

平成 21 年 6 月 1 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：19890195

研究課題名（和文）ソノポレーション法を用いた骨誘導における新たな治療法の開発とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of new therapy for osteogenesis using sonoporation and its molecular mechanism

研究代表者

岩永 賢二郎（IWANAGA KENJIRO）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20448484

研究成果の概要：骨延長術は骨の造成のみならず周囲の骨膜、筋、神経脈管などの軟組織も同時に延長されることから、従来の骨欠損部位に対する自家骨移植術にはない利点を有する。しかしながら骨移植法に比べ治療期間の長期化が大きな欠点とされている。近年、骨延長術の治療期間の短期化を目的とした骨硬化促進の研究がなされている。そこで本研究では顎骨に骨延長術を行い、延長部に対し bFGF を超音波遺伝子法にて骨芽細胞に導入し、創傷治癒促進、骨硬化促進度合を解析したところ、新規骨誘導療法の実現に向け多くの知見を得ることができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ソノポレーション、骨延長、マイクロバブル、遺伝子導入、bFGF

## 1. 研究開始当初の背景

骨延長術は骨の造成のみならず周囲の骨膜、筋、神経脈管などの軟組織も同時に延長されることから、従来の骨欠損部位に対する自家骨移植術にはない利点を有する。しかしながら骨移植法に比べ治療期間の長期化が大きな欠点とされている。近年、骨延長術の治療期間の短期化を目的とした骨硬化促進の研究がなされている。rhbFGF タンパクとコラーゲンなどの担体を用いた骨硬化促進効果は多く報告されているが、半減期が短く、担体の機能性に依存する部分も大きい。一方、ウイルスベクターによる方法も行われてい

るが、安全面に問題がある。そこで注目されているのが、非ウイルスベクターによる遺伝子導入である。申請者はマイクロバブルと超音波を併用したソノポレーション法に着目した。

## 2. 研究の目的

顎骨に骨延長術を行い、延長部に対し bFGF 発現遺伝子をソノポレーション法にて骨芽細胞に導入し、創傷治癒促進、骨硬化促進度合を解析する。

## 3. 研究の方法

- ① *In vitro*の実験系における骨芽細胞への導入効率の検討：超音波遺伝子導入装置（ソニトロン 2000）とマイクロバブルを用いヒト由来骨芽細胞様細胞である Saos2 に pVIVO1-GFP/LacZ を導入する。24 時間培養した後、 $\beta$ -gal 染色により導入状態を確認する。設定条件として超音波の条件（超音波強度、照射時間、DUTY 比など）とマイクロバブルの濃度がある。
- ② *In vitro*の実験系における bFGF 発現プラスミドの導入と細胞状態の分子生物学的解析：ソノポレーション法を用い Saos2 細胞に bFGF 発現プラスミドを導入する。bFGF 導入後、MTT 法により細胞増殖能を測定する。ALP 酵素活性法で骨芽細胞分化能を解析する。また von Kossa 染色により骨形成量を測定する。
- ③ 臨床への応用を目指し、動物実験系での成績評価：実験動物を対照群（単純骨延長群）、超音波単独照射群、bFGF 発現プラスミド単独投与群、bFGF 発現プラスミド投与+超音波遺伝子導入群の四群に分け、骨延長終了、遺伝子導入後の期間によってそれぞれ 1 週、2 週、4 週群（各群：3 匹）とする。手術は全身麻酔下にて行い、下顎骨体部の骨切りを行い、創外固定延長器を装着する。術後 7 日間の待機期間の後、0.5mm/日の割合で骨延長を行う。総延長距離は 3.5mm とし、7 日間の延長を行う。延長終了後、延長部に対して以下の刺激を加える。実験群：延長終了時、延長部にマイクロバブル/bFGF 遺伝子混合溶液をインジェクションし、ソニトロン 2000 の超音波プローブを当て超音波照射する。以上の経過で延長終了後 1 週、2 週、4 週で安楽死させ、試料を採取する。RT-PCR 法にて bFGF 遺伝子発現、Western blotting 法にて bFGF タンパクの発現を確認するとともに  $\mu$  CT ならびに組織学的に骨形成の良否を評価する。

#### 4. 研究成果

- ① *In vitro*の実験系における骨芽細胞への導入効率の検討：遺伝子の導入効率を上げるため、超音波造影剤であるマイクロバブル（Sonovue）を併用した。細胞懸濁液に pVIVO1-GFP/LacZ とマイクロバブルの混合液を加え、超音波照射を行い 24 時間後、 $\beta$ -Gal 染色により導入状態を確認した。超音波の強度および至適細胞数を調べたところ、細胞数  $1.5 \times 10^6$  個に対し、周波数 1 MHz、強度  $2.0 \text{ W/cm}^2$ 、Duty 比 10%、マイクロバブルの濃度は 2.5% で最大の効果が得られた。

- ② *In vitro*の実験系における bFGF 発現プラスミドの導入と細胞状態の分子生物学的解析：MTT 法にて bFGF 発現プラスミド導入群で明らかな細胞活性増強を認めた。また導入群では ALP 活性の抑制を認めた。von Kossa 染色にて骨形成量を評価したところ、bFGF 導入群はコントロール群に比べ有意な骨形成の増強を認めた。
- ③ 臨床への応用を目指し、動物実験系での成績評価：bFGF 導入群仮骨周囲組織に bFGF 遺伝子の発現が観察され、bFGF タンパクも検出された。 $\mu$  CT および組織学的に、bFGF 導入群仮骨に軟骨架橋の消失と骨架橋が見られ、治癒の促進が観察された。

#### 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 1 件）

- ① Hironobu Maeda, Kazuhiro Tominaga, Kenjiro Iwanaga, Fuminori Nagao, Manabu Habu, Toshiyuki Tsujisawa, Yuji Seta, Kuniaki Toyoshima, Jin-ichi Fukuda, Tatsuji Nishihara. Targeted drug delivery system for oral cancer therapy using sonoporation. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2009. (in press) 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Maeda, H., Iwanaga, K., Nagao, F., Tsujisawa, T., Tominaga, K., Fukuda, J., Nishihara, T. Targeted drug delivery system for cancer therapy using sonoporation. 86<sup>st</sup> General Session of the IADR, Toronto, Canada, July, 3, 2008
- ② Nagao, F., Tsujisawa, T., Maeda, H., Iwanaga, K., Habu, M., Yoshioka, I., Tominaga, K., Fukuda, J., Nishihara, T. Gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist into HIG-82 cells. 86<sup>st</sup> General Session of the IADR, Toronto, Canada, July, 3, 2008
- ③ 永尾史徳, 岩永賢二郎, 土生学, 吉岡泉, 福田仁一, 富永和宏. ソノポレーション法を用いた遺伝子導入による顎関節炎の次世代治療法の開発 第 21 回日本顎関節学会総会・学術大会 大阪 2008 年 7 月 27 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩永 賢二郎 (IWANAGA KENJIRO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20448484

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし