

Fibroblast Growth Factor-2 Stimulates Periodontal Tissue Regeneration

Shinya Murakami,* Satoru Yamada,* Takenori Nozaki,* and Masahiro Kitamura*



Introduction: An ideal goal of periodontal therapy is to achieve the complete regeneration of periodontal tissue destroyed by the progression of periodontal diseases. The use of recombinant cytokines is one of the physiologically efficient procedures to stimulate periodontal tissue regeneration. Recently, the safety and efficacy of topical application of basic fibroblast growth factor (FGF-2) to regenerate 2- or 3-walled vertical bone defects was evaluated in Phase 2 multicenter clinical trials in Japan. The results revealed a significant difference in the percentage of increase in alveolar bone height at 36 weeks after administration between the placebo group and the 0.3% FGF-2 group.

Case Presentation: Two cases of intraosseous bone defects, which were treated with a topical application of FGF-2, are presented. To our knowledge, this is the first case report of FGF-2-induced periodontal tissue regeneration. The flap operation was conducted in accordance with the modified Widman procedure, and recombinant human FGF-2 with 3% hydroxypropylcellulose was used as a vehicle and topically applied to the vertical bone defects. A standardized dental radiograph revealed a considerable increase in radiopacity at the bone defects 36 weeks after administration; also, no serious adverse events attributable to the drug were identified in either case.

Conclusion: These results strongly suggest that topical application of 0.3% FGF-2 can be efficacious in an increase in the height of alveolar bone that has been destroyed by periodontitis. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:95-99.

Key Words: Case report; fibroblast growth factor 2; periodontitis; regeneration.

Background

Recent progress in periodontal biology has demonstrated that undifferentiated somatic tissue stem cells and progenitor cells exist within the periodontal ligament.¹ Accordingly, improving or enhancing the biologic potential of these cells can facilitate more effective periodontal tissue regeneration. We have been working on establishing new treatments to accelerate the regeneration of periodontal tissue by topical application of the human recombinant fibroblast growth

factor-2 (FGF-2).²⁻⁵ Recently, randomized controlled Phase 2 multicenter clinical trials were conducted in Japan to evaluate the safety and efficacy of the FGF-2 drug for use in periodontal tissue regeneration.^{6,7} To improve the operability of drug administration to the alveolar bone defect, we mixed freeze-dried recombinant human FGF-2 with 3% hydroxypropylcellulose (HPC), a colorless and viscid vehicle solution, and prepared the gel-like investigational drug. Periodontitis patients with 2- or 3-walled vertical bone defects ≥ 3 mm from the top of the remaining alveolar bone crest were registered. The primary outcome was the percentage of increase in alveolar bone height at the bone defect, to which the investigational drug was applied. The exploratory Phase 2A clinical trial, which involved 13 dental hospitals and 74 patients, revealed that 0.3% FGF-2

* Department of Periodontology, Graduate School of Dentistry, Osaka University, Osaka, Japan.

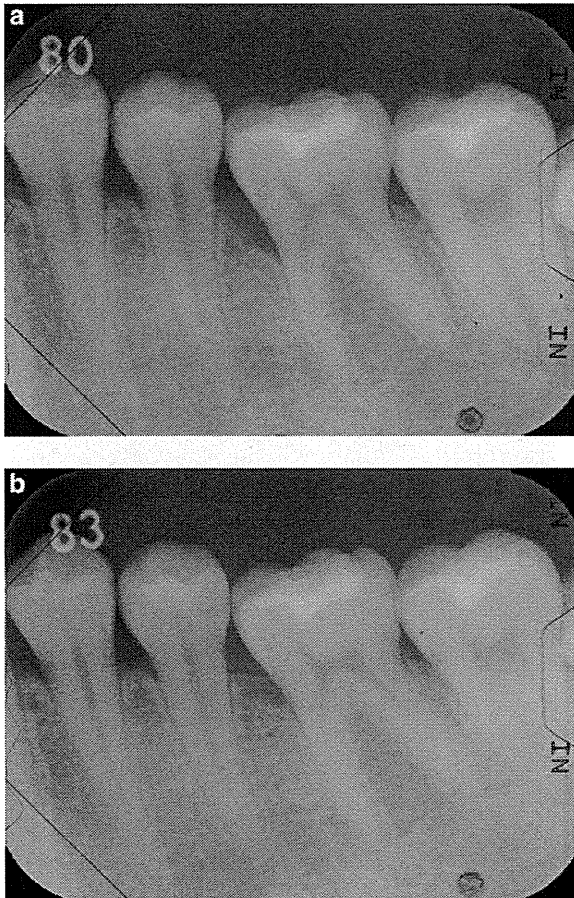


FIGURE 1a Case 1. Standardized dental radiograph before administration. **1b** 36 weeks after administration of 0.3% FGF-2.

significantly improved the percentage of increase in alveolar bone height compared to the vehicle alone, with an ≈ 2 mm clinical attachment level (CAL) regained.⁶ Based on these results, a randomized, double-masked, placebo-controlled Phase 2B clinical trial involving 24 dental hospitals was designed and conducted on 253 periodontitis patients.⁷ In this clinical trial, 200 μ L of the investigational drug containing 0%, 0.2%, 0.3%, or 0.4% FGF-2 was administered to the bony defects. Each dose of FGF-2 showed a significant increase in the percentage of increase in alveolar bone height at 36 weeks after administration, and the percentage peaked (50.6%) in the 0.3% FGF-2 group. The CAL regained in each group was >2 mm, and no significant difference was observed between the groups. Furthermore, no serious adverse effects attributable to the FGF-2 drug were identified in either clinical trial.

In this case report, we present two cases in which 0.3% FGF-2 was administered to the vertical bone defects. The concentration of FGF-2 was revealed when the clinical trial was completed and the mask was removed.

Clinical Presentation, Management, and Outcomes

Case 1

The patient was a systemically healthy, 24-year-old male. After the initial preparation, a 7-mm periodontal pocket

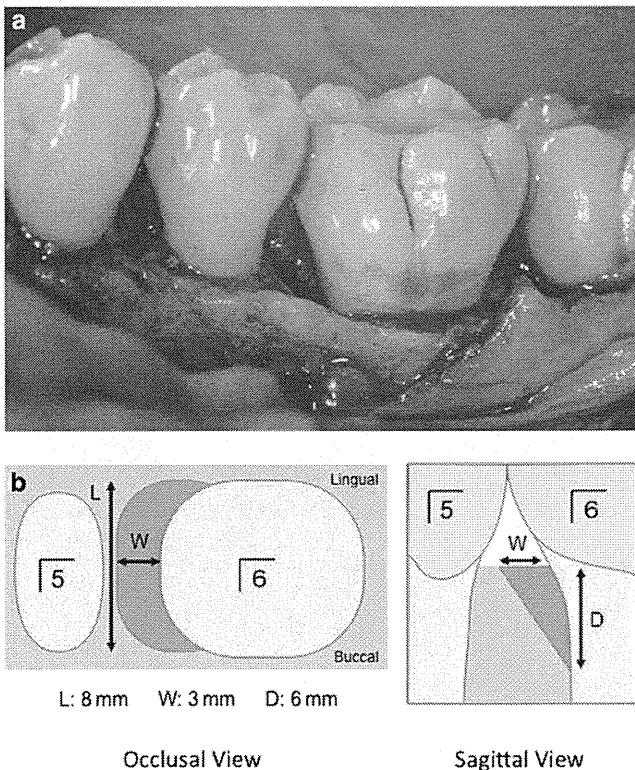


FIGURE 2a Case 1. Image during surgery. **2b** Illustration of the size and shape of the 3-walled bone defect.

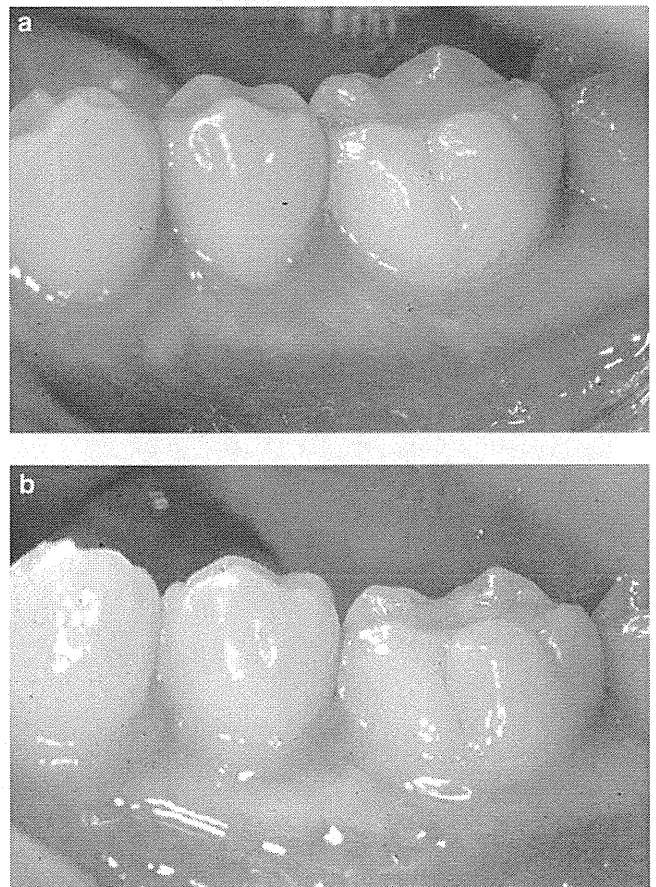


FIGURE 3a Case 1. Preoperative image of the site. **3b** Postoperative image of the FGF-2-treated site.

remained at the mesio-buccal site of the lower left first molar. The tooth mobility was 0, and the width of the keratinized gingiva was 5 mm. The standardized dental radiograph taken before the surgery shows the vertical bony defect at the mesial site of the tooth (Fig. 1). Because this patient provided written informed consent for this clinical trial, we conducted a flap operation at this site in accordance with the modified Widman procedure.⁸ All granulation tissues associated with the bone defect were removed, and soft and hard deposits on the root surface were also removed to ensure thorough degranulation and root planing. Before application of 200 μ L of the investigational drug (0.3% FGF-2 plus 3% HPC), the sutures were prepared. They were then closed after the application of the drug to the bone defect. No specific root conditioning was performed. Figure 2 illustrates the size and shape of the 3-walled bone defect that was confirmed during the surgery. Figure 3 shows the images of the test site before administration and again 36 weeks after administration. At 36 weeks after administration, the probing depth of the test site was 3 mm, and the CAL regained was 4 mm. The geometric standardized radiography used photograph indicators. The tooth axis height at the baseline between the remaining alveolar bone crest and the bottom of

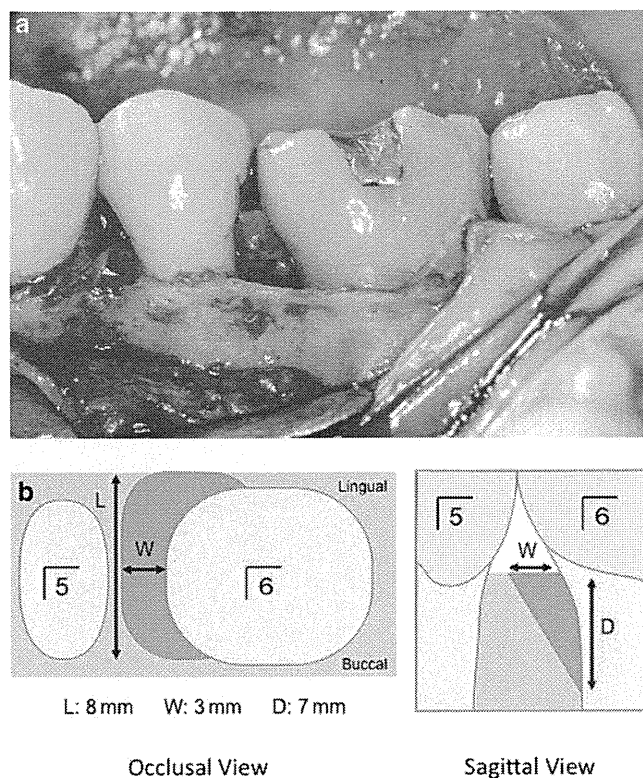


FIGURE 5a Case 2. Image during surgery. 5b Illustration of the size and shape of the 2-walled bone defect.

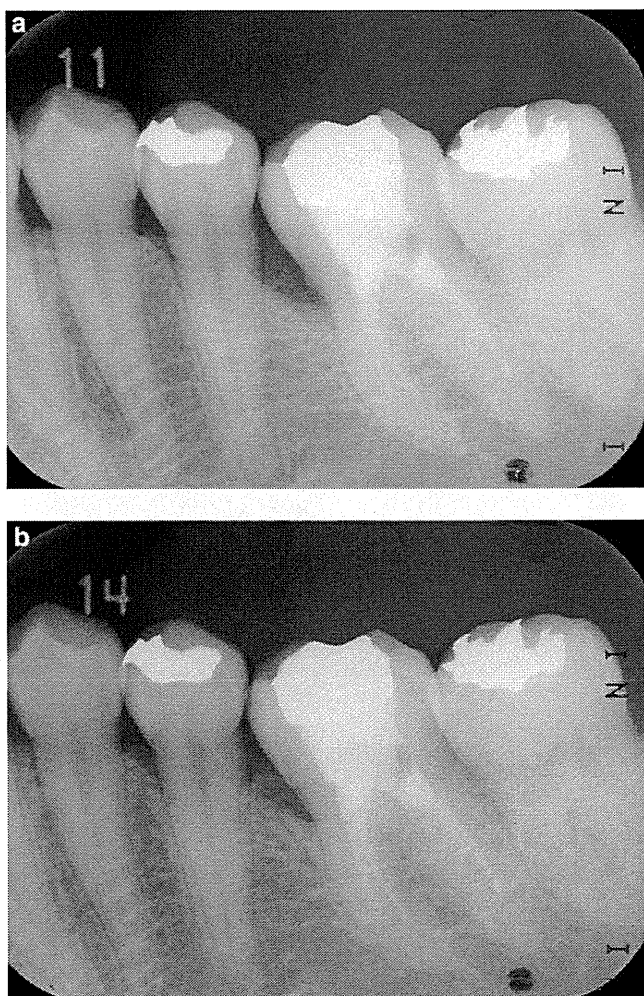


FIGURE 4a Case 2. Standardized dental radiograph before administration. 4b 36 weeks after administration of 0.3% FGF-2.

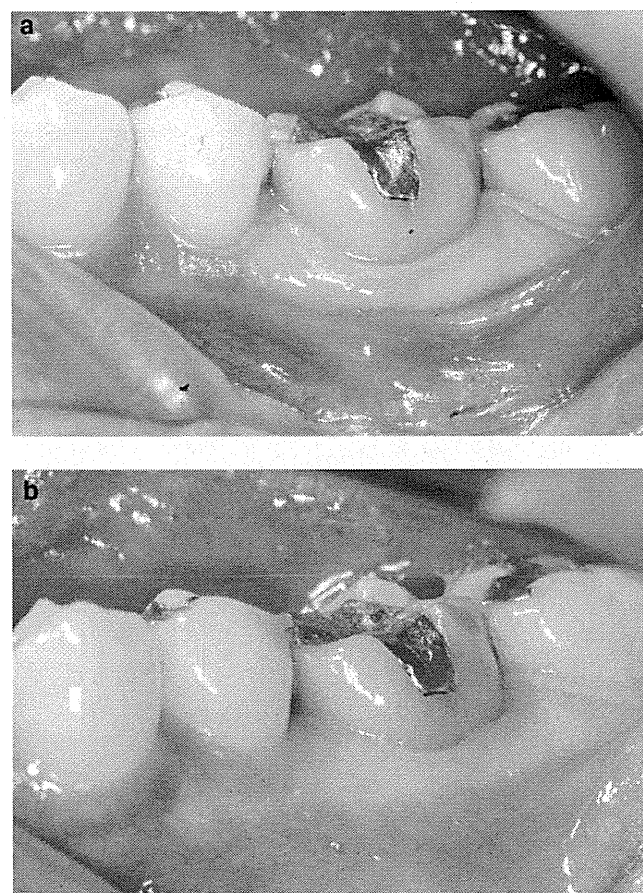


FIGURE 6a Case 2. Preoperative image of the site. 6b Postoperative image of the FGF-2-treated site.

the bone defect was regarded as 100%. Five doctors (Toshi Furuuchi, Dai Onodera, Naoyuki Kurihara, Yoichi Shimeno, and Ikuho Kojima, Tohoku University Dental Hospital, Sendai, Japan) specializing in dental radiology independently measured the percentage of increase in alveolar bone height using the methods described previously.^{6,7} The median of the five measurements taken from the same image was then selected. The standardized dental radiograph shows the increase in bone mineral content at the test site (Fig. 1); the rate of increase in alveolar bone height was 59.7%.

Case 2

The patient was a systemically healthy, 54-year-old female. After the initial preparation, a 9-mm periodontal pocket remained at the mesio-lingual site of the lower left first molar. The tooth mobility was 0, and the width of the keratinized gingiva was 5 mm. The standardized dental radiograph taken before the surgery shows the vertical bone defect at the mesial site (Fig. 4). Because this patient also provided written informed consent for this clinical trial, we conducted the same surgical procedure at this site, and the investigational drug (0.3% FGF-2 plus 3% HPC) was administered to the bone defect. Figure 5 illustrates the size and shape of the 2-walled bone defect that was confirmed during the surgery. Figure 6

shows the images of the test site before administration and 36 weeks after administration. At 36 weeks after administration, the probing depth of the test site was 3 mm, and the CAL regained was 5 mm. The standardized dental radiograph shows the increase in bone mineral content at the test site (Fig. 4); the rate of increase in alveolar bone height was 101%.

Discussion

The results of these clinical trials strongly suggest that topical application of FGF-2 can be efficacious in alveolar bone height at 2- or 3-walled bone defects and moderate intraosseous bone defects. HPC is merely a vehicle and does not function as an osteoconductive material or space maker. Thus, it is essential in the future to introduce the concept of a “scaffold” into the carrier of the FGF-2 drug to treat severe bony defects or horizontal bone destruction with FGF-2. Interestingly, a recent study using a beagle dog 1-wall defect model indicated the efficacy of concomitant use of FGF-2 and β -tricalcium phosphate for periodontal regeneration after severe destruction.⁹ Development of an FGF-2 drug carrier that could provide a formable and osteoconductive scaffold for undifferentiated progenitor cells in the near future would dramatically promote the application of the FGF-2 drug. ■

Summary

<p>Why is this case new information?</p>	<p>To our knowledge, this is the first case report showing that topical application of 0.3% FGF-2 can be efficacious in the increase in alveolar bone height.</p>
<p>What are the keys to successful management of this case?</p>	<p>It is important to ensure thorough degranulation and root planing at the bony defect and to prepare the sutures before application of FGF-2.</p>
<p>What are the primary limitations to success in this case?</p>	<p>Topical application of 0.3% FGF-2 can be efficacious at moderate intraosseous bone defects. However, development of a new scaffold customized for the FGF-2 drug carrier is desirable to treat severe bony defects or horizontal bone destruction with FGF-2.</p>

Acknowledgments

The clinical trials were supported by Kaken Pharmaceutical (Tokyo, Japan), which has provided research grants (Dr. Murakami, J100801004). Dr. Murakami has also received consulting and lecture fees from Kaken Pharmaceutical. Drs. Yamada, Nozaki, and Kitamura report no conflicts of interest related to this case report.

CORRESPONDENCE:

Dr. Shinya Murakami, Department of Periodontology, Graduate School of Dentistry, Osaka University, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan. E-mail: ipshinya@dent.osaka-u.ac.jp.

References

1. Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-155.
2. Kao RT, Murakami S, Beirne OR. The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. *Periodontol 2000* 2009;50:127-153.
3. Murakami S. Periodontal tissue regeneration by signalling molecule(s): What role does fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol 2000* 2011;56:188-208.
4. Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res* 2001;80:2075-2079.
5. 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 Res* 2003;38:97-103.
6. Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, et al. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: Randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS One* 2008;3:e2611.
7. Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, et al. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: Results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res* 2011;90:35-40.
8. Ramfjord SP, Nissle RR. The modified Widman flap. *J Periodontol* 1974;45:601-607.
9. Anzai J, Kitamura M, Nozaki T, et al. 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* 2010;403:345-350.

○ indicates key references.

Annual Review 循環器 2012

2012年1月25日発行

中外医学社

1. 大動脈疾患における遺伝子異常

国立循環器病研究センター研究所分子生物学部室長 森崎裕子

同 部長 森崎隆幸

key words aortic aneurysm and dissection, Marfan syndrome, Loeys-Dietz syndrome, vascular Ehlers-Danlos syndrome, arterial tortuosity syndrome, TGF- β signaling pathway

動 向

FBNI 遺伝子異常による Marfan 症候群¹⁾, *COL3A1* 遺伝子異常による血管型 Ehlers-Danlos 症候群²⁾ のように, 結合組織を構成する細胞外マトリックス分子をコードする遺伝子の異常により発症する全身性結合組織疾患において高頻度で大動脈瘤・解離などを合併することは, 以前より知られていた. 一方, 近年になり, TGF β 受容体遺伝子 (*TGFBR1/TGFBR2*) の異常による Loeys-Dietz 症候群³⁾ をはじめとして, 細胞外マトリックスや血管平滑筋細胞の機能維持に関係すると考えられている種々の遺伝子 (*SLC2A10, SMAD3*)^{4,5)} の異常によっても大動脈病変をきたすものがあることがわかってきた. これ以外にも, 血管平滑筋細胞の細胞骨格タンパク質である血管平滑筋アクチンやミオシンに関係する遺伝子 (*ACTA2, MYH11, MYLK*)⁶⁻⁸⁾ も遺伝性大動脈・解離の原因遺伝子として同定されている. さらに, 近年の分子生物学的研究の進歩により, Marfan 症候群など細胞外マトリックスの構造異常によると考えられてきた疾患であっても, 大動脈病変の進展には TGF β シグナルの機能異常が関与していることが明らかとなり, 大動脈瘤・解離の病態の本質は,

細胞内シグナル伝達異常であるとも考えられるようになってきた. 同時に, シグナル制御による大動脈瘤の発生抑制という画期的な治療法が現実化するとともに, 治療戦略のうえでもパラダイムシフトを生じている.

A. 大動脈疾患と遺伝

大動脈疾患の中でも特に臨床的に重要なのは大動脈瘤・解離である. 大動脈瘤の発症および進展には, 動脈硬化・炎症・遺伝的要因など様々な要因が関与しているが, 中でも, 若年発症の場合や, 胸部大動脈, 特に胸部上行大動脈に主病変があるものは, 老人発症あるいは腹部大動脈瘤・解離に比べて, 遺伝的背景が強いことが知られている.

胸部大動脈瘤では, Marfan 症候群, Loeys-Dietz 症候群・血管型 Ehlers-Danlos 症候群などの全身性結合組織異常に伴う症候群性のものが全体の 10% 弱を占めている.

一方, 非症候群性大動脈瘤の症例でも, 約 20% は家系内に複数の患者を認めることより, 遺伝的要因が発症に関与していると考えられている⁹⁾. これらの家族発症例の多くは常染色体優性

遺伝形式をとって発症するが、常染色体劣性遺伝形式をとる症例もある。これまでに、家系解析により同定された4カ所の原因遺伝子座のうち2カ所については原因遺伝子も同定され、その他にも、3つの原因遺伝子が同定されたが、これらの遺伝子異常によるものはすべて単一遺伝子の異常で大動脈瘤を発症する単一遺伝子疾患である。

その他、大動脈蛇行・大動脈縮窄などの大動脈異常でも遺伝的要因によるものがいくつか知られている。

B. 症候群性大動脈疾患と原因遺伝子

1. Marfan症候群: *FBNI* 遺伝子

Marfan(マルファン)症候群(Marfan syndrome: MFS)は、*FBNI* 遺伝子の変異により発症し、多彩な表現型を呈する全身性遺伝性疾患である¹⁾。病態の本質は、結合組織における細胞外マトリックスの一つ、microfibrilの主要な構成成分であるフィブリリン蛋白の質的あるいは量的異常により引き起こされる結合組織障害であり、特に骨格系(骨の過形成と関節の弛緩による、高身長、クモ状指、側弯、胸郭変形など)、心血管系(大動脈瘤、僧帽弁逸脱症など)、眼系(水晶体亜脱臼、近乱視、網膜剥離など)に特徴的な病変をきたす。発症頻度は、従来、人種性別を問わずほぼ1~2万人に1人とされてきたが、現在では、軽症例も含めれば5000人に1人程度であろうと推定されている。遺伝形式は常染色体優性遺伝で、両親いずれかが患者の場合、その子には性別に関係なく50%の確率で遺伝する。しかし患者の約25%には家族歴を認めず、その場合は新生突然変異により発症すると考えられている。診断は、1996年に設定されたGhent診断基準が長い間ゴールドスタンダードであったが¹⁰⁾、遺伝子診断技術の向上により次項で述べるLDSなどが新規疾患として認められるようになると、これらの疾患との鑑別

が現行基準では不十分となってきた。2010年には、診断基準の見直しがされ、大動脈拡張・水晶体亜脱臼・遺伝子変異の3点をより重視した新診断基準が提唱されている¹¹⁾。

MFSの大動脈病変は、バルサルバ洞を含む上行大動脈の拡大で、特に大動脈基部の拡張が特徴的であるが、その他、胸部下行~腹部大動脈にも認められる。病理学的には、嚢胞性中膜壊死(cystic medial necrosis)とよばれる中膜平滑筋層の変性を認めるが、この病変は、MFS以外にも結合組織の異常による大動脈解離ではしばしば認められる所見であり、診断的意義は限定的である。

FBNI 遺伝子がコードしているフィブリリンは、細胞外基質の基本成分の一つであり、皮膚、肺、血管、骨、筋肉、腱など、全身の結合組織に広く存在し、細胞骨格の重要な成分であるほか、TGF β シグナルの活性制御にも重要な働きをしていることが、最近の研究で明らかになっている。*FBNI* 遺伝子変異は、血液ゲノムを用いた通常の遺伝子解析でも臨床的に診断された患者の約70%以上で検出され、組織を用いた解析法を併用すると90%以上で検出される。*FBNI* 遺伝子変異による発症機序は、従来は、保存されたシステインが他のアミノ酸に置換(ミスセンス変異)し、正常蛋白質の機能を阻害する優性阻害効果(dominant negative effect)によるものが多いとされていた。しかし、最近の研究では、早期停止型変異による症例が約1/2から1/3にもものぼることがわかり¹²⁾、さらにこれらの変異では正常蛋白質の量が半減するハプロ不全効果で発症すると考えられることより、フィブリリンの量的減少による機能異常が病態を引き起こしていると予測され、実際にマウス実験にてこの仮説が証明された¹³⁾。この機能異常には、前述のTGF β シグナル伝達系の関与が示唆されている。

2. Loeys-Dietz症候群: TGF β 受容体 (*TGFBR1*/*TGFBR2*) 遺伝子

Loeys-Dietz(ロイス-ディーツ)症候群(Loeys-Dietz syndrome: LDS)は、TGF β 1型受容体(*TGFBR1*)または2型受容体(*TGFBR2*)遺伝子の変異により発症する全身性遺伝性結合組織疾患として、2005年に、眼間解離・二分口蓋垂・動脈蛇行を三徴として提唱された新規の疾患である³⁾。臨床所見としては、その他に、側弯・内反足・クモ状指・頸椎異常・関節過可動・頭蓋骨早期癒合などの骨格系所見、大動脈基部拡張・大動脈瘤・解離などの心血管異常、血管型Ehlers-Danlos症候群(EDS)様の透過性皮膚所見を高頻度に認める¹⁴⁾。一部の症例ではMFSとの鑑別が難しいことは当初より指摘されており、従来MFS2型とよばれていた水晶体亜脱臼を伴わないMFS家系が、実は遺伝子解析により当疾患であったことが判明している¹⁵⁾。発症頻度は、現時点では不明であるが、MFSと診断された症例の約5~15%が、実はLDSであろうと推定されている。表現型はきわめて多様で、上記のようにMFS類似の骨格所見・特徴的顔貌が主病変である症例から、大動脈瘤・解離・動脈蛇行のみで血管外所見をほとんど認めない症例まである。しかし、ほぼ全例で若年発症の大動脈基部拡張を認めるのが特徴で、動脈病変が大動脈に限定されるMFSと異なり、脳動脈や腹腔内動脈などの中小サイズの血管にも動脈瘤形成を認める。また、20歳前に解離を発症するなどMFSに比べて血管症状の進行が早いため、早期の診断と管理がより重要である。

TGFBR1/*TGFBR2*遺伝子がコードしているTGF β 1型受容体および2型受容体は、ともに細胞増殖・分化を制御しているサイトカインの一つであるTGF β の受容体であり、細胞膜上に存在し互いにヘテロマーを形成している。いずれもセリン・スレオニンキナーゼ活性を有しており、リガンドであるTGF β が両受容体に結合すること

により、まず2型受容体が1型受容体をリン酸化し、ついで1型受容体がシグナル伝達物質であるR-Smadをリン酸化、これによりSmad分子の核内への移行が起こり、最終的に下流の各種の遺伝子発現が制御されている。

これまでにLDS患者で同定された遺伝子変異は、*TGFBR1*遺伝子、*TGFBR2*遺伝子ともに機能喪失型の変異であり、変異の型からはシグナル伝達系の減弱が予測される。しかし、実際に変異を認めた患者の細胞や組織の解析では、むしろSmadのリン酸化や下流の遺伝子発現の亢進が認められた。その理由は不明であるが、LDSでもMFSにおけると同様にTGF β シグナル伝達系が亢進しているという事実は、大動脈瘤発症のメカニズムを考える上で大変興味深い。

3. 血管型Ehlers-Danlos症候群: *COL3A1* 遺伝子

Ehlers-Danlos(エーラス-ダンロス)症候群(Ehlers-Danlos syndrome: EDS)は、コラーゲンなど、結合組織成分の先天性代謝異常により、皮膚・関節・血管などの結合組織の脆弱性を認める遺伝性疾患の総称であり、主病変部位により古典型・関節過可動型・血管型・後側弯型・関節弛緩型・皮膚脆弱型に病型分類されている¹⁶⁾。病型により原因遺伝子も異なるが、これまでに同定された原因遺伝子は、コラーゲンの合成や成熟に関わるものがほとんどである。このうち、大動脈瘤・解離・破裂を伴うものとして注意すべき病型は、*COL3A1*遺伝子の変異による血管型Ehlers-Danlos症候群(旧分類: IV型)であり、全身血管および内臓組織の脆弱性を主病変とし、動脈破裂、腸管破裂、妊娠中の子宮破裂などの重篤な症状をきたす予後不良な疾患である。皮膚は、薄く透過性で、血管脆弱性に伴う易出血性を認めるが、他の病型でみられるような異常な皮膚伸展性は通常認めない。また、関節の過可動性は小関節に限

られるのも特徴である。その他、血気胸、筋・靭帯損傷、内反足、脳出血・梗塞などもしばしば認める。自然歴では、20歳までに1/4の患者が、40歳までに4/5の患者が何らかの明らかな医学的問題を経験するといわれている¹⁷⁾。発症頻度は、数万人に1人とされ、遺伝形式は常染色体優性である。高度の組織脆弱性と止血の困難さから、内視鏡、浣腸などの侵襲的検査や外科的手術はなるべく避けるのが基本であり、またカテーテル挿入部位で動脈破裂や解離を起こす可能性があるため、スクリーニングとしての血管造影は一般的に勧められない。そのためにも、家族歴や臨床所見から本疾患を疑った場合には、遺伝学的検査あるいは生化学的検査により早期に診断を確定することが患者管理においても重要とされる。

COL3A1 遺伝子がコードしている3型コラーゲンは、線維性コラーゲンであり、皮膚や内臓組織における細胞外マトリックスの主要成分である。3型コラーゲンの特徴は、通常のコラーゲン線維とは別に、細網線維とよばれる細い網目状の構造を形成し、細胞などの足場として組織の保持と強度を支える機能を有している点であり、特に創傷治癒過程の初期段階で重要な働きをしている。3型コラーゲン線維は、[Gly-X-Y]の繰り返し配列をもつ3本のアルファ鎖同士が螺旋状に絡み合ったトリプルヘリックス構造をとっているが、血管型Ehlers-Danlos症候群の患者の多くでは、このグリシン(Gly)が他のアミノ酸に置換しているか、あるいは一部が欠損しているために、トリプルヘリックス構造をとれず、結果として、細胞外に分泌される正常3型コラーゲンの量が極端に減少している。一方、検出された変異の数%は、フレームシフト変異や早期停止型変異により変異型コラーゲンが産生されず、結果として正常3型コラーゲンの量が半減するものであるが、この場合は、臨床症状が比較的軽症な場合があることがわかっている。

4. 動脈蛇行症候群: *SLC2A10* 遺伝子

動脈蛇行症候群 arterial tortuosity syndrome (ATS) は、全身の動脈血管の伸張と蛇行および大中動脈の瘤形成を主徴とし、皮膚弛緩、弛緩性関節、特徴的顔貌などを伴う遺伝性結合組織疾患であり、グルコーストランスポーター10 (GLUT10) の異常により発症する⁴⁾。動脈蛇行や身体的特徴が前述のLDS類似する症例もあるが、LDSと異なり、大動脈解離に至ることはまずない。きわめて稀な疾患で、遺伝形式は常染色体劣性である。患者の変異が、遺伝子変異のヘテロ保因者である両親に由来する場合は、兄弟における再発危険率は1/4となる。

GLUT10は、*SLC2A10* 遺伝子によりコードされる糖輸送体の1つで、肝・脂肪組織をはじめとして多くの組織で発現しており、血管平滑筋にも高い発現を認めるが、この遺伝子の機能喪失型の異常で動脈の変化が引き起こされる機序は不明である。しかし、ATS患者の血管平滑筋においてもやはりTGF β シグナル伝達系の亢進が認められており、動脈におけるTGF β シグナル伝達系の重要性を示唆する証拠の1つになっている。

5. ターナー症候群: X染色体異常

X染色体モノソミーあるいはX染色体短腕の部分欠失により発症し、女兒の2000~3000人に1人で認められる比較的頻度の高い染色体異常である。低身長、翼状頸、外反肘、原発性無月経、腎奇形など多彩な症状を呈するが、心血管系では、大動脈二尖弁(10~25%)、大動脈縮窄(8%)を高頻度で認める。ターナー症候群の最大40%で大動脈基部の拡張を認めるとされるが、大動脈解離の合併は1.4%程度と低く、解離発症例の多くは、大動脈二尖弁、大動脈縮窄、高血圧などの他の危険因子を有しているとされている。

6. その他の症候群

多発性嚢胞腎 (*PKD1*, *PKD2* 遺伝子) や, ヌーナン (Noonan) 症候群 (*PTPN11*, *KRAS*, *SOS1*, *RAF1* 遺伝子他), アラジール (Alagille) 症候群 (*JAG1*, *NOTCH2* 遺伝子), 皮膚弛緩症の一部 (*ELN*, *FBLN4* 遺伝子), 骨形成不全症 (*COL1A1*, *COL1A2* 遺伝子他), 変形性関節炎の一部 (aneurysms-osteoarthritis syndrome: AOS) (*SMAD3* 遺伝子) でも, 大動脈瘤・解離の合併の報告がある⁵⁾. 遺伝形式は疾患により異なるが, 常染色体優性遺伝形式をとるものが多い.

C. 非症候群性大動脈疾患と原因遺伝子

Marfan 症候群などの症候群性疾患によるものを除いた胸部大動脈瘤・解離患者でも約2割は家系内に複数の患者を認め, 遺伝的要因の関与が示唆されている. こうした家族性胸部大動脈瘤患者の家系解析により4カ所の原因遺伝子座が同定され¹⁸⁻²¹⁾, うち2カ所については前述の *TGFBR2* 遺伝子および *MYH11* 遺伝子 (平滑筋ミオシン重鎖をコードする) が原因遺伝子として同定されており⁷⁾, それ以外にも, *ACTA2* 遺伝子⁶⁾ および *MYLK* 遺伝子⁸⁾ (ミオシン軽鎖キナーゼをコードする) が原因遺伝子として同定されている. これらの遺伝子異常による大動脈瘤・解離は, 全て常染色体優性遺伝形式をとる単一遺伝子疾患であるが, このうち, 比較的頻度が高い *ACTA2* 遺伝子変異について次に述べる.

ACTA2 遺伝子

ACTA2 遺伝子がコードしている平滑筋 α アクチン α -smooth muscle actin (SMA) は, 血管平滑筋細胞における主要な細胞骨格であり, 非症候群性家族性胸部大動脈瘤の約15%は, この遺伝子の変異により発症するという報告もある. 本邦の解析でも, 50歳以下で発症した若年性非症

候群性家族性胸部大動脈瘤患者の約20%で同遺伝子の変異が同定されている²²⁾. 多くの症例では, 大動脈瘤あるいは解離が主症状であるが, 冠動脈疾患やもやもや病様の脳血管障害の合併が多いことも指摘されている²³⁾. 一部の特殊な変異例では, 網状皮斑や虹彩異常 (iris flocculi) を伴ったり (Arg149Cys変異), 脳内血管異常 (内頸動脈の近位部拡張と遠位部狭窄, 中大脳動脈の放射状分枝), 動脈管開存症, 縮腫異常, 膀胱不全, 腸回転異常など多臓器にわたる平滑筋機能異常を伴う (Arg179His変異)²⁴⁾ ものがある.

D. 遺伝性大動脈瘤と TGF- β シグナル異常

最近の大動脈異常の分子遺伝学的研究において最も注目されているのは, 大動脈瘤発症における TGF β のシグナル伝達系の関与である. *FBNI* 異常による MFS, *TGFBRs* 異常による LDS, *SLC2A10* 異常による ATS, *SMAD3* 異常による AOS, のすべての疾患の患者平滑筋細胞において, TGF β のシグナル伝達系の亢進が認められており, 平滑筋細胞における TGF β シグナルの亢進が, これらの疾患における大動脈瘤発症の根底にあると提唱する学者もいる²⁵⁾. また, マウス MFS モデルにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の一つで TGF β 作用の阻害作用があるといわれるロサルタンを投与したら血管病変を改善できたという報告もされた¹³⁾. 現在, MFS に対するロサルタンの効果をヒト臨床試験により確認中である. 「遺伝子そのものの異常は治せない」が, その下流のシグナル異常を制御することにより「遺伝子病の発症を防ぐ」ことが可能である, ことを示したという点で, 遺伝子病の治療を考える上でもその意味はきわめて大きく, 今後の進展が期待される.

文献

- 1) Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991; 352: 337-9.
- 2) Superti-Furga A, Gugler E, Gitzelmann R, et al. Ehlers-Danlos syndrome type IV: a multi-exon deletion in one of the two COL3A1 alleles affecting structure, stability, and processing of type III procollagen. *J Biol Chem*. 1988; 263: 6226-32.
- 3) Loeys BL, Chen J, Neptune ER, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in *TGFBR1* or *TGFBR2*. *Nat Genet*. 2005; 37: 275-81.
- 4) Coucke PJ, Willaert A, Wessels MW, et al. Mutations in the facilitative glucose transporter *GLUT10* alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nat Genet*. 2006; 38: 452-7.
- 5) van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, et al. Mutations in *SMAD3* cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet*. 2011; 43: 121-6.
- 6) Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, et al. Mutations in smooth muscle alpha-actin (*ACTA2*) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet*. 2007; 39: 1488-93.
- 7) Zhu L, Vranckx R, Van Kien PK, et al. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet*. 2006; 38: 343-9.
- 8) Wang L, Guo DC, Cao J, et al. Mutations in myosin light chain kinase cause familial aortic dissections. *Am J Hum Genet*. 2010; 87: 701-7.
- 9) Albornoz G, Coady MA, Roberts M, et al. Familial thoracic aortic aneurysms and dissections—incidence, modes of inheritance, and phenotypic patterns. *Ann Thorac Surg*. 2006; 82: 1400-5.
- 10) De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, et al. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet*. 1996; 62: 417-26.
- 11) Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet*. 2010; 47: 476-85.
- 12) Faivre L, Collod-Beroud G, Loeys BL, et al. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and *FBN1* mutations: an international study. *Am J Hum Genet*. 2007; 81: 454-66.
- 13) Habashi JP, Judge DP, Holm TM, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*. 2006; 312: 117-21.
- 14) Loeys BL, Schwarze U, Holm T, et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med*. 2006; 355: 788-98.
- 15) Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, et al. Heterozygous *TGFBR2* mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet*. 2004; 36: 855-60.
- 16) Bighton P, De Paepe A, Steinmann B, et al. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet*. 1998; 77: 31-7.
- 17) Germain DP. Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Orphanet J Rare Dis*. 2007; 2: 32.
- 18) Vaughan CJ, Casey M, He J, et al. Identification of a chromosome 11q23.2-q24 locus for familial aortic aneurysm disease, a genetically heterogeneous disorder. *Circulation*. 2001; 103: 2469-75.
- 19) Guo D, Hasham S, Kuang SQ, et al. Familial thoracic aortic aneurysms and dissections: genetic heterogeneity with a major locus mapping to 5q13-14. *Circulation*. 2001; 103: 2461-8.
- 20) Hasham SN, Willing MC, Guo DC, et al. Mapping a locus for familial thoracic aortic aneurysms and dissections (TAAD2) to 3p24-25. *Circulation*. 2003; 107: 3184-90.
- 21) Khau Van Kien P, Mathieu F, Zhu L, et al. Mapping of familial thoracic aortic aneurysm/dissection with patent ductus arteriosus to 16p12.2-p13.13. *Circulation*. 2005; 112: 200-6.
- 22) Morisaki H, Akutsu K, Ogino H, et al. Mutation of *ACTA2* gene as an important cause of familial and nonfamilial nonsyndromic thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD). *Hum Mutat*. 2009; 7: 7.
- 23) Guo DC, Papke CL, Tran-Fadulu V, et al.

Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *Am J Hum Genet.* 2009; 84: 617-27.

24) Milewicz DM, Ostergaard JR, Ala-Kokko LM, et al. De novo ACTA2 mutation causes a novel syndrome of multisystemic smooth muscle

dysfunction. *Am J Med Genet.* 2010; 152A: 2437-43.

25) Dietz HC, Loeys B, Carta L, et al. Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2005; 139: 4-9.

原 著

歯周炎罹患歯に対する FGF-2 投与の長期的効果および安全性の検討

北村正博*¹, 古市保志*², 藤井健男*³, 川浪雅光*⁴, 國松和司*⁵,
 島内英俊*⁶, 山田 了*⁷, 小方頼昌*⁸, 和泉雄一*⁹, 伊藤公一*¹⁰,
 中川種昭*¹¹, 新井 高*¹², 山崎和久*¹³, 吉江弘正*¹⁴, 野口俊英*¹⁵,
 渋谷俊昭*¹⁶, 高柴正悟*¹⁷, 栗原英見*¹⁸, 永田俊彦*¹⁹, 横田 誠*²⁰,
 前田勝正*²¹, 廣藤卓雄*²², 坂上竜資*²³, 原 宜興*²⁴, 野口和行*²⁵,
 小笠原健文*²⁶, 村上伸也*¹

*¹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

*²北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

*³北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系高度先進保存学分野

*⁴北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

*⁵医療法人社団 顕正会歯科臨床研修センター

*⁶東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野

*⁷東京歯科大学

*⁸日本大学松戸歯学部歯周治療学講座

*⁹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野

*¹⁰日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座

*¹¹慶應義塾大学病院歯科・口腔外科教室

*¹²鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室

*¹³新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔生命福祉学専攻口腔生命福祉学科口腔保健学講座

*¹⁴新潟大学大学院医歯学総合研究科摂食環境制御学講座歯周診断・再建学分野

*¹⁵愛知学院大学歯学部歯周病学講座

*¹⁶朝日大学歯学部口腔感染医療学講座歯周病学分野

*¹⁷岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野

*¹⁸広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座歯周病態学分野

*¹⁹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野

*²⁰九州歯科大学

*²¹九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

*²²福岡歯科大学総合歯科学講座総合歯科学分野

*²³福岡歯科大学口腔治療学講座歯周病学分野

*²⁴長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学講座歯周病学分野

*²⁵鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進治療科学専攻顎顔面機能再建学講座歯周病学分野

*²⁶町田市民病院 歯科・歯科口腔外科

(受付日: 2011年11月14日 受理日: 2012年1月28日)

連絡先: 村上伸也

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-8

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

Shinya Murakami

Department of Periodontology, Division of Oral Biology and Disease Control, Osaka University Graduate School of Dentistry
 1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

E-mail: ipshinya @dent.osaka-u.ac.jp

Long-term Benefits of Regenerative Therapy Using FGF-2

Masahiro Kitamura^{*1}, Yasushi Furuichi^{*2}, Takeo Fujii^{*3}, Masamitsu Kawanami^{*4},
 Kazushi Kunimatsu^{*5}, Hidetoshi Shimauchi^{*6}, Satoru Yamada^{*7}, Yorimasa Ogata^{*8},
 Yuichi Izumi^{*9}, Koichi Ito^{*10}, Taneaki Nakagawa^{*11}, Takashi Arai^{*12},
 Kazuhisa Yamazaki^{*13}, Hiromasa Yoshie^{*14}, Toshihide Noguchi^{*15}, Toshiaki Sibutani^{*16},
 Syogo Takashiba^{*17}, Hidemi Kurihara^{*18}, Toshihiko Nagata^{*19}, Makoto Yokota^{*20},
 Katsumasa Maeda^{*21}, Takao Hirofuji^{*22}, Ryuji Sakagami^{*23}, Yoshitaka Hara^{*24},
 Kazuyuki Noguchi^{*25}, Takefumi Ogasawara^{*26} and Shinya Murakami^{*1}

^{*1}Department of Periodontology, Division of Oral Biology and Disease Control, Osaka University Graduate School of Dentistry, ^{*2}Department of Oral Rehabilitation, Division of Periodontology and Endodontology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, ^{*3}Department of Oral Rehabilitation, Division of Highly-advanced Conservative Dentistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, ^{*4}Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, ^{*5} Dental Training Center, Kensei-kai Medical Incorporated Association, ^{*6} Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Biology, Tohoku University Graduate School of Dentistry, ^{*7}Tokyo Dental College, ^{*8}Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, ^{*9}Department Periodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ^{*10}Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry, ^{*11}Department of Dentistry and Oral Surgery, School of Medicine, Keio University, ^{*12}Department of Periodontics and Endodontics, Tsurumi University of Dental Medicine, ^{*13}Laboratory of Periodontology and Immunology, Division of Oral Science for Health Promotion, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, ^{*14}Department of Oral Biological Science, Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, ^{*15}Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University, ^{*16}Department of Periodontology, Division of Oral Infections and Health Science, School of Dentistry, Asahi University, ^{*17} Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^{*18}Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, ^{*19}Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, ^{*20}Kyushu Dental College, ^{*21} Section of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University, ^{*22}Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College, ^{*23} Section of Periodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College, ^{*24}Department of Periodontology, Unit of Translationall Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, ^{*25}Division of Periodontology Department of Oral and Maxillofacial Rehabilitation Course for Developmental Therapeutics Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, ^{*26}Department of Dentistry and Oral Surgery, Machida Municipal Hospital and

(Received : November 14, 2011 Accepted : January 28, 2012)

Abstract : Basic fibroblast growth factor (FGF-2) is one of the major candidates as a periodontal tissue regenerating agent. A series of animal studies and clinical trials have demonstrated its efficacy and safety. In the present study, we surveyed the eight-year periodontal treatment and symptom records of 79 patients who had been administered investigational drugs containing 0% (placebo; vehicle alone), 0.03%, 0.1% or 0.3% human recombinant FGF-2 (Code No. KCB-1D) in the exploratory phase II clinical trial, to evaluate the long-term benefits of regenerative therapy using FGF-2. The treatments and symptoms caused by progression of local periodontitis and those not related to periodontitis were categorized as “events” or “censored”, respectively. The number of events was 14, and survival analysis (generalized Wilcoxon test) revealed that 0.3% FGF-2 significantly prolonged the time to “event” as compared with vehicle alone ($p=0.0345$). In this study, no safety problem was observed

Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 54(1) : ●●-●●, 2012.

Key words : regenerative therapy, basic fibroblast growth factor, long-term follow up, retrospective study, survival analysis

要旨 : 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2 : basic fibroblast growth factor) は、歯周組織再生誘導薬の有力な候補の一つと期待されており、動物実験および臨床治験によって、その有効性と安全性が明らかにされている。本研究では、KCB-1D (歯周病を対象とした遺伝子組み換えヒト型 FGF-2 の治験薬コード) を用いた探索的 II 相臨床治験に参加した 79 名の被験者を対象として、フラップ手術時にプラセボ (0%) あるいは 0.03%, 0.1%, 0.3% の何れか濃度の FGF-2 を投与した被験歯の長期経過を調査した。すなわち、診療録などの診療情報から、臨床治験最終観察日から本研究調査実施日までの間 (約 8 年間) に、各種濃度の FGF-2 あるいはプラセボを投与された被験歯に対して行なわれた治療や、被験歯に出現した症状の内容と年月日を調査した。そして、これらのうち、治験薬投与部位における歯周炎の悪化に起因すると判定された治療や症状をイベント、それ以外を打ち切りとして、生存時間解析を行った。その結果、発生した全イベントは 14 例で、生存時間解析の結果、0.3% FGF-2 投与群はフラップ手術を単独で施行したプラセボ群に比べてイベント発生までの期間の有意な延長が認められた (一般化 Wilcoxon 検定 : $p=0.0345$)。また、本研究の観察期間を含めて FGF-2 投与の安全性に関する問題は認めなかった。

日本歯周病学会会誌 (日歯周誌) 54(1) : ●●-●●, 2012

キーワード : 歯周組織再生, 塩基性線維芽細胞増殖因子, 歯の長期的予後, 後ろ向き観察研究, 生存時間解析

緒 言

超高齢化社会を迎え、歯の喪失に伴う様々な QOL の低下が社会的問題となっている我国で、成人が歯を喪失する第一の原因は歯周炎である¹⁾。そのため、歯周炎によって失われた歯周組織を再生させることにより歯の喪失を防ぐことができれば、生涯を通じて自分の歯で咀嚼することが可能となり国民の QOL の向上、さらにはより良い全身状態の維持に寄与するものと考えられる。そこで現在、歯周炎による歯の喪失を減少させるため、重度歯周炎に対する標準的治療法となりうる歯周組織再生誘導薬の開発が強く求められている。

塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2 : basic fibroblast growth factor) は、歯周組織再生誘導薬の有力な候補の一つとして期待され、ビーグル犬^{2,3)}やカニク

イザル⁴⁾を用いた動物実験および 3, 2 壁性歯槽骨欠損を有すると診断された歯周炎患者を対象とした II 相臨床治験^{5,6)}で、その歯周組織再生誘導能と安全性が明らかになってきている。これらの II 相臨床治験では、FGF-2 投与 36 週後の時点で、臨床的な付着を獲得しつつ、通常のフラップ手術に比べて統計学的に有意な新生歯槽骨の増加がもたらされることが証明されている。しかしながら、歯周組織再生療法の真の目的が長期的な歯の保存であることを考慮すると、歯の予後を含めた FGF-2 投与のさらに長期的な効果と安全性を検討することは大きな意義があると考えられる。そこで、本研究では、上記の FGF-2 を用いた新規歯周組織再生療法の開発に係る II 相臨床治験のなかでも、早期に実施され長期の術後観察が可能である探索的試験⁵⁾に参加した被験者を対象として、各種濃度の FGF-2 あるいはプラセボを投与した歯の長期経過を調査し、歯周炎に対する FGF-2 を用いた歯周

組織再生療法の長期的な効果と安全性を検討した。

材料および方法

1. 被験者

対象は、KCB-1D（歯周病を対象とした遺伝子組み換えヒト FGF-2 の治験薬コード）探索的試験⁵⁾で試験対象の3壁もしくは2壁性の骨欠損形態を有すると診断された部位（各被験者につき1部位）に治験薬が投与された被験者79名とした。同治験は二重盲検・多施設共同・無作為化・プラセボ対照のデザインで、医薬品の臨床試験の実施に関する基準（GCP：Good Clinical Practice）遵守下で、科研製薬株式会社の依頼に基づき2001年～2004年に実施された。被験歯には、ハイドロキシプロピルセルロース（HPC）を基材としたプラセボ（0%）、0.03%、0.1%、0.3%の何れかの濃度の FGF-2 を含有する治験薬がフラップ手術時に単回投与され、それぞれの歯周組織再生状態が比較・検討され、0.3% FGF-2 投与群で統計学的に有意な歯槽骨の増加が認められている⁵⁾。

2. 研究組織および研究デザイン

KCB-1D 探索的試験⁵⁾を実施した13施設の研究責任者が臨床研究施設の被験者の診療録などの診療情報から、臨床治験最終観察日から本研究調査実施日までの間に被験歯にみられた歯周病の再発や予後に関わる各種事象の発生日と発生状況を追跡可能な限り調査した。その後、研究代表者（村上伸也）が各施設の研究責任者から匿名化されたデータの提供を受け、各種濃度の FGF-2 あるいはプラセボが投与された被験歯における各種事象の発生頻度や程度を比較・解析した。なお、本研究に必要な KCB-1D 探索的試験⁵⁾の成績は、科研製薬株式会社から研究代表者に提供された。

3. 調査実施手順

各臨床研究施設の研究責任者あるいは主治医等の研究分担者は、所属研究施設の診療録等の診療情報より、治験薬投与36週後の KCB-1D 探索的試験⁵⁾の最終観察日から本研究調査日までの期間に被験歯（治験薬を投与した歯）に対して行った治療もしくは被験歯に生じた事象（以下、治療等）のうち(1)～(6)に該当するものとその時期（年月日）を調査した。そして、さらに、(1)～(5)については、当該治療等の発生が治験薬投与部位の歯周炎の悪化に起因するか否かを各臨床研究施設の研究責任者あるいは研究分担者が判定した。調査内容は調査票に記載され、匿名化されて研究代表者へ提出された。なお、各施設の研究責任者あるいは研究

分担者の判定の妥当性については別途設置した委員会で評価・確認された。

- (1) 抜歯（治験薬投与部位を有する歯根の抜去を含む）
- (2) 歯周組織再生療法（エナメルマトリクスタンパク：EMD を用いた歯周組織再生療法、歯周組織再生誘導法：GTR 法等）
- (3) 歯周組織再生療法を除く歯周外科手術
- (4) 積極的な介入をした非外科的歯周治療（歯肉縁下の処置を目的としたスケーリング・ルートプレーニング、局所抗菌薬投与等）
- (5) その他、歯周炎の進行が原因となって生じた事象（逆行性歯髄炎等）
- (6) 異常な歯周組織の治療（歯肉増殖等）が疑われる所見

4. 統計解析

上記の(1)～(5)の治療等うち、治験薬投与部位の歯周炎の悪化に起因する治療等であると判定されたものをイベント、それ以外を打ち切りとして、生存時間解析を行った。なお、観察期間内に同一被験歯に治療等が複数存在する場合には、最初に発生した治療等をイベントもしくは打ち切りとして扱った。また、観察期間内に治療等が認められなかった被験者のうち、現在は来院していない被験者は診療情報が最後に得られた日を打ち切り日に、そして、現在も来院している被験者は調査実施日を打ち切り日とした。

5. 倫理的対応

本研究は、「臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日厚生労働省告示第415号）」を遵守して実施され、実施前に各研究施設の倫理委員会もしくはそれに相当する組織の承認を得た。本研究は被験者に対する介入を伴わない既存の診療情報のみを用いた観察研究であるため、被験者に対するインフォームド・コンセントは各研究施設が必要と判断した場合にのみ取得した。そして、インフォームド・コンセントの取得が必要ではないと判断された場合においては、本研究の概要を各臨床研究施設のホームページ等で公開した。

結 果

1. 被験者の構成

被験者構成を図1に示す。治験薬投与が行われた被験者79名の中で、25名は転院等によって調査実施日までの診療情報の一部が得られなかったため治療等が発

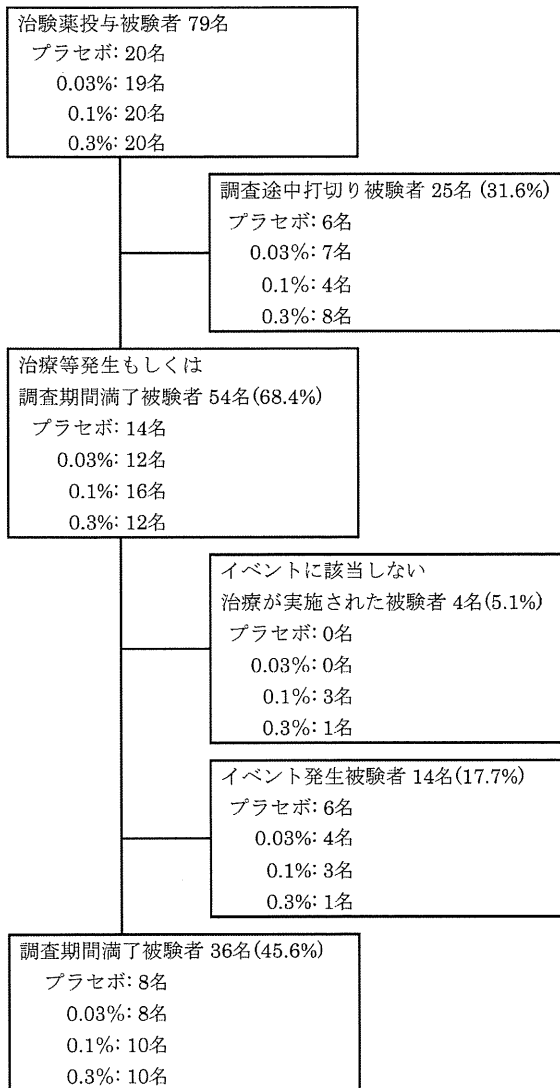


図1 被験者構成

生じたか否かを十分に判断できない調査途中打ち切り被験者であった。残りの54名の中で、イベント発生被験者は14名、イベントに該当しない治療等（治療計画上の積極的な抜歯、根尖性歯周炎のための歯根端切除術等）により打ち切りとなった被験者は4名、そして、調査実施日までイベントの発生やイベントに該当しない治療の実施がなかったことが診療情報から確認できた調査期間満了被験者は36名であった（図1）。

2. 各群の被験者、被験歯および試験部位の特性と観察期間

KCB-1D 探索的試験⁵⁾参加時の被験者の性別や年齢、被験歯の歯種および試験部位の骨吸収等の臨床所

表1 各群の治験薬投与日から最後に被験歯を観察した日までの期間

	中央値(日)	範囲(最小-最大)
プラセボ投与群(20名)	2,887	714-3,143
0.03%FGF-2投与群(19名)	2,879	263-3,093
0.1%FGF-2投与群(20名)	2,886	168-3,150
0.3%FGF-2投与群(20名)	2,868	249-3,122

見にて記すべき群間の偏りは認められていない。そして、治験薬投与日から最後に被験歯を観察した日までの期間も、全ての群で同程度であった（表1）。

3. イベント

各群で発生したイベントの内容と発生数を表2に示す。イベントが発生した14名の中で、積極的な介入をした非外科的歯周治療の発生数が7名と最も多かった。続いて、歯周組織再生療法（EMD, GTR等）が3名と多く、抜歯と歯周組織再生療法を除く歯周外科手術がそれぞれ2名であった。その他、歯周炎の進行が原因となって生じた事象は全ての群で発生しなかった。また、各群のイベントの発生数は、プラセボ群6名、0.03%群4名、0.1%群3名、0.3%群1名であった（図1および表2）。

4. 生存時間解析

治験薬投与日（0日目）からの経過日数に対するイベント未発生率を表すKaplan-Meier曲線を図2に示す。生存時間解析の結果、0.3% FGF-2投与群はプラセボ群に比べてイベント発生までの期間の有意な延長が認められた（一般化Wilcoxon検定：p=0.0345）。すなわち、0.3%FGF-2投与群では投与後2800日（約7.6年）程度で1名にイベントが発生し、観察期間の最終的なイベント未発生率は約80%であった。これに対してプラセボ群では、投与後2000日（約5.4年）まではイベント未発生率80%を維持していたものの、それ以降にイベント発生が増加し、最終的なイベント未発生率は約60%であった（図2）。

5. 安全性

本研究の観察期間中に、被験歯に異常な歯周組織の治癒（歯肉増殖等）が疑われる所見は認められなかった。

表2 発生したイベントと各群における発生数

(1)抜歯 (治験薬投与部位を有する歯根の抜去を含む)	全体 2名 (2.5%) プラセボ: 1名 0.03%: 0名 0.1%: 1名 0.3%: 0名
(2)歯周組織再生療法 (EMD, GTR等)	全体 3名 (3.8%) プラセボ: 2名 0.03%: 1名 0.1%: 0名 0.3%: 0名
(3)歯周組織再生療法を除く歯周外科手術	全体 2名 (2.5%) プラセボ: 0名 0.03%: 0名 0.1%: 2名 0.3%: 0名
(4)積極的な介入をした非外科的歯周治療 (歯肉縁下の処置を目的としたスクレーピング・ルートプレーニング, 局所抗菌薬投与等)	全体 7名 (8.9%) プラセボ: 3名 0.03%: 3名 0.1%: 0名 0.3%: 1名
(5)その他, 歯周炎の進行が原因となつて生じた事象(逆行性歯髄炎等)	全体 0名 (0%) プラセボ: 0名 0.03%: 0名 0.1%: 0名 0.3%: 0名
合計	全体14名 (17.7%) プラセボ: 6名 0.03%: 4名 0.1%: 3名 0.3%: 1名

考 察

現在, 進行した歯周炎に対する歯周外科処置としては, 組織付着療法に分類されるフラップ手術が標準的治療法として施行されている。フラップ手術は, 歯根面および歯周ポケット内部に蓄積した細菌および細菌由来病原物質を汚染セメント質とともに除去することが可能であり, 術後には, 炎症の軽減, 臨床的アタッチメントの獲得, 歯周ポケットの減少が認められる⁷⁾。しかしながら, フラップ手術単独では, 本来の歯周組織に見られる歯槽骨, 歯根膜およびセメント質の新生を伴う線維性付着はわずかしか形成されず, 歯周組織の再生はほとんど期待できない。また, 臨床的アタッチメントの獲得も長い上皮性付着の形成によることが多く⁸⁾, 長期的には再度の付着喪失を伴う歯周炎の再発が懸念される。そのため, フラップ手術等の従来の

歯周外科処置では達成できない歯周組織の再生に対する臨床現場の期待は非常に大きく, 盛んに研究開発が行われてきた。そして現在, 歯周組織再生誘導法 (GTR 法) およびエナメルマトリックスタンパク (EMD) を用いた歯周組織再生療法が我国で臨床適応されており, 米国では血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) と骨補填材である多孔性リン酸三カルシウム (β -tricalcium phosphate; β -TCP) との合剤がヒト型リコンビナントサイトカインを用いた歯周組織誘導材料として登場している⁹⁾。しかしながら, これらの方法は, 治療成績が術者の技術レベルに大きく左右されたり, 動物由来製剤であったりといった問題点から, 重度歯周炎に対する標準的治療法となり得る歯周組織再生誘導薬の開発が強く求められている。そこで, 我々は, 様々な細胞に対する生理活性を有する FGF-2 を, 歯周組織再生誘導薬の有力な候補の一つと考え, その歯周組織誘導能の動物実験²⁻⁴⁾による確認を経て, 3, 2 壁性歯槽骨欠損を有する歯周炎患者を対象とした第 II 相臨床試験^{5, 6)}を展開してきた。その結果, FGF-2 投与 36 週後において, 通常のフラップ手術と同程度の付着を獲得するとともに有意な歯槽骨新生がもたらされたことから, FGF-2 の歯周組織再生誘導薬としての有用性が強く示唆されている。そこで, 本研究では, 歯周組織再生療法の真の目的が長期的な歯の保存であることを考慮し, 投与 36 週後において歯周組織再生誘導薬としての有用性が確認された FGF-2 のさらに長期的な効果と安全性を検討するため, 第 II 相臨床試験の中でも臨床試験終了後の経過期間が約 8 年と長期に及ぶ KCB-1D 探索的試験⁵⁾に参加した被験者を対象として, フラップ手術時に各種濃度の FGF-2 あるいはプラセボを投与した歯の長期経過を調査した。

歯周組織の再生を歯槽骨, セメント質, 歯根膜などの再生と定義¹⁰⁾すれば, これらの組織の再生を直接かつ明確に確認する唯一の方法は組織学的評価である。しかしながら, ヒトでの組織学的な評価は倫理的な観点から困難を極めるため, 一般的に臨床試験では, 規格エックス線写真による歯槽骨レベルの評価や臨床的アタッチメントレベル (CAL) の測定が歯周組織再生を評価する代替評価項目として利用される¹⁰⁾。しかしながら, 数年を超える長期の臨床経過の追跡では, その間に咬耗・摩耗や修復処置による歯冠形態の変化や歯の移動が生じるケースが多く, X 線検査の規格化や一定の基準点を設定した CAL の測定は, 実際には不可能な場合が多い。そこで, 本研究では, 一連の動的な歯周治療を受けサポータティブペリオドンタルセラピーを受けている被験者では, 歯周炎の治療経過が悪

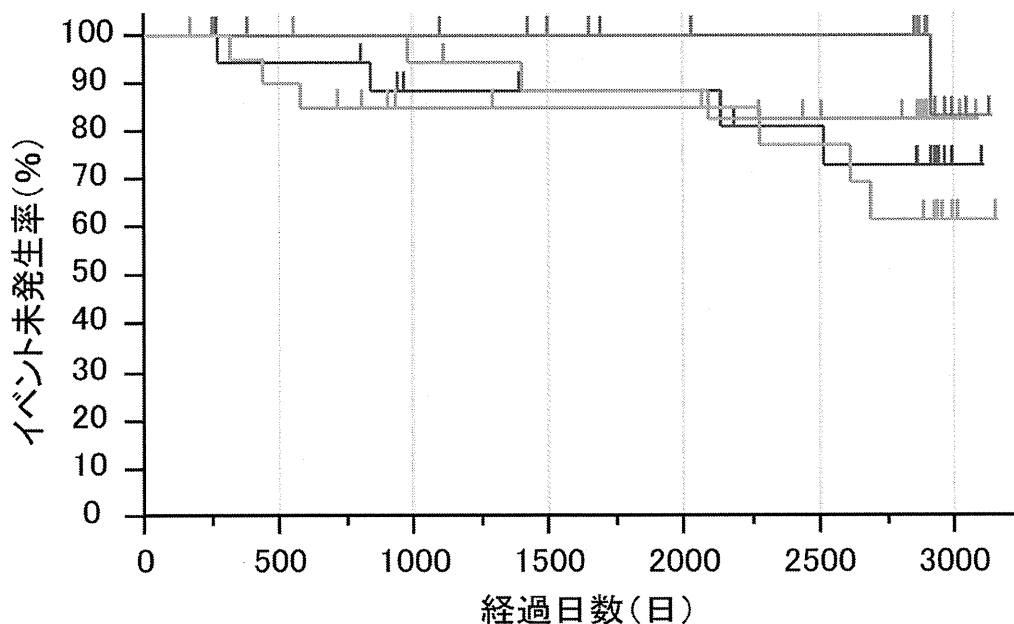


図2 イベント未発生率を表す Kaplan-Meier 曲線

赤：0.3%FGF-2 投与群，緑：0.1%FGF-2 投与群，青：0.03%FGF-2 投与群，桃：プラセボ投与群。各群の Kaplan-Meier 曲線上のヒゲは打ち切りを表す。生存時間解析の結果，0.3%FGF-2 投与群はプラセボ群に比べてイベント発生までの期間の有意な延長が認められた（一般化 Wilcoxon 検定： $p=0.0345$ ）。

く抜歯に至るケースでも抜歯に至る前に歯周外科的処置や歯周ポケットに対する非外科的な処置が通常行われることにヒントを得て，表2に示した(1) 抜歯，(2) 歯周組織再生療法，(3) 歯周組織再生療法を除く歯周外科手術，(4) 積極的な介入をした非外科的歯周治療(5) その他，歯周炎の進行が原因となって生じた事象をイベントとして，FGF-2 投与の長期的効果を判定する評価指標とした。

本研究では，転院等によって診療情報の一部が得られなかったため観察期間に治療等が発生したか否かを十分判断できなかった被験者は全被験者(79名)の約30%(25名)であった(図1)。しかしながら，KCB-1D 探索的試験⁵⁾で割り付けられた被験者の背景情報および調査途中打ち切り被験者数に大きな群間の偏りがなく，本研究における各群の観察期間が各群で同程度であったことから(表1)，各群の被験者の一般的特性が結果に大きな影響を与えることはなかったと考えられる。

観察期間における各群のイベントの発生数は，プラセボ群6名，0.03%群4名，0.1%群3名，0.3%群1名と，高濃度の FGF-2 を投与した群ほど低かった(図1および表2)。さらに，生存時間解析の結果においても，0.3% FGF-2 投与群がフラップ手術単独施行に相

当するプラセボ群に対して有意にイベント発生までの時間を延長させることが示され，0.3%FGF-2 投与が，歯周炎の再発・悪化のリスクを長期的に低減することが示唆された(図2)。

本研究で被験歯に歯周炎の悪化による抜歯を認めたのは約2.5%(2歯)で，当初予想した通り非常に少なかった。Palcanis¹¹⁾はフラップ手術を含む歯周外科処置が歯の長期的な保存に与える影響を総説として報告している。この総説によると，Ramfjord ら¹²⁾は，歯周外科処置を行った1800歯の5年間の経過観察によって22歯(約1.2%)が抜去されていたことを報告しているが，その他の多くの長期観察では抜歯はほとんど認められていない。また，5年未満の観察では，フラップ手術後の臨床的アタッチメントの喪失は多くの場合1mm未満であり，5年程度の経過観察ではフラップ手術と FGF-2 投与群との術後のイベント発生に大きな違いを認めなかったという本研究の結果と合致する。今回対象とした被験者が参加した KCB-1D 探索的試験⁵⁾の結果を受け2005年～2007年に実施された KCB-1D 用量反応試験⁶⁾における同様の観察では，観察期間が約5年間と本研究の観察期間の8年より短く，イベントの発生に統計学的に有意な群間差を認めていない(結果未発表)。以上の結果から，治療に