

氏 名	その 園 部 純 也
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1805 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Bone induction by BMP-2 expressing adenoviral vector in rats under treatment with FK506 (FK506 による免疫抑制下での BMP-2 発現アデノウイルスベクターによるラットの骨誘導に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 村 孝 志 教 授 開 祐 司 教 授 飯 塚 忠 彦

論 文 内 容 の 要 旨

目的：作製に成功したヒト BMP-2 発現アデノウイルスベクター (AxCAOBMP-2) の *in vivo* における有用性を検討することを目標とした。アデノウイルスベクターは高い遺伝子導入・発現効率を示し、動物個体において直接発現が可能であるため、近年、遺伝子治療等に应用されている。しかし、現在広く使用されているアデノウイルスベクターは、T 細胞が関与した宿主の免疫反応により感染細胞が排除され、発現した目的遺伝子が長く維持されない。このため現状では免疫原性を抑える種々の方法が必要となる。今回、臨床において最も広く使用されている免疫抑制剤である FK506 による一過性免疫抑制下で、AxCAOBMP-2 の *in vivo* での骨誘導能を検索した。

方法：24匹のウイスター系ラットを検定に用い、FK506 投与を AxCAOBMP-2 の筋肉内注入の前日のみに行った。ラット腹部皮下に 12 mg/kg (I 群), 6 mg/kg (II 群), 3 mg/kg (III 群) の各濃度で FK506 を投与した。対照群には FK506 のプラセボを同容量投与した。各群を 6 匹とした。翌日、すべてのラットの右下腿部腓腹筋内に、AxCAOBMP-2 (3.93×10^9 pfu/ml) を 25 μ l 局注した。AxCAOBMP-2 注入21日後に注入した腓腹筋組織を採取し、X 線学的、組織学的、生化学的検索を行った。

結果：X 線学的解析において I 群では 6 匹すべてに、II 群では 5 匹に、III 群では 3 匹に不透過像が認められたが、対照群には認められなかった。組織学的解析においては I 群、II 群、III 群に骨誘導がみられ、新生骨量は I 群で最も多くみられた。生化学的検索ではアルカリフォスファターゼ活性、カルシウム濃度が I 群、II 群、III 群において有意に上昇していた。また、FK506 の投与量が多い群ほど、誘導された骨量が多かった。

考察：アデノウイルスベクターは動物個体への直接投与による遺伝子発現が可能である。しかしアデノウイルス由来の蛋白の発現により遺伝子導入細胞が排除され、発現した目的遺伝子が 1～2 週で失われてしまう。そのため長期の遺伝子発現を必要としない遺伝子治療、すなわち AxCAOBMP-2 による骨形成などには最適の手法であると考えられる。一方、本研究では示していないが、免疫能のあるラットと免疫抑制したラットでは、局注後 3 日目では局注した部位の筋肉内 BMP-2 蛋白の発現量に差がほとんど見られないものの、局注後 7 日目では明らかに差がみられた。これは T 細胞が関連した免疫反応により、ベクター投与後 3 日から 7 日のうちに遺伝子発現が減弱するのではないかと考えられた。今回、この免疫反応を抑えるため、重篤な副作用が少なく、有効なことから、臨床で最も広く用いられている FK506 を使用した。本研究結果より、臨床でも使用可能な濃度の FK506 を用いた一過性の免疫抑制下において、AxCAOBMP-2 は骨誘導能を発揮することがわかった。もちろん、免疫反応を惹起しない改良型アデノウイルスベクターが容易に使用可能になれば問題ないが、現段階では臨床において使用可能な免疫原性を抑制する方法として、FK506 を使用すれば、AxCAOBMP-2 は臨床において骨再建への応用が可能であり、有用であることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

今回、申請者は FK506 を用いてラットを一過性の免疫抑制状態にするモデルを作製し、ヒト BMP-2 発現アデノウイルス

スペクターによる骨誘導能を検討した。In vitro においては、申請者らが独自に作製したヒト BMP-2 発現アデノウイルスベクターは C2C12 を骨芽細胞に分化させることが確認されているが、ラット筋肉内に注入するのみでは骨を誘導し得なかった。この原因はアデノウイルスベクター感染細胞が宿主の免疫系（主に T cell）によって排除されるからであると推察された。そこで申請者は、現在臨床において臓器移植等に広く用いられている FK506 に着目した。FK506 は T 細胞からの分化、増殖因子である IL-2 および IFN- γ などのサイトカインの産生を阻害することで免疫抑制作用を発揮するとされている。今回の実験モデルにおいては、FK506 の投与により一過性に免疫抑制することで十分量の骨が誘導されることが認められ、ベクター量、投与方法を調節すれば必要量の骨を誘導させることが可能となることから臨床的にも有用であると考えられる。

以上の研究はヒト BMP-2 発現アデノウイルスベクターによる骨誘導の解明に貢献し、骨形成因子を用いた遺伝子治療の臨床応用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15年1月15日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。