

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300182

研究課題名(和文) 生体でのBMPによる骨形成機序に裏付けられた低侵襲性歯槽骨再生遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Alveolar bone regeneration based on the low invasive therapy using in vivo BMP gene transfer.

研究代表者

山本 敏男 (YAMAMOTO, Toshio)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30107776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,000,000円

研究成果の概要(和文)：低侵襲性歯槽骨再生法の開発を目指し in vivo electroporation法を用いてラット歯周組織にBMP-2/7発現ベクターによる遺伝子導入を行い，骨誘導能について解析した。歯周組織の細胞にBMPが発現したことから遺伝子導入が可能で有り，且つ既存の骨に新たな骨が添加することが示された。本法は，非ウイルス性ベクターとelectroporation装置のみで施行でき，簡便かつ経済的であると共に侵襲性が極めて低い等の利点がある。以上より，in vivo electroporation法を用いた歯周組織へのBMP遺伝子導入法は新たな骨再生療法となる可能性が期待された。

研究成果の概要(英文)：To develop a low invasive alveolar bone regeneration therapy, non-virus BMP-2/7 expressive vector was transferred into the periodontal tissue of rats using in vivo electroporation. The expression of BMP-2 and -7 in the periodontal cells was immunohistochemically confirmed. Moreover, the bone formation induced by BMP-2/7 gene transfer took place and the newly formed bone was added to originally existed bone. The method used can be carried out only with non-virus BMP vector and an electroporation devise. In addition, the method is handy, economic and quite a low invasiveness. These advantages lead to the expectation that gene transfer by in vivo electroporation method can be used for bone regeneration in near future.

研究分野：組織学

キーワード：歯槽骨 遺伝子導入 骨再生 BMP electroporation

1. 研究開始当初の背景

わが国は超高齢化社会を迎え、高齢者の生活の質の向上が重要な課題となっている。寝たきりや認知症など、重度な生活の質の低下は歯の喪失による咀嚼率の低下に起因する場合がある。この歯の喪失の最大の原因は歯周病であることが知られている。歯周病は国内において、約9000万人が罹患しているとされ、進行すると歯を支える骨である歯槽骨が破壊・吸収され、最終的には歯が脱落する。一旦歯槽骨が吸収されると歯槽骨は再生されず減少した状態のままである。一方、積極的な歯槽骨再生治療は自家骨移植や自己細胞移植など侵襲性を伴う大掛かりな外科的治療法があるが、症例が限られ高齢者に対する外科的処置はリスクが高く、適しているとはいえない。

BMPは強力な骨誘導能を有するサイトカインであることが知られている。しかし、BMPの発見以来骨再生治療で有効に臨床応用されていない。その背景には、BMPをタンパクの状態で使用するには高度な精製が必要であり、またコラーゲンなどの担体が必要であること (Bessho, Kawai, et al. J. Musculoskel. Res. 2002) からコスト高の問題が存在する。一方、BMP遺伝子をウイルス性ベクターとして生体内へデリバリーする方法があるが、BMP遺伝子を発現させると免疫応答の問題が生じ免疫抑制下といった特殊な状態でのみ骨誘導が可能であった (Kaihara, Kawai, et al. Gene Therapy 2004)。そのため、歯槽骨といった小規模な部位での治療法として応用するにはリスクが高い。その解決策として、我々は非ウイルス性BMP-2遺伝子発現ベクターと *in vivo* electroporation法を併用した骨誘導法を開発した (Kawai et al. Human Gene Therapy. 2003, Kawai et al. Anatomical Record. 2005, Kawai et al. BMC Musculoskeletal. 2006. 特願2006-511121(国際)2006.3.22)。本法は非ウイルス性ベクターの弱点である遺

伝子導入効率の低さをelectroporation法の併用によって改善したものである。

Electroporationはすでに精神科や顎関節症の治療法として確立されていることから、安全性にも問題ないと考えられる。

BMPの骨形成機序については、BMPがいわゆる未分化間葉系細胞に作用することで骨形成細胞に分化することは実験的に明らかになっている。しかしながら、歯周組織のように既存の骨組織がある場合、誘導骨と既存の骨との正確な評価が必要となり、且つ骨形成細胞の由来など生体 (*in vivo*) でのBMPによる骨誘導メカニズムの全容は明からでない。これらのことから、BMPの臨床応用が遅れているといえる。そこで、本研究はその解決策として生体でのBMP遺伝子導入後の骨誘導過程において細胞動態を把握しつつ骨形成機序を明らかにすると共に、臨床応用を目指した検索を行うこととした。

2. 研究の目的

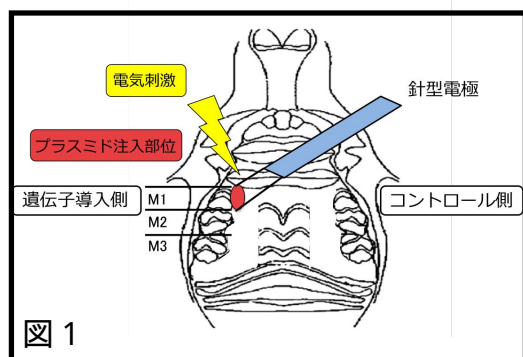
外科的治療のみである歯槽骨再生治療に新たな治療システムとして骨形成機序に裏付けされた安全、簡便かつ効果的低侵襲性歯槽骨再生治療法を開発すること 具体的目的として、1)一度失われた歯槽骨は自己再生されないことから、強力な骨誘導能を有するサイトカインBone Morphogenetic Protein:以下BMP)を安全かつ効率的に歯周組織に作用させ、歯槽骨再生を促す。2)われわれが開発したBMP遺伝子発現システム(非ウイルス性BMP発現ベクターと *in vivo* electroporation法との併用)を歯周組織で適用し、歯槽骨再生治療法として確立させる。

3)安全性を確立するため、これまで明らかにされていないBMP遺伝子導入による生体での骨形成メカニズムを明らかにすることで早期臨床応用の実現化を目指す。

3. 研究の方法

BMP遺伝子導入によって誘導された骨形成の

解析を行うために、後述のように大きく分けて1)と2)の実験を行った。実験動物にはラット(SD系, 9週齢)を用いた。非ウイルス性BMP遺伝子ベクターは、BMP-2またはBMP-7の単独発現ベクターより強い骨誘導能が知られているのでBMP-2と7の同時発現ベクター(PCGS-BMP-2/7)を用いた。遺伝子導入は図1に示すようにBMP-2/7遺伝子(25 μ L(0.5 μ g/ μ L)を上顎の第一大臼歯部の口蓋側歯周組織に行い、反対側をコントロールとした。注入後直ちに針型平行電極を注入部位に挿入し、50V, 50msec X 32パルスの条件でエレクトロポレーションを行った。



上記の方法で作製したBMP遺伝子導入ラットについて下記の解析を行った。

1) 遺伝子導入後の骨形成についての組織学的、免疫組織化学的解析

BMP遺伝子導入後の歯周組織における骨形成過程を経時的(1,3,5,7,10日後)に観察した。また、BMP発現細胞と骨芽細胞のマーカー(骨型アルカリホスファターゼ、以下ALP)ならびにリンパ球や好中球などの炎症性細胞(マーカー; CD68)の出現を免疫組織化学的に調べた。さらに、通常、骨組織はリモデリングが生じている。そこで、骨リモデリングと誘導歯槽骨との関連性を検討するために、カルセイン(8mg/kg(b.w)/ml)とテトラサイクリン(20mg/kg(b.w)/mL)で骨ラベリングし、遺伝子導入後1ならびに2週間で試料を採取した。採取後、樹脂包埋切片を作製し、通常光と蛍光法で同一切片を観察した。

2) BMP遺伝子導入後の細胞動態と骨形成機

序の検討

骨形成細胞の由来が骨髄の未分化間葉系細胞であるのか、または歯根膜等の局所由来かを検討した。未分化間葉系細胞の同定は、同細胞系のマーカーの一つであるCD44の免疫染色でおこなった。また、遺伝子組換え動物であるGFPラットを用いた実験を行った。すなわち、X線照射で骨髄を破壊したラットにGFPラットの骨髄を移植し、続いてBMP遺伝子導入を行い、遺伝子導入部位におけるGFP陽性細胞の出現を調べた。

4. 研究成果

1) の実験

遺伝子導入後1日後より導入側の歯周組織では、血球やリンパ球等の炎症性細胞の浸潤が認められ、導入3日で最も強い炎症像を呈した。導入5日以降では炎症像は殆ど認められなくなった。導入部位においてBMPタンパクの発現をBMP-2ならびにBMP-7抗体を用いた免疫染色をおこなって調べると、導入後1日目でBMP-2ならびにBMP-7陽性の細胞が出現した。したがって、本研究で行った針型電極を用いたelectroporation法ならびに通電条件で局所の細胞にBMP遺伝子を導入できることが示された。一方、骨動態について観察すると、導入5日目頃から歯槽骨周囲に新生骨が認められるようになった(図2)。

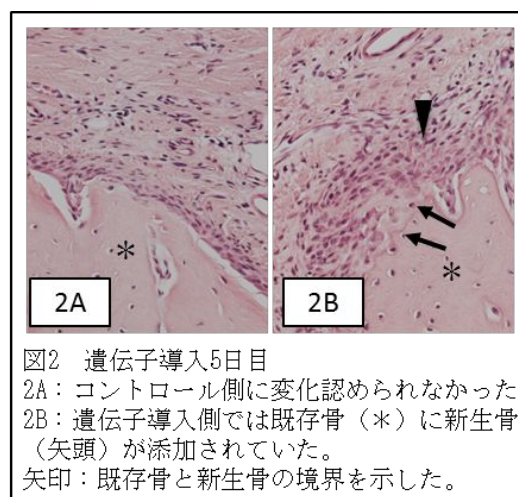


図2 遺伝子導入5日目
2A: コントロール側に変化認められなかった。
2B: 遺伝子導入側では既存骨(*)に新生骨(矢頭)が添加されていた。
矢印: 既存骨と新生骨の境界を示した。

さらに7日以降では既存骨に添加するような新生骨が認められた。

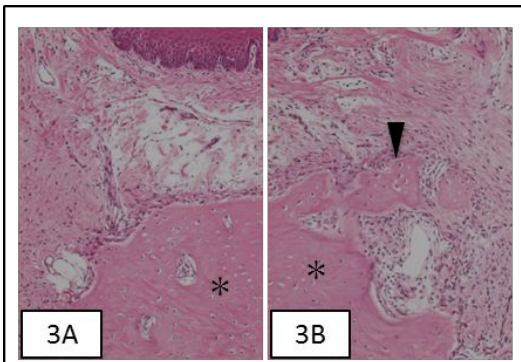


図3 遺伝子導入10日後
3A: コントロール側には新生骨は認められなかった。3B: 遺伝子導入側では既存骨(*)に新生骨(矢頭)が添加され、骨が伸長していた。

骨型 ALP の免疫染色を行うと、新生骨または既存骨に添加した骨周囲に多数の陽性細胞がみられ活発な骨形成を行っていることが明らかであった。これらの結果から、遺伝子導入1日目で BMP タンパクが発現し、その後組織に炎症反応がみられるものの導入後5日前後で消炎し、この時期に近接して骨形成がみられことが示された。また、カルセインとテトラサイクリンを用いた骨のラベリング実験においても遺伝子導入側の骨組織ではラベリング間隔が広がっており骨形成が促進されていたことが示された。

2) の実験

CD44 抗体を用いた免疫染色を行って観察すると、遺伝子導入1日後、3日後ではコントロール側と比較して CD44 陽性細胞が多く認められた。5日以降では陽性細胞は減少し、7日後にはコントロール側と比較して陽性細胞数に差はなかった。次に GFP ラットの骨髄を移植した動物を用いた実験を行った。GFP 陽性細胞の検出は抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を行った。導入3日後では炎症反応がみられ、血球・リンパ系の細胞は GFP 陽性を呈した。また、紡錘状を呈した線維芽細胞様の細胞にも GFP 陽性を呈するものが観察された。導入10日後のものを観察すると、新生の添加骨が認められ、破骨細胞は GFP 陽性を呈したが骨芽細胞は GFP 陰性であった。これらの結果は遺伝子導入に未分化間葉系細胞がよ

り多く出現することを示したものである。したがって、新生骨の形成にはこれらの未分化間葉系細胞も動員されることが推測された。一方、これらの未分化間葉系細胞の由来を検討するために行った骨髄移植実験では、遺伝子導入3日後に線維芽細胞の様相を呈する細胞が GFP 陽性を呈したことから、骨髄由来の細胞が遺伝子導入により線維芽細胞様細胞に転化したと考えられた。しかしながら、10日後にみられた新生骨の骨芽細胞は GFP 陰性であったので骨髄由来ではないと考えられた。今回、骨髄由来の細胞が骨芽細胞に転化したという直接的な所見は得られなかったが、従来の研究で骨周囲の線維芽細胞様細胞が BMP 陽性を呈し、骨芽細胞への分化を示唆する像が得られていることから、3日後にみられた GFP 陽性の線維芽細胞様細胞から骨芽細胞への分化についてはさらに検討を要する。

3) 結論

本研究においては、*in vivo* electroporation 法を用いてラット歯周組織中の細胞に BMP-2/7 発現ベクターによる遺伝子導入が可能であり、且つ骨誘導能が示された。本法は、非ウイルス性ベクターと electroporation 装置のみで施行可能であるため、簡便かつ経済的である。また、生体に対して切開、粘膜剥離等の外科的侵襲がないため、反復して行うことも可能である。したがって、臨床的にデンタル X 線写真や CT 写真撮影等により骨形成状態をモニタリングしながら、治療を行うことも期待できる。以上より、*in vivo* electroporation 法を用いた歯周組織への BMP 遺伝子導入法は、今後、新たな骨再生療法となる可能性が示唆された。

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)

〔学会発表〕(計 8 件)

河井まりこ、片岡陽平、飯田征二、大浦

清, 山本敏男: BMP-2/7 発現非ウイルス性ベクターと *in vivo* electroporation を併用した歯周組織への遺伝子導入と歯槽骨再生.

第 15 回再生医療学会総会, 2016 年 3 月 17 ~ 19 日, 大阪,

河井まりこ, 片岡陽平, 飯田征二, 山本敏男: 歯槽骨再生を目的とした歯周組織への遺伝子導入と細胞動態の解析.

第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015 年 10 月 16 ~ 18 日, 名古屋

河井まりこ, 片岡陽平, 池亀美華, 大浦清, 山本敏男: *in vivo* electroporation を用いた BMP 遺伝子導入による筋内異所性骨誘導における未分化間葉系細胞の動態について.

第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2015 年 9 月 11 ~ 13 日, 新潟

河井まりこ, 片岡陽平, 塩津範子, 池亀美華, 大浦清, 飯田征二, 山本敏男:

In vivo electroporation 法を用いた歯周組織への遺伝子導入と歯槽骨再生の試み.

第 14 回日本再生医療学会, 2015 年 3 月 19 日 ~ 21 日, 横浜

片岡陽平, 河井まりこ, 飯田征二, 山本敏男: 歯槽骨再生を目的とした歯周組織への遺伝子導入の試み.

第 59 回日本口腔外科学会, 2014 年 10 月 18 日 ~ 20 日, 千葉

片岡陽平, 河井まりこ, 塩津範子, 池亀美華, 飯田征二, 山本敏男: Gene transfer to Periodontal tissue using *in vivo* electroporation for alveolar bone.

第 56 回歯科基礎医学会, 2014 年 9 月 26 日 ~ 28 日, 福岡

M. Kawai, T. Yamamoto: Alveolar Bone Regeneration by BMP Gene Transfer using *in vivo* Electroporation.

20th Annual Meeting of JSGT 2014, 2014 年 8 月 6 日 ~ 8 日, Tokyo

河井まりこ, 片岡陽平, 塩津範子, 池亀美華, 飯田征二, 山本敏男: *In vivo* electroporation を用いた歯周組織への遺伝子導入と骨再生法への応用.

第 13 回日本再生医療学会総会, 2014 年 3 月 4 日 ~ 6 日, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本敏男 (YAMAMOTO, Toshio)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30107776

(2) 研究分担者

河井まりこ (KAWAI, Mariko)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 40379839

池亀美華 (IKEGAME, Mika)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 70282986

(3) 連携研究者

長塚仁 (NAGATSUKA, Hitoshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 70237535