

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09726

研究課題名(和文) ウィルスベクターを用いた遺伝子活性化基質による骨再生療法の創製

研究課題名(英文) The creation of bone regenerative therapy by gene activated matrix with viruses vector

研究代表者

三浦 桂一郎 (Miura, Kei-ichiro)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10634446

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)：われわれは、非ウィルス性の骨形成性プラスミドベクターを搭載した遺伝子活性化基質(Gene Activated Matrix: GAM)が優れた骨再生能を有することを証明してきたが、プラスミドベクターは遺伝子導入効率が低いため、より遺伝子導入効率の良いGAMの開発が望まれている。一方、ウィルスベクターは遺伝子導入効率は高いが、重篤な副作用が出現する点が問題である。本研究は、安全性の高いウィルスベクターを用いたGAMを開発することを目的としている。現在までには、非ウィルス性ベクターと比較して優位性を認めなかったため、今後、濃度や担体への組み込み方など、条件をさらに詳細に評価していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、BMP2搭載AAVベクターを用いた遺伝子活性化基質の開発を目的としていたが、非ウィルス性ベクターと比較して優位性は認めなかった。しかしながら、本研究で得られた結果は今後のバイオマテリアル開発においての新たな知見であり、これらの結果に基づき、今後、さらなる骨再生療法の発展を考えると考える。

研究成果の概要(英文)：We have proved that gene activated matrix (GAM) with non-viral osteogenic plasmid vector has good bone regenerative ability. However, plasmid vector has low gene transfer efficiency. Therefore, new GAM which has good gene transfer efficiency is expected. On the other hand, although viral vectors have high gene transfer efficiency, there is a problem that serious side effects appear. The purpose of this study is to develop a GAM using a highly safe viral vector. To date, no superiority has been observed compared to non-viral vectors, so it is necessary to evaluate the conditions in more detail, such as the concentration and how to incorporate them into the carrier.

研究分野：口腔顎顔面外科学分野

キーワード：骨再生療法 Tissue engineering Gene Activated Matrix ウィルスベクター

## 1. 研究開始当初の背景

自家骨移植は現在、骨再生療法のゴールドスタンダードであるが、骨採取部の二次的侵襲や採取量の限界などの問題点があるため、これに置き換わる骨再生バイオマテリアルの登場が望まれている。現在、生理的濃度の骨形成性因子を徐放するプラスミドベクターを搭載した遺伝子活性化基質(Gene Activated Matrix: GAM)が期待されてきている。しかし、プラスミドベクターは安全ではあるが、遺伝子導入効率が低く大量に必要なことが問題であるため、臨床応用の障害になっている。その一方で、ウィルスベクターは遺伝子導入効率が高いものの、死亡例を含む有害事象が出たことがあることから臨床応用が停滞している。しかし現在は安全性の高いウィルスベクターが開発され、現在多くの遺伝子治療による臨床研究が展開されてきている。我々は、ゲノムに取り込まれずに安全性が高く生体内で高い遺伝子導入効率を呈するアデノ随伴ウィルスベクターに着目した。アデノ随伴ウィルスベクターを用いた多くのヒト遺伝子治療は臨床研究において、これまでに重篤な有害事象は発生せず、優れた性能を発揮していることが知られている。これらの研究ではウィルスベクターを基質に組み込み生体内に投与方法は未だに行われていない。骨組織の再生を考えると、再生組織の形態付与は非常に重要であり基質の使用は必須であると言える。申請者は従来から生体アパタイトの前駆物質であるリン酸オクタカルシウム (OCP)と、細胞分化の足場となるアテロコラーゲンを組み合わせた OCP/コラーゲン複合体 (OCP/Col)を用いて口腔外科領域の骨欠損が効果的に再生することを報告し臨床応用に向け試験を進めてきた。さらに、リン酸カルシウムはウィルスとの親和性が高いことが知られており、OCP/Col にウィルスベクターが強力に吸着することが期待できる。したがって、OCP/Col はウィルスベクターを用いる上で最適の基質であると考えた。

## 2. 研究の目的

1999年の Bonadio らによる GAM を用いた骨再生研究の成果は 20 年近く経過した現在でも臨床研究による成果はない。その大きな要因は、プラスミドベクターは導入効率が悪いからである。一方でウィルスベクターは従来、アデノウィルスやレトロウィルスを用いていたが、これらは全身性炎症反応を惹起すること、発がんリスクがあることが問題となっていた。しかし、近年のアデノ随伴ウィルスベクターや改良されたレトロウィルスベクターなどは、非病原性であり生体内で高い遺伝子導入効率を有することから、多くの臨床研究がされており本格的な臨床応用に近いがこれらを GAM のベクターとして用いた報告はこれまでない。本研究は局所に移住してくる細胞への導入効率の高いウィルスベクターの選別、そしてウィルスベクターの局在を長期間維持する技術を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ウィルスベクターの選定と導入遺伝子：種々のウィルスベクターが開発されている中、先述のようにアデノ随伴ウィルスベクターが最適と考えるが、対照として遺伝子が長期発現し病原性や細胞傷害性を持たないレトロウィルスベクターの可能性を検討する。導入遺伝子は、我々が既にクローニングに成功し GAM 搭載遺伝子としての効果を確認済みの BMP4、および骨関連遺伝子の転写因子 Runx2 とする。

ウィルスベクター搭載遺伝子活性化基質型 OCP/Col の製作：まずは成形された OCP/Col にウィルスベクターを滴下して GAM を製作する。ベクターの吸着が不十分だった場合、OCP 顆粒と

ウィルスベクターをアテロコラーゲン溶液に均質に混和し、OCP 全体に均一かつ強固にウィルスベクターを吸着させる。この溶液を凍結乾燥し GAM を製作する。ウィルスベクターの吸着レベルは、ベクターにルシフェラーゼを組み込み、その活性を *in vitro* で測定しウィルスベクターの経時的溶出を観察して行う。

移植実験：上記 で選定した GAM をラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルに埋入し、中～長期経過後 (4, 8, 12, 24 週)の骨形成を組織学的、ならびに 3 次元 CT 画像で評価する。さらにウィルスベクターの長期保持性を確認するため、ウィルスベクターにルシフェラーゼを組み込み、その体内分布を IVIS (*in vivo* imaging system) で観察し、細胞内取り込みならびに遺伝子発現を評価する。さらに GFP 発現ベクターも使い、サンプル摘出後に GFP 発現を解析しウィルスベクターの長期局在性を観察する。

#### 4 . 研究成果

現在までに、ラット頭蓋冠臨界骨欠損に対する *in vivo* による評価において、非ウィルス性ベクターと比較して優位性を認めておらず、今後、濃度や担体への組み込み方などの詳細な条件の探索が必要になるものと思われる。

#### 5 . 主な発表論文等

なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	鎌倉 慎治  (Kamakura Shinji)  (80224640)	東北大学・医工学研究科・教授   (11301)	
研究分担者	住田 吉慶  (Sumita Yoshinori)  (50456654)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授   (17301)	
研究分担者	中谷 佑哉  (Nakatani Yuya)  (50770822)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員   (17301)	削除：2020年2月12日

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