

平成 22 年度

次世代医療機器評価指標作成事業

再生医療審査 WG 報告書

再生医療審査 WG 座長

大阪大学大学院医学系研究科

脳神経感覚器外科学（眼科学）

西田 幸二

# 目 次

## I. 次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG 委員名簿

## II. 平成 22 年度 WG 会議議事概要

## III. 歯周組織治療用細胞シートに関する評価指標(案)

## IV. 調査事項

- |   |       |
|---|-------|
| 1. 歯科再生治療の現状：組織修復と臓器置換型再生治療                     | 辻 孝   |
| 2. 骨の再生について                                     | 山口 朗  |
| 3. 歯周組織再生治療における細胞移植について                         | 和泉 雄一 |
| 4. 自己骨髄幹細胞移植による歯周組織再生治療と課題について                  | 栗原 英見 |
| 5. リコンビナントサイトカインを用いた歯周組織再生誘導<br>—開発の現状、課題、将来展望— | 村上 伸也 |
| 6. 細胞シートの内外の動向について                              | 岩田 隆紀 |

## V. 参考資料

- |  |       |
|--|-------|
| 1. ヒト（自己・同種）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針<br>1-1. 平成 20 年 9 月 12 日付「平成 20 年 2 月 8 日付 ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保についての修正後の通知」<br>1-2. 平成 20 年 9 月 12 日付「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」 |       |
| 2. 歯周組織を含めた歯の構造および細胞治療について   | 和泉 雄一 |
| 3. 骨膜シートを用いた刺繍組織の再生について  | 吉江 弘正 |
| 4. 歯根膜シートを用いた歯周組織の再生について   | 岩田 隆紀 |
| 5. 細胞やサイトカインを使用した歯周病治療について   | 村上 伸也 |
| 6. 自己骨髄幹細胞移植による歯周組織再生治療と課題   | 栗原 英見 |

**I. 次世代医療機器評価指標作成事業  
再生医療審査 WG 平成 22 年度委員名簿**

**次世代医療機器評価指標作成事業  
再生医療審査 WG 平成 22 年度委員名簿（敬称略）**

**座長**

西田幸二 大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学(眼科学) 教授

**委員（五十音順）**

和泉雄一 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 教授

岩田隆紀 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 特任講師

辻 孝 東京理科大学 総合研究機構 教授

村上伸也 大阪大学大学院歯学系研究科 口腔分子免疫制御学講座 教授

山口 朗 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔病理学分野 教授

吉江弘正 新潟大学医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座 教授

**オブザーバー**

栗原英見 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野 教授

**厚生労働省**

関野秀人 厚生労働省 医療機器審査管理室 室長

東健太郎 厚生労働省 医療機器審査管理室 新医療材料専門官

牧村知美 厚生労働省 医療機器審査管理室 認証係長

吉成知也 厚生労働省 医療機器審査管理室 技官

**独立行政法人 医薬品医療機器総合機構**

鹿野真弓 医薬品医療機器総合機構 生物系審査第二部 部長

馬場俊輔 医薬品医療機器総合機構 生物系審査第二部 主任専門員

磯部総一郎 医薬品医療機器総合機構 審査マネジメント部 部長

長瀬喜則 医薬品医療機器総合機構 審査マネジメント部 医療機器基準課

**国立医薬品食品衛生研究所（事務局）**

松岡厚子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 部長

澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第三室 室長

加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官

## II. 平成 22 年度 WG 会議議事概要

次世代医療機器評価指標策定事業再生医療審査 WG  
平成 22 年度第一回会議議事録（概要）

1. 開催日時： 2010 年 9 月 24 日（金） 10 時～12 時
2. 開催場所： オフィス東京 C5 会議室
3. 出席者（座長以下五十音順・敬称略）  
委員：西田 幸二（大阪大学）、和泉 雄一（東京医科歯科大学）、岩田 隆紀（東京女子医科大学）、辻 孝（東京理科大学）、村上 伸也（大阪大学）、山口 朗（東京医科歯科大学）、吉江 弘正（新潟大学）  
厚生労働省：関野 秀人、東 健太郎、牧村 知美、吉成 知也  
医薬品医療機器総合機構：馬場 俊輔  
オブザーバー：中岡 竜介（国立衛研）  
事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：松岡 厚子、澤田 留美、加藤 玲子
4. 配布資料
  1. 平成 22 年度第一回委員会議事次第
  2. 平成 22 年度委員名簿
  3. 再生医療審査 WG 平成 21 年度報告
  4. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知：平成 22 年 1 月 18 日付薬食機発 0118 第 1 号「次世代医療機器評価指標の公表について」
    - ・ 別添 3 「重症心不全細胞治療用細胞シートに関する評価指標」
    - ・ 別添 4 「角膜上皮細胞シートに関する評価指標」
  5. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知：平成 22 年 5 月 28 日付薬食機発 0528 第 1 号「次世代医療機器評価指標の公表について」
    - ・ 別添 1 「角膜内皮細胞シートに関する評価指標」

平成 21 年度次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療審査 WG 報告書

5. 議事内容
  - ①平成 17～21 年度における WG 活動内容についての説明が事務局より報告された。

②平成 22 年度の座長及び委員による自己紹介が行われた。委員は下記の通り。（敬称略）

**座長**

西田 幸二 大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学(眼科学) 教授

**委員**（五十音順）

和泉 雄一 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 教授

岩田 隆紀 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 特任講師

辻 孝 東京理科大学 総合研究機構 教授

村上 伸也 大阪大学大学院歯学系研究科 口腔分子免疫制御学講座 教授

山口 朗 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔病理学分野 教授

吉江 弘正 新潟大学医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座 教授

③平成 22 年度の活動方針について討議した。

次世代医療機器評価指標策定事業再生医療審査 WG  
平成 22 年度第二回会議議事録(概要)

1. 開催日時: 2010 年 11 月 9 日(火) 15 時~17 時
2. 開催場所: オフィス東京 L4 会議室
3. 出席者(座長以下五十音順・敬称略)  
委員: 西田 幸二(大阪大学)、和泉 雄一(東京医科歯科大学)、岩田 隆紀(東京女子医科大学)、辻 孝(東京理科大学)、村上 伸也(大阪大学)、山口 朗(東京医科歯科大学)、吉江 弘正(新潟大学)  
厚生労働省: 関野 秀人、東 健太郎、牧村 知美、吉成 知也  
医薬品医療機器総合機構: 馬場 俊輔、長瀬 喜則  
産業技術総合研究所: 廣瀬 志弘、安佛 尚志  
オブザーバー: 中岡 竜介(国立衛研)  
事務局(国立医薬品食品衛生研究所): 松岡 厚子、澤田 留美、加藤 玲子
4. 配布資料
  1. 平成 22 年度第二回委員会議事次第
  2. 平成 22 年度第一回委員会議事録(概要)
  3. 「製品の品質管理」と「非臨床試験」について(岩田委員作成)
  4. 「臨床試験(治験)について」(吉江委員作成)
  5. 平成 22 年 4 月 40 日付薬食審査発 0420 第 1 号「細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確認申請書の記載要領について」
5. 議事内容
  - ① 各委員にそれぞれのご専門についてご発表して頂いた。

- 歯周組織を含めた歯の構造および細胞治療について	和泉委員
- 骨膜シートを用いた歯周組織の再生について	吉江委員
- 歯根膜シートを用いた歯周組織の再生について	岩田委員
- 細胞やサイトカインを使用した歯周病治療について	村上委員



② 評価指標素案たたき台を岩田委員および吉江委員に説明していただきながら、全委員にて討議した。

- ・ 今回対象とする歯周組織治療用細胞シートは下記の通りである。

＜シートの種類＞

- 1:細胞のみからなるシート
- 2:細胞とスキャフォールドからなるシート

＜細胞ソース＞

- 1:骨膜シート
- 2:歯根膜シート
- 3:骨髄由来間葉系幹細胞シート
- 4:脂肪由来間葉系幹細胞シート

- ・ 今回の評価指標素案では、製品の安全性試験、効能試験(作用機序に即した効能の試験)、非臨床試験(使用する動物、どのようなモデル系で行うのか等)について、それぞれ歯周組織治療用細胞シートに特化した内容を記載する。
- ・ 臨床試験(治験)に関しては対象疾患を含めて、次回再度討議することになった。

③ 第三回会議では、広島大学 大学院 医歯薬学総合研究 歯周病態学分野 栗原英見先生よりご講演していただく予定。

④ 今後の会議日程

- 第三回会議 : 平成 22 年 12 月 17 日(金) 10 時～12 時 オフィス東京にて  
第四回会議 : 平成 23 年 3 月 10 日(木) 15 時～17 時 オフィス東京にて

次世代医療機器評価指標策定事業再生医療審査 WG  
平成 22 年度第三回会議議事録(概要)

1. 開催日時： 2010 年 12 月 17 日(金) 10 時～12 時
2. 開催場所： オフィス東京 L4 会議室
3. 出席者(座長以下五十音順・敬称略)  
委員：西田 幸二(大阪大学)、和泉 雄一(東京医科歯科大学)、岩田 隆紀(東京女子医科大学)、辻 孝(東京理科大学)、村上 伸也(大阪大学)、山口 朗(東京医科歯科大学)、吉江 弘正(新潟大学)  
厚生労働省：関野 秀人、牧村 知美、吉成 知也  
医薬品医療機器総合機構：馬場 俊輔、長瀬 喜則  
産業技術総合研究所：本間 一弘、廣瀬 志弘、安佛 尚志  
オブザーバー：中岡 竜介(国立衛研)  
事務局(国立医薬品食品衛生研究所)：澤田 留美、加藤 玲子
4. 配布資料
  1. 平成 22 年度第三回委員会議事次第
  2. 平成 22 年度第二回委員会議事録(概要)
  3. 「製品の品質管理」と「非臨床試験」について(岩田委員、吉江委員、村上委員作成)
  4. 「臨床試験(治験)」について(吉江委員作成)
  5. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知：平成 22 年 12 月 15 日付薬食機発1215第 1 号「次世代医療機器評価指標の公表について」  
別添1「関節軟骨再生に関する評価指標」
5. 講演  
「自己骨髄幹細胞移植による歯周組織再生治療と課題」  
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 教授  
栗原 英見 先生
6. 議事内容
  - ① 評価指標素案たたき台を岩田委員、村上委員および吉江委員にご説明していただきながら、全委員にて討議した。

- ・ 今回、細胞ソースを四つ(骨膜、歯根膜、骨髄由来間葉系幹細胞、脂肪由来間葉系幹細胞)取り扱うが、マーカーに関しては、本文中には「ーについて適切なマーカー」と記載し、**appendix** に具体例を列挙する。
- ・ 非細胞材料について具体例をあげる。(フィブリン、アテロコラーゲン、beta-TCP、リン酸カルシウムなど)
- ・ 移植した細胞がどういう作用機序で再生機能を果たしているか、分かっている範囲で明確にする。(移植細胞本体が組織の再生を行うのか、分泌するサイトカインが再生を促しているのかなど)
- ・ 効能評価についても具体例を **appendix** に例示する。
- ・ 非臨床試験は歯周病に特化したもののみ記載する。
- ・ 臨床試験の評価項目に関しては、委員の中で合意が得られているものは本文に記載し、それ以外の項目は **appendix** 例示する。
- ・ 観察期間については整合性と取って結論を出す。
- ・ 既存治療についても例をあげる。
- ・ 用語の定義に関しては、抽出された用語を歯周病学会用語集から抜粋したものを、村上先生に一般向けに加筆修正していただく。

## ② 今後の会議日程

第四回会議：平成23年3月10日(木) 15時～17時 オフィス東京にて

次世代医療機器評価指標策定事業再生医療審査 WG  
平成 22 年度第四回会議議事録(概要)

1. 開催日時: 2011 年 03 月 10 日(木) 15 時～17 時
2. 開催場所: オフィス東京 L4 会議室
3. 出席者(座長以下五十音順・敬称略)  
委員: 西田 幸二(大阪大学)、和泉 雄一(東京医科歯科大学)、岩田 隆紀(東京女子医科大学)、村上 伸也(大阪大学)、山口 朗(東京医科歯科大学)、吉江 弘正(新潟大学)  
栗原 英見 先生(広島大学)  
厚生労働省: 関野 秀人、東 健太郎、間宮 弘晃  
医薬品医療機器総合機構: 馬場 俊輔、長瀬 喜則  
産業技術総合研究所: 本間 一弘、廣瀬 志弘、安佛 尚志  
事務局(国立医薬品食品衛生研究所): 松岡 厚子、澤田 留美、加藤 玲子
4. 配布資料
  1. 平成 22 年度第四回委員会議事次第
  2. 平成 22 年度第三回委員会議事録(概要)
  3. 歯周組織治療用細胞シートに関する評価指標(案) 事務局たたき台
  4. 「製品の品質管理」と「非臨床試験」について
  5. 「臨床試験(治験)」について
5. 議事内容  
前回の討議内容を踏まえて修正した評価指標素案たたき台を岩田委員、村上委員および吉江委員にご説明していただきながら、全委員にて討議した。
  - ・ 全体を通して、歯周組織治療に特化した内容のみの記載となるよう確認した。
  - ・ 本評価指標素案で取り扱う細胞シートは、細胞のみから形成されるシートだけでなく、細胞と支持体が結合してシート状の形態を呈したものを包括することを再確認し、同意が得られた。
  - ・ 確認試験、純度試験、効能試験において、採取細胞を未分化のまま使用するか、分化させてから使用するかで、指標を分けて記載することとなった。
  - ・ 特に支持体と細胞を結合させて移植する場合、移植体の品質基準を設けておいた方がいいとの意見があり、最終製品としての物性や性状を確認する旨の一文を追記することとなった。

- ・ 臨床以外の項目からも用語の定義が必要と考えられるものを抽出し、前回と同様に歯周病学会用語集からその説明を抜粋した後、村上先生に一般向けに加筆修正していただくこととなった。

以上を踏まえた上で、再度修正を行い、メーリングリスト等を用いて全委員の了承が得られた文書を本 WG の評価指標素案とし報告書に掲載することで合意が得られた。

### III. 歯周組織治療用細胞シートに関する評価指標（案）

1. はじめに
2. 本評価指標の対象
3. 本評価指標の位置づけ
4. 用語の定義
5. 評価にあたって留意すべき事項
  - (1) 製品の品質管理
  - (2) 非臨床試験
  - (3) 臨床試験（治験）
6. 参考文献

## 歯周組織治療用細胞シートに関する評価指標（案）

### 1. はじめに

ヒト由来細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器（以下「細胞・組織加工医薬品等」という。）の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、平成20年2月8日付薬食発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）、平成20年9月12日付薬食発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）に示されているところである。本評価指標は、歯周組織破壊を伴う歯周疾患（歯周炎）等の治療を目的として適用される医療機器であって細胞シート状の製品（支持体が含有された製品を含む。）について、上述の基本的要件に加えて留意すべきものを示すものである。

### 2. 本評価指標の対象

本評価指標は、歯周組織破壊を伴う歯周疾患（歯周炎）等の治療を目的として適用されるヒト骨膜細胞加工医療機器、ヒト歯根膜細胞加工医療機器、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞加工医療機器及びヒト脂肪由来間葉系幹細胞加工医療機器のうち細胞シート状の製品（支持体が含有された製品を含む。以下同じ。）について、基本的な技術要件に加えて品質、有効性及び安全性の評価にあたって留意すべき事項を示すものである。現時点ではヒト ES 細胞、iPS 細胞等の多能性幹細胞由来の製品及び異種細胞・組織由来の製品は本評価指標の対象とはしない。

なお、開発する製品が医療機器に該当するか判断し難い場合には、必要に応じ、厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室に相談すること。

### 3. 本評価指標の位置づけ

細胞・組織加工医療機器の種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、また本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩であることから、本評価指標が必要事項すべてを包含しているとみなすことが必ずしも適切でない場合もある。

従って、本評価指標は申請内容に関して拘束力を有するものではなく、個々の細胞・組織加工医療機器についての試験の実施や評価に際しては、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースで柔軟に対応することが必要である。

なお、本評価指標の他、ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針、ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針及び国内外のその他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

### 4. 用語の定義

本評価指標における用語の定義はヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針及びヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針の定義による他、以下のとおりとする。

- (1) 歯周組織：歯の機能を支持する歯の周囲の組織。歯肉、歯根膜、セメント質、歯槽骨からなる。歯の頸部を取り囲み歯槽突起を被覆する歯肉、歯根と歯槽骨との間に存在する歯根膜、象牙質の表面を覆いシャーピー線維を内部に封入するセメント質、さらに歯槽を形成し、シャーピー線維を骨内に埋入して歯を固定する歯槽骨である。
- (2) 硬組織：口腔内の硬組織は、歯か歯周組織に分類される。歯に属すものは、歯の本体をなす象牙質と歯冠部の象牙質を被覆するエナメル質である。歯周組織に属すものは、歯を支える歯槽骨と歯根部の象牙質を被覆するセメント質である。従って、歯周組織再生の対象となる硬組織は歯槽骨とセメント質となる。
- (3) 歯周基本治療：歯周病に対する治療の一つ。歯周外科手術に先立って行われる。歯周基本治療の主目的は、原因である細菌性バイオフィーム（デンタルプラーク）のみならず様々な誘因を除去することにより、歯周組織の炎症を取り除き、歯周病の進行を停止させることにある。歯周病治療における中心的な位置づけをなし、初期治療（initial preparation）とも呼ばれる。
- (4) 細胞シート：細胞同士、または細胞と支持体が結合してシート状の形態を呈したものをいう。
- (5) 支持体：細胞をシート状に形成するための足場となるものをいい、移植・投与される細胞シート製品に含有されるか否かを問わない。なお、支持体の原料として生物由来の原材料が用いられる場合もある。
- (6) 組織付着療法：上皮組織あるいは結合組織の歯根面に対する付着（アタッチメント）を促す歯周外科手術を指す。フラップ手術がこれに含まれる。
- (7) 臨床的アタッチメントゲイン：上皮組織および結合組織の歯根面に対する付着（アタッチメント）の獲得。臨床的には、上皮組織と結合組織の付着の違いを区別することは出来ない。歯周組織の炎症などによりアタッチメントが喪失し、そのレベル（歯肉溝あるいはポケットの底部）が根尖方向に移動することをアタッチメントロスといい、一度喪失したアタッチメントが歯周治療などにより同レベルが歯冠側へ移動することをアタッチメントゲインという。
- (8) 歯槽骨（同義語：歯槽突起）：上・下顎骨のうち歯槽を構成し歯を支持している部分。解剖学的には上顎骨の歯槽突起、下顎骨の歯槽部をさす。歯槽骨の厚さは、前歯部では、前庭側の骨質が薄く、歯根の外形に一致した骨面の豊隆歯槽隆起がみられ、歯槽壁が欠如している部分もある。舌側は、一般に歯槽壁が厚く、下顎ではいっそう厚くなる傾向が強い。歯周組織再生を評価する上で、規格 X 線写真による新生歯槽骨量の計測は、臨床上最も客観的な指標となり得る。



- (9)プロービングデプス:歯周プローブを用いて歯肉溝やポケット内を探索すること。プローブ挿入圧は20~25g前後で、アタッチメントレベル、歯肉縁下のプラークや歯石の有無、病的歯根面の形態を知ることができる。歯軸に平行に上下的に動作する垂直的プロービングと、根分岐部病変部において頬舌側から挿入する水平的プロービングがある。プロービングにより計測された歯肉溝あるいはポケット底部から歯肉縁(歯肉の最歯冠側の位置)までの距離をプロービングデプスとよぶ。
- (10)歯肉退縮:辺縁歯肉の位置が根尖側方向へ移動し、歯根表面が露出した状態。歯周炎の進行、加齢的原因、誤ったブラッシングによる機械的刺激などによって生じる。また、重度歯周炎に対する歯周治療後にも生じやすく、臨床的に問題となる。歯根表面が露出すると、齶蝕、摩耗、象牙質知覚過敏が生じることがある。

## 5. 評価に当たって留意すべき事項

### (1) 製品の品質管理

#### ①最終製品の性状

本製品は間葉系組織より採取された細胞を培養し、硬組織形成能を持つ間葉系幹細胞を含む前駆細胞から構成される培養細胞群である。個々の細胞は位相差顕微鏡にて線維芽細胞様を呈することを確認する。例えば、歯根膜、骨膜、骨髄、脂肪組織由来等の接着細胞、もしくはこれらの細胞と支持体(フィブリンやコラーゲングル等)を組み合わせたものが考えられその際の最終製品としての移植体の物性や性状を確認する。

#### ②細胞数および生存率

回収した細胞シートを酵素処理し、細胞数ならびに生存率(トリパンブルー染色陰性率など)を算出する。<sup>\*1</sup>

#### ③確認試験

目的とする体内での有効性(骨やセメント質等の硬組織形成能、ならびに歯根膜形成能など)を達成し、かつ安全性上の問題(意図しない分化、過形成、異常増殖など)を可能な限り回避するとともに、一定の品質及び安全性を保持するために必要な、最終製品中の細胞の特性解析指標を定め、これらを用いて最終製品中の細胞が目的の細胞であることを確認すること。細胞特性解析指標としては、形態学的評価、表現系特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、多分化能などが挙げられ、必要に応じて試験項目・試験方法・判断基準を設定すること。なお、歯周組織を再生するための細胞群は、硬組織や靱帯様組織を再生しうる前駆細胞であることが望ましい。細胞表面抗原としてはいわゆる間葉系幹細胞のマーカーといわれるCD29、CD44、CD90、CD105陽性、CD14、CD34、CD45陰性を示す。ただし、硬組織誘導能の無い線維芽細胞でも同様の表現系を示すため、歯周組織を再生しうる細胞特異的な表面マーカーとは言い難い。これらの細胞表面抗原をいくつか組み合わせることにより、間葉系由来の細胞を表現する指標とはなりうるが、有効性と関連する遺伝子発現などを別途確認する。<sup>\*2</sup>細胞を分化させて用いる

場合には分化誘導の指標を設定し確認する。

#### ④細胞の純度試験

混入細胞（たとえば歯肉線維芽細胞、血管内皮細胞等やその他の採取時に混入する可能性のある細胞）、未分化細胞または脱分化細胞、異常増殖細胞、形質転換細胞といった目的細胞以外の細胞の検出及びその安全性を確認する試験方法及び判断基準を設定する。<sup>\*2</sup> ③に記載した間葉系幹細胞マーカーや、細胞を分化させて用いる場合には分化誘導の指標を用いて移植する細胞純度を確認する。

#### ⑤非細胞材料および最終製品の生体適合性

歯周組織の再生では三次元的な組織再生を最終目的としているため、細胞と支持体（たとえばコラーゲン、リン酸カルシウム、フィブリンなど）の組み合わせを用いることが多く、このような最終製品の一部を構成するものについては生体適合性を評価する必要がある。必要に応じて規格を設定し、支持体が目的とする機能を有することを評価し、安全性（例えば、感染症や異物反応等）について説明する必要がある。非細胞材料の生体適合性については、ISO10993-1、JIS T 0993-1、または ASTM F 748-04 等を参考にすること。

#### ⑥効能試験

歯周組織再生を目的とした細胞・組織加工医療機器の最終製品の有効性を評価するためには、組織学的検討や生化学的検討を行う必要がある。未分化な細胞を移植する場合には生体内で移植した細胞が目的とする組織の再生に有効であることを確認するための試験を実施する。分化させた細胞を移植する場合には、例えば硬組織関連遺伝子の発現や、歯根膜特異的なマーカー遺伝子の発現などを確認する必要がある。<sup>\*3</sup>

## （2）非臨床試験

非臨床試験としては主に大型動物（ブタ・サルが用いられる場合もあるが主にイヌ）が用いられる。欠損モデルとしては骨内欠損モデル（1壁性、2壁性、3壁性）、分岐部モデル（Ⅱ度、Ⅲ度）、水平性クリティカルディフェクトモデルなどの様々な欠損モデルが用いられている。実験的欠損を切削器具などで作製し、その際に炎症を惹起させるマテリアルを欠損部に充填させることにより意図的な炎症モデルを作成することも可能である。少なくとも上記のいずれかのモデルにおいて歯周組織治療用細胞シートの有効性を示す必要がある。有効性の評価はX線的ならびに組織学的に、歯槽骨・歯根膜・セメント質の形態計測等により行う。安全性に関する情報も可能な限り収集する。

## （3）臨床試験（治験）

### ①対象疾患

歯周組織破壊を伴う歯周疾患で、歯周外科手術の適応となる歯周炎を有する患者を対象とする。

## ②対象部位の選択

歯周基本治療後の再評価時に、アタッチメントロスが残存し、X線写真で歯槽骨欠損が認められる部位が目安であるが、歯槽骨の骨吸収度（垂直性・水平性、進行度）や骨欠損の深さを勘案して判断する。

## ③観察・測定項目

米国歯周病学会のコンセンサスレポート<sup>1,2)</sup>などを参考にする。歯周組織再生療法の目標は歯周組織付着器官を再生させることであり、臨床的には、骨欠損がどれだけ新生骨で満たされたか、あるいは、臨床的アタッチメントの獲得がどれだけ認められたかを評価する必要がある。ただし、通常行われる組織付着療法においても上皮性付着を含む臨床的アタッチメントの獲得が認められるため<sup>3-7)</sup>、歯槽骨レベルの改善を主要な評価項目に設定して対照群と比較することが推奨される。

### a) 有効性

- 規格化撮影された歯科用 X 線写真：  
歯槽骨の計測には、歯槽骨頂のレベルや骨内欠損の深さの測定が含まれる。骨レベルの改善は、新生した骨レベルの実測値、あるいは治療前の骨欠損の深さの何パーセントが改善したかで、骨欠損の深さの変化を数値で表す等によって評価する<sup>1)</sup>。
- 規格化した臨床的アタッチメントレベル：  
臨床的アタッチメントレベルの測定は、ステント等を用いて規格化するとともに、プロービング圧の統一化などについて測定器具の選定や測定者のトレーニングを実施することが推奨される。
- 歯周検査（プロービングデプス、プロービング時の歯肉出血、歯肉炎指数、歯の動揺度、プラーク指数、プラークコントロールレコード、角化歯肉幅など）：  
治療前の歯肉炎症の程度、プロービングデプス、歯肉退縮量、プロービング時の出血および動揺度等は、治療後の臨床評価に影響を与える可能性があるため、治療群間の不均衡を確認する目的で、治療前後の情報を入手すべきである。また、臨床的アタッチメントの獲得量は、治療前のプロービングデプスの値に依存している<sup>6-10)</sup> ことを十分に認識して臨床試験計画を策案すべきである。また、評価しようとする再生療法が歯肉退縮を抑制できる可能性がある場合には、歯肉退縮も評価項目に設定することを考慮する。

### b) 安全性

全身状態の所見、口腔内所見、自覚症状の有無を確認する。また、治療後の歯周組織に、炎症、感染、過形成、過増殖などの異常所見がないか確認する。

## ④観察期間

設定時期は治療方法により異なるが、歯槽骨の骨レベルの変化がX線写真上で確認できるなど、治療方法の有用性が見られる時期を適切に設定すること。たとえば、治療前（ベースライン）と治療6か月以後<sup>11)</sup>に観察することが望ましい。

## ⑤臨床評価について

臨床データパッケージ及び治験実施計画書は、当該治療法に期待される臨床上の位置付け等に応じて、非臨床データ等も踏まえて適切に計画されるべきである。できる限り医薬品医療機器総合機構の対面助言を利用するとともに、今後、従来の確認申請が廃止され、ベンチャーやアカデミア等が有する有益なシーズを実用化するための助言や相談を開発初期から行う制度として「薬事戦略相談制度」が開始されることに留意すること。

## 6. 参考情報

### Appendix

\*<sup>1</sup> 例えば細胞外基質が豊富であり通法での細胞数や細胞生存率の測定が困難な場合は、組織学的な評価などの別の測定方法などを設定し、出荷基準を設定すること。

\*<sup>2</sup> 例えば歯根膜細胞シートの場合、歯肉線維芽細胞との選別と硬組織形成能を評価するためにアルカリフォスファターゼの FACS 試験を実施し、それに付け加え歯根膜組織特異的な遺伝子発現を確認するために *PERIOSTIN (POSTN)* 遺伝子の発現を Real-time PCR 法にて評価する。

例えば骨膜シートの場合、結合組織由来細胞との選別のために、骨芽細胞系細胞の特異的転写因子である *OSTERIX (SP7)* または *RUNX2* や最終分化マーカーである *OSTEOCALCIN (BGLAP)* などの発現を定量的 PCR 法にて評価する。また、硬組織形成能を評価するために、デキサメタゾンなどによる分化誘導処理によりアルカリフォスファターゼ活性の上昇および *in vitro* の石灰化を誘導できることを細胞組織化学的に評価する。

例えば脂肪組織由来細胞の場合、細胞の純度を高める処理の前後で、アルカリフォスファターゼ、*RUNX2*、*PLAP1* などの mRNA 発現が上昇していることを Real-time PCR で確認する。

例えば骨髄由来細胞の場合、細胞数増幅後における線維芽細胞との比較において *MMP1*、*Adrenomedullin (ADM)*、*Protein tyrosine kinase-7 (PTK7)*、*Collagen type XV α1 chain (COLXVA1)*、*tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI2)*、*Neuroserpin (SERPIN1)*、*MHC-DR-α,-β* などの遺伝子発現パターンを Real time PCR で確認する。

\*<sup>3</sup> 骨芽細胞関連遺伝子としては例えば *OSTERIX (SP7)*、*RUNX2*、*OSTEOCALCIN (BGLAP)* などが挙げられる。歯根膜関連遺伝子としては例えば *PERIOSTIN (POSTN)* や *PLAP1* などが挙げられる。

### 参考論文

- 1) The American Academy of Periodontology. Consensus Report Periodontal Regeneration Around Natural Teeth. *Annals of Periodontology* November 1996. 1996; 1(1): 667-670.
- 2) The American Academy of Periodontology. Section 7 Periodontal Regeneration Around

- Natural Teeth. *Annals of Periodontology* 1996 World Workshop in Periodontics. 1996; 1: 621-666.
- 3) Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol.* 1993; 64(4): 243-253.
  - 4) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会編 歯周病の診断と治療の指針 2007. 医歯薬出版 2007.
  - 5) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会編 歯周病の検査・診断・治療計画の指針 2008. 医歯薬出版 2008.
  - 6) The American Academy of Periodontology. Consensus Report Surgical Pocket Therapy. *Annals of Periodontology* November 1996. 1996; 1(1): 618-620.
  - 7) Laurell L, Gottlow J, Zybutz M, Persson R. Treatment of intrabony defects by different surgical procedures: a literature review. *J Periodontol.* 1998; 69(3): 303-313.
  - 8) Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, Hill RW, Kerry GJ, Appleberry EA, Nissle RR, Stults DL. Four modalities of periodontal treatment compared over five years. *J Periodontal Res.* 1987; 22(3): 222-223.
  - 9) Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol.* 1996; 67(2): 93-102.
  - 10) Becker W, Becker BE, Caffesse R, Kerry G, Ochsenein C, Morrison E, Prichard J. A longitudinal study comparing scaling, osseous surgery, and modified Widman procedures: results after 5 years. *J Periodontol.* 2001; 72(12): 1675-1684.
  - 11) Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H. Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. *J Periodontol.* 2008; 79(5): 811-818.

## IV. 調査事項

- |   |       |
|---|-------|
| 1. 歯科再生治療の現状：組織修復と臓器置換型再生治療                     | 辻 孝   |
| 2. 骨の再生について                                     | 山口 朗  |
| 3. 歯周組織再生治療における細胞移植について                         | 和泉 雄一 |
| 4. 自己骨髄幹細胞移植による歯周組織再生治療と課題について                  | 栗原 英見 |
| 5. リコンビナントサイトカインを用いた歯周組織再生誘導<br>—開発の現状、課題、将来展望— | 村上 伸也 |
| 6. 細胞シートの内外の動向について                              | 岩田 隆紀 |

# 歯科再生治療の現状：組織修復と臓器置換型再生治療

辻 孝<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東京理科大学、総合研究機構、教授

<sup>2</sup>東京理科大学大学院、基礎工学研究科生物工学専攻、教授

〒278-8510 千葉県野田市山崎2641 東京理科大学・総合研究機構

TEL: 0471-22-9711、FAX: 0471-22-9711

E-mail: t-tsuji@rs.noda.tus.ac.jp

咀嚼や発音を含む口腔機能は、齲蝕や歯周病に起因する歯の部分的な損傷や喪失、疾患の発症により障害を受け、全身の健康状態にも影響を及ぼすと考えられている。現在、完全な歯の機能を再生しうる新たな治療技術として、部分的な組織修復や歯全体の再生を目指した歯科再生治療技術の開発が進められている。歯の組織修復治療には、これまでの人工材料による機能代替を目的とした治療ではなく、幹細胞移入やサイトカインの応用が進められており、歯を丸ごと再生する歯科再生治療は、次世代の再生医療としての臓器置換再生医療のコンセプトを実証する重要なモデルケースであると考えられている。そこで本稿では、歯科再生医療の基盤となる最近の知見や技術開発を概説する。

## 歯科再生治療のコンセプト

咀嚼、発音などの口腔機能は、健康状態の維持・向上とクオリティーオブライフに重要であるとされている<sup>1</sup>。歯は典型的な上皮・間葉相互作用によって誘導される外胚葉性器官であり、象牙質、エナメル質、セメント質や歯槽骨などの様々な硬組織を含む特徴的な構造を有している<sup>2-4</sup>。歯には、象牙質の産生やその生物学的機能を維持する歯髄組織や、歯を顎骨に固定する役割を持つ歯周組織が存在する<sup>5</sup>。齲蝕や歯周疾患を含む歯の部分的な損傷や喪失、疾患の発症は、発音、咀嚼、咬合などの口腔機能に重大な問題を引き起こし、全身の健康状態に影響を及ぼすと考えられている<sup>1</sup>。これらの疾患に対する歯科治療として、歯の根管治療や歯石除去、金属冠などの人工材料を用いた治療技術が確立している<sup>6,7</sup>。特に、外傷や齲蝕、歯周疾患により不幸にも歯を喪失した場合には、伝統

的に入れ歯やブリッジ、歯科用インプラントなどを用いた歯の機能代替治療が行われてきた<sup>6,7</sup>。これらの人工物を用いた治療は、機能回復において有効であるとされているものの、機能的な咬合系の回復という点で、骨のリモデリングを介した歯の移動能や外部からの侵害刺激に対する応答能といった生物学的機能を有しないことから、天然歯が有する生物学的な機能回復を目指して歯の再生治療に向けた技術開発が進められている<sup>8</sup>。

最近の発生生物学、幹細胞生物学、組織工学的技術の進歩により、次世代を担う再生医療技術の開発が進められている<sup>9-12</sup>。様々な組織や臓器の部分的な損傷に対する治療として、幹細胞移入療法や、組織幹・前駆細胞の活性化と分化を誘導するサイトカイン療法は、いずれも臨床応用が期待される魅力的な治療コンセプトとされている<sup>13</sup>。これ

までに歯の発生や分化、細胞の増殖を制御するサイトカインネットワークについて数多く報告がされており、分子レベルでの解析が進められている<sup>14,15</sup>。これらの知見は、将来の歯髄や歯周組織、歯槽骨の再生に向けて応用が期待されている(図1;<sup>16</sup>)。

再生医療の最終的な目標は、疾患や外傷、加齢に伴う臓器の損傷や傷害を、機能的に完全な再生臓器で置き換える臓器置換再生医療である<sup>3,12,17</sup>。歯科領域においては、幹細胞から作製した再生歯のみならず、歯胚に由来する歯と歯周組織と歯槽骨をひとつの機能ユニットを創り出して移植するという可能性も考えられる<sup>16</sup>。このような再生歯を移植する治療方法は、審美的にも、生理的、機能的にも治療要求性を満たす新しい生物学的治療技術として、近い将来に確立されることが期待される<sup>18</sup>。これまでに喪失歯に対する機能的な歯の再生治療のために、生分解性材料を用いた歯胚の再構築や、細胞凝集法による歯胚の再構成といった数々の技術的アプローチが、過去30年にわたって進められてきた<sup>3,16,19</sup>。最近では、歯の喪失部位に再生した歯胚を移植することにより、正常な組織配置と咀嚼機能ばかりでなく、周囲組織と連携機能する歯根膜機能と中枢と連絡した神経機能を有する機能的に完全な歯の再生が達成された<sup>20,21</sup>。本稿では、歯の組織修復や歯の置換再生治療における最近の知見と、技術開発について概説する。歯科再生治療は歯の機能を完全に回復すると共に、これまでの人工材料による代替を主とした歯科治療を変革する可能性を有している。

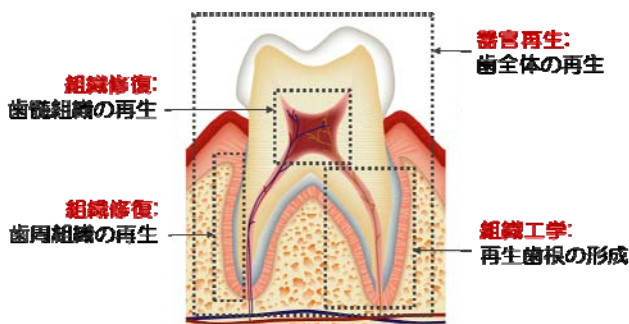


図1 歯科再生治療のコンセプト

組織修復、組織工学、歯全体の再生による歯科再生治療技術の開発戦略を示す。

## 歯の発生

毛、乳腺、腎臓、歯などの器官は、胎児期の局所的な上皮細胞と間葉細胞の相互作用によって誘導される器官原基から発生する<sup>22-24</sup>。歯の器官形成を実質的に制御するメカニズムは、シグナル分子や転写因子を含む、局所的な上皮・間葉相互作用である(図2)<sup>14</sup>。歯胚発生は、歯の形成予定部位で歯堤が肥厚することから始まり(lamina期)、その後、歯堤は裏打ちする神経堤細胞由来の外胚葉性間葉組織へと陥入する<sup>4,25</sup>。胎齢10-11日の歯胚発生初期においては、歯胚上皮組織はFGF8、BMP4、SHH、TNF、WNT10bなどのシグナル分子を産生し、これらは歯胚間葉におけるBarx1、Dlx1/2、Lhx6、Lhx7、Msx1、Pax9、Gli1などの転写因子の発現を誘導することによって、陥入した上皮組織の周囲で間葉細胞は凝集を起こす(蕾状期)<sup>26-30</sup>。その後、胎齢14日において、SHHやBMP、FGF、WNTを発現する一過的なシグナルセンターであるエナメルノットが形成され、上皮・間葉相互作用を制御すると考えられている(帽状期)<sup>31</sup>。間葉細胞の一部は象牙芽細胞と歯髄細胞に分化する根尖部歯乳頭組織を形成しながら根尖方向に収束していく<sup>32</sup>。鐘状期では、歯胚上皮細胞はエナメル芽細胞に、歯胚間葉細胞は象牙芽細胞に分化して、上皮・間葉境界面にそれぞれエナメル質と象牙質を産生する<sup>33</sup>。また、歯胚由来間葉細胞から生み出される歯小嚢細胞はセメント質、歯根膜、歯槽骨からなる歯周組織に分化する<sup>34</sup>。歯の形態形成は、歯冠の大きさや歯そのものの長さ、また歯冠内部の咬頭咬頭形成から構成される<sup>16</sup>。歯の咬頭のパターン形成を制御しているのは、二次エナメルノットから産生されるBMP、FGF4などのシグナル分子であると考えられている<sup>35</sup>。歯冠形成が完了した後、エナメル芽細胞の供給を行っていたエナメル上皮がヘルトビッチ上皮鞘となり、エナメル質の産生が停止することで、歯根形成が開始される。歯根形成は、歯が口腔内への萌出後も対合歯と咬合するまで伸長を続け<sup>36</sup>、咬合による物理的的刺激を受けることにより歯根伸長



## 胎齢と発生ステージ

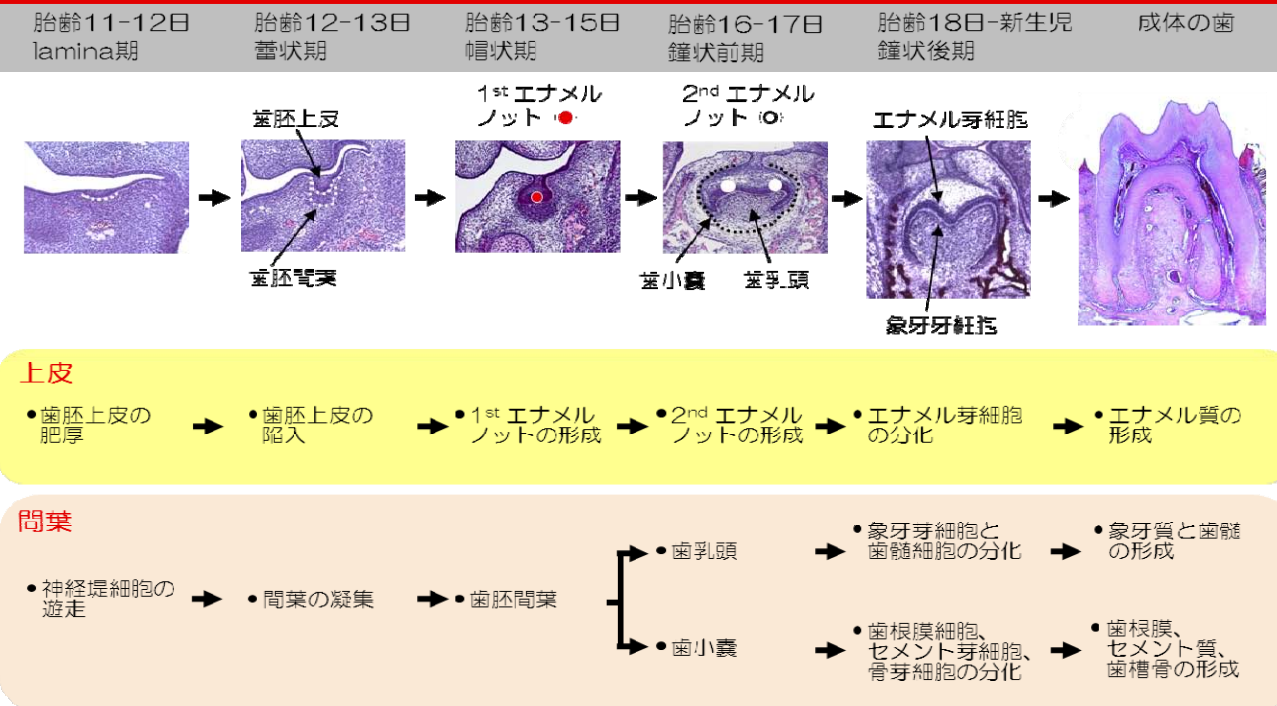


図2 歯の発生

歯の発生は lamina 期に始まり、placode 期に歯胚が形成され、歯胚上皮細胞の陥入と神経堤細胞由来である外胚葉性間葉組織の形成によって、蕾状期へと発生が進行する。その後の帽状期においては歯胚の形態形成が生じ、歯胚上皮にはエナメルノットが、間葉では後に歯乳頭と歯小囊へと分化する歯胚間葉が発生する。歯冠の形態形成は初期鐘状期に始まり、後期鐘状期には最終的な歯冠の形態が決定される。歯の萌出の間は歯根の形成と共に、歯小囊細胞から歯根と歯槽骨を結合する歯周組織への分化が起こる。歯胚発生の各ステージにおいて、多様なシグナル分子と転写因子が発現している。

が停止して、完成歯へとなる。歯胚発生が終了した完成歯においても、歯の組織を形成可能な成体組織幹細胞が存在することが知られており、その後の組織修復に寄与すると考えられている。

### 歯由来幹細胞とサイトカインを用いた歯の組織修復治療

幹細胞研究の進展により、象牙質や歯髄、歯根膜、セメント質、歯槽骨などの形成に寄与する歯組織由来幹細胞の同定が進められ、細胞の分化能をはじめとする性質など新たな知見が明らかにされつつある<sup>15,37</sup>。歯科治療においても、他の再生治療と同様に、幹細胞を単離し、歯の組織を修復するための細胞移植治療に応用することが歯科再生医療の重要なコンセプトのひとつと考えられている(図3a;<sup>15,36</sup>)。

#### 1) 歯髄再生のための根尖部歯乳頭幹細胞の利用

歯乳頭から発生する歯髄は象牙質内部の結合組織性の構造物であり、血管、神経、線維芽細胞、象牙芽細胞が存在する<sup>8</sup>。歯髄幹細胞(DPSCs)とヒト脱落乳歯幹細胞(SHED)は、それぞれヒトの第三大臼歯と脱落した乳歯の歯髄から同定された<sup>8</sup>。これらの細胞は、CD146とSTRO-1を発現すると共に高い増殖能を有しており、象牙芽細胞や脂肪細胞、神経細胞への多分化能を有する歯の組織幹細胞であると考えられている<sup>38-40</sup>。これらの細胞は、象牙質と歯髄の組織修復に向けた細胞移入療法のためのよい細胞シーズになると考えられている。血管成分が少なく、ゼラチン状の軟組織である根尖部歯乳頭組織は、歯根形成途中の根尖部位に存在し、歯根部の歯髄と象牙質の発生起源となる組織である<sup>41</sup>。

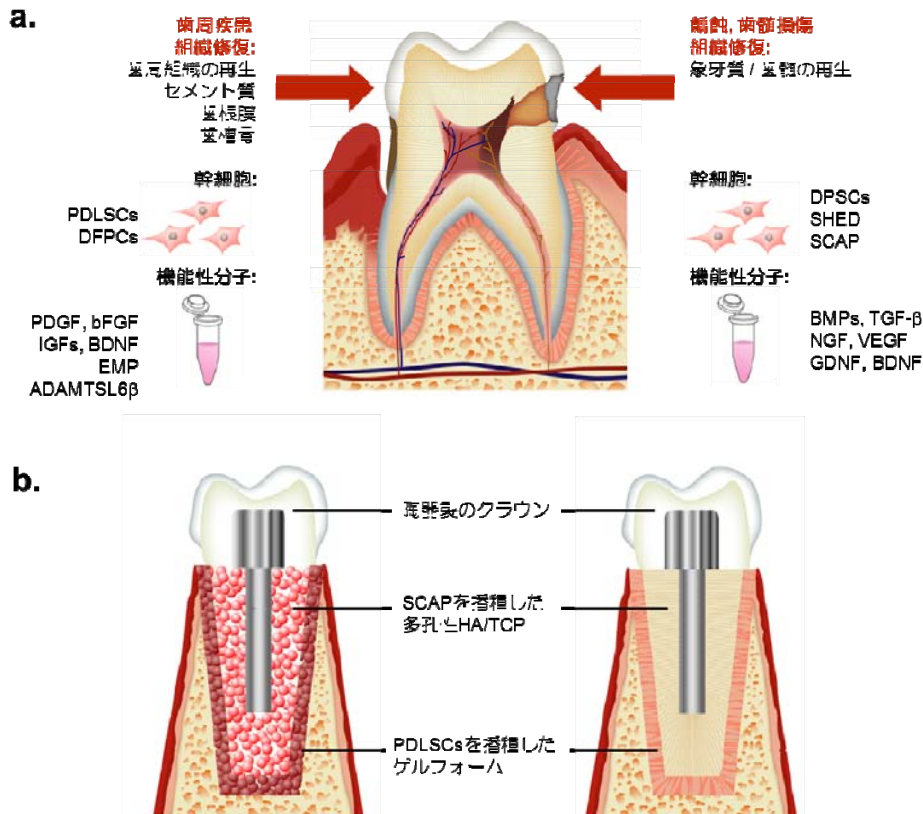


図 3 歯の組織修復と組織工学

(a) 齶蝕や歯髄損傷、歯周疾患に対する歯の組織修復療法

齶蝕や歯周疾患による組織傷害を修復するアプローチとして、幹細胞移入療法とサイトカイン療法が開発されている。これまでに齶蝕や歯髄の損傷に対して、象牙芽細胞と歯髄へ分化可能な DPSCs、SHED、SCAP などの幹細胞を移植する研究が進められてきた (右)。一方、組織の修復を誘導すると期待されている BMP、TGF-β、NGF、VEGF、GDNF、BDNF などのサイトカインも、歯の幹細胞の活性化と分化を促進する可能性を有する。歯周組織の再生には、PDLSCs や DFSCs のような歯由来組織幹細胞の移植と共に、PDGF、IGF、BDNF、bFGF、EMP、ADAMTSL6βなどは歯周組織を再生できる可能性を有している (左)。

(b) 組織工学による再生歯根の作製

再生歯根は、歯根の形に成型した HA/TCP の担体に SCAP を播種し、その上から PDLSCs を含むゲルフォームを巻きつけ、そこへ陶器製の冠を装着する。HA/TCP と SCAP、ゲルフォームと PDLSCs による再生歯根は、歯槽骨内へ移植することによって再生歯根の周囲に象牙質と歯根膜を再生し、正常な歯の機能を果たすことが期待されている。

略号：PDLSCs, 歯根膜幹細胞；DFSCs, 歯小嚢幹細胞；PDGF, 血小板由来増殖因子；IGFs, インスリン様増殖因子；BDNF, 脳由来神経栄養因子；bFGF, 塩基性線維芽細胞成長因子；EMP, エナメルマトリックスタンパク質；ADAMTSL6β, A disintegrin-like metalloprotease domain with thrombospondin type I motifs like 6β；DPSCs, 歯髄幹細胞；SHED, ヒト脱落乳歯幹細胞；SCAP, 根尖部歯乳頭幹細胞；BMP, 骨形成タンパク質；TGF-β, トランスフォーミング増殖因子β；NGF, 神経成長因子；VEGF, 血管内皮増殖因子；GDNF, グリア細胞由来神経栄養因子。

根尖部歯乳頭には根尖部歯乳頭幹細胞（SCAP）と呼ばれる特徴的な幹細胞が存在し、高いテロメラーゼ活性を有して、旺盛な増殖能と象牙芽細胞、脂肪細胞への分化能を有する<sup>32-42</sup>。SCAPは生体内への移植によって典型的な象牙質構造を形成することから、組織修復や組織工学における有望な細胞ソースになると考えられる。

罹患率の最も多い歯科疾患である齲蝕に対する治療として、一般的に人工材料による修復治療が行われる<sup>15</sup>。最近では、象牙質の組織修復のために、歯胚発生や上皮・間葉相互作用の基盤となる BMP や TGF- $\beta$ 1 を用いたサイトカイン療法の開発が期待されている<sup>14-43</sup>。さらに、歯髄組織を形成可能な DPSCs や CD31/CD146 陰性の歯髄 SP 細胞や CD105 陽性歯髄幹細胞などの歯組織由来の幹細胞も、硬組織修復と歯髄再生に有用とされている<sup>41-44</sup>。このように、サイトカインや歯組織由来幹細胞を用いた歯質・歯髄組織の再生は、臨床応用に向けた可能性を有している<sup>44</sup>。

## 2) 歯周組織および歯小嚢に由来する幹細胞の歯周組織再生治療への応用

歯周組織はセメント質、歯根膜、歯槽骨からなり、咬合力を緩衝する結合組織である<sup>34</sup>。歯周組織は、歯周炎による長期間の炎症反応により、自然治癒不可能な損傷を受ける場合もあり、損傷した歯周組織を再生する確実な治療技術は未だ確立されておらず<sup>45</sup>、幹細胞移入やサイトカインの応用が期待されている。歯周組織を構成する細胞は歯小嚢組織から分化することが知られている<sup>16-46</sup>。歯根形成期において、歯小嚢幹細胞（DFSCs）は発生途中の歯根表面に存在することが報告されており、歯周組織再生に应用可能な細胞ソースとなりうると考えられている<sup>46-48</sup>。さらに成人の歯周組織からも、歯周組織を治癒可能な歯根膜幹細胞（PDLSCs）が同定されており<sup>49</sup>、生体内への移植により、セメント質や歯根膜を再生可能であることが示され、DFSCs と併せて歯周組織再生を実現可能な細胞ソースとして期待されている<sup>46-49</sup>。

これらの幹細胞移入療法に加えて、歯周組織再生の臨床応用に向けた歯根膜細胞シートの技術開発が進められている<sup>50-51</sup>。また、歯周組織の再生を促進するため、PDGF、IGF-1、BDNF や bFGF などのサイトカインの局所投与による治療法の開発も進められている<sup>52-54</sup>。さらに歯周組織は、コラーゲン線維や弾性線維（マイクロフィブリル）などの線維性の細胞外マトリクスから構成される<sup>55-56</sup>。最近、fibrillin-1 結合タンパク質である ADAMTSL6 $\beta$ の局所投与が、マイクロフィブリルの修復を介して歯周組織の創傷治癒の促進に高い効果を示すことが明らかにされた<sup>57</sup>（投稿中）。このマイクロフィブリルの修復のためのマトリクス成分の投与による分子医学的治療は、幹細胞療法やサイトカイン療法に加えて、歯周組織再生の新たなアプローチになることが期待される。

## 3) 幹細胞と組織工学技術による再生歯根の形成

最近、喪失歯に対するブリッジや入れ歯による歯科治療に代わって、歯槽骨に直接埋入する歯科用インプラントが有効な治療技術として急速に広まっている<sup>58</sup>。歯科用インプラントの有用性は確立されているものの、インプラントには歯根膜が存在しないため、天然歯で認められる加齢や成長に伴って歯が動く機能などを有していないなど改良すべき点が残されている<sup>8</sup>。咬合機能ばかりでなく、歯の生理的機能も回復させる方法として、組織工学的手法を用いた幹細胞による歯根再生が進められてきた（図 3b；<sup>8-32</sup>）。歯根の形態に成型した hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) の担体に SCAP を播種し、その上から PDLSCs を播種しゲルフォームを巻きつけることによって歯根様構造物を形成し、その上に人工的な冠を装着することによって、歯の生理的機能を回復させる歯根再生という新たなアプローチが報告された。この組織工学的手法は、歯根と歯周組織を結合させることで機能的な歯根を再生する方法であり、幹細胞による組織再生療法、機能発現に適した人工材料開発、さらには、現在の欠損歯治療技術を

統合しうる次世代再生医療技術のひとつになることが期待されている<sup>42-59</sup>。この歯根再生のアプローチは、成体組織から細胞を取得できる点から歯全体の再生よりも早期に臨床応用される可能性を有している。

### 臓器置換再生医療の実現に向けた歯の再生

幹細胞移入療法により、部分的な組織修復の可能性は示されているものの、現在の再生工芸技術では、高度に複雑化した臓器を再構築するという最終目標には到達していない。この理由は、臓器は複数の組織と細胞種から構成されることで固有の機能を発現し、様々な組織と細胞による統合された相互作用を通して恒常性が維持されるためである<sup>3</sup>。これまでに病気や事故、加齢によって喪失や傷害を受けた組織を置換するために、機能的に完全な代替臓器を再生するための技術開発が数多く試みられてきた。心臓や眼、腎臓などの機能を再現するために、マイクロチップを含むプラスチックや金属からなる機械製の人工臓器の開発が進められている<sup>60-61</sup>。また、腎臓や膵臓の代謝機能や分泌機能などの生化学的機能を再現するため、細胞と材料を用いて組織工学的に再生するハイブリッド型人工臓器の開発が進められている<sup>60-61</sup>。さらに、歯や毛や乳腺のような外胚葉性器官を形成することを目的として、未熟な幹細胞から三次元的な細胞操作により再生器官原基を作製し、胎児期の上皮・間葉相互作用による器官形成を再現させるこ

とによって、機能的に完全な再生臓器を発生させるアプローチが考えられている<sup>3-18</sup>(図4;<sup>3-18</sup>)。歯全体の再生に向けた研究における主な取り組みとしては、完全に単一化された上皮細胞と間葉細胞を用いた三次元的な細胞操作技術である。現在、再生歯胚を作製するための下記のふたつのアプローチから技術開発が進められている。

#### 1) 生分解性スキャホールドを用いた歯胚の再生

天然材料、ならびに人工ポリマーで作製した生分解性のスキャフォールドを用いる方法では、材料に細胞を播種することにより、任意の形態を有する組織を再生することが可能である。この技術は、均一な細胞配置を有する三次元的組織を形成する技術として高い有効性が示されており、骨や軟骨の再生治療に向けた臨床応用化が進められている<sup>11-12, 62</sup>。これまでに、歯の形に成型した Polyglycolic acid/poly-L-lactate-co-glycolide copolymer (PLA/PLGA) や、コラーゲンスポンジに萌出前のブタ第三大臼歯、またはラット蕾状期歯胚の上皮細胞と間葉細胞を播種することによって、歯周組織を除くエナメル質、象牙質、歯髄から構成される小さな歯を形成できることが明らかにされている<sup>63-67</sup>。このようにスキャホールド法は、再生歯の形や大きさの制御に有望な技術であるものの、歯の発生頻度が低く、胎児期の天然歯胚の発生を再現した上皮・間葉相互作用による正常な歯の組織構造を形成させることが困難であった<sup>18-68</sup>。

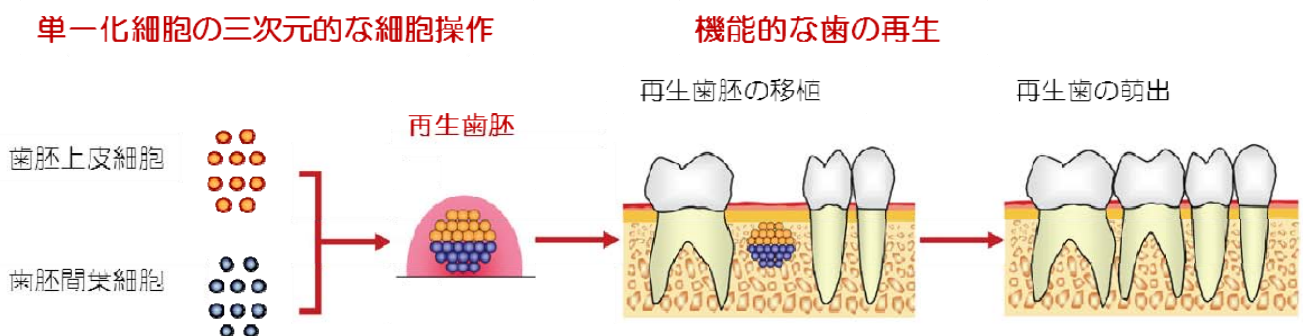


図4 再生器官原基の移植による歯の再生戦略

器官原基法によって上皮細胞と間葉細胞を再構築して作製した再生歯胚の移植によって、成体内で歯を再生する戦略が考えられる。

## 2) 細胞凝集法を用いた再生歯胚の形成

細胞凝集法は、器官形成における上皮・間葉相互作用を再現させることによって、臓器や器官原基を再構築することを目的とした再生工学的手法のひとつである<sup>3,18,68</sup>。これまでに毛包と乳腺に由来する幹細胞を用いた細胞凝集体を、生体内に移植することにより、複数の細胞種が正しく配置した正常な臓器構造を再生できる可能性が報告されている<sup>69,70</sup>。また、遠心分離した上皮細胞と間葉細胞のペレットを組み合わせることでより作製した人為的な歯胚から、完全な歯の形成が可能であることが報告されている<sup>71,72</sup>。臼歯歯胚から単離した上皮細胞と間葉細胞を混合した細胞凝集体からも、上皮細胞の自律的な凝集と、その後の上皮細胞と間葉細胞の自己組織化によって、正常な組織構造を有する歯が形成されることが報告されている<sup>73</sup>。さらに私たちは、生体外における三次元的な細胞操作によって、高細胞密度の上皮細胞と間葉細胞を区画化して再配置する器官原基法を開発した<sup>20</sup>。この方法により再生された歯胚は、上皮・間葉相互作用を再現することによって、組織学的に正常な歯を再生した。この器官原基法は、従来技術と

比較して再現性が高く、安定的に再生歯へと発生させることを可能とした。この技術の開発により、歯や毛包の再生をはじめ、幅広い器官再生の研究に道を拓いた。

## 成体内における機能的な歯の再生

将来の実用化に向けて器官再生治療を考えると、再生した臓器が組織学的に正常であることだけでなく、レシピエントの周囲環境や神経系と連携機能することにより、喪失した臓器機能を完全に補うことが期待されている。発生物学でよく使用される実験動物であるアフリカツメガエルにおいて、ポンプ機能を有する2次心臓の再生や光応答性を有する眼球の再生が報告されているものの、哺乳類においては、提供されたドナー臓器を直接移植する以外に方法はない<sup>11</sup>。

歯は咀嚼や発音、審美性といった重要な口腔機能を果たし、コミュニケーションや栄養摂取のために欠くことのできないものである<sup>1</sup>。これらの口腔機能は、歯や咀嚼筋、顎関節が中枢神経系の制御下において協調して機能することにより成り立

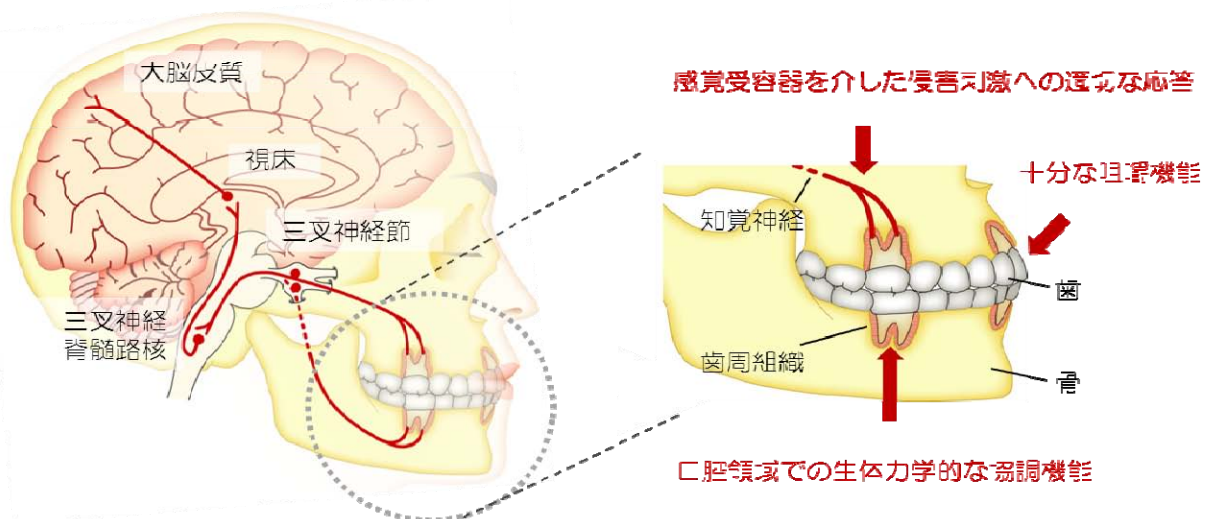


図5 顎顔面領域における口腔機能の調和

咀嚼、発音、審美性などの口腔機能は、咀嚼筋と顎関節が中枢神経系によって制御されることにより協調的に機能する。歯には対合歯との咬合における十分な咀嚼機能がなければならない。また歯は、顎顔面領域の組織と共に機械的外力と侵害刺激に対して応答する歯根膜機能を有する。さらに、歯に対する侵害刺激を歯髄や歯根膜の知覚神経が受容し、延髄後角の三叉神経脊髄路核を介して中枢神経系へ伝達する機能を有している。

っている(図5; <sup>74 75</sup>)。したがって、再生歯胚による歯科再生治療の確立には、再生歯胚が成体口腔内の歯の喪失部位で発生し、萌出すると共に、顎顔面領域における咬合機能、機械的外力にตอบสนองする歯根膜機能、侵害刺激の伝達が可能な中枢と連結した神経機能を有した機能的に完全な歯を再生することが望まれている。

### 1) 再生歯の萌出と咬合

歯の喪失部位に移植した再生歯胚が、成体顎骨内で発生して萌出して対合歯と咬合することは、歯科再生医療に向けた重要な課題のひとつである。歯の萌出は、歯と周囲の歯槽骨を構成する細胞によって複雑で厳密な制御をうける<sup>76</sup>。萌出の過程では、歯を覆っている骨組織を歯小嚢に存在する破骨細胞が局所的に分解することによって歯が萌出方向に移動する<sup>77</sup>。一般的に歯胚の萌出は、歯堤の残遺物である線維性の歯導帯によって誘導されると考えられてきた<sup>78</sup>。しかしながら、再生歯胚は抜歯窩において正常に発生することに加え、天然歯胚をマウス口腔内の歯の存在しない(Diastema)領域に移植することにより発生し、萌出することが報告されている<sup>20 79</sup>。さらに最近では、歯導帯を持たない再生歯胚が成体口腔内で萌出し、対合歯と咬合することによって、天然歯と同等の咀嚼機能を回復させる可能性が示された<sup>21</sup>。

### 2) 再生歯の機械的外力への応答

歯が歯根膜を介して口腔および顎顔面領域と連携機能することは、加齢に応じた歯および顎骨の成長と、咀嚼や発音などの口腔機能に重要である<sup>1 75</sup>。歯根膜は、過剰な機械的外力に対する緩衝能を有するばかりでなく、歯科矯正治療における歯槽骨のリモデリングを介した歯の移動において重要な役割を果たすことが知られている<sup>77</sup>。また、歯を喪失した部位に患者自身の別の歯を移植する自家歯牙移植においても、移植歯に付着した健全な歯根膜が顎骨との骨性癒着を防ぐと共に、歯根

周囲の歯槽骨と正常な連結を形成することが明らかにされている<sup>80</sup>。一方、歯科用インプラントには歯根膜が存在せず、歯根と歯槽骨の正常な組織構造が存在しないことが課題とされている<sup>81</sup>。実際に、機能的な歯根膜を用いた生物学的な再生治療は、人工材料による治療を代替する方法として、歯の機能回復に有効であることが報告されている<sup>82 83</sup>。器官原基法による再生歯胚の移植により萌出した再生歯においては、再生歯の歯根膜が機械的外力に応じた適切な骨芽細胞と破骨細胞の局在を介して歯根周囲の骨リモデリングを起こすことが示されたことから、再生歯は顎顔面領域の修復と連携機能の再生によって、歯根膜を介した歯の生理的機能を再生することが明らかにされた<sup>21</sup>。

### 3) 再生歯の知覚神経機能

末梢神経系は、胎児期において発生している器官からの誘引と、軸索の成長を伴う中枢神経との連結によって確立され、臓器機能の発現制御、ならびに痛みや機械的外力などの侵害刺激の中枢への伝達に重要な役割を果たす<sup>84 85</sup>。また、臓器の移植後に神経線維が再度侵入することによる末梢神経系の再構築は、臓器機能の回復に必要であると考えられている<sup>86 87</sup>。歯には知覚性の三叉神経と交感神経が侵入しており、どちらも歯の正常な機能発現と保護に重要である<sup>85</sup>。歯の機能代替治療に有用とされる歯科用インプラントにおいても、咬合力に対する知覚伝達は十分ではないことから、知覚性の神経機能を回復させる歯科再生治療が期待されている<sup>88</sup>。最近、私たちは再生歯胚を移植することにより、萌出した再生歯の歯髓と歯根膜に知覚神経と交感神経が侵入していることを明らかとし、それらが正常に侵害刺激を受容して中枢神経系に伝達することを実証した<sup>21</sup>。これらの結果から、再生歯胚の移植による歯全体の再生治療は、咀嚼や機械的外力に対する応答だけではなく、侵害刺激を中枢に伝達するという歯の重要な機能においても再生できる可能性を示している<sup>21</sup>。

## 結び

歯科再生治療の臨床応用の実現に向けた課題として、歯の再生を可能とする細胞シーズを同定することは重要である。従来の移植医療と同様に、免疫学的拒絶反応を避けるために、患者自身の細胞を利用することになると考えられる<sup>315</sup>。最近の幹細胞研究、ならびに器官形成研究の進歩により、成体の組織幹細胞が歯科再生治療を含む再生医療全般における有用な細胞シーズとなりうることを示されている<sup>315</sup>。歯の組織から同定された DPSCs や SHED、SCAP、PDLSCs、歯小嚢幹細胞などの幹細胞は、恒常的かつ組織が傷害を受けた際には自己複製と必要な細胞の供給に関与している。これらの幹細胞は、齲蝕や歯周疾患などの歯の組織修復を目的とした幹細胞移入療法において、有益な細胞シーズになると期待されている<sup>337</sup>。また、歯全体を再生する治療に向けて、胎児期の歯胚に由来する上皮細胞と間葉細胞から形成した再生歯胚を発生させ、機能的な歯を再生するという戦略で研究が進められてきた<sup>21</sup>。今後は、患者の歯や歯以外の組織から、胎児期に見られる歯の誘導を再現しうる能力をもつ幹細胞の同定や、歯の器官形成を誘導しうる遺伝子を同定することが課題であろう。また、内胚葉、中胚葉、外胚葉へと分化可能な iPS 細胞も歯の再生に有用な細胞シーズの候補として期待される。

一方、切歯、犬歯、小臼歯、大臼歯などの歯は、胎児期の口腔内の位置に応じて制御される特徴的な形態を有している<sup>235</sup>。これらの形態的特徴は機能的な咬合に必要な要素であると共に、歯科治療における重要な要素のひとつである審美治療においても重要である<sup>1318</sup>。これまでに、歯の形態を制御するための分子メカニズムは多数報告されており<sup>335</sup>、これらの分子基盤を基とした歯の大きさや歯冠、歯根の形態を制御する方法は、機能的な咬合と審美性を有する再生歯を形成するために重要な項目として考えられている。

このようにスキャホールドを用いた組織工学、形態形成を制御する遺伝子の同定やサイトカイン

の利用など、歯の形態を制御する再生工学技術の確立には、さらなる研究開発が必要であろう。歯科再生医療は、より複雑な他の臓器に応用可能な次世代の臓器置換再生医療に向けた重要な研究開発モデルだと考えられており、歯科再生医療の実現に向けた技術開発を通して、毛包や乳腺、肝臓、腎臓のような様々な組織・臓器の再生に向けた重要な知見が得られることが期待される<sup>318</sup>。

## 謝辞

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金・再生医療実用化研究事業（代表、東京医科歯科大学・山口朗教授）、文部科学省・特定領域研究「マルチスケール操作によるシステム細胞工学」（代表、名古屋大学・福田敏男教授）、文部科学省・科学研究費補助金・基盤研究（A）、文部科学省・私学助成・学術フロンティア推進事業「再生工学研究センター」の研究費により行われました。

## 参考文献

- 1 Proffit, W. R., Fields, H. W. & Sarver, D. M. *Contemporary orthodontics*. 4th edn, (Mosby Elsevier, 2007).
- 2 Tucker, A. & Sharpe, P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* **5**, 499-508, (2004).
- 3 Ikeda, E. & Tsuji, T. Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* **8**, 735-744, (2008).
- 4 Pispas, J. & Thesleff, I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol* **262**, 195-205, (2003).
- 5 Avery, J. K., Steele, P. F. & Avery, N. *Oral development and histology*. 3rd edn, (Thieme, 2002).
- 6 Brenemark PI, Z. G. in *osseointegration in*


- clinical dentistry.* (ed Albrektsson T) (Quintessence, 1985).
- 7 Rosenstiel, S. F., Land, M. F. & Fujimoto, J. *Contemporary fixed prosthodontics.* 3rd edn, (Mosby, 2001).
- 8 Huang, G. T. *et al.* The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* **34**, 645-651, (2008).
- 9 Brockes, J. P. & Kumar, A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science* **310**, 1919-1923, (2005).
- 10 Watt, F. M. & Hogan, B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**, 1427-1430, (2000).
- 11 Langer, R. S. & Vacanti, J. P. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am* **280**, 86-89 (1999).
- 12 Atala, A. Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 879-892, (2005).
- 13 Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321, (2008).
- 14 Thesleff, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* **116**, 1647-1648 (2003).
- 15 Mantesso, A. & Sharpe, P. Dental stem cells for tooth regeneration and repair. *Expert Opin Biol Ther* **9**, 1143-1154, (2009).
- 16 Yen, A. H. & Sharpe, P. T. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* **331**, 359-372, (2008).
- 17 Purnell, B. New release: the complete guide to organ repair. Introduction. *Science* **322**, 1489, (2008).
- 18 Sharpe, P. T. & Young, C. S. Test-tube teeth. *Sci Am* **293**, 34-41 (2005).
- 19 Duailibi, S. E., Duailibi, M. T., Vacanti, J. P. & Yelick, P. C. Prospects for tooth regeneration. *Periodontol 2000* **41**, 177-187, (2006).
- 20 Nakao, K. *et al.* The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* **4**, 227-230, (2007).
- 21 Ikeda, E. *et al.* Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13475-13480, (2009).
- 22 Michos, O. Kidney development: from ureteric bud formation to branching morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 484-490, (2009).
- 23 Patel, V. N., Rebusini, I. T. & Hoffman, M. P. Salivary gland branching morphogenesis. *Differentiation* **74**, 349-364, (2006).
- 24 Soukup, V., Epperlein, H. H., Horacek, I. & Cerny, R. Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature* **455**, 795-798, (2008).
- 25 Mikkola, M. L. Genetic basis of skin appendage development. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 225-236, (2007).
- 26 Bei, M. Molecular genetics of tooth development. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 504-510, (2009).
- 27 Tummers, M. & Thesleff, I. The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **312B**, 309-319, (2009).
- 28 Cobourne, M. T. & Sharpe, P. T. Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 314-324, (2010).
- 29 Nakatomi, M. *et al.* Genetic interactions



- between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol* **340**, 438-449,(2010).
- 30 Khan, M., Seppala, M., Zoupa, M. & Cobourne, M. T. Hedgehog pathway gene expression during early development of the molar tooth root in the mouse. *Gene Expr Patterns* **7**, 239-243, (2007).
- 31 Matalova, E., Antonarakis, G. S., Sharpe, P. T. & Tucker, A. S. Cell lineage of primary and secondary enamel knots. *Dev Dyn* **233**, 754-759, (2005).
- 32 Sonoyama, W. *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE* **1**, e79, (2006).
- 33 Fukumoto, S. & Yamada, Y. Review: extracellular matrix regulates tooth morphogenesis. *Connect Tissue Res* **46**, 220-226 (2005).
- 34 Saito, M., Nishida, E., Sasaki, T., Yoneda, T. & Shimizu, N. The KK-Periome database for transcripts of periodontal ligament development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **312B**, 495-502, (2009).
- 35 Jernvall, J. & Thesleff, I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* **92**, 19-29, (2000).
- 36 Cho, M. I. & Garant, P. R. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* **24**, 9-27. (2000).
- 37 Huang, G. T., Gronthos, S. & Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* **88**, 792-806, (2009).
- 38 Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13625-13630, (2000).
- 39 Miura, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5807-5812,(2003).
- 40 Shi, S. *et al.* The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* **8**, 191-199, (2005).
- 41 Friedlander, L. T., Cullinan, M. P. & Love, R. M. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J* **42**, 955-962, (2009).
- 42 Sonoyama, W. *et al.* Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* **34**, 166-171, (2008).
- 43 Murray, P. E., Windsor, L. J., Smyth, T. W., Hafez, A. A. & Cox, C. F. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**, 509-520 (2002).
- 44 Nakashima, M., Iohara, K. & Sugiyama, M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**, 435-440, (2009).
- 45 Bartold, P. & Narayanan, A. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol* **40**, 29-49. (2006).
- 46 Saito, M. *et al.* Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res* **20**, 50-57

- (2005).
- 47 Morsczeck, C. *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* **24**, 155-165. Epub 2005 Feb 2012. (2005).
- 48 Luan, X., Ito, Y., Dangaria, S. & Diekwisch, T. G. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev* **15**, 595-608. (2006).
- 49 Seo, B. M. *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149-155 (2004).
- 50 Ishikawa, I. *et al.* Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration. *Periodontol 2000* **51**, 220-238, (2009).
- 51 Flores, M. G. *et al.* Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats. *J Clin Periodontol* **35**, 1066-1072, (2008).
- 52 Takeda, K. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng* **11**, 1618-1629, (2005).
- 53 Giannobile, W. V. *et al.* Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontol Res* **31**, 301-312 (1996).
- 54 Kitamura, M. *et al.* Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS One* **3**, e2611, (2008).
- 55 Sawada, T. *et al.* Immunohistochemical Characterization of Elastic System Fibers in Rat Molar Periodontal Ligament. *J Histochem Cytochem* (2006).
- 56 Shiga, M. *et al.* Characteristic phenotype of immortalized periodontal cells isolated from a Marfan syndrome type I patient. *Cell Tissue Res* **331**, 461-472, (2008).
- 57 Tsutsui, K. *et al.* ADAMTSL-6 is a novel extracellular matrix protein that binds to fibrillin-1 and promotes fibrillin-1 fibril formation. *J Biol Chem* **285**, 4870-4882,(2010).
- 58 Petrie, T. A., Reyes, C. D., Burns, K. L. & Garcia, A. J. Simple application of fibronectin-mimetic coating enhances osseointegration of titanium implants. *J Cell Mol Med* **13**, 2602-2612, (2009).
- 59 Han, C. *et al.* Periapical Follicle Stem Cell: A Promising Candidate for Cementum/Periodontal Ligament Regeneration and Bio-Root Engineering. *Stem Cells Dev*, (2009).
- 60 Copeland, J. G. *et al.* Cardiac replacement with a total artificial heart as a bridge to transplantation. *N Engl J Med* **351**, 859-867, (2004).
- 61 Wolf, A. V. The artificial kidney. *Science* **115**, 193-199 (1952).
- 62 Griffith, L. G. & Naughton, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* **295**, 1009-1014, (2002).
- 63 Honda, M. *et al.* Rat costochondral cell characteristics on poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* **24**, 3511-3519, (2003).
- 64 Young, C. S. *et al.* Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* **81**, 695-700

- (2002).
- 65 Iwatsuki, S., Honda, M. J., Harada, H. & Ueda, M. Cell proliferation in teeth reconstructed from dispersed cells of embryonic tooth germs in a three-dimensional scaffold. *Eur J Oral Sci* **114**, 310-317, (2006).
- 66 Duailibi, M. T. *et al.* Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* **83**, 523-528 (2004).
- 67 Yelick, P. C. & Vacanti, J. P. Bioengineered teeth from tooth bud cells. *Dent Clin North Am* **50**, 191-203, viii, (2006).
- 68 Yen, A. H. & Sharpe, P. T. Regeneration of teeth using stem cell-based tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* **6**, 9-16, (2006).
- 69 Zheng, Y. *et al.* Organogenesis from dissociated cells: generation of mature cycling hair follicles from skin-derived cells. *J Invest Dermatol* **124**, 867-876, d (2005).
- 70 Shackleton, M. *et al.* Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439**, 84-88, (2006).
- 71 Hu, B. *et al.* Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue Eng* **12**, 2069-2075, (2006).
- 72 Yamamoto, H., Kim, E. J., Cho, S. W. & Jung, H. S. Analysis of tooth formation by reaggregated dental mesenchyme from mouse embryo. *J Electron Microsc (Tokyo)* **52**, 559-566 (2003).
- 73 Song, Y. *et al.* Application of lentivirus-mediated RNAi in studying gene function in mammalian tooth development. *Dev Dyn* **235**, 1334-1344, (2006).
- 74 Nickel, J. C., Iwasaki, L. R., Walker, R. D., McLachlan, K. R. & McCall, W. D., Jr. Human masticatory muscle forces during static biting. *J Dent Res* **82**, 212-217 (2003).
- 75 Dawson, P. E. *Functional occlusion : from TMJ to smile design.* (Mosby, 2006).
- 76 Wise, G. E., Frazier-Bowers, S. & D'Souza, R. N. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**, 323-334 (2002).
- 77 Wise, G. E. & King, G. J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res* **87**, 414-434, (2008).
- 78 Carollo, D. A., Hoffman, R. L. & Brodie, A. G. Histology and function of the dental gubernacular cord. *Angle Orthod* **41**, 300-307 (1971).
- 79 Ohazama, A., Modino, S. A., Miletich, I. & Sharpe, P. T. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* **83**, 518-522 (2004).
- 80 Tsukiboshi, M. Autogenous tooth transplantation: a reevaluation. *Int J Periodontics Restorative Dent* **13**, 120-149 (1993).
- 81 Lindhe, J., Karring, T. & Lang, N. P. *Clinical periodontology and implant dentistry.* 5th edn, (Blackwell, 2008).
- 82 Polimeni, G., Xiropaidis, A. V. & Wikesjo, U. M. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000* **41**, 30-47, (2006).
- 83 Bartold, P. M., Shi, S. & Gronthos, S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol 2000* **40**, 164-172, (2006).
- 84 Guyton, A. C. & Hall, J. E. *Textbook of medical physiology.* 10th edn, (Saunders, 2000).
- 85 Luukko, K., Kvinnsland, I. H. & Kettunen, P. Tissue interactions in the regulation of

- 
- axon pathfinding during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* **234**, 482-488, (2005).
- 86 Bengel, F. M. *et al.* Effect of sympathetic reinnervation on cardiac performance after heart transplantation. *N Engl J Med* **345**, 731-738, (2001).
- 87 Kjaer, M., Beyer, N. & Secher, N. H. Exercise and organ transplantation. *Scand J Med Sci Sports* **9**, 1-14 (1999).
- 88 Hammerle, C. H. *et al.* Threshold of tactile sensitivity perceived with dental endosseous implants and natural teeth. *Clin Oral Implants Res* **6**, 83-90 (1995).

# 骨の再生について

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再建学講座口腔病理学分野

山口 朗

はじめに

骨組織は再生能力の強い組織の一つであるが、骨再生過程における細胞・分子レベルでの解析は遅れていた。その理由として、骨は非常に硬い組織であるために、細胞・分子レベルでの解析が困難であったことがあげられる。最近では、この点を克服し、骨芽細胞の分化や骨形成のメカニズムが細胞・分子レベルで解析され、それらの研究成果を基盤として骨再生のメカニズムを分子・細胞レベルで解析する研究が展開しつつある。本稿では、まず骨形成の概要を紹介し、次いで骨再生の基本と骨再生療法を概説する。

## I. 骨形成

### 1. 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化制御機構

#### 1) 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化

間葉系幹細胞は自己複製能を有し、骨芽細胞、軟骨細胞、筋肉、脂肪細胞などの間葉系細胞への多分化能を保持する細胞と定義することができる。各間葉系細胞への分化は細胞系譜特異的な転写因子で制御されている (図 1)。

間葉系幹細胞が骨芽細胞への分化能を獲得すると骨原性細胞(osteoprogenitor cell)と呼ばれる細胞になる。骨組織では骨髄内と骨膜部に骨原性細胞が存在し、末梢血中にも骨原性細胞が循環していることも報告されている<sup>1</sup>。Undale ら<sup>2</sup>は、ヒトの末梢血では造血系細胞マーカー陰性(lin-)/ALP+の population が骨原性細胞である可能性を報告している。骨原性細胞が骨芽細胞へ分化すると種々の表現形質を発現するようになる。骨芽細胞分化の初期では高いアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、I 型コラーゲンの産生能、副甲状腺ホルモン受容体などが発現し、成熟した骨芽細胞ではオステオカルシンを産生するようになる。

#### 2) 骨芽細胞の分化を制御するサイトカイン

##### a) Bone morphogenetic protein (BMP)<sup>3</sup>

BMP は間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させる強力なサイトカインで、その活性は細胞外、受容体、細胞内のレベルで制御されている。BMP 受容体には2種類の I 型受容体(BMPR-IA、BMPR-IB)と1種類の II 型受容体(BMPR-II)がある。これらの受容体はセ

リン／スレオニンキナーゼ型受容体で、細胞から分泌された BMP が産生細胞自身または周囲の標的細胞の BMP 受容体に結合することにより BMP の作用が発現する。BMP のアンタゴニストである Noggin、Chordin、Follistatin、Gremlin などの DAN ファミリータンパク質は細胞外で BMP 受容体と競合し、BMP 活性を制御している。

#### b) IGF-1

骨芽細胞は Insulin-like growth factor-I (IGF-I) と IGF-II を産生し、それらは骨基質中に取り込まれ、骨芽細胞の分化・機能を調節していると考えられている。オステオカルシンのプロモーターを用いて骨芽細胞に特異的に IGF-I が過剰発現するトランスジェニックマウスでは、骨芽細胞数の増加はみられなかったが、骨形成率、骨量が野生型より増加していたため、IGF-I の骨形成促進作用は分化した骨芽細胞の機能亢進に依存していると考えられている<sup>4</sup>。

#### c) FGF2

FGF2 は骨形成を促進する重要な局所因子であるが、全身投与によっても骨形成が亢進することが報告されている。また、卵巣摘出ラットに FGF2 を全身投与すると海綿骨と皮質骨内骨膜面で著明な骨形成促進がみられることも報告されている。さらに、FGF2 は局所投与により、ヒト歯周病における歯槽骨形成を促進することが報告されているが<sup>5</sup>、その作用メカニズムは十分に明らかにされていない。

### 3) 骨芽細胞の分化と機能を制御する転写因子

#### 1) Runx2

*Runx2* ノックアウトマウスでは骨芽細胞の分化が著明に抑制され、骨が全く形成されないために、*Runx2* は骨芽細胞の分化と骨形成に必須の転写因子である<sup>6</sup>。*Runx2* は I 型コラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチン遺伝子などの転写を促進し骨芽細胞の分化を促進するが、最終分化に関しては抑制的に作用していると考えられている。さらに、BMP のシグナルと *Runx2* の関連性が解析され、BMP→Smad→*Runx2* というカスケードが骨芽細胞の分化過程で重要であると考えられている<sup>3</sup>。

#### 2) Osterix (Osx)

*Osx* は Zinc-finger タンパクファミリーに属する転写因子で、骨芽細胞に特異的に発現しており、*Osx* ノックアウトマウスでは骨が完全に欠損している<sup>7</sup>。さらに、*Osx* ノックアウトマウスの骨格では *Runx2* が発現し、*Runx2* ノックアウトマウスでは *Osx* の発現がみられないため、*Osx* は *Runx2* の下流で作用する骨形成に必須の転写因子である<sup>7</sup>。

## II. 骨再生

### 1. 骨折の治癒過程

骨折が起ると、初期の外傷性反応として出血による血腫が形成される。この時、血小板に由来する TGF- $\beta$  や PDGF (platelet-derived growth factor) は、引き続いて起る肉芽組織の増殖に関与すると考えられる。骨折部に形成される肉芽組織中には、後に骨・軟骨を形成する能力を有する再生芽ともいえる細胞が出現するが、それらの細胞の性状や由来は十分に明らかにされていない。

長管骨の骨再生過程では、骨折後さらに時間が経過すると、肉芽組織の部位には骨芽細胞、軟骨細胞が出現し、仮骨の形成が始まる。また、骨折部周辺でも骨膜細胞の増殖が起り、骨の添加がみられ、仮骨の形成も始まる。時間の経過とともに、各々の仮骨部は軟骨または骨に特徴的な細胞外基質を産生し、成熟する。その後、軟骨は骨組織に置換され、軟骨内骨化が進行し、骨折の治癒が完了する。一方、抜歯窩の治癒過程では通常、軟骨の形成は認められない。その理由は明らかにされていないが、抜歯窩では血管の供給が非常に良いために酸素分圧が上昇し、骨芽細胞へ分化しやすい状況となるためかもしれない（酸素分圧が低いと軟骨細胞へ分化しやすいと考えられている）。

## 2. 骨再生における BMP の役割と応用

### 1) 骨再生過程における BMP の発現プロファイル

マウス、ラットの骨再生モデルを用いた多くの実験により、骨再生過程で BMP-2, BMP-4, BMP-3, BMP-6, BMP-7 (OP1), GDF5 などの mRNA が発現していることが報告されている<sup>8-10</sup>。また、ヒトの骨再生過程でも免疫染色で BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-7 が骨芽細胞に発現していることが報告されている<sup>11</sup>。骨再生部で種々の BMP が発現していることが示されているが、骨再生過程における BMP の発現する時期に関しては用いる骨再生モデル間での差がみられる。

### 2) BMP 関連因子の発現プロファイル

BMP の活性は受容体や細胞内レベルだけではなく、細胞外でも noggin, chordin などの BMP アンタゴニストが受容体に結合することにより調節されている。骨再生の過程でも BMP-4 と noggin が時間・空間的に相関をもって発現している<sup>12</sup>。しかし、骨再生過程における種々の BMP と BMP アンタゴニストの発現プロファイルや機能の相互作用メカニズムは十分に解析されていない。

### 3) 骨再生における内因性 BMP-2 の役割

BMP-2 及び BMP-4 のノックアウトマウスは胎生致死のために、これらのマウスを用いて骨再生過程における BMP の役割を解析することができない。最近、Tsuji ら<sup>12</sup> は *Prx1-Cre* トランスジェニックマウス (*Prx1* は四肢と頭蓋の間葉系細胞に特異的に発現している) と *BMP-2 floxed* マウスを交配することにより、四肢特異的に BMP-2 が欠損しているマウスを作成した。彼らは、このマウスでは四肢骨が形成されているが、離乳

後、四肢骨の骨折が自然発生し、骨再生が起こらないことを見出した。さらに、これらのマウスの大腿骨の骨折モデルでは、BMP-4, BMP-7 の発現は認められたが、骨再生は起こらなかった。これらの結果は、BMP-2 は骨再生に必須な内因性の BMP であることを示唆している。

#### 4) BMP による骨再生誘導

##### a) リコンビナント BMP タンパクを用いた骨再生

リコンビナントヒト BMP (rhBMP)、特に rhBMP-2, rhBMP-7 が骨再生を促進することが動物実験で示されている<sup>13,14</sup>。さらに、rhBMP-2 及び rhBMP-7 がヒトにおける骨再生に有効であることも報告されており<sup>15-17</sup>、臨床応用が期待されている。しかし、臨床応用までには、克服すべきいくつかの問題点も残されている。

rhBMP を骨再生部へ適応する場合、適切な担体の開発が必須である。rhBMP の担体としてはウシ由来 I 型アテロコラーゲンが使用されているが、臨床応用する場合、これらは異種タンパクとなるために抗原性の問題が危惧されている。米国における臨床治験では、ウシアキレス腱から精製した I 型コラーゲン製品(Helistat)を担体として利用して良好な骨再生誘導が示されたが、15 例中 1 例で移植後 6 週目に一過性にウシ I 型コラーゲンの抗体価が上昇したことも報告されている<sup>15</sup>。さらに、ウシのタンパクを利用する場合は、BSE などの感染の問題も危惧されるので、異種動物の I 型コラーゲンを臨床応用する場合には慎重な検討が必要である。これらの問題点を克服するために、高分子ポリマーなどの人工合成担体の開発が行なわれている。そして、ポリ乳酸・ポリエチレングリコールなどの複合体が rhBMP の担体として優れていることが報告され<sup>18,19</sup>、それらの臨床応用が期待されている。

rhBMP の骨再生誘導能に関する有効性は多くの動物実験で示されているが、霊長類で骨再生を誘導するにはマウス、ラットに比べて大量の rhBMP が必要とされており、rhBMP が高価なために臨床応用に関しても経済的な問題点が指摘されている。この点に関しては、大腸菌で作成された rhBMP-2 や BMP-2 の構造を基にした合成ペプチドが培養細胞を用いた実験で骨芽細胞分化を促進し、さらに動物実験で骨誘導活性をもつことが報告されているので<sup>20-23</sup>、これらの BMP を利用することにより経済的なコストを削減できる可能性がある。また、rhBMP の活性を促進する因子を探索することにより少量の rhBMP で効率良く骨再生を導くことが可能と思われる。BMP 作用を促進する因子としてプロスタグランジン受容体(EP4)アゴニスト<sup>24</sup>、ヘパリン<sup>25</sup>などが報告されており、それらの BMP 作用促進メカニズムも解析されているので、臨床応用への展開が期待される。

##### b) BMP 遺伝子を用いた細胞・遺伝子治療による骨再生



近年、BMP 遺伝子を利用した骨再性治療法に関する基礎的研究が報告されている。骨再生部の細胞にアデノウイルス、レトロウイルスを用いて直接 *BMP-2*, *BMP-4* 遺伝子を導入することにより、骨再生が促進されることが報告されている<sup>26,27</sup>。一方、特定の細胞を一度体外で培養し、遺伝子導入を行なった後に、骨再生部にそれらの細胞を移植する方法も報告されている。利用されている細胞としては、筋肉<sup>28</sup>、骨髄間質細胞<sup>29</sup>、脂肪細胞<sup>30</sup>、皮膚線維芽細胞<sup>31</sup>などが多く、遺伝子としては *BMP-2*, *BMP-4*, *BMP-7* などが用いられている。

我々は *BMP-2* 遺伝子を導入した GFP トランスジェニックマウスの皮膚線維芽細胞をヌードマウスの骨欠損部に移植すると効率よく骨形成が促進されることを明らかにした<sup>31</sup>。この場合、骨再生部の骨芽細胞を GFP の発現をマーカーとして詳細に解析すると、多くの骨芽細胞は移植した皮膚線維芽細胞ではなく、宿主由来の細胞で構成されていた。また、アデノウイルスで *BMP-2* 遺伝子を過剰発現させた皮膚線維芽細胞は遺伝子導入後 2—8 日目まで *BMP-2* タンパクを産生していたため<sup>31</sup>、骨再生過程で初めの 1 週間ほど *BMP-2* の過剰産生があれば十分に骨再生が誘導できると考えられた。また、Feeley ら<sup>32</sup> アデノウイルス、レンチウイルスで *BMP-2* とルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ骨髄間質細胞を骨再生部に移植し、ルシフェラーゼの活性化と骨再生を解析し、アデノウイルスを感染させた細胞の移植では、骨再生部におけるルシフェラーゼ活性は 1 週目でピークとなり、4 週では顕著に減少したが、レンチウイルスを感染させた細胞の移植では、1—12 週までほぼ同程度のルシフェラーゼ活性を示したことを報告した。さらに、アデノウイルス、レンチウイルスで *BMP-2* を感染させた細胞を移植すると、両者で良好な骨再生が誘導されたため、骨再生過程では初期の 1—2 週間 *BMP-2* が産生されていれば、その後の骨再生には宿主の細胞が骨芽細胞へ分化し、骨再生が促進されると考えられる。

#### c) 歯科用インプラント周囲の骨誘導への応用

歯科用インプラント周囲に rhBMP-2 を共有結合で付着させることにより、インプラント周囲の骨形成の促進やインプラント体周囲の骨への接着面が増加することが報告されている<sup>33</sup>。また、Dunn ら<sup>34</sup> *BMP-7* アデノウイルスを混合したコラーゲンをインプラント周囲に付着させて移植すると骨欠損部の骨量を有意に促進し、インプラント周囲における骨接触面も増加させる傾向があることを報告している。さらに、Seol ら<sup>35</sup> は、*BMP-2* の *BMPR-I* と *BMPR-II* に結合する部を模倣する 15 アミノ酸からなる合成ペプチドをインプラント周囲に結合させると、インプラント移植周囲における骨再生が亢進することを示唆する所見を報告している。今後、歯科用インプラントに *BMP* を応用する手法の開発も期待される。

### 3. 間葉系幹細胞の骨再生への臨床応用

現在までに、間葉系（幹）細胞を骨再生部に自家移植したとの臨床報告がなされている。Gan らは<sup>36</sup>、多孔性の  $\beta$ -TCP と間葉系幹細胞の混合物を 4 1 例の脊椎癒合術に適応し、その有効性を報告している。今までの報告は、間葉系幹細胞を  $\beta$ -TCP などの担体と混合して移植しているが、今後、間葉系幹細胞に BMP-2 などの遺伝子を発現したものの応用が期待される。

おわりに

以上のように、今後は細胞移植療法と遺伝子治療を念頭において新しい骨再生療法を開発するための基礎研究をさらに進展させ、臨床応用にまで発展することが期待される。この目的を達成するためには、正常の骨芽細胞の分化および骨形成の調節機構をさらに詳細に解析するプロジェクトも進行させ、骨再生の分子メカニズムを基盤とした口腔領域の骨再生療法を確立する必要がある。

### 参考文献

1. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG: Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 153:1133-1140,2001
2. Undale A, Srinivasan B, Drake M, McCready L, Atkinson E, Peterson J, Riggs BL, Amin S, Modder UI, Khosla S: Circulating osteogenic cells: characterization and relationship to rates of bone loss in postmenopausal women. *Bone.* 2010 47:83-92,2010
3. Yamaguchi A, Komori T, Suda T: Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and Cbfa1. *Endocr. Rev.* 21:393-411,2000
4. Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, Chernausek SD, Rosen CJ, Donahue LR, Malluche HH, Fagin JA, Clemens TL: Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology*141:2674-2682,2000
5. Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, Fujii T, Shimauchi H, Sasano T, Furuuchi T, Fukuda M, Noguchi T, Shibutani T, Iwayama Y, Takashiba S, Kurihara H, Ninomiya M, Kido J, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Hara Y, Izumi Y, Hirofuji T, Imai E, Omae M, Watanuki M, Murakami S: Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS One.* 3:e2611, 2008
6. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson

- RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T: Target disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764,1997
7. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29,2002
  8. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV: Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 36:1392-1404,2005.
  9. Niikura T, Hak DJ, Reddi AH: Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. *J Orthop Res*. 24:1463-1471,2006.
  10. Tsiridis E, Giannoudis PV: Transcriptomics and proteomics: advancing the understanding of genetic basis of fracture healing. *Injury*. 37:S13-19,2006.
  11. Kloen P, Di Paola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet DL, Goumans MJ: BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone*.;33:362-371,2003.
  12. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V: BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet*. 38:1424-1429,2006.
  13. Murakami N, Saito N, Takahashi J, Ota H, Horiuchi H, Nawata M, Okada T, Nozaki K, Takaoka K: Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier. *Biomaterials*. 24(13):2153-2159,2003.
  14. Hak DJ, Makino T, Niikura T, Hazelwood SJ, Curtiss S, Reddi AH: Recombinant human BMP-7 effectively prevents non-union in both young and old rats. *J Orthop Res*. 24:11-20,2006.
  15. Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, Mirza SK, Lyon TR, Webb LX, Pollak AN, Golden JD, Valentin-Opran A: Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am*. 88:1431-1441,2006.
  16. Ronga M, Baldo F, Zappalà G, Cherubino P: Recombinant human bone morphogenetic protein-7 for treatment of long bone non-union: An observational, retrospective, non-randomized study of 105 patients. *Injury* 37:S51-56,2006.
  17. Nordsletten L: Recent developments in the use of bone morphogenetic protein in orthopaedic trauma surgery. *Curr Med Res Opin*. 22:S13-17,2006.

18. Saito N, Okada T, Horiuchi H, Murakami N, Takahashi J, Nawata M, Ota H, Nozaki K, Takaoka K.: A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nat Biotechnol.* 19:332-335,2001.
19. Seeherman H, Wozney JM: Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:329-345,2005.
20. Bessho K, Konishi Y, Kaihara S, Fujimura K, Okubo Y, Iizuka T: Bone induction by *Escherichia coli* -derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 38:645-649,2000.
21. Sachse A, Wagner A, Keller M, Wagner O, Wetzel WD, Layher F, Venbrocks RA, Hortschansky P, Pietraszczyk M, Wiederanders B, Hempel HJ, Bossert J, Horn J, Schmuck K, Mollenhauer J: Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone* 37:699-710,2005.
22. Saito A, Suzuki Y, Ogata S, Ohtsuki C, Tanihara M: Accelerated bone repair with the use of a synthetic BMP-2-derived peptide and bone-marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A.* 72:77-82,2005.
23. Kim IS, Lee EN, Cho TH, Song YM, Hwang SJ, Oh JH, Park EK, Koo TY, Seo YK: Promising efficacy of *Escherichia coli* recombinant human bone morphogenetic protein-2 in collagen sponge for ectopic and orthotopic bone formation and comparison with mammalian cell recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng Part A.* 17:337-438,2011.
24. Toyoda H, Terai H, Sasaoka R, Oda K, Takaoka K: Augmentation of bone morphogenetic protein-induced bone mass by local delivery of a prostaglandin E EP4 receptor agonist. *Bone* 37:555-562,2005.
25. Zhao B, Katagiri T, Toyoda H, Takada T, Yanai T, Fukuda T, Chung UI, Koike T, Takaoka K, Kamijo R: Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem.* 281:23246-23253,2006.
26. Rundle CH, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Chen ST, Sheng MH, Wergedal JE, Lau KH, Baylink DJ: In vivo bone formation in fracture repair induced by direct retroviral-based gene therapy with bone morphogenetic protein-4. *Bone.* 32:591-601,2003.
27. Egermann M, Baltzer AW, Adamaszek S, Evans C, Robbins P, Schneider E, Lill CA: Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. *Hum Gene Ther.* 17:507-517,2006.
28. Peng H, Usas A, Gearhart B, Olshanski A, Shen HC, Huard J: Converse relationship between in vitro osteogenic differentiation and in vivo bone healing elicited by different

- populations of muscle-derived cells genetically engineered to express BMP4. *J Bone Miner Res.* 19:630-641,2004.
29. Gamradt SC, Abe N, Bahamonde ME, Lee YP, Nelson SD, Lyons KM, Lieberman JR: Tracking expression of virally mediated BMP-2 in gene therapy for bone repair. *Clin Orthop Relat Res.* 450:238-245,2006.
  30. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, Lieberman JR: Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng.* 11:120-129,2005.
  31. Hirata K, Tsukazaki T, Kadowaki A, Furukawa K, Shibata Y, Moriishi T, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Mizuno A, Yamaguchi A: Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 promotes bone repair more effectively than those expressing Runx2. *Bone.* 32:502-512,2003.
  32. Feeley BT, Conduah AH, Sugiyama O, Krenek L, Chen IS, Lieberman JR: In vivo molecular imaging of adenoviral versus lentiviral gene therapy in two bone formation models. *J Orthop Res.* 24:1709-1721,2006.
  33. Becker J, Kirsch A, Schwarz F, Chatzinikolaidou M, Rothamel D, Lekovic V, Laub M, Jennissen HP: Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clin Oral Investig.* 10:217-224,2006.
  34. Dunn CA, Jin Q, Taba M Jr, Franceschi RT, Bruce Rutherford R, Giannobile WV: BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects. *Mol Ther.* 11:294-299,2005.
  35. Seol YJ, Park YJ, Lee SC, Kim KH, Lee JY, Kim TI, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Chung CP: Enhanced osteogenic promotion around dental implants with synthetic binding motif mimicking bone morphogenetic protein (BMP)-2. *J Biomed Mater Res A.* 77:599-607,2006.
  36. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J: The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials.* 29:3973-8239,2008.

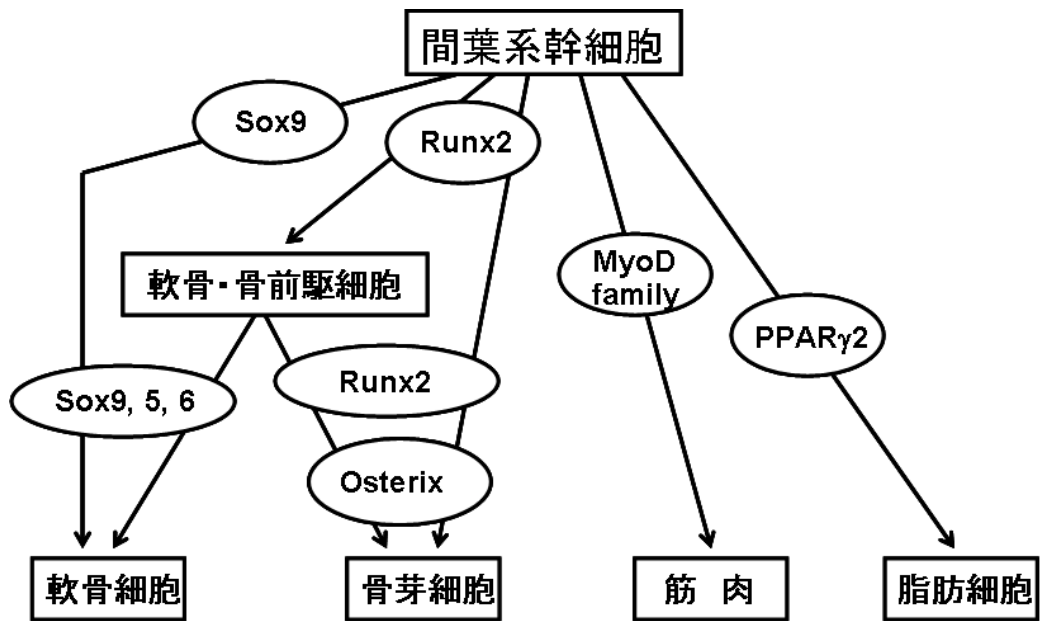


図 1  
 間葉系幹細胞から各間葉系細胞系譜への分化を制御する転写因子

## 歯周組織再生治療における細胞移植について

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

和泉 雄一

本邦における再生医療研究の実例

1. 歯周組織の細胞移植療法。骨髄間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生療法。

題名「歯周組織の細胞移植療法。骨髄間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生療法。」

著者「河口浩之、林秀昭、水野智仁、藤田剛、長谷川直彦、柴 秀樹、中村茂夫、日野孝宗、吉野宏、田中英夫、木村昭郎、辻紘一郎、加藤幸夫、栗原英見」

掲載誌名「Clinical Calcium 2005; 15: 1197-1202.」

題名「臨床応用一再生医療の実例一 歯周組織再生医療の実例」

著者「河口浩之、栗原英見」

掲載誌名「Nippon Rinsho 2008; 66: 948-954.」

1) 臨床研究デザイン

症例報告（コントロールなし）

2) 対象疾患

記載なし（歯周組織骨内欠損を有する患者と思われる。）

3) 登録症例数

7例

4) 評価項目

有効性：規格デンタルエックス線写真上での歯槽骨の再生

安全性：有害事象

5) 試験期間

2カ月～1年

6) 結果

エックス線写真上での歯槽骨の再生が認められた。

有害な事象は観察されなかった。

2. 組織工学的技術を応用し間葉系幹細胞と多血小板血清を使用した新規歯周組織再生療法。症例報告。

題名 「A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: a clinical case report.」

著者 「Yamada Y, Ueda M, Hideharu H and Baba S.」

掲載誌名 「Int J Periodontics Restorative Dent 2006; 26: 362-369.」

1) 臨床研究デザイン

症例報告 (コントロールあり)

2) 対象疾患

記載なし (歯周組織骨内欠損を有する患者と思われる。)

3) 登録症例数

1例 (54歳女性)

4) 評価項目

有効性: クリニカルアタッチメントレベル

安全性: 有害事象

5) 試験期間

1年

6) 結果

実験側で最大 4mm のアタッチメントゲインが観察された。

有害な事象は観察されなかった。

3. ヒト培養骨膜シート移植に多血小板血清とハイドロキシアパタイト顆粒を併称したヒト骨内歯周組織欠損の治療。症例報告。

題名 「Treatment of human infrabony periodontal defects by grafting human cultured periosteum sheets combined with platelet-rich plasma and porous hydroxyapatite granules: case series.」

著者 「Okuda K, Yamamiya K, Kawase T, Mizuno H, Ueda M, Yoshie H.」

掲載誌名 「J Int Acad Periodontol. 2009; 11: 206-213.」

1) 臨床研究デザイン

症例報告 (コントロールあり)

2) 対象疾患

歯周組織骨内欠損を有する患者。

3) 登録症例数

3例 (女性)

4) 評価項目

有効性: クリニカルアタッチメントレベル

安全性: 有害事象



5) 試験期間

6 か月

6) 結果

クリニカルアタッチメントゲインが 確認された。

有害な事象は観察されなかった。

#### 海外における再生医療臨床研究の実例

1. 歯根膜細胞前駆細胞を用いた人における歯周組織の再生。3 症例の報告。

題名 「Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases」

著者 「Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang T-M, Chen J-H, Wang BB, Huang G T-J, Wang S, Shi S.」

掲載誌名 「Oral Diseases 2010; 16: 20–28.」

1) 臨床研究デザイン

症例報告 (コントロールなし)

2) 対象疾患

6mm 以上の歯周ポケットを有する骨内欠損のある広汎型慢性歯周炎患者

3) 登録症例数

3 例 (25 歳 2 例、42 歳 1 例)

4) 評価項目

有効性：クリニカルアタッチメントレベル

安全性：有害事象

5) 試験期間

32～72 カ月

6) 結果

症例により、2～6mm のアタッチメントゲインが認められた。

有害事象は観察されなかった。

#### 再生医療研究の実例について

歯周組織再生における細胞移植を用いた臨床研究の報告はいまだ少なく、現状においては人への応用を行った報告はわずかである。臨床研究の報告は本邦におけるものが多かった。どの報告においても症例報告であり、その効果に関して、通常の歯周外科手術

との比較、また現在までに行われている歯周組織再生療法(歯周組織再生誘導法 (GTR法)、エナメルマトリックスタンパクを使用した歯周組織再生療法 (EMDGAIN®) )等との比較が必要であろう。今後、より多数の患者における対照群を有した臨床研究 (Randomized Controlled Clinical Trial (RCT)) が必要と考えられる。

# 自己骨髄間葉系幹細胞移植による歯周組織再生治療と課題

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  
栗原 英見

はじめに

細胞移植による再生医療は、これまで治療が困難といわれていた疾患を根治させる可能性をもった新しい概念の医療である。歯周病は糖尿病、動脈硬化症、早産・低体重児出産などに関わることが明らかになり、再生医療で歯周病を治療することは、全身の健康の保持・促進に大きく寄与する。旧広島大学歯学部附属病院（現広島大学病院（歯科領域））では、腸骨骨髓液から間葉系幹細胞を分離・培養し、未分化な状態で歯周病罹患部位へ細胞を移植して歯周組織を再生させる臨床研究を行った。本稿では、基礎研究から臨床へ展開した「骨髄由来間葉系幹細胞を用いた歯周病治療」について述べる。尚、本臨床研究は平成14年10月17日に広島大学歯学部倫理委員会において承認され、平成18年までに完了している。厚生労働省から出された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が厚生労働省から出された平成18年7月3日より以前に開始されたものである。

## I. 細胞移植による歯周組織再生治療と骨髄間葉系幹細胞

現在あるいは今後開発される新しい“歯周組織再生療法”には、サイトカイン療法と細胞治療が挙げられる。前者は比較的小さな組織欠損に対して、主として増殖因子に分類されるサイトカイン（fibroblast growth factor-2 : FGF-2、platelet-derived growth factor : PDGF、brain-derived neurotrophic factor : BDNF など）を薬あるいはデバイスとして局所に投与して、局所の組織再生能力のある細胞を活性化し、組織再生カスケードを起動するものである。後者は大きな組織欠損に対応する方法である。大きな欠損では歯周組織局所に残存あるいは誘導できる細胞だけでは十分な再生が期待できない。そこで、組織再生能力のある細胞を移植することによって歯周組織を再生しようとするものである。骨髄間葉系幹細胞（MSC）は軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞などに分化する能力を有している。Tsutsumi ら<sup>1)</sup>は、骨髄から間葉系幹細胞を分離・培養する際、FGF-2 を培地に加えることで、多分化能のある未分化な状態を保持したまま骨髄間葉系幹細胞を効率良く増殖させる方法を確立した。

## II. 骨髄間葉系幹細胞移植による歯周組織再生の動物実験

歯周組織再生治療では、セメント質、歯槽骨、歯周靭帯、歯肉といった複数の異なる組織を再生させる必要があるため、様々な細胞に分化できる MSC は歯周組織再生に最も適した細胞と考えられる。ビーグル犬の腸骨あるいは顎骨から MSC を分離し、Tsutsumi らの方法によ

って細胞増殖し、ビーグル犬臼歯部に実験的に作製した分岐部病変に増殖した MSC を 2 % アテロコラーゲンゲルと混和して移植した。MSC 移植後 8 週間後には、分岐部病変がほぼ新生歯槽骨で満たされ、歯周靭帯、セメント質も再生していた。歯肉上皮細胞の侵入、骨性癒着、歯根吸収は観察されなかった<sup>2)</sup>。さらに、同じ実験系で green fluorescence protein (GFP) で標識した MSC を移植したところセメント芽細胞、歯周靭帯線維芽細胞、骨芽細胞、骨細胞と思われる細胞で GFP 陽性反応が観察され (図 1)、移植した MSC が歯周局所で様々な細胞に分化して歯周組織を再生したと考えられた<sup>3)</sup>。学内の倫理委員会の承認後、歯周炎治療に骨髄間葉系幹細胞を移植し歯周組織を再生させる臨床研究を行った。

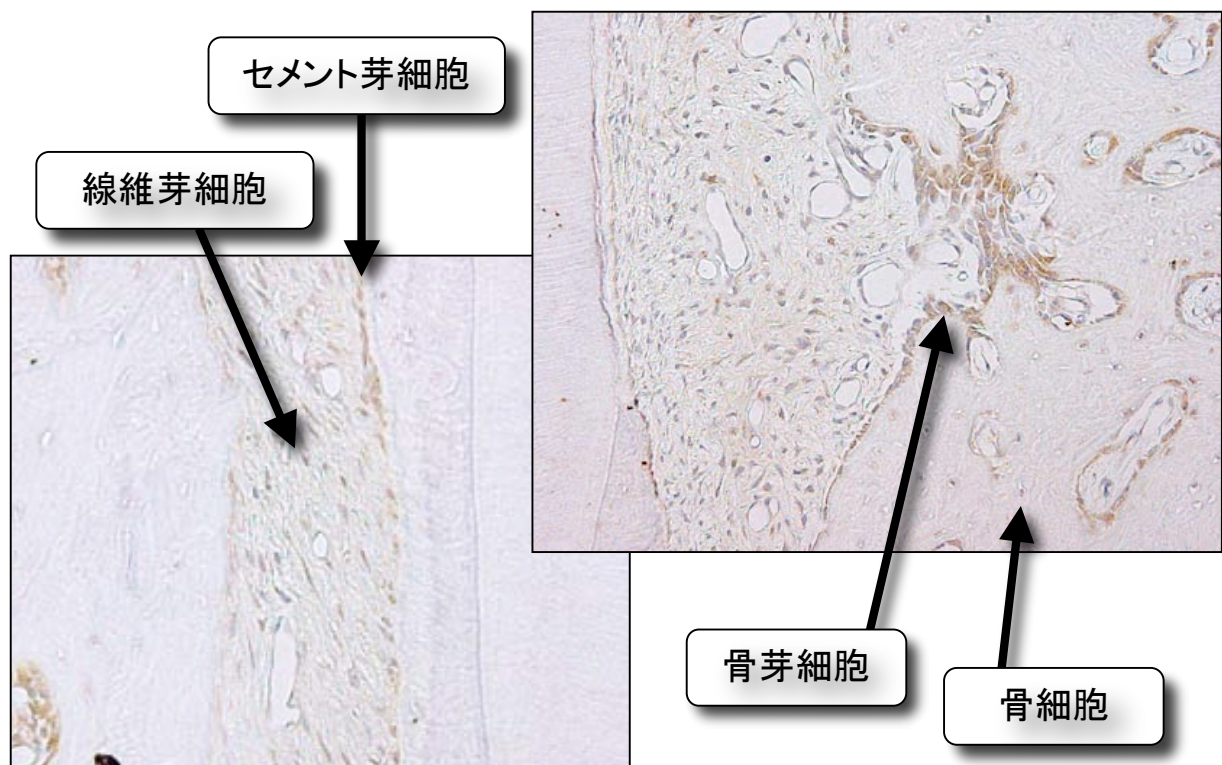


図1. 移植MSCの歯周組織局所における分化

GFPで標識した骨髄間葉系幹細胞を移植。セメント芽細胞、骨芽細胞、歯周靭帯線維芽細胞にGFP陽性反応が見られる。

### Ⅲ. 自己骨髄間葉系幹細胞移植による歯周組織再生治療の臨床研究

#### 1. 臨床研究の基本的な方針と安全対策

本臨床研究は、患者自己の骨髄間葉系幹細胞を、患者自己血清を用いて分離・培養し、未分化の状態歯周組織欠損部に移植するものである。広島大学病院の歯科と医科の診療科で分業体制をとり、広島大学内の基礎講座、さらには関連企業・ベンチャー企業と共同して、この治療法の「有効性」と「安全性」を検証した。臨床研究の実施に関しては、新 GCP (Good Clinical Practice) 準拠したプロトコルを作成した。対象の歯周組織欠損は Class II の分岐部病変、2 壁性、3 壁性の骨縁下欠損、すり鉢状歯槽骨欠損とした。対象年齢は 20 歳から 60

歳として、細かな除外基準は別に定め予備登録後の検査結果が適合する患者を本登録した。細胞培養を伴う再生医療では、細胞移植に至るまでに培養細胞への微生物汚染、ヒューマンエラー、いたずら・盗難など様々なリスクが考えられ、それぞれに対して、ハードウェア、ソフトウェアの面から安全対策を講じた。また、移植 MSC の質の担保についても最新の知見を基に行なった。

## 2. 治療の流れ (図2)

以下に述べる事項については標準作業手順書を作成し、それに基づいて複数で作業を実施した。細胞培養については2名の作業員に加え作業モニター1名の3名体制で実施した。また、患者の予備登録から細胞移植手術までの全てのステップを(株)富士通と共に開発した臨床研究支援ソフトの管理下で行った。

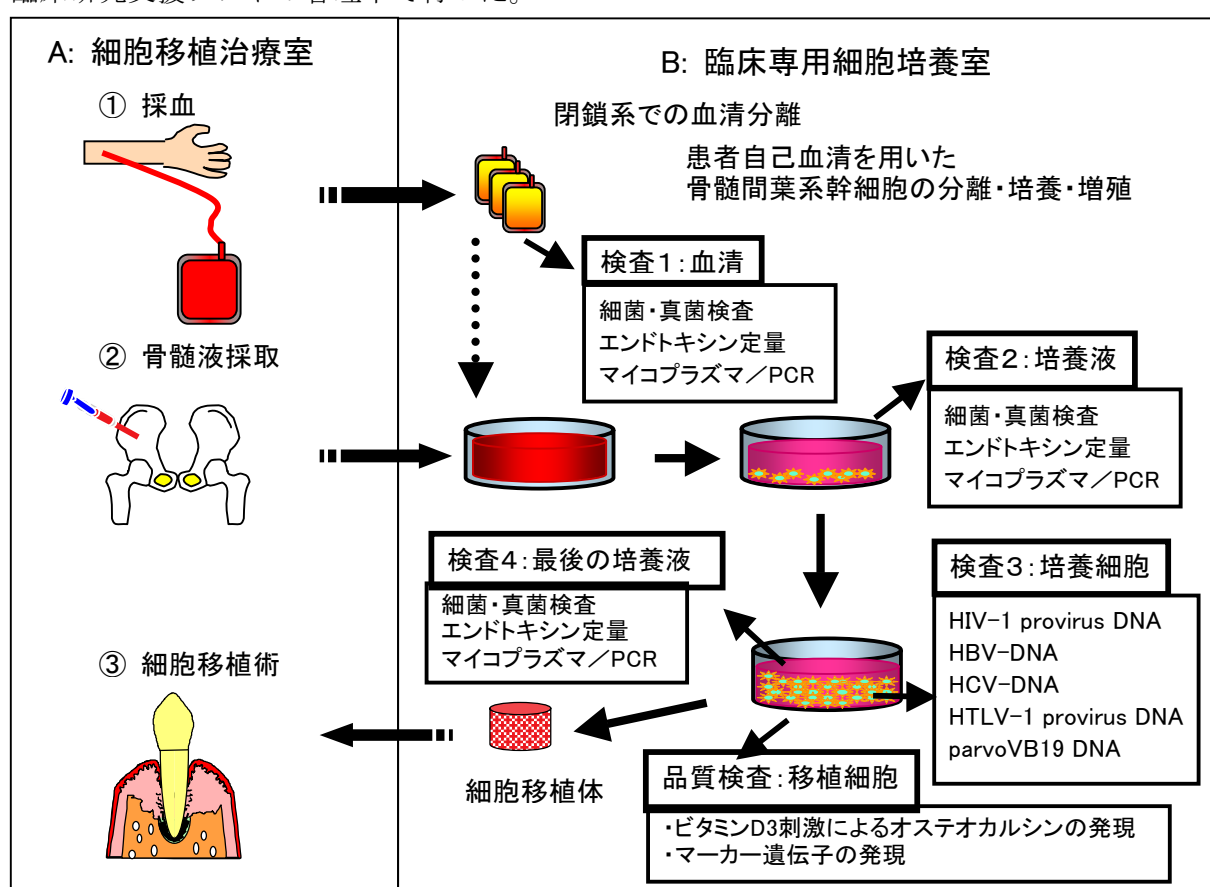


図2. 自己骨髄間葉系幹細胞移植治療の流れ

### a. 採血と血清分離

基礎研究における細胞培養では、一般に市販のウシ胎児血清 (FCS) を含む培地を使用しているが、FCS には未知の感染物質の存在の可能性が否定できないため、本臨床研究では患者自身の血清を使って細胞培養を行った。患者の前腕肘正中静脈から 200ml の採血を行い、約 90ml の患者血清を分離した (図3 A)。採血から血清分離までの全作業は、専用の血清分離バッグで行った (図3 B-D)。このバッグを利用することで採血から血清分離までの全過程を完全な閉鎖系で行うことが可能となり、外部からの寄生体の混入を避けることができる。このバ

バッグを用いて分離した成人血清はヒト MSC を FCS 以上の効率で増殖させることを事前に確認した (図 4) <sup>4)</sup>。

分離した患者血清の一部は直ちに細菌・真菌培養検査、エンドトキシン定量検査、マイコプラズマ PCR 検査を行い、使用時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

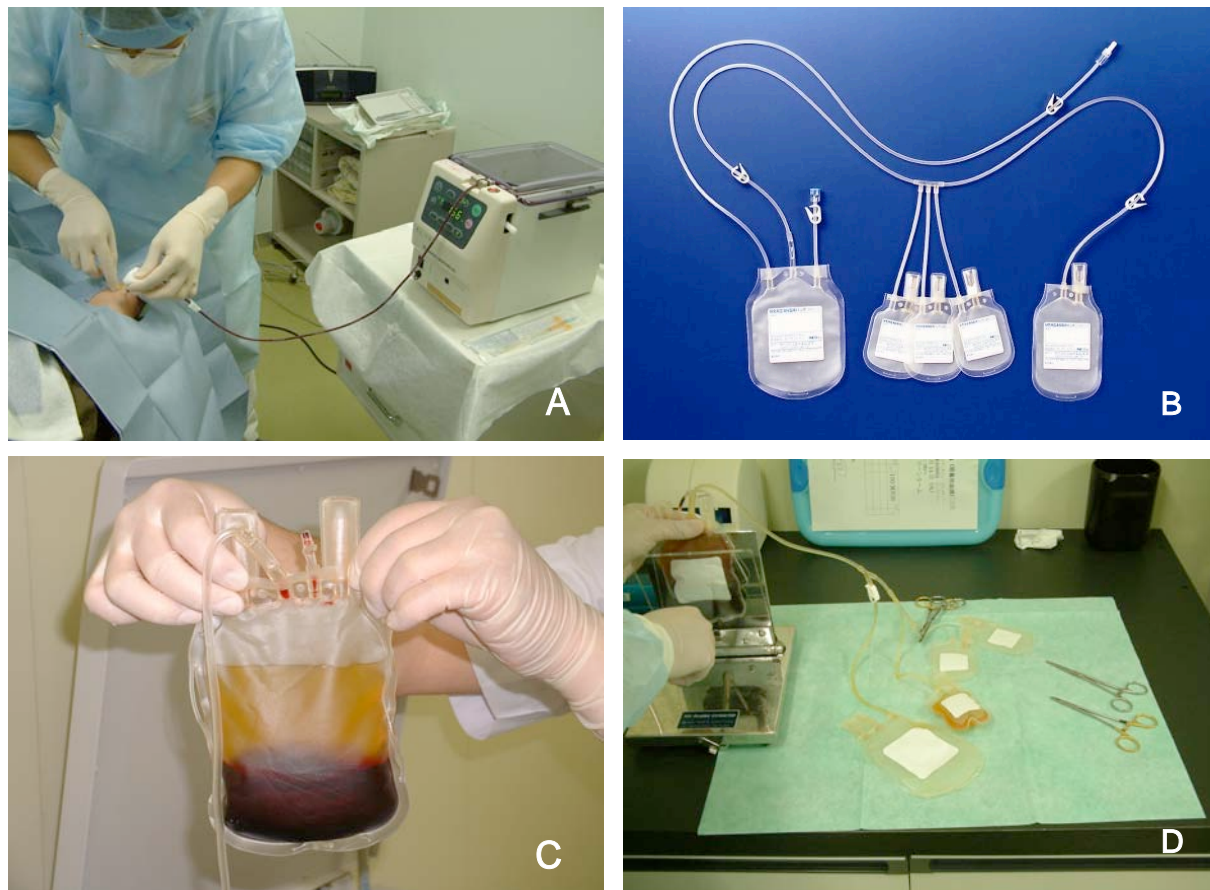


図3. 完全閉鎖系による自己血清の分離

A:前腕肘正中静脈から採血、B:専用の血清分離用バッグ、C:専用のバッグ内で凝血後、遠心して血清成分を分離、E:血清分離板を用い、血清のみを連結している小バッグに移す。

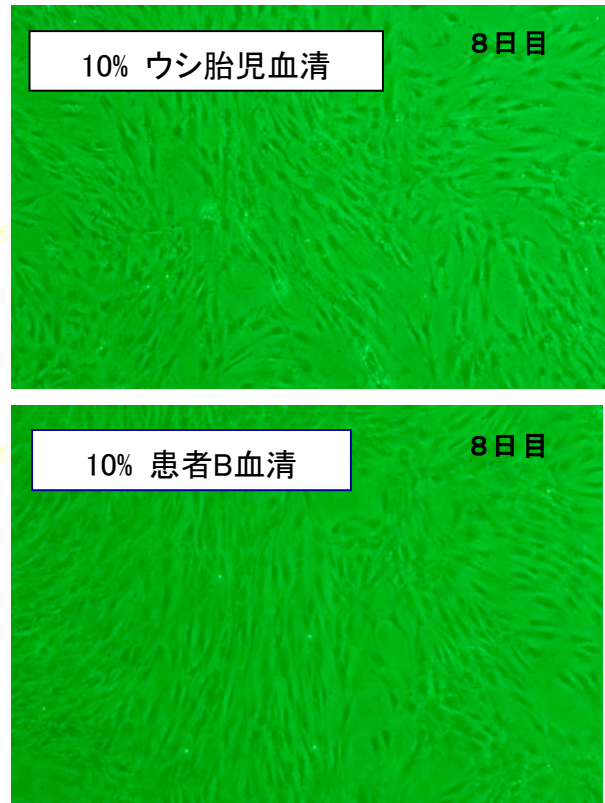
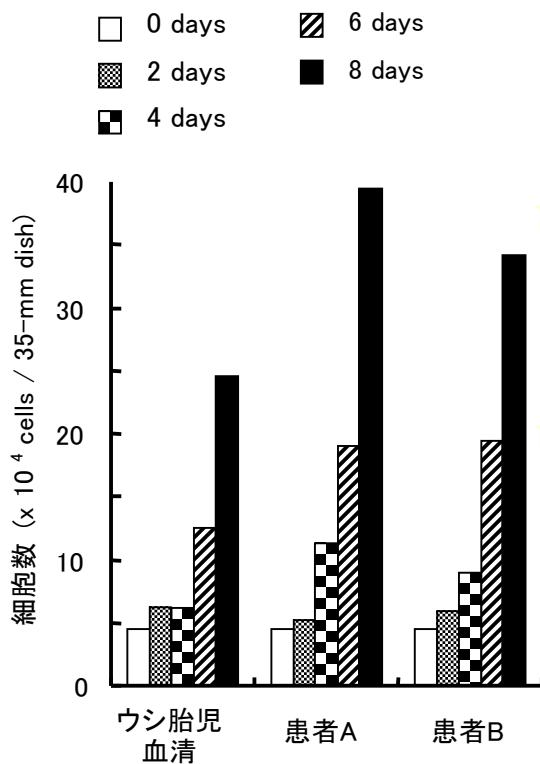


図4. 完全閉鎖系血清分離バッグで分離した成人血清のヒト骨髄間葉系幹細胞増殖能

#### b. 骨髄液採取と MSC の分離・培養

患者の骨髄液は局所麻酔下で腸骨から約 15ml 採取した (図 5 A)。採取した骨髄液は、直ちに 100 unit/ml のヘパリンを含有した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) と混和し、細胞培養室に搬送、細胞を洗浄した後に 10% 患者自己血清およびストレプトマイシン、ゲンタマイシンを含む DMEM、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した (図 5 B, C)。培地は 3 日毎に交換し、幹細胞のコロニーが形成された時点で FGF-2 (1 ng/ml) を添加、継代し、必要な細胞数まで増殖させた (図 5 D)。通常、3 回の継代で 21 日間培養することで必要な細胞数に達する。細胞培養期間中にウィルスや細菌、真菌などの寄生体の混入についてモニタリングするため、培養細胞と細胞培養液を一部採取し、検査を行った。

培養した細胞が MSC であることを確認 (細胞品質の検証) のために、一般的な幹細胞表面マーカー (CD29(+), CD105(+), CD34(-)) の発現確認の他に、ビタミン D3 刺激によるオステオカルシンの発現誘導、MSC の遺伝子発現を確認した。MSC の特異的マーカーは同定されていないので、標準の MSC と標準線維芽細胞における遺伝子の発現パターンの比較から、tissue factor pathway inhibitor 2、serine (or cysteine) proteinase inhibitor、MHC-DR- $\alpha$ 、MHC-DR- $\beta$  などを幹細胞で発現の強いマーカー遺伝子 (図 6)、matrix metalloproteinase 1、collagen type XV $\alpha$ 1、CUG triplet repeat RNA-binding protein などは標準線維芽細胞株で強く発現するマーカー遺伝子とし<sup>5)</sup>、移植細胞の遺伝子発現パターンを確認することによって培養 MSC の品質保証とし

た。その後の基礎研究で、他にもいくつかの有用な分子マーカーも同定し、マーカー遺伝子として利用した<sup>9)</sup>。表1に今回の臨床研究で実施した細胞の安全性と質の検査項目と判定値を示す。

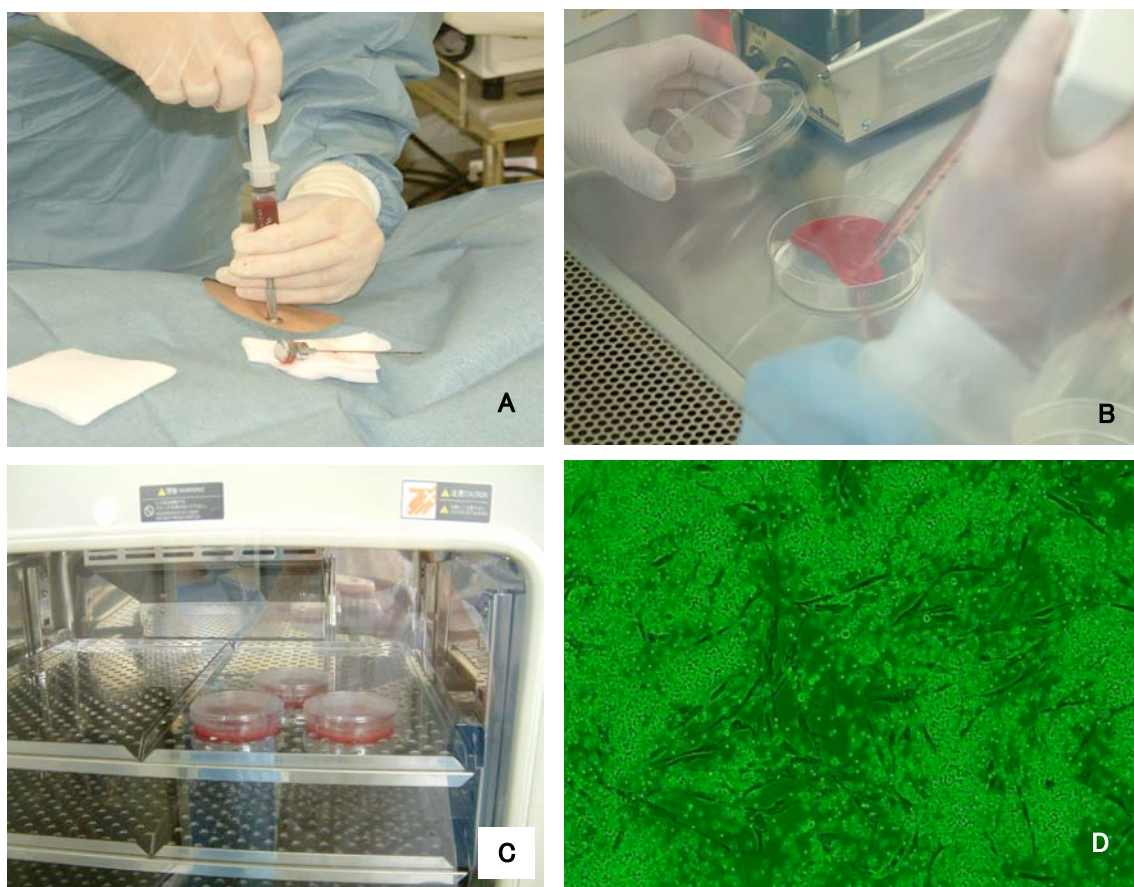


図5. 骨髄液採取から細胞培養まで  
A. 腸骨骨髄液の採取、B,C. 骨髄液からの間葉系幹細胞の分離・培養、D. 紡錘形細胞がシャーレに付着(培養3日目の細胞)

表1. 細胞の安全性と質の確認検査一覧

	検査項目	検査方法	判定基準
安 全 性 検	真菌・細菌否定試験	培養法	(-)
	糸状性真菌否定試験	培養法	(-)
	全マイコプラズマ属共通 PCR	PCR 法	(-)
	エンドトキシン定量	エンドスペシー法	50 EU/L 以下
	HIV-1 プロウィルス DNA	PCR 法	(-)
	HBV-DNA S 領域リアルタイム PCR 定 量	リアルタイム PCR 法	(-)
	HCV-RNA/Nested-PCR	RT-PCR 法	(-)
	HTLV-1 プロウィルス DNA	PCR 法	(-)



査	パルボウイルス B19 DNA/PCR 定量	リアルタイム PCR 法	(-)
質 の	表面マーカー	フローサイトメトリー法	CD29(+), CD105(+), CD34(-)
検 査	遺伝子発現	リアルタイム PCR 法	幹細胞マーカー遺伝子と線維芽細胞マーカー遺伝子の発現パターンを分析

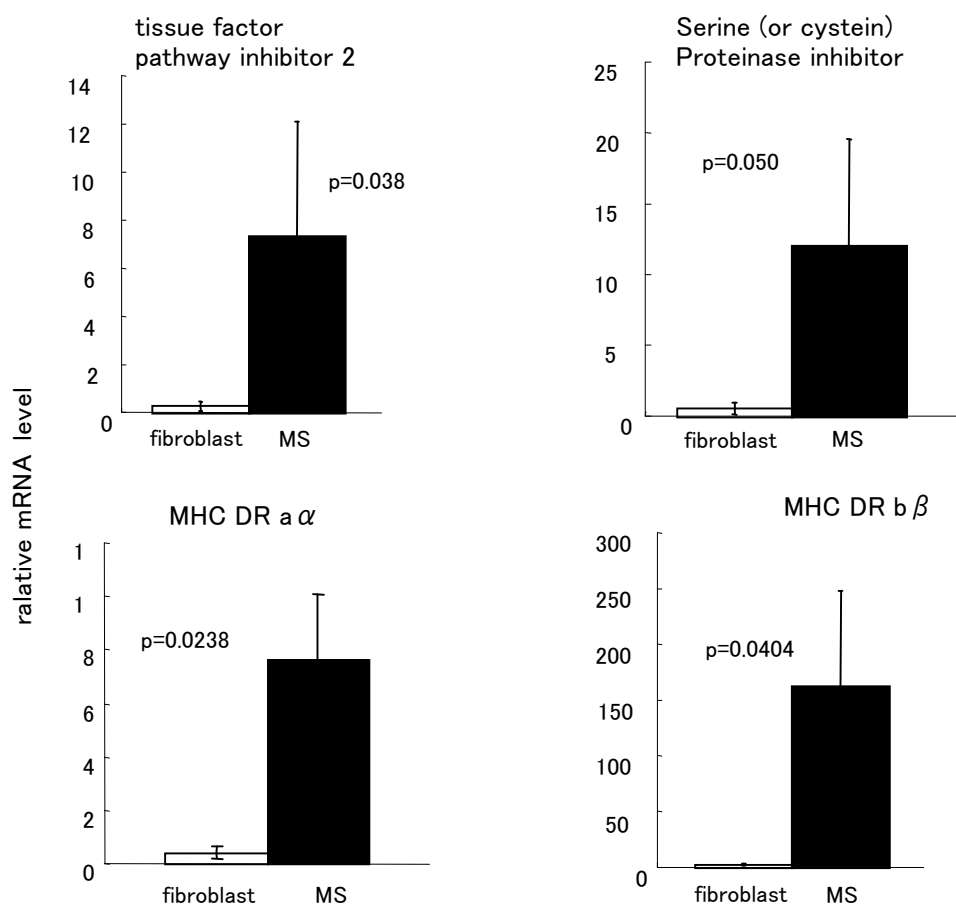


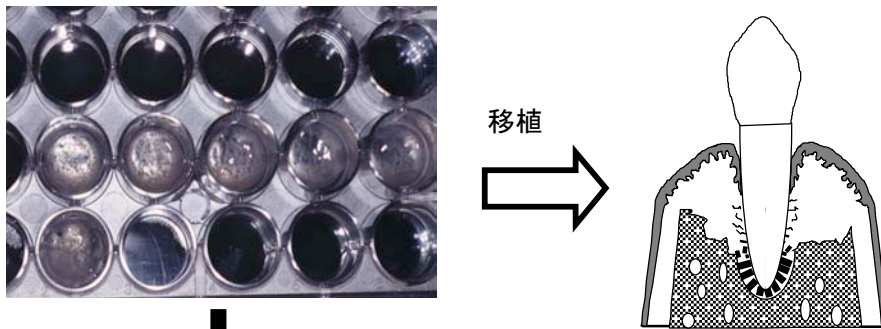
図6. ヒト骨髄幹細胞の遺伝子発現の相対比較パターン  
骨髄幹細胞(■)で線維芽細胞(□)よりも多く発現する遺伝子

### c. 細胞移植

細胞移植手術は骨髄採取日から約3週間後、通常では十分な数のMSCが獲得できる日に設定した。細胞移植当日は細胞移植治療室(手術室)と細胞培養室の間で綿密に連絡を取り合って手術の進行に合わせて移植体の調整を行なった。MSCを培養皿からトリプシンを用いて剥離し、MSCの細胞密度が $2 \times 10^7$  cells/mlとなるよう医療用2%アテロコラーゲン(株式会社高研、東京)と混和し細胞複合体を作成した。細胞複合体中のMSCの生細胞数(トリパンブルー染色陰性細胞)を確認したところ94%であった(図7)。また、細胞複合体中のMSCを組織学的に観察するとアテロコラーゲングル内に平均的に分散していた。細胞移植手術は、

一般的に行われている Guided Tissue Regeneration 法に準じて行なった。口腔内・手術野を可及的に消毒後、局所麻酔後に歯肉溝切開を入れ、歯肉を剥離、歯肉骨膜弁を形成した。歯肉縁下歯石および壊死セメント質を除去、病変部の炎症性肉芽組織を搔爬・廓清後、歯根面を滑沢化後に細胞複合体を移植し、歯肉弁を復位、縫合した。細胞複合体の移植は調製後10分以内に完了した。患者は手術当日は入院し、出血等に対する術後管理、術後口腔衛生管理と食事の管理を行なった。

細胞複合体:2%アテロコラーゲン中に $2 \times 10^7$ cells/mlのMSC



細胞複合体中の生細胞数の確認

① 細胞を回収

0.1%コラゲナーゼ/培地で37℃、1時間処理後遠心

② 生細胞数の計測

トリパンプルー染色陰性細胞

細胞複合体中の細胞生存率:94%

図7. 細胞複合体中調製後の細胞生存率の測定

移植のために調製した細胞複合体の一部を用いて細胞を再分離し生細胞数を確認した。

d. 移植後評価

本治療法の有効性を評価するための主たる評価項目は規格デンタルエックス線写真による歯槽骨再生量とした。また、副次的な評価項目として規格測定された臨床的アタッチメントレベル (CAL) から算出した臨床的アタッチメント獲得量とした。評価時期は移植3ヵ月後、移植6ヵ月後として術前の検査値と比較した。規格デンタルエックス線写真上では、移植後6ヵ月から歯槽骨の再生が認められ、その後も再生歯槽骨はより明瞭となっている。一部の症例では患者の協力のもと移植後1年、2年で評価した。細胞を移植した全8症例の平均歯槽骨獲得率は69.3%、臨床的アタッチメント平均獲得量は全症例平均で2.44mm、各症例の

CAL 最大部の獲得量の全症例平均は 2.89mmであった。細胞移植による口腔内、移植局所、全身的な有害事象は無かった。

#### IV. 課題と展望

MSC 移植による歯周組織再生治療をより質の高いものに改善、改良すべき課題がある。私どもが考えている課題は、①更なる安全性の担保、②患者負担の軽減、③効率化である。安全性に関しては細胞培養を担当する者の質の担保（公的資格認定など）、無血清合成培地の利用が挙げられる。患者負担の軽減については MSC の採取部位として顎骨骨髓、歯髄などへの変更が考えられる。また、培養した MSC を凍結保存して複数回使用する安全な方法を確立する必要がある。無血清合成培地の使用は患者負担の軽減にも繋がる。効率化については細胞自動培養装置の導入が考えられる。行政の支援体制も整ってきたことから、新しい指針に準拠したシステムを構築し自己間葉系幹細胞移植による歯周組織再生治療の標準化、効率化を進めていきたいと考えている。

#### 参考文献

- 1) Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K et al : Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 413-419, 2001.
- 2) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N et al : Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 75: 1281-1287, 2004
- 3) Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A et al : Behavior of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* 77: 1003-1007, 2006.
- 4) Mizuno N, Shiba H, Ozeki Y et al : Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures. *Cell Biol. Inter.* 30: 521-524, 2006.
- 5) Ishii M, Koike C, Igarashi A et al : Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 297-303, 2005.
- 6) Igarashi A, Segoshi K, Sakai Y et al : Selection of common markers for bone marrow stromal cells from various bones using real-time RT-PCR: effects of passage number and donor age. *Tissue Engineering* 13: 2405-2417, 2007.

## リコンビナントサイトカインを用いた歯周組織再生誘導

### －開発の現状、課題、将来展望－

大阪大学大学院歯学研究科

村上伸也

#### 1) はじめに

歯周炎の原因は、歯と歯肉の境界部（歯肉縁）周辺に付着したデンタルプラーク（細菌性バイオフィルム）である。従って、患者自身による口腔清掃や dental professional によるスケーリングやルートプレーニングを適切に行うことでその原因を機械的に除去することにより、歯周炎の進行阻止が達成されている。しかしながら、このようないわゆる原因除去療法のみでは、歯周炎の進行により喪失された歯周組織を元通り取り戻すことはできない。進行した症例の場合には、原因除去療法に引き続き歯周外科療法（フラップ手術が一般的な術式として行われる）が施されることがあるが、その場合に期待できる歯周組織再生量は極めて限られている。近年になり、歯根周囲に存在する靭帯組織である「歯根膜」の中に、未分化間葉系幹細胞が成人になっても保存されていることが証明され(1)、この組織幹細胞を活用することにより歯周組織の再生量を人為的に高めるための歯科医学的工夫がなされるようになった。まず、歯を支持する歯槽骨の再生を促進する目的で、自家骨の移植（歯周外科時に顎骨骨体部等より自家骨を少量採取して移植）や骨伝導性骨補填剤の填入が行われるようになった(2)。このような目的の骨補填剤は現在も全世界的に開発・販売され、臨床応用されている。1980年代に入ると Guided Tissue Regeneration（GTR）法が開発され臨床応用されるようになった(3)。そしてこれ以降、「歯周組織再生療法」が歯周治療のオプションの一つに加えられるようになった。しかしながら現在においても、technique sensitive な治療法である、予知性が低い、といった問題点が GTR 法の課題として残され、新たな歯周組織再生療法の開発が継続されることとなった。1990年代に入り、新たに開発されたのが、エナメルマトリクスデリバティブ（EMD）である(4)。これは、歯根形成期にエナメル上皮細胞より分泌されるエナメルマトリクスタンパクがセメント質形成を促進することに着目して開発された医療材料であり、ブタの顎骨の幼若歯胚より粗精製した amelogenin を豊富に含む画分が製品として販売されている。EMD は technique sensitive という問題をある程度解決したといえるが、将来的にはヒト型リコンビナント製剤が開発されることが期待されている。

このような背景から、ヒト型リコンビナントサイトカインを用いて歯根膜中の組織幹細胞を活性化することにより歯周組織再生を誘導しようとする試みが、次世代の歯周組織再生療法として現在注目を集めている。動物実験で歯周組織再生誘導能が確認されているサイトカインを表1に示す。このうち、歯周病患者を対象とした臨床試験において、その有効性が示唆されているサイトカインに焦点をあて、その開発の経緯・現状・課題・将来展望について以下に記す。

## 2) サイトカイン療法開発の現状

### (1) 血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) とインスリン様増殖因子-1 (IGF-I)

PDGFはA鎖、B鎖とよばれる2種類のタンパクが2量体を形成しており、その組み合わせにより3種のアイソフォーム-AA, -AB, -BBの存在が確認されている。このうち、PDGF-BBは、糖尿病性の足部潰瘍治療薬(Regranex®)として米国・欧州等にて臨床応用がなされている。

PDGFの歯周組織再生誘導剤としての有効性を検討した初期の研究においては、PDGF-BBとIGF-1の合剤を用いて、その効果が検討されている。ビーグル犬の自然発症歯周炎の結果発症した歯周組織欠損部に3 $\mu$ gのPDGF-BBとIGF-1を投与することにより歯槽骨・セメント質の新生が観察されたと報告されている(5)。つぎに、カニクイザルに実験的歯周炎を誘発させ、その結果形成された歯周組織欠損部に10 $\mu$ gのPDGF-BB, IGF-1を投与し、歯周組織再生量を評価している(6)。その結果、以下の①～③の結果を報告している。すなわち、①IGF-1のみでは統計学的に有意な歯周組織再生が誘導されなかった。②PDGF-BBのみでは、新付着量のみ有意な再生が誘導された。③PDGF-BB/IGF-1の合剤を投与することにより統計学的に有意な新付着および骨充填が認められた。

次いで、0.15mg/mlのPDGF-BBとIGF-1の合剤を用いて38名の歯周病患者を対象にして臨床試験(2施設二重盲検臨床治験)がなされた。その結果、同合剤の投与により統計学的に有意な骨再生量(実薬群42.3% vs 対照群18.5%  $p<0.05$ )が得られたと報告されている(7)。一方で、臨床的付着レベル(CAL)の獲得量には統計学的有意差は認められなかった(実薬群1.52mm vs 対照群1.98mm)。また、PDGF-BBの培養ヒト歯根膜細胞(HPDL)に対する作用が*in vitro*にて検討されており、PDGF-BBはHPDLの増殖・コラーゲン産生を促進することが明らかにされている(8,9)。しかしながら、上記の研究成果以降、PDGF-BBとIGF-1の合剤を用いたヒトでの歯周組織再生誘導効果の検討に関する報告は途絶えることになり、現在に至っている。

## (2) PDGF-BB と $\beta$ -TCP (GEM-21S)

その後、歯周組織再生における PDGF-BB と骨伝導性の足場材である  $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -tricalcium phosphate:  $\beta$ -TCP) の併用効果が、11 の施設が参加した無作為比較対照試験として検討されることとなった(10)。計 180 名の歯周病患者を① $\beta$ -TCP + 0.3mg/ml PDGF-BB、② $\beta$ -TCP + 1.0mg/ml PDGF-BB、③ $\beta$ -TCP のみ、の 3 群に無作為に割り付け、6 ヶ月後に臨床的付着レベル (CAL) の獲得量の評価と、レントゲンの結果を基にした骨再生量の評価が行われた。その結果、6 ヶ月後の CAL の獲得はそれぞれ平均値で①3.7mm、②3.7mm、③3.5mm、となり、これら群間での統計学的有意差は認められなかった (①vs③、 $p=0.11$ )。しかしながら、レントゲンのな%骨再生量においては①57%>②34%>③18%の順で統計学的に有意な差 (①vs③、 $p<0.001$ ) が示された。また本臨床研究では、プラセボ群との比較において、0.3mg/ml の低濃度 PDGF-BB 投与群の方が、1.0mg/ml の高濃度 PDGF-BB 投与群よりも、統計学的に高い骨再生誘導能 (①vs②、 $p<0.01$ ) を示した。

この結果を受け、[ $\beta$ -TCP + 0.3mg/ml PDGF-BB]製剤は、歯周組織再生材料として米国食品医薬局 (FDA) の承認を受け、GEM21S®の商品名で米国での販売が開始されている。

## (3) 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2)

線維芽細胞増殖因子 (FGF) は、FGF-1~23 からなるファミリーを形成している。FGF-2 は、線維芽細胞のみならず血管内皮細胞、神経外胚葉系細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、血管平滑筋細胞、上皮細胞などの多種類の細胞の増殖を誘導することが知られている。とりわけ、再生医学の分野で注目されている FGF-2 の活性の 1 つに、その強力な血管新生促進作用が挙げられる。さらに、FGF-2 は未分化間葉系細胞の多分化能を保持させたまま、その細胞増殖を促進する活性を有していることも明らかにされている。臨床応用例として、褥瘡性潰瘍等の難治性皮膚潰瘍の治療薬 (Fiblast Spray®) として FGF-2 製剤は製造承認が取られている(11)。

FGF-2 の歯周組織再生誘導効果も、ビーグル犬およびカニクイザルを用いた実験的 2 級根分岐部モデルより検証されている(12,13,14)。同歯周組織欠損部に架橋ゼラチンを基剤とした 0.1~0.4% FGF-2 製剤を実験側の骨内欠損部に填入し、対照側には、ゼラチンのみを填入した。そして、FGF-2 投与後それぞれ 6 週および 8 週経過した後にコンピュータによる画像解析にて組織学的形態測定を行った。その結果、統計学的に有意な新生骨量、新生骨梁量、新生セメント質を伴った歯周組織再生が、FGF-2 を局所投与することにより生じることが明らかにされた。また、同部位においてシャーパー線維も再

現されているのが確認された(12)。さらに、上皮の下方増殖、骨性癒着、歯根吸収等の異常な治癒所見はいずれの症例の FGF-2 投与側においても観察されなかった。

2001 年より FGF-2 の歯周組織再生誘導効果並びに安全性の検討を目的として、本邦の 13 施設が参加しての用量反応試験（前期第 II 相）が展開された。本試験では①0.03%、②0.1%、③0.3% FGF-2 含有試験薬と④プラセボ（基剤の 3% hydroxypropylcellulose のみ）の各群を設定し、歯周組織再生誘導薬としての有効性と安全性が検討された。その結果、ヒトの 2 壁性および 3 壁性歯槽骨欠損に対し、各群の CAL の獲得量は①2.00mm、②2.02mm、③2.18mm、④2.63mm となり、群間の統計学的有意差は認められなかった。一方、レントゲンの %骨再生量を計測すると①20.19%、②29.39%、③58.62%、④23.92% となり、0.3 % FGF-2 の局所投与が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た ( $p=0.021$ ) (15)。また、同試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。

この結果を受け、2005 年より全国 24 施設が参加しての用量反応試験（後期第 II 相）が展開された。本試験では①0.2% FGF-2、②0.3% FGF-2、③0.4% FGF-2 含有試験薬と④プラセボ（基剤の 3% hydroxypropylcellulose のみ）の各群を設定し、先と同様に歯周組織再生誘導薬としての有効性と安全性が検討された。その結果、ヒトの 2 壁性および 3 壁性歯槽骨欠損に対し、各群の CAL の獲得量は①2.12mm、②2.32mm、③2.23mm、④1.79mm となり、前回同様、群間の統計学的有意差は認められなかった。一方、レントゲンの %骨再生量を計測すると①33.24%、②50.58%、③46.56%、④15.11% となり、全ての FGF-2 試験薬はプラセボに対して統計学的有意差を示した ( $p<0.004$ )。また、0.3% FGF-2 は 0.2% FGF-2 に比し統計学的に有意な歯槽骨新生を誘導したが ( $p<0.02$ )、0.3% FGF-2 群と 0.4% FGF-2 群の群間には統計学的有意差は認められず ( $p=0.90$ )、0.3% が臨床推奨容量と判断された(16)。また、同試験期間中においても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。

### 3) 臨床試験から学ぶ課題

#### (1) 評価法に関する課題

歯周組織再生とは歯槽骨、セメント質、機能的な歯根膜の再生であると定義される。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な評価である(17)。しかし、本邦で評価可能なヒトの組織を採取することは倫理的な観点から非常に難しく、海外でも少数例を対象とする試験に限られる(18)。そのため有効性の評価指標として、一般的な臨床試験では歯槽骨の評価や付着の評価が行われている。

歯周組織の重要な構成要素の 1 つである歯槽骨の新生量を評価することは、臨床的に

可能である(17, 19)。手術により歯槽骨を露出させて直接評価する方法と X 線写真を用いて非侵襲的に評価する方法が想定されるが、X 線写真を用いる場合には、撮影及び読影が規格的に行われる必要がある(19)。

付着の評価としては、臨床的付着レベル(CAL)が習慣的に利用されてきた(17, 19)。CAL の変化は、新生歯槽骨の評価と異なり、歯周組織の構成要素を直接証明する方法ではない(17)。また、プローブ先端の組織内への貫通量がこの変数に含まれるため(20)、歯肉溝の炎症の程度や挿入圧の影響を受ける指標であることに留意すべきである。

### (2)これまでの臨床研究から判断される歯周組織再生の臨床的評価とは

医薬審第 1047 号 厚生省医薬安全局審査管理課長通知（「臨床試験のための統計的原則」について）には、臨床試験で偏りを回避するための最も重要な計画上の技法は、盲検化及びランダム化であると記載されている。しかしながら、歯周組織再生療法の分野でサイトカイン療法の開発が始まるまでは、二重盲検下でのランダム化デザインを採用した試験はほとんど実施されておらず、上記 2) で挙げた 4 試験(7,10,15,16)はこのデザインで有効性を示した数少ない先例である。

これらの臨床試験における歯槽骨の評価では、何れの試験でも実薬群と対照群との統計学的な有意差が認められたのに対して、CAL に関しては全ての試験で実薬群と対照群に同程度の付着の獲得を認め、歯槽骨の評価と付着の評価が乖離する結果で一貫している。

組織学的な検討により、歯周組織が再生した場合には結合組織性の付着様式が認められるのに対して、フラップ手術等によって十分な歯周組織再生が起こらなかった場合でも、長い上皮性付着による治癒がしばしば認められることが明らかになっている(21, 22, 23)。しかし、この付着様式の違いを臨床的に、即ちプロービングによって判別することは極めて困難である。以上のことから、歯周外科治療後に歯槽骨の新生を認め、これと同程度かそれ以上の CAL の獲得を認めた場合には、歯周組織の再生が誘導されたものと臨床的に推察できる。

### (3)歯周組織再生療法における true endpoint とは

歯周組織再生療法がもたらす理想的な成果は、機能的な歯が長期にわたって口腔内に保存されることである。現行の歯周組織再生療法において、術後 6 ヶ月～1 年程度に認められた歯周組織の再生は、プラークコントロール及びメンテナンスが徹底されていれば、長期的に維持されることが報告されており(24, 25)、術後 6 ヶ月～1 年程度における評価項目の改善度によって長期的な歯の状態を十分に予知できると考えられる。ただ



し、当該歯の長期的な予後調査により新規歯周組織再生療法が機能的な歯の保存にどの程度貢献したかを明らかにすること、即ち true endpoint の探索は、新規歯周組織再生療法が一般に普及した後に歯周病専門医が中心となって実施すべき重要な課題の一つである。

#### 4) 将来展望

既存の歯周組織再生療法の多くは、歯根膜組織中に内在する「歯周組織幹細胞」を幹細胞源として用いている。ここで紹介しているサイトカイン療法もまた、リコンビナントサイトカインを歯周外科時に局所投与することにより、同上組織幹細胞を活性化し、歯周組織再生を誘導しようとするものである。そして、歯周組織再生用の device として米国にて販売が開始された GEM21S®は、歯周治療の分野にサイトカインが導入された先例と位置づけられる。同 device は PDGF-BB と骨伝導性の足場材を組み合わせたものとなっているが、その臨床上的有効性と適応症例の追認は今後の報告を待たねばならない。

一方、国内で臨床治験が進められている FGF-2 製剤に関しては、 $\beta$ -TCP のような生体組織工学における“足場”の概念を導入してはいない。これは、FGF-2 単独の有効性と安全性をまず慎重に評価する必要があるためである。しかしながら、もし国内の製造承認が得られたならば、将来的には FGF-2 の基剤に生体組織工学的な工夫が期待されることになるであろう。すなわち、歯周組織再生を期待する空間の保持（スペースメイキング）能力を有し、かつ、適度の賦形性を有する FGF-2 の基剤の選定あるいは新規の足場材の開発が検討されるであろう。さらに、その足場材に骨伝導性が付与されたならば、FGF-2 療法の歯周治療における適応症例はさらに拡大されることになるものと期待される。さらに、歯科用インプラントの osseointegration を促進させる作用も期待されるようになるかもしれない。

このようにサイトカイン療法は、大きな可能性を秘めた治療法であるが、現時点では依然として新規な治療法であることも事実である。適応症を吟味し、その有効性と安全性を真摯に評価することで、同療法を正しく育成することが強く望まれる。

一方、歯根膜組織中に内在する「歯周組織幹細胞」の数は加齢と共に減少することが示されている。従って、重度に歯根膜を含む歯周組織が破壊された症例や高齢者に対する歯周組織再生療法を考慮する場合には、他歯の歯根膜・骨髄・脂肪組織等に由来する間葉系幹細胞を移植する細胞治療も新たな歯周組織再生療法のオプションとして開発が進むものと期待される。

これらの新規歯周組織再生療法開発に向けた取り組みは、日本が世界の牽引役を果た

している分野であり、今後も産官学が一体となってプロジェクトの推進がなされることが、強く期待される。

#### 文献

- (1) Seo BM, Miura M, Gronthos S et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364, 149-155.
- (2) Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL et al. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. *Ann Periodontol* 2003; 8, 227-265.
- (3) Gottlow J, Nyman S, Lindhe J et al. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol* 1986; 13, 604-616.
- (4) Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8. 193-204
- (5) Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991; 62, 458-467.
- (6) Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelma RD, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontal Res* 1996; 31, 301-312.
- (7) Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW et al. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor -1 in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1997; 68, 1186-1193.
- (8) Mumford JH, Carnes DL, Cochran DL et al. The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model. *J Periodontol* 2001; 72, 331-340.
- (9) Ojima Y, Mizuno M, Kuboi et al. In vitro effect of platelet-derived growth factor-BB on collagen synthesis and proliferation of human periodontal ligament cells. *Oral Dis* 2003; 9, 144-151.
- (10) 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* 2005; 76, 2205-2215.
- (11) Ishibashi Y, Soeda S, Ohura T et al. Clinical effects of KCB-1D, a solution of recombinant human basic fibroblast growth factor, on skin ulcer. A phase III study comparing

- with sugar and povidone iodine ointment *Rinsho Iyaku* 1996: 12, 2159-2187. (in Japanese)
- (12) Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, et al. Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res* 2001: 81, 2075-2079.
- (13) 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* 2002: 38, 1-8.
- (14) Murakami S. Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol* 2000, 2011 (in press).
- (15) 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(7), e2611.
- (16) Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M et al. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of multicenter randomized clinical trial. *J Dent Res* 2011:90,35-40.
- (17) Garrett S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1996: 1, 621-666.
- (18) Nevins M, Camelo M, Nevins ML et al. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol* 2003:74, 1282-1292.
- (19) Machtei EE. Outcome variables for the study of periodontal regeneration. *Ann Periodontol* 1997: 2, 229-39.
- (20) Listgarten MA. Periodontal probing: what does it mean? *J Clin Periodontol* 1980:7, 165-176.
- (21) Caton J, Zander HA. Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. *J Clin Periodontol* 1976:3, 54-58.
- (22) Bowers GM, Schallhorn RG, Mellonig JT. Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. *J Periodontol* 1982:53, 509-514.
- (23) Wikesjö UM, Nilvéus R. Periodontal repair in dogs. Healing patterns in large circumferential periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1991:18, 49-59.
- (24) Gottlow J, Nyman S, Karring T. Maintenance of new attachment gained through guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1992:19, 315-317.
- (25) Becker W, Becker BE. Treatment of mandibular 3-wall intrabony defects by flap debridement and expanded polytetrafluorethylene barrier membranes. Long-term evaluation of

32 treated patients. J Periodontol 1993;64, 1138-1144.

表 1 歯周組織再生誘導能を示すサイトカイン

---

PDGF-BB	+	IGF- I
(platelet- derived growth factor)		(insulin -like growth factor-I)
BMP-2		
(bone morphogenetic protein-2)		
TGF- $\beta$		
(transforming growth factor- $\beta$ )		
OP-1 (BMP-7)		
(osteogenic protein-1)		
5. BDNF		
(brain-derived nerotrophic factor)		
6. GDF-5		
(growth and differentiation factor-5)		
7. PDGF-BB	+	$\beta$ -TCP (GEM21S®)
(platelet- derived growth factor)		( $\beta$ -tricalcium phosphate)
8. FGF-2 (bFGF)		
(basic fibroblast growth factor)		

---

## 細胞シートの内外の動向について

東京女子医科大学

岩田 隆紀

はじめに

既存の薬物治療や外科的切除では根治し得ない難治性疾患や、組織・臓器の損傷や欠損に対する新たな治療法として「再生医療」が注目され、細胞・増殖因子・スキャフォールドの3要素を兼ね備えた「組織工学」の概念が Vacanti と Langer によって提唱された<sup>1</sup>。皮膚や軟骨疾患に対する臨床応用が行われて一定の効果を上げているものの、生体分解性スキャフォールドの分解に伴う炎症による移植片の拒絶や壊死、また注入した細胞の安定性が低いことなどから万能な方法とは言い難いことが露呈してきている<sup>2</sup>。細胞生物学の目覚ましい発展により、近年ではヒト胚性幹細胞や人工多能性幹細胞などの臨床応用が進められており、細胞ソースの問題は克服されつつあるが、細胞をいかに効率よく移植するかに関しては未だ理想的な手法が見つかっていないのが現状である。

細胞シート工学

スキャフォールドを用いた組織工学の問題点を克服するために、東京女子医科大学・岡野光夫教授のグループでは N-イソプロピルアクリルアミドという温度応答性の高分子を細胞培養皿表面に共有結合させ、温度変化によって細胞の接着を制御することに成功した<sup>3</sup>。すなわち、32℃以上においてはこの高分子は疎水性となり細胞は接着するが32℃以下では親水性となり細胞は培養皿表面から離脱する。従来の細胞分散液（トリプシンやディスパーゼ）を用いた細胞の回収では、細胞周囲環境の破壊や細胞自体の活性を減弱させてしまうが、この温度応答性培養皿の利点は簡単な温度操作のみで、無傷の細胞ならびに細胞外タンパク質をシート状に回収できることである。更には細胞周囲環境も保存されるので、細胞周囲に存在する接着タンパクにより、細胞シート受容側に接着するため糊や縫合がいらず、細胞シート同士も短時間に接着するために重ねることで厚い組織を構築することも可能である。動物実験モデルにおいては肺気漏<sup>4</sup>、肝臓<sup>5</sup>、軟骨<sup>6</sup>、甲状腺<sup>7</sup>などの再生にも有効であることが示唆されているが、本稿では臨床研究が行われている分野について説明する。

温度応答性培養皿を用いた細胞シートの臨床応用

### 1. 自己口腔粘膜細胞シートによる角膜再生

2003年から大阪大学・西田幸二教授のグループが臨床研究を開始した角膜上皮の再生治療であるが<sup>8</sup>、2007年9月より協働機関の株式会社セルシードがフランスにおける治

験がリヨン国立病院で開始された。角膜上皮幹細胞疲弊症を適応症例として、同社が製品化した温度応答性培養皿上で自己口腔粘膜上皮細胞を培養してシート化し、温度低下のみで細胞シートを回収、患者に移植するというものである。自家細胞を用いることで免疫拒絶の心配がなく、温度応答性培養皿から回収した細胞シートはフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質を保持しているため、生着性に優れており縫合の必要がない。フランスにおける治験は、すでに予定の 25 症例の治療を 2009 年に終了し、1 年間の観察経過も 2010 年 9 月に終了している。今後、欧州医薬品審査庁（EMEA）に販売承認取得申請を行う予定であり、2011 年には米国でも治験開始を予定している。

## 2. 自己筋芽細胞シートによる重症心不全治療

拡張型心筋症及び虚血性心疾患による重症心不全は、心臓移植が最終的な治療法であるが、臓器移植法の改正に伴いドナー数は増加傾向あるものの、待機患者を満たすまでには至っておらず、再生医療の重要な対象疾患群である。大阪大学・澤芳樹教授のグループによる前臨床試験<sup>9</sup>の良好な結果を踏まえ、2006 年より補助人工心臓を必要とするような末期的拡張型心筋症患者を対象とする自己筋芽細胞シート移植の臨床試験を開始し、これまで 4 例に細胞シート移植が施行され、1 例は補助人工心臓からの離脱及び退院まで可能となっている。また重症虚血性心疾患に対する自己骨格筋芽細胞シート移植では、顕著な心筋虚血の改善および自覚症状の改善が得られている。今後、他施設での共同治験開始に向け、現在準備が進んでいる。

## 3. 自己口腔粘膜細胞シートによる食道癌内視鏡治療後の狭窄防止

表在の食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術（endoscopic submucosal dissection: ESD）は、大きな病変でも一括切除することができ、開胸や開腹手術を伴った従来の除去方法に比べて非常に低侵襲であるため、適応拡大が期待されている。しかし、切除エリアが大きくなると炎症反応と食道狭窄のためにバルーン拡張術を何度も受ける必要があるが、大変な苦痛を伴うとともに再狭窄する可能性もある。そこで、自己口腔粘膜上皮細胞を細胞ソースとして温度応答性細胞培養皿を用いて作成した細胞シートを食道癌除去後の患部に移植して、早期に炎症反応を抑え、狭窄を防止するとともに治癒を促進する再生医療的治療法を開発した。本治療法は 2008 年より、ヒト臨床を開始し、2010 年 8 月までに予定の 10 例の治療を完了し、良好な結果が得られている。

## 4. その他

東京女子医科大学では歯根膜シートによる歯周病の再生治療が 2011 年 1 月に厚生労働大臣の承認を受け臨床研究が開始されている。さらに細胞シートを用いて、気胸や術中肺気漏を閉鎖する再生治療も臨床研究の準備段階に入っている。また、心筋、軟骨、網膜、肝・膵臓などさまざまな組織の再生治療・ヒト臨床応用を国内外の大学・研究機

関との連携による実施を目指している。

#### 温度応答性培養皿を用いない細胞シート

新潟大学・吉江弘正教授のグループでは患者自身から採取された組織を培養し、以下のような三種類の細胞を培養し、それぞれにおいて臨床的な有効性を報告している (<http://www.kenshishika.com/gakkai/gakkai.html>)。

#### ① 歯肉上皮細胞シート<sup>10</sup>

少量の口腔粘膜組織片を採取し、上皮細胞を分離後培養すると、10層程度の上皮細胞シートが得られる。この歯肉上皮細胞シートにコラーゲンシートを足場にして、慢性剥離性歯肉炎の患者4症例に応用したところ6ヶ月後の臨床および組織所見で有効性が認められた。

#### ② 歯肉線維芽細胞シート<sup>11</sup>

臼歯部歯肉から数mmの歯肉を採取して、歯肉線維芽細胞を分離して培養し、ヒアルロン酸・アテロコラーゲンスポンジに播種して歯肉線維芽シートを作製した。このシートを、歯肉退縮が認められる歯周炎患者4名、14部位に臨床応用し、良好な歯肉の再生が観察された。

#### ③ 骨膜シート<sup>12</sup>

下顎臼歯部から採取した数mmの骨膜を、6週間培養して骨膜シートを作成した。慢性歯周炎患者に多血小板血漿 (PRP) とハイドロキシアパタイト顆粒 (HA) を混和して、骨欠損部に充填後、培養骨膜シートを移植したところ、自家の培養骨膜シートと自家 PRP および HA を用いた歯周手術は、歯周組織の再生をより促進させることが示唆された。

#### 海外における歯周領域の細胞シート治療

GLP 準拠では行っていない臨床研究ではあるが、通常培養皿からシート状に回収した歯根膜前駆細胞を骨補填剤と混ぜ、3名の歯周炎患者に移植を行った臨床研究が台湾から報告され、その有効性と安全性が確認された<sup>13</sup>。

また、世界最大の臨床研究データベースである [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) で検索を行うと、中国において歯根膜細胞シートを用いた臨床研究が現在行われているようである。前臨床研究から得られたデータ<sup>14</sup>をもとに、トリプシン/EDTA 溶液中でシート状に回収された歯根膜細胞をペレット培養し、牛骨由来骨補填剤とともに移植するとプロトコールには記載されている。

まとめ



歯周疾患には未だ決定的な治療法が存在せず、また罹患患者が非常に多いことから、世界的にも再生治療が積極的に行われている分野である。温度応答性培養皿を使う使わないにかかわらず、細胞外マトリックスを伴った移植が可能な細胞シート移植は、多くの歯科医師・研究者が取り入れている手法であり、臨床研究の結果が待ち遠しい。細胞治療の課題であるコストの問題が自動培養化装置などで軽減され、量産化が実現し、産業化が促進されれば、世界中のより多くの患者の救済につながると考えている。

#### 参考文献

1. Langer, R.; Vacanti, J. P., Tissue engineering. *Science* **1993**, *260* (5110), 920-6.
2. Yang, J.; Yamato, M.; Kohno, C.; Nishimoto, A.; Sekine, H.; Fukai, F.; Okano, T., Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* **2005**, *26* (33), 6415-22.
3. Yamada, N.; Okano, T.; Sakai, H.; Karikusa, F.; Sawasaki, Y.; Sakurai, Y., Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* **1990**, *11* (11), 571-576.
4. Kanzaki, M.; Yamato, M.; Yang, J.; Sekine, H.; Kohno, C.; Takagi, R.; Hatakeyama, H.; Isaka, T.; Okano, T.; Onuki, T., Dynamic sealing of lung air leaks by the transplantation of tissue engineered cell sheets. *Biomaterials* **2007**, *28* (29), 4294-302.
5. Ohashi, K.; Yokoyama, T.; Yamato, M.; Kuge, H.; Kanehiro, H.; Tsutsumi, M.; Amanuma, T.; Iwata, H.; Yang, J.; Okano, T.; Nakajima, Y., Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* **2007**, *13* (7), 880-5.
6. Kaneshiro, N.; Sato, M.; Ishihara, M.; Mitani, G.; Sakai, H.; Mochida, J., Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *349* (2), 723-31.
7. Arauchi, A.; Shimizu, T.; Yamato, M.; Obara, T.; Okano, T., Tissue-engineered thyroid cell sheet rescued hypothyroidism in rat models after receiving total thyroidectomy comparing with non-transplantation models. *Tissue Eng Part A* **2009**.
8. Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashida, Y.; Watanabe, K.; Yamamoto, K.; Adachi, E.; Nagai, S.; Kikuchi, A.; Maeda, N.; Watanabe, H.; Okano, T.; Tano, Y., Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* **2004**, *351* (12), 1187-96.
9. Memon, I. A.; Sawa, Y.; Fukushima, N.; Matsumiya, G.; Miyagawa, S.; Taketani, S.; Sakakida, S. K.; Kondoh, H.; Aleshin, A. N.; Shimizu, T.; Okano, T.; Matsuda, H., Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J*

*Thorac Cardiovasc Surg* **2005**, *130* (5), 1333-41.

10. Okuda, K.; Momose, M.; Murata, M.; Saito, Y.; Inoie, M.; Shinohara, C.; Wolff, L. F.; Yoshie, H., Treatment of chronic desquamative gingivitis using tissue-engineered human cultured gingival epithelial sheets: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* **2004**, *24* (2), 119-25.

11. 村田雅史、奥田一博、百瀬学、吉江弘正、久保健太郎、黒柳能光, 歯肉由来線維芽細胞とマトリックスから成る培養歯肉の根面被覆術への応用: 症例報告. *日本歯周病学会会誌* **2004**, *46* (春季特別号), 113.

12. Yamamiya, K.; Okuda, K.; Kawase, T.; Hata, K.; Wolff, L. F.; Yoshie, H., Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. *J Periodontol* **2008**, *79* (5), 811-8.

13. Feng, F.; Akiyama, K.; Liu, Y.; Yamaza, T.; Wang, T. M.; Chen, J. H.; Wang, B. B.; Huang, G. T.; Wang, S.; Shi, S., Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis* **2010**, *16* (1), 20-8.

14. Yang, Z.; Jin, F.; Zhang, X.; Ma, D.; Han, C.; Huo, N.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Lin, Z.; Jin, Y., Tissue engineering of cementum/periodontal-ligament complex using a novel three-dimensional pellet cultivation system for human periodontal ligament stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* **2009**, *15* (4), 571-81.