

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390455

研究課題名(和文) 骨伝導性DNA/プロタミン複合体を応用したインジェクション型骨補填材の開発

研究課題名(英文) Application of bone conductive DNA/protamine complex for injectable bone graft materials

研究代表者

福島 忠男 (FUKUSHIMA, TADAO)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80084250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：サケ由来DNAとプロタミンからDNA/プロタミン複合体を合成し、インジェクション型骨補填材としての有効性を検討した。DNA/プロタミン複合体は水と混和するとペーストになり、骨関連遺伝子の発現も向上させた。また、ラット頭蓋骨埋入実験で骨欠損部位にこのペーストを埋入すると新生骨形成が促進されていた。したがって、DNA/プロタミン複合体はインジェクション型骨補填材の素材として有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The DNA/protamine complex was prepared by reaction between salmon testis DNA and protamine in order to investigate the potentials of the complex for injectable bone graft materials. The complex became paste by kneading the complex powder and distilled water, and the paste upgrade the expression of bone-related genes. Moreover, the paste induced new bone formation in rat cranial defect. Therefore, the DNA/protamine complex paste will be a useful biomaterial for injectable bone graft material.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯科再生・再生歯学

キーワード：DNA プロタミン 複合体 骨補填材 インジェクション 骨形成 ペースト 骨伝導性

1. 研究開始当初の背景

高齢者の増加，外科的技法の向上および歯周病患者の急増に伴い，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，アガロースが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．最近，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や骨形成誘導物質 (b-FGF 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．我々も医療材料としての可能性を検討する研究を始めたが，DNA は水溶性であるために単独使用はできない．そこで，リン酸基をカチオン性人工脂質で修飾したところ有機溶媒可溶性となり，溶媒を除去するとフィルム (DNA フィルム) になった．フィルムにおける *in vitro in vivo* の評価は良かったが，ラット皮下組織内での分解速度が速く，改善が不可欠となった．分解速度が速いのは，リン酸基に静電的に反応している 1 分子の脂質が，生体内に存在するイオンの影響を受け解離したと考える．そこで，DNA のリン酸基にキトサンのようなポリカチオン性高分子のアミノ基と反応させて架橋構造にすれば，分解速度は遅くなるものと考え DNA/キトサン複合体を合成した．分解速度は遅くなり，組織親和性も良好であった．また，水で混合するとペースト状になり，PBS バッファーでリンスすると強く凝集する性質を利用して独自のモールド加工法を考案した．しかし，ラット皮下埋入試験において厚い試料では一部分解されず残存していた．これはキトサンの分解酵素がない生体内で細胞貪食が十分進まなかった結果と考える．そこで，生体内で酵素分解するカチオン性ポリアミノ酸 (ポリリシンなど) との複合化を行った．水不溶性 DNA 複合体が得られ，ラット皮下内での分解性は良かったが，加工性に難点があった．加工性が悪いのはポリアミノ酸の分子が長く，1 分子に数多くの DNA が反応したことと，強い水素結合によって結合力の強い高次架橋構造が形成され，固い凝集体になったためである．従って，分子の短いカチオン性タンパク質を用い，DNA-DNA 間架橋を抑えつつ水不溶化にすれば，水に分散しやすい複合体になるものと推測した．カチオン性天然タンパク質であるプロタミンは抗菌性，免疫強化作用，新陳代謝促進作用などの機能を有し，インシュリン投与時の中和剤など医薬品として利用され

ており，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結合する．そこで，DNA にプロタミンを反応させれば，前述した機能を有し，水系で分散されやすい DNA/プロタミン複合体が得られるものと考えた．期待通り，水不溶性の DNA/プロタミン複合体が得られ，水と乳鉢中で練和すると半透明なペーストになった．臨床では，骨欠損部にアテロコラーゲン，血液などを利用して流動化した骨補填材がサイナスリフト法やソケットリフト法で充填され，コラーゲンで成型した骨補填材も骨再生医療に用いられている．しかし，患部への形状付与が十分とは言えず，BSE の問題もあり，バイオセラミックスからなる骨補填材に流動性や賦形性を付与する材料の開発が急務である．我々も DNA/プロタミン複合体の水と混合するとペースト状になり，風乾すると自己成形する，このユニーク性質は骨補填材の流動性や賦形性を付与するに最適と考えた．また，サイトカインを常温で長期間安定させる脂質被覆法も確立しており，脂質被覆サイトカインを添加すればさらなる骨誘導性の向上も期待できる．そこで，バイオセラミックス，脂質被覆サイトカイン，DNA/プロタミン複合体からなる高骨伝導性インジェクション型骨補填材の開発に着手することにした．

2. 研究の目的

DNA/プロタミン複合体の特性を生かしたインジェクト型骨補填材を開発することが目的である．すなわち，この複合体はそれ自体に骨伝導性や抗菌性があり，水不溶性であるが水と練和すればペーストになる特徴がある．ペーストになれば固体や液体の有機・無機物との混合も容易であり，この混合物が流動性を示せばインジェクトが可能となる．そこで，バイオセラミックス (炭酸アパタイトなど)，脂質被覆サイトカイン (b-FGF など) を含む各種 DNA/プロタミン複合体ペーストを作成する．そして，添加物の成分 (単独組成，混合組成，傾斜機能組成) 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，ビーグル犬大腿骨埋入試験など) 試験などから総合的に検討し，生体分解する高骨伝導性インジェクト型骨補填材の開発を目指す．

3. 研究の方法

(1) DNA/プロタミン複合体の合成

DNA/プロタミン複合体の合成：100ml のプロタミン硫酸塩 (500mg，MW:4500) 水溶液に，先に調整していた 100ml のサケ由来 DNA (500mg，300 bp) 含有水溶液を添加して 1 時間攪拌しながら，反応させた．反応後，24 時間沈殿物を蒸留水にて洗浄した．洗浄後，蒸留水中の沈殿物を遠心分離で回収し，蒸留水で数回洗浄した．洗浄後，再度遠心分離で

回収した白色沈殿物を凍結下で乾燥した。

(2) DNA/プロタミン複合体の流動性と賦形性

複合体を水と混合し、ペースト状にした。ペースト状複合体の粘度をフロ-テスターより計測した。また、ペースト状複合体を円盤状のシリコンモールドに入れ、離型後、24時間放置(湿度100%)し、寸法変化を寸法測定器より計測した。

(3) DNA/プロタミン複合体薄膜上で培養した骨芽細胞の遺伝子発現

300bp DNA/プロタミン複合体と水の練和物をガラスディスク(8mm x 1mm)に少量乗せ、さらにその上にテフロンプレートを置いた。そして、加圧機で加圧して複合体を薄膜にした。滅菌した複合体薄膜付着ガラスディスクを培養ウエルに入れ、ヒト由来骨芽細胞MG-63を播種(5×10^4 細胞数/ml)し、5日間培養した。スフェロイド形成した細胞を回収し、再度プラスチックウデッシュにて24時間培養した。培養後細胞を回収し、mRNA抽出後に通法にしたがってReal-time PCRを行った。なお、オステリックス(OSX),オステオカルシン(OCN),オステオポンチン(OPN),アルカリフォスファターゼ(ALP),ランクス2(Runx2),コラーゲン(Col-I)の発現量をqPCR法で測定した。同時に3000bpDNA/プロタミン複合体と7000bpDNA/プロタミン複合体のReal-time PCR分析も行い、参考資料とした。

(4) DNA/プロタミン複合体からのFGF-2の徐放量の測定

DNA/プロタミン複合体粉末(200mg)にFGF-2(1mg)含有滅菌水(0.16ml)を滴下し、乳鉢上で練和し、0.5%FGF-2含有300bpDNA/プロタミン複合体ペーストを作製した。FGF-2含有300bpDNA/プロタミン複合体ディスクを200mlのDMEM培地を含む24wellプレートに入れた。そして、浸漬1日、3日、5日、1週間、2週間、3週間後のFGF-2の徐放量をELISAにて測定した。

(5) 炭酸アパタイト含有DNA/プロタミン複合体ペーストの粘度

DNA/プロタミン複合体ペーストに炭酸アパタイトを60%添加して炭酸アパタイト含有DNA/プロタミン複合体ペーストを作製した。そして、粘度は(2)と同様の方法にて測定した。

(6) DNA/プロタミン複合体ペーストのラット頭蓋骨埋入実験と骨形成能の評価

μ-CT分析と組織観察

DNA/プロタミン複合体ペーストを内径8.0mm、厚さ1.0mmのシリコンモールドに注入し、ディスク試料を作製した。吸入麻酔下で10週齢雄SDラット頭蓋骨に直径8.0mmの骨欠損を

トレフィンバーにて形成した。そして、ディスク試料を欠損部に埋入し、そして骨膜および上皮の縫合を行った。埋入1ヶ月、2ヶ月および3ヶ月後に、microCT(μ-CT)撮影を行い、DNA/プロタミン複合体の骨形成能について検討した。また、埋入試料を摘出し、通法に従って固定、脱灰、HE染色した組織を鏡視した。そして、埋入部位で形成された新生骨を画像処理ソフト(WinROOF)にて解析し、μ-CTのスライス数(厚さ; 35 μm)10枚分の積算量を新生骨の体積量とした。なお、コントロールはペーストを埋入していないものとした。

埋入部位のReal time-PCR分析

複合体ペースト埋入部位近傍組織(DP)(埋入2週間)および骨膜(PO)を採取した。そして、組織から細胞をアウトグロス法にて採取し、その後、培養、増殖させた。各細胞から通法に従ってmRNAを抽出し、遺伝子発現を分析した。また、ターゲット遺伝子はOPN, RANK-2, ALP, OPN, OCNである。

(7) 加齢ラットにおける300bp DNA/プロタミン複合体の骨形成能の促進効果

ディスク試料は(3)同じ方法で作製し、40週齢雄SDラットを用いた以外はすべて(6)と同じ実験を行った。なお、FGF-2含有複合体も用いた。

(8) ビーグル犬における300bp DNA/プロタミン複合体の骨形成能の促進効果

生後10ヶ月のオスピーグル犬を用いた。まず、前臼歯を3本抜歯し、1ヶ月後に1壁性の骨欠損(6 x 7 x 5 mm)を片顎3箇所で作製した(両側計6欠損)。そして、それぞれ2欠損をBlank(骨補填材なし) T C P埋入、DNA/プロタミン複合体ペーストを埋入した。埋入1ヶ月後にμCTにて骨形成状態を比較した。

(9) 脂質修飾FGFの合成と骨形成促進効果

脂質修飾FGFの合成

脂質(Dialkyl-N-glucono-L-glutamate)をb-FGFにバッファー液中中で反応させ、脂質被覆FGFを沈殿させた。そして、遠心分離後、残液をUVで分析し、未反応サイトカイン量から、脂質の反応性を比較した。

骨形成促進効果

脂質修飾FGF-2を質量比2%(w/w)となるように複合体と混ぜ、蒸留水と練和し、ペースト状にした。そして、(6)と同様の骨埋入実験を行った。なお、脂質を含む複合体も試料とした。(10)炭酸アパタイト含有複合体の骨形成効果

4. 研究成果

(1) DNA/プロタミン複合体の粘度と寸法変化

フロ-テスターより粘度を算出した。粘度

は約 280Pas でインジェクションが可能であることが明らかとなった。なお、放置 24 時間後の寸本変化は殆どなく、極めて優れた賦形性を有していた。

(2) DNA/プロタミン複合体薄膜上での

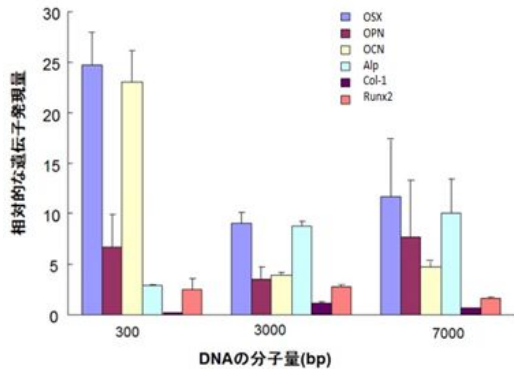


図1 遺伝子発現

骨芽細胞の培養と遺伝子発現

細胞の複合体への接着は悪く、スフェロイドを形成した。そこでスフェロイドの遺伝子発現分析を行ったがその結果を図1に示した。相対的にDNA分子量の小さい方が骨関連遺伝子発現は高く、特にOSXとOCNが高かった。この結果より複合体には骨形成促進作用があると推察された。

(3) FGFの徐放量

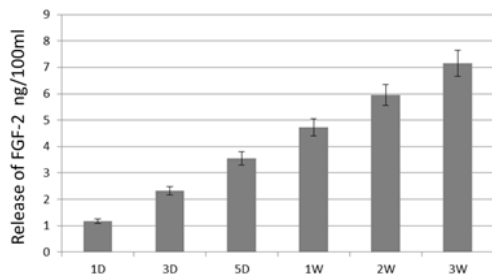


図2 FGF徐放量(D:day,W:week)

図2にFGFの徐放量を示した。徐放量は極めて規則正しく一定量徐放されており、複合体がサイトカインのキャリアー材として有望であることが示唆された。

(4) 炭酸アパタイト含有DNA/プロタミン複合体ペーストの粘度

粘度は約 3.5×10^3 Pas であったがインジェクトは可能であった。

(5) DNA/プロタミン複合体ペーストのラット頭蓋骨埋入実験と骨形成能の評価

μCT分析とHE染色組織監査

標本μCT画像とHE染色組織標本による経時的な骨形成量を比較した。埋入3ヶ月後の結果を図3に、μCT画像分析より得られた骨量を図4に示した。

た。コントロールでは欠損周辺から伸長して出来た新生骨がμCt画像分析やHE染色

組織標本観察より僅かに認められた。しかし、経時的に新生骨量は増加していなかった。一方、300bpDNA/プロタミン複合体埋入試料の新生骨量は

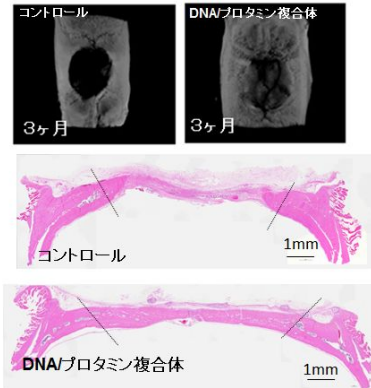


図3 μ-CT像と組織標本(脱灰, HE染色) (埋入期間:3ヶ月)

はコントロールと比較して著しく多く、経時的に増加していた。特に、埋入3ヶ月後になると骨欠損部位のほとんどは新生骨で置換されていた。これらの結果より

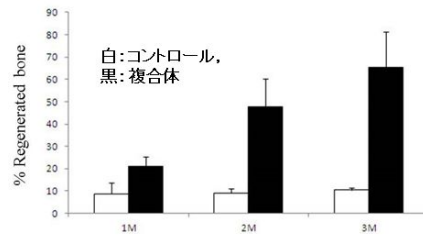


図4 骨形成量(1M:1ヶ月, 2M:2ヶ月, 3M:3ヶ月)

DNA/プロタミン複合体は骨形成促進作用を有していることが明らかとなった。

PCR分析

図5から明らかなようにPO細胞よりDP

由来細胞の方がいずれも骨関連遺伝子の発現は高く、DNA/プロタミン複合体は骨形成促進作用を有していることがPCR分析からも明らかとなった。

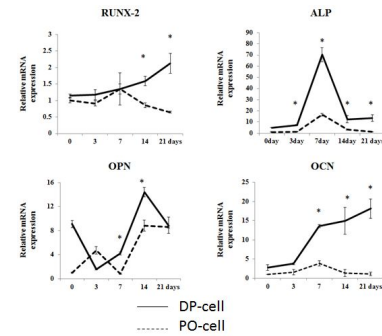


図5 培養後のRT-PCR分析

(6)加齢ラットにおける300bpDNA/プロタミン複合体の骨形成能の促進効果

図7に新生骨量を示した。図から明らかなように複合体を埋入すると加齢ラットの頭蓋骨の再生が著しく速くなり、FGF-2を添加すると再生がさらに加速されていた。FGF-2含有複合体からのFGF-2の徐放量は極めて規則正しく一定量徐放されており(図2)、複合体がサイトカインのキャリアー材として有望であることが示唆された。また、FGF-2が骨関連遺伝子発現を助長することも図7より明らかとなった。以上の結果より加齢ラ

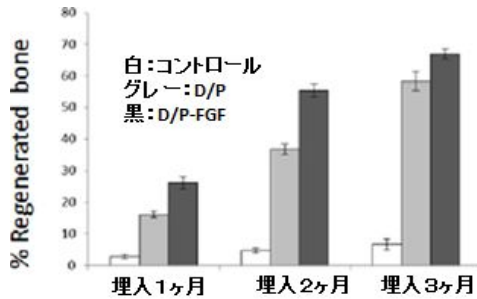


図7 新生骨量

ットの骨再生に FGF-2 含有 DNA/プロタミン複合体が有望であることが判明した。

(7) ビーグル犬における 300bp DNA/プロタミン複合体の骨形成能の促進効果

埋入部位の μ -CT 像を図 8 に示した。

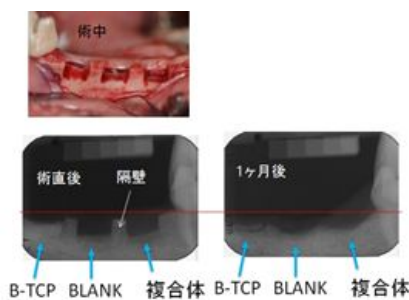


図8 ビーグル犬埋入実験

骨形成が多いように観察できる。

(8) 脂質修飾 FGF の合成と骨形成促進効果

脂質修飾 FGF の合成

脂質と FGF との反応は UV 分析より約 18% であった。

骨形成促進効果

図に脂質および脂質修飾 FGF 含有複合体の骨形成量を示した。FGF 含有複合体のものと比較して、骨形成量は少なかった。脂質修飾による FGF の活性の低下か徐放量の軽減による低下なのかは不明である。

(9) 炭酸アパタイト含有複合体の骨形成効果

炭酸アパタイト含有複合体の骨形成量は複合体単独使用と殆ど同じであり、炭酸アパタイトによる複合体の骨形成促進効果は認められなかった。

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)

[雑誌論文](計7件)

Yosuke Shinozaki, Masako Toda, Jun Ohno, Minoru Kawaguchi, Hirofumi Kido, Tadao Fukushima, Evaluation of bone formation guided by DNA/protamine complex with FGF-2 in an adult rat calvarial defect model, J Biomed Mater Res Part B, 査読有, In press.

DOI:10.1002/jbm.b.33143

Yosuke Shinozaki, Tsukasa Yanagi, Yuichiro Yamaguchi, Hirofumi Kido, Tadao Fukushima. Osteogenic evaluation of DNA/protamine complex paste in rat cranial defects, J Hard Tissue Biology, 査読有, 22:401-408, 2013
査読有, 22, 2013, 401-408.

Nana Mori, Jun Ohno, Ruji Sakagami, Tohru Hayakawa, Tadao Fukushima. Cell viabilities and biodegradation rates of DNA/protamine complexes with two different molecular weights of DNA. J Biomed Mater Res Part B, 査読有, Applied Biomater 101B, 2013, 743-751. DOI:10.1002/jbm.b.32877.

Akihiro Irie, Jun Ohno, Tohru Hayakawa, Hirofumi Kido, Tadao Fukushima. Transparent films formation of DNA/cationic polymer complexes by hydrothermal hot pressing: Observation of cell culture on films and biodegradation of films in vivo. J Hard Tissue Biology, 査読有, 22, 2013, 105-114.

Tohru Hayakawa, Tadao Fukushima. Fibronectin adsorption by using 27M Hz quartz microbalance technique. J Oral Tissue Engin, 査読有, 10, 2012, 28-33.

Yosuke Shinozaki, Nana Mori, Jun Ohno, Minoru Kawaguchi, Hirofumi Kido, Tohru Hayakawa, Tadao Fukushima. Rat calvarial tissues response of flowable DNA/protamine complex mixtures with DNA/chitosan complex to be used as a protective membrane for guided bone regeneration. J Oral Tissue Eng, 査読有, 9, 2012, 159-166.

Tadao Fukushima, Jun Ohno, Rieko, Imayoshi, Nana Mori, Ryuji Sakagami, Makoto Mitarai, Tohru Hayakawa. DNA/protamine complex paste for an injectable dental material. J Mater Sci-Mater Med, 査読有, 22, 2011, 2607-2615. DOI:10.1007/s10856-4446-9.

[学会発表](計11件)

森 南奈, 大野 純, 坂上竜資, 早川 徹, 福島 忠男:異なる分子量を用いた DNA/プロタミン複合体の基礎的性質, 第13回日本再生医療学会総会, 平成26年3月, 国立京都国際会館(京都市)

篠崎 陽介, 戸田 雅子, 大野 純, 御手洗 誠, 城戸 寛史, 早川 徹, 福島 忠男, 老齢ラットにおける FGF-2 添加 DNA/protamine 複合体の骨形成能の評価, 第13回日本再生医療学会総会, 平成26年3月, 国立京都国際会館(京都市)

柳 東,篠崎 陽介,川口 稔,城戸 寛史,福島 忠男:脂質修飾 FGF 含有 DNA/protamine 複合体のラットにおける頭蓋骨欠損部位再生能の評価,第 40 回福岡歯科大学総会,平成 25 年 12 月,福岡歯科大学(福岡市)

森 南奈,篠崎 陽介,大野 純,早川 徹,福島 忠男:ラット頭蓋骨における DNA/プロタミン複合体ペーストの骨形成能,第 22 回硬組織再生生物学会総会,平成 25 年 8 月,鶴見大学歯学部(横浜)

篠崎 陽介,田村翔悟,大野 純,城戸 寛史,早川 徹,福島 忠男:FGF-2 による DNA/プロタミン複合体の骨形成促進効果,第 34 回日本バイオマテリアル学会,平成 24 年 1 月,仙台市仙台国際センター(仙台市)

戸田 雅子,森 南奈,大野 純,尾崎 正雄,早川 徹,福島 忠男:サケ白子由来 DNA/プロタミン複合体の骨形成促進効果,第 34 回日本バイオマテリアル学会,平成 24 年 1 月,仙台市仙台国際センター(仙台市)

戸田 雅子,大野 純,尾崎 正雄,早川 徹,福島 忠男:DNA/プロタミン複合体は骨形成を誘導する,第 60 回日本歯科理工学会,平成 24 年 10 月,九州大学(福岡市)

篠崎 陽介,森 南奈,大野 純,城戸 寛史,早川 徹,福島 忠男:FGF-2 添加 DNA/プロタミン複合体のラット頭蓋骨欠損モデル実験による骨形成能の評価,第 60 回日本歯科理工学会,平成 24 年 10 月,九州大学(福岡市)

篠崎 陽介,入江 昭仁,森 南奈,大野 純,城戸 寛史,早川 徹,福島 忠男:DNA/キトサンおよび DNA/プロタミン複合体を成分とした新規 GBR メンブレンの組織反応性,第 59 回日本歯科理工学会,平成 24 年 4 月,徳島市あわぎんホール(徳島市)

篠崎陽介,森南奈,大野純,城戸寛史,福島忠男,早川徹:サケ白子由来 DNA とプロタミンとの複合体による新生骨形成能の評価,第 41 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会,平成 23 年 9 月,名古屋国際会議場(名古屋市)

森 南奈,篠 陽介,御手洗 誠,坂上 竜資,福島 忠男:サケ白子由来 DNA とプロタミンからなる複合体ペーストの骨形成促進効果,第 54 回秋季日本歯周病学会学術大会,平成 23 年 9 月,海峡メッセ下関(下関市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

福島 忠男 (FUKUSHIMA TADAO)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号:80084250

(2)研究分担者

川口 稔 (KAWAGUCHI MINORU)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号:10122780

(3)連携研究者

大野 純 (OHNO JUN)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号:10152208

(4)連携研究者

土井 豊 (DOI YUTAKA)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号:40116067

(5)連携研究者

早川 徹 (HAYAKAWA TOHRU)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号:40172994

(6)連携研究者

岡畑 恵雄 (OKAHATA YOSHIO)
山形大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号:80038017