

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870441

研究課題名(和文)高機能改良型Gene Activated Matrixによる骨再生能の評価

研究課題名(英文)Bone regeneration ability of high functioning modified Gene Activated Matrix

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(歯学系)・助教

研究者番号：10634446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、従来の骨移植材料に遺伝子を組み込み骨形成能を向上させた骨再生材料の開発をめざしたものである。すなわち、Minicircle DNA とナノ粒子リン酸カルシウムとを複合し、これらを高分子足場材料に組み込んだ高機能改良型遺伝子活性化基質(Gene Activated Matrix, GAM)の開発が目的である。本研究において、骨形成性プラスミドベクターを搭載したアテロコラーゲンと β -Tricalcium Phosphateとを複合したGAMを用いて骨再生能を証明し、研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Bone regeneration therapy is key issue in oral and maxillofacial surgery. At present, autogenous bone graft is the gold standard, and we also have reported the benefit of secondary bone graft using particulate cancellous bone and marrow (K Miura, et al.2015). However, this technique has several drawbacks, such as limited quantity of harvested bone and excessive surgical intervention into healthy tissue. So excellent bone regeneration material is expected. During this period, we have demonstrated that lyophilized GAM, which consists of atelocollagen and pDNA encoding effective osteogenic proteins such as BMP4 or Runx2, induced the bone formation (M Umebayashi, et al. 2015). For clinical application of GAM, we will create the more effective biomaterial using nano-bioglass for increasing cell transplantation efficiency, Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCOL) for facilitating cell migration ability, and low dosage plasmid vectors going forward.

研究分野：歯学

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

【学術的背景】

口腔外科領域における骨再生材料について

現在は骨欠損に対し、自家骨移植が適用されているが、この代替手法として人工骨 (Hydroxyapatite (HA) や β -Tricalcium Phosphate (β -TCP)) がすでに応用されている (Kokubo T, et al, Biomaterials 24; 2003)。しかし、未だに自家骨移植が gold standard であり、組織再生の鍵となる細胞・成長因子・担体の三要素を兼ね備えた骨再生材料の開発が望まれている。これまで、申請者らはリン酸カルシウムの 1 種である Octacalcium Phosphate (OCP) と、担体としてのコラーゲンを複合化した OCP・Collagen 複合体 (OCP/Col) を用い、口腔外科領域の骨欠損がより効果的に再生し得ることを示した再現性の高い結果を報告した (K Miura, et al. IJOMS, 2012)。

骨再生材料に直接的にタンパクを組み込むデメリット

種々の骨再生材料に対し、骨形成促進タンパクを組み込み骨再生能を向上させる方法が用いられている。欧米では BMP-2 製品を用い、骨欠損に対し一定の成果を上げているが (Boyne et al. J Oral Maxillo Surg. 2005) いまだに大きな骨欠損には対応できていない。また、骨形成促進タンパクは、(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、これを改善すべく、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。

タンパク組み込みのデメリット改善のための遺伝子導入法と同手法の今後の課題について

現在、最も効果的な遺伝子導入法は、ウィルスベクターを用いた方法であるがウィルス感染の危険性が高いなどの欠点を有するた

め、安全で効果的な非ウィルス性ベクターであるプラスミドベクターが用いられている (Cao X, et al. Int J Nanomedicine 6;2011)。一方でプラスミドベクターは導入効率が低く、また、治療上不要な配列が存在し、予期せぬ免疫応答が起きるなどの欠点がある (Kobelt, et al. Mol Biotechnol 53;2013)。この欠点を改善するために、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部分を除外したものを Minicircle DNA と称し、安全性、遺伝子導入の効率化の点で有用とされている。

ナノサイエンスを用いた遺伝子導入効率化

申請者も 2013 年に報告 (K Miura, et al. Applied Surface Science. 2013) したように、近年になりナノサイエンステクノロジーが向上してきている。遺伝子治療領域においても、リン酸カルシウム微粒子が細胞貪食を起こしやすく、遺伝子導入法が効果的との報告がある (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

Bonadio らは、PTH 遺伝子を組み込んだコラーゲン基質 (Gene Activated Matrix) を骨欠損部に移植し、骨再生の可能性を示した (Nature Medicine 1999)。この方法は、遺伝子導入効率が低く、確実ではなかったが、東京医科歯科大学の春日井らは、リン酸カルシウムを用いることで、導入効率の問題を克服できることを示した (Endo, et al. Tissue Eng 2006)。

【本研究を申請するに至った経緯】

本研究は申請者の平成 24~25 年度の研究活動スタート支援による研究の成果を元にさらなる展開を目指した継続的研究である。すなわち、申請者は安全かつ遺伝子導入の効率を高めるため Minicircle DNA を用いることを発想したが、この plasmid の産生に成功し、

従来の plasmid に比して導入効率が高いことを、エレクトロポーション法を用いた *in vitro* における GFP の発現で確認した。さらに 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(従来型 GAM)を作製し、ラット(背部皮下、頭蓋骨欠損)に移植する Bioassay を行ったが、GFP の発現は認めるものの十分とは言いがたかった。そこで、より遺伝子導入効率を高め、確実な骨再生を実現するために以下の計画を立案した。

【この間の申請者の学術報告およびこの成果を応用し本研究を進展させるための計画】

申請者らは当該研究の対象であるリン酸カルシウムを従来よりも簡便に微小化することに成功し、かつその骨伝導性に関する新たな知見(K Miura, et al. Applied Surface Science, 2013) および、リン酸カルシウム系骨再生材料による再生骨の知見(A Matsui, et al. Cleft Palate-Craniofacial J, 2013 in press)を専門誌に報告してきた。そこで、申請者が作成し得たリン酸カルシウム微粒子を GAM に応用することを考えた。この微粒子は、ナノ-サブミクロンパーティクルであるが、これを単一ナノパーティクルにすることよりエンドサイトーシス(細胞貪食)が惹起されやすくなり、GAM の遺伝子導入効率がさらに高まることが期待されることから、効率の良いナノパーティクル作成法の検討を本研究の柱の一つとする。また基質として使用するコラーゲンは、従来、豚皮由来のものを用いていたが、よりコラーゲン線維が微細で細胞の貪食に有利に働くと考えられ animal product free の材料であるサケ鱗由来のコラーゲンを用いる。さらにヒト MSC に *in vitro* で遺伝子導入(BMP4, Runx2, FGF2)を行い、どの遺伝子(あるいはその組み合わせ)を導入すると最も骨芽細胞への分化能が高まるか bioassay で確認することをもう一つの柱とする。そし

て、これらの実験から判明した結果にもとづき、最終目標である高機能改良型 GAM を作製し、これをラット頭蓋冠臨界骨欠損部に移植し、経時的に骨形成の評価を行い高機能改良型 GAM の性能を確認する。

本研究は、前年度までの申請者の学術的報告および研究に基づき、ナノ粒子リン酸カルシウムの作製を達成し、Minicircle DNA を用いた分子生物学的手法、GAM の組織工学の手法を用いて、遺伝子導入法に関する学理をさらに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、高齢社会の進展に伴い顎骨および歯槽骨の再生はますます重要になってきている。現在、確実に有効な方法は新鮮自家骨移植だが、二次的外科的侵襲を要し採取量に限界があるなどの欠点がある。本研究では、従来の骨移植材料に遺伝子を組み込むことによって骨形成能を向上させた骨再生材料の開発をめざし、Minicircle DNA とナノ粒子リン酸カルシウムとを複合し、これらを高分子足場材料に組み込んだ高機能改良型遺伝子活性化基質(Gene Activated Matrix, GAM)の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、

改良型 GAM の作製

改良型 GAM の *in vitro* での骨芽細胞分化能の検討に基づいた高機能改良型 GAM の作製

高機能改良型 GAM を用いた *in vivo* (ラット頭蓋冠臨界骨欠損)での検討を行う。

4 . 研究成果

口腔外科領域では骨再生療法は重要な課題である。現在、新鮮自家骨移植が最も有効で、申請者も有用性を報告している(K Miura, et al.2015)。しかし、外科的侵襲や採取量の問題で、人工骨再生材料の開発が望まれている。本研究は、従来の骨移植材料に遺伝子を組み込み骨形成能を向上させた骨再生材料の開発をめざしたものである。すなわち、Minicircle DNA とナノ粒子リン酸カルシウムとを複合し、これらを高分子足場材料に組み込んだ高機能改良型遺伝子活性化基質 (Gene Activated Matrix, GAM) の開発が目的である。これまでにわれわれは骨形成性プラスミドベクター(pBMP4,pRunx2)を搭載したアテロコラーゲンによる遺伝子活性化基質(Gene Activated Matrix: GAM)を含浸した β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) を用いて骨再生能を証明した(M Umabayashi , et al. 2015)が、大量のプラスミド DNA が必要であった。したがって、今後は GAM の臨床応用を目的にナノバイオグラスを用いて遺伝子導入効率を高めるとともに低接着性コラーゲンを用いて細胞遊走能の促進を図り、低用量プラスミドベクターを保持した新規バイオマテリアルを開発し、骨再生療法の臨床応用を目指す。

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 10 件)

1. Miura K, Yoshida M, Yamaguchi K, Yoshida R, Asahina I. Sonographic evaluation of bone formation after sagittal split ramus osteotomy. J Ultrasound Med. 2016 Feb; 35(2): 395-400 査読あり
2. Sanuki T, Mishima G, Kurata S, Watanabe T, Kiriishi K, Tachi Mizuki,

Ozaki Y, Okayasu I, Kawai M, Matsushita Y, Miura K, Ayuse T J Dent Anesth Pain Med. 2015 Sep;15(3):129-134. 査読あり

3. Miura K, Yoshida M, Asahina I. Secondary Bone Grafting With Simultaneous Auto-Tooth Transplantation to the Alveolar Cleft. JOMS. June 2015 Volume 73, Issue 6, Pages 1050–1057 査読あり
4. 三浦桂一郎, 朝比奈泉. "高齢者の口蓋垂に生じた扁平上皮乳頭腫の1例." 日本口腔内科学会雑誌 20(1): 8-13. 査読あり
5. 三浦桂一郎, 朝比奈泉. "抜歯後止血困難を呈した血友病Aの2例." 日本口腔内科学会雑誌 20(2): 38-41. 査読あり
6. Matsui, A., K. Matsui, T. Handa, Y. Tanuma, K.Miura, Y. Kato, T. Kawai, O. Suzuki, S. Kamakura, and S.Echigo, "The regenerated bone quality by implantation of octacalcium phosphate collagen composites in a canine alveolar cleft model," Cleft Palate Craniofac J 51:4 (Jul 2014), 420-430. 査読あり

[学会発表] (計 18 件)

1. 南里篤太郎,古賀喬充,河井洋祐,井 隆司, 三浦桂一郎,大場誠悟,住田吉慶,朝比奈泉:脱灰象牙質の脱灰程度と顆粒の大きさの違いが骨再生に与える影響.第 18 回日本顎顔面インプラント学会学術大会,島根,2014 年 11 月 29 日
2. 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 2014 年 9 月 13 日
3. 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,2014年7月22日

4. 古賀喬充,南里篤太郎,河井洋祐,三浦桂一郎,井 隆司,住田吉慶,朝比奈 泉:脱灰象牙質の脱灰程度と顆粒の大きさの違いが骨再生に与える影響.第68回NPO法人日本口腔科学会学術集会,東京,2014年5月9日

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(歯学系)・助教

研究者番号：1000010634446