

博士論文概要

論文題目

Fabrication of DNA / Apatite
Nano-composite Layer for Gene Transfer
遺伝子導入のための DNA / アパタイト
ナノ複合層の設計構築に関する研究

申請者

Yushin	YAZAKI
矢崎	侑振

2013年5月

近年、「細胞」、「増殖・分化因子」、「足場（スキャホールド）」を適切に組み合わせ、機能させることによって、病気や事故などにより失われた臓器や組織の機能を回復させようという再生医療が注目されている。その際、組織や臓器の再生、及び機能回復のためには、幹細胞の増殖、分化を制御する必要がある。そのための手法の一つとして遺伝子導入が挙げられる。従来の遺伝子導入法は一般に、DNA と遺伝子導入剤の複合粒子を細胞が存在する培養液や生体内等の溶液相中に分散させる手順で行われる。しかしこのような手法では、液相中における粒子の動態制御が困難なため、遺伝子を導入する場所（位置）をコントロールすることは難しい。したがって、特に *in vivo* 応用においては、粒子の拡散による治療効果の低減や副作用（例えば、非標的細胞への遺伝子導入や、肝臓や肺などへの導入剤の蓄積による障害）が懸念される。同様に粒子の動態制御が困難なことに起因して、遺伝子が細胞に導入されるタイミングの制御、生体内の様に複数の細胞種が存在する系における特定の種類の細胞のみへの遺伝子導入なども困難である。一方、ハイドロキシアパタイトに代表されるリン酸カルシウムはバイオセラミックスとして広く知られ、生体材料学と臨床医学（特に整形外科や歯科）の領域で臨床応用されてきた。他方、分子生物学の分野では、リン酸カルシウムは非ウイルス系遺伝子導入剤として長く用いられてきた。1990年代に入り再生医療が注目され、上記の各分野でも再生医療応用に向けた研究が進められ始めた。例えば近年、リン酸カルシウム系材料の研究が組み合わせられ、DNA がナノスケールでリン酸カルシウムに担持された複合層（以下、D-CaP 層）が開発された。この複合層はバイオセラミックス及び遺伝子導入剤の両者の機能を併せ持つ。すなわち、高い生体適合性と、材料表面によって媒介される遺伝子導入機能を有する。もし、この D-CaP 層に課題である遺伝子導入の場所や時期のコントロール能、あるいは特定種の細胞（標的細胞）のみへの遺伝子導入能を付加し、リン酸カルシウム系遺伝子導入剤の欠点である遺伝子導入効率を改善できれば、再生医療用材料として大変有望であると期待される。そこで本研究では、（1）D-CaP 層上における場所特異的遺伝子導入法の開発、（2）D-CaP 層への溶解性制御因子担持による遺伝子導入時期のコントロール、（3）D-CaP 層への抗体担持による特定細胞腫への遺伝子導入効率の向上、（4）D-CaP 層への脂質担持による遺伝子導入効率の向上を目的とした。なお、本研究ではリン酸カルシウムとして特にハイドロキシアパタイトを用いた DNA / アパタイトナノ複合層（以下、D-Ap 層）の設計・構築を試みた。

本論文は 7 章により構成されている。

第 1 章では、本論文の研究背景と目的、そして概要について述べている。アパタイトの形成方法としては、焼結法、プラズマ溶射法、ゾル-ゲル法、アルカリ水熱法などが挙げられるが、本論文ではリン酸カルシウム過飽和溶液を用いた共沈法により D-Ap 層を高分子基材表面に形成した。DNA を添加した常温・常圧

の CaP 過飽和溶液中にこれらの基材を浸漬すると、CaP 結晶と DNA 分子の共沈反応によって基材表面に D-Ap 層を形成できる。さらに、CaP 過飽和溶液中に DNA とともに各種機能分子（溶解性制御因子、細胞接着分子、抗体、脂質など）を担持した D-Ap 層を形成した。この共沈形成のプロセスには CaP 結晶および DNA 分子、機能分子との静電的相互作用が関与していると考えられる。本研究で開発した D-Ap 層形成法の利点としては、体液に類似した CaP 過飽和溶液を用いたマイルドな環境で共沈反応を起こすことで、D-Ap 層中の DNA および各種機能分子の生理活性・機能のある程度保持することができることが挙げられる。また、この共沈形成法によればマトリックスである D-Ap 層の内部にも DNA および機能分子を担持できるので、あらかじめ高分子基材表面に形成したアパタイト層の表面に DNA および各種機能分子を吸着させる表面吸着法に比べて、多量の DNA および機能分子を担持し、徐放能を付与できる。第 2 章では、「DNA-フィブロネクチン-アパタイト複合層（以下、DF-Ap 層）上における場所特異的遺伝子導入、及び分化誘導」について述べている。なおフィブロネクチンは細胞接着性タンパク質の一種で、細胞表面に存在するレセプターと結合する性質を有する。このフィブロネクチンを D-Ap 層に担持することで同層表面における細胞接着を促進し、遺伝子導入効率を向上させる効果がある。本章では、異なる遺伝子を担持させた 2 種類の DF-Ap 複合層を 1 つのウェル内で隣接させ、その表面で細胞を培養することにより、それぞれの複合層表面に接着した細胞に、その複合層に担持させた遺伝子のみを場所特異的に導入する手法を確立した。また、それによって隣接した各基板表面に接着した細胞をそれぞれ別の方向に分化誘導できる可能性を示した。本研究で確立した DF-Ap 複合層を用いた遺伝子導入法により、目的の遺伝子を目的の場所の細胞に選択的に導入し、その分化を誘導できることが明らかになった。第 3 章では、「炭酸イオン、及びフッ化物イオンのドーピングによる DF-Ap 層上における遺伝子導入効率、及び導入時期の制御」について述べている。本章ではまず、コーティング溶液中として用いられる CaP 過飽和溶液中へ NaHCO_3 、あるいは NaF を添加することで、形成される DF-Ap 層に炭酸イオン、あるいはフッ化物イオンをドーピングさせる技術を確立した。炭酸イオンのドーピングにより DF-Ap 層の溶解性を向上させ、一方フッ化物イオンのドーピングにより DF-Ap 層の溶解性を低下させることができた。そして得られた各 DF-Ap 層表面で培養した細胞への遺伝子導入効率が、同複合層の溶解性と正の相関を示すことを見出した。すなわち、DF-Ap 層の溶解性を制御することでその表面における遺伝子導入効率を制御できることを見出した。また、DF-Ap 層の溶解性を低下させることで、同複合層表面上で遺伝子導入が起こる時期を遅延させることができた。以上より、コーティング溶液中への NaF や NaHCO_3 の添加により、同液中で形成される DF-Ap 層の溶解性を制御でき、それにより同複合層

表面における遺伝子導入の効率や時期を制御できることが明らかになった。第4章では、「DNA-抗体-アパタイト複合層（以下、DA-Ap層）上における細胞特異的遺伝子導入」について述べている。なお、抗体はフィブロネクチンと異なり非常に高い特異性を持って抗原に接着するタンパク質である。抗体は目的の細胞の表面に存在するタンパク質を抗原とするものを用いた。本章ではまず、抗体の抗体-抗原反応活性を失活させることなく、DA-Ap層を形成させる技術を確立した。そして得られたDA-Ap層表面で培養した細胞のうち、目的の細胞へのみ、遺伝子導入効率を向上させることができた。すなわち、抗体-抗原反応に高い特異性を利用した細胞特異的な遺伝子導入の可能性を見出した。第5章では、「DNA-脂質-アパタイト複合層（以下、DL-Ap層）を用いた高効率、かつ場所特異的遺伝子導入」について述べている。なお、本章で用いた脂質は、その分子中に親水部と親油部を持つ両親媒性物質の1種であり、水溶液中で凝集してナノからサブミクロンサイズの粒子「リポソーム」を形成する。リポソームの内部や表面にはDNAが結合し、DNA-リポソームコンプレックスを形成する。このDNA-リポソームコンプレックスが効率的に細胞内に取り込まれることで細胞内に遺伝子が導入される。リポソームを用いた手法は非ウイルス系としてはトップクラスの遺伝子導入効率を示すことが知られている。本章ではまず、脂質の遺伝子導入機能を失わせることなく、DL-Ap層を形成させる技術を確立した。DL-Ap層への脂質の担持により遺伝子導入効率を向上させることができた。その結果、DL-Ap層による導入効率は、DF-Ap層によるそれと比較しても有意に高い導入効率向上を達成した。また、DL-Ap層を用いて場所特異的に遺伝子を導入できることも明らかになった。第6章では、「共沈法、及び吸着法により作製したDL-Ap層の、遺伝子導入への応用における比較」について述べている。本章ではまず、共沈法と吸着法のいずれの方法でも脂質の遺伝子導入機能を失わせることなく、DL-Ap層を形成させる技術を確立した。共沈法によりDNAと脂質をDL-Ap層内部にまで担持させることで、吸着法により作製した同層よりも担持量を増加させ、より長期に渡ってそれらを徐放させることができた。その結果、共沈法により作製したDL-Ap層による導入効率は、吸着法により作製した同層によるそれと比較して有意に高かった。第7章では、「遺伝子導入への応用におけるDL-Ap層形成条件（DNA添加濃度、DNA/脂質比率）の最適化」について述べている。本章ではまず、種々のDNA添加濃度、DNA/脂質比率のDL-Ap層を形成させる技術を確立した。それぞれ2種類の脂質を用いてDL-Ap層を形成させた結果、脂質ごとに複合層形成条件をそれぞれ最適化する必要があることが明らかになった。第8章は「結論」である。本章では、本論文の成果を総括し、さらに再生医療や遺伝子治療などへの応用展開の可能性について述べている。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 矢崎侑振 印

(2013年 5月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
筆頭論文 (査読有)	<p>○ Coprecipitation of DNA-lipid complexes with apatite and comparison with superficial adsorption for gene transfer applications Yushin Yazaki, Ayako Oyane, Hideo Tsurushima, Hiroko Araki, Yu Sogo, Atsuo Ito, and Atsushi Yamazaki <i>Journal of Biomaterials Applications</i>. (掲載決定)</p> <p>○ Fabrication of DNA-antibody-apatite composite layers for cell-targeted gene transfer Yushin Yazaki, Ayako Oyane, Hiroko Araki, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki, Hideo Tsurushima <i>Science and Technology of Advanced Materials</i>. 2012, 13, 064204</p> <p>○ Control of gene transfer on a DNA-fibronectin-apatite composite layer by the incorporation of carbonate and fluoride ions Yushin Yazaki, Ayako Oyane, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki, Hideo Tsurushima <i>Biomaterials</i>. 2011, 32, 4896</p> <p>○ Control of Efficiency of Gene Transfer on Surface of DNA-Fibronectin-Apatite Composite Layer Yushin Yazaki, Ayako Oyane, Hideo Tsurushima, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki <i>Bioceramics</i>. 2009, 22, 547</p>
共著論文 (査読有)	<p>○ Fabrication of a DNA-lipid-apatite composite layer for efficient and area-specific gene transfer Ayako Oyane, Yushin Yazaki, Hiroko Araki, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki, Hideo Tsurushima <i>Journal of Materials Science: Materials in Medicine</i>. 2012, 23, 1011</p> <p>BMP-2 gene-fibronectin-apatite composite layer enhances bone formation Wei Zhang, Hideo Tsurushima, Ayako Oyane, Yushin Yazaki, Yu Sogo, Atsuo Ito, Akira Matsumura <i>Journal of Biomedical Science</i>. 2011, 18, 62</p> <p>Inhibition of hydrogen embrittlement of Ni-Ti superelastic alloy in acid fluoride solution by hydrogen peroxide addition Ken'ich Yokoyama, Yushin Yazaki, Jun'ich Sakai <i>Journal of Biomedical Materials Research Part A</i>. 2011, 98, 404</p> <p>Hydrogen Absorption and Thermal Desorption Behavior of Ni-Ti Superelastic Alloy Immersed in Neutral NaCl and NaF Solutions under Applied Potential Asahi Ota, Yushin Yazaki, Ken'ich Yokoyama, Jun'ich Sakai <i>Materials Transactions</i>. 2009, 50, 1843</p>
共著総説 (査読有)	<p>○ Gene transfer system using calcium phosphate composite layers for tissue engineering applications Ayako Oyane, Yushin Yazaki, Hideo Tsurushima, Xiupeng Wang, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki <i>Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan</i>. 2012, 19, 466</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 (筆頭)	<p>○ Effect of ion incorporation into a DNA-fibronectin-apatite composite layer on its gene transfer capability <u>Yushin Yazaki</u>, Ayako Oyane, Atsuo Ito, Yu Sogo, Hiroko Araki, Atsushi Yamazaki, Hideo Tsurushima 2012年6月 The 9th World Biomaterials Congress</p> <p>○ 抗体担持によるDNA-アパタイト複合層の遺伝子導入能向上 <u>矢崎侑振</u>、大矢根綾子、鶴嶋英夫、荒木裕子、十河友、伊藤敦夫、山崎敦司 2012年1月 つくば医工連携フォーラム2012</p> <p>○ Antibody immobilized in a DNA-apatite composite layer enhances gene transfer efficiency <u>Yushin Yazaki</u>, Ayako Oyane, Hideo Tsurushima, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki 2011年11月 11th Asian BioCeramics Symposium</p> <p>○ リポソーム-アパタイト複合層を利用した遺伝子導入システム —リポソーム構成分子の検討— <u>矢崎侑振</u>、大矢根綾子、十河友、伊藤敦夫、山崎淳司、鶴嶋英夫 2010年3月 日本セラミックス協会2010年年会</p> <p>○ リポソーム-アパタイト複合層を利用した遺伝子導入技術の開発 <u>矢崎侑振</u>、大矢根綾子、鶴嶋英夫、十河友、伊藤敦夫、山崎淳司 2010年1月 日本セラミックス協会第48回セラミックス基礎科学討論会</p> <p>○ DNA-抗体-アパタイト複合層を利用した 遺伝子導入技術の開発 <u>矢崎侑振</u>、鶴嶋英夫、大矢根綾子、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫 2009年11月 第31回日本バイオマテリアル学会大会</p> <p>○ Control of Efficiency of Gene Transfer on Surface of DNA-Fibronectin-Apatite Composite Layer <u>Yushin Yazaki</u>, Ayako Oyane, Hideo Tsurushima, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki 2009年10月 The 22nd International Symposium on Ceramics in Medicine</p> <p>○ アパタイト表面における細胞への遺伝子導入効率の制御 <u>矢崎侑振</u>、大矢根綾子、鶴嶋英夫、十河友、伊藤敦夫、山崎淳司 2009年3月 日本セラミックス協会2009年年会</p> <p>○ アパタイト表面における遺伝子導入の時間的コントロール <u>矢崎侑振</u>、大矢根綾子、鶴嶋英夫、山崎淳司、十河友、伊藤敦夫 2009年1月 つくば医工連携フォーラム2009</p> <p>○ アパタイト表面における遺伝子導入の空間的・時間的コントロール <u>矢崎侑振</u>、大矢根綾子、鶴嶋英夫、山崎淳司、十河友、伊藤敦夫 2009年1月 日本セラミックス協会第47回セラミックス基礎科学討論会</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 (共著)	<p>○ 細胞接着性タンパク質-アパタイト複合層を用いた遺伝子導入法の開発 矢崎侑振、大矢根綾子、鶴嶋英夫、村山雅美、山崎淳司、十河友、伊藤敦夫 2008年12月 日本セラミックス協会第12回生体関連セラミックス討論会</p> <p>過酸化水素添加によるフッ化物水溶液中におけるNi-Ti超弾性合金の水素脆化抑制 矢崎侑振、横山賢一、酒井潤一 2008年3月 日本金属学会第143回春季大会</p> <p>○ Biomimetic calcium phosphate coating and application to gene delivery Ayako Oyane, <u>Yushin Yazaki</u>, Wei Zhang, Xiupeng Wang, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki, Hideo Tsurushima 2013年6月 The 4th Asian Biomaterials Congress</p> <p>○ 遺伝子導入機能を有するアパタイト複合層の設計と応用 大矢根綾子、<u>矢崎侑振</u>、王秀鵬、十河友、伊藤敦夫、山崎淳司、鶴嶋英夫 2012年11月 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012</p> <p>○ A DNA-lipid-apatite composite layer mediates efficient and area-specific gene transfer Ayako Oyane, <u>Yushin Yazaki</u>, Hiroko Araki, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki, Hideo Tsurushima 2012年6月 The 9th World Biomaterials Congress</p> <p>○ Area-specific gene transfer on a DNA-fibronectin-apatite composite layer Ayako Oyane, <u>Yushin Yazaki</u>, Hideo Tsurushima, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki 2011年11月 11th Asian BioCeramics Symposium</p> <p>○ Control of efficiency and timing of gene transfer on apatite-based composite layer Ayako Oyane, Hideo Tsurushima, <u>Yushin Yazaki</u>, Hiroko Araki, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki 2011年3月 International Conference on Biomaterials Science 2011</p> <p>○ アパタイト複合層を利用した場所特異的遺伝子導入 大矢根綾子、<u>矢崎侑振</u>、鶴嶋英夫、十河友、伊藤敦夫、山崎淳司 2011年1月 つくば医工連携フォーラム2011</p> <p>その他3件</p>
その他 (受賞)	<p>○ ABC award <u>Yushin Yazaki</u>, Ayako Oyane, Hideo Tsurushima, Yu Sogo, Atsuo Ito, Atsushi Yamazaki 2011年11月 11th Asian BioCeramics Symposium</p> <p>○ 最優秀発表賞 <u>矢崎侑振</u>、大矢根綾子、鶴嶋英夫、村山雅美、山崎淳司、十河友、伊藤敦夫 2008年12月 日本セラミックス協会第12回生体関連セラミックス討論会</p>
その他 (特許)	9件出願