

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 25 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：2012～2013

課題番号：24890167

研究課題名(和文) ナノリン酸カルシウム結合ミニサークルDNA搭載遺伝子活性化基質による骨再生

研究課題名(英文) Bone regeneration by gene activated matrix combined with nano-size calcium phosphate particle and minicircle DNA

研究代表者

三浦 桂一郎 (Miura, Kei-ichiro)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10634446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：Minicircle DNAを用いこのプラスミドを産生し従来のプラスミドより導入効率が高いことを確認した。またGFP遺伝子を組み込んだMinicircle DNA・リン酸カルシウム顆粒/コラーゲン複合体を作成しin vivoで評価を行った。この間、申請者らはリン酸カルシウムを簡便に微小化(ナノサブミクロンパーティクル)し、かつその骨伝導性に関して(K Miura, et al. Applied Surface Science. 2013)、また骨再生材料に関する知見(A Matsui, et al. Cleft Palate-Craniofac J, 2013)を報告した。

研究成果の概要(英文)：By making use of minicircle DNA, this plasmid was successfully made. And we found that cell transplantation efficiency of this plasmid was higher than conventional plasmid. After that we prepared minicircle DNA/calcium phosphate particle/collagen composite combined with Green Fluorescent Protein gene, and assessed the material in vivo analysis. During this period, we successfully made nano-submicron calcium phosphate particle and reported the osteoconduction of the material (K Miura, et al. Applied Surface Science. 2013). Furthermore, we obtained the knowledge of bone regeneration material (A Matsui, et al. Cleft Palate-Craniofac J, 2013).

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：口腔外科学一般

キーワード：骨再生 Gene Activated Matrix 口腔外科 リン酸カルシウム ナノサイエンス

## 1. 研究開始当初の背景

### 歯槽骨再生における骨再生材料の要求の高まり

口腔外科領域では、外傷・手術で生じた骨の欠損を再生させることは重要な課題である。現在、骨が喪失した場合、自家骨移植が広く適用されているが、二次的外科的侵襲が必要で採取量に限界があるなど欠点がある。これに替わる手法として人工骨

(Hydroxyapatite (HA) や  $\beta$ -Tricalcium Phosphate ( $\beta$ -TCP)) がすでに臨床応用されている (Kokubo T, et al, Biomaterials 24; 2003) が、未だに自家骨移植が gold standard である。骨再生には細胞・成長因子・担体の三要素が重要で、これらの組み合わせで骨再生が効率化するため、骨再性能、生体吸収性を有し、骨再生に関わる成長因子群・細胞群の機能が賦活化する骨再生材料の開発が望まれている。

これまで、申請者らは骨組織のアパタイト形成過程としての起点を担う Octacalcium Phosphate (OCP) と、OCP の賦形性・操作性が高まるように細胞分化の足場となるコラーゲンを組み合わせた OCP・コラーゲン複合体 (OCP/Col) を用い、口腔外科領域で扱う大きな顎骨欠損が、より効果的に再生するとして、ビーグル犬を用いた動物実験で再現性の高い結果を報告してきた (K Miura, et al. IJOMS in press; 2012)。

### 骨再生材料にタンパクを複合化することの欠点

これらの骨再生材料に、骨再生能がさらに向上化、能動化するように、骨形成を促進するタンパク質を組み込む方法が用いられており、欧米では BMP-2 製品を使用し、小さな骨欠損に対し一定の成果が上がっている (Boyne et al. J Oral Maxillo Surg. 2005)。しかし、いまだに大きな骨欠損には対応できていない。また、現在、タンパクを用いた治療法は、(1) 高価 (2) 易免疫反応性 (3)

タンパク放出に時間的、量的な予知性が乏しいなどの欠点があり、この欠点を改善すべく、細胞内に遺伝子を導入し目的のタンパク質を発現させる遺伝子導入法が発展している。

### タンパク複合化の欠点を改善するための遺伝子導入法と、遺伝子導入法のこれからの課題

現在最も効果的な遺伝子導入法は、ウイルスベクターを用いた手法である。この手法は、遺伝子導入効率が非常に高く、目的タンパク質の発現効率が高い点がメリットである。反面、ウイルス感染の危険性が高く、大量投与で副作用が出るデメリットがある。したがって、安全で効果的な非ウイルス性ベクターが求められている。非ウイルスベクターは生体適合性、低細胞毒性、低コスト、などの点で優れ、現在はプラスミドベクターが最も使われている (Cao X, et al. Int J Nanomedicine 6;2011)。しかしプラスミドベクターの遺伝子導入効率は低く、さらに、プラスミドベクターには、遺伝子治療に必要なない配列が存在し、予期せぬ免疫応答が起きたり、遺伝子導入効率が下がったりする (Kobelt, et al. Mol Biotechnol in press;2012)。したがって、治療目的の遺伝子を導入する際に、プラスミドベクター中の不要な部分を除去することで生物学的安全性が高まり、遺伝子導入が効率化すると考えられる。

### 遺伝子導入法の効率化が図られる手法としての Minicircle DNA

過去、Kobelt らは、遺伝子治療上、プラスミド DNA 中の不要な部分を除去し、これを Minicircle DNA と称し、遺伝子導入効率を上げ、もともとのプラスミド遺伝子ベクターに置き換わる効果的な方法を提唱した (Kobelt, et al. Mol Biotechnol in press;2012)。

### ナノサイエンスを用いた遺伝子導入効率化

また、近年、ナノサイエンス技術が向上し、

リン酸カルシウムのナノサイズ化テクノロジーが格段に向上している。遺伝子治療領域においても、リン酸カルシウムナノ粒子が、細胞膜のカルシウムイオンを經由したエンドサイトーシス（細胞貪食）を惹起しやすく、さらにリン酸カルシウム自体がもともと生体適合性が高いことから細胞毒性が低く、ナノリン酸カルシウムを用いた遺伝子導入システムは効果的であるとの報告がある（Cao X, et al. Int J Nanomedicine 6;2011）。

#### Gene Activated Matrixを用いた遺伝子導入効率の向上

一方、過去に Bonadio らは、PTH 遺伝子を組み込んだコラーゲン基質（Gene Activated Matrix 遺伝子活性化因子）を骨欠損部に移植することで骨欠損の再生が可能であることを示した（Nature Medicine 1999）。この方法は、遺伝子導入効率の低さから確実性の欠けるものであるが、東京医科歯科大学教授の春日井昇平教授らは、この問題の克服が図れることを示した（Endo,et al. Tissue Eng 2006）。

本研究は、Minicircle DNA を用いた分子生物学的手法、ナノ粒子リン酸カルシウムを用いたナノテクノロジー領域の手法、Gene Activated Matrix、のそれぞれの有用性に着目し、遺伝子導入法に関する学理を究明しようとするものである

## 2．研究の目的

口腔外科領域において、顎骨や歯槽骨欠損の再生は重要な課題である。現在、確実に有効な方法として、新鮮自家骨移植があるが、二次的外科的侵襲を要し採取量にも限界があるなど、欠点も多い。本研究では、従来の骨再生材料よりも容易かつ確実に骨の再生能が向上するように、Minicircle DNA とナノ粒子リン酸カルシウムとをコンビネーション化し、高分子に組み込んだ Gene Activated Matrix の開発を目的とした。

## 3．研究の方法

本研究においては、1．Minicircle DNA の抽出、精製、遺伝子の導入、2．ナノ粒子リン酸カルシウム-Minicircle DNA/高分子複合体（Gene Activated Matrix）の作製を、同時に進行し、最終的に小動物への埋入実験を行い、「ナノ粒子リン酸カルシウム-Minicircle DNA/高分子複合体（Gene Activated Matrix）による骨組織再生」の方法を確立する。

## 4．研究成果

Minicircle DNA を用いこのプラスミドを産生し従来のプラスミドより導入効率が高いことを確認した。また GFP 遺伝子を組み込んだ Minicircle DNA・リン酸カルシウム顆粒/コラーゲン複合体を作成し in vivo で評価を行った。この間、申請者らはリン酸カルシウムを簡便に微小化（ナノサブミクロンパーティクル）し、かつその骨伝導性に関して（K Miura,et al.Applied Surface Science.2013）、また骨再生材料に関する知見（A Matsui,et al.Cleft Palate-Craniofacial J,2013）を報告した。

## 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 2 件）

Kei-ichiro Miura, Takahisa Anada, Yoshitomo Honda, Yukari Shiwaku, Tadashi Kawai, Seishi Echigo, Tetsu Takahashi, Osamu Suzuki, Characterization and bioactivity of nano-submicro octacalcium phosphate/gelatin composite, Applied Surface Science, 査読有、282 巻、2013、138-145  
DOI:10.1016/j.apsusc.2013.05.086  
Aritsune Matsui, Keiko Matsui, Takuto

Handa, Yuji Tanuma, Kei-ichiro Miura,  
Yuta Kato, Tadashi Kawai, Osamu  
Suzuki, Shinji Kamakura, Seishi  
Echigo, The Cleft Palate-Craniofacial  
Journal、査読有、in press、2013  
DOI:10.1597/10-096

〔学会発表〕(計1件)

三浦 桂一郎、住田 吉慶(発表者)、江  
頭 寿洋、梅林 真由美、長井 一浩、  
Weijian Zhong、朝比奈 泉：骨髄濃縮  
液による骨組織再生の試み・BMP2との  
相乗効果の検討、第67回NPO法人日本  
口腔科学会学術集会(栃木) 2013年

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

三浦 桂一郎 (MIURA, Kei-ichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：1000010634446