

氏名	かわい まりこ
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2668 号
学位授与の日付	平成 16 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	Ectopic bone formation by human bone morphogenetic protein-2 gene transfer to skeletal muscle using transcutaneous electroporation に関する研究 (経皮的エレクトロポレーションを使用した骨格筋への骨形成因子-2遺伝子導入による異所性骨形成)
論文調査委員	(主査) 教授 鈴木茂彦 教授 中村孝志 教授 飯塚忠彦

### 論文内容の要旨

骨形成因子 (bone morphogenetic protein-2: BMP-2) は形成において重要な役割を有している。リコンビナントヒト BMP (rhBMP) が作成されて以来、骨再生への臨床応用が注目されてきた。一方、rhBMPを臨床応用するには適切な担体の開発やrhBMPの経済的コストなどに関して解決すべき問題点が残されているため、近年はBMP遺伝子を利用した遺伝子治療の開発が期待されている。遺伝子治療はウイルスベクターを用いるものと用いないものとに分類されている。アデノウイルスを代表とするウイルスベクターは多くの動物モデルで研究されており、標的筋肉や細胞に高い効率でBMP-2遺伝子を導入できるが、免疫応答を刺激するということを含めていくつかの問題がある。一方、Naked DNA, lipoplex, polyplex, *in vivo* エレクトロポレーション (以下EP) などの非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムは抗原性の問題がなく、次世代の遺伝子治療手段として注目されている。

(目的) *In vivo* EPによる遺伝子導入は発現プラスミドとEP装置のみが必要とされる単純かつ経済的なものであるが、BMP-2発現プラスミドを用いたEPによる遺伝子治療研究は未だに報告されていない。従来筋肉をターゲットとした *in vivo* EPは皮膚切開後直接筋肉に電極版を設定するか、あるいは針型およびフォーク型電極にて皮膚より筋肉に直接電極を作用させる方法がとられてきた。これらの方法では外科的侵襲が大きいと考え、侵襲が少なく、かつ筋肉に対する為害性が少ないEPを開発するために、皮膚を介して間接的に筋肉を電極板にて挟み込む方法を試みた。この方法により、同一部位にくり返しEPによる遺伝子導入が可能となった。今回、naked DNAと比較して1000倍の遺伝子導入効率があるとされる *in vivo* EPを用い、間接的方法による筋肉内局所的遺伝子導入を試み、BMP-2発現プラスミド導入により効率的に異所性骨形成を誘導できる手法を確立することを目的とした。

(方法) 具体的には、以下の手順で実験を行った。1) rhBMP-2発現プラスミドの作製。2) ラット下腿皮膚を介して筋肉内にrhBMP-2発現プラスミドを注射後、下腿筋肉をプレート型電極板にて挟み *in vivo* EPを24時間ごとに1~5回施行。3) LacZ発現プラスミドを用いて間接的 *in vivo* EPによる遺伝子導入を確認。4) BMP-2遺伝子およびタンパク質の発現と局在をRT-PCR法、ウエスタンブロット法、免疫組織化学染色より確認。5) *In vivo* EPによるBMP-2遺伝子導入により誘導された異所性骨 (21日後) を軟X線、組織形態学的に評価し、生化学的に定量解析。7) *In vivo* EPによる組織の損傷程度を肉眼的、組織学的に評価した。

(結果) 以上の実験で、BMP-2発現プラスミドを用いた間接的 *in vivo* EPを施行した全ての群で異所性骨形成が認められたが、その頻度はEPの回数が増すにつれて増加し、5回施行した群では100パーセントの確率で骨誘導が確認できた。一方、プラスミドの濃度による差はみられなかった。誘導された異所性骨は形態学的に、rhBMP-2の移植で誘導される骨と同様であった。*In vivo* EPによる筋肉の損傷は、炎症性細胞浸潤がEPの回数の増加とともに増えたが、広範囲な壊死や筋肉融解等の大きな損傷は認められなかった。

(考察) 本研究で得られた結果より、*in vivo* EPによるBMP-2遺伝子導入による骨誘導はシンプルかつ経済的な骨再生

療法の開発に大きく寄与すると考えられた。また、外科的侵襲が少なく、くり返し遺伝子導入を施行できるという利点は、骨形成をモニタリングしながら、治療を行える可能性をも示している。

#### 論文審査の結果の要旨

顎顔面外科領域において、腫瘍、先天性奇形、外傷等によって生じる顎顔面骨骨欠損部の再建は主に人工材料あるいは自家骨による骨再建が行われてきたが必ずしも満足しうる結果がえられていないのが現状である。そのため、強力な骨誘導活性を持つサイトカインである骨形成因子 Bone Morphogenetic Protein (BMP) の応用による骨再生法の研究がなされてきた。しかし、BMPタンパク自身を用いた研究ではタンパクの精製に伴う経済的問題や適切な担体の必要性などの問題がある。また、その後発展したBMP発現ウイルスを用いた遺伝子治療法には、ヒトに感染させることによる多くの未解決の問題が残されている。そのため、非ウイルス性BMP遺伝子導入による骨再生法の開発が望まれている。

本研究は経皮的 *in vivo* electroporation を用いてBMP-2発現ベクターによる遺伝子導入をラット筋肉内にて成功させ、骨誘導実験系を確立した。これらはBMP-2を用いた骨再生法研究でははじめての非ウイルス性遺伝子導入法による骨誘導実験系である。また、本方法はプラスミドと electroporation の装置のみが必要であるという非常に簡便なものである。さらに生体に対して切開等の外科的侵襲なく施行可能であることより、繰り返し遺伝子導入が可能であるという特徴も備えている。これより、今後の骨再生法の新しい治療法を見出したといえる。

以上の研究はBMPの非ウイルス性遺伝子導入による骨誘導法の解明に貢献し、新たな骨再生法の開発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、学位授与申請者は、平成15年11月12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。