

皮質骨由来細胞によるティッシュエンジニアリングは
移植歯周囲への骨形成を促進する

松村 奈穂美

大学院歯学独立研究科 硬組織制御再建学講座
(主指導教員: 芳澤 享子 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Tissue engineering with compact bone-derived cell spheroids
accelerates bone formation around transplanted tooth

Nahomi Matsumura

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor: Professor Michiko Yoshizawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

【目的】

小児の永久歯の先天欠如に対する治療の選択肢として、歯の移植が行われている。しかしながら、骨幅の狭い歯槽骨への歯の移植は困難であるため、適応となる症例に限られる点が問題であった。近年、培養細胞、担体、生理活性物質等を組み合わせることで組織を再生させるティッシュエンジニアリングの手法が注目されている。そこで本研究では、ティッシュエンジニアリングの手法を歯の移植に併用することで移植歯周囲に骨を形成させ、骨が狭小な歯槽部への歯の移植を可能にする方法について検討を行った。

【材料と方法】

3週齢雄性 C57BL/6J マウスを麻酔薬の過量投与により安楽死させた後、上顎第一、第二臼歯の抜去を行った。大腿骨と脛骨の両端を切断し、フラッシュアウトにて骨髓細胞を採取した後、密度勾配遠心法にて単核球 (MNC) を採取した。次に皮質骨を細切し、コラゲナーゼにて酵素処理を行った後、皮質骨由来細胞 (CBDC) を採取した。皮質骨由来細胞は、2 継代後にスフェロイド形成用ディッシュへ播種し、24 時間後にスフェロイドを回収した。スフェロイドは使用時まで凍結保存した。細胞の担体として、アテロコラーゲンスポンジを整形して用いた。CBDC 群 (CBDC スフェロイド + アテロコラーゲンスポンジ + 歯)、MNC 群 (MNC + アテロコラーゲンスポンジ + 歯)、Collagen 群 (アテロコラーゲンスポンジ + 歯) および Tooth 群 (歯のみ) の 4 群を設定し、ペントバルビタールによる全身麻酔下で、それぞれを 6~8 週齢雄性 SCID マウス背部皮下へと移植した。4 週後に移植物を摘出し、中性ホルマリンにて固定後、 μ CT と分析用ソフトウェアを用いて新生骨の解析を行った。撮影後に移植物を脱灰、脱水し、パラフィンに包埋した。薄切したサンプルは、H-E 染色、マッソントリクローム染色、TRAP 染色および SP7 に対する免疫染色により評価した。

【結果】

4 群とも骨形成が認められたが、新生骨量は CBDC 群が他の 3 群と比較して有意に多かった。4 群すべてにおいて根管中隔に新生骨が認められた。MNC 群、Collagen 群、Tooth では歯根外側への骨形成は僅かであったの

に対し、CBDC 群では歯根外側に多くの骨形成を認め、一部の移植体では新生骨は歯冠周囲に及んでいた。骨密度(BV/TV)は各群間で有意差が見られなかったが、CBDC 群では Tooth 群、Collagen 群と比較して骨梁数(Tb.N)が少なく、骨梁間隙(Tb.Sp)、骨梁中心距離(Tb.Spac)は低値であったことから、CBDC 群における新生骨の骨梁構造は疎であると考えられた。HE 染色では、4群とも幼弱な骨形成が見られ、新生骨と歯根の間には歯根膜様の線維性組織が介在していた。しかしながら、根尖部付近ではセメント質の肥大と置換性骨吸収がみられた。マッソントリクローム染色では、4群とも新生骨と歯根との間の線維は濃染する膠原線維であり、歯根膜様の構造が見られた。

【考察】CBDC 群では、MNC 群、Collagen 群、Tooth 群と比較して新生骨量が有意に増加しており、新生骨は根幹中隔以外に歯根外側にも認められた。この結果から、CBDC スフェロイドによるティッシュエンジニアリングを併用することで、歯の移植と同時に骨増生が得られる可能性が示された。一方、単離された MNC では明らかな骨形成は認められなかったことから、併用する細胞には高い骨形成能が必要と考えられた。新生骨と歯根の間には歯根膜様の膠原線維が存在し、ティッシュエンジニアリングによる骨形成においても歯根膜は維持されることが示された。しかしながら、歯根尖付近ではセメント質の過形成や置換性骨吸収も見られたことから、根尖部での骨性癒着や歯根吸収が起こる可能性には注意が必要と考えられた。本研究では異所性の移植モデルを用いているため、移植歯に対する機能負荷の影響について検討することはできなかった。今後は同所性の移植モデルを用いて、さらに機能負荷の影響や新生骨の長期予後についても検討を行う必要があると考えられた。

緒言

永久歯の先天欠如は人口の 0.15～16.2%とされており、治療が必要な症例も少なくない¹⁾。先天欠如に対する治療として、補綴治療、矯正治療やインプラントによる治療の他に、患者自身の別の部位の歯を移植する自家歯牙移植が行われている¹⁾。ブリッジによる補綴治療では隣在歯を削る必要があるが、自家歯牙移植ではその必要がない。また、矯正治療やインプラント治療と比較して、治療期間が短い点や費用も安価である点がメリットと考えられる²⁾。これまでの研究では比較的良好な予後が示されており、Rohofらによれば根未完成歯移植の10年後の成功率は96.3%であり³⁾、合併症は、歯髄壊死、歯根吸収、アンキローシスの順で、それぞれの発生率は3.3%、2.9%、2.0%であった。また、Machadoらのsystematic reviewでは、6年以上経過した移植歯の予後は75.3%から91%⁴⁾であり、Yangらの研究では10年後の生存率は74%と報告されている⁵⁾。

一方、自己歯牙移植の欠点として、予後が移植される受容側の骨の状態に影響されることが挙げられる⁶⁾。移植後にも移植床外側の皮質骨が保たれている必要があるため、移植床の骨幅は移植歯より大きくなくてはならないが、それだけの骨幅が確保できない症例も少なくない。例えば上顎側切歯は先天欠如が頻繁に見られる部位であるが、小臼歯や大臼歯などのドナー候補歯のサイズと比較すると、骨幅が十分ではない場合も多い²⁾。このように骨幅の狭い歯槽骨への歯の移植が可能になれば自家歯牙移植の適応が広がると考えるが、現在そのような治療法はない。

骨幅の狭い歯槽部への移植を可能にする方法として、移植床部にあらかじめ骨増生を行うことが考えられる。しかしながら骨増生と歯の移植という複数回の手術が必要となり、患者への負担が大きい。歯の移植と同時に骨増生を行うことができれば、手術回数を減らすことができるとともに治療期間の短縮が見込まれ、患者負担を軽減することができる。現在歯槽骨の増生には自家骨や人工骨の移植などが用いられている^{6, 7)}。自家骨移植では骨再生の確実性が高いものの健全な組織を傷つける必要がある⁸⁾。人工骨による骨増生では、移植部位の欠損形態や再生骨量に制限があり、創の哆開などの合併症も多い^{6, 7)}。再生医療は培養された細胞などを利用して組織を再生する新しい概念であり、歯科領域でもインプラント治療を対象とした骨再生治療がすでに臨床応用されている^{9, 10)}。特に細胞と生体吸収性材料を用いて組織再生を行うティッシュエンジニアリング(組織工学)が骨再生治療の主要な方法となっている^{9, 11)}。内川らは、歯の移植に β -TCPブロックによる担体と骨髄単核球細胞(MNC)を用いたティッシュエンジニアリングを併用することで、歯槽骨再生を同時に行う可能性について検討を行った¹²⁾。その結果、歯の周囲への骨再生は促進されたものの、 β -TCPブロックは複雑な歯槽骨や抜去歯に形態を合わせることが技術的に困難であり、一部では骨性癒着が認められるなどの問題があった。また、MNCによる骨再生促進効果は認められず、より高い骨再生能を有する細胞と賦形性に優れた担体が必要と考えられた。

本研究では、これまでの研究から優れた幹細胞性と高い骨再生能を有することが報告されて

いる皮質骨由来間葉系間質細胞 (Compact bone-derived mesenchymal stromal cells: CB-MSCs) を浮遊培養することで得られるスフェロイドを用いることとした^{13, 14, 15)}。また、賦形性に優れたコラーゲンスポンジ¹⁶⁾を担体として採用することで、より臨床応用に適した手法の開発を目指した。

材料と方法

本研究における動物実験は、「松本歯科大学動物実験委員会」の承認を得て行った (承認番号 318)。実験の流れを図 1 に示す。

1. 実験動物

C57BL / 6J 雄マウスおよび C.B-17/IcrHsd-Prkdcscid (SCID)雄マウスを日本 SLC から購入し、松本歯科大学ハイテクセンターの実験動物施設で飼育した。飼育環境は、12 時間の明暗サイクルで温度は $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50~60%に制御された部屋で、飼料と水は自由摂取とした。

2. 担体

細胞の担体として、アテロコラーゲンスポンジ (テルプラグ®S サイズ, オリンパステルモバイオマテリアル株式会社) を直径 8 mm, 高さ 5 mmの半円形に成型した。断面には歯牙を挿入するための陥凹を形成し、一晩 UV 照射を行い滅菌後使用した。

3. 抜歯および細胞調製

歯および細胞採取には、3 週齢 C57BL / 6J 雄マウス 30 匹を使用した。ペントバルビタールを腹腔内に過量投与し、安楽死させた後、直ちに根管充填用ピンセットにて上顎の第 1 臼歯 (M1) と第 2 臼歯 (M2) を抜去した。歯の形成段階は Moorrees らの分類で R3/4 であった¹⁷⁾。歯の移植の成否は残存する歯周組織の面積に依存するため^{1, 2, 3, 18)}、抜歯の際には歯根膜を保護するよう細心の注意を払った。抜去した歯は MEM α 培地 (富士フィルム和光純薬株式会社) に浸漬した上で、実体顕微鏡 (LEICAMZ6; Leica Mikrosysteme) で抜去歯および歯根膜の状態を確認し、付着した骨の断片が見られた場合には除去した。歯根膜が失われているものや、歯根破折を生じているものは移植には使用しなかった。抜去歯は移植するまで同じ培地中に浸漬して保管した。

次いで同マウスから脛骨と大腿骨を剖出し、周囲の筋、腱、骨膜等の付着軟組織を除去後、両側の骨端部を切断した。切断面から 27G 針付き注射器を用いて骨髓腔を MEM α で洗い流し、骨髓細胞を採取した。MNC の分離には、密度勾配遠心分離法を用いて、Uchikawa らの方法に従って行った¹²⁾。具体的には Lymphocyte-Mammal (Cedarlane, Burlington) を用いて 22°C 、600 g で 20 分間遠心分離を行い、Buffy coat の細胞をピペットにて採取して MEM α を加え懸濁した後、再度 22°C 、600 g で 10 分間遠心分

離を行った。上清を除去し、MEM α で 1.0×10^6 個/ μ l になるよう再懸濁した。

CB-MSCsは、これまでに報告されたプロトコールに従って分離、培養を行った^{19, 20)}。MNCの抽出後に残った骨組織をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-); 富士フィルム和光純薬株式会社)に移し、剪刀で1~2 mmの断片に切断した。得られた骨細片を50 mlの遠心管に入れ、25%コラゲナーゼ(富士フィルム和光純薬株式会社)と20%ウシ胎児血清 (FBS; Biowest)を含む20 mlのPBS(-)に浸漬し、バイオシェーカーを用いて37°C, 90 rpmで45分間振盪した。40 μ mのセルストレーナーを通して夾雑物を除去し、細胞を別の遠心管に集めた。細胞は、10%FBS, 1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アンホテリシン(Biological Industries USA, Inc.), および10 ng/ml組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF; PeproTech) 添加MEM α 中で培養した。細胞が80%コンフルエントに達した時点でトリプシンにて回収し、2継代目の細胞を以前の報告¹⁴⁾に従って55 mm径の自発的スフェロイド形成用培養ディッシュ (AS ONE) に 1.5×10^4 細胞/ cm^2 の密度で播種した。播種24時間後にCB-MSCsスフェロイドを回収し、凍結保存液 (STEM-CELLBANKER, タカラバイオ株式会社) 中で使用直前まで-80°Cにて保管した¹⁵⁾。使用直前に38°Cのウォーターバスにて急速融解した。

4. 細胞の播種と移植

細胞を採取したマウスとは別個体の6~8週齢のSCID雄マウス10匹の背部4か所を移植部位とし、それぞれの移植位置をTooth群, Collagen群, MNC群, CB-MNC群の4群にランダムに割り当てた(n=6~8)。Tooth群では、足場であるアテロコラーゲンを使用せず、抜去した歯のみを移植した。Collagen群では、抜去した歯をアテロコラーゲン内に挿入し、50 μ lの培地を滴下して移植した。MNC群では、抜去した歯をアテロコラーゲン内に挿入し、 1.0×10^6 個のMNCを播種して移植した。播種MNCの数は、文献²¹⁾および予備実験に基づいて決定した。CB-MSC群では、MNC群と同様に抜去した歯をアテロコラーゲン内に挿入し、 1.0×10^6 個のCB-MSCsスフェロイドを播種後移植した。

ペントバルビタールの腹腔内注射による全身麻酔下で背部の剃毛を行い、背部正中に10 mm程度の皮膚切開を行った。鈍的剥離を行い、上記4群の移植片を皮下に注意深く挿入した後、皮膚縫合を行った。また、担体のみ、あるいはCB-MSCsスフェロイド+担体のみによる骨形成能を確認するため、担体のみ、および担体に歯を挿入せずにMNCsもしくはCB-MSCsを播種したものを実験群と同様に移植した。移植後4週間で、麻酔の過剰投与によりマウスを安楽死させた。移植物を摘出し、10%緩衝ホルマリン溶液で固定後、以下の解析を行った。

5. マイクロCT (μ CT) 撮影および骨形態計測

移植物を μ CT (ScanXmate-A080; ComScan Tecno Co. Ltd) を用いて撮影した。撮

影条件は、電圧 30.0kV、電流 250 mA、ピクセルサイズ 512×480 とした。骨様組織の領域選択は、1 人の術者が各断層面から形態に応じて手動で選択し、これらの CT 画像を 3 次元 (3D) 画像に再構成後、分析ソフトウェア (TRI/3D-BON; ラトック社) を使用して形態計測を実施した。使用した形態計測パラメータは、骨組織体積 (TV)、骨体積 (BV)、骨表面積 (BS)、骨密度 (BV / TV)、骨梁数 (Tb.N)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁間隙 (Tb.Sp)、骨梁中心距離 (Tb.Spac)、フラクタル次元、ストラクチャーモデルインデックス (SMI) および骨パターンファクター (TBPf) である^{22, 23)}。なお、TV、BV / TV については、全体に加えて、歯根の外側と内側 (歯根間部) に分けて解析を行った。

6. 組織学および免疫組織化学的解析

組織学的解析のため、固定されたサンプルを 10%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液 (pH 7.4) で 18 日間 20°Cにて脱灰後脱水し、パラフィンに包埋した。サンプルを 5 μm のスライスに薄切し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行った。移植菌を含むスライドを選択し、マッソントリクローム染色と TRAP 染色を行った。マッソントリクローム染色は、脱パラフィン後第 1 媒染溶液(武藤化学)にて媒染、水洗後、ワイゲルトの鉄ヘマトキシリンで核染色を行った。水洗後第 2 媒染溶液(武藤化学)にて媒染後 0.75%オレンジ G 液で染色し、酢酸水で洗浄後、ボンソーキシリジン、酸フクシン、アゾフロキシシン混合液(富士フィルム和光純薬株式会社)で細胞質を染色した。酢酸水で洗浄し、2.5%リンタングステン酸染色後酢酸水で媒染、酢酸水で洗浄後、アニリン青で膠原繊維線維を染色して酢酸水で洗浄した後、エタノールで分別・脱水を行いキシレンで透徹し、封入した。一方、TRAP 染色は、脱パラフィン後 TRAP 染色液で 37°C 30 分の染色後洗浄後ヘマトキシリンで核染色を行った。なお、TRAP 染色液の作製には、ナフトール AS-BI リン酸ナトリウム(和光純薬)・N, N-ジメチルホルムアミド・0.2 M アセテートバッファー(pH5.0)(ナカライテスク)・ファストレッドバイオレット LB 塩(シグマ アルドリッチ, 東京, 日本)・L (+) 酒石酸 (ナカライテスク)・蒸留水を混合して作成した上で、NaOH で pH5.0 になるように調整を行った。スライドは、顕微鏡 (DP71, オリンパス株式会社)にて撮影を行った。

次に、切片を免疫組織化学により染色した。切片を EDTA 溶液中で加熱することで抗原の賦活化を行い、次に 3% H_2O_2 -70%メタノール内に 30 分浸漬し、内因性ペルオキシダーゼの不活性化した後、一次抗体とともに 4°Cで一晩反応させた。使用した一次抗体は、抗 SP7 抗体 (Anti-Sp7/Osterix antibody, ab22552, アブカム) である。ネガティブコントロールでは、一次抗体の代わりに切片を 1%ウシ血清アルブミン含有 PBS にて同じ時間インキュベーションした。切片を PBS で 3 回洗浄し、2 次抗体 (ImmPRESS®Anti-RabbitIg, MP-7401, Vector Laboratories Inc.) にて室温で 30 分間反応させた後、ImmPACT DAB (SK-4105, Vector Laboratories Inc.) にて指定の

プロトコールに従って可視化した。切片をヘマトキシリンで対比染色した後、脱水・封入を行った。

7. 統計分析

Easy R (EZR) v3.4.1 ソフトウェア (自治医科大学附属さいたま医療センター) を統計分析に使用した²⁴⁾。データは平均±標準偏差 (SD) として表した。データは、一元配置分散分析を行い、事後検定として多重比較に Tukey-Kramer 検定を行った。p<0.05 を有意差ありとした。

結果

1. μ CT および形態計測分析

撮影した μ CT の 3D 再構成画像では、すべての群で移植歯周囲に骨様の不透過性組織を認めた (図 2A-D)。Tooth 群では新生骨様組織は歯根間にほぼ限定されていたが、Collagen 群と MNC 群では、一部歯根外側にも新生骨様組織を認めた。CB-MSD 群では歯根外側から、さらに歯冠周囲にも新生骨様組織が認められた。

TV は、海綿骨と隣接する骨髓腔を含む組織の体積であり、BV は海綿骨の体積を、BS は骨の表面積を表す²³⁾。TV、BV、および BS は、Tooth 群と Collagen 群、および Tooth 群と MNC 群とでは有意差を認めず、Collagen 群と MNC 群との間でも有意差は認められなかった (図 2E-G)。一方、Tooth 群、Collagen 群、MNC 群と比較して、CBDC 群の TV、BV、BS は有意に大きかった ($p < 0.01$)。骨密度を表す BV / TV は、すべての群間では有意差を認めなかった (図 2H)。

次いで、骨様組織の分布を検討するために、歯根外側領域と歯根間領域とに分けて評価した。歯根外側領域における TV (TV_o) は、Tooth 群と Collagen 群、および Tooth 群と MNC 群とでは有意差を認めず、Collagen 群と MNC 群との間でも有意差は認められなかった (図 2I)。一方、Tooth 群、Collagen 群、MNC 群と比較して、CB-MSD 群では有意に大きかった (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$)。歯根外側領域における TV / BV (BV_o/TV_o) は CB-MSD 群で比較的小さい値であったが、いずれの群においても有意差は認めなかった (図 2J)。歯根間領域における TV (TV_r) と BV / TV (BV_r/TV_r) は、すべての群間で有意差を認めなかった (図 2K, L)。また、TV_o と TV_r のパーセンテージを比較すると、CB-MSD 群を除く 3 群では TV_o は 60%程度とおおむね一定であったのに対し、CB-MSD 群では TV_o は約 90%と歯根外側領域への骨様組織の新生が顕著であった (図 2M)。歯種による影響を排除するために、M1 のみについても検討を行ったが、同様の傾向であった (補足図 2)

次に、マイクロ CT 画像を使用して骨梁構造を比較した。CT スライス画像からは、3D 再構成画像と同様に、すべての群で歯の周囲に骨様の不透過像を認めた (図 3 A-D)。

歯根間領域の骨梁構造には群間で明らかな差を認めなかったが、CB-MSc 群の歯根外側領域の骨様組織はやや疎であり、骨梁間の連結も少なかった。

TRI/3D-BON を用いて骨梁構造を定量的に解析した(図 3E-K)。Tb.N は単位距離あたりに存在する骨梁の平均数を表し、Tb.Th.は領域内の骨梁幅の平均を示す。Tb.Sp は骨梁間の平均距離を表し、Tb.Spac は骨梁中心距離の平均を表す²³⁾。Tb.N が Tooth 群、Collagen 群と比べて CB-MNC 群で有意に少なかった ($p < 0.05$) (図 3E)。一方、Tb.Th.にはすべての群間で有意差は認められなかった (図 3F)。Tb.Sp, Tb.Spac では、Tooth 群、Collagen 群と比べて CB-MNC 群で有意に大きい値を示した ($p < 0.05$) (図 3G,H)。

フラクタル次元は、骨表面の不規則性の複雑さの程度を表す²³⁾。SMI は骨梁の構造の指標であり、理想的な板状の場合は 0、棒状の場合は 3、球状の時は 4 とし、その混合状態を中間値で示す²³⁾。TBPf は、3D 空間上で骨梁の表面近傍体積の変化に対する表面積の変化量を計算したものであり、凹面構造の多い骨梁は負となり凸面構造の多い骨梁は正の値を示す²³⁾。すべての群間で、フラクタル次元、SMI,TBPf は有意差を示さなかった (図 3I-K)。

2. 組織学および免疫組織化学的検討

次に、 μ CT 画像によって描出された骨様組織を詳細に検討するため、摘出物を組織学および免疫組織化学的に解析した。HE 染色により、4 群とも歯根間領域を中心として新生骨 (NB)を認めた(図 4A-D)。新生骨は歯根周辺に見られたが、CB-MSc 群のみ歯から離れた部位にも骨形成が認められた(図 4D 黄矢印)。一部の標本では、根尖部の象牙質に連続する肥大したセメント質様硬組織形成を認めた(図 4B 黒矢印)。これらの根尖部付近においては、セメント質様組織と NB との境界は不明瞭であり、すべての群で認められた。根分岐部周辺では、NB と歯根象牙質 (De)とは不連続であり、De 表層のセメント質と NB の間には結合組織が介在していた(図 4E-H)。また、各群間での違いは認められなかった。歯根外側では De 周囲に結合組織が分布していた(図 4I-L)。歯根外側に新生骨が多く見られた CB-MSc 群では、根分岐部と同様に NB と De 間には結合組織が介在し、歯根との癒着は認められなかった(図 4L)。

骨芽細胞の分布を検討するため、SP7 に対する免疫染色を行った。すべての群で骨再生が顕著な根分岐部付近では、新生骨周囲に多くの陽性細胞が認められ、群間の違いは明らかではなかった(図 5A~D)。歯根外側において、CB-MSc 群では新生骨部で SP7 強陽性の細胞が認められたが(図 5D)、他群では新生骨は少なく、結合組織中には SP7 弱陽性細胞が分布していた(図 5C)。次に破骨細胞の分布を検討するため、TRAP 染色を行った。これまでの実験から陽性細胞が確認されていたサンプル(B-TCP を担体として CB-MScs を播種し、ヌードマウスの背部皮下に移植後 4 週で取り出した標本)を陽性コントロールとした(図 5E)。同時に行った染色では、いずれの群においても、TRAP 陽性細胞は認められなかった(図 5F~I)。HE 染色による標本を用いて、形態学的に破骨細胞様の形態を示す多角巨細

胞を検索したが、Collagen 群のごく一部に認められたのみであり(図 5J)、他の標本では明らかな多核の破骨細胞様の細胞は認められなかった。

HE 染色の結果からは、移植された歯根の周囲に歯根膜様の組織が認められたため、歯根膜の再生を検討するためにマッソントリクローム染色を行った。4 群とも移植歯根周囲には膠原線維が認められた(図 6A~D)。歯根分岐部では、新生骨と歯根表層のセメント質間に歯根膜様の膠原線維が走行し、一部では歯根には垂直に入り込む像が認められた(図 6E~H)。ただし、歯根にはほぼ平行、あるいは斜めに走行する線維が多く、骨内へ侵入する像はわずかで、この傾向に群間の差は認められなかった。歯根外側でも膠原線維の走行は認められ、CB-MSD 群では新生骨と歯根との間に介在していた(図 6I-L)。

考察

本研究では、歯の移植用の担体としてアテロコラーゲンのスポンジを使用した。アテロコラーゲンとは、アレルギーの原因部分の一つであるテロペプチドを酵素処理で取り除いたものであり、抗原性が低いことから医療用・化粧品用に広く利用されている²⁵⁾。今回使用したアテロコラーゲンは、線維化アテロコラーゲンと熱変性コラーゲンを 9:1 の割合で混合し、熱処理による架橋を行ったスポンジ状の材料である¹⁶⁾。止血や創傷治癒促進の作用があり、ティッシュエンジニアリングの担体としても皮膚再生などに広く使用されているが²⁶⁾、骨再生への応用は少ない。その理由として、吸収速度の速さがあげられる。これまで骨再生の担体には、セラミック素材としてハイドロキシアパタイトや β -TCP のブロック、あるいは顆粒が多く用いられてきたが、近年ではポリマー、あるいはセラミック系素材とポリマーの複合体なども研究されている²⁷⁾。ハイドロキシアパタイトの吸収速度は遅く²⁷⁾、 β -TCP はハイドロキシアパタイトより吸収速度は速いものの、移植後 72 週程度も吸収と骨再生が続くとされており²⁸⁾、生体内では 4 週程度で吸収されてしまうコラーゲンとは大きな違いがある。理想的環境下では 4 週間程度で骨再生が見られるが、臨床における骨再生には通常 3-8 か月程度を必要としていることから、コラーゲンと細胞を用いた骨ティッシュエンジニアリングは困難であり、むしろ骨形成を阻害する可能性があることが知られている^{27, 29)}。

今回コラーゲン担体のみを歯と移植した群では、歯のみを移植した群と比較して骨新生の増加は見られなかったが、これは β -TCP ブロックと歯との移植によって明らかな骨新生の促進が見られた Uchikawa らの報告とは異なる¹²⁾。本研究でも示したように、アテロコラーゲンスポンジそのものには骨形成能や骨分化能はなく、 β -TCP と比較すれば骨誘導能も低いことを反映しているものと考えられた。一般的にコラーゲンは単独で骨再生用の細胞の担体として用いられることはなく BMP-2 など比較的早期に骨再生が得られる増殖因子用の担体として用いられてきており^{30, 31)}、骨形成細胞を用いた骨ティッシュエンジニアリング用の担体としては適しているとはいえない。ただし、ハイドロキシアパタイトや β -TCP ブロックでは、歯根の形態や複雑な歯槽骨欠損の形態に整形することは困難であり、顆粒状のものは、顆粒を移植部位に

とどまらせるためには、コラーゲンやチタン製の膜などで多く方法が必要であり、技術的には困難である。今回の実験でも、骨欠損の形態に応じて柔軟に形態を合わせることができるコラーゲンスポンジの操作性の良さは明らかであり、骨再生用の担体として使用することが可能となれば、今後自家歯牙移植への臨床応用を考える上では、有利と考えられた。

本研究では、骨形成性細胞として CB-MSCs 由来スフェロイドを用いた。CB-MSC 群では Collagen 群と比較して有意に新生骨量が増加した。一方、MNC 群では、コラーゲンのみを用いた群と有意な差を認めなかったが、これは移植された細胞中に含まれる MSCs あるいは骨形成性細胞の数に差があるためと考えられた。MNC では培養を行っておらず、ヒト骨髄 MSC 中に含まれる骨形成幹細胞 (CD271+/C45-) の割合は 0.06%程度とされており³²⁾、CB-MSCs と比較して低い。また、近年の研究から、CB-MSCs 中の骨形成性細胞は、これまで骨再生に広く利用されてきた骨髄間質細胞と比較しても高い骨分化能や骨形成能を持つことが知られている¹³⁾。さらに、CB-MSCs を 3 次元培養して得られたスフェロイドを本研究では用いているが、これは平面培養された CB-MSCs よりさらに高い骨分化能と骨形成能を持つ^{14,15)}。吸収期間が短いアテロコラーゲンスポンジを担体として骨再生に用いる場合には、CB-MSCs によるスフェロイド、あるいはそれと同等の高い骨形成を有する細胞を使用が必要と考えられた。その一方で、CB-MSC 群では Collagen 群と比較して骨量の増加は見られたものの、骨梁解析の結果からは Tb.N の減少と Tb.Sp や Tb.Spac の増加が見られた。これは比較的疎な骨梁が形成されていることを意味しているため、移植菌の安定性については不利な条件と考えられる。歯槽骨の状態はリモデリングによって応力の影響を受けるため、CB-MSCs スフェロイドの有用性を確実なものとするためには、同所性の移植モデルを用いた、より長期間の経過観察によって再生骨の成熟の程度を見る必要がある。なお、今回の 4 週間という移植期間が MNC による骨新生には十分でなかった可能性も否定できないが、予備実験の段階で 8 週間の経過観察を行った標本でも、4 週間からの骨量の増加は認められなかった。したがって、本研究で得られた新生骨量の違いは、観察期間が原因であったとは考えられない。

本研究では CB-MSC 群以外のすべての群においても、歯根間領域を中心とした骨新生が認められているため、骨芽細胞の由来については複数の細胞源を想定する必要がある。歯根膜細胞は骨形成能を持ち³³⁾、歯髄にも高い骨形成能を持つ細胞が存在することが知られている³⁴⁾。本研究では骨芽細胞のトラッキングを行うことはできなかったため、それぞれの骨形成細胞の由来については確定できていない。しかしながら、すべての群で歯根間領域における骨再生を認めたことから、この部分では歯根膜由来の骨形成細胞が重要な役割を果たしていることが推測された。また、歯根尖周囲にはセメント質様の肥大した硬組織が形成されているサンプルが見られたが、群間での差はなく、さらに部位が根尖周囲に限局していたことから、これらには歯髄由来の細胞の関与が推測される。一方、歯根の外側に形成された骨は、CB-MSC 群で明らかに多く認められ、それ以外の群では少なかった。そこで CB-MSCs のみによる骨形成能を確認するため、MNC とアテロコラーゲンスポンジのみ、あるいは CB-MSCs スフェロイドとアテロコラーゲンスポンジとのみで歯を伴わずに移植したところ、CB-MSCs を移植

したサンプルでのみ骨形成が認められた(補足図 1)。これらの結果から、CB-MSC 群で見られた骨量の増加は、移植された CB-MSCs スフェロイド由来の骨形成細胞による可能性が高いと考えられた。

CB-MSC 群以外では歯根間領域と歯根外側領域とで骨形成能の違いが見られた原因は不明だが、ティッシュエンジニアリングによる組織再生には、細胞や担体の他に生理活性物質が必要とされている。細胞が骨形成の方向に誘導されるためには、骨形成性蛋白などが必要であるが、歯根間といった比較的閉鎖的な空間では、このような骨形成性因子が保持されやすかったものと考えられる。実際の歯槽骨再生治療でも、1 壁性や2壁性の骨欠損と比較して、3壁性以上の壁を持つ骨欠損では再生が得られやすい³⁵⁾。したがって、骨再生のための条件がより厳しい歯根外側領域では、移植した細胞による骨形成能の違いが大きく影響したものと考えられた。ただし、本研究ではメカニズムの解明には至っておらず、今後歯根間と歯根周囲における骨形成性蛋白の発現や局在の違いについても、検討していく必要がある。

一般的に骨形成には骨芽細胞の成熟が必要であり、そのためには破骨細胞と骨芽細胞との相互作用が必須とされている。しかしながら、今回の我々の実験結果からは、TRAP 陽性細胞が見られず、形態学的にも成熟した破骨細胞はほとんど見られなかった。骨形成の様式としては、発生、あるいは再生過程で起こる骨形成と、リモデリングによる骨形成があることが知られているが³⁶⁾これは今回の実験における骨新生が骨芽細胞と破骨細胞の相互作用によるリモデリングのメカニズムとは異なるメカニズムによってできたものとあることを示唆している。再生骨の形成過程については不明な点も多く、細胞分化の制御についてもよく知られていない。本研究で見られた骨形成のメカニズムを解析することで、ティッシュエンジニアリングによる骨再生過程の新たなメカニズムの解明につながる可能性もあるものと考えている。

新生骨と歯根の間には膠原線維が存在し、一端は歯根に嵌入している像が認められたことから、これらは歯根膜と考えられた。ただし、コラーゲン線維の走行は歯根と並行なものが多く、歯根と新生骨を連結する機能的な構造はごく一部のみであった。機能的な歯根膜の獲得には機械的刺激が必要とされており、移植された歯が実際に負荷を受けることが必要と考えられる。その一方で、 β -TCP ブロックによる移植で見られた担体、あるいは新生骨と歯根との癒着は根尖部以外では認められなかった。したがって、アテロコラーゲンスポンジを歯牙移植の担体として用いることは、 β -TCP ブロックによる担体と比較して、操作性のみならず、骨性癒着の予防からも歯牙移植には有利であると考えられた。

本研究の結果から、CB-MSCs スフェロイドとアテロコラーゲンスポンジによる担体を併用することで、歯牙移植と同時に歯槽骨の増生が得られる可能性が初めて示された。CB-MSCs の採取は歯科領域でも容易であり、わずかな骨片からでも十分な細胞数が得られると考えられる。また、賦形性に優れたアテロコラーゲンスポンジとの組み合わせで骨新生が見られたことから、今後臨床的にも応用可能な技術となることが期待される。

参考文献

- 1) Rakhshan V (2015) Congenitally missing teeth (hypodontia): A review of the literature concerning the etiology, prevalence, risk factors, patterns and treatment. *Dent Res J* 12:1–13.
- 2) Andreasen JO (1992) *Atlas of replantation and transplantation of teeth*. Philadelphia, PAWB Saunders Co.
- 3) Rohof ECM, Kerdijk W, Jansma J, Livas C, Ren Y (2018) Autotransplantation of teeth with incomplete root formation: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig* 22:1613–1624.
- 4) Machado LA, do Nascimento RR, Ferreira DMTP, Mattos CT, Vilella OV (2016) Long-term prognosis of tooth autotransplantation: a systematic review and meta-analysis, *Int J Oral Maxillofac Surg* 45:610–617.
- 5) Yang S, Jung BY, Pang NS. (2019) Outcomes of autotransplanted teeth and prognostic factors: a 10-year retrospective study. *Clin Oral Invest* 23:87–98.
- 6) Kagami H, Agata H, Satake M, Narita Y (2011) Considerations on designing scaffold for soft and hard tissue engineering. Ed. Gilson Khang. *The Handbook of Intelligent Scaffold for Regenerative Medicine* Pan Stanford Publishing Singapore, 509-536.
- 7) Titsinides S, Agrogiannis G, Karatzas T (2019) Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Jpn Dent Sci Rev* 55:26-32.
- 8) Starch-Jensen T, Deluiz D, Deb S, Bruun NH, Eduardo Tinoco EMB (2020) Harvesting of autogenous bone graft from the ascending mandibular ramus compared with the chin region: A systematic review and meta-analysis focusing on complications and donor site morbidity. *J Oral Maxillofac Res* 11: e1. Published online 2020 Nov 30.
- 9) Kagami H (2015) The potential use of cell-based therapies in the treatment of oral diseases. *Oral Dis* 21:545-549.
- 10) Shamsoddin E, Houshmand B, Golabgiran M (2019) Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: A systematic review. *J Adv Pharm Technol Res* 10:46-50.
- 11) Langer R. Vacanti JP (1993). *Tissue engineering*. *Science* 260:920–926.
- 12) Uchikawa E, Yoshizawa M, Li X, Matsumura N, Li N, Chen K, Kagami H (2020) Tooth transplantation with a β -tricalcium phosphate scaffold accelerates bone formation and periodontal tissue regeneration *Oral Dis* in press.
- 13) Fernandez-Moure JS, Corradetti B, Chan P, Van Eps JL, Janecek T, Rameshwar P, Weiner BK, Tasciotti E (2015) Enhanced osteogenic potential of mesenchymal stem

- cells from cortical bone: a comparative analysis. *Stem Cell Res Ther* 6:203.
- 14) Chen K, Li X, Li N, Dong H, Zhang Y, Yoshizawa M, Kagami H (2019) Spontaneously Formed Spheroids from Mouse Compact Bone-Derived Cells Retain Highly Potent Stem Cells with Enhanced Differentiation Capability. *Stem Cells Int* 2019:Article ID 8469012.
 - 15) Dong H, Li X, Chen K, Li N, Kagami H (2021) Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived MSCs for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part C*, in press.
 - 16) Itoh H, Aso Y, Furuse M, Noishiki Y, Miyata T (2001) A honeycomb collagen carrier for cell culture as a tissue engineering scaffold. *Artif Organs* 25:213-217.
 - 17) Moorrees CF, Fanning EA, Hunt Jr EE (1963) Age variation of formation stages for ten permanent teeth. *J Dent Res* 42:1490–1502.
 - 18) Andreasen JO (1976). Histometric study of healing of periodontal tissues in rats after surgical injury. I. Design of a standardized surgical procedure. *Odontol Revy* 27:115–130.
 - 19) Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, Li H, Wang X-Y, Yao H-Y, Zhang Y, Mao N (2010) A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc* 5: 550–560.
 - 20) Zhang Y, Li X, Chihara T, Mizoguchi T, Hori A, Udagawa N, Nakamura H, Hasegawa H, Taguchi A, Shinohara A, Kagami H (2015) Comparing immunocompetent and immunodeficient mice as animal models for bone tissue engineering. *Oral Dis* 21:583-92.
 - 21) Henrich D, Seebach C, Verboket R, Schaible A, Marzi I, Bonig H (2018) The osteo-inductive activity of bone-marrow-derived mononuclear cells resides within the CD14+ population and is independent of the CD34+ population. *Eur Cell Mater* 6:165–177.
 - 22) Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25:1468–1486.
 - 23) RATOC System Engineering Co., Ltd. 3D medical image analysis application. Retrieved from <https://www.ratoc.co.jp/ENG/3diryo.html> accessed at 4/4/2021.
 - 24) Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48:452–458.
 - 25) 村田 勝 (2008) 医療用コラーゲン性マテリアルの現状と近未来. *北海道医療大学歯学雑誌* 27:1-14.
 - 26) Ichioka S, Ohura N, Sekiya N, Shibata M, Takashi Nakatsuka T (2003) Regenerative

- surgery for sacral pressure ulcers using collagen matrix substitute dermis (artificial dermis). *Ann Plast Surg* 51:383-389.
- 27) Wei S, Ma J-X, Xu L, Gu X-S, Ma X-L (2020) Biodegradable materials for bone defect repair. *Mil Med Res.* 7:54.
 - 28) Ogose A, Kondo N, Umezu H, Hotta T, Kawashima H, Tokunaga K, Ito T, Kudo N, Hoshino M, Gu W, Endo N (2005) Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion) in human bones. *Biomaterials* 27:1542-1549.
 - 29) Lang A, Kirchner M, Stefanowski J, Durst M, Weber MC, Pfeiffenberger M, Damerau A, Hauser AE, Hoff P, Duda GN, Buttgerit F, Schmidt-Bleek K, Timo Gaber T (2019) Collagen I-based scaffolds negatively impact fracture healing in a mouse-osteotomy-model although used routinely in research and clinical application. *Acta Biomater* 86:171–184.
 - 30) Misch C, Wang HL (2011) Clinical applications of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for bone augmentation before dental implant placement. *Clin Adv Periodontics* 1:118-131.
 - 31) Kowalczewski CJ, Saul JM (2018) Biomaterials for the delivery of growth factors and other therapeutic agents in tissue engineering approaches to bone regeneration. *Front Pharmacol* 9:513.
 - 32) Henrich D, Verboket R, Schaible A, Konradowitz K, Oppermann E, Brune JC, Nau C, Meier S, Bonig H, Marzi I, Seebach C (2015) Characterization of bone marrow mononuclear cells on biomaterials for bone tissue engineering in vitro. *Biomed Res Int* 2015:762407.
 - 33) Gay IC, Chen S, MacDougall M (2007) Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res* 10:149-60.
 - 34) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13625-13630.
 - 35) Zang SQ, Kang S, Hu X, Wang M, Wang XW, Zhou T, Wang QT (2017) Comparison of different periodontal healing of critical size noncontained and contained Intrabony defects in beagles. *Chin Med J (Engl)* 130:477-486.
 - 36) Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N (2017) Bone Formation Is Coupled to Resorption Via Suppression of Sclerostin Expression by Osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 32:2074-2086.

図

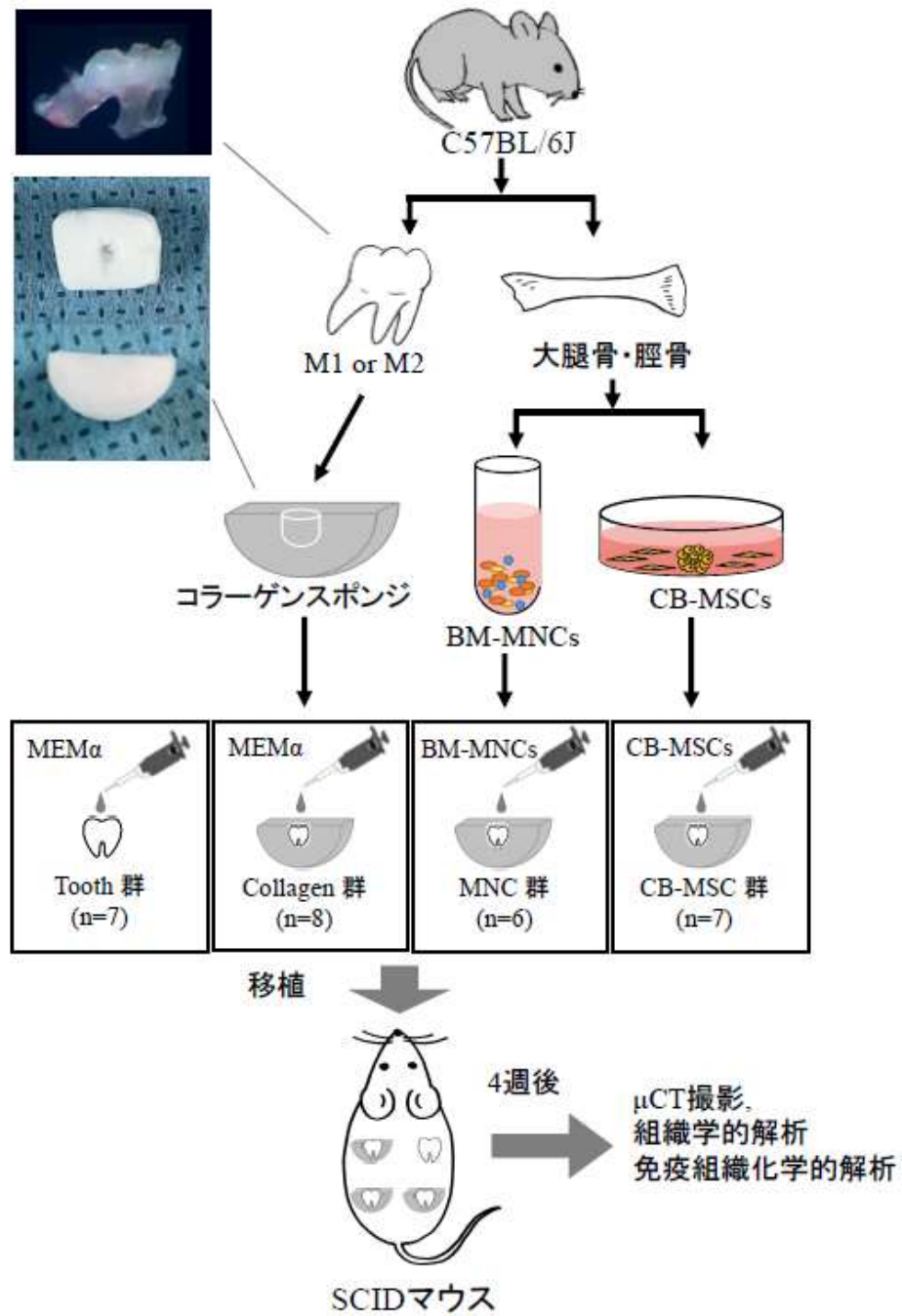


図 1

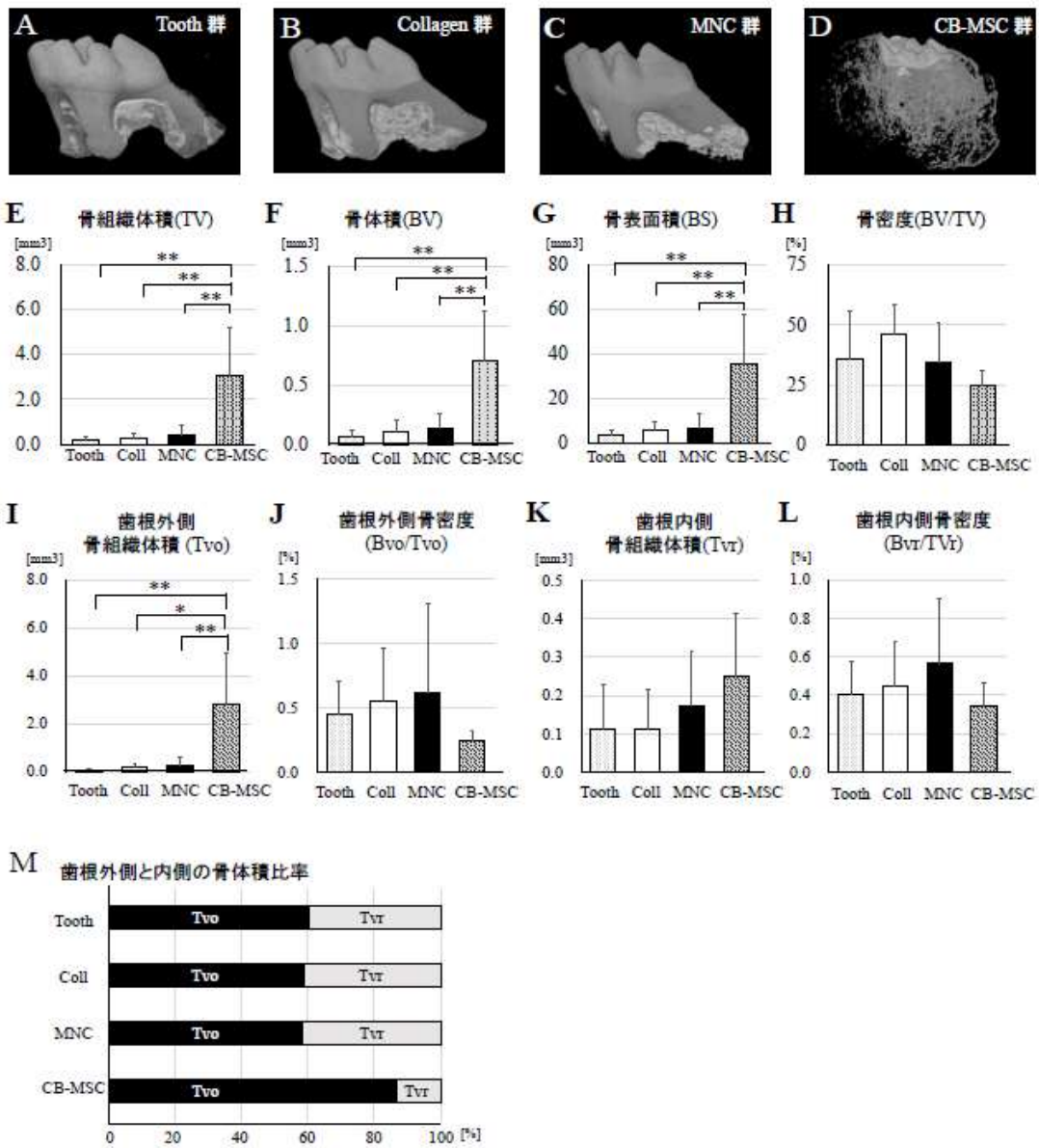


図 2

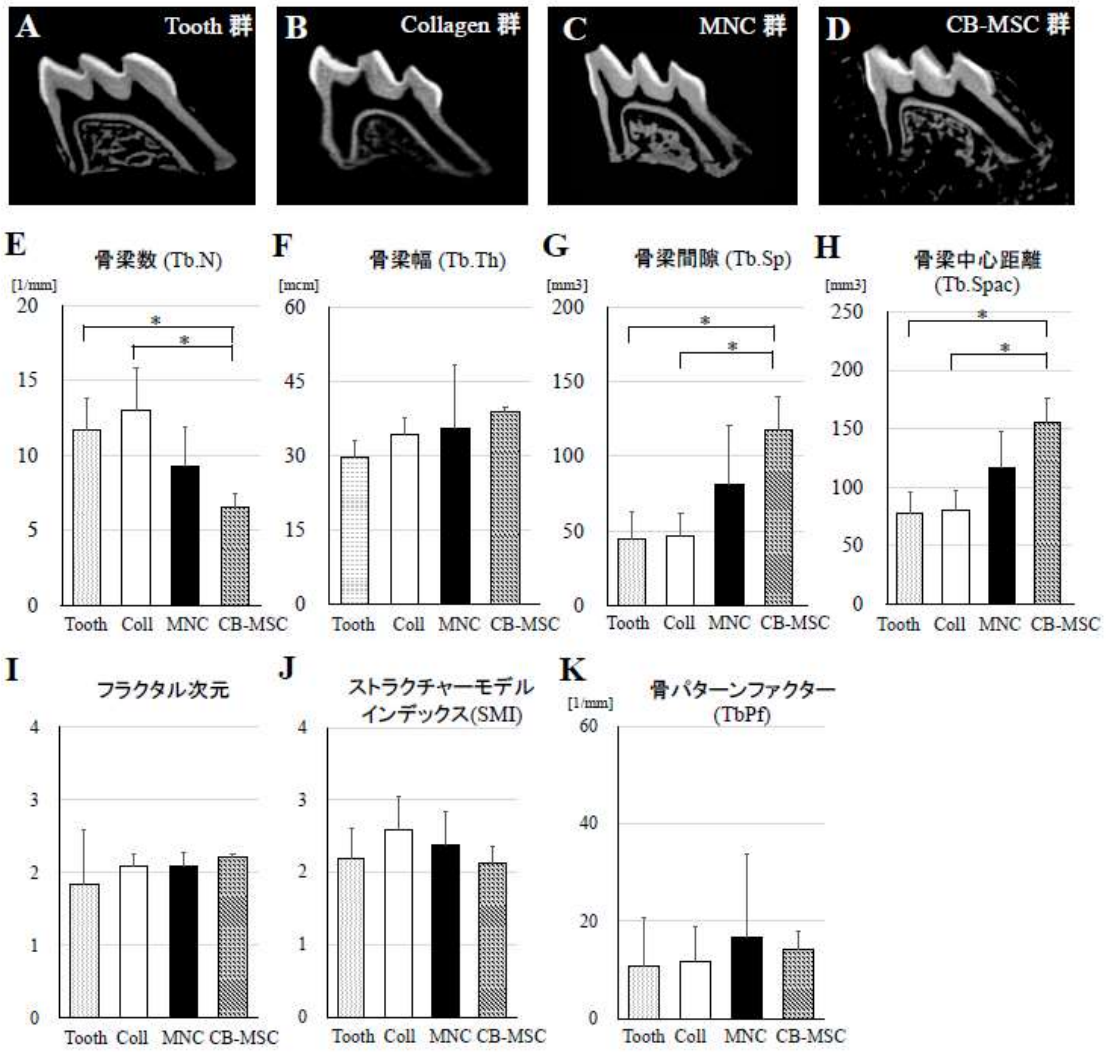


図 3

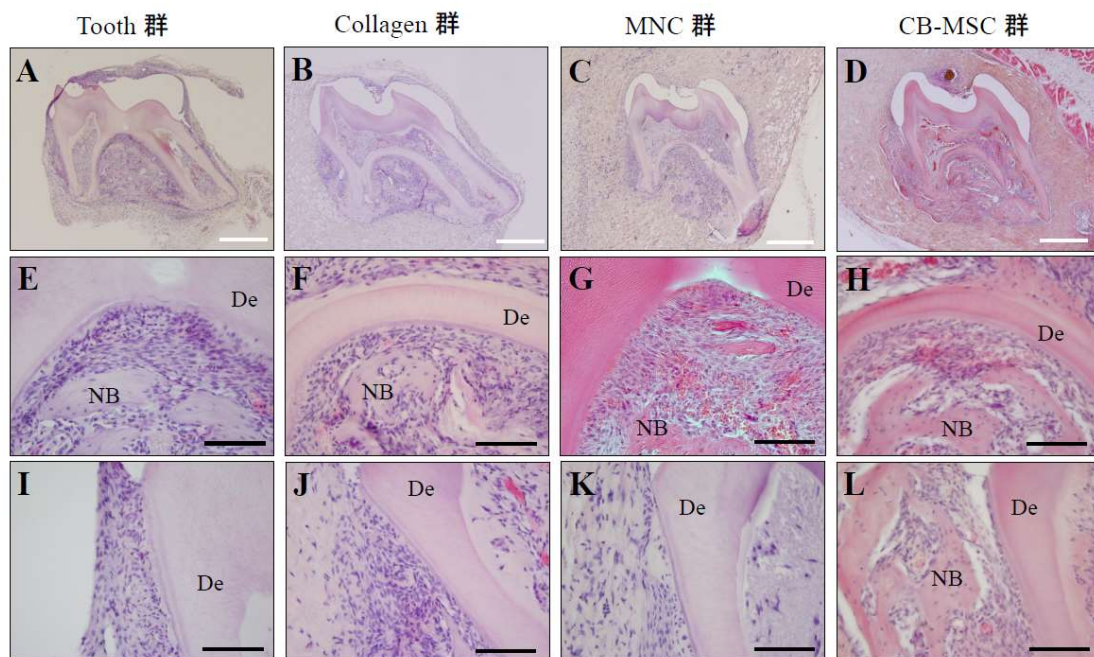


图 4

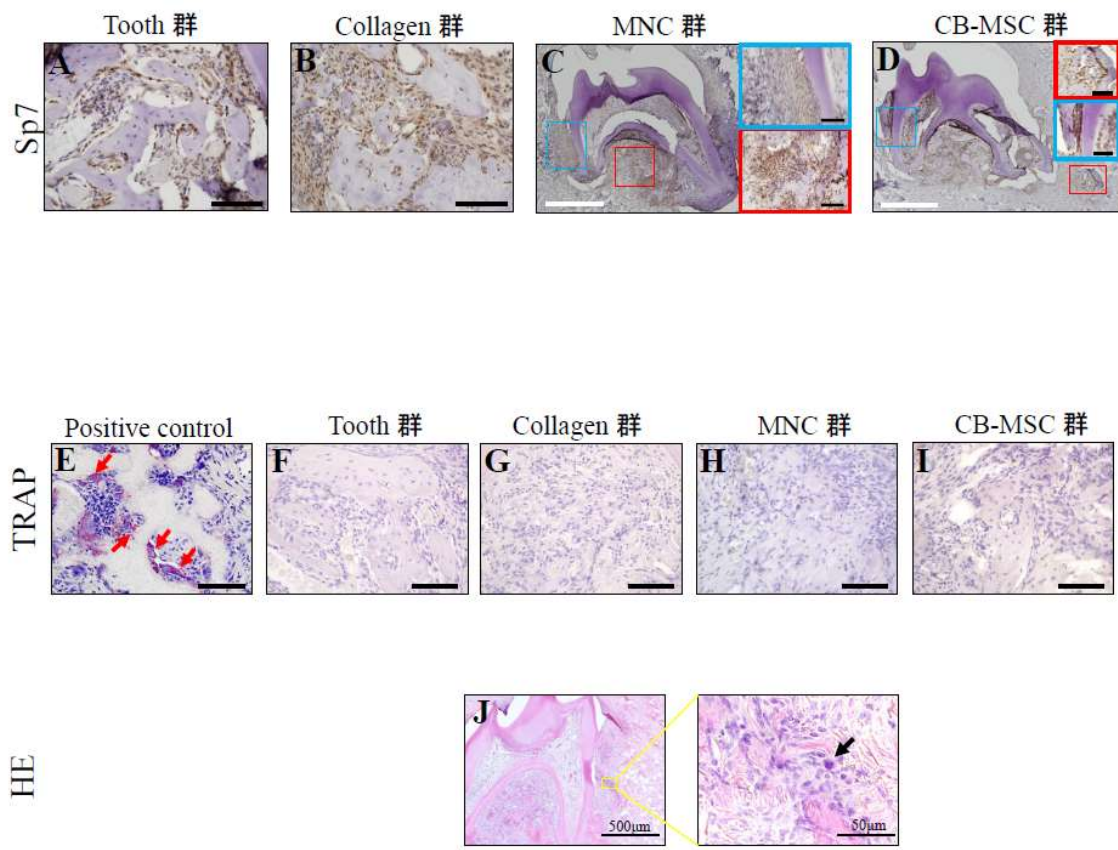


图 5

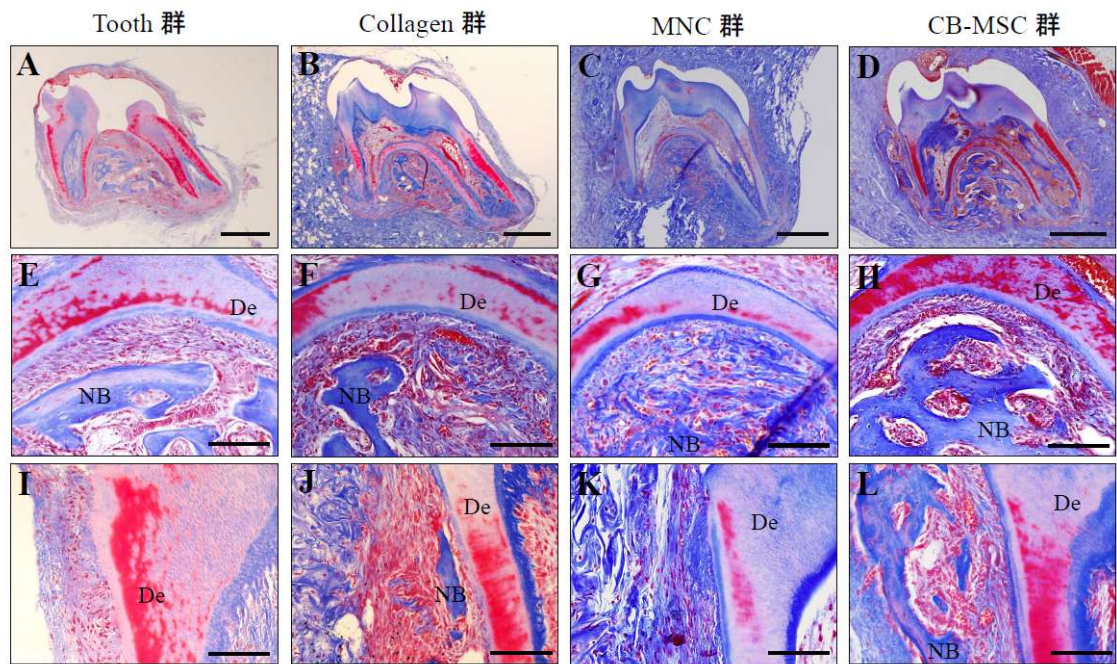
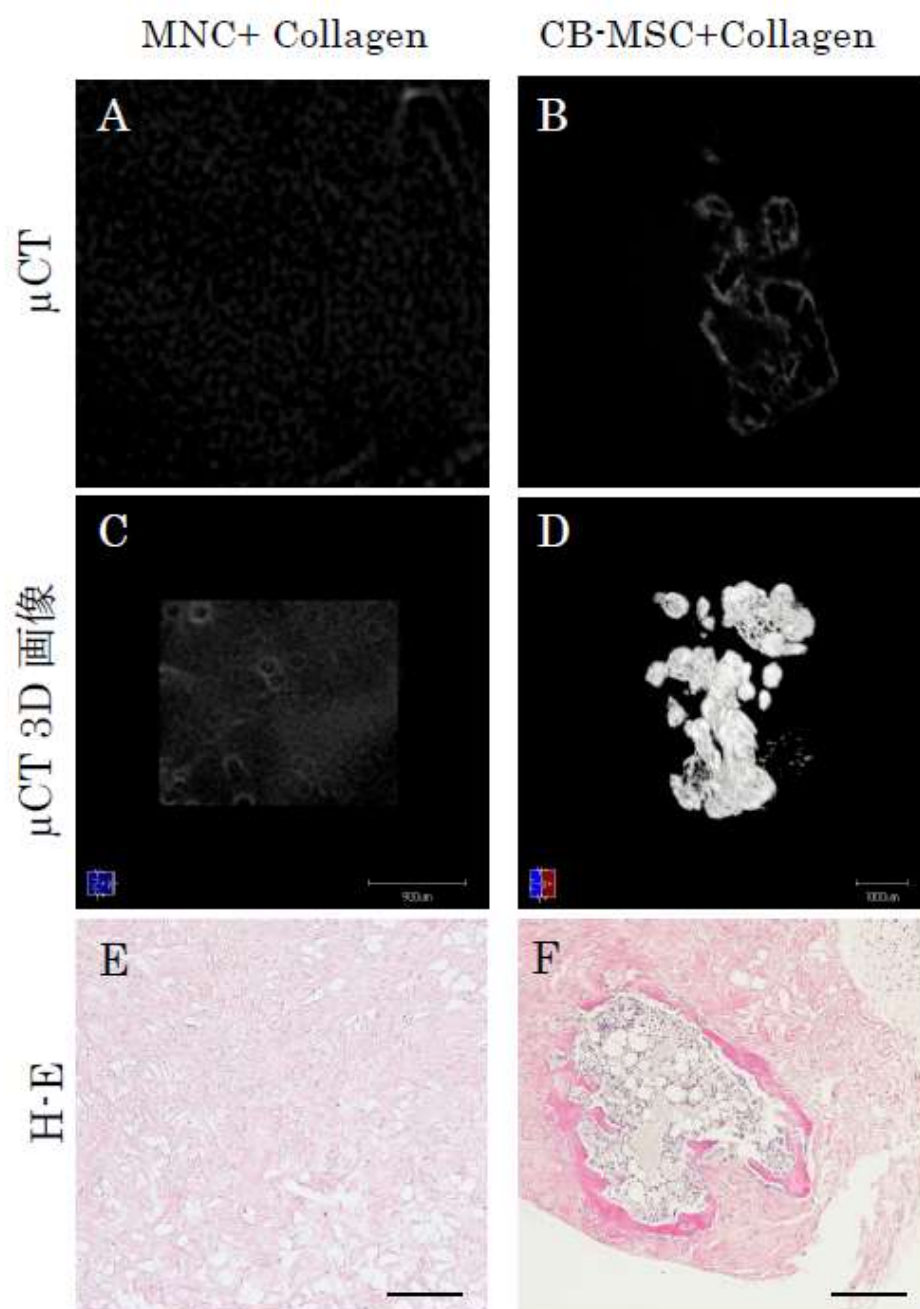
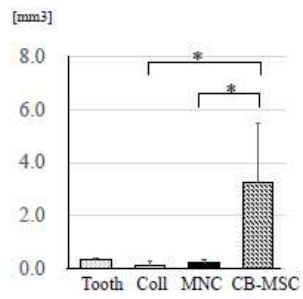


图 6

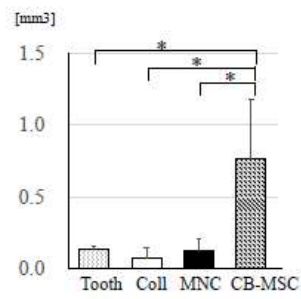


補足図 1

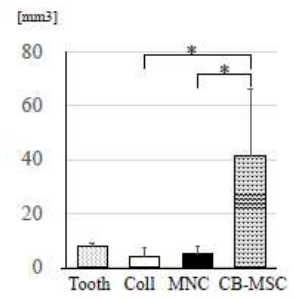
A 骨組織体積(TV_M1)



B 骨体積 (BV_M1)



C 骨表面積 (BS_M1)



補足図 2

図の説明

図1. 実験の流れ

3週齢雄の C57BL/6J マウスから上顎の第1臼歯 (M1) と第2臼歯 (M2) の抜歯と、脛骨と大腿骨の剖出を行った。脛骨と大腿骨から MNC を抽出し、さらに残った骨組織を細切後、酵素処理を行い、CB-MSCs を分離した。CB-MSCs を培養後、2継代目の細胞を用いて、専用のディッシュ上でスフェロイドを形成した。実験には抜去した歯のみの群 (Tooth 群)、成型したアテロコラーゲンスポンジと抜去した歯の群 (Collagen 群)、Collagen 群に MNC を播種した MNC 群、Collagen 群に CB-MSCs スフェロイドを播種した CB-MSC 群の計4群を用いた。6~8週齢の SCID 雄マウスの背部に切開を行い、背部皮下に1匹あたり4つのサンプルを移植した。4週後に移植物を摘出し、解析を行った。

図2. μ CTによる移植歯周囲の骨の解析

A~D: 4群の μ CT画像の再構成3D構築画像を示す。CB-MSC群では、他の3群と比較して新生骨が著明であった。Tooth群、Collagen群、MNC群では新生骨は主に歯根間にみられたが、CB-MSC群では歯根外側や歯冠方向へも骨の新生も認められた。E: 4群のTVの比較を示す。F: 4群のBVの比較を示す。G: 4群のBSの比較を示す。H: 4群のBV/TVの比較を示す。I: 4群の歯根外側領域のTV(TV_o)の比較を示す。J: 4群の歯根外側のBV/TV(BV_o/TV_o)の比較を示す。K: 4群の歯根間領域のTV(TV_r)の比較を示す。L: 4群の歯根間領域のBV/TV(BV_r/TV_r)の比較を示す。M: 4群のTVに占めるTV_oとTV_rのパーセンテージを示す。CB-MSC群では、TV、BV、BSはそれぞれTooth群、MNC群、およびCollagen群に比べ有意に高値を示した。CB-MSC群では、TV_oは他の3群と比較して有意に高値であり、歯根外側への骨新生が著明であった。Coll: Collagen群。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

図3. μ CTによる移植歯周囲の骨梁構造の解析

A~D: 4群の μ CT画像のスライス画像を示す。E: 4群のTb.Nの比較を示す。F: 4群のTb.Thの比較を示す。G: 4群のTb.Spの比較を示す。H: 4群のTb.Spacの比較を示す。I: 4群のフラクタル次元の比較を示す。J: 4群のSMIの比較を示す。K: 4群のTbPfの比較を示す。CB-MSC群ではTooth群、Collagen群と比較してTb.Nが低値であり、Tb.Sp、Tb.Spacは高値であった。Coll: Collagen群。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

図 4. HE 染色像

A~D:標本全体の弱拡大像を示す. E~H:標本の根分岐部の強拡大像を示す. I~L:標本の歯根外側の強拡大像を示す. 4群とも歯根間領域に新生骨が認められた. CB-MSD群では歯根外側にも新生骨が認められた. NB: 新生骨, De:象牙質 Scale bar:500 μm (A-D), 100 μm (E-L), 黄矢印:歯根から乖離した骨組織, 黒矢印:根尖周囲の肥大セメント質様構造.

図 5. 免疫組織化学染色 (SP7) と TRAP 染色

A~D: 各群の SP7 染色像を示す. いずれの群においても, 骨新生が見られる部分では SP7 強陽性細胞が多く認められた. CB-MSD群では, 歯根外側でも新生骨部に一致して強陽性細胞を多数認めた. E: TRAP 染色陽性コントロールの標本を示す. 赤矢印で示す部位に TRAP 陽性細胞が認められる. F~I: 各群の TRAP 染色を示す. いずれの群においても TRAP 陽性細胞は認められなかった. J: Collagen 群の HE 標本を示す. 歯根外側に破骨細胞様の多核細胞を認める (黒矢印).

図 6. マッソントリクローム染色

A~D: 標本全体の弱拡大像を示す. E~H:標本の根分岐部の強拡大像を示す. I~L: 標本の歯根外側の強拡大像を示す. 4群とも, 新生骨と歯根の間には歯根膜腔が維持されており, 膠原線維の走行が見られた. 歯根膜腔では, 歯根と水平に走行する膠原線維が多く見られ, 一部はセメント質や骨へ侵入するものの, 多くは未熟な歯根膜様組織であった. NB: 新生骨, De:象牙質, Scale bar: $\times 25$ 500 μm (A-D), 100 μm (EL).

補足図の説明

補足図 1. 細胞と担体のみの移植結果.

コラーゲン担体に MNC あるいは CB-MSc を播種し，歯を挿入せずに SCID マウス背部皮下へ移植して 4 週後に摘出した. μ CT スライス画像 (A, B). μ CT 画像の 3D 再構成画像 (C, D). サンプルのパラフィン切片による H-E 染色画像 (E, F). コラーゲン担体に MNC を播種後移植したサンプルでは，硬組織の形成は認められなかった (A, C, E). 一方 CBCD を播種後移植したサンプルでは，豊富な骨組織の形成が見られ，内部には骨髄様の構造も認められた (B, D, F). Scale bar=200 μ m

補足図 2. μ CT による移植歯周囲の骨解析 (M1)

μ CT による移植歯周囲の骨解析について，骨組織体積，骨体積，骨表面積を使用した歯 M1 の結果を示す. M1 においては，CB-MSc 群は Collagen 群，MNC 群と比較し有意に新生骨が著明であった.