

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 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：2015～2016

課題番号：15H06504

研究課題名(和文) 微小粒子状生体材料と機能性miRNAを搭載した新規遺伝子活性化基質による骨再生

研究課題名(英文) Bone regeneration device combined with nano-sized vector and miRNA

研究代表者

梅林 真由美 (UMEBAYASHI, Mayumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：50754719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、遺伝子導入試薬等を用いることなく、骨再生に有効である遺伝子を生体内で直接遺伝子導入させることで骨再生を可能とする遺伝子活性化基質(GAM)を開発することである。すでに、1000µgの遺伝子による遺伝子活性化基質で骨再生ができることは確認しているが、臨床応用を考えるとより少ない遺伝子量での骨再生が望まれる。そのため、miRNAに着目し、さらに遺伝子を修飾して作成した非薬剤性遺伝子ベクターを作成してこの問題の解決を図ることとした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to developed new bone regenerative device without gene transfer reagent. Our team reported that gene activated matrix(GAM) which combined with 1000µg BMP4 DNA, -TCP and atelo-collagen formed new bone after GAMs were implanted to rats' calvarium defects. However, 1000µg DNA is too much for clinical application. Therefore we focused on miRNA and new gene transfection technique.

研究分野：骨再生学

キーワード：骨再生

### 1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域では、欠損した顎骨の再生は重要な問題であるが、現在でも新鮮自家骨移植が gold standard である。しかしながら、自家骨移植は侵襲が大きく、骨採取量に限界があるため自家骨に代わる骨再生材料として人工代替材料に BMP などの成長因子の添加や MSC など幹細胞の応用が進められてきた。しかし、高い骨誘導能で知られる BMP は高容量で用いると強い浮腫を誘発するという副作用が存在し、培養細胞は移植に必要な細胞数の確保に設備、時間や多大な労力が必要となることから実際の臨床における standard となり得る有効な骨再生法の開発は未だに困難である。

そこで、申請者は、タンパクと比較して大量精製が容易で、生体における直接応用に安全性が高いと考えられている plasmid DNA (pDNA) に着目し遺伝子活性化基質 (Gene Activated Matrix : GAM) の開発を行ってきた。GAM は PTH 遺伝子を組み込んだコラーゲン基質を骨欠損に移植することで骨再生が可能であることを Bonadio らが報告したのが最初である。しかし、この実験では遺伝子導入効率は極めて低く、100mg もの pDNA を使用したにも関わらず、十分な骨形成を誘導することは困難であった。そのため、その導入率の低さを補うことを目的に、これまでウイ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きた。しかしながら、実際の臨床に応用可能な有効な手法による GAM の開発は十分とはいえないのが現状である。

一方申請者は、臨床応用が容易な GAM の開発を行うことを念頭に、BMP4 をコードする pDNA と、近年核酸医薬のデリバリーに有効性が示されているアテロコラーゲン基質を応用することで、効果的に骨再生を誘導することを検討してきた。その結果、この BMP4 コード型 GAM を、1000  $\mu$ g の pDNA をアテロコラーゲンに混和凍結乾燥することで作製した場合に、マウスの頭蓋骨において一定の骨誘導効果を発揮し得ることを確認している。しかしながら、ウイルスベクターや遺伝子導入試薬を応用した GAM で報告されている pDNA 量 (0.02~0.1mg) と比較すると依然として pDNA は高用量である。また、このように大量の pDNA を投与しても、細胞に導入される前に核酸分解酵素などによって分解、失活するものは多いと考えられ、臨床応用のデバイスとしては非効率であると考えられる。そのため、安全性に問題はないと考えられているものの、臨床応用を目指すにあたり、さらに低用量で効果的に骨誘導を図る方法を検討する必要がある。そこで、BMP4 コード型 GAM に搭載する遺伝子と遺伝子導入方法について改良を加えることとした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体材料のナノサイズ化技術と microRNA (miRNA) の核酸医薬技術を応用した in vivo gene delivery による新規骨再生法を開発することにある。具体的には、非薬剤性のナノサイズ化遺伝子導入用ベクターを組み込んだアテロコラーゲン基質に、高い骨誘導能や炎症抑制能を発揮する miRNA、もしくはそれらをコードする plasmid DNA を組み合わせた遺伝子活性化基質 (gene activated matrix; GAM) を開発することで、我々がこれまで開発してしてきた GAM の骨再生能力 (1000  $\mu$ g の DNA を搭載) を飛躍的に高めることを企図する。今回着眼した miRNA は、近年生体内で様々な遺伝子の発現を調節することで、細胞増殖や分化、アポトーシス、さらには発癌や老化など多彩な生体活動において重要な働きを持つことが明らかになってきている。miRNA は生体内で複数の遺伝子発現を同時に制御すると考えられているため、BMP4 の発現効果においても増強させることができるのではないかと考えた。すなわち、間葉系幹細胞 (MSC) からの骨芽細胞分化に関与する複数の遺伝子群を同時に機能させることや、BMP の副反応として発現する炎症の抑制に関わる遺伝子群を機能させることに役割を持つ miRNA を搭載することでより少量の pDNA で GAM の効果を高めることを期待している。

### 3. 研究の方法

(1) 遺伝子自体の遺伝子導入効率をあげることで遺伝子の少量化を図ることができると考え、遺伝子自体に修飾を加えてベクターとする技術と組み合わせることとした。これにより、非薬剤性でありながら、生体内での導入が可能となると考えている。遺伝子を修飾して作成されたこのベクターは遺伝子量によってはベクター同士で凝集を起こすことがあり、搭載できる遺伝子量に制限があるため、まずは搭載できる遺伝子量の条件設定を行う。

(2) miRNA のデリバリーについて、まずは候補となる miRNA の検索を in vitro で行う。その上でそれらを搭載した GAM の有効性を in vivo において確認する。MSC の培養において、BMP4 による骨芽細胞分化誘導時に発現変動の大きい miRNA を検索する。まずは、骨分化に有効であると報告されている候補遺伝子 A を使用し、遺伝子量を減らすことができるか検討を行う。そのため、候補遺伝子 A を含有する pDNA を作成する。この pDNA を作成するにあたり、細胞に導入されたことが確認できるよう、蛍光タンパクを発現する配列を組み込むこととした。

(3) 最後に至適化された遺伝子量を含んだ遺伝子ベクターと有効と思われる miRNA の候補遺伝子 A の両方を GAM に内含させることで、骨再生を誘導する BMP4 コード型 GAM における pDNA 少量化を達成できるか検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1)まずは、非薬剤性遺伝子ベクターで実際に含有させることができる遺伝子量を決定し、それが in vitro で遺伝子導入されるか確認を行った。遺伝子候補としてはこれまで使用してきた骨再生を促進させる BMP4 を使用した。この BMP4 は細胞に導入された際に導入が可視化できるように GFP タンパクを発現する DNA 配列と共に plasmid 化している。

今回の遺伝子ベクターを作成するにあたり、DNA の修飾は、これまでの研究で導入効率がよい組み合わせを使用することとした。遺伝子ベクターの作成において、これまで申請者が使用してきた 1000 µg もの遺伝子を使用するとベクター自体が凝集し、遺伝子導入能がなくなることが確認された。そのため、溶媒の種類や濃度の変更に加え、段階的に遺伝子量を減少し、ベクターに含有できる遺伝子の最大量の決定を行った。

(2)miRNA の検索は、脂肪細胞を培養して行った。解析の結果、数種類の miRNA が骨再生に有用である可能性が高いと予測されたが、さらなる詳細な検討が必要であると考えられる。

また、今回の候補遺伝子 A が骨形成に実際に有用か検討を行った。これまで作成してきた GAM に BMP4 ではなく候補遺伝子 A の pDNA を混和させて作成した場合に、移植でどのような効果があるのか確認した。さらに遺伝子量の変更も加え、遺伝子量による比較も行った。

次に、候補遺伝子 A を含んだ pDNA を修飾し、非薬剤性ベクターを作成した。これを培養細胞に播種し、蛍光タンパクの発現が見られるか確認した。また、その細胞において、コントロールと比較して経時的に骨分化を促進する遺伝子が上昇するかを確認した。

(3)BMP4 で作成した非薬剤性遺伝子導入ベクターと miRNA の候補遺伝子 A で作成したベクターのそれぞれで GAM を作成し、それをこれまでと同様にラット頭蓋骨上に作成した欠損に移植を行った。現在経時的に観察を行っているところである。今後は、さらに詳細な検討を重ねると共に、他の miRNA 候補遺伝子の検討やそれらの pDNA の作成、これらを BMP4 のベクターと組み合わせた時にどのような効果があるのかなど in vitro、in vivo で検討を行っていく予定である。

#### 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)

S Ohba, Y Sumita, M Umebayashi, H Yoshimura, H Yoshida, S Mastuda, H Kimura,

I Asahina, K Sano. Onlay bone augmentation on mouse calvarial bone using a hydroxyapatite/collagen composite material with total blood or platelet-rich plasma. Arch Oral Biol. 査読あり. 61:23-27, 2016.

〔学会発表〕(計 3 件)

M Umebayashi, Y Sumita, I Asahina: BONE AUGMENTATION BY GENE ACTIVATED MATRIX COMPOSED OF PLASMID DNA, BMP4 OR RUNX2, EMBEDDED IN ATELOCOLLAGEN. 10th World Biomaterial Congress (WBC), Montreal Convention Center (Canada, Montreal), 2016.5.17-22

M Umebayashi, Y Sumita, I Asahina. Successful bone augmentation by the graft of plasmid DNA, BMP4 or Runx2, embedded in atelocollagen. The 22nd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (ICOMC). Melbourne Convention and Exhibition Centre(Australia, Melbourne), 2015.10.27-30.

梅林真由美,住田吉慶,河井洋祐,渡邊すみ子,朝比奈泉. BMP4/Runx2 遺伝子活性化基質によるラット頭蓋骨骨増生の試み. 第 69 回日本口腔科学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府、大阪市) 2015.5.13-15.

〔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:  
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  
梅林 真由美 (UMEBAYASHI, Mayumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
助教  
研究者番号：50754719

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし