

# Biologics-based regenerative technologies for periodontal soft tissue engineering

## 歯周軟組織設計に対する生物学的製剤に基かれた再生技術

Lorenzo Tavelli<sup>1</sup> Michael K. McGuire<sup>1,2,3</sup> Giovanni Zucchelli<sup>1,4</sup> Giulio Rasperini<sup>1,5</sup>  
Stephen E. Feinberg<sup>6</sup> Hom-Lay Wang<sup>1</sup> William V. Giannobile<sup>1,7</sup>

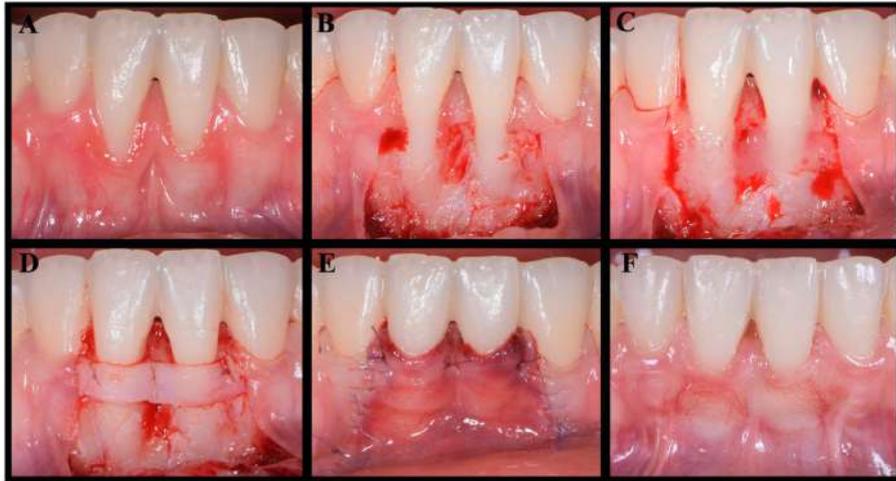
J Periodontol. 2020;91:147-154.

### 生物学的製剤に基かれた再生技術

歯肉退縮は歯根面の露出と同時にセメントエナメル境から歯肉辺縁の根尖側への移動であると定義される。この状況は唇側歯槽骨周囲の吸収も含んでいる。したがって、組織再生誘導法 (GTR) が歯肉退縮の治療を目的とした最初のアプローチの方法の一つであったことは明白である。しかしながら、厚みの薄い歯肉を持つ場合または、浅い退縮欠損の場合において起こりうることは限られているように、歯根被覆を目的とした GTR の使用は様々な限界を持っていた。このように、様々な著者は失われた歯周組織を再生する試みで、細胞分化、基質の生合成、細胞補強に対する遺伝子または細胞の活性化を誘導することができるタンパク質グループであるような成長因子または生物学的製剤の使用を研究してきた。本レビューでは、歯根被覆促進のための生物学的製剤を用いた再生技術の作用機序、根拠、成果を提示することを目的としている。

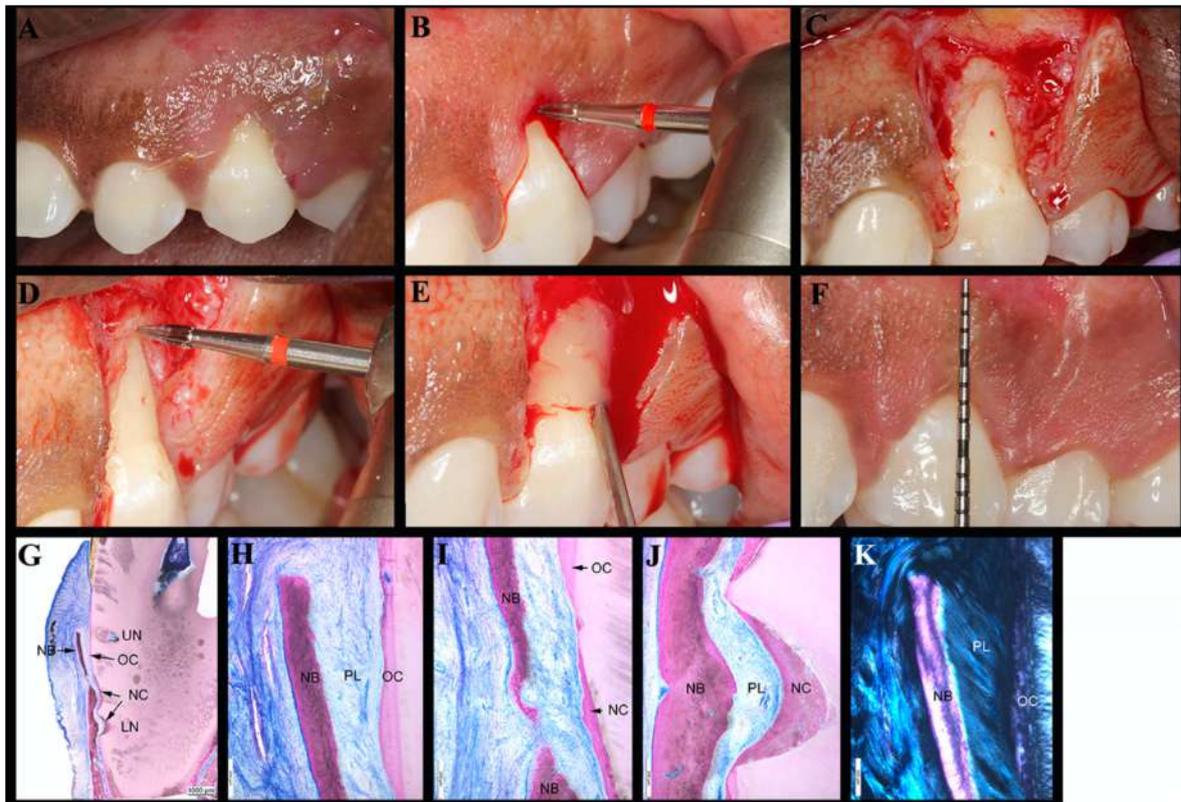
### エナメルマトリクス誘導體

エナメルマトリクスタンパクはセメント質の形成前に歯根の発育段階で沈着される。豚の胎児歯から得られた生体模倣型のエナメルマトリクス誘導體 (EMD) が、歯根膜細胞 (PDL) や骨芽細胞の増殖・遊走を促進することで、自然な歯の発生過程を模倣したセメント質形成を刺激することを明らかにした。EMD は歯周組織再生を当初は目的としてきたが、一方で、局所の成長因子の発現と血管新生を促進するという特性から、歯根被覆術に対しても研究されてきた (図1)。



**FIGURE 1** Root coverage procedure with connective tissue graft + EMD. **A)** Baseline defect; **B)** Split-full-split flap elevation; **C)** After root conditioning with 24% EDTA, EMD was applied to the root surface; **D)** CTG sutured over the EMD and the root surfaces; **E)** Flap closure; **F)** 1-year outcomes showing complete root coverage

しかしながら、EMD が歯肉退縮 (GRs) の治療において臨床的に有用性があるかどうかは疑問の余地がある。Modica らは歯冠側移動術 (CAF) 単独と比較して、EMD と CAF を組み合わせた際に、臨床的アタッチメントレベル (CAL) の獲得と平均歯根被覆がより大きいことを示した。多施設共同研究では EMD を加えることで CAF+CTG を使用した歯根被覆術の結果はより促進されたことを示した。しかしながら、他の研究では EMD を使用した場合、歯根の被覆率の向上という点では有意な効果は得られておらず、Del Pizzo らは、CAF に EMD を追加することは、歯根被覆率の臨床的利益のためではなく、歯周再生を得るための試みとして正当化されるべきであると結論付けた。実際に、McGuire と Cochran は、CAF+CTG を受けた歯の表面は、歯根表面に長い上皮性付着と結合組織性の付着で治癒し、一方、CAF+EMD 標本の組織学的切片では、新生セメント質、散在した結合組織 (PDL を組織化していると解釈される)、歯根表面から一定の距離にある緻密骨の一部が観察されることを示した。EMD が GRs の歯周再生を誘導するという特性は、McGuire らによる組織学およびマイクロコンピュータ断層撮影 (micro-CT) 分析を含む前向きケースコントロール研究で後に裏付けられた (図 2)。



**FIGURE 2** Clinical and histologic efficacy of EMD in the regeneration of recession defects. **A)** Test gingival recession defect 8 weeks after the creation of the recession; **B)** Histologic marker being placed into root surface at the position of the free gingival margin after root planing and application of EDTA; **C)** Full-thickness flap creating recipient bed showing notch at the gingival margin level and relationship to the alveolar bone crest; **D)** Insertion of histologic notch into root surface at the level of the alveolar bone crest; **E)** Application of EMD over root surface; **F)** Healing at 9 months showing complete root coverage; **G)** Low-power ground section demonstrating both notches, newly formed bone (NB), and old and new cementum (OC and NC, respectively); **H)** Ground section showing new bone (NB) separated from old cementum (OC) by newly-formed periodontal ligament (PL); **I)** New bone (NB) covering previously exposed root surface. Root surface is covered by both old (OC) and new cementum (NC); **J)** Continuing down the root surface, new bone (NB), periodontal ligament (PL) and cementum (NC) can be seen covering the notch at the original gingival margin level; **K)** Section under polarized light showing newly formed periodontal ligament fibers (PL) between newly formed bone (NB) and old cementum (OC). (Adapted with permission from *Journal of Periodontology*<sup>22</sup>)

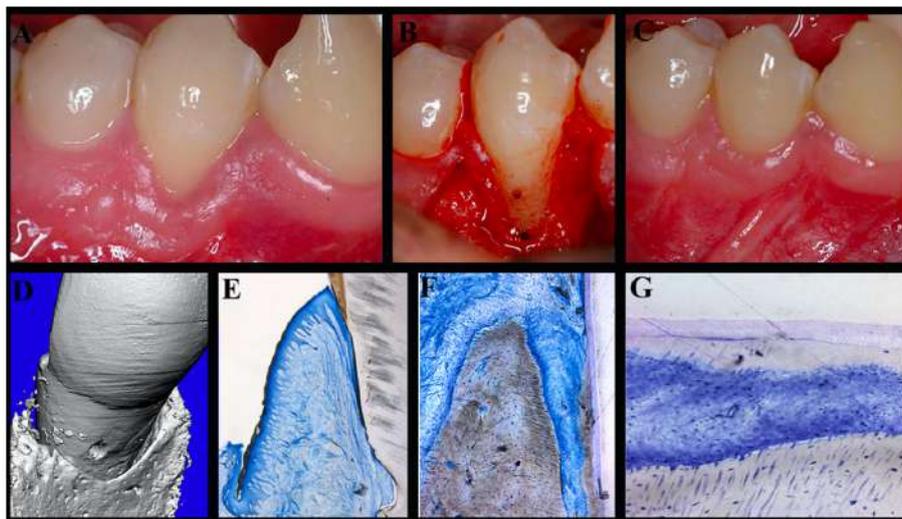
近年に行われた無作為化臨床試験では、いくつかの歯根被覆方法(CAF 単独、CAF+EMD、CAF+コラーゲンマトリックス、CAF+コラーゲンマトリックス+EMD)の有効性を評価した結果、CAF+コラーゲンマトリックス+EMDの方が歯根の完全被覆率が高いことが示された。また、他の研究では、創傷の安定性に寄与し、歯周再生に必要な空間を維持する移植材の足場の役割が示唆されており、EMDに自家骨移植を組み合わせることで臨床成績が向上する可能性が示唆されている。加えて、審美的な結果や患者満足度の向上にEMDが果たす役割の可能性が報告されている。最後に、生物製剤の添加は、手術のみの場合と比較して喫煙者に有益であることがわかっている。

### 血小板由来成長因子-BB

血小板由来成長因子-BB(PDGF)は、歯周組織学の分野で最も研究されている成長因子の一つである。1980年代後半に導入されて以来、いくつかの動物実験や臨床研究により、骨、セメント質、PDLの再生を促進する役割が確認されている。作用機序については、PDLや歯槽骨細胞が増殖性や走化性を高めるようなPDGFの複数受容体に発現していることが示されている。特に、Boyanらは、PDGF-BBが最も強力なものであることを示しているPDL細胞の細胞分裂反応および走化性反応における遺伝子組換えヒトPDGFの様々なアイソフォーム(AB,AA,BB)の効果を示した。McGuireとScheyerは、対照として結合組織移植片(CTG)を使用した症例において、GRs

の治療に rhPDGF-BB を使用することを最初に調査した。フラップ展開後、露出した根面および歯冠側 PDL 線維に rhPDGF-BB 溶液を塗布し、rhPDGF-BB 溶液に浸漬させた少量のリン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)を歯根面上に置いた。コラーゲンマトリックスを rhPDGF-BB 溶液に浸漬させ、フラップを縫合する前に移植片の上に適応させた。 $\beta$ -TCP を rhPDGF-BB\*のキャリアとして使用した理由は、 $\beta$ -TCP 粒子が軟組織の崩壊を防ぎ、新生骨形成のためのマトリックスを提供する足場の役割を持ち、また血栓の安定化を促進するためである。本治療は、歯根の被覆率、審美性の面で有効であり、有害事象は報告されていない。これらの所見から、本症例は、口蓋から採取した自家製 CTG を必要とせず、rhPDGF-BB +  $\beta$ -TCP とコラーゲンマトリックスを用いて GRs を治療するための概念実証を提供するものであると著者らは結論づけた。

これらの有望な結果を踏まえ、同グループは、CAF+rhPDGF-BB+ $\beta$ -TCP+生体吸収性コラーゲン創傷治癒ドレッシング(試験群)と CAF+CTG を比較したスプリットマウス無作為化臨床試験を計画した。対照群では 9 ヶ月後に退縮の改善が認められたが、研究終了時には成長因子処置された部位の方がより大きな PD 減少が認められた。両群とも同様の KTW(角化組織幅)ゲイン、審美的結果、患者満足度が観察された。さらに、本研究では、矯正治療のために抜歯を必要とした 6 本の治療歯の組織学およびマイクロ CT 解析を行った。9 ヶ月後、CAF+CTG 群では長い付着上皮と結合組織繊維が根面に平行に沿って治癒しているのを示す一方で、成長因子処置を受けた部位では歯周組織再生の証明を示した。再生した骨はマイクロ CT で切り込みに対して歯冠側に可視化され、組織学的解析では骨細胞とセメント細胞が新たに形成された骨とセメント質に取り込まれていることが確認された。新生 PDL は、新生セメント質と新生骨の中にシャープリー線維が斜めに入り込んでいることを示した。このことから、PDGF を介したアプローチにより、GRs の治療と歯周組織再生が可能であることが明らかになった(図3)。



**FIGURE 3** Clinical and histologic efficacy of rhPDGF-BB in the regeneration of recession defects. **A)** Clinical photograph of recession defect 2 months after its surgical creation. Osseous and gingival reference notches were placed at the time of surgical correction of the recession defect; **B)** In each case, the osseous crest was placed  $\approx$  3 mm apical to the pre-corrected gingival margin; **C)** Complete root coverage is maintained 9 months after correction of the recession defect with rhPDGF-BB +  $\beta$ -TCP; **D)** Nine months after grafting with rhPDGF-BB +  $\beta$ -TCP, micro-CT reveals coronal bone regeneration superior to the osseous notch; **E through G)** Ground sections demonstrated robust coronal bone regeneration and newly formed cementum 9 months after grafting with rhPDGF-BB +  $\beta$ -TCP; **G)** Higher-power ground section revealing regeneration of all tissues of missing periodontium. (Adapted with permission from *Journal of Periodontology*<sup>10</sup>)

$\beta$ -TCP とコラーゲン膜を組み合わせた、rhPDGF-BB を使用した後の研究では、ADM(無細胞性真皮マトリクス)または CTG を用いた歯根被覆の適応について比較検討した。Deshpande らは、CTG と rhPDGF-BB+ $\beta$ -TCP+コラーゲン膜を用いた場合、それぞれ 91.3%と 87.7%の平均根被覆率を得たが、一方で、CAF 単独では 6 ヶ月後の平均根被覆率は 68.6%であった。

rhPDGF-BB の使用は、GRs の治療において自家移植である CTG と同等の治療成績を達成する可能性があるが、新生骨、新生セメント質、新生 PDL を含む再生された歯肉退縮が、修復によ

る治癒を示すようなフラップ単独または CTG で治療された歯肉退縮部位と比較して長期的な安定性が高いというエビデンスはない。McGuire らの 5 年間の追跡調査では、CTG 群と rhPDGF-BB 群の間での歯肉退縮量の変化について、最初の 6 ヶ月間の時点と比較して、5 年間の安定性が良好であることが示された。しかしながら、CTG は歯肉退縮の減少、完全な歯根被覆部位の割合、KTW の増加に優れた結果を示した。

### 血小板濃縮物

成長因子の密度を高め、創傷治癒力を高めるために、患者自身の血液を遠心分離して血小板を濃縮することは、医学の多分野で実証されている。血小板濃縮物(PC)は、骨縁下欠損や上顎洞底挙上術の創傷治癒促進剤と考えられており、また、歯根被覆術では足場のマトリックスとしても使用されてきた。血小板が多血小板血漿 (PRP) および多増殖因子血漿 (PRGF) は、第一世代の PC と考えられる。歯根被覆の結果におけるそれらの影響は最小であり、一般的に意味のある結果を出してこなかった。自己血小板濃縮物の生物学的限界は、成長因子(GF)の組成が PDGFs や FGFs などの遺伝子組換え GF を用いて達成された場合よりもかなり低いことである。したがって、これらの方法で有意な再生を促進するための生物学的に適切な濃度を達成できるかどうかは疑問である。

第二世代の PC では、抗凝固剤を添加せずに血液を遠心分離を行う。多血小板フィブリン(PRF) は、処理速度と処理時間により、A-PRF、L-PRF、チタン調製 PRF に分類される。その利点として、PDGF、血管内皮成長因子 (VEGF)、TGF- $\beta$ 1、インスリン様成長因子 (IGF-1) などを含む成長因子の放出が報告されている。歯根被覆術において、PRF は、CTG 採取後の口蓋ドナーサイトにおける創傷治癒促進材として研究されるか、組織移植片と組み合わせ、または単独で研究されてきた。それにも関わらず、PRF の添加は歯根被覆術の治療成績をさらに向上させることはできなかったようであり、自家結合組織移植 (CTG) は依然として選択されるべき技術であることに変わりはない。考えられる説明は、歯肉退縮が軟部組織辺縁の厚みの影響を受け、PRF 膜が周囲組織からの細胞移動を促進する足場として機能しないことである。さらに、初期の研究では、IL-1 $\beta$  および TGF- $\beta$  のような血小板によって典型的に発現される因子のより高い濃度は、PDGF- $\alpha$  受容体および利用可能な結合部位の数を減少させることによって PDGF-AA に対する阻害的相互作用をもたらすことが示されており、これはまた、歯根被覆のための血小板濃縮物の限定的な成功を説明する可能性がある。まとめると、GF レベルのわずかな濃縮を含む血小板濃縮物の使用は創傷の修復と歯根被覆率を有意に向上させることはできなかった。そのため、現在のエビデンスに基づいて、これらの処置を臨床的に使用することは推奨されていない。

### 線維芽細胞成長因子-2

線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) は、ヘパリン結合性サイトカインであり、複数の細胞集団の血管新生および骨形成活性を高めることができる。また、FGF-2 は PDL 内の間葉系細胞の増殖と遊走を刺激することが可能である。このような強力な創傷治癒特性を考慮し、FGF-2 は単独または再生移植材 (scaffold) マトリックスとの併用により、歯周病や骨の再生を目的とした研究が進められている。石井らは、FGF-2 が生体内での歯根被覆結果に及ぼす影響を初めて評価した。スプリットマウス無作為化デザインにおいて、歯肉退縮を両側に作成し、FGF-2 単独または FGF-2 とキャリアマトリックス ( $\beta$ -TCP) を併用した治療法に分けられた。顕微鏡的および組織学的解析の結果、いずれの治療法も上皮の侵入を抑えつつ、ある程度の歯周組織再生を達成する効果があることが示された。特に、細胞や血管の浸潤、移動、成長を可能にする再生移植材と組み合わせることで GF の効果が得られることが示唆しているように、FGF-2+ $\beta$ -TCP は FGF-2 単独に比べて新生

骨と新生セメント質の形成量が多いことを示した。GR が発生すると、唇側歯槽骨が再吸収され、その結果、再生に好ましくない欠損構造となる。したがって、再生移植材が血栓と GF により良い安定性を提供していると推測される。これらの知見と一致するように、近年の 2 つの臨床前研究では、FGF-2 を再生移植材に組み込んだ場合、FGF-2 単独と比較して優れた結果が示された。また、FGF-2 と生分解性スポンジを用いて治療した部位では新たなセメント質と骨が観察され、一方で、別のグループでは、4 週目と 16 週目で FGF-2 を用いることで、コラーゲンマトリックスの再生移植材が歯根被覆量を増強させることができたことを明らかにした。これらの臨床前試験では、FGF-2 が特に再生移植材に組み込まれた場合、歯周組織再生と歯根被覆率を向上させることが示した。それにも関わらず、これらの臨床前試験の結果を立証するために、ヒト臨床試験が必要である。表 1 は、歯根被覆治療で使用される生物学的製剤を基にした技術を要約したものである。

現時点では、生物学的に基づかれた技術は、インプラント部の裂開した軟組織欠損の被覆にはまだ適用されていない。

**TABLE 1** Summary of the biologics-based technologies for application in root coverage procedures

Biological agent	Origin	Properties	Carrier matrix	Level of evidence (SORT)	Reference(s)
Enamel matrix derivative (EMD)	Porcine fetal tooth	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulating cementogenesis</li> <li>Enhancing proliferation, differentiation and migration of PDL cells and osteoblasts</li> <li>Enhancing blood vessels formation</li> <li>Promoting growth factor expression</li> </ul>	Can be used alone (gel) or with an absorbable collagen sponge	A	Rasperini et al., McGuire et al., Sangiorgio et al. <sup>6,22,23</sup>
Recombinant human platelet-derived growth factor (rhPDGF-BB)	Molecularly cloned from human PDGF-B gene	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promoting bone, cementum and PDL regeneration</li> <li>Enhancing proliferation and chemotaxis of PDL and alveolar bone cells</li> </ul>	Can be used alone (gel) or with different scaffolds ( $\beta$ -TCP, DFDBA, FDBA)	B	McGuire and Scheyer, McGuire et al., Simion et al. <sup>9,10,69</sup>
Platelet-rich fibrin	Centrifugation of the patient's own blood without the addition of anticoagulants	<ul style="list-style-type: none"> <li>Releasing of low concentrations of growth factors (including PDGF, VEGF, TGF-<math>\beta</math>1, and IGF-1)</li> </ul>	Has been used alone (as a membrane) or in combination with soft tissue grafts	B	Keceli et al., Kuka et al. <sup>45,48</sup>
Fibroblast growth factor-2	Molecularly cloned from human FGF-2 gene	<ul style="list-style-type: none"> <li>Enhancing angiogenic and osteogenic activity</li> <li>Stimulating the proliferation and migration of PDL cells</li> </ul>	Can be used alone, with an absorbable sponge, a collagen matrix, or $\beta$ -TCP	C	Ishii et al., Cha et al. <sup>66,68</sup>

DFDBA, demineralized freeze dried bone allograft; FDBA, freeze dried bone allograft; SORT, strength-of-recommendation taxonomy; SORT A: consistent, good-quality patient-oriented evidence; SORT B: inconsistent or limited-quality patient-oriented evidence; SORT C: consensus, disease-oriented evidence, usual practice, expert opinion or case series for studies of diagnosis, treatment, prevention, or screening.<sup>70</sup>

## 結論

歯周組織再生を促進しながら歯肉退縮を治療することを目的とする場合には、EMD や PDGF を歯根被覆に使用することを支持するエビデンスがある。血小板濃縮物は、今まで曖昧な結果を示しており、その臨床的使用法はまだ決定されていない。FGF-2 を用いた臨床前データは有望であり、臨床使用の可能性を判断するためにはヒトでの研究が必要である。軟組織再生のための生物学的製剤の使用の将来的な開発には、歯槽骨と軟組織の両方の再生を増強するための次世代の生体吸収性足場を成長因子に結合させることを含んでいるかもしれない。

## 謝辞

## 文献紹介

William V. Giannobile は、以前に Biomimetic Therapeutics と Straumann のコンサルタントを務め、助成金を受けたことがある。Giulio Rasperini と Giovanni Zucchelli は、以前に Straumann のコンサルタントを務めたことがある。Michael K. McGuire は、Straumann と Osteohealth から直接研究支援を受けている。他の著者は、本研究に関連する製品や情報に直接または間接にかかわらず、いかなる金銭的利益も有していない。本研究は、ミシガン大学歯周病学大学院生研究基金によって部分的に支援された。

南川 彰/船登 彰芳