

軟骨欠損に対するアデノウイルスベクターを用いた 遺伝子治療の基礎的研究

京都府立医科大学整形外科

久保俊一, 新井祐志, 池田 巧, 中村 周
大橋鈴世, 寺内 竜, 高橋謙治

目的

離断性骨軟骨炎や関節内骨折などの外傷により関節軟骨損傷がしばしば引き起こされる。関節軟骨は修復能力に乏しく、軟骨欠損部は完全には修復されないため、長期的には損傷された関節軟骨は変性し、変形性関節症に陥いる。軟骨損傷に対して修復の促進を目的として種々の移植術を用いた研究が行われている^{1,2}。移植軟骨細胞の代謝活性を賦活化する方法として、サイトカインの応用は有力な手段である。その際、局所において、サイトカインを細胞選択的かつ持続的に作用させる必要がある。

一方、近年、遺伝子治療が注目され、関節疾患に対する応用も行われつつある。われわれはこれまで、関節内において治療効果を有する物質の有効濃度を長期間維持させる有望な drug delivery system として、アデノウイルスベクターを用いた *in vivo* 遺伝子導入法に注目してきた^{3,4}。本研究では、関節軟骨欠損に対する軟骨移植術において、局所での選択的な遺伝子発現を得る目的で、アデノウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子導入法の有用性を検討した。

方法

組み換えアデノウイルスベクター

本研究では、アデノウイルスベクターゲノム DNA (36Kb) のうち E1A, E1B, および E3 を欠失させ、CAG プロモーターを含む β -

galactosidase 遺伝子(LacZ)を含む発現単位を E1 欠失部位に挿入した非増殖性アデノウイルスベクター(AxCALacZ)を用いた。対照ベクターとして、発現単位を持たないアデノウイルスベクター (Ax1w)を用いた。

ラット軟骨細胞

Wister系ラットの2週齢の雄の両側の上腕骨近位、大腿骨遠位および脛骨近位関節面から軟骨を採取した。軟骨片を単離し、平板培養した。軟骨細胞がサブコンフルエントに達したところで、AxCALacZ および Ax1w をそれぞれ multiplicity of infection (MOI) が 50 となるように遺伝子導入を行った。吸着終了後、酸可溶性 bovine type I collagen 溶液中に 2.0×10^6 個/ml となるように細胞を分散した。ゲル化させた後、軟骨細胞を三次元的に培養した。

コラーゲンゲル内の軟骨細胞におけるLacZ発現の検討

遺伝子導入1および8週間後、AxCALacZ (各 n=3) および Ax1w (各 n=3) で処理された軟骨細胞を含むコラーゲンゲルを取り出し、固定を行った。5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside(X-gal)による発色後、コラーゲンゲルを肉眼的に観察した。さらに10 μ m の凍結組織切片を作製し Safranin O 染色を行い、組織学的に検討した。

β -galactosidase 酵素活性の経時的推移

遺伝子導入3日, 1,3,5,8週間後, それぞれの軟骨細胞を包埋したコラーゲングルを取り出し(各 n=3), 軟骨細胞を単離した。 β -galactosidase assay kit を用いて, 軟骨細胞で発現している β -galactosidase の酵素活性を測定した(各 n=3)。また回収した軟骨細胞の総蛋白質量を BSA Protein Assay を用いて計測し, 酵素活性の値を各ゲルの総蛋白質量により補正した。

軟骨欠損部における導入遺伝子の発現の検討

12週齢雄の Wister Rat 18匹の大腿骨の膝蓋関節面に径2mmのドリルを用いて, 全層性の軟骨欠損を作製した。欠損部の左側には AxCALacZにより処理した軟骨細胞を含むコラーゲングルを移植し, 右側には Ax1wにより処理した軟骨細胞を含むコラーゲングルを移植した。ゲルの固定には fibrin glue を用いた。

移植1,4,8週間後(各 n=6), 大腿骨を一塊として摘出し, X-gal染色を行った。発色後, 軟骨欠損部の肉眼的観察を行った。次に脱灰後, 厚さ10 μ mの凍結切片を作製し, Safranin O染色を行った後, 組織学的に検討した。

結果

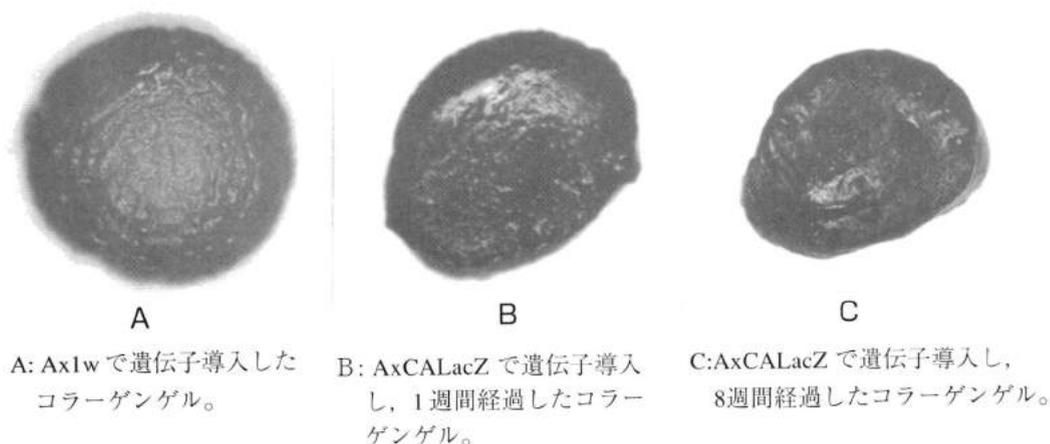
コラーゲングル内における LacZ の発現

遺伝子導入1週間後ではゲル全体が青く染色され, LacZの強い発現を認めた。遺伝子導入8週間においてもゲルは青く染色され, LacZの発現は持続していた(図1)。組織学的には, 軟骨細胞周囲においてサフランin Oにより染色される軟骨基質を認めた。遺伝子導入1週間後と比べ8週間後のゲルではさらにサフランin Oによる染色性の増加を認めた。LacZ発現軟骨細胞の割合は遺伝子導入1週と8週間後においてそれぞれ82 \pm 5.6%と55 \pm 6.8%であり, 遺伝子導入8週間後においても良好な LacZ の発現を認めた。

コラーゲングル内における β -galactosidase 酵素活性の経時的変化

遺伝子導入3日, 1, 3, 5, 8週間後にコラーゲングル内から軟骨細胞を回収し, β -galactosidase 酵素活性を経時的に測定した。遺伝子導入3日, 1, 3, 5, 8週間後の酵素活性はそれぞれ3.94 \pm 0.14 \times 10⁴, 4.13 \pm 1.14 \times 10⁴, 3.38 \pm 0.60 \times 10⁴, 0.61 \pm 0.14 \times 10⁴, 0.51 \pm 0.07 \times 10⁴(unit/mg protein)であった。導入3週間までは極めて高い活性が維持され,

図1. コラーゲングル内の軟骨細胞における LacZ 遺伝子の発現



経時的な減少を認めたが導入8週後でも活性は維持されていた。

軟骨欠損部における LacZ の発現

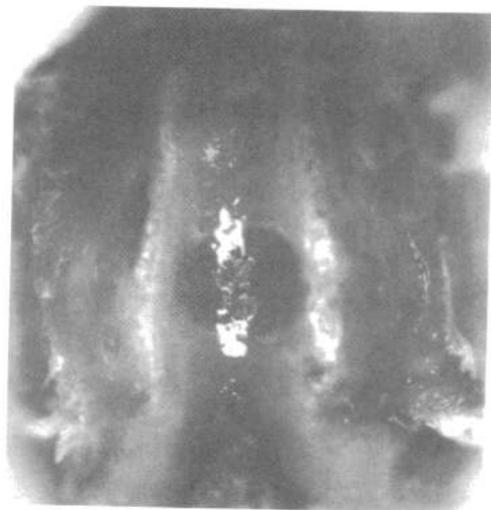
Ax1w (対照群) および AxCALacZ により処理された軟骨細胞を欠損部に移植後、1, 4 および 8 週間後に大腿骨を摘出し、肉眼的観察を行った。対照群および遺伝子導入群ともに軟骨細胞移植部における欠損は認められず、両者間で差は認めなかった。X-gal 染色により遺伝子導入群では 1 週、4 週および 8 週間後において移植部分は青く染色され LacZ の発現を認めた (図2)。X-gal により染色された欠損部は 1 週以後、4 週および 8 週後では徐々に染色性は低下していた。Ax1w により処理された軟骨細胞移植群では X-gal 染色により染色はされなかった。軟骨欠損部を中心とした凍結切片の組織学的所見では、遺伝子

導入した軟骨細胞の形態は保たれ、サフラニンOにより細胞周囲は染色された。遺伝子導入1週間後と比較し、4 週および 8 週間後ではサフラニンOによる染色性は経時的に増加していた。LacZ の発現はゲル内で観察された結果と同様に経時的には減少があったものの、移植 8 週間においても発現は維持されていた。

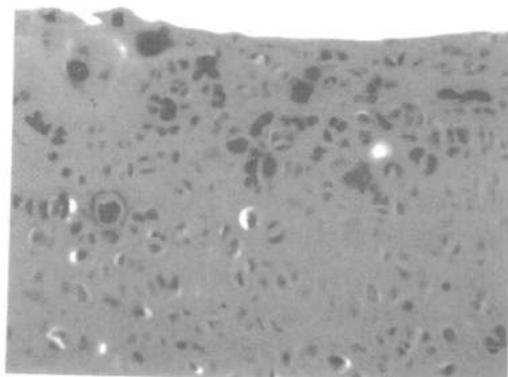
考察

関節軟骨損傷の修復過程は、組織学的特性から通常の治癒過程とは異なっている。深さが軟骨下骨に達しない損傷では、損傷部辺縁の残存している軟骨細胞が分裂増殖し、軟骨基質の産生を行うが、その応答はきわめて弱く欠損部はほとんど修復されない⁵。軟骨下骨に達する損傷では、骨髄からの炎症性細胞浸潤により形成された肉芽組織内の未分化間

図 2



A: AxCALacZ で遺伝子導入した軟骨細胞を軟骨欠損部に移植し、1 週間経過した大腿骨の肉眼的所見。



B: 移植した軟骨細胞の組織学的所見。

葉系細胞が増殖し、化生を起し軟骨組織を形成する⁶。しかし、再生軟骨は生化学的な分析によると、質的に正常軟骨と異なり、やがて変性におちいる⁷。難治性の軟骨損傷に対しては従来から組織移植による軟骨修復に関する研究が行われてきているが、移植片の固定性や欠損部分における機能の維持という点ではまだ満足できる結果は得られていない。

軟骨代謝の生物学的研究の進歩により、軟骨損傷に対する新しい薬剤としてサイトカインが注目され、種々のサイトカインによる組織誘導を応用した研究が盛んに行われている。軟骨細胞に対し基質産生を促進させ、分裂増殖を刺激し、また未分化間葉系細胞に対しては軟骨細胞への分化を誘導させるようなサイトカインが軟骨損傷に対する治療薬として期待されている。成長因子は、軟骨代謝の同化作用を促進し、異化作用を抑制することが知られており軟骨修復過程において重要な役割をはたすものと考えられている^{8,9,10}。しかし、関節内へ直接サイトカインを投与した場合、短時間で代謝されるため、作用持続時間に問題があり、また損傷部に対し効率よく作用させることは困難である。

近年、難治性疾患に対する新しい治療法として遺伝子治療が注目されている。これまでに、悪性腫瘍、先天性疾患などに対する臨床応用がなされている^{11,12}。関節疾患に対しても積極的な応用が行われており、軟骨損傷に対しても期待できる方法である。遺伝子導入に関しては、ベクターを直接関節内へ投与し遺伝子導入を行う *in vivo* 遺伝子導入法と、体内から細胞を取り出し、体外で遺伝子導入した後に関節内に戻す *ex vivo* 遺伝子導入法がある。われわれは、これまでに関節内へアデノウイルスベクターを直接投与する *in vivo* 遺伝子導入法について検討を行ってきた⁴。しかしながら、軟骨細胞移植などのような場合で、治療対象となる組織に対する選択性が必要な時には、*ex vivo* 遺伝子導入法が有用であ

る¹³。本研究では軟骨損傷に対する軟骨細胞移植において、アデノウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子導入法の有用性を検討した。軟骨欠損部へ移植する同種の軟骨細胞の形質発現を維持するためにコラーゲンゲルの scaffold に包埋した。この軟骨細胞にアデノウイルスベクターを用いて極めて効率よく遺伝子導入を行うことができた。そして、欠損部において導入遺伝子の発現は8週間にわたって持続していた。その際、遺伝子導入による軟骨細胞の代謝活性への障害は認めず、遺伝子導入後も旺盛な基質産生が確認できた。*Ex vivo* 遺伝子導入法は、局所での選択的かつ持続的なサイトカインなどの発現が期待できる方法である。

アデノウイルスベクターにより導入された遺伝子は染色体外に存在するため、その発現は一過性であるとされているが、本研究においては安定して長期にわたって維持された。コラーゲンゲル内の軟骨細胞は再分化し、増殖速度が抑制されたため導入された遺伝子が修飾をうけず、発現が維持されたものと考えられる。今回の結果からアデノウイルスベクターを用いた *ex vivo* 法は優れた方法であると考えられる。アデノウイルスベクターの利点として、1) 軟骨細胞を含むほぼすべての細胞に対して応用が可能である。2) 導入効率が他のベクターと比べ非常に高く、遺伝子導入細胞の selection が不要である。3) 導入遺伝子の発現が長期間維持される。4) 移植前後における導入遺伝子の発現量をモニタリングできる。などの利点があげられる。そして本研究における *ex vivo* 導入法でも極めて効率のよい遺伝子導入が認められ、これらの利点が確認された。本法は軟骨損傷に対し、局所的に効率よくサイトカイン等の薬剤を作用させる有用な手段であるといえる。

文献

1. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isalsson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocytes transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-95
2. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg* 1989;71:74-80.
3. Arai Y, Kubo T, Kobayashi K, Takeshita K, Takahashi K, Ikeda T et al. Adenovirus vector-mediated gene transduction to chondrocytes: *In vitro* evaluation of therapeutic efficacy of transforming growth factor- β 1 and heat shock protein 70 gene transduction. *J Rheumatol* 1997;24:1787-95.
4. Ikeda T, Kubo T, Arai Y, Nakanishi T, Kobayashi K, Takahashi K, et al. Adenovirus mediated gene delivery to the joints of guinea pigs. *J Rheumatol* 1998;25:1666-73.
5. DePalma AF, McKeever CD, Subin DK. Process of repair of articular cartilage demonstrated by histology and autoradiography with tritiated thymidine. *Clin Orthop* 1966;48:229-42.
6. Kettunen K. Effect of articular function of the repair of a full-thickness defect of the joint cartilage. An experimental study of mature rats. *Ann Chir Gynaec Fenniae* 1963;52:627-41.
7. Woo SL, Buckwalter JA. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Park Ridge, The American Academy of Orthopaedic Surgeons 1987:465-83.
8. Morales TI, Roberts AB. Transforming growth factor- β regulates the metabolism of proteoglycans in bovine cartilage organ cultures. *J Biol Chem* 1988;263:12828-31.
9. Kato Y, Hiraki Y, Inoue H, Kinoshita M, Yutani Y, Suzuki F. Differential and synergistic action of somatomedin-like growth factors, fibroblast growth factor and epidermal growth factor in rabbit costal chondrocytes. *Eur J Biochem* 1983;129:685-90.
10. Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 1990;190:445-62.
11. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene transfer into human immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *New Engl J Med* 1990;323:570-578.
12. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Penina P, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 1995;270:470-5.
13. Kang R, Marui T, Ghivizzani SC, Nita IM, Georgescu HI, Suh JK, et al. *Ex vivo* gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular cartilage defects: A feasibility study. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:139-43.