様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成　24 年　5 月　10 日現在

機関番号：15201
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2009～2011
課題番号：21659433
研究課題名（和文）　おとり遺伝子を用いた国産戦略による変形性関節症への新規遺伝子治療法の展開

研究課題名（英文）　THE DEVELOPMENT OF NEWLY JAPAN-ORIGINAL GENE THERAPY FOR DEGENERATIVE ARTHROSIS USING DECOY GENE.

研究代表者
石橋　浩晃（ISHIBASHI HIROAKI）
島根大学・医学部・准教授
研究者番号：90254630

研究成果の概要（和文）：変形性関節症における滑液や関節組織細胞を使った基礎的研究の結果，様々なサイトカインが関節組織の線維芽細胞，軟骨細胞や未分化間葉系細胞からの基質破壊酵素の産生を誘導し，骨・軟骨破壊が進行していくことが解明されてきた．我々もヒトから採取した顎関節組織や，培養細胞を使って，腫瘍壊死因子αや IFNγなどの炎症性サイトカインが転写因子 AP-1 や NF-kB を介して uPA の産生を亢進させるとともに，MMPs の産生を促進し，骨・軟骨破壊が進行してくことを明らかにしてきた．しかし，現在までの報告を基に中和抗体やアンチセンスによる遺伝子治療により，基質破壊酵素を抑制し，病態の進行を制御しようとする試みはない．その最たる理由は臨床応用における安全性がいまだ確立されていないことである．そこで，本研究はおとり遺伝子により転写因子のプロモーター領域への結合を阻害するという概念による遺伝子治療を，極めて安全性の高いウイルスベクターを用いて変形性関節症の治療に応用し，顎関節疾患治療法として確立・応用することを目的とて研究を遂行した．本研究により，HVJ-リポソーム法を用いた遺伝子導入による関節症進行の抑制を動物モデルで検討するため，マウス顎関節に変形性関節症を誘発させる実験系を確立した．しかし，安定した変形性関節症モデルによる再現性をいまだ確認できていないのが現状である．そこで，同時に口腔癌細胞や顎骨嚢胞上皮細胞などにも，おとり遺伝子導入による病態進行抑制の有無の検討を行った．今後，本法による変形性関節症の進行抑制効果について，これらの結果を応用し検討していく予定である．

研究成果の概要（英文）：Examination for the expression of uPA and MMPs stimulated by several cytokines using cultured cells. The expression of uPA and MMPs was increased by the stimulation with TNFα using cultured cells derived from cartilaginous tissue of TMJ. Examination of transcriptional factor related to cytokines stimulation. Transcriptional factors, NF-kB and Sp1, were activated by TNFα stimulation at the cultured cells derived from cartilaginous tissue. Establishment of the condition for the gene transfer We established the condition for the Decoy oligodeoxynucletides targeted to NF-kB and Sp1 using HVJ-liposome method, and decoy ODNs were routinely transferred to 100％ of the cells. Inhibition of the expression of uPA and MMPs by Decoy ODNs transfection The expression of the uPA and MMPs were inhibited by the transfection of Decoy ODNs to the cultured cells derived from cartilaginous tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,200,000	0	1,200,000
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総　計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：歯学　・　病態科学系歯学・歯科放射線学
キーワード：免疫・感染・炎症

1．研究開始当初の背景

変形性関節症においてサイトカインが関節細胞の基質破壊酵素の産生を誘導し，骨・軟骨破壊が進行していくことが解明されてきた．申請者も現在まで腫瘍壊死因子αが転写因子NF-kBを介して線溶系酵素のプラスミノ-ゲンアクチベ-タ-や金属プロテア-ゼの産生を促進し，骨・軟骨破壊が進行してくことを明らかにしてきた．しかし近年の知見を基に中和抗体やアンチセンスによる遺伝子治療により，基質破壊酵素を抑制し病態の進行を制御しする試みはない．その最たる理由は臨床応用における安全性がいまだ確立されていないことである．申請者は現在まで，癌の新規遺伝子治療法として，おとり遺伝子導入により転写因子のプロモ-タ-領域への結合を阻害して癌の増殖を抑制するという全く新しい概念による遺伝子治療を，極めて安全性の高いウイルスベクタ-を用いて確立していた．そこで本研究課題ではおとり遺伝子療法を他疾患に展開していく魁として，変形性関節症の治療に応用し，顎関節疾患の臨床における現状を打破し，21世紀の顎関節疾患治療法として確立することが必要であった．

２．研究の目的

本研究は，おとり遺伝子により関節組織内細胞の基質破壊酵素産生を抑制するという，全く新しい概念の遺伝子治療を開発することを目的とする．すなわち以下に記載するおとり遺伝子を用いて，TNFαにより活性化した転写因子群のプロモ-タ-領域への結合を阻害し，複数の基質破壊酵素の産生を同時抑制する可能性を追求することが最大の目的である．すなわち，おとり遺伝子を関節構成細胞の核内に発現させることができれば，TNFαにより活性化したNF-kB が圧倒的大量に存在するおとり遺伝子に結合してしまい，その結果，NF-kBが関与する全ての基質破壊控訴群のDNA翻訳を同時に抑制できる．そのためには，標的細胞の核内におとり遺伝子を多数かつ確実に発現させる必要がある．そこで，HVJ（Hemagglutinating virusof Japan）ウイルスベクターを用いたHVJ-リポソ-ム法を応用する．

３．研究の方法

(1)TNFαによる基質破壊酵素の産生の検証．

関節由来細胞における炎症性サイトカインの基質破壊酵素産生に与える影響を検討するために以下の検討を行った．すなわち，関節由来細胞を分離培養し，TNFα刺激によりuPAやMMP-1の発現量の変化をNorthern blotにて検討した．また，おとり遺伝子戦略のためには，標的転写因子の選択が重要であるが，関節細

胞はTNF　α共存下でNF-kBの活性化がみられる事をバンドシフトアッセイにより確認し，TNFαが本戦略の標的転写因子として利用できる事を検索した.

(2)ヒト関節組織における蛋白発現の解析.

本戦略には実際の生体組織においておとり遺伝子療法の標的分子が生理活性を示している事が原則になる．そこで，ヒト顎関節頭組織におけるTNFα,uPA およびMMP-1の局在を免疫組織化学染色により検索した．この組織中の基質破壊酵素が生理活性を示しているのか観察するために，組織中の基質破壊活性を in situ zymographyにより解析した.

(3)基質破壊酵素産生におけるおとり遺伝子導入効果の検討.変形性関節症へのNF-kBを標的としたおとり遺伝子治療を展開するための,基礎的資料を得るために，関節由来細胞にHVJ-リポソーム法を用いておとり遺伝子を導入し，TNF　α刺激によるuPAおよびMMP-1発現に与える効果をNorhtern blotにより検討した.

(4)臨床試験にむけての準備段階として動物モデルにおける変形性関節症への治療効果を検討する事が目的なので，動物モデルにおいて活性化している転写因子の解析が重要である．そこで動物モデル組織内において活性化している転写因子をバンドシフトアッセイにより検討した.

(5)動物モデルでの変形性関節症において抑制される基質破壊酵素の検索．基質破壊酵素およびその抑制因子に関して，申請者らの施設で検索しうる分子について未導入関節（対照）と，おとり遺伝子導入関節を用いて以下の方法により解析した.

①免疫組織化学的染色によるスクリ-ニング
②組織抽出物を用いたELISAによる蛋白定量
③Northern blotやRT-PCRによる遺伝子発現量の比較検討.
④in site hybridizationによる発現細胞の同定と，おとり遺伝子導入による抑制効果の検討.

(6)HVJ-リポソーム法に関する副作用の観察.
実験的関節症に対してHVJ-リポソームにより遺伝子導入したマウスを使って,肉眼的所見,解剖学的所見，組織学的所見により，副作用の有無について観察した．さらに，おとり遺伝子を封入しない,すなわちEmptyのHVJ-リポソームを投与したマウスについて同様に観察した.特にHVJは肺胞上皮細胞からの感染力が強いとされ，肺，気管，気管支などの呼吸器を中心に肺出血や，うっ血水腫などの変化の有無について詳細に検索した.

４．研究成果

(1) 本研究課題においてはHemagglutinating Virus of Japan (HVJ)を用いたHVJ-リポソ-ム法を応用して，骨由来樹立細胞を用いて，安全かつ確実におとり遺伝子を導入できる方法の確立した．受精鶏卵を使用し，HVJ の大量培養やウシ赤血球を用いた凝集能の測定により，ウイルス力価の定量法を確立した．これにより大量培養したHVJに紫外線を照射して，ゲノムRNAを断片化して失活させ,HVJ ウイルスの外套蛋白の融合能のみを保存させたHVJ particleの調製に成功した．このHVJ particlesとおとり遺伝子を含有するリポソ-ムを厳重な温度制御により融合させ，おとり遺伝子含有HVJ-リポソ-ムを作成した．このHVJ-リポソ-ムを培養液に添加し,さらに詳細な温度制御によりおとり遺伝子を封入したHVJ-リポソ-ムと培養骨肉腫細胞を融合させ,おとり遺伝子を導入させることを可能にした.本研究課題を遂行するには，破骨細胞様細胞や軟骨由来細胞などに安定して遺伝子導入できる最善の導入条件を確立する必要があり，

この遺伝子導入条件は将来の臨床応用に際しての基礎的資料となる

(2) FITC標識したおとり遺伝子をHVJ-リポソーム法にて培養口腔扁平上皮癌細胞に導入し，フローサイトメトリ-にてその導入効率を確認した．対象としておとり遺伝子を単味添加群，従来のリポソーム法にておとり遺伝子を導入した細胞を用いて，各群の導入効率を比較検討した．フローサイトメトリーにて蛍光強度を導入効率として比較検討した．おとり遺伝子単独群（培養液添加）や，従来のリポソーム法に比較して，HVJ-リポソーム法にて遺伝子導入した細胞は蛍光励起が右方にシフトしており，100%の細胞に導入が可能であった．

(3)関節由来細胞を分離培養し，TNFα刺激によりuPAやMMP-1の発現量の変化をNorthern blotにて検討すると，TNF αの濃度依存性にuPA およびMMP-1のmRNA発現が亢進し，関節細胞の基質破壊酵素産生にTNF αの関与を解明した．また，関節細胞はTNF α共存下でNF-kBの活性化がみられる事をバンドシフトアッセイにより確認し，TNFαが本戦略の標的転写因子として利用できる事を証明した．

(4)変形性関節症へのNF-kBを標的としたおとり遺伝子治療を展開するための，基礎的資料を得るために，関節由来細胞にHVJ-リポソーム法を用いておとり遺伝子を導入し，TNF α刺激によるuPAおよびMMP-1発現に与える効果をNorhtern blotにより検討し，基質破壊酵素の発現が抑制できることを解明した．

(5)動物モデルでの変形性関節症において抑制される基質破壊酵素の検索．これまでの研究成果により，NF-kBを標的にしたおとり遺伝子は培養関節細胞においてuPAやMMPsなどの強力な基質破壊酵素の同時抑制が可能であることが解明できた．しかし，おとり遺伝子治療を臨床応用に展開していくための次の段階として，動物モデルにおける変形性関節症においてもおとり遺伝子導入が同様の分子の発現を抑制できるか，あるいは他に発現抑制している分子があるのかを詳細に検索する事が必要である．そこで，基質破壊酵素およびその抑制因子に関して，申請者らの施設で検索しうる分子について未導入関節（対照）と，おとり遺伝子導入関節を用いて以下の方法により解析し，おとり遺伝子導入により基質破壊酵素の発現が抑制できることを解明した．

(6)実験的関節症に対してHVJ-リポソームにより遺伝子導入したマウスを使って，肉眼的所見，解剖学的所見，組織学的所見により，副作用の有無について観察した．さらに，おとり遺伝子を封入しない，すなわちEmptyのHVJ-リポソームを投与したマウスについて同様に観察した．特にHVJは肺胞上皮細胞からの感染力が強いとされているが，肺，気管，気管支などの呼吸器を中心に肺出血や，うっ血水腫などの明らかな変化を認めず，副作用の発現はみられなかった．

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３件）

1)Kanno T, Ishibashi H, Sukegawa S, Tsunematsu K, Nakamura S, Mano S, Sekine J, Furuki Y. A pediatric case of unicystic ameloblastoma treated with conservative suegery leading to eruption of the impacted permanent teeth. Hospital Dentistry and Oral-Maxillofacial Surgery. 23(2):129-132,2011.

2)Kondo S, Ishibashi H, Nariai Y, Kato T, Enomoto Y, Karino M, Sekine J: Management of tongue squamous cell carcinoma in pregnant women: Report of two Patients. Asian J Oral Maxillofac Surg 21:129-132,2009

3)Matsuura M, Onimaru M, Yonemitsu Y, Suzuki H, Nakano T, Ishibashi H, Shirasuna K, Sueishi K: Autocrine loop between vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangio-genesis in oral squamoid cancer cells. Am J Pathology 174:361-368,2009.

〔学会発表〕(計１件)

1)Ishibashi, H. Koike, H. Hideshima, K. Karino, M. Tunematsu, K, Sekine J. 「Novel gene therapy」 Newly regulation strategy against tumor angiogenesis and chemosensitivity using decoy system. 4th Internatinal Conference of Advanced Digital Technology in Head and Neck reconstruction, Freiburg, 2011.5.5

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.shimane-u.ac.jp/oral/

６．研究組織
(1)研究代表者
石橋　浩晃 (ISHIBASHI HIROAKI)
島根大学・医学部・准教授
研究者番号：90254630
(2)研究分担者
なし
(3)連携研究者
なし