

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560250

研究課題名(和文) Gene-activating scaffoldによる in vivo組織再生

研究課題名(英文) Gene-activating scaffolds for in vivo tissue regeneration

研究代表者

大矢根 綾子 (OYANE, Ayako)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・主任研究員

研究者番号：50356672

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)：DNAを担持させたリン酸カルシウム層(DNA-CaP複合層)は、細胞足場機能と遺伝子導入機能を併せ示すことから、細胞の挙動(分化・増殖など)を遺伝子レベルで制御できる組織再生用スキャホールドとして有用と期待される。本研究では、医療用輸液を原料とする過飽和溶液技術・共沈析出技術を用い、DNA-CaP複合層のナノ構造を精緻に制御するとともに、複合層形成の反応過程を明らかにすることによって、遺伝子導入機能向上のための複合層の設計・構築指針を示した。

研究成果の概要(英文)：Calcium phosphate (CaP) layers immobilizing DNA (DNA-CaP composite layers) would be useful as surface components of tissue engineering scaffolds. This is because DNA-CaP composite layers possess a biocompatible surface suitable for cell growth and can control the cell behavior (differentiation, proliferation, etc.) through surface-mediated gene delivery. In this study, we fabricated DNA-CaP composite layers via coprecipitation in supersaturated CaP solutions that are prepared from infusion fluids. We shed light on the processes of coprecipitation and formation of the DNA-CaP composite layers in the supersaturated CaP solutions. Furthermore, we varied the coprecipitation conditions, i.e., coprecipitation time and Ca and P concentrations in solution, and obtained a guideline for the fabrication of DNA-CaP composite layers with high gene delivery capability and good cell compatibility.

研究分野：生体医工学，生体材料学，

キーワード：DNA リン酸カルシウム 医療用輸液 遺伝子導入 トランスフェクション 細胞足場 ナノコンポジット

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞の挙動を制御することで、失われた臓器や組織の機能を回復させたり、臓器や組織そのものを再生しようとする再生医療が注目されている。再生医療において重要な課題は、細胞足場(スキャホールド)上の目的の場所で、目的の細胞を、目的の細胞へと増殖・分化させることである。細胞の挙動制御に有効な手法の一つに、遺伝子導入が挙げられる。2000年頃から、分化誘導因子の遺伝子をスキャホールドと複合化し、この遺伝子をスキャホールド上の細胞に導入することにより、組織再生を誘導しようとする試みが行われてきた¹。このように、細胞の遺伝子発現を制御することで、その挙動を制御できるスキャホールドを gene-activating scaffold と呼ぶことができる。しかし、医療応用可能な安全性と高い遺伝子導入機能(分化誘導能)を併せ持つ gene-activating scaffold を得ることは容易ではなかった。

骨ミネラルであるリン酸カルシウム(CaP)とDNAの共沈析出物を利用するCaP法は、安全性の高い遺伝子導入法として知られている。2004年にShenらは、CaP過飽和溶液中でのCaPとDNAの共沈析出反応を利用して基材上にDNA-CaP複合層を形成させ、同層の表面で比較的高効率に遺伝子導入を行えることを報告した²。一方研究代表者らは、独自の過飽和溶液技術・共沈析出技術(特許4604238号など)を利用し、DNA-CaP複合層に第三成分(細胞接着性タンパク質、脂質、炭酸イオンなど)を複合担持し、これによって遺伝子導入機能のさらなる向上を図ってきた³。こうして機能向上を達成した複合層は、*in vivo*(動物体内)でも遺伝子導入機能を発揮し、細胞分化ならびに組織再生を誘導した⁴。すなわち、DNA-CaP複合層は、gene-activating scaffoldの素材として有用と期待される。

近年、研究代表者らは、生成物の安全性(無菌性、エンドトキシンフリー等)の担保を目的とし、CaP過飽和溶液の原料を化学試薬から医療用輸液に変更した。この医療用輸液を原料とするCaP過飽和溶液中で形成された新規の複合層は、従来とは異なるマイクロ形態・結晶構造を有し、第三成分を含まずとも優れた導入効率を示した⁵。

2. 研究の目的

本研究では、上述のgene-activating scaffold構築のための要素技術として、医療用輸液を原料とするCaP過飽和溶液で得られるDNA

- CaP複合層による遺伝子導入技術の高度化を図った。スキャホールドのモデル材料としてポリスチレン(PS)の平板状基材を用い、同基材をCaP過飽和溶液中に浸漬することで(共沈析出反応)基材上にDNA-CaP複合層を形成させた(図1左)。得られた基材上で細胞を培養することで固相遺伝子導入(surface-mediated gene delivery)を行い(図1右)複合層の遺伝子導入機能を評価した。

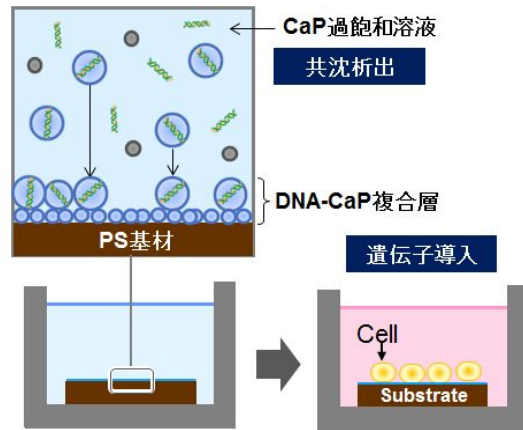


図1 CaP過飽和溶液中での共沈析出反応によるDNA-CaP複合層形成(左)と同複合層表面における細胞への遺伝子導入(右)

本研究ではまず、CaP過飽和溶液のカルシウムおよびリン濃度を変化させ、DNA-CaP複合層の遺伝子導入機能に与える影響について調査し、溶液濃度を最適化した(溶液濃度の検討)。次に、最適化された過飽和溶液濃度条件下で反応時間を変化させ、共沈析出・複合層形成の反応過程を追求するとともに、反応時間がDNA-CaP複合層の遺伝子導入機能に与える影響について調査し、反応時間を最適化した(反応時間の検討)。

3. 研究の方法

(1) 溶液濃度の検討

厚さ1mm、大きさ10mm×10mmのPS基材に酸素プラズマ処理を施し、表面を親水化した。次に、6種類の医療用輸液、およびルシフェラーゼのcDNAを含むプラスミドを混合し、DNA含有CaP過飽和溶液を調製した。過飽和溶液の濃度は、先行研究⁵における溶液濃度を基準(1.0倍濃度)とし、DNA濃度を一定(40µg/mL)に保ったまま、医療用輸液の混合比を調節することで、CaおよびP濃度を0.6~1.4倍に変化させた。これらの過飽和溶液2mLに、上記のPS基材を37°Cで3時間浸漬した(共沈析出反応)。基材上に形

成された DNA-CaP 複合層の組成と構造を、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、エネルギー分散型 X 線分光分析 (EDX)、薄膜 X 線回折 (TF-XRD) 分析、および複合層溶解液の化学分析 (DNA、Ca、P の定量) により調べた。また、各複合層の表面で CHO-K1 細胞を 3 日間培養した後、同細胞のルシフェラーゼ活性を評価することにより、遺伝子導入機能を調べた。

(2) 反応時間の検討

調製直後の 1.0 倍濃度過飽和溶液中の粒子のサイズ分布を動的光散乱法 (DLS) により、ゼータ電位を光散乱電気泳動法 (ELS) により調べた。また、プラズマ処理 PS 基材を、1.0 倍濃度過飽和溶液 2 mL 中に 37°C で 1 時間から 24 時間までの種々の時間浸漬した (共沈析出反応)。基材上に形成された DNA-CaP 複合層の組成と構造、ならびに遺伝子導入機能を、3.(1) と同様にして調べた。

4. 研究成果

(1) 濃度条件の検討

3.(1) で得られた複合層の SEM 観察、EDX 分析、溶解液の化学分析を行った。その結果、いずれの濃度 (0.6 ~ 1.4 倍濃度) の CaP 過飽和溶液中でも、PS 基材上にサブミクロン粒子群からなる DNA-CaP 複合層が形成されることが分かった。TF-XRD 分析により、複合層中の CaP は非晶質構造を持つと考えられた。過飽和溶液濃度 (Ca、P 濃度) の増加に伴い、基材上のサブミクロン粒子のサイズは減少し、数密度は増大した。これは、CaP に対する溶液過飽和度の増大によって、均一核形成の頻度が増大したことによると考えられる。

種々の濃度の CaP 過飽和溶液から得られた複合層の表面で細胞を培養し、遺伝子導入を行った。培養細胞のルシフェラーゼアッセイの結果によれば、過飽和溶液濃度を高めると、0.6 倍から 1.2 倍濃度までは複合層の遺伝子導入機能の増大傾向が認められたが、1.4 倍濃度では減少に転じた (図 2)。この減少は、光学顕微鏡観察の結果から、複合層の細胞毒性によるものと考えられた。1.4 倍濃度過飽和溶液中では、PS 基材上に微小な DNA-CaP 複合粒子が高密度に集積する。これらの粒子が培養液中で部分溶解し、細胞周囲のカルシウムイオン濃度を急上昇させたことで、細胞 viability を低下させたと考えられる。

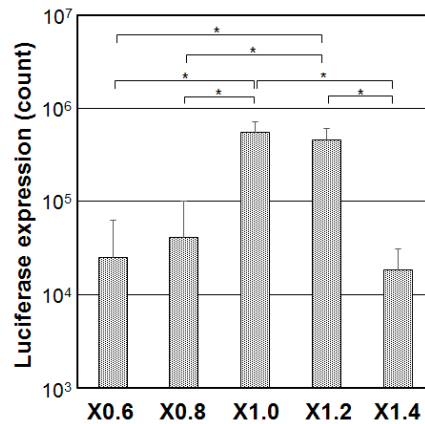


図 2 種々の濃度の CaP 過飽和溶液から得られた DNA-CaP 複合層の遺伝子導入機能 (* p < 0.05) (5. の雑誌論文 より転載)

(2) 反応時間の検討

まず、前項 (1) で最適化された濃度 (1.0 倍濃度) の CaP 過飽和溶液を用い、共沈析出の反応過程を調べた。調製直後の過飽和溶液に対する DLS および ELS 測定の結果、1.0 倍濃度過飽和溶液中には直ちにサブミクロン粒子 (粒径 200 ~ 300 nm) が形成され、同粒子が負のゼータ電位 (約 -24 mV) を持つことが確認された。これらの結果は、同過飽和溶液中で直ちに CaP の均一核形成が起こること、生成直後の CaP 粒子が負電荷を持つ DNA と結合していることを示している。同溶液中の粒子は反応時間と共に成長したものの、24 時間後にもサブミクロンサイズの単分散状態を保っていた。PS 基材表面の SEM 観察および EDX 分析の結果によれば、反応開始 1 時間以内にサブミクロン粒子が基材上に固定され、その数密度は反応時間と共に増大していった。PS 基材表面の TF-XRD 分析により、同基材上の CaP は、反応開始 24 時間後においても非晶質構造を保持することが確認された。

以上の結果から推定される 1.0 倍 CaP 過飽和溶液中での反応過程は次の通りである。まず、同溶液中において、調製後速やかに非晶質状態の CaP が均一核生成する。生成した CaP 粒子は直ちに DNA と結合し、比較的大きな負のゼータ電位を持つ。これらの DNA-CaP 複合粒子は、電荷反発により分散状態を維持しながら、周囲の溶液から DNA、無機イオン、CaP クラスタやその集合体を取り込み、結晶化を抑制されたまま三次元的に成長する。サブミクロンサイズに成長した粒子は沈降し、PS 基材表面に結合・集積していく。

種々の反応時間（CaP 過飽和溶液への浸漬時間）で得られた複合層の表面で細胞を培養し、遺伝子導入を行った。培養細胞のルシフェラーゼアッセイの結果によれば、反応時間を 3~6 時間とした場合に、複合層の遺伝子導入機能が最大となった（図 3）。

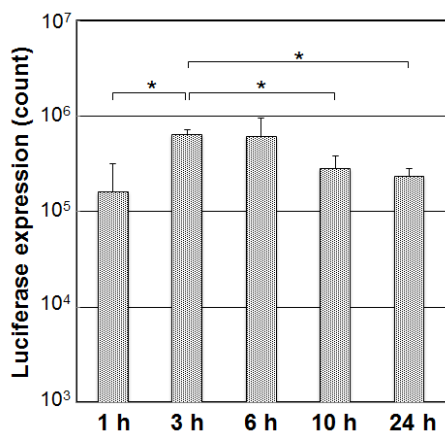


図 3 種々の濃度の CaP 過飽和溶液から得られた DNA-CaP 複合層の遺伝子導入機能 (* p < 0.05) (5 .の雑誌論文 より転載)

(3) まとめ

CaP 過飽和溶液の濃度および反応時間（共沈析出時間）を変化させると、DNA - CaP 複合層を構成するサブミクロン粒子のサイズと集合状態を制御することができ、これらの反応条件を調節することで、同複合層の遺伝子導入機能を向上できることが分かった。本 DNA - CaP 複合層は、安全性の高い原料（医療用輸液）と構成成分（CaP、DNA）からなり、細胞足場機能と遺伝子導入機能を併せ示すことから、組織再生用 gene-activating scaffold の素材として有用と期待される。

引用論文

- Shea et al. Nature Biotech., 17, 551, 1999.
- Shen et al. Nature Mater., 3, 569, 2004.
- Oyane et al. Acta Biomaterialia, 8, 2034, 2012.
- Zhang et al. J. Biomed. Sci., 18, 62, 2011.
- Oyane et al. CrystEngComm, 15, 4994, 2013.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Q.T.H. Shubhra, A. Oyane, H. Araki, M. Nakamura, H. Tsurushima, Calcium phosphate nanoparticles prepared from infusion fluids for stem cell transfection: process optimization and cytotoxicity

analysis, Biomater. Sci., 査読有, Vol. 5, 2017, pp. 972-981. DOI: 10.1039/C6BM00870D

A. Oyane, H. Araki, M. Nakamura, Y. Shimizu, Q.T.H. Shubhra, A. Ito, H. Tsurushima, Controlled superficial assembly of DNA-amorphous calcium phosphate nanocomposite submicrospheres for surface-mediated gene delivery, Coll. Surf. B-Biointerf., 査読有, Vol. 141, 2016, pp. 519-527. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.02.010

Y. Yazaki, A. Oyane, Y. Sogo, A. Ito, A. Yamazaki, H. Tsurushima, Area-specific cell stimulation via surface-mediated gene transfer using apatite-based composite layers, Int. J. Mol. Sci., 査読有, Vol. 16, 2015, pp. 8294-8309. DOI: 10.3390/ijms16048294

〔学会発表〕(計 16 件)

Q.T.H. Shubhra, A. Oyane, H. Araki, M. Nakamura, H. Tsurushima, Gene delivery using magnetic calcium phosphate nanoparticles prepared from medicinal solutions, 日本セラミックス協会 2017 年年会, 2017/3/17, 日本大学駿河台キャンパス(東京都千代田区)

大矢根綾子, リン酸カルシウム系足場材料の設計・構築と再生医療応用, 技術情報協会セミナー, 2017/3/15, 技術情報協会(東京都品川区)(招待講演)

大矢根綾子, 元素を利用したリン酸カルシウムの組成・構造制御とバイオメディカル応用, 元素ブロック高分子材料の創出第 5 回合同修士論文発表会, 2017/3/4, 京都リサーチパーク(京都府京都市)(招待講演)

Q.T.H. Shubhra, A. Oyane, H. Araki, M. Nakamura, H. Tsurushima, Gene delivery using calcium phosphate nanoparticles prepared from infusion fluids: Process optimization and comparison with commercial systems, 日本セラミックス協会第 29 回秋季シンポジウム, 2016/9/8, 広島大学東広島キャンパス(広島県東広島市)

Q.T.H. Shubhra, A. Oyane, Fabrication of CaP nanoparticles from infusion fluids for gene delivery: Effect of process variables, 8th HOPE MEETING, 2016/3/8, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

A. Oyane, M. Nakamura, Physicochemical

fabrication of calcium phosphate-based bioceramics, 15th Asian BioCeramics symposium, 2015/12/11、東京医科歯科大学(東京都千代田区)(招待講演)

大矢根綾子、リン酸カルシウム薄膜・粒子の液相合成とバイオメディカル応用、第2回ガラス科学技術研究会、2015/10/9、日本ガラス工業センター(東京都新宿区)(招待講演)

大矢根綾子、中村真紀、リン酸カルシウム系融合材料の合成とバイオメディカル応用、第64回高分子討論会、2015/9/16、東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市)(依頼講演)

大矢根綾子、荒木裕子、伊藤敦夫、鶴嶋英夫、高効率遺伝子導入のためのDNA-リン酸カルシウム複合粒子群の設計、日本セラミックス協会2015年年会、公益社団法人日本セラミックス協会、2015/3/19、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

A. Oyane, M. Nakamura, Biomimetic processing of calcium phosphates for biomedical applications, The 15th International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-15), 2015/1/26, 名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)(招待講演)

大矢根綾子、中村真紀、バイオメテック法によるリン酸カルシウム形成技術とバイオメディカル応用」第7回産総研ナノシステム連携促進フォーラム、2015/1/9、秋葉原コンベンションホール(東京都千代田区)

大矢根綾子、荒木裕子、伊藤敦夫、鶴嶋英夫、医療用輸液法によるDNA-CaP複合粒子の作製とリバーストランスフェクション応用、第36回日本バイオマテリアル学会大会、2014/11/17、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

大矢根綾子、バイオメテック法によるリン酸カルシウム成膜技術とバイオメディカル応用、第65回コロイドおよび界面化学討論会、2014/9/3、東京理科大学神楽坂キャンパス(東京都新宿区)(依頼講演)

A. Oyane, M. Nakamura, Wei Zhang, X.P. Wang, A. Ito, H. Tsurushima, Biomimetic calcium phosphate coating for tissue engineering applications, 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (2014ISOMRM), 2014/8/29, Chang Gung University (桃園市・台湾)

(招待講演)

A. Oyane, Biomimetic calcium phosphate coating for biomedical applications, 2014 CYCU Biomaterials Summer Workshop, 2014/8/27, 中原大学(桃園市・台湾)(招待講演)

A. Oyane, Wei Zhang, X.P. Wang, A. Ito, H. Tsurushima, Calcium phosphate-based composite layers for surface-mediated gene delivery, The 5th International Congress on Ceramics (ICC5), 2014/8/18, Beijing International Convention Center(北京・中国)(招待講演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ：<http://staff.aist.go.jp/a-oyane/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大矢根 綾子 (OYANE Ayako)

産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・主任研究員

研究者番号：50356672

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

菊池 正紀 (KIKUCHI Masanori)

物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・グループリーダー

研究者番号：00354267

王 秀鵬 (WANG Xiupeng)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：70598789

伊藤 敦夫 (ITO Atsuo)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・グループリーダー

研究者番号：30356480

葭仲 清 (YOSHINAKA Kiyoshi)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：90358341

鶴嶋 英夫 (TSURUSHIMA Hideo)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：50315470

(4)研究協力者

荒木 裕子 (ARAKI Hiroko)
産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・
テクニカルスタッフ
研究者番号：なし