

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792266

研究課題名(和文) コラーゲンスキャフォールドに FGF-2 を併用した新しい歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Periodontal regeneration by collagen scaffold in combination with FGF-2

研究代表者

加藤 昭人 (KATO, Akihito)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40507571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：組織再生の足場となるスキャフォールドにコラーゲンスポンジを用い、線維芽細胞増殖因子(FGF-2)を併用した新しい歯周病再生治療法の開発を行った。優れた生体親和性、細胞侵入性が高いコラーゲンハイドロゲルスキャフォールドに創傷治癒促進効果を有するFGF-2を含浸させてインプラント歯周組織欠損に埋入したところ、スキャフォールド単体の埋入よりも失われた歯槽骨やセメント質、歯根膜の再生が促進され、新しい歯周組織再生用材料として十分に効果的であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We examined whether combined therapy of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) induced wound healing and collagen hydrogel scaffold stimulated periodontal regeneration. Collagen hydrogel scaffold has rapid cell infiltration in the scaffold and replacement by regenerative tissue with low cytotoxicity. Implantation of collagen hydrogel scaffold in combination with FGF-2 enhanced regeneration of alveolar bone, cementum, periodontal ligament in beagle dogs. The combined therapy is expected to be a suitable therapy for periodontal tissue engineering.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯周組織再生 線維芽細胞増殖因子(FGF2) スキャフォールド コラーゲンハイドロゲル 分岐部病変 tissue engineering 動物実験 ビーグル犬

1. 研究開始当初の背景

再生療法の成功には細胞の足場となるスキャフォールドが重要である。これまでにコラーゲンがスキャフォールドとして広く臨床応用されているが、近年新しく開発されたアスコルビン酸-銅架橋システムによるコラーゲンハイドロゲルは、高い細胞誘導性と組織置換性が報告されている。このコラーゲンハイドロゲルをイヌ歯周組織欠損に塗布した研究では、歯槽骨やセメント質の形成が促進され、細胞の増殖効果が得られたことが報告されており、コラーゲンハイドロゲルのスキャフォールドとしての可能性が示された。しかしながら、コラーゲンハイドロゲルはその性質上流動性が高く、機械的強度も低いことから、臨床応用には問題があった。

一方、真皮欠損部グラフト材として応用されているコラーゲンスポンジは、これまでの研究で良好な生体親和性やスペースメイキング効果が明らかにされている。研究者はこのコラーゲンスポンジに前述のコラーゲンハイドロゲルを含ませて欠損部に埋入することができれば、コラーゲンハイドロゲルを欠損内に保持でき、歯周病により喪失した骨やセメント質、歯根膜を再生するのに有効なスキャフォールドとなり得る可能性があると考えた。そこでコラーゲンハイドロゲルをコラーゲンスポンジに含浸させたコラーゲンハイドロゲルスキャフォールドを開発し、イヌ歯周組織骨欠損に埋入する研究を行ったところ、歯周組織の再生効果を認め、スキャフォールドとしての有効性が明らかになった。

また、再生療法には組織を再構築するため細胞の増殖・分化を促進する増殖因子の働きが重要であるが、増殖因子をコラーゲンハイドロゲルスキャフォールドに添加して歯周組織欠損部に埋入できれば、歯周組織再生のさらなる促進につながる可能性が高い。

FGF-2 は結合組織新生や血管新生を強力に誘導する増殖因子として広く知られ、*in vitro* において細胞の骨形成能を上昇させることが報告されている。この FGF-2 をコラーゲンハイドロゲルスキャフォールドに含浸させて歯周組織に埋入すれば再生が起こりにくい大きな組織欠損でも既存の組織由来細胞の増殖を大きく促進させ、歯周組織の飛躍的な再生が期待される。

2. 研究の目的

- (1) FGF-2 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドの作製
- (2) FGF-2 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドをイヌ歯周組織欠損に埋入して歯周組織治癒に及ぼす効果を検討

3. 研究の方法

- (1) FGF-2 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドの作製

① ウシ真皮由来アテロコラーゲン溶液をア

スコルビン酸、塩化第二銅二水和物で架橋し、脱泡・フィルター処理を行い、1.5%コラーゲンハイドロゲルを作製した(図1-A)。

② コラーゲンハイドロゲルに FGF-2 (フィブラストスプレー) を含浸させた。

③ 5×3×3mm の大きさにトリミングしたコラーゲンスポンジ(図1-B)に、FGF-2 含有コラーゲンハイドロゲル(FGF2 濃度:50 μg/個)を含浸させ、FGF2 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドを作製した(図1-C)。

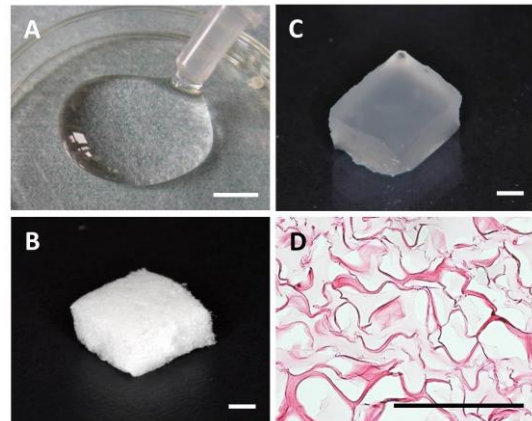


図1 A:コラーゲンハイドロゲル B:コラーゲンスポンジ C:FGF-2 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールド D: コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドのH.E.染色像 Scale: A = 5 mm; B, C = 1 mm; D = 100 μm.

(2) FGF-2 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドのイヌ歯周組織欠損への埋入
ビーグル犬の上下前臼歯部頰側に高さ 5mm、深さ 3mm の根分岐部Ⅱ級骨欠損を作製した。骨膜除去、根面のルートプレーニングを行い、24%EDTA で処理後、次の3群に分けた。

FGF/Co1 群: FGF-2 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドを骨欠損部に埋入

Co1 群: コラーゲンハイドロゲルスキャフォールド単体を埋入

対照群: 骨欠損部に何も埋入せず
観察期間は1週、4週とし、臨床的観察、エックス線写真撮影、組織学的観察および計測(図3)を行った。

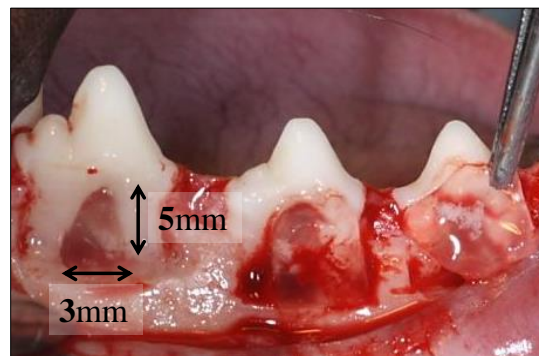


図2 根分岐部Ⅱ級骨欠損へのスキャフォールド埋入

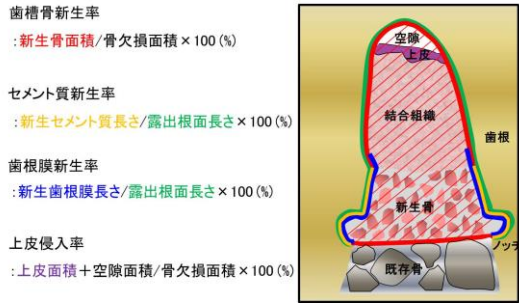


図3 組織学的計測項目

4. 研究成果

(1) 臨床的観察

4週後の対照群では、歯肉退縮により分岐部開口部の露出が認められたが、Co1群、FGF/Co1群では分岐部の露出は観察されなかった(図4)。



図4 4週後の口腔内写真

(2) エックス線写真

対照群に比べ、Co1群、FGF/Co1群では4週で不透過性の充進が認められた(図5)。

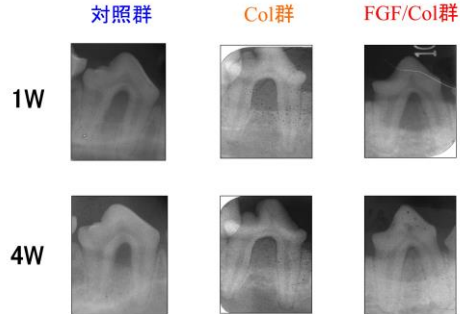


図5 1週, 4週後のエックス線写真

(3) 組織学的観察

① 1週

対照群では分岐部内に上皮組織の侵入が観察されたが、他の2群では認められなかった。Co1群の分岐部内はスキャフォールドで満たされており、周囲に細胞の集積がみられた。FGF/Co1群では、多数の血管新生、スキャフォールド内への細胞侵入が多数観察され、活発な骨新生が認められた。(図6)

② 4週

対照群の根面には少量のセメント質様硬組織が形成され、新生骨との間に密度が低い疎な結合組織が観察された。線維の走行は根面と平行であった(図7)。Co1群では欠損の半分程度に新生骨形成が認められ、セメント質様硬組織の形成も多く観察された。骨とセメント質様硬組織の間のコラーゲン線維は密

で根面と垂直に走行する線維もみられた(図8)。FGF/Co1群では新生骨が多量に形成され、セメント質様硬組織が分岐部頂にまで観察された。骨と根面の間には線維組織に富んだ歯根膜様組織が観察された(図9)。

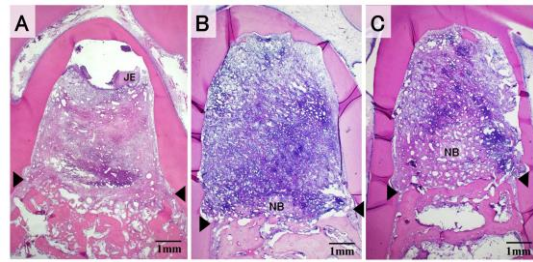


図6 1週の組織像 A:対照群 B:Co1群 C:FGF/Co1群 JE:上皮 NB:新生骨

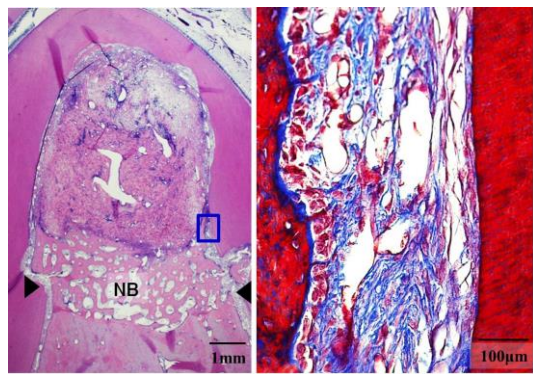


図7 4週対照群の組織像 NB:新生骨

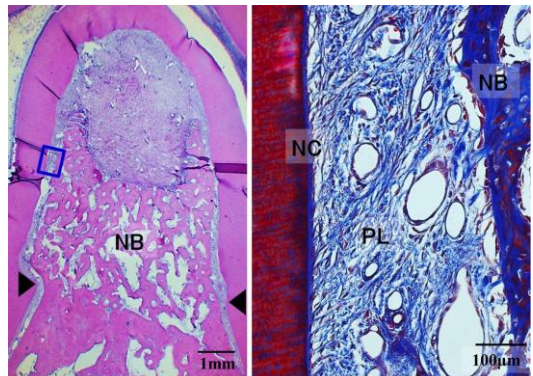


図8 4週Co1群の組織像 NB:新生骨 NC:新生セメント質 PL:新生歯根膜

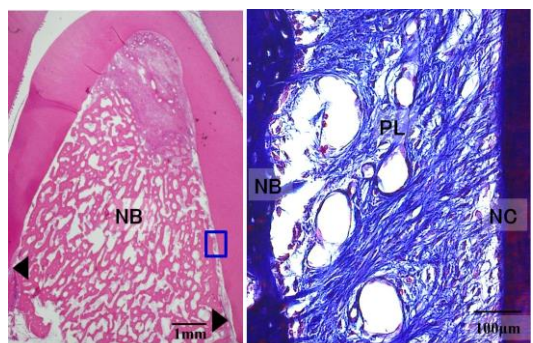


図9 4週FGF/Co1群の組織像 NB:新生骨 NC:新生セメント質 PL:新生歯根膜

(4) 組織学的計測

① 歯槽骨新生率

対照群と比較して、FGF/Col 群、Col 群ともに有意に高い骨形成がみられた。また、分岐部中央付近では FGF/Col 群と Col 群との間に有意差は認められなかったが、240 μm から頬側では 2 群間に有意差が認められた。(図 10)

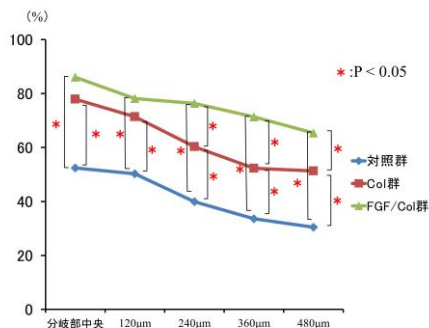


図 10 歯槽骨新生率

② セメント質新生率

FGF/Col 群、Col 群ともに対照群と比較して有意に大きい値を示した。(図 11)

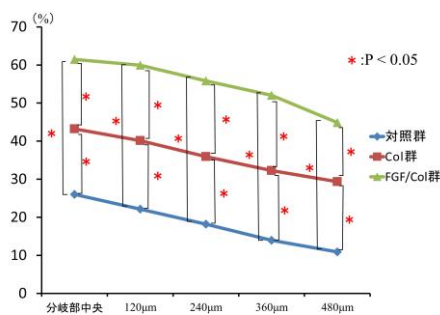


図 11 セメント質新生率

③ 歯根膜新生率

FGF/Col 群は他の 2 群と比較して、全ての部位で歯根膜形成に有意差が認められた。(図 12)

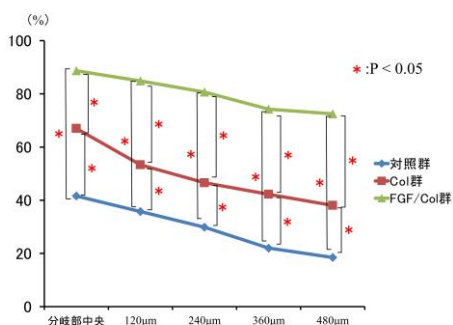


図 12 歯根膜新生率

④ 上皮侵入率

FGF/Col 群と Col 群の上皮侵入率はほぼ同じであった。対照群と他の 2 群との比較では、240 μm から頬側で対照群に有意に大きい上皮侵入が認められた。(図 13)

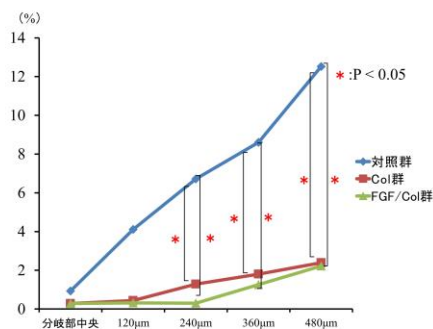


図 13 上皮侵入率

以上の結果から、FGF-2 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドは歯周組織の治癒を促進することが明らかとなり、歯周組織再生用マテリアルとしての可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Y Kosen, H Miyaji, A Kato, T Sugaya, M Kawanami: Application of collagen hydrogel/sponge scaffold facilitates periodontal wound healing in class II furcation defects in beagle dogs. J Periodont Res, 査読有, 47: 626-634, 2012.
DOI:10.1111/j.1600-0765.2012.01475.x

[学会発表] (計 10 件)

- ① 百瀬 起人, 加藤 昭人, 他: FGF2 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドの根分岐部 II 級骨欠損への応用. 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 平成 26 年 5 月 23 日-24 日, 長良川国際会議場, 岐阜.
- ② 小川 幸祐, 加藤 昭人, 他: ナノ β-TCP コーティングスキャフォールドと FGF2 併用による歯周組織治癒. 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 平成 26 年 5 月 23 日-24 日, 長良川国際会議場, 岐阜.
- ③ 西田 絵梨香, 加藤 昭人, 他: チタン表面のカーボンナノチューブコーティングと生体適合性評価. 第 13 回日本再生医療学会総会, 平成 26 年 3 月 4 日-6 日, 京都国際会館, 京都.
- ④ 田中 佐織, 加藤 昭人, 他: 新規イオン徐放性 S-PRG フィラー含有根管シーラーの生体適合性の検討. 日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会 (第 138 回) 春季日本歯周病学会学術大会, 平成 25 年 6 月 27 日-28 日, 福岡国際会議場, 福岡.
- ⑤ 百瀬 起人, 加藤 昭人, 他: FGF 含有コラーゲンハイドロゲルスキャフォールドの根分岐部 class II 骨欠損への応用. 第 56 回春季日本歯周病学会学術大会, 平成

25年5月31日-6月1日, タワーホール舟堀, 東京.

- ⑥ 小川幸佑, 加藤昭人, 他: ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドのイヌ歯周組織欠損モデルへの応用. 第56回春季日本歯周病学会学術大会, 平成25年5月31日-6月1日, タワーホール舟堀, 東京.
- ⑦ 宮治裕史, 加藤昭人, 他: カーボンナノチューブコーティングチタンの生体応用. 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム, 平成24年11月26-27日, 仙台国際センター, 仙台.
- ⑧ A Kato, H Miyaji et al: The bone-forming effect of nano- β -TCP/collagen scaffold. 98th annual meeting of AAP in collaboration with JSP, Sept 29-Oct 2, 2012, Los Angeles Convention Center, Los Angeles, USA.
- ⑨ E Nishida, A Kato et al: Preparation and biological evaluation of titanium coated with CNT-net. 98th annual meeting of AAP in collaboration with JSP, Sept 29-Oct 2, 2012, Los Angeles Convention Center, Los Angeles, USA.
- ⑩ 宮治裕史, 加藤昭人, 他: 高気孔性 β -TCP スキャフォールドの作製と評価. 第55回春季日本歯周病学会学術大会, 平成24年5月18日-19日, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/tis-sue-engineering.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 昭人 (KATO Akihito)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 40507571

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし