

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K17161

研究課題名（和文）DNAジェリーと間葉系幹細胞シート併用による歯周組織再生療法

研究課題名（英文）Periodontal tissue regenerative therapy by DNA Jerry and the mesenchymal stem cell sheet

研究代表者

山本 南奈（Yamamoto, Nana）

福岡歯科大学・口腔歯学部・医員

研究者番号：60736677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：DNAジェリー+骨芽細胞を -MEMと骨芽細胞分化誘導培地（以下OIM）でそれぞれ5日間、10日間培養した際の上清液を馴化培地として作製した。そして、骨芽細胞を -MEM、OIM、作製した馴化培地で培養し、その細胞活性を測定した。馴化培地の方が -MEM、OIMで培養した場合と比較して細胞活性が高かった。DNAジェリーが細胞活性を上昇させていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究ではDNAジェリーを骨欠損部位に移植すると何も入れていない群と比較すると優位に新生骨を認めた。しかしそのメカニズムは不明であった。本研究の研究成果によりDNAジェリーと骨芽細胞を培養しその上清液を馴化培地として作成した培地を用いることで、-MEM、OIMと骨芽細胞を培養するよりも細胞活性が優位に高いことがわかった。

研究成果の概要（英文）：We manufactured it as the conditioned medium which acclimatized a supernatant liquid when it cultured DNA Jerry + osteoblasts in -MEM and an osteoblastic differentiation instruction conditioned medium (following OIM) each for 5days, 10days. And it is cultured osteoblasts in -MEM, OIM, a conditioned medium to acclimatize which we made and measured the cell activity. Cell activity was higher than the case that a conditioned medium to acclimatize cultured in -MEM, OIM. It was suggested that DNA Jerry raised cell activity.

研究分野：歯科再生医療

キーワード：DNAジェリー 間葉系幹細胞 細胞シート 賦形性 馴化培地 骨芽細胞分化誘導培地

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者の増加、および有病者(骨粗鬆症,糖尿病,歯周病など)の急増に伴い、遅発炎症や抗原抗体反応が無く、抗菌性を示す歯科用生体分解能生体材料の開発は急務である。現在、生体分解性生体材料の担体としてコラーゲン、ポリ乳酸など使用されているが分解速度、遅発炎症、抗原抗体反応、BSE および取り扱いなどに問題がある。そこで、DNA がそれらに替わる医療用材料の素材として注目され国内外で研究がなされている。DNA は骨形成に必要なリン酸基を多数有しており、塩基対間に抗生物質などをインターカレーションやグループバインディングさせ、さらに抗原抗体反応を起こし難いなど、生体材料の素材として極めて魅力ある要素を具備している。

しかし、DNA は様々な魅力的な性質を具備しているが、水溶性であるため単独使用すると生体内での拡散速度の問題からその用途は限定されてしまう。そこで、300bp DNA に各種カチオン性高分子材料と反応させて水不溶性にした各種 DNA 複合体を新規骨再生材料として用い、*in vitro*、*in vivo* 実験より評価してきた。特に DNA/プロタミン複合体は水と混和するとペーストになり細胞毒性は軽微で、ラット皮下軟組織への反応もマイルドであった。また、合成する DNA の分子量を変化させることで、複合体の生体分解性を調節できることを報告してきた。ラット頭蓋骨埋入実験においては骨の新生を著しく促進させ、この促進効果は主に DNA によるものと考えられている。DNA/プロタミン複合体はペーストであり操作性や賦形性に優れているが、反面、ペーストであるので細胞が容易に侵入できないという短所もある、つまり、細胞が容易に侵入しやすい気孔径、スペースを有すればさらなる骨の新生が期待できると考える。そこで、超高分子 DNA の物性や機能を活用すれば DNA 単独でも今までにない新規の DNA スキャフォールドの開発が可能であると着想を得た。本研究では、特に DNA に着目し新規スキャフォールド材の開発を目指す。

まず、超高分子 DNA の物性を活用する。つまり、水溶性高分子の単独使用は生体内での拡散が速く難しいが高分子の溶解性は分子量に依存するので水溶性であっても超高分子を用いて溶解や拡散を出来る限り制御すればよいと考える。超高分子であるオリジナル DNA (20,000bp) を水に添加すれば DNA はゼリー状 (DNA ジェリー) になり、それを凍結乾燥すれば細胞が播種でき、かつ拡散を遅延できるポーラスな DNA スキャフォールドが作製できると推察し予備実験を開始した。期待通り、水に DNA を適量添加し混和すると多孔体構造を有するゼリー状になり、優れた骨形成を示した。また、水への溶解速度も 300bpDNA の 1/20 程度であることがわかった。

次に、DNA の機能の活用である。DNA は塩基対やラセン構造の溝に特定物質と特異的な反応をする。例えば、プロタミン(Pro)もその一つであるが、プロタミンは DNA の溝中で $\alpha$ -ヘリカル構造状態を取りながらリン酸基と強く静電的に結合する。この反応は極めて容易である。そして、サイトカイン(Cy)や細胞接着タンパク質(CAP)をクロスリンク剤による Protein-Protein conjugation 法にてプロタミンに結合させる。そして、サイトカインおよび細胞接着タンパク質と結合したプロタミンを多孔体 DNA DNA スキャフォールドに反応させて、各種サイトカイン・細胞接着タンパク質共役型 DNA スキャフォールド材を作成する。作成した DNA スキャフォールド材を *in vitro*(細胞毒性試験、細胞活性試験など)、*in vivo*(ラット頭蓋骨埋入試験など) 試験などから総合的に検討し、骨の新生を促進し易い環境を有する DNA スキャフォールド材の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

超高分子 DNA の特性を生かしたサイトカイン・細胞接着タンパク質共役型 DNA スキャフォールド材を開発することが本研究の目的である。すなわち、DNA 自体に骨形成促進機能があり、超高分子であるので添加量を調整し、水と混和すれば多孔体構造のゼリーになる特徴がある。このゼリー体が流動性を示せばインジェクトが可能となる。また、DNA はラセン構造体の溝にカチオン性プロタミンを特異的に結合させる。そこで、クロスリンカーにてサ

イトカイン(b-FGF など)および細胞接着タンパク質(フィブロネクチンなど)を共有結合させたプロタミンを DNA に静電的に反応させてサイトカインや接着タンパク質を DNA スキャフォールド材にコンジュゲートさせる。そして、添加物の成分(単独組成、混合組成)と新生骨形成能との相関を *in vitro*(細胞毒性試験、細胞活性試験など)、*in vivo*(ラット頭蓋骨埋入試験など)試験などから総合的に検討し、骨形成を促進し易い環境を有し、安全性が高い DNA スキャフォールド材の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

超高分子 DNA の特性を生かしたサイトカイン・細胞接着タンパク質共役型 DNA スキャフォールド材を開発する。その目標を達成するために以下のことを行う。

- ① DNA ジェリーの溶解速度、粘度、気孔率、賦形性より混和比(DNA 量/水の量)の適正化を行う。
- ② 各種の Cy-Pro カップリング剤および CAP-Pro カップリング剤を合成し、紫外線照射により水不溶化にしたガラス板上の DNA 薄膜に各種 DNA カップリング剤を反応反応量を定量分析する。
- ③ ガラス板上のカップリング剤処理済み DNA 薄膜に骨芽細胞を播種し、骨分化誘導培地で培養後、骨形成関連遺伝子の発現量を測定する。
- ④ DNA ジェリーから作成した乾燥 DNA ディスクおよびカップリング剤処理済み DNA ディスクをラット頭蓋骨へ移植し、骨形成能を評価する。

### 4. 研究成果

ラット頭蓋骨に作製した骨欠損部位に DNA ジェリーを単独で填入し、経時的にマイクロ CT にて観察すると骨の新生を確認することが出来た。しかし、サイトカインや細胞接着タンパク質とのコンジュゲートの方法の確立が困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nana MORI-YAMAMOTO, Minoru KAWAGUCHI, Kimiko OHGI, Ayako MATSUMOTO, Ryuji SAKAGAMI	4. 巻 17
2. 論文標題 Preparation and Biodegradation Properties of DNA/poly-lysine Complexes by FE-SEM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11223/jarde.17.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nana YAMAMOTO, Kimiko OHGI, Ayako MATSUMOTO, Ryuji SAKAGAMI, Yasunori YOSHINAGA
2. 発表標題 Development of DNA scaffold
3. 学会等名 58th General Session of the KAP（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------