

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18791582

研究課題名(和文) BMP と細胞の複合移植によって水平性骨欠損の歯周組織再生量の増大を目指す研究

研究課題名(英文) Research to increase the amount of periodontal tissue regeneration of horizontal bone defect by composite graft of cells and BMP

研究代表者

齊藤恵美子 (SAITO EMIKO)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80374528

研究成果の概要：歯周病で喪失した歯周組織の再生療法として、申請者は骨形成を誘導する性質をもつ Bone Morphogenetic Protein(BMP)に着目し、その有効性を報告してきた。本研究では、歯周組織再生量の増大をはかる目的で、歯根膜細胞の培養を行い、この細胞をBMPと露出根面との間のスパーサー部分に組み込んで移植する方法を考案して基礎的な検索を行った。

まず、BMP による組織再生誘導における局所因子について検索を行った結果、既存骨の幅が大きい部位ほど骨形成量が増大することが明らかになった。次に、広い骨欠損部へ培養歯根膜細胞を単独で移植しても、歯槽骨の再生をあまり促進せず、歯根膜細胞の培養と BMP の複合移植によって歯周組織の再生量を増大することができる可能性が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯根膜細胞、培養、BMP、歯周組織再生

1. 研究開始当初の背景

現在、歯周炎罹患者に最も多い水平性骨欠損に対する適切な歯周組織再生療法がない。BMP (Bone Morphogenetic Protein) は、この水平性骨欠損でも骨新生と結合組織性付着の形成を誘導する可能性を持つと注目されているが、骨性癒着および根吸収が生じる場合も報告されている。この骨性癒着と根吸収は、従来行われてきた根面に直接接触させて移植する移

植法に原因があると考えた。そこでスパーサーを用いた新しい移植法に着目して、この移植法が異常治癒を抑制できることを報告した。

しかし、歯周組織再生量は十分とはいえず、歯周組織欠損に対して、結合組織性付着が52%、新生骨量は11%にとどまった。そこで、申請者は、歯周組織再生に有効な細胞をあらかじめ採取、培養を行い準備しておき、移植手術時にスパーサーに播種してBMP ととも

に移植を行うことによって、異常治癒を生じずに、歯周組織再生量の増大をはかることが可能なのではないかと考案した。(図1)

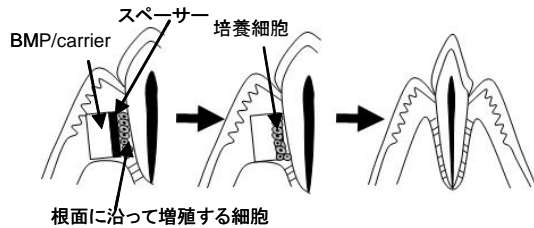


図1 考案した移植法

2. 研究の目的

BMPによる歯周組織再生量に影響を与える全身因子(加齢、糖尿病など)に関する報告は多いが、局所因子についての報告はない。

そこで、先ずこれを解明して再生量の増大を検討することによって、再生量の正確な評価と、増大を期待できる局所的条件の解明を行う。次にBMPとともに移植することによって骨を形成し、さらに根面では結合組織性付着を形成する性質の細胞について検索を行う。次に、解明された有効細胞とBMPを水平性骨欠損モデルに移植して、歯周組織再生について病理組織学的に検索を行う。

3. 研究の方法

(1) BMPの歯周組織再生量に与える局所因子の検索

ビーグル犬の前臼歯周囲に歯槽骨を4mm切除した骨欠損モデルを作成して、3mmの高さにrhBMP2を移植した。BMP2による歯槽骨形成量を高さで計測した。歯槽骨形成量に対する移植部位および残存骨の幅の影響を検索した。

(2) 培養歯根膜細胞の歯根膜形成能の検索

ラットの歯根膜、口蓋歯肉、大腿骨髄から採取した各細胞を培養した。各培養細胞と象牙質と一緒に背部皮下に移植した。象牙質表面の形成組織を病理組織学的に観察した。

(3) 温度感応材料のBMP担体としての検索

温度感応ゲル(TGP)にrhBMP-2を配合して、移植前に体温近くにて整形硬化を行った後、ラット背部皮下に移植を行って、硬組織形成について病理組織学的な評価を行った。

(4) 象牙質表面に播種した培養歯根膜細胞に与えるBMPの影響の検索

ビーグル犬の前歯から歯根膜細胞を採取、

培養した。培養細胞を採取した同じ宿主に5mmの骨および歯根膜、セメント質を除去した欠損モデルを作成し、培養歯根膜細胞とその外側にBMPを移植した。歯周組織の治癒、再生組織について病理組織学的に観察した。

4. 研究成果

(1) 残存歯槽骨の幅は、ビーグル犬の場合、部位によって異なり、上顎口蓋側が大きく、上顎頰側が最も幅が小さかった。

rhBMP2によって形成される新生歯槽骨量は、上顎口蓋側が上顎頰側よりも有意に大きいことが明らかになった。

それに対して、セメント質の形成量は、部位による差を認めなかった。(表1)

	BMP-treated group				Total (n=48)
	maxillary buccal site (n=12)	maxillary palatal site (n=12)	mandibular buccal site (n=12)	mandibular lingual site (n=12)	
Width of residual bone	0.26 ± 0.19	1.47 ± 0.70 ^{ab}	0.43 ± 0.40	0.47 ± 0.19	0.63 ± 0.61
Height of regenerated bone	0.38 ± 0.29	2.38 ± 0.38 ^a	1.43 ± 0.86	1.43 ± 0.87	1.40 ± 0.95
Area of regenerated bone	0.09 ± 0.09	2.39 ± 2.55 ^{ab}	0.44 ± 0.59	0.48 ± 0.34	0.81 ± 1.50
Cementum regeneration	2.49 ± 1.21	2.40 ± 0.85	2.04 ± 0.75	2.50 ± 0.84	2.35 ± 0.91

Kruskal-Wallis test: statistical differences between the four recipient sites
maxillary palatal site vs maxillary buccal site, a p<0.01
maxillary palatal site vs mandibular buccal site, b p<0.05

表1 BMPによる再生量と既存歯槽骨の幅との関係

(2) 既存歯槽骨の幅と組織再生量の関係

rhBMP2によって形成される新生歯槽骨量は、残存歯槽骨の幅が大きいほど有意に高く、再生量も多くなる。しかし、歯根膜の再生量は残存歯槽骨の幅には影響を受けないことが明らかになった。

またrhBMP2による歯槽骨の形成量は、根面の結合組織性付着量と相関しないことが明らかになった。(表2)

	Downgrowth of junctional epithelium	Height of regenerated bone	Area of regenerated bone	Cementum regeneration	Root resorption	Ankylosis
Height of regenerated bone	r= 0.301835 P= 0.0784					
Area of regenerated bone	r= 0.266723 P= 0.1199	0.891495 0.0001***				
Cementum regeneration	r= 0.197015 P= 0.2506	0.129214 0.4547	0.287818 0.0933			
Root resorption	r= 0.893798 P= 0.0001***	0.205952 0.2309	0.138902 0.4187	0.325899 0.0574		
Ankylosis	r= -0.171973 P= 0.3160	0.142034 0.4076	0.175626 0.3058	-0.205784 0.2302	-0.286153 0.0952	
Width of residual bone	r= 0.496497 P= 0.0038**	0.791388 0.0001***	0.828393 0.0001***	0.135379 0.4299	0.340153 0.0473*	-0.036906 0.8296

Spearman's rank correlation coefficient:
r<0.2, very low correlation. r=0.5, low correlation. r<0.7, moderate correlation.
r<0.9, high correlation. r>0.9, very high correlation.
P>0.05, not significant. *P<0.05, significant.
** P<0.01, very significant. *** P<0.001, highly significant

表2 既存歯槽骨の幅および各組織再生量の相関関係

したがって BMP による歯槽骨の再生量の増大が、既存骨の幅が大きい場合に期待でき、BMP による歯周組織再生療法の適応症として、上顎の口蓋側、下顎臼歯部頬側などがあげられると考えられる。

また、現在臨床応用されている BMP によるインプラント移植部位の歯槽骨再建術についても、予知性の高い治療方法へ発展させる論拠の1つになるものと思われる。

(3)ラットから採取、培養を行った培養歯根膜細胞、歯肉細胞、骨髄細胞の ALP 活性は、骨髄由来細胞が最も高く、ついで歯根膜細胞、歯肉細胞の順となった。これらの培養細胞は、ともに *in vivo* において象牙質を認識することが明らかになった。

培養歯肉細胞は象牙質表面に吸収窩を形成した。また、骨髄由来細胞は培養条件によって様々な接触様式を呈した。

その中で特に培養歯根膜細胞は、象牙質を吸収せず、部分的に象牙質のコラーゲン基質と結合することが示された。

(4) TGP は温度感応性である為、体温付近にて硬化 (ゲル) した。移植材内部への血管、細胞浸潤はあまり認められず、移植材を取り囲むように骨様硬組織が形成していた。

このことより、体温付近で硬化する TGP は、口腔内の多様な欠損形態や根面形態への形態付与に有効であることが明らかになった。BMP の担体として有効な材料となりえる可能性が示された。

(5)ビーグル犬の水平性骨欠損モデルにおいて、象牙質表面に播種した培養歯根膜細胞に与える BMP の影響の検索

培養歯根膜細胞は、単独で根面に移植された場合、歯槽骨の再生をほとんど認めず、根面に平行に走行する線維のアダプテーションが観察された。

このことから培養歯根膜細胞は ALP 活性が高い場合でも、歯槽骨の再生には影響しないことが明らかになった。さらに歯根膜は多様な細胞から構成されており、培養細胞を移植した場合に必ずしも結合組織性付着を形成することはなくて、アダプテーションとなる場合があることが明らかになった。

BMP のみを移植した部位では歯槽骨の再生は認められたが、一部に骨性癒着が認められた。

培養歯根膜細胞と BMP を移植した部位では、歯根膜の再生が増加した。しかし標本に

よっては歯根膜の再生が部分的にとどまり、歯槽骨の再生と根面に平行または斜走する線維のアダプテーションが観察された。

これらのことより、培養歯根膜細胞と BMP の複合移植によって歯周組織の再生量が増大する可能性が明らかとなった。しかし、通常の培養条件では培養歯根膜細胞が、移植後に必ずしもセメント質を形成するとは限らないことも明らかになった。

今後は、歯根膜細胞の培養時にエムドゲイン、bFGF などの成長因子の添加を行い、培養細胞の歯根膜形成能を高める方法について検討を行うことによって、より広範囲の再生を期待できる治療法に発展させることができると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Akira Saito, Emiko Saito, Ryohei Handa, Yoshiyuki Honma and Masamitsu Kawanami: Influence of residual bone on recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)-induced periodontal regeneration in experimental periodontitis in dogs, *Journal of Periodontology* 2 March 2009: accept(査読有)
- ② 川浪雅光、齋藤 彰、加藤 熙、齋藤恵美子 (他 3 名 7 番目): 歯周組織再生療法の臨床研究の現況. *歯科臨床研究*. 5(2): 71-81(2008). (査読有)
- ③ 宮治裕史、菅谷 勉、齋藤 彰、齋藤恵美子 (他 3 名 6 番目): BMP を用いた歯周組織再生療法の開発. *日本歯科評論*. 68(4): 39-40(2008).(査読無)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Akira Saito, Emiko Saito, Ryohei Handa, Yoshiyuki Honma and Masamitsu Kawanami: Periodontal healing after transplantation of teeth cultured with EMD, 米国歯周病学会, 2008 年 9 月 8 日, シアトル (アメリカ)
- ② 齋藤 彰, 齋藤恵美子, 原橋宏幸, 半田良平 (他 4 名 2 番目): *in vitro* で歯根膜細胞を増殖させた歯の移植後の治癒に与えるエムドゲインの影響. 日本歯周病学会, 2007 年 5 月 19 日横須賀
- ③ 齋藤恵美子, 齋藤 彰, 堀川 元, 原橋宏幸, 半田良平, 川浪雅光: TGP ゲルに rhBMP-2 を配合した場合の硬組織形成. 日本歯科保存学会, 2006 年 11 月 9 日, 鹿児島

- ④ 齋藤 彰、齋藤恵美子、川浪雅光（他 3 名 2 番目）：歯周組織再生療法への BMP の応用. 第 13 回 BMP 研究会 ,2006 年 5 月 2 日,東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 恵美子 (SAITO EMIKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80374528

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし