

〔原著〕

## FGF-2及びBMP-2がヒト歯根膜細胞群において組織再生に与える影響

上與那原朝秀, 日高 竜宏, 白井 要, 門 貴司, 長澤 敏行, 古市 保志

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

## Effects of FGF-2 and BMP-2 on the tissue regeneration using PDL derived cells

Tomohide UEYONAHARA, Tatsuhiro HIDAKA, Kaname SHIRAI, Takashi KADO, Toshiyuki NAGASAWA, Yasushi FURUICHI

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

## Abstract

Recently, cytokines such as fibroblast growth factors (FGF-2) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) have attracted attention due to its efficacy in periodontal tissue regeneration. Animal studies have reported that FGF-2 and BMP-2 promote proliferation and differentiation of periodontal ligament (PDL) cells, and subsequently enhance periodontal tissue regeneration. However, there have been few studies of the interaction between FGF-2 and BMP-2 on PDL derived cells *in vivo*. The purpose of the present study was to use an animal model to determine whether FGF-2 and/or BMP-2 influence tissue regeneration using PDL derived cells.

Implanted materials included human PDL (HPDL) derived cells (collected from 3 human extracted teeth) and implants without PDL cells, human demineralized dentin matrix (DDM ; provided as crushed dentin particles of extracted teeth), and growth factors (1 : none, 2 : FGF-2, 3 : BMP-2, 4 : FGF-2+BMP-2). The materials

were implanted into the subcutaneous tissues of nude mice. Four weeks after the implantation, the mice were sacrificed, implanted tissue collected, and the tissue prepared for histological analyses. The rates of new bone formation and the number of blood vessels in the implanted tissue were measured, and the expression of human GAPDH mRNA were verified with RT-PCR.

The histological analyses established that the number of blood vessels was significantly increased in the implanted tissue with FGF-2, the new bone formation ratio was significantly increased with BMP-2, and new bone formation ratio and number of blood vessels were increased with a combination of FGF-2+BMP-2, resulting in new bone formation with internal newly formed vessels.

The study suggests that implantation of HPDL derived cells in combination with FGF-2 and BMP-2 would be useful for periodontal tissue regeneration.

**Key words** : ヒト歯根膜細胞群, FGF-2, BMP-2

## 緒 言

歯周病とは、歯肉と歯槽骨、セメント質、歯根膜からなる歯周組織が歯周病原菌を原因とする慢性炎症により破壊される疾患であり、成人が歯を喪失する主な原因となる疾患である。一度損傷を受け失われた歯周組織の再生能は限られている (Melcher, 1976)。近年、生体組織工学を用いて失われた生体組織を再生する再生医療が注目されている。生体組織工学において、細胞、増殖因子と足場が組織再生に必要な三大因子である (Langer & Vacanti, 1993)。増殖因子の中でも、特に塩基性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor; FGF-2) や骨形成タンパク (bone morphogenetic protein; BMP-2) などのサイトカインが歯周組織再生療法において注目されている。FGF-2は皮膚、血管、骨、軟骨などさまざまな組織形成に関与する細胞成長因子の一つである。その働きは主に組織の創傷治癒、血管新生を促すことであり、線維芽細胞、血管内皮細胞、未分化間葉系細胞などの細胞増殖促進作用など様々な生理活性を有している (Gospodarowicz et al., 1986; Ledoux et al., 1992; Tsutsumi et al., 2001)。歯科領域においては、現在歯周組織への治験の第Ⅲ相まで進んでおり、FGF-2の歯周組織への局所応用が歯周病により破壊されたヒト歯周組織の再生に有効であることが示されており (Kitamura et al., 2008)、今後臨床応用が期待されているサイトカインである。しかし治験においては2壁性や3壁性の骨欠損を対象としており1壁性や水平性骨欠損などの大きな骨欠損への応用には改善の余地が残っている。ヒト歯根膜由来間葉系細胞群 (HPDL細胞群) に対するFGF-2の作用については様々な報告があり、主に血管内皮細胞や未分化間葉系細胞の増殖と分化を促し、血管新生を促進させると報告されている (Nugent & Iozzo, 2000; Takayama et al., 1997)。また、FGF-2は歯根膜由来未分化間葉系細胞の基質形成や前骨芽細胞などの未成熟な細胞に対して硬組織形成を抑制すると考えられている (Debiais et al., 1998; Takayama et al., 1997)。一方、BMP-2は骨、軟骨の発生と維持に深く関与しており、それ以外にも多彩な生理活性を有しているタンパク質である。その働きは主に異所性の骨誘導能であると報告されており、未分化間葉系細胞・前骨芽細胞から骨芽細胞への分化や骨芽細胞の増殖を促進させたと報告されている (Campbell & Kaplan, 1992; Ripamonti & Reddi, 1994; Urist, 1965)。歯科領域においては、rhBMP-2と吸収性コラーゲンスポンジキャリアとの組み合わせが海外で現在市販されており、サイナスリフトやインプラントのための骨増大に

用されている。BMP-2はHPDL細胞群に対して骨芽細胞への分化および骨の形成を促進する作用を有し、ALP活性を上昇させることが報告されている (Kobayashi et al., 1999)。これまでにShiraiらは、株化したブタ歯根膜由来間葉系細胞にFGF-2及びBMP-2が与える影響を検討し、ブタ歯根膜由来間葉系細胞はBMP-2刺激により石灰化物を形成するだけでなく、FGF-2の刺激により管腔様構造を構築したこと、FGF-2はBMP-2の誘導する石灰化物の形成を抑制し、反対にBMP-2はFGF-2の誘導する管腔様構造の形成を抑制したことを報告している (Shirai et al., 2009)。*In vivo*におけるFGF-2 + BMP-2の相互作用に関する報告として、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMMSCs)、FGF-2 + BMP-2を併用することで骨密度が上昇したことが報告されている (Akita et al., 2004)。しかし、HPDL細胞群に対するFGF-2及びBMP-2の相互作用に関する報告はない。これまで、歯周組織再生療法に用いられてきた移植材としては、自家骨あるいは骨補填剤がある。自家骨は骨採取における侵襲、骨採取量の制限などの課題が残されており、骨補填剤は非吸収性であることが多く、生体内で永久に残存し感染源になりうることなど改善する余地が残っている。そこで今回の研究では、拒絶反応のない自己組織由来材料であり、利用されることなく捨てられているヒト抜去歯象牙質の再利用に着目し、担体としてDDMを用いた。また、Shiraiらの*in vitro*の研究結果に基づき、HPDL細胞群に対してFGF-2及びBMP-2を併用すると血管新生や骨新生が促進するとの仮説を立て、担体とHPDL細胞群からなる埋植体を製作し、そこにFGF-2、BMP-2およびその併用を添加しヌードマウス背部皮下に移植することによって組織再生、特に血管組織形成や骨様組織形成にどのような影響を及ぼすかを検討した。

## 材料と方法

### 1. 実験動物と飼育

実験動物は4週齢の雄性ヌードマウス (BALB/c Slc-nu体重: 約20 g) を1週間の検疫期間をおき、実験に使用した。室温平均24°C、明暗12時間周期のもとで固形飼料と水を自由に与えて飼育した。本研究は北海道医療大学動物実験の承認 (承認番号: 第014号) を得て行った。

### 2. HPDL細胞群の採取

HPDL細胞群は北海道医療大学歯科内科クリニックを受診した患者において、治療上抜歯が必要と判断し抜去した3人の患者の3本の歯の歯根膜組織からoutgrowth

法にて増殖させ (Nagatomo et al., 2006), 3細胞群を採取し, それぞれHPDL 1, HPDL 2, HPDL 3とした. 歯根膜組織はNo. 11メスを用いて各抜去歯の歯根中央1/3から採取し, I型コラーゲンコート培養ディッシュ上で10%ウシ胎児血清 (FBS, Valley Biomedical), 2 mM L-グルタミン (Invitrogen), 200  $\mu$ g/mlカナマイシン (Sigma-Aldrich), 100  $\mu$ g/mlペニシリン・ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich), 5  $\mu$ g/mlアムホテリシン B (Sigma-Aldrich) 含有DMEM培地 (Sigma-Aldrich) をbiopsy mediumとして用い24時間培養した. その後得られたHPDL細胞群は, growth mediumとして10%FBS, 2 mM L-グルタミン, 200  $\mu$ g/mlカナマイシン含有DMEM培地を用いて5代継代培養後, 歯根膜特異的遺伝子であるPLAP-1, periostinの発現を確認して埋植実験に使用した. 全ての培養は37°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で行った.

### 3. ヒト凍結乾燥脱灰象牙質顆粒の製作

ヒト凍結乾燥脱灰象牙質の製作は, 村田らの方法に従った (村田ら, 2003). すなわち, 修復・補綴物, 根管充填物や齲蝕のないヒト抜去歯を低温骨粉碎機 (NS-101, 岡田鉄工所) で液体窒素冷却下にて粉碎し, 完全脱灰12時間 (2% HNO<sub>3</sub>, pH2.0), 洗浄60分 (冷蒸留水), 凍結乾燥を12時間行い, 凍結乾燥脱灰象牙質顆粒 (Demineralized Dentin Matrix: DDM) として用いた. その後, DDMは粒径0.4~0.8 mmサイズの篩にかけて回収した.

### 4. 成長因子

成長因子として, リコンビナントヒトBMP-2 (R&D Systems), リコンビナントヒトFGF-2 (科研製薬) を使用した. 溶媒としてPBSを用い, Shiraiらの報告 (Shirai et al., 2009) を参考にしてFGF-2溶液は2  $\mu$ g/site, BMP-2溶液は5  $\mu$ g/siteとなるように調整した.

### 5. 埋植体の調整

埋植体には, 担体としてDDM (20 mg/site) を用い, 移植する細胞としてHPDL 1, HPDL 2, HPDL 3のそれぞれを用い, 無細胞群も設定した. 成長因子の付与には, ①無添加群, ②FGF-2群, ③BMP-2群, ④FGF-2+BMP-2併用群の4条件を設定した. 埋植体として, DDMと3つのHPDL細胞群および無細胞群からなる4群に4条件の成長因子を付与することによって, 16条件の埋植体を調整した. 埋植体の調整は埋植直前に行った.

### 6. 埋植体の皮下埋植法

皮下埋植は, 村田らの方法に従った (村田ら, 2003). すなわち, 滅菌注射用水で10倍希釈したPentobarbital sodium (NENBUTAL<sup>®</sup>, 大日本住友製薬) を8  $\mu$ l/g体重でヌードマウスの腹腔内に投与し, 全身麻酔を行った. その後, 背部両側にそれぞれ1カ所ずつ, 計2カ所に約10 mmの皮下切開を加えて, 皮下結合組織を鈍的に剥離してポケットを形成し, 1条件あたり4カ所で計32匹64カ所埋植体を埋植した. 埋植体は切開創付近に後戻りしないよう切開創から十分な距離をとって埋植し, 創部はナイロン糸で2~3針縫合し, 抗生剤軟膏 (アクロマイシン<sup>®</sup>, ポーラファルマ) を塗布した.

表1 埋植体の条件

|                | 細胞     | FGF-2 | BMP-2 |
|----------------|--------|-------|-------|
| 無添加群           | HPDL 1 | -     | -     |
|                | HPDL 2 |       |       |
|                | HPDL 3 |       |       |
|                | 無細胞群   |       |       |
| FGF-2群         | HPDL 1 | +     | -     |
|                | HPDL 2 |       |       |
|                | HPDL 3 |       |       |
|                | 無細胞群   |       |       |
| BMP-2群         | HPDL 1 | -     | +     |
|                | HPDL 2 |       |       |
|                | HPDL 3 |       |       |
|                | 無細胞群   |       |       |
| FGF-2+BMP-2併用群 | HPDL 1 | +     | +     |
|                | HPDL 2 |       |       |
|                | HPDL 3 |       |       |
|                | 無細胞群   |       |       |

1条件あたり4カ所, DDM (20 mg/site) は全てに含まれる.  
HPDL細胞群: 1  $\times$  10<sup>7</sup>個/site  
FGF-2: 2  $\mu$ g/site BMP-2: 5  $\mu$ g/site

### 7. 薄切切片の作製

埋植4週後にエーテル吸入による深麻酔にて屠殺し, 埋植体を周囲結合組織とともに一塊として摘出し, 10%中性緩衝ホルマリン液に24時間浸漬固定した. 10% EDTA溶液中で脱灰した後, パラフィン包埋し, 厚さ3  $\mu$ mの切片を作製した.

### 8. Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)

移植したHPDL細胞が生着しているかを検討するために, HPDL 1, HPDL 2, HPDL 3および無細胞の成長因子無添加群からなる摘出試料を用い, 以下の実験を行った. 摘出した組織をISOGEN (Nippon gene) に浸漬, ホ

モジナイズし、全RNAを添付プロトコールに従い抽出した後、cDNAをcDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) を用いて合成した。PCRはTaq PCRコアキッット (Qiagen) を用いて60°C 25 cyclesにて行った。標的遺伝子としてヒトglyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) を用いforward/reverseプライマー (5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3'/5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'; NM002046) を作製した。PCR反応産物は1.5% (w/v) アガロース (Sigma-Aldrich) に電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、Light Capture (Atto) を用いて観察した。

### 9. 摘出した埋植体の組織学的観察と血管数・新生骨形成割合の分析

作製した薄切切片にヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-Eosin: H-E) 染色を施し、光学顕微鏡で組織学的観察後、1条件あたり無作為に5視野 (倍率100倍) を選び1視野当たりのDDM周囲に存在する血球を含む管腔状構造を血管としその数を計測した。また、同様に1条件あたり無作為に5視野を選び1視野当たりのDDM周囲に存在する新生骨の面積およびDDMの面積をImage J (NIH) にて計測後、新生骨形成割合 (新生骨の面積/DDMの面積) を算出した。

### 10. 統計解析

計測結果は平均値±標準偏差で表示し、Steel-Dwass法およびWilcoxonの順位和検定を用いて有意水準を0.05にて解析した。

今回の実験終了後、採取した細胞は廃棄し、遺伝子解析を行わないことで北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会の承認を得た (承認受付番号: 81号)。

## 結 果

### 1. 摘出した埋植体中におけるヒト由来細胞の存在: ヒトGAPDH mRNAの発現

摘出した組織中にHPDL細胞群由来のものが存在するかどうかを検討するためにヒトGAPDH mRNAの発現を調べた結果、HPDL 1, HPDL 2, HPDL 3の成長因子無添加群から摘出した組織の全てから、ヒトGAPDH mRNAの発現がみられた (図1A~C)。しかしDDMのみからなる無細胞群では、ヒトGAPDH mRNAの発現はみられなかった (図1D)。

### 2. 摘出した埋植体の組織学的所見

HPDL 1を含む埋植体埋植4週後のH-E組織像では、無添加群において弱拡大 (×100) でDDMの象牙細管の横断面が観察でき (図2A), 強拡大 (×400) ではDDM周囲には細胞が配列し薄い線維性膜で被包化されていた (図2B)。FGF-2群では、DDM周囲に血球を含む管腔様構造が多数みられた (図2CD)。しかし新たな骨の添加はほとんど認められなかった。BMP-2群では弱拡大でDDM表面に新生骨が添加性に形成されているのがみられ (図2E), 強拡大では骨細胞を含む新生骨が観察された (図2F)。FGF-2+BMP-2併用群では弱拡大でDDM表面に新生骨が添加性に形成されて、血球を含む管腔様構造も同時に観察された (図2G)。また、強拡大では血球を含む管腔様構造をとり囲むように新生骨の形成がみられた (図2H)。HPDL 2を含む埋植体では、HPDL 1の時と同様の所見がみられた。すなわち無添加群では血球を含む管腔様構造がみられたが、新生骨はみられなかった (図3AB)。FGF-2群では、多数の血球を含む管腔様構造をみる事ができた (図3CD)。BMP-2群ではDDM表面に添加性に新生骨の形成がみられた (図3EF)。FGF-2+BMP-2併用群では、血球を含む管腔様構造をとり囲むように新生骨の形成がみられた (図3GH)。HPDL 3を含む埋植体でもHPDL 1, HPDL 2とほぼ同様な所見がみられた (図4A~F)。しかし、FGF-2+BMP-2併用群において血球を含む管腔様構造はみられたが、新生骨の形成はみられなかった (図4GH)。無細胞埋植体では、無添加群で血球を含む管腔様構造がみられるが、新生骨はみられなかった (図5AB)。FGF-2群では、DDM周囲や内部に血球を含む管腔様構造がみられた (図5CD)。BMP-2群では、DDM表面に添加性に新生骨の形成がみられた (図5EF)。FGF-2+BMP-2併用群において血球を含む管腔様構造はみられたが、新生骨の形成はみられなかった (図5GH)。

### 3. 血管および新生骨の分析観察

摘出された組織中の血管数と新生骨形成割合をH-E染色切片上で画像解析により算出した (図6, 7)。

#### 1) 血管の分析観察

HPDL細胞群を含む埋植体では、1視野 (倍率100倍) 当たりのDDM周囲に存在する血管数は、FGF-2群では $16.01 \pm 8.30$ 個/視野で、FGF-2+BMP-2併用群では $15.28 \pm 9.05$ 個/視野であり、これら両群と無添加群 ( $6.28 \pm 4.55$ 個/視野) およびBMP-2群 ( $6.68 \pm 5.72$ 個/視野) との間に統計学的な有意差を認めた ( $p < 0.05$ ,



図1 RT-PCR :

A : HPDL 1 B : HPDL 2 C : HPDL 3 D : 細胞なし

HPDL細胞群を含む埋植体を埋植した組織からはヒトGAPDHの発現がみられ, HPDL細胞群を含まない埋植体を埋植した組織からはヒトGAPDHの発現がみられなかった。

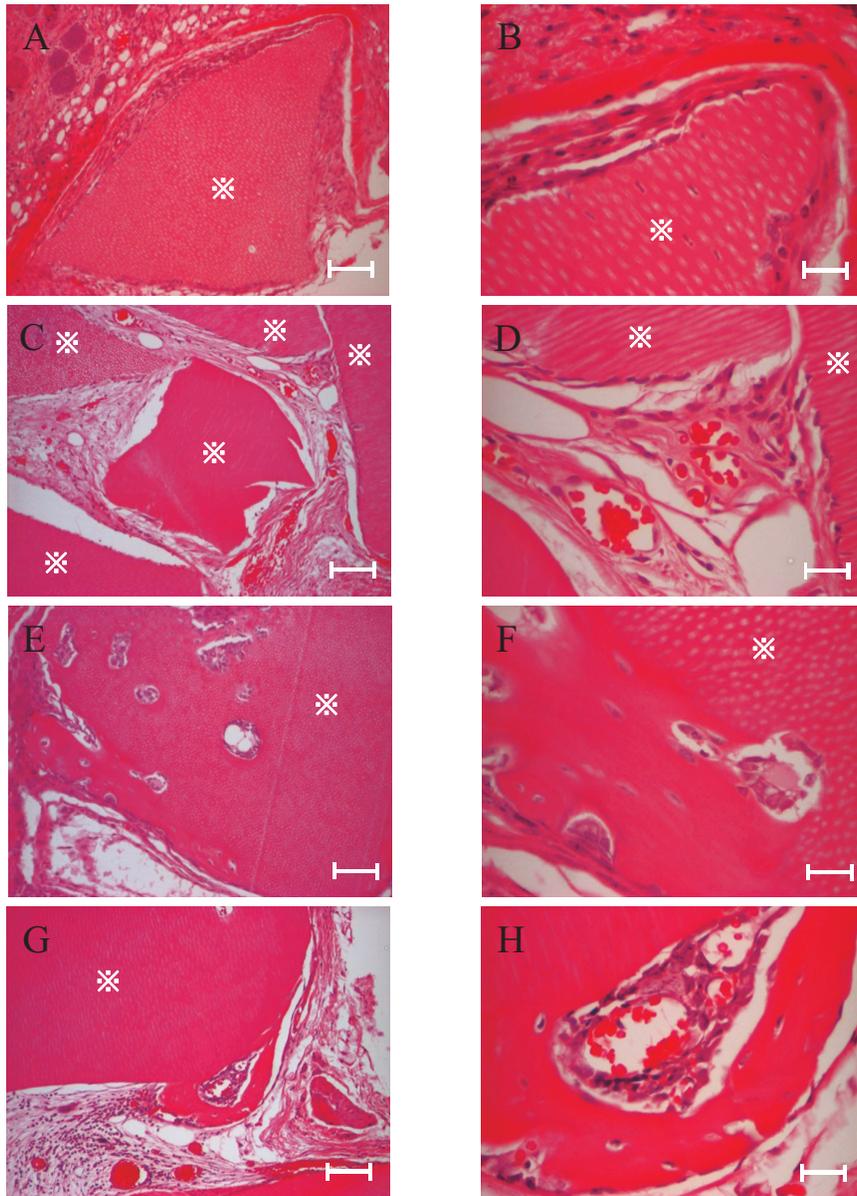


図2 HPDL 1 を含む埋植体埋植 4 週後のH-E組織像 :

A : 無添加群, 弱拡大 ( $\times 100$ , bar : 100  $\mu\text{m}$ ). DDM (\*) の象牙細管の横断面がみられる。

B : 無添加群, 強拡大 ( $\times 400$ , bar : 25  $\mu\text{m}$ ). DDM 周りには細胞の配列, 及び薄い線維性膜で被包化されていることがみられる。

C : FGF-2群, 弱拡大 ( $\times 100$ , bar : 100  $\mu\text{m}$ ). DDM 周囲に血球を含む管腔様構造が多数みられる。

D : FGF-2群, 強拡大 ( $\times 400$ , bar : 25  $\mu\text{m}$ ). DDM 周囲に血球を含む管腔様構造がみられる。

E : BMP-2群, 弱拡大 ( $\times 100$ , bar : 100  $\mu\text{m}$ ). DDM 表面に新生骨が添加性に形成されている。

F : BMP-2群, 強拡大 ( $\times 400$ , bar : 25  $\mu\text{m}$ ). 骨細胞を含む新生骨がみられる。

G : FGF-2 + BMP-2併用群, 弱拡大 ( $\times 100$ , bar : 100  $\mu\text{m}$ ). DDM 表面に新生骨が添加性に形成されている。

H : FGF-2 + BMP-2併用群, 強拡大 ( $\times 400$ , bar : 25  $\mu\text{m}$ ). 血球を含む管腔様構造をとり囲むように新生骨の形成がみられる。

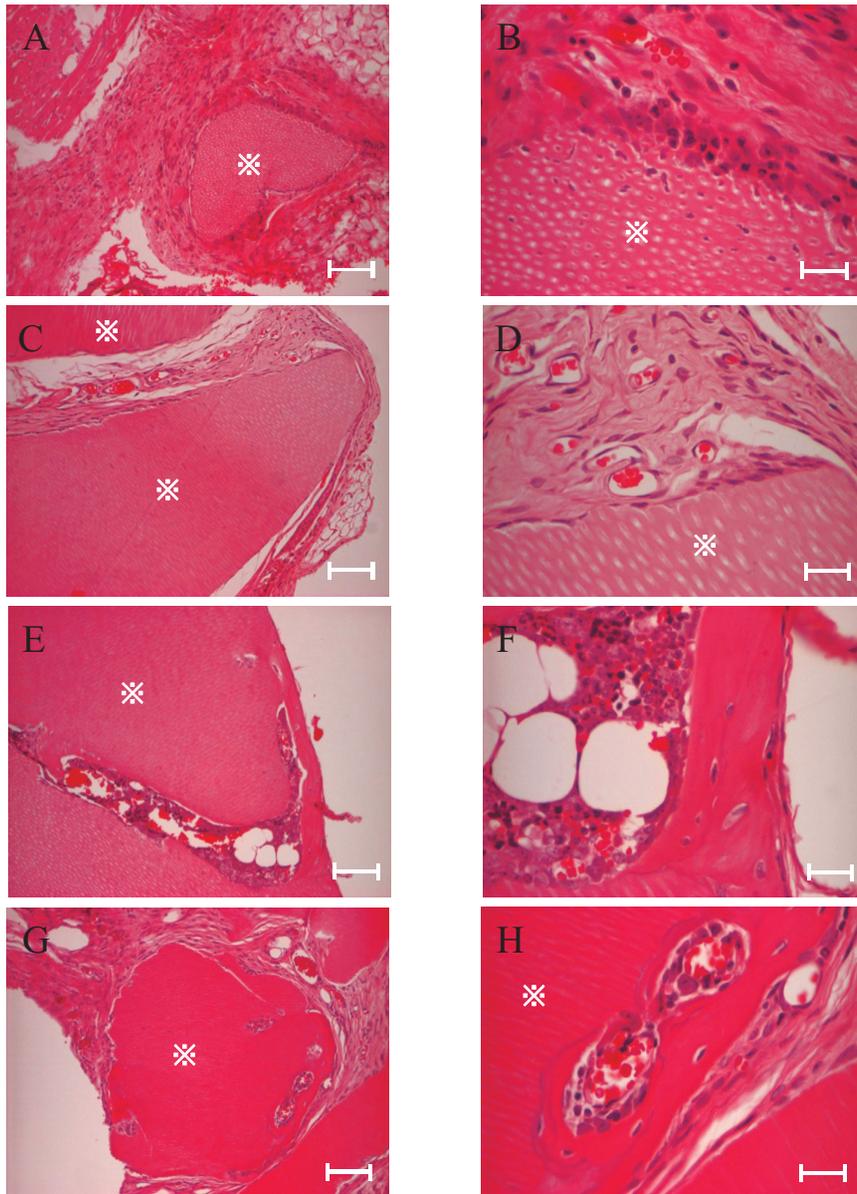


図3 HPDL 2 を含む埋植体埋植 4 週後のH-E組織像：

- A：無添加群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM（※）の象牙細管の横断面がみられる。  
 B：無添加群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲には細胞の配列，及び薄い線維性膜で被包化されていることがみられる。  
 C：FGF-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造が多数みられる。  
 D：FGF-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる。  
 E：BMP-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM表面に新生骨が添加性に形成されている。  
 F：BMP-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．骨細胞を含む新生骨がみられる。  
 G：FGF-2+BMP-2併用群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM表面に新生骨が添加性に形成されている。  
 H：FGF-2+BMP-2併用群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．血球を含む管腔様構造をとり囲むように新生骨の形成がみられる。

図6)．一方で，無細胞埋植体では，血管数はFGF-2群で $22.85 \pm 7.43$ 個/視野であり，無添加群（ $5.65 \pm 3.70$ 個/視野）およびBMP-2群（ $5.95 \pm 4.64$ 個/視野）との間に統計学的な有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）．さらに，FGF-2+BMP-2併用群では $15.75 \pm 9.36$ 個/視野であり，無添加群，BMP-2群との間に統計学的な有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）．また，FGF-2群はHPDL細胞群を含む群より無細胞

群で統計学的に有意に大きな値を示した．

## 2) 新生骨の分析観察

HPDL細胞群を含む埋植体では，1視野（倍率100倍）当たりのDDM周囲に存在する新生骨形成割合は，BMP-2群では $0.036 \pm 0.069$ であり，この値は他群と比較して有意に高かった（ $p < 0.05$ ）．またFGF-2+BMP-2併

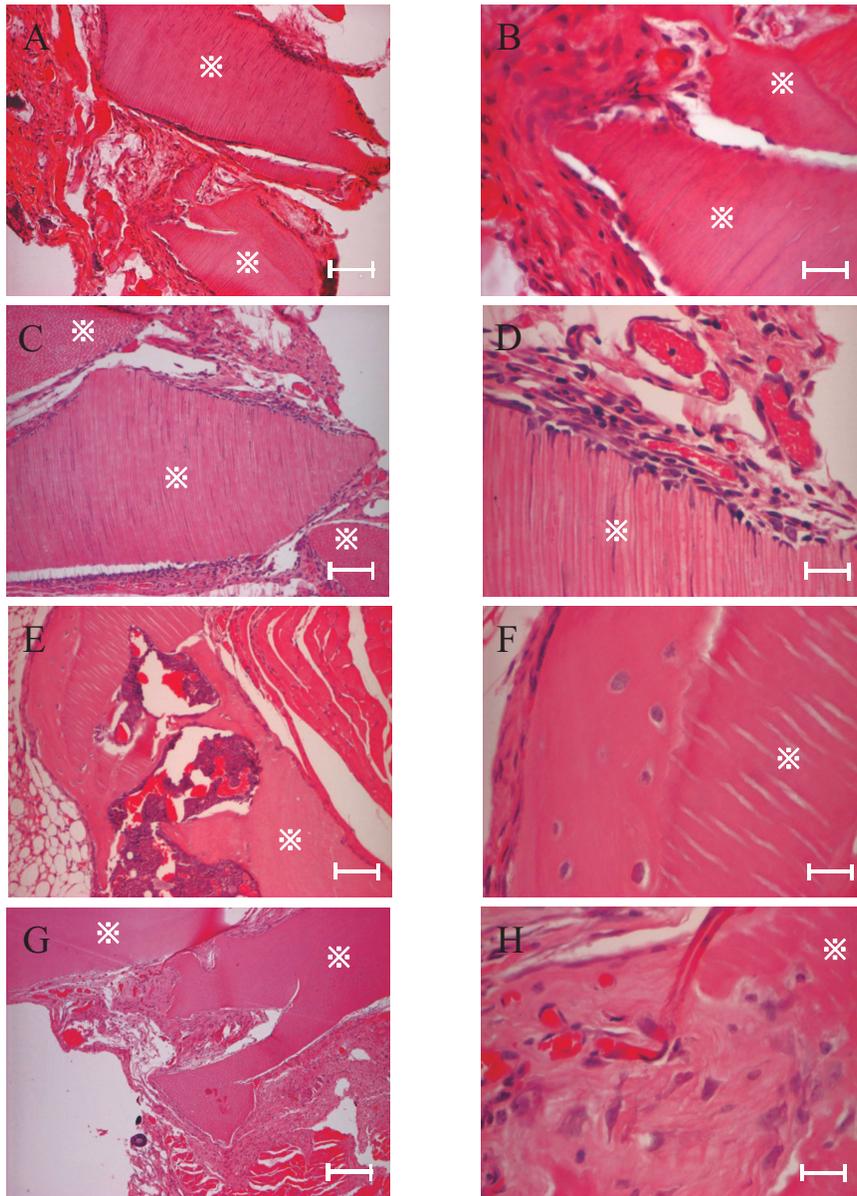


図4 HPDL 3を含む埋植体埋植4週後のH-E組織像：

A：無添加群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM（\*）の象牙細管の縦断面がみられる．

B：無添加群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲には細胞の配列，及び薄い線維性膜で被包化されていることがみられる．

C：FGF-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造が多数みられる．

D：FGF-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる．

E：BMP-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM表面に新生骨が添加性に形成されている．

F：BMP-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．骨細胞を含む新生骨がみられる．

G：FGF-2+BMP-2併用群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる．

H：FGF-2+BMP-2併用群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．血球を含む管腔様構造が確認できるが新生骨の形成はみられない．

用群では $0.009 \pm 0.029$ であり，これは無添加群と比較して有意に高い値を示した（ $p < 0.05$ ，図7）．一方で，無細胞群では，1視野（倍率100倍）当たりのDDM周囲に存在する新生骨形成割合はBMP-2群で高い傾向にあったが，無添加群，FGF-2群およびFGF-2+BMP-2併用群との間には有意な差は認めなかった．また，BMP-2群ではHPDL細胞群を含む群は無細胞群よりも統計学的に有意

に大きな値を示した（ $p < 0.05$ ）．

## 考 察

これまで歯周組織再生療法に用いられてきた移植材は，自家骨あるいはリン酸カルシウム系セラミックなどの無細胞性生体材料である（Block & Kent, 1985）．自家骨には，骨採取における健常組織への侵襲，患者の精神

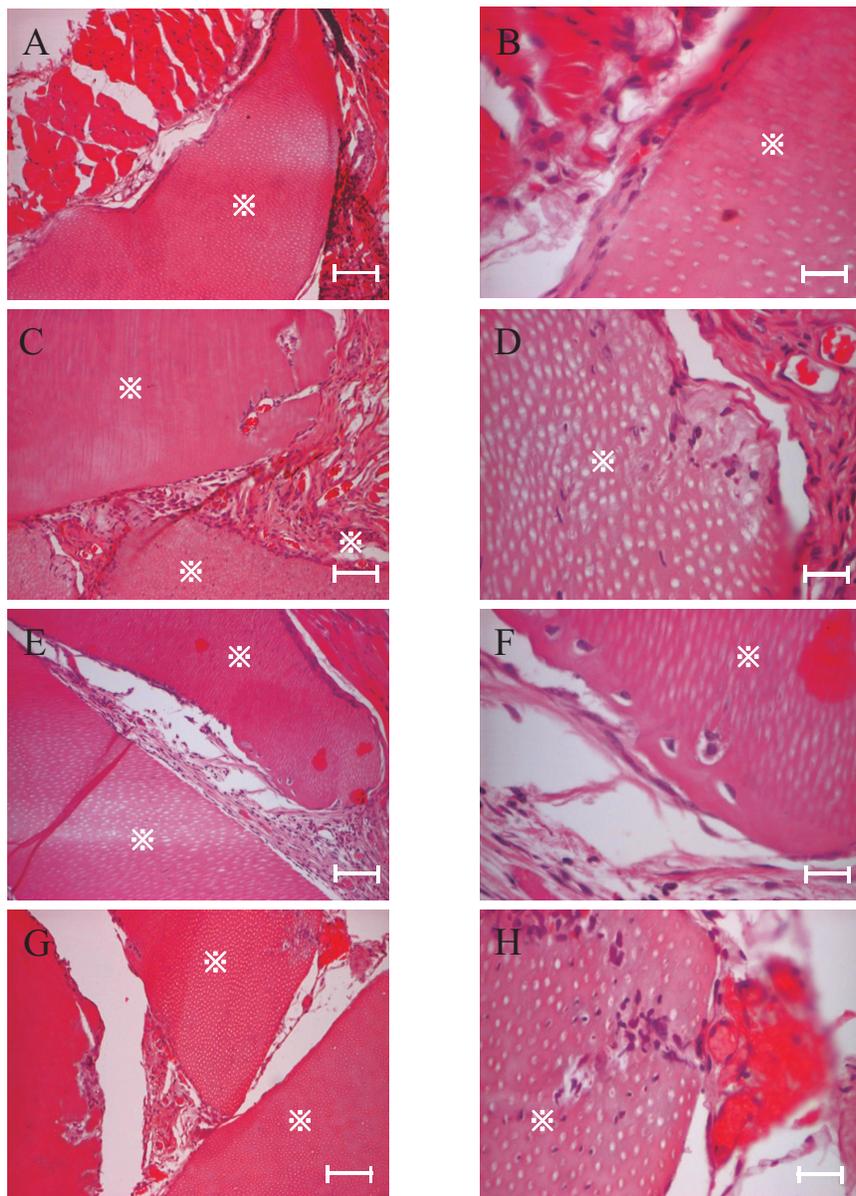


図5 HPDL細胞群を含まない埋植体埋植4週後のH-E組織像：

A：無添加群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM（※）の象牙細管の横断面がみられる．

B：無添加群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲には細胞の配列，及び薄い線維性膜で被包化されていることがみられる．

C：FGF-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲や内部に血球を含む管腔様構造がみられる．

D：FGF-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる．

E：BMP-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM表面に新生骨が添加性に形成されている．

F：BMP-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．骨細胞を含む新生骨がみられる．

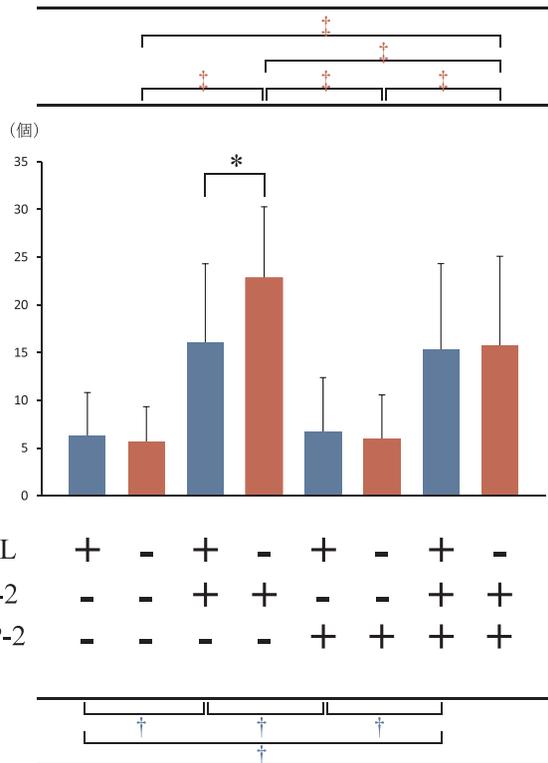
G：FGF-2+BMP-2併用群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる．

H：FGF-2+BMP-2併用群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．血球を含む管腔様構造が確認できるが新生骨の形成はみられない．

的身体的負担過多，骨採取量や形態の制限などの課題が残されている（Block & Kent, 1985）．また無細胞性生体材料では主にハイドロキシアパタイトが組織親和性と骨伝導能を有することから骨補填材として広く用いられている（島田ら，1989；小笠原ら，2000）．しかしながら，それらの骨補填材は非吸収性であるため，生体内で永久に残存し感染源になりうることや，骨誘導能を有さ

ないため，早期の骨増生は望めず，患者の時間的負担過多になりやすい．そこで利用されることなく捨てられているヒト抜去歯象牙質の再利用に着目し，本研究では担体としてDDMを用いた．

今回の研究では，担体とHPDL細胞群からなる埋植体を製作し，そこにFGF-2，BMP-2およびその併用を添加しヌードマウス背部皮下に移植した．背部皮下では骨形

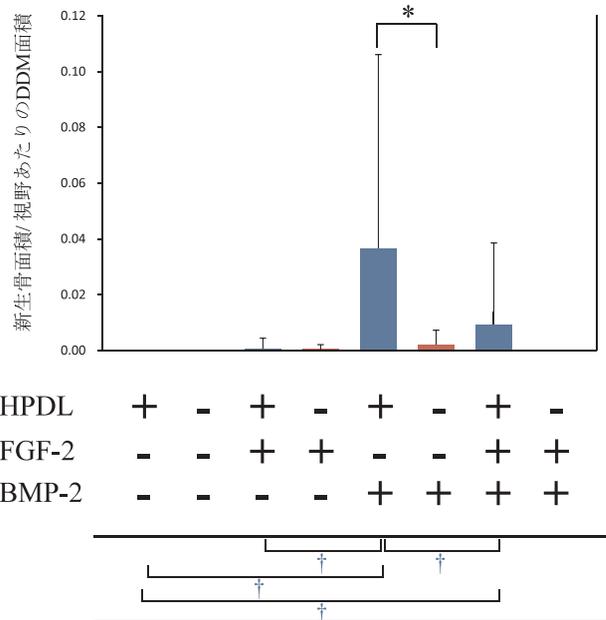


**図6** 血管数  
測定値は平均±標準偏差 (n = 4) で表示している。  
青：HPDL細胞群を含む群 赤：無細胞群  
同色の異なるアルファベット間に統計学的有意差を認める (Steel-Dwass法：p<0.05)。  
\*は有意水準0.05以下をもって有意差ある群間を示す (Wilcoxonの順位和検定)。

成に関与する細胞が少ないため、新生骨形成は埋植体の効果によるものと考えられる。今回の研究では埋植体におけるサイトカインの効果を検討するために背部皮下に埋植実験を行った。

本研究では移植したHPDL細胞が組織に生着しているかを検討した。RT-PCRの結果、HPDL 1, HPDL 2, HPDL 3の成長因子無添加群による埋植体から、ヒトGAPDH mRNAの発現が確認された(図1A~C)が、無細胞無添加群ではGAPDH mRNAの発現が認められなかった(図1D)。このことより、ヌードマウス背部皮下に移植したHPDL細胞群が生着し組織形成に関与したことが考えられる。GAPDH mRNAの発現において細胞群間に強弱があったことから、摘出した組織に存在したHPDL細胞群の量に差があることがわかる。一方、骨形成量に差はなかった。このことから、埋植したHPDL細胞群は骨以外の組織の形成にも関与した可能性が考えられる。

無細胞無添加群とHPDL細胞群を含む無添加群では、ともに新生骨はみられず血管数も同程度であった。このことから、異所性にHPDL細胞群を移植しても血管新生や骨新生を促進しないということが考えられる。背部皮



**図7** 新生骨形成割合：  
測定値は平均±標準偏差 (n = 4) で表示している。  
青：HPDL細胞群を含む群 赤：無細胞群  
違う条件間における異なるアルファベット間に統計学的有意差を認める (Steel-Dwass法：p<0.05)。  
\*は有意水準0.05以下をもって有意差ある群間を示す (Wilcoxonの順位和検定)。

下にDDM単独を埋植して4週後に新生骨が観察されたという報告 (Murata et al., 2010) もあるが、32週間観察しても骨誘導は認められなかった (佐藤ら, 2002), あるいは3週間の観察期間中での新生骨の形成量にバラつきが大きかった (Ike et al., 1998) とも報告されている。本研究においてもこれらの研究と一致するように無添加群では新生骨形成がみられなかった。DDM単独における新生骨形成に関してはさらなる検討が必要と思われる。

無細胞群において比較すると、FGF-2群は無添加群、BMP-2群およびFGF-2+BMP-2併用群よりもより多くの血管がみられ、さらに、FGF-2+BMP-2併用群では無添加群とBMP-2群よりも多く血管がみられた。HPDL細胞群を含むFGF-2群、FGF-2+BMP-2併用群はそれぞれ無添加群、BMP-2群と比較して有意に多くの血管がみられた。FGF-2は歯根膜由来間葉系細胞に対して管腔形成促進作用があり (Shirai et al., 2009), FGF-2は創傷治癒過程において皮膚に対して血管新生を促進する働きがある (Tsuboi et al., 1990) と報告されている。このことから本研究ではFGF-2を含む埋植体の働きによりhost由来、donor由来細胞両方に対して血管の形成を促すことによ

り血管数の増加に関与したことが考えられる。血管新生は組織再生に重要であるため、FGF-2による血管数の増加は歯周組織再生に有効であると考えられる。また、FGF-2群においてHPDL細胞群を含む群と無細胞群を比較すると、無細胞群の方が有意に多く血管がみられた。FGF-2はHPDL細胞群に対して作用するよりもヌードマウス背部皮下の場の細胞に働きかけた方が効果的に血管数は増加することが考えられる。BMP-2群ではHPDL細胞群の有無に関わらず血管数は同程度であり、無添加群と比較しても有意差は認めなかった。無細胞群についてFGF-2 + BMP-2群とFGF-2群とを比較すると、FGF-2とBMP-2を併用した場合の宿主細胞による血管新生はFGF-2単独で添加した場合より減少している。このことはShiraiらの結果と同様であり、BMP-2がFGF-2の血管新生の働きを抑制したと考えられる。一方、HPDL細胞群を含むFGF-2 + BMP-2併用群ではHPDL細胞群を含むFGF-2群と比較して血管数は減少しなかった。このことはHPDL細胞群を含むFGF-2 + BMP-2併用群では新生骨が形成され、さらに図2 GH, 3 GHにみられるような硬組織形成に伴う血管新生が生じたことによると考えられる。骨再生に先だって血管新生が起こることが報告されている(岸ら, 2001)ことから、創傷治癒の過程で生じる血管新生はその後の組織再生にとって重要な最初のステップであると考えられる。

骨新生についてみると、無細胞群では、BMP-2群はわずかに新生骨の形成を認めたが、無添加群、FGF-2群およびFGF-2 + BMP-2併用群との間に有意差はみられなかった。また、FGF-2 + BMP-2併用群でもほとんど新生骨の形成がみられなかった。一方、HPDL細胞群を含む4群のうち、BMP-2群は他群と比較して有意に高い新生骨形成割合を示した。また、FGF-2 + BMP-2併用群における新生骨形成割合は無添加群と比較して有意に高い値を示したが、BMP-2群より有意に低い値を示した。Debiaisらの研究によると、FGF-2はヒト頭蓋由来細胞に作用させると、未分化な状態では細胞増殖を促進し分化を抑制するが、分化が進んだ状態では細胞増殖促進効果はなかったとの報告がある(Debiais et al., 1998)。このことから、今回の研究ではBMP-2はHPDL細胞群中に存在する未分化間葉系細胞と骨芽細胞に対して作用し骨分化を促したが、FGF-2 + BMP-2の併用群ではFGF-2が未分化間葉系細胞に対して作用し、BMP-2の骨芽細胞への分化および骨形成促進作用を抑制したのと考えられる。FGF-2群では、HPDL細胞群の有無に関わらず新生骨はほとんどみられなかった。BMP-2群では、新生骨形成割合は無細胞群よりもHPDL細胞群を含む群で統計学

的に有意に高い値を示した。ヌードマウスの背部皮下には骨系の細胞が少ないためBMP-2による骨芽細胞への分化および骨形成の促進効果が小さかったが、HPDL細胞群中には骨芽細胞や骨芽細胞に分化しうる未分化間葉系細胞など様々な細胞を含むとされており(Seo et al., 2004; Hidaka et al., 2012)、BMP-2による骨分化促進効果が際立って出現したと考えられる。FGF-2 + BMP-2併用群では、HPDL細胞群を含む群が無細胞群より高い新生骨形成割合の傾向を示した。これは使用したりコンピナントBMP-2がヒト由来であることに起因しているかもしれない。

現在、歯周治療において行われるフラップ手術による原因除去療法では、炎症状態に陥った歯周組織に治癒を促すことは可能であるが、歯周組織の再生はほとんど望むことはできない。そこで、組織再生誘導法(GTR法)(Nyman et al., 1982)やエムドゲイン®療法(Heijl, 1997)が開発され、それまでの原因除去療法に比べ、歯周組織の再生において一定の成績をあげている(Murphy & Gunsolley, 2003; Tonetti et al., 2002)。しかし、GTR法やエムドゲイン®療法は組織内の細胞に働いて再生を導いているために、広範囲な歯周組織欠損においては組織再生に十分な細胞の遊走や増殖が困難である。そのため、これらの歯周組織再生療法では部分的な再生しか期待できないことから、適応症が限られているのが現状である。また、これまでに歯周組織欠損の残存骨壁数は歯周治療の予後に大きく関係しており3壁性の骨欠損は組織再生能が高く、1壁性や2壁性の骨欠損は組織再生能が低いと報告されている(Kim CS et al., 2004)。そこで、近年の生体組織工学を用いた手法に注目が集まり、特にサイトカイン療法にかかる期待は大きい。しかしながら、骨が再生しにくいと考えられる1壁性や2壁性骨欠損、さらには水平性骨欠損にサイトカイン療法を用いた研究は僅かである。Saitoらはビーグル犬の歯周組織における水平性骨欠損に対してBMP-2を用いて骨形成が増大したと報告している(Saito et al., 2003)。一方、Kinoshitaらは12匹のビーグル犬に水平性骨欠損を人工的に作製し、rhBMP-2を投与したところ、歯周組織の再生が認められたが、骨の再生量は平均0.68mmであったと報告しており(Kinoshita et al., 1997)、期待されたより骨の再生量は少なく、得られた骨再生がBMPの作用によるものか否かの判断が困難であると思われる。Murakamiらの実験(Murakami et al., 1999; 村上 et al., 2000)においても、実験的に作製されたモデルはFGF-2を用いなくても比較的再生が生じやすいと考えられる3壁性の骨欠損であった。これらの実験結果から歯周組織

再生には、成長因子の種類と同様に骨欠損形態が影響を及ぼしているものと考えられ、このことが歯周組織再生にとって不利な条件を作り出しているものとする。そこで本研究では、より複雑で大きな歯周組織欠損の再生を目的とし血管新生に重要なFGF-2と骨誘導能を有するBMP-2の併用に注目した。これまでにヒト間葉系幹細胞(hMSCs)を用いてFGF-2+BMP-2を併用すると、hMSCsのみ、hMSCs+FGF-2あるいはhMSCs+BMP-2と比較して有意にALP陽性細胞数が増加したと報告されている(Akita et al., 2004)。さらに、*in vivo*でヌードラットの頭蓋骨欠損モデルを用いてFGF-2+BMP-2の併用効果を検討したところ、埋植2週で最も骨形成が促進され、PBSを用いた群、hMSCs群と比較して有意に骨形成量が増加したと報告されている(Akita et al., 2004)。また、ウサギの脊椎固定にウサギのBMMSCs、FGF-2+BMP-2を併用すると、BMMSCsのみと比較して有意に高い成功率を示し、BMMSCs+FGF-2、BMMSCs+BMP-2と比較してもその成功率に高い傾向があることが示されている(Minamide et al., 2007)。

今回の研究では、担体のみと比較してHPDL細胞群を含むFGF-2及びBMP-2の併用群における血管数、新生骨形成の増加がみられた。さらにHPDL細胞群を含むFGF-2及びBMP-2併用群では、組織像において内部に新生血管を含む骨新生が特徴的にみられた。以上のことからHPDL細胞群を含むFGF-2及びBMP-2の併用による移植は組織再生に有用である可能性が示された。

## 結 論

FGF-2、BMP-2およびその併用がHPDL細胞群において血管組織形成や骨様組織形成に及ぼす影響を検討し、以下の結果を得た。

1. HPDL細胞群を含む埋植体を埋植すると摘出した組織からヒトGAPDH mRNAの発現を認め、移植したHPDL細胞群が生着していることが確認できた。

2. HPDL細胞群の有無に関わらずFGF-2群では無添加群、BMP-2群と比較して有意に多くの血管がみられたが新生骨形成はみられなかった。さらにFGF-2群では、無細胞群はHPDL細胞群を含む群よりも有意に多くの血管が観察された。

3. HPDL細胞群を含むBMP-2群では無添加群、FGF-2群およびFGF-2+BMP-2併用群と比較して有意に新生骨形成割合が増加した。さらに、HPDL細胞群を含むBMP-

-2群では、無細胞BMP-2群と比較して有意に新生骨形成割合が増加していたが、血管数には差を認めなかった。

4. HPDL細胞群を含むFGF-2+BMP-2併用群では、血管数は無添加群やBMP-2群と比較して有意に増加した。またFGF-2群と比較しても同程度の血管数であった。一方、同様の条件において、新生骨形成割合はBMP-2群と比較して有意に減少したものの、HPDL細胞群を含む無添加群と比較すると有意に増加した。HPDL 1、HPDL 2を含むFGF-2+BMP-2併用群では血管を取り囲むように新生骨の形成がみられた。

以上の事から本研究によりヒト歯根膜細胞群にFGF-2とBMP-2を併用添加すると、担体のみと比較して血管および骨形成を増加させ、内部に新生血管を含む骨新生が形成されることが示された。また増加した血管および骨形成はヒト歯根膜細胞群に由来する可能性が示唆された。本研究の知見を基に大型動物を用いて、歯根膜細胞群の移植とFGF-2及びBMP-2添加が歯周組織再生に及ぼす効果について検索を行っていく予定である。

## 文 献

- Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T & Akino K. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound Repair Regen* 12 : 252-259, 2004.
- Block MS & Kent JN. Healing of mandibular ridge augmentations using hydroxylapatite with and without autogenous bone in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 43 : 3-7, 1985.
- Campbell JT & Kaplan FS. The role of morphogens in endochondral ossification. *Calcif Tissue Int* 50 : 283-289, 1992.
- Debiais F, Hott M, Graulet AM & Marie PJ. The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J Bone Miner Res* 13 : 645-654, 1998.
- Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J & Fujii DK. Effect of retina-derived basic and acidic fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of retina-derived capillary endothelial cells. *Exp Eye Res* 43 : 459-476, 1986.
- Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report.

- J Clin Periodontol 24 : 693-696, 1997.
- Hidaka T, Nagasawa T, Shirai K, Kado T & Furuichi Y. FGF-2 induces proliferation of human periodontal ligament cells and maintains differentiation potentials of STRO-1+/CD146+periodontal ligament cells. Archs Oral Biol, 2012, in press.
- Ike M, Marshall R & Urist M.D. Recycled dentin root matrix for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein J. Oral Implantol 24 : 124-132, 1998.
- Kim CS, Choi SH, Chai JK, Cho KS, Moon IS, Wikesjo UM & Kim CK. Periodontal repair in surgically created intrabony defects in dogs : influence of the number of bone walls on healing response. J Periodontol 75 : 229-35, 2004.
- 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.
- 岸好彰, 高橋好文, 東分吉, 松尾雅斗, 高橋和人, 長谷川二郎. 咬合機能下におけるインプラント界面骨と微小循環. 日本歯周病学会誌 43 : 43-51, 2001.
- 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, Hirofujii 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.
- Kobayashi M, Takiguchi T, Suzuki R, Yamaguchi A, Deguchi K, Shionome M, Miyazawa Y, Nishihara T, Nagumo M & Hasegawa K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. J Dent Res 78 : 1624-1633, 1999.
- Langer R & Vacanti JP. Tissue engineering. Science 260 : 920-926, 1993.
- Ledoux D, Gannoun-Zaki L & Barritault D. Interactions of FGFs with target cells. Prog Growth Factor Res 4 : 107-120, 1992.
- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol 47 : 256-260, 1976.
- Minamide A, Yoshida M, Kawakami M & Okada M, Enyo Y, Hashizume H & Scott D Boden. The effects of bone morphogenetic protein and basic fibroblast growth factor on cultured mesenchymal stem cells for spine fusion. Spine (Phila Pa1976) 32 : 1067-1071, 2007.
- Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T & Okada H. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. J Periodontal Res 34 : 425-430, 1999.
- 村上伸也, 高山真一, 岡田宏. 【21世紀を担う研究者の動向】 歯周組織再生をめざして 塩基性線維芽細胞増殖因子を応用した治療法の開発. 生体材料 18 : 186-193, 2000.
- 村田勝, 佐藤大介, 赤澤敏之, 平敏夫, 佐々木智也, 有末眞. ノードマウスにおけるヒト脱灰象牙質顆粒の骨・軟骨誘導. Journal of Hard Tissue Biology 11 : 110-114, 2003.
- Murata M, Akazawa T, Takahata M, Ito M, Tazaki J, Hino J, Nakamura K, Iwasaki N, Shibata T & Arisue M Bone induction of human tooth and bone crushed by newly developed automatic mill. J. Ceram. Soc. Japan 118 : 434-437, 2010.
- Murphy KG & Gunsolley JC. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. Ann Periodontol 8 : 266-302, 2003.
- Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S Muneta T & Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. J Periodontal Res 41 : 303-310, 2006.
- Nugent MA & Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. Int J Biochem Cell Biol 32 : 115-120, 2000.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T & Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol 9 : 290-296, 1982.
- 小笠原健文, 五百蔵一男, 野村篤, 藤原寿彦, 阿多史雄, 神田禎則, 白川正順. アパタイトブロック長期填入例のCTによる検討. 日本口腔インプラント学会誌 13 : 180, 2000.
- Ripamonti U & Reddi AH. Periodontal regeneration : potential role of bone morphogenetic proteins. J Periodontal Res 29 : 225-235, 1994.
- Saito E, Saito A & Kawanami M. Favorable healing following space creation in rh-BMP-2-induced periodontal regeneration of horizontal circumferential defects in dogs with experimental periodontitis. J Periodontol 74 : 1808-

1815, 2003.

佐藤大介, 村田勝, 佐々木智也, 赤澤敏之, 有末眞.  
ヒト脱灰象牙質/リコンビナントヒトBMP-2複合イン  
プラントによる骨誘導. 日本口腔インプラント学会誌  
15 : 403-411, 2002.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S,  
Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY & Shi S. In-  
vestigation of multipotent postnatal stem cells from hu-  
man periodontal ligament. Lancet 364 : 149-55, 2004.

島田勝弘, 陳明裕, 武宜昭. HAPとβ-TCPの骨伝導性  
および安定性に関する組織学的研究家兎脛骨骨髓腔内  
移植実験の長期観察結果について. 日本口腔インプラ  
ント学会誌 2 : 236-243, 1989.

Shirai K, Ishisaki A, Kaku T, Tamura M & Furuichi Y.  
Multipotency of clonal cells derived from swine periodon-  
tal ligament and differential regulation by fibroblast  
growth factor and bone morphogenetic protein. J Peri-  
odontal Res 44 : 238-247, 2009.

Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S,  
Terashima A, Asano T, & Okada H. Effects of basic fi-  
broblast growth factor on human periodontal ligament  
cells. J Periodontal Res 32 : 667-675, 1997.

Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adriaens P,  
Dubravec D Fonzar A, Fourmouis I, Mayfield L, Rossi  
R, Silvestri M, Tiedemann C, Topoll H, Vangsted T &  
Walkamm B. Enamel matrix proteins in the regenerative  
therapy of deep intrabony defects. J Clin Periodontol 29 :  
317-325, 2002.

Tsuboi R & Rifkin DB. Recombinant basic fibroblast  
growth factor stimulates wound healing in healing-  
impaired db/db mice. J Exp Med. 172(1) : 245-51, 1990.

Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C,  
Yoshida E Takagishi K, & Kato Y. Retention of mul-  
tilineage differentiation potential of mesenchymal cells

during proliferation in response to FGF. Biochem Biophys  
Res Commun 288 : 413-419, 2001.

Urist MR. Bone : formation by autoinduction. Science 150 :  
893-899, 1965.



上與那原 朝秀

平成19年 3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成24年 3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了

平成24年 4月 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野  
任期制助手