

Mini Review

In situ Tissue Engineeringによる歯周組織の再生中原 貴^{1,2)}, 中村達雄²⁾, 田畑泰彦²⁾, 江藤一洋¹⁾, 清水慶彦²⁾¹⁾東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子発生学分野²⁾京都大学再生医科学研究所*Regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering*

Our strategy for tissue regeneration is to induce maximum intrinsic healing potential at the site of a tissue defect, applying the elements of tissue engineering. Regeneration of periodontal tissues occurs through the combined application of a collagen sponge scaffold and gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor (bFGF) for controlled release. This "sandwich membrane" with or without bFGF (100 µg) was applied to a three-walled alveolar bone defect (3 × 4 × 4 mm) in nine dogs. Periodontal tissues, both hard and soft, treated with bFGF were effectively regenerated four weeks after the operation with functional recovery of the periodontal ligament in parts. Next, the effect of combining cells with the treatment was evaluated. Periodontal fenestration defects (6 × 4 mm) were created bilaterally in the maxillary canines of six dogs. One of these was filled with the collagen sponge scaffold seeded with autologous periodontal ligament-derived cells (3 × 10⁵), and the other was left empty. After four weeks, on the cell-seeded side, regeneration of the cementum was observed uniformly on the root surfaces, indicating that the seeded cells had formed new cementum. Our findings suggest a promising new approach to periodontal regeneration that is based upon *in situ* tissue engineering.

Rec.11/27/2002, Acc.1/29/2003, pp116-121

Taka Nakahara^{1,2)}, Tatsuo Nakamura²⁾, Yasuhiko Tabata²⁾, Kazuhiro Eto¹⁾, Yasuhiko Shimizu²⁾¹⁾Section of Molecular Craniofacial Embryology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University²⁾Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

Key words tissue engineering, periodontal tissue regeneration, collagen scaffold, bFGF controlled-release system, periodontal ligament cell

歯周病は、罹患率の高い慢性炎症疾患である。歯周病が進行すると、歯を支持する歯周組織（歯槽骨・歯根膜・セメント質・歯肉）が破壊され、ついには歯牙が脱落する。高齢社会を迎えたわが国では、失われた歯周組織を再生させるための研究は、臨床上きわめて重要なテーマとなっている。

1993年に Vacanti らにより Tissue Engineering が提唱されて以来、現在まで人体の多くの組織や器官の再生が可能になりつつある^{1,2)}。Tissue Engineering とは、scaffold（細胞の足場）、細胞、成長（増殖）因子の3つの構成要素を組み合わせ、*in vitro*で組織・臓器を作り、これを生体内へ移植する方法である。一方、日本でも再生医学と呼ばれる同様の研究が、独自のコンセプトにより様々なアプローチを展開している^{3,4)}。

歯科領域においては、Tissue Engineering が提唱される

以前より、組織再生誘導法（guided tissue regeneration: GTR法）が知られている。このGTR法は、遮断膜により欠損部への上皮と結合組織の侵入を防ぎ、歯槽骨や歯根膜が再生するのを“待つ”方法である。それに対して、われわれは、生体組織に積極的に働きかけ、本来備わった自然治癒力を最大限に引き出す環境を作りあげていくことを目的として、*in situ* Tissue Engineeringを提唱している^{5,6)}。欧米のTissue Engineeringが、培養室で作りあげた組織・臓器を生体へ移植する手法であるのに対し、われわれの戦略は、Tissue Engineeringの3つの要素を生体内の組織欠損のその場所（*in situ*）に応用し、局所における自然治癒力を最大限に生かしつつ、組織再生に有利な環境を作ることを目指している。

これまで歯周組織の再生には、各種成長因子の活用が試みられている⁷⁻¹²⁾。そのなかでも、骨誘導能の強い骨形

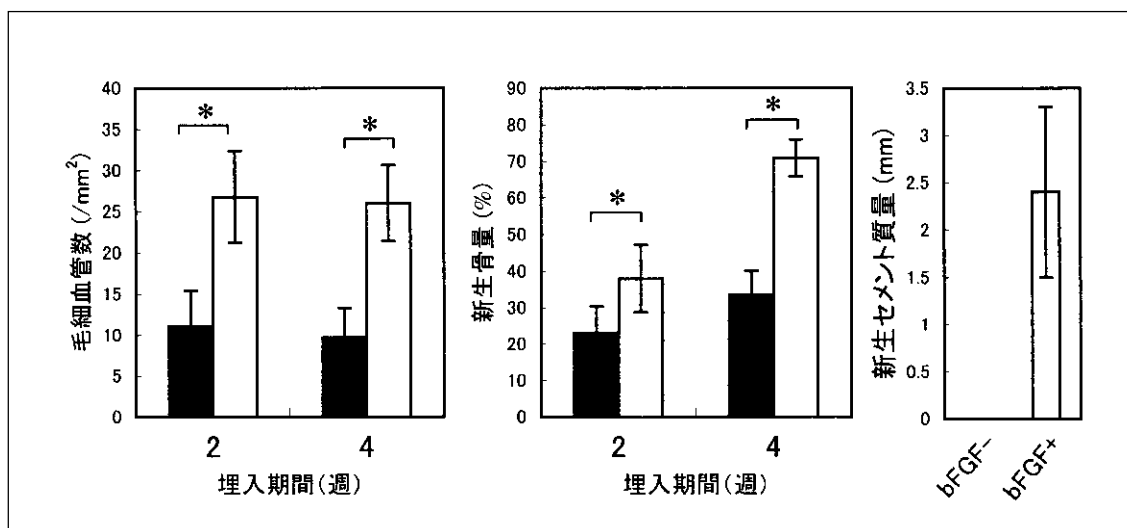


図1 bFGF含有ゼラチン微粒子とcollagen sponge scaffold複合体(サンドイッチメンブレン)の3壁性歯槽骨欠損へ埋入後の組織計測評価の結果。

経時的毛細血管数(左). 経時的新生骨面積(中央). 術後4週の新生セメント質量(右). bFGF徐放群(□), bFGF未処理群(■). * $p < 0.01$.

成タンパク(bone morphogenetic protein-2: BMP-2)の臨床応用への期待は大きい。しかしながら、BMP-2を用いた動物実験では、歯槽骨に対する再生効果は強力であるものの、セメント質や歯根膜に対する効果は一定ではなく、骨性癒着という副作用も報告されている。また、BMP-2は霊長類における効果の低さや加齢による細胞の応答性の低下が指摘されている¹³⁾。一方、すでに皮膚科領域で臨床応用されている塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)は、単一の細胞への分化を誘導するのではなく、分化段階の上流に位置する歯周組織の未分化細胞(幹細胞)の増殖を促して、各組織を形成する細胞を供給することが示唆されている¹⁴⁾。そのため、bFGFは、複合組織からなる歯周組織の協調的な再生を誘導する因子として期待される。

近年、細胞増殖因子を局所応用する場合、増殖因子タンパク単独ではなく、各増殖因子に最適な徐放化キャリア(担体)を併用する方法が知られてきた¹⁵⁾。増殖因子は、キャリアなしで局所投与すると急速な拡散が起こり、十分な再生効果が得られず予知性はきわめて乏しい。これまでに、細胞増殖因子の放出期間をコントロールする徐放化キャリアを用いて、歯周組織の再生を試みた研究はほとんどみられない。

成長因子とscaffoldによる歯周組織の *in situ* Tissue Engineering

そこで、われわれは、bFGFの徐放化キャリアとして開

発したゼラチン微粒子と組織再生の足場とするコラーゲンスポンジ(collagen sponge scaffold)を組み合わせ、歯周組織の再生を試みた¹⁶⁾。

Scaffoldは、われわれが以前より用いているcollagen sponge scaffoldである¹⁷⁾。これは、熱脱水架橋により分解がコントロールされ、欠損内に三次元的足場を構築し、周囲からの細胞が遊走するのを助けつつ再生組織に置換される。また、成長因子はゼラチン微粒子によるbFGF徐放システムを応用した¹⁸⁾。化学架橋によって分解を調節した酸性ゼラチンは、bFGFと静電的に結合している。生体内でゼラチンが酵素分解されると、これに結合しているbFGFが放出され、完全にゼラチンが分解されるまで放出が持続する。

われわれは、これらのcollagen sponge scaffoldとゼラチン微粒子の複合体を開発し、“サンドイッチメンブレン(sandwich membrane)”と命名した。この複合体は、ゼラチン微粒子がcollagen sponge scaffoldシートで折りたたまれ、包み込まれた状態になっている。つまり、これは細胞の足場とbFGFの徐放化を兼ね備えたデバイスとなる。

実験は、9頭のビーグル犬の上下顎左右側切歯を抜歯し、創傷が治癒した後、埋入実験を開始した。上下顎の犬歯近心部に、人工的に3壁性歯槽骨欠損(3×4×4mm)を作製し、その左右側にbFGF(100μg or 0μg)を結合させたゼラチン微粒子を包含したサンドイッチメンブレンを埋入した。術後1, 2, 4週目に、再生組織の組織学的観察と組織計測評価を行った。

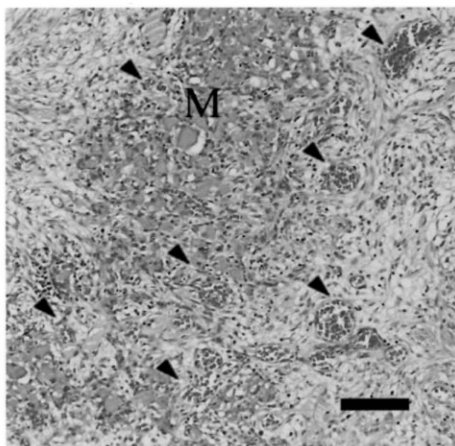


図2 bFGF徐放群術後4週の組織像。
残存微粒子の周囲に多数の毛細血管が観察される。矢頭: 新生血管, M: ゼラチン微粒子。Bar = 100 μ m。

その結果, bFGF徐放群は, 術後1週で未分化細胞の増殖とcollagen sponge scaffold内への侵入が観察され, 術後2週でほぼ再生組織に置き換わっていた。図1に示すようにbFGF未処理群に比べ, 観察期間を通して有意に高いレベルの血管誘導が維持され, 活発な新生骨の形成が観察された。さらに, 術後4週の露出歯根面には新生セメント質が形成され, 新生歯根膜コラーゲン線維が歯根面に垂直に走行し, 新生セメント質中に包埋されていた。また, 術後4週において一部にゼラチン微粒子が残存し, その周囲に多くの毛細血管が観察された(図2)。この所見は, 術後4週までbFGFの効果が持続し, 血管を誘導していることを示している。同時に, この残存微粒子が存在することは, 未だ微粒子がbFGFを保持しており, さらにbFGFを放出することを示している。

歯周組織の再生には, 硬組織と軟組織の両者の再構築が必要であるとともに, 歯を支持し噛む行為を可能とする歯根膜の機能の回復が求められる。本実験において, 歯槽骨とセメント質の再生に合わせて, 新生歯根膜コラーゲン線維の機能的走行が観察されたことは, きわめて興味深い。

一方, bFGF未処理群では, 活発な未分化細胞の増殖が誘導されず, 血管増生も乏しいため, 欠損部は線維性結合組織で満たされ, 上皮侵入や歯根吸収など通常の創傷治癒が起こるにとどまった。

本実験では, 組織欠損部に周囲の細胞が遊走する足場を組み, そこへbFGFを持続的に供給する生体内環境を作りあげた。これによって, 再生初期には歯周組織幹細胞の増殖と遊走を促し, さらに治癒期間を通して血流が豊富に維

持される。この豊富な血液供給が歯周組織にとどまらず, 組織再生を促進させる重要な要件であることが実証された。

細胞とscaffoldによる歯周組織の *in situ* Tissue Engineering

近年, 医学研究では細胞移植が注目を浴び, 今後, 自家の細胞を利用したcell-based therapyは, 臨床医学において中心的な役割を担うと言われる^{19, 20}。最近, 歯科領域においても, 骨髄幹細胞を歯周組織再生に応用する研究が始まったが²¹, とくに歯周組織の再生には歯根膜由来の細胞が重要であり, 歯根膜および近接する内骨膜下の血管近傍に, 未分化間葉細胞(歯周組織幹細胞)の存在が示唆されている。歯根膜細胞は, 抜去歯の歯根から歯根膜組織片を採取し, これを培養することで容易に得られる。臨床的にも智歯抜歯や矯正治療のための便宜抜歯などにより, 歯根膜組織片の採取は可能である。細胞は液体窒素により半永久的に保存できるので, 一度細胞を採取して増やしておけば, 将来, 必要になった時に autologous source として利用できる。

そこで, われわれは, 歯周組織のcell-based therapyの可能性を検討するため, 自家の歯根膜細胞とcollagen sponge scaffoldを組み合わせ, 歯周組織の*in situ* Tissue Engineeringを試みた²²。

実験には, 6頭のビーグル犬の側切歯を抜歯して歯根膜組織片を採取した。そして, 増やした細胞をいったん凍結保存し, *in vivo*と*in vitro*の実験に供した。歯根膜細胞は, 未だ特異的なマーカーは見つかっていないが, 骨芽細胞様のphenotypeを持つことが知られている。そこで, まず, *in vitro*で培養細胞のアルカリホスファターゼ(ALPase)活性測定を行い, 培養細胞が同活性を持つことを確認した。

ついで, ビーグル犬の開窓状歯槽骨欠損モデルを用いた動物実験により, 自家の歯根膜由来細胞の効果を評価した。この開窓状歯槽骨欠損モデルは, 種々の生体材料や因子による効果を比較する際, 歯槽骨とセメント質に対する再生評価を行うのに適している。実験は, イヌの上顎左右犬歯部に開窓状歯槽骨欠損(6 × 4 mm)を作製し(図3), そこへ自家のALPase陽性細胞(3 × 10⁵ cells)を播種したcollagen sponge scaffoldを埋入後, 欠損部をe-PTFE膜で覆って骨ピンで固定した。対照群は, 欠損のままe-PTFE膜による被覆処置のみ行った。術後4週目で, 組織学的観察と組織計測評価を行った。

一般に, 本欠損モデルの創傷治癒では, 歯槽骨の基部側にあたる欠損部の根尖側の組織形成量(図4のABとAC)が, 歯冠側の組織形成量(図4のCBとCC)よりも多くなる傾向がみられる。本実験でも, 細胞播種群と対照群の歯

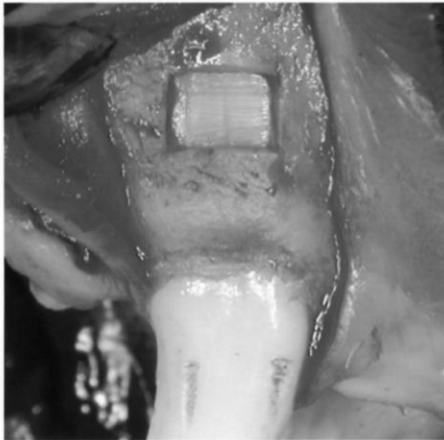


図3 ビーグル犬の上顎犬歯部に作製した開窓状歯槽骨欠損。

歯槽骨頂から根尖方向6 mmに位置する開窓状の歯周組織欠損(6 × 4 mm). 歯根表面の歯根膜とセメント質は完全に除去し、歯根象牙質を露出した。

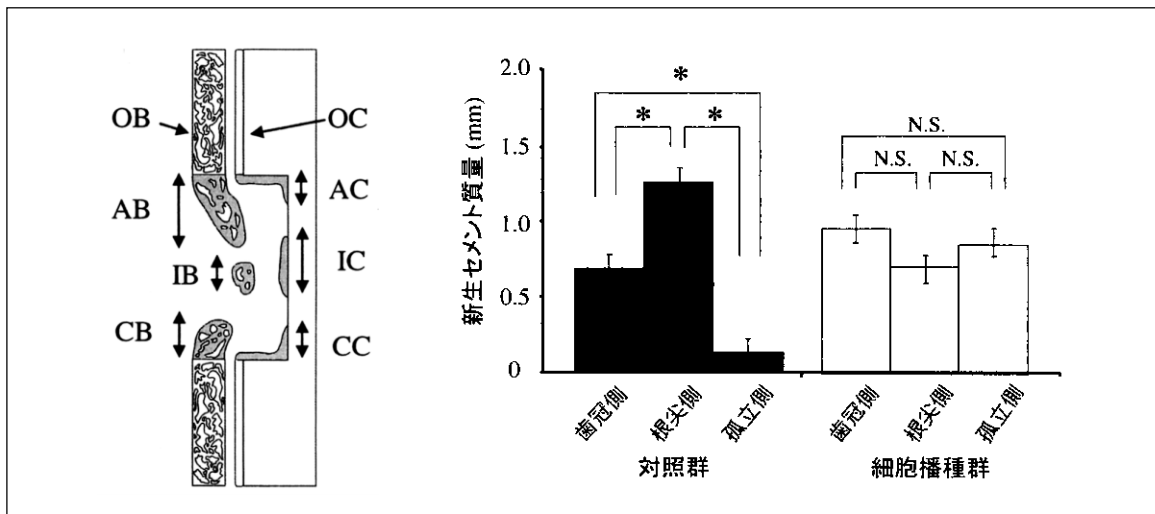


図4 開窓状骨欠損モデルの組織計測評価法(左)。

OB: 既存の歯槽骨, AB: 根尖側の新生骨量, IB: 孤立側の新生骨量, CB: 歯冠側の新生骨量, OC: 既存のセメント質, AC: 根尖側の新生セメント質, IC: 孤立側の新生セメント質, CC: 歯冠側の新生セメント質。

新生セメント質量の形成部位間の多重比較検定結果(Bonferroni法)(右)。

* $p < 0.0001$. N.S., 有意差なし。

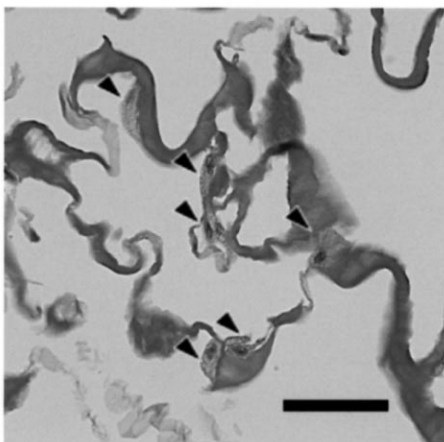


図5 歯根膜細胞を播種した collagen sponge scaffold の培養5日目の HE 染色像。

細胞(矢頭)が紡錘上に伸展し collagen sponge に接着している。
Bar = 50 μ m。

槽骨形成や対照群のセメント質形成において、図4の対照群に示すように、3者の再生部位間に高度に有意な組織形成量の片寄りがみられた。これは、本欠損モデルによくみられる傾向と一致している。これに対し、図4にみる細胞播種群のセメント質形成だけは、3部位の形成量に有意差がみられなかった。これは、新生セメント質が歯根面上に片寄りなく均等に形成されたことを意味している。

細胞の播種方法に関しては、細胞の carrier-scaffold がきわめて重要である（図5）。すなわち、欠損部へ細胞懸濁液のみを投与したり、血餅や液状ゼラチンに混ぜただけでは、細胞の接着するものが存在しないので、埋入と同時に欠損部から細胞が流れ去ってしまう。現在まで試みられている細胞播種実験では²³⁻²⁵⁾、播種した細胞が本来の機能を営むだけの環境作りが十分でなかった可能性があるため、播種細胞の効果を評価するには正当性に欠ける。それに比べて本実験では、collagen sponge scaffold がしっかりとした足場を供給し、播種細胞が歯根表面と接触することで *in vivo* differentiation を引き出したと思われる²⁶⁾。また、歯周組織という環境で site-specific differentiation を起こしたとも考えられる²⁷⁾。すなわち、播種細胞がセメント芽細胞に分化し、分化した場所でセメント質を形成した可能性が示唆される。

本実験で用いた歯根膜由来細胞は、いったん凍結・解凍した細胞である。歯根膜細胞を臨床に応用する場合、前述のように細胞の採取後、長期間の凍結保存が必要となる。したがって、本実験の結果は、凍結解凍後の細胞が *in vivo* で新生セメント質を形成する能力を維持していたことを示すもので、凍結細胞が臨床応用にきわめて有望であることが明らかになった。

おわりに

従来の歯垢・歯石の除去、歯科材料による義歯や歯冠修復に依存した歯科治療では、臨床現場の歯科医師の意識は技術の習熟のみに集中してしまい、新しい臨床法の発展は望めない。生物学、医学の分野で驚くべき新知見が次々に報告される今日、歯科医療における長い再建医学の歴史を顧みて、biological approach による新治療を生み出す時機が到来したことを実感する。今後、破壊された組織に残った細胞を活性化させる因子や患者由来の細胞を利用した斬新かつ有用な歯科治療が、加速度的に進展することであろう。

文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. Science, 260: 920-926, 1993.
- 2) Stock UA, Vacanti JP: Tissue engineering: current state and

prospects. Annu Rev Med, 52: 443-451, 2001.

- 3) Ikada Y: Tissue engineering research trends at Kyoto University. In: Ikada Y, eds. Tissue engineering for therapeutic use 1. Elsevier, Tokyo, 1998, pp1-14.
- 4) Tabata Y: Significance of Biomaterials and Drug Delivery Systems in Tissue Engineering. Connective Tissue, 33: 315-324, 2001.
- 5) Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K, Kurokawa Y, Satomi S, Shimizu Y: Experimental study on *in situ* tissue engineering of the stomach by an acellular collagen sponge scaffold graft. ASAIO J, 47: 206-210, 2001.
- 6) 中村達雄: 再生医学の応用の現状と課題 軟組織・膜・気管・食道) の再生. Pharma Medica, 18: 75-80, 2000.
- 7) Wikesjo UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, Jin L, Wozney JM: Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. J Clin Periodontol, 26: 392-400, 1999.
- 8) Kinoshita A, Oda S, Takahashi K, Yokota S, Ishikawa I: Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. J Periodontol, 68: 103-109, 1997.
- 9) Choi SH, Kim CK, Cho KS, Huh JS, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjo UM: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs. J Periodontol, 73: 63-72, 2002.
- 10) Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H: Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. J Dent Res, 80: 2075-2079, 2001.
- 11) Tatakis DN, Wikesjo UM, Razi SS, Sigurdsson TJ, Lee MB, Nguyen T, Ongpipattanukul B, Hardwick R: Periodontal repair in dogs: effect of transforming growth factor-beta 1 on alveolar bone and cementum regeneration. J Clin Periodontol, 27: 698-704, 2000.
- 12) Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniadis HN: The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. J Periodontol, 62: 458-467, 1991.
- 13) Seto I, Asahina I, Oda M, Enomoto S: Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow. J Oral Maxillofac Surg, 59: 53-61; discussion 62-53, 2001.

- 14) Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H: Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 32: 667-675, 1997.
- 15) 田畑泰彦: 再生医学と生体組織工学—その再生医療への役割—. *日本歯科医師会雑誌*, 55: 303-317, 2002.
- 16) Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Inoue M, Shigeno K, Tabata Y, Eto K, Shimizu Y: Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane. *Tissue Eng*, 9: 153-162, 2003.
- 17) Toba T, Nakamura T, Shimizu Y, Matsumoto K, Ohnishi K, Fukuda S, Yoshitani M, Ueda H, Hori Y, Endo K: Regeneration of canine peroneal nerve with the use of a polyglycolic acid-collagen tube filled with laminin-soaked collagen sponge: a comparative study of collagen sponge and collagen fibers as filling materials for nerve conduits. *J Biomed Mater Res*, 58: 622-630, 2001.
- 18) 田畑泰彦: 再生医療のための生体組織工学. *蛋白質 核酸 酵素*, 47: 770-778, 2002.
- 19) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49, 2002.
- 20) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7: 211-228, 2001.
- 21) Kurihara H, Hirachi A, Kawaguchi H, Hasegawa N, Tsuji K, Matsubara T, Kato Y: Periodontal tissue regeneration with autologous cell transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in dog. proceeding of International Symposium on Oral Tissue Regeneration. Bangkok, Thailand, 2002.
- 22) Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Kuremoto K, Matsuno T, Shigeno K, Tabata Y, Eto K, Shimizu Y: In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. submitted.
- 23) Lang H, Schuler N, Nolden R: Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects — a study in minipigs. *J Dent Res*, 77: 393-405, 1998.
- 24) van Dijk LJ, Schakenraad JM, van der Voort HM, Herkstroter FM, Busscher HJ: Cell-seeding of periodontal ligament fibroblasts. A novel technique to create new attachment. A pilot study. *J Clin Periodontol*, 18: 196-199, 1991.
- 25) Dogan A, Ozdemir A, Kubar A, Oygur T: Assessment of periodontal healing by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in artificial furcation defects in a dog: a pilot study. *Tissue Eng*, 8: 273-282, 2002.
- 26) Aukhil I, Simpson DM, Suggs C, Pettersson E: In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. An experimental study using physical barriers. *J Clin Periodontol*, 13: 862-868, 1986.
- 27) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW: Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 6: 1282-1286, 2000.