

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670863

研究課題名(和文)機能性microRNAの生体内deliveryによる骨再生促進システムの開発

研究課題名(英文)Delivery of functional microRNA accelerates the bone regeneration with BMP2 and BMAC.

研究代表者

朝比奈 泉 (ASAHINA, Izumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：30221039

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究の目的は、骨形成や炎症に関わるmiRNAをデリバリーすることで、BMPと骨髄濃縮液BMACによる骨再生を効果的に達成することである。実験は、まず動物実験モデルの作出のため、BMP2とBMACをマウス頭蓋骨へ移植した時に骨形成を誘導できるBMP2の臨界濃度を検討した。また、骨髄MSCの培養で、BMP2や炎症性サイトカインの添加によって発現が変動するmiRNAを探索し、候補を抽出した。その結果、BMP2によるMSCの骨芽細胞分化誘導中に発現の変動が大きかった1つのmiRNAが、通常の半量濃度のBMP2とBMACによる骨形成を促進し得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文):Direct implantation of freshly isolated bone-marrow aspirate concentrates (BMAC) with minimal amount of rhBMP2 to the mouse cranium were performed to assess the effectiveness of administration of functional miRNA in vivo. On the other hand, mouse bone-marrow mesenchymal stem cells (MSC) were exposed to rhBMP2 for osteoblastic induction in culture to search the candidates of miRNA. As a result, when some miRNAs, which were chosen in vitro assay, were transplanted with BMAC and minimal amount of BMP2, we found one miRNA can accelerate the new bone formation. At present, we are doing further experiments to investigate the function of this miRNA in detail.

研究分野：口腔外科学・再生医学

キーワード：骨再生 microRNA BMP

1. 研究開始当初の背景

顎骨欠損の再生は重要な課題であるが、現在のところ新鮮自家骨移植に代わる有効な方法は無い。われわれは、人工代用骨に骨誘導能を付与するため、BMP を応用した Tissue Engineering による骨再生を試みてきた。その中で、老齢な高等動物における骨欠損の確実な再生には、BMP 単独の移植でなく、それに応答する細胞の添加が有効であることを明らかにした。しかしながら、自己骨髄由来培養骨芽細胞を用いた歯槽骨再生の臨床研究から、培養細胞の増殖・分化能は個人差が大きく、培養操作には多大な労力と経費を要することが明らかになった。さらに、初代培養間葉系幹細胞(MSC)は高い可塑性を有するものの、移植に必要な細胞数を得るために培養を重ねると、急速に可塑性を失うことも明になった。そのため、われわれは、骨再生に必要な細胞を組織から採取し、培養操作を加えず移植する容易で確実な骨組織の誘導方法を開発する必要があると考えた。そこで、まず新鮮骨髄液から遠心操作によって得られる骨髄細胞濃縮液 (bone-marrow aspirate concentrates; BMAC) に着目し、それを直接骨欠損部位に応用することで、効果的に骨再生が達成される方法を検討してきた。

一方、近年 Tissue Engineering による骨再生において、BMP や細胞の移植に伴う局所の炎症反応から産出される TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカインが、新生骨の形成を阻害する可能性が示されている。そして、これら炎症性サイトカインの機能を阻害すると、骨再生のレベルが改善されることが示されている。そこで、申請者は、移植に伴う局所の炎症反応を簡便、且つ適正に抑制する補充療法を Tissue Engineering による骨再生に併用することを考えた。近年腫瘍や炎症の抑制効果が期待される核酸医薬のデリバリー技術において、micro(mi)RNA は標的となる遺伝子の特異的、且つ直接的に攻撃でき、さらには iPS 細胞の作製や目的とする細胞への分化に関わる機能も期待されることから、次世代の核酸医薬品としての有用性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨形成や炎症に関わる機能性 miRNA を補助的にデリバリーすることで、BMP と BMAC による骨再生を効果的、且つ安全・廉価に達成することを試みる。

3. 研究の方法

低濃度 BMP と BMAC による骨再生モデルの作出；
実験は、まず miRNA のデリバリー効果を

評価するのに用いる動物モデルの作出から開始した。即ち、骨髄濃縮液 (BMAC) と rhBMP2 のマウス (8 週齢 C57BL/6) 頭蓋骨上 (骨膜下) への移植において、骨形成を誘導できる BMP2 の臨界濃度の検討を行った。実験は、移植後 2, 4 週で骨形成を十分に認める通常濃度の 1/10 量の BMP2 から検討を行った。

炎症抑制や骨形成に機能する miRNA の探索；

マウス骨髄由来 MSC を使用して、BMP2 の添加培養による骨芽細胞への分化誘導中に変動する miRNA の検索から、本実験に使用する miRNA の候補を抽出した。即ち、BMP2 の添加培養期間に変動の大きな miRNA を骨形成に関わる因子として評価を行い、又、BMP2 に加えて、炎症性サイトカインである TNF α や IFN γ の添加培養を行なうことで、骨芽細胞への分化抑制が認められた MSC において変動の大きい miRNA を炎症抑制に関わる因子として評価を行った。

次に、骨形成や炎症抑制に関わる因子の候補として抽出した miRNA について、MSC に transfection を行い、*in vitro* において骨芽細胞分化への影響を評価した。

炎症抑制や骨形成に機能する miRNA の生体へのデリバリーによる骨形成促進の検討；

低濃度 BMP2 と BMAC による移植モデルに、候補とした miRNA を補充投与することで実際に骨形成が促進されるかを検討した。移植試料は、低濃度 BMP2 を吸着させた β TCP 顆粒と miRNA を搭載したアテロコラーゲンを混和させ凍結乾燥した基質に、BMAC を播種して作製し、マウス頭蓋骨上に移植を行った。移植した試料は、移植後 2, 4 週で採取し、組織学的に観察を行った。

4. 研究成果

本研究期間では、移植モデルの作出を行った後、miRNA の候補の選定とその投与効果の評価を順に行なった。

低濃度 BMP と BMAC による骨再生；

通常濃度の半量の BMP2 を β -TCP 顆粒に吸着させた試料において、BMAC を播種してマウス頭蓋骨上に移植した時に、移植後 2 週の段階で組織学的に僅かに骨形成を認めた。さらに、移植後 4 週までに十分な骨形成を認めた。それに対して、それ以下で設定した濃度の試料では、BMAC を播種しても移植後 2 週の段階では骨形成を認めなかった。一方、通常濃度の BMP2 を使用した場合、移植後 2 週で十分な骨形成を認め、移植後 4 週では成熟した骨形成を認めた。そのため、通常濃度の半量程度をこのモデルにおける臨界濃度と考え、本研究では半量濃度 BMP2 と BMAC

による骨形成に対する miRNA の補充投与の効果を評価することとした。

miRNA の選定；

マウス骨髄由来 MSC を BMP2 添加培地において 2 週間培養を行ったところ、BMP2 添加培地への変更時、変更後 7 日目、14 日目の時点で細胞数と ALP 活性を計測すると共に、細胞から miRNA を抽出して、その発現プロファイルを qPCR array にて解析を行った。その結果、ALP 活性がピークに達する前の培養 7 日目において、発現の変動が大きい miRNA がいくつか認められた。そのため、それらの発現プラスミドを作製し、MSC への導入を行うことで、骨芽細胞分化に対する機能の評価を行った。その結果、3 種類の miRNA について、骨芽細胞分化への寄与が示唆されたため、投与の候補とした。一方、炎症抑制効果が示唆される miRNA については、現在炎症性サイトカイン存在下での MSC の骨分化培養における解析を実施しているところである。

miRNA の生体へのデリバリーによる骨形成促進の検討；

半量濃度の BMP2 を吸着させた β TCP 顆粒と miRNA を搭載したアテロコラーゲンを混和させ凍結乾燥した基質に、BMAC を播種して移植試料を、マウス頭蓋骨上に移植を行った。現在までに、*in vivo* における骨促進効果が示唆される miRNA を見出しているが、その効果は顕著ではなかったため、投与する miRNA の量などを含めた移植条件の検討を行っているところである。

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 6 件)

1. Kawasaki T, Sumita Y, Egashira K, Ohaba S, Kagami H, Tran SD, Asahina I. 2015. Transient exposure to hypoxic and anoxic oxygen concentrations promotes either osteogenic or ligamentogenic characteristics of periodontal ligament-derived cells. *Biores Open Access. in press.* 査読有
2. Umebayashi M, Sumita Y, Kawai Y, Watanabe S, Asahina I. 2015. Gene activated-matrix with atelocollagen/tricalcium-phosphate and plasmid DNA encoding BMP4 or Runx2 promotes rat calvarial bone augmentation. *Biores Open Access. in press.* 査読有
3. I T, Sumita Y, Minamizato T, Umebayashi M, Liu Y, Tran SD, Asahina I. 2014. Bone marrow-derived cell therapy for oral mucosal repair after irradiation. *J Dent Res.*, vol.93(8): 813-820. 査読有
4. Yoshida K, Sumita Y, Marukawa E,

Harashima M, Asahina I. 2013. Effect of platelet-rich plasma on the bone engineering with the alloplastic substitute containing BMP2. *Biomed Mater Eng.*, vol.23(3): 163-72. 査読有

5. Xia D, Sumita Y, Liu Y, Tai Y, Wang J, Uehara M, Agata H, Kagami H, Fan Z, Asahina I, Wang S, Tran SD. 2013. GDFs promote tenogenic characteristics on human periodontal ligament-derived cells in culture at late passages. *Growth Factors.*, vol.31(5): 165-73. 査読有
6. 住田吉慶, 朝比奈泉. 2013. 歯・歯槽骨(歯槽骨の再生医療/歯の再生医療) 第 2 節; 臓器・器官ごとの再生医療研究の動向、再生医療における臨床研究と製品開発～医工連携に向けた「自社技術」と「再生医療」の接点を探る～. 情報技術協会. 79-87. 査読無

[学会発表](計 9 件)

1. 梅林真由美・住田吉慶・河井洋祐・朝比奈泉: 遺伝子活性化基質(GAM)を用いた骨再生促進システムの開発. 第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 幕張メッセ(千葉) 2014 年 10 月 17 日～19 日.
2. 中谷佑哉, 住田吉慶, 南里篤太郎, 河井洋祐, 井 隆司, 古賀喬充, 江頭寿洋, 朝比奈泉: Platelet Rich Plasma (PRP) のフリーズドライ保存における有用性の検討. 第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 幕張メッセ(千葉), 2014 年 10 月 17 日～19 日.
3. 江頭寿洋, 住田吉慶, 三浦桂一郎, 中谷佑哉, 朝比奈泉: 骨髄濃縮液による骨組織再生の試み. 第 44 回日本口腔インプラント学会, 東京国際フォーラム(東京), 2014 年 9 月 12 日～14 日.
4. 井上実, 各務秀明, 朝比奈泉: 自己骨髄間質細胞を用いた歯槽再生の臨床研究. 第 44 回日本口腔インプラント学会, 東京国際フォーラム(東京), 2014 年 9 月 12 日～14 日.
5. 各務秀明, 井上実, 田口明, 朝比奈泉: 自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生臨床研究: 長期経過に関する検討. 第 44 回日本口腔インプラント学会, 東京国際フォーラム(東京), 2014 年 9 月 12 日～14 日.
6. 江頭寿洋, 住田吉慶, 三浦桂一郎, 中谷佑哉, 長井一浩, 朝比奈泉: 骨髄濃縮液による骨再生の試み-BMP の骨誘導能に対する促進効果の検討- 第 22 回長崎障害者支援生成医療研究会, 長崎大学良順会館(長崎), 2014 年 7 月 22 日.
7. 古賀喬充, 南里篤太郎, 井隆司, 住田吉慶, 朝比奈泉: 脱灰象牙質を用いた歯槽骨再生の臨床. 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 福岡国際会議場(福岡), 2013 年 10 月 11 日～13 日.
8. 三浦桂一郎, 住田吉慶, 梅林真由美, 中谷佑哉, 長井一浩, Weijian Zhong, 朝比奈

泉：骨髄濃縮液によるBMP-2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，栃木県総合文化センター（栃木），2013年5月22日～24日。

9. 末廣史雄,西村正宏,上田忠佳,坂井裕大,朝比奈泉,村田比呂司：低血清培養による顎骨骨髄由来間質細胞を用いた新規顎骨再生医療の開発，第12回日本再生医療学会総会，パシフィコ横浜（神奈川県），2013年3月21日～23日。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝比奈 泉 (ASAHINA, Izumi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授
研究者番号：30221039

(2) 研究分担者

住田 吉慶 (SUMITA, Yoshinori)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授
研究者番号：50456654

西村 正宏 (NISHIMURA, Masahiro)
鹿児島大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：00294570

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：