

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19167

研究課題名（和文）骨形成不全症患者の骨折治癒促進を目的とした高機能骨誘導性基質の開発

研究課題名（英文）Development of gene-activated bone matrix for intractable fractures

研究代表者

野田 さわこ（Noda, Sawako）

長崎大学・病院（歯学系）・助教

研究者番号：00713900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、遺伝子・核酸を搭載した自己組織化ナノベクターを応用することで、骨誘導性を発揮する遺伝子活性化人工骨基質を開発し、難治性骨折などの治療に応用することで、治癒不全や骨変形などを軽減させる新規治療用材料を創出することにある。これまでに、BMP4やCol1遺伝子などを搭載した自己組織化ナノベクターを数種の人工骨基質に組み込んだGAMによる有効性評価を骨折モデルなどで実施し、一定の有効性に関する知見が得られているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

局所に応用する骨誘導デバイスの新規技術開発の成果を、難治性骨折を対象とした治療に発展的に応用する試みは、われわれの研究グループ独自の知見と技術を発展させた従来にはない独創的な課題であると考えている。そのため、骨折局所でその機能を効果的に発揮させる技術が開発されれば、最近試みられている細胞移植による再生治療とは異なり、安定供給の見込める汎用性の高い新規医療材料を創出できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Therapeutic method for in vivo gene delivery has not been established on bone engineering though its potential usefulness has been suggested. The aim of this study is to investigate the efficacy of gene-activated matrix (GAM) harboring self-assembly nano device (nanoball vector) for intractable fractures. As results, when GAMs composed of nanoball vectors containing plasmid (p) DNAs encoding bone morphogenetic protein 4 (pBMP4) or collagen type (pCol) were transplanted to rat fractures of femur and cranial bone defects, those GAMs showed the potential ability to treat intractable fractures. We are currently carrying out the additional experiments for clarifying the usefulness of GAM composed with nanoball vector containing other genes and artificial bone materials for the treatment of intractable fractures.

研究分野：再生医療

キーワード：難治性骨折 人工骨基質 遺伝子 生体デリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性骨折が問題となる疾患の一つに骨形成不全症がある。指定難病である骨形成不全症 (osteogenesis imperfecta; OI) は、全身の骨脆弱性による易骨折性や進行性の骨変形に加え、様々な程度の結合組織症状を示す先天性疾患として知られている。70%以上の症例では、結合組織の主要な成分である型コラーゲンの遺伝子変異 (coll1a1, coll1a2) により、質的あるいは量的異常が原因で発症するとされているが、I型コラーゲン遺伝子に異常を認めない症例も存在する。OIの発症頻度は2-3万人に1人とされているが、先天異常のため根治療法は存在せず、対症療法に頼らざるを得ない。治療法としては、四肢の骨変形に対して骨切術や変形予防のための髄内釘挿入などが行われているが、骨切後の治癒が非常に遅く新たな骨折を繰り返す、処置後に偽関節を形成するといった問題により、対症療法も十分に機能していないのが現状である。そのため、多くの患者が、生涯にわたり車椅子での生活を余儀なくされている。

近年、plasmid DNA (pDNA) や small interfering RNA (siRNA) に代表される核酸医薬に大きな期待が寄せられているものの、標的とする生体細胞の細胞質や核へ核酸を安全、効率的に送達する手法は確立されていない。その一手段として、非ウイルスベクターの送達デバイスに、polyethylenimine (PEI) といったカチオン性高分子などの応用が盛んに研究されている。これらは、アニオン性の遺伝子に対し、表面がカチオン性に帯電したナノサイズの微粒子を形成する。このようなカチオン性微粒子はアニオン性に帯電した細胞膜と静電的に強く結合し、高い遺伝子送達効果を示す。しかしながら、カチオン性デバイスは、その表面電位に比例して細胞障害性や生体成分との凝集が増大するため、医薬品としての応用が非常に困難である。そこで、長崎大学では、 γ -polyglutamic acid (γ -PGA) といったある種の生体適合性のアニオン性高分子を用いて、カチオン性微粒子の表面を静電的に被膜することによって、核酸を安全かつ効果的に生体内の細胞へ送達する画期的な新規自己組織化ナノデバイス“Nanoball ベクター”を開発した (Kodama et al, 2013 *etc.*)。Nanoball はアニオン性を示し、細胞膜と静電的に反発するにも関わらず、高い細胞内取り込みを示すばかりか、構成する高分子の種類を変えることで肝臓や肺といった臓器への指向性を付与することができる。さらに、生体分解型の新規カチオン性高分子である dendrigraft poly-L-lysine (DGL) にて pDNA-DGL- γ -PGA 複合体を構築すると、生体内でのマクロファージに高い遺伝子取り込みが確認される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子搭載自己組織化ナノデバイス (Nanoball ベクター) を応用することで、強い骨誘導性を発揮する遺伝子活性化人工骨基質 (Gene Activated Matrix ; GAM) を開発することにある。そして、この高機能骨誘導性 GAM を難治性骨折の治療に応用することで、骨折の治癒不全や遷延、あるいはそれによる骨変形などの症状を軽減させ、患者 QOL の飛躍的な向上を目指す。Nanoball は、核酸キャリアとしての高分子ナノ材料にアニオン性高分子を配した新しい生体適合型デバイスであり、従来のカチオン性デバイスと比較して、低毒性・高効率に生体内の細胞へ遺伝子を送達できる。そのため、本研究では *in vivo* での導入を高効率に成し得る Nanoball の機能を、骨折局所で発揮させる技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) 骨折局所の細胞への遺伝子送達を高効率に達成する Nanoball の作製条件を明らかにする：

Nanoball はアニオン性を示し、細胞膜と電氣的に反発するにも関わらず、高い細胞内取り込みを示す(アニオン性高分子の特異的受容体を介した細胞接着と、カベオラ介在性のエンドサイトーシスによると考えられる)ばかりか、構成する高分子の種類や配合比を変えることで肝臓や肺などの臓器や特定の細胞への指向性を付与することができる。本研究では、カチオン性材料として既に Nanoball での有用性が示されている PEI、及び DGL を評価に用い、アニオン性材料として同様に γ PGA を用いた。これらのカチオン性とアニオン性の材料を N/P 比 8 以上の様々な割合で構成した Nanoball (pAcGFP-BMP4 コード型) について、まず健常マウス由来の培養骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) とマクロファージへの遺伝子導入後の機能解析と細胞毒性の評価を *in vitro* にて行った。その上で、候補材料から成る Nanoball を人工骨基質 (atelocollagen + TCP 微粒子や OCP/コラーゲン、HA/コラーゲン基質など) に播種後、凍結乾燥をして作製した GAM の移植実験を実施した。移植は、健常マウスの頭蓋骨欠損モデルと大腿骨の骨折モデルで評価した後、OI モデルマウスで同様の実験を行った。

(2) 骨折局所での骨誘導に大きく寄与する遺伝子を明らかにする：

骨形成不全症では、 α 1(I) 型コラーゲンの質的異常による機能性骨芽細胞の不足を補うために Col1a1 遺伝子を候補とし (Zeng et al, 2018)、 α 2(I) 型コラーゲンの量的異常を補うために骨芽細胞分化を強く誘導する BMP2/4 や BMP9 遺伝子、破骨細胞の成熟を抑制する Osteoprotegerin (OPG) 遺伝子などを候補と考えた。さらに、骨芽細胞分化に関わる複数の遺伝子を制御し得る miRNA も検討した。例えば、miRNA20a は MSC において骨芽細胞分化の複数の経路を制御することで、分化を促進するばかりか、マクロファージの貪食作用や血管新生の制御にも関わることが報告されている (Zhang et al, 2011)。また、OI 由来 MSC は脂肪細胞への分化が優位であることが報告されている (Gioia et al, 2012) が、miRNA20a はその転写因子である PPAR γ の発現を抑制する。一方で、移植された GAM に集積するマクロファージや血管内皮細胞からの BMP4 や OPG など分泌蛋白の異所性発現によるパラクライン的な骨誘導が期待できる遺伝子を検討した。実験は、1) で作製した新規 Nanoball に候補遺伝子を搭載し、移植実験にて評価した。移植実験は、目標 1 の項と同様に健常と OI モデルマウスの両方を使用して実施する予定とした。

4. 研究成果

初年度は、まず Nanoball ベクターの作製条件の検討から実験を開始した。Nanoball は構成する高分子の種類や配合比を変えることで肝臓や肺などの臓器や特定の細胞への指向性を付与することができる。そこで、まずは脾臓などへの有用性が分かっているカチオン性材料とアニオン性材料の組み合わせ以外に、骨表面に吸着する化合物を 2 種類抽出し、それらで構成される Nanoball を作製することで、骨組織への指向性のある Nanoball 作製を試みた。さらに、野生型マウスの骨再生と大腿骨骨折モデルの作出を開始し、それらのモデルへの GAM の移植を試みることによる新規 GAM の検討を開始した。

次年度は前年度に引き続き、骨指向性のある Nanoball ベクター作製の条件検討およびその生体内での機能評価を実施した。Nanoball ベクターの作製条件については、マクロファージ指向性を有するカチオン性材料 DGL が骨障害局所に集積するマクロファージや MSC、繊維芽細胞にも指向性を有することが確認できた。そのため、そのカチオン性材料からなる自己組織化ベクター、

もしくはその自己組織化ベクターをコアとしたアニオン性のNanoballを作製し、生体内での機能評価を試みた。評価方法は、通常の骨再生モデルのほか、骨折モデルをラットに作製し、骨折部へNanoballを搭載したGAMの移植を試みた。その結果、骨折の治癒促進に一定の有効性が得られた。骨折治癒への有効性が得られたため、その有効性の増強を図るべく、さらに遺伝子や人工骨基質の組み合わせを検討することとした。

最終年度は、Nanoballベクターを構成するカチオン性高分子とアニオン性高分子の材料を最適化し、BMP4やCol1遺伝子などを搭載したNanoballを組み込んだGAMの評価を包括的に行った。GAMの人工骨基質材料についても、アテロコラーゲンやTCP顆粒、TCP微粒子、OCP/コラーゲン基質(OCP/Col)、HAコラーゲン基質(リフィット)などを応用し、GAMの作製条件の最適化を図った。移植には、難治性骨折モデルと頭蓋骨欠損モデルを応用し評価を行った。このうち、有効性の高いと考えられる条件を抽出できたので、現在骨形成不全症(OI)モデルマウスへの移植実験の準備を進めているところである。OIモデルの骨折治癒に一定の知見が得られた段階で論文としてデータを纏める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ohba Seigo, Sumita Yoshinori, Nakatani Yuya, Noda Sawako, Asahina Izumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Alveolar bone preservation by a hydroxyapatite/collagen composite material after tooth extraction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 2413 ~ 2419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-018-2705-6	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 -
1. 著者名 Umebayashi Mayumi, Ohba Seigo, Kurogi Tadafumi, Noda Sawako, Asahina Izumi	4. 巻 46
2. 論文標題 Full Regeneration of Maxillary Alveolar Bone Using Autogenous Partially Demineralized Dentin Matrix and Particulate Cancellous Bone and Marrow for Implant-Supported Full Arch Rehabilitation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Implantology	6. 最初と最後の頁 122 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1563/aaid-joi-D-19-00315	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 -
1. 著者名 Ohba Seigo, Sato Mika, Noda Sawako, Yamamoto Hideyuki, Egahira Kazuhiro, Asahina Izumi	4. 巻 31
2. 論文標題 Assessment of safety and efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for peri-implant disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 101936 ~ 101936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pdpdt.2020.101936	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 -
1. 著者名 Miura Kei ichiro, Sasaki Miho, Ohba Seigo, Noda Sawako, Sumi Misa, Kamakura Shinji, Takahashi Tetsu, Asahina Izumi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Long term clinical and radiographic evaluation after maxillary sinus floor augmentation with octacalcium phosphate / collagen composite: A retrospective case series study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.3301	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
--	---------------------------	-----------------------	----

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