

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670871

研究課題名(和文)機能性microRNAデリバリーシステムによる非培養脂肪組織幹細胞からの骨再生

研究課題名(英文)Functional miRNA promotes the bone regeneration with rhBMP2 and ADCs

研究代表者

田島 暢崇(TAJIMA, Nobutaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：00447492

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、骨形成に関わる機能性miRNAを補助的に全身や局所にdeliveryすることで、BMPと非培養脂肪細胞(ADC)による骨再生を効果的に達成することを試みた。実験は、まず脂肪由来間葉系幹細胞(AD-MSC)の培養において、骨芽細胞分化の誘導中に発現の変動の大きいmiRNAsの抽出から開始した。その結果、ある特定のmiRNAを抽出し、それをAD-MSCに遺伝子導入し、培養を行なったところ、pparの発現抑制やrunx2の発現上昇を認めた。そのため、低用量BMP2とADCのマウス頭蓋骨欠損部への移植に、そのmiRNAを組み合わせたと、骨形成を促進させ得ることが一部示唆された。

研究成果の概要(英文)：Direct implantation of freshly isolated adipose-derived cells (ADC) 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 adipose mesenchymal stem cells (AD-MSC) were exposed to rhBMP2 for osteoblastic induction in culture to search the candidates of miRNAs. As a result, when a certain miRNA, which were chosen in vitro assay, were transplanted with ADC and minimal amount of BMP2, we found this 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 脂肪由来細胞 microRNA

### 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。申請者のグループは、現在まで人工代用骨に骨誘導能を付与するため、BMPを応用した骨再生を試みてきた。その中で、老齢な高等動物の大きな骨欠損を確実に再生するには、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第I相臨床研究から、培養細胞の増殖・分化能には個体差が大きく、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が、移植に必要な細胞数を確保するために培養を重ねると、急速に可塑性を失うことも見出した。ここで、申請者らは、骨再生に必要な細胞を組織から採取し、培養操作を加えることなく移植することで、容易で確実な骨再生法を検討する必要があるとの結論に至った。そこで本研究では、on siteで脂肪組織から豊富に採取できるADCに着目し、それを直接骨欠損部位に応用することを考えた。

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- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ 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。実際、マウス頭蓋骨欠損へのMSC移植に、制御性T細胞(Treg cells)の静脈投与を併用すると、有意に骨形成が促進される。そこで、申請者らは、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、miRNA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、miRNAを生体内へデリバリーすることで、脂肪組織から採取した幹細胞濃縮液を、培養操作を介さずに直接生体に応用する簡便で効果的な骨再生療法を開発することである。具体的には、炎症や骨形成に関わる機能性miRNAを補助的に全身や局所にデリバリーすることで、BMPと非培養脂肪由来細胞(ADC)による骨再生を効果的達成することを試みる。

### 3. 研究の方法

低濃度BMPとADC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、ADC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。

骨形成に機能するmiRNAの探索：

マウスAD-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。次に、骨形成に関わる因子の候補として抽出したmiRNAについて、AD-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。

骨形成に機能するmiRNAの生体へのデ

リバリリーによる骨形成促進の検討：

低濃度 BMP2 と ADC 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  $\beta$ 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、ADC 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、移植モデルの作出後、miRNA の候補の選定とその投与効果の評価を順に行った。

低濃度 BMP2 と ADC による骨再生：

通常濃度のほぼ半量の BMP2 を  $\beta$ -TCP 顆粒に吸着させた試料において、ADC 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が観察された。それ以下の濃度の BMP2 を吸着させた場合、移植後 2 週では骨形成が認められず、それ以上では移植後 2 週で骨形成を十分に認めるようになった。そのため、通常濃度の半量程度を臨界濃度と考え、以降の評価に応用することとした。

miRNA の選定：

AD-MSc を BMP2 添加培地で培養を行い、ALP 活性がピークに達するまでのいくつかのタイムポイントで、細胞から miRNA の抽出を行い、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 3-7 日にかけて、変動の大きい miRNA をいくつか検出することができた。そのため、その中から過去の論文データとも照らし合わせて、ひとつの miRNA を候補として抽出し、その発現プラス

ミドを作製して、AD-MSc への導入を行うことで、骨芽細胞分化に対する機能を評価した。その結果、遺伝子導入を行った AD-MSc を継続培養したところ、*ppary* の発現抑制や *runx2* の発現上昇を認めた。そのため、この miRNA の機能を *in vivo* にて検討することとした。

miRNA の生体へのデリバリリーによる骨形成促進の検討：

半量濃度の rhBMP2 を吸着させた  $\beta$ -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、ADC を播種した試料を、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データを一部得ているが、その結果の再現性やメカニズムを含めた詳細な検討を実施し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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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

田島 暢崇 (TAJIMA, Nobutaka)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
客員研究員  
研究者番号：00447492

(2)研究分担者

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

(3)研究分担者

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