

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791606
 研究課題名 (和文) 根面の BMP 塗布とコラーゲンスキャフォールド移植による
 歯周組織再生療法の開発
 研究課題名 (英文) Periodontal regeneration following BMP-root conditioning and
 collagen scaffold implantation.
 研究代表者
 宮治 裕史 (MIYAJI HIROFUMI)
 北海道大学 北海道大学病院 講師
 研究者番号：50372256

研究成果の概要(和文):根面に骨誘導タンパク(BMP)を塗布する方法にコラーゲンスキャフォールドを併用移植する新しい歯周組織再生療法の開発を行った. コラーゲンハイドロゲルとコラーゲンスポンジから成る新しいスキャフォールドは, 生体親和性, 細胞侵入性が高く, 単体でも骨増生効果や歯周組織再生効果を有していた. BMP塗布との併用療法を検討したところ, 十分な歯周組織再生が認められ, アンキローシスも抑制でき, 新しい治療法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 BMP-conditioning and implantation of a collagen scaffold stimulated periodontal regeneration. The collagen scaffold was composed of collagen hydrogel and type I collagen sponge. Application of collagen scaffold promoted bone augmentation and periodontal regeneration with high biocompatibility and tissue replacing ability. Root surface conditioning with BMP and implantation of collagen scaffold sufficiently enhanced periodontal regeneration and rarely induced ankylosis. The combined therapy is expected to be a suitable therapy for periodontal tissue engineering.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,300,000	0	1,300,000
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 21 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:歯学・歯周治療系歯学

キーワード:歯周組織再生, BMP-2, コラーゲン, スキャフォールド

1. 研究開始当初の背景

新しいコンセプトを持った再生療法の開発のため、研究者はこれまでに強力な分化誘導因子である骨誘導タンパク質 (BMP) を根表面に局在させる方法を開発しており、組織再生に有効であることを確認した。

一方、組織再生には細胞の足場 (スキャフォールド) と再生の場の確保が必要であると考えられている。研究者は BMP を塗布する再生療法を進展させ、BMP 塗布後さらに近年開発された新しいコラーゲンハイドロゲルを根面に塗布する方法を考案し評価を行った。その結果、再生量がさらに増加し、塗布したコラーゲンハイドロゲルがスキャフォールドとして作用した可能性が明らかになった。

そこでこのコラーゲンハイドロゲルを、スポンジ型アテロコラーゲン (FC-HAC) とハイブリッドさせることで、コラーゲンハイドロゲルの特性にコラーゲンスポンジの機械的強度を付与することが可能ではないかと考えた。BMP を根面に塗布する方法とコラーゲンハイブリッド体移植を併用することで、歯周組織再生量が大幅に促進される可能性が高いと考えた (図 1)。

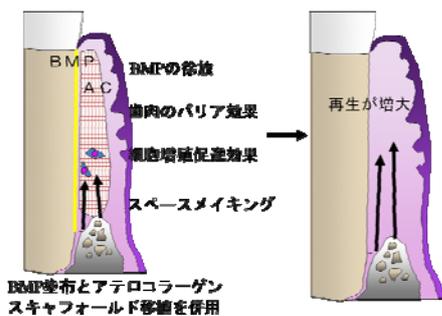


図 1. 研究のコンセプト

2. 研究の目的

(1) アテロコラーゲンスキャフォールドの生体親和性や組織置換性を評価するためにラット頭蓋骨上へアテロコラーゲンスキャフォールドを埋入して生体反応を確認した。

(2) イヌ歯周組織欠損部でのアテロコラーゲンス

キャフォールド埋入後の歯周組織再生効果を評価し、最後にBMPとアテロコラーゲンスキャフォールドを併用した方法が大幅に歯周組織再生を促進できるか検討した。

3. 研究の方法

(1) アテロコラーゲンスキャフォールドを移植した場合の生体反応に関する検討

①アテロコラーゲンスキャフォールド作製

各濃度 (2.5, 4, 6, 8%) のFC-HACスポンジを $4 \times 4 \times 4$ mm の大きさにトリミングした。コラーゲンハイドロゲルはウシアテロコラーゲン粉末から作製したアテロコラーゲン溶液をアスコルビン酸と塩化第II銅にて架橋し作製した。各FC-HACスポンジにコラーゲンハイドロゲルを含浸させアテロコラーゲンスキャフォールドとした (図 2)。

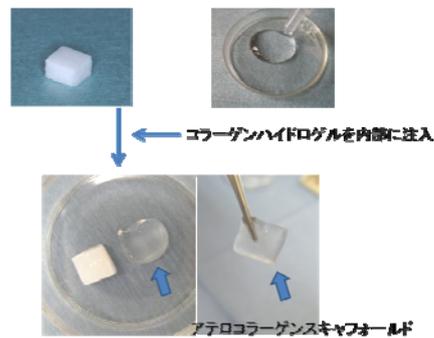


図 2. スキャフォールドの作製の流れ

①ラットへの移植方法

ラット頭蓋部に皮膚切開後、頭蓋骨を露出させ、ラウンドバーにて 3×3 mm の大きさで皮質骨を除去した。ラットを 3 群に分け、アテロコラーゲンスキャフォールド、およびハイドロゲルを含まないFC-HACスポンジのみを頭蓋骨上へ移植 (図 3)、皮膚を縫合した。対照群は何も移植しなかった。

②組織学的評価方法

5 日における生体親和性、細胞侵入性を確認し、15 日における新生骨の形態を観察した。また、新生骨形成量の組織学的計測を行った。

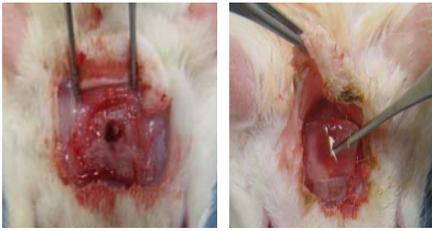


図 3.アテロコラーゲンスキャフォールドの移植

(3)アテロコラーゲンスキャフォールドに線維芽細胞増殖因子(FGF2)を添加した場合の生体反応に関する検討

強力な細胞誘導効果を有する生体材料(FGF2)を併用することを試み、検討を行った。

①ラットへの移植方法

(2)と同様に移植実験を行った。実験群では、FGF2(15 μ g)を含むアテロコラーゲンスキャフォールドを頭蓋骨上へ移植、対照群では FGF2 を含まないものを移植した。

②組織学的評価方法

7 日における細胞侵入性、血管新生の様子を観察し、カウントした。

(4)アテロコラーゲンスキャフォールドによる歯周組織再生の検討

①実験的歯周組織欠損の作製

ビーグル犬 3 頭の上顎前臼歯部頰側に根分岐部 class II 骨欠損を作製した(図 4)。実験群ではアテロコラーゲンスキャフォールドを埋入し、対照群では何も埋入しなかった。

②評価方法

2 週、4 週後に歯周組織再生に関する項目の組織学的観察および計測を行った。



図 4. 根分岐部 class II 骨欠損

(5)根面の BMP 塗布とアテロコラーゲンスキャフォールドの併用移植による歯周組織再生の検討

①実験的歯周組織欠損の作製

ビーグル犬 6 頭の下顎前臼歯に 1 壁性骨欠損を作製した(図 5)。BMP+ACS 群では 25 μ l の BMP-2(濃度; 1 μ g/ μ l)を根面に塗布し、骨欠損にアテロコラーゲンスキャフォールドを埋入(図 6)、ACS 群あるいは BMP 群では BMP-2 塗布あるいはスキャフォールド埋入のみ行い、未塗布群では塗布・埋入しなかった。4 週の観察期間終了後に、組織学的観察および計測を行った。

②評価方法

歯周組織再生に関する項目の組織学的観察および計測を行った。



図 5. 左:1 壁性骨欠損, 右:骨欠損にスキャフォールドを埋入。

4. 研究成果

(2) アテロコラーゲンスキャフォールドを移植した場合の生体反応に関する検討

5日の組織像を図 6 に示す。アテロコラーゲンスキャフォールド周囲に炎症性細胞浸潤は少なく、スキャフォールド内部に線維芽細胞が散在するのが観察された。一方FC-HACスポンジのみを移植した群では炎症性細胞が若干見られ、線維芽細胞の侵入は少ない傾向が見られた。骨面積の計測結果では、アテロコラーゲンスキャフォールド移植群で対照群より有意な骨増生が認められた(図 7)。

以上からアテロコラーゲンスキャフォールドは生体親和性、細胞侵入性に優れ、骨誘導を促進できる生体材料であることが示された。

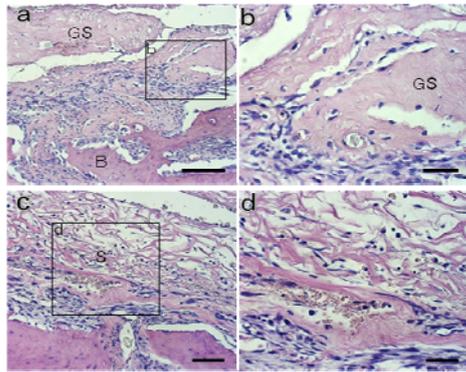


図 6. 組織像. a,b: アテロコラーゲンスキャフォールド移植群, c,d: FC-HACスポンジ移植群. GS:アテロコラーゲンスキャフォールド, S:FC-HACスポンジ, B:新生骨.

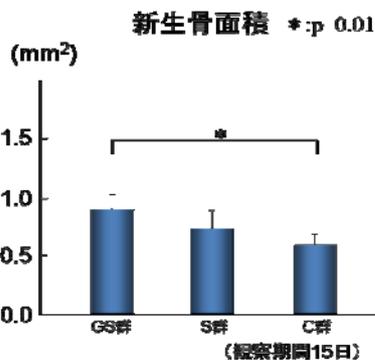


図 7. 新生骨面積. GS:アテロコラーゲンスキャフォールド移植群, S:FC-HACスポンジ移植群, C:対照群.

(3)アテロコラーゲンスキャフォールドに線維芽細胞増殖因子(FGF2)を添加した場合の生体反応に関する検討

7日における細胞侵入性, 血管新生の状態を図8に示す. FGF2を添加した実験群では, 対照群と比較して, より多くの線維芽細胞, 血管新生が認められた. 細胞数, 多核細胞数, 血管数をカウントした結果, いずれも実験群が有意に多い値であった(図9).

以上から, アテロコラーゲンスキャフォールドはFGF2などの生体材料のキャリアとして用いることが可能であることが示された.

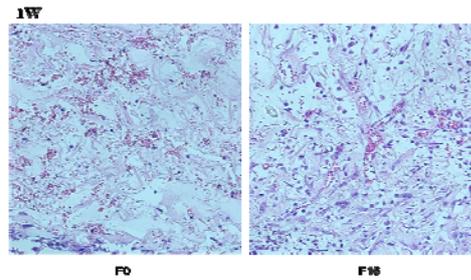


図 8. 組織像. F0:対照群, F15:実験群.

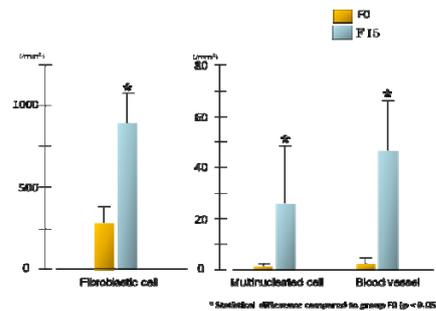


図 9. 線維芽細胞数, 多核細胞数, 血管新生数. F0:対照群, F15:実験群.

(4)アテロコラーゲンスキャフォールドによる歯周組織再生の検討

実験群の分岐部には著明な新生骨が認められ, 歯根表面にはセメント質や歯根膜様組織の形成が観察された(図10). 歯周組織の再生率は, 対照群と比較して有意に大きかった(図11). 以上の結果から, アテロコラーゲンスキャフォールドは歯周組織再生も促進する優れた材料であることが明らかになった.

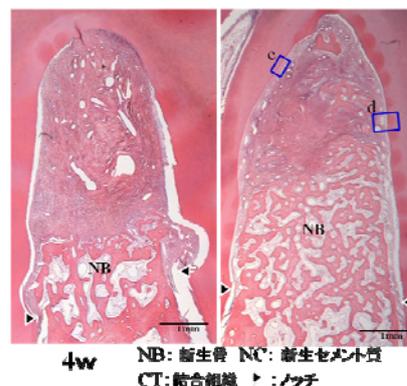


図 10. 組織像. 左:対照群, 右:実験群

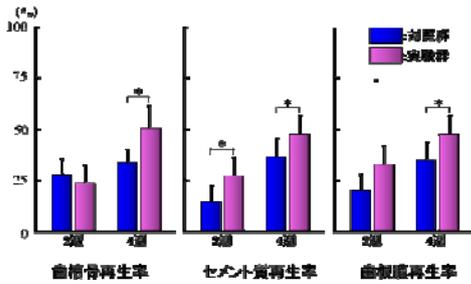


図 11. 組織学的計測結果.

(5) 根面の BMP 塗布とアテロコラーゲンスキャフォールドの併用移植による歯周組織再生の検討 4 週の組織像を図 12 に示す. 未塗布群では骨欠損底部に少量の新生骨しか見られなかった. BMP 群および ACS 群では骨欠損の半分程度の新生骨が見られたが, BMP 群では根面に沿って歯冠側へ細長く歯槽骨が再生しているのが特徴的に観察された. ACS 群では骨欠損全体に骨が再生していた. BMP+ACS 群では CEJ 付近まで歯槽骨が大幅に再生しているのが観察された. 根表面に歯根膜様組織に関して BMP 群では細胞や細胞外基質の密度は低く疎な構造として観察されたが, BMP+ACS 群では細胞や細胞外基質に富み, 血管網も発達していた.

BMP+ACS 群の歯槽骨再生量は他の 3 群に比較して有意に大きく, 歯根膜再生量も未塗布群より大きかった. アンキローシスは BMP 群で有意に大きかった(図 13).

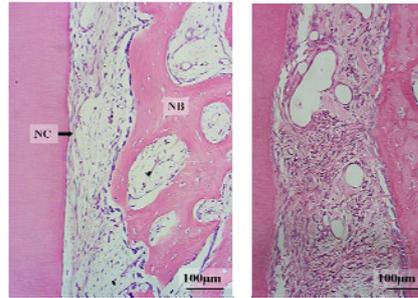
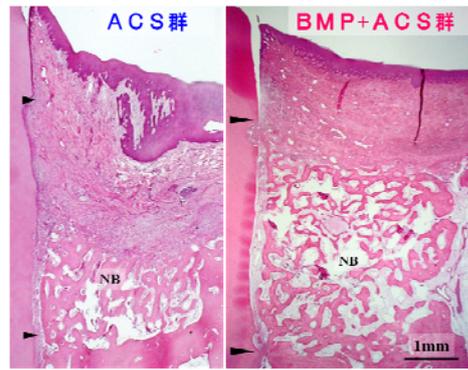
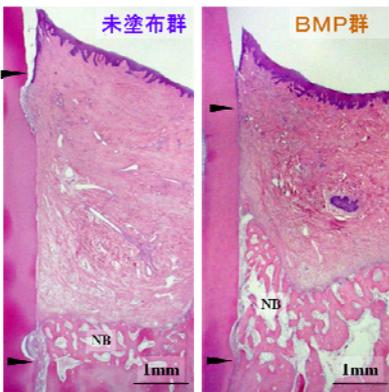


図 12. 3 段目左: BMP 群拡大像, 3 段目右 BMP+ACS 群拡大像, 歯根と新生骨の間の歯根膜様組織を示す.

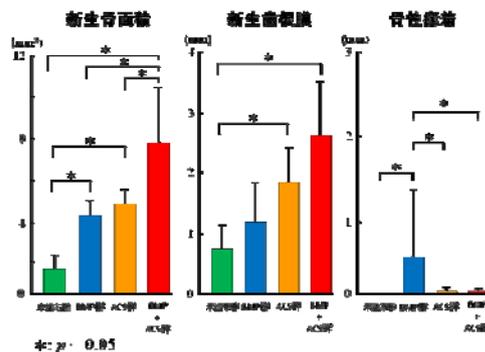


図 13. 組織学的計測結果.

以上より骨誘導タンパクを塗布する方法にコラーゲンスキャフォールドを併用移植する歯周組織再生療法は, 新しい治療法として十分に効果的であることが示された. 特に骨再生が十分でありかつアンキローシスが発生しなかったことは臨床応用に向け有利であった. このスキャフォールドは, 本研究でも示したように増殖因子を保持できること, さらに成型しやすいことから歯周組織以外の部位にも移植が容易であり, 様々な組織の再生療法に応用できる可能性が示された.

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7件)

① H Miyaji, T Sugaya, K Ibe, R Ishizuka, K Tokunaga, M Kawanami : Root surface conditioning with bone morphogenetic protein-2 facilitates cementum-like tissue deposition in beagle dogs. J Periodontal Res, 査読有, in press, 2010.

② S Shimoji, H Miyaji, T Sugaya, H Tsuji, T Hongo, M Nakatsuka, KU Zaman, M Kawanami : Bone perforation and placement of collagen sponge facilitates bone augmentation. J Periodontol, 査読有, 80: 505-511, 2009.

③ 川浪雅光, 齋藤 彰, 加藤 熙, 菅谷 勉, 小田島朝臣, 宮治裕史, 齋藤恵美子: 歯周組織再生療法の臨床研究の現況. 歯科臨床研究, 査読無, 5: 71-81, 2008.

④ 宮治裕史, 菅谷 勉, 加藤昭人, 齋藤 彰, 小田島朝臣, 齋藤恵美子, 川浪雅光: BMPを用いた歯周組織再生療法の開発. 日本歯科評論, 査読無, 68 :39-40, 2008.

⑤ 得永佳介, 菅谷 勉, 宮治裕史, 川浪雅光: コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体のスキヤフォールドとしての有効性とBMP併用による骨増生. 日歯保存誌, 査読有, 51:659-669, 2008.

⑥ H Miyaji, T Sugaya, K Kato, N Kawamura, M Kawanami : The effects of collagen hydrogel implantation in buccal dehiscence defects in beagles. J Oral Tissue Engin, 査読有, 5: 87-95, 2007.

⑦ 加藤昭人, 宮治裕史, 菅谷 勉, 川浪雅光: 1壁性骨欠損における歯根象牙質表面へのBMP-2 塗布による歯周組織再生効果. 日歯周誌, 査読有, 49:296-304, 2007.

[学会発表](計8件)

① K Inoue, H Miyaji, H Fukuda, H Yokoyama, S Tanaka, T Sugaya, M Kawanami : Bone Marrow Cell Sheet in BMP-applied Collagen Scaffold for Bone Tissue Engineering. The 50th Anniversary of Korean Academy of Conservative Dentistry, 2009 Autumn Scientific Meeting (132nd) and The 11th Joint Meeting between KACD and JSCD. Nov12-14 2009, Ramada plaza (Jeju, Korea).

② 光銭裕太, 宮治裕史, 加藤昭人, 横山裕之, 逸見 優, 小林尚子, 石塚良介, 田中佐織, 菅谷 勉, 川浪雅光: 根分岐部class II骨欠損にコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体を移植した場合の組織反応. 日本歯科保存学会2009年度秋季学術大会(第131回), 2009年10月29-30日, 仙台国際センター(仙台).

③ 井上加菜, 宮治裕史, 福田寛恵, 横山裕之, 田中佐織, 菅谷 勉, 川浪雅光: 培養骨髄細胞シートとBMP含有FC-HACスポンジの併用移植

による異所性骨形成. 日本歯科保存学会2009年度秋季学術大会(第131回), 2009年10月29-30日, 仙台国際センター(仙台).

④ 小林尚子, 宮治裕史, 井原朝子, 鷲巢太郎, 横山裕之, 光銭裕太, 菅谷 勉, 川浪雅光: FGF-2含有コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体が骨新生に与える効果. 日本歯科保存学会2009年度秋季学術大会(第131回), 2009年10月29-30日, 仙台国際センター(仙台).

⑤ 得永佳介, 宮治裕史, 石塚良介, 加藤昭人, 井上加菜, 逸見 優, 光銭裕太, 玉川博貴, 菅谷 勉, 川浪雅光: コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体を頭蓋骨に移植した場合のスキヤフォールドとしての有効性とBMP併用による骨増生. 第52回日本歯周病学会春季学術大会, 2009年5月15-16日, 岡山コンベンションセンター(岡山).

⑥ H. MIYAJI, T. SUGAYA, K. TOKUNAGA, N. KOBAYASHI, S. SHIMOJI, K. INOUE, Y. KOSEN, M. KAWANAMI : Osteoinduction following implantation of collagen hydrogel-sponge composite. 86th General Session of the IADR, July2-5 2008, Metro Tronto Convention Centre (Toronto, Canada).

⑦ 石塚良介, 宮治裕史, 加藤昭人, 得永佳介, 井上加菜, 田中陽, 菅谷 勉, 川浪雅光: 象牙質表面へのBMP-2 とコラーゲンハイドロゲルの塗布による歯槽骨再生と骨性癒着. 第7回日本再生医療学会総会, 2008年3月13-14日, 名古屋国際会議場(名古屋).

⑧ 加藤昭人, 宮治裕史, 石塚良介, 得永佳介, 井上加菜, 菅谷 勉, 川浪雅光: 1壁性骨欠損においてBMP-2 の根面塗布は歯周組織再生を高める. 日本歯科保存学会 2007 年秋季学会(第127回), 2007年11月8-9日, 岡山コンベンションセンター(岡山).

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮治 裕史(MIYAJI HIROFUMI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号:50372256

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし