

# 大腿骨頭壊死症に対する遺伝子治療実験

徳永邦彦、遠藤直人、北原 洋、伊藤知之、近藤直樹、伊藤雅之、高野玲子  
(新潟大学大学院医歯学総合研究科・機能再建医学講座・整形外科学分野)

## 1. ラット大腿骨頭壊死症モデルの作成

遺伝子治療や細胞療法を用いた治療実験モデルの条件は①扱いやすい小動物、②再現性がある、③免疫組織染色が可能、④遺伝子情報が豊富、⑤壊死発生時期が明確、⑥壊死発生部位が予測できることなどが挙げられる。Norman らが報告したラット外傷性大腿骨頭壊死症モデルを改良し、上記を満たす骨壊死モデルを樹立した。

本モデルでは、骨細胞と骨髄細胞の apoptosis が壊死に先行して観察され、術後7日で阻血部全域に壊死骨が、術後3週から髓内血管再生と添加骨形成が、術後6週で破骨細胞による modeling が起きるが、大部分の壊死骨は置換されず残存していた。免疫組織染色や mRNA in situ hybridization を用いた骨形成細胞の検討では、添加骨形成を司る細胞が未分化骨形成細胞であり、骨壊死後の再生過程が骨発生や骨折後骨修復とは異なることが示された。骨頭内壊死部の破骨細胞は添加骨形成で作られた新生骨表面にのみ存在し、壊死骨を吸収しないことから、この現象は壊死骨が長期に渡り残存する理由のひとつと考えられた。

## 2. 遺伝子治療実験

上記のモデルの検討から骨壊死治療の標的を①骨髄内の血管再生と②壊死骨吸収を起点とする正常な骨再生と考え、骨・血管再生に anabolic effect をもつ HGF の遺伝子導入実験を施行した。

脱臼させた骨頭関節面と膝関節から髓内に挿入した針にフック型電極をつなぎ、大転子より大腿骨頸部に挿入した針から plasmid vector を注入しエレクトロポレーションをかけた。luciferase assay で求めた至適導入条件は 100V・50-950ms・12 pulses・30 $\mu$ g で、遺伝子発現期間は導入2日目にピークを示し、6週でコントロールレベルにもどった。この条件でラット大腿骨頭壊死モ

デルに pCAGGS-HGF を導入した。HGF 導入群では早期より導入部位に旺盛な血管新生や骨新生がみられ、6週でコントロール群に比べ有意に添加骨形成を認めた。

エレクトロポレーション法は簡便で安価でありウイルスベクターで懸念される免疫反応などの問題も少ない。その反面、導入効率が低く、さらなる工夫が必要であることが判明した。

## 3. 来年度における研究予定

より低侵襲でエレクトロポレーションと同等の遺伝子導入効果が期待できる hydrodynamic 法と sonoporation 法による遺伝子導入を検討する。

# 自己骨髄単核球細胞移植による血管新生と骨形成

安永裕司、久留隆史、田中隆治、山崎琢磨、越智光夫  
(広島大学大学院整形外科)

## 1. 研究目標

血管新生と骨新生による再生誘導を行うための基礎的データを収集する。骨形成能をもつ成長因子の応用も検討する。再生医療、遺伝子治療を用いた低侵襲治療法の開発を目指す。

## 2. 自己骨髄単核細胞移植による血管新生と骨形成

骨髄から血管内皮細胞の population を含む骨髄単核細胞(BMMNC)を採取し、血管新生因子であるbFGFを徐放化させた bFGFgelatin hydrogel を加えて兎の大腿骨に作成した骨欠損に移植し、その血管新生と後に続く骨形成を検討した。

兎大腿骨頸部の直径 6mm の骨欠損部にアテロコラーゲン(Col)のみ, Col + BMMNC( $5 \times 10^6$  cells), Col + bFGF(10 $\mu$ g), Col + BMMNC + bFGF を充填した4群を作製し、術後 2, 4, 8W で屠殺し血管新生と骨形成を評価した。

BMMNC は 10 $\mu$ g bFGFgelatin hydrogel との併用にて移植後 2W で血管内皮前駆細胞(EPC)に分化し明らかな血管新生を生じた。移植後 8Wでは他の群と比較して明らかに骨形成を促進していた。

bFGFgelatin hydrogel と BMMNC との併用は、骨髄内の阻血性変化に対する骨髄内血管新生と骨形成の可能性を示すものと考えられた。

(Hisatome T, Yasunaga Y, Ochi M, Tabata Y, Ikada Y. Neovascularization and bone regeneration by implantation of autologous bone marrow mononuclear cells. Biomaterials In press )

## 3. 来年度における研究予定

移植細胞として培養増殖させた骨髄間葉系幹細胞あるいはそれと骨髄単核細胞を併用し、bFGF とともに作用させて血管新生と骨形成を検討し、至適な移植細胞を決定する。また、大腿骨頭壊死症の動物モデルを使用してより臨床例に近似した条件での検討を行う予定である。