Acceleration of distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-2 transfected into normal mesenchymal cell

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2018-06-14
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: Tsuchiya, Hiroyuki
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00051058

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.





正常間葉系細胞への骨形成因子 (rhBMP-2)

遺伝子導入による延長仮骨形成促進

(課題番号 14571365)

平成 14 年度~平成 15 年度科学研究費補助金 基盤研究(c)(2) 研究成果報告書

平成 16 年 4 月

研究代表者 土屋 弘行 (金沢大学大学院医学系研究科・助教授)

金沢大学附属図書館



0400-05047-

研究組織

研究代表者: 土屋 弘行 (金沢大学大学院医学系研究科・助教授)

研究分担者 : 櫻吉 啓介 (金沢大学大学院医学系研究科・助手)

交付決定額(配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,100	0	2,100
平成 15 年度	1,400	0	1,400
総計	3,500	0	3,500

単位 千円

研究発表

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果

<はじめに>

整形外科では骨髄炎や骨腫瘍などの疾患の治 療のため長管骨や関節の切除を余儀なくされる 場合が多い.欠損部を補填する方法としては欠損 が小さい場合には自家骨移植や同種骨移植、人工 骨移植を行ってきた. また, 骨欠損が大きい場合 には人工関節置換や切断を余儀なくされる症例 があった. 現在, tissue engineering の技術が開 発されつつあり、その目指すところは人工物では なく生体親和性の高い、もしくは元の生体と同等 のものを再生することである. 我々が従来行って きた手法に仮骨延長法という手技がある. これは 骨切りを行った長管骨を意図的に1日に1mm づ つ延長を行うことで延長部に正常な骨組織を誘 導し, 骨を延長する技術である. 骨を延長する速 度は軟部組織の延長への耐性によって規定され るため、ヒトでは 1mm/日が一般的である. 延長 期間を短縮することは現状では困難であり、治療 期間を短縮するためには延長終了後の仮骨成熟 期間を短縮する必要がある. 仮骨成熟を短縮する ためにこれまでに臨床的に行われている手法は、 ①自家骨髄の仮骨延長部への注入、②電磁波刺激、 ③通電刺激, ④低出力超音波刺激, ⑤自家骨移植 等がある. 何れも有効な手段ではあるが, 劇的に 骨形成を促進することは出来ない. 骨形成因子は, 本来骨ができない部分にも骨組織を誘導する蛋 白として知られており、骨折治癒を促進する物質 として期待されている. しかし、多くの技術的な 問題があり、確実な臨床応用には至っていない. 最も新しい取り組みとしては、ヒト BMP の遺伝 子を組み込んだ体細胞やウィルスを動物モデル の骨折部や骨欠損部に注射することで骨形成を 促進させる試みがされている. このような遺伝子 治療は、それ自体の危険性(不必要に大量のBMP のコピーを産生することの未知の危険性など)の ため、現在のところ人体への応用はない. しかし、 近い将来、自分の体から採取した血液細胞や表皮 細胞に BMP 遺伝子を導入し、有効期間の判明し ている遺伝子治療が可能になれば、安全性の高い ものとして臨床応用可能である. 本研究では, 感 染性のないプラスミドを用い、ヒトより採取した

体細胞に化学的に BMP-2 遺伝子を導入することにより、他の固体への感染の問題は起こらず、また遺伝子発現は永久ではないため必要な時期にのみ BMP-2 を発現させることを目指している.

この技術を確立することで、すべての骨折に対 して①骨癒合期間が短縮する,②偽関節・遷延治 癒が減少する, ③これまで手術による強固な内固 定を必要とした骨折の多くが外固定(ギプス、も しくは簡単な副子) のみで治療できる可能性があ る. さらに、先天性疾患のために脚短縮、四肢左 右不等などが生じている患者や、骨腫瘍などで骨 や軟部組織の一部を切除せざるを得なくなった 患者などの治療には近年, 仮骨延長法という方法 を用いて生理的に患肢を延長したり、欠損部を補 う治療を行っている. 仮骨延長術とは主に創外固 定器を用いて徐々に骨を延長する方法で、骨欠損 を伴う骨折や粉砕骨折などにも極めて有用な治 療法である.この手法は大変応用範囲の広い手技 であるが、その欠点は延長した仮骨が正常の骨ま で成熟する過程は生理的な骨形成と同じである ため、長期にわたり創外固定器を装着すること必 要があることである.しかし,この仮骨延長法骨 は骨形成を行う点では骨折と同様であるため、 BMP による仮骨形成の促進、骨硬化の促進が期 待でき、治療期間を半減させる可能性を秘めてい る. 今回は患者自身の, 寿命に限りのある正常細 胞に BMP-2 遺伝子を導入し、骨形成を 促進す るための遺伝子治療を開発することを目的とし ている. BMP-2 には, 骨とは全く無縁のヒト頬 粘膜細胞ですら骨形成能を備えた細胞に分化さ せる能力があることがわかっており、幹細胞とい われる様々な細胞に分化する可能性を秘めた細 胞が存在する部位であれば(幹細胞は血液中を循 環しており、すなわち生体内すべての部位に幹細 胞は存在する) 骨組織を誘導させることが可能で ある. BMP-2 の遺伝子は自分自身の血液, 頬粘 膜細胞、表皮の線維芽細胞などの簡単に採取する ことのできる細胞にも導入可能であり(導入方法 などによりその効率は異なる), 生体への侵襲が きわめて少ない. また, その治療の応用範囲は骨 折,偽関節,骨欠損,変形,骨系統疾患など骨癒 合および骨欠損の補填を必要とする全ての整形外科疾患が本治療の対象となり、もたらされる恩恵は多大なものである。癌や代謝性疾患に対する遺伝子治療と異なり、ウイルスベクターや寿命の長い細胞を用いないことが本技術の特徴である。従って、安全性も高いと言える。骨形成と言う面では、2・3ヶ月の寿命をもつ自家正常細胞がBMPを限られた期間発現するというのが理想である。骨癒合をさらに促進するためには、治療を再度行えばよい。短期間の効果を狙った遺伝子治療であるので、使用に対する利便性および安全性という面では優れている。また、もう一つの特徴として、GFP(Green Fluoresent Protein)をレポーターに用いることで生体内でのBMP活動がリアルタイムに体外から観察可能である。

<目的>

ヒト骨形成因子 (recombinant human bone morphogenetic protein-2,以下 rhBMP-2 と略す,図1)遺伝子を体細胞に導入し、それを創外固定器による仮骨延長部に与えることで骨形成を促進させることが目的である.ラットで実験モデルを作製し、その有効性を実証する.

<対象と方法>

プラスミドの作成

Wyeth社よりpSP65プラスミドのMultiple cloning site (以下MCS) にヒト骨形成因子 2 (recombinant human bone morphogenetic protein・2・125,以下rhBMP・2—125,図2)を逆挿入した形態で提供いただいた。これを制限酵素 Sallで切り出し、得られたrhBMP・2・125遺伝子を蛍光蛋白であるGFP遺伝子を組み込んだプラスミドpEGFP・C3 (Clonetech社)のMCSのSall部に挿入した(pEGFP・C3・rhBMP・2・125,図3). E. Coliにて増幅後に精製カラムを用いて精製したものを電気泳動した(図4)。作成されたプラスミドはApliced Biosystems社の373Aにて解析を行いシーケンスを確認した(表 1).

ラット体細胞株 C2C12 (筋組織由来) への遺伝 子導入の確認 -BMP-2の mRNA 発現-

ラット筋芽細胞由来株 C2C12 は rhBMP-2蛋白の存在下で骨芽細胞様に分化し骨形成的になることが知られている 2 . 2×10^{4} 個のラット筋芽細胞由来株 C2C12 を 10%FBS 加 DMEM を用い60mm ディッシュで培養し、翌日にpEGFP-C3-rhBMP-2-125 プラスミドをFuGENETM6 により遺伝子導入を行い、24 時間で培養上清を変え、48 時間時にトリプシンではがした細胞を検体とした。対象には pEGFP-C3 プラスミドを遺伝子導入したものとした。 Primerは Gonda らの論文 1 に準じた(表 1)。 ロシュ・ダイアグノスティックス社の LightCycler を用いてmRNA の発現量を測定した(図 5).

-レーザー共焦点蛍光顕微鏡での蛍光確認-

同様の条件でスライド上に培養し、遺伝子導入 後 48 時間で固定を行なった. スライドは抗ヒト BMP-2 モノクローナル抗体 (IgG), Alexa594 標 識・抗 IgG 抗体を用いて免疫染色を行った. GFP と Alexa594 の蛍光はレーザー共焦点蛍光顕微鏡 である Zeiss 社の LSM5 Pascal を用いて観察した (図 6).

-rhBMP-2 蛋白の検出(ELISA) -

上記のように 60mm ディッシュにて遺伝子導入を行い24時間で上清を交換し48時間時の培養上清を回収した. 1500rpm, 5分の遠心分離後に上清のみを-20℃で保存した.

Zeptometrix 社の ELISA プレート(immuno-tek) を用いて抗 GFP ポリクローナル抗体 (rabbit) を 吸着させた後,保存してあった上清を加え4℃で 一晩おき,翌日一次抗体として抗ヒト BMP-2 モノクローナル抗体(mouse)を室温で 1 時間,二次 抗体として POD 標識抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間作用させ,TMB を 15 分作用させた後に 1N NaCl で反応を停止させた. 630nm での測定値を 基準に 450nm の吸光度を測定した (表 2).

·ALP 活性·

同様の条件で 96 穴ディッシュにて遺伝子導入 を行い, 24 時間で上清を除去し p ニトロフェニ

ルリン酸反応を利用したリキテック ALPII にて 反応させ、ELIZA リーダーにて ALP 活性の測定 を行なった(表 3).

遺伝子導入された C2C12 細胞および Bone marrow stromal cell のラットへの移植

・体細胞株への遺伝子導入・

Rickard らの方法 3)に従って 8 週齢 (250g) の Whister 系ラットの大腿骨を無菌的に採取し、周 囲を α·MEM で 2 回洗浄した後, 無菌的に両骨端 を切除し、骨髄腔をα·MEM で洗浄(flush) し た. 1200rpm/3 分遠心分離を行い, 上清を除去し た後に 15%FBS 加α-MEM に 2nM L-glutamine, 100iu/ml penicillin, 100μ g/ml streptmycin \dot{z} 加えた培養液で 5%CO₂, 37℃で 24 時間培養を行 なう. 上記のものに 50 μ g/ml L-ascorbic acid を 加えた培養液に変更し、さらに5~6日培養を行 なう. その後 full confluent まで2~3日毎に培 養液を交換する. 得られた一次培養骨髄細胞 (bone marrow stromal cell, 以下 BMSC) を 2 ×104個, 60mm ディッシュに撒き翌日に上記の ように遺伝子導入を行なった. 24 時間で上清を交 換し、48 時間時にトリプシン処理し BMSC を採 取した.

C2C12 も同様に遺伝子導入を行い, 48 時間時 にトリプシン処理を行い細胞を採取した.

両群とも対象には pEGFP-C3 を遺伝子導入した細胞を用いた.

-筋肉内埋入-

採取した細胞を DMEM40 μ 1で撹拌後に I型コラーゲンスポンジ 5×5 mm にしみこませた. 同スポンジを同系ラットの両大腿二頭筋内に埋入し閉創した. コントロールには pEGFP-C3 を遺伝子導入した BMSC を用いた. また同様に C2C12にても行なった. 移植術後 4 週まで毎週レ線撮影を行った(図 7 、8).

-骨欠損部埋入-

8 週齢の Whister 系ラットを 40mg/kg のペントバルビタールの腹腔内注射で麻酔後に大腿外側から左大腿骨まで展開し、骨膜を剥離後に

1 mm 径の Kirchner wire でドリルを行い、当科で作成したハーフピンを大腿骨近位と遠位にそれぞれ 2 本ずつ刺入した. 中央を threadwire sawにて切断後、当科で作成した創外固定器を装着した(図 9). 大腿骨骨幹部に一期的に 3 mm の延長を行ない、できたスペースに上記のごとく作成した細胞埋入コラーゲンスポンジを移植し閉創した.移植後 4 週まで毎週レ線撮影を行った(図 1 0 1 1 1 1

·延長部埋入·

同様に作成した 3mm の骨欠損部に遺伝子導入 済みの BMSC を移植後,翌日より1日 0.5mm ず つ 10 日間の延長操作を加え,計 5mm の延長を 行なった.延長終了時点から4週まで毎週レ線撮 影を行なった(図12,13).

<結果>

プラスミドの作成

シーケンスは作成前にデザインしたものと一致し、constructionには相違がないことが確認された.

ラット体細胞株 C2C12 (筋組織由来) への遺伝 子導入の確認

-BMP-2 の mRNA 発現-

の如く, rhBMP-2 を遺伝子導入した検体では rhBMP-2 の mRNA 産生の増加が認められた.

-レーザー共焦点蛍光顕微鏡での蛍光確認-

C2C12 お よ び BMSC と も に pEGFP-C3-rhBMP-2-125 を導入した場合に GFP の蛍光を発したが、その導入効率は BMSC では極めて不良であった。また免疫染色により rhBMP-2 を蛍光したが、その分布は必ずしも GFP の蛍光とは一致せず、またコントロールでの 結果と差は認められず、rhBMP-2 蛋白の産生は 免疫染色上は否定的であった.

-rhBMP-2 蛋白の検出(ELISA) -

ELISAでは培養上清中のrhBMP-2-125活性の 亢進は認められなかった. -ALP 活性-

pEGFP-C3-rhBMP-2-125 を導入した C2C12 での ALP 活性は 0.295 ± 0.022 , 一方 pEGFP-C3 を導入した場合は 0.175 ± 0.017 であり, ALP 活性の亢進が認められた.

遺伝子導入された C2C12 細胞および Bone marrow stromal cell のラットへの移植・筋肉内埋入・

 $1 \sim 4$ 週の各群 (pEGFP-C3-rhBMP-2 導入群, pEGFP-C3 導入群) ともレ線にて骨形成は認められなかった.

-骨欠損部埋入・

 $1 \sim 4$ 週の各群 (pEGFP-C3-rhBMP-2 導入群, pEGFP-C3 導入群) ともレ線にて骨形成は認められなかった。 4 週時にはハーフピン周囲の骨透亮像および周囲の反応性骨形成をみるようになり、ピンの固定性は限界であった。

-延長部埋入-

 $1\sim 4$ 週の各群 (pEGFP-C3-rhBMP-2 導入群, pEGFP-C3 導入群) ともレ線にて骨形成は認められなかった. 同様にピン周囲の骨透亮像が4 週で出現し、ピンの固定性の限界であった.

く考察>

in vitro において rhBMP-2 の mRNA の産生は 亢進しているにもかかわらず、生成されているで あろう rhBMP-2 蛋白を検出する ELISA では産生 の亢進は認められなかった。また細胞の免疫染色 においても rhBMP-2 は必ずしも GFP との蛍光と 一致しなかった。何れの negative study とも抗ヒト BMP-2 抗体を用いていることから、生成され た EGFP-C3-rhBMP-2-125 の rhBMP-2 の 3 次元 構造が変化してしまい、抗体が認識できなくなっ てしまった可能性がある。Sall サイトでの切断が 必要であったため、rhBMP-2-1245 の N 末端はわ ずか 2bps しかなかった(図)このことが 3 次元 構造を大きく変えた可能性は否定できない。渉猟 しえた限りでは、rhBMP-2 と他の蛋白との融合 蛋白を生成するようなプラスミドもしくはウィ ルスを用いた報告はなかった. 融合蛋白を用いるのではなく, co-transfection もしくはリポーター遺伝子 rhBMP-2 を別々に産生させるようなプラスミドを作成した方が良かったかもしれない.

また、生成された EGFP-C3-rhBMP-2-125 蛋 白がどのような経路で細胞外に放出されるかは 分からず、また BMP-2 は一般的には細胞外から receptor を介して smad 系が賦活化されて生理活 性が発揮されるとされているが、このように自己 が産生してかつ分化していく場合には細胞内か ら作用しておる可能性も否定できない. つまり周 囲の遺伝子導入されていない細胞を刺激する能 力があるのかが疑問であった. これまでに発表さ れているウィルスを用いた実験系ではそのコピ 一数の多さからか細胞外液(培養上清)での rhBMP-2 の検出は容易である. 細胞外に放出さ れたであろう融合蛋白を追跡することが困難で あった以上、逆に同プラスミドから EGFP-C3-rhBMP-2-125 蛋白を産生させる系を 用いて生成された蛋白を用いてその作用を計測 したほうが良かったかもしれない.

一方, pEGFP·C3·rhBMP·2·125 を導入した細 胞では ALP 活性は亢進しており、生理活性はあ る程度維持されていたと考えてよい. しかしなが ら in vivo での結果では体内での骨形成を起こす には十分ではなかった. これまでの報告において もプラスミドで rhBMP·2 を導入し、骨形成に成 功したのは Park ら 4のみである. ウィルスで骨 形成に成功しているものは極めて多数あり、より 一般的な手法である. リポフェクションなどの手 技では当然導入効率は数%から 10 数%で、また そのコピー数はきわめて少ない. 一方ウィルスに おける導入効率はほぼ 100%に近く, コピー数も 多い. よりスムーズに十分に rhBMP-2 を産生さ せるためにはウィルスベクターを用いることを 考慮しなくてはいけないと考えられる. ただ, 唯 一の問題点は恒久的に産生し続ける可能性があ ることと,過剰に産生することから起こりうる未 知の副作用である. 今後, 出来ることならば産生 コピー数をより向上させるプラスミドベクター での遺伝子導入方法を工夫したい.

また別の可能性として, 局所での直接的な遺伝

子導入方法も考えられる. Aihara らのラットでの実験 がによれば皮下に直接注入したプラスミドベクターと刺入した周囲に電圧をかける(electroporation)ことで遺伝子を導入することができる. 課題となるのは target となる細胞を選ぶことが出来ないことと, その target となっている細胞が局所にとどまる可能性がすくない(同実験では全身での骨形成亢進=骨粗鬆症モデルでの骨密度向上であった)ことである. 今後の発展に期待したい.

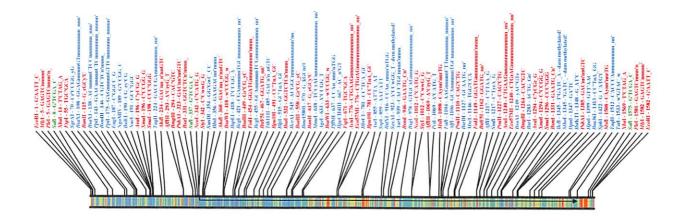
<まとめ>

- pEGFP-C3-rhBMP-2-125 プラスミドベクターは GFP 蛋白を発現し、おそらくrhBMP-2-125 によると思われる ALP 活性の向上(骨芽細胞への分化能力)を示したが、rhBMP-2-125 を免疫学的には捉えることが出来なかった。
- ・ 同プラスミドを遺伝子導入された体細胞を用いてもラット生体内で骨形成を促進することは出来なかった.

<′猫文>

1 . Gonda K, Nakaoka T, Yoshimura K, Otawara Y, Hamamoto Y, Harrii K : Heterotopic Ossification of degenerating rat skeletal muscle induced by

- adenovirus-mediated transfer of bone morphogenetic protein-2 gene. J Bone and mineral research 15(6), 2000
- 2. Okubo Y, Bessho K, Fujiyama K, Iizuka T, Miyatake S: Expression of bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector in C2C12 myoblasts induces differentiation into the osteoblast lineage. Biochemical and biophysical research communications 262, 739-743 1999
- 3. DJ Rickard, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I: Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. Developmental Biology 161, 217-228 1994
- 4. Park J, Rites J, Kloss F, von der Mark K, Wiltfang J, Neukam FW, Schneider H: Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenobiral vectors and liposomes. Gene Therapy 10, 1089-1098 2003
- 5. Aihara H, Miyazaki J: Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. Nature Biotechnology 16(9), 867-870 1998



rhBMP-2-125 1587 bp

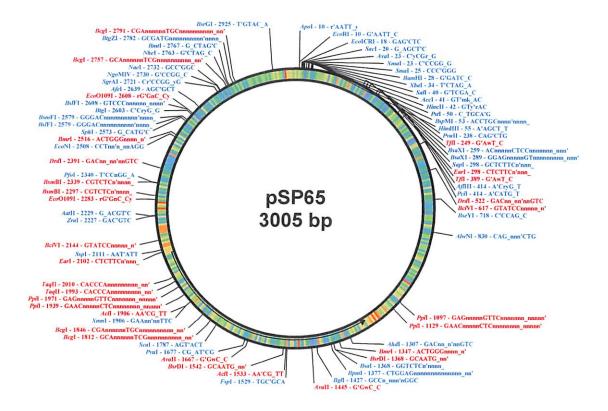
GC% in 3 bp blocks

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

1 GAATTCCGTC GACTCTAGAG GGGGACTTCT TGAACTTGCA GGGAGAATAA 51 CTTGCGCACC CCACTTTGCG CCGGTGCCTT TGCCCCAGCG GAGCCTGCTT 101 CGCCATCTCC GAGCCCCACC GCCCCTCCAC TCCTCGGCCT TGCCCGACAC 151 TGAGACGCTG TTCCCAGCGT GAAAAGAGAG ACTGCGCGGC CGGCACCCGG 201 GAGAAGGAG AGGCAAAGAA AAGGAACGGA CATTCGGTCC TTGCGCCAGG 251 TCCTTTGACC AGAGTTTTTC CATGTGGACG CTCTTTCAAT GGACGTGTCC 301 CCGCGTGCTT CTTAGACGGA CTGCGGTCTC CTAAAGGTCG ACCATGGTGG 351 CCGGGACCCG CTGTCTTCTA GCGTTGCTGC TTCCCCAGGT CCTCCTGGGC 401 GGCGCGGCTG GCCTCGTTCC GGAGCTGGGC CGCAGGAAGT TCGCGGCGGC 451 GTCGTCGGGC CGCCCCTCAT CCCAGCCCTC TGACGAGGTC CTGAGCGAGT 501 TCGAGTTGCG GCTGCTCAGC ATGTTCGGCC TGAAACAGAG ACCCACCCCC 551 AGCAGGGACG CCGTGGTGCC CCCCTACATG CTAGACCTGT ATCGCAGGCA 601 CTCAGGTCAG CCGGGCTCAC CCGCCCCAGA CCACCGGTTG GAGAGGGCAG 651 CCAGCCGAGC CAACACTGTG CGCAGCTTCC ACCATGAAGA ATCTTTGGAA 701 GAACTACCAG AAACGAGTGG GAAAACAACC CGGAGATTCT TCTTTAATTT 751 AAGTTCTATC CCCACGGAGG AGTTTATCAC CTCAGCAGAG CTTCAGGTTT 801 TCCGAGAACA GATGCAAGAT GCTTTAGGAA ACAATAGCAG TTTCCATCAC 851 CGAATTAATA TTTATGAAAT CATAAAACCT GCAACAGCCA ¥ACTCGAAATT 901 CCCCGTGACC AGACTTTTGG ACACCAGGTT GGTGAATCAG AATGCAAGCA 951 GGTGGGAAAG TTTTGATGTC ACCCCCGCTG TGATGCGGTG GACTGCACAG 1001 GGACACGCCA ACCATGGATT CGTGGTGGAA GTGGCCCACT TGGAGGAGAA 1051 ACAAGGTGTC TCCAAGAGAC ATGTTAGGAT AAGCAGGTCT TTGCACCAAG

- 1101ATGAACACAGCTGGTCACAGATAAGGCCATTGCTAGTAACTTTTGGCCAT1151GATGGAAAAGGGCATCCTCTCCACAAAAGAGAAAAACGTCAAGCCAAACA1201CAAACAGCGGAAACGCCTTAAGTCCAGCTGTAAGAGACACCCTTTGTACG1251TGGACTTCAGTGACGTGGGGTGGAATGACTGGATTGTGGCTCCCCCGGGG1301TATCACGCCTTTTACTGCCACGGAGAATGCCCTTTTCCTCTGGCTGATCA1351TCTGAACTCCACTAATCATGCCATTGTTCAGACGTTGGTCAACTCTGTTA1401ACTCTAAGATTCCTAAGGCATGCTGTGTCCCGACAGAACTCAGTGCTATC
- 1451 TCGATGCTGT ACCTTGACGA GAATGAAAAG GTTGTATTAA AGAACTATCA
 1501 GGACATGGTT GTGGAGGGTT GTGGGTGTCG CTAGTACAGC AAAATTAAAT
- 1551 ACATAAATAT ATATATACTC TAGAGTCGAC GGAATTC

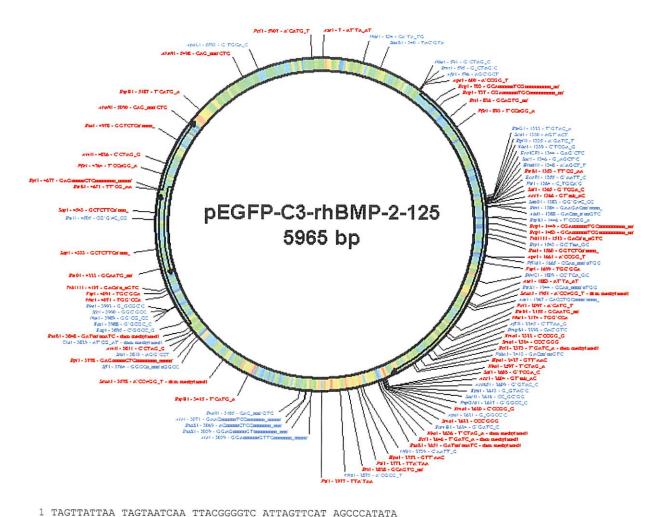
ヒト骨形成因子2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2-125) の塩基配列. 太字部分が rhBMP-2 の蛋白部分の配列. 二重下線は EcoRI サイトを表し、この部位で pSP65 の MCS に挿入されている。下線は SalI サイトを表す。N 末 端側には 2 箇所あり、下流の SalI サイトにて切断したものを選択し使用した。



1 gaatacacgg aattcgagct cgcccgggga tcctctagag tcgacctgca gcccaagctt 61 ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 121 caacatacga googgaagca taaagtgtaa agootggggt gootaatgag tgagotaact 181 cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 241 gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc 301 ttoctogoto actgactogo tgogotoggt ogttoggotg oggogagogg tatoagotoa 361 ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 421 agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 481 taggeteege ecceetgaeg ageateacaa aaategaege teaagteaga ggtggegaaa 541 cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 601 tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 661 gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 721 gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 781 tettgagtee aacceggtaa gacacgaett ategecaetg geageageea etggtaacag 841 gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta 901 cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 961 aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggttttt 1021 tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 1081 ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag 1141 attatcaaaa aggatottoa ootagatoot tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 1201 ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 1261 tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat

1321 aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 1381 acgotcaccg gotccagatt tatcagcaat aaaccagcca gocggaaggg ocgagcgcag 1441 aagtggtoot gcaactttat cogoctocat coagtctatt aattgttgcc gggaagctag 1501 agtaagtagt togocagtta atagtttgog caacgttgtt gocattgota caggoatogt 1561 ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 1621 agttacatga toccocatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tocttoggtc ctocgatcgt 1681 tgtcagaagt aagttggcog cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 1741 tottactgtc atgocatocg taagatgctt ttotgtgact ggtgagtact caaccaagtc 1801 attotgagaa tagtgtatgo ggogacogag ttgctcttgo coggogtcaa tacgggataa 1861 taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 1921 aaaactotca aggatottac ogotgttgag atcoagttog atgtaaccca otogtgcacc 1981 caactgatot toagcatott ttactttoac cagcgtttot gggtgagcaa aaacaggaag 2041 gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 2101 cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 2161 tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 2221 acctgacgto taagaaacca ttattatoat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac 2281 gaggecettt egtetegege gttteggtga tgaeggtgaa aacetetgae acatgeaget 2341 cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg 2401 cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat 2461 tgtactgaga gtgcaccata tcgacgctct cccttatgcg actcctgcat taggaagcag 2521 cccagtagta ggttgaggcc gttgagcacc gccgccgcaa ggaatggtgc atgcaaggag 2581 atggcgccca acagtccccc ggccacgggg cctgccacca tacccacgcc gaaacaagcg 2641 ctcatgagcc cgaagtggcg agcccgatct tccccatcgg tgatgtcggc gatataggcg 2701 ccagcaaccg cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc 2761 tggctagcga tgaccctgct gattggttcg ctgaccattt ccggggtgcg gaacggcgtt 2821 accagaaact cagaaggttc gtccaaccaa accgactctg acggcagttt acgagagaga 2881 tgatagggtc tgcttcagta agccagatgc tacacaatta ggcttgtaca tattgtcgtt 2941 agaacgcggc tacaattaat acataacctt atgtatcata cacatacgat ttaggtgaca 3001 ctata

クローニングベクターpSP56の塩基配列. 二重下線部が EcoRI サイト. 同部に rhBMP-2-125 遺伝子が挿入された状態で提供された.



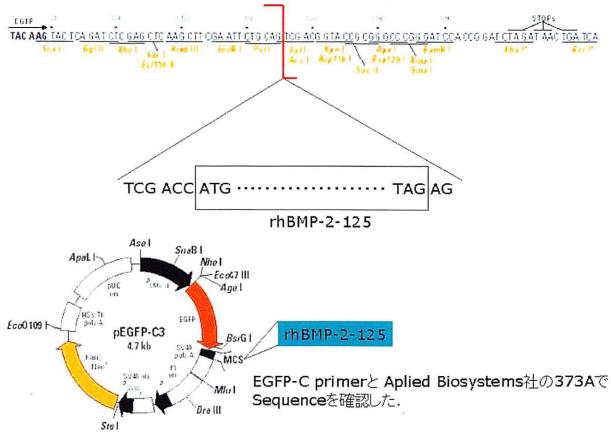
51 TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG 101 CCCAACGACC CCCGCCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT 151 AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT 201 AAACTGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCCC 251 CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCCAGTA 301 CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA 351 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA 401 TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA 451 TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA 501 ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG 551 GTCTATATAA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC CGTCAGATCC GCTAGCGCTA 601 CCGGTCGCCA CCATGGTGAG CAAGGGCGAG GAGCTGTTCA CCGGGGTGGT 651 GCCCATCCTG GTCGAGCTGG ACGGCGACGT AAACGGCCAC AAGTTCAGCG 701 TGTCCGGCGA GGGCGAGGGC GATGCCACCT ACGGCAAGCT GACCCTGAAG 751 TTCATCTGCA CCACCGGCAA GCTGCCCGTG CCCTGGCCCA CCCTCGTGAC 801 CACCCTGACC TACGGCGTGC AGTGCTTCAG CCGCTACCCC GACCACATGA 851 AGCAGCACGA CTTCTTCAAG TCCGCCATGC CCGAAGGCTA CGTCCAGGAG

901	CGCACCATCT	TCTTCAAGGA	CGACGGCAAC	TACAAGACCC	GCGCCGAGGT
951	GAAGTTCGAG	GGCGACACCC	TGGTGAACCG	CATCGAGCTG	AAGGGCATCG
1001	ACTTCAAGGA	GGACGGCAAC	ATCCTGGGGC	ACAAGCTGGA	GTACAACTAC
1051	AACAGCCACA	ACGTCTATAT	CATGGCCGAC	AAGCAGAAGA	ACGGCATCAA
1101	GGTGAACTTC	AAGATCCGCC	ACAACATCGA	GGACGGCAGC	GTGCAGCTCG
1151	CCGACCACTA	CCAGCAGAAC	<u>A</u> CCCCCATCG	GCGACGGCCC	CGTGCTGCTG
1201	CCCGACAACC	ACTACCTGAG	CACCCAGTCC	GCCCTGAGCA	AAGACCCCAA
1251	CGAGAAGCGC	GATCACATGG	TCCTGCTGGA	GTTCGTGACC	GCCGCCGGGA
1301	TCACTCTCGG	CATGGACGAG	CTGTACAAGT	ACTCAGATCT	CGAGCTCAAG
1351	CTTCGAATTC	TGCA <u>GTCGA</u> C	CATGGTGGCC	GGGACCCGCT	GTCTTCTAGC
1401	GTTGCTGCTT	CCCCAGGTCC	TCCTGGGCGG	CGCGGCTGGC	CTCGTTCCGG
1451	AGCTGGGCCG	CAGGAAGTTC	GCGGCGGCGT	CGTCGGGCCG	CCCCTCATCC
1501	CAGCCCTCTG	ACGAGGTCCT	GAGCGAGTTC	GAGTTGCGGC	TGCTCAGCAT
1551	GTTCGGCCTG	AAACAGAGAC	CCACCCCCAG	CAGGGACGCC	GTGGTGCCCC
1601	CCTACATGCT	AGACCTGTAT	CGCAGGCACT	CAGGTCAGCC	GGGCTCACCC
1651	GCCCCAGACC	ACCGGTTGGA	GAGGGCAGCC	AGCCGAGCCA	ACACTGTGCG
1701	CAGCTTCCAC	CATGAAGAAT	CTTTGGAAGA	ACTACCAGAA	ACGAGTGGGA
1751	AAACAACCCG	GAGATTCTTC	TTTAATTTAA	GTTCTATCCC	CACGGAGGAG
1801	TTTATCACCT	CAGCAGAGCT	TCAGGTTTTC	CGAGAACAGA	TGCAAGATGC
1851	TTTAGGAAAC	AATAGCAGTT	TCCATCACCG	AATTAATATT	TATGAAATCA
1901	TAAAACCTGC	AACAGCCAAC	TCGAAATTCC	CCGTGACCAG	ACTTTTGGAC
1951	ACCAGGTTGG	TGAATCAGAA	TGCAAGCAGG	TGGGAAAGTT	TTGATGTCAC
2001	CCCCGCTGTG	ATGCGGTGGA	CTGCACAGGG	ACACGCCAAC	CATGGATTCG
2051	TGGTGGAAGT	GGCCCACTTG	GAGGAGAAAC	AAGGTGTCTC	CAAGAGACAT
2101	GTTAGGATAA	GCAGGTCTTT	GCACCAAGAT	GAACACAGCT	GGTCACAGAT
2151	AAGGCCATTG	CTAGTAACTT	TTGGCCATGA	TGGAAAAGGG	CATCCTCTCC
2201	ACAAAAGAGA	AAAACGTCAA	GCCAAACACA	AACAGCGGAA	ACGCCTTAAG
2251	TCCAGCTGTA	AGAGACACCC	TTTGTACGTG	GACTTCAGTG	ACGTGGGGTG
		ATTGTGGCTC			
		TTTTCCTCTG			
		CGTTGGTCAA			
		ACAGAACTCA			
		TGTATTAAAG			
					ATATACTCTA
					ATAACTGATC
					TAAAAAACCT
					ATTGTTGTTG
					CAATAGCATC
					GTTGTGGTTT
					CGTTAATATT
					TAGACCGAGA
295	1 ATAGGCCGA	A ATCGGCAAAA	TOCCTTATAA	AICAAAAGAA	TAGACCGAGA

3001	TAGGGTTGAG	TGTTGTTCCA	GTTTGGAACA	AGAGTCCACT	ATTAAAGAAC
3051	GTGGACTCCA	ACGTCAAAGG	GCGAAAAACC	GTCTATCAGG	GCGATGGCCC
3101	ACTACGTGAA	CCATCACCCT	AATCAAGTTT	TTTGGGGTCG	AGGTGCCGTA
3151	AAGCACTAAA	TCGGAACCCT	AAAGGGAGCC	CCCGATTTAG	AGCTTGACGG
3201	GGAAAGCCGG	CGAACGTGGC	GAGAAAGGAA	GGGAAGAAAG	CGAAAGGAGC
3251	GGGCGCTAGG	GCGCTGGCAA	GTGTAGCGGT	CACGCTGCGC	GTAACCACCA
3301	CACCCGCCGC	GCTTAATGCG	CCGCTACAGG	GCGCGTCAGG	TGGCACTTTT
3351	CGGGGAAATG	TGCGCGGAAC	CCCTATTTGT	TTATTTTTCT	AAATACATTC
3401	AAATATGTAT	CCGCTCATGA	GACAATAACC	CTGATAAATG	CTTCAATAAT
3451	ATTGAAAAAG	GAAGAGTCCT	GAGGCGGAAA	GAACCAGCTG	TGGAATGTGT
3501	GTCAGTTAGG	GTGTGGAAAG	TCCCCAGGCT	CCCCAGCAGG	CAGAAGTATG
3551	CAAAGCATGC	ATCTCAATTA	GTCAGCAACC	AGGTGTGGAA	AGTCCCCAGG
3601	CTCCCCAGCA	GGCAGAAGTA	TGCAAAGCAT	GCATCTCAAT	TAGTCAGCAA
3651	CCATAGTCCC	GCCCCTAACT	CCGCCCATCC	CGCCCTAAC	TCCGCCCAGT
3701	TCCGCCCATT	CTCCGCCCCA	TGGCTGACTA	ATTTTTTTA	TTTATGCAGA
3751	GGCCGAGGCC	GCCTCGGCCT	CTGAGCTATT	CCAGAAGTAG	TGAGGAGGCT
3801	TTTTTGGAGG	CCTAGGCTTT	TGCAAAGATC	GATCAAGAGA	CAGGATGAGG
3851	ATCGTTTCGC	ATGATTGAAC	AAGATGGATT	GCACGCAGGT	TCTCCGGCCG
3901	CTTGGGTGGA	GAGGCTATTC	GGCTATGACT	GGGCACAACA	GACAATCGGC
3951	TGCTCTGATG	CCGCCGTGTT	CCGGCTGTCA	GCGCAGGGGC	GCCCGGTTCT
4001	TTTTGTCAAG	ACCGACCTGT	CCGGTGCCCT	GAATGAACTG	CAAGACGAGG
4051	CAGCGCGGCT	ATCGTGGCTG	GCCACGACGG	GCGTTCCTTG	CGCAGCTGTG
4101	CTCGACGTTG	TCACTGAAGC	GGGAAGGGAC	TGGCTGCTAT	TGGGCGAAGT
4151	GCCGGGGCAG	GATCTCCTGT	CATCTCACCT	TGCTCCTGCC	GAGAAAGTAT
4201	CCATCATGGC	TGATGCAATG	CGGCGGCTGC	ATACGCTTGA	TCCGGCTACC
4251	TGCCCATTCG	ACCACCAAGC	GAAACATCGC	ATCGAGCGAG	CACGTACTCG
4301	GATGGAAGCC	GGTCTTGTCG	ATCAGGATGA	TCTGGACGAA	GAGCATCAGG
4351	GCTCGCGCC	AGCCGAACTG	TTCGCCAGGC	TCAAGGCGAG	CATGCCCGAC
4401	GGCGAGGATC	TCGTCGTGAC	CCATGGCGAT	GCCTGCTTGC	CGAATATCAT
4451	GGTGGAAAAT	GGCCGCTTTT	CTGGATTCAT	CGACTGTGGC	CGGCTGGGTG
4501	TGGCGGACCG	CTATCAGGAC	ATAGCGTTGG	CTACCCGTGA	TATTGCTGAA
4551	GAGCTTGGCG	GCGAATGGGC	: TGACCGCTTC	CTCGTGCTTT	ACGGTATCGC
4603	CGCTCCCGAT	TCGCAGCGCA	TCGCCTTCTA	TCGCCTTCTT	GACGAGTTCT
465	TCTGAGCGGG	ACTCTGGGGT	TCGAAATGAC	CGACCAAGCG	ACGCCCAACC
470	TGCCATCAC	G AGATTTCGAT	TCCACCGCCG	CCTTCTATGA	AAGGTTGGGC
475	1 TTCGGAATC	TTTTCCGGGF	CGCCGGCTGG	ATGATCCTCC	AGCGCGGGGA
480	1 TCTCATGCT	GAGTTCTTC	CCCACCCTAG	GGGGAGGCTA	ACTGAAACAC
485	GGAAGGAGA	AATACCGGA	A GGAACCCGCG	CTATGACGGC	AATAAAAAGA
490	1 CAGAATAAA	A CGCACGGTGT	r TGGGTCGTTI	GTTCATAAAC	GCGGGGTTCG
495	1 GTCCCAGGG	C TGGCACTCT	G TCGATACCCC	ACCGAGACCC	CATTGGGGCC
500	1 AATACGCCC	G CGTTTCTTC	C TTTTCCCCAC	CCCACCCCC	AAGTTCGGGT
505	1 GAAGGCCCA	G GGCTCGCAG	CAACGTCGGG	GCGGCAGGCC	CTGCCATAGC

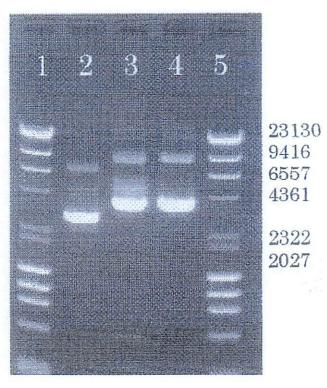
5101 CTCAGGTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAACTT CATTTTTAAT 5151 TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT GACCAAAATC 5201 CCTTAACGTG AGTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG TAGAAAAGAT 5251 CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC TGCTGCTTGC 5301 AAACAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTTGCC GGATCAAGAG 5351 CTACCAACTC TTTTTCCGAA GGTAACTGGC TTCAGCAGAG CGCAGATACC 5401 AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC TTCAAGAACT 5451 CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT ACCAGTGGCT 5501 GCTGCCAGTG GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGACT CAAGACGATA 5551 GTTACCGGAT AAGGCGCAGC GGTCGGGCTG AACGGGGGGT TCGTGCACAC 5601 AGCCCAGCTT GGAGCGAACG ACCTACACCG AACTGAGATA CCTACAGCGT 5651 GAGCTATGAG AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG CGGACAGGTA 5701 TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG GAACAGGAGA GCGCACGAGG GAGCTTCCAG 5751 GGGGAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCCTG TCGGGTTTCG CCACCTCTGA 5801 CTTGAGCGTC GATTTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA GCCTATGGAA 5851 AAACGCCAGC AACGCGGCCT TTTTACGGTT CCTGGCCTTT TGCTGGCCTT 5901 TTGCTCACAT GTTCTTTCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT GGATAACCGT 5951 ATTACCGCCA TGCAT

pEGFP-C3-rhBMP-2-125 sequence



作成したプラスミドベクターpEGFP-C3-rhBMP-2-125. Clontech 社の pEGFP-C3 の SalI サイトに pSP65-rhBMP-2-125 から切り出された rhBMP-2-125 が挿入されている. 下線部が SalI サイト. 上流には蛍光蛋白である EGFP の配列があり, 転写された場合は EGFP-rhBMP-2-125 の融合蛋白が生成される.

シーケンスは接合部の配列を確認した. Primer は CGACCACTACCAGCAGAACA と TTGCATTCATTTTATGTTTCAGG (太下線部)を用いた.



電気泳動結果(1%Agarose gel 電気泳動にて 300ng 泳動)

line1: Marker (λ-HindIII digest, φ X174-HaeIII digest)

line2: 4.85kb コントロールプラスミド

line3:5.9kb コントロールプラスミド

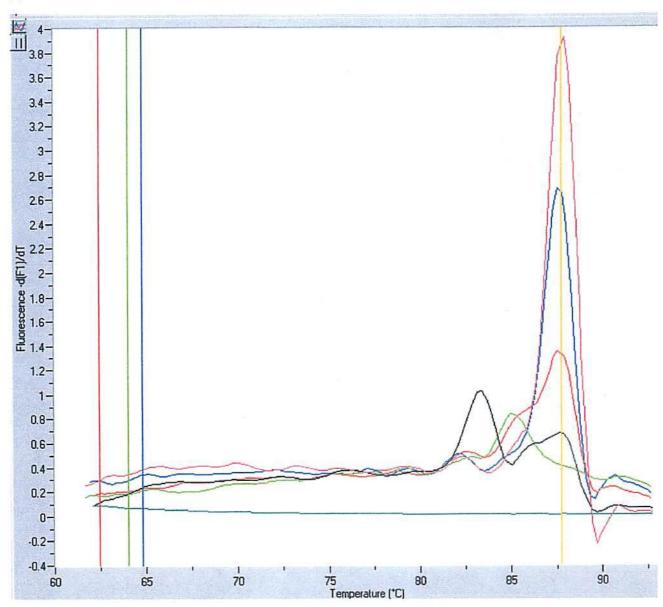
line4: pEGFP-C3-rhBMP-2

line5: Marker (λ -HindIII digest, ϕ X174-HaeIII digest)

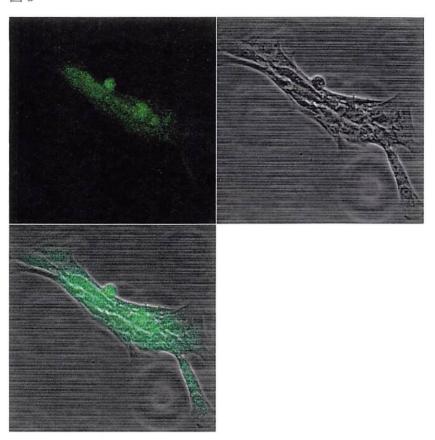
表1

Gene	Primer sequence	GenBank accession no.	Nucleotide coordinates
Human BMP-2	CCACGGAGGAGTTTATCACC	M22489	1790-1809
	CAAAAGTTACTAGCAATGGC		2173-2154

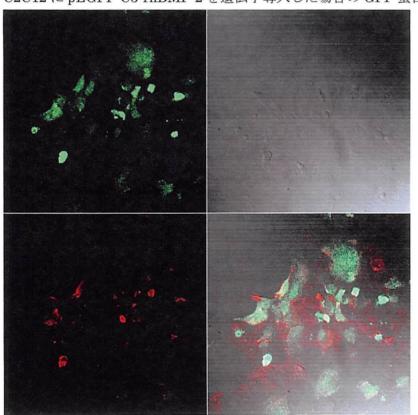
シーケンス確認, および RT-PCR に用いた primer.



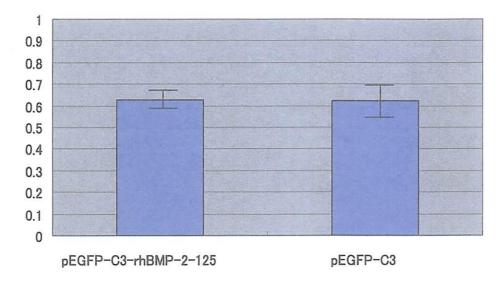
赤線, 青線は pEGFP-C3-rhBMP-2-125 を導入した C2C12 でのmRNA 発現量を示す. オレンジ線はプラスミド自体, 黒線・緑線は pEGFP-C3 を導入した C2C12 でのmRNA 発現量である.



C2C12 に pEGFP-C3-rhBMP-2 を遺伝子導入した場合の GFP 蛋白の蛍光.

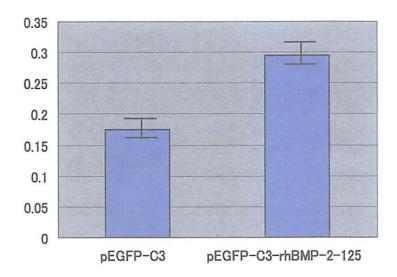


同標本を抗ヒト rhBMP-2 モノクローナル抗体と Alexa594 にて免疫染色した像. 緑の蛍光は GFP 蛋白の蛍光,赤は Alexa594 の蛍光(rhBMP-2-125)を示す. 両者とも蛍光している細胞もあるが, GFP の蛍光と比例するような増強はない. GFP-rhBMP-2-125 蛋白は Alexa594 で蛍光標識されていない可能性が高い.

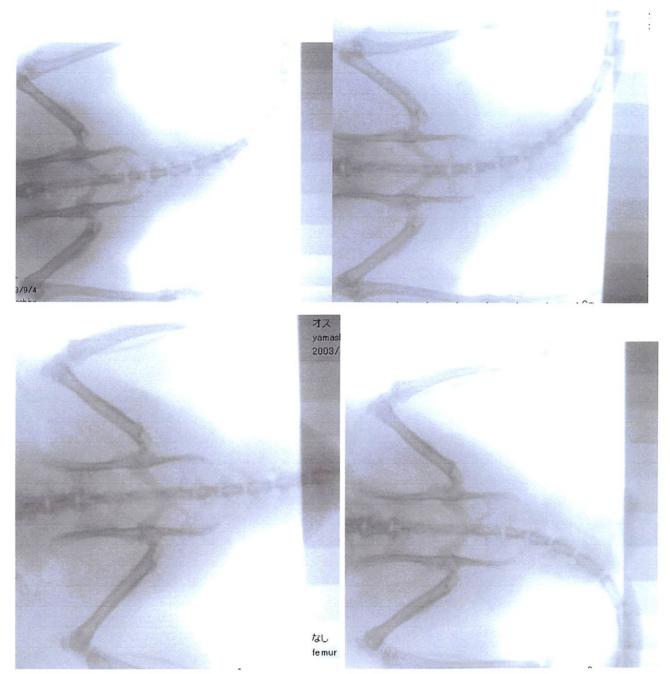


C2C12 に遺伝子導入した際の 24-48 時間時の培養上清の rhBMP-2 をターゲットにした ELISA での POD 活性. 両者に差はない. pEGFP-C3 は 0.628 ± 0.030 , pEGFP-C3-rhBMP-2-125 は 0.621 ± 0.084 であった. バーは標準偏差を示す.

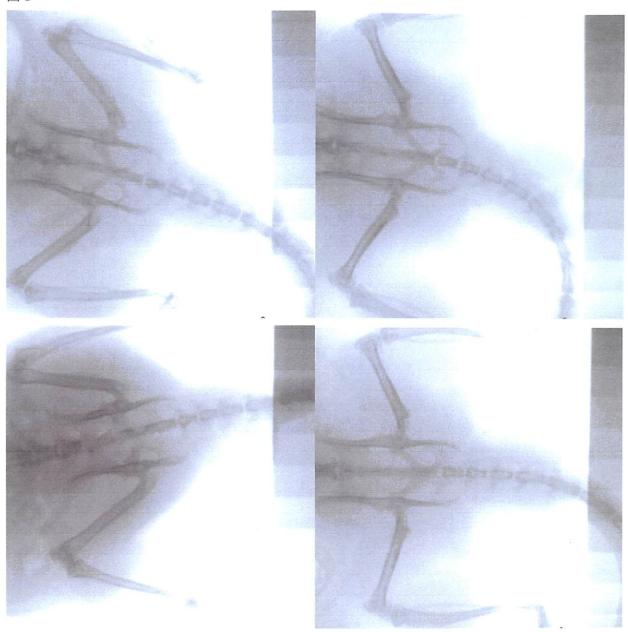
表3



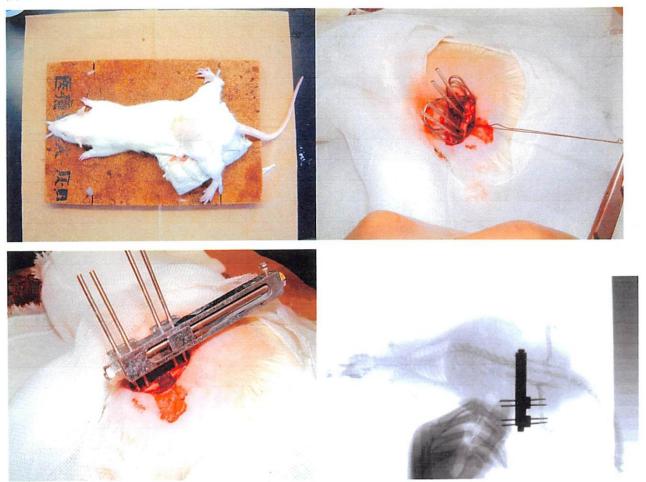
C2C12 に pEGFP-C3 及び pEGFP-C3-rhBMP-2-125 を遺伝子導入し、24 時間時の細胞の ALP 活性を 測定した. pEGFP-C3 は 0.175 ± 0.017 , pEGFP-C3-rhBMP-2-125 は 0.295 ± 0.022 であった. バー は標準偏差を示す.



左上:pEGFP-C3-rhBMP-2-125 を遺伝子導入した C2C12 を包埋したコラーゲンスポンジを両大腿二頭筋内 (大腿骨の尾側) に埋入後1週のレ線. 右上:同2週. 左下:同3週. 右下:同4週.

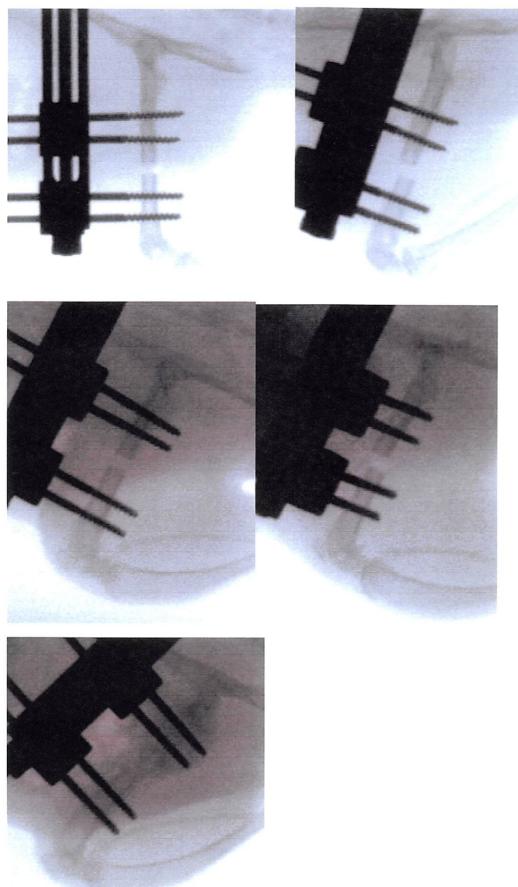


コントロール. 左上: pEGFP·C3 を遺伝子導入した C2C12 を包埋したコラーゲンスポンジを大腿二頭筋内に埋入後1週のレ線. 右上:同2週. 左下:同3週. 右下:同4週.



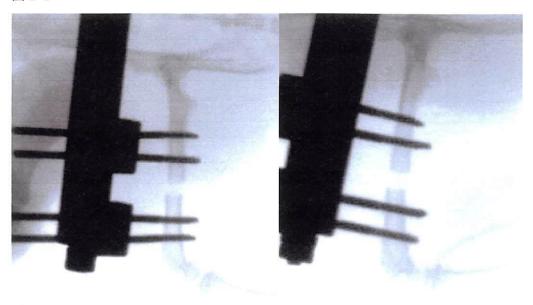
ラットの左大腿部を展開し、大腿骨をほぼ全長にわたり露出した後に 1 mm の Kirschner 鋼線でプリドリリングしハーフピンを 4 本刺入した. 創外固定器を装着後、Threadwire saw を用い骨幹部を切断し 3 mm の一期的延長を行なった.

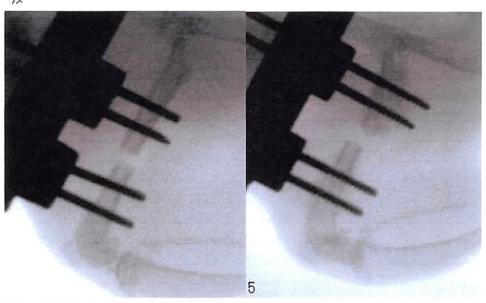
図10

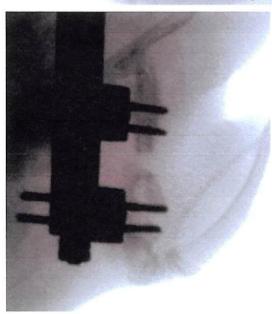


pEGFP-C3·rhBMP-2-125 遺伝子導入後の C2C12 細胞を骨欠損部に移植したモデル. 上段左:手術直後. 上段右:術後1週. 中段左:術後2週. 中段右:術後3週. 下段:術後4週. 何れも骨形成を認めない.

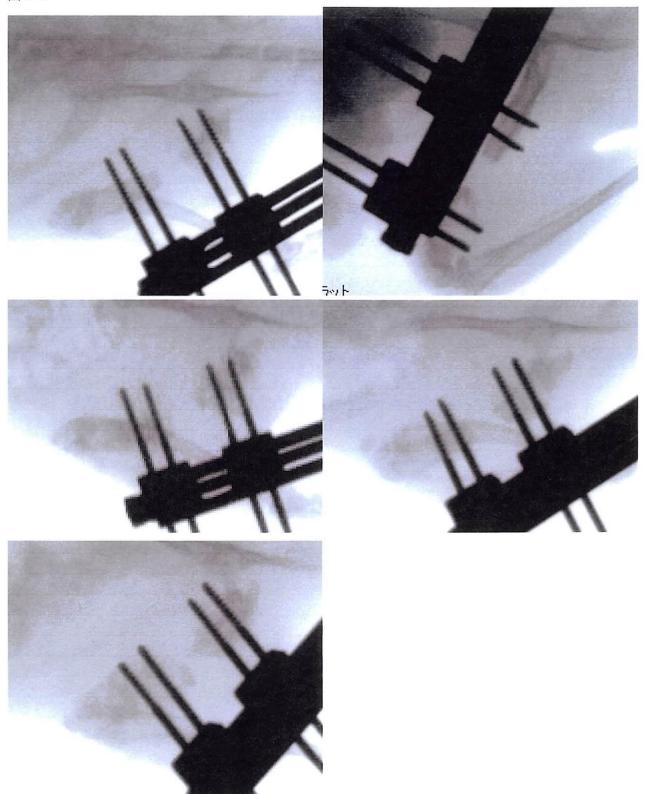
図11



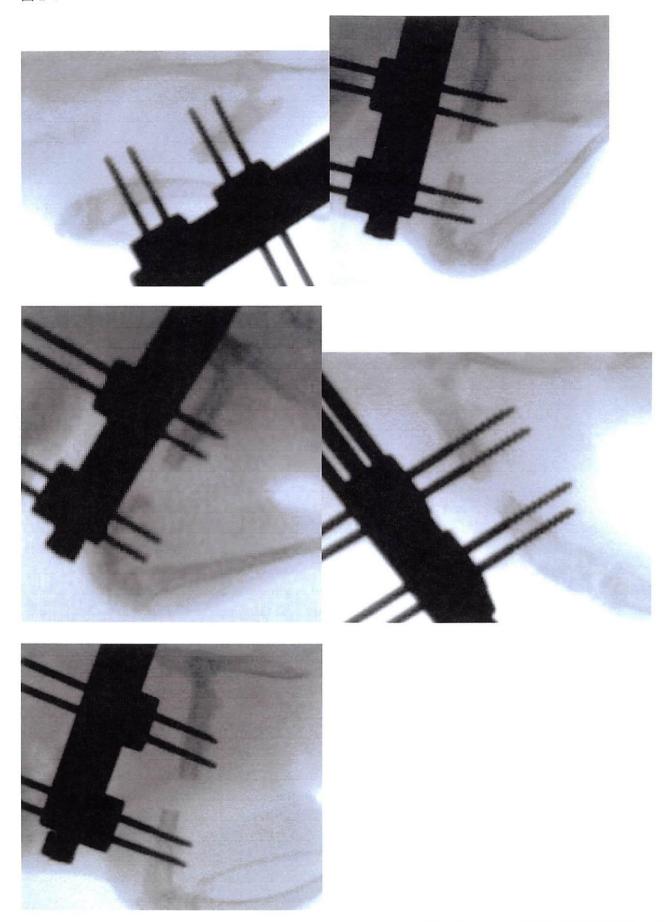




コントロール. pEGFP-C3 遺伝子導入後の C2C12 細胞を骨欠損部に移植したモデル. 上段左:手術直後. 上段右:術後1週. 中段左:術後2週. 中段右:術後3週. 下段:術後4週. 何れも骨形成を認めない.



pEGFP-C3-rhBMP-2-125 遺伝子導入した BMSC を一期的に作成した 3mm の骨欠損部に埋入し,1週間の待機後に1日0.5mm ずつ10日間延長操作を行なった.上段左:延長終了時.上段右:延長終了後1週.中段左:延長終了後2週.中段右:延長終了後3週.下段左:延長終了後4週.4週時点では骨形成が見られないため固定性が維持できなくなり、ピン周囲の弛みが生じている.反応性に骨は肥厚している.



コントロール. pEGFP・C3 遺伝子導入した BMSC を一期的に作成した 3mm の骨欠損部に埋入し, 1 週間の待機後に 1 日 0.5mm ずつ 10 日間延長操作を行なった. 上段左:延長終了時. 上段右:延長終了後 1 週. 中段左:延長終了後 2 週. 中段右:延長終了後 3 週. 下段左:延長終了後 4 週.