

京都大学	博士（医学）	氏 名	大 澤 賢 次
論文題目	Osteoinduction by low invasive approach using human bone morphogenetic protein-2 encoding plasmid DNA （ヒト骨形成因子発現プラスミドベクターを用いた低侵襲遺伝子導入法による骨誘導に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
【背景と目的】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り、強力な骨誘導活性を有するタンパクであり、現在ヒトリコンビナント BMP-2、BMP-7 が欧米を中心に臨床応用されている。骨再生における BMP の臨床応用では、たとえ適切な担体を用いても十分な骨形成量を得るためには経済的コストがかかるため、これを克服するためのドラッグデリバリーシステムの開発、改良は重要な課題であった。このような中で、遺伝子導入法を応用した骨形成の手法が考案された。一般に遺伝子導入法はウイルスベクターを用いる方法と用いない方法に大別され、ウイルスベクター法は高い導入効率を示すが、ウイルスの抗原性といった安全性に関する問題があり、非ウイルスベクター法は比較的安全性が高いと考えられるが、導入効率が低いという問題がある。骨再生治療分野においては、効率よりも安全性が特に重要視されるべきであり、非ウイルスベクター法は有用であると考えられる。先行実験では電気パルスを用いた遺伝子導入法によりヒト骨形成因子（以下 hBMP-2）遺伝子導入が行われ、ラット筋組織内で骨形成を誘導したと報告されているが、電撃による組織傷害を生じる可能性があり、安全性の懸念から未だ臨床応用されるには至っていない。そこで今回は、より侵襲の少ない方法によって hBMP-2 遺伝子導入を行い、臨床応用に即した生体内での骨誘導法を確立することを目的とした。 【方法】 実験 1）マウス下腿部筋肉内に皮膚を介してプラスミドを直接注入後、超音波を照射して遺伝子導入を行った。まずレポーター遺伝子を用いて超音波照射条件の最適化を行い、次に至適条件にて hBMP-2 遺伝子導入を行った。hBMP-2 タンパクの発現を免疫組織化学的に、骨形成を X 線、組織化学的、生化学的に評価した。 実験 2）マウス下腿部筋肉内に、hBMP-2 プラスミドを、総用量を単回で投与する群、総用量を分割した量を 2、4 ないし 8 回反復して投与する群に分けて直接注入し、遺伝子導入を行った。hBMP-2 タンパクの発現を免疫組織化学的に、骨形成を X 線、組織化学的、生化学的に評価した。 【結果】実験 1 では導入後 7 日目から hBMP-2 の発現が免疫組織化学的に確認された。導入 14 日後から対象部位での骨形成が X 線、組織形態学的、生化学的に 100% の確率で確認され、導入 21 日後においても同様に確認された。また、対象			

部位での組織の損傷を示唆する明らかな所見は認められなかった。さらに、実験 2 においては、単回投与群では骨形成が認められなかったのに対し、2 回、4 回、8 回と少用量で反復して投与するほどより高率に骨形成が認められた。 以上より、hBMP-2 プラスミドを用いて、超音波遺伝子導入法により骨誘導が可能であること、および他に特殊な装置などを用いない最もシンプルな方法であるプラスミド注入のみでも投与方法の改良により骨誘導が可能であることが示唆された。 【考察】今回用いた 2 つの方法はいずれも骨誘導が可能であったが、より確実に骨形成させるためには超音波遺伝子導入法が有効であると考えられた。また、いずれの方法も安全に繰り返し遺伝子導入を行うことができるため、経時的に骨形成の状態を観察、評価し、投与量を調整しながら治療を行う事ができる可能性がある。hBMP-2 遺伝子を用いた超音波遺伝子導入法およびプラスミド少量反復注入はシンプルで経済的かつ低侵襲で安全性の高い骨再生治療法の開発に貢献するものであると考える。
（論文審査の結果の要旨） 骨形成因子（BMP）は欧米を中心に臨床応用されているが、担体の安全性や経済性などの問題がある。これを解決するために BMP-2 遺伝子導入による骨誘導法が考案され、アデノウイルスベクター、エレクトロポレーション等の実験が行われたが、安全性への懸念があり未だ臨床応用されていない。 そこで本研究では、従来の方法より生体への侵襲が少ない超音波遺伝子導入法とプラスミド少量反復注入による骨誘導法に関して検討を行った。超音波遺伝子導入法では、導入効率が低いという欠点を改善するために、遺伝子導入操作を工夫し、少量のプラスミドベクター注入と短時間の超音波照射とを反復して行うことにより、マウス腓腹筋において効率よく骨形成させることに成功した。さらに、超音波遺伝子導入法に関する実験を行う過程で、ほかの物理的刺激を用いない、よりシンプルな方法である局所注入のみでも、総投与量を分割して、少量で反復して注入することにより骨形成させることが可能であることを示した。 以上の研究はより安全な骨形成因子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ことが多い。 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 23 年 1 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。