

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23059

研究課題名(和文) 核酸・新規カチオン性高分子複合体の空間的配置の適正化による新規骨誘導性基質の開発

研究課題名(英文) Development of Gene-Activated Matrix for Bone Augmentation with Self-Assembly Nano-Device Containing Plasmid DNAs

研究代表者

原 昌士 (Hara, Masahito)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：10885297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、遺伝子活性化基質(gene-activated matrix :GAM)に生体安全性の高い plasmid DNA搭載自己組織化ナノデバイス(Nanoball)ベクターを応用し、生体局所に効率的に骨形成性遺伝子を送達することで、骨誘導型GAMの開発を目指すものである。カチオン性高分子であるDendri-Graft Poly-L-lysine (DGL)によるカチオン性のNanobalをGAMに応用することで骨誘導能を有することを見出した。さらに、骨形成に寄与する特定のmicroRNAを同時に搭載することで効果が増強する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内への遺伝子導入方法としてウイルスベクターと非ウイルスベクターの応用が検討されている。ウイルスベクターは高効率な遺伝子導入により盛んに研究されているが、大量投与による過剰免疫反応による死亡事故などが報告されており安全性が確実ではない。また、非ウイルスベクターである高分子は分解時の副産物についての評価が困難である。しかしながら、我々が開発したGAMの構成成分は、DGLや-PGA、atelocollagen基質、-TCP顆粒などそれぞれ既に臨床応用されている材料を応用しており、生体適合性が高いことから、臨床応用可能なGAMを開発する上で極めて有利である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop new gene-activated matrix induced in vivo bone formation through an application of self-assembled nanodevice with plasmid DNAs which have biocompatibility. By applying the cationic polymer such as Dendri-Graft Poly-L-lysine (DGL) to GAM, we found the osteoinductive ability of GAM is promoted. Furthermore, when microRNAs related to regulation of bone morphogenetic protein (BMP) signals were contained in nanoballs, composed of artificial bone substitutes was promoted its in vivo osteoinducibility ability.

研究分野：骨再生治療

キーワード：GAM Nanoball 骨再生治療 DDS

1. 研究開始当初の背景

顎骨・歯槽骨の再生治療は、現在でも新鮮自家骨移植が gold standard であるが、自家骨採取は侵襲が大きく、採取量に限界がある。そこで、低侵襲かつ有効性の高い新規骨再生療法の開発が望まれている。そのため、我々は人工骨基質に成長因子の添加や間葉系幹細胞 (MSC) の応用などを進めてきた。しかしながら、Bone Morphogenetic Protein (BMP) などの蛋白質は移植後の副作用発現、MSC の応用には個人差や培養の不安定さといった課題があり、臨床上、自家骨移植以上に有効な骨再生療法は開発されていない。

我々は、蛋白と比較して大量精製が容易で、生体に対する安全性が高い plasmid DNA (pDNA) を搭載した骨誘導型 GAM の開発に従事してきた。骨誘導型 GAM は、PTH 遺伝子を組み込んだコラーゲン基質が最初の報告であるが (Bonadio et al, 1999)、現在その遺伝子導入効率の低さを補うため、ウィルスベクターや遺伝子導入試薬の応用が盛んに試されている。しかしながら、これらの試みは人体への為害作用から臨床応用が困難である。そのため、申請者は臨床応用が容易な GAM を開発するための第一歩として、siRNA 等のデリバリーに有効な atelocollagen 基質に BMP4 をコードする pDNA (pBMP4) を直接組み込み、移植したところ、ラット頭蓋骨骨膜上で、0.5 ~ 1mg の pDNA 量で一定の垂直的骨誘導効果が確認された (Umebayashi et al, 2015)。しかしながら、導入試薬応用時の pDNA 量 (0.02 ~ 0.1mg) と比較すると、依然として高用量であるため、人体への応用が容易な遺伝子送達技術を開発し、より高機能な GAM を創出する必要があると考えた。

カチオン性ベクターを全身性に投与すると、血液成分との凝集による組織有害性が示唆されている (Kodama et al, 2016)。そのため、我々はアニオン性の Nanoball を先行開発した。しかしながら、細胞膜電荷と静電的に引き合うことから、局所での遺伝子導入効率はカチオン性ベクターが有利と考えられた (Raftery et al, 2019)。一方で、Nanoball のカチオン性構成成分である PEI は、細胞毒性の高さが指摘されている。そのため、本研究では、新規カチオン性高分子である DGL を Nanoball に応用することを企図した。DGL は lysine のみで構築されており、生体分解性を示すため、安全性が高くなる。また、 dendritic 構造を有することから、遺伝子の安定的運搬、および導入遺伝子の発現も高くなることが予測される (Hirotsu

et al,2017)。本研究は顎骨再生の局所での応用を目的としているため、安全性の高いカチオン性ベクターの有効性について検討した。

これまで開発してきた GAM では、BMP4 といった骨形成性遺伝子のみを搭載で検討を重ねてきた。しかしながら、より広範囲な顎骨欠損では、豊富な血管網構築により骨形成に必要な細胞や因子を局所に供給することが可能となるため、血管形成性の遺伝子を搭載によって骨再生が促進されると考えた。ここで重要になるのは、役割の異なる遺伝子をどのように GAM 中に配置すれば良いのかが明らでないことである。広範囲顎骨欠損においては、担体材料の吸収前に GAM の中心部にまで早期に血管を誘導できれば、高効率な骨誘導が可能となると考えた。

2 . 研究の目的

骨形成局所の細胞への遺伝子送達を高効率に達成するため、DGL を応用した Nanoball の条件を検討する必要がある。まずは、pBMP4 をベースとして遺伝子を搭載することで、カチオン性の pBMP4-DGL、およびアニオン性の pBMP4-DGL- PGA 複合体を作製し、ラットへ移植を行うことで、骨再生局所の細胞への遺伝子取り込みや骨誘導性の変化を評価し、機能的な Nanoball の条件を探索する。

GAM に搭載する BMP4 遺伝子を mRNA または pDNA で導入し、mRNA 導入による骨再生の有効性を評価する。それにより Nanoball に搭載する分泌蛋白質をコードする遺伝子の導入形式を検討する。

BMP4 を骨誘導性の搭載遺伝子とし、血管形成に関与すると考えられる遺伝子を最適化された Nanoball にそれぞれ組み込み、それらの Nanoball を搭載した GAM の骨誘導性を検討する。その際に、BMP4 と血管形成に関与する遺伝子のそれぞれの Nanoball の GAM 中の適正に分布についても検討する。

3. 研究の方法

カチオン性遺伝子ベクターとして有用性が期待されている新規材料 DGL を用い pDNA-DGL と、pDNA-DGL- PGA を検討に用いた。それらの遺伝子送達効率および安全性を GAM 移植部に集積する各細胞を用いて評価した。さらに、ラット頭蓋骨欠損への GAM 移植実験で、骨誘導能について評価した。また、移植後 Nanoball を搭載した GAM に集積する細胞について、高効率に導入される細胞種を免疫組織化学および FACS にて検討した。具体的には導入する遺伝子に GFP もコードし、免疫組織化学では抗 GFP 抗体と細胞種ごとの特異的マーカーで二重染色を行った。また、FACS では GFP の蛍光と細胞の表面マーカーで細胞種ごとの GFP 陽性細胞率を評価した。

遺伝子の導入形式を検討するため、まずは、骨分化の制御に関与すると考えられる mRNA ならびに骨形成に寄与する特定の microRNA を搭載した Nanoball を作製し、各種細胞に遺伝子導入して、標的タンパク質発現を、pDNA を応用した場合と比較することで、その有用性について検討した。その後、ラットの欠損モデルに移植し有用性について評価した。

GAM 移植後の評価を行うにつれ基質改良の重要性を改めて認識した。我々は早期の臨床応用を検討しているためすでに安全性が認められているものを応用することとした。各材料を基質として使用し、遺伝子導入効果や骨誘導性について評価した。また、搭載する遺伝子は単独での応用、ならびに 2 種類を組み合わせたものを比較検討した。数種類の混合比の組み合わせで GAM を作製し移植し、CT データならびに組織検査を行うことで評価した。

4. 研究成果

本研究課題では、より優れた骨誘導能を人工骨基質に付与するため、カチオン性の Nanoball による mRNA デリバリーの有効性を評価することとした。カチオン性高分子である DGL によるカチオン性の Nanoball を搭載した GAM の有効性について、搭載する核酸・遺伝子、および人工骨基質の選定を合わせ、総合的に評価した。その結果、当初予定した mRNA ではなく、骨形成に寄与する特定の microRNA を搭載した Nanoball を OCP/Collagen 基質に組み込んだ GAM の骨誘導性について、ラット頭蓋骨の造成モデルや欠損モデルにおいて知見を得ることができた。そのため、これまでに自己組織化 nanodevice として有用性を見いだしているアニオン性高分子

-PGA で被膜した Nanoball を応用した GAM と比較することで、カチオン性 Nanoball を応用する有効性 について最終的な検討を実施しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masahito Hara, Yoshinori Sumita, Yukinobu Kodama, Mayumi Iwatake, Hideyuki Yamamoto, Rena Shido, Shun Narahara, Takunori Ogaeri, Hitoshi Sasaki, Izumi Asahina	4. 巻 14
2. 論文標題 Gene-Activated Matrix with Self-Assembly Anionic Nano-Device Containing Plasmid DNAs for Rat Cranial Bone Augmentation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma14227097	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------