

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10181

研究課題名(和文)次世代傾斜機能を具備した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 next generation drug delivery system using gene transfection vector

研究代表者

神田 佳明(Kanda, Yoshiaki)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00709123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロタミンでコーティングしたリン酸カルシウムナノ粒子を基材とし、BMP-2とIGF-1をコードした核酸を搭載した非ウイルス性遺伝子導入剤を開発した。プロタミンを付与することで、口腔内の代表的な菌である *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* に濃度依存的に強い殺菌効果を示した。一方、MC3T3E1細胞や生体に適用した場合、BMP-2及びIGF-1がそれぞれ徐放されること、および、搭載するプラスミドDNAの配合率を変えることで、遺伝子導入によって徐放されるタンパク量に違いが生じることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔常在菌が存在する口腔内では、移植する生体材料の細菌感染が大きな問題点となっている。また、これまでの多くの臨床や研究において、細胞賦活因子-担体複合体は担体に細胞賦活因子を含有した溶液を浸漬させることで作成していることから、細胞賦活因子が必要な時期には、移植した細胞賦活因子の活性が低下することが問題視されていた。しかし、本研究で開発した遺伝子導入剤は、歯周病原菌に対する殺菌効果を持ち、複数の細胞賦活因子を長期にわたって徐放させることができるため、上記の問題点を改善できる。さらに本材料は粉状であることから使用範囲も広く、今後の組織再生治療の発展に大きく貢献するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Protamine-coated multi-shell calcium phosphate (CaP) was developed as a non-viral vector for tissue regeneration therapy in this study. The antibacterial effects of CaP nanoparticles against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increased with an increase in the protamine dose. In the combination treatment with BMP-2 and IGF-1, the concentration ratio of BMP-2 and IGF-1 is an important factor affecting bone formation activity. During gene transfection treatment, BMP-2 and IGF-1 were released simultaneously after gene transfer; the loaded dose of the plasmid DNA encoding IGF-1 did not impact the BMP-2 or IGF-1 yield or new bone formation ratio in vitro and in vivo. In conclusion, two growth factor-releasing systems were developed using an antibacterial gene transfer vector, and the relationship between the loaded plasmid DNA dose and resultant growth factor yield was determined in vitro and in vivo.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：遺伝子導入 リン酸カルシウムナノ粒子 組織再生療法 殺菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周組織は、骨、セメント質、歯肉、歯根膜などの複合組織で構成されることから、その修復や再生は、複数の細胞賦活因子が幾何学的、時系列的により複雑に相互作用しあうことで行われる。一方、口腔常在菌が存在する口腔内での歯周外科処置では、移植する生体材料の細菌感染が臨床上の大きな問題点となっている。これまでの多くの臨床や研究において、細胞賦活因子担体複合体は担体に細胞賦活因子を含有した溶液を浸漬させることで作成していることから、細胞賦活因子が必要な時期には、移植した細胞賦活因子の活性が低下することが問題視されていた。一方、申請者らは、これまでにリン酸カルシウムナノ粒子を基材とした非ウィルス性遺伝子導入技術を開発し、担体に侵入してきた細胞を遺伝子導入させることで、長期にわたって任意の成長因子を徐放できることを報告してきた。また、本遺伝子導入剤は、様々なペプチドや蛋白、抗体などを表面に付与することができることも特徴としている。そこで、この技術を応用し、表面に抗菌ペプチドでコーティングし、かつ複数の核酸を搭載した遺伝子導入剤を適用することで、抗菌性を保有した複数の細胞賦活因子を徐放できるドラックデリバリーシステムを構築できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

複数の細胞賦活因子の分泌を誘導し、かつ歯周病原菌に対して抗菌効果を示す遺伝子導入剤を開発することである。

### 3. 研究の方法

#### (1)リン酸カルシウムナノ粒子遺伝子導入ベクターの開発

硝酸カルシウム(18mM、pH9.0)及びリン酸二アンモニウム(10.8mM、pH9.0)を等量混和し、リン酸カルシウムナノ粒子のコアを作成する。その後、作成したコアに対してBMP-2をコードしたプラスミドDNA(pUC-57(BMP-2)とIGF-1をコードしたプラスミドDNA(pUC-57(IGF-1))を異なる配合率で添加後、再び、硝酸カルシウム溶液及びリン酸二アンモニウム溶液を加え、最後にプロタミン(0,5,10もしくは20 mg/ml)を加え、12000rpmで10分間遠心分離後、上澄みを捨てたのち、超純水を加え再度懸濁液とした。BMP-2及びIGF-1プラスミドDNAの配合率によって、それぞれの群をCaP(B:I=1:1)、CaP(B:I=1:2)及びCaP(B:I=1:4)と命名した。遺伝子導入試験、細胞毒性試験、および殺菌試験時には、上記プラスミドDNAの代わりにEGFPをコードしたプラスミドDNA(pUC-57(EGFP))を使用し、配合したプロタミンの濃度によって、それぞれCaP/Protamine-0、CaP/Protamine-5、CaP/Protamine-10及びCaP/Protamine-20とした。

#### (2)遺伝子導入効率試験と細胞毒性試験

MC3T3E1細胞(RIKENより購入)は10%FBS、100U/mLペニシリン-100U/mLストレプトマイシン含有Mediumを用いて5%CO<sub>2</sub>、37℃環境下であらかじめ培養した。24wellplateに $2 \times 10^4$ となるように細胞を播種し、24時間後、新鮮な培養液(450 $\mu$ l)に交換後、各種CaP(CaP/Protamine-0、CaP/Protamine-5、CaP/Protamine-10及びCaP/Protamine-20)を50 $\mu$ l添加した。その後は培養液を交換せず、24時間後、蛍光顕微鏡下(BZ-9000、Keyence)を用いて遺伝子導入効率を計測した。また、細胞毒性は、同様にCaPを添加3日後及び7日後に、MTT(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma)試験を行い評価した。コントロール群としてlipofectamine2000(Thermo Fisher Scientific)を使用した。

#### (3)遺伝子導入による細胞賦活因子の徐放量計測(ELISA)

MC3T3E1細胞(RIKENより購入)は10%FBS、100U/mLペニシリン-100U/mLストレプトマイシン含有Mediumを用いて5%CO<sub>2</sub>、37℃環境下であらかじめ培養した。96wellplateに $5 \times 10^3$ となるように細胞を播種し、24時間後、新鮮な培養液(90 $\mu$ l)に交換後(各種CaP CaP(B:I=1:1)、CaP(B:I=1:2)及びCaP(B:I=1:4)を10 $\mu$ l添加した。その後は培養液を交換せず、78時間後、上澄み溶液を回収した。BMP-2 ELISA Development Kit(Promokine)及びMurine IGF-1 Standard ABTS ELISA Development Kit(Peprotech)を用いて上澄み溶液中に徐放されたBMP-2及びIGF-1の量を吸光高度計(Spectra MAX 190; Molecular Devices)を使用し、計測した。

#### (4)殺菌試験

細菌はStaphylococcus aureus JCM 2413(以下、S. aureus)、Streptococcus mutans JCM5705(以下 S.mutans)、Aggregatibacter actinomycetemcomitans JCM2434(以下 A. actinomycetemcomitans)、and Porphyromonas gingivalis JCM12257(以下 P. gingivalis)(RIKEN BioResourceCenter)を使用した。S. aureus、S.mutansはBHI培地、A. actinomycetemcomitansはBHI-YE培地で37℃で24時間培養、P. gingivalisは血液寒天培地で37℃で48時間培養したものを使用した。細菌量をcolour wave colorimeterを用いて1.0に調

整後、20  $\mu$ L の細菌培養液に 20  $\mu$ L の各種 CaP 懸濁液 (CaP/Protamine-0、CaP/Protamine-5、CaP/Protamine-10 及び CaP/Protamine-20) 及び 100  $\mu$ L PBS を混和し、嫌気性、37 環境下で 20 時間培養した。その後、反応液を寒天培地に播種、*S. aureus* は 1 日間、*S. mutans* 及び *A. actinomycetemcomitans* は 2 日間、*P. gingivalis* は 7 日間、嫌気性、37 環境下で培養後、細菌コロニー数をカウントした。

#### (5)動物実験

すべての動物実験は国立大学法人東北大学実験動物の管理と使用に関する指針に従い、動物実験専門委員会の許可を得て行った。動物実験を行う前に(1)で作成した CaP 懸濁液をコラーゲン scaffold に含浸させた。全身麻酔下で Wister 系ラットの頭蓋骨に直径 5 mm も骨欠損モデルを作成し、あらかじめ準備したコラーゲン scaffold を移植し、縫合した。28 日後、 $\mu$ CT を撮影し、骨形成量及び骨密度を計測した。その後、BMP-2 ELISA Development Kit (Promokine) 及び rat IGF-1 ELISA kit (Abcam) を用いて scaffold 内に徐放された BMP-2 及び IGF-1 の量を計測した。

#### 4. 研究成果

遺伝子導入効率は、プロタミンの添加量が多くなるにつれて高なり、市販薬である lipofectamine と同程度の遺伝子導入効率であった。しかし、プロタミンが 10mg/mL を超えると有意差はなかった。一方、細胞親和性は濃度依存的に低くなる傾向がみられた。(図 1)

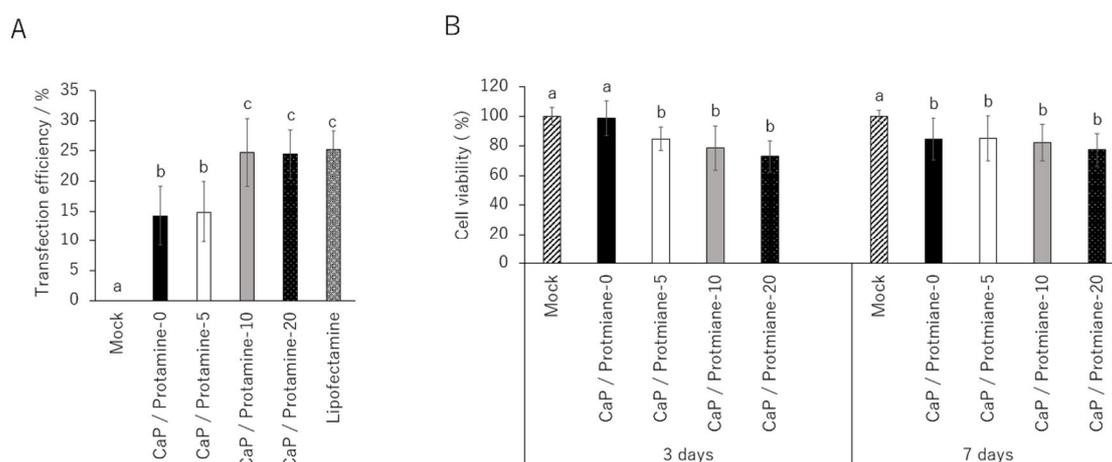


図 1 (Xiang et al, Acta Biomater. 2021 より抜粋。A: 遺伝子導入効率、B: 細胞親和性)

一方、殺菌作用はプロタミン濃度依存的に向上するが、その効果は細菌種によって異なっていた。(図 2)

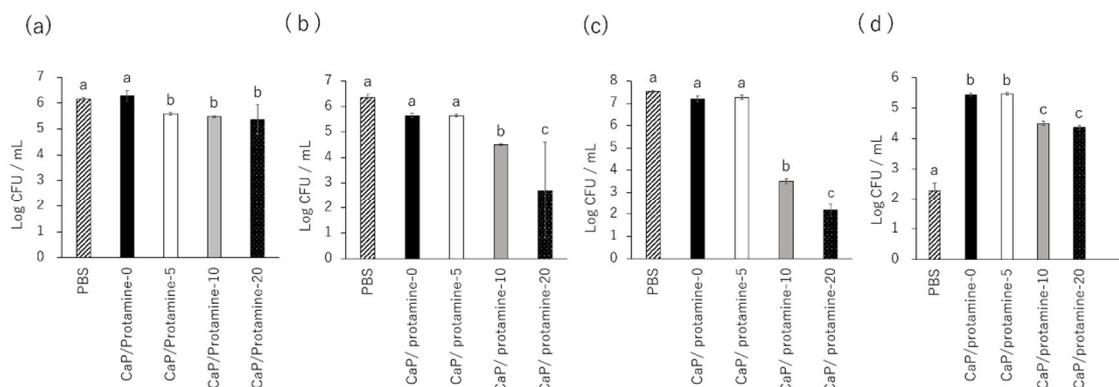


図 2 (Xiang et al, Acta Biomater. 2021 より抜粋。殺菌試験結果 (a) *S. aureus*, (b) *A. actinomycetemcomitans*, (c) *S. mutans*, (d) *P. gingivalis*.)

この結果を基に、プロタミンの添加量を 10mg/mL と規定し、搭載するプラスミド DNA 量の異なるリン酸カルシウムナノ粒子を作成した。遺伝子導入効率を ELISA 試験にて評価したところ、in vitro (図 3) 及び in vivo (図 4) BMP-2 及び IGF-1 を同時に放出することを確認した。しかし、搭載するプラスミド DNA の含有量を変えても徐放される BMP-2 及び IGF-1 の量に有意差は認められなかった。このことから細胞への遺伝子導入技術による細胞賦活因子の徐放量には上限があることが示唆された。またリン酸カルシウムナノ粒子移植後の骨欠損部での BMP-2 及び IGF-1 の両方を徐放することによって scaffold 単独群と比べて骨形成量及び骨密度は有意に高くなったが、BMP-2 単独及び IGF1 単独と比べた場合、有意差は認められなかった(図 5)。

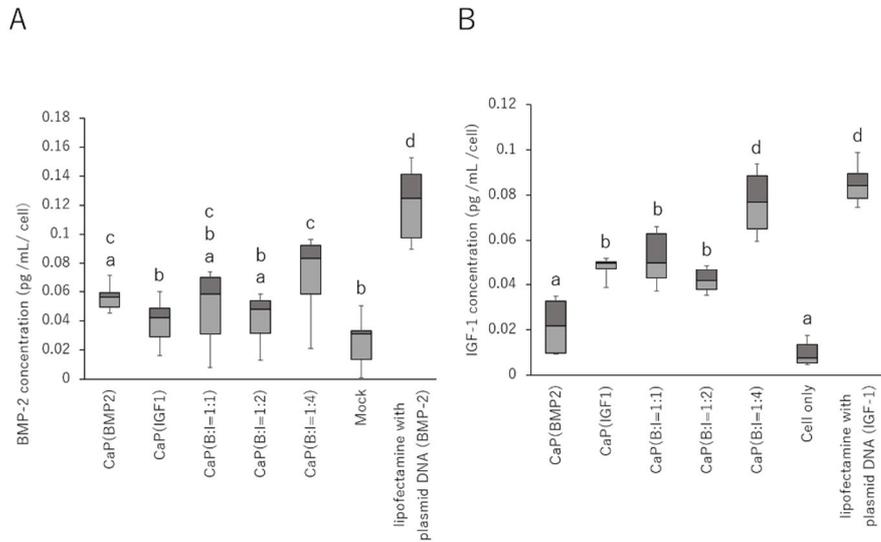


図 3: (Xiang et al, Acta Biomater. 2021 より抜粋。MC3T3E1 細胞における各種 CaP 適用 1 日後の(A) BMP-2 及び (B) IGF-1 の徐放量)

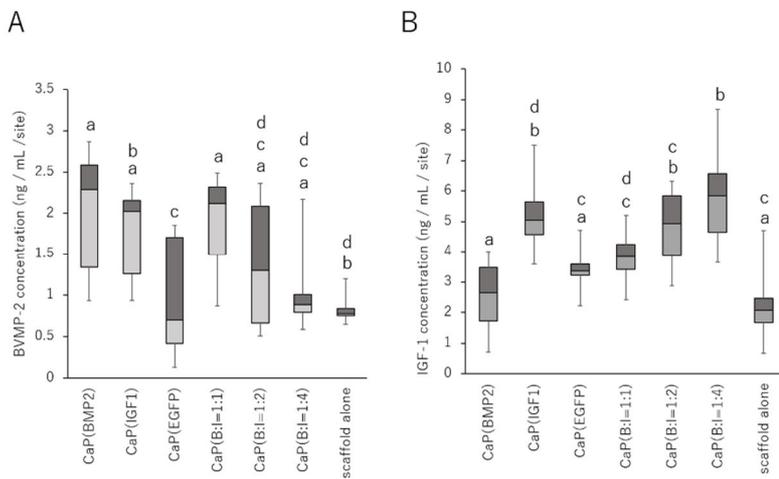


図 4: (Xiang et al, 2021 より抜粋。ラット頭蓋骨骨欠損に移植 28 日後の (A) BMP2 及び (B) IGF-1 の徐放量)

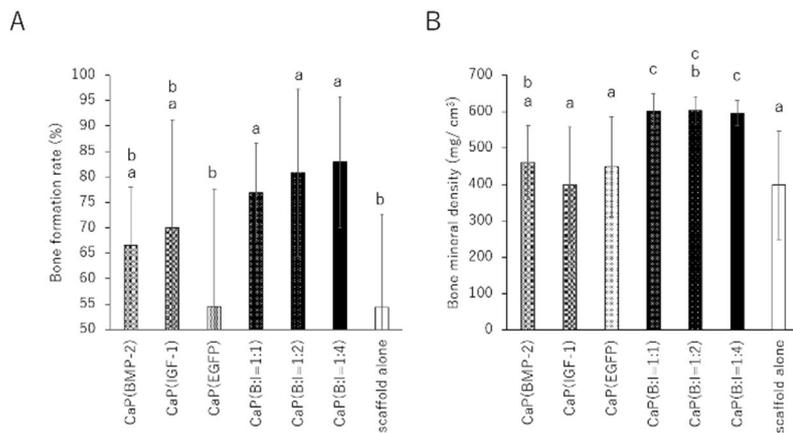


図 5: (Xiang et al, Acta Biomater. 2021 より抜粋。ラット頭蓋骨骨欠損に移植 28 日後の (A) 骨形成量及び(B) 骨密度)

本研究の結果、BMP-2 及び IGF-1 の 2 つのプラスミド DNA を搭載した遺伝子導入剤を細胞もしくは生体に適用した場合、BMP-2 及び IGF-1 がそれぞれ徐放されること、および、搭載するプラスミド DNA の配合率を変えることで、遺伝子導入によって徐放されるタンパク量に違いが生じることを明らかにした。また、プロタミンを付与することでリン酸カルシウム

遺伝子導入ナノ粒子に抗菌性を具備させることができることが示された。本リン酸カルシウムナノ粒子遺伝子導入剤は粉状として利用できることから、これまで歯周組織再生療法で感染が報告された GTR 膜や移植する骨補填材に応用することで、同材料に抗菌性を具備させることができると思われる。さらに、本研究では、骨形成量や骨密度の有意な差は見られなかったが、BMP-9 等より強い硬組織誘導能を持つ細胞賦活因子のプラスミド DNA を搭載することで、既存の生体材料に抗菌性に加えて硬組織誘導作用など新たな効果を付与することが期待できる。歯周組織など複合組織の再生においては、複数の細胞賦活因子の導入が必要不可欠となると考えられることから、複数の細胞賦活剤を徐放させることのできる本遺伝子導入技術は、今後の組織再生治療の発展に大きく貢献するものと思われる。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Xiang C, Tenkumo T, Ogawa T, Kanda Y, Nakamura K, Shirato M, Sokolova V, Epple M, Kamano Y, Egusa H, Sasaki K.	4. 巻 119
2. 論文標題 Gene transfection achieved by utilizing antibacterial calcium phosphate nanoparticles for enhanced regenerative therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 375-389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2020.11.003.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	佐々木 啓一 (Sasaki keiichi) (30178644)	東北大学・歯学研究科・教授  (11301)	
研究分担者	天雲 太一 (Tenkumo Taichi) (80451425)	東北大学・大学病院・講師  (11301)	
研究分担者	小川 徹 (Ogawa Toru) (50372321)	東北大学・歯学研究科・准教授  (11301)	
研究分担者	宮下 牧子 (Miyashita Makiko) (40814405)	東北大学・大学病院・医員  (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	伊藤 彩  (Ito Aya)  (90778771)	東北大学・大学病院・特任助手    (11301)	

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		
ドイツ	University of Duisburg-Essen		