

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670859

研究課題名(和文) 生体内核酸送達による骨再生法の開発に関する戦略的研究

研究課題名(英文) Strategic research on development of bone regenerative therapy with in vivo delivery of nucleic acids

研究代表者

高戸 毅 (Takato, Tsuyoshi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90171454

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)：本研究では、組織欠損部周囲の細胞への核酸送達による骨格組織修復療法の可能性を探り、その基盤技術を創出することを目的とした。核酸内包ナノミセルの最適化を行い、核酸内包ナノミセルを搭載した組織修復用機能性生体材料の作製を試みた。さらに、骨格形成関連因子の核酸を内包したナノミセルの投与により、骨格組織の変性の抑制や修復が誘導されることを、小動物における骨格組織変性モデルにより確認した。以上より、治療用遺伝子の核酸を内包したナノミセルが骨格組織修復を誘導できるコンセプトが示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine the potential of the skeletal tissue repair by nucleic acid delivery to cells around tissue defects, and to develop basic technologies to achieve the therapy. First, nanomicelles encapsulating nucleic acids were optimized. Second, functional biomaterials carrying the nanomicelles were examined for their use in tissue repair. Lastly, in vivo experiments using the animal model of skeletal tissue degeneration revealed that the administration of nanomicelles encapsulating nucleic acids of a skeletogenesis-related factor suppressed the degeneration and repaired the degenerated tissues. Thus, this study provides a proof of concept for the skeletal tissue repair using nanomicelles that encapsulate nucleic acids of therapeutic genes.

研究分野：口腔外科学、再生医学

キーワード：骨再生 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

様々な原因で生ずる組織欠損に対する治療は焦眉の課題であり、その治療法として組織再生療法が注目を浴びて久しい。口腔外科領域においては、歯周疾患や炎症・外傷により破壊された歯槽骨の再建が大きな治療ニーズである。組織誘導療法 (guided tissue regeneration- GTR) や骨誘導再生療法 (guided bone regeneration- GBR) 等は自然治癒力の確保という側面が大きい。申請者らは骨形成に関する基礎研究を行う一方で、生体材料あるいは遺伝子送達による組織再生に関する研究を進めてきた。これらの知見・技術シーズを組み合わせて歯槽骨再建という臨床ニーズに応えるべく本研究は着想された。本研究の基盤となる知見・技術シーズを以下に概説する。

(1) 骨形成性遺伝子：骨形成性シグナルの最適化を通じて、恒常活性型 bone morphogenetic protein (BMP) 受容体 IB (caBMPRII) と転写因子 Runx2 の過剰発現により、線維芽細胞から骨形成性細胞への direct reprogramming (直接リプログラミング) が可能であることを世界に先駆けて報告した (文献①)。また、ヘッジホッグ (Hh) シグナルが骨分化の細胞運命決定から生体の骨量調節まで関与することを報告した (文献②-④)。

(2) 生体材料： $\alpha$  型リン酸三カルシウムを射出成型することにより、テトラポッド型リン酸カルシウムインプラントを開発した (文献⑤)。

(3) 遺伝子キャリアによる遺伝子送達：ポリエチレングリコール-ポリカチオンのブロック共重合体と核酸の自己会合により形成される高分子ナノミセルによる遺伝子送達が骨再生を誘導できることを報告した (文献⑥)。

<引用文献>

- ① Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. *FASEB J* 21(8):1777-87, 2007
- ② Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung UI: Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev Cell* 14(5):689-699, 2008
- ③ Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 protein participates in the hedgehog-mediated specification of the osteoblast lineage during endochondral

ossification. *J Biol Chem* 287(21):17860-9, 2012

- ④ Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI: Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem* 288(14):9924-32, 2013
- ⑤ Choi S, Liu IL, Yamamoto K, Igawa K, Mochizuki M, Sakai T, Echigo R, Honnami M, Suzuki S, Chung UI, Sasaki N. Development and evaluation of tetrapod-shaped granular artificial bones. *Acta Biomater* 8(6):2340-7, 2012
- ⑥ Itaka K, Ohba S, Miyata K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Chung UI, Kataoka K: Bone regeneration by regulated in vivo gene transfer using biocompatible polyplex nanomicelles. *Mol Ther* 15(9):1655-62, 2007

## 2. 研究の目的

既に同定した骨形成性遺伝子を内包した高分子ナノミセルを搭載した機能性生体材料で骨格組織欠損部を被覆あるいは満たすことで、組織欠損部周囲の細胞への mRNA 送達により骨格組織の形成を誘導する組織修復療法の可能性を探り、その基盤技術を創出したいと考えている。以下の3点を行う。

- (1) 核酸内包ナノミセルの最適化と骨格形成関連遺伝子核酸内包ナノミセルの作製
- (2) 核酸内包ナノミセルを搭載した組織再生用機能性生体材料の作製
- (3) 核酸内包ナノミセルによる骨格組織修復療法の小動物モデルにおける検証

申請者らが培ってきたリン酸カルシウムインプラント、遺伝子キャリア、そして骨形成に関する基礎的知見を有機的に組み合わせることで、新しい再生システムの創出を目指す。生体内への核酸・mRNA送達により、積極的に組織にはたらきかけて歯槽骨再生を誘導する革新的な歯槽骨再建療法の創成により、口腔領域の再生医療の応用拡大につながる。さらに、基礎医学・工学から得られた先端的知見や技術シーズを臨床医学・歯学ニーズに迅速に転換応用する基盤技術の創成も期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 核酸内包ナノミセルの最適化と骨格形成関連因子の核酸内包ナノミセルの作製

骨格組織の再生に向けて、核酸からのタンパク発現の最大化と制御可能化を実現するポリマーの最適化を行う。核酸の保持能、リリース能、タンパク発現能に焦点をあてた最適化を行う。最適化にあたっては、in vitroで合成したレポーター遺伝子のmRNAを用いて、

培養細胞や動物への導入効率を検証する。これにより、mRNAの合成条件の検討も行われる。

## (2) 核酸内包ナノミセルを搭載した組織再生用機能性生体材料の作製

申請者らが開発を進めてきたテトラポッド型リン酸カルシウムインプラントに核酸内包ナノミセルを搭載し、種々の条件検討を行う。評価項目としては、バイオマテリアルの表面処理、分解能制御により、治療目的に応じた材料や物性の最適化に加え、核酸内包ミセルの保持能、リリース性能を最適化するためのインターフェース構築を進める。

## (3) 核酸内包ナノミセルによる骨格組織修復療法の小動物モデルにおける検証

小動物における骨格系組織欠損モデルを用いて、骨格形成関連因子核酸内包ミセルによる組織修復効果を検証する。通常の組織学的解析に加えて、免疫染色による各種マーカー蛋白質の発現解析を行い、治療効果の分子メカニズムについても知見を得る。

## 4. 研究成果

### (1) 核酸内包ナノミセルの最適化と骨格形成関連因子核酸内包ナノミセルの作製

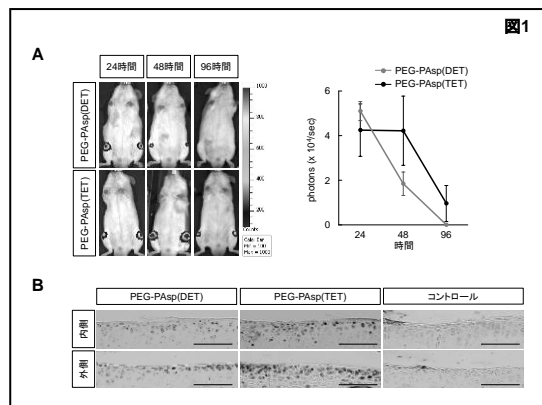
先行研究で、ポリエチレングリコール(PEG)ーポリカチオン鎖のブロックコポリマーと核酸からなるナノミセルが核酸送達に有用であることが報告されていた。そこで、ポリカチオン部分のポリアスパラギン酸主鎖に2個のアミノエチレン繰り返し側鎖をもつもの(PEG-PAspDET)と3個のアミノエチレン繰り返し側鎖をもつもの(PEG-PAspTET)について、骨格系組織へのmRNA送達能を検証した。それぞれに、1 μg ルシフェラーゼ遺伝子 mRNA を搭載した遺伝子キャリアをマウス膝関節内に注射にて投与した。投与後24、48、96時間でIVISイメージングシステムによりルシフェラーゼ蛋白質の発現を解析したところ、PEG-PAspDETは一過性の発現を誘導したが、PEG-PAspTETは持続的な発現を誘導した(図1A)。緑色蛍光蛋白(GFP)遺伝子mRNAを搭載した遺伝子キャリアをマウス膝関節内に注射投与し、投与4日後の免疫染色により関節軟骨におけるGFPの発現を確認した(図1B)。

### (2) 核酸内包ナノミセルを搭載した組織再生用機能性生体材料の作製

骨形成性因子の核酸内包ナノミセルを搭載したリン酸カルシウム微小人工骨の骨分化促進作用を間葉系細胞の培養系で検証した。遺伝子発現解析の結果、人工骨と組み合わせた際の核酸送達効率についてはさらなる改善が必要であることが判明した。

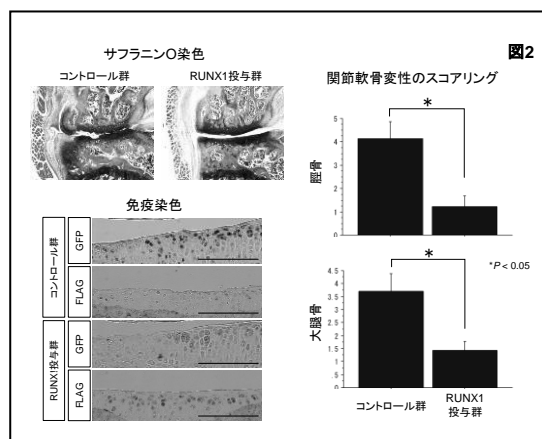
### (3) 核酸内包ナノミセルによる骨格組織修復療法の小動物モデルにおける検証

①の結果をうけ、2種類の核酸キャリア(ナ



ノミセル)の骨格組織修復効果の検証をマウスにおいて行った。変形性膝関節症を発症するモデルマウスの膝関節内に、3日に1回のペースで1か月間、骨格組織の形成と維持に関わる転写因子であるRUNX1のmRNAを内包したナノミセルを投与した。PEG-PAspDETを用いた場合、RUNX1 mRNA投与群の関節軟骨で軟骨組織変性が抑制される傾向を認めたが、コントロールと比して有意差は得られなかった。

一方、PEG-PAspTETを用いた場合は、送達したmRNAに由来するRUNX1蛋白質の発現を認め、コントロール群と比べて軟骨組織変性が有意に抑制された(図2)。さらに、主要な軟骨基質蛋白質の一つであるII型コラーゲン、軟骨形成に必須の転写因子SOX9、細胞増殖マーカーである増殖細胞核抗原の発現が亢進していた。



これらの結果は、膝関節内に送達したmRNAに由来するRUNX1蛋白質が関節軟骨内部で治療用転写因子として働くことで、軟骨細胞としての形質の維持や増殖に関わる遺伝子群の発現を調節し、軟骨組織変性の進行が抑制されたことを示すものと思われる。以上より、治療用遺伝子の核酸を内包したナノミセルが骨格組織において組織修復を誘導できるコンセプトが示された。

上記の結果を受け、歯槽骨欠損モデルにおける検証のためにモデルを確立し、検証実験の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Kashiwagi M, Hojo H, Kitaura Y, Maeda Y, Aini H, Takato T, Chung UI, Ohba S: Local administration of a hedgehog agonist accelerates fracture healing in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 479(4):772-8, 2016  
doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.134.
- ② Kanno Y, Nakatsuka T, Saijo H, Fujihara Y, Hikita A, Chung UI, Takato T, Hoshi K: Computed tomographic evaluation of novel custom-made artificial bones, "CT-bone", applied for maxillofacial reconstruction. *Regenerative Therapy.* 5:1-8, 2016  
doi:10.1016/j.reth.2016.05.002
- ③ Hoshi K, Fujihara Y, Mori Y, Asawa Y, Kanazawa S, Nishizawa S, Misawa M, Numano T, Inoue H, Sakamoto T, Watanabe M, Komura M, Takato T: Production of three-dimensional tissue-engineered cartilage through mutual fusion of chondrocyte pellets. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 45(9):1177-85, 2016  
doi: 10.1016/j.ijom.2016.03.002.
- ④ Takato T. Tissue Engineering in Bone: The Contention of a Hundred Schools of Thought. *Artif Organs.* 40(4):331-3, 2016  
doi:10.1111/aor.12739
- ⑤ Aini H, Itaka K, Fujisawa A, Uchida H, Uchida S, Fukushima S, Kataoka K, Saito T, Chung UI, Ohba S: Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Sci Rep* 6:18743, 2016  
doi:10.1038/srep18743
- ⑥ Maeda Y, Yamamoto K, Yamakawa A, Aini H, Takato T, Chung UI, Ohba S: The H2 blocker famotidine suppresses progression of ossification of the posterior longitudinal ligament in a mouse model. *RMD Open* 1:e000068, 2015  
doi:10.1136/rmdopen-2015-000068
- ⑦ Suenaga H, Unami M, Hoshi K, Mori Y, Takato T: Rare case of composite embryonal rhabdomyosarcoma and leiomyosarcoma of the tongue of an adult. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol.* 26(1):30-4, 2014  
doi:org/10.1016/j.ajoms.2012.08.019
- ⑧ Kamimura W, Koyama H, Miyata T, Takato T: Sugar-based crosslinker forms a stable atelocollagen hydrogel that is a favorable microenvironment for 3D cell culture. *J Biomed Mater Res A.* 102(12):4309-16, 2014

doi:10.1002/jbm.a.35106

- ⑨ Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo H, Abe T, Abe M, Suenaga H, Kanno Y, Sugiyama M, Hoshi K: Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. *Oral Sci Int.* 11(2):45-51, 2014  
doi:org/10.1016/S1348-8643(14)00008-1
- ⑩ 高戸毅, 藤原夕子, 星和人, 小笠原徹, 西條英人, 安部貴大, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山円, 森良之: 顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究, *日本口腔科学会雑誌* 63(2):207-215, 2014  
doi:10.11277/stomatology.63.207

[学会発表] (計 13 件)

- ① Kashiwagi M, Hojo H, Kitaura Y, Maeda Y, Aini H, Takato T, Chung UI, Ohba S: Hedgehog agonist promotes callus formation in a mouse fracture model. *IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, 2017.3.23, San Francisco (USA)*
- ② Takato T, Hikita A: The novel methods of creating three-dimensional tissues and organs. *2016 International Symposium on Innovative 3D Printing, 2016.10.14, Taipei (Taiwan)*
- ③ 高戸毅: 教育講演 iPS 細胞応用の最前線. (社) 日本先進インプラント医療学会 第19回総会・学術大会, 2016年9月3日, 一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区)
- ④ Hailati Aini, 位高啓史, 齋藤琢, 鄭雄二, 大庭伸介: ナノミセルを用いた治療用転写因子の mRNA 送達 は マウスモデルにおいて変形性関節症の進行を抑制する. 第34回日本骨代謝学会学術集会, 2016.7.21, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- ⑤ Aini H, Itaka K, Kataoka K, Saito T, Chung UI, Ohba S: Polyplex nanomicelle-mediated messenger RNA delivery of a cartilage anabolic transcription factor into the articular cartilage ameliorates the progression of osteoarthritis. *2016 OARSI World Congress on Osteoarthritis, 2016.4.1, Amsterdam (Netherland)*
- ⑥ 位高啓史, Hailati Aini, 藤澤彩乃, 内田寛邦, 内田智士, 齋藤琢, 片岡一則, 鄭雄二, 大庭伸介: 軟骨形成性転写因子 mRNA の関節内投与による変形性関節症治療の試み. 第15回日本再生医療学会総会, 2016年3月17日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- ⑦ 高戸毅: 再生医療が拓く新しい医療. 第101回日本消化器内視鏡学会関東地方会, 2015年12月12日, シェーンバッハ・サ

ポー (東京都千代田区)

- ⑧ 高戸毅, 藤原夕子, 金澤三四朗, 菅野勇樹, 鄭雄二, 星和人: 3D プリンターによる外科用インプラントの創生. 第 53 回日本人工臓器学会大会, 2015 年 11 月 20 日, 東京ドームホテル (東京都文京区)
- ⑨ 高戸毅: 再生医療が拓く未来の医療. 第 103 回日本美容外科学会, 2015 年 6 月 7 日, 東京ビッグサイト (東京都江東区)
- ⑩ 高戸毅: 3D プリンターによる外科用インプラントの創生. 第 90 回日本医療機器学会大会, 2015 年 5 月 29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑪ 高戸毅, 藤原夕子, 金澤三四朗, 星和人: 3D プリンターによる外科用インプラントの創生. 第 76 回日本臨床外科学会総会, 2014 年 11 月 21 日, 郡山市民文化センター (福島県郡山市)
- ⑫ Takato T, Fujihara Y, Hoshi K: Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region. 7th World Congress on Preventive and Regenerative Medicine, 2014. 11. 4-7, Taipei (Taiwan)
- ⑬ 藤原夕子, 高戸毅, 星和人: マクロファージのサブクラスが軟骨再生に与える影響. 第 35 回日本炎症・再生医学会, 2014 年 7 月 1-4 日, 万国津梁館 (沖縄県名護市)

[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]

ホームページ等

<https://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高戸 毅 (TAKATO, Tsuyoshi)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 90171454

### (2) 研究分担者

星 和人 (HOSHI, Kazuto)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 30344451

藤原 夕子 (FUJIHARA, Yuko)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50466744

大庭 伸介 (OHBA, Shinsuke)  
東京大学・大学院工学系研究科 (工学部)・准教授  
研究者番号: 20466733

### (3) 連携研究者

鄭 雄一 (TEI, Yuichi)  
東京大学・大学院工学系研究科 (工学部)・教授  
研究者番号: 30345053

### (4) 研究協力者

Hailati Aini