

学位論文

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
顎口腔再建外科学分野

片岡 陽平

歯槽骨再生を目的とした *in vivo* electroporation 法を用いた
ラット歯周組織への遺伝子導入

片岡 陽平

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野

(指導：飯田征二教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔形態学分野

(委託：山本敏男教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (2014 年 9 月 福岡)

第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会 (2014 年 10 月千葉)

第 14 回再生医療学会総会 (2015 年 3 月 神奈川)

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歯槽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¹⁾。現在、臨床的に行われている歯槽骨再生法としては、自家骨移植²⁻⁴⁾、骨組織誘導再生療法⁵⁾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 は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 を発見した⁶⁾。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⁷⁾、骨再生にむけて臨床応用されてきた⁸⁻¹⁰⁾。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¹¹⁾。

一方で、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^{12,13)}。そこで、本研究ではラット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。

BMP 遺伝子導入の方法として非ウイルス性ベクターと *in vivo* electroporation 法の組合せにより行った。一般的に、DNA 直接投与法や遺伝子銃法のようなウイルスベクターを用いない遺伝子導入法では導入効率が低いことが欠点となるが¹⁴⁾、生体内の標的組織部に電気パルスをかけることにより、細胞膜を一過性に穿孔させ遺伝子導入を行う *in vivo* electroporation 法¹⁵⁾を併用することで遺伝子発現効率は数百倍増加する¹⁶⁾。また、ウイルス性ベクターを用いないことから、ウイルス特有の毒性や免疫応答の惹起等¹⁷⁾を考慮する必要がなく、安全性が高い。さらに操作性が簡便であり、且つ経済性に優れている。

BMP は BMP-2, BMP-4 あるいは BMP-7 など骨誘導能を有するいくつかのファミリーから構成されており、これらは BMP-2/4 や BMP-2/7 などのヘテロダイマーを形成し、各ホモダイマーと比較して骨誘導能が高いことが知られている¹⁸⁾。

これまでに行った実験において、BMP-2/7 を産生する非ウイルス性ベクターを構築し、ラット下腿筋を目的部位として BMP-2/7 発現非ウイルス性ベクターと *in vivo* electroporation 法の併用により異所性骨誘導に成功している¹⁹⁾。同実験においては、BMP-2/7 発現ベクターは BMP-2 や BMP-7 等の BMP 単独発現ベクターと比較して骨形成速度を増大させ、早期に骨形成を誘導することが確認されている¹⁹⁾。

よって、本研究では歯槽骨再生を目的とし、非ウイルス性ベクターである BMP-2/7 発現プラスミドベクターと *in vivo* electroporation 法を併用したラット歯周組織への遺伝子導入を試みた。

材料ならびに方法

1. BMP-2/7 プラスミドベクターの精製

BMP-2/7 遺伝子発現ベクター (pCAGGS-BMP-2/7) は Endofree Plasmid Kits Giga® (QIAGEN, Germany, Hilden) にて精製した¹⁹⁾。

2. 実験動物

実験動物には 9 週齢雄性 SD ラットを使用した。なお、本研究において使用した全ての動物は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の実験動物規則に従い飼育、使用した。また、本研究は岡山大学動物実験委員会の審査、承認を受けて行った。(承認番号：0KU-2012137)

3. ラット歯周組織へのヒト BMP-2/7 遺伝子導入 (図 1)

ラットはペントバルビタールナトリウム (5.0mg/100g 体重) 腹腔内投与にて麻酔を行った。プラスミド DNA (pCAGGS-BMP-2/7) 0.5 μ g/ μ l を 30G 針シリンジにてラット上顎右側第 1 大臼歯口蓋側歯周組織へ注入し、針型平行電極 (ネッパージーン, Chiba, Japan) を注入部位に挿入し、直ちにエレクトロポレーター (ジーンパルサー, 株式会社オオタ, Okayama, Japan) にて 50V, 50 msec. \times 32 pulses の条件下に電気刺激を加えた。

4. 組織学的観察

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にて麻酔後、4%パラホルムアルデヒド・PBS (Phosphate buffered saline) (pH7.4) による灌流固定を行い、口蓋部を摘出した。摘出組織は同固定液にて 12 時間浸漬固定後、10% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) を含む PBS (pH 7.4) にて 4 週間脱灰を行った。脱灰後、パラフィン包埋し、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・エオジン染色および免疫組織化学的染色を行い、組織学的に観察した。

1) ヘマトキシリン・エオジン染色

切片をキシレンにて脱パラフィンし、100%から 70%エタノールおよび精製水にて再水和後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。70%から 100%エタノールおよびキシレンにて脱水・透徹を行った後、Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にて封入し、組織学的観察を行った。

2) 免疫組織化学的染色

切片をキシレンにて脱パラフィン後、0.05%シトラコン酸ナトリウム溶液 (イムノセイバー, 日新 EM, Tokyo, Japan) にて 98°C で 45 分間処理し、抗原を賦活化した。さらに内因性ペルオキシダーゼの不活性化のため、室温で 10 分間 0.3% 過酸化水素水に反応させ、PBS で洗浄した後、続けて 30 分間 10%ウシ血清アルブミンを含む PBS に反応させ、PBS で洗浄した。抗体は、骨芽細胞マーカーとしてウサギポリクロナール抗体抗ラット骨型アルカリフォスファターゼ (Alkaline Phosphatase:ALP) 抗体 (タカラバイオ, Shiga, Japan)、未分化間葉系細胞マーカーとしてマウスモノクロナール抗体抗ラット CD44 抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) を使用した。

一次抗体として抗ラット ALP 抗体は 200 倍、抗ラット CD44 抗体は 400 倍に 1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で希釈して 4°C で一晩反応させた。二次抗体として、抗ラット ALP 抗体は抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) を用い、3%ウシ血清アルブミンを含む PBS で 100 倍に希釈して使用した。抗ラット CD44 抗体は ENVISION™ キット® (DAKO Japan, Tokyo, Japan) を用いて免疫反応を行った。発色は 0.01% 3, 3'-ジアミノベンチジン [0.05M Tris HCl Buffer (pH7.6)] で行った。対比染色はマイヤーヘマトキシリン染色液

(Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で行った。陰性対照は二次抗体のみで行い、すべて陰性であった。

3) 蛍光免疫染色

脱パラフィン後に前述の免疫組織化学的染色と同様にして抗原賦活化処理と内因性ペルオキシダーゼ不活性化処理を行った。蛍光免疫染色として、マウスモノクローナル抗体抗ラット CD68 抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)、ウサギポリクローナル抗体抗ヒト BMP-2 抗体 (Abcam, Tokyo, Japan) および抗ヒト BMP-7 抗体 (Abcam, Tokyo, Japan) を使用した。一次抗体として、抗ラット CD68 抗体は 500 倍、抗ヒト BMP-2 抗体は 600 倍、抗ヒト BMP-7 抗体は 400 倍にそれぞれ 3% ウシ血清アルブミンを含む PBS で希釈して 4°C で一晩反応させた。PBS にて洗浄後、二次抗体を抗ラット CD68 抗体は抗マウス IgG Alexa594 ヤギ抗体 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands)、抗ヒト BMP-2 抗体および抗ヒト BMP-7 抗体は抗ウサギ IgG Alexa488 ヤギ抗体 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) を用いて、それぞれ 1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で 100 倍に希釈して室温で 60 分間反応させた。標本は反応終了後、PBS で洗浄し、対比染色として Hoechst33342 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) で 10 分間反応させ、PBS で洗浄後にベクターシールド (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

結果

In vivo electroporation 法による歯周組織への BMP-2/7 遺伝子導入後の経時的組織像

1) ヘマトキシリン・エオジン染色像 (図 2)

遺伝子導入 1 日後より遺伝子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た。導入 3 日後では最も強い炎症像が認められた。導入 5 日後以降、炎症像は殆ど認められなくなり、既存の歯槽骨周囲に新生骨

が認められた。さらに7日後では既存骨に添加する新生骨が認められた。

2) 抗ラット CD68 抗体染色像 (図 3)

遺伝子導入 1 日後より遺伝子導入側の歯周組織では炎症性細胞のマーカーである抗ラット CD68 抗体陽性細胞の出現が認められた。導入 3 日後ではより多くの陽性細胞が認められ、導入 5 日後では減少した。

3) 抗ヒト BMP-2 抗体染色像 (図 4)

遺伝子導入 1 日後より導入遺伝子 BMP-2/7 の発現の結果産生されたと考えられる抗ヒト BMP-2 抗体陽性細胞が認められ、導入 5 日後では減少した。

4) 抗ヒト BMP-7 抗体染色像 (図 5)

抗ヒト BMP-7 抗体による染色では抗ヒト BMP-2 抗体と同様に遺伝子導入側歯周組織において遺伝子導入 1 日後から抗ヒト BMP-7 抗体陽性細胞の出現が認められ、導入 5 日後以降は減少した。

5) 抗ラット CD44 抗体染色像 (図 6)

未分化間葉系細胞のマーカーの一つである抗ラット CD44 抗体を用いた免疫染色では遺伝子導入 1 日後、3 日後ではコントロール側と比較し、陽性細胞が多く認められた。5 日後以降、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、陽性細胞数の差はなかった。

6) 抗ラット骨型 ALP 抗体染色像 (図 7)

ヘマトキシリン・エオジン染色像では遺伝子導入 5 日後から既存の歯槽骨周囲に新生骨が形成され、ラット ALP 陽性細胞は新生骨の周囲に多く認められた。さらに導入 7 日後では既存の歯槽骨に連続して新生骨が形成され、その周囲に多くのラット ALP 陽性骨芽細胞が認められた。

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。ヒト BMP-2、ヒト BMP-7 陽性細胞は共に遺伝子導入 3 日後までの出現が最も多く、以降、長期間の持続的な陽性細胞の出現は認められなかった。Wikesjo らはイヌを使用した実験で、3.0mg/ml と高濃度の rhBMP-2 をコーティングしたインプラント体の埋入により、リモデリングが過剰に活性化され、埋入したイン

プラント周囲の骨吸収とともにインプラントが著しく移動すると報告しており²⁰⁾、大量の BMP の局所投与では骨再生に対して阻害作用があると考えられている²¹⁾。一方、本法では自己生体内の細胞に BMP を発現させており、且つ BMP の発現は短期間であったことから、骨吸収のような BMP による為害性は少ないと考えられた。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への正確な遺伝子導入が可能であった。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。

また、BMP-2/7 遺伝子導入後の歯周組織では、プラスミドの注入や電気刺激により、好中球やリンパ球、マクロファージ等と考えられる類円形の炎症性細胞の浸潤が認められた。それら炎症性細胞の局在は炎症性細胞マーカーである CD68 陽性細胞の局在と類似していた。また、未分化間葉系細胞のマーカーの一つとされる CD44 陽性細胞の局在と重なる部位があることより、遺伝子導入後の歯周組織では炎症性細胞の周囲に未分化間葉系細胞が誘導された可能性が考えられた。未分化間葉系細胞は炎症性細胞が産生するサイトカインや増殖因子に対して遊走性が活性化するという報告²²⁾があり、今後詳細な検討が必要と考えられた。

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している²³⁾。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新生骨が認められた。新生骨の周囲には骨型 ALP 陽性細胞が多く認められたことから、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。これは今回、BMP-2、BMP-7 等の単独遺伝子導入ではなく、骨形成速度が増大する BMP-2/7 遺伝子発現ベクターを用いたことが早期の骨形成に影響したと考えられた。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。

また、本研究では BMP 遺伝子導入 7 日後までは新生骨の添加像を確認したが、今後、歯槽骨のリモデリングに対する影響を検討するべく長期的な観察を行うことが必要と考える。

結論

本研究では、*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。

謝辞

稿を終えるにあたり、研究のご指導を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野、飯田征二教授に謹んで感謝の意を表すと共に懇篤なる御指導、御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔形態学分野、山本敏男教授に謝意を表します。また、研究実施に際し御指導、御鞭撻を賜りました河井まりこ博士（現 大阪歯科大学薬理学講座講師）に心より感謝いたします。最後に本研究を行うにあたり、貴重な援助と助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔形態学分野の緒先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Genden, E. M.: Comparison of functional and quality-of-life outcomes in patients with and without palatomaxillary reconstruction: a preliminary report. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.*, **129**, 775–780, 2003.
- 2) Grillon, G. L., Gunther, S. F. & Connole, P. W.: A new technique for obtaining iliac bone grafts. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **42**, 172–176, 1984.
- 3) Mcneir, D. & Ray, R.: Alternative Donor Site in Maxillofacial Surgery : A Preliminary Report. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **50**, 1258–1263, 1992.
- 4) Besly, W. & Ward Booth, P.: Technique for harvesting tibial cancellous bone modified for use in children. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **37**, 129–133, 1999.
- 5) Zitzmann, N. U., Schärer, P. & Marinello, C. P.: Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* ., **16**, 355–366, 2001.
- 6) Urist, M.R. & Strates B.S.: Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* ., **50**, 1392-1406, 1971.
- 7) Wozney, J. M.: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* ., **242**, 1528–1534, 1988.
- 8) Fiorellini, J. P.: Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J. Periodontol.*, **76**, 605–13, 2005.
- 9) Triplett, R. G.: Pivotal , Randomized , Parallel Evaluation of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 / Absorbable Collagen Sponge and Autogenous Bone Graft for Maxillary Sinus Floor Augmentation. *YJOMS* ., **67**, 1947–1960, 2009.

- 10) Herford, A. S. & Boyne, P. J.: Reconstruction of Mandibular Continuity Defects With Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2). *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **66**, 616–624 ,2008.
- 11) Yaremchuk, K. L., Toma, M. S., Somers, M. L. & Peterson, E.: Acute airway obstruction in cervical spinal procedures with bone morphogenetic proteins. *Laryngoscope.*, **120**, 1954–7 ,2010.
- 12) Nishimura, M., Takase, K., Suehiro, F. & Murata, H.: Candidates cell sources to regenerate alveolar bone from oral tissue. *Int. J. Dent.*, **2012**, 1–5 ,2012.
- 13) Pittenger, M. F.: Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science.*, **284**, 143–148 ,1999.
- 14) Wolff, J. A.: Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science.*, **247**, 1465–1468 ,1990.
- 15) Grigorescu, A. : Electroporation and electrofusion in cellular and viral biology. *Rev Roum Virol.*, **43**, 101–107 ,1992.
- 16) Aihara, H. & Miyazaki, J.: Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 867–870 ,1998.
- 17) Sakurai, H., Kawabata, K., Sakurai, F., Nakagawa, S. & Mizuguchi, H.: Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int. J. Pharm.*, **354**, 9–15 ,2008.
- 18) Isrel D.I., J. Nove, K.M. Kerms, R.J. Kaufman, V. Rosen, K.A. Cox, J.M. Wozney.: Heterodimers bone morihogenetic protein show enhanced activities *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factor.*, **13**, 291-300 , 1996.
- 19) Kawai, M.: Simple strategy for bone regeneration with a BMP-2/7 gene expression cassette vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 1012–7 ,2009.

- 20) Wikesjö, U. M. E.: Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J. Clin. Periodontol.*, **35**, 1001–10 ,2008.
- 21) Keller, S.: Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat. Struct. Biol.*, **11**, 101–7 ,1992.
- 22) Honczarenko, M.: Human Bone Marrow Stromal Cells Express a Distinct Set of Biologically Functional Chemokine Receptors. *Stem Cells.*, **24**, 1030–1041 ,2006.
- 23) Beederman, M.: BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J. Biomed. Sci. Eng.*, **06**, 32–52 ,2013.

付図

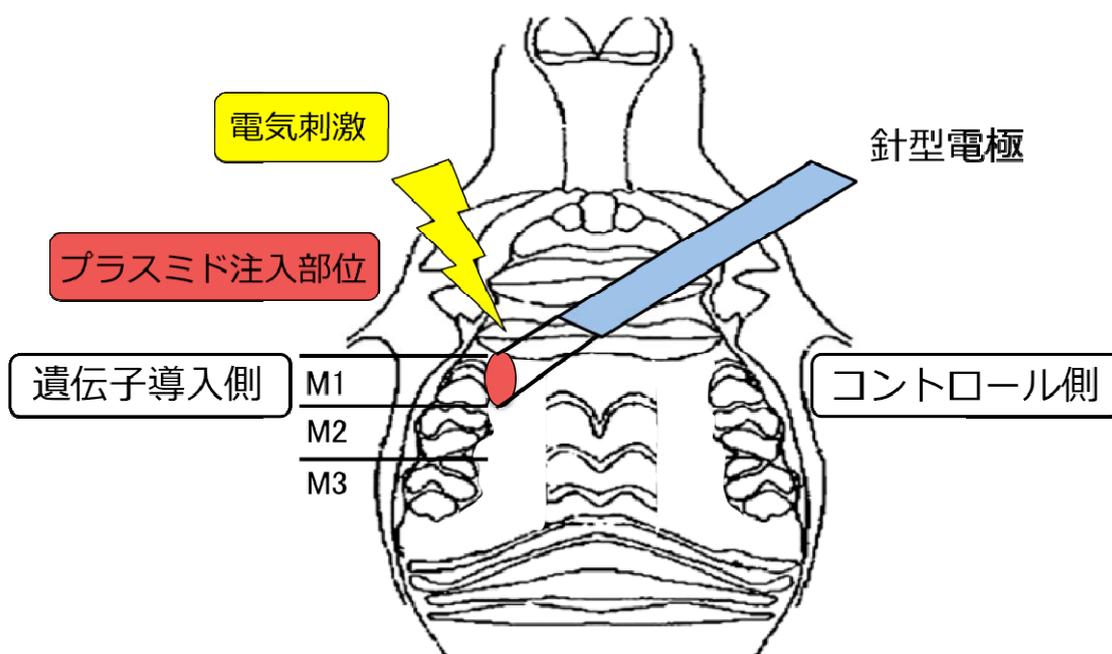


図1 ラット歯周組織への遺伝子導入

M1（上顎右側第1大臼歯）口蓋側歯周組織を目的部位としてプラスミドベクターを注入し、針型電極を注入部位に挿入、直ちに電気刺激を与えた。反対側をコントロール側として観察した。

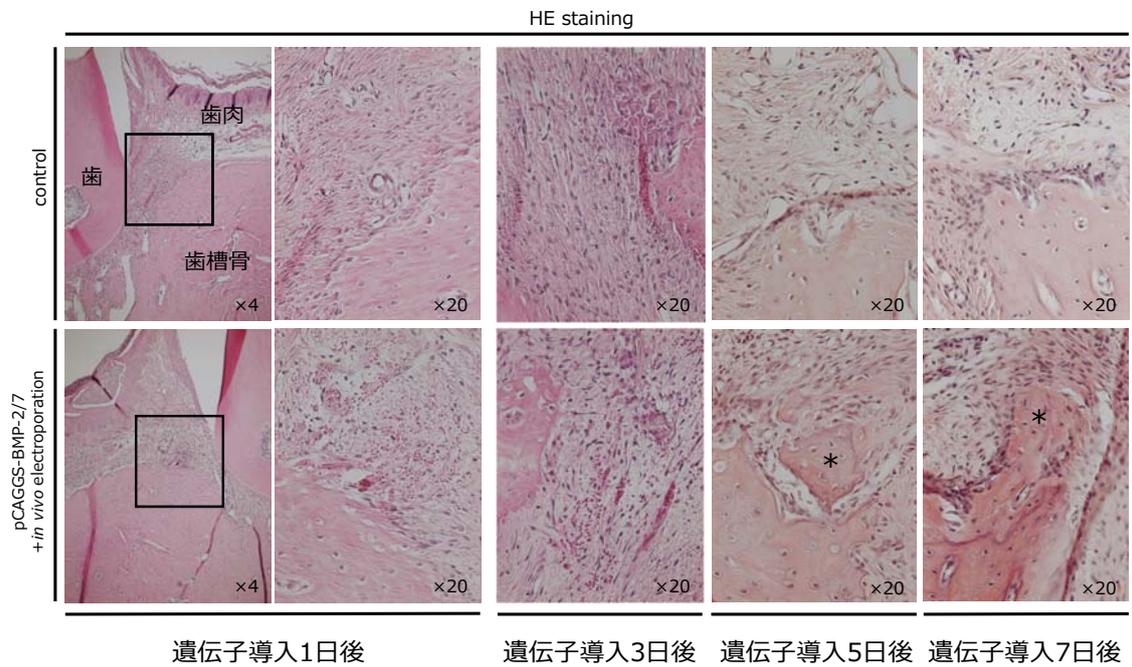


図2 ラット歯周組織におけるヘマトキシリン・エオジン染色像

図下段の遺伝子導入側では3日目までは骨の新生は認められなかったが、5日以降では新生骨が認められた。 *：新生骨

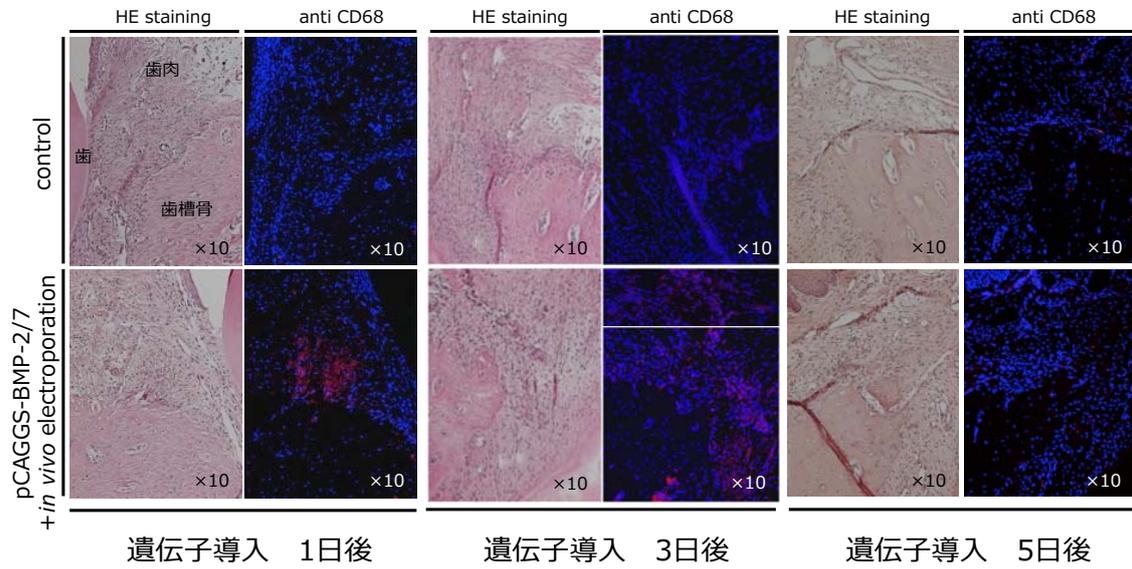


図3 ラット歯周組織における抗ラット CD68 抗体染色像

遺伝子導入側（図下段）では、3日目までは炎症性細胞が多数出現したが5日以降では激減した。赤桃色蛍光：CD68陽性の炎症性細胞

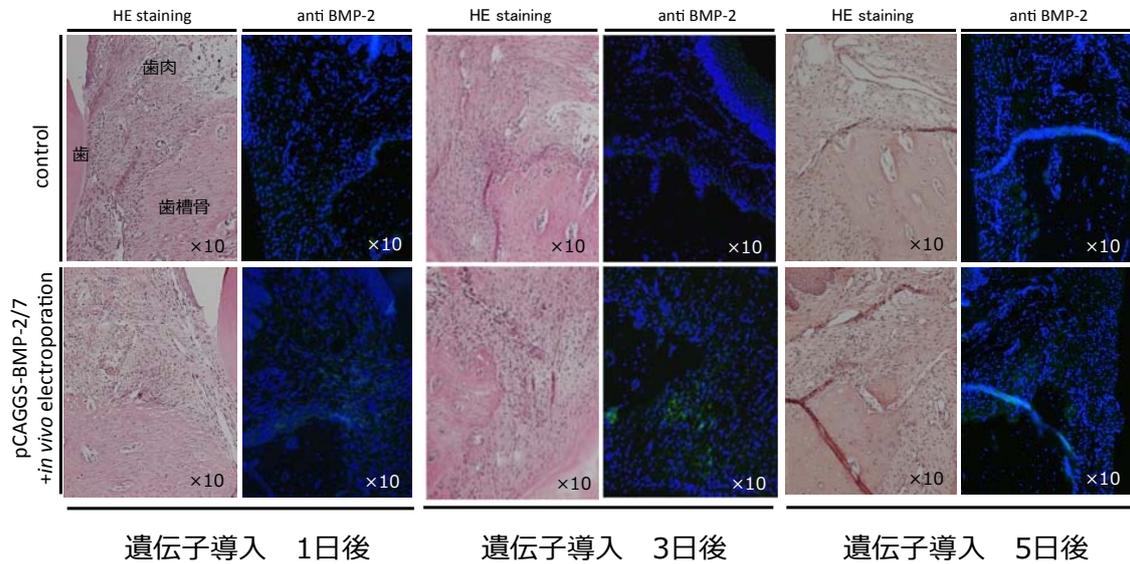


図4 ラット歯周組織における抗ヒト BMP-2 抗体染色像

BMP-2 タンパクを発現する細胞は遺伝子導入 1 日後から出現したが、5 日後には減少した (図下段)。緑色蛍光：BMP-2 発現細胞

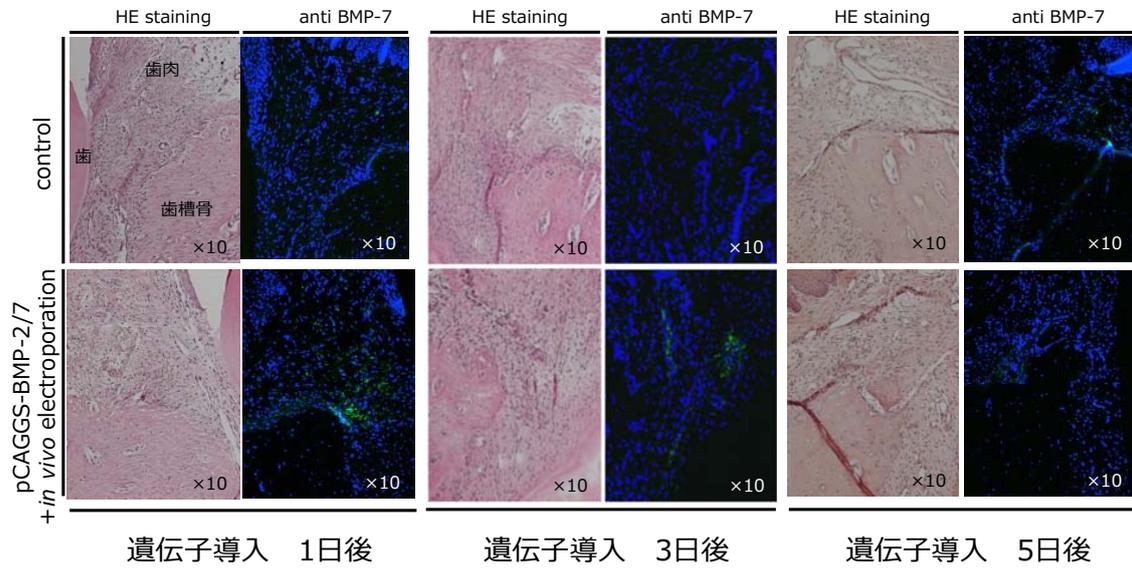


図5 ラット歯周組織における抗ヒト BMP-7 抗体染色像

BMP-7 タンパクを発現する細胞は BMP-2 同様に遺伝子導入 1 日後から出現し、5 日後には減少した (図下段)。緑色蛍光：BMP-7 発現細胞

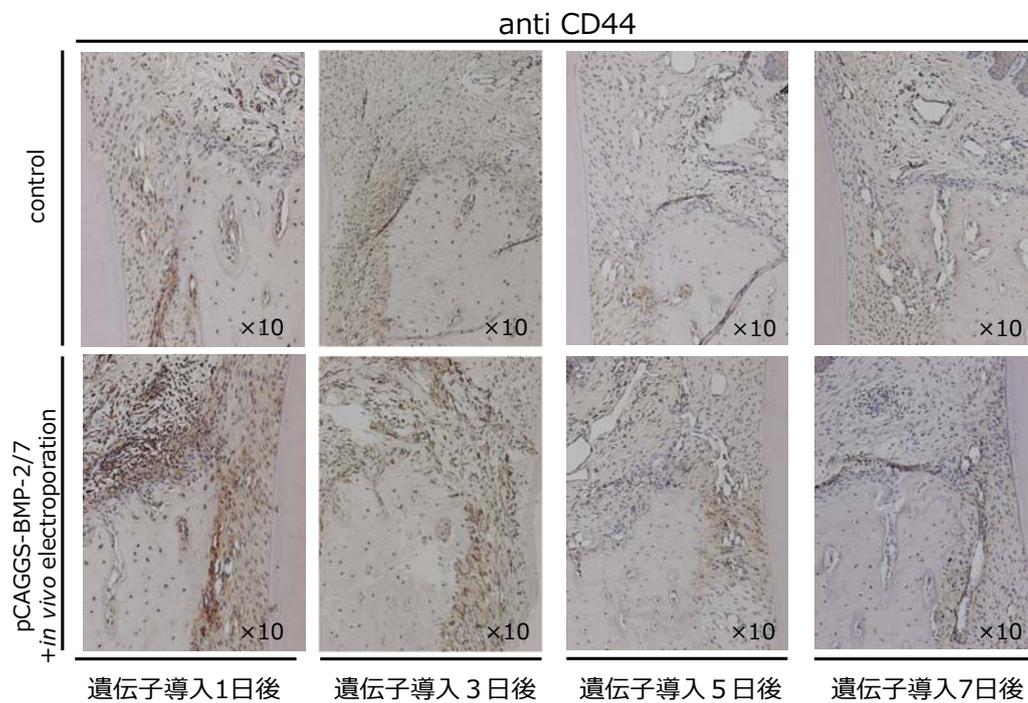


図6 ラット歯周組織における抗ラット CD44 抗体染色像

導入1日後から3日目まではコントロール側（図上段）と比較し、陽性細胞は導入側で多く認められたが（図下段）、5日後以降は減少し、7日後には両側に陽性細胞数の差はみられなかった。褐色：CD44陽性細胞

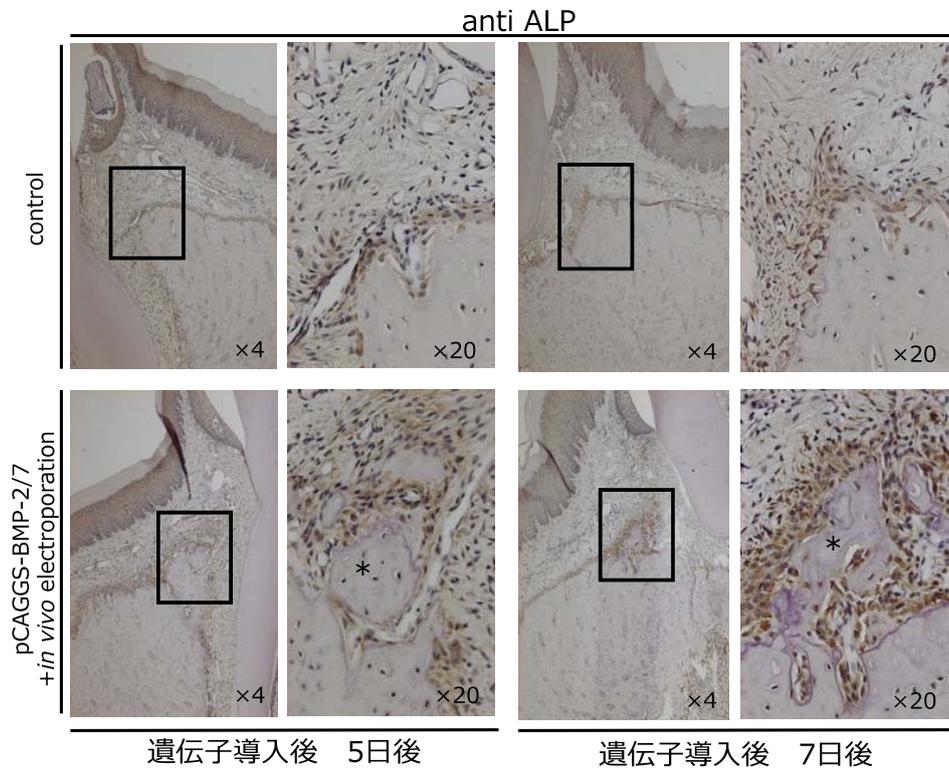


図7 ラット歯周組織における抗ラット骨型アルカリフォスファターゼ抗体染色像

遺伝子導入5、7日後では新生骨の形成がみられ（図下段）、新生骨周囲にはアルカリフォスファターゼ（ALP）強陽性の細胞が多数認められた。褐色：ALP 陽性細胞 *：新生骨