

論文要旨等報告書

氏	下野賢吾
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3574 号
学位授与の日付	平成20年3月25日
学位授与の要件	歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	ヘパリン結合活性を増強した遺伝子改変骨形成タンパク質を徐放するキャリアの最適化とその骨再生効果
論文審査委員	教授 鈴木 一臣 教授 窪木 拓男 准教授 池亀 美華

学位論文内容の要旨

1. 緒言

骨形成タンパク質 (bone morphogenetic proteins ; BMPs) は骨再生において非常に重要な働きをしており、骨折や骨欠損の治療に対する効果が期待されている。recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) の臨床応用は既に始まっているが、このタンパク質を用いてもヒトや大動物において安定した効果が得られない場合がある。その原因としては、骨欠損部にrhBMP-2をキャリアとともに投与しても、キャリアからリリースされたrhBMP-2が血行を介して拡散してしまい、必要な時期に必要な濃度のrhBMP-2が再生局所に維持されないことが考えられる。このため、現状では大量かつ高濃度のrhBMP-2を投与するか、十分な骨組織が再生されるまで繰り返し投与を行わなければならない。この結果、医療費の増大や、高濃度のrhBMP-2を繰り返し投与することによって引き起こされる様々な副作用が懸念されている。

この問題を解決するために、共同研究者のSebaldらは、遺伝子組換技術によりヘパリン結合部位を改変・修飾することにより組織停滞性を高め、骨誘導能を改善した遺伝子組換変異型骨形成タンパク質 (rhBMP-2 T4, Wurzler, K. K. et. al., 2004) を、大腸菌発現系で生成することに成功した。しかしながらrhBMP-2 T4は糖鎖の修飾が哺乳類細胞由来のrhBMP-2とは異なること、ヘパリン結合ドメインの追加挿入により自らの組織停滞性が向上していることから、従来の野生型rhBMP-2に最適化されているキャリアを用いることが適切であるかどうか不明であった。そこで本研究では、等電点の異なる各種ゼラチンをキャリアに用いてrhBMP-2 T4に最適な徐放動態を示すゼラチンハイドロゲルを*in vitro* と *in vivo* の両面から検討するとともに、ラット頭蓋骨骨欠損モデルでその骨再生能を検討した。

2. 方法および結果

1) *in vitro*ならびに*in vivo*におけるrhBMP-2 T4徐放試験

等電点を調整した6種類のゼラチンハイドロゲル (スぺルミン修飾ゼラチン : spermated gelatin, SM, エチレンジアミン修飾ゼラチン : ethylenediaminated gelatin, ED, 塩基性ゼラチン : basic gelatin with the isoelectric point 9.0, PI9, 酸性ゼラチン : acidic gelatin with the isoelectric point 5.0, PI5, コハク酸修飾ゼラチン : succinylated acid gelatin, SUC, スルホン酸修飾ゼラチン : sulfoethylated acid gelatin, SUL) に¹²⁵I標識したrhBMP-2 T4を含浸させ、*in vitro*ならびに*in vivo*において徐放動態を検討した。この結果、等電点が高いゼラチンハイドロゲルほど、高いBMP-2 T4の残存率を示した。さらに、残存率の優れていたSM群とPI9群の長期徐放動態を確認すると実験期間を通じてキャリアを用いないrhBMP-2 T4群に比べSM群とPI9群は

高い残存率を示した。術後7日目ではSM群がPI9群に比較して高い残存率を示したが、両群とも術後14日になるとrhBMP-2 T4はほぼ局所より消失した。

2) ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおける rhBMP-2 T4/ゼラチンハイドロゲル複合体の骨再生能の評価

rhBMP-2 T4/ゼラチンハイドロゲルの骨再生能を検討するために、ラット頭蓋骨骨欠損(直径6.2 mm、8週齢)にrhBMP-2 T4を0.1, 1.0, 5.0 μg 含浸させたSMとPI9を埋植し、術後2, 4, 8週で屠殺、軟エックス線ならびに組織学的検討を加えた。キャリアを用いないrhBMP-2 T4溶液を直接滴下したものをコントロール群とした。

軟エックス線写真像においては、術後4週のrhBMP-2 T4を含浸させたPI9群は骨欠損部に高い不透過像を示した。しかし、SM群では1.0 μg と5.0 μg ともに骨欠損部周囲に不透過性の亢進はみられたものの、骨欠損部全体にわたる不透過像は認められなかった。キャリアを用いないコントロール群では術後8週においても不透過像は認められなかった。二元配置分散分析の結果、キャリアの種類 ($p < 0.001$) とrhBMP-2 T4の量 ($p < 0.001$) に、骨欠損部の不透過性の多寡に対する主効果が認められ、さらに両因子に相互作用が認められた ($p < 0.001$)。

組織学的検討の結果、PI9群において濃度依存的に骨欠損部の骨再生を認めた。しかしながら、SM群ではほとんど骨欠損を修復する骨再生は認められず、欠損部の骨の断端の肥厚のみが観察された。コントロール群では術後8週においてもほとんど骨の再生は認められなかった。

3) 再生初期組織における遺伝子発現の検討

骨再生初期の遺伝子発現を確認するために5.0 μg のrhBMP-2 T4溶液を含浸させたPI9とSMを骨欠損部に埋植し、術後1週目に骨欠損部に再生した組織を回収し遺伝子発現を検討した。SM群においてはPI9をキャリアに用いた場合と比較して、TNF α 、IL-1 β 、CTGFとBMPRIIの遺伝子発現が高かった。対応のないt-testの結果、IL-1 β ($p = 0.0128$)、CTGF ($p = 0.0327$) とBMPRII ($p = 0.0162$) に有意な遺伝子発現の差が認められた。TNF α の遺伝子発現はSMにおいて高い傾向があった($p = 0.1462$)。

3. まとめ

遺伝子組換え技術によりヘパリン結合ドメインを追加挿入した大腸菌由来遺伝子組換え変異型骨形成タンパク質(rhBMP-2 T4)のキャリアとしては、等電点を変えたゼラチンハイドロゲルの中でも塩基性ゼラチンであるPI9が最も適していた。本成長因子を臨床応用する際には、大動物やヒトを用いたトランスレーショナル研究が不可欠であるが、本新規骨補てん材の応用により、臨床現場における優れた骨再生のみならず、副作用の低減や費用の削減に大いに期待がもたれる。

論文審査結果の要旨

骨形成タンパク質 (bone morphogenetic proteins ; BMPs) は骨再生において非常に重要な働きをしており、骨折や骨欠損の治療に対する効果が期待されている。米国では recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) の臨床応用が既に始まっているが、これらの因子を用いてもヒトや大動物において安定した効果が得られない場合がある。その原因として、骨欠損部に rhBMP-2 をキャリアとともに投与しても、キャリアからリリースされた rhBMP-2 が、すぐに拡散してしまい、必要な時期に必要な濃度の rhBMP-2 が再生局所に維持されないことが考えられている。

これらの問題点を解決するためにヘパリン結合部位を改変・修飾することで組織停滞性を高め、骨誘導能を改善した遺伝子組換え変異型骨形成タンパク質 (rhBMP-2 T4, Wurzler, K. K. et. al., 2004) が開発された。しかし、rhBMP-2 T4 は大腸菌発現系で合成されるために、現在、臨床で用いられている哺乳動物細胞由来の rhBMP-2 とは糖鎖の修飾が異なる。また、それ自体がヘパリン結合部位を追加挿入され組織停滞性が向上しているため、より効果を増強する適切なキャリア材は不明であった。そこで本研究では等電点の異なるゼラチンハイドロゲルからの rhBMP-2 T4 の徐放動態を *in vitro* と *in vivo* の両面から検討するとともに、ラット頭蓋骨骨欠損モデルでその骨再生能を検討した。その結果以下の点が明らかになった。

1. *in vitro* と *in vivo* の徐放試験の結果から、等電点が高いゼラチンハイドロゲルほど rhBMP-2 T4 をより局所に停滞させることがわかった。特に塩基性ゼラチン (basic gelatin with the isoelectric point 9.0; PI9) をスペルミンで修飾したスペルミン修飾ゼラチン (sperminated gelatin; SM) が、ゼラチンハイドロゲルの分解に伴って rhBMP-2 T4 を最も長期に徐放することが明らかとなった。
2. ラット頭蓋骨骨欠損モデルでは、SM 群に対して PI9 群が高い骨再生能を示した。PI9 群では rhBMP-2 T4 の濃度に依存した骨の再生がみられた。
3. ラット頭蓋骨骨欠損部における術後 1 週の再生組織の IL-1 β や TNF α などの炎症性メディエーターの遺伝子発現は、SM 群が PI9 群に比べ亢進していた。

これらの知見により rhBMP-2 T4 は PI9 をキャリアに用いた場合に、ラット頭蓋骨骨欠損を効率よく再生させることが明らかとなった。本研究は成長因子を応用した再生医療の臨床応用に向け、非常に示唆に富む有益な研究業績と考えられた。また、実験計画および実験手法も適切であった。従って本申請論文は博士 (歯学) の学位授与に値するものと判断した。