原 著

免疫不全マウスに移植したヒト歯槽骨骨膜由来細胞移植片
の免疫組織学的検索

片山 梨香, 田 胡 和 浩, 尾 形 顕, 出 口 眞 二

神奈川歯科大学大学院歯学研究科歯周病学講座

(受付日: 2010 年 11 月 9 日 受理日: 2011 年 1 月 26 日)

Immunohistochemical analysis of implanted human alveolar bone periosteal cell sheets in
scid mice

Rika Katayama, Kazuhiro Tago, Akira Ogata and Shinji Deguchi

Department of periodontology, Kanagawa Dental College Graduate School

(Received: November 11, 2010 Accepted: January 26, 2011)

Abstract: Previous studies have reported positive reaction for Ki-67, and expression of osteoblastic markers, such as osteopontin and osteocalcin, in three-dimensional sheets of human alveolar bone periosteal cells (HABPCs). The purpose of the present study was to examine the possibility of use of these cells in periodontal regeneration therapy by observing the immunohistochemical changes in HABPC sheets transplanted into immunodeficient mice. One, two, four, and eight weeks after the transplantation, the animals were sacrificed and the process of angiogenesis and osteogenic potential were identified by the expression of blood vessel markers and bone markers. Two weeks after the transplantation, angiogenesis was observed inside/in the HABPCs sheets, which became more and more pronounced with increasing interval after the implantation. Angiogenesis was three identified in hematoxylin and eosin-stained sections at two weeks, and became more pronounced with increasing interval from the transplantation. One week after the transplantation, ALP staining was positive, however, there was no reaction at eight weeks; von Kossa staining was positive at eight weeks after the transplantation. Positive reaction for OP, OC, Col - I and Runx-2 was found at two weeks after the transplantation, in addition to positive reaction for VEGF and FGF-2 at one week. Moreover, positive staining for VWF and CD31 was observed in the transplanted tissue, suggesting that the new blood vessels grew from the recipient mouse tissues. This study suggested that the periosteal cell sheets developed the ability for calcification following transplantation, and therefore appeared to have the potential for use in periodontal regeneration therapy.

Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 53(1): 13-26, 2011.

連絡先: 片山梨香

〒 238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町 82 番地

神奈川歯科大学大学院歯学研究科歯周病学講座

Rika Katayama

Department of Periodontology, Kanagawa Dental College Graduate School

82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-0053, Japan

E-mail: narimatu@kdcnet.ac.jp

Key words : three dimensional structure, regeneration, angiogenesis

要旨 : 以前の研究でヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPCs) を用いた三次元構造を有する細胞シートに Ki-67 の陽性反応, およびオステオポンチンやオステオカルシンなどの骨芽細胞マーカーの発現を報告した。本研究の目的は HABPCs 移植片を免疫不全マウスに移植し, 免疫組織化学的变化を観察することで歯周組織再生療法に使用できる可能性を調べることである。移植 1, 2, 4, 8 週間後に屠殺し, 血管新生と骨形成能の過程は血管マーカーと骨マーカーの発現によって特定された。血管新生は移植 2 週間後に HE 染色において認められ, 移植期間に伴い増加した。また, ALP の陽性所見は移植 1 週間後に観察され, 移植 8 週間後には陰性であった。移植 8 週間後に von Kossa の陽性所見が観察された。OP, OC, Col- I, Runx-2 は移植 2 週間後より, また VEGF, FGF-2 は移植 1 週間後より陽性反応が認められた。また, VWF, CD31 ともに陽性反応を示しており, それらの抗体の種特異性から移植片内部に生じた血管はマウス由来であることが示された。これらのことより, 今回作製した骨膜由来細胞による移植片は, 石灰化能を有することが示され, 歯周組織再生療法に応用できる可能性が示唆された。

日本歯周病学会会誌(日歯周誌)53(1) : 13-26, 2011

キーワード : 三次元構造, 再生療法, 血管新生

緒 言

組織工学的な再生療法は, 今世紀, 最も期待される医療であり, 現在までにその基礎的また臨床的研究は目まぐるしい発展を遂げている。これまで, 歯科における歯周組織再生療法では, 上皮組織や結合組織, セメント質, 歯根膜, 歯槽骨をターゲットとした手法が報告され, 臨床応用されている。再生療法のひとつである組織再生誘導法 (guided tissue regeneration : GTR 法)¹⁾は, 周囲の骨壁が少ない欠損形態に対し, 上皮の侵入を阻止し, スペースメイキングを可能とするバリアーメンブレンを用いて, 歯根膜由来細胞を歯根面に誘導することでセメント質を伴う結合組織性付着を得る治療法である。また, エナメル基質タンパク (Enamel Matrix Derivative : EMD)²⁾を用いた歯周組織再生療法は, 歯根形成期に起こる歯周組織の発生過程を模倣した治療法であり, ヘルトヴィッヒ上皮鞘の内エナメル上皮細胞が分泌するタンパク質により, 象牙質表面に無細胞セメント質の形成を促す。しかし, 骨壁の少ない骨欠損に対する GTR 法は, 清掃性などを考慮した理想的な歯肉形態に導くのは困難であり, 処置後の歯肉の不良形態への対応が必要となる。また, EMD は粘性のある液体であり, スペースメイキングの乏しい点を考慮する必要がある。すなわち, 骨欠損の状態により, 軟組織が陥没を生じる可能性もある。このように, 残存する歯周組織の量の多少が歯周組織再生の成否に影響を及ぼす。しかし, GTR 法や EMD は互いを併用することや, 骨移植材を併用することで, その適応症はさらに拡大している³⁻⁹⁾。そして, 最近, 臨床で用いられている形質転換増殖因子- β

(transforming growth factor- β : TGF- β) や血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor : PDGF) などを成分とする多血小板血漿 (platelet-rich plasma : PRP) は, 骨芽細胞の増殖や I 型コラーゲンの産生促進などが報告されており, 創傷治癒促進や歯周組織再生促進効果が期待されている¹⁰⁻¹⁴⁾。また, 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : FGF-2) は, 線維芽細胞や血管内皮細胞, 骨芽細胞などの細胞増殖を刺激することが報告されており¹⁵⁻¹⁹⁾, さらに強力な血管新生促進作用が注目され, 骨形成タンパク-2 (bone morphogenetic protein-2 : BMP-2)^{20,21)} は骨形成能の高さを利用した治療の実現に向け, 臨床応用研究が進められている。また, 自家骨移植や他家骨移植, 異種材料移植, 代用骨移植なども臨床で用いられている手法であるが, 自家骨移植の場合は採取骨量の制限と二次的な手術野を必要とし, 外科的侵襲による疼痛発症などの欠点がある。また, 異種材料移植においては, 感染のリスクが挙げられ, 代用骨移植は骨伝導能は認められているが, 骨誘導能については否定的であり, 骨を形成する能力には乏しいとされている。このように現在行われている再生療法には, それぞれ利点や欠点があり, 適応の制限がある。理想的な再生療法として, 外科的な侵襲が低いこと, 生体への親和性が良いこと, 感染のリスクのない高い安全性, 操作性や付形性に優れ, 組織再生量や形態の制御が可能なことなどが求められる。

このような条件を満たす方法として, 組織工学的手法が注目されている²²⁻²⁵⁾。この手法は, 足場・細胞・増殖因子と再生の 3 要素²⁶⁾が揃った理想的な材料と考えられる。奥田, 吉江らは培養骨膜シート + PRP + ハイドロキシアパタイトの併用療法にて, アタッチメ

ントゲインの獲得を報告している²⁷⁾。血管が分布しないところに破骨細胞は出現できず、したがって骨形成が起きないため、歯周組織再生には、血管の介入が不可欠となる²⁸⁾。以前、我々はヒト歯槽骨骨膜由来細胞を多層に培養することにより強固な細胞シートを形成し、その細胞シートを折りたたむことにより三次元構造を与え、新しい移植片の作製を試みた。さらに、我々は、その移植片を免疫不全マウスに移植したところ、I型コラーゲン (Col-I), Ki-67, アルカリフォスフォスファターゼ (ALP) 陽性反応が観察され、移植片内部には多数の血管形成を認めた²⁹⁾。しかし、形成された血管がマウス由来のものか、ヒト由来のものか、血管形成のメカニズムや骨への分化の有無は解明されていない。そこで、本研究ではヒト歯槽骨骨膜由来細胞を用いて作製した移植片を免疫不全マウスへ移植し、組織学的検索、免疫組織学的検索を行い、歯周組織再生療法への応用の可能性を検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

本研究は、神奈川歯科大学附属病院に来院した歯周病患者を対象に行った。神奈川歯科大学倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを得た上で、歯周外科処置時に部分層弁にて歯肉剥離を行い、歯槽骨上にある組織を3×3mm程度採取した。採取した組織を骨膜片とし、細分化した後、Cell culture slip (Thermanox Plastic: Nalge Nunc International, USA) で骨膜片を押さえることにより、静置した状態を保ち培養した。その後、細分化した骨膜片から遊走してきた細胞のうち、10% ウシ胎児血清 (FCS: Whittier Bio-products, USA), 0.25mM の L-ascorbic acid-2-phosphate (AsA-2P: 和光純薬, 大阪) および 100 units/ml の penicillin (Gibco, USA), 100μg/ml の streptomycin (Gibco, USA), 3.5mg/ml の D-glucose (和光純薬, 大阪), 10nM の dexamethasone (Dex, 和光純薬), 10mM β-glycerophosphate (β-GP) を添加した α-Minimum Essential Medium (α-MEM: Gibco, USA) の骨分化誘導培地にて1週間培養し、von Kossa 染色陽性の細胞をヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (human alveolar bone periosteal cells: HABPCs) の初代培養細胞とし、実験に供した。初代 HABPCs がコンフルエントに達した後、0.25% Trypsin (ニッスイ, 東京) にて処理し、細胞密度を 1.8×10^4 cells/cm² に調整、37℃, 5%CO₂ 下にて継代培養を行い、継代数3~6のものを使用した。

細胞培養液は、α-MEM に 10% FCS, 0.25mM の

AsA-2P, 100 units/ml の penicillin, 100μg/ml の streptomycin, 3.5mg/ml の D-glucose を添加したものを使用し、2日間毎に培地交換を行った。なお本研究はヘルシンキ宣言を遵守し行った。

2. 細胞シートおよび移植片の作製

細胞シートおよび移植片の作製は、尾形らの方法に従い行った³⁰⁾。すなわち、継代した HABPCs を 1.8×10^4 cells/cm² の密度で直径 60 mm の培養皿に播種、37℃, 5%CO₂ 下で培養を行った。さらに、1週間後、コンフルエントに達した培養皿上に HABPCs を 3.6×10^4 cells/cm² の密度で播種、同様の条件下で培養を3週間行った。2日間毎に、培地交換を行った。4週間培養後、0.25% Trypsin で培養皿から細胞を浮遊させ、細胞シートとした。その細胞シートをピンセットを用いて折りたたんだ後、培養皿上で3日間静置し、三次元構造を与え、移植片とした。

3. 実験動物および移植方法

実験動物は、重症複合型免疫不全症 (SCID) マウス (日本クレア株式会社, 東京), 6週齢, オス, 体重約 20g を使用した。使用した実験動物は、神奈川歯科大学動物実験倫理委員会が定めた「神奈川歯科大学動物実験指針」に基づき取り扱った。

まず、ジエチルエーテル (和光純薬, 大阪) を用い吸入麻酔を行った後、生理食塩水にて10倍希釈したソムノペンチル (共立製薬株式会社, 東京) を 100~110mg/ml の用量で腹腔内投与した。背部を剃毛し、長さ 1cm の切開を入れ、皮下をポケット状に剥離した。そして、作製した移植片を皮下に移植し、4-0 合成吸収性縫合糸 (コーテッドバイクリル: ジョンソン・エンド・ジョンソン, USA) にて縫合した。対照群は、同様に切開、剥離を行い移植はせず、そのまま縫合した。抜糸は術後2週間目に行った。SCID マウスへの移植実験は、1匹あたりに1つの移植片とした。移植後、1, 2, 4, 8週に十分に麻酔を行った後、灌流固定を行った。

4. 組織学的検索

移植片および SCID マウスから採取した組織片は、4% パラホルムアルデヒド水溶液 (和光純薬, 大阪) にて固定後、さらに振とう器にかけた状態で2時間、4℃にて固定した後パラフィン包埋したものをマイクロームにて厚さ 4 mm の切片を作製した。その後、作製した切片を、キシレン (和光純薬, 大阪), 100%, 95%, 90%, 80%, 70% アルコールにて順次脱パラフィンを行った。ALP 染色は、染色キット (和光純薬, 大阪) を用いて、室温で1時間、反応させ水洗した後に停止させた。von Kossa 染色は紫外線下で5% 硝酸銀水溶液 (和光純薬, 大阪) に1時間反応させて水洗した

後に5%チオ硫酸ナトリウム水溶液(和光純薬, 大阪)に3分間反応させ水洗した。そして、ケルンエイトロート水溶液(武藤化学, 東京)にて対比染色を行った。HE染色において炎症性細胞の浸潤を認める部位を境界とし、移植片および移植細胞、マウスの組織およびマウス細胞とを区別、点線で示し、以降の染色にも用いた。

5. 免疫組織学的検索

組織学的検索同様に切片を作製し、脱パラフィン後に、10%正常ヤギ血清(normal goat serum:NGS)でブロッキングを行った。一次抗体は、抗ヒトI型コラーゲン(Col-1)ラビットポリクローナル抗体(1:200:株式会社エル・エス・エル, 東京), 抗ヒトFGF-2ラビット抗体(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, USA), 抗ヒトVEGFラビット抗体(1/50:SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, USA), 抗マウスCD31ラット抗体(1/100:BMA Biomedicals, Netherland), 抗ヒト von willebrand 因子(VWF)ラビット抗体(1/50:SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, USA), 抗ヒトKi67ラビットポリクローナル抗体(1/50:SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, USA), 抗ヒトRunx2ラビットモノクローナル抗体, 抗ヒトオステオポンチン(OP)ラビットポリクローナル抗体(1/1500:CHEMICON INTERNATIONAL), 抗ヒトオステオカルシン(OC)ラビットポリクローナル抗体(1/25:Abd serotec), を用い、4℃で1晩、反応させた。二次抗体は、抗OC, 抗OP, 抗Ki67, 抗Runx2, 抗 von willebrand 因子, 抗ヒトVEGFラビット抗体, 抗ヒトFGF-2ラビット抗体にはRabbit, Immunoglobulins/Biotin (1/400:DAKO, USA)を用いて室温で1時間作用させ、発色はStreptavidin-Cy3 (1/100:Sigma:USA)にて室温で1時間行った。抗CD31には alexa 488ラットIgG(Dako Cytomation)を用いて、室温で1時間作用させた。なお観察は蛍光顕微鏡にて行った。

結 果

1. 移植片の作製

HABPCsは紡錘形を呈しており、60mmの培養皿上に播種を行ったところ、7日間でコンフルエントに達する細胞増殖能があった。また、細胞播種を繰り返すことによってHABPCsを積層することが可能であった。積層したHABPCsをtrypsinを用いてシート状に浮遊させ、ピンセットで細胞シートを折り畳んでも崩れることなく、移植片を作製することができた。また、作製後3日間、静置したところ、ピンセットで把持しても形態を保つことのできる物性を持ち、大き

さは9×5mmで厚みは1.5mmであった。

2. 組織学的所見

HE染色において、移植1週間後の組織内の移植片は、細胞シートを折りたたんだ際にできたと思われる層構造が認められた(図1a)。また、移植2週間後には移植片内部に血管が見られ、血管数は経時的に増加傾向を示した(図1b, c)。移植片は、移植4週間後までは移植時とほぼ同様の形態を保っていたが、移植8週間後には移植片の大きさは移植時の比較し、縮小傾向を示した(図1d)。さらに、移植1週間後には、移植片周辺全体に多くの炎症性細胞が認められたが、移植後2, 4週間後には減少傾向を示しており、移植8週間後にはほとんど見られなかった(図1)。

ALP染色においては、移植1週間において、表層および層構造部に強い陽性反応を示し、移植2, 4週間後に陽性反応を示す部位は表層および内部でも少なくなり、移植8週間においては陽性所見を認めなかった(図2)。von Kossa 染色陽性所見は、移植1, 2週間後には認めず、移植4週間後において移植片中心部の層構造に沿って認められ、移植8週間後には、より広い範囲で認められた(図3)。

3. 免疫組織学的所見

Col-I 陽性反応は、すべての期間において移植片全体に陽性反応を認め、移植片表層、内部に同様の強さの陽性反応であった(図4)。FGF-2 陽性反応は、表層、内部ともに全体的にまばらに陽性反応を認め、経時的に増加傾向を示した(図5)。VEGFは、移植1週間後では移植片周辺に陽性反応を認め、移植2週間後以降は移植片内部にも強い陽性反応を示した(図6)。移植8週間後のVWF, CD31の陽性所見は、同部位で表層、内部ともに強い陽性反応を認めた(図7)。Ki-67においては、移植1, 2週間後では移植片表層に陽性反応を多く認め、内部にはわずかな陽性反応が見られた。移植後4, 8週間後は、1, 2週間後と比較し、内部にも全体的に陽性反応が認められた(図8)。

Runx-2においては、移植1週間後にごくわずかに表層に陽性反応を認め、移植2週間後では増加傾向を示し、内部にも陽性反応を認めた。また、移植4, 8週間後では表層、内部ともに陽性反応部位が増加した。すべての期間において、内部よりも表層の部位において陽性反応は強く認められた(図9)。OC, OP 陽性反応は、移植1週間後には認められず、移植2週間後には移植片表層と内部に弱い陽性反応が見られ、移植4週間後では移植片全体的に認められ、移植後8週間後には移植片の表層, 内部ともに強い陽性反応を示した(図10, 11)。

図1 組織内の移植片の HE 染色像 (× 200), 拡大像 (× 400)

- a: 移植 1 週間後。移植片周囲に炎症性細胞が認められ (矢印), 移植片は層構造を示していた。
- b: 移植 2 週間後。移植片周囲に炎症性細胞が認められたが, 移植 1 週間後と比較し, 減少していた (矢印)。また, 血管様構造が認められた (矢頭)。
- c: 移植 4 週間後。移植片周囲に炎症性細胞はほとんど認められず (矢印), 血管様構造は移植 2 週間後と比較し増加傾向を示した (矢頭)。
- d: 移植 8 週間後。移植片周囲に炎症性細胞は認められず, 明確な血管様構造が認められた (矢頭)。
- T: Transplant BV: Blood Vessel CT: Connective Tissue

図2 組織内の移植片の ALP 染色像 (× 100), 拡大像 (× 400)

- a: 移植 1 週間後。移植片内の層構造部および表層に強い陽性反応が認められた (矢印)。
- b: 移植 2 週間後。移植片内の層構造部および表層に陽性反応を認めたが, 移植 1 週間後と比較し, 陽性反応を示した部位は減少した (矢印)。
- c: 移植 4 週間後。移植 2 週間後と比較し, さらに陽性反応を示した部位は減少し, 移植片内にわずかに陽性反応を認めた (矢印)。
- d: 移植 8 週間後。移植片内および表層に陽性反応は認められなかった。

図3 組織内の移植片の von Kossa 染色像 (× 200)

- a: 移植 1 週間後。移植片内に陽性反応は認められなかった。
- b: 移植 2 週間後。移植 1 週間後と同様、移植片内に陽性反応は認められなかった。
- c: 移植 4 週間後。移植片内に陽性反応が認められた (矢印)。
- d: 移植 8 週間後。移植片内に陽性反応が認められ、移植 4 週間後と比較し、さらに陽性反応を示した部位が増加した (矢印)。

図4 組織内の移植片の Col- I の陽性反応 (× 200)

- a: 移植 1 週間後。移植片内全体に強い陽性反応が認められた。
- b: 移植 2 週間後。移植 1 週間後と同様、移植片全体に強い陽性反応が認められた。
- c: 移植 4 週間後。移植 2 週間後と比較し、陽性反応は減少傾向を示したが、移植片全体に陽性反応が認められた。
- d: 移植 8 週間後。移植 4 週間後と比較し、同様の強さの陽性反応が認められた。

図5 組織内の移植片の FGF-2 染色像 (× 200)

- a: 移植 1 週間後。移植片内に陽性反応が認められた (矢印)。
 b: 移植 2 週間後。移植 1 週間後と同様, 移植片内に陽性反応が認められた (矢印)。
 c: 移植 4 週間後。移植 1, 2 週間後と同様, 陽性反応が認められ, 増加傾向にあった (矢印)。
 d: 移植 8 週間後。移植 1, 2, 4 週間後と比較し, 移植片内全体に広範囲の陽性反応が認められた (矢印)。

図6 組織内の移植片の VEGF 染色像 (× 200)

- a: 移植 1 週間後。移植片内にわずかに陽性反応が認められた (矢印)。
 b: 移植 2 週間後。移植 1 週間後と比較し移植片内の陽性反応は増加傾向を示した (矢印)。
 c: 移植 4 週間後。移植 1, 2 週間後よりさらに陽性反応の増加を認めた (矢印)。
 d: 移植 8 週間後。移植 1, 2, 4 週間後と比較し, 移植片内全体に広範囲の陽性反応が認められた (矢印)。

図7 移植8週間後における組織内の移植片の染色像 (× 200)

- a : HE 染色像。移植片内に血管様構造が認められた (矢印)。
 b : VWF 染色像。移植片内に陽性反応を示した (矢印)。
 c : CD31 染色像。VWF 染色像の陽性反応と同部に陽性反応が認められた (矢印)。

図8 組織内の移植片の Ki-67 染色像 (× 200)

- a : 移植1週間後。移植片内の表層にわずかな陽性反応は認められた (矢印)。
 b : 移植2週間後。移植片内の層構造部に沿って陽性反応が認められた (矢印)。
 c : 移植4週間後。移植片内の表層の層構造部に強く陽性反応を認め、移植2週間後と比較し陽性反応の増加を認めた (矢印)。
 d : 移植8週間後。移植片内および表層に陽性反応が認められた (矢印)。

図9 組織内の移植片の Runx2 染色像 (× 200)

- a: 移植 1 週間後。移植片内にわずかに陽性反応が認められた (矢印)。
 b: 移植 2 週間後。移植 1 週間後より陽性反応部位は増し、移植片内の全体にまばらに陽性反応が認められた (矢印)。
 c: 移植 4 週間後。移植 2 週間後と比較し、さらに陽性反応を示した部位が増加し、移植片内に陽性反応を認めた (矢印)。
 d: 移植 8 週間後。移植片内の全体に強い陽性反応が認められた (矢印)。

図10 組織内の移植片の OP 染色像 (× 200)

- a: 移植 1 週間後。移植片内に陽性反応は認められなかった。
 b: 移植 2 週間後。移植片内にわずかに陽性反応が認められた (矢印)。
 c: 移植 4 週間後。移植 2 週間後と比較し、陽性反応を示した部位が増加した (矢印)。
 d: 移植 8 週間後。移植 4 週間後と比較し、さらに陽性反応が増加し、移植片内全体に陽性反応が認められた (矢印)。

図 11 組織内の移植片の OC 染色像 (× 200)

- a: 移植 1 週間後。移植片内に陽性反応は認められなかった。
 b: 移植 2 週間後。移植片内の表層および内部に弱い陽性反応が認められた (矢印)。
 c: 移植 4 週間後。移植片内に陽性反応が認められ、移植 2 週間後と比較し、陽性反応を示した部位は移植片内部より表層に多く認められた (矢印)。
 d: 移植 8 週間後。移植 4 週間後と比較し、さらに陽性反応が増加し、移植片表層強いに陽性反応が認められた (矢印)。

考 察

骨膜は、骨表面を覆う結合組織であり、骨の発生、栄養供給、成長、再生を司る役割を持っている。骨膜は、組織学的に二つの細胞層で構成されており、一つは骨側にあり骨基質に局在する骨芽細胞・前骨芽細胞の骨形成層、もう一つはその周囲を囲む線維芽細胞の線維層である。骨形成層は、骨芽細胞や骨細胞へ分化する能力のある細胞を含み、線維層には線維芽細胞のほかに細胞外基質を含むと言われている³¹⁻³³⁾。また、培養骨膜の研究報告は数多くされており、その特徴が本来の骨膜と同等であったこと³⁴⁾や冷凍保存においても性質が維持されたこと³⁵⁾などが示されている。今回、我々が用いた歯槽骨骨膜由来細胞も骨芽細胞以外のさまざまな細胞の存在が考えられる。

細胞増殖能の検索には proliferating cell nuclear antigen (PCNA) や Ki-67 などが用いられるが、PCNA は半減期が 24 時間と長く、増殖細胞で合成された PCNA の 40% が G₀期に入った 48 時間後においても検出され、核の染色所見や染色強度に多様性があると言われている。それに対し Ki-67 は半減期が 20 分と短いため、細胞増殖に対する特異性が高いと言わ

れている³⁶⁾。我々は、細胞増殖能マーカーとして Ki-67 を用いたところ、移植 1 週間後において移植片の表層に陽性反応を認めた。陽性反応は経時的に増加傾向を示し、生体内に移植することで休止期にあった HABPCs の増殖期への移行が考えられた。

成人の骨格で起こる一連の骨形成と骨吸収をリモデリングと呼び、骨形成の過程が活性化、吸収、逆転、形成、休止の順序で 5 相の代謝回転として起こる。活性化は、循環血中の単球マクロファージ系から内分泌的環境、力学的環境、基質損傷などの信号により、破骨細胞前駆細胞は前破骨細胞に分化し、骨表面に付着する。そして、多核の破骨細胞になり骨吸収を開始し、その部位は吸収窩となる。吸収が終了すると骨芽細胞前駆細胞が骨芽細胞へと分化・増殖する。骨芽細胞は類骨を形成し、石灰化が進行、骨細胞となり形成は終了する³⁷⁻³⁹⁾。このようにリモデリング・サイクルにおいて、破骨細胞と骨芽細胞は連関して働く。すなわち、破骨細胞前駆細胞は血管から供給されるため、骨形成には血管侵入が重要な役割を担っている。

血管新生を調節するサイトカインとして、VEGF があり、その作用は血管内皮細胞の増殖・分化を促進し、血管新生の中心的役割を果たす^{40,41)}。また FGF-2 は血管内皮細胞や骨芽細胞の細胞増殖を活性化し、血管

新生や骨形成を促進する。今回の研究結果からマウス背部組織内の移植片には移植 1 週間後において層構造部に沿って、VEGF, FGF-2 の陽性反応が認められた。また、HE 染色においても層構造部に沿って、血管構造が認められた。このことから、VEGF や FGF-2 によって血管新生が誘導され、血管様構造を含まない移植片であっても、生体内に移植することで血管新生が起きる可能性が示された。

さらに、骨形成の中心的役割を果たす骨芽細胞は、間葉系幹細胞に由来し、軟骨細胞や脂肪細胞など同一の起源を持つ。その骨芽細胞は、I 型コラーゲン、ALP, OPN など特異的な遺伝子を発現するが、その発現は分化段階によって異なる。骨芽細胞の分化の初期には I 型コラーゲンのマトリックスが形成され、その後 ALP, 続いてオステオネクチン, OPN, OC などの遺伝子発現、タンパク量が上昇する。産生された骨基質は最終的に細胞外へ沈着していく。すなわち、骨芽細胞の前駆細胞は I 型コラーゲンと ALP を、初期の骨芽細胞は OPN と骨シロタンパクを、そして成熟骨芽細胞ではそれらに加え OC も発現する⁴²⁻⁴⁵⁾。移植 1 週間後の移植片内には ALP 陽性反応が認められたため、骨芽細胞の分化が開始していたと考えられる。また、移植 4 週間後から骨形成マーカーである OPN, OC の陽性反応が徐々に増加傾向を示し、ALP の発現が低下した。これらの結果より石灰化の進行が示唆され、von Kossa 染色においては移植 4, 8 週間後より陽性反応を示し、石灰化硬組織が認められた。

また、骨芽細胞は骨基質タンパクに加え、TGF- β , BMP などのサイトカインを産生し、骨芽細胞に作用することで骨組織の維持に重要な役割を担っている。これまで、BMP によって発現誘導が認められる遺伝子として Runx2, Osterix などが報告されている。Runx2 は、骨形成の分子基盤をなす転写因子であり、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化に必須な役割を果たす。そして、Osterix などが前骨芽細胞から未熟骨芽細胞へと分化させ、同時に軟骨細胞への分化を抑制する。また、Runx2 により I 型コラーゲン, OC, OPN, 骨シロタンパクなどの基質タンパク質の発現が調節され、骨芽細胞が骨形成細胞としての機能を示すようになる⁴⁶⁻⁴⁹⁾。移植 1 週間後の移植片内には、Runx2 の弱い陽性反応を認め、移植 4, 8 週間後には移植片全体に陽性反応が認められたため、今回用いた三次元構造を有する細胞シートを生体内へ移植することで HABPCs を骨芽細胞へ分化させていく可能性が示された。

また、VWF は動脈、毛細血管、静脈に至る全身の血管内皮細胞で産生され、血管内皮下組織や血小板に存

在する糖タンパクである。リンパ管の内皮細胞では産生されないため、血管内皮細胞に特異性が高い物質である。CD31 は内皮細胞および内皮細胞間、単球に発現する膜抗原である。白血球に対しては血管内皮への接着や血管外遊走に関与し、内皮細胞同士の接着などにも関与するため、血管内皮細胞マーカーとして用いられる。そこで、今回の移植実験で認められた新生血管が、マウス由来かヒト由来かの判定をするため、VWF 抗体はマウスとヒト、CD31 はマウスにのみ交差反応を示す血管内皮細胞マーカーを用いた。すなわち、VWF 陽性反応のみ認められればヒト由来、VWF および CD31 陽性反応が認められればマウス由来の新生血管であると判定できる。その結果、組織内の移植片は、VWF, CD31 とともに陽性細胞を認めた。このことにより、ヒト由来の歯槽骨膜細胞を用いた移植片を移植したことで、ホストであるマウスの血管が移植片に侵入し、休止期にある細胞に栄養を与え HABPCs を骨芽細胞へ分化させ、骨形成を促す可能性が明らかになった。また、組織内の移植片の血管は、細胞シートを折り畳んだ際にできた折り目より形成される所見が認められた。今後はこのメカニズムを検討することで、移植に最適な細胞シートの作製方法や期間を決定する必要がある。また、線維芽細胞等の他の細胞との比較を行い、有用性を検討する必要性があると考えられる。

以上のことから、作製した移植片は自己由来の細胞と足場を兼ね備え、また、血管新生を促し、骨形成を誘導する優れた移植材となる可能性が示唆された。しかし、培養期間に 4 週間かかっていることから、さらに効率よく細胞シートを作製可能にするため、血管新生のメカニズムを検討することで、細胞濃度や播種のタイミングなどを検討する必要性があると考えられる。また、歯周組織再生に適した移植片の厚みや形態なども今後の課題であると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜りました本学人体構造学講座組織学分野高橋 理教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に対し、多くのご教示とご閲覧を戴きました口腔治療学講座歯科保存学分野寺中敏夫教授、および研究環境を整えて下さり、研究指導して下さいた自然科学講座歯科生体工学分野川瀬俊夫教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行に対し、御理解と御支援を戴きました口腔治療学講座歯周病学分野の諸先生方に感謝致します。

本論文の要旨は、第 53 回秋季日本歯周病学会学術大会（平成 22 年 9 月 19 日）において発表した。

文 献

- 1) Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 9 : 290-296, 1982.
- 2) Heijl L : Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect A case report. *J Clin Periodontol*, 24 : 693-696, 1997.
- 3) Vojislav Lekovic, Paulo M. Camargo, Michael Weinlaender, Zoran Aleksic, E. Barrie Kenney, Melica Nedic : A Comparison Between Enamel Matrix Proteins Used Alone or in Combination With Bovine Porous Bone Mineral in the Treatment of Intrabony Periodontal Defects in Humans. *J Periodontol*, 71 : 1110-1116, 2000.
- 4) Diega Velasquez-Plata, E. Todd Scheyer, James T. Mellonig : Clinical Comparison of an Enamel Matrix Derivative Used Alone or in Combination With a Bovine-Derived Xenograft for the Treatment of Periodontal Osseous Defects in Humans. *J Periodontol*, 73 : 433-440, 2002.
- 5) E. Todd Scheyer, Diega Velasquez-Plata, Michael A. Brunsvold, David J. Lasho, James T. Mellonig : A Clinical Comparison of a Bovine-Derived Xenograft Used Alone and in Combination With Enamel Matrix Derivative for the Treatment of Periodontal Osseous Defects in Humans. *J Periodontol*, 73: 423-432, 2002
- 6) Sculean A, Windisch P, Chiantella GC, Donos N, Brex M, Reich E : Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *J Periodont Res*, 28 : 397-403, 2001.
- 7) Brian S. Gurinsky, Michael P. Mills, James T. Mellonig : Clinical Evaluation of Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft and Enamel Matrix Derivative Versus Enamel Matrix Derivative Alone for the Treatment of Periodontal Osseous Defects in Humans. *J Periodontol*, 75 : 1309-1318, 2004.
- 8) Vojislav Lekovic, Paulo M. Camargo, Michael Weinlaender, E. Barrie Kenney, Nikola Vasilic : Combination Use of Bovine Porous Bone Mineral, Enamel Matrix Proteins, and a Bioabsorbable Membrane in Intrabony Periodontal Defects in Humans. *J Periodontol*, 72: 583-589, 2001
- 9) Rosen PS, Reynolds MA : A retrospective case series comparing the use of demineralized freeze-dried bone allograft and freeze-dried bone allograft combined with enamel matrix derivative for the treatment of advanced osseous lesions. *J Periodontol*, 73 : 942-949, 2002
- 10) Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H, Sato T, Kawase T, Saito Y, Wolff LF, Yoshie H : Platelet-Rich Plasma Combined With a Porous Hydroxyapatite Graft for the Treatment of Intrabony Periodontal Defects in Humans: A Comparative Controlled Clinical Study. *J Periodontol*, 76 : 890-898, 2005
- 11) Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H : Platelet-Rich Plasma-Derived Fibrin Clot Formation Stimulates Collagen Synthesis in Periodontal Ligament and Osteoblastic Cells In Vitro. *J Periodontol*, 74 : 858-864, 2003
- 12) Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzui H, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-Rich Plasma Contains High Levels of Platelet-Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor- β and Modulates the Proliferation of Periodontally Related Cells In Vitro. *J Periodontol*, 74:849-857, 2003
- 13) Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H: Tissue-Engineered Cultured Periosteum Used With Platelet-Rich Plasma and Hydroxyapatite in Treating Human Osseous Defects. *J Periodontol*, 79:811-818, 2008
- 14) Kawase T, Okuda K, Saito Y, Yoshie H: In Vitro Evidence That the Biological Effects of Platelet-Rich Plasma on Periodontal Ligament Cells Is Not Mediated Solely by Constituent Transforming-Growth Factor- β or Platelet-Derived Growth Factor. *J Periodontol*, 76:760-767, 2005
- 15) Murakami S, Takayama S, Kitamura, M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H: Recombinant human basic fibroblast growth factor (b-FGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodont Res*, 38:97-103, 2003
- 16) Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okuda H: Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 32:667-675, 1997
- 17) Takayama S, Yoshida J, Hirano H, Okada H, Murakami S: Effects of Basic fibroblast Growth Factor on Human Gingival Epithelial Cells. *J Periodontol*, 73:1467-1473, 2002
- 18) Takayama S, Murakami S, Nozaki T, Ikezawa K, Miki Y, Asano T, Terashima A, Okada H: Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 33:315-322, 1998
- 19) Shimabukuro Y, Ichikawa T, Takayama S, Yamada S, Takedachi M, Terakura M, Hashikawa T, Murakami S: Fibroblast growth factor-2 regulates

- the synthesis of hyaluronan by human periodontal ligament cells. *J cell Physiol*, 203:557-563, 2005
- 20) Gaston NK, Francis JH: Effects of Occlusal Loading on Ankylosis, Bone, and Cementum Formation During Bone Morphogenetic Protein-2-Stimulated Periodontal Regeneration In Vivo. *J Periodontol*, 70: 1125-1135, 1999
- 21) Q-M. Jin, O. Anusaksathien, S.A. Webb, R.B. Rutherford, W. V. Giannobile: Gene Therapy of Bone Morphogenetic Protein for Periodontal Tissue Engineering. *J Periodontol*, 74:202-213, 2003
- 22) Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M: Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*, 31:27-33, 2003
- 23) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H: Enhancement of Periodontal Tissue Regeneration by Transplantation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *J Periodontol*, 75:1281-1287, 2004
- 24) Okuda K, Momose M, Murata M, Saito Y, Inoue M, Shinohara C, Wolff LF, Yoshie H: Treatment of Chronic Desquamative Gingivitis Using Tissue-Engineered Human Cultured Gingival Epithelial Sheets: A Case Report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 24:119-125, 2004
- 25) Murakami S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T: Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodont Res*, 38:97-103, 2003
- 26) R Langer, JP Vacanti: Tissue Engineering. *Science*, 260:920-926, 1993
- 27) 奥田一博, 吉江弘正: 細胞培養シート移植を応用した歯周組織再生法. *日歯科評論*, 別冊: 164-169, 2009
- 28) 岸 好彰, 高橋好文, 東 文吉, 松尾雅斗, 長谷川次郎: 咬合機能下におけるインプラント骨界面と微小循環. *日歯周誌*, 43:43-51, 2001.
- 29) 尾形 顕, 辻上 弘, 杉本 久, 根本賢治, 菅谷彰, 川瀬俊夫, 出口真二: ヒト由来骨膜細胞による構造体の免疫不全マウスへの移植. *日本歯周病学会学会誌*, 48:119, 2006.
- 30) 尾形 顕, 出口真二: ヒト歯槽骨骨膜由来細胞を用いた新しい移植片作製法. *日歯周誌*, 48:192-200, 2006.
- 31) Konstantinos NM, Loukia KP: The healing potential of the periosteum Molecular aspects. *J Injury*, 36: S13-S19, 2005
- 32) Arthur Lewis Eyre, M.B., F.R.C.S.: The Periosteum: Its Function Reassessed. *Clin Orthop*, 189: 303-307, 1984.
- 33) Seeman E: Periosteal bone formation--a neglected determinant of bone strength. *N Engl J Med*, 349: 320-323, 2003
- 34) Mizuno H, Hata K, Kojima K, Bonassar LJ, Vacanti CA, Ueda M: A novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum. *Tissue Eng*, 12:1227-1335, 2006
- 35) Mase J, Mizuno H, Okada K, Sakai K, Mizuno D, Usami K, Kagami H, Ueda M: Cryopreservation of cultured periosteum: Effect of different cryoprotectants and pre-incubation protocols on cell viability and osteogenic potential. *J Cryobiol*, 52: 182-192, 2006
- 36) Rose DSC, Maddox PH, Brown DC : Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol*, 47 : 1010-1014, 1994.
- 37) AM Parfitt: The cellular Basis of Bone Remodeling: The Quantum Concept Reexamined in Light of Recent Advances in the Cell Biology of Bone. *Calcif Tissue Int*, 36, S37-S34, 1984
- 38) Ellen MH, Dorte Q, Erik FE, Leif Mosekilde, Flemming M: Cancellous Bone Remodeling Occurs in Specialized Compartments Lined by Cells Expressing Osteoblastic Markers. *J Bone Miner Res*, 16, 1575-1582, 2001
- 39) AM Parfitt: The Mechanism of Coupling: A Role for the Vasculature. *Bone*, 26:319-323, 2000
- 40) Fouad S, Janet R, Terry PY, Marina G, Xiang-Fu W, Martin LB, Andre CS: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376: 62-68, 1995
- 41) Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H: Vascular Endothelial Growth Factor Can Substitute for Macrophage Colony-Stimulating Factor in Support of Osteoblastic Bone Resorption. *J Exp Med*, 190: 293-298, 1999
- 42) William TB, Helena R: The Nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*, 39: 169-179, 1995.
- 43) Ohgushi H, Caplan AI : Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*, 48 : 913-927, 1999.
- 44) Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG : Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res*, 285 : 491-500, 1996.
- 45) Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE: Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and

- protein expression during osteoblast differentiation: Polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol*, 166: 220–234, 1994.
- 46) Theo PH, Daniela S, Makoto MT, Walter B, Christine H: Canonical Wnt/beta-Catenin Signaling Prevents Osteoblasts from Differentiating into Chondrocytes. *Dev Cell*, 8: 727–738, 2005.
- 47) Hongliang H, Matthew JH, Xiaolin T, Kai Y, David MO, Fanxin L: Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*, 132: 49–60, 2004.
- 48) Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, Miyazaki T, Kitaura H, Nakamura K, Fujita T, Kanatani N, Moriishi T, Yamana K, Liu W, Kawaguchi H, Nakamura K, Komori T: Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev Dyn*, 236: 1876–1890, 2007.
- 49) Hannes S, Stephen JG, Reinhard E, Otto M, Walter S, Watchara K, Barbara S, Eva S, Walter K: Molecular Characterization and Functional analysis of the surface protein CD31. *J Immunol*, 145: 3889–3897, 1990.
-