

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06255・19K21349

研究課題名(和文) miRNAを搭載した細胞指向性ナノサイズベクターによる新規人工骨の開発

研究課題名(英文) Development of novel artificial bone materials with cell-directed nano-sized vector encoding miRNA

研究代表者

四道 玲奈 (SHIDO, Rena)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・研究協力員

研究者番号：80827618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、機能性micro(mi)RNA搭載自己組織化ナノデバイス(Nanoball)および、ナノサイズ化人工骨材料を応用することで、局所で強い骨誘導能を発揮する新規遺伝子活性化基質(gene-activated matrix :GAM)の開発を目指した。機能性miRNAを搭載したplasmid(p)DNAをGAMに応用することで、優れた骨誘導能を発揮できた。さらに、人工骨材料をナノサイズ化することで、骨形成能促進効果が一部確認できた。一方で、Nanoballを高濃度で使用すると凝集することにより、生体内で炎症反応などの有害作用があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、これまで生体に対する安全性の高いpDNAによる骨誘導型GAMの開発に従事してきた。現在、生体内での遺伝子導入は、レンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスといったウイルスベクターが盛んに研究されているが、大量投与による過剰免疫反応による死亡事故などが報告されており安全性に欠ける。一方で、非ウイルスベクターであるNanoballは安全性が高く、また高い遺伝子導入効果が認められている。Nanoballを応用することで、安全で高機能な骨誘導型GAMの開発ができると考えられ、臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed for develop new gene-activated matrix induced considerable osteogenesis locally through an application of self-assembled nanodevice with micro(mi) RNA and nano-sized artificial bone materials. By applying the plasmid(p) DNA loaded with functional miRNA to GAM, we were able to demonstrate superior osteoinductive ability. Furthermore, it was confirmed that the artificial bone material was nanosized to partially promote the bone formation ability. On the other hand, it was found that when Nanoball is used at a high concentration, it has a harmful effect due to an inflammatory reaction or the like in vivo due to aggregation.

研究分野：外科系歯学

キーワード：GAM miRNA Nanoball

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域の骨再生の現状

顎骨・歯槽骨の再生治療は、現在でも新鮮直骨移植が gold standard であるが、自家骨採取は侵襲が大きく、採取量に限界がある。これらに変わる方法として、申請者らは人工骨基質に成長因子の添加や間葉系幹細胞(MSC)の応用を進めてきた。しかし、例えば BMP は移植後の副作用発現、幹細胞の応用には個人差や培養の不安定さといった課題があり、臨床上、自家骨移植以上に有効な骨再生療法は確立されていない。

plasmid DNA による遺伝子活性化基質

申請者らは、蛋白と比較し生体に対して安定性の高い plasmid DNA(pDNA)を搭載した骨誘導型遺伝子活性化基質 (gene-activated matrix :GAM)の開発に従事してきた。人体への為害作用が予想される遺伝子導入試薬やウイルスベクターを使用せず、siRNA 等のデリバリーに有効な atelocollagen 基質に BMP4 をコードする pDNA による GAM を作製し、ラット頭蓋骨に移植したところ、0.5~1mg の pDNA 量で一定の骨誘導効果が確認できた(Umebayashi et al,2015)。しかしながら、導入試薬応用時の pDNA 量 (0.02~0.1mg)と比較すると依然として高容量であるため、生体に応用が容易な遺伝子送達技術を開発し、少量の DNA による高機能 GAM を想像する必要がある。

機能性 micro RNA の応用

miRNA は、生体内で複数の遺伝子発現を同時に制御することで、細胞増殖や分化、アポトーシスなど多彩な生体活動に重要な働きを持つことが知られており、核酸医薬品として注目されている。申請者らは、MSC において骨芽細胞分化の複数の経路を制御し、さらにマクロファージの貪食機能や血管新生の制御にも関与する miR20a に着目し、その pmiRNA を直接 GAM に応用したところ、0.5mg 程度の pmiRNA で 1mg の pBMP4 による GAM と同程度の新生骨形成を認めた。

Nanoball ベクターの応用

核酸キャリアとして、最外殻をアニオン性高分子で被膜化した新しい生体適合性の自己組織化ナノデバイス Nanoball(Kodama et al, 2013 etc)に着目した。Nanoball は、カチオン性デバイスと比較して低細胞毒性であり、生体内の細胞へ遺伝子導入効率は同等以上である。この Nanoball に pBMP4 を搭載した GAM の機能を評価したところ、従来の 1/10 程度(0.05mg)の pBMP4 で十分な新生骨形成が見られた。

ナノサイズ化粒子の応用

近年ナノサイズ化したカチオン性ポリマーや β -TCP などの有効性が示唆されている。このうち、リン酸カルシウム系の無機材料は pDNA と静電的に結合するため、ナノサイズ化された粒子は、細胞膜上の Ca^{2+} チャンネルを通じたエンドサイトーシスによる DNA の細胞内取り込みを起こしやすい(Bisht et al, 2005)。さらに、 β -TCP ナノサイズ顆粒はマクロファージに投与すると、直径が $10\mu m$ 以上の顆粒と比較して、炎症性サイトカインの産生が抑制される。

以上を集約し、高機能骨誘導型 GAM が開発出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機能性 micro(mi)RNA 搭載自己組織化ナノデバイス(Nanoball)およびナノサイズ化人工骨材料を応用することで、局所で強い骨誘導性を発揮する新規遺伝子活性化基質 (gene-activated matrix: GAM)を開発することにある。

3. 研究の方法

(1) pmiR20a を搭載した Nanoball を組み込んだ GAM の骨誘導性を検討し、このストラテジーの有用性について検討する。pmiR20a を直接組み込んだ GAM 及び pBMP4 を搭載した Nanoball を組み込んだ GAM について、申請者らがこれまでに有用性を検討してきており、これらの結果を比較することで、Nanoball ベクターと miRNA の応用が pDNA の少量化にどの程度寄与するか評価した。

(2) Nanoball を応用した際の GAM 周囲の細胞への影響を検討した。Nanoball について、骨髄 MSC とマクロファージ、線維芽細胞への遺伝子導入効率と細胞毒性の評価を行い、Nanoball による為害作用の有無を調べた。その後、移植実験を行い、最も為害作用が少なく、効果が認められる Nanoball 量について検討した。

(3) GAM 基質に β -TCP のナノサイズ粒子を応用することの有用性について評価する。基質の基本形は、賦形成を与える意味もあり β -TCP 顆粒(150-500 μm)と 2% Atelocollagen を混和の上、

凍結乾燥したものをを用いている。これと比較し、ナノサイズ粒子(250-1000 μm , ArrowBone-)を配合し、それに Nanoball を組み込んで凍結乾燥し GAM を作製した。これを移植し骨形性能を評価した。

4 . 研究成果

骨再生局所での Nanoball の適用を企図し、GAM 移植部に集積する骨髄由来の MSC およびマクロファージ、血管内皮細胞を遺伝子送達のターゲットとし、作製した Nanoball の取り込み効率を評価した。さらに遺伝子導入後の細胞分化能について評価したところ、従来の plasmid DNA を導入した場合と同様の傾向を示した。これまで、申請者らは pBMP4 搭載 GAM の骨誘導能を確立していたため、まず pBMP4 搭載 Nanoball による GAM の移植実験を行ったが、Nanoball は高濃度で使用すると凝集により生体内で炎症反応などの為害作用があることが分かった。為害作用が少なく効果的な骨形成能を誘導する Nanoball 量を検索したが、500 μg の pDNA を直接搭載した GAM の骨形性能には及ばなかった。pmiR20a の骨芽細胞における骨形成促進効果に加え、マクロファージにおいて炎症抑制効果が示唆されており、pmiR20a 搭載 Nanoball による GAM では、Nanoball による炎症反応を抑制し、高容量の Nanoball が GAM に搭載できるのではないかと検討している。また、近年ナノサイズ化粒子が DNA の取り込みを促進すると示唆されており、これを GAM に応用し骨形成能を比較した。従来の GAM 基質に -TCP のナノサイズ粒子を配合し移植したところ、コントロールと比較し、明らかな有意差が認められないものの骨形性能の促進が認められた。これらのメカニズムについて現在検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----