

## 成長因子の歯周組織再生療法への応用について

中村 利明

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 成人系歯科センター 歯周病科

### The application of growth factors for the periodontal regenerative therapy

Toshiaki Nakamura

Department of Periodontology, Advanced Dentistry Center, Kagoshima University Medical and Dental Hospital.

#### ABSTRACT

Periodontitis is an inflammatory disease resulting in the loss of tooth-supporting tissues including the periodontal ligament, cementum, and alveolar bone, ultimately resulting in tooth loss. Two innovative approaches, guided tissue regeneration and application of enamel matrix derivative, have been found to achieve periodontal regeneration that reproduced essentially normal structure. However, these regenerated tissues were limited to a small part of the damaged area. Thus, further progress is needed in regeneration-based treatment of periodontal disease. So far, several regenerative methods using growth factors including bone morphogenetic proteins (BMPs), platelet-derived growth factor, and basic fibroblast growth factor, have been developed to treat periodontal defects and have achieved favorable results in animal studies and clinical trials. These factors exert their pleiotropic effects, stimulating key events required for periodontal regeneration. Here, I would like to describe the conventional periodontal regenerative therapies, and discussed the application of growth factors including BMP-9 for the periodontal regenerative therapy.

**Key words:** Periodontitis, Regenerative therapy, Growth factor, BMP

#### I. 緒言

歯周病は組織破壊性の慢性炎症性疾患であり、歯周病により歯が失われると、歯槽骨は次第に吸収し、口腔機能回復に様々な制約が生じる。歯周病により破壊される歯周組織は歯槽骨、セメント質、歯根膜といった複数の異なる組織によって構成されており、これら失われた歯周組織を再生させるべく現在、骨移植術、Guided tissue regeneration (GTR) 法、エナメルマトリックスデリバティブ (Enamel matrix derivative: EMD) を中心とした歯周組織再生療法が実施されている。レントゲンにおいて垂直性骨吸収が認められた場合、その欠損が深ければ深いほど10年後にその歯の喪失率は高くなるため<sup>1)</sup>、このような垂直性骨欠損に対する歯周

組織再生療法は歯の長期的な保存という意味において重要な処置であり、現在までに一定の成果を挙げているものの、多くの患者がその恩恵を受けているとは言い難い。また、既存の歯周組織再生療法は改善すべき点が多く残されており、そのためさらなる適応症の拡大と予知性の改善および、技術的な問題を克服し、効率的な歯周組織再生を成すために Tissue engineering の3要素の観点から、成長因子、細胞移植、Scaffold について盛んに研究が行われている。本稿では、歯周組織再生療法について概説するとともに、現在、我々が取り組んでいる Bone morphogenetic protein (BMP)-9 を軸とした歯周組織再生へのアプローチについて解説したい。

## II. 現在の歯周治療および歯周組織再生療法

歯周組織再生とは歯支持組織である歯槽骨、歯根膜およびセメント質を伴う再生と定義される<sup>2)</sup>。現在、本邦における日常臨床では、垂直性骨欠損もしくは根分岐部病変を伴う歯周組織欠損に対して骨移植術、GTR法およびEMDが歯周組織再生療法として実施されている。

### A. 骨移植術

骨移植術に用いられる骨移植材としては自家骨、他家骨、異種骨および人工骨がある。現在、骨移植材として理想的な性質をすべて兼ね備えたものは存在しないため、それぞれの材料が持つ性質（骨形成能、骨誘導能、骨伝導能、生体内での吸収速度、臨床的操作性

など）を充分理解した上で適応することが肝要である。自家骨は骨形成能を持ち、古くからゴールドスタンダードとして用いられてきたが（図1）、採取量および採取部位に制限がある。他家骨（本人以外の骨）としては、骨誘導能を持つ脱灰凍結乾燥他家骨（demineralized freeze-dried bone allograft: DFDBA）があり、米国において広く使用されているものの、本邦では未認可である。そのため、本邦では採取量、採取部位などに制限を受けない代替材料として異種骨および人工骨が期待される。異種骨として国内承認されているものはウシ焼成骨であるボーンジェクト<sup>®</sup>とBio-Oss<sup>®</sup>があり精製処理法の違いからその物性には違いがある。また、これらは非常に吸収が遅い（もしくは



図1. 骨移植術（自家骨）：右下2番頰側～近心に存在するカップ状の骨欠損（レントゲン上では近心に垂直性骨吸収像として確認出来る）に対して、舌側に存在する骨隆起から自家骨を採取し、自家骨移植を行った。術前：5mmのPPD（上）と近心に垂直性の骨吸収像（下、矢印）が認められた。術中：自家骨移植前（上）、移植後（下）、術後（1年）：近心の透過像の改善が認められる（下、矢印）

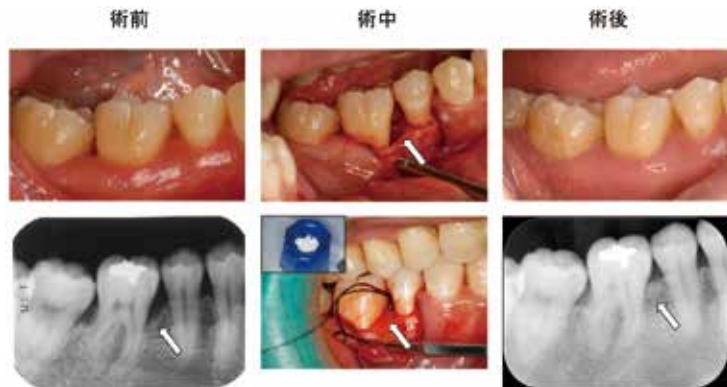


図2. 骨移植術（異種骨）：右下6番近心に存在する3壁性骨欠損に対する適応症例。術前：5mmのPPDと近心に垂直性の骨吸収像（下、矢印）が認められた。術中：骨移植前（上）、移植後および骨移植材（下）、術後（約5年）：近心の透過像の改善が認められる（下、矢印）

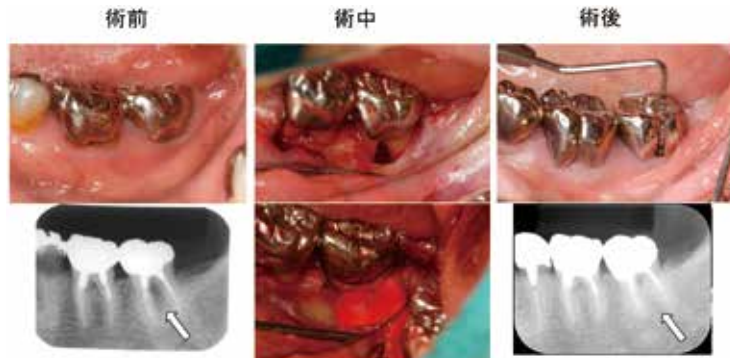


図3. GTR法：根分岐部病変に対する適応症例。術前：左下7番頰側中央に7mmのPPDと2度の根分岐部病変（LindheとNyman）および分岐部に局限した骨吸収像（下、矢印）が認められた。術中：分岐部搔爬・形態修整およびSRP後（上）、吸収性メンブレン設置後（下：ジーシーメンブレン）、術後（約7年）：PPDは3mm、根分岐部病変は1度に改善し、レントゲン上では根分岐部の透過像の改善が認められる（下、矢印）

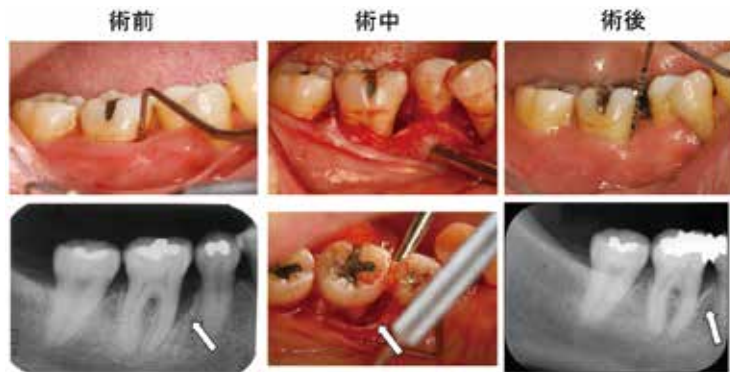


図4. EMD（エムドゲイン<sup>®</sup>ゲル）：右下6番近心に存在する骨欠損に対する適応症例。術前：右下6番近心に8mmのPPD（CAL=10mm）と、近心に垂直性の骨吸収像（下、矢印）が認められた。術中：EMD塗布前の骨欠損状態。レントゲンでは確認出来ないが近心から舌側を取り巻く複雑な骨欠損が確認出来る（下、矢印）、術後（約6年）：PPDは3mmで5mmのCALのgainを認め、レントゲン上では近心垂直性骨欠損の著明な改善が認められる（下、矢印）

吸収されない）ため、移植材の感染に常に注意しなければならない<sup>3)</sup>。ボーンジェット<sup>®</sup>は歯周組織欠損への骨移植材としての保険適応があり当科でも使用されている（図2）。Bio-Oss<sup>®</sup>は骨組織と類似した構造を有しており、欧米を中心に骨増生時の骨移植材として頻用されている。他にも、様々な種類の骨移植材が存在するが、国内におけるこれらを使用するには様々な制約があり、承認されている物は限られている<sup>4)</sup>。

#### B. GTR法

Nymanらによって報告<sup>5)</sup>されたGTR法は、骨欠損開口部に遮断膜（メンブレン）を設置し、上皮および歯肉結合組織由来の細胞の侵入を阻止することで、歯

根膜由来細胞を選択的に誘導し、歯周組織再生を図るものである。適応となる骨欠損は2～3壁性の垂直性骨欠損と1度および2度の根分岐部病変（LindheとNymanの分類）で、メンブレンとしては非吸収性、吸収性のあるものがあるが、非吸収性膜として頻用されていた延伸多孔質ポリテトラフルオロエチレン（ePTFE）製のゴアテックスGTRメンブレンは2012年3月をもって販売中止となっている。幅の狭い骨欠損では両者に臨床効果の差はないとされ、現在は二次手術の必要が無い吸収性メンブレンが主流である（図3）。メンブレンの取り扱い、設置に熟練を要するため、後述のEMDにその座を引き渡した感があるが、

骨欠損形態によってはGTRが適している場合もあり、またメンブレン使用の概念はGuided bone regeneration (GBR)に通じ、その重要性に変わりはないと思われる。

### C. EMD

一般に、再生は部分的に発生を模倣すると考えられるが、エナメルマトリックスタンパク質は、歯根の発生段階において内外エナメル上皮が根尖側に移動し形成されるヘルトヴィッチ上皮鞘より分泌されるタンパク質で、歯根形成段階においてセメント質の形成に重要な役割を果たしている<sup>6)</sup>。そのためエナメルマトリックスタンパク質の歯周組織再生の可能性が検討され<sup>7)</sup>、このタンパク質を幼若ブタの歯胚よりEMDとして精製、商品化したものがエムドゲイン<sup>®</sup>である。骨内欠損における術後10年の臨床評価において、EMDはOpen flap debridementと比較して有意に臨床的アタッチメントレベル (CAL) の獲得が大きく、GTRとEMDの間には差が無かった報告されている<sup>8)</sup>。当科においてもGTR法と変わらない臨床成績を取っており<sup>9)</sup>、平成20年7月より先進医療「歯周外科治療におけるバイオ・リジェネレーション法」としても実施しているところである (図4)。現在、EMDにプロピレングリコールアルジネートを加えてゲル状にしたプレフィルドシリンジタイプのエムドゲイン<sup>®</sup>ゲルとして利用可能で、その適用方法は様々な注意点はあまるもの、歯根面に塗布するだけで、この術式の簡便さはメンブレンを用いるGTR法にはない優れた面であり、歯周組織再生療法のあるべき姿の一つを具現化したものであるといっても過言ではない。

## Ⅲ. 成長因子の応用

### A. Platelet-derived growth factor (PDGF)

PDGFは血管新生作用や間葉系細胞の遊走および増殖促進作用を持つとされ、その創傷治癒促進効果を期待し幅広い分野で臨床応用が検討されている成長因子である<sup>10)</sup>。歯周領域では古くは1989年にinsulin-like growth factor-1 (IGF-I) とのコンビネーションによる歯周組織再生に関する *in vivo* の効果がLynchらにより報告されている<sup>11)</sup>。PDGFは5つのアイソフォームが存在し (PDGF-AA, -BB, -AB-CC, -DD)、2005年にFDA (アメリカ食品医薬品局) により承認されたGEM 21S<sup>®</sup> (図5: 国内未承認) はリコンビナントタンパクであるrhPDGF-BBとキャリアーの $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -tricalcium phosphate:  $\beta$ -TCP) との組み合わせで (図5)、無作為化比較試験による術後3年の海外での臨床試験の結果では、キャリアーのみと比



図5. GEM 21S<sup>®</sup>: 0.3 mg/ml の rhPDGF-BB と Synthetic bone matrix ( $\beta$ -TCP) がセットになっている。(Osteohealth 社)

較して、0.3mg/ml の rhPDGF-BB とキャリアーの併用により歯周ポケット深さ (PPD) の改善と CAL の獲得において優れていたと報告しているが<sup>12)</sup>、GEM 21S<sup>®</sup> に同封されている $\beta$ -TCP の有効性には疑問も呈されている<sup>13)</sup>。すべての成長因子において言えることではあるが、コンビネーションとして用いるキャリアーとしてどれがベストかというエビデンスは少なく、各種コラーゲン製剤、骨補填材などとの併用においては注意が必要であり、今後のエビデンスの構築が望まれる。

### B. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)

FGFはウシ下垂体から発見されたタンパクで、FGF-1~23からなるファミリーを形成している。中でもFGF-2はbasic-FGF (bFGF, 塩基性線維芽細胞増殖因子) とも呼ばれる成長因子で、歯根膜細胞の増殖・遊走および強力な血管新生作用を有しており、主に大阪大学の研究グループにより歯周組織再生への有効性に関する基礎的研究が進められ、日本において大規模





図6. FGF-2 (bFGF): 右上3番遠心に存在する垂直性骨欠損に対する適応症例。術前: 右上3番遠心に7mmのPPDと、垂直性の骨吸収像(下, 矢印)が認められた。術中: FGF-2填塞前の骨欠損状態。遠心に2~3壁性の骨欠損が確認出来る(矢印), 術後(約1.5年): PPDは3mm, レントゲン上では遠心垂直性骨欠損の著明な改善が認められる(下, 矢印)

な臨床治験(鹿児島大学歯周病科も参加)が実施された(図6)。FGF-2によるヒトの歯周組織再生に関して、第Ⅲ相臨床治験(有効性およびエムドゲイン®ゲルとの比較試験)の術後36週の結果が2015年に発表され<sup>14)</sup>、FGF-2は、エムドゲイン®ゲルに劣る臨床評価項目は認められず、かつレントゲンをういた骨再生の評価においてFGF-2の有効性が確認されたとしている。2015年10月1日に製造販売承認申請を行ったとの発表があり、国内での承認を待つ段階であるが、FGF-2の歯周組織再生領域に与えるインパクトは大きく、さらなる展開が期待される。

### C. BMPs

1965年にUristにより脱灰骨基質中に存在する異所性骨形成能を持つ因子として報告された<sup>15)</sup> BMPは、その後、遺伝子のクローニングの結果、現在は20種類近くのアイソフォームが存在する。BMPはアクチビン、インヒピン、およびtransforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )と共にTGF- $\beta$  superfamilyを構成し、(i) BMP-2, -4, (ii) BMP-5, -6, -7, -8, (iii) BMP-9, -10, (iv) BMP-3, -3b, -13, -11, -12, -14, -16の4つのサブグループに分類され、発生や組織の恒常性維持など様々な機能を担っている<sup>16)</sup>。BMPはセリン/スレオニンキナーゼ型受容体である7種類のI型受容体と3種類のII型受容体に各々のリガンドに特徴的な受容体の組み合わせで結合し、これらを通じてsmadシグナリングやMAPキナーゼカスケード等を活性化し、様々な作用を発揮している<sup>17)</sup>。これらBMPsの中で、主にBMP-2, -7 (osteogenic protein-1: OP-1), growth/differentiation factor (GDF)-5が歯周組織再生への応用について検討されて

いる。BMP-2および-7は未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化調節に重要な働きを持つBMPであり、古くから骨再生において中心的な役割を果たすと考えられ、骨形成促進因子として*in vitro*, *in vivo*の両面から様々な組織、細胞において詳細に検討されてきたが、歯周組織再生において、イヌやサルの歯周組織欠損モデルを用いた検討から、治癒/再生を促進する結果は得られているものの、歯根吸収/アンキローシスも観察されている<sup>18)</sup>。結果として、現在までヒトにおいては歯周組織再生領域での適応は認められておらず、歯科においては上顎洞挙上術もしくは歯槽堤増大術時の骨再生に関しての適応にとどまっており、整形外科領域では、脊椎固定や脛骨骨折などに適応されている<sup>19)</sup>。臨床応用時には、基礎研究で報告されているBMP-2や-7の濃度と比較してかなり高濃度で使用されておりその費用対効果については検討が必要で、またその適応外使用による数々の有害事象も散見されている<sup>20-22)</sup>。GDF-5は、cartilage-derived morphogenetic protein-1 (CDMP-1)の別名をもつ成長因子であり、骨格形成予定領域に凝集した間葉系細胞に発現し、後に四肢の長軸方向の成長をはじめ、関節・腱・靭帯の形成過程で発現・機能している<sup>23-25)</sup>。またGDF-5遺伝子の変異によりマウスにおいて短四肢が、ヒトにおいては軟骨形成不全症が起こることが知られている<sup>26, 27)</sup>。歯は付着器官である歯根膜とセメント質により歯槽骨と結合しているが、この付着器官は歯小囊より発生し、その段階においてGDF-5, -6, -7がこの領域に発現することが報告されており<sup>28)</sup>、我々は歯周組織再生におけるGDF-5の有効性を検討するために、ヒ

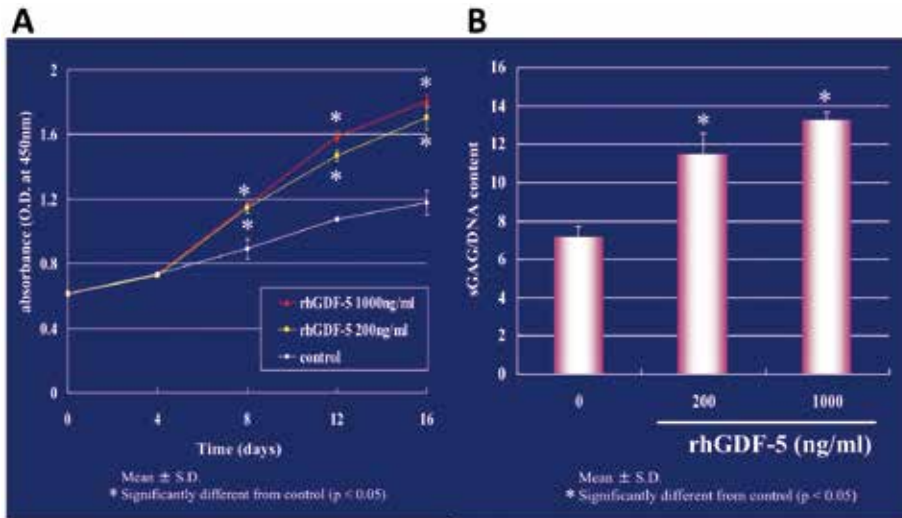


図7. GDF-5のHPDLにおける細胞増殖(A)・sGAG産生(B)促進効果(Nakamura T. *et al.* *J Periodontal Res* 2003; 38: 597-605. より引用改変)

ト歯根膜細胞 (Human periodontal ligament: HPDL) に対する rhGDF-5 の細胞生物学的作用を解析した。その結果, rhGDF-5 による骨芽細胞分化マーカーの上昇は認められなかったものの, 増殖と細胞外マトリックスの一つである Sulfated glycosaminoglycan (sGAG) の産生を促進することを見出し (図7), 歯周組織再生に適した環境を創出する可能性が示唆された<sup>29)</sup>。その後, *in vivo* における GDF-5 のキャリアーとして吸収性コラーゲンスポンジ (ACS),  $\beta$ -TCP などを用いた研究を経て<sup>30)</sup>, rhGDF-5/ $\beta$ -TCP の組み合わせを用いたヒトにおける第2相の臨床試験が行われ, 術後24週において臨床パラメーター (PPD および CAL) の改善を認め (ただしコントロール群との有意差は無し), また組織学的観察において BMP-2, -7 と異なり歯根吸収/アンキローシスは認めなかったとの報告が成された<sup>31, 32)</sup>。これらのことから GDF-5 は, 有望な歯周組織再生の Biologic agent の一つと考えられている。

#### IV. BMP-9

BMP-9 (別名 GDF-2) は胎生期マウスの肝細胞から発見され<sup>33)</sup>, BMP-2 や BMP-7 とともに骨形成性の BMP に分類されており, 肝細胞増殖作用, 脂質代謝酵素誘導作用, リンパ管形成制御作用など様々な作用を有する。数ある BMPs の中で BMP-2 が骨形成因子のゴールドスタンダードと考えられていたが, BMP-9 は間葉系幹細胞を骨芽細胞様に分化する能力が

BMP-2 と同等かそれ以上であると報告<sup>34)</sup> され, 筋肉に損傷がある場合にのみ同部位に異所性骨形性能を示すというユニークな特徴も有している<sup>35)</sup>。また BMP-9 は, BMP-2, -4, -7 や GDF-5 など現在まで研究されてきた BMPs と異なり, BMP antagonist である Noggin<sup>36)</sup> や抑制性の BMP である BMP-3 の作用を受けにくい<sup>37)</sup>。現在, 我々は, このように BMP-2 と異なる特徴を持ちながらも osteogenic な性質を保持する BMP-9 に着目し, 有望な歯周組織再生促進因子の候補として基礎研究に着手している。当講座において, 再生療法における細胞ソースの一つとして脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells: DFAT) に着目して研究を進めているが, まず DFAT の骨芽細胞様分化調節因子としての BMP-9 の可能性について検討を行った。DFAT は成熟脂肪細胞から天井培養と呼ばれる方法で体外培養することにより得られる多分化能を持つ線維芽細胞様の細胞群であるが<sup>38)</sup>, ラット由来 DFAT (rDFAT) において BMP-9 は FK506 と共刺激することにより著しい骨関連遺伝子の発現と ALP 活性および石灰化を亢進し, また BMP-9 と FK506 共刺激により上昇した ALP 活性は noggin により抑制されないことを見出した<sup>39)</sup> (図8)。FK506 (tacrolimus) は, 免疫抑制剤の一つで Cyclosporine A などと共に, 臓器移植などで広く用いられている。この FK506 は, BMP または TGF の I 型受容体の細胞質側 GS ドメインに結合し, シグナル伝達を抑制している FKBP12 に結合しその複合体が受容

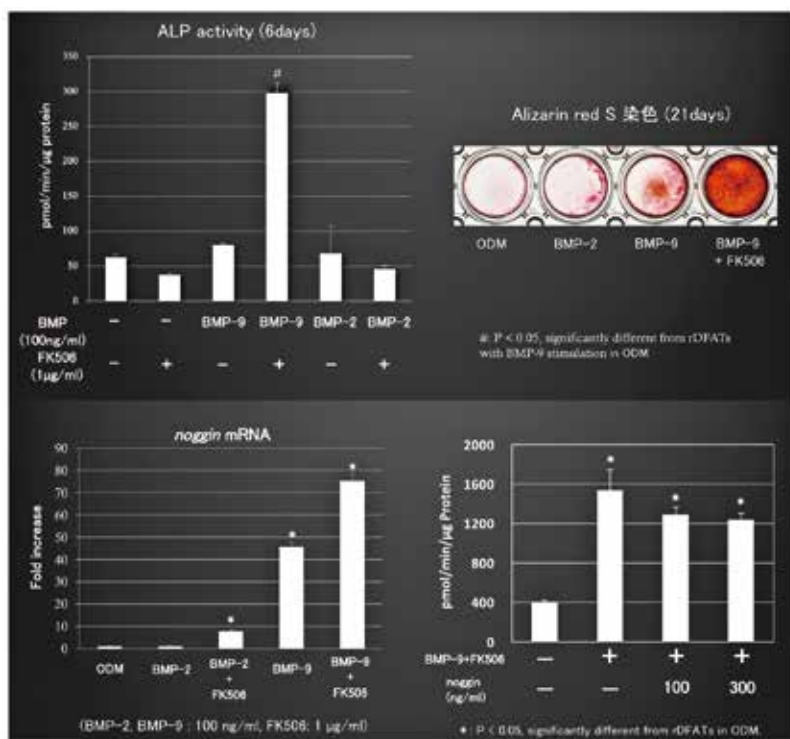


図8. rDFATにおけるBMP-9とFK506共刺激による骨芽細胞様分化促進(上段)とNoggin耐性(下段)(Nakamura T. *et al. Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440: 289-294. より引用改変)

体から離れることで、その抑制性を解除すると考えられている<sup>16)</sup>。そのため、BMP-9の機能発揮における補助因子としてFK506を用いたDFATを効率的に骨芽細胞様細胞へ分化させる可能性が示唆された。次に歯周組織の再生過程において重要な役割を担うヒト歯根膜由来線維芽細胞(hPDLF)に対するBMP-9の作用について検討を行ったところ、BMP-9はhPDLFsの骨関連遺伝子の発現、ALP活性および石灰化物形成をBMP-2よりも有意に亢進させることを確認している<sup>40)</sup>。ヒト歯根膜由来幹細胞(PDLSC)において、遺伝子導入によるBMP-9の強発現により骨芽細胞様分化が促進されることも報告されており<sup>41)</sup>、BMP-9は歯周組織再生において石灰化組織の形成にはPositiveに作用すると推察される。前述の通り、BMP-9はBMP-2と異なる作用を持ち、またその作用を発揮する受容体群も異なる。そのため、今後BMP-2をはじめとした他のBMPとBMP-9との骨・歯周組織再生における作用の違いを明らかにし、BMP-9を用いた効率的な再生療法の基盤を確立するべく、様々な視点から検討しているところである。

## V. おわりに

歯周組織再生療法において、様々な成長因子の応用が検討され、その有効性が示されているが、EMDをはるかに凌駕する結果を提示しているといえるものは未だ存在しない。しかし、成長因子単独もしくはキャリアーとの併用による応用は、臨床において非常にシンプルですみやかに導入できる術式であり、BMP-9をはじめとしてまだまだ検討する余地のある成長因子またはその補助因子は存在すると考えている。細胞移植療法など様々な組織再生のストラテジーが検討されているが、その適応症や予知性という面で、今後棲み分けが成されていくものと思われる。しかしながら、将来的に有効かつ魅力的な歯周組織再生療法が多く確立されたとしても、原因除去療法である歯周基本治療により、歯周組織再生に適した環境を創出することが最も大切であることに変わりはないと思われる(図9)。歯周治療に限ったことではないが、常にその疾患の原因を探求し、治療に当たる、その延長線上に再生療法が存在することを忘れてはならない。

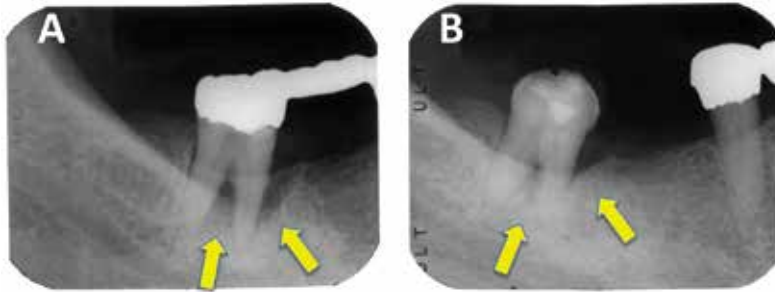


図9. 原因除去療法(歯周基本治療)による歯周組織の改善:A:初診時右下7番。近心にPPD 9mm, 頬側中央にPPD 12mmと2度の根分岐部病変(LindheとNyman)を認め、レントゲン上で近心および分岐部に骨吸収像(矢印)が認められた。B:歯周基本治療後。PPDは3~4mmになり、レントゲンの不透過像の改善が認められた(矢印)。初診時保存困難と思われたが、一連の治療終了6年経過後も問題なく機能している。原因除去をベースとした歯周基本治療の重要性を示している。

## VI. 謝辞

本稿を寄稿するにあたり、野口和行教授および鹿児島大学歯周病学分野の医局員の方々と、大学院時代に様々な形で御指導いただき研究の基礎を築いて頂いた東京医科歯科大学 和泉雄一教授、昭和大学 山本松男教授に深甚なる謝意を表します。

## VII. 参考文献

- Papapanou PN, Wennstrom JL: The angular bony defect as indicator of further alveolar bone loss. *J Clin Periodontol*, 18, 317-322. 1991.
- Garrett S: Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol*, 1, 621-666. 1996.
- Yoshinuma N, Sato S, Fukuyama T, Murai M, Ito K: Ankylosis of nonresorbable hydroxyapatite graft material as a contributing factor in recurrent periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 32, 331-336. 2012.
- 佐藤 秀一, 伊藤 公一: 歯周組織再生および骨再生における骨移植材の現状 どの骨移植材が最も効果的か? *日本歯周病学会会誌*, 55, 300-311. 2013.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 9, 290-296. 1982.
- Brookes SJ, Robinson C, Kirkham J, Bonass WA: Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Arch Oral Biol*, 40, 1-14. 1995.
- Hammarstrom L: Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 24, 658-668. 1997.
- Sculean A, Kiss A, Miliauskaitė A, Schwarz F, Arweiler NB, Hannig M: Ten-year results following treatment of intra-bony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*, 35, 817-824. 2008.
- 町頭 三保, 中村 利明, 白方 良典, 金城 守明, 瀬戸口 尚志, 和泉 雄一: 歯周治療におけるエムドゲインゲルの臨床的評価. *鹿児島大学歯学部紀要*, 25, 39-44. 2005.
- Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE: Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 90 Suppl 1, 48-54. 2008.
- Lynch SE, Williams RC, Polson AM, et al.: A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*, 16, 545-548. 1989.
- Nevins M, Kao RT, McGuire MK, et al.: Platelet-derived growth factor promotes periodontal regeneration in localized osseous defects: 36-month extension results from a randomized, controlled, double-masked clinical trial. *J Periodontol*, 84, 456-464. 2013.
- Ridgway HK, Mellonig JT, Cochran DL: Human histologic and clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor and beta-tricalcium phosphate for the treatment of periodontal



- intraosseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 28, 171-179. 2008.
- 14) Kitamura M, Akamatsu M, Kawanami M, et al.: Randomized placebo-controlled and controlled non-inferiority phase III trials comparing trafermin, a recombinant human fibroblast growth factor 2, and enamel matrix derivative in periodontal regeneration in intrabony defects. *J Bone Miner Res*. 2015.
- 15) Urist MR: Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150, 893-899. 1965.
- 16) Sanchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, Ten Dijke P: Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*, 80, 43-59. 2015.
- 17) Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M: Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*, 147, 35-51. 2010.
- 18) Stavropoulos A, Wikesjo UM: Growth and differentiation factors for periodontal regeneration: a review on factors with clinical testing. *J Periodontol Res*, 47, 545-553. 2012.
- 19) Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM: Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res*, 93, 335-345. 2014.
- 20) Neovius E, Lemberger M, Docherty Skogh AC, Hilborn J, Engstrand T: Alveolar bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 66, 37-42. 2013.
- 21) Woo EJ: Adverse events reported after the use of recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Oral Maxillofac Surg*, 70, 765-767. 2012.
- 22) Woo EJ: Adverse events after recombinant human BMP2 in nonspinal orthopaedic procedures. *Clin Orthop Relat Res*, 471, 1707-1711. 2013.
- 23) Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, et al.: Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development*, 126, 1305-1315. 1999.
- 24) Merino R, Macias D, Ganan Y, et al.: Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev Biol*, 206, 33-45. 1999.
- 25) Storm EE, Kingsley DM: GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol*, 209, 11-27. 1999.
- 26) Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ: Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature*, 368, 639-643. 1994.
- 27) Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J, Luyten FP: A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat Genet*, 12, 315-317. 1996.
- 28) Morotome Y, Goseki-Sone M, Ishikawa I, Oida S: Gene expression of growth and differentiation factors-5, -6, and -7 in developing bovine tooth at the root forming stage. *Biochem Biophys Res Commun*, 244, 85-90. 1998.
- 29) Nakamura T, Yamamoto M, Tamura M, Izumi Y: Effects of growth/differentiation factor-5 on human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res*, 38, 597-605. 2003.
- 30) Lee J, Wikesjo UM: Growth/differentiation factor-5: pre-clinical and clinical evaluations of periodontal regeneration and alveolar augmentation--review. *J Clin Periodontol*, 41, 797-805. 2014.
- 31) Stavropoulos A, Windisch P, Gera I, Capsius B, Sculean A, Wikesjo UM: A phase IIa randomized controlled clinical and histological pilot study evaluating rhGDF-5/beta-TCP for periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*, 38, 1044-1054. 2011.
- 32) Windisch P, Stavropoulos A, Molnar B, et al.: A phase IIa randomized controlled pilot study evaluating the safety and clinical outcomes following the use of rhGDF-5/beta-TCP in regenerative periodontal therapy. *Clin Oral Investig*, 16, 1181-1189. 2012.
- 33) Song JJ, Celeste AJ, Kong FM, Jirtle RL, Rosen V, Thies RS: Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology*, 136, 4293-4297. 1995.
- 34) Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al.: Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, 85-A, 1544-1552. 2003.
- 35) Leblanc E, Trenszt F, Haroun S, et al.: BMP-9-induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. *J Bone Miner Res*, 26, 1166-1177. 2011.
- 36) Wang Y, Hong S, Li M, et al.: Noggin resistance

- contributes to the potent osteogenic capability of BMP9 in mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 31, 1796-1803. 2013.
- 37) Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al.: Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther*, 11, 1312-1320. 2004.
- 38) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al.: Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*, 215, 210-222. 2008.
- 39) Nakamura T, Shinohara Y, Momozaki S, Yoshimoto T, Noguchi K: Co-stimulation with bone morphogenetic protein-9 and FK506 induces remarkable osteoblastic differentiation in rat dedifferentiated fat cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 440, 289-294. 2013.
- 40) Fuchigami S, Nakamura T, Furue K, Sena K, Shinohara Y, Noguchi K: Recombinant human bone morphogenetic protein-9 potently induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. in press.
- 41) Ye G, Li C, Xiang X, et al.: Bone Morphogenetic Protein-9 Induces PDLSCs Osteogenic Differentiation through the ERK and p38 Signal Pathways. *Int J Med Sci*, 11, 1065-1072. 2014.