

| | |
|---------|--|
| 氏 名（本籍） | 岸 ^{きし} 本 ^{もと} 光 ^{こう} 司 ^し |
| 学位の種類 | 博 士（医 学） |
| 学位記番号 | 医 博 第 1 8 8 7 号 |
| 学位授与年月日 | 平 成 1 4 年 3 月 2 5 日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研究科専攻 | 東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻 |
| 学位論文題目 | 骨形成蛋白遺伝子 <i>BMP-4</i> のエレクトロポレーションを用いた導入による異所性骨形成 |

（主 査）

| | | |
|--------|------------|------------|
| 論文審査委員 | 教授 国 分 正 一 | 教授 仲 村 春 和 |
| | 教授 山 田 敦 | 教授 松 原 洋 一 |

論文内容要旨

目 的

骨形成蛋白 (BMP) は異所的に骨, 軟骨を誘導する。担体にしみこませて蛋白質の形で用いることもできるが, 異物反応, 感染をおこさず, BMP を徐放する最適の担体は見つかっていない。一方で BMP をコードする遺伝子をウィルスベクターで導入し持続的に発現させると, 担体を用いずに骨を誘導できることが報告されている。しかし, ウィルスベクターは免疫反応をおこすうえ, 導入範囲をコントロールすることが困難である。本研究では, 遺伝子導入の方法として, 最近発生物学分野でよく用いられるエレクトロポレーションを用いた。これは細胞膜に, 矩形波をかけ微少で可逆的な穴をあけ, 陰電荷を帯びる DNA を細胞内に導入する方法である。BMP-4 をコードする遺伝子を, エレクトロポレーションでマウスの腓腹筋に導入し, 骨の誘導の有無を調べた。

材 料 と 方 法

プラスミド: mouse BMP4cDNA および, 対照として LacZ 遺伝子を, 強制発現ベクター pMiw II および pCAGGS の multiple cloning site に挿入した (それぞれ pMiw-BMP4, pMiwZ, pCAGGS-BMP4, pCAGGS-LacZ)。大腸菌に形質転換し, 増殖させ QIAGEN Plasmid Maxi Kit で DNA を抽出, 精製した後, 生理的食塩水に溶解した。マウス: pMiw II ベクターでは BALB/cA, pCAGGS ベクターでは C57BL/6J のそれぞれ雄を用い, 8 週齢でエレクトロポレーションを行い, SPF 条件下に飼育した。パルス発生装置: BTX 社のパルス発生装置 T820 を使用, 電極は 2 本のステンレス製針型電極を 5mm の間隔に固定したものを使用した。

麻酔下にマウスの左後肢を除毛。経皮的に腓腹筋に電極を刺入し, その間に各プラスミド 100 μ g 相当量を筋注, 直後に 50 ms, 100 V のパルスを 3 回, 陰陽極を反転し計 6 回かけた。一定期間飼育後, 頸椎脱臼で屠殺し, 軟 X 線撮影を同一条件下に行った。腓腹筋のコンパートメントを摘出し, 10 μ m の凍結切片を作成した。 β ガラクトシダーゼの活性は X-gal で反応させ調べ, BMP-4 の発現は抗体染色を行い調べた。また, HE 染色と, von Kossa 染色を行った。

結 果

軟 X 線像で pMiwZ, pMiw-BMP4 導入群とも腓腹筋筋層内に, 異所性石灰化像を認めため, 組織学的検索により骨組織の確認を行った。

pMiw-BMP4 導入群の BMP-4 に対する免疫染色ではエレクトロポレーション後 7 日に間葉系

細胞で発現がみられた。14日後以降では発現は減弱していた。組織像では、7日後6匹中6匹に筋束の石灰化と間葉系細胞の浸潤がみられ、14日後に6匹中2匹に層状骨を、うち1匹には骨髄の形成を認めた。21日後の6匹中4匹に層状骨を、うち2匹に骨髄の形成を認め、28日後の6匹中2匹に層状骨を、うち1匹には骨髄の形成を認めた。

pMiwZ 導入群では筋束が石灰化していたが、層状骨の構造は存在しなかった。時間経過とともに石灰化領域は減少した。生理食塩水を筋注後にエレクトロポレーションを行っても、同様の筋束の石灰化が認められ、この筋束の石灰化は通電による反応性のものといえた。

プラスミド溶液量を減らし、マウスの系統を変えることにより、筋束の石灰化は検出されなくなった。pCAGGS-BMP4のエレクトロポレーションでは、BMP-4の発現がエレクトロポレーション後14日でもみられ、骨形成が14日後以降でみられた。

担体を用いなくとも骨を誘導することができ、この方法は整形外科的な遺伝子治療に有望だと思われる。

審査結果の要旨

骨形成蛋白（BMP）は異所的に骨，軟骨を誘導する。担体にしみ込ませて用いることもできるが，異物反応，感染を起こさず，BMPを徐放する最適の担体は見付かっている。ウィルスベクターは免疫反応を起こす上に，導入範囲のコントロールが困難である。本研究では，エレクトロポレーションを用いて，BMP-4をコードする遺伝子をマウスの腓腹筋に導入し，骨の誘導を調べた。

プラスミド作製は，mouse BMP4 cDNA と，対照として LacZ 遺伝子を，強制発現ベクター pMiw II および pCAGGS の multiple cloning site に挿入した（それぞれ pMiw-BMP4，pMiwZ，pCAGGS-BMP4，pCAGGS-LacZ）。大腸菌に形質転換し，増殖させ QIAGEN Plasmid Maxi Kit で DNA を抽出，精製した後，生理的食塩水に溶解した。マウスは，pMiw II ベクターでは BALB/cA，pCAGGS ベクターでは C57BL/6J のそれぞれ雄を用いた。エレクトロポレーションは，8 週齢で腓腹筋に行い，一定期間後に軟 X 線撮影を行い，腓腹筋のコンパートメントを摘出し， β ガラクトシダーゼ活性，BMP-4 の発現，HE 染色と von Kossa 染色標本の観察を行った。

その結果，① 軟 X 線像で pMiwZ，pMiw-BMP4 導入群とも腓腹筋筋層内に，異所性石灰化が認められた。② pMiw-BMP4 導入群で BMP-4 はエレクトロポレーション後 7 日に間葉系細胞で発現がみられ，14 日後以降では発現は減弱していた。組織像で，7 日後 6 匹中 6 匹に筋束の石灰化と間葉系細胞の浸潤がみられ，14 日後に 6 匹中 2 匹に層状骨を，うち 1 匹には骨髄の形成がみられた。21 日後の 6 匹中 4 匹に層状骨を，うち 2 匹に骨髄の形成がみられ，28 日後の 6 匹中 2 匹に層状骨を，うち 1 匹には骨髄の形成がみられた。③ pMiwZ 導入群で筋束が石灰化していたが，層状骨の構造は存在しなかった。時間経過とともに石灰化領域は減少した。生理食塩水を筋注後にエレクトロポレーションを行っても，同様の筋束の石灰化が認められ，通電による反応性石灰化といえた。④ プラスミド溶液量を減らし，マウスの系統を変えることにより，筋束の石灰化は陰性となった。pCAGGS-BMP4 の導入では，BMP-4 の発現がエレクトロポレーション後 14 日でもみられ，骨形成が 14 日後以降でみられた。

以上，本研究は初めて，担体を用いずにエレクトロポレーションで骨を誘導することに成功し，例えば偽関節に対する本法による整形外科遺伝子治療の可能性を明らかにしたもので，学位授与に十分値する。