

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17038

研究課題名(和文)世界初！ナノセラミクス配合ヒトコラーゲンによる安心安全な歯周組織再生法

研究課題名(英文) Safe and reliable periodontal tissue regeneration using human collagen with nanoceramics.

研究代表者

西田 絵利香 (Nishida, Erika)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：50779882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチドは、動物由来成分を含まないバイオマテリアルとして注目されている。これを顆粒状に成形し(RCP)、さらに型リン酸三カルシウム(-TCP)微粒子を配合した作製した-TCP/RCPは、in vitro評価及びラット頭蓋骨欠損モデルによる評価によって、良好な生体親和性と骨形成能を示した。次にビーグル犬で歯周組織再生効果があるかどうかを検討した。術後8週後、実験群の新生骨量は対照群より2.2倍多かった。また、歯根膜様組織も2.1倍多く形成され、歯肉退縮を有意に抑制した。以上より-TCP/RCPは歯周組織再生材料として有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この世界初の新規足場材は、動物由来成分を含まないため、高い安全性と生体吸収性、良好な骨形成効果を発揮することが期待される。本足場材が創製できれば優れた生物学的特性を発揮すると考えられ、歯周組織再生を大きく促進すると考えられる。歯周病患者は国内に4500万人、世界には推定1億人おり、臨床効果が実証されれば、新しい足場材として全世界的に応用される可能性があり、それら歯周病患者の治療に貢献できるとともに、その市場規模は計り知れず、研究開発の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Human type I collagen-like recombinant peptides have attracted attention as biomaterials that do not contain animal-derived components. The -TCP/RCP, which was made by granulating RCP and blending it with -tricalcium phosphate (-TCP) particles, showed good biocompatibility and osteogenic potential by in vitro evaluation and evaluation in a rat skull defect model. Next, we examined whether there was a periodontal tissue regenerative effect in beagle dogs. Eight weeks after surgery, the experimental group had 2.2 times more new bone than the control group. In addition, 2.1 times more periodontal ligament-like tissue was formed, and gingival recession was significantly suppressed. These results suggest that -TCP/RCP is effective as a periodontal tissue regeneration material.

研究分野：歯周組織再生

キーワード：歯周組織再生 スキャフォールド ナノセラミクス ヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は生活習慣病の一つで、超高齢社会を迎えますます増加の一途をたどっている。GTR法やエムドゲインを用いた歯周組織再生療法が臨床応用されているが、重度歯周病では十分な再生効果が得られていない。近年ティッシュエンジニアリングの概念に基づいて、再生療法に足場材(スキャフォールド)使用の重要性が認識されている。しかし現在臨床応用されているハードなバイオセラミクス系材料は、生体吸収が遅く(あるいは無く)、残留による治癒不全の危険性があり、歯周組織再生においてはペリオドンタルアタッチメント(歯根膜)の再生が起きづらい。一方、ソフトなコラーゲン等の生体吸収性ポリマー材料は、生体吸収に優れ、骨欠損形態にそってフレキシブルに骨補填可能であるが、動物由来成分でできているため、感染物質汚染のリスクがある。さらにコラーゲン単独では骨形成能が低く、歯周組織の再生量が少ないのも現状である。したがって安全安心で、骨形成能に優れ、生体吸収性が良好な足場材の開発が求められている。

申請者は今回、動物由来成分を含まないヒトI型コラーゲン様リコンビナントペプチドの使用、吸収性に優れるナノ粒子化したバイオセラミクスの併用、の2点に着目した。申請者はすでにこのヒトコラーゲンペプチドを用いた顆粒状足場材を試作してラットに移植する予備実験を行い、良好な生体親和性と骨形成効果を確認した。一方で申請者はこれまでにナノ材料の足場材応用の研究を継続しており、今回強い骨形成を補填するためにナノバイオセラミクスを作製して、新規開発されたヒトI型コラーゲン様リコンビナントペプチド足場材に添加することを考案した。

この世界初の新規足場材は、動物由来成分を含まないため、高い安全性と生体吸収性、良好な骨形成効果を発揮することが期待される。本足場材が創製できれば優れた生物学的特性を發揮すると考えられ、歯周組織再生を大きく促進すると考えられる。歯周病患者は国内に4500万人、世界には推定1億人おり、臨床効果が実証されれば、新しい足場材として全世界的に応用される可能性があり、それら歯周病患者の治療に貢献できるとともに、その市場規模は計り知れず、研究開発の意義は大きい。

2. 研究の目的

本研究では世界初のヒトコラーゲンペプチドとナノバイオセラミクスを併用した再生用足場材を創製し、歯周組織再生効果を実証することを目的とする。組織再生には足場材(スキャフォールド)が重要であり、申請者は近年ポリマートリックスであるコラーゲンスキャフォールドの研究を行い、ナノカーボン材料やナノセラミクス材料の併用による組織再生効果を実証してきた。コラーゲンは、生体親和性、吸収性に優れ、スキャフォールドの骨格をなす強度を持つが、動物由来成分である懸念があった。今回、申請者が着目するコラーゲンスキャフォールドは、ヒトリコンビナントのコラーゲンペプチドから構成され、動物由来成分を含まず、安心安全な世界初のコラーゲンバイオ材料である。本研究ではヒトコラーゲンペプチド足場材にナノ粒子化したバイオセラミクスを配合し、生物学的スクリーニング評価、および歯周組織再生療法へ試用してその再生能力を検討する。

3. 研究の方法

本研究計画では、バイオセラミクスとして -TCP ナノ粒子を用い、ヒトコラーゲンペプチド顆粒に -TCP ナノ粒子を添加した新規足場材を作製し、歯周組織再生に最適化した条件の検討と、歯周再生治療へ展開することが目的である。

(1)スキャフォールドの作製； -TCP ナノ粒子配合ヒトコラーゲンペプチド足場材を作製する。ヒトコラーゲンペプチド顆粒は0.5~2 mmに調整し、0.01, 0.1, 1 wt%の -TCP ナノ粒子分散液を使用する。物性評価ならびに培養細胞を用いた生体親和性試験、バイオアクティブ効果に関する生化学的評価を *in vitro* にてスクリーニング評価し、最適条件を決定する。

(2)ラットでの評価； -TCP ナノ粒子を配合した足場材をラット頭蓋骨欠損モデルに埋入し、2, 4 週後にX線写真撮影ならびにマイクロCT撮影を行い、骨再生程度を評価する。次に脱灰薄切標本作製し、HE染色、マッソントリクローム染色、免疫染色を行い、組織学的に細胞イングロースと骨形成の観察、骨増生量の計測を行う。これらの結果から歯周組織再生のために最適な条件を決定して、以下イヌ歯周病モデルでの検討を行う。

(3)ビーグル犬での骨再生実験；前臨床試験としてビーグル犬に歯周病モデルを作製し、足場材埋入による再生実験を行う。マイクロCT撮影を行い、骨再生程度を評価する。術後4, 8週後の組織学標本をマッソントリクローム染色して、抗菌性、炎症性細胞浸潤状態、セメント質、歯根膜、歯槽骨の再生状態と微細形態、歯肉上皮との関連、歯根吸収、アンキロシスなどを観察する。さらに一部の標本をALP, BSP, OPN免疫染色し、根表面の細胞分化の程度を観察する。以上より、生体親和性の確認や、歯周組織の再生状態等を多角的に評価して、将来の臨床応用に向けたデータの蓄積を行う。

4. 研究成果

-TCP/RCP の SEM および EDX 分析では、-TCP 粒子は用量に依存して RCP の表面を覆っており、表面には Ca 及び P の存在が確認された (図 1)。細胞培養試験により、-TCP/RCP は 1%TCP で有意に細胞増殖を促進した。免疫染色及び LIVE/DEAD 染色の結果、TCP/RCP 上に細胞の接着と伸展が確認され、死細胞はわずかで低い細胞毒性を示すことがわかった。また、リアルタイム RT-PCR の結果、RCP 及び -TCP/RCP は Runx2, ALP, IBSP, ITGB 1 の骨形成マーカーの発現を刺激することが示された (図 2)。

以上の *in vivo* 評価において、-TCP/RCP は 1%TCP が最も適切な条件であると示唆され、その濃度設定で *in vitro* 評価に移行した。

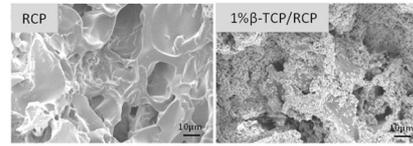


図 1 SEM像

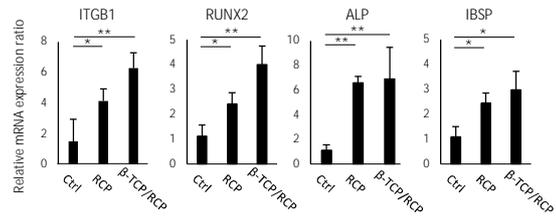


図 2 RT-PCR

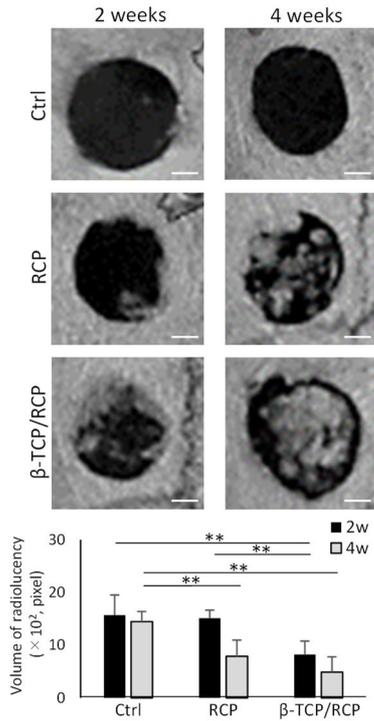


図 3 ラット頭蓋骨欠損モデルでのCT評価

ラット頭蓋骨欠損モデルでの組織形態学的評価では、対照群では骨欠損部はまばらな線維性結合組織で占められ、新生骨形成はわずかであったが、RCP および -TCP/RCP 適用群では、顕著な骨形成が認められ、特に -TCP/RCP は厚く多量の新生骨が認められ、-TCP/RCP は有意に骨新生を促進することが示された (図 3)。

また、ビーグル犬に作製した実験的骨欠損部に埋植した結果、術後 8 週におけるマイクロCT画像解析より、-TCP/RCP 埋植後の新生骨量は対照群と比較して 2.2 倍多く、両群間に有意差を認めた (図 4)。組織学的所見から、埋植された -TCP/RCP の周囲や内部に新生骨様組織の形成を認め、-TCP/RCP 埋植によって歯根膜様組織が 2.1 倍多く形成され、歯肉退縮を有意に抑制した。

以上より -TCP/RCP は骨形成能力を有し、歯周組織再生材料として有効であることが示唆された。

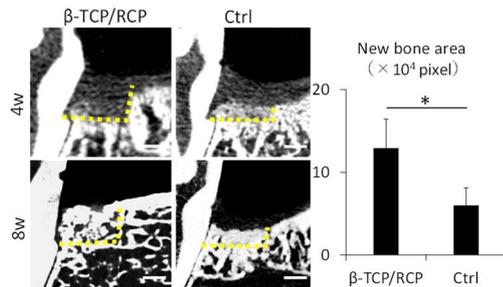


図 4 イヌ骨欠損モデルでのCT評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tomokazu Furihata, Hirofumi Miyaji, Erika Nishida, Akihito Kato, Saori Miyata, Kanako Shitomi, Kayoko Mayumi, Yukimi Kanemoto, Tsutomu Sugaya, Tsukasa Akasaka | 4. 巻 108 |
| 2. 論文標題 Bone forming ability of recombinant human collagen peptide granules applied with tricalcium phosphate fine particles | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research | 6. 最初と最後の頁 3033-3044 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34632 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Erika NISHIDA, Hirofumi MIYAJI, Kanako SHITOMI, Tsutomu SUGAYA, Tsukasa AKASAKA | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Evaluation of antibacterial and cytocompatible properties of multiple-ion releasing zinc-fluoride glass nanoparticles | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Dental Materials Journal | 6. 最初と最後の頁 157-164 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2019-176 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hirofumi MIYAJI, Kayoko MAYUMI, Saori MIYATA, Erika NISHIDA, Kanako SHITOMI, Asako HAMAMOTO, Saori TANAKA, and Tsukasa AKASAKA | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Comparative biological assessments of endodontic root canal sealer containing surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler or silica filler | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Dental Materials Journal | 6. 最初と最後の頁 287-294 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2019-029 JOI JST.JSTAGE/dmj/2019-029 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 E Nishida, H Miyaji, K Shitomi, T Sugaya, T Akasaka | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Evaluation of antibacterial and cytocompatible properties of multiple-ion releasing zinc-fluoride glass nanoparticles | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Dental Materials Journal | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 K Shitomi, H Miyaji, S Miyata, E Nishida, K Mayumi, T Sugaya, H Kawasaki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Human Dentin Coated with Silver Nanoclusters Exhibits Antibacterial Activity against Streptococcus mutans | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nano Biomedicine | 6. 最初と最後の頁 21-28 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11344/nano.11.21 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 田中佐織, 宮治裕史, 西田絵利香, 宮田さほり, 加藤昭人, 眞弓佳代子, 田中 享, 井上 哲 | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 S-PRGフィラー含有根管充填用シーラーの生体親和性評価 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 日本歯科保存学会誌 | 6. 最初と最後の頁 107-114 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Hirofumi MIYAJI, Kayoko MAYUMI, Saori MIYATA, Erika NISHIDA, Kanako SHITOMI, Asako HAMAMOTO, Saori TANAKA and Tsukasa AKASAKA | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Comparative biological assessments of endodontic root canal sealer containing surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler or silica filler | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Dental Materials Journal | 6. 最初と最後の頁 287-294 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2019-029 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kohei Kawamoto, Hirofumi Miyaji, Erika Nishida, Saori Miyata, Akihito Kato, Akito Tateyama, Tomokazu Furihata, Kanako Shitomi, Toshihiko Iwanaga, Tsutomu Sugaya | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Characterization and evaluation of graphene oxide scaffold for periodontal wound healing of class II furcation defects in dog | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Nanomedicine | 6. 最初と最後の頁 2365-2376 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IJN.S163206 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Hirofumi miyaji, Shusuke murakami, Erika nishida, Tsukasa akasaka, Bunshi fugetsu, Junko umeda, Katsuyoshi kondoh, Tadashi iizuka, Tsutomu sugaya | 4. 巻 15(3) |
| 2. 論文標題 Evaluation of tissue Behavior on three-dimensional collagen scaffold coated with carbon nanotubes and beta-tricalcium phosphate nanoparticles | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Tissue Engineering | 6. 最初と最後の頁 123-130 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11223/jarde.15.123 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 降籟友和, 宮治裕史, 西田絵利香, 加藤昭人, 宮田さほり, 薮佳奈子, 眞弓佳代子, 金本佑生実, 菅谷勉, 赤坂司 |
| 2. 発表標題 -TCPナノ粒子配合ヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチド骨補填材による骨形成効果 |
| 3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本大介, 宮治裕史, 西田絵利香 |
| 2. 発表標題 サブミクロン-TCPおよびZnO添加ヒトI型コラーゲン様リコンビナントペプチド骨補填材の開発 |
| 3. 学会等名 第23回生体関連セラミックス討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西田絵利香, 宮治裕史, 降籟友和, 加藤昭人, 宮田さほり, 薮佳奈子, 眞弓佳代子, 金本佑生実, 菅谷勉, 赤坂司 |
| 2. 発表標題 ヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチド/サブミクロン-TCP骨補填材による骨形成効果 |
| 3. 学会等名 第41回バイオマテリアル学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 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, 眞弓佳代子, 加藤昭人, 菅谷 勉 |
| 2. 発表標題 バイオメテックアパタイト成膜スキャフォールドの特性評価 |
| 3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会北海道ブロック第3回研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西田絵利香, 宮治裕史, 薮佳奈子, 菅谷勉 |
| 2. 発表標題 Zinc-Fluorideガラス塗布材の細胞親和性評価 |
| 3. 学会等名 第148回日本歯科保存学会2018年度春季学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮治裕史, 眞弓佳代子, 金本佑生実, 西田絵利香 |
| 2. 発表標題 S-P R G フィラー含有根管充填シーラーによる根管充填後の根尖組織治癒 |
| 3. 学会等名 第148回日本歯科保存学会2018年度春季学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 薮佳奈子, 宮治裕史, 西田絵利香, 菅谷勉 |
| 2. 発表標題 亜鉛ガラス含有グラスアイオノマーセメントの物性および抗菌効果 |
| 3. 学会等名 第148回日本歯科保存学会2018年度春季学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西田絵利香, 宮治裕史, 薮佳奈子, 菅谷勉, 小野博信 |
| 2. 発表標題 酸化グラフェンスキャフォールドへの垂鉛担持による抗菌性の向上 |
| 3. 学会等名 第40回バイオマテリアル学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Saori Tanaka, Hirofumi Miyaji, Erika Nishida, A. Joseph Nathanael, Maki Nakamura, Ayako Oyane, Toru Tanaka, Satoshi Inoue |
| 2. 発表標題 Calcium phosphate coating on human dentin and composite resin surface by laser-assisted biomimetic process |
| 3. 学会等名 20th KACD-JSCD Scientific Joint Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 館山彰人, 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, 薮佳奈子, 降旗友和, 眞弓佳代子, 菅谷勉 |
| 2. 発表標題 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 |
| 3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西田絵利香, 宮治裕史, 薮佳奈子, 眞弓佳代子, 菅谷勉, 梅田純子, 近藤勝義, 古月文志 |
| 2. 発表標題 カーボンナノチューブによるチタン-生体界面のナノスケール改質と骨形成接合効果 |
| 3. 学会等名 第16回日本再生歯科医学会学術大会・総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 H Miyaji, K Mayumi, E Nishida, S Miyata, K Shitomi, T Furihata, Y Kanemoto, T Akasaka, T Sugaya |
| 2. 発表標題 Application of S-PRG nanofillers for novel periodontal therapeutic approach |
| 3. 学会等名 第104回AAP共催JACP・JSPバンクーバー大会（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西田絵利香, 宮治裕史, 降旗友和, 宮田さほり, 加藤昭人, 金本佑生実, 菅谷勉, 赤坂 司 |
| 2. 発表標題 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 |
| 3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---|---------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 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, 降旗友和 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2018-217792 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

| |
|--|
| 北海道大学大学院歯学研究院口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室 https://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/perio.html 北海道大学大学院歯学研究院口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室 https://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/perio.html |
|--|

| | | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|