

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20420

研究課題名(和文) サイトカイン・細胞接着タンパク質共役型DNAスキャフォールド材の開発

研究課題名(英文) Development of cytokine, cell adhesion protein conjugate type DNA scaffold materials

研究代表者

山本 南奈 (Yamamoto, Nana)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：60736677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNAをバイオマテリアルとして活用を目的とした。DNAには骨形成促進機能があり、水と混和すればジェリーになる。DNAジェリーはインジェクト可能であった。クロスリンカーにてサイトカインおよび細胞接着タンパク質を共有結合させたプロタミンをDNAに静電的に反応させてサイトカインや接着タンパク質をDNAスキャフォールド材にコンジュゲートさせる。コンジュゲートする技法を確立することが困難であったため、今後の課題とする。添加物の成分と新生骨形成能との相関を検討した。ラット頭蓋骨に作製した骨欠損部位にDNAジェリーを充填すると骨の新生を認め、HE染色を行うと細胞毒性は比較的マイルドであった。

研究成果の概要(英文)：We thought that utilize DNA as biomaterial. There is an osteoplasty promotion function, and DNA has the characteristic that it becomes Jerry of the porosity if mixed with water by adjusting quantity of addition because it is porous. DNA Jerry, and it was injectable. DNA specifically couples cationic protamine in the helical structure. Protamine which let cytokine and cell adhesion protein covalently link in a cross linker to DNA electrostatically, and DNA lets scaffold materials. It was difficult to establish the technique that a conjugaion. Examined a correlation of ingredient of the additive and new osteoplasty ability from in vitro, an in vivo examination, and DNA having the environment that promotes osteoplasty. The new osteoplasty ability the bone defect on the rat skull with DNA Jerry and recognized the new bone when observed it in microCT. The cytotoxicity was relatively mild when performed HE dyeing. It was suggested that use alone acted on predominance for new bone.

研究分野：歯周病学

キーワード：DNA DNAジェリー サイトカイン 細胞接着タンパク質

1. 研究開始当初の背景

1. 研究の背景

高齢者の増加、および有病者(骨粗鬆症、糖尿病、歯周病など)の急増に伴い、遅発炎症や抗原抗体反応が無く、抗菌性を示す歯科用生体分解能生体材料の開発は急務である。現在、生体分解性生体材料の担体としてコラーゲン、ポリ乳酸など使用されているが分解速度、遅発炎症、抗原抗体反応、BSE および取り扱いなどに問題がある。そこで、DNA がそれらに替わる医療用材料の素材として注目され国内外で研究がなされている。DNA は骨形成に必要なリン酸基を多数有しており、塩基対間に抗生物質などをインターカレーションやグループバインディングさせ、さらに抗原抗体反応を起こし難いなど、生体材料の素材として極めて魅力ある要素を具備している。

しかし、DNA は様々な魅力的な性質を具備しているが、水溶性であるため単独使用すると生体内での拡散速度の問題からその用途は限定されてしまう。そこで、300bp DNA に各種カチオン性高分子材料と反応させて水不溶性にした各種DNA複合体を新規骨再生材料として用い、*in vitro*、*in vivo* 実験より評価してきた。特にDNA/プロタミン複合体は水と混和するとペーストになり細胞毒性は軽微で、ラット皮下軟組織への反応もマイルドであった。また、合成するDNAの分子量を変化させることで、複合体の生体分解性を調節できることを報告してきた。ラット頭蓋骨埋入実験においては骨の新生を著しく促進させ、この促進効果は主にDNAによるものと考えられている。DNA/プロタミン複合体はペーストであり操作性や賦形性に優れているが、反面、ペーストであるので細胞が容易に侵入できないという短所もある、つまり、細胞が容易に侵入しやすい気孔径、スペースを有すればさらなる骨の新生が期待できると考える。そこで、超高分子DNAの物性や機能を活用すればDNA単独でも今までにない新規のDNAスキャフォールドの開発が可能であると着想を得た。本研究では、特にDNAに着眼し新規スキャフォールド材の開発を目指す。

まず、超高分子DNAの物性を活用する。つまり、水溶性高分子の単独使用は生体内での拡散が速く難しいが高分子の溶解性は分子量に依存する

ので水溶性であっても超高分子を用いて溶解や拡散を出来る限り制御すればよいと考える。超高分子であるオリジナルDNA(20,000bp)を水に添加すればDNAはゼリー状(DNAゼリー)になり、それを凍結乾燥すれば細胞が播種でき、かつ拡散を遅延できるポーラスなDNAスキャフォールドが作製できると推察し予備実験を開始した。期待通り、水にDNAを適量添加し混和すると多孔体構造を有するゼリー状になり、優れた骨形成を示した。また、水への溶解速度も300bpDNAの1/20程度であることがわかった。

次に、DNAの機能の活用である。DNAは塩基対やラセン構造の溝に特定物質と特異的な反応をする。例えば、プロタミン(Pro)もその一つであるが、プロタミンはDNAの溝中で α -ヘリカル構造状態を取りながらリン酸基と強く静電的に結合する。この反応は極めて容易である。そして、サイトカイン(Cy)や細胞接着タンパク質(CAP)をクロスリンク剤によるProtein-Protein conjugation法にてプロタミンに結合させる。そして、サイトカインおよび細胞接着タンパク質と結合したプロタミンを多孔体DNA DNAスキャフォールド材に反応させて、各種サイトカイン・細胞接着タンパク質共役型DNAスキャフォールド材を作成する。作成したDNAスキャフォールド材を*in vitro*(細胞毒性試験、細胞活性試験など)、*in vivo*(ラット頭蓋骨埋入試験など)試験などから総合的に検討し、骨の新生を促進し易い環境を有するDNAスキャフォールド材の開発を目指す。

2. 研究の目的

超高分子DNAの特性を生かしたサイトカイン・細胞接着タンパク質共役型DNAスキャフォールド材を開発することが本研究の目的である。

すなわち、DNA自体に骨形成促進機能があり、超高分子であるので添加量を調整し、水と混和すれば多孔体構造のゼリーになる特徴がある。このゼリー体が流動性を示せばインジェクトが可能となる。また、DNAはラセン構造体の溝にカチオン性プロタミンを特異的に結合させる。そこで、クロスリンカーにてサイトカイン(b-FGFなど)および細胞接着タンパク質(フィブロネクチンなど)を共有結合させたプロタミンをDNAに静

電的に反応させてサイトカインや接着タンパク質をDNAスキャフォールド材にコンジュゲートさせる。そして、添加物の成分(単独組成、混合組成)と新生骨形成能との相関を *in vitro*(細胞毒性試験、細胞活性試験など)、*in vivo*(ラット頭蓋骨埋入試験など)試験などから総合的に検討し、骨形成を促進し易い環境を有し、安全性が高いDNAスキャフォールド材の開発を目指す。

3. 研究の方法

超高分子DNAの特性を生かしたサイトカイン・細胞接着タンパク質共役型DNAスキャフォールド材を開発する。その目標を達成するために以下のことを行う。

①DNAジェリーの溶解速度、粘度、気孔率、賦形性より混和比(DNA量/水の量)の適正化を行う。

②各種のCy-Proカップリング剤およびCAP-Proカップリング剤を合成し、紫外線照射により水不溶化したガラス板上のDNA薄膜に各種DNAカップリング剤を反応反応量を定量分析する。

③ガラス板上のカップリング剤処理済みDNA薄膜に骨芽細胞を播種し、骨分化誘導培地で培養後、骨形成関連遺伝子の発現量を測定する。

④DNAジェリーから作成した乾燥DNAディスクおよびカップリング剤処理済みDNAディスクをラット頭蓋骨へ移植し、骨形成能を評価する。

4. 研究成果

ラット頭蓋骨に作製した骨欠損部位にDNAジェリーを単独で填入し、経時的にマイクロCTにて観察すると骨の新生を確認することが出来た。しかし、サイトカインや細胞接着タンパク質とのコンジュゲートの方法の確立が困難であった。

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)

Salmon DNA Accelerates Bone Regeneration by Inducing Osteoblast Migration.

Sato A, Kajiya H, Mori N, Sato H, Fukushima T, Kido H, Ohno J.

The effect of slow degraded DNA scaffolds on bone regeneration

Ayako Matsumoto, Hiroshi Kajiya, Nana M-Yamamoto, Tsukasa Yanagi, Ayaka Imamura, Koji Okabe, Tadao Fukushima, Hirofumi Kido and Jun Ohno

[雑誌論文](計 2件)

[学会発表](計 5件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 ()

研究者番号：

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()