

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21235

研究課題名(和文) ナノバイオガラス・低接着性コラーゲンを応用した高機能遺伝子活性化基質の創成

研究課題名(英文) High functional gene activated matrix with nanobioglass and low adhesive scaffold collagen

研究代表者

三浦 桂一郎 (MIURA, Kei-ichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10634446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、低用量非ウイルス性ベクターを保持した新規バイオマテリアルの開発を目的に、ナノバイオガラスを用いてDNAの細胞貪食能を高めプラスミドDNAの遺伝子導入効率化を図り、担体として用いていたアテロコラーゲンを低接着性コラーゲンに置換し、細胞のスフェロイド形成の誘導作用と骨髄間葉系細胞の骨芽細胞への分化促進作用を強化し、従来のGAMを改良し臨床応用を目指した。プラスミドDNA、ナノバイオガラス、LasColの濃度を調節し、骨形成能が最も高い組み合わせを選定すべくマウス頭蓋冠上への移植実験を行った。結果、アテロコラーゲン群と比較すると、有意差は認めなかったものの、優れた骨形成能を示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop new biomaterials that hold low dose nonviral vectors. We aimed for clinical application by improving conventional GAM with the enhancement of the cellular phagocytosis of DNA by nanobioglass, the improvement of gene transfer efficiency of plasmid DNA, and both induction of cell spheroid formation and enhancement for bone marrow mesenchymal cells to promote differentiation into osteoblasts by the low adhesive scaffold collagen as a scaffold. In order to select the appropriate concentration among plasmid DNA, nanobioglass and LasCol which possess the highest osteogenic potential, transplantation experiments were conducted on the mouse calvaria. As a result, although there was no significant difference when compared with the atelocollagen group, low adhesion collagen showed good osteogenic potential.

研究分野：口腔顎顔面外科学

キーワード：Gene Activated Matrix Bone Regeneration LASCol バイオマテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域における骨再生材料について

現在は骨欠損に対し、自家骨移植が頻用されているが、この代替手法として人工骨 (Hydroxyapatite (HA) や  $\beta$ -Tricalcium Phosphate ( $\beta$ -TCP)) がすでに応用されている (Kokubo T, et al, Biomaterials 24; 2003)。しかし、未だに自家骨移植が gold standard であり、組織再生の鍵となる細胞・成長因子・担体の三要素を兼ね備えた骨再生材料の開発が望まれている。これまで、我々はリン酸カルシウムの1種である Octacalcium Phosphate (OCP) と、担体としてのコラーゲンを複合化した OCP・Collagen 複合体 (OCP/Col) を用いた研究 (K Miura, et al. IJOMS, 2012) (Matsui A, et al. CPCJ, 2014)、 $\beta$ -TCP 搭載 GAM を用いた研究 (M Umebayashi, et al. BioResearch, 2015) で口腔外科領域の骨欠損が効果的に再生し得ることを報告した。

GAM を用い、直接的に骨原性タンパクを使用すると生じる弊害を回避する人工骨補填材に BMP2 や BMP4 といった骨形成性タンパクを組み込むと骨形成が促進することが報告されている (Boyne et al. J Oral Maxillo Surg. 2005)。しかし、高濃度で頭頸部領域に投与すると気道障害のリスクがあり、費用が高額になることに加え長期保存維持が不安定であるなどの問題点が存在する。したがって、われわれは骨形成性タンパクよりも安全にかつ長期間機能する特徴を有する plasmid DNA を、 $\beta$ -TCP 含有アテロコラーゲンに搭載した GAM を用いて、6-7 週齢の F344 ラット (オス) の頭蓋骨上および 9mm の頭蓋冠臨界骨欠損に移植し、優れた骨再生を示した (M Umebayashi, et al. BioResearch, 2015)。

プラスミドベクターを用いた遺伝子導入法は安全性が高い

遺伝子導入効率を向上させるために、培養細胞の添加、ウイルスベクターの使用、および遺伝子導入試薬が併用されている。しかし細胞培養には労力や時間がかかり、ウイルスベクターや試薬は細胞毒性があるため臨床応用が難しい。したがって、我々は安全で効果的な非ウイルス性ベクターであるプラスミドベクターを用いている。プラスミドベクターは導入効率が低いことが知られているが、癌や四肢虚血の Phase I/II トライアルにおいて高濃度プラスミドを使用し安全性に問題がなかった事が知られている (Comerota AJ, et al. J Vasc Surg. 2002) (Makita N, et al. Drug Delivery Syst. 2010)。従ってわれわれはプラスミド量を増加し遺伝子導入効率を高めた (M Umebayashi, et al. BioResearch, 2015)。

$\beta$ -TCP をナノ化して細胞貪食能を高くし、遺伝子導入を効率化する申請者らが報告 (K Miura, et al. Applied Surface Science. 2013) したように、ナノサイエンステクノロジーが発達してきている。リン酸カルシウムをナノ化することにより、細胞貪食が起こりやすくなり遺伝子導入効率が高まる事が知られている (Cao X, et al. Int J Nanomedicine 6;2011)。

超音波を用いた新生骨の非侵襲的評価非侵襲的に骨再生材料による初期の骨形成を評価する方法として超音波を用いる方法を申請者は報告しており、本研究で有用である (K Miura, et al. J Ultrasound Med, in press)。

## 2. 研究の目的

口腔外科領域において、超高齢化社会に伴い、多数歯欠損や悪性腫瘍によって顎骨および歯槽骨を喪失する患者が増加しており、骨再生療法は重要な課題である。現在、新鮮自家骨移植が有効な方法であり、申請者らもその有用性を報告している (K Miura, et al. JOMS, 2015)。しかし外科的侵襲、採取量の限界が

あり、これに置き換わる骨再生材料が必要である。われわれは -TCP 含有アテロコラーゲンに plasmid DNA を搭載した遺伝子活性化基質(Gene Activated Matrix: GAM) を用いた骨再生の有効性を証明し、臨床応用に向けて研究を進めている (M Umabayashi, et al. BioResearch, 2015)。本研究は、これまでのわれわれの研究を発展させるものである。すなわち、本研究の目的は、適切な plasmid 量を決定し、ナノサイエンスを併用して臨床応用可能なマテリアルを開発し、骨欠損を有する国民の QOL に貢献することである。

### 3 . 研究の方法

本研究では、細胞貪食能を高めるために作製したナノ化した -TCP を含む GAM の製法を確立する。そのうえで、In vivo における骨再生能、すなわち骨新生初期(埋入後 10 日、2 週、3 週)では I 型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシンを用いた免疫組織学的表現形質評価、また、超音波を用いた非侵襲的評価を行う(埋入後 2 週)。骨石灰化期(埋入後 4, 8, 12, 24 週)においては、超音波を用いた非侵襲的評価、HE 染色を用いた組織学的評価、オステオカルシンを用いた免疫組織学的評価、 $\mu$ CT を用いた放射線学的評価を行い、骨の成熟度に関して評価する。これらの評価に基き、臨床応用可能なバイオマテリアルの製法を確立していく。

### 4 . 研究成果

本研究は、低用量非ウイルス性ベクターを保持した新規バイオマテリアルの開発を目的に、 ナノバイオグラスを用いて DNA の細胞貪食能を高めプラスミド DNA の遺伝子導入効率化を図り、担体として用いていたアテロコラーゲンを低接着性コラーゲンに置換し、細胞のスフェロイド形成の誘導作用と骨髄間葉系細胞の骨芽細胞への分化促進作用を強化し、従来の GAM を改良し臨床応用を目指した。プラスミド DNA、ナノバイオグラス、

LasCol の濃度を調節し、骨形成能が最も高い組み合わせを選定すべくマウス頭蓋冠上への移植実験を行った。結果、アテロコラーゲン群と比較すると、有意差は認めなかったものの、優れた骨形成能を示した。

### 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 6 件)

[1] M. Umabayashi, S. Ohba, K.-i. Miura, T. Koga, R. Shidou, T. Kawasaki, I. Asahina, Dissectomy for malocclusion with anterior open bite due to posterior disc displacement without reduction, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 査読あり Volume 30, Issue 2, Pages 142-145 (2018).

[2] S. Ohba, H. Ozaki, K.I. Miura, T. Koga, T. Kawasaki, N. Yoshida, I. Asahina, Physiological positioning strategy alters condylar position after mandibular ramus sagittal split osteotomies for mandibular prognathism, Cranio : the journal of craniomandibular practice 査読あり Apr 8:1-8. doi: 10.1080/08869634.2017.1314432. (2017) 1-8.

[3] S. Ohba, H. Kohara, T. Koga, T. Kawasaki, K.-i. Miura, N. Yoshida, I. Asahina, Soft tissue changes after a mandibular osteotomy for symmetric skeletal class III malocclusion, Odontology 査読あり, Volume 105, Issue 3, pp 375-381 (2017) .

[4] T. Sanuki, K. Miura, T. Watanabe, T. Ayuse, Transcutaneous vocal cord ultrasonography after oral and maxillofacial surgery requiring intermaxillary fixation: A technical report, European Journal of

Anaesthesiology (EJA) 査読あり 33(8)  
(2016) 598-599.

[5] S. Ohba, N. Nakao, T. Kawasaki, K.I. Miura, T. Minamizato, Y. Koga, N. Yoshida, I. Asahina, Skeletal stability after sagittal split ramus osteotomy with physiological positioning in patients with skeletal mandibular prognathism and facial asymmetry, The British journal of oral & maxillofacial surgery 査読あり October Volume 54, Issue 8, Pages 920-926 (2016).

[6] T. Koga, T. Minamizato, Y. Kawai, K. Miura, T. I, Y. Nakatani, Y. Sumita, I. Asahina, Bone Regeneration Using Dentin Matrix Depends on the Degree of Demineralization and Particle Size, PloS one 査読あり 11(1) (2016) e0147235.

〔学会発表〕(計0件)

〔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

三浦 桂一郎 (MIURA, Kei-ichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 10634446