

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861667

研究課題名(和文)細胞賦活因子の徐放制御機構を具備した多層性ナノアパタイト-コラーゲンの開発

研究課題名(英文) Development of the multi-shell nanohydroxyapatite-collagen scaffold with control system of releasing growth factor

研究代表者

天雲 太一(Tenkumo, Taichi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80451425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：組織再生療法では、細胞、足場(担体)、成長因子の3要素が必須といわれている。今回の研究では、骨組織の再生を目的として、BMP-2を分泌するプラスミドを含有したリン酸カルシウム遺伝子導入ベクターとナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体(担体)を組み合わせ、この上で未分化間葉細胞を培養したところ、細胞は担体に進入し、BMP-2が分泌されていることを観察した。このことから遺伝子導入ベクターを担体と組み合わせることで、組織再生に必要な成長因子を分泌させる生体材料を開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Fundamental elements of tissue regeneration include cells, growth factors, and a scaffold. This study aimed to fabricate a growth factor releasing biodegradable scaffold for tissue regeneration. We prepared multi-shell calcium phosphate (CaP) nanoparticles functionalised with DNA, polyethyleneimine (PEI), protamine, and octa-arginine (R8), and compared their respective transfection activity and cell viability measures using human mesenchymal stem cells. These experiments demonstrated that the scaffolds were associated with moderate hMSC cell viability and were capable of releasing the BMP-2 protein into hMSCs following gene transfection. In particular, the scaffold loaded with protamine-containing CaP nanoparticles demonstrated the highest cell viability and transfection efficiency in hMSCs; thus, it might be suitable to serve as an efficient growth factor releasing scaffold.

研究分野：歯周組織再生

キーワード：ナノハイドロキシアパタイト リン酸カルシウム 遺伝子導入 生体材料 プロタミン

### 1. 研究開始当初の背景

骨組織などの硬組織再生研究では、細胞、scaffold、細胞賦活因子(成長因子)の3要素を組み合わせることで、組織が再生できることが報告されている。この中で成長因子とscaffoldを併用する場合、その多くは成長因子が溶解した溶液にscaffoldを浸漬させて、生体に移植させている。しかし、組織再生療法では、成長因子が作用する適切な時期は、治癒の後半であり、移植した成長因子の多くがすでに放出され、効果的な供給になっていない可能性がある。そのため、高濃度の成長因子を用いる戦略が取られているが、一方で、局所的・短期的な高濃度の成長因子は骨吸収などの真逆の効果が現れることが報告されている。

発生学的には、局所の細胞が、適切な時期に適切な成長因子を放出しあうことで組織を構築している。組織再生療法においても同様に、scaffold内に侵入してきた細胞が適切な成長因子を局所に放出することで、効果的に組織再生を促せる可能性があると思われる。その方法として、我々は遺伝子導入に着目した。リン酸カルシウムは骨の主成分である一方で、遺伝子導入材として細胞に遺伝子導入できることが従来から知られている。しかし、遺伝子導入効率が低いことが問題とされていたが、我々は、これまでにリン酸カルシウム粒子を3重構造にすることやペプチドを付与することで遺伝子導入効率や細胞毒性が変化することを明らかにしてきた。

また、一方で、我々はこれまでナノハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(以下nHAC)を作製し生体分解性・生体親和性に優れたscaffoldであることを報告してきた。このscaffoldにリン酸カルシウム遺伝子導入ベクター(以下CaP)を組み込むことでscaffold内に進入してきた細胞に対して遺伝子導入を行い、成長因子を分泌させることで効果的に組織再生を促すことができる可能性がある。

### 2. 研究の目的

これまでに開発してきたナノハイドロキシアパタイト・コラーゲンに遺伝子をコードしたナノリン酸カルシウム顆粒ベクターを付与させることで、遺伝子徐放制御機構を具備したナノハイドロキシアパタイト・コラーゲンscaffoldを開発することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) リン酸カルシウムナノ粒子遺伝子導入ベクター(CaP)の作製

pHを9.0に調整した硝酸カルシウム(18mM)およびリン酸二アンモニウム(10.8mM)を等量混合後、ヒトBMP-2(pUC57)もしくはGFP1をコードしたプラスミドDNA(pAcGFP1)(1mg/mL)をそれぞれ単独もしくはプロタミン(10mg/mL)と複合体を形成したものを添加し、攪拌後、再度等量の硝酸カ

ルシウムおよびリン酸2アンモニウムを加え、最後にオクタ-アルギニン(以下R8)(1mg/mL)、ポリエチレンイミン(以下PEI)もしくはプロタミン(10mg/mL)を加えて攪拌した。その後、4000rpmで30分間遠心分離にかけ、余剰のペプチドを分離した後、超音波(UR-20P, Tomy, Japan; frequency: 21kHz)で攪拌した。得られた各種CaP粒子の分散率、大きさおよび電位を図1に示す。また、コントロールとしてLipofectamine®を使用した。

Sample	PDI	Average size / nm	ζ potential / mV
① CaP/DNA/CaP/R8	0.442±0.10	298±64	+2±0
② CaP/DNA/CaP/PEI	0.391±0.00	188±27	+37±2
③ CaP/DNA/CaP/Protamine	0.254±0.01	233±59	+12±3
④ CaP/DNA/CaP/PEI-Protamine	0.289±0.03	296±26	+16±1
⑤ CaP/DNA-Protamine/CaP/R8	0.445±0.08	149±64	+11±0
⑥ CaP/DNA-Protamine/CaP/PEI	0.411±0.08	100±28	+33±5
⑦ CaP/DNA-Protamine/CaP/Protamine	0.295±0.03	240±134	+12±1

図1 各種Capの分散率、大きさ、電位

#### (2) ナノハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(nHAC)の作製

アテロコラーゲンを塩酸に溶解して塩酸1型コラーゲンを精製し、中性リン酸buffer( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ )を加え、さらに $\text{CaCl}_2$ に加え( $\text{Ca}:\text{P}=5:3$ )、37度で12時間インキュベートした。遠心分離(2500rpm)に30分間かけた後、上澄み液を捨て、円柱状に成型後、1%EDC(1-エチル・3-カルボジイミド塩酸塩)で1時間架橋後、1%グリシンで架橋反応を停止させた。水洗後、12時間、凍結乾燥した(0.08mbar,  $-80^\circ\text{C}$ )。

#### (3) nHAC/CaPの作製

(2)で作製したnHACにhBMP-2(pU57)を含有したCaP/DNA-protamine/CaP/R8、CaP/DNA-protamine/CaP/PEIもしくはCaP/DNA-protamine/CaP/protamine懸濁液をそれぞれ加え、12時間、凍結乾燥した(0.08mbar,  $-80^\circ\text{C}$ )。凍結乾燥後、 $-20^\circ\text{C}$ 下で保存した。

#### (4) 細胞培養

hMSCs (HMSC.BM-100, Cellular Engineering Technologies, USA)は、10%FBS, 100U/mLペニシリン-100U/mLストレプトマイシン含有D-MEMを用いて培養した。本実験では、3-7継代の細胞を使用した。

Wister系ラットの切歯から歯髄組織、歯根膜組織を採取し、10%FBS, 100U/mLペニシリン-100U/mLストレプトマイシン含有D-MEMを用いて培養した。本実験では、2-5継代の細胞を使用した。

ヒト腫瘍細胞であるHeLa細胞およびSoas2細胞(Cellular Engineering Technologies, USA)は、10%FBS, 100U/mLペニシリン-100U/mLストレプトマイシン含有D-MEMを用いて培養した。

#### (5) 遺伝子導入試験(in vitro)

##### hMSC に最適な遺伝子導入剤の検討

24 穴プレートに  $2 \times 10^4$ /well となるように hMSC 細胞を播種し、5%CO<sub>2</sub>、37 環境下で培養した。24 時間後、培養液を交換後、で作成した各種 CaP 遺伝子ベクター (AcGFP-1 もしくはヒト BMP-2 (pUC57) 含有) 50  $\mu$ L を添加した。7 時間後、再度新鮮な培養液に交換した。

遺伝子導入から 72 時間後に、AcGFP-1 を含有した CaP 群では、光学顕微鏡並びに蛍光顕微鏡下で観察し、遺伝子導入効率を計測した。細胞毒性については MTT 試験 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Sigma, Japan) assay を行い計測した。hBMP-2 (pU57) を含有した CaP 群では、培養中の BMP-2 濃度について ELISA (Human Bone Morphogenetic Protein 2 ELISA Development Kit, Promokine, USA) を用いて測定した。

##### nHAC/CaP scaffold 上での遺伝子導入効率

hBMP-2 (pU57) を含有した各種 nHAC/CaP scaffold を 24 穴プレートに設置し、 $2 \times 10^4$  個となるように hMSC 細胞を播種し、72 時間後の培養液中の BMP2 濃度について ELISA を用いて測定後、細胞毒性を調べるために scaffold に対して MTT 試験を行った。細胞増殖性を調べるため、72 時間培養後の nHAC/CaP scaffold を超音波粉碎 (UR-20P, Tomy, Japan; frequency) し、DNA 量を測定した。遺伝子導入後の BMP-2 分泌期間を調べるため、同様に hBMP-2 (pU57) を含有した各種 nHAC/CaP scaffold を 24 穴プレートに設置し、 $2 \times 10^4$  個となるように hMSC 細胞を播種し、19 日間 5%CO<sub>2</sub>、37 環境下で培養した。培養液は毎日交換し、培養液中の BMP2 濃度を測定した。

##### 遺伝子導入試験(in vivo)

の結果をもとに 0, 5, 10, 25, 50  $\mu$ L の CaP/DNA-protamine/CaP/Protamine 懸濁液を用意した。架橋剤を EDC もしくはアスコルビン酸・塩化銅で作成した nHAC もしくはコラーゲン scaffold としてテルダーミス® (オリンパスモバイオマテリアル、東京) を作製し、それぞれ CaP 添加することで、CaP の含有量の異なる nHAC/CaP scaffold、およびテルダーミス®/CaP を作製した。

Wister 系ラット (雄、8 週齢) 背部皮下にそれぞれ移植し、4、7、14、21、28 後にトサツし、移植周囲組織ごと摘出し、組織内に含まれる BMP2 濃度、ALP 活性を測定し比較検討した。

ラット歯髄細胞、歯根膜細胞に対する遺伝子導入効率・細胞毒性の検討  
24 穴 plate に  $2 \times 10^4$ /well となるように

で採取、培養したラット歯髄細胞、歯根膜細胞を播種し、5%CO<sub>2</sub>、37 環境下で培養した。24 時間後、培養液を交換後、(1) で作成した AcGFP-1 を含有した各種 CaP 遺伝子ベクター懸濁液を添加した。7 時間後、再度新鮮な培養液に交換した。遺伝子導入から 72 時間後に、AcGFP-1 を含有した CaP 群では、光学顕微鏡並びに蛍光顕微鏡下で観察し、遺伝子導入効率を計測した。細胞毒性については MTT 試験を行った。

##### HeLa 細胞、Soas2 細胞に対する遺伝子導入効率・細胞毒性の検討

24 穴プレートに  $2 \times 10^4$ /well となるように HeLa 細胞もしくは Soas2 細胞を播種し、5% CO<sub>2</sub>、37 環境下で培養した。24 時間後、培養液を交換後、(1) で作成した AcGFP-1 を含有した各種 CaP 遺伝子ベクター懸濁液を添加した。7 時間後、再度新鮮な培養液に交換した。遺伝子導入から 72 時間後に、AcGFP-1 を含有した CaP 群では、光学顕微鏡並びに蛍光顕微鏡下で観察し、遺伝子導入効率を計測した。細胞毒性については MTT 試験を行った。

##### CaP の細胞取り込み経路の同定

96 穴プレートに  $5 \times 10^3$ /well になるように HeLa 細胞、Soas2 細胞、hMSC 細胞を播種し、24 時間 5%CO<sub>2</sub>、37 環境下で培養した。(1) で作製した AcGFP-1 含有各種 CaP 遺伝子ベクター懸濁液を添加する 30 分前にスクロースもしくは、メチル シクロデキストリン、10 分前にアミロライド、もしくは LY294002 それぞれ添加した。遺伝子導入 4 時間後に、蛍光顕微鏡下で遺伝子導入効率を測定し、細胞へ取り込み経路を検索した。

## 4. 研究成果

### (1) hMSC に対する遺伝子導入試験

各種 CaP ベクターの hMSC に対する遺伝子導入効率及び細胞毒性の結果を図 2 に示す。PEI を含む CaP は Lipofectamine® と同等の遺伝子導入効率を示した。R8 及びプロタミンを付与した CaP の高い細胞親和性を示したが、遺伝子導入は低かった。一方、Plasmid DNA とプロタミンの複合体を含有した CaP では、全ての群で細胞親和性が向上した。また、プロタミン群の遺伝子導入効率は有意に上昇した。

Sample	Transfection efficiency (%)	Cell viability (%)
CaP/DNA/CaP/R8	41 ± 10	73 ± 16
CaP/DNA/CaP/PEI	61 ± 7	42 ± 10
CaP/DNA/CaP/Protamine	23 ± 5	65 ± 7
CaP/DNA-Protamine/CaP/R8	43 ± 9	62 ± 12
CaP/DNA-Protamine/CaP/PEI	51 ± 5	65 ± 5
CaP/DNA-Protamine/CaP/Protamine	48 ± 8	89 ± 16
Lipofectamine® 2000	54 ± 9	56 ± 8
Untreated cells	0 ± 5	100 ± 19

図 2 : hMSC に対する遺伝子導入効率・細胞毒性

このことから、Plasmid DNA をプロタミンで複合体化することは、作製した Cap 遺伝子ベクターに付与する際に有用であることが明らかとなった。

この結果をもとに nHAC/CaP scaffold を作製し、hMSC 細胞に対する BMP-2 濃度 (図 3A)、細胞増殖性 (図 3B)、細胞毒性を調べた (図 3C)。

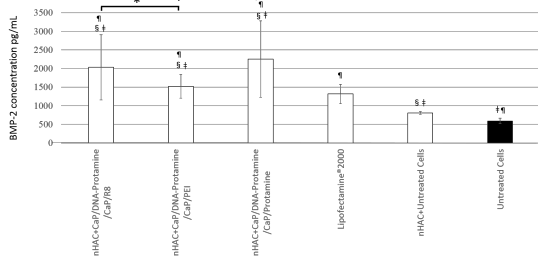


図 3A : hMSC 細胞に対する BMP-2 濃度

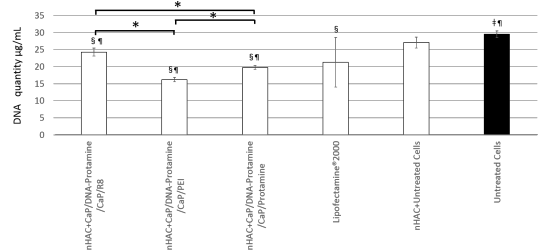


図 3B : 細胞増殖試験

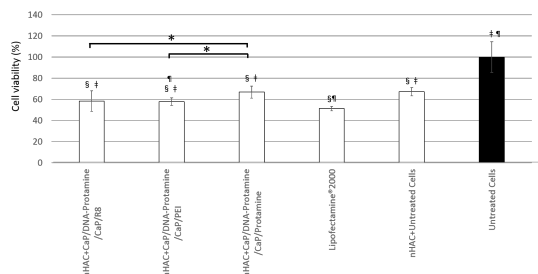


図 3C : 細胞毒性試験

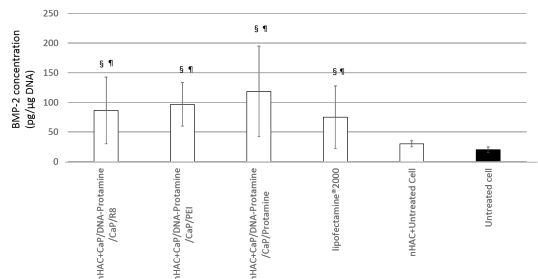


図 3D : BMP-2/DNA 量

nHAC/CaP 群の培養液中の BMP-2 濃度は CaP を含まない群と比較して有意に高い濃度を示した。このことは、nHAC/CaP scaffold 上で scaffold 内に侵入、付着した細胞に対して遺伝子導入が成功したことを示している。一方

で PEI を含有した BMP-2 濃度は他の nHAC/CaP 群と比較して有意に低かった。細胞毒性に関して、CaP 配合群は nHAC + untreated cell 群と比べて有意差が見られなかった。細胞増殖性は、nHAC+cell 群及び細胞のみをプラスチックシャーレに培養した群と比較して有意に低かったが、Lipofectamine 群とは同等の細胞増殖能を示した。nHAC/CaP 間では PEI を含有した群が他と比較して有意に低かった。

しかし、BMP-2/DNA 量で比較すると、nHAC/CaP 群間で有意な差は認められなかった (図 3D)。この結果は、CaP 単独の結果と同じであったことから、nHAC/CaP の遺伝子導入効率、細胞毒性は CaP の遺伝子導入効率、細胞毒性に依存することが明らかとなった。さらに遺伝子導入後の BMP-2 の分泌期間について図 4 に示す。Cap/DNA-protamine/CaP/R8 及び Cap/DNA-protamine/CaP/protamine 群では、分泌のピークは 4 日目を示し、その後減少したのに対し、Cap/DNA-protamine/CaP/PEI 群ではピークは 2 日目に認められ、その後減少した。全ての nHAC/CaP 群は遺伝子導入後、10 日目まで BMP-2 を分泌することが明らかとなった。

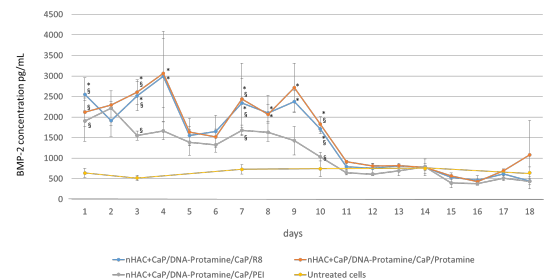


図 4 : 遺伝子導入後の BMP-2 放出量

これらのことから、本研究では、nHAC scaffold に CaP 遺伝子導入ベクターを組み込むことで、scaffold に侵入した細胞に対して遺伝子導入できること、特に hMSC 細胞については CaP ベクターは Cap/DNA-protamine/CaP/R8 もしくは Cap/DNA-protamine/CaP/protamine が有効であることが明らかとなった。

## (2) 遺伝子導入効率 (in vivo)

摘出した組織内の BMP-2 濃度を測定したところ、CaP を含む全ての群で有意に高い BMP-2 濃度を示した。BMP-2 の分泌時期は、基盤となる生体材料が大きく影響することが認められた。また、ALP 活性は放出される BMP-2 濃度に関連することが認められた。しかし、Cap の配合率で比較した場合、大きな違いは認められなかった。このことから、CaP を配合した生体材料を生体内に移植しても、局所細胞に遺伝子導入することができ、目的とするタンパクを徐放できること、そのタンパク放出期間は scaffold に依存することが明らかとなった。

(3) ラット歯髄細胞、歯根膜細胞に対する遺伝子導入効率・細胞毒性  
細胞種により遺伝子導入効率および細胞毒性が異なることが明らかとなった。

(4) HeLa 細胞、Soas2 細胞に対する遺伝子導入・細胞毒性  
細胞種により遺伝子導入効率および細胞毒性が異なることが明らかとなった。特に Lipofectamine® と比較して作製した CaP ベクターは高い細胞親和性をもつことが認められた。

(5) 細胞取り込み経路について  
細胞種や CaP に付与するペプチドの濃度によって、各種 CaP の取り込み経路が異なることが認められた。

#### 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 1 件)

Taichi Tenkumo, Juan Ramón Vanegas Sáenz, Yukyo Takada, Masatoshi Takahashi, Olga Rotan, Viktoriya Sokolova, Matthias Epple, Keiichi Sasaki, Gene Transfection of Human Mesenchymal Stem Cells With a Nano-hydroxyapatite-collagen Scaffold Containing DNA-functionalised Calcium Phosphate Nanoparticles, Genes to Cells, 査読有、21 巻、2016 年、印刷中  
DOI: 10.1111/gtc.12374

〔学会発表〕(計 2 件)

Taichi Tenkumo, Juan Ramón Vanegas Sáenz, Yukyo Takada, Masatoshi Takahashi, Olga Rotan, Viktoriya Sokolova, Matthias Epple, Keiichi Sasaki, Gene transfection with the nanohydroxyapatite-collagen scaffold, containing DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles, 6<sup>th</sup> Hiroshima Conference and 50<sup>th</sup> Anniversary Commemoration, 2015 年 10 月 23-25 日、International Conference Center Hiroshima(広島)

天雲太一, Juan Ramon Vanegas Saenz, 高橋正敏、高田雄京、佐々木啓一、遺伝子徐放型生体材料の開発、粉体粉末冶金協会春季大会(第 116 回講演大会)、2015 年 5 月 26-27 日、早稲田大学国際会議場(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: リン酸カルシウム法を用いた遺伝子導入方法、ならびに当該方法に用いる遺伝子導

入剤およびキット

発明者: 天雲太一、バネガス サエンズ フアン ラモン、佐々木啓一

権利者: 天雲太一、バネガス サエンズ フアン ラモン、佐々木啓一

種類: 特許

番号: 特許願 2016-48612 号

出願年月日: 2016 年 3 月 11 日

国内外の別: 国内

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

天雲太一(Tenkumo, Taichi)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 80451425

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: