

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890115
 研究課題名（和文） BMP-2 発現アデノウイルスベクターおよび吸収性材料による骨再生に関する研究
 研究課題名（英文） Study of bone reconstruction using BMP-2-expressing recombinant adenoviral vector and degenerative biomaterials
 研究代表者
 海原 真治（SHINJI KAIHARA）
 京都大学・医学研究科・特定助教
 研究者番号：70452331

研究成果の概要：

ラットの連続性を排した下腿骨欠損実験モデルにおいて、ポリ乳酸（PLLA）とアテロペプチド I 型コラーゲンを担体として BMP-2 発現アデノウイルスベクターを貼付して埋入した。1 ヶ月後には骨形成を認め、3 ヶ月後で骨形態を維持し、6 ヶ月では健側とほぼ同様の骨強度がえられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1320000	0	1320000
2008 年度	1350000	405000	1755000
年度			
年度			
年度			
総計	2670000	405000	3075000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：生体材料、移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組み換えヒト骨形成因子 (rhBMP-2) は、異所性に骨を誘導することが出来る蛋白性因子で、そのため rhBMP-2 による骨の再生医療は多くの研究がなされている。rhBMP-2 は臨床において、骨再建、骨折治療、顎変形症治療、骨形成性疾患など、極めて応用範囲が広い。本邦でも 1995 年より rhBMP-2 の顎骨の骨欠損の補填を目的に臨床試験が行われている。また、欧米ではすでに臨床応用が開始され、骨折の治療などで極めて良好な結果を得ている。しかし、十分な骨を誘導するには大量の rhBMP-2 が必要であり極めて高額な医療となるのが現状である。

そこで今回の研究では、以前からの遺伝子治療の手法で、安価で極めて強力な遺伝子導入効率を持つ BMP-2 発現アデノウイルスベクター (AdBMP-2) の利用を考えた。アデノウイルスベクターは遺伝子導入効率が極めて高いベクターで、その有用性は広く認められている。米国では肺嚢胞性線維症に対する臨床試験が行われており、日本でも悪性腫瘍に対する治療に使うべく申請などが行われている。我々の研究開発した AdBMP-2 は、それだけでは宿主の免疫応答反応により、正常の免疫機能を持った動物では骨誘導を行うことは出来ないため、少量の免疫抑制剤を併用することで、免疫機能を正常に持つ動物においても、極めて簡単に少量で迅速に十分な骨誘導ができる。

アデノウイルスベクターによる骨誘導は、抗原性の問題は残るものの、現在の治療法の欠点を補う新しい方法として期待されるものである。その骨誘導様式は、アデノウイルスが接触した間葉系細胞に、BMP-2 遺伝子を導入し骨芽細胞系細胞に分化させ骨誘導させるもので、局所注入によって導入される。たとえば、ラットの下腿の筋肉にウイルス液を局注すると、ウイルス液が浸透した筋肉組織は極めて高率で骨に誘導される。しかし、局所注入によって導入されるが故に目的にあった形態を付与することは困難である。

さらに、今回の研究のように連続性のない骨欠損の再建を行う場合は、骨誘導が完了するまでの期間、周囲の形態を維持する必要がある、現在行われている治療と同様にチタンなどの非吸収性の材料とともに使用されることが多い。

AdBMP-2 を有効に作用させるには担体を使用した Drug Delivery System が必要であり、最も多く使用されているものがアテロペプチド I 型コラーゲンやヒドロキシアパタイトを担体としたものである。現状では、これらの担体は力学的な問題から、臨床応用の際には形態を維持するために自家骨、人工骨またはチタンなどの非吸収性の材料とともに使用することを余儀なくされることが多い。しかし、複数回の手術や感染リスクなど様々な問題を伴うため、臨床においては低侵襲で確実な再建で、最終的には自己の生体に置換されるような方法が求められている。現在様々な担体の開発によりこの問題に対処すべく研究がなされているが、満足できるものはまだない。今後の骨再建治療において、これらの点は必ず克服しなければならない極めて重大な問題である。

今回の研究では、連続性のない骨欠損部の再建を目的として、骨誘導が完了するまでの期間、周囲の形態維のために吸収性材料を併用することを検討した。

2. 研究の目的

アデノウイルスベクターは遺伝子導入効率が極めて高く、その有用性は広く認められている。以前より、われわれは遺伝子治療の手法で、極めて強力な遺伝子導入効率をもつ AdBMP-2 を作成し、安価で、少量で迅速に多量の骨誘導が出来ることを研究してきた。さらに、少量の免疫抑制剤を併用することで、正常な免疫機能をもつ動物においても骨誘導が可能であることを証明した。

今回の研究では、現状での骨再建治療の欠点を補う方法として、AdBMP-2 を利用することで、極めて安価で、簡単に迅速な骨誘導、さらに担体として非吸収性材料を使用せずに最終的には自己組織に置換するために吸収性材料

(ポリ乳酸(PLLA)、アテロコラーゲン(ACS))を使用して骨欠損部を再建することを目的とした。

この研究は、骨の再生医療において、極めて安価で簡便に目的の形態で骨再生を行ない、現在ではチタンなどの非吸収性の材料と併用しなければ再建が不可能であるような骨欠損においても、吸収性の材料を併用して再建を可能にし、最終的には自己の組織に置換するという理想的な骨再生医療を提供するための基礎となる研究であり、最終的には自己の組織に置換する理想的な骨再生方法を確立したいと考えている。

さらに、この手法で悪性腫瘍や外傷で欠損した顎骨の再建が可能になれば、再建部位にデンタルインプラントの植立が可能な理想的な顎骨再建となると考えられる。

3. 研究の方法

AdBMP-2による骨誘導において困難であった、形態を付与した骨再建を可能にするために、理想的な形態に整形し、適切な強度をもつ PLLA と ACS の複合体を作成して、それを AdBMP-2 の担体として使用する。この担体を利用して AdBMP-2 の発現部位を規定し、形態を付与した骨再建を可能にする。PLLA と ACS は吸収性の材料であるため、最終的には宿主の組織にすべて置き換わるという、理想的な骨再建方法を確立する。

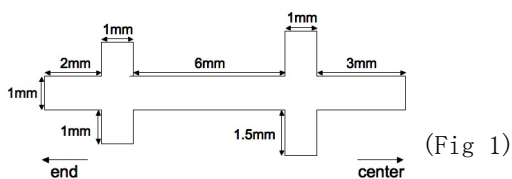
(1) 材料

1. AdBMP-2 の調整

超低温フリーザーにて保存されている組換えウイルス液を 293 細胞 (ヒト胎児腎細胞株) で培養、増殖させ高力価ウイルス液を得る。高力価ウイルス液を精製、力価を測定する。完成したウイルス液は超低温フリーザーにて保存する。

2. 担体の作成

PLLA を加工し、ラットの下腿骨の連続性のない骨欠損部に適合する形態にする。PLLA の形態は、離断部である critical bone defect を 6mm に設定し、回転防止のために両端に鏝を付与した。さらに、内外固定器具を使用しない目的のために、骨髄内へ維持を求める形態に工夫をした (Fig 1)。AdBMP-2 を規定部位に発現させるための担体として ACS を成形し、PLLA の外周に付与して PLLA-ACS 複合体とした。



(2) 方法

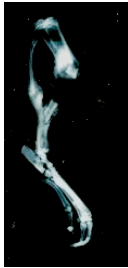
11 週齢の雄性 Wistar 系ラット 35 匹を検定に用いた。ラットの下腿骨を critical defect (6mm) として水平断で離断して連続性を排した骨欠損を形成した。その欠損部に AdBMP-2 と免疫抑制剤としての FK506 を混和して ACS に塗布し、欠損部に適合した PLLA-ACS の複合体を埋入した。さらに、PLLA を骨髄内に軸として維持することで創外固定を行わず、創部をギプス包帯にて固定した。各群 7 匹として、1、3、6 ヶ月後に再建された骨を放射線学的、組織学的、生化学的、生理的検討した。また、コントロール群として、AdBMP-2 を塗布しない群、AdLacZ を塗布した群を用いた。これらの施術は、ペントバルビタールの腹腔内投与にて無痛的に行った。

(3) 評価方法

各群骨形成後に、ペントバルビタールの過剰投与にて屠殺した。埋入した右側下腿骨を摘出し、軟 X 線撮影を行い、さらに μ CT 撮影にて骨欠損内部を詳細に検索した。さらに、各群 2 匹を組織学的検討としてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、各群 5 匹で 3 点曲げ骨強度試験を行い生理学的に検討した。

4. 研究成果

まず、今回のコントロール群である PLLA-ACS 複合体のみ埋入した群と AdLacZ を塗布した群 (Fig 2) では再建 1 ヶ月後において骨形成が認められなかったため、3、6 ヶ月後の経過観察を行わなかった。



(Fig 2)

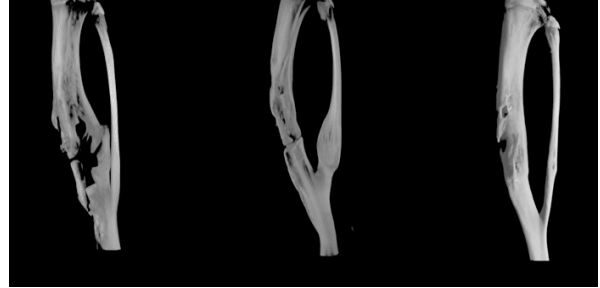
(1) 軟 X 線学的所見



健常側 1 ヶ月後 3 ヶ月後 6 ヶ月後
(Fig 3)

軟 X 線写真では、1 ヶ月後には健常側の外形とほぼ一致した骨形成が認められ、3 ヶ月から 6 ヶ月と経過するに従って骨の成熟が認められた。(Fig 3)

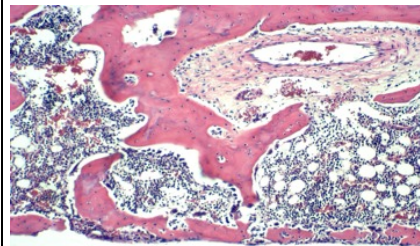
(2) μ CT 所見



1 ヶ月後 3 ヶ月後 6 ヶ月後
(Fig 4)

μ CT では 1 ヶ月後では PLLA 周囲の骨形成は認められるもののまだ脆弱な骨である。さらに、軟 X 線写真よりも確実に 3 ヶ月から 6 ヶ月への経時的な骨成熟が認められた。(Fig 4)

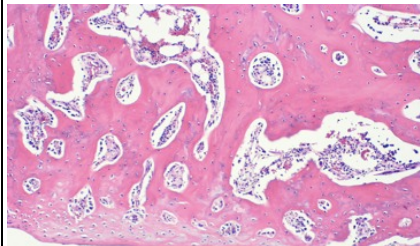
(3) 組織学的所見



10 μ m

PLLA

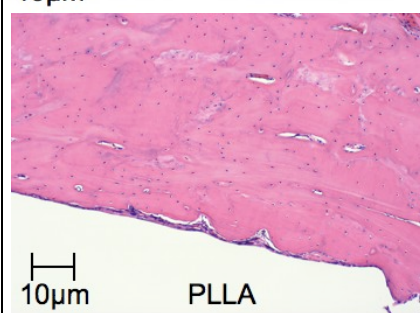
1 ヶ月後



10 μ m

PLLA

3 ヶ月後



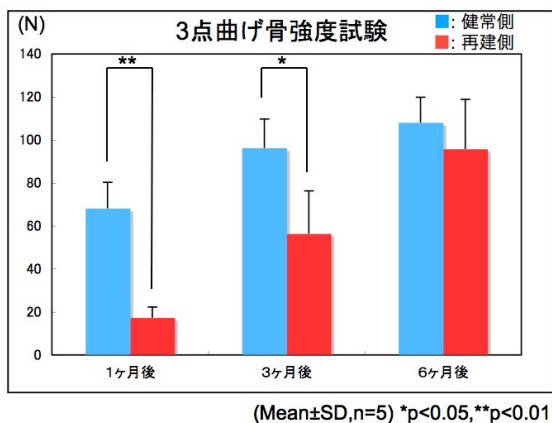
10 μ m

PLLA

6 ヶ月後
(Fig 5)

1ヶ月後ではPLLAの周囲に沿って骨芽細胞の誘導が認められた。さらに、3ヶ月後では骨形成は促進し、6ヶ月後では十分な骨の成熟が認められた。しかし、PLLAとの境界部は骨と直接結合しているのではなく、一層の結合組織の介在が認められた。(Fig 5)

(4) 骨強度試験



(Fig 6)

1, 3ヶ月後では健常側と比較して再建側の骨強度は有意に弱かった。しかし、6ヶ月での再建側は健常側とほぼ同等の骨強度を得ることが出来た。(Fig 6)

まとめ

今回の結果より、AdBMP-2による迅速で確実な骨再建は吸収性材料と組み合わせることで、固定器具の装着や移植骨採取部を必要とせずに低侵襲で行うことができた。さらに、PLLAとは強固に結合していないため、再建後の成長の妨げにならないことが予測された。今後は、吸収性材料の材質や形態に更なる検討を加えることにより、臨床応用にとって有用な再建方法になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海原 真治 (SHINJI KAIHARA)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号：70452331

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者