

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006 ～ 2009

課題番号：18300169

研究課題名 (和文) 治療遺伝子を用いた腰痛に対する低侵襲治療システムの開発

研究課題名 (英文) Development of minimally invasive treatment system for low back pain using gene therapy

研究代表者

土井田 稔 (DOITA MINORU)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60237170

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：低侵襲治療システム、椎間板変性、遺伝子治療、再生医療

## 1. 研究計画の概要

### (1) 椎間板への遺伝子導入

本研究では、臨床応用可能なより安全で効率の高い遺伝子導入法の開発を行い、その手法を応用して治療遺伝子を椎間板内に導入することにより変性椎間板を再生させることである。そのために超音波コントラスト法による椎間板への遺伝子導入法を応用する。この方法を用いれば、安全かつ簡便に椎間板内への治療遺伝子の導入が可能になりうる。さらに、RNA 干渉法と呼ばれる新しい手法を椎間板に応用し、椎間板の変性に関連する負の要素 (遺伝子発現) をブロックすることにより、効率よく椎間板の再生を促進させることを目的とする。

### (2) 椎間板変性モデルの作成

臨床応用を見据え、椎間板変性疾患モデルを作成し、遺伝子導入後の変性椎間板組織の再生を MRI により客観的に評価する。

### (3) 低侵襲治療システムの構築

椎間板変性モデルを用いて、異化遺伝子の発現を抑制する siRNA と椎間板の基質を合成する遺伝子を導入し、変性椎間板の再生を客観的に確認する。これらの結果を総合して、安全で長期的に最も有効となりうる低侵襲腰痛治療法を開発する。

## 2. 研究の進捗状況

### (1) 椎間板への遺伝子導入

ラット尾椎椎間板に超音波を照射することで比較的高い効率で遺伝子導入が可能であること明らかにし、ウイルスを使用せず椎間板内に遺伝子を導入することに成功した。また、ラット尾椎椎間板に導入した標識遺伝子をブロックするための siRNA をコードす

る plasmid を椎間板へ in-vivo 導入し、標識遺伝子の発現が down regulate されることを報告した。

### (2) 椎間板変性モデルの作成

SD ラットの尻尾に椎間板に創外固定器を装着し、持続的に圧迫を加えて椎間板変性モデルを作成した。約 1 週間の圧迫により椎間板の変性を X-P, MRI と病理組織標本により確認し椎間板変性モデルの妥当性を証明した。このモデルを用いて変性過程に関与する遺伝子を PCR アレイにより解析した結果、椎間板での蛋白及び mRNA レベルでの MMP-3 の経時的な進行性の発現上昇が確認されるとともに他の MMP 群及び ADAMST 群でも発現上昇が確認され、同化遺伝子群に比べ異化遺伝子群が上昇する不均衡が経時的に増大すること椎間板変性につながっていることを明らかにした。

### (3) 低侵襲治療システムの構築

椎間板変性モデルを用いて、MMP-3 や ADAMST 群などの異化遺伝子の発現を抑制する siRNA と TGF-beta や BMP-2 など椎間板の器質合成を促進させる増殖因子の遺伝子を導入し、変性椎間板の再生を実験的にを行っている。導入遺伝子の longevity を調べ、長期的な遺伝子導入が可能かを検証する。また、実験動物の血液検査と全身主要臓器の病理組織検査を行い安全性について検証を行っている。

## 3. 現在までの達成度

③ やや遅れている。

椎間板への遺伝子導入については、in vitro と in vivo ともにウイルスベクターを用いな

い方法を確立し報告した。椎間板の基質合成を促進する遺伝子の導入と異化遺伝子の発現を抑制する siRNA の導入に成功し報告した。また、創外固定器を用い、椎間板を持続的に圧迫する変性モデルを確立し、変性過程に重要な役割を担う遺伝子の同定を行った。今後は治療遺伝子を変性椎間板内に導入し、変性を治癒させる研究と臨床応用に向けての安全性の評価に時間を有することから予定よりは、“やや遅れている”と評価した。しかし、研究目標の達成と研究成果の報告は予定通りの進行である。

#### 4. 今後の研究の推進方策

椎間板変性モデルを用いて、MMP-3 や ADAMST 群などの異化遺伝子の発現を抑制する siRNA と TGF-beta や BMP-2 など椎間板の器質合成を促進させる増殖因子の遺伝子を導入し、変性椎間板の再生を実験的に行う。また、将来の臨床応用に向けて、実験動物の血液検査と全身主要臓器の病理組織検査を行い安全性について検証を行う。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 7 件)

① Suzuki T, Nishida K, Kakutani K, Maeno K, Yurube T, Takada T, Kurosaka M, Doita M. Sustained long term RNA interference in nucleus pulposus cells in vivo mediated by unmodified small interfering RNA. *Eur Spine J*:18:263-70,2009 (査読有り)

② Nishida K, Suzuki T, Kakutani K, Yurube T, Maeno K, Kurosaka M, Doita M. Gene therapy approach for disc degeneration and associated spinal disorders. *Eur Spine J*:17:459-66,2009 (査読有り)

③ Kaneyama S, Nishida K, Takada T, Suzuki T, Shimomura T, Maeno K, Kurosaka M, Doita M. Fas ligand expression on human nucleus pulposus cells decreases with disc degeneration. *J Orthop Science*:13:130-5,2009 (査読有り)

④ Kakutani K, Nishida K, Uno K, Takada T, Shimomura T, Maeno K, Kurosaka M, Doita M. Prolonged down regulation of specific gene expression in nucleus pulposus cells mediated by RNA interference in vitro. *J Orthop Res*:24:1271-8,2009 (査読有り)

⑤ Nishida K, Doita M, Takada T, Kakutani K, Miyamaoto H, Shimomura T, Kurosaka M. Sustained transgene expression in intervertebral disc cells in vivo mediated by micro-bubble enhanced ultrasound gene therapy. *Spine*:31:1415-9,2009 (査読有り)

[学会発表] (計 21 件)

① Yurube T, et al. Pathomechanism of disc degeneration in a rat-tail model. 55<sup>th</sup> Orthopaedic Research Society, 2/21-24, 2009, Las Vegas

② 西田康太郎、他 腰椎変性疾患に対する分子生物学的アプローチの可能性. 第16回日本腰痛学会、11/1、2008、東京

③ 鈴木哲平、他 In vivo 椎間板への RNA 干渉を用いた内因性遺伝子に対する長期間の発現抑制の試み. 第23回日本整形外科基礎学術集会、10/23-24、2008、京都

④ Suzuki T, et al. Long term RNA interference in nucleus pulposus in vivo mediated by native unmodified short interfering RNA. 54<sup>th</sup> Orthopaedic Research Society, 3/1-4,2008, San Francisco

⑤ Nishida K, et al. Down regulation of specific gene expression in intervertebral disc cell in vivo mediated by micro-bubble enhanced ultrasound gene therapy. 33<sup>rd</sup> International Society for the Study of the Lumbar Spine, 6/13-17, 2006, Bergen