

梅林 真由美 論文内容の要旨

主 論 文

Gene activated-matrix comprised of atelocollagen and plasmid DNA encoding Bmp4 or Runx2 promotes rat cranial bone augmentation

BMP4/Runx2 遺伝子活性化基質によるラット頭蓋骨骨増生の試み

梅林 真由美、住田 吉慶、河井 洋祐、渡邊 すみ子、朝比奈 泉

BioResearch Open Access : in press

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：朝比奈 泉 教授)

[緒言]

骨再生研究では、生体材料への骨誘導能付与を目的に **bone morphogenetic proteins (BMPs)** の応用が試みられてきた。しかし、**BMP** には浮腫を誘発する副反応や高額な費用、さらに長期保存維持の不安定性などの問題点が存在する。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特徴である。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、細胞培養には多大な労力と時間およびコストがかかり、培養細胞の骨再生能には個人差がある。また、ウイルスベクターや試薬は細胞毒性があるため臨床応用が困難である。そこで本研究では臨床応用が可能な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、増量した **plasmid DNA** とコーゲンからなる **GAM** の骨再生への有用性を検討した。

[対象と方法]

GAMに搭載する plasmid DNA として、強力な骨形成因子である BMP4 及び転写因子である Runx2 を選定した。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、pRunx2)。作製したベクターは細胞内活性を確認するため、in vitro で 5×10^5 個の MC-3T3 に 0.02mg のベクターを導入し骨分化マーカーである ALP の活性測定を行った。GAM は 0.02、0.1、1mg の plasmid DNA と 100 μ l の 2% bovine-atelocollagen 及び 20mg の β -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 (オス) の頭蓋骨上および 9mm の頭蓋骨骨欠損部に移植した。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した。

[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 及び Runx2 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、少量の群では確認できなかった。移植後 4 週で GFP 群と比較して 1mg の plasmid DNA を含んだ BMP4 及び Runx2 群 (実験群) では 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、実験群では増加し、GFP 群と比較して 4-5 倍であった。抗オステオカルシン免疫染色では実験群の新生骨周囲に明らかな発現を認めた。さらに骨欠損モデルでは、実験群にのみ骨欠損内に偏在した骨再生が確認できた。

[考察]

本研究では、plasmid 量を増加することで遺伝子導入効率を高め、細胞やウイルスベクター及び遺伝子導入試薬を使用することのない GAM による骨再生の有効性が示唆された。plasmid の適正量については今後検討する必要があるが、がんや下肢の虚血に対する臨床研究において 1-16mg の plasmid を使用した症例で重篤な副作用が認められなかったことが報告されている。また今回、分泌蛋白である BMP4 と転写因子である Runx2 の骨形成能に大きな違いが確認できなかった。これまで GAM では移植部周囲にある線維芽細胞に遺伝子導入されると考えられていたが、Runx2 は線維芽細胞に導入されても骨芽細胞分化を促進しないことが報告されており、われわれの in vitro の結果と考え合わせると GAM は周囲にある間葉系幹細胞や骨前駆細胞などにも遺伝子導入している可能性が示唆された。アテロコラーゲン は低抗原性ですでに臨床応用されており、安全な plasmid 量の検討が進めば本研究の臨床応用は十分可能であると考えられる。