

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670838

研究課題名(和文) エラスチンの細胞形質転換誘導によるDNA/プロタミン複合体への骨再生促進効果

研究課題名(英文) Effect of the cells transformed by elastins on facilitation of DNA/protamine complex-induced bone regeneration

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：3種類のサケ由来水不溶性エラスチン、水溶性エラスチン、エラスチンペプチドをDNA/プロタミン複合体に配合させた3種類のエラスチン含有DNA/プロタミン複合体ペーストを作成した。そして、これらペーストをラット頭蓋骨に埋入し、新生骨再生実験を行ったところエラスチンペプチドが有効であることが判明した。また、Real-time PCR解析よりエラスチンペプチドが筋線維芽細胞のマーカーである α -SMAとエラスチン分解酵素である MMP-2の遺伝子発現を促進させることも判明した。したがって、エラスチンペプチドは骨再生用素材として有効であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：It was reported that fibroblast cell can differentiate into myofibroblast cell via osteoblast cell in the presence of elaschin peptide. Thus, three mixtures of DNA/protamine complex with salmon-derived water-insoluble elaschin, water-soluble elastin and elaschin peptide were prepared. These pastes were implanted into rat cranial defect for three months. It was found that the DNA/protamine complex with elaschin peptide formed new bone faster than the others. Moreover, real-time PCR indicated that elaschin peptide can facilitate the development of α -SMA and MMP-2. Therefore, elaschin peptide will be useful materials for repair of bone defects.

研究分野：生体材料

キーワード：エラスチン DNA プロタミン 骨再生 ペースト

1. 研究開始当初の背景

DNAは新規生体材料の素材として注目されている。今までに、DNAを水不溶化するためにDNA/プロタミン複合体が合成され、その生物学的特性が検討されており、*in vitro* や *in vivo* 実験より生分解生体材料として有望であると結論を得ている。DNA/プロタミン複合体の最大の特徴は水と練和するとペーストになり、かつ、骨形成誘導性を有していることである。新生骨形成量は再生部位中の骨芽細胞数とそれらの活性の影響を大きく受ける。細胞密度を上げるには外因性骨芽細胞の移植が有効であるが、時間やコストがかかるとともに免疫の問題もある。したがって、内因性細胞を骨芽細胞形質転換できればこの問題は解決されることが期待できる。エラスチンペプチドを適応して、線維芽細胞を筋線維芽細胞から骨芽細胞様細胞に形質転換させる系が、モデル実験として報告されている。

著者らはエラスチンによる細胞形質転換の利用が有効ではないかと考えた。すなわち、エラスチンは、好中球・マクロファージが産出するMMPなどの酵素で分解され、エラスチンペプチドとなる。また、水溶性エラスチンは、約20以上の温度では水不溶性となる特徴(コアセルベーション現象)があり、体内で水不溶性になれば移植部位からの拡散が抑制されるので、骨補填材の素材として有利であると思われる。さらに、DNA/プロタミン複合体自体には骨形成誘導性がある。本研究では、DNA/プロタミン複合体にエラスチンペプチド、水溶性エラスチン、または水不溶性エラスチンを添加してエラスチン含有インジェクション型DNA/プロタミン複合体ペーストを作製し、骨形成能の促進効果を検討した。

2. 研究の目的

エラスチンの特殊な機能、すなわち線維芽細胞を筋線維芽細胞にやがて骨芽細胞に変える機能を利用して骨再生促進型骨補填材を開発することが目的である。なお、補填材のベースとしてDNA/プロタミン複合体およびキトサン含有DNA/プロタミン複合体を用いる。その理由は、1)水と練和するとペーストになるのでエラスチンの配合が容易である、2)線維芽細胞や骨芽細胞を含む骨膜様組織形成を経て骨形成を誘導する、すなわち骨伝導性を有している。3)キトサンはエラスチン分解酵素を産出する好中球やマクロファージを誘導する。そこで、エラスチン(水不溶性、水溶性)およびエラスチンペプチドを含む各種複合体ペーストを、さらに、これらペーストにサイトカイン(TGF- β 、b-FGF)を加えた各種複合体ペーストも試作する。そして、添加物の成分と新生骨形成能との相関をラット頭蓋骨埋入*in vivo*試験(染色組織観察など)、実験部位組織から採取した細胞での*in vitro*(遺伝子発現試験、細胞活性試験、免疫染色など)などから総合的に検討す

る。

3. 研究の方法

(1)DNA/プロタミン複合体の合成とペースト化:DNA/プロタミン複合体の合成とペースト化は福島らの方法¹⁾で行った。このペーストにエラスチンペプチドおよび水溶性エラスチン、水不溶性エラスチンを20%と50%になるようにDNA/プロタミン複合体ペーストに添加した。

(2)頭蓋骨埋入試験:ペーストを内径8mm、厚さ1.5mmのシリコンモールドに填塞し、ディスクを形成した。10週齢のラットの頭蓋骨部位に、トレフィンバーで欠損を作製し、ディスク状複合体を埋入した。埋入後、骨膜および、上皮の縫合を行った。

(3)新生骨形成能評価:埋入1ヶ月、2ヶ月及び3ヶ月ごとに同一個体を用いて μ CT撮影を行い、骨形成量を比較検討した。また、対象群として、Blank群及び300bpDNA/プロタミン複合体単独群も同様に評価を行った。なお、3ヶ月後に埋入試料を周囲組織から摘出し、通法にて固定、脱灰、HE染色した組織の観察もした。

(4)9週齢ラット口蓋歯肉からout growth法にて採取した細胞を濃度の異なるエラスチンペプチド(10 μ l/ml、100 μ l/ml、200 μ l/ml)下で10日間培養後、RNAを抽出した。そして、筋線維芽細胞のマーカーである α -SMAとエラスチン分解酵素であるMMP-2の遺伝子発現をReal time-PCRで解析した。なお、培養3日の遺伝子を1としCt法にて解析した。

4. 研究成果

50%エラスチン化合物含有試料のものが20%のものより、骨形成性が優れていたため、埋入3ヶ月後の結果を図1に示した。埋入後、Blank群(a)では、ほとんど骨形成は見られなかったが、DNA/プロタミン複合体単独群(b)とエラスチン添加DNA/プロタミン複合体群(c)には新生骨形成が確認でき、新生骨形成量は経時的に増加した。エラスチン添加群の中でもエラスチンペプチド添加群(c-1)の骨量が最も多く、次いで水溶性エラスチン添加群(c-2)、水不溶性添加群(c-3)の順に形成が多かった。



(a) (b) (c-1) (c-2) (c-3)

図1 埋入3ヶ月後の骨欠損部位の μ CT像

図2に埋入3ヶ月後の病理組織像を示した。 μ CT像と同様に最も新生骨が再生されていたのは50%エラスチンペプチド含有DNA/プロタミン複合体であった。

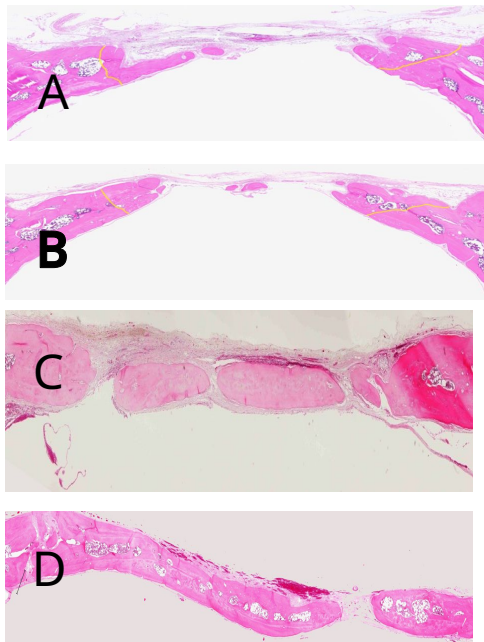


図2 病理組織像(A:Blank, B:DNA/プロタミン、C:20エラスチンペプチド含有DNA/プロタミン、D:50エラスチンペプチド含有DNA/プロタミン)

次にエラスチンペプチドが最も骨再生に優れていたため筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA とエラスチン分解酵素である MMP-2 の遺伝子発現を Real time-PCR で解析した。その結果を図3に示した。いずれの遺伝子も発現が認められ特に MMP-2 の遺伝子発現量は経時的に増加していました。

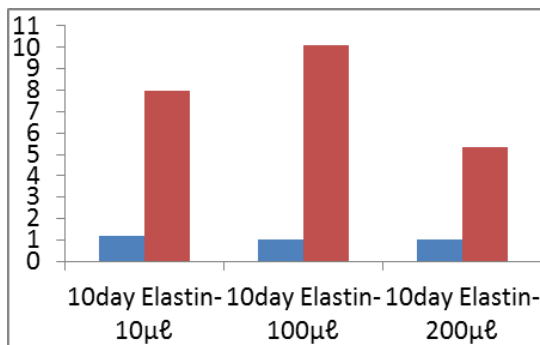


図3 Real time PCR (青: SMA、茶: MMP-2)

以上の結果より、エラスチンペプチドは骨再生用素材として有効であることが判明した。

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 2件)

M. Toda, J. Ohno, Y. Shinozaki, M. Ozaki, T. Fukushima. Osteogenic potential for

replacing cells in rat cranial defects implanted with a DNA/protamine complex paste. Bone 67, 237-245, 2014, 査読あり, DOI:http://dx.doi.org./10.1016/j.bone.2014.07.018
T. Yanagi, H. Kajiya, M. Kawaguchi, H. Kido, T. Fukushima. Photothermal stress triggered by near infrared-irradiated carbon nanotubes promotes bone deposition in rat calvarial defects. Journal of Biomaterials application 29, 1109-1118, 2015, 査読あり DOI:10.1177/0885328214556913

[学会発表](計 6件)

戸田 雅子、大野 純、尾崎 正雄、早川 徹、福島 忠男、エラスチンによるDNA/プロタミン複合体への骨形成促進効果、第61回日本歯科理工学会学術講演会、2013年4月13日、タワーホール船堀、東京
福島忠男、サケ白子由来DNAを素材した新規生体材の開発、平成25年度日本歯科理工学会九州地方会夏季セミナー、2013年8月31日、長ながさき式見ハイツ、長崎市
田村翔吾、戸田雅子、篠崎陽介、大野 純、尾崎正雄、御手洗 誠、早川 徹、福島忠男、超高分子DNAスキャホールドの作成と骨形成能、第64回日本歯科理工学会、2014年10月5日、アステールプラザ、広島市
柳 束、森 南奈、鍛冶屋 浩、大野 純、城戸 寛史、御手洗 誠、早川 徹、福島 忠男、有病モデルラットにおけるDNA/プロタミン複合体の骨形成能の評価、第36回日本バイオマテリアル学会、2014年11月18日、タワーホール船橋、東京
勝俣 由里、鍛冶屋 浩、柳 束、大関 悟、池邊 哲郎、福島 忠男、DNA含有新規スカフォールド誘導性Na/pil1b(SLC34A2)の発現を介する新生骨形成作用、第7回トランスポーター研究会九州部会、2014年11月22日、産業医科大学、北九州市
勝俣 由里、鍛冶屋 浩、森 紘一郎、田中文恵、佐々木 三奈、府川 晃久、大関 悟、池邊 哲郎、福島 忠男、DNAにより誘導されるリン酸輸送体の新生骨形成作用への関与、第41回福岡歯科大学学会総会、2014年12月14日、福岡歯科大学、福岡市

[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：
出願年月日：
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

福島 忠男 (Fukushima, Tadao)
福岡歯科大学・大学院研究科・教授
研究者番号：80084250

(2) 研究分担者

大野 純 (Ohno, Jun)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：10152208

(3) 研究分担者

森 南奈 (Mori, Nana)
福岡歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：60736677

(4) 研究分担者

篠崎 陽介 (Shinozaki, Yosuke)
福岡歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80736687