



Title	幹細胞移植による歯周組織再生誘導時に併用する炭酸アパタイトの有効性検証
Author(s)	川壽, 公輔
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/87969">https://doi.org/10.18910/87969</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

幹細胞移植による歯周組織再生誘導時に併用する  
炭酸アパタイトの有効性検証

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻  
口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学  
川寄 公輔  
(指導教官：村上 伸也 教授)



## 緒言

歯周組織は歯槽骨・セメント質・歯肉・歯根膜から構成され、歯を顎骨に強固に支持している。歯周病は細菌バイオフィルムが原因となり、その進行に伴い歯周組織が慢性炎症的に破壊されることで、成人が歯を失う一番の原因となっている<sup>[1]</sup>。歯周病に対する治療としては、スケーリング、ルートプレーニング等によりその原因となる細菌バイオフィルムや歯石を壊死セメント質とともに除去することで、歯周病の進行を抑制することが可能である。しかしながら、この原因除去療法のみでは一度破壊された歯周組織の再生には至らない<sup>[2]</sup>。

一般に組織再生には、Tissue Engineering の観点から幹細胞、シグナル因子、足場材の 3 つの因子が必要となる<sup>[3, 4]</sup>。歯周治療の分野においては、歯周病で失われた歯周組織を再生させることを目的に、シグナル因子として塩基性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor-2 : 以下、FGF-2 と略す) <sup>[5-7]</sup>、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor-BB) <sup>[8]</sup>、エナメルマトリクスタンパク (Enamel matrix derivative : 以下、EMD と略す) <sup>[9]</sup> 等の局所投与が歯周組織再生療法として臨床応用されている。また、自家骨移植や骨補填材の歯槽骨欠損部への埋植、あるいは組織再生誘導法 (GTR 法) は足場材の概念を基に開発された歯周組織再生療法と位置付けることができる。そして、上記の歯周組織再生療法は、歯根膜等に内在する歯周組織幹細胞のもつ自己修復力を活性化することにより、歯周組織の再生をはかる治療法ととらえることができる。しかしながら、生体内の幹細胞数は加齢とともに減少し、歯周組織においても内在性幹細胞の増殖能や分化能が低下することが報告されている<sup>[10, 11]</sup>。また、重度歯周病に罹患した歯周組織においては、組織破壊に伴い罹患歯周囲の内在性幹細胞数が減少すると推察され、前述の歯周組織再生療法では十分な効果が期待できない。そこで、重度歯周病を対象疾患とし、歯周組織欠損部に他組織から採取した間葉系幹細胞を移植する「細胞治療」の研究開発が進められている。

これまでに、骨髓由来間葉系幹細胞<sup>[12]</sup>、脂肪組織由来幹細胞<sup>[13]</sup>、歯髓幹細胞<sup>[14]</sup>、歯根膜由来幹細胞<sup>[15]</sup>、さらには iPS 細胞<sup>[16]</sup>を用いた移植治療の効果が非臨床研究にて報告されている。また、Iwata らはヒト歯根膜細胞シートの自己移植による歯周組織再生効果を臨床研究にて評価し、平均 55 ヶ月という長期経過症例においても良好な予後を観察している。しかしながら、歯根膜細胞移植を成立させるために必要となる抜歯可能かつ健全な第三大臼歯を提供できる歯周病患者の割合は低く、細胞の供給源が適応患者を制限する主な原因となっている<sup>[17]</sup>。

我々の研究室では、幹細胞の供給源として、安全に十分量の採取が可能な皮下脂肪に着目し研究をすすめてきた<sup>[18]</sup>。脂肪組織由来幹細胞 (Adipose tissue-Derived Stem Cells : 以下、ADSC と略す) の単離方法は、Zuk らの方法<sup>[19]</sup>が

一般的に用いられているが、Okura らは同方法により単離した細胞からエチレンジアミン四酢酸処理により回収される細胞を脂肪組織由来多系統前駆細胞（Adipose tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cells：以下、ADMPC と略す）とした<sup>[20-23]</sup>。ADMPC は ADSC と比較し、脂肪細胞、軟骨細胞および骨芽細胞への高い分化能を示すこと<sup>[24]</sup>から、より純度の高い幹細胞であると捉えられる。我々の研究室では、これまでに ADMPC の自己移植による歯周組織再生効果について、ビーグル犬実験的歯周病モデルを用いた非臨床研究にて明らかにし報告してきた<sup>[25]</sup>。そして、同結果に基づき、重度歯周病患者を対象に、皮下脂肪組織より単離・培養した ADMPC を、フィブリンゲルを足場材として歯槽骨欠損部に自己移植し、当該治療法の安全性と歯周組織再生効果を臨床研究にて評価した<sup>[26]</sup>。その結果、ADMPC 自己移植を行った 12 名全例で重篤な有害事象を認めることなく、歯周ポケットの減少と臨床的アタッチメントレベルの獲得、エックス線画像解析における歯槽骨の再生が認められた。また、一壁性、四壁性骨欠損など既存の歯周組織再生療法では十分な効果が期待できない症例においても ADMPC 自己移植による歯周組織再生効果が確認されている。

一方で、一部の重症例において、移植部位に歯肉退縮や組織陥凹が生じ、組織再生のためのスペースが十分に確保されなかつた症例も経験しており、そのことにより ADMPC 移植による組織再生効果が制限される可能性が課題として残されている。そこで、重度歯周炎患者を対象に安定的に良好な治療効果を発揮させるためには、ADMPC 移植に際し、高いスペースメイキング能力を有する足場材を併用すること、さらに、当該治療法の実用化を念頭に橋渡し研究を推進するためには、既に歯科分野で臨床応用されている足場材の中からその候補を選定することが必要であると考えられた。

現在、我が国では歯科適応の足場材として複数の人工骨補填材が臨床応用されている。なかでも骨リモデリングにおける生理的な破骨細胞の働きによって分解され、生体に吸収されるβ型リン酸三カルシウム（以下、β-TCP と略す）、あるいは炭酸アパタイトが ADMPC の候補足場材として想定された。β-TCP の先行研究によれば、ビーグル犬一壁性骨欠損モデルに対して β-TCP 単独埋植を行った 6 週後の組織学的解析結果から、大部分の β-TCP は吸収し、上皮および結合組織の陥入によって、歯周組織の再生スペースが一部喪失していることが報告されている<sup>[27]</sup>。そこで、本研究では、β-TCP よりも相対的に吸収が遅く、動物実験において β-TCP よりも優れた骨伝導能を示したとの報告<sup>[28]</sup>がある炭酸アパタイトに着目した。炭酸アパタイトは、ハイドロキシアパタイトのリン酸基の一部が炭酸基に置換された組成を有し、生体の生理的環境である pH7.4 では安定しているが、pH3～5 では高い溶解性を示すことで、生体内で破骨細胞によって吸収され、骨への置換が進行する<sup>[29]</sup>。

本研究では、ADMPC 移植療法の足場材として炭酸アパタイトの有効性を検証することを目的とし、炭酸アパタイトが ADMPC の細胞機能に及ぼす影響について *in vitro* にて検討するとともに、ビーグル犬実験的歯周病モデルを用いて ADMPC と炭酸アパタイトの複合体移植が歯周組織再生効果に及ぼす影響について *in vivo* での検討を加えた。

## 材料および方法

### 1. 細胞培養

ヒト ADMPC は Adipo Medical Technology 社 (大阪、日本) より供与されたものを実験に供した。ADMPC の継代培養は、40 %MCDB-201 (SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA)、10 µg/ml Epidermal Growth Factor (Peptech、Hamburg、Germany)、1 nM デキサメタゾン (SIGMA-ALDRICH)、100 mM アスコルビン酸 (富士フィルム和光純薬、大阪、日本)、5 %牛胎仔血清 (以下、FCS と略す: ニチレイバイオサイエンス、東京、日本)、60 µg/ml カナマイシン (以下、KM と略す: 富士フィルム和光純薬) を含有した Dulbecco's Modified Eagle Medium-low glucose (以下、DMEM-LG と略す: Gibco、Grand Island、NY、USA) を、Expansion-Medium (以下、Exp-Med と略す) として用い、37 °C 5 %CO<sub>2</sub> 湿度 100 % 条件下にて、100 mm フィブロネクチンコートディッシュ (Corning、Corning、NY、USA) 上で行った。継代は 0.05 %Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) 含有リン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBS と略す: 富士フィルム和光純薬) を用いて行い、継代数 5 から 15 の細胞を実験に供した。

炭酸アパタイト製培養用ディスク (以下、CAD と略す: GC、東京、日本) 上での培養は、同ディスクを Exp-Med に 7 日間浸漬した後、実験に使用した。本研究にて用いた CAD は、96 穴細胞培養プレート (Corning) での培養時には厚さ 1 mm 、直径 4 mm に、48 穴細胞培養プレート (Corning) の培養時には厚さ 1 mm 、直径 11 mm に成型されたものを各プレート内に設置し、ADMPC を播種、培養した。

### 2. 細胞形態の観察

48 穴細胞培養プレートのウェル底面に CAD を設置し、ADMPC を  $2.5 \times 10^4$  個/well となるように播種し、Exp-Med で 24 時間培養した。同様に ADMPC を 48 穴細胞培養プレートに直接播種したものを対照群とした。培地を除去し、PBS で 3 回洗浄した後、4 %パラホルムアルデヒド (以下、PFA と略す: 富士フィルム和光純薬) 含有 PBS にて一晩室温で固定した。固定液を除去し、PBS で 3 回洗浄した後、0.25 %TritonX-100 (MP バイオジャパン、東京、日本) 含有 PBS にて 30 分間室温で処理した。続いて 1 %ウシ血清アルブミン (SIGMA-ALDRICH) 含有 PBS で 5 分間ブロッキングを行った。PBS で 3 回洗浄した後、Hoechst33342 溶液 (1:500; 同人化学研究所、熊本、日本)、Rhodamin Phalloidin 溶液 (1:100; Thermo Fisher Scientific) 含有 PBS を 30 分間 4 °C で反応させ染色した。その後 PBS にて 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡 Nikon ECLIPSE Ti-U (Nikon、東京、日本) で観察した。

### 3. 細胞内小器官の観察

48 穴細胞培養プレートのウェル底面に CAD を設置し、ADMPC を  $5.0 \times 10^4$  個/well となるように播種し、Exp-Med で 3 日間培養した。同様に ADMPC を 48 穴細胞培養プレートに直接播種したものを対照群とした。PBS にて 2 回洗浄した後、2 %PFA(日新 EM、東京、日本)、2 %グルタールアルデヒド(EM Science、Hatfield、PA、USA) 含有 0.1 M リン酸緩衝液（以下、PB と略す：pH 7.4：富士フィルム和光純薬）を用いて、30 分間 4 °C にて固定した。その後、2 %グルタールアルデヒド含有 PB に交換、一晩 4 °C にて固定した。PBS で 3 回洗浄した後、2 %四酸化オスミウム（富士フィルム和光純薬）含有 PB を用いて、1 時間 4 °C にて固定した。続いて 50 %エタノール（富士フィルム和光純薬）にて 5 分間 4 °C で 1 回、70 %エタノールにて 5 分間 4 °C で 1 回、90 %エタノールにて 5 分間室温で 1 回、無水エタノールにて 5 分間室温で 3 回脱水処理を行った。脱水処理後のサンプルをエポキシ樹脂 Quetol-812（日新 EM）に浸漬させ、48 時間 60 °C にて重合し、レジンブロックを作製した。レジンブロックをウルトラミクロトーム Ultracut UCT (Leica、Vienna、Austria) にて 70 nm 厚にて薄切り、5 %酢酸ウラニル(VI)（東海電子顕微鏡解析、愛知、日本）にて 15 分間室温で 1 次染色し、蒸留水にて洗浄後、鉛染色液(SIGMA-ALDRICH) にて 3 分間室温で 2 次染色を行った。染色した超薄切片を透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus (JEOL、東京、日本) で観察した。

### 4. 細胞増殖の評価

96 穴細胞培養プレートのウェル底面に CAD を設置し、ADMPC を  $2.5 \times 10^3$  個/well となるように播種し、Exp-Med で 2 日間培養した。同様に ADMPC を 96 穴細胞培養プレートに直接播種したものを対照群とした。細胞内 ATP レベルを指標に生細胞数を評価し、播種 6 時間後の測定値を基準に、12 時間後、24 時間後、36 時間後、48 時間後の細胞増殖率を算出した。細胞内 ATP レベルは CellTiter-Glo®2.0 Cell Viability Assay (Promega、Madison、WI、USA) による発光アッセイを行い、GloMax 96 Microplate Luminometer w/Dual Injectors (Promega) にて検出した。

### 5. 死細胞数の評価

96 穴細胞培養プレート (Corning) のウェル底面に CAD を設置し、ADMPC を  $2.0 \times 10^4$  個/well となるように播種し、Exp-Med で 3 日間培養した。同様に ADMPC を 96 穴細胞培養プレートに直接播種したものを対照群とした。播種 24 時間後、48 時間後、72 時間後の培養上清を回収し、上清中に含まれる乳酸脱水素酵素を指標に死細胞数を評価した。乳酸脱水素酵素の測定は、LDH-Glo™

Cytotoxicity Assay (Promega) による発光アッセイを行い、GloMax 96 Microplate Luminometer w/Dual Injectors にて検出した。

## 6. 硬組織形成細胞への分化

ADMPC の硬組織形成細胞への分化誘導は、細胞を 48 穴細胞培養プレートに  $5.0 \times 10^4$  個/well となるように播種し、10 %FCS および 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  KM 含有 DMEM に 10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸（富士フィルム和光純薬）、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アスコルビン酸（富士フィルム和光純薬）、0.1  $\mu\text{M}$  デキサメタゾン（SIGMA-ALDRICH）を添加した培養培地（以下、石灰化誘導培地と略す）にて培養し、以後 3 日ごとに培地交換することにより行った。

## 7. 全 RNA の抽出および相補的 DNA（以下、cDNA と略す）の作製

培養細胞からの全 RNA 抽出には、Maxwell® RSC simply RNA Cells Kit (Promega) を用いた。抽出・精製した全 RNA を鋳型として、High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

## 8. Real-time PCR 法による遺伝子発現解析

Real-time PCR 法による解析は、cDNA を鋳型として、表 1 に示す各遺伝子特異的な Real-time PCR 用プライマー（タカラバイオ、滋賀、日本、および FASMAC、神奈川、日本）を用いて行った。PCR 反応は Fast SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) を用いて、Step One Plus Real-time PCR System® (Applied Biosystems) にて行った。なお、各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子の一つであるヒポキサンチンリボシルトランスフェラーゼ (*HPRT*) を内在性コントロール遺伝子として同遺伝子の発現量に対する相対量として算出した。

表 1 本研究で使用した Real-time PCR 用プライマーの一覧

Gene		Primer sequence
<i>RUNX2</i>	F	5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'
	R	5'-CATTCCGGAGCTCAGCAGAATAA-3'
<i>IGFBP6</i>	F	5'-AACCGCAGAGACCAACAGAG-3'
	R	5'-TTGGGCACGTAGAGTGTGTTG-3'
<i>HGF</i>	F	5'-GAATTGGCCATGAATTGACCTC-3'
	R	5'-ATCATGGAACTCCAGGGCTGAC-3'
<i>VEGFA</i>	F	5'-GAGCCTTGCCCTGCTGCTCTAC-3'

	R	5'-CACCAAGGGTCTCGATTGGATG-3'
HPRT	F	5'-GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA-3'
	R	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAAACAAAC-3'

## 9. 培養上清中の insulin-like growth factor binding protein 6 (以下、IGFBP6 と略す) 濃度の解析

ADMPC を 48 穴細胞培養プレートに  $2.5 \times 10^4$  個/well となるように播種し、10 %FCS および 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  KM 含有 DMEM にて 3 日間培養した際の培養上清中に含まれる IGFBP6 濃度を Human IGFBP6 ELISA-Kit (RayBiotech、Norcross、GA、USA) を用いて、定量的に解析した。

## 10. イヌ ADMPC の単離

本実験における全ての動物実験は、大阪大学歯学研究科動物実験委員会の承認（承認番号：動歯・30-002-01）を得て行った。全身麻酔下でメスビーグル犬（北山ラベス、長野、日本）より腹部大網組織を採取し、イヌ ADMPC の単離を行った。全身麻酔は、まず前投与として 0.04 mg/kg アトロピン硫酸塩（田辺三菱製薬、大阪、日本）を筋肉内投与し、続いて導入麻酔として 0.4 mg/kg 酒石酸プロトルファノール (Meiji Seika ファルマ、東京、日本)、30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  塩酸メデトミジン（日本全薬工業、福島、日本）、0.4 mg/kg ミダゾラム（アステラス製薬、東京、日本）の 3 種混合液を筋肉内投与した。鎮静を確認後、6~8 mg/kg プロポフォール（丸石製薬、大阪、日本）を静脈内投与することで深麻酔下に誘導後、気管挿管を行い、人工呼吸器による 1~5 %イソフルランの吸入とプロポフォール静脈内投与併用することで麻酔を維持しつつ、開腹下にて腹腔内側にある大網組織を採取した。採取した脂肪組織 10 ml を 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  KM 含有 PBS にて 2 回洗浄した後、0.25 %コラゲナーゼ (SIGMA- ALDRICH) 含有 PBS を 20 ml 添加し、恒温槽にて 37 °C で 1 時間振盪した。脂肪組織分解産物を 2 本のチューブに等量に分注し、20 % FCS、60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  KM 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose (以下、DMEM-HG と略す: Gibco) を 15 ml ずつ各チューブに添加し、遠心分離 (400 G、室温、10 分間) を行った。上清を吸引除去した後、10 %FCS、60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  KM 含有 DMEM-HG を各チューブに 15 ml 添加し、懸濁した。懸濁液を 15 ml の Histopaque (SIGMA- ALDRICH) が入ったチューブに積層し、室温にて遠心分離 (20 G、3 分間→60 G、3 分間→180 G、3 分間→300 G、3 分間→570 G、20 分間) を行った。幹細胞を含む中間層を回収し、回収量の 2 倍量の PBS にて懸濁し、遠心分離 (400 G、4 °C、5 分間) を行った。遠心分離後、上清を吸引除去し、10 %FCS、60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  KM 含有 DMEM-HG を各チューブに 10 ml 添加し、合計 20 ml の細胞懸濁液を作製

した。同細胞懸濁液を 40 μm セルストレーナー (Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA) にて濾過した後、100 mm 細胞培養ディッシュ (Corning) に播種した。24 時間の培養後、浮遊した細胞を PBS で洗浄し、0.5 mol/l エチレンジアミン四酢酸 (ナカライトスク、京都、日本) を作用させ、剥離した細胞を ADMPC とした。イヌ ADMPC の継代培養はヒト ADMPC と同様に行った。

## 11. イヌ実験的歯槽骨欠損モデルの作製と ADMPC 自己移植

21~25 ヶ月齢 のメスビーグル犬の下顎第三前臼歯遠心および第一後臼歯近心に二壁性骨欠損を、55~73 ヶ月齢 のメスビーグル犬の第一後臼歯近心に一壁性骨欠損を作製し、ADMPC-炭酸アパタイト複合体移植による歯周組織再生効果を検討した。すなわち、脂肪組織採取時と同様の方法にて全身麻酔を行った後、リドカイン塩酸塩 (歯科用キシロカイン: デンツプライシロナ、東京、日本) による局所麻酔下にて、左右両側の下顎第四前臼歯を抜去した。抜歯 12 週後に全身麻酔下にて、上下顎臼歯部のスケーリングを行った後、ポピドンヨード液 10 %錠 (健栄、大阪、日本) およびザルコニン 0.025 %錠 (健栄) を用いて術野の消毒を行い、滅菌ガーゼ (ハクゾウ、大阪、日本) にて清拭した。1.8 ml リドカイン塩酸塩を用いて浸潤麻酔を行い、第三前臼歯から第一後臼歯まで歯肉溝切開を行い、粘膜骨膜弁を形成した。二壁性骨欠損モデルでは、下顎第三前臼歯遠心部および第一後臼歯近心にそれぞれ頬舌径 3 mm、深さ 4 mm、近遠心径 5 mm の骨欠損を歯科用切削バーメルファースチールバーシリンダー S010、016 (デンツプライシロナ) を用いて作製し、根面を一層削合することで既存のセメント質を除去し、骨欠損の最下端部には MGST36RA016 (ベルデンタサプリ) を用いてノッチを形成した。その後、左右側に作製した骨欠損を無作為に試験側と対照側に振り分け、試験側には ADMPC と炭酸アパタイトを、対照側には ADMPC とフィブリングルを自己移植した。試験側、対照側ともに移植細胞数は欠損あたり  $6.25 \times 10^6$  個 とした。クライオバイアル (Thermo Fisher Scientific) 中で凍結した細胞を 37 °C の恒温槽にて融解し、PBS にて遠心洗浄後、PBS にて前述の移植細胞数の細胞懸濁液を調整した。スパーテル (アズワン、大阪、日本) にて細胞懸濁液を炭酸アパタイトもしくはフィブリングルのいずれかの足場材と混合し、それぞれ複合体を作製した。下顎第三前臼歯遠心の骨欠損には顆粒径 0.3~0.6 mm の炭酸アパタイト (サイトランス®グランニュール S サイズ (GC)) を、第一後臼歯近心の骨欠損には顆粒径 0.6~1.0 mm の炭酸アパタイト (サイトランス®グランニュール M サイズ (GC)) を用いた。対照側のフィブリングルはベリプラスト P®組織接着コンビセット 1 ml (CSL ベーリング、東京、日本) を使用した。一壁性骨欠損モデルでは、下顎第一後臼歯近心に頬舌方向に交通させた、深さ 6 mm、近遠心径 5 mm の一壁性骨欠損を、

二壁性骨欠損と同様に作製した。その後、作製した骨欠損を Sham 手術群、炭酸アパタイト単独群、炭酸アパタイト+ADMPC 移植群に振り分けた。炭酸アパタイト+ADMPC 移植群には、 $8.3 \times 10^5$ ~ $6.25 \times 10^6$  個の ADMPC を移植し、炭酸アパタイトは顆粒径 0.3~0.6 mm を使用した。また、ADMPC・炭酸アパタイト複合体は 2 壁性骨欠損モデルと同様に作製した。二壁性骨欠損、一壁性骨欠損とともに移植後に粘膜骨膜弁を復位した後、ゴアテックススチーラー® (W. L. Gore and Associates, Newark, DE, USA) を用いて単純縫合を行った。移植 1 週後に抜糸を行い、移植 2 週後まで 1 日 1 回、グルコン酸クロルヘキシジン液（丸石製薬）を用いて、口腔内の処置部位に噴霧消毒を継続しながら、口腔内の手術部位の経過観察を行った。二壁性骨欠損モデルでは移植 6 週後に、一壁性骨欠損モデルでは移植 12 週後に、プロポフォールによる深麻酔下にて大腿動静脈を切断することにより安楽死させ、下顎骨を採取した。

## 12. 組織学的解析

採取した下顎骨は、4 %パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（pH 7.4：富士フィルム和光純薬）を用いて 2 週間 4 °C で浸漬固定を行った。浸漬固定後の組織は、10 %ギ酸クエン酸ナトリウム脱灰液 (900 ml/l 蒸留水、100 ml/l ギ酸（富士フィルム和光純薬）、29 g/l クエン酸（富士フィルム和光純薬）、18 g/l クエン酸三ナトリウム二水和物（富士フィルム和光純薬）を用いて、2 ヶ月間室温にて脱灰処理した後、通法に従いパラフィン包埋した。組織ブロックを舌側から頬側方向に向かって 150 μm 間隔で薄切り、組織切片を作製した。作製した切片に対して、ベーメル・ヘマトキシリソ（富士フィルム和光純薬）および 1 %エオシン Y 液（富士フィルム和光純薬）を用いて HE 染色を行った。また、媒染剤（武藤化学、東京、日本）、マロリー・アゾカルミン G 染色液（武藤化学）、5 %リソタングステン酸水溶液（富士フィルム和光純薬）およびマロリー・アニリン青オレンジ G 液（武藤化学）を用いて AZAN 染色を行った。染色した組織切片より、髄腔の露出から骨欠損部の中央と判断される切片を選定し、解析対象とした（図 1A）。組織切片の観察は光学顕微鏡 Nikon ECLIPSE Ci (Nikon) で観察し、形態計測は、画像解析ソフトウェア Nis Elements (Nikon) を用いて、ノッチと根面の削合部位から規定した骨欠損部における新生骨の面積を計測した（図 1B）。二壁性骨欠損モデルにおいては、骨欠損部の落ち込んだ結合組織、骨欠損部の遠心面と底面、根面で囲まれる組織再生スペースの面積をそれぞれ計測した（図 1C）。また、一壁性骨欠損モデルにおいては、根面と固有歯槽骨で挟まれる軟組織から、血球と血管を除去した線維性組織を再生歯根膜と定義し、再生歯根膜の長軸方向における長さと再生歯根膜と定義される範囲のコラーゲン線維密度を算出した（図 1D）。

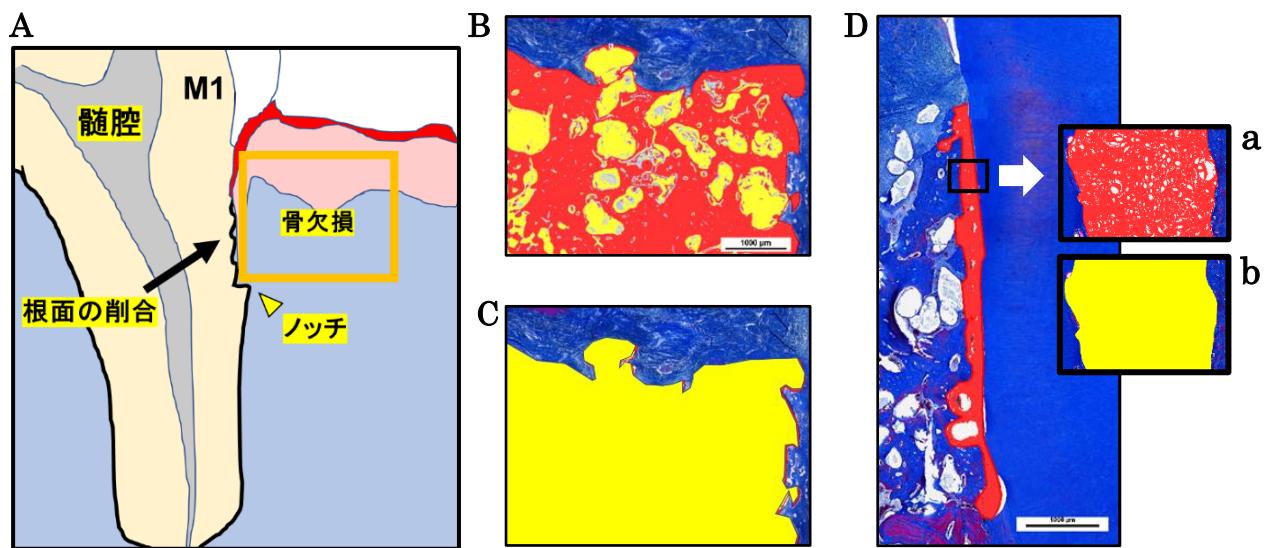


図 1. 組織学的解析の方法

- A.骨欠損の中央と判断される組織切片の概形図を示す。
  - B.骨欠損部のAZAN染色像において新生骨を赤色、炭酸アパタイトを黄色で表示している。
  - C.骨欠損部のAZAN染色像において組織再生スペースを黄色で表示している。
  - D. AZAN染色像において固有歯槽骨と根面で囲まれる軟組織のうち、血管と血球を除去した範囲を再生歯根膜と定義し、赤色で表示している。再生歯根膜を含む黒色の枠線で表示した部分の拡大図をa、bとして示す。
    - a.黒色の枠線で囲んだ範囲における再生歯根膜中のコラーゲン線維を赤色で示す。
    - b.拡大像aにおける再生歯根膜の外形を黄色で示す。
- (aの赤色で示される面積) ÷ (bの黄色で示される面積) × 100 = コラーゲン線維密度[%]

### 13. マイクロ CT 断層撮影と定量解析

二壁性骨欠損モデルの下顎骨については、実験動物用3Dマイクロエックス線CT R\_mCT2（リガク、東京、日本）により断層撮影を行い、得られた2次元画像を3次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON（ラトックシステムエンジニアリング、東京、日本）を用いて、骨欠損作製範囲におけるエックス線不透過物体積の解析を行った。一壁性骨欠損モデルの下顎骨については、二壁性骨欠損モデルと同様の解析に加えて、実験動物用3Dマイクロエックス線CT Sky scan1276（Bruker、Billerica、MI、USA）により断層撮影を行い、得られた2次元画像を3次元画像解析ソフトウェア CT\_An（Bruker）により3次元構築し、骨欠損作製範囲におけるエックス線不透過物体積、残存炭酸アパタイトの体積、新生骨体積を定量的に解析した。

#### 14. 統計処理

実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析（ANOVA）を行った後に post-hoc analysis として Tukey-Kramer 検定を用いて行い、 $p < 0.05$  を有意差があるものとした。

## 結果

### 1. CAD 上で培養した ADMPC の細胞形態の観察

炭酸アパタイトが ADMPC の細胞機能に及ぼす影響を明らかにするために、まず CAD 上で培養した ADMCP の細胞形態について解析を行った。すなわち、CAD 上で培養した ADMPC（以下、CAD 群と略す）を Hoechst にて核染色、Rhodamin Phalloidin にてアクチンを染色し、蛍光顕微鏡にて細胞形態を観察する一方で、透過型電子顕微鏡で細胞内小器官を観察した。対照群は細胞培養プレートで培養した ADMPC（以下、対照群と略す）とした。蛍光顕微鏡による観察から、CAD 群は対照群と同様に、紡錘形の細胞形態を呈し、核の形態にも異常は認められなかった（図 2A）。また透過型電子顕微鏡による観察から、CAD 群は、対照群と同様に、核の凝縮や断片化、ミトコンドリアの膨化を認めず、核の近傍にゴルジ装置とともに多数の粗面小胞体を認めた（図 2B）。

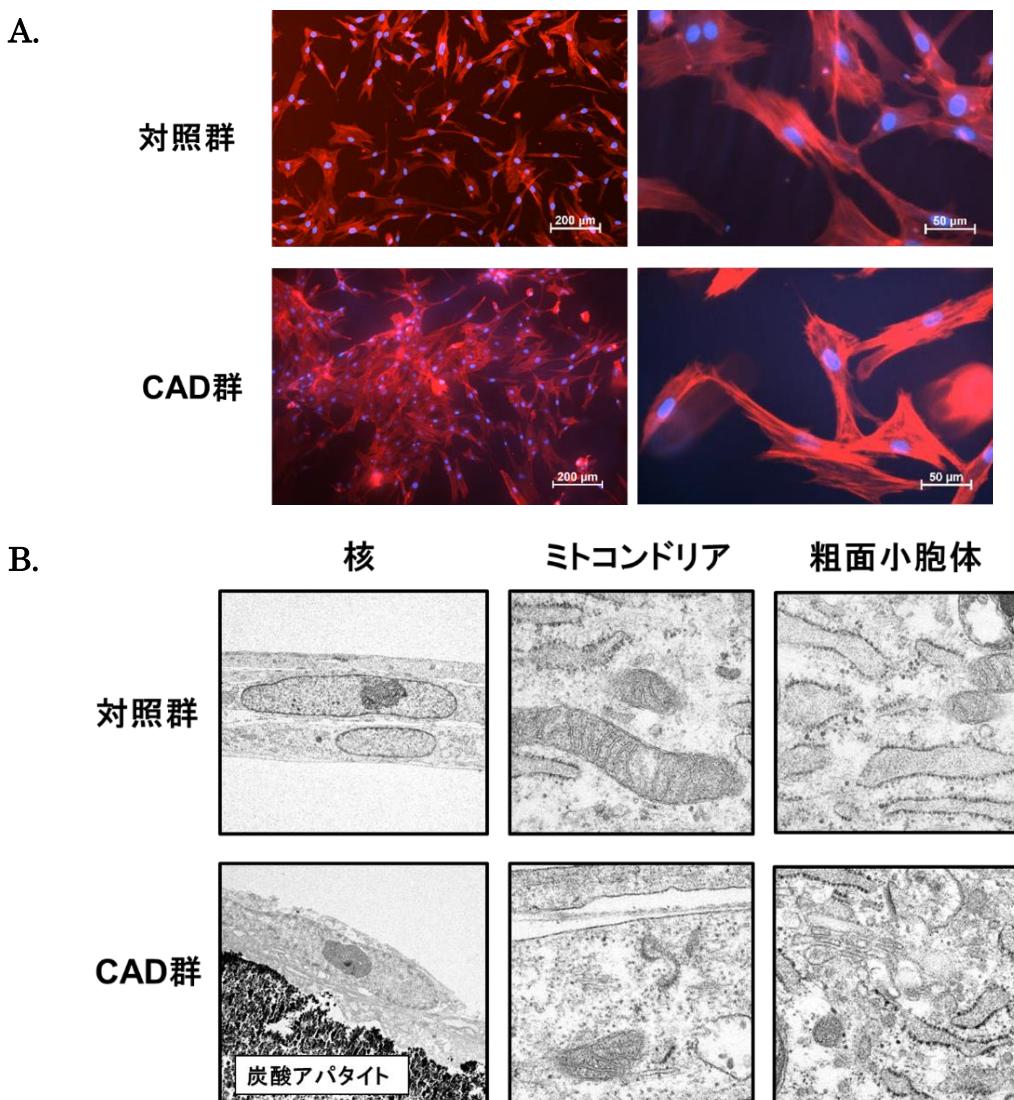


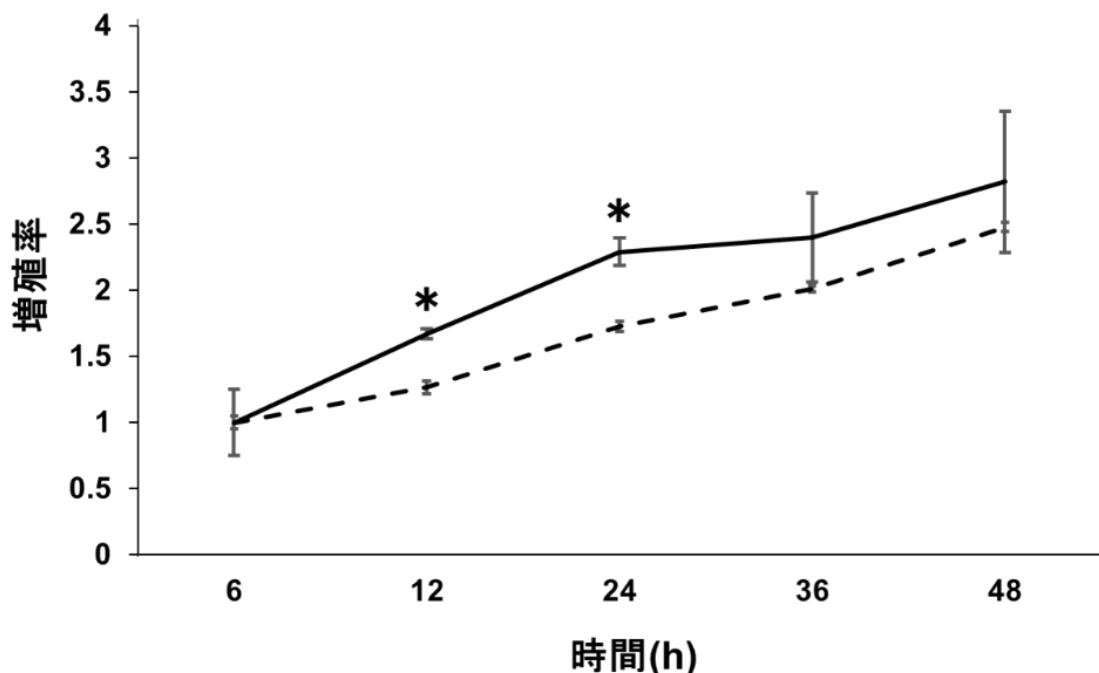
図 2. CAD 上で培養した ADMPC の蛍光顕微鏡像および電子顕微鏡像

- A. 対照群および CAD 群における播種 24 時間後の ADMPC の細胞形態の蛍光顕微鏡像を示す。
- B. 対照群および CAD 群における 3 日間培養した ADMPC の細胞内小器官として、核 ( $\times 4210$ )、ミトコンドリア ( $\times 42100$ )、粗面小胞体 ( $\times 42100$ ) の透過型電子顕微鏡像を示す。

## 2. 炭酸アパタイトが ADMPC の細胞増殖能に及ぼす影響の検討

次に、炭酸アパタイトが ADMPC の細胞増殖能に及ぼす影響について解析を行った。すなわち、対照群、CAD 群の播種 6 時間後、12 時間後、24 時間後、36 時間後、48 時間後の生細胞由来の ATP 量を計測し、播種 6 時間後の ATP 量を基準に 12 時間毎の細胞増殖率を算出した。その結果、播種 12 時間後、24 時間後において対照群と比較し、CAD 群における有意な細胞増殖率の上昇を認めた（図 3A）。一方で、3 日間培養した ADMPC の培養上清中に含まれる乳酸脱水素酵素の濃度変化を発光アッセイにて検出することで、死細胞数を評価したが 3 日間の培養における死細胞数について、CAD 群は、対照群と比較し、有意な差は認められなかった（図 3B）。以上の結果から、炭酸アパタイト上で培養した ADMPC は通常培養に比べ増殖が亢進していることが明らかとなった。

A.



B.

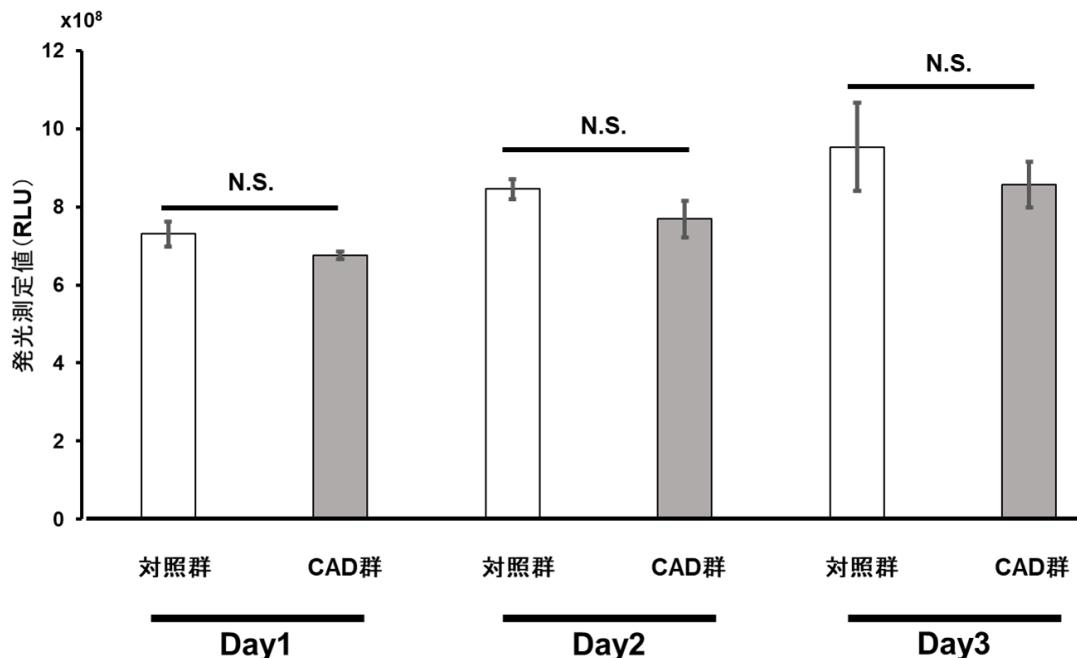


図 3. 炭酸アパタイトが ADMPC の細胞増殖能、死細胞数に及ぼす影響

- A. 対照群および CAD 群とともに 2 日間培養し、ATP 量を指標として、播種 6 時間後の細胞数を基準とした 12 時間毎の細胞増殖率を示す。実線は CAD 群、点線は対照群を示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。結果は、それぞれ平均値土標準誤差で示す。\*  $p < 0.05$  vs 通常培養。
- B. 対照群および CAD 群とともに 3 日間培養し、経時的な培養上清中の乳酸脱水素酵素濃度を反映した発光測定値を示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。結果は、それぞれ平均値土標準誤差で示す。N.S. : Not Significant。

### 3. 炭酸アパタイトが硬組織形成細胞への分化能へ及ぼす影響の検討

炭酸アパタイトが ADMPC の硬組織形成細胞への分化能に与える影響について、ADMPC の石灰化誘導時の *RUNX2* の遺伝子発現を指標として解析を行った。対照群、CAD 群、ともに 6 日間石灰化誘導培地で培養した結果、非誘導群と比較し、いずれの群においても同程度の *RUNX2* 遺伝子の発現上昇を認めた(図 4)。

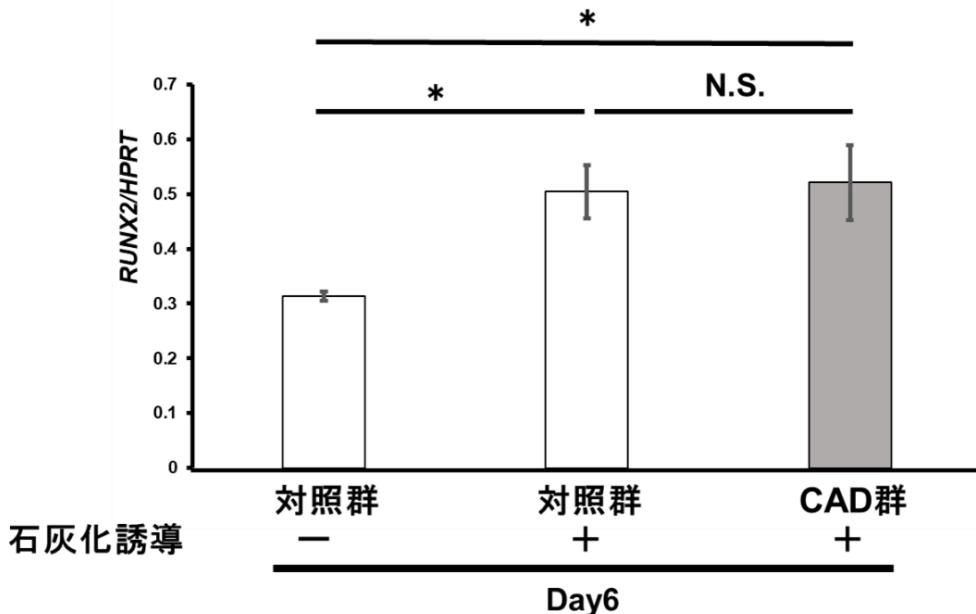


図4. 炭酸アパタイトが ADMPC の *RUNX2* 発現に及ぼす影響

対照群および CAD 群ともに石灰化誘導培地にて 6 日間培養した際の *RUNX2* の遺伝子発現を示す。mRNA の発現の値は *HPRT*との相対比で示す。3回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。N.S. : Not Significant, \* p <0.05。

#### 4. 炭酸アパタイトが ADMPC の液性因子産生能へ及ぼす影響の検討

炭酸アパタイトが ADMPC の液性因子産生能に及ぼす影響について解析を行った。対照群、CAD 群ともに 3 日間培養したのち、*IGFBP6*、*HGF*、*VEGF* の発現を評価したところ、いずれの遺伝子に関しても CAD 群は対照群と同程度の発現を認めた（図 5A）。また、*IGFBP6* については、培養上清中に含まれるタンパク発現についても評価した。その結果、CAD 群は対照群と同程度の *IGFBP6* の発現を認めた（図 5B）。以上から、炭酸アパタイト上で培養した ADMPC において、通常培養と同程度の液性因子の産生能が維持されていることが示唆された。

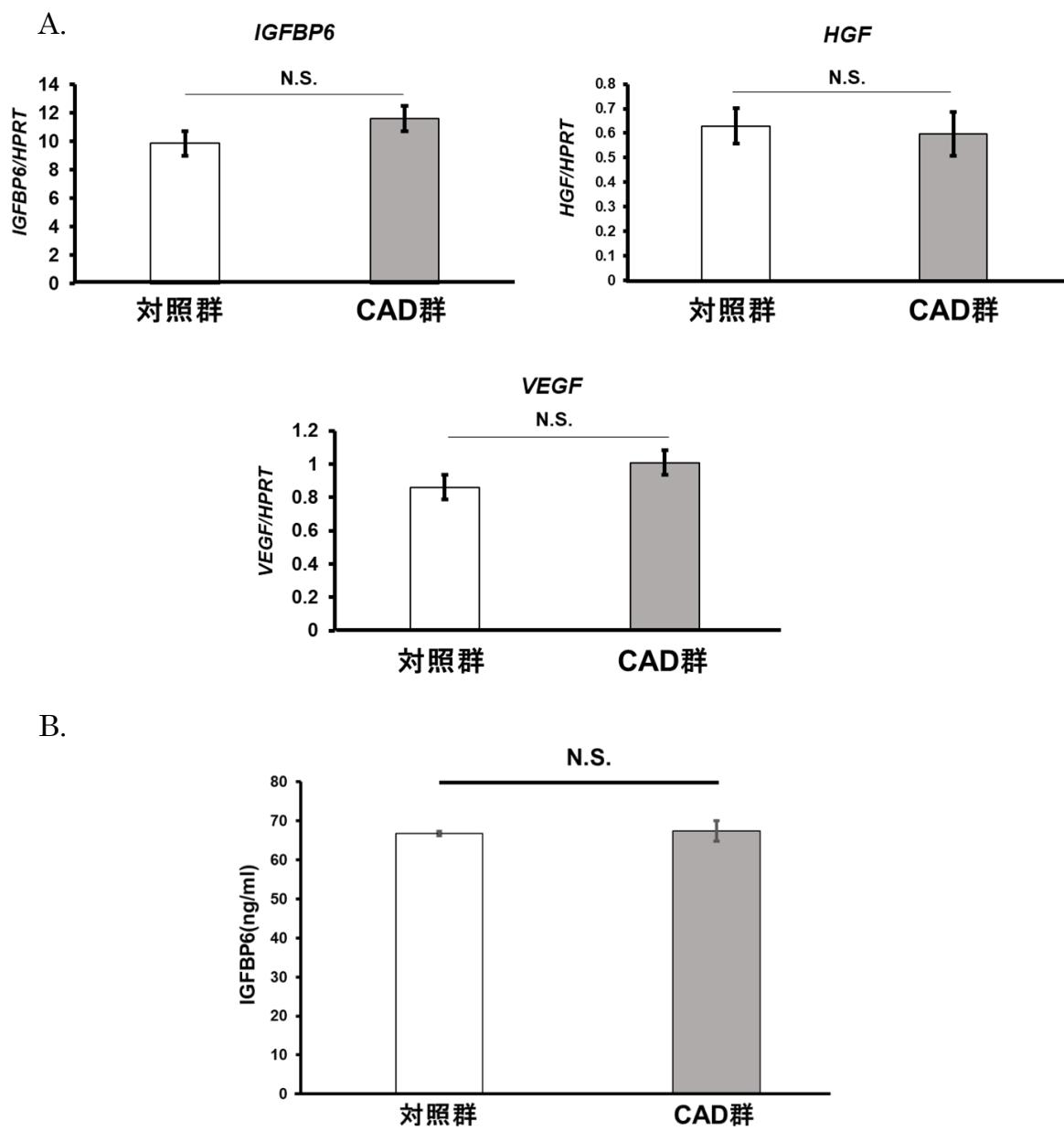


図 5. 炭酸アパタイトが液性因子の產生能へ及ぼす影響

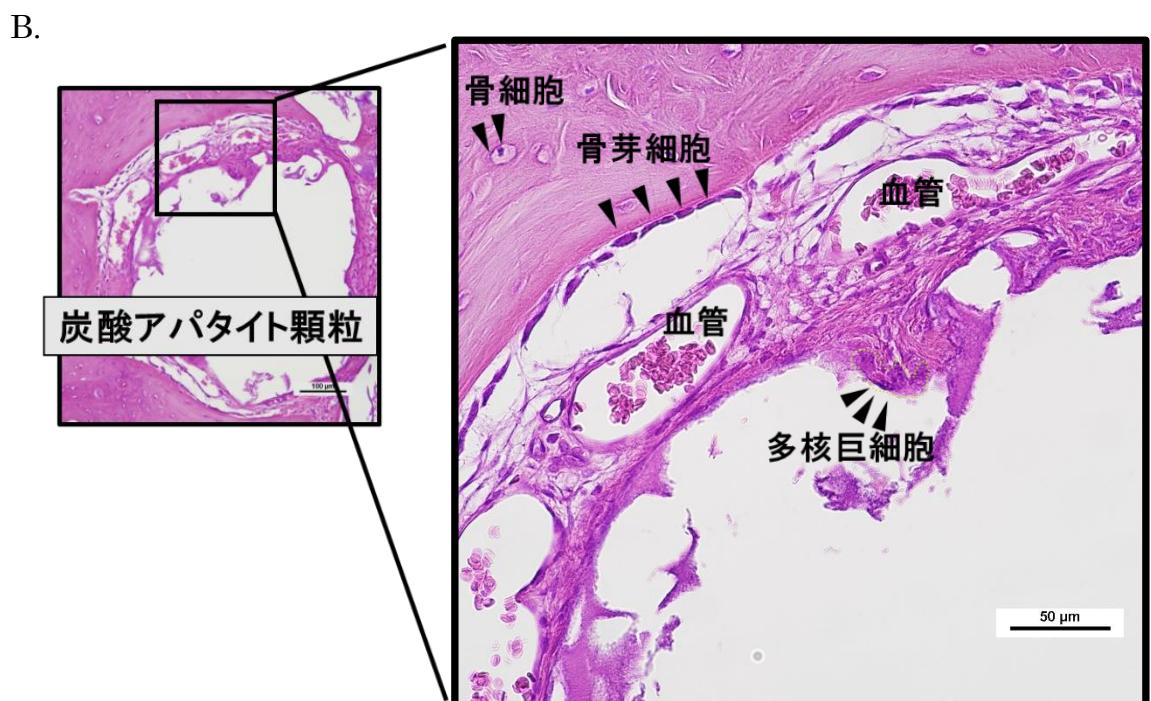
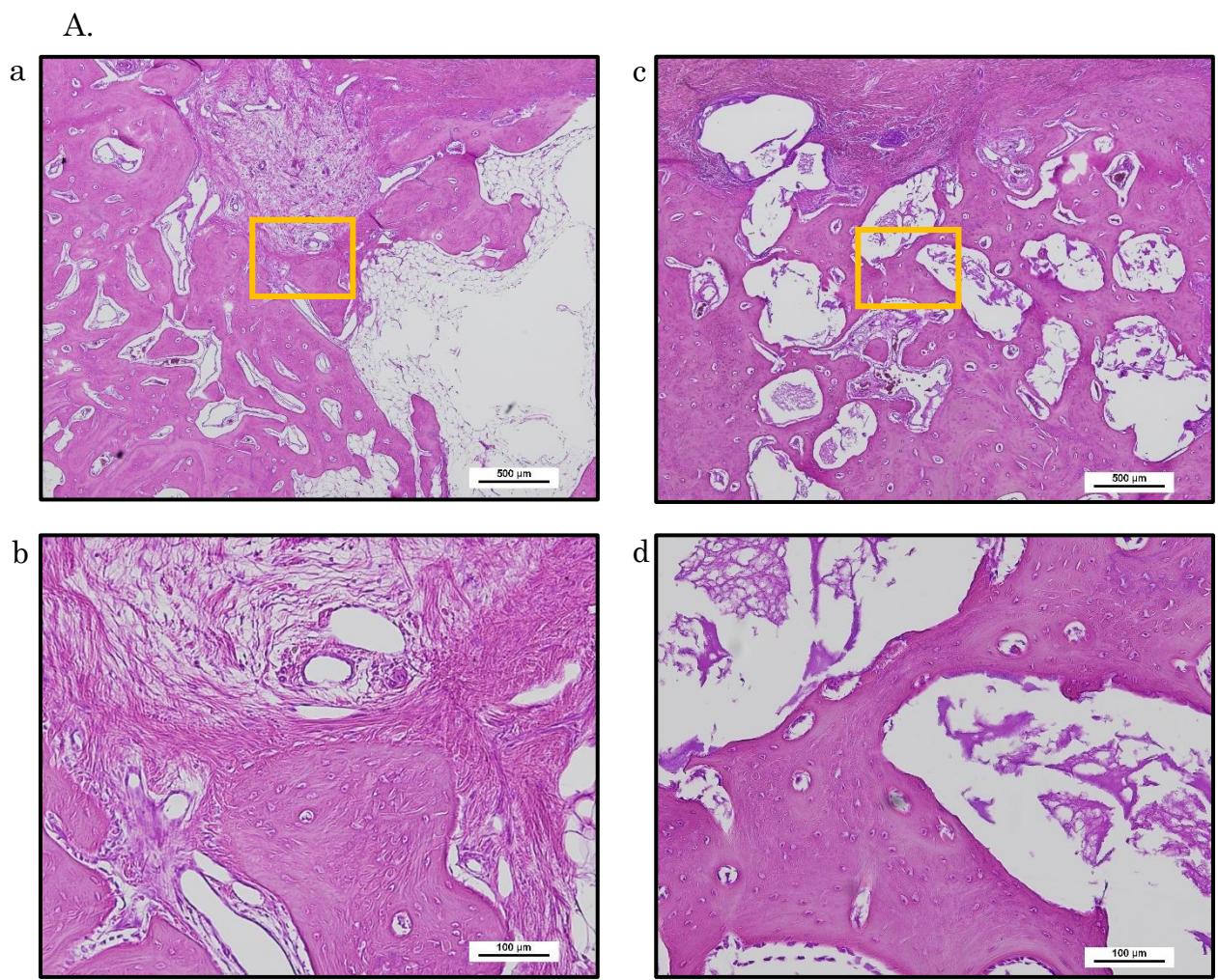
- 対照群および CAD 群とともに 3 日間培養した際の *IGFBP6*, *HGF*, *VEGF* の発現を示す。mRNA の発現は *HPRT*との相対比で示す。
  - 対照群および CAD 群とともに 3 日間培養した際の培養上清中に含まれる *IGFBP6* 濃度を示す。
- 以上の実験は 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。結果は、それぞれ平均値土標準誤差で示す。N.S. : Not Significant。

## 5. イヌ二壁性骨欠損モデルを用いた ADMPC 自己移植における足場材としての炭酸アパタイトの有効性の検討

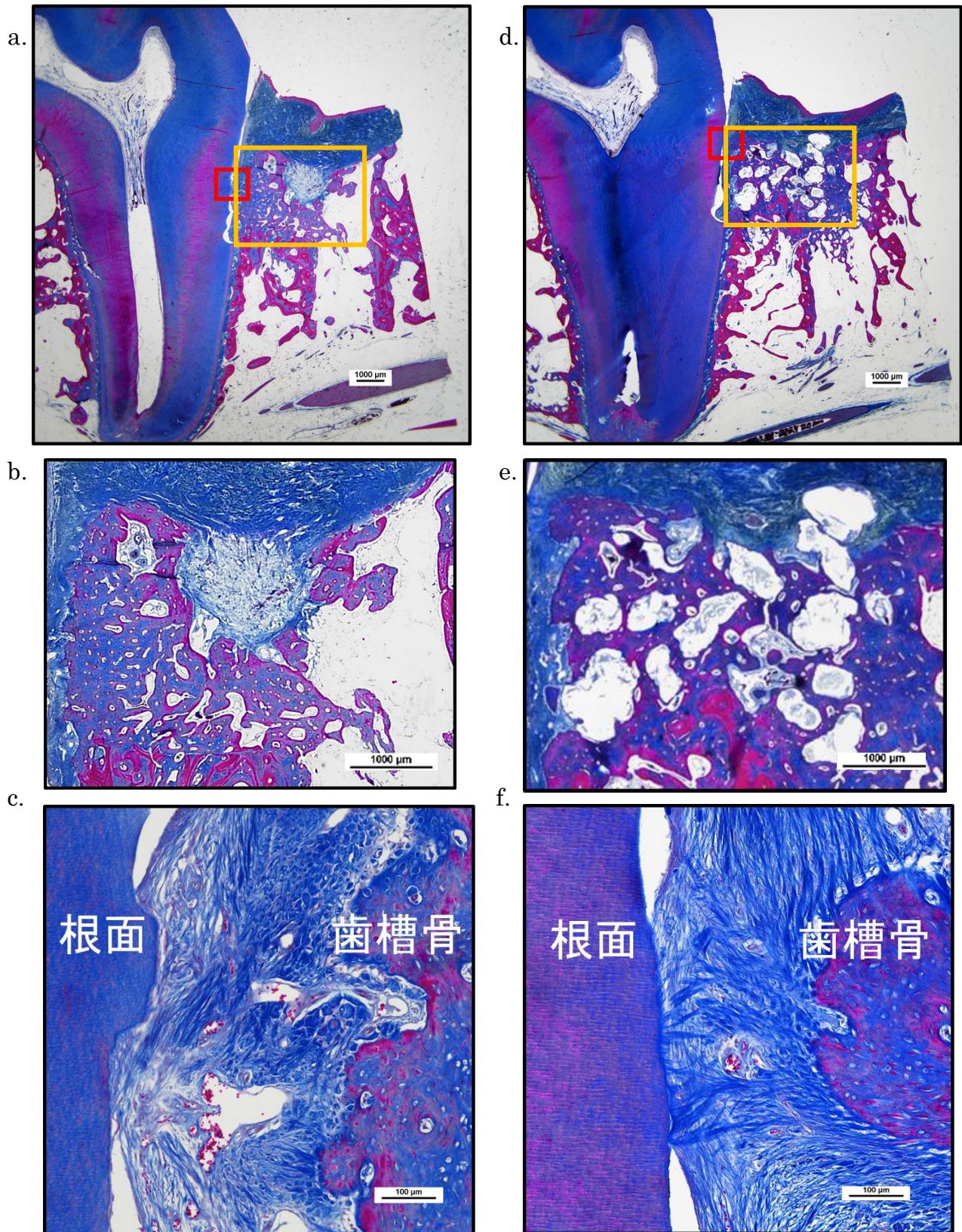
次に、*in vivo* にて ADMPC 自己移植における足場材としての炭酸アパタイトの有効性を評価するため、ビーグル犬二壁性骨欠損モデルに対して、対照側にフィブリゲルと ADMPC（以下、フィブリンゲル群と略す）、試験側に炭酸アパタイトと ADMPC（以下、炭酸アパタイト群と略す）を自己移植し、移植 6 週後における歯槽骨の再生を組織学的解析、マイクロ CT 解析にて評価した。

まず組織学的解析において、矢状断で薄切した組織切片を HE 染色、AZAN 染色し、髄腔の露出から骨欠損の中央と判断される切片を選定した。さらに、根面の削合、ノッチから各切片における骨欠損部の位置を規定した。HE 染色の結果、フィブリンゲル群、炭酸アパタイト群のいずれにおいても移植部位に好中球等の炎症性細胞浸潤を認めなかった（図 6A）。また、炭酸アパタイト群において残存した炭酸アパタイト顆粒の周囲には、多核巨細胞に加え、骨芽細胞、骨細胞が観察され、ADMPC とともに移植された炭酸アパタイトの骨置換が生じていることを確認した（図 6B）。次に、AZAN 染色像において、両群にごく一部の新付着獲得が認められたが、骨性癒着や歯根吸収などの異常治癒所見は認められなかつた（図 6C）。また、AZAN 染色像において、新生骨と残存した炭酸アパタイトを鑑別し、両群の新生骨の面積を解析したところ、炭酸アパタイト群はフィブリンゲル群と同程度の新生骨の形成を認めた（図 6D）。

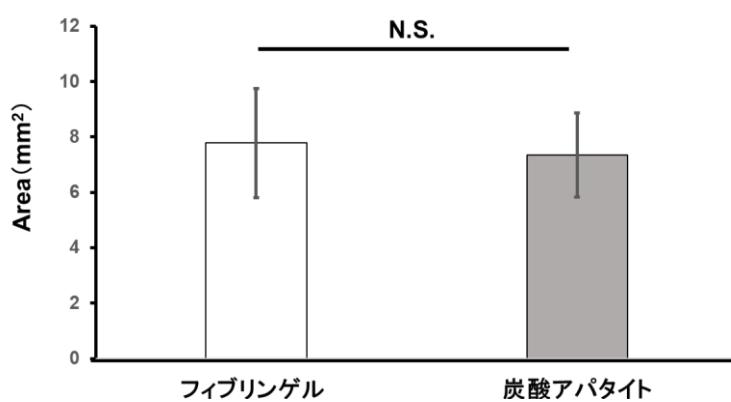
次に、骨欠損部に侵入した結合組織、骨欠損の底面と遠心面、根面で囲まれた組織再生のスペースの面積を解析したところ、炭酸アパタイト群は、フィブリンゲル群を有意に上回り、スペースメイキング能力に関してフィブリンゲルに対する炭酸アパタイトの優位性が明らかとなった（図 6E）。次に、フィブリンゲル群、炭酸アパタイト群の移植 6 週後のマイクロ CT 解析の 3 次元構築像から、フィブリンゲル群においては、頬側に骨欠損の陥凹が残っているのに対し、炭酸アパタイト群においては炭酸アパタイトの顆粒が欠損部を埋めていることが明らかとなった（図 6F）。次に、作製した骨欠損部におけるエックス線不透過物の体積を定量的に評価したところ、第一後臼歯近心、第三前臼歯遠心の双方の骨欠損において、炭酸アパタイト群はフィブリンゲル群の体積を有意に上回った（図 6G）。さらに、第一後臼歯近心と第三前臼歯遠心の欠損作製部位の違いを補正するため、炭酸アパタイト群の体積をフィブリンゲル群の体積で割り、体積比率を算出したところ、炭酸アパタイト顆粒 M サイズはフィブリンゲルの 1.8 倍、顆粒 S サイズは 2.4 倍となり、S サイズの方が高い増加率を示した（図 6G）。また、ADMPC と炭酸アパタイト顆粒を混合した移植体の賦形性と粘稠性は、操作性の観点から S サイズの方が優れていた。以上から、ADMPC 移植における足場材として、炭酸アパタイトの S サイズが適していることが示唆された。



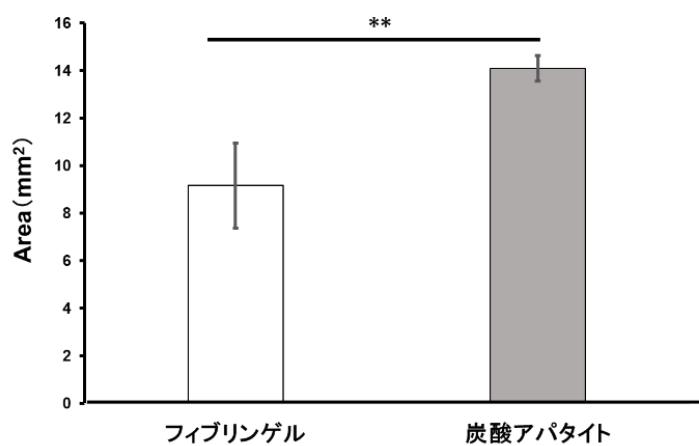
C.



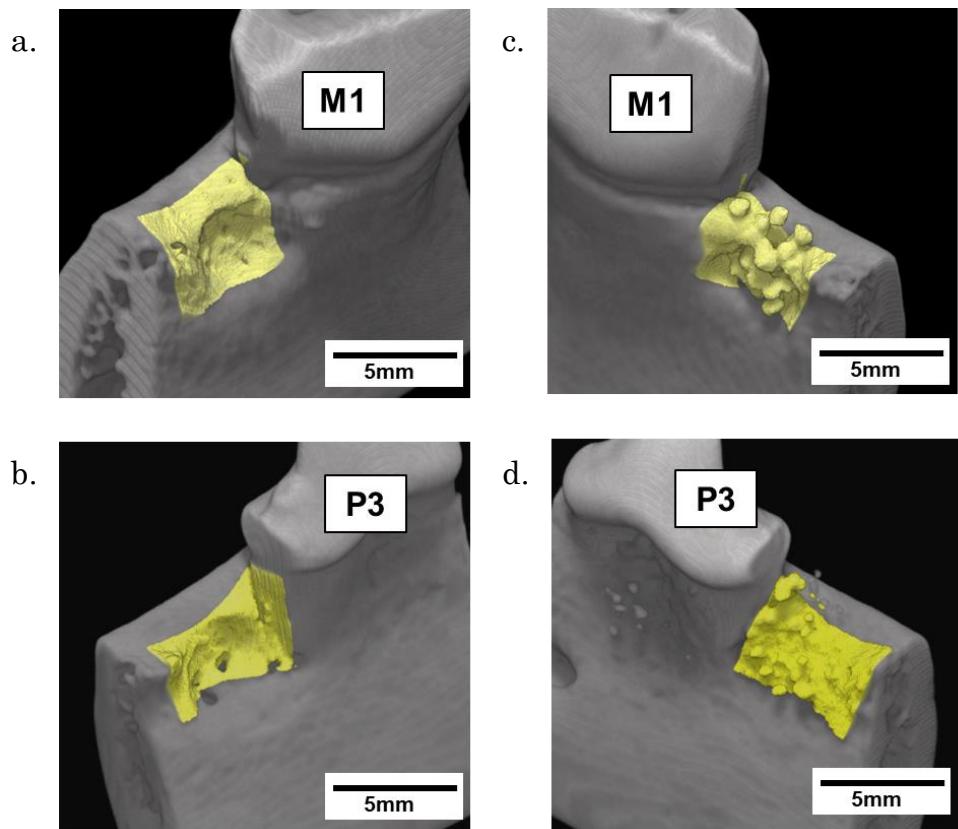
D.



E.



F.



M1:第一後臼歯 P3:第三前臼歯

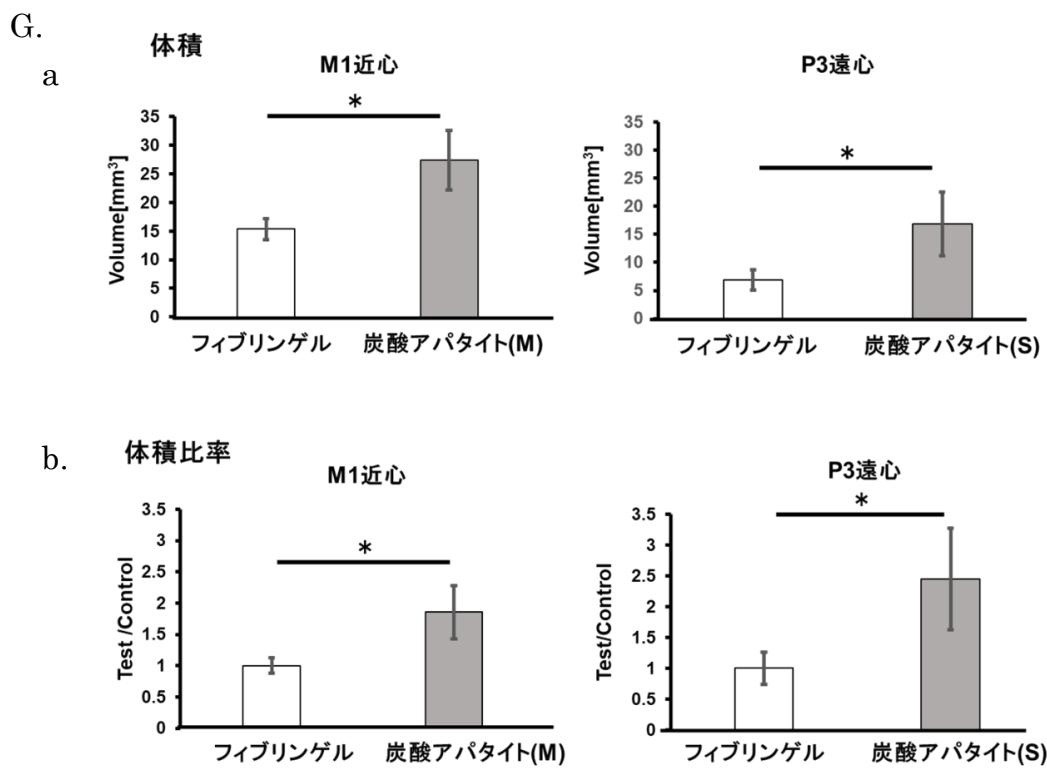


図 6. 二壁性骨欠損モデルを用いた ADMPC の足場材としての炭酸アパタイトの歯周組織再生効果の検討

移植 6 週後における炭酸アパタイト群 (N=5)、フィブリングル群 (N=5) の

- A. 骨欠損部における代表的な HE 染色像を示し、骨欠損中央の拡大部を黄色の枠線で示す。
  - a. フィブリングル群の骨欠損部を示す。
  - b. フィブリングル群の骨欠損部の拡大像を示す。
  - c. 炭酸アパタイト群の骨欠損部を示す。
  - d. 炭酸アパタイト群の骨欠損部の拡大像を示す。
- B. 炭酸アパタイト群における代表的な炭酸アパタイト周囲の HE 染色像を示す。骨細胞、骨芽細胞、多核巨細胞を矢頭で示す。
- C. 代表的な AZAN 染色像を示す。骨欠損部を黄色の枠線、根面周囲の拡大部を赤色の枠線で示す。
  - a. フィブリングル群の全体像を示す。
  - b. フィブリングル群の骨欠損部の拡大像を示す。
  - c. フィブリングル群の根面周囲の拡大像を示す。
  - d. 炭酸アパタイト群の全体像を示す。
  - e. 炭酸アパタイト群の骨欠損部の拡大像を示す。
  - f. 炭酸アパタイト群の根面の拡大像を示す。

- D. AZAN 染色像の骨欠損部における新生骨の面積の定量解析結果を示す。結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。N.S. : Not Significant。
- E. AZAN 染色像の骨欠損部における組織再生スペースの面積の定量解析結果を示す。結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。\*p <0.05。
- F. マイクロ CT 解析結果の代表的な 3 次元構築像を示す。骨欠損部を黄色で示す。
  - a. ADMPC+フィブリングルの M1 近心の骨欠損を示す。
  - b. ADMPC+フィブリングルの P3 遠心の骨欠損を示す。
  - c. ADMPC+炭酸アパタイト (M サイズ) の M1 近心の骨欠損を示す。
  - d. ADMPC+炭酸アパタイト (S サイズ) の P3 遠心の骨欠損を示す。
- G. M1 近心と P3 遠心の欠損毎に、マイクロ CT 解析結果を示す。
  - a. 骨欠損部のエックス線不透過物体積の定量解析結果を示す。
  - b. フィブリングル群から炭酸アパタイト群への体積変化比率を示す。

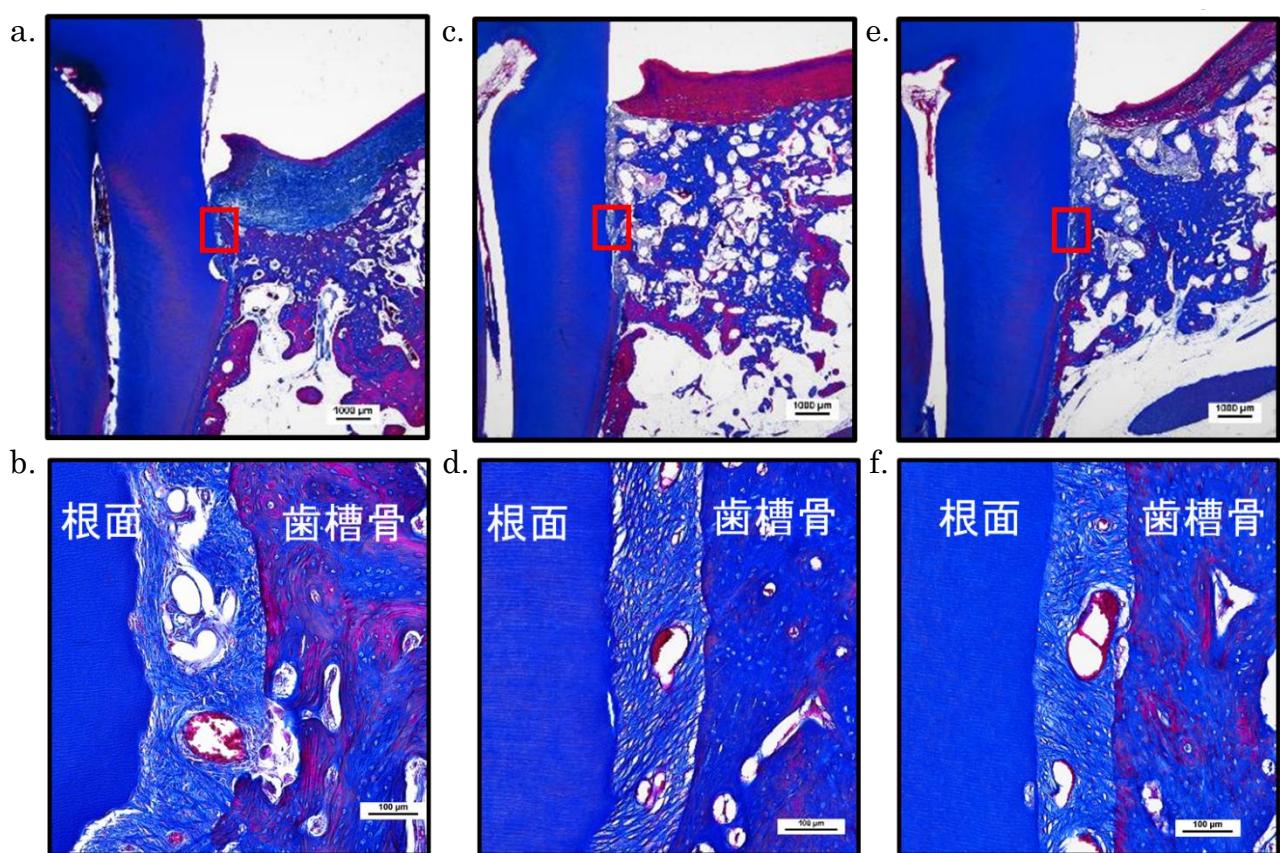
結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。\*p <0.05。

## 6. イヌ実験的歯周病モデル（一壁性骨欠損モデル）における ADMPC・炭酸アパタイト複合体移植の有効性の検討

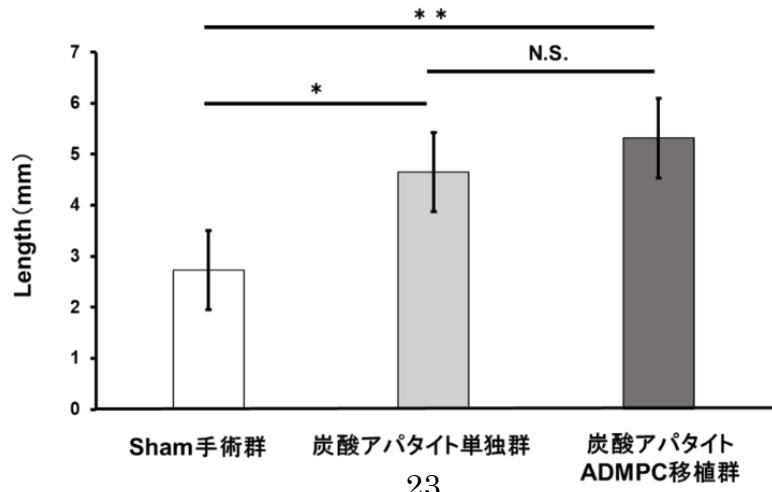
ADMPC・炭酸アパタイト複合体移植の重度歯周炎における有効性を検討するため、ビーグル犬一壁性骨欠損モデルを用いて骨欠損のみを作製した Sham 手術群、炭酸アパタイト単独群、炭酸アパタイト+ADMPC 移植群の 3 群を設定し、移植 12 週後に AZAN 染色による組織学的解析およびマイクロ CT 解析を行い、試験部位の歯周組織再生を評価した。AZAN 染色の結果、3 群ともに欠損底部から連続した新付着の獲得が明らかとなった(図 7A)。そこで獲得した新付着を定量的に解析するため、固有歯槽骨と根面で挟まれる軟組織を再生歯根膜と定義し、その長さとコラーゲン線維密度を計測した。再生歯根膜の長さは、炭酸アパタイト単独群と炭酸アパタイト+ADMPC 移植群において、Sham 手術群と比較し有意に大きい値を示した(図 7B)。また、再生歯根膜のコラーゲン線維密度については、3 群間で有意な差を認めなかった(図 7C)。続いて骨欠損部における新生骨面積を組織学的に評価したところ、炭酸アパタイト+ADMPC 移植群は、炭酸アパタイト単独群と Sham 手術群と比較し、有意な新生骨の形成亢進を認めた(図 7D)。また、マイクロ CT 解析の結果より、Sham 手術群と比較し、炭酸アパタイト単独群と炭酸アパタイト+ADMPC 移植群において骨欠損部の回復が確認された(図 7E)。次に、炭酸アパタイトと新生骨の鑑別を可能とする高分解能マイクロ CT を使用し、骨欠損部におけるエックス線不透過物の体積および残存炭酸アパタイトの体積を計測することで、新生骨の体積を算出した。まず、エックス線不透過物体積を計測すると、炭酸アパタイト+ADMPC 移植群は炭酸アパタイト単独群と Sham 手術群を有意に上回った(図

7F)。また、炭酸アパタイト単独群、炭酸アパタイト+ADMPC 移植群における残存炭酸アパタイト量に有意な差は認められなかった(図 7G)。さらに、新生骨の形成量については、炭酸アパタイト+ADMPC 移植群が Sham 手術群、炭酸アパタイト単独群を有意に上回った(図 7H)。以上の結果をまとめると、炭酸アパタイト単独群と炭酸アパタイト+ADMPC 移植群は Sham 手術群よりも長い新付着を獲得し、移植 12 週時点での炭酸アパタイトの残存を認めた。さらに、炭酸アパタイト+ADMPC 移植群は他の 2 群よりも有意な新生骨の形成を認めた。

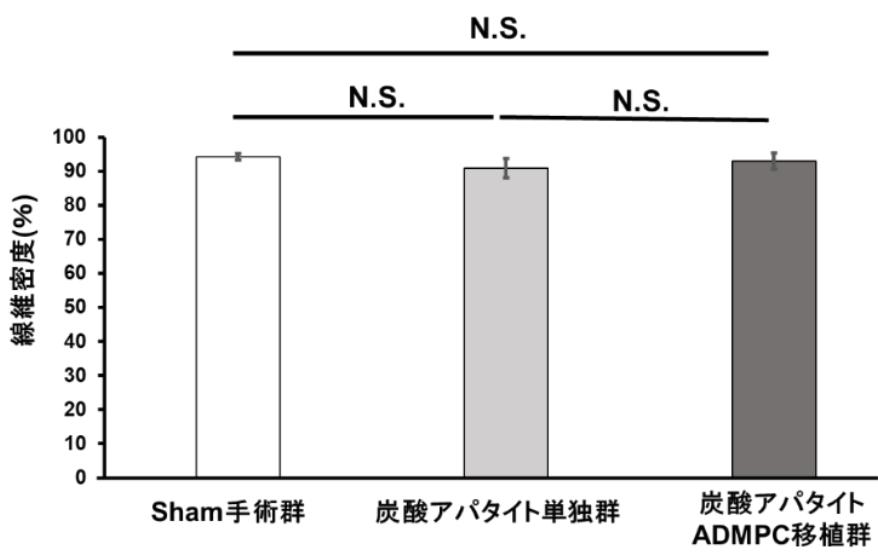
A.



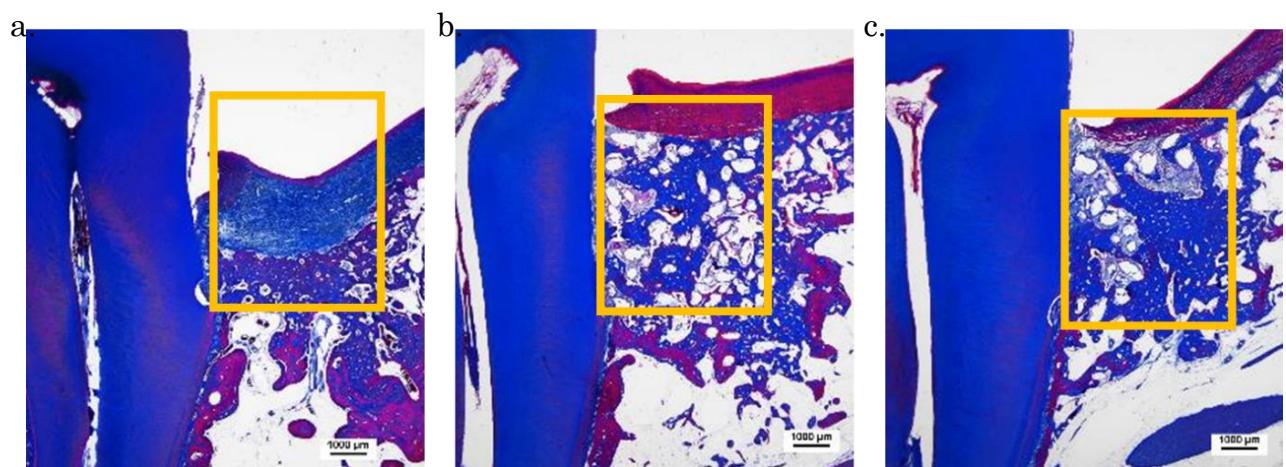
B.



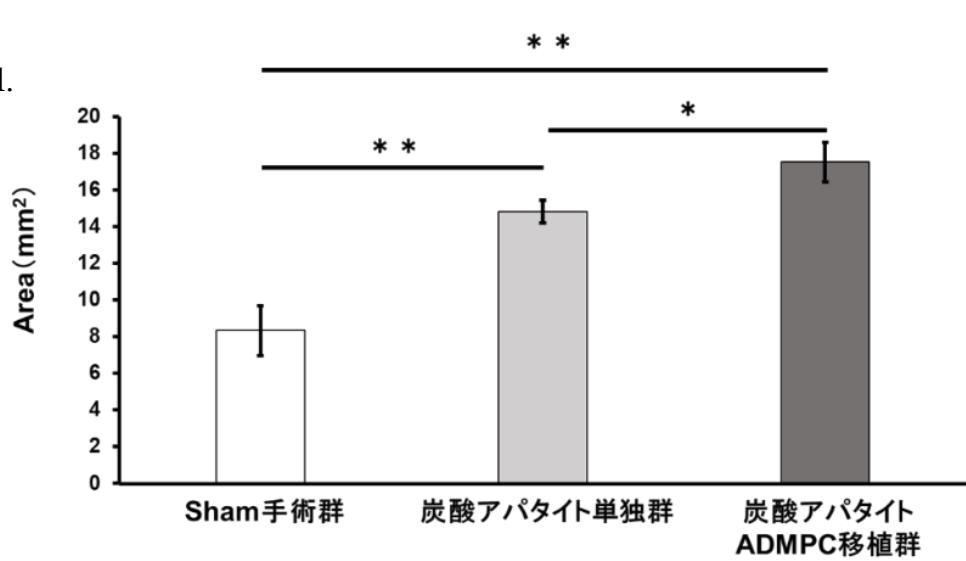
C.



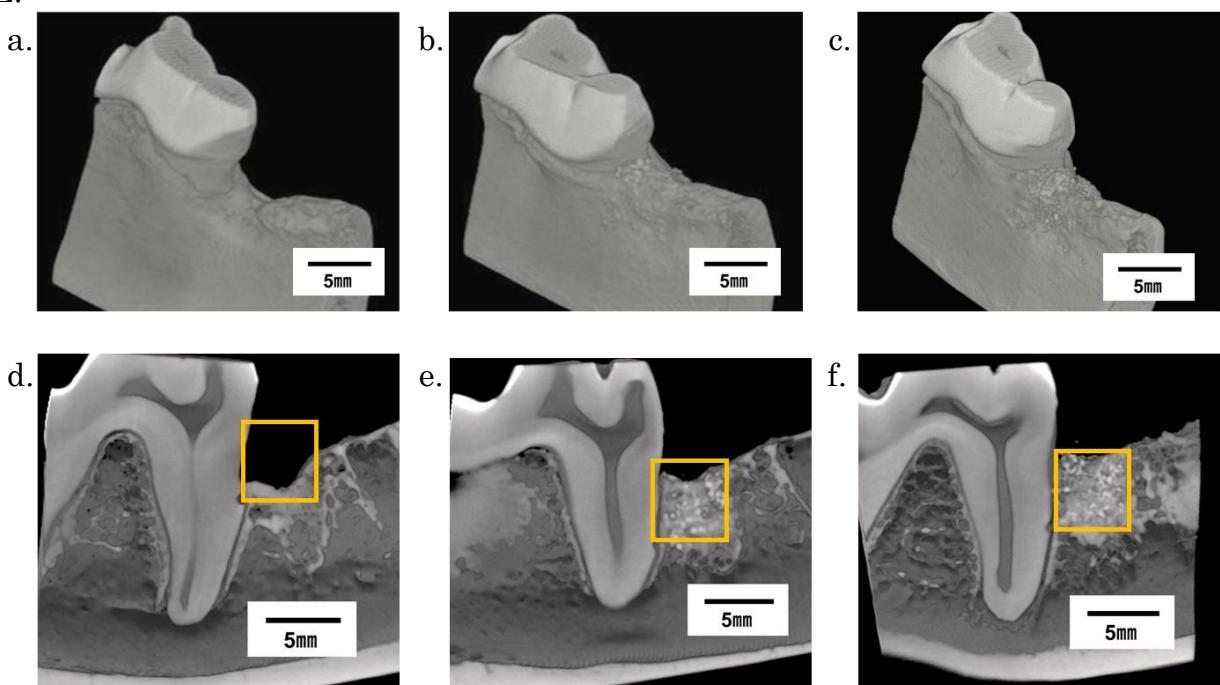
D.



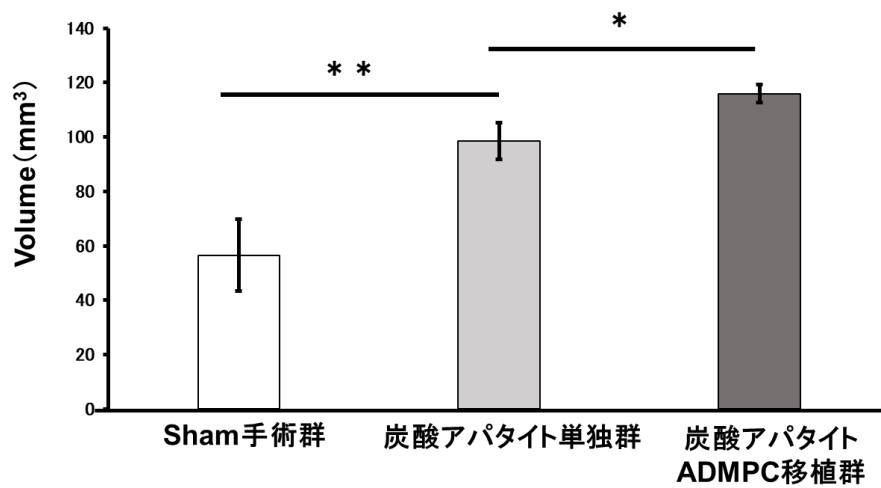
d.



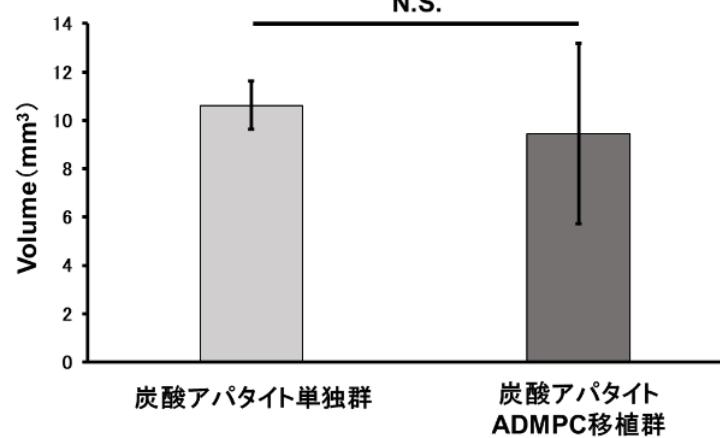
E.



F.



G.



H.

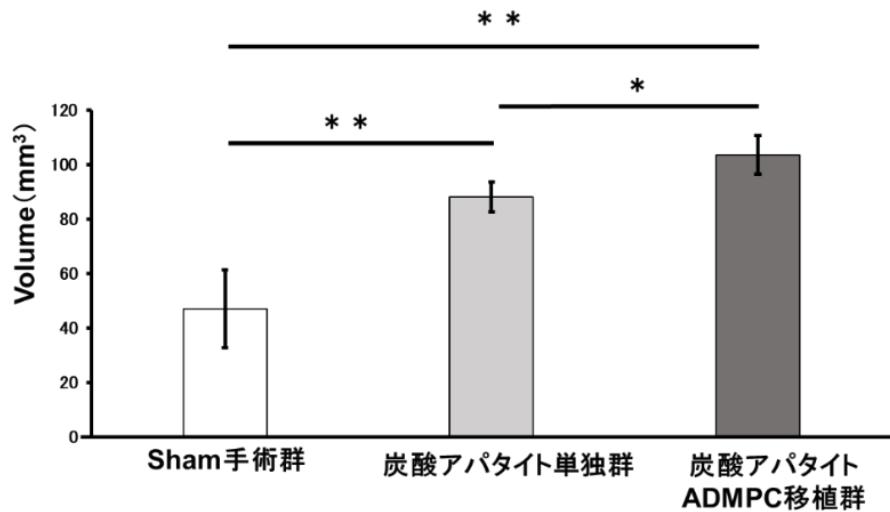


図 7. 一壁性骨欠損モデルを用いた ADMPC・炭酸アパタイト複合体移植の歯周組織再生効果に関する検討

移植 12 週後における、Sham 手術群 (N=4)、炭酸アパタイト単独群 (N=3)、炭酸アパタイト +ADMPC 移植群 (N=3) の

A. 代表的な AZAN 染色像を示す。赤色の枠線で囲んだ根面周囲の拡大像を下段に示す。

- Sham 手術群における全体像を示す。
- Sham 手術群における根面周囲の拡大像を示す。
- 炭酸アパタイト単独群における全体像を示す。
- 炭酸アパタイト単独群における根面周囲の拡大像を示す。
- 炭酸アパタイト +ADMPC 移植群における全体像を示す。
- 炭酸アパタイト +ADMPC 移植群における根面周囲の拡大像を示す。

B. 再生歯根膜長さの定量解析結果を示す。結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

\* p <0.05、\*\* p <0.01、N.S. : Not Significant。

C. 再生歯根膜の線維密度の定量解析結果を示す。

結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。N.S. : Not Significant。

D. 代表的な AZAN 染色像を示す。なお、骨欠損部を黄色の枠線で示す。下段に、骨欠損部における新生骨の定量解析結果を示す。

- Sham 手術群における骨欠損部を示す。
- 炭酸アパタイト単独群における骨欠損部を示す。
- 炭酸アパタイト +ADMPC 移植群における骨欠損部を示す。
- 骨欠損部における新生骨の定量解析結果を示す。

結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。\* p <0.05、\*\* p <0.01。

- E. 代表的なマイクロ CT 解析の代表的な 3 次元構築像を上段に、断面像を下段に示す。骨欠損部を黄色の枠線で示す。
- a. Sham 手術群における 3 次元構築像を示す
  - b. 炭酸アパタイト単独群における 3 次元構築像を示す。
  - c. 炭酸アパタイト+ADMPC 移植群における 3 次元構築像を示す。
  - d. Sham 手術群における断面像を示す。
  - e. 炭酸アパタイト単独群における断面像を示す。
  - f. 炭酸アパタイト+ADMPC 移植群における断面像を示す。
- F. 骨欠損部におけるエックス線不透過物の高分解能マイクロ CT の定量解析結果を示す。結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。 \*p <0.05、 \*\*p <0.01。
- G. 骨欠損部における残存炭酸アパタイトの高分解能マイクロ CT の定量解析結果を示す。結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。 N.S. : Not Significant。
- H. 骨欠損部における新生骨の高分解能マイクロ CT の定量解析結果を示す。結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。 \*p <0.05、 \*\*p <0.01。

## 考察

歯周治療の最終的な目標は、歯周病によって失われた歯周組織の解剖学的形態と機能を、歯周病に罹患する前の状態に復することである。この目標を達成するためには、歯周病の原因となる細菌バイオフィルムを除去するのみならず、破壊された歯周組織を再生させるための介入、すなわち歯周組織再生療法を施すことが必要となる。FGF-2、EMD の局所投与や GTR 法などの既存の歯周組織再生療法は、軽度から中等度の歯周組織欠損に対しては再生効果を期待できるが、重度歯周病に適応可能な再生療法は未だ確立されていない。この問題に対し、我々の研究室では、ADMPC の自己移植による歯周組織再生療法の研究開発を進めてきた。本研究では、既に実施済みの臨床研究にて明らかとなった課題を解決することで、臨床応用に向けた橋渡し研究をさらに推進することを目指し、炭酸アパタイトの併用が ADMPC 自己移植療法に及ぼす影響を *in vitro*、*in vivo* の両面で検討した。

細胞移植治療に併用する足場材の具備すべき条件としては、足場材が移植細胞に対して細胞毒性を示さないこと、移植細胞の接着、増殖、および分化等の細胞機能を阻害しないこと、十分な数の細胞との移植用複合体が容易に作製できること、足場材としての機械的特性を維持したまま移植後は生体内で適切な代謝を受けること等が挙げられる<sup>[30-32]</sup>。そこで本研究では、まず、炭酸アパタイトが ADMPC の増殖、分化、液性因子の分泌能に及ぼす影響を *in vitro* で評価した。炭酸アパタイト顆粒は歯科適応骨補填材として既に臨床応用されているが、顆粒上で細胞を培養することは困難であることから、本研究では、臨床で用いられている炭酸アパタイト顆粒と同じ製法で最終形態をディスク状に成型した CAD の上で ADMPC を培養した。その結果、CAD 上に播種した ADMPC の細胞形態の観察から、細胞骨格に加え、核やミトコンドリア、粗面小胞体の解剖学的形態は通常培養と差を認めず、また、CAD 上で ADMPC は増殖・分化し、液性因子を産生することが明らかとなった。これらの結果は、ADMPC を炭酸アパタイトとともに歯周組織欠損部に移植した際に、炭酸アパタイトが ADMPC にその細胞機能を発揮できる環境を提供する足場材であることを示唆している。本研究で実施した *in vivo* 移植実験では、移植した ADMPC のトラッキングを行わなかったため、組織学的な解析において移植細胞の残存数や局在等を検討することは困難であった。今後、標識した ADMPC を用いた移植実験を実施することで炭酸アパタイト上における ADMPC の局在や生存期間について *in vivo* で解析を進めたいと考えており、ビーグル犬に比べ顎骨の脱灰等が比較的簡便なラットを用いた実験系の構築を開始している。

幹細胞移植治療の分子機序に関して、これまででは、移植した幹細胞が組織を構成する各種細胞に直接分化することで組織再生に寄与する Repair 効果が幹細胞移植治療による組織再生の中心的な役割を担うと考えられていた。しかしながら近年、移植した幹細胞が成長因子等のサイトカインや細胞外基質、さらには exosome 等を分泌することにより被移植部位周囲に存在する組織幹細胞や前駆細胞を活性化する Trophic 効果が組織再生の主たる分子機序であるとパラダイムシフトしてきた<sup>[33]</sup>。我々の研究室では、ADMPC 自己移植による歯周組織再生メカニズムの一端として、ADMPC が分泌する液性因子が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を活性化し、その分子機序に IGFBP6 が関与していることを報告した<sup>[34]</sup>。本研究においては、CAD 上で培養した ADMPC が、通常培養と同様に IGFBP6 を産生していることを明らかにした。このことは、炭酸アパタイトとともに移植した ADMPC が、Trophic 効果による歯周組織再生能を維持しうることを示唆している。一方で、HGF、VEGF の遺伝子発現に差を認めなかつたが、培養上清中のタンパク発現は、通常培養に比べ CAD 上での培養で両分子ともに 30~50%程度の減少を認めた（結果には示さず）。このことは、炭酸アパタイトには一部のタンパク質を吸着する性質がある<sup>[35]</sup>ことから、ADMPC が産生したサイトカインの一部が CAD に捕捉され、培養上清中の濃度が低下したためではないかと考えられる。幹細胞の分泌する液性因子はオートクラインに作用することで幹細胞の増殖に寄与すると報告がある<sup>[36]</sup>ことから、CAD 上で培養した ADMPC の増殖が亢進したメカニズムの一端に、ADMPC 由来の液性因子が CAD 表面に吸着し留まることで、効率よく ADMPC に作用した可能性があるのではないかと推察している。現在、CAD 表面に吸着した ADMPC 由来サイトカインの検出方法について検討を行っているが、炭酸アパタイトが ADMPC 由来液性因子を保持する役割が見出せれば、幹細胞移植治療の足場材として Trophic 効果を支援、増強するという新たな機能として評価されるものと考えられる。なお CAD 上で培養した ADMPC の増殖率が、播種 12 時間後、24 時間後に対照群に比べ亢進した一方、播種 36 時間後、48 時間後において有意な差を認めなかつたのは、細胞密度の上昇によって細胞増殖が抑制された結果と考えている。

本研究において、*in vitro* の解析では CAD への ADMPC の細胞接着が、*in vivo* での移植実験では、炭酸アパタイト表層に破骨細胞様の多核巨細胞や骨芽細胞が観察された。この結果は無機材料である炭酸アパタイトに対し細胞が接着する分子機序の存在を示しているものの、その詳細については解析に至らなかつた。前述の通り、炭酸アパタイトはカルシウムイオンやリン酸イオン等の極性基を介してタンパク質を吸着する<sup>[35]</sup>。そのため、*in vitro* の実験においては、炭酸アパタイトは培養液中の血清タンパクを吸着し、*in vivo* の実験において

ては埋植部位の血液や体液中のタンパク質、細胞由来の細胞外基質等を吸着すると考えられる。これらの炭酸アパタイト表層のタンパク質に細胞接着分子が結合することで、炭酸アパタイトへの細胞接着が可能になると考えられる。

骨髓由来間葉系幹細胞を炭酸アパタイト上で培養し、*collagen1A1*、*alkaline phosphatase*、*osteopontin*、*osteocalcin* 等の骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を検討した先行研究<sup>[37]</sup>では、通常培養と比較し、炭酸アパタイト上で培養によって、これら遺伝子発現がいずれも上昇することを報告している。一方で、同論文では、骨髓由来間葉系幹細胞の増殖は、通常培養に比べ低下することが示されており、本研究で得られた ADMPC の実験結果と異なる。間葉系幹細胞の性質は由来する組織によって異なることが知られており、脂肪組織に由来する間葉系幹細胞は一般に高い増殖能と液性因子の分泌能を有していると報告されている<sup>[38]</sup>。ADMPC の炭酸アパタイト上で増殖亢進は前述のように分泌する液性因子の影響があると考えられる一方で、本研究における硬組織形成細胞への分化に関しては培養 6 日目の *RUNX2* 発現を指標として評価するにとどめた。マスター遺伝子である *RUNX2* の発現は分化能の評価に際し重要であるが、分化過程の解析には経時的な分化マーカー遺伝子の発現解析に加え、*alkaline phosphatase* 活性や、最終分化の指標として石灰化ノジュールの形成について検討すべきである。現在、各種遺伝子発現および *alkaline phosphatase* 活性について解析を開始しているが、石灰化ノジュール形成に関しては、アリザリンレッド染色や Von Kossa 染色はカルシウム塩を染色するため、CAD 上の培養細胞の染色には適さず、他の方法を探索する必要があると考えている。

前述の ADMPC 自己移植による歯周組織再生療法の安全性と有効性を評価した臨床研究においては、ADMPC の足場材としてフィブリングルが用いられた。フィブリングルは生体接着剤として様々な外科手術に臨床応用されており、安全性に関する懸念が少ない一方で、フィブリングル単体の埋植では歯周組織の再生効果に及ぼす影響は限定的であることが報告されている<sup>[39]</sup>。実際、同上臨床研究においてフィブリングルが十分なスペースメイキング能力を発揮できないことが当該治療法の実用化にむけ解決すべき課題の一つであることが明らかとなった。本研究では、ビーグル犬に作製した二壁性骨欠損に対する ADMPC 自己移植の足場材として、炭酸アパタイトのフィブリングルに対する優位性が明らかとなった。炭酸アパタイトを ADMPC と移植することにより、フィブリングルを足場材としたときと同等の新生骨が観察されたことは、炭酸アパタイトが ADMPC による歯槽骨再生に対し抑制的な効果を示さなかった結果といえる。一方で、結合組織下の組織再生スペースの保護に関しては、炭酸アパタイトがフィブリングルに対する優位性を発揮したことは、炭酸アパタイトの高いスペースメイキング能力を実証した結果といえ、移植 6 週後以降における継続的

な組織再生が期待できるものと考えている。

本研究で、ビーグル犬に作製した実験的骨欠損として第三前臼歯遠心と第一後臼歯近心の部位を用いており、両欠損部の条件が全く同一と評価することは困難であるが、顆粒径が 0.3~0.6mm の S サイズと 0.6~1.0mm の M サイズにおいて、操作性、賦形性の観点に加え、移植 6 週後のエックス線不透過物の体積比率において M サイズより S サイズの炭酸アパタイトが良好な結果を示した。骨欠損の大きさと移植細胞数を規定して実験を行ったものの、作成した骨欠損に対し粒径の小ささから S サイズの方がより密に充填することが可能であった影響を排除することは難しいが、血餅の維持や血管新生には、顆粒径が 0.3~0.5 mm、顆粒同士の空隙が 0.1 mm 程度となる骨補填材が骨再生に適しているという報告<sup>[40, 41]</sup>もあることから、炭酸アパタイトの S サイズが ADMPC 移植治療の足場材としてより適切であると考えられた。

既存の歯周組織再生療法では、一壁性および四壁性の垂直性骨欠損に対する十分な組織再生効果は期待できない。本研究では、ADMPC 移植治療の重度歯周病への適応を目指し、次にビーグル犬一壁性骨欠損モデルを用いて ADMPC・炭酸アパタイト複合体の組織再生効果を検討した。臨床において、一壁性骨欠損に対して通常のフラップ手術を施行しても、十分な歯周組織再生は期待できないが、本研究におけるビーグル犬一壁性骨欠損モデルでは、術後 12 週の組織学的解析、マイクロ CT 解析の結果から sham 手術群において作製した骨欠損に対し約 30% の歯槽骨再生が認められたことは、イヌの自己再生能の高さを示すものである。また、炭酸アパタイト単独群では sham 手術群の約 2~2.5 倍の歯槽骨再生が認められ、ADMPC・炭酸アパタイト併用群ではさらに有意な歯槽骨再生量の増加が観察された。このことは ADMPC と炭酸アパタイトの併用が重度歯周組織欠損に対する再生療法として有効であることを示唆している。しかしながら、結合組織付着の評価指標の一つとして解析した再生歯根膜長さについては併用群で高い傾向を示したもの、統計学的有意差は得られなかった。また、歯槽骨再生量の増加に関して炭酸アパタイト単独群に対して ADMPC の効果は約 10% 程度の上乗せであった。これは、再生効果が得にくい重度歯周病モデルとして実施した一壁性骨欠損モデルにおいて、前述のようにイヌの高い自己再生能を一因として炭酸アパタイトのみの埋植で想定以上の再生効果が発揮された結果だと考えている。本研究で用いた骨欠損モデルは、人為的に作製した非炎症性の骨欠損モデルであることも各実験群の治癒を押し上げたのではないかと推測しており、本歯周病モデルにおける限界の一つだと考えている。今後は、歯周組織に炎症を惹起した後に移植を行うイヌ分岐部病変モデル<sup>[25]</sup>や自然発症歯周炎モデル<sup>[42]</sup>を用いて再生効果を検討することで、ADMPC による歯周組織再生効果をより明確に示すことが可能なのではないかと考えられる。

二壁性骨欠損モデルにおける ADMPC・炭酸アパタイト移植部位の移植 6 週後の HE 染色像から、炭酸アパタイト顆粒の周囲に好中球等の炎症性細胞浸潤を認めず、多核巨細胞および骨芽細胞が観察された。このことは、正常な骨リモデリングに基づく炭酸アパタイトの生体吸収過程が進行していることを示唆している。また、一壁性骨欠損モデルにおける移植 12 週後の組織学的解析の結果、歯根吸収や骨癒着等の異常治癒所見を認めることなく、歯根と新生歯槽骨が一定の距離を保ち、その間に軟組織が介在する組織像が観察されたことは、理想的な歯周組織再生が誘導されていることを示唆している。イヌの歯および顎骨の組織学的解析では、ギ酸での長期間におよぶ脱灰処理を必要とすることが、組織学的染色手法の妨げとなっている。しかし、一部の分子はギ酸処理後も抗原性が失われることなく、免疫染色での検出が可能であることが明らかになっている。現在、酒石酸抵抗性産生ホスファターゼに対する免疫染色を行い破骨細胞の同定を試みているが、他の分子についても順次、検出を試みることで、ADMPC・炭酸アパタイト併用による組織再生効果の分子機序を同定したいと考えている。

我々の研究室がこれまでに報告した知見に加え、本研究にて得られた結果から、ADMPC と炭酸アパタイトの併用による歯周組織再生機序について考察する。炭酸アパタイトとともに歯周組織欠損部に移植した ADMPC は炭酸アパタイト上で増殖し、硬組織形成細胞へ分化することで新生骨を形成する repair 効果を示す一方で、液性因子を分泌することで欠損部周囲の幹細胞を活性化する trophic 効果を示すと考えられる。炭酸アパタイトのスペースメイキング能力と骨伝導能に加え、ADMPC による repair 効果と trophic 効果による組織再生効果が理想的な歯周組織の再生を誘導しているものと考えられる。今後、これら両者と併用する至適シグナル因子を検討することは重要な研究課題の一つであるが、細胞、足場材、シグナル因子の理想的な組み合わせが明らかとなれば、これまで対応が困難であった重度歯周病に対応可能な歯周組織再生療法の開発につながるものと考えている。

## 結論

本研究の結果より、以下の結論を得た。

1. 炭酸アパタイト上で培養した ADMPC は、正常な細胞形態を示すとともに増殖が亢進した。
2. 炭酸アパタイト上で培養した ADMPC は、硬組織形成細胞への分化能および液性因子の分泌能を示した。
3. ビーグル犬二壁性骨欠損モデルにおいて、ADMPC と併用する足場材として、炭酸アパタイトのフィブリングルに対する優位性が明らかとなった。
4. ビーグル犬一壁性骨欠損モデルにおいて、ADMPC と炭酸アパタイトの併用は、炭酸アパタイト単独と比較し、良好な歯槽骨の再生を認めた。
5. 組織学的な解析から、ADMPC と炭酸アパタイトの併用は、異常治癒所見を示さず理想的な歯周組織の再生を誘導した。

以上から、炭酸アパタイトの ADMPC 自己移植による歯周組織再生誘導時の有効性が示唆された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の進行にあたり、直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科、竹立匡秀講師に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文献

1. Aida, J., et al., Reasons for Permanent Tooth Extractions in Japan. *Journal of Epidemiology*, 2006. 16(5): p. 214-219.
2. Glickman, I., Periodontal disease. *New England Journal of Medicine*, 1971. 284(19): p. 1071-1077.
3. Langer, R. and J.P. Vacanti, Tissue engineering. *Science*, 1993. 260(5110): p. 920-6.
4. Murakami, S., Periodontal tissue regeneration by signaling molecule (s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF - 2) have in periodontal therapy? *Periodontology 2000*, 2011. 56(1): p. 188-208.
5. Murakami, S., et al., Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *Journal of Periodontal Research*, 1999. 34(7): p. 425-430.
6. Kitamura, M., et al., FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *Journal of dental research*, 2011. 90(1): p. 35-40.
7. Kitamura, M., et al., Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PloS one*, 2008. 3(7): p. e2611.
8. Kaigler, D., et al., Platelet-derived growth factor applications in periodontal and peri-implant bone regeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2011. 11(3): p. 375-385.
9. Venezia, E., et al., The Use of Enamel Matrix Derivative in the Treatment of Periodontal Defects: a Literature Review and Meta-analysis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2004. 15(6): p. 382-402.
10. Du, T.-T., et al., Effect of aging on proliferative and differentiation capacity of human periodontal ligament stem cells. *Journal of Southern Medical University*, 2017. 37(3): p. 360-366.
11. Zheng, W., et al., Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment. *Tissue Engineering Part A*, 2009. 15(9): p. 2363-71.
12. Yamada, Y., et al., A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 2006. 26(4).
13. Tobita, M., et al., Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 2008. 14(6): p. 945-53.
14. Iohara, K., et al., A Novel Combinatorial Therapy With Pulp Stem Cells and Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2013. 2(7): p. 521-533.

15. Feng, F., et al., Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Disease*, 2010. 16(1): p. 20-8.
16. Hynes, K., et al., Mesenchymal Stem Cells from iPS Cells Facilitate Periodontal Regeneration. *Journal of Dental Research*, 2013. 92(9): p. 833-839.
17. Iwata, T., et al., Periodontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cell sheets - A safety and efficacy study in ten patients. *Regenerative Therapy*, 2018. 9: p. 38-44.
18. Schaffler, A. and C. Buchler, Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 2007. 25(4): p. 818-27.
19. Zuk, P.A., et al., Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2002. 13(12): p. 4279-4295.
20. Okura, H., et al., Transdifferentiation of human adipose tissue-derived stromal cells into insulin-producing clusters. *Journal of Artificial Organs*, 2009. 12(2): p. 123-130.
21. Okura, H., et al., Properties of hepatocyte-like cell clusters from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2010. 16(4): p. 761-770.
22. Okura, H., et al., Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2010. 16(3): p. 417-425.
23. Okura, H., et al., Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2011. 17(2): p. 145-154.
24. Okura H, S.M., Morita M, Ichinose, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells but not adipose tissue-derived stromal/stem cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. in Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease. 2013.
25. Ozasa, M., et al., Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells. *Inflammation and Regeneration*, 2014. 34(2): p. 109-116.
26. 大阪大学歯学部付属病院にて実施された臨床研究  
Available from: [https://rctportal.niph.go.jp/s/detail/um?trial\\_id=UMIN000007698](https://rctportal.niph.go.jp/s/detail/um?trial_id=UMIN000007698).
27. Anzai, J., et al., Long-term observation of regenerated periodontium induced by FGF-2 in the beagle dog 2-wall periodontal defect model. *PloS one*, 2016. 11(7): p. e0158485.
28. Sato, N., et al., Comparison of the vertical bone defect healing abilities of carbonate apatite,

- $\beta$  -tricalcium phosphate, hydroxyapatite and bovine-derived heterogeneous bone. *Dental materials journal*, 2020. 39(2): p. 309-318.
- 29. Ishikawa, K., et al., Fabrication of low crystalline B-type carbonate apatite block from low crystalline calcite block. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2010. 118(1377): p. 341-344.
  - 30. Eltom, A., G. Zhong, and A. Muhammad, Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019. 2019: p. 1-13.
  - 31. Sundelacruz, S. and D.L. Kaplan, Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Seminars in Cell Developmental Biology*, 2009. 20(6): p. 646-55.
  - 32. Han, J., et al., Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, 2014. 59 Suppl 1: p. 117-30.
  - 33. Fu, Y., et al., Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2017. 23(6): p. 515-528.
  - 34. Sawada, K., et al., Trophic factors from adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells promote cytodifferentiation of periodontal ligament cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015. 464(1): p. 299-305.
  - 35. Takemoto, S., et al., Selective protein adsorption and blood compatibility of hydroxy-carbonate apatites. *Journal of biomedical materials research*, 2004. 69(3): p. 544-51.
  - 36. Zaragozi, L.E., G. Ailhaud, and C. Dani, Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 Signaling Is Critical for Self - Renewal of Human Multipotent Adipose - Derived Stem Cells. *STEM CELLS*, 2006. 24(11): p. 2412-2419.
  - 37. Nagai, H., et al., Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. *Journal of Material Science:Material in Medicine*, 2015. 26(2): p. 99.
  - 38. Schäffler, A. and C. Büchler, Concise Review: Adipose Tissue - Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell - Based Therapies. *STEM CELLS*, 2007. 25(4): p. 818-827.
  - 39. Zhang, L., et al., In vivo alveolar bone regeneration by bone marrow stem cells/fibrin glue composition. *Archives of Oral Biology*, 2012. 57(3): p. 238-44.
  - 40. Klawitter, J. and S. Hulbert, Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *Journal of biomedical materials research*, 1971. 5(6): p. 161-229.
  - 41. Coathup, M.J., et al., The effect of particle size on the osteointegration of injectable silicate-substituted calcium phosphate bone substitute materials. *Journal of biomedical*

- materials research, 2013. 101(6): p. 902-10.
42. 米田俊之, 生命歯科医学のカッティング・エッジ. 第 1 章 口腔組織の形成と再生. 大阪大学出版会. 2008 : p. 60-63.