

主論文の要旨

Periodontal tissue regeneration using the cytokine cocktail mimicking secretomes in the conditioned media from human mesenchymal stem cells

〔 ヒト間葉系幹細胞培養上清由来液性因子を模倣した
成長因子混合剤を用いた歯周組織再生 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

坂口 晃平

【緒言】

歯周病は歯周組織の破壊を引き起こす炎症性疾患であり、歯を喪失する原因のひとつである。破壊された歯周組織を再生する試みとして、組織再生誘導法、歯根膜シートや骨膜シートなどの組織工学的手法、エムドゲイン® (EMD) や成長因子の投与などが行われてきた。EMDは歯根形成時に分泌されるアメロジェニンを主成分としたブタ歯胚由来の製剤であり、今日の臨床で幅広く用いられている。

われわれはこれまで様々なパラクライン効果を有するヒト間葉系幹細胞培養上清由来液性因子 (MSC-CM) に着目し、MSC-CMが血管新生や内在性幹細胞の遊走を促し、骨および歯周組織の再生を促進することを報告してきた。MSC-CMは細胞の品質および安全管理、さらには費用面など幹細胞移植の臨床における課題を部分的に克服することができる。しかし、MSC-CMを含む細胞由来製剤においても、含有するすべての成分分析や規格化が困難であり課題が存在する。さらに骨・歯周組織再生においてMSC-CMのどの因子が有効であるかも不明である。従ってMSC-CM中の有効成分を同定することが製剤化への第一歩であると思われる。われわれはMSC-CMにインスリン様成長因子-1 (IGF-1)、血管内皮細胞成長因子-A (VEGF-A)、トランスフォーミング成長因子- β 1 (TGF- β 1) が含まれていることを過去に報告してきた。本研究では、MSC-CMに含まれていたこれら3種の成長因子を組み合わせてMSC-CMを模倣した成長因子混合剤 (CC) を作製し、イヌ根分岐部II級欠損モデルを用いてCCの歯周組織再生能を評価し、EMDとの比較を行った。

【材料と方法】

IGF-1、VEGF-A、TGF- β 1をヒトリコンビナント製剤でMSC-CM中に含まれる濃度 (それぞれ1,400pg/ml、500pg/ml、350pg/ml) で混合しCCを作成した。さらにCCをヒドロキシプロピルセルロース (HPC) と混和して粘稠な溶液 (CC/HPC) を作製した。

イヌ骨髄間葉系幹細胞 (dBMMSCs) およびイヌ歯根膜細胞 (dPDLCs) は12-18月齢雄のビーグル犬より単離培養し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) はScienCell Research Laboratories社より購入したものを使用した。dBMMSCsおよびdPDLCsの遊走に対するCCの効果をMigration assay、HUVECsの管腔形成に対する効果をTube formation assayで評価した。

動物実験ではイヌ根分岐部II級骨欠損モデルを用いてCCの歯周組織再生能を評価した。4頭の12-18月齢雄ビーグル犬の前臼歯の頬側にラウンドバーとグレーシーキュレットを用いて高さ5mm、奥行き3mmの頬舌的に貫通しない根分岐部II級欠損を外科的に作成し、シリコーン材(ポリビニルシロキサン)を充填し閉創した。4週後に周囲の炎症性肉芽組織を搔爬してCC/HPCを投与した (CC/HPC群)。対照群は何も投与しないDefect群、基材のみを投与するHPC群、EMDを投与するEMD群を設定した。投与後8週で検体を回収し以下の評価を行った。各分岐部欠損の最も頬側の位置から舌側方向へ1,000 μ mおよび1,500 μ mの位置(それぞれ頬側寄りの位置、頬舌的中央部の

H-E染色した切片を用いてそれぞれ組織学的評価および組織形態計測を行った。組織形態計測は新生骨形成率（NBR）および新生セメント質形成率（NCR）を算出して群間で比較した（Fig. 1）。さらに血管内皮細胞のマーカである von Willebrand factor（vWF）に対する抗体を用いて免疫組織化学的評価も行った。

【結果】

CC群は Migration assay で EMD群と比べて dBMMSCs および dPDLCS の遊走細胞数が多く（Fig. 2a）、Tube formation assay では対照群と比べて長く分岐の多い HUVECs による管腔形成を認めた（Fig. 2b）。

動物実験の実験期間中、膿瘍形成や歯の動揺度増加はいずれの欠損作成部位でも認められなかった。頬側寄りの位置における切片では、Defect群およびHPC群で欠損底部に限局する新生骨および新生セメント質が認められ（Fig. 3a,b）、欠損中央部は結合組織で満たされていた（Fig. 3e,f）。CC/HPC群では欠損底部から欠損中央部にかけて新生骨および新生セメント質が認められ（Fig. 3c,g）、EMD群では欠損底部にわずかな新生骨と、欠損底部から欠損中央部にかけて新生セメント質が認められた（Fig. 3d,h）。頬舌的中央部のいずれの群の切片も、頬側寄りの位置と比べて新生骨および新生セメント質が広範囲に形成されていた。とくにCC/HPC群とEMD群では新生セメント質が欠損全体に認められた（Fig. 3o,p）。CC/HPC群の新生骨は欠損全体に認められ（Fig. 3k）、EMD群では欠損底部から中央部までに限局した範囲で認められた（Fig. 3l）。異物反応やアンキローシスはいずれの欠損においても認められなかった。

CC/HPC群およびEMD群では、歯根および骨の表面や歯根膜線維にvWF陽性細胞による管腔構造が多数認められたが（Fig. 3s,t）、Defect群およびHPC群ではほとんど認められなかった（Fig. 3q,r）。

組織形態計測を行ったところ、頬側寄りの位置および頬舌的中央部いずれの位置においてもCC/HPC群のNBRは他群と比べ高値であった。頬舌的中央部におけるEMD群のNBRはDefect群と比べ高値であった。また、頬側寄りの位置および頬舌的中央部いずれの位置においてもCC/HPC群およびEMD群のNCRはDefect群およびHPC群と比べて高値であり、CC/HPC群とEMD群間に有意な差は認めなかった（Fig. 4）。

【考察】

EMDの高いセメント質形成能は過去に報告されているが、本研究でCC/HPC群のNCRはEMD群と有意な差を認めなかったことから、CCのセメント質形成能がEMDに匹敵する可能性が示唆された。さらにCC/HPC群のNBRはEMD群より高値であったことから、CCの骨形成能はEMDと比べ優れている可能性が示唆された。CC/HPC群のdBMMSCsおよびdPDLCSの遊走細胞数がEMD群と比べて多くみられた。内在性幹細胞の遊走能の差が骨形成能の差に影響を与えた可能性が考えられる。

一般的に成長因子の効果は濃度依存的であり、多くの研究において十分な再生効果を得るために成長因子は高濃度で使用されてきた。高い濃度が必要なのは単独の成長

因子では再生過程の一部分だけを促進するためと考えられる。しかし、成長因子の高濃度での使用はBMP-2で報告されているように口腔粘膜の発赤や腫脹、疼痛などの炎症性の障害を引き起こす可能性がある。CCはごく低濃度の成長因子を使用し良好な歯周組織の再生を認めた。CCに含まれる各成長因子は骨・歯周組織再生に寄与することが過去に報告されている。CCに含まれる3種の成長因子は単独あるいは協調することで、再生過程の多くの段階を効果的に活性化している可能性が考えられる。

【結語】

CCは幹細胞の遊走や血管新生を促し歯周組織の再生を促進した。CCによる骨形成はEMDより優っており、CCによるセメント質形成はEMDと同程度であった。MSC-CMを模倣した規格化可能なCCは、細胞移植やMSC-CMなどの細胞由来製剤における様々な問題点を回避できる有用な歯周組織再生剤となりうる可能性が示唆された。