

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592864

研究課題名(和文) 遺伝子搭載ナノデバイスによる低侵襲な骨造成法の確立

研究課題名(英文) Establishment of minimum invasive bone augmentation technique with nano-devices containing DNAs

研究代表者

近藤 尚知 (KONDO, HISATOMO)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：70343150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： Direct in vivo gene transferの手法については、GFPの導入が確認されているため、この手法は有用と考えられる。本研究では、BMP-2の遺伝子導入によって、個体によっては骨形成が促進されていると思われるものもあったが、顕著な骨形成促進効果は観察できなかった。他の導入遺伝子候補の検索では、PDGFとTGF- β の併用が、単独使用に比較して顕著な効果があることが明らかとなり、これらの遺伝子導入により、BMP-2と同等、あるいはそれ以上の効果が得られることも期待ができる。また、細胞内シグナル伝達に関する解析から、下流のシグナルの制御で骨形成促進効果が得られることも示唆された。

研究成果の概要(英文)： We have tried to establish a method of minimum invasive bone augmentation with nano-devices containing DNAs. Our preliminary experiment showed that direct in vivo gene transfer technique successfully introduced plasmid DNA of green fluorescence protein into cells of calvarial tissue. However, BMP-2 plasmid did not show positive effects for bone tissue regeneration in rat calvarial bone defect models. On the other hand, in another experiments to search the candidates of gene delivery, osteogenic differentiation of UE7T-13 cells, a bone marrow-derived hMSC line, was markedly enhanced by PDGF, although PDGF alone did not induce differentiation. These results suggest that the enhancement of TGF- β (TGF)-induced osteogenic differentiation by PDGF-induced PI3K/Akt-mediated signaling depends on TGF-induced MEK activity. Thus, PDGF positively modulates the TGF-induced osteogenic differentiation of hMSCs through synergistic crosstalk between MEK- and PI3K/Akt-mediated signaling.

研究分野： 歯医学

科研費の分科・細目： 補綴系歯学

キーワード： 歯科 骨組織再生 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

高齢者のクオリティ・オブ・ライフを著しく低下させる要因のひとつとして「歯の喪失」があげられる。超高齢者社会を迎えているわが国において、歯牙喪失による咀嚼障害、構音障害、審美障害を訴える患者の数は増加傾向にあり、その対策は急務である。歯牙を喪失した場合の機能回復の方法として、ブリッジ、義歯（入れ歯）、デンタルインプラントなどが挙げられるが、多数の歯を喪失した場合には、ブリッジの適用は困難となる。一方で、義歯とインプラントの治療効果については残存歯槽骨の状態に左右される部分が大きく、骨量の有無が重要なポイントとなる。近年は治療効果と予後の観点からデンタルインプラントが適用となる症例が増加しているため、抜歯後の顎骨・歯槽骨の維持または回復が重要視されている。しかしながら、抜歯後または、抜歯に至る過程ですでに骨吸収が亢進し、歯槽骨が失われてしまうことも多く、その際にはインプラントを適用するために骨造成手術（骨移植手術）を行うことになる。骨造成手術については、自家骨移植がゴールド・スタンダードとされ、最も確実な方法と認められながらも、手術侵襲の大きい点、採取できる骨量に限界があることから敬遠されがちである。また、歯を喪失する者の多くが高齢者であり、種々の全身疾患を有する場合が多く、骨移植手術における侵襲が大きな問題となる。申請者は、日常の臨床において常に自家骨移植を施行しており、それを受ける患者側の肉体的・精神的負担の大きさを日々強く感じている。したがって、手術を回避、または極力低侵襲にする方法を開発することで、上記問題をクリアすることが可能となり、高齢者のクオリティ・オブ・ライフの改善に大きく貢献できると考えた。一方で、近年、遺伝子導入用いた治療方法（遺伝子治療）が臨床でも応用されつつある。iPS細胞（人工多能性幹細胞：induced

pluripotent stem cell, Cell 2006, Nature 2007)もこの手法を用いて作成されており、この方法の有効性が注目されていた。遺伝子導入には、その効率の観点から、ウイルスベクターを用いることが多いが、ウイルスの毒性が問題視されている点については否定ができない。そのため、安全性に配慮すればプラスミドベクターを使用せざるを得ないが、導入効率が問題であった。当時の遺伝子・核酸医薬を搭載可能な超分子ナノデバイスとしては、高分子ミセル型ナノデバイスと脂質二分子膜を主体とするエンベロープ型のナノデバイスが候補であった。本研究では、生体内の異物認識機構を巧みに回避するステルス機能、体内を移動して組織に浸透する組織浸透機能を利用して、効率的な遺伝子導入・発現を可能にするものであるエンベロープ型遺伝子搭載ナノデバイスを応用することとした。

2. 研究の目的

我々は、種々の遺伝子導入実験を行っており、GFP 遺伝子(プラスミド)を用いた Direct In Vivo Gene Transfer の試行において、肯定的な結果を得ていたため、これらの試みを臨床応用にまで発展させることは非常に意義があると考え、そのファーストステップとして本研究を計画した。本研究においては、導入効率という大きな問題を解決するため、遺伝子搭載ナノデバイスを用い、遺伝子導入的手法によって骨組織再生を促す低侵襲な骨造成法を開発することを目的とした。導入する遺伝子として、骨組織再生および骨誘導能が期待できる Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)、Osterix 等を用い、遺伝子搭載ナノデバイスと Direct in vivo gene transfer の併用で生体内への遺伝子導入効率どこまで高められるか、さらにはその骨造成効果を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

予備実験として培養細胞で遺伝子の導入

効果を評価した。GFP 搭載ナノデバイスはエンベロープ型のベクターを用いて、蛍光顕微鏡によってその導入の状態を観察した。

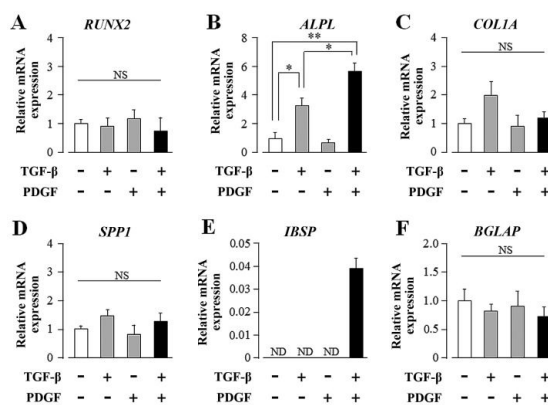
ラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いて、Direct in vivo gene transfer の手法で、遺伝子搭載ナノデバイスを応用して、硬組織の再生を解析・評価することを試みた。ラットの頭蓋骨（左右の頭頂骨）に 5 mm の骨欠損をつくったラット頭蓋骨骨欠損モデルにおいて、骨欠損作成後 1, 3, 5 日後に、BMP-2 遺伝子を骨欠損部の近傍の骨膜下に注射して遺伝子導入を行った。その後経時的にマイクロフォーカスCTによって骨欠損部の硬組織再生の様子をエック線学的に観察した。

上記と並行して、導入する遺伝子の次の候補として、TGF- β 、PDGF、VEGF などの骨組織形成促進効果について培養細胞を用いて検討した。さらに、遺伝子導入のためのスキャホールドとして用いることのできる生体材料（ハイドロキシアパタイト、TCP、コラーゲンなどについても、骨欠損部に填入した際の骨組織再生効果について評価検討した。

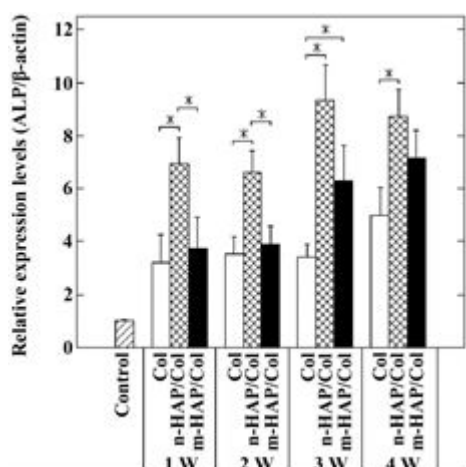
4. 研究成果

予備実験として培養細胞で GFP 搭載ナノデバイス（エンベロープ型のベクター）を用いた観察では、リポフェクタミンによる遺伝子導入と比較して顕著な差を認めなかった。この結果を受け、ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおいて、遺伝子導入試薬（In Vivo JET PEI）を用いて Direct in vivo gene transfer の手法で、BMP-2 遺伝子導入を行った。BMP 遺伝子は、1 骨欠損あたりにつきプラスミド DNA : 50 マイクログラムを用いた。マイクロフォーカスCTによる経時的観察の結果では、遺伝子導入によって硬組織は増加傾向にあったが有意な差は認めなかった。BM

P-2 のプラスミド DNA の量の不足も考慮して、プラスミドを 100 マイクログラムに増量して、再度遺伝子導入実験を行った。硬組織の再生において、対照群と比較して有意な増加は認めなかった。今回は DNA の量が多すぎて、反対側まで漏れてしまい、左右の骨欠損に差が出なくなっていることも考えられた。遺伝子導入に用いる他の遺伝子の候補として、TGF- β 、PDGF、VEGF の硬組織再生効果をヒト骨髄由来未分化間葉系の細胞を用いて検索した。骨形成促進効果の評価は、Alizarin Red 染色による細胞外基質石灰化能の観察やリアルタイム RT-PCR 法による骨芽細胞（OB）分化マーカー遺伝子の mRNA 発現解析、ウェスタンブロット法により細胞内シグナル伝達分子のリン酸化の解析によって行った。その結果、TGF- β は、OB 分化を促進した。そして、TGF- β により誘導される MEK/ERK 経路の活性化が、MSC の OB 分化を促進した。一方、PDGF により誘導される PI3K/AKT 経路の活性化は、単独での OB 分化促進効果は認められなかったが、TGF- β により誘導される OB 分化を促進した。



この PDGF と TGF- β との協調的な OB 分化促進効果は MEK 阻害剤で完全に消失することから、PDGF 誘導性の PI3K/AKT による TGF- β 誘導性 OB 分化の促進効果は、MEK 依存的であることまでが明らかとなった。



また、ナノサイズアパタイト粒子とマクロサイズアパタイト粒子とを混合した複合体調製上に骨芽細胞様細胞 SaOS-2 を播種して培養後、定量的 RT-PCR 法によって骨系分化マーカーの遺伝子発現解析を行った結果、ナノサイズ・アパタイト/コラーゲン複合体上で培養することで骨系分化マーカーの発現が上昇することが明らかとなった。

以上の結果から、本研究において用いた、エンベロープ型のベクターによる遺伝子導入は必ずしも十分な効果があるとはいえなかった。このタイプのベクターは過去にも研究においても試験してみたが、有意な効果を認めなかった。この点については、ある一定の条件での結果であり、今後機会があれば、更なる検討を加えたいと考えているが、第 1 選択として用いるべき候補ではないことが示唆された。Direct in vivo gene transfer の手法については、GFP による実験では導入が確認されているため、この手法の有効性については問題ないと考えられる。本研究では、個体によっては骨形成が促進されていると思われるものもあったが、期待したような顕著な骨形成促進効果は観察できなかった。その理由については、BMP-2 のプラスミドが細胞に導入されたとしても、必ずしも組織中で十分な量のタンパクを分泌できなかった可能性もあり、顕著な骨組織再生効果が観察されなかった理由については、今後詳細の検討が必要である。骨組織中には、

常に BMP-2 が存在し、導入された BMP-2 のプラスミドが分泌したのか、もともと組織中に存在したタンパクなのか、どの程度の量のタンパクが分泌できたかどうかの確認が困難であるため、この点についての検証方法も検討する必要がある。また、並行して行った、骨組織再生のための他の導入遺伝子候補の検索では、PDGF と TGF-β の併用が、単独使用に比較して顕著な効果があることが明らかとなり、今後はこれらの遺伝子導入により、BMP-2 と同等、あるいはそれ以上の効果が得られることも期待ができる。また、細胞内シグナル伝達に関する解析も行ったことにより、より下流のシグナルを制御することにより、骨形成促進効果が得られることも示唆された。さらに、本結果は遺伝子導入によるシグナル制御はもとより、コンパウンドなどによる単純なシグナル制御により骨形成促進効果が得られることも示唆され、非常に有用な成果を得たと考える。

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)

- Jun Yokota, Naoyuki Chosa, Shunsuke Sawada, Naoto Okubo, Noriko Takahashi, Tomokazu Hasegawa, Hisatomo Kondo, Akira Ishisaki PDGF-induced PI3K-mediated signal enhances TGF-induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the TGF- β -activated MEK-dependent manner International Journal of Molecular Medicine, 33: 534-542, 2014, DOI: 10.3892/ijmm.2013.1606
- Hatakeyama W., Taira M., Chosa N., Kihara H., Ishisaki A., Kondo H. Effects of apatite particle size contained in two apatite/collagen composites on osteogenic

differentiation profile in osteoblastic cells. International Journal of Molecular Medicine, 2013 Oct 2. doi: 10.3892/ijmm.2013.1516. [Epub ahead of print]

W HATAKEYAMA, M TAIRA, H KIHARA, M SASAKI, S KIMURA, H KONDO

Subcutaneous Tissue Reactions Against Nano-apatite Collagen Composites. Nano Biomedicine 4(2):118-124, 2012 <http://www.nanobio.jp/n4-2-7e.html>

M TAIRA, W HATAKEYAMA, H KIHARA, H KONDO, K UEDA, T NARUSHIMA.

Quantitative Analyses of Osteogenic-differentiation-related Gene Expressions in Human Osteoblast-like Cells (SaOS-2) Journal of Oral Tissue Engineering 10(1): 34-41, 2012. <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=di3ortis/2012/001001/004&name=0034-0041e&UserID=202.244.196.214>

〔雑誌論文〕(計 4 件)

畠山航, 平雅之, 鬼原英道, 高藤恭子, 近藤尚知. アパタイト/コラーゲン複合体中のアパタイト粒子の違いが骨芽細胞様細胞の骨系分化挙動に及ぼす影響評価 第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会. 2013 年 9 月, 福岡

横田潤, 鬼原英道, 三浦真吾, 高藤恭子, 近藤尚知. TGF- と IGF-1, PDGF または VEGF の間葉系幹細胞に対する骨分化促進効果 第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会. 2013 年 9 月, 福岡

畠山航, 平雅之, 鬼原英道, 近藤尚知. 細胞分離回収用磁性マイクロビーズに関する研究 日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会, 2013

年 11 月, 弘前

J YOKOTA, HI KIHARA, K TAKAFUJI, H KONDO, A ISHISAKI, T KOBAYASHI

Combination of TGF- and other cytokines synergistically enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. 22nd Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration, October17-19, 2013, Dublin, Ireland

W HATAKEYAMA, H KIHARA, K TAKAFUJI, H KONDO Bone regeneration of rat critical size calvarial defect with large-size fully inter-connected porous apatite/collagen composite 22nd Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration, October17-19, 2013, Dublin, Ireland

畠山航, 松本知生, 丸尾勝一郎, 鬼原英道, 近藤尚知. ナノアパタイト粒子配合医療用コラーゲンを用いたラット頭蓋骨欠損部における骨再生の試み. 第 42 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 2012 年 9 月. 大阪市.

横田潤, 高藤恭子, 丸尾勝一郎, 鬼原英道, 近藤尚知. 多血小板血漿由来主要サイトカインが間葉系幹細胞の骨分化に及ぼす影響. 第 42 回公益社団法人日本口腔インプラント学会・学術大会 2012 年 9 月, 大阪市.

〔学会発表〕(計 7 件)

6. 研究組織

- (1)研究代表者: 近藤尚知 (Hisatomo Kondo)
研究者番号: 70343150
- (2)研究分担者: 石崎 明 (Akira Ishisaki)
研究者番号: 20356439
- (3)連携研究者: 黒田真司 (Shinji Kuroda)
研究者番号: 50323689