

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21895

研究課題名（和文）光誘導RNA導入法を応用した骨再生のための新規ドラッグデリバリーシステムの開発

研究課題名（英文）Development of new drug delivery system by photocontrolled Intracellular RNA delivery using carrier-photosensitizer conjugates

研究代表者

江國 大輔（Ekuni, Daisuke）

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：70346443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、光誘導RNA導入法を用いて、マイクロRNA（miRNA）による培養細胞（骨芽細胞）に対する影響を調べることとした。RNAキャリアを形質転換した大腸菌で作製した。光増感剤で修飾したキャリアタンパク質を付与したマイクロRNA（miRNA）（miR-29a-3p, miR-21a-5p）（Precursorタイプ）を骨芽細胞（MC3T3 E-1）に導入した。まず、細胞質内へ移行したことを顕微鏡下で観察した。次に、1週間後のアルカリフォスファターゼ活性を調べて、コントロールよりも増大していることが確認された。また、細胞の生存率を調べた結果、導入による有意な低下は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯を支える骨（歯槽骨）までもが吸収する「歯周炎」に進行すると、生活の質の低下やフレイル（虚弱）を引き起こす。よって、歯槽骨の吸収を制御することは歯周病の予防および治療にとって非常に重要である。近年注目されているマイクロRNA（miRNA）は、全ての生命現象に関わる遺伝情報を制御する。したがって、適切なmiRNAを細胞内に導入することで病気の治療などに大きく役立つと考えられる。本研究成果から、近年開発された光誘導RNA導入法を用いて、マウスの骨芽細胞における増骨活性を誘導できた。この光誘導RNA導入法は疾患部位だけに薬としてのmiRNAを運ぶ方法として応用できる可能性があり、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the effects of microRNA (miRNA) on a cell culture model (osteoblasts) using a peptide carrying a photosensitizer. A carrier protein for RNA was produced by transformants (*Escherichia coli*). The carrier protein was labeled with Alexa546, the photosensitizer. The carrier protein bound to miRNAs (miR-29a-3p, miR-21a-5p) (precursor type) and the complex was endocytosed and entrapped in an endosome of osteoblasts (MC3T3 E-1). We confirmed that the complex was localized within cells under the microscope. Then, we investigated alkaline phosphatase activity after 1 week. The activities by miR-29a-3p and miR-21a-5p were higher than the control. We also investigated the effects on cell survival. There are no effects on cell survival.

研究分野：社会歯科学

キーワード：マイクロRNA 歯周病 骨再生

1. 研究開始当初の背景

歯周病の中でも、歯を支える骨(歯槽骨)までもが吸収する「歯周炎」に進行すると、食べ物がうまく噛めないなどの機能障害、さらには生活の質の低下やフレイル(虚弱)を引き起こす。よって、歯槽骨の吸収を制御することは歯周病の予防および治療にとって非常に重要である。近年注目されているマイクロRNA(miRNA)は、全ての生命現象に関わる遺伝情報を制御する。したがって、適切なmiRNAを細胞内に導入することで病気の治療などに大きく役立つと考えられる。近年、光依存的に、かつ選択的にRNAを運ぶキャリア分子が開発された。

この光誘導RNA導入法は副作用を防ぎ、疾患部位だけに薬としてのmiRNAを運ぶ方法としても応用できる可能性がある。新たな歯周病予防・治療戦略につなげる本研究の着想が、「歯垢や歯石を除去する」という固定概念から脱却して、「副作用の少ない分子科学に基づく歯周内科学(薬物治療学)の発展」というパラダイムシフトを起こすことに寄与する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「狙ったタイミングで狙った細胞内に素早く」miRNAを導入できる技法を用いて、培養細胞(骨芽細胞)に対する影響を調べることにした。

3. 研究の方法

RNAキャリア(Tat-U1A-rose bengal conjugate; TatU1A-RB)を形質転換した大腸菌で作製した。TatU1A-RBを光増感剤(Alexa Fluor 546 C5-Maleimide)で修飾した。骨芽細胞(MC3T3 E-1)を培養(MEM(E-1or 546 C5-Maleimide)を調べることとし)した。

予備実験では、キャリアの作製方法および導入方法の確認を行った。このときに導入したのは低分子ヘアピン型RNAであった。可視光照射の条件は530-550nm、20J/cm²とした(Ohtsuki et al, 2015)。

次に、2種類のマウスmiRNA(miR-29a-3p、miR-21a-5p)(Precursorタイプ)を作製した。それぞれに光増感剤修飾キャリアを付与した複合物を可視光照射(530-550nm、20J/cm²)により、骨芽細胞に導入した。1週間後にアルカリフォスファターゼ活性を測定した。405nmで吸光度測定した(ラボアッセイTMラボアッ、富士フィルム和光、東京)。ネガティブコントロールとして、トランスフェクション薬液のみを設定した。また、生細胞増殖を確認するために、導入して1日後の活性を計測した{OD(450nm/620nm)}。

4. 研究成果

1) 予備実験

キャリアの作製方法および導入方法の確認を行った。既存の方法(Ohtsuki et al, 2015)に沿って、その再現性を確認した。光増感剤修飾TatU1AにshRNAを結合させた。この複合体を細胞のエンドソーム内に取り込ませた後に光照射し、細胞質内へ移行したことを顕微鏡下で観察した(図1)。

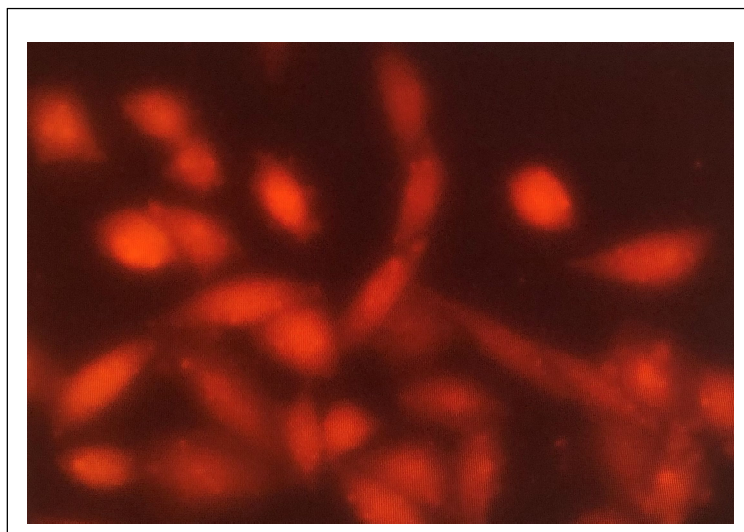


図1 光照射後の細胞質内の分布

細胞質内全体に赤色の光増感剤が導入されている。

2) 本実験

選定した miRNA から 2 種類の mimic (miR-29a-3p と miR-21a-5p) を作製した。miRBase (<https://www.mirbase.org/>) のライブラリから、Precursor タイプの塩基配列をもとに、キャリアタンパク質に結合させるためのループ部分をオリジナルで設計した。

次に、骨芽細胞を用いて、視覚的な細胞内移行を確認した (図 2)。増骨活性に関するシグナルの変化をそれぞれ確認した。1 週間後のアルカリフォスファターゼ活性が増大していた。次に、miRNA の mimic に実験光増感剤の TatU-1A を付与して、光照射を行い、視覚的な細胞内移行を確認した。

さらに、再現性を確かめた。1 週間後のアルカリフォスファターゼ活性の増大を再度確認できた (図 3)。また、細胞の生存率を調べた結果、導入による有意な低下は認められなかった。実験光増感剤を付加した光応答性 miRNA キャリア蛋白質を使用し、細胞内に miRNA を導入して、培養骨芽細胞の増骨活性を促すことができた。miR-29a は、Wnt シグナルの Dkkopf-1、Kremen2 および secreted frizzled related protein 2 を抑制して、骨芽細胞の分化を制御し (Kapinas et al, 2010)、骨粗鬆症モデルでは、骨形成を促進する (Lian et al, 2021)。miR-21a-5p は PTEN を抑制することで、骨形成を制御している (Zhou et al, 2016)。本研究結果は支持される。

今後、この技術を応用して、将来の歯周治療 (歯槽骨の回復) に貢献できる可能性がある。

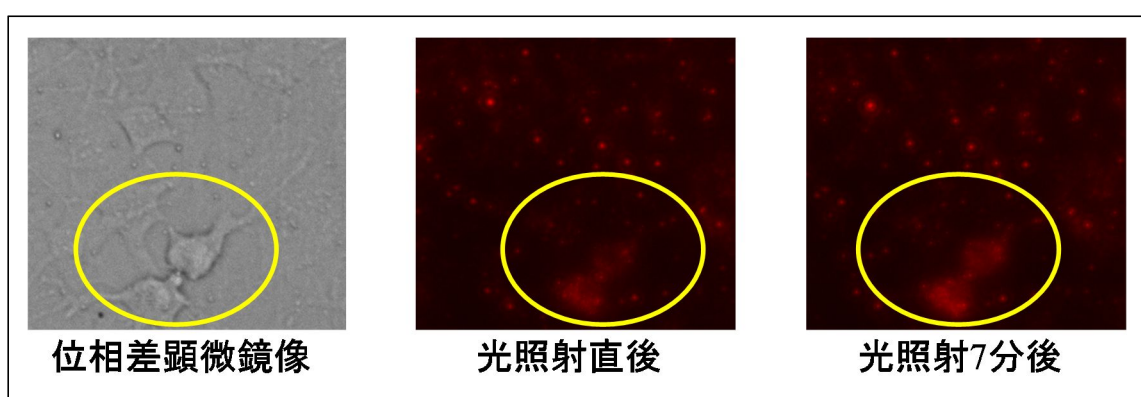


図 2 光照射後の細胞内導入の確認
黄色の枠内の細胞内に、赤色の光増感剤が増加している。

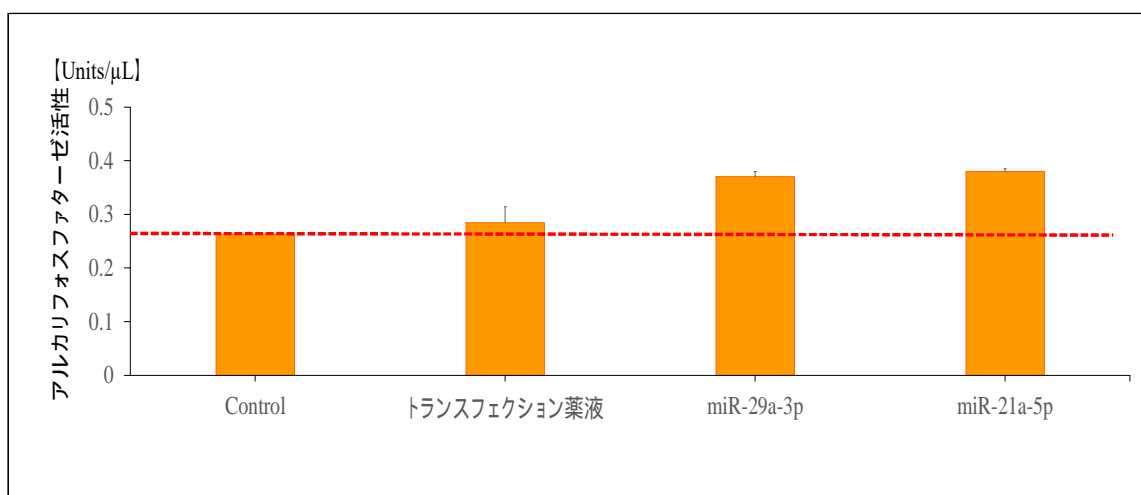


図 3 miRNA 導入後のアルカリフォスファターゼ活性の比較
何も添加していないコントロールとトランスフェクションの薬液を添加したネガティブコントロールと比較して、miR-29a-3p と miR-21a-5p を導入した場合に、アルカリフォスファターゼ活性が高い値を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江國大輔, 福原瑠子, 森田 学
2. 発表標題 可視光照射によるmiRNAの骨芽細胞への導入
3. 学会等名 第33回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森田 学 (Morita Manabu) (40157904)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	福原 瑠子 (内田瑠子) (Fkuhara Yoko) (60779742)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	片岡 広太 (Kataoka Kota) (80744185)	岡山大学・歯学部・客員研究員 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------