

顎骨骨髓間葉系幹細胞を用いた顎骨増生医療の開発

西村 正宏

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
先進治療科学専攻 顎顔面再建学講座 口腔顎顔面補綴学分野

Alveolar ridge augmentation using alveolar bone marrow mesenchymal stem cells

Masahiro Nishimura

Department of Oral and Maxillofacial Prosthodontics, Field of Oral and Maxillofacial Rehabilitation, Advanced Therapeutic Course, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

Abstract

This review shows a summary of our previous studies concerning how to augment alveolar bone ridge by minimum intervention using autologous alveolar bone derived mesenchymal stem cells (MSC) and scaffolds. We successfully collected MSC from alveolar bone marrow using newly developed puncture needle, and expanded them in vitro. We have developed serum free culture medium and found several new initial osteogenic markers and new resistance factors for external stimuli on MSC. Furthermore, we found several factor controlling MSC migration and osteogenic differentiation. We combined MSC with calcium phosphate scaffold and transplanted them into canine edentulous model and successfully observed osseointegration between augmented bone and implant. We are going to start alveolar bone augmentation treatment using alveolar bone marrow MSC/scaffold utilizing above mentioned techniques in the near future.

Key words: Mesenchymal stem cells (MSC), Alveolar ridge augmentation, Implant, Regenerative medicine, Alveolar bone

I. 緒言

歯科補綴領域の治療を困難とさせる大きな要因として、顎堤の高度吸収（萎縮）がある。しかし高度に吸収した顎堤上での補綴装置の安定性は悪く、特にインプラント治療では造骨の必要を迫られることが多い。歯科補綴学の歴史はこの困難な状態を術者の技術や歯

科材料によって如何にかバーして患者のQOLを向上させるかを考え・治療する歴史であったと言っても過言ではない。一方、2012年にノーベル賞となった山中先生のiPS細胞に代表されるように、日本の再生医療研究は世界でもトップクラスを走っており、再生医療を実現することは今では国策となっている。私も以前

から、歯科補綴学は従来からの材料至上主義の学問から組織・細胞を用いて生体そのものを再生する研究も加えるべきであると考えて、基礎研究にも重点をおいて研究を行ってきた。そして私の研究の方向性を大きく変える契機となったのが、平成12年度に採択された科学技術振興機構の新規事業志向型研究開発成果展開事業「骨・軟骨組織の再生療法：代表者 広島大学歯学部加藤幸夫教授」であった。本予算は総額約2.4億円を投じて間葉系幹細胞（以下 MSC）を使って、骨、軟骨、歯周組織を再生する技術を開発し、ベンチャーを創設して再生医療を実現することが目標であり、私もその一翼を担当することとなった。その結果誕生した（株）ツーセルは、現在でも多くの研究者を抱え、事業を拡大している。広島大学歯学部ではその後も高度先進医療開発経費（A研究）「自己細胞の機能制御による口腔領域の新しい細胞医療の開発」が採択され、総額約3億円を投じて無菌的な細胞調整のための施設、Cell Processing Center (CPC) など、多くの設備が設置され、歯周病態学分野において、世界で初めての歯周組織再生のための臨床研究も開始された¹⁾。さらに、加藤幸夫教授らのグループでは2002年度ひろしま産業振興機構の知的クラスター事業「間葉系幹細胞及び上皮細胞の超増幅法」、2003年度科学技術振興機構事業化のための育成研究「歯周病と骨疾患に対する細胞治療の事業化：幹細胞治療法のシステム化」、2007年度 JST イノベーションプラザ広島 育成研究課題「間葉系幹細胞 (MSC) の安全性判定法とそれを用いた細胞治療法の事業化」など、数千万円規模の予算が連続して採択され、MSC 研究の拠点となっていった。口腔の QOL の向上を目指す連携研究でも広島大学は再生工学代表連携校として、昨年までの5年間、全国大学からの研究者を集めて、毎年「ヒト間葉系幹細胞の分離、培養および骨分化の技術についての講習会」を開催し、私も講師の役を担ってきた。こういった流れの中で、私は顎骨を再生するためのシステムづくりを担当した。歯科補綴領域で現在、現実的で最もニーズの高い再生治療は、この顎骨の再生であると感じていたからである。現在でも、骨を造成するためには、自家骨移植がゴールドスタンダードであるとされているが、採骨部位の侵襲、採骨量の制限などのために、必ずしもすべての患者に受け入れられる治療法とは言えない。「造成」とは元々マンションやビルを造成する意味で使われ、本来の骨を増やす単語は「増生」とされている。そこで、本稿をお借りして国内外の研究に加えて私のグループのこれまでの顎骨再

生医療関連の研究内容について紹介したい。

II. 顎骨増生医療開発のスキーム

再生医療を実現させるためには、目的組織を構成する細胞に分化可能な細胞とそれを支持する担体/支持体が欠かせず、移植サイトの場の環境 (niche) と再生するための時間、そして適切な成長因子が必要になる。小範囲の顎骨を再生する目的であれば、現在の臨床でも担体/支持体として骨補填材・人工骨が用いられているが、再生すべき範囲が広がると骨補填材・人工骨だけの再生は望めない。そこで骨補填材・人工骨等に骨形成能を持たせるために、自己細胞を複合させる方法が多く研究され、臨床応用もされている²⁾。自己細胞の安全な培養には CPC が必要で、安全性の高い培養機器や培地も求められるため、そのコストは極めて高くなる。自己細胞を個別に培養してその品質や安全性を評価することがコスト高に繋がることから、これを回避するために、アログラフトによる軟骨治療も検討されているが³⁾、未知の病原性の存在や、拒絶反応の問題が疑われ、また日本人の感情も他人の細胞を受け入れ難いと考えられるため、普及は困難と考えられる。そこで自己細胞を移植せず、幹細胞培養液中の成分を濃縮して骨を再生しようとする試みもある⁴⁾。しかし我々は、イスを用いた歯周組織欠損モデルに移植した GFP 標識 MSC が歯根膜を構成する細胞や歯槽骨の骨細胞に分化していることを見出したことから、細胞そのものの移植の有用性を感じている⁵⁾。

一方、2006年に樹立された iPS 細胞の登場で、これまでは分化させることが困難であった細胞も作製可能になり、難病の治療に大きく貢献することが期待される。しかし骨はすでに MSC の移植による再生治療の実績があることから、MSC による骨再生医療システムの整備によって患者に、より早く、安全な医療を提供できると考えられる。図1に示すように、MSC による骨増生医療には多くのステップが必要で、そのスキームが円滑に回らなければ実現は困難である。以下に各段階において解決すべき問題と、それに関わる報告を述べる。

1) 患者本人からの細胞採取

(1) 口腔領域からの幹細胞採取

歯科医にとって口腔内の組織は採取が容易であるため、口腔内組織に存在する多分化能細胞は顎骨再生のための有力なツールとなる⁶⁾。口腔内から採取可能な組織は、歯（歯髄と歯根膜）、歯肉、顎骨、骨膜、骨髄、

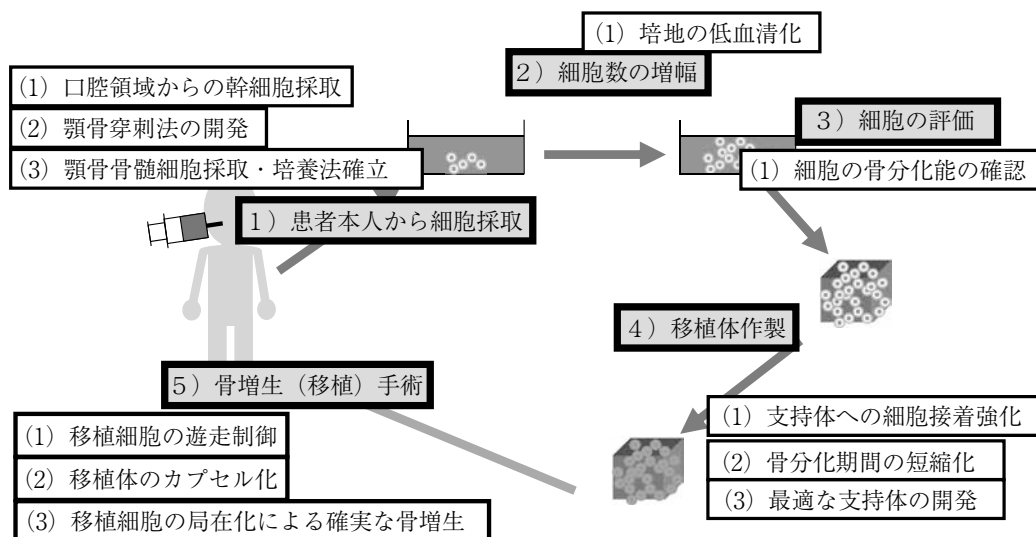


図1 骨増生医療開発のスキーム

臨床応用を考える際はこのスキームがスムーズに回らなければ実現しない。各ステップでこれまで我々が行ってきた研究内容を示す。

脂肪などが考えられ、それぞれから採取可能な細胞を表1に示す。顎骨を再生することが目的であれば、骨を構成する骨膜、骨、骨髓、血管、神経などに分化可能な細胞が候補となる⁷⁾。歯髄や歯根膜は近年、それぞれ国立長寿医療研究センターと東京女子医科大学のグループで臨床研究の細胞ソースとして用いられているが、そもそも抜歯可能な歯が存在しない場合には利用不可能で、特に高齢者で骨増生が必要な患者において抜歯可能な歯が存在することは稀であると考えられるため、顎骨の増生の細胞ソースとしての利用機会は低い。骨片を含めた骨や骨膜は骨切り手術や様々な骨除去手術時に余剰となるが、これらを採取するためには採骨同様に患者の侵襲は大きくなる。歯肉中にも幹細胞が含まれており⁸⁾、我々もその数の濃縮を試みたが、骨分化能の高い細胞数は少なく、採取部位による含有率も異なるため、骨増生のための細胞ソースとしては適していない。脂肪組織は皮下脂肪や口腔内頬粘膜などからも採取が可能で、既に大阪大学の歯周病学講座のグループでは「自己脂肪組織由来幹細胞を用いた新しい歯周組織再生療法の開発」として臨床研究を開始している。一方、我々は世界で初めて顎骨骨髓中のMSCの分化能を検討し、これが腸骨由来のMSCと匹敵する骨分化能を持つことを報告した⁹⁾。この報告を受けて、緒方らのグループは高齢者の顎骨から分離培養したMSCが高い増殖能と骨分化能を持ち、幹

細胞マーカーを発現していることを報告した¹⁰⁾。さらにマウス下顎骨中のMSCと長管骨からのMSCの性質を比較した報告では、両者は同様の骨・軟骨分化能を持つが、下顎骨からのMSCのほうが、長管骨からのMSCよりも免疫寛容能が高いことが報告された¹¹⁾。神経堤由来の顎骨MSCは中胚葉由来の長管骨からのMSCと比較して形成する骨の性質以外に免疫能の違いを持つことは、生物学的にも興味深い。一方MSCの骨髓中での局在を調べるため、我々はMSC特異的遺伝子(LIF, GATA6)を同定し、それを標識として、生体内でのMSCの局在を解析した。その結果、MSCは成獣マウスでの骨内膜の近くと、骨髓内側に存在していることが判明した¹²⁾。これらの基礎的成果を基に、我々は顎骨骨髓由来のMSCを顎骨増生のための細胞ソースとして臨床応用に向けた研究を進めている。

(2) 顎骨穿刺法の開発

古くから白血病治療のために骨髓移植をする際に骨髓穿刺針は使われてきたため、例えば腸骨を穿刺するための穿刺針は多い。しかし腸骨穿刺針は顎骨には適応し難い。そこで我々は顎骨を穿刺しやすい小型の穿刺針を企業と共同開発した(図2A～C:一般医療機器09B2X00010G00056)。例えば、動物モデルで、イヌの歯槽一頬粘膜移行部に1cm程度の切開を入れ、

表1 顎骨再生治療に適した口腔内の細胞ソース

採取細胞	採取機会	採取者	問題点
脂肪由来幹細胞	脂肪組織	形成外科医・口腔外科医	一般的な歯科治療では困難
骨芽細胞・骨膜細胞	骨切り, 骨隆起除去	口腔外科医	多分化能が低い
歯髄・歯根膜細胞	智歯・便宜抜歯	歯科医師	歯を抜かなければ入手困難
歯肉由来幹細胞	口腔粘膜	歯科医師	幹細胞の割合が少ない
顎骨骨髓間葉系幹細胞	顎骨	歯科医師	採取量が少ない

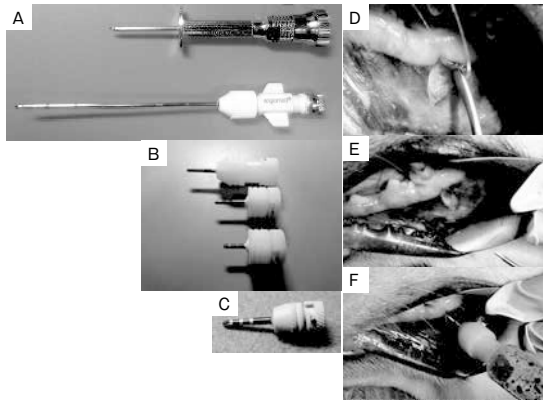


図2 顎骨骨髓用の穿刺針の開発とヒスでの穿刺の例

A: 医科用の骨髓穿刺針上から小宮式穿刺針, オステイカット B: 試作段階の穿刺針 C: 完成した穿刺針 D: ヒスの下顎骨の骨面に至る切開を入れている状態 E: 穿刺針を入れるために2mmのドリルで穿孔した状態 F: 穿孔部分に穿刺針を挿入し10ml シリンジで吸引している様子。骨髓採取は局所麻酔下で5分以内に終了する。

下顎骨を2mmのドリルで穿孔し, そこに本穿刺針をねじ込み, シリンジで吸引することで, 確実に顎骨骨髓液を採取することができるようになった(図2D~F)。我々はその顎骨骨髓液からMSCを効率よく培養するための, 細胞播種濃度を検討するため, 血球計算器を用い, 採取された骨髓液中の有核細胞数(WBC)を計測し, 培養皿への骨髓液の播種密度と, 10日培養後に得られた間質細胞の数を計測した。その結果, 5×10^4 cells/cm²での播種密度をピークに, 高密度で播種するとむしろ得られるMSCの数が減少することが判明した(図3)。これは骨髓液中に存在する赤血球等の非接着系細胞の存在により, 間質細胞の接着が阻害されるためであると考えられた。そこで, この実験以降に採取された骨髓液は 5×10^4 WBC/cm²で培養皿へ播種することとした。

(3) ヒト顎骨骨髓採取・MSC培養法の確立

ヒス顎骨による最適なMSC培養方法のデータを参考に, 我々はヒト顎骨骨髓液の採取とMSCの最適な

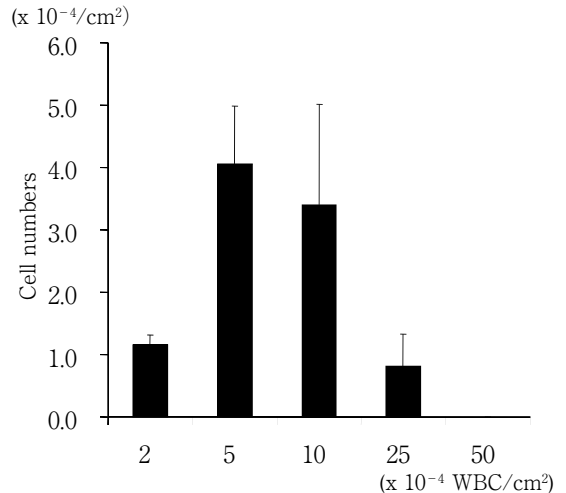


図3 ヒス顎骨骨髓液から培養されたMSC数。

通常の培養皿へ異なるWBC密度で骨髓液を播種し, 培養10日後に得られたMSCの数。

培養法を検討した。私の前任校の長崎大学口腔外科の朝比奈教授らは, 口腔内からの骨原性細胞採取に関する臨床研究を倫理委員会で承認されて実施しており, 採取する組織として骨髓液も含まれていたため, 私も共同研究者として加えて頂き, インプラント埋入直前に溢出する骨髓液を採取してMSC培養を試みた。研究のために患者に新たな侵襲を加えて骨髓穿刺することは倫理的に避けたかったためである。そのため, 毎回採取できる骨髓液の量は大きく異なり, 培養成功率も低かったが, 27名のインプラント埋入患者から顎骨の骨髓液を採取することができた。しかしその中でMSCの増殖が確認でき, 培養が成功した例は15名分のみであった。ただし採取した骨髓液のWBC/RBC比が高い骨髓液のほうが, 培養成功率が高かった。つまり, 今回の方法でインプラント埋入直前に採取した骨髓液には末梢血が混入しており, 実質的なMSCの数が少ないうえに, 赤血球によるMSCの接着阻害があったために, MSCが培養できなかったと考えられる。次にMSCの培養に成功した15例(上顎から3例,

下顎から12例)のMSCの増殖率を検討するため、細胞の累積増殖曲線を解析すると、採取部位や患者年齢の差による細胞増殖率には違いは見られなかった。今回はインプラント埋入予定部位からの骨髄液採取であり、全例でCTスキャンによる骨の解析も行われていたため、採取相当部位のCT値とそこから採取された骨髄液からのMSC増殖率の相関についても解析した。その結果、CT値の高い部位から採取された骨髄液のMSCほど増殖が早い傾向が認められた。さらに増殖したMSCの*in vitro*での骨分化能と、患者の年齢、採取部位のCT値との関係を検討した。その結果、患者年齢も、採取部位のCT値もMSCの骨分化能との間には相関は認められなかった。興味深いことに、*in vitro*で石灰化能の異なるMSCを免疫不全マウスの頭頂骨モデルに移植すると、*in vitro*で石灰化能の低い細胞でも高い骨増生を示した¹³⁾。両細胞の膜発現抗原をフローサイトメトリーで解析すると、いずれもMSCの膜抗原を発現していたが、唯一MSCでは発現が陰性であるはずのHLA-DRが*in vitro*で石灰化能の高い細胞で19%発現していた。HLA-DRは骨芽細胞で高発現する抗原であるが、生体内にこの細胞を移植した際には必ずしも骨増生に有利に働くわけではない事が示唆された。したがって、臨床研究を開始するまでに、*in vitro*での石灰化能以外に、生体内での骨増生能を予測するマーカーを検討する必要があると考えられる。

2) 細胞数の増幅

(1) 培地の低血清化

通常のMSCはウシ胎児血清(FBS)などの血清を10%含有した培地で培養されている。ヒトでの臨床研究では、安全性の観点から、自己血清で培養することになるため、現在実施されている臨床研究では患者から400mlが採血され、決して侵襲の低い医療とは言えない。血清はその個体によって成分にバラツキがあり、そのロット差は細胞の増殖や分化に大きく影響する。また生物由来の因子は未知の病原体を含有している可能性もあるために、完全ゼノフリーの無血清培地の開発が盛んに行われている。多くの研究者から報告されているように、MSCは血清濃度が低い方が増殖能も分化能も高い^{14, 15)}。そこで私は平成16年から3年間、科学技術振興機構 成果育成プログラムA(権利化試験)(代表:広島大学, 二川浩樹教授)の補助を受けて、「抗菌ペプチドを用いた再生医療用幹細胞の大量増殖技術の開発」として、無血清培地の開発を行

い、動物幹細胞培養用無血清培地(特許第4745750号)、新規抗菌性ペプチド(特許第4817335号)、塩基性抗菌性ペプチドを有効成分とする細胞増殖剤(特許第4293889号)を発明した。これらの培地の特徴は、抗生物質を含有せずに細菌の増殖を抑制できる事であった。そして従来の報告と同様に、我々の開発した抗菌ペプチド入りの無血清培地は従来の血清培地に比較し、MSCの増殖能も骨分化能も高かった。一方、加藤幸夫らと(株)ツーセルのグループも完全ゼノフリーの無血清培地を開発し、その後STKシリーズとして上市した¹⁶⁾。しかしこの培地は腸骨由来のMSCや滑膜組織由来のMSCの培養用に開発されたもので、顎骨骨髄MSCを通常の培養皿上で培養すると、セルフラグレーションしてしまい、培養は困難であった(図4)。そのため、血清を1%添加することでこの問題は解決した。そしてSTK2培地に血清を1%添加した培地でも通常の10%含有培地よりも顎骨骨髄MSCの増殖能と骨分化能は高かったため、今後の臨床研究に向けて、詳細な解析を行っている所である。

3) 細胞の評価

(1) 顎骨骨髄由来MSCの幹細胞マーカーの探索

増殖したMSCの多分化能を確認するために、骨・軟骨・脂肪への分化誘導培地により細胞を分化させ、各細胞基質を染色する方法や酵素活性を測定する方法がとられているが、それぞれの細胞に分化するまでには2~4週の培養期間を要する。そこで、我々はMSCの多分化能を早い段階で検出するための遺伝子の探索を行った。MSCは線維芽細胞と形態的に見分けがつかないため、まず、我々は採取時の線維芽細胞のコンタミネーションを否定するために、線維芽細胞とMSCを区別可能な遺伝子をDNAマイクロアレイによって検索した。その結果、tissue factor pathway inhibitor-2, neuroserpin, MHC-DR- α , MHC-DR- β 等がMSCの方で高発現することを報告した¹⁷⁾。その後加藤らは脛骨、腸骨、顎骨の骨髄由来のMSCと線維芽細胞との間、さらにそのMSCの継代数や患者年齢の違いの間での遺伝子発現の違いを検討し、LIF, IGF1, PRG1, MGP, BMP4, CTGF, KCTD12, IGFBP7, TRIB2, and DYNC1H1の組み合わせを多分化能を持つ骨髄MSCの信頼できるマーカーとして提案した¹⁸⁾。

(2) 顎骨骨髄由来MSCの細胞の骨分化能の確認

我々はさらに、MSCの骨分化能予測マーカーを探索する目的で、DNAマイクロアレイ法にて骨、軟骨、

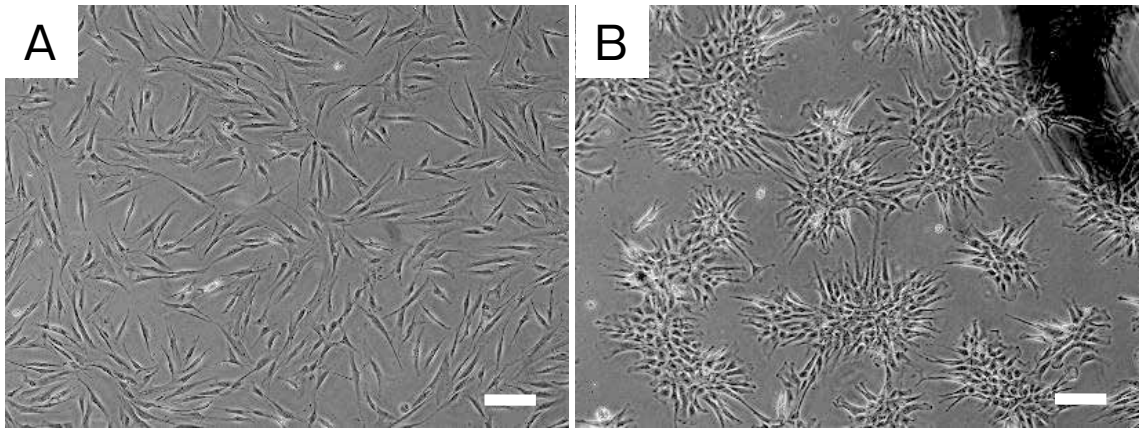


図4 ヒト顎骨髄 MSC の血清 (10%) 含有培地と STK2 (完全無血清培地) による培養による形態の違い。(A) : 血清 (10%) 含有培地, (B) : STK2培地で培養した細胞の位相差顕微鏡像。Bar = 0.2mm。

脂肪分化誘導28日後に変化する遺伝子の中から、骨分化誘導で特異的に発現が変化する遺伝子を絞り込んだ。表2に骨分化誘導時の各遺伝子発現を Realtime-RT-PCR で分析した結果と、その siRNA を MSC へ導入して骨分化誘導した際の細胞増殖、分化マーカーの変化の一覧を示す。その結果、GILZ 遺伝子の発現は亢進し、その siRNA 導入により増殖および骨分化は全体的に抑制された。LBH、ELL2 遺伝子の発現は亢進し、その siRNA 導入により増殖への影響はみられないが骨分化は抑制された。DLXIN-1、ATF7IP 遺伝子の発現は変化しなかったが、その siRNA 導入により骨分化は抑制された。MAML2 遺伝子の発現に変化は認められなかったが、その siRNA により増殖および骨分化は抑制された。FOXO3A、ZFHX4 遺伝子の発現は亢進し、siRNA 導入により初期の骨分化は抑制されたが、最終的な骨分化には影響を与えなかった。LASS5 遺伝子の発現は変化が認められなかったがその siRNA 導入により MSC の最終的な骨分化が促進された。これまで報告にあるように、RUNX2 遺伝子の発現は亢進し、その siRNA 導入は骨分化を抑制した (特願2008-114551 : 骨分化状態を測定する組成物および骨分化を調節する組成物)。我々はさらに早期に確実に骨分化する MSC を見分けるマーカーを探索する目的で、骨、軟骨、脂肪分化誘導24時間後に変化する遺伝子の中で、特に骨分化誘導時に発現が亢進する遺伝子として zinc fingers and homeoboxes 3 (ZHX3) を特定した¹⁹⁾。この遺伝子は RUNX2 や Osterix 等の周知の骨分化特異的転写因子よりも、より早期の骨分化マーカーとして有用であると考えられる。

4) 移植体作製

(1) 支持体への細胞接着強化

立体的な組織を再生するためには、細胞を立体的な支持体へ付着させて生体内へ移植する必要がある、またこの移植体を移送するときの振動、あるいは生体内へ移植した直後のプロテアーゼの刺激によっても細胞が支持体から剥離してしまうことが懸念される。我々は以前から軟骨内骨化を促進する因子として幾つかの植物レクチンの効果を確認していたが²⁰⁾、偶然にもこれらの植物レクチンの中で、*phaseolus vulgaris* erythroagglutinin (PHA-E) or concanavalin A (ConA) が支持体と MSC とを強固に接着させる作用を持つことを発見した (特許4703943号 : 外部刺激に対する抵抗性付与剤, US 特許6,992, 178 B2 : Agent imparting resistance to external stimuli)。具体的には、支持体と MSC を接着後に PHA-E あるいは ConA を短時間処理することで、機械的振動にもプロテアーゼにも耐性を得られることを発見した。さらにチタンやハイドロキシアパタイトを PHA-E あるいは ConA で事前にコーティングすることで MSC の初期接着を促進することも分かった²¹⁾。この発見は複雑な形状の支持体に MSC を確実に接着させる際に有用な技術であると考えられる。

(2) 骨分化期間の短縮化

事前に骨分化誘導した MSC を移植すると、非誘導の MSC を移植するよりも、*in vivo* での骨形成能は高いことが報告されている²²⁾。また、他の細胞でも、骨分化誘導をかけた細胞の移植は *in vivo* での異所性骨

表2 DNA マイクロアレイ解析から選ばれた骨分化特異的遺伝子の siRNA 導入後の細胞変化

骨分化誘導時の発現	遺伝子	細胞増殖	アリザリンレッド染色	カルシウム定量	アルカリフォスファターゼ活性
↑	GILZ	↓	↓	↓	↓
↑	LBH	→	↓	↓	↓
↑	ELL2	→	↓	↓	↓
→	DLXIN	→	↓	↓	↓
→	ATF7IP	→	↓	↓	↓
→	MAML2	↓	↓	↓	↓
↑	FOXO3A	→	→	→	↓
↑	ZFHX4	→	→	→	↓
→	LASS5	→	↑	↑	→
↑	RUNX2	→	↓	↓	↓

化を認めるが、未分化状態の細胞を移植しても異所性骨化を認めない²³⁾。我々は、臨床応用を考えて、通常の成長因子よりも安価で、MSCを確実に骨分化させる因子を検索していた。その結果、前述の ConA が MSC の骨分化を著明に促進することを見出した（特許第4388483号：間葉系幹細胞の骨化及び/又は軟骨化促進剤と骨化及び/又は軟骨化促進方法）。その後の解析で、ConA は MSC の BMP-2分泌を促進し、オートクライン、パラクライン的に骨分化を促進している可能性が示された²⁴⁾。高価なりコンビナント蛋白によって *in vitro* で MSC の骨分化を促進することに代わって、植物由来で安価な ConA の有効性が確認されたのである。

(3) 最適な支持体の開発

骨を増生するためには、細胞は賦形性のある支持体と複合して生体内に移植することが必要であるが、支持体はその後吸収されるべきか、むしろ長期的に形が維持されるべきかという議論がある。生体を完全に再生するという意味では、人工物は完全に生体に置き換わる必要があるが、特にインプラント治療の時に増生した骨が再度吸収してしまうようでは困る。そこで、我々は連通孔を有した焼結型ハイドロキシアパタイトの臨床研究を行い好成績を得た²⁵⁾。しかし適切な力を受けて、機能する骨は吸収しない事は Wolff の法則 (1892年) として知られており、この法則に基づいて、最近のインプラントの形状はデザインされている²⁶⁾。増生した骨にインプラントを埋入する際に、支持体は代謝されて、生体の骨に置換されなければ、インプラント-骨の界面には厳密にはオッセオインテグレーションは獲得されない。そこで1980年代から吸収性のリン酸カルシウム系の骨補填材 (α -TCP や β -TCP 等) の開発が整形外科や歯科の領域で進められてきた。し

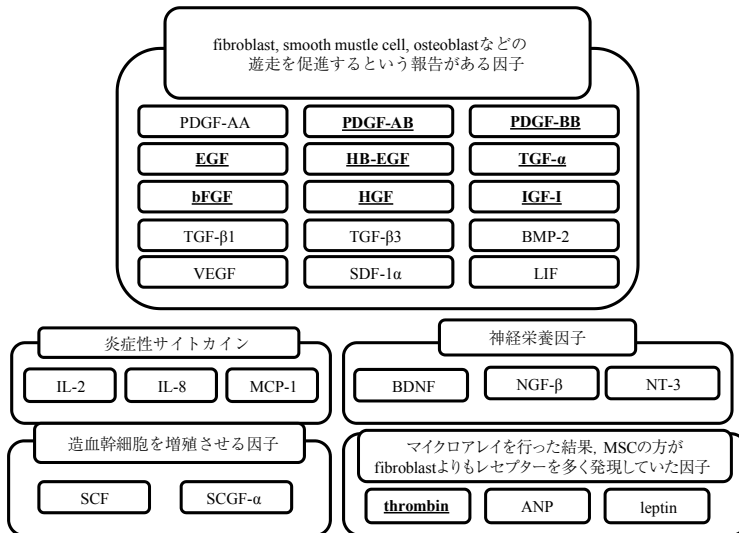
かし骨基質は純粋にリン酸カルシウムのみではなく、炭酸カルシウムやフッ化物、マグネシウム等の元素も含有されているため、より生体骨の構成に近く、置換可能なアパタイトとして、九州大学の石川らはリン酸カルシウムの一部が炭酸基に置換された賦形性のある炭酸アパタイトを開発している²⁷⁾。一方東北大学の鈴木らは骨伝導能が高く、骨に置換可能な Octacalcium phosphate (OCP) を開発している²⁸⁾。バイオマテリアルの世界ではこれらの材料を横並びに評価することなく研究が進められているが、顎骨増生医療の開発には、MSC との組み合わせとして最適な支持体の選択とさらなる改良が必要となる。

5) 骨増生 (移植) 手術

(1) 移植細胞の遊走制御

生体内に MSC を移植した後の挙動については、様々な報告がある。欠損軟骨を再生する目的で、MSC を膝関節欠損モデルに移植すると、2週間後に移植部位から6mm 以上離れた部位に移植した MSC が存在していたとする報告もあることから²⁹⁾、我々は MSC の遊走を制御する因子の同定するため、表3に示す26種類の生体由来因子を検討した。そのうち下線を付けた9つの因子は MSC の遊走を特異的に促進することを発見した（特許第5048323号：損傷組織の治療剤と治療方法、国際特許 US8, 119,397 B2, Australia 2005228778: Therapeutic agents and therapeutic methods for treating injured tissue)。興味深いことに、この中の Thrombin は MSC の遊走能は促進するが、歯肉線維芽細胞の遊走は抑制した³⁰⁾。このことは歯周組織の修復を考えた時、Thrombin を局所投与することで、レシピエントからの MSC の遊走が促進され、周囲組織からの線維芽細胞の遊走を抑制するという、新たな治療薬の開発に繋がるかもしれない。

表3 MSC の遊走能試験に用いた26個の生体由来因子とその分類



(2) 移植体のカプセル化

前臨床研究として私のグループでは、イヌの上顎骨小臼歯を抜歯して無歯顎堤モデルを作製後、同じイヌの顎骨骨髓由来MSCを培養して支持体の顆粒と混和して移植体をシリンジに填塞し、無歯顎堤部分をトンネル状に骨膜剥離し、この移植体を填塞する実験を行っていた。しかし填塞後に切開部分から支持体の顆粒が漏出して、結果として安定した移植が困難であった。そこで、我々は移植体を市販の空カプセルにパッキングして容易にMSC/支持体複合体を移植する方法を考案した(特許第5140804号:生体再生カプセル)。本法では培地を含む移植体をパッキングしてもカプセルは崩壊せず、容易に骨膜下へ確実に全てを挿入可能であった³¹⁾。移植3か月後にはレシピエントの骨と移植体は一体となる個体がみられ、増生部位へ埋入したチタンインプラントは増生骨と癒着していた。本発明は細胞のパッキングのみならず、飲用し難い溶液をカプセル化して、飲用し易くする方法としての応用も期待される。

(3) 移植細胞の局在化による確実な骨増生

さらに我々がイヌによる顎骨増生実験を重ねたところ、前法のシリンジでの移植体移植やカプセルによる移植によって、確実に骨が増生ができる場合(図5)と、移植体が全くレシピエントと癒着しない場合があり、実際はその治療成績には大きなばらつきがあることを経験した。そもそも顎骨増生において移植体は移

植時とその後、必要な増生部位で高い賦形性を維持し、レシピエント骨と連続的に癒着することが必要である。そのためには骨代謝サイクルと類似のスピードで吸収性のある多孔質な支持体とMSCを、何らかの物質でまとめて増生予定部位へ移植する方法が最も理想的である。移植体をまとめるための高粘度物質としては、コラーゲンやフィブリンゲル、ヒアルロン酸などが考えられるが、体温でゲル化しないヒアルロン酸は適さない。コラーゲンはウシや豚から抽出し、抗原性を持つ部分を切断したアテロコラーゲンが市販されているが、あくまで動物由来の材料である。そこで、我々は患者自己の血漿から得られるフィブリンを利用することを考えた。クエン酸入りの採血管で採取した血漿に塩化カルシウムを適量加えることで血液凝固カスケードに従ってフィブリノーゲンがフィブリン化し、MSC/支持体を固めることになる。その際、細胞を多く含む生着層をレシピエントの骨に接するように設置すると、逆に設置するよりも明らかに既存骨との連続性を保って骨が確実に増生することを見出した(特願2012-167382, 図6)。この骨増生メカニズムについては今後解明予定だが、既存骨からの脈管系の誘導が進むことで破骨細胞等も遊走しやすくなり、骨形成に適した環境が早期に形成されるためであろうと推測している。

III. おわりに

以上のように私と私の関連するグループは様々な公

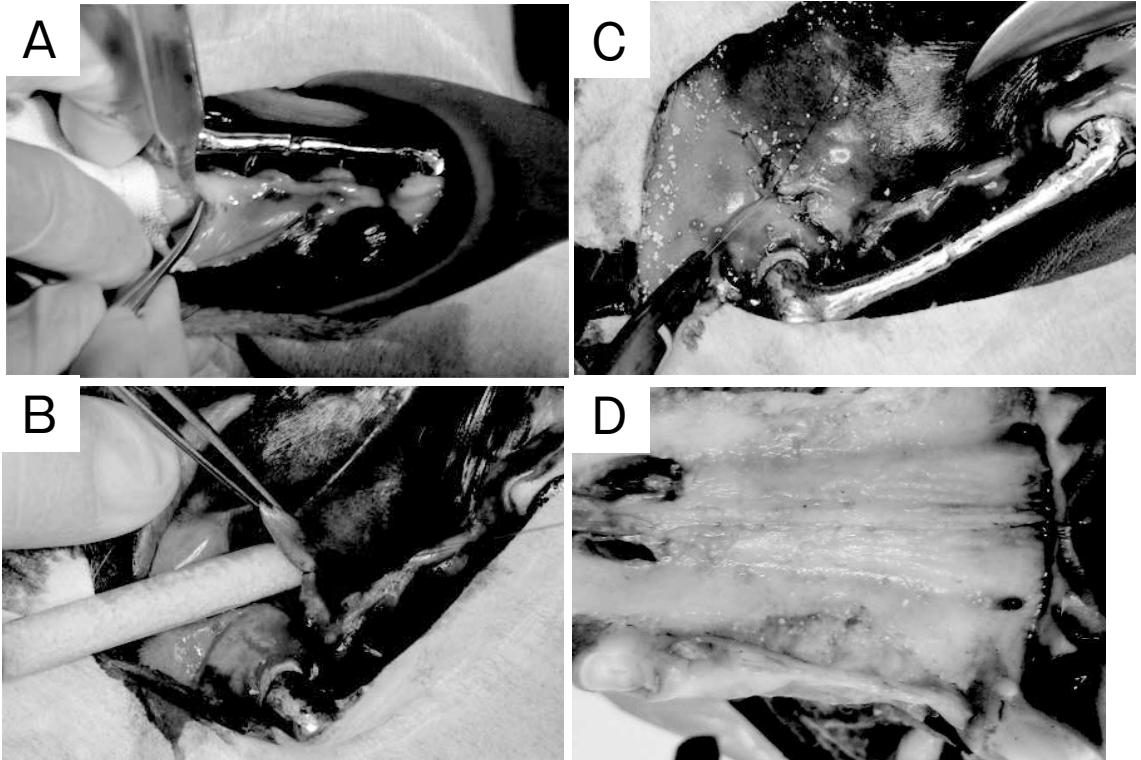


図5 MSC/支持体の移植体をシリンジに装填して骨増生が成功した例

(A)：イヌの上顎骨無歯顎堤モデルにおいて、犬歯相当部の頬側歯槽部に切開を入れている段階。(B)：トンネル状に骨膜を剥離し、先端を切断した1mlシリンジに移植体を充填して、骨膜下に移植体を移植している段階。(C)：移植後に切開部分を縫合した状態。(D)：2か月後に犬の頭部をホルマリンで灌流固定後、上顎骨を剖出し、増生部分の粘膜を剥離した状態。写真下の部分にレシピエントと強固に連続した増生骨が認められる。

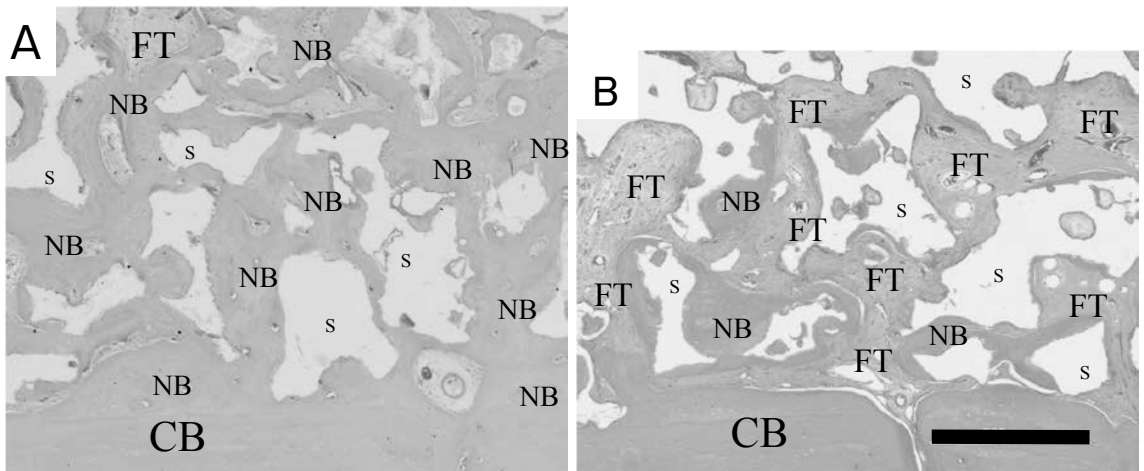


図6 生着層の骨増生への寄与確認

200X10⁴個のMSCを炭酸アパタイト系の支持体と共にラット頭頂骨へ移植し、8週後の組織像。A：生着層を骨面に設置した場合、B：生着層を骨膜側に設置した場合。CB：既存頭蓋骨 NB：新生骨 S：支持体 FT：線維性組織をそれぞれ示す。Bar=0.5mm。(株)ジーシー研究所 生体材料開発グループ 坂井裕大 研究員より提供。

的資金と企業との共同研究によって、顎骨 MSC を用いた骨増生医療の開発に取り組んできた。2007年に採択された NEDO 研究開発技術シーズ育成調査では、我々の開発している顎骨 MSC を用いた骨増生医療が普及した場合は、2016年の国内インプラント市場規模を約1.5倍に増大させるという結果が得られた。超高齢社会を迎える日本人の口腔 QOL を向上するために、インプラント治療は大変有効な手段の一つであるが、そのために採骨を必要とされる患者さんも多いため、本再生医療の実現は補綴・患者主導型のインプラント治療を推進するための有力なツールの一つとなると考えられる。もちろん本医療は、インプラント治療目的の骨増生以外にも、顎口蓋裂や外傷等の骨欠損に対しても有効な治療方法の一つとなろう。

ただし、ヒト幹細胞を用いて患者を治療しようとする臨床研究を実施する際には、その有効性と安全性を十分に検証し、厚生労働省の策定したヒト幹細胞指針に則って行うことが求められている。その中で細胞はこの指針の基準を満たす CPC で培養されることが求められており、そのためのコストも極めて高くなる。しかし2013年4月に再生医療推進法が成立し、細胞・組織の培養・加工を医療機関外に委託できることが明確になったため、培養のコストについては今後解決されることが期待される。今後我々はヒト幹細胞指針に則った、一般歯科開業医に普及しやすい骨再生医療の展開を目指して研究を推進していく予定である。

参考文献

- 1) 河口浩之, 林 秀昭, 水野智仁, 藤岡大助, 内田雄士, 平地昭雄, 毛利吉宏, 岩田倫幸, 足利新, 藤田 剛, 長谷川直彦, 日野孝宗, 吉野 宏, 辻紘一郎, 加藤幸夫, 栗原英見: 自家骨髄間葉系幹細胞移植による歯周組織再生医療法の開発. 再生医療, 4, 69-77, 2005.
- 2) Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., and Akiyama, K.: Stem cells in dentistry—Part II: Clinical applications. *J Prosth Res*, 2012.
- 3) Nagai, T., Sato, M., Furukawa, K. S., Kutsuna, T., Ohta, N., Ushida, T., and Mochida, J.: Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. *Tissue Eng Part A*, 14, 1225-1235, 2008.
- 4) Katagiri, W., Osugi, M., Kawai, T., and Ueda, M.: Novel cell-free regeneration of bone using stem cell-derived growth factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 28, 1009-1016, 2013.
- 5) Hasegawa, N., Kawaguchi, H., Hirachi, A., Takeda, K., Mizuno, N., Nishimura, M., Koike, C., Tsuji, K., Iba, H., Kato, Y., and Kurihara, H.: Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodont*, 77, 1003-1007, 2006.
- 6) Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., and Akiyama, K.: Stem cells in dentistry—part I: stem cell sources. *J Prosth Res*, 56, 151-165, 2012.
- 7) Nishimura, M., Takase, K., Suehiro, F., and Murata, H.: Candidates cell sources to regenerate alveolar bone from oral tissue. *Int J Dent*, 2012, 857192, 2012.
- 8) Davies, L. C., Lonnie, H., Locke, M., Sundberg, B., Rosendahl, K., Gotherstrom, C., Le Blanc, K., and Stephens, P.: Oral Mucosal Progenitor Cells Are Potently Immunosuppressive in a Dose-Independent Manner. *Stem Cells Dev*, 21, 1478-1487, 2012.
- 9) Matsubara, T., Suardita, K., Ishii, M., Sugiyama, M., Igarashi, A., Oda, R., Nishimura, M., Saito, M., Nakagawa, K., Yamanaka, K., Miyazaki, K., Shimizu, M., Bhawal, U. K., Tsuji, K., Nakamura, K., and Kato, Y.: Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 20, 399-409, 2005.
- 10) Han, J., Okada, H., Takai, H., Nakayama, Y., Maeda, T., and Ogata, Y.: Collection and culture of alveolar bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells from older individuals. *J Cell Biochem*, 107, 1198-1204, 2009.
- 11) Yamaza, T., Ren, G., Akiyama, K., Chen, C., Shi, Y., and Shi, S.: Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *J Dent Res*, 90, 317-324, 2011.
- 12) Kubo, H., Shimizu, M., Taya, Y., Kawamoto, T., Michida, M., Kaneko, E., Igarashi, A., Nishimura, M., Segoshi, K., Shimazu, Y., Tsuji, K., Aoba, T., and Kato, Y.: Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells*, 14, 407-424, 2009.
- 13) 西村正宏, 末廣史雄, 黒木唯文, 坂井裕大, 朝比奈泉, 骨増生に向けた顎骨骨髓液採取と間質細胞培養法. *日口インプラント学誌*, 26, 668-675,

- 2013.
- 14) Meuleman, N., Tondreau, T., Delforge, A., Dejeneffe, M., Massy, M., Libertalis, M., Bron, D., and Lagneaux, L.: Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol*, 76, 309–316, 2006.
 - 15) Montzka, K., Fuhrmann, T., Woltje, M., and Brook, G. A.: Expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: serum-reduced medium is better than conventional medium. *Cytotherapy*, 12, 587–592, 2010.
 - 16) 加藤幸夫, 邵 金昌, 長谷川進一, 西村正宏, 桂由紀, 中村憲正, 辻 紘一郎: 幹細胞用無血清培地の開発, 幹細胞医療の実用化技術と産業展望, 東京. シーエムシー出版, pp50–60. 2013.
 - 17) Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., Kawaguchi, H., Sugiyama, M., Kamata, N., Iwata, T., Matsubara, T., Nakamura, K., Kurihara, H., Tsuji, K., and Kato, Y.: Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 332, 297–303, 2005.
 - 18) Igarashi, A., Segoshi, K., Sakai, Y., Pan, H., Kanawa, M., Higashi, Y., Sugiyama, M., Nakamura, K., Kurihara, H., Yamaguchi, S., Tsuji, K., Kawamoto, T., and Kato, Y.: Selection of common markers for bone marrow stromal cells from various bones using real-time RT-PCR: Effects of passage number and donor age. *Tissue Eng*, 13, 2405–2417, 2007.
 - 19) Suehiro, F., Nishimura, M., Kawamoto, T., Kanawa, M., Yoshizawa, Y., Murata, H., and Kato, Y.: Impact of zinc fingers and homeoboxes 3 on the regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Stem Cells Dev*, 20, 1539–1547, 2011.
 - 20) Yan, W., Pan, H., Ishida, H., Nakashima, K., Suzuki, F., Nishimura, M., Jikko, A., Oda, R., and Kato, Y.: Effects of concanavalin A on chondrocyte hypertrophy and matrix calcification. *J Biol Chem*, 272, 7833–7840, 1997.
 - 21) Nishimura, H., Nishimura, M., Oda, R., Yamanaka, K., Matsubara, T., Ozaki, Y., Sekiya, K., Hamada, T., and Kato, Y.: Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells—including bone marrow mesenchymal stem cells—on various scaffolds. *Exp Cell Res*, 295, 119–127, 2004.
 - 22) Agata, H., Asahina, I., Yamazaki, Y., Uchida, M., Shinohara, Y., Honda, M. J., Kagami, H., and Ueda, M.: Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *J Dent Res*, 86, 79–83, 2007.
 - 23) Ikeda, H., Sumita, Y., Ikeda, M., Ikeda, H., Okumura, T., Sakai, E., Nishimura, M., and Asahina, I.: Engineering bone formation from human dental pulp and periodontal ligament-derived cells. *Ann Biomed Eng*, 39, 26–34, 2011.
 - 24) Sekiya, K., Nishimura, M., Suehiro, F., Nishimura, H., Hamada, T., and Kato, Y.: Enhancement of osteogenesis by concanavalin A in human bone marrow mesenchymal stem cell cultures. *Int J Artif Organs*, 31, 708–715, 2008.
 - 25) 宮内美和, 杉山 勝, 西村正宏, 島末 洋, 重石英生, 平岡美里, 武知正晃, 岡本哲治, 赤川安正, 鎌田伸之: インプラント治療に新規連通多孔体ハイドロキシアパタイト人工骨 NEOBONE® を使用した一例. 広大歯誌, 40, 62–65, 2008.
 - 26) Hansson, S.: The implant neck: smooth or provided with retention elements. A biomechanical approach. *Clin Oral Implants Res*, 10, 394–405, 1999.
 - 27) Zaman, C. T., Takeuchi, A., Matsuya, S., Zaman, Q. H., and Ishikawa, K.: Fabrication of B-type carbonate apatite blocks by the phosphorization of free-molding gypsum-calcite composite. *Dent Mater J*, 27, 710–715, 2008.
 - 28) Suzuki, O.: Octacalcium phosphate: osteoconductivity and crystal chemistry. *Acta Biomater*, 6, 3379–3387, 2010.
 - 29) Quintavalla, J., Uziel-Fusi, S., Yin, J., Boehnlein, E., Pastor, G., Blancuzzi, V., Singh, H. N., Kraus, K. H., O’Byrne, E., and Pellas, T. C.: Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials*, 23, 109–119, 2002.
 - 30) Ozaki, Y., Nishimura, M., Sekiya, K., Suehiro, F., Kanawa, M., Nikawa, H., Hamada, T., and Kato, Y.: Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 16, 119–129, 2007.
 - 31) Nishimura, M., Sakai, Y., Suehiro, F., Tsuboi, M., Kamada, K., Hori, T., Sakai, M., Takeda, M., Tsuji, K.,

and Hamada, T.:Interface, implant, regenerated bone and recipient alveolar bone, Interface oral health science 2009, Tokyo. Springer, pp119–122. 2010.