

氏名	おおくぼ やす のり 大久保 康 則
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2323号
学位授与の日付	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Osteoinduction with bone morphogenetic protein-2 expressing adenoviral vector (骨形成因子発現アデノウィルスベクターを用いた骨誘導能について)
論文調査委員	(主査) 教授 中村孝志 教授 開 祐示 教授 飯塚忠彦

論 文 内 容 の 要 旨

骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein; BMP) は未分化間葉系細胞を骨芽細胞に分化誘導することによって強力な骨誘導作用を発揮する。1988年 Wozney らの研究グループによって BMP-2,4 のクローニングが行われ, その結果遺伝子組換え技術により BMP の合成が可能となった。そのうち BMP-2,7 が遺伝子組換え技術によって工業的に生産され, 臨床応用可能となっている。しかし, BMP の臨床応用にあたっては BMP による十分な骨形成量を得ることが重要であり, そのためには適切なドラッグデリバリーシステムの改良, 開発は重要な研究課題と考えられる。現在アデノウィルスベクターは遺伝子治療など幅広く利用されている。アデノウィルスベクターの利点は高力価, 高導入効率, in vivo の組織, 細胞への遺伝子導入に適していることがあげられる。今回, 新たなドラッグデリバリーシステムに代わり得る, システム一つとして BMP-2 を発現するアデノウィルスベクターを作製し, 培養細胞および実験動物においてその活性を検討したのでその概要を報告する。

[実験方法]

まず, BMP-2 により骨芽細胞分化が選択的に誘導される未分化間葉系細胞 C2C12 に BMP-2 発現アデノウィルスベクター (AxCAOBMP-2) を添加して骨芽細胞への分化に対する影響を検討した。C2C12 に BMP-2 が導入されたか否かを検討するために免疫蛍光染色およびウェスタンブロット法を行った。また骨芽細胞への分化は, アルカリホスファターゼ活性, ならびにオステオカルシン産生を指標に評価した。ついで正常ラットにシクロホスファミドを用いて一過性の免疫抑制状態にするモデルを作製し, BMP-2 発現アデノウィルスベクターによる骨誘導能を検討した。処置群は高濃度 AxCAOBMP-2 投与群 (8.75×10^8 pfu), 低濃度 AxCAOBMP-2 投与群 (1.75×10^8 pfu), コントロールウィルスである AxCALacZ 投与群 (1.75×10^8 pfu, コントロール群) とした。感染前日にシクロホスファミドを 125mg/kg の濃度で腹腔内に投与した。24時間後, それぞれのウィルスを下腿筋肉内に投与した。感染21日後にラットを屠殺して, 下腿筋肉を摘出し, 軟エックス線撮影を行い, 組織学的, 生化学的検討 (アルカリホスファターゼ活性およびカルシウム含有量) を行った。

[結果]

免疫蛍光染色において BMP-2 感染群は BMP-2 陽性細胞が認められ, 細胞内の局在は細胞質内に認められた。ウェスタンブロットにおいても BMP-2 感染群はいずれの濃度においてもバンドが認められ, その発現量は用量依存性に増加した。アルカリホスファターゼ活性およびオステオカルシン産生においては, AxCAOBMP-2 感染群は用量依存性に増加する傾向を示した。軟エックス線所見, および組織所見では AxCAOBMP-2 投与群では新生骨の形成を認めた。しかし, コントロール群では新生骨の形成を認めなかった。また, コントロール群ではアルカリホスファターゼ活性およびカルシウム含有量はほとんど上昇しなかった。AxCAOBMP-2 投与群内での比較では高濃度群は低濃度群よりもアルカリホスファターゼ活性およびカルシウム含有量は有意に高値を示した。

[考察]

BMP-2 発現アデノウイルスベクターによって培養細胞および一過性免疫抑制状態の実験動物において骨誘導活性を認めた。本研究の結果より BMP-2 発現アデノウイルスベクターは今までのデリバリーシステムに代わり得る新たなシステムとして有用なことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein; BMP) は未分化間葉系細胞を骨芽細胞に分化誘導することによって強力な骨誘導作用を発揮する。しかし、BMP の臨床応用にあたっては BMP による十分な骨形成量を得ることが重要であり、そのためには適切なドラッグデリバリーシステムの改良、開発は重要な研究課題と考えられる。今回、新たなドラッグデリバリーシステムに代わり得るシステムの一つとして BMP-2 を発現するアデノウイルスベクターを作製し、培養細胞および実験動物においてその活性を検討した。

BMP-2 発現アデノウイルスベクターによって、筋芽細胞 C2C12 は骨芽細胞に分化誘導されることが明らかになり、またシクロホスファミドにより一過性免疫抑制状態にした実験動物においては高い骨誘導活性を認めた。本研究の結果より BMP-2 発現アデノウイルスベクターは今までのデリバリーシステムに代わり得る新たなシステムとして有用であることが示唆された。

以上の研究は骨形成因子の新たなデリバリーシステムの解明に貢献し、今後の骨形成因子の臨床応用への可能性に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年1月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。