

審査の結果の要旨

氏名 大庭 伸介

本研究は骨形成性シグナル経路の最適化を行い、最適化された骨形成性シグナル経路を遺伝子導入によって生体内で安全に活性化させ、骨再生を誘導するシステムの基盤技術の開発を目指して行われたものであり、下記の結果を得ている。

1. **BMP シグナル・Hh シグナル・Runx2 シグナル・Wnt シグナル・IGF-1 シグナル**の5種の骨形成性シグナル経路を活性化あるいは抑制する遺伝子の全組合せを **Colla1GFP-ES** 細胞に導入し、**GFP** の蛍光を指標にして、無血清培地で1週間以内に骨芽細胞分化を誘導する組合せのスクリーニングを行った。無血清培地で1週間以内に骨芽細胞分化を誘導する最小のシグナルユニットは **BMP シグナルと Runx2 シグナルの組合せ (caALK6+Runx2)** であった。さらにこの組合せはマウス **ES 細胞・ヒト間葉系間質細胞・ヒト皮膚線維芽細胞・NIH3T3 細胞・HeLa 細胞**において1週間程度で強力に骨芽細胞分化を誘導した。以上より、**BMP シグナルと Runx2 シグナルの組合せ (caALK6+Runx2)** は、幹細胞のみならず終末分化した非骨芽系細胞からの骨芽細胞分化においても、最適化骨形成性シグナル経路の条件を満たす最小のシグナルユニットであることが示された。
2. 次に、**BMP シグナルと Runx2 シグナルの組合せ (caALK6+Runx2)** による協調作用のメカニズムを **core binding factor  $\beta$  (Cbfb)** に着目して明らかにすることを試みた。**Cbfb** の機能喪失・機能亢進の実験より、この組合せによる骨芽細胞分化誘導においては、それぞれのシグナルによって **Cbfb** が制御されていることが示唆された。その分子機序について **Cbfb** の mRNA 発現量・蛋白発現量、及び **Cbfb** と **Runx2** の複合体形成とその DNA 上への誘導に関して解析を行った。その結果、**Runx2** が **Cbfb** をユビキチンプロテアソーム系による分解か

ら保護することが示された。また、caALK6+Runx2 を導入した場合にのみ Runx2 と Cbfb は複合体を形成し、共に osteocalcin プロモーター上へ誘導されることが示された。以上より、BMP シグナルと Runx2 シグナルの組合せ (caALK6+Runx2) による協調的な骨芽細胞分化誘導は、Runx2 による Cbfb の安定化と、BMP シグナルによる Runx2-Cbfb 複合体の形成促進及び複合体の DNA 上への誘導を介すると考えられた。

3. アデノウィルスベクターを用いた *in vitro* 遺伝子導入により BMP シグナルと Runx2 シグナルの組合せ (caALK6+Runx2) を活性化させた皮膚線維芽細胞シートをマウス頭蓋部の臨界骨欠損部へ移植すると、術後 4 週で有意な骨再生が誘導された。また、リン酸カルシウムペーストとアデノウィルスベクターからなる骨再生用インプラント体を用いた局所遺伝子導入によって、臨界骨欠損部周囲の細胞において BMP シグナルと Runx2 シグナルの組合せ (caALK6+Runx2) を活性化させることで細胞を移植することなく骨再生が誘導された。さらに、免疫原性の高いウィルスベクターに代わって polyplex nanomicelle を用いた遺伝子導入による骨再生を検討した。リン酸カルシウムペーストと polyplex nanomicelle からなる骨再生用インプラント体を用いた臨界骨欠損部周囲への遺伝子導入によっても、細胞を移植することなく術後 4 週で有意な骨再生が誘導されることが示された。

以上、本研究は従来にない GFP の蛍光発現を指標にした *in vitro* 骨芽細胞分化判定法と分子生物学的手法を用いて、*in vitro* において骨形成性シグナル経路の最適化を行い、さらにその作用メカニズムを明らかにした。また最適化されたシグナル経路が骨再生に有効であることも示した。さらに polyplex nanomicelle を用いた遺伝子導入の骨再生への応用に関しては従来に報告がなく、本研究が最初の試みである。本研究は今後の骨再生医療の発展に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。