングデプス、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）にわたり、複数存在する。

本研究では、複数の有効性評価項目のうち、重要な三つの評価項目を組上に挙げ、そのうちの少なくとも一つに関して統計的有意性が得られる場合を成功とする被験者数設計の方法論を以下の手順で開発する。

1. 有効性評価項目の絞り込み：本研究では、新生歯槽骨の増加の有無、臨床的アタッチメントの獲得の有無、プロービングデプスの改善の有無に注目する。
2. 帰無仮説（標準治療で期待される有効性、言い換えれば、当該試験の被験治療で少なくとも期待される有効性）の

設定：項目 1 で絞り込んだ評価項目に対して帰無仮説を設定する：ここでは、 H_{0A} 「全例のうち、新生歯槽骨が増加する被験者の占める真の割合=0.05」、 H_{0B} 「全例のうち、臨床的アタッチメントを獲得する被験者の占める割合=0.05」、 H_{0C} 「全例のうち、プロービングデプスが改善する被験者の占める真の割合=0.05」と設定する。

3. 対立仮説（当該試験の被験治療で期待される有効性）の設定： H_{1A} 「全例のうち、新生歯槽骨が増加する被験者の占める真の割合」、 H_{1B} 「全例のうち、臨床的アタッチメントを獲得する被験者の占める割合」、 H_{1C} 「全例のうち、プロービングデプスが改善する被験者の占める真の割合」が、0, 1, 0.2, ..., 1 (0.1 刻みずつ) となる場合のすべての組み合わせを検討する。
4. 有意水準及び多重性の調整方法の設定：有効性評価項目が複数存在するため、検定を複数回実施することになる。このため、多重性の問題が生じる。多重性の調整方法は多種多様であるが、少なくとも Bonferroni 法では保守的すぎ、必要な被験者数は増大することが危惧される。本研究では、閉検定手順の代表格の一つとして Holm 法を用いる。
5. 「成功 (効果あり)」の判定方法：三つの帰無仮説についての有意性検定に対する片側 p 値を Holm の方法で調整し、そのうちのいずれかが有意水準 0.05 よりも小さくなったときを被験治療が成功 (効果あり) と判定する。
6. 検討する被験者数とシミュレーション

の設定：検討する被験者数は 5, 10, 15, 20, 25 例とし、2 及び 3 で示した帰無仮説及び対立仮説に基づいて

10000 試験分の 2 項乱数を生成し、5 で「成功 (効果あり)」と判定した回数の占める割合 (検出力) を算出する。

表 1. 被験者数が 5 例の場合の諸種の対立仮説の組み合わせで算出した検出力の結果.

被験者数	新生歯槽骨増加被験者割合	アタッチメント獲得被験者割合	デブス改善被験者割合	検出力
5	0.1	0.1	0.7	0.838
5	0.1	0.1	0.8	0.945
5	0.1	0.1	0.9	0.992
5	0.1	0.2	0.7	0.846
5	0.1	0.2	0.8	0.946
5	0.1	0.3	0.7	0.865
5	0.1	0.7	0.1	0.846
5	0.1	0.7	0.2	0.848
5	0.1	0.7	0.3	0.864
5	0.1	0.8	0.1	0.944
5	0.1	0.8	0.2	0.945
5	0.1	0.9	0.1	0.992
5	0.2	0.1	0.7	0.845
5	0.2	0.1	0.8	0.948
5	0.2	0.2	0.7	0.859
5	0.2	0.7	0.1	0.846
5	0.2	0.7	0.2	0.856
5	0.2	0.8	0.1	0.944
5	0.3	0.1	0.7	0.865
5	0.3	0.7	0.1	0.866
5	0.7	0.1	0.1	0.843
5	0.7	0.1	0.2	0.842
5	0.7	0.1	0.3	0.863
5	0.7	0.2	0.1	0.846
5	0.7	0.2	0.2	0.862
5	0.7	0.3	0.1	0.860
5	0.8	0.1	0.1	0.944

表 2. 被験者数が 10 例の場合の諸種の対立仮説の組み合わせで算出した検出力の結果.

被験者数	新生歯槽骨増加被験者割合	アタッチメント獲得被験者割合	デブス改善被験者割合	検出力
10	0.1	0.1	0.4	0.860
10	0.1	0.2	0.4	0.899
10	0.1	0.3	0.3	0.867
10	0.1	0.3	0.4	0.938
10	0.1	0.4	0.2	0.898
10	0.1	0.4	0.3	0.943
10	0.1	0.5	0.2	0.967
10	0.1	0.6	0.1	0.990
10	0.2	0.1	0.4	0.894
10	0.2	0.1	0.5	0.968
10	0.2	0.2	0.3	0.823
10	0.2	0.2	0.4	0.923
10	0.2	0.3	0.2	0.828
10	0.2	0.3	0.3	0.900
10	0.2	0.4	0.1	0.899
10	0.2	0.4	0.2	0.927
10	0.2	0.5	0.1	0.968
10	0.3	0.1	0.3	0.866
10	0.3	0.1	0.4	0.942
10	0.3	0.2	0.2	0.819
10	0.3	0.2	0.3	0.896
10	0.3	0.3	0.1	0.864
10	0.3	0.3	0.2	0.899
10	0.3	0.4	0.1	0.941
10	0.4	0.1	0.1	0.861
10	0.4	0.1	0.2	0.892
10	0.4	0.1	0.3	0.937
10	0.4	0.2	0.1	0.893
10	0.4	0.2	0.2	0.923
10	0.4	0.3	0.1	0.941
10	0.5	0.1	0.1	0.956
10	0.5	0.1	0.2	0.964
10	0.5	0.2	0.1	0.966
10	0.6	0.1	0.1	0.989

表 3. 被験者数が 15 例の場合の諸種の対立仮説の組み合わせで算出した検出力の結果.

被験者数	新生歯槽骨増加被験者割合	アタッチメント獲得被験者割合	デブス改善被験者割合	検出力
15	0.1	0.1	0.4	0.919
15	0.1	0.1	0.5	0.986
15	0.1	0.2	0.3	0.815
15	0.1	0.2	0.4	0.946
15	0.1	0.3	0.2	0.816
15	0.1	0.3	0.3	0.918
15	0.1	0.4	0.1	0.919
15	0.1	0.4	0.2	0.946
15	0.1	0.5	0.1	0.982
15	0.2	0.1	0.3	0.816
15	0.2	0.1	0.4	0.944
15	0.2	0.2	0.3	0.875
15	0.2	0.3	0.1	0.814
15	0.2	0.3	0.2	0.874
15	0.2	0.4	0.1	0.947
15	0.3	0.1	0.2	0.828
15	0.3	0.1	0.3	0.914
15	0.3	0.2	0.1	0.817
15	0.3	0.2	0.2	0.866
15	0.3	0.3	0.1	0.919
15	0.4	0.1	0.1	0.921
15	0.4	0.1	0.2	0.941
15	0.4	0.2	0.1	0.945
15	0.5	0.1	0.1	0.983

表 4. 被験者数が 20 例の場合の諸種の対立仮説の組み合わせで算出した検出力の結果.

被験者数	新生歯槽骨増加被験者割合	アタッチメント獲得被験者割合	デブス改善被験者割合	検出力
20	0.1	0.1	0.3	0.916
20	0.1	0.1	0.4	0.988
20	0.1	0.1	0.5	0.999
20	0.1	0.2	0.2	0.854
20	0.1	0.2	0.3	0.961
20	0.1	0.2	0.4	0.994
20	0.1	0.3	0.1	0.921
20	0.1	0.3	0.2	0.965
20	0.1	0.3	0.3	0.989
20	0.1	0.4	0.1	0.987
20	0.1	0.4	0.2	0.995
20	0.1	0.5	0.1	0.999
20	0.2	0.1	0.2	0.854
20	0.2	0.1	0.3	0.961
20	0.2	0.1	0.4	0.994
20	0.2	0.2	0.1	0.852
20	0.2	0.2	0.2	0.932
20	0.2	0.2	0.3	0.982
20	0.2	0.3	0.1	0.963
20	0.2	0.3	0.2	0.981
20	0.2	0.4	0.1	0.995
20	0.3	0.1	0.1	0.914
20	0.3	0.1	0.2	0.961
20	0.3	0.1	0.3	0.989
20	0.3	0.2	0.1	0.964
20	0.3	0.2	0.2	0.981
20	0.3	0.3	0.1	0.990
20	0.4	0.1	0.1	0.988
20	0.4	0.1	0.2	0.995
20	0.4	0.2	0.1	0.995
20	0.5	0.1	0.1	1.000