

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592987

研究課題名(和文) ナノ磁性粒子遺伝子導入法による骨再生

研究課題名(英文) Bone regeneration by transfection method with magnetic nanoparticles

研究代表者

園部 純也 (Junya, Sonobe)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50464219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではBMP-2遺伝子導入し骨形成能を検定する事を目的とした。ラット由来骨髄間養系幹細胞を用い、マグネトフェクション法で導入した。培養液中のアルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシン濃度を経時的に検定し、In vitroにおける骨形成能を評価した。また、In vivoにおいてコラーゲンを担体とし導入した細胞をラット筋肉内に埋入し、X線、生化学的に検定した。本研究期間においては骨形成を示す結果は得ていない。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate an ability of bone formation with BMP-2 gene transfection. BMP-2 genes were transfected into rat mesenchymal stem cells by magnetofection method. The alkaline phosphatase activity and osteocalcin into medium was measured, and then osteoinductive activity in vitro was evaluated. In addition, transfected cells within collagen carriers were implanted into rat muscle pouch. Excised tissues were evaluated by radio graphical and biological analysis. However, we had not achieved a result of bone induction into muscle pouch in this study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：遺伝子導入法 マグネトフェクション 骨再生

1. 研究開始当初の背景

BMP は異所性骨形成シグナルとしての作用を有する唯一のサイトカインであり、骨格形成、骨折治癒などのあらゆる生理的骨形成に必須の役割を担うことが明らかになっている。特に BMP-2 においてはその強い骨誘導能から研究が進んでいる。しかし、BMP は現在のところ、安価で大量生産不可能なことから臨床での使用には問題となる。一方 BMP 発現アデノウイルスベクターによる遺伝子導入は、生産に費用の高む BMP を宿主自身の細胞に作らせるという、今までの BMP 研究の発想を大きく転換した独創的なものである。つまり、アデノウイルスベクターを介して宿主（臨床においては患者）自身の細胞に BMP を作らせるという画期的な方法での骨誘導が可能になり、技術的にも費用的にも容易に臨床の場へ供給出来得ると考えられる。ただし、免疫反応への対処という問題が唯一残されており、申請者らはこの問題を解決すべくアデノウイルスベクターの欠点を補う方法の開発を行った。(文献 1,2) しかし、組み換えウイルスベクターはその感染において細胞膜上の特異受容体を必要とするため、遺伝子導入可能な細胞に限られる。また生体内で産生される特異抗体も問題となる。近年、カチオン性高分子と磁性粒子の長所を組み合わせ応用した新たな遺伝子導入法が開発された。それは、ナノサイズの磁性粒子をカチオン性高分子のポリエチレンイミンなどで被覆して、粒子表面を正電荷に帯電させる。それに負電荷のプラスミド DNA を静電的相互作用で吸着させ磁石を用いてその複合体を標的細胞に誘導し DNA を細胞内に導入する方法である。このナノ磁性粒子を用いた遺伝子導入法（マグネトフェクション法）は、プラスミド DNA を磁性粒子に混合後、磁性粒子表面に吸着させ目的細胞に添加し磁場により粒子の細胞表面への集積を起し遺伝子導入する方法である。目的とした DNA は標的部

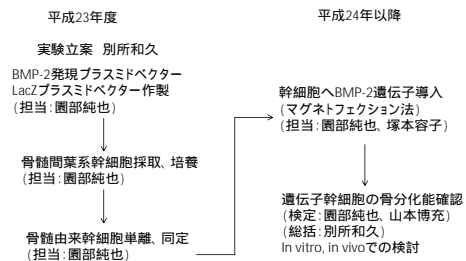
位へ磁場により集積するため拡散し難く、従来の遺伝子導入法のように担体が不要となりうる点、さらに低濃度の DNA を短時間で比較的効率よく遺伝子導入可能である点が利点とされる。

2. 研究の目的

ナノ磁性粒子を用いた遺伝子導入法（マグネトフェクション法）は導入効率もウイルスベクターと比較しても劣らない。またウイルス由来の抗原抗体反応が起こることが問題となる点において、従来のウイルスベクターを用いた遺伝子導入法に比べ、このマグネトフェクション法は有利となりうることが予想される。今回、未分化間葉系幹細胞に遺伝子導入後、細胞シートにより組織構築することで骨組織を誘導し、将来の顎骨再建に寄与するのが目的である。

3. 研究の方法

BMP-2 プラスミドベクターを作製する。マグネトフェクション法にて *in vitro* での BMP-2 遺伝子導入を評価した。コントロールとして LacZ プラスミドベクターを作製し遺伝子導入効率を検定した。さらにラット骨髄間葉系幹細胞を採取後単離・同定し幹細胞へ遺伝子導入した。生体内での採取幹細胞の骨分化能を確認し、エックス線撮影、組織学的・生化学的検定を行った。



4. 研究成果

本研究期間では BMP - 2 遺伝子導入し骨形成能を検定する事を目的とした。ラット由来骨髄間葉系幹細胞を用い、マグネトフェクション法で導入した。培養液中のアルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシン濃度を経時的に検定し、In vitro における骨形成能を評価した。また、In vivo においてコラーゲンを担体とし導入した細胞をラット筋肉内に埋入し、X 線、生化学的に検定した。

まず、平成 23 年度は BMP-2 プラスミドベクター (pCAGGS-BMP-2) とコントロールベクターである LacZ プラスミドベクター (pCAGGS-LacZ) を作成した。またラット骨髄間葉系幹細胞の採取を行った。骨髄細胞培養しコロニー形成後、細胞塊を採取し継代した。フローサイトメトリーで幹細胞を単離同定し、表面マーカーである CD90、CD29 陽性であることを確認した。

平成 24 年度ではマグネトフェクション法を用いて骨髄間葉系幹細胞への遺伝子導入効率を検定した。In vitro においては培養液内のアルカリフォスファターゼ活性やオステオカルシンを測定した。

最終年度である平成 25 年度ではウイルスベクターなど他の遺伝子導入法と比較し、その遺伝子導入効率を向上させる事をまず目標とした。マグネトフェクションキットを用い、HeLa 細胞株を培養し、GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察し、約 40%の細胞が GFP 陽性を示した。さらに 24 年度までに単離した、骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、マグネトフェクションキットを用い BMP-2 プラスミド (BMP 群) を導入した。コントロールは LacZ を使用した。培養 7, 14, 21 日後に細胞溶解液中のアルカリフォスファターゼ活性とオステオカルシン濃度を検定した。BMP 群ではコントロール群に比べ、培養 7 日目、14 日目ではアルカリフォスファターゼ活性の上昇を認めた。一方、オステオカルシン濃度は 1

4 日目、21 日目では上昇していたが、有意差を得るには至らなかった。また、in vivo において、ラット下腿腓腹筋内に 3%アテロコラーゲンに含浸した遺伝子導入後の骨髄間葉系幹細胞を埋植し、組織学的、生化学的、X 線解析を行ったが、骨形成を確認するには至らなかった。

本研究期間内ではマグネトフェクション法を用い、将来顎骨再生等の臨床応用の糸口を検索すべく、骨再生の可能性を検定した。本研究ではナノ磁性キャリアと目的遺伝子との複合体が、標的細胞へ効率良く、また迅速に集積する事で、遺伝子導入効率が向上するのではないかと考えられる。標的細胞に集積する過程で、血中抗体やヌクレアーゼなどの、導入効率を引き下げる要因を検討し、さらに導入効率を向上させる方法を検討する必要があると考えられ、今後の課題である。

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1件)

A. Hussain, K. Takahashi, J. Sonobe, M. Bamba, Y. Tabata, K. Bessho

Bone regeneration of rat calvarial defect by magnesium calcium phosphate gelatin scaffolds with or without bone morphogenetic protein-2 査読有 J Maxillofac Oral Surg 13: 29-35, 2014.

[学会発表](計5件)

池野 正幸 術後1年で再発を認めたエナメル上皮線維腫の1例 第44回日本口腔外科学会近畿支部学術集会 2013年6月29日 神戸市

Nishijima E.Emi 歯肉頬移行部粘膜に発生した神経鞘腫の1例 第43回日本口腔外科学会近畿支部学術集会 2012年6月23日 豊中市

北本 久登 下顎骨に再発を繰り返した後、口底に発現したエナメル上皮腫の1例 第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会 2012年5月17-18日 広島市

陳 資史 下顎枝に認められた単純性骨嚢胞の1例 第56回日本口腔外科学会

総会 2011年10月21-23日 大阪市
陳 資史 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の臨
床的観察 第24回日本顎関節学会総会
2011年7月23-24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園部純也 (SONOBE, Junya)
京都大学医学研究科・講師
研究者番号: 50464219

(2) 研究分担者

別所和久 (BESSHO, Kazuhisa)
京都大学医学研究科・教授
研究者番号: 90229138

中尾一祐 (Nakao, Kazumasa)
京都大学医学研究科・助教
研究者番号: 40599932

塚本容子 (Tsukamoto, Hiroko)
京都大学医学研究科・その他
研究者番号: 30437230