

ID No.	131
研究課題名	機能性 microRNA の生体内 delivery による骨再生促進システムの開発
研究代表者	朝比奈 泉 (長崎大学・教授)
研究組織	
受入教員	渡邊 すみ子 (東京大学医科学研究所・特任教授)
研究分担者	住田 吉慶 (長崎大学・准教授)
	河井 洋祐 (長崎大学・助教)
	梅林 真由美 (長崎大学・助教)
	江頭 寿洋 (長崎大学・大学院生)
研究報告書	
<p>本研究期間では、まずmicro(mi)RNAの選定に先がけて、移植モデルの作出から実験を開始した。本研究では、局所での炎症反応の抑制や骨芽細胞分化の促進に関わる機能性miRNAを応用することで、低濃度BMPと非培養脂肪細胞(ADCs)による効果的、且つ安全な骨再生を実現することを目的の一つとしている。そのため、候補となるmiRNAの機能を評価するための有用な移植モデルが必要と考え、低濃度BMP2と非培養ADCsによる移植条件において、骨誘導が可能となるBMP2の臨界濃度の検討を行なった。その結果、通常濃度(25µg/ml)の半量となる12.5µg/mlにて20mgリン酸カルシウムにBMP2を吸着させ、それにmouse-ADCsを播種した複合体を頭蓋骨上に移植した時に、骨形成が僅かに認められた。それに対して、それ以下の濃度では骨形成を認めることができなかった。そのため、12.5µg/mlが骨形成を誘導し得る臨界濃度と考え、miRNAの機能解析の移植モデルに使用することとした。</p> <p>一方、BMPには浮腫を誘発する副反応や長期保存維持の不安定性などの問題点が存在し、低濃度BMPを使用するとしても、これらの問題点が解決されない可能性がある。そこでわれわれは、大量精製が可能であるplasmid DNAを搭載した基質(遺伝子活性化基質; GAM)に着目した。GAMは内包したplasmid DNAを生体内で細胞に直接導入し、蛋白より安全にかつ長期間機能することが期待される。現在、GAMによる骨再生研究が行われつつあるが、GAMは遺伝子導入効率が低いという欠点があり、それを補うために培養細胞の添加やウイルスベクターの使用、および遺伝子導入試薬の併用が行われている。しかし、われわれは、BMP遺伝子搭載型GAMによる骨再生法を確立するため、細胞やウイルスベクターおよび試薬を用いず、BMPをコードする少量のplasmid DNAとコーゲン基質のみからなるGAMに、炎症抑制やBMP遺伝子の発現や維持に関わるmiRNA</p>	

を搭載することで、効果的な骨再生を図ることも目的の一つとすることにした。

実験はまずBMP4をコードするplasmid DNA (pBMP4)を搭載したatelocollagen基質のGAMIについて、骨再生の誘導が可能なpBMP4量の検討を行った。実験方法は、ベクターにはplasmid IRES-AcGFPを用い、これを対照 (pGFP)として使用すると共に、それぞれのDNAを組み込み発現ベクターとした (pBMP4)。作製したベクターは細胞内活性を確認するため、*in vitro*で $5 \times 10^5$ 個のMC-3T3に0.02mgのベクターを導入後、骨分化マーカーであるALPの活性測定を行った。GAMIは0.02、0.1、1mgのplasmid DNAと100 $\mu$ lの2% bovine-atelocollagen及び20mgの $\beta$ -TCP顆粒を混和後、凍結乾燥して作製した。このGAMを6-7週齢のF344ラットの頭蓋骨上および9mmの頭蓋骨骨欠損部に移植を行った。移植した試料は、術後2週で遺伝子導入を確認するためGFP発現を観察し、術後4、8週で新生骨形成の状態を組織学的・免疫組織学的に評価することにした。

その結果、*in vitro*では導入後1日でGFP発現を確認し、導入後4、7日でBMP4群がGFP群と比較して、有意に高いALP活性を示した。移植後2週で共焦点顕微鏡にて1mgのplasmid DNAを含んだGAMでのみGFPの発現が確認され、0.02mgと0.1mgの群では確認できなかった。移植後4週で、1mgのplasmid DNAを含んだBMP4群では、GFP群と比較して3倍の新生骨が認められた。移植後8週で新生骨量はGFP群では変化がないものの、BMP4群ではさらに増加し、GFP群と比較して4-5倍であった。骨欠損モデルにおいても同様な傾向を認め、実験群にのみ骨欠損内に偏在した骨再生を確認することができた。そのため、pBMP4を搭載したatelocollagen-GAMの機能を増強することが期待できるmiRNAを搭載するモデルとして、0.1mgと0.5mgのpBMP4を搭載したatelocollagen-GAMを応用し、機能的なmiRNAの選定をしていくこととした。

本研究課題の2年間で、機能性miRNAの生体内デリバリーを図るために、2つの実験モデルを確立した。現在、miRNAの発現プロファイル解析や、候補因子の合成2本鎖RNAの作製などmiRNAの選定に関わる実験に注力している。今後、候補となりえるmiRNAを順次それぞれの実験モデルに応用し、効果的な骨再生法の開発を進めていく予定である。