

令和元年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11539

研究課題名(和文) 遺伝子治療を併用したフルオロアパタイトによる新しい歯髄保護療法の開発

研究課題名(英文) Development of new dental pulp treatment using gene silencing and synthesis of fluoroapatite.

研究代表者

天雲 太一 (Tenkumo, Taichi)

東北大学・歯学研究科・講師

研究者番号：80451425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リン酸カルシウムを基盤とした遺伝子導入剤を作製し、遺伝子導入効率や生体親和性を向上するため、付与するペプチドを検討したところ、ラット歯髄由来細胞に対してオクタアルギニンやプロタミンが有効であることが明らかとなった。また、LPS刺激を受けたラット由来歯髄細胞に適用したところ、TNF- α mRNAの発現率が減少した。このことから作製した遺伝子導入剤は遺伝子サイレンシングを行うことで、抗炎症作用を示すことが示唆された。一方、象牙質上に垂直に結晶配列したフルオロアパタイトを合成することに成功した。これらをラット歯髄に適応した場合にも抗炎症作用を示すことが組織学的に観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、細胞賦活因子のキャリアーとして様々な生体材料が開発されている。本研究で開発した遺伝子導入剤は骨や歯を構成するリン酸カルシウムを基盤としており、それ自体で硬組織形成促進作用を示す。本研究では遺伝子サイレンシング効果を付与することで、抗炎症作用を具備した生体材料を開発した。このことは常在細菌にさらされている歯周病やう蝕などの口腔内疾患だけでなく、関節リウマチなどの慢性的な国民病にも応用可能であり、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is that the development of new dental pulp protection treatment with a Anti-inflammatory effect using gene silencing and regeneration by the fluoroapatite synthesis. In this study, a gene transfection vector based on Calcium phosphate(CaP), which is composed of bone, enamel and dentin, was prepared and evaluated the gene transfection efficiency and cell viability of CaP with different peptide. For rat dental pulp derived (DP) cells, CaP nanoparticles with octa-arginine or Protamine induced high transfection efficiency and cell viability. Furthermore, this reduced the TNF- α mRNA expression of the rat DP cells stimulated by LPS. These results suggested that the gene silencing using CaP with siRNA(anti-TNF- α) reduced inflammation. On the other hand, the synthesis of fluoroapatite having vertical crystal arrangement against dental surface. Furthermore, the application of CaP with siRNA(anti-TNF- α) reduced the inflammation in histological observation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：フルオロアパタイト リン酸カルシウム 遺伝子サイレンシング 抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

一般に、炎症では、主に血管拡張と組織液や細胞成分の浸潤によって引き起こされる腫脹や発熱などの兆候を経た後で治癒に向かう。一方、歯髄組織は象牙質という硬組織に囲まれた特殊な臓器であり、炎症を起こした場合、血管拡張から始まる炎症への治癒過程を取ることができず、そのまま壊死もしくは壊疽することが知られている。そのため、細菌感染が歯髄組織に達していない場合においても、切削や細菌分泌物などによって歯髄炎を惹起し、結果、歯髄除去治療（抜髄）が必要となることが多い。歯髄を保護するためには炎症反応を制御する機構が必要となる。一方、我々は遺伝子導入技術に着目し、成長因子の局所への徐放方法を開発してきた。この遺伝子導入剤は生体内の骨や歯を構成するリン酸カルシウムを基盤としていることから、炎症を抑制させる siRNA を搭載することで、局所の炎症を抑制させるだけでなく、象牙質の再生にも寄与できる可能性がある。一方、エナメル質を構成する規則正しく配列したハイドロキシアパタイトで構成されている。また、フッ素の取り込みによって耐酸性の高いフルオロアパタイトになることが報告されている。我々はチタンディスク上で結晶配列を整えたフルオロアパタイトの結晶を合成することに成功してきた。これらの技術を融合させることで歯髄保護とエナメル質再生を目的とした新しい治療法が確立できるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は炎症を抑制する遺伝子治療と、結晶配列を統一させたバイオミメティックなフルオロアパタイトの形成を組み合わせた新しい歯髄保護療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入剤の開発と有効性の検討

リン酸カルシウムナノ粒子遺伝子導入ベクター (CaP) の作製

pH を 9.0 に調整した硝酸カルシウムおよびリン酸二アンモニウムを等量混合後、ヒト BMP-2 (pUC57) もしくは GFP1 をコードしたプラスミド DNA (pAcGFP1) (1mg/mL) を添加し、攪拌後、再度等量の硝酸カルシウムおよびリン酸 2 アンモニウムを加え、最後にオクタ-アルギニン (以下 R8) (1~100mg/mL)、ポリエチレンイミン (以下 PEI)、プロタミン (10mg/mL) もしくはオルトケイ酸テトラエチルを加えて攪拌した。その後、12000rpm で 30 分間遠心分離にかけ、余剰のペプチドを分離した後、超音波にて攪拌した。

細胞培養

hMSCs (HMSC.BM-100, Cellular Engineering Technologies, USA) およびヒト骨芽細胞 (hOB, PromoCell GmbH) は、10%FBS, 100U/mL ペニシリン-100U/mL ストレプトマイシン含有 D-MEM を用いて培養した。本実験では、3-7 継代の細胞を使用した。また、Wistar 系ラットの切歯から歯髄組織を採取し、10%FBS, 100U/mL ペニシリン-100U/mL ストレプトマイシン含有 MEM を用いて培養した。またラット上顎歯肉より歯肉組織を採取し同様に培養した。本実験では、2-5 継代の細胞を使用した。

遺伝子導入試験及び細胞毒性試験 (in vitro)

24 穴プレートに 2×10^4 /well となるように各培養細胞を播種し、5%CO₂、37 環境下で培養した。24 時間後、培養液を交換後、1-1 で作成した各種 CaP 遺伝子ベクター (AcGFP-1 含有) 50 μ L を添加した。7 時間後、再度新鮮な培養液に交換した。遺伝子導入から 72 時間後に、光学顕微鏡並びに蛍光顕微鏡下で観察し、遺伝子導入効率を計測した。細胞毒性については MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide assay) を行い、細胞増殖率を計測した。

CaP の細胞取り込み経路の同定

96 穴プレートに 5×10^3 /well になるように hOB 細胞もしくはラット由来歯髄細胞を播種し、24 時間 5%CO₂、37 環境下で培養した。(1) で作製した AcGFP-1 含有各種 CaP 遺伝子ベクター懸濁液を添加する 30 分前にスクロースもしくは、メチルシクロデキストリン、10 分前にアミロライド、もしくは LY294002 それぞれ添加した。遺伝子導入 4 時間後に、蛍光顕微鏡下で遺伝子導入効率を測定し、細胞へ取り込み経路を検索した。

PH 細胞導入経路の測定

HEPES 緩衝液に HeLa 細胞、Soas2 細胞、hMSC 細胞、hOB 細胞もしくはラット歯髄細胞 (1.0×10^7) をそれぞれ播種し、BCECF-AM (最終濃度 3 μ M) を加えた後 30 分間 5%CO₂、37 環境下で培養した。励起波長 500nm、蛍光波長 530nm で蛍光度を測定した。その後アミロライド溶液もしくは滅菌蒸留水を添加後、1-1 で作製した各種 CaP 遺伝子ベクター懸濁液を添加し、10 分間 5%CO₂、37 環境下で培養し、再度蛍光度を測定し細胞内 PH の変化量を測定した。

LPS 刺激後の遺伝子導入効率、細胞毒性試験

24 穴プレートに 2×10^4 /well となるようにラット歯髓由来細胞もしくはラット歯肉由来細胞を播種し、5%CO₂、37 環境下で培養した。24 時間後、培養液を交換後、LPS(1 μg/mL)を添加し、その 4 時間後に siRNA(TNF-a)を搭載した CaP 遺伝子ベクター (CaP/siRNA/CaP/protamine) 50 μL を添加した。遺伝子導入から 72 時間後に、MTT 試験を行い細胞増殖率を計測した。また、同様に細胞から RNA を抽出し r PCR 法によって TNF-a の発現率を検討した。

(2) フルオロアパタイトの合成

ウシ象牙質片の作成

ウシ切歯歯根から、3×3×1mm に規格化した象牙質片を作製し、EDTA で脱灰 (3 分間) 後滅菌蒸留水にて洗浄後、紫外線滅菌を行い以下の実験に用いた。

フルオロアパタイトの合成

硝酸カルシウム (0.25M) 水素ジアンモニウムリン酸 (0.15M) 及びフッ化カリウム (0.05M) を混合した溶液に、2-1 で作製した象牙質片上を浸漬させ、121 度 2 気圧で 16 時間オートクレーブを行った。象牙質片場に作成された沈殿物について、SEM 観察、X 線回折測定、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) を行った。

物性試験 (溶解性試験、微小硬さ試験)

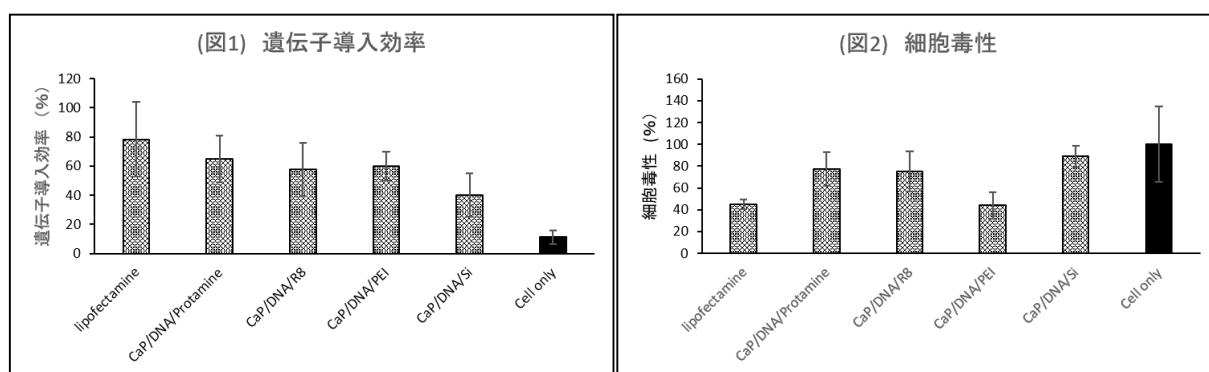
作製したフルオロアパタイト (10mg) をガラスアイオノマーセメント (フジ、GC、日本) と 1 : 10 の割合でそれぞれ混和し板状に加工し、ビッカース硬さ試験を行った。また、PBS に 24 時間浸漬し、浸漬前後の重量変化を測定し、溶解性について検討した。

(3) ラット歯髓への適用

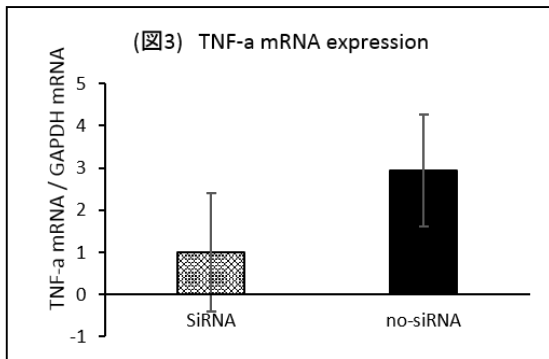
Wister 系ラット (雄、12 週齢) の左右第一大臼歯にダイヤモンドチップを搭載した超音波洗浄装置でラット臼歯部咬合面に直径 0.5 mm の露髄を伴う窩洞を形成する。1-1 で作製した CaP 遺伝子ベクター (CaP/siRNA/CaP/protamine) (0, 10 μL) を歯髓組織に適用した。その後フルオロアパタイト/ガラスアイオノマー混合セメントにて仮封を行った。観察期間を 2、4 週とし、通常に従って脱灰薄切標本作製。ヘマトキシリン エオジン重染色を行い、組織学的観察を行った。また、適用したラット大臼歯を摘出し、粉碎後、歯髓を組織内に含まれる BMP2 濃度、ALP 活性を測定し比較検討した。

4. 研究成果

遺伝子導入効率は細胞種によって異なることから、まずリン酸カルシウムナノ粒子を基盤とした効率的な遺伝子導入剤を開発し検証した (図 1)。その結果、遺伝子導入効率についてはケイ素を除いて特に有意な差は見られなかった。一方、細胞毒性試験では PEI を付与した群について高い細胞毒性を示した (図 2)。



これらの結果から、ラット歯髓由来細胞に対しては、作成した遺伝子導入剤の最外層にオクタアルギニンもしくはプロタミンを付与することで、細胞毒性が低いまま、遺伝子導入効率が上昇することが分かった。一方、LPS で細胞を刺激し、siRNA を含有した上記 4 群を適用したところ、細胞増殖率は、すべての群で無処理群と比較して高かった。また、遺伝子導入剤を添加したすべての群で TNF-a の発現率の減少が認められた (図 3)。このことから作成したどのリン酸カルシウム遺伝子導入剤においても遺伝子サイレンシングが行われることが明らかとなった。しかし細胞増殖率は、PEI を付与した群で低い傾向を示した。以上の結果からラット歯髓由来細胞、ラット歯肉由来細胞への遺伝子サイレンシングにもリン酸カルシウムナノ粒子最外層にオクタアルギニンもしくはプロタミンを付与した遺伝子導入剤が有効であることが示唆された。一方、その細胞内導入経路試験では、細胞の種類によって導入経路が異なることが確認された。



特に、オクタアルギニンを付与した場合はアミロライドで前処理することで骨系細胞に対して遺伝子導入効率が高くなった。そのため、細胞内のpH変化を測定したところ、hMSC及びhOB細胞ではアミロライド処理前後で細胞内のpH値変動が少なかった。これらの結果から遺伝子導入効率は細胞内pHの影響を受けることを示唆した。

また、生体内に適用する際に、遺伝子導入剤の生体親和性及び徐放性について検討するため、各種濃度のリン酸カルシウムナノ粒子をコラーゲンを基材とした scaffold に配合し、生体内で

の遺伝子導入効果について評価した。その結果、生体内での過度な炎症を惹起しないこと、観察期間内においてはガン化所見は認められなかったこと、目的の遺伝子の発現が確認され、生体内でも遺伝子導入できること、またその作用時間は scaffold によることを明らかとした。以上の結果からラット歯髄への適用には CaP/DNA/Protamine を用いることとした。

一方、合成したフルオロアパタイトの元素解析結果を図4、図5に示す。

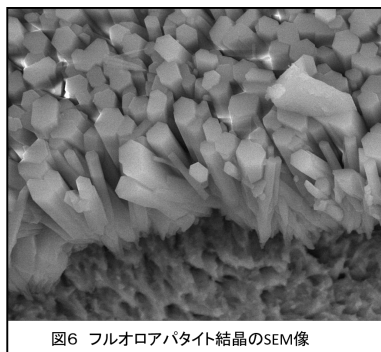
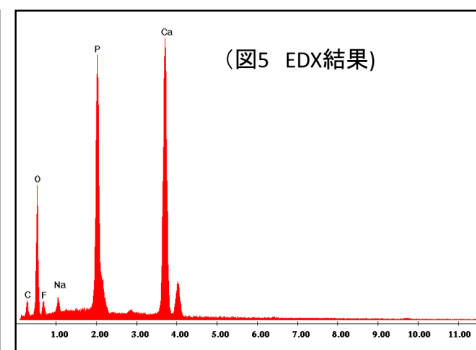
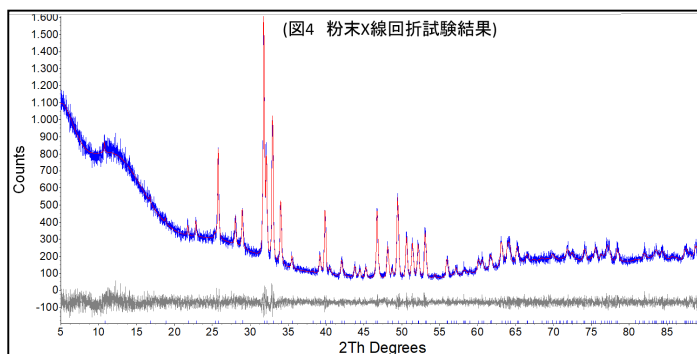


図6 フルオロアパタイト結晶のSEM像

これらの結果から、沈殿した合成物はフルオロアパタイトであることが明らかとなった。一方、そのSEM像を図6に示す。象牙質面に垂直方向に配列されたフルオロアパタイトを象牙質上に観察された。これらの結果から、生体のエナメル質と同様に象牙質上に垂直な結晶配列を持ったフルオロアパタイトを合成できることが確認された。次いで、各々の結晶は溶解性を評価したが、水溶液中で拡散しやすく単独での使用は困難であった。そこで、ガラスアイオノマーセメントに混合し、溶解性、セメントの機械的強度について検討した結果、従来のセメントと同等の強度を示した。

上記の結果をもとにラット歯髄窩洞に CaP/siRNA/Protamine 遺伝子導入剤を適用し、フルオロアパタイト含有セメントで窩洞を封鎖した。全ての群において壊死や壊疽、重篤な感染所見は認められなかった。2週間後の組織学的観察からは、CaP 遺伝子導入剤を適用した群では control 群と比較して、歯髄組織内の炎症性細胞の浸潤が少ないことが観察された。4週後では窩洞に dentin bright の形成が認められた。以上のことから CaP/siRNA(抗 TNF-α)/Protamine 遺伝子導入剤の適用は in vitro, in vivo において炎症を抑制することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Taichi Tenkumo, Juan Ramón Vanegas Sáenz, Keisuke Nakamura, Yoshinaka Shimizu, Viktoriya Sokolova, Matthias Eppler, Yuya Kamano, Hiroshi Egusa, Tsutomu Sugaya, Keiichi Sasaki. Prolonged Release of Bone Morphogenetic Protein-2 In Vivo by Gene Transfection with DNA-Functionalized Calcium Phosphate Nanoparticle-Loaded Collagen Scaffolds. *Materials Science & Engineering C*, 92, 172-183. 2018 Nov 1;92:172-183. doi: 10.1016/j.msec.2018.06.047. 査読有

Vanegas Sáenz JR, Tenkumo T, Kamano Y, Egusa H, Sasaki K. Amiloride-enhanced gene transfection of octa-arginine functionalized calcium phosphate nanoparticles. *PLoS One*.

2017 Nov 16;12(11):e0188347. doi: 10.1371/journal.pone.0188347. eCollection 2017. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Tenkumo T, Saenz JRV, Nakamura K, Shimizu Y, Sokolova V, Epple M, Kamano Y, Egusa H, Sugaya T, Sasaki K. Gene transfection in vivo with bone morphogenetic protein-2 encoding DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticle-loaded collagen scaffolds. International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2018 in Sendai, Japan, Jan. 2018

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高橋正敏

ローマ字氏名：(Takahashi, masatoshi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：50400255

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐々木啓一

ローマ字氏名：(Sasaki, keiichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。