

機関番号： 12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792059

研究課題名 (和文) siRNA による遺伝子ノックダウン技術を用いた骨再生システムの開発

研究課題名 (英文) Development of bone regeneration system with siRNA-mediated gene knock-down

研究代表者

長濱 浩平 (NAGAHAMA KOUHEI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60401368

研究成果の概要 (和文)：

本研究では骨形成性シグナル経路として、BMP、ヘッジホッグ、Wnt、Runx2 に着目し、各経路に抑制的にはたらくシグナル分子 (骨分化抑制シグナル) を siRNA を用いた遺伝子ノックダウン技術により抑制することで、骨再生を誘導することを目指した。骨分化抑制因子 11 種に対して、それぞれ siRNA を作製し、ノックダウン効果を確認した。これらの siRNA のうち、骨分化を誘導した組合せについては、現在動物モデルによる確認を進めている。

研究成果の概要 (英文)：

This study aimed to induce bone regeneration by inhibiting signaling factors that worked as inhibitors in osteogenic signaling pathway, focusing on BMP, hedgehog, Wnt, and Runx2 signaling pathways. We generated 11 siRNAs for those factors and confirmed that each siRNA knocked down target genes. Among them, the combination of siRNAs that shows promising effects on osteogenic differentiation is being examined in animal bone defect model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正小児系歯学

キーワード：歯科矯正、siRNA

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂患者の治療で重要なポイントのひとつは、顎裂部の閉鎖とその後に行われる歯科矯正治療による咬合の緊密化である。現状では、まず顎裂部の閉鎖を図るために自家腸骨移植を施し、次いで、その移植部に永久歯の萌出誘導や矯正力による歯の移動を行うという流れで治療が行われている。しかしながら優れた治療法である自家腸骨移植には、外科的侵襲、移植骨量の限界、移植骨

の吸収などいくつかの欠点があり、特に大きな顎裂では移植骨が生着不良であるケースが多く、歯の移動を含めた咬合再建の難題となっている。そのため、安全で機能的な十分量の骨を供給するシステムが渴望され、近年では組織工学的手法を用いた顎裂部骨移植の報告が散見されるようになって来た。とは言えそれらの報告を評価すると、安全性・確実性の面で多くの不安を残している。その原因のひとつとして、「生体内で骨形成を可能

にするシグナルの解析が不十分なまま臨床応用が行われている」ことが挙げられる。

近年の骨再生医学では、再生医療に重要な要素である「細胞源・足場・シグナル」(*Science* 260:920-926, 1993) という三つの要素の中で、シグナル研究が十分に解析されないまま、成体幹細胞や胚性幹細胞 (ES 細胞) 等の幹細胞を細胞源とし、生分解性の足場材料と組み合わせて骨欠損部へ移植する幹細胞移植の報告が多くなされている (*Cell Prolif* 37:97-110, 2004; *Clin Orthop Relat Res* 395:11-22, 2002)。

しかしながら臨床応用を考慮した場合、必要な幹細胞の量と質の問題、安全性 (他家細胞の使用・奇形腫の発生) の問題および金銭的、時間的なコストの問題等、解決すべき問題があまりにも多い。そこで、特に分化シグナルに重点をおき、組織再生に最適なシグナルを効率よく標的細胞に到達させることが、新たな再生医療戦略の要になると考えられた。

骨形成シグナル研究に関しては、基礎研究の分野において骨形成を促進するシグナル経路だけでなく抑制シグナルも数多く報告されており複雑な骨制御機構が徐々に明らかとなってきた (*Nature* 423:332-355, 2003)。また、Runx2 と BMP シグナルの組み合わせが、骨芽細胞への分化決定に対する十分条件であることも報告されている (*FASEB J.* 21, 1-21, 2007)。しかし、上記の活性化シグナルのみでは組織再生能は不十分であり、さらに遺伝子導入法を用いるため、導入効率および生体への安全性の問題が存在し、臨床への応用が難しいという問題が残っている。

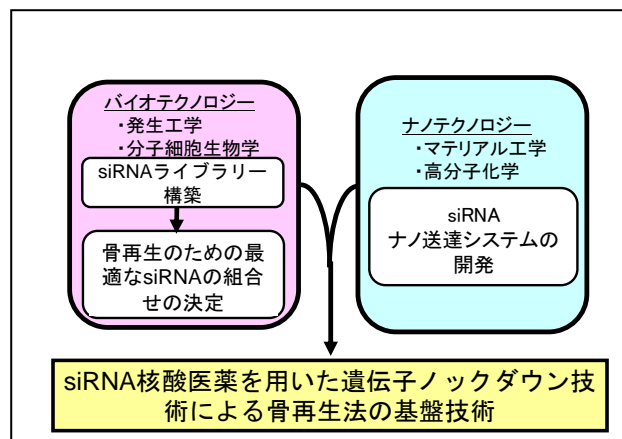
そこで、本研究は、十分な解析がなされていない骨分化抑制シグナルに着目し、近年その安全性および汎用性が脚光を浴びている siRNA を用いた遺伝子ノックダウン技術により、これらのシグナルを抑制することで骨再生を誘導できないかという発想に基づいて計画された。特に siRNA は核酸医薬品としての臨床応用が期待され、適切なドラッグデリバリーシステムと組み合わせれば、遺伝子導入法を凌駕するのは疑いない。

RNAi (RNA interference, RNA 干渉) は 1998 年に線虫で初めて報告された現象である。siRNA (short interfering RNA) によりその配列特異的に mRNA が分解され、標的遺伝子の発現が減少することが知られている (*Nature*, 391, 806-811, 1998)。RNAi は線虫だけでなく昆虫、植物、動物などのさまざまな生物種間で保存されていることが示され、生物共通の核酸制御システムであることが示唆されている (*Nature*, 411, 834-842, 2001)。近年、RNAi を応用した siRNA による遺伝子ノックダウン技術は生物学研究のみならず、医療分野にも大きく期待されるものとなってきた。

た。遺伝子サイレンシングの配列特異性と発現抑制効果の高さから主にウイルス疾患や癌、遺伝性疾患の原因遺伝子に対する適用の可能性が多数報告されている (*Nat Biotechnol.*, 20:500-505, 2002)。最近、骨代謝研究分野においても siRNA を用いた骨再生に関して報告されている (*J. Biol. Chem.* 282(36):26450-9, 2007)。しかしながら、骨再生に対する報告では単一遺伝子に対する siRNA を用いた解析でありその再生誘導効果も十分でない。本研究のように、組み合わせを含めて網羅的に検討することで、骨再生に向けた最適な siRNA の条件を解明しようとする試みはこれまでに報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では骨分化抑制シグナルに着目し、siRNA を用いた遺伝子ノックダウン技術によりこれらのシグナルを抑制することで、骨再生を誘導することを目指している。再生に最適な siRNA の組合せの決定と安全で効率的なナノ送達システムを確立し、siRNA 核酸医薬を用いた臨床応用の基盤を構築することを目的とする (下図)。



3. 研究の方法

(1) siRNAライブラリーの構築

遺伝子改変マウスの表現系やヒトにおける疾患の原因遺伝子に関する報告、さらには本研究室の先行文献を参考に、骨芽分化を制御するシグナル経路のうち、特に重要なシグナルとして知られている BMP・Runx2・Wnt・Hedgehog シグナル等に対する抑制因子に着目し、siRNA ライブラリーの構築を行う。具体的には下記の遺伝子に対する siRNA を作製する。

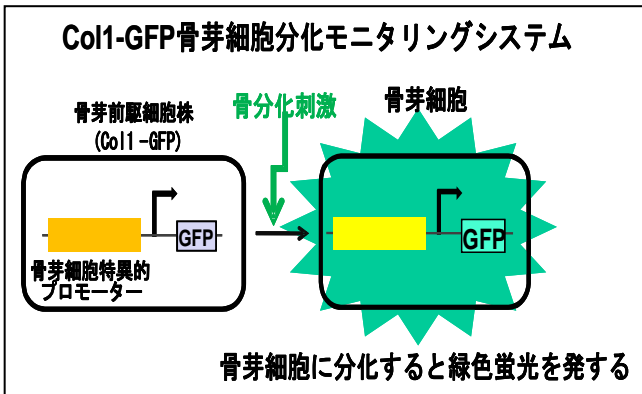
- ①Noggin, Smurf1, Smad6, Tob, SOST (BMP signal に対する抑制因子)
- ②Stat1, Twist1, Twist2 (Runx2 signal に対する抑制因子)
- ③Ptch1, Gli3 (Hedgehog signal に対する抑制因子)

- ④GSK3b (Wnt signalに対する抑制因子)
- ⑤PPAR・(脂肪分化因子)、Sox9 (軟骨分化因子)

作製した siRNA は、その発現抑制効果を Real-time PCR および Western blotting により mRNA およびタンパク発現レベルで確認を行い、ライブラリーを構築する。

(2) 骨再生に有効なsiRNAの網羅的検索

申請者らが開発した Col1-GFP システム(下図)を用いて、(1)により構築した siRNA ライブラリーの網羅的な解析を行う。これらの細胞を用いることで、骨芽細胞分化・軟骨細胞分化を GFP・dsRed の蛍光発色を指標にリアルタイムで簡便かつ非侵襲的にモニタリングすることができる。



この細胞を用いたスクリーニングの結果、候補となった siRNA の組み合わせについては分化マーカーのレポーターを用いたルシフェラーゼアッセイ、Real-time RT-PCR による分化マーカーの発現解析および骨芽細胞分化の指標として ALP 染色、von kossa 染色、骨芽分化誘導をモニターすることで、骨再生に向けた最大かつ最少ユニットの siRNA の組み合わせを明らかとする。

明らかとなった最適な siRNA ユニットが標的遺伝子特異的にその作用を発揮することを Real-time PCR および Western blotting で確認するとともに、各種臓器・組織由来の細胞に in vitro にて作用させることで骨形成能の特異性および安全性を確認する。

(3) ナノ送達システムを用いたsiRNAの細胞内導入法の確立

ナノ送達システムとしては、共同研究者が開発した pKa の異なる複数のカチオンを側鎖にもつポリエチレングリコール-ポリカチオンブロック共重合体 (PEG-DET) を用いる。まず、in vitro でのミセルの徐放性の確認を蛍光標識により検討する。さらにナノ送達システムを用いた際の siRNA の効果を標的遺伝子の Real-time RT-PCR および Western blotting により確認するとともに、Col1-GFP システム、さらには、骨芽分化マーカーの発現および各種染色を行うことで、骨形成能も

保持されていることを確認する。また、細胞毒性、細胞生存率の検討を行い、安全性の確認も行う。

(4) siRNAとナノ送達システムによる骨再生効果のin vivoにおける検証

①単純骨欠損モデル

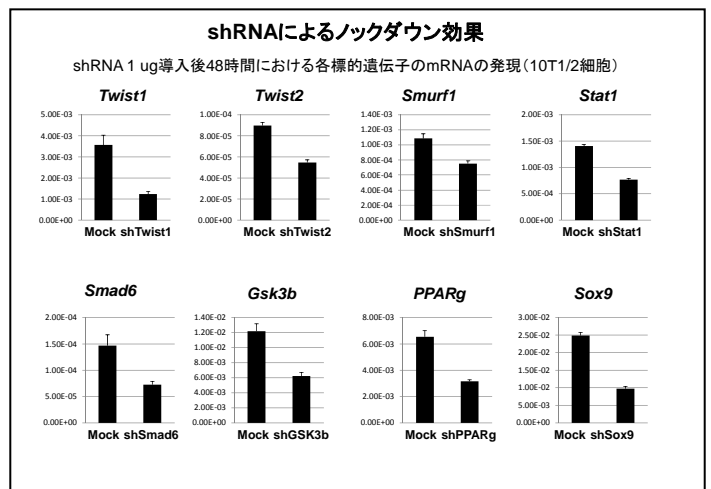
(2), (3)より確立された最適な siRNA の組合せと siRNA ナノ送達システムを組み合わせ、in vivoにおける骨再生効果を検証する。骨再生においては、人工骨材料であるリン酸カルシウム担体に混合し、近交系である C57BL/6 マウスの頭蓋骨に作製した臨界骨欠損 (直径 5 mm、トレパンにて作成) において、その骨誘導性、生体親和性、免疫反応を血液生化学的、放射線学的 (X線、CT)、組織学的 (脱灰及び非脱灰) に評価する。

②歯の移動実験モデル

さらに、歯科矯正学的観点から、歯の移動実験モデルを用いた骨再生効果も検証する。モデルとしては、生後 8 週齢マウスを用いて、切歯遠心の歯肉を剥離し、歯槽骨の一部を除去後、同部に siRNA とリン酸カルシウム担体の混合物を注入して歯肉を元に戻し、創傷接着剤にて固定する。混合物が生着した後、0.5mm ワイヤを用いて両側中切歯間を離開するように矯正力をかけ、移植組織を含んだ周囲組織の変化を観察する。移動期間は 6 時間、12 時間、24 時間、2 日、3 日、7 日、14 日、30 日間とする。経時的变化を組織学的に解析する。

4. 研究成果

Noggin, Smurf1, Smad6, Tob, SOST, Stat1, Twist1, Twist2, Ptch1, Gli3, GSK3b, PPAR・・・Sox9 に対する siRNA を設計し、骨形成抑制遺伝子の siRNA ライブラリーを作製した。作製した siRNA は標的因子に対して有意なノックダウン効果を示すことが確認された (下図)。



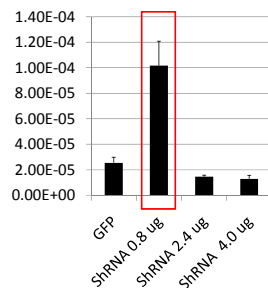
次に申請者らが開発したCol1-GFPシステ

ムを用いて、構築したsiRNAライブラリーの網羅的な解析を行った。骨芽細胞分化をGFPの蛍光発色を指標に判断し、骨分化を誘導するsiRNAの組合せを検索した。その結果、BMPシグナルの抑制因子 (Smurf-1, Smad6)、Runx2の抑制因子 (Stat1, Twist1/2, GSK3b)、他の系統への分化誘導因子 (PPAR gamma, Sox9) に対するshRNAの組合せ (sh-cocktail_7)において、GFPの蛍光を認めたことから、骨分化を誘導していることが示唆された。次に、sh-cocktail_7 を前骨芽細胞株であるMC3T3-E1細胞に、量を変えて導入し、骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシンmRNAの発現を検討した。その結果、0.8 ugのsh-cocktail_7 導入群で著しい発現誘導を確認できた (下図)。以上より、sh-cocktail_7 が骨分化誘導効果を有すること、そしてその効果の分子的な裏付けを得ることができた。

shRNAの組合せによる骨分化誘導効果(MC3T3-E1)

BMPシグナル抑制因子の抑制: shSmurf1, shSmad6
Runx2抑制因子の抑制: shStat1, shTwist1, hsTwist2, shGsk3b
多系統(脂肪・軟骨)への分化誘導因子の抑制: shPPARgamma, shSox9

オステオカルシンmRNAの発現(Real-time RT-PCR)



現在、sh-cocktail_7 をポリエチレングリコール-ポリカチオンブロック共重合体 (PEG-DET) をベースにしたナノ送達システム、あるいはポリイオンコンプレックス (PIC) に搭載させて、siRNA の徐放性と毒性、さらには骨分化誘導効果を検討している。ポリエチレングリコール-ポリカチオンブロック共重合体 (PEG-DET) あるいはポリイオンコンプレックス (PIC) は共同研究者である東京大学工学系研究科片岡研究室で開発されたものであり、その動態や生体親和性等の基礎データを既に取得されているため、本研究では骨芽細胞系細胞を用い、骨分化に対する効果と副作用に特化して検討を進めている。さらに並行して、動物モデルにおける再生誘導効果を検討している。人工骨材料であるリン酸カルシウム担体に上記のナノ送達システムに搭載した sh-cocktail_7 を混合し、マウスの頭蓋骨に作製した臨界骨欠損に移植した。現在までに、埋植 1、2、3 週後、1、2、4 カ月後までのサンプルの回収を予定している。

頭蓋骨骨欠損モデルにおける基礎データが得られ次第、歯の移動実験モデルにおける

検討に進む予定である。現在までに、モデルの自然経過に関するデータを集積している。歯槽骨の一部を除去後、歯の移動を開始すると、観察期間中 (30 日) 欠損部が治癒しないことが確認された。従って、このモデルの骨欠損部に sh-cocktail_7 を含むリン酸カルシウム担体を移植した際の効果を術後 30 日以内に検討することが最適であると考えられた。

インビトロにおいて有意に骨分化を誘導する siRNA の組合せが sh-cocktail_7 一つのみであった結果から、本研究における問題点として以下の二つの可能性が考えられた：

1. 標的とした分子群の抑制だけでは骨・軟骨分化の誘導に不十分である。
2. siRNA の導入効率が 100% ではないため、抑制効果がマスクされてしまう。

今後の展望として、上記 1. の問題を解決するためには、標的とする分子群をさらに広げることが考えられる。これまでに検討した因子に加えて、近年注目を集めている Notch シグナルの関連分子はその候補に挙げられる。Notch1/2 のノックアウトマウスでは骨量の増加が認められるため、Notch シグナルは前駆細胞プールの増大に働いており、中期から後期の骨分化には抑制的にはたっていることが示唆されている (Nat Med 14:306-14, 2008)。この Notch シグナルの作用は Runx2 の機能の抑制を介していることが示されている。また、上記 2. の問題を解決するためには、引き続きナノ送達システムを含めた、DDS に関する検討を続ける必要があると考えられる。最近、合成高分子による DDS に加えて、exosome が shRNA の生体内デリバリーに有効であるという報告も散見される (Nat Biotech 29:341-5, 2011)。したがって、exosome の応用も視野に入れて検討を行う必要があると考えられる。

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 3 件)

1. Inokuchi T, Kawamoto T, Aoki K, Aoki A, Nagahama K, Baba Y, Suzuki S, Shibayama M, Mano Y, Ohya K, Moriyama K. The effects of hyperbaric oxygen on tooth movement into the regenerated area after distraction osteogenesis. Cleft Palate Craniofac J. 2010 Jul; 47(4):382-92 査読有
2. Aoki A, Kawamoto T, Aoki K, Inokuchi T, Kudoh A, Nagahama K, Baba Y, Suzuki S, Ohya K, Moriyama K. A amount of bone lengthening affects blood flow

recovery and bone mineralization after distraction osteogenesis in a canine cleft palate model. Cleft Palate Craniofac J. 2010 May; 47(3):303-13 査読有

3. 須佐美隆史、長濱浩平、大久保和美、高橋直子、松崎雅子、森良之、高戸毅 口唇口蓋裂患者における歯科矯正治療に関するアンケート調査—動的矯正治療を終了した患者を対象に. 日口蓋誌 35 巻 P41-55 2010 査読有

[学会発表] (計2件)

1. 長濱浩平 当科における口唇口蓋裂患者に対する上顎骨延長法とその術後評価第20回日本顎変形症学会総会 2010年6月15日 札幌
2. 長濱浩平、須佐美隆史、朝日藤寿一、幸地省子、坂本輝雄、倉田和之、石渡靖夫、高戸毅、齋藤功：片側性口唇口蓋裂患者における矯正歯科治療に関するアンケート調査—動的治療後の多施設共同研究— 第34回 日本口蓋裂学会総会 2010年5月27-28日 東京

[図書] (計2件)

1. 長濱浩平：歯のせいで肩がこると言われたら？ 医師・歯科医師のための口腔診療必携 困ったときのマニュアル・ヒント集 202, 100 高戸 毅 監修, 金原出版, 東京, 2010
2. 長濱浩平：口腔・顔面写真撮影のポイントとは？ 医師・歯科医師のための口腔診療必携 困ったときのマニュアル・ヒント集 202, 245 高戸 毅 監修, 金原出版, 東京, 2010

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

東京大学医学部附属病院顎口腔外科・歯科矯正歯科ホームページ：
<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長濱 浩平 (NAGAHAMA KOUHEI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 60401368

(2) 研究分担者

該当しません

(3) 連携研究者

該当しません