

令和元年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11822

研究課題名(和文) バイオミネラリゼーション法による歯周組織再生用ナノ材料の創製と応用

研究課題名(英文) Fabrication and application of nanomaterial using biomineralization method for periodontal tissue engineering

研究代表者

宮治 裕史 (Miyaji, Hirofumi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：50372256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体内での骨形成を模したバイオミネラリゼーション法を用いて、ナノ構造化アパタイトスキャフォールドを創製し、生体親和性、骨増生効果および歯周組織再生効果を検討した。またアパタイトへ線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) を複合化し、スキャフォールドの高機能化を図った。その結果、アパタイトスキャフォールドの生体親和性は良好で、ラット頭蓋骨の増生を有意に促進し、ビーグル犬の2級分岐部骨欠損において歯周組織再生効果を示した。また、アパタイトスキャフォールドへのFGF2の複合化は骨形成を強く促進した。以上よりナノ構造化アパタイトスキャフォールドは有用な骨再生材料であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は国民病の一つで、患者数は国内で4500万人と推定され、超高齢社会を迎えますます増加の一途をたどっている。本研究ではバイオミネラリゼーション技術の応用によって骨や歯周組織を再生する効果が示されたことから、歯周病の新しい治療法として患者に貢献できる可能性がある。また生理活性物質FGF2の複合化によって再生量が飛躍的に増大することが実証され、複合物質を調整することで再生組織の選択性や抗菌性等も発揮できる可能性があり、再生医療イノベーションの一端を担う可能性がある。本研究での知見が医工連携でのナノ技術を用いた医療用マテリアルの開発促進につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We fabricated the nano-structured apatite scaffold using biomineralization method to imitate the bone formation in the body. The evaluation of biocompatibility, bone inductive effect and periodontal regenerative activity of apatite scaffold were carried out. In addition, we obtained the apatite scaffold loaded with fibroblast growth factor-2 (FGF2) to enhance the bio-properties of scaffold and assessed the bone forming ability. The results showed that apatite scaffold exhibited high biocompatibility and bone forming effect in rat cranial bone defect. Apatite scaffold stimulated the periodontal regeneration in class II furcation defect in beagle dogs. In addition, FGF-2 loaded apatite scaffold remarkably promoted the bone augmentation of rat skull bone, compared to pristine apatite scaffold. The nano-structured apatite scaffold would be beneficial for medical application in bone and periodontal tissue engineering.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：バイオミネラリゼーション アパタイト スキャフォールド 生体親和性 骨増生 歯周組織再生 ナノ構造 線維芽細胞増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 歯周組織再生療法のための足場材 (スキャフォールド) の必要性  
歯周病は国民病の一つで、超高齢社会を迎えますます増加の一途をたどっている。  
重度歯周病では既存の歯周組織再生療法を用いても十分な再生効果が得られないのが現状であった。  
歯周組織再生に最適化された高いポテンシャルを有するスキャフォールドは無く新規開発の必要性があった。
- (2) バイオミネラリゼーション法によるスキャフォールド創製  
スキャフォールド表面をナノ構造化すると生体活性が向上することが明らかとなった。  
バイオミネラリゼーション法は生体内での骨形成 (細胞外基質へのアパタイトの析出成長) を模しており、低融点基材上にも容易にナノ構造化骨類似アパタイト薄膜を形成できた。

## 2. 研究の目的

- (1) バイオミネラリゼーション法を用いてコラーゲンスキャフォールドにナノ表面構造を有するアパタイト薄膜を構築する。
- (2) ラットならびにビーグル犬にてナノ構造化アパタイトスキャフォールドの生物学的効果を検証する。
- (3) アパタイト薄膜へタンパク質を複合化し、アパタイトスキャフォールドの高機能化を図る。

## 3. 研究の方法

- (1) ナノ構造化アパタイトスキャフォールドの作製  
ウシタイプ I コラーゲンによるコラーゲンスキャフォールドを裁断した。  
交互浸漬処理によりアモルファスリン酸カルシウムプレコートを行った。  
リン酸カルシウム過飽和水溶液中に浸漬してアパタイト層形成を行い、SEM 観察を行った。
- (2) 骨芽細胞 MC3T3-E1 を用いた培養試験  
アクチンマイクロフィラメント染色による細胞付着性の検討を行った。  
LIVE/DEAD 染色による細胞毒性評価を行った。  
WST-8 アッセイによる細胞増殖性試験と LDH アッセイによる細胞毒性試験を行った。
- (3) ラット埋植による骨増生試験  
ラット頭蓋骨上にスキャフォールドを埋植し、骨形成の観察を行った。  
ソフトウェアを用いて 5 週後の骨増生量の計測を行った。  
免疫染色を行い 10 日後のスキャフォールド内部への細胞のイングロースを観察した。
- (4) ビーグル犬歯周組織における再生試験  
2 級分岐部骨欠損へにスキャフォールドを埋植し、4 週後の歯周組織再生の観察を行った。
- (5) タンパク質内包化試験  
ラット頭蓋骨上に線維芽細胞増殖因子 (FGF2) 10 $\mu$ g を内包したスキャフォールド (HAF10) を埋植し、骨形成の観察を行った。  
ソフトウェアを用いて 5 週後の骨増生量の計測を行った。

## 4. 研究成果

- (1) ナノ構造化アパタイトスキャフォールドの表面観察 (図 1)  
コラーゲンスキャフォールド (Ctrl) に比較して、アパタイトスキャフォールド (HA) ではナノ構造を有するアパタイト結晶薄膜の構築を認めた。

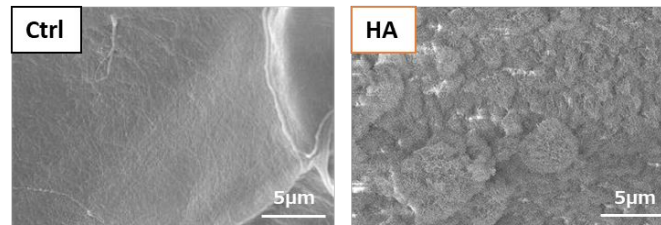


図1

- (2) 骨芽細胞 MC3T3-E1 を用いた培養試験 (図 2)  
アクチン染色試験では、Ctrl, HA 群ともに表面への細胞付着を認めた。  
LIVE/DEAD 染色では両群とも生細胞 (緑) を認めた。

細胞増殖性は Ctrl に比較して HA で低下したが、細胞毒性は同等であり、HA の細胞親和性は良好と考えられた。

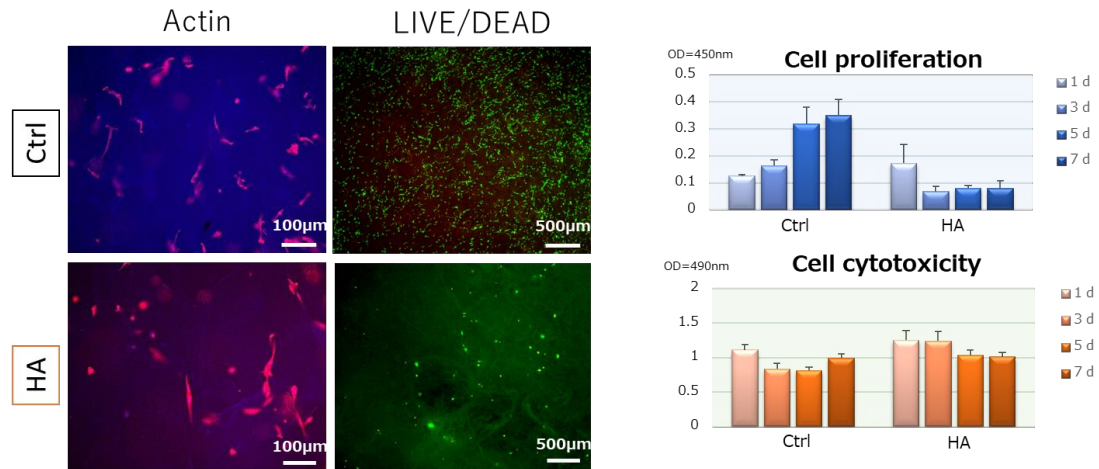


図2

(3) ラット埋植による骨増生試験 (図3)

Ctrl ではスキャフォールドの残留を認めたが、HA では新生骨の形成が良好だった。HA の骨増生量は Ctrl の約 5 倍であり、骨補填材としての応用が期待できる。免疫染色では HA 内部への骨芽細胞 (赤) の良好なイングロースを認めた。

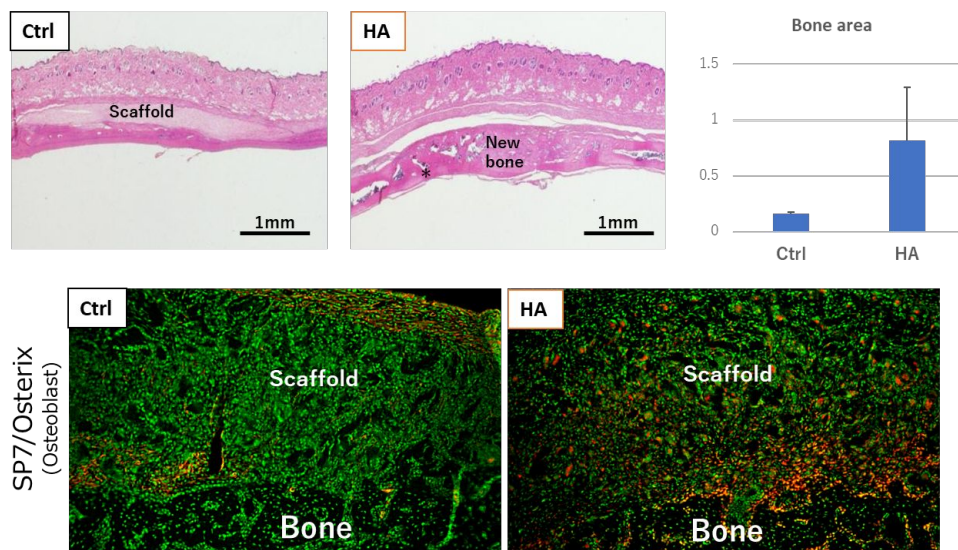


図3

(4) ビーグル犬歯周組織における再生試験 (図4)

HA は Ctrl に比較して歯周組織再生を促進した。残留 HA には骨基質の添加を認めた (拡大像)。歯周組織再生用スキャフォールドとしての応用が期待できる。

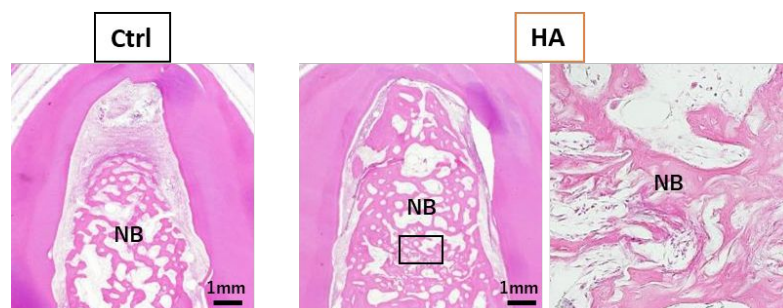


図4

(5) タンパク質内包化試験 (図5)

HAF10 は良好な骨増生を示した。

HAF10 は HA ならびに Ctrl よりも良好な骨増生を示し、内包した FGF2 の骨形成効果が発揮さ



れたと考えられた。本法は様々な生理活性物質を内包できることから、骨再生用スキャフォールドとしてさらなる高機能化が可能であると考えられた。

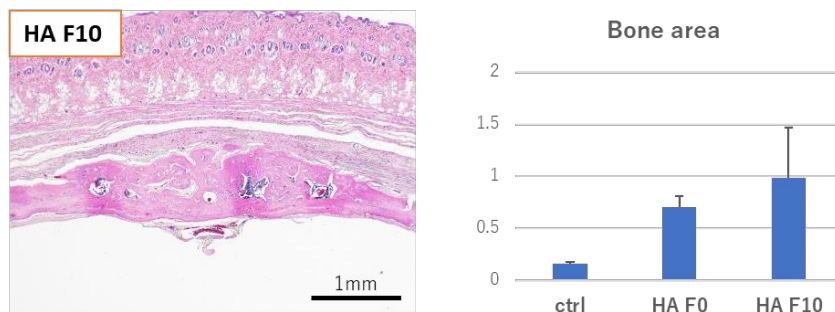


図5

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計9件)

A Oyane, M Nakamura, I Sakamaki, Y Shimizu, S Miyata, H Miyaji. Laser-assisted wet coating of calcium phosphate for surface-functionalization of PEEK. PLoS ONE, 査読有, 13 (10), 1-15 (e0206524), 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206524>

AJ Nathanael, A Oyane, M Nakamura, M Mahanti, K Koga, K Shitomi, H Miyaji. Rapid and area-specific coating of fluoride-incorporated apatite layers by a laser-assisted biomimetic process for tooth surface functionalization. Acta Biomater, 査読有, 79, 148-157, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.025>

J Nathanael, A Oyane, M Nakamura, K Koga, E Nishida, S Tanaka, H Miyaji. Calcium phosphate coating on dental composite resins by a laser-assisted biomimetic process. Heliyon, 査読有, 4(8), e00734 (1-16), 2018.

[doi:10.1016/j.heliyon.2018.e00734](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00734)

H Miyaji, S Murakami, E Nishida, T Akasaka, B Fugetsu, J Umeda, K Kondoh, T Iizuka, T Sugaya. Evaluation of tissue behavior on three-dimensional collagen scaffold coated with carbon nanotubes and  $\beta$ -tricalcium phosphate nanoparticles. J Oral Tissue Engin, 査読有, 15(3), 123-130, 2018.

<https://doi.org/10.11223/jarde.15.123>

A Tateyama, A Kato, H Miyaji, E Nishida, Y Iwasaki, S Fujii, K Kawamoto, K Shitomi, T Furihata, K Mayumi, T Sugaya. Bone induction by  $\beta$ -tricalcium phosphate microparticle emulsion containing simvastatin. Nano Biomed, 査読有, 9, 69-76, 2017.

<https://doi.org/10.11344/nano.9.69>

S Murakami, H Miyaji, E Nishida, K Kawamoto, S Miyata, H Takita, T Akasaka, B Fugetsu, T Iwanaga, H Hongo, N Amizuka, T Sugaya, M Kawanami. Dose effects of beta-tricalcium phosphate nanoparticles on biocompatibility and bone conductive ability of three-dimensional collagen scaffolds. Dent Mater J, 査読有, 36, 573-583, 2017.

<http://doi.org/10.4012/dmj.2016-295>

AJ Nathanael, A Oyane, M Nakamura, I Sakamaki, E Nishida, Y Kanemoto, H Miyaji. In vitro and in vivo analysis of mineralized collagen-based sponges prepared by a plasma- and precursor-assisted biomimetic process. ACS Appl Mater Interfaces, 査読有, 9, 22185-22194, 2017.

DOI: 10.1021/acsami.7b04776

K Ogawa, H Miyaji, A Kato, Y Kosen, T Momose, T Yoshida, E Nishida, S Miyata, S Murakami, H Takita, B Fugetsu, T Sugaya, M Kawanami. Periodontal tissue engineering by nano beta-tricalcium phosphate scaffold and fibroblast growth factor-2 in one-wall infrabony defects of dogs. J Periodont Res, 査読有, 51, 758-767, 2016.

DOI:10.1111/jre.12352

M Nakamura, A Oyane, Y Shimizu, S Miyata, A Saeki, H Miyaji. Physicochemical fabrication of antibacterial calcium phosphate submicrospheres with dispersed silver nanoparticles via coprecipitation and photoreduction under laser irradiation. Acta Biomater, 査読有, 46, 299-307, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.015>

### 〔学会発表〕(計18件)

大矢根綾子, 坂巻育子, 中村真紀・古賀健司, 部 佳奈子, 眞弓佳代子, 宮治裕史. 過飽和液中レーザー照射法を利用したヒト象牙質基材へのフッ素担持アパタイト成膜. 日本セラミックス協会, 2019.

西田絵利香, 宮治裕史, 降籬友和, 宮田さほり, 加藤昭人, 金本佑生実, 菅谷 勉, 赤坂 司. ナノ-TCP/ヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチド顆粒の骨形成特性評価. 日本再生医療学会, 2019.

大矢根綾子, 坂巻育子, 中村真紀, 古賀健司, 部 佳奈子, 眞弓佳代子, 宮治裕史. 過飽和液中レーザー照射法による象牙質表面へのフッ素担持アパタイトの迅速成膜. 日本バイオマテリアル学会, 2018.

S Tanaka, H Miyaji, E Nishida, AJ Nathanael, M Nakamura, A Oyane, T Tanaka, S Inoue. Calcium phosphate coating on human dentin and composite resin surface by laser-assisted biomimetic process. KACD-JSCD Joint Scientific Meeting, 2018.

A Oyane, AJ Nathanael, M Nakamura, K Shitomi, H Miyaji. Fluoride-incorporated apatite coating for tooth surface modification by laser irradiation in supersaturated solutions. Bioceramics 30, 2018.

舘山彰人, 加藤昭人, 宮治裕史, 西田絵利香, 岩崎泰彦, 藤井秀司, 川本康平, 部 佳奈子, 降籬友和, 眞弓佳代子, 菅谷 勉. シンバスタチン添加-TCP 微粒子エマルジョン骨ペーストの特性評価および骨形成効果. 日本歯周病学会, 2018.

K Shitomi, H Miyaji, AJ Nathanael, M Nakamura, A Oyane, T Sugaya. Acid-resistance and antibacterial properties of laser-processed and fluoride-incorporated apatite layer. AAP, 2018.

大矢根綾子, AJ Nathanael, 中村真紀, 宮治裕史. 生体に心地よい無機質表面の作り方と歯科応用. CSJ 化学フェスタ, 2018.

大矢根綾子, A. Joseph Nathanael, 中村真紀, 眞弓佳代子, 部佳奈子, 宮治裕史. 飽和液中レーザー照射による象牙質表面への迅速リン酸カルシウム成膜. 日本セラミックス協会, 2018.

A. Joseph NATHANAEL, 大矢根綾子, 中村真紀, 部 佳奈子, 宮治裕史. 過飽和液中レーザー照射によるフッ素担持アパタイトの迅速成膜. 日本セラミックス協会 2018 年年会 2018.

A. Joseph NATHANAEL, 大矢根綾子, 中村真紀, 部 佳奈子, 宮治裕史. 過飽和液中レーザー照射によるフッ素担持リン酸カルシウム成膜と抗菌性評価. 日本バイオマテリアル学会, 2017.

田中佐織, 宮治裕史, 西田絵利香, A. Joseph NATHANAEL, 中村真紀, 大矢根綾子, 田中 享, 飯田俊二, 高師則行, 井上 哲. レーザー援用バイオメティック法によるレジン表面の改変とアパタイト形成能評価. 日本総合歯科学会, 2017.

部 佳奈子, 宮治裕史, A. Joseph NATHANAEL, 中村真紀, 大矢根綾子, 菅谷 勉. レーザー照射による焼結水酸アパタイト基材へのフッ素担持リン酸カルシウム成膜と抗菌特性評価. 日本歯科保存学会, 2017.

AJ Nathanael, A Oyane, M Nakamura, H Miyaji, E Nishida, Y Kanemoto. Apatite-coated collagen sponges for tissue engineering applications. IUMRS-ICAM2017, 2017.

西田絵利香, 宮治裕史, 金本佑生実, A. Joseph NATHANAEL, 中村真紀, 大矢根綾子, 村上秀輔, 眞弓佳代子, 加藤昭人, 菅谷 勉. バイオメティック法によるリン酸カルシウム成膜スキャフォールドの特性評価. 日本再生医療学会, 2017.

中村真紀, 大矢根綾子, 宮田さほり, 佐伯 歩, 宮治裕史. レーザー光を用いて作製した銀ナノ粒子含有リン酸カルシウム球状粒子の抗菌性評価. 日本バイオマテリアル学会, 2016.

金本佑生実, 宮治裕史, 西田絵利香, A. Joseph NATHANAEL, 中村真紀, 大矢根綾子, 村上秀輔, 眞弓佳代子, 加藤昭人, 菅谷 勉. バイオメティック法によるリン酸カルシウム成膜スキャフォールドの生物学的特性. 日本バイオマテリアル学会, 2016.

西田絵利香, 宮治裕史, A. Joseph NATHANAEL, 中村真紀, 大矢根綾子, 田中 享, 加藤昭人, 菅谷 勉. レーザー援用バイオメティック法によるレジン表面へのリン酸カルシウムの析出. 日本歯科保存学会, 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: コラーゲン様ペプチド及びリン酸カルシウムの複合体並びにこれを含む生体組織修復材  
発明者: 宮治裕史, 西田絵利香, 宮田さほり, 降籬友和

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-217792

出願年：2018 年  
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/biomate.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田中 佐織

ローマ字氏名：TANAKA, Saori

所属研究機関名： 北海道大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：90344522

研究分担者氏名：加藤 昭人

ローマ字氏名：KATO, Akihito

所属研究機関名： 北海道大学

部局名：大学院歯学研究院

職名：助教

研究者番号（8桁）：40507571

研究分担者氏名：中塚 愛

ローマ字氏名：NAKATSUKA, Megumi

所属研究機関名： 北海道大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：00547648

研究分担者氏名：西田 絵利香

ローマ字氏名：NISHIDA, Erika

所属研究機関名： 北海道大学

部局名：大学病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：50779882

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大矢根 綾子

ローマ字氏名：OYANE, Ayako

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。