

| | | | |
|---------|---|----------|----------|
| 氏名 | 片岡 陽平 | | |
| 授与した学位 | 博士 | | |
| 専攻分野の名称 | 歯学 | | |
| 学位授与番号 | 博甲第5323号 | | |
| 学位授与の日付 | 平成28年3月25日 | | |
| 学位授与の要件 | 医歯薬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) | | |
| 学位論文の題目 | 歯槽骨再生を目的とした <i>in vivo</i> electroporation法を用いたラット歯周組織への遺伝子導入 | | |
| 論文審査委員 | 長塚 仁 教授 | 山本 敏男 教授 | 志茂 剛 准教授 |

学位論文内容の要旨

緒言

歯科領域において歯周病、嚢胞性病変等により生じた骨欠損部に対する骨再生療法は、機能的、審美的に患者の生活の質を高めるために重要である。現在、臨床的に行われている歯槽骨再建法としては、自家骨移植、骨組織誘導再生療法等があるが、いずれも外科的侵襲を伴うものであり、患者の負担は大きい。従って、外科的侵襲の少ない新たな歯槽骨再生法の開発は重要な課題である。

1971年 Urist が異所性骨形成を誘導するタンパク性因子として Bone Morphogenetic Protein:BMP を発見して以降、BMP の応用による骨再生法の研究がなされ、遺伝子工学的手法の発展と共にリコンビナントヒト BMP(recombinant human BMP:rhBMP)が作製され、骨再生にむけて臨床応用されてきた。しかし、BMP タンパクを使用する場合、経済的な問題や適切な担体を選定する必要があり、現状で骨再生法としては安定性に欠くのが実情である。

歯周組織中には、骨髄由来あるいは歯周組織由来の未分化間葉系細胞が存在するとされる。そこで、歯周組織中の細胞に BMP 遺伝子を導入・発現させ、分泌された BMP タンパクをその周囲に存在する未分化間葉系細胞に作用させることにより骨形成細胞への分化を誘導するという新たな歯槽骨再生法を確立することを目的とした。

方法

Wistar ラット雄 9 週齢の上顎右側第 1 大臼歯口蓋側歯周組織を標的として、BMP-2/7 遺伝子発現ベクター(pCAGGS-BMP-2/7) 0.5 μg/μl を 30G 針シリンジにて注入後、針型平行電極を注入部位に挿入し、エレクトロポレーターにて直ちに電気刺激 (50V, 50msec×32pulses) を与えた。遺伝子導入 1, 3, 5, 7 日後に各ラットをジエチルエーテル過剰吸入麻酔下に 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (pH 7.4) による還流固定を行い、口蓋部を摘出した。摘出組織は同固定液にて 12 時

間浸漬固定の後、0.05M リン酸 (pH 7.4) で緩衝した 10% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 溶液にて脱灰し、パラフィンに包埋した後、厚さ 5 μ m の連続切片を作製した。

切片はヘマトキシリン・エオジン染色で観察すると共に、抗ラット CD68 抗体、抗ヒト BMP-2 抗体、抗ヒト BMP-7 抗体、抗ラット CD44 抗体、抗ラット骨型 Alkaline Phosphatase (ALP) 抗体を用いた免疫染色による組織学的解析を行った。

結果

遺伝子導入側では、1日後より歯周組織標的部位に血球やリンパ球等の炎症性細胞の浸潤が認められ、且つヒト BMP-2、ヒト BMP-7 陽性細胞の出現が認められた。また、未分化間葉系細胞マーカーの一つであるラット CD44 陽性細胞も認められた。3日後では最も強い炎症像が認められたが、5日後になると炎症は軽減しており、周囲に ALP 陽性細胞を多く認める新生骨が観察されるようになり、さらに7日後では既存骨に添加するような新生骨を認めた。

考察

本研究では、ラット歯周組織にヒト BMP-2/7 遺伝子発現ベクターと *in vivo* electroporation 法の組合せによる遺伝子導入により、BMP の発現が可能であった。また、BMP の発現部位は歯槽頂付近の歯周組織に限局しており、ラット口蓋側歯周組織形態に対応した針型電極を用いることで目的部位に限局した遺伝子導入が可能と考えられた。歯周治療における治療目的部位の決定は厳正に行われるべきものであり、治療目的部位に限局して遺伝子導入操作が行えるという点でも本法は有効であると考えられた。BMP は未分化間葉系細胞を骨芽細胞や軟骨細胞に分化させる能力を有することが知られている。本研究では、遺伝子導入5日後以降の標的歯周組織では既存の歯槽骨に添加するように新生骨を認め、さらに新生骨の周囲にはラット骨型 ALP 陽性細胞を多く認めたことから、遺伝子導入により産生された BMP により未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化が促進され骨形成に働いたと考えられた。一方で、コントロール側では新生骨の添加は認められなかった。

結論

In vivo electroporation 法を用いてラット歯周組織中の細胞に BMP-2/7 発現ベクターの遺伝子導入が可能であり、且つ骨誘導能を示した。本法は、非ウイルス性ベクターと electroporation の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。よって、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。

論文審査結果の要旨

歯科領域において歯周病、嚢胞性病変等により生じた骨欠損部に対する骨再生療法は、機能的、審美的に患者の生活の質を高めるために重要である。現在、臨床的に行われている歯槽骨再建法としては、自家骨移植、骨組織誘導再生療法等があるが、いずれも外科的侵襲を伴うものであり、患者の負担は大きい。従って、外科的侵襲の少ない新たな歯槽骨再生法の開発は重要な課題である。

歯周組織中には、歯周組織由来あるいは骨髄由来の未分化間葉系細胞が存在するとされる。本研究は、ラット歯周組織中の細胞に BMP 遺伝子を導入・発現させ、合成・分泌された BMP タンパクをその周囲に存在する未分化間葉系細胞に作用させることにより骨形成細胞への分化を誘導する、という新たな歯槽骨再生法を確立することを目的として行われたものである。遺伝子導入方法として *in vivo* electroporation 法を用いた。BMP 発現ベクターとしては、BMP-2 または BMP-7 単独発現ベクターより骨形成誘導能が高いことが知られている BMP-2/7 同時発現ベクターを用いた。

In vivo electroporation 法を用いてラット歯周組織中の細胞に BMP-2 と BMP-7 が発現していることが免疫組織化学的に確認され、BMP-2/7 発現ベクターによる遺伝子導入に成功したと考えられた。組織学的に遺伝子導入 5 日後から新生骨が認められるようになったことから、*in vivo* electroporation 法による骨形成が確認された。

本法は、非ウイルス性ベクターと electroporation の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、デンタル X 線写真や Computed Tomography 写真撮影等により骨形成状態をモニタリングしながら、反復して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、新たな歯槽骨再生治療法となる可能性が示唆された。よって審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。