

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11900

研究課題名(和文) BMP-2遺伝子発現ベクターとRANKL結合ペプチドによる新規骨形成法の開発

研究課題名(英文) Novel osteogenic method using BMP-2 gene expression vector and RANKL binding peptide

研究代表者

佐藤 俊三 (Sato, Toshimi)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：20769468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成タンパクであるbone morphogenetic protein (BMP)-2の遺伝子導入にウイルスを用いないことで生じる造成骨の減少を骨形成促進ペプチドが補うか否かを検討した。8週齢雄性マウスの腓腹筋内にgreen fluorescent protein (GFP)/BMP-2遺伝子発現プラスミドベクターを注射し、電気穿孔法により遺伝子導入した。2週間後から、対照群と比較して骨形成促進ペプチド投与群では異所性骨の骨密度増加および骨微細構造指標の改善と骨吸収指標の抑制が認められ、骨形成促進ペプチドが、BMP-2遺伝子導入により誘導される骨量、質ともに向上させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、ウイルスベクターに比べて安全性の高い非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入時の欠点を、骨形成促進ペプチドであるreceptor activator of Nf- κ B ligand (RANKL) 結合ペプチドの併用により改善できることを示唆している。

得られた結果は、ウイルスを用いた遺伝子治療より、より安全性が高い非ウイルスベクターを用いたBMP-2遺伝子導入法による新規骨形成法の開発に向けて有用な情報を与えている。本研究成果は、骨領域におけるウイルスを用いない遺伝子治療への可能性を広げた研究であり、局所へのペプチド投与方法をさらに検討することにより、今後の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-binding peptide, an osteogenic peptide, can compensate for the decrease in bone formation caused by the absence of viral gene transfer of bone morphogenetic protein (BMP)-2, an osteogenic protein. After two weeks of the gene transfer by electroporation, both bone mineral density and bone microstructure indices were increased, and bone resorption indices were suppressed in the group treated with bone-forming peptides compared with the control group, suggesting that the osteogenic peptides may compensate for the reduction of the nonviral vector-induced bone formation.

研究分野：硬組織薬理学

キーワード：非ウイルスベクター BMP-2 RANKL結合ペプチド 骨形成促進 骨形態計測 遺伝子治療 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂患者の咬合改善のためには、歯牙を萌出させ、あるいは移動させる場所に骨を造成させることが必要だが、最も優れた方法と言われる自家骨移植を繰り返すには患者の負担が大きい。我々は、自家骨移植に代わる局所の骨造成法にBMP(bone morphogenetic protein)-2を用いる方法を開発してきた。BMP-2は諸外国で使われているが、炎症が惹起されるという副作用があるため、BMP-2量を少なくすれば、副作用も少なくなるだろうという仮説をたてた。BMP-2量を減らした分骨造成も少なくなるため、その分を補う骨形成促進ペプチドを開発してきた。RANKL結合ペプチドであるW9ペプチド(W9)は、骨芽細胞分化促進とともに、細胞増殖活性も有する。マウスの頭蓋骨欠損モデルを用いた検証では、BMP-2が誘導する骨形成がほとんど認められない少量のBMP-2(0.3 µg)を使用しても、W9ペプチドにより骨形成が亢進し、欠損部を埋める骨形成が認められた(1)。

一方、骨形成タンパク(BMP-2)の遺伝子導入は、局所の骨形成を誘導する代替法として期待されている。必要以上のBMP-2タンパクが発現せず、タンパク精製の必要が無いため、費用も抑えられる。特にウイルスを用いない非ウイルスベクターによる遺伝子導入は高い安全性を示す。しかし、ウイルスを使った遺伝子導入に比べて、ウイルス無しではBMP-2遺伝子が誘導する骨量はわずかである。実際、先行実験では、レトロウイルスを用いた遺伝子発現ベクターでは、うまく骨を誘導できたが、ウイルスベクターに比べてより安全な非ウイルス性ベクターを用いた場合、骨形成量はウイルスベクター使用時比で明らかに少なかった。

癌治療にウイルスベクターを使う遺伝子治療は各国で承認されているが、骨造成の臨床応用にはハードルが高く、より安全なウイルスを使わない遺伝子治療が求められている。このため、ウイルスを使わない遺伝子治療の方策を開発することは、今後、骨領域の遺伝子治療を臨床応用するためには、重要なステップであると思われる。

2. 研究の目的

非ウイルス性ベクターによる遺伝子導入効率の悪さを骨形成促進ペプチドであるW9により補えるか否かを明らかにすること。

3. 研究の方法

1) In vitro の系による検証

骨芽細胞系細胞株 ST2 細胞を用いて、BMP-2 遺伝子を導入した細胞における W9 の骨芽細胞分化促進作用を骨芽細胞初期分化マーカーの alkaline phosphatase (Alp) 活性の計測で示した。具体的には、GFP/BMP-2 遺伝子発現プラスミドベクター(下図)による遺伝子導入を行った ST2 細胞を、DMEM (10% FBS) に 100 µM W9 を添加した培地で 10 日間培養した。Alp 活性をマイクロプレートリーダー(計測波長 405 nm)で測定し、タンパク濃度で除することにより算出した。タンパク濃度の測定は、通常の BSA キットを用いた。

2) In vivo の系による検証

(ア) 遺伝子導入により発現した BMP-2 タンパクの検出および定量

8 週齢のオスの C57BL/6 マウス 18 匹の腓腹筋内に GFP/BMP-2 遺伝子発現プラスミドベクターもしくは対照としてコントロールベクター注入し、直後にエレクトロポレーション(100 V, 50 msec, 8 pulse)による遺伝子導入を行った。遺伝子導入後 1, 7, 14 日後にマウスを安楽死させ、遺伝子導入部位の非脱灰切片を作製後、GFP 陽性細胞の検出を行った。ま

た、遺伝子導入部位の筋肉を摘出し、ホモジナイズ後、ELISAにより懸濁液中の GFP 産生量を定量し、BMP-2 タンパクの発現量を推計した。

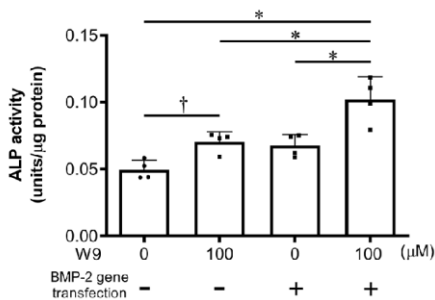
(イ) BMP-2 遺伝子導入により誘導される異所性骨に対する RANKL 結合ペプチド W9 の効果の検討

異所性骨の経時的な変化を *in vivo* μ CT による 3 次元画像データを用いた微細構造解析も含めた骨密度解析を行った。具体的には、10 匹のマウスの腓腹筋内に BMP-2 遺伝子を導入後、W9 (実験群) もしくは溶媒 (対照群) を注入した浸透圧ポンプを背部皮下に埋入した。遺伝子導入後 7 日ごとに *in vivo* μ CT を撮影し、TRI/3D-BON ソフトウェアを用いて 3 次元骨形態計測を行った。また、骨形成活性の評価のため、遺伝子導入 12 日後にアリザリンを皮下投与した。21 日後に安楽死させ、軟 X 線撮影後に非脱灰切片を作製し、TRAP 染色、von Kossa 染色ならびに蛍光組織像の観察後、骨形態計測学的解析により、W9 の骨形成促進作用を検討した。

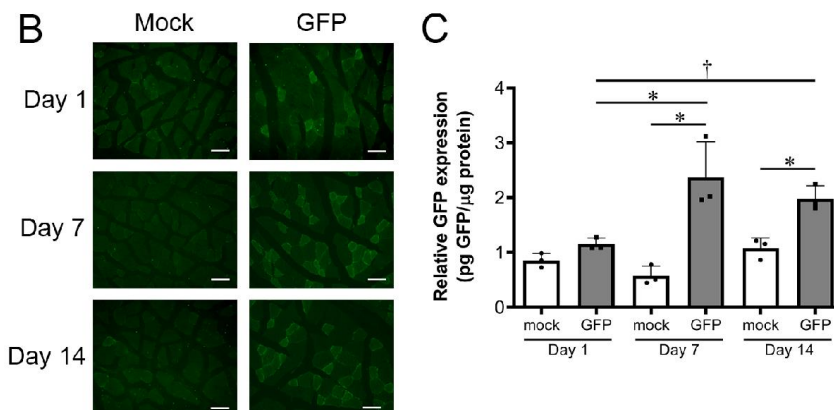
4. 研究成果

この結果を得るまでに W9 の投与方法を工夫し、局所に投与する場合も、エレクトロポレーションをかける時期と同時が良いのか、ずらした方が良いのか様々な検討を行った。最終的には、以下 1~5 に示すように、W9 の投与は徐放的に全身投与する方法で、非ウイルス性ベクターによる遺伝子導入効率の悪さを骨形成促進ペプチドである W9 により補えるという仮説を証明することができた。非ウイルスベクターによる BMP-2 遺伝子導入によりマウスの足の筋肉 (腓腹筋) に異所性骨石灰化は誘導され、骨形成促進ペプチドの全身投与により、誘導された異所性骨は骨量、骨密度、骨幅、骨形成活性指標すべてが、遺伝子導入のみの群と比べて高値を示した。

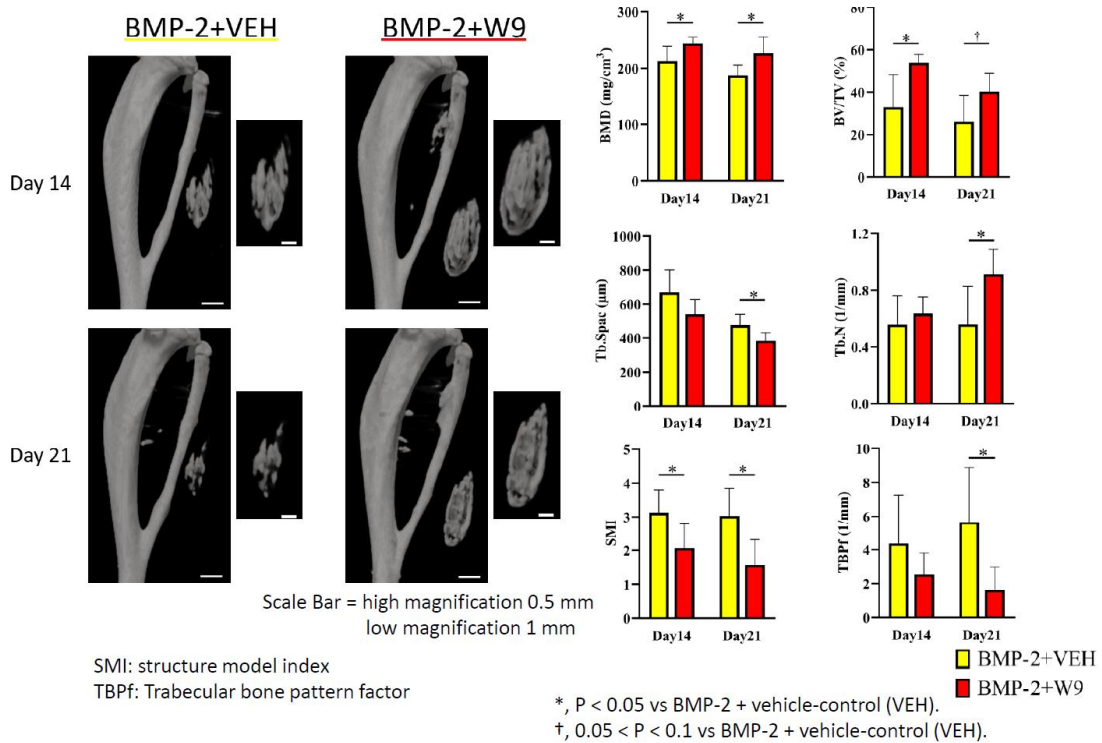
1. BMP-2 遺伝子導入を行った ST2 細胞への W9 添加は、アルカリフォスファターゼ活性 (ALP activity) を上昇させた。



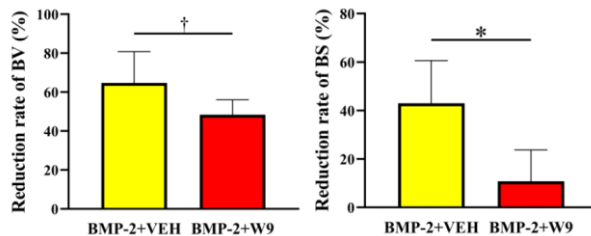
2. 非ウイルスベクターを用いた BMP-2 遺伝子導入によりマウス腓腹筋内に産生された BMP-2 蛋白量は 200 pg 以下と GFP 発現タンパク量から推定された。



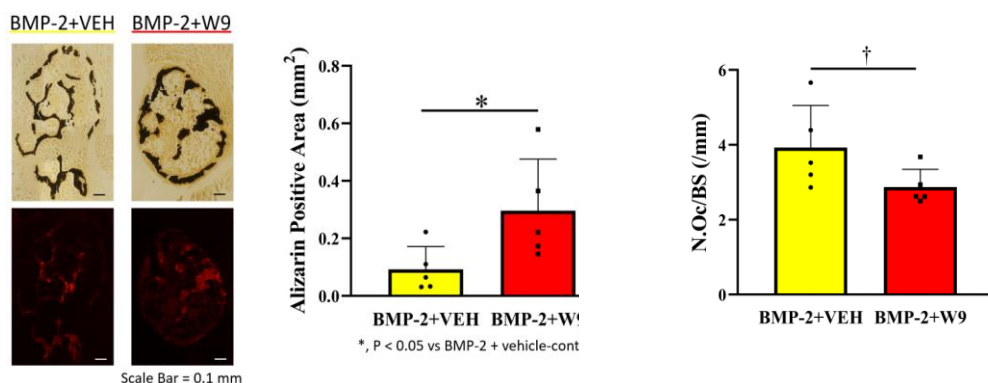
3. W9の投与はBMP-2遺伝子導入により誘導された異所性骨の骨量(BV/TV)および骨密度(BMD)増大作用と微細構造指標(Tb.Spac, Tb.N, SMI, TBPf)の改善作用を示した。



4. 遺伝子導入後14日目から21日目にかけて異所性骨の骨量(BV)・骨表面(BS)減少が認められたが、それらの減少率(Reduction rate)はW9投与により抑制された。



5. W9投与群は溶媒投与群と比べて骨形成活性指標(Alizarin Positive Area)が高値を示し、異所性骨表面の破骨細胞数(N. Oc/BS)に抑制作用が認められた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagahiro Shigeki, Uehara Tomoki, Yamamoto Kawai Mariko, Keo Preksa, Sato Toshimi, Ochi Hiroki, Sato Shingo, Kuroda Shinji, Ono Takashi, Miyashin Michiyo, Aoki Kazuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 RANKL-binding peptide promotes ectopic bone formation induced by BMP-2 gene transfer in murine gastrocnemius muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental, Oral and Maxillofacial Research	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/DOMR.1000327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawai Mariko Yamamoto, Ozasa Ryosuke, Ishimoto Takuya, Nakano Takayoshi, Yamamoto Hiromitsu, Kashiwagi Marina, Yamanaka Shigeki, Nakao Kazumasa, Maruyama Hiroki, Bessho Kazuhisa, Ohura Kiyoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Periodontal Tissue as a Biomaterial for Hard-Tissue Regeneration following bmp-2 Gene Transfer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 993 ~ 993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma15030993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長弘 茂樹, 上原 智己, ケオ・プレクサ, 河井 まりこ, 青木 和広
2. 発表標題 RANKL結合ペプチドはBMP-2遺伝子発現非ウイルスベクターによる骨形成を促進する.
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 2019.10.01 千代田区
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Present and Future Perspectives of Bone Morphometry- From the Oral Biological Point of View.
3. 学会等名 The 42nd Annual meeting of Japanese Society for Bone Morphometry
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山本 まりこ(河井まりこ) (YAMAMOTO KAWAI MARIKO) (40379839)	関西女子短期大学・その他部局等・教授 (44419)	
研究 分担者	青木 和広 (AOKI KAZUHIRO) (40272603)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------