

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 糸満盛憲

平成 12 (2000) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立に関する研究.....	1
糸満盛憲	

### II. 分担研究報告

1. 自家細胞を用いた軟骨形成に関する研究に関する研究.....	8
糸満盛憲	
2. 同種移植骨のウイルス不活化を目的とした マイクロ波誘電加熱技術の確立に関する研究.....	9
馬淵清資	
3. 軟骨機能維持法の開発に関する研究.....	10
岩本幸英	
4. SOX9 の遺伝子導入による軟骨細胞分化に関する研究.....	16
岩田 久	
5. 軟骨細胞・幹細胞培養による軟骨移植技術の検討に関する研究.....	18
越智光夫	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (添付)	

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
(総括) 研究報告書

自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立に関する研究

主任研究者 糸満盛憲 北里大学医学部整形外科学教授

研究要旨

(1) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：骨を入れた容器の中に生理的食塩水を加え加湿することで、骨全体の温度を短時間で均一にすることが可能となった。(2) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：家兔骨髄幹細胞を三次元培養することにより軟骨細胞へと分化し、軟骨様組織を形成した。また SOX9 cDNA を遺伝子導入し過剰発現させた胎児腎皮質細胞は軟骨細胞様細胞に分化した。以上より、骨髄幹細胞あるいは SOX9 を遺伝子導入した細胞が軟骨欠損の修復に活用できることが示された。軟骨細胞の形質を維持する培養法として、コラーゲンゲル培養あるいはアガロース上での浮遊培養が、有効な培養法であることが示された。また転写因子 CRYBP1 と FPM315 の発現を調節することで修復軟骨の変性を予防しうる可能性が示された。

分担研究者

馬淵清資 北里大学医療衛生学部教授  
岩本幸英 九州大学医学部整形外科学教授  
岩田 久 名古屋大学医学部整形外科学教授  
越智光夫 島根医科大学整形外科学教授

A. 研究目的

(1) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：同種骨は人工骨に比べ骨誘導能に優れているが、ウイルスや細菌などの感染性疾患の伝播の危険を有する。また従来の滅菌処理方法では、骨誘導能を損なう可能性がある。本研究の目的は、マイクロ波加温装置を用いて不定形の骨を均一に加温する条件を検討し、適切な加温技術を確立し、骨誘導能を維持しつつ感染性疾患の伝播の可能性のない同種骨の滅菌法を実用可能とすることである。

(2) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：変形性膝関節症、慢性間接リウマチ、外傷、腫瘍切除術によって生じる骨軟骨欠損を同種あるいは自家骨軟骨組織片移植にて修復する試みがなされているが、いまだ不十分な点が多い。一方自家軟骨細胞により補填修復する試みは、関節軟骨から軟骨組織を採取する必要があ

ること、軟骨細胞の単層培養では細胞の形質の維持が困難であること、また移植時に移植細胞が流出する可能性があることなどの問題がある。本研究の目的は、組織工学的手法を用いてコラーゲンゲルやポリグリコール酸などの鋳型に軟骨細胞あるいは軟骨細胞の前駆細胞を三次元的に培養し、必要とされる大きさや形状の軟骨組織を作製し、欠損部に移植することで自家細胞に折る軟骨欠損を修復する方法を確立することである。

B. 研究方法

(1) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：マイクロ波誘電加温装置を用いて牛骨を加温し、骨内の温度分布を測定することにより、ウイルスの不活化、殺菌の温度条件、均一に加温するための制御方法を設定する。次にマイクロ波加温処理が骨の力学的強度に与える影響を、力学試験機を用いて検討する。また温度分布の測定結果をもとに、有限要素法によりマイクロ波磁場における骨の加温状況を数値解析し、さまざまな形状や大きさの骨における処理条件を求め。最終的には温度制御可能なマイクロ

波加温処理技術を確立し、加温処理装置を実用化するためのプロトタイプを作製する。

(2)自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：まず適切な担体を用い、動物及びヒトの軟骨細胞あるいは軟骨前駆細胞の三次元培養法を確立する。担体としてコラーゲンゲルやポリグリコール酸を用い、動物（ラット、ウサギ）、ヒトの軟骨細胞、骨髄幹細胞を三次元的に培養する。これらの培養細胞が軟骨の形質を表現することを検討するために、軟骨基質蛋白の発現を mRNA 及び蛋白レベルで評価する。評価には polymerase chain reaction (PCR) 法、ノーザンブロット法、免疫組織化学的な方法を用いる。また軟骨細胞に分化しうる細胞を、成長因子やホルモンなどを加えることで効率的に増殖分化させ、適切な担体の中で軟骨組織を形成させる。さらにこの軟骨組織を増大させる。次に生体における移植軟骨の有効性を検討する。動物に移植した軟骨組織の長期的な状態と、移植軟骨と周囲の軟骨の境界部の結合を組織学的に検討する。最後にヒトの外傷性あるいは離断性骨軟骨炎による軟骨欠損に対して自家細胞による移植実験を行い、その有用性を検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物実験規則に沿い、実験操作に関しては動物に不必要な不安や苦痛を与えないように取り扱いに注意する。また、ヒトの組織細胞を扱う場合には、病院内の倫理委員会の承認を得て、提供者の自由意志による同意を得て行う。

### C. 研究結果

(1) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：滅菌には 80℃、10 分間の加温が必要であることが知られている。そのため本年度は、電力調節が可能なマイクロ波加温装置を作製し、この加温装置により牛大腿骨骨頭の温度を 80℃に制御する方法を検討した。骨を入れた容器の中に生理的食塩水を加え加湿することで、海綿骨及び皮質骨の温度を同一にし、骨全体を短時間に均一にすることが可能となった。

(2) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：1) ラット軟骨細胞をアガロース上で浮遊

培養することにより三次元培養を行ったところ、軟骨細胞は塊状となり、単層培養と比較して細胞形質はよく保たれていた。この浮遊軟骨細胞塊をラットの関節軟骨欠損部に移植したところ、短期的には十分な軟骨の形成を認めた。2) ウサギの骨髄より骨髄液を採取し、単層培養を行った後、継代した細胞をペレット状にして TGF- $\beta$ 1 を加えた培地にて高密度培養することで、骨髄幹細胞は軟骨細胞に分化し軟骨基質を形成した。3) 軟骨分化誘導能を持つ転写因子 SOX9 を過剰発現させると、胎児腎皮質細胞はアルシアンブルー陽性で II 型コラーゲン mRNA を発現する軟骨細胞に分化した。4) 軟骨分化抑制能を持つ転写因子 CRYBP1 と FPM315 は正常関節軟骨では発現されないが、変性軟骨コラーゲンの発現が低下した関節軟骨ではその発現が上昇することより、これらの転写因子は軟骨の変性に関与する可能性が示された。

### D. 考察

(1) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：今後はこの方法で加温滅菌された骨の力学的強度やその骨誘導能を評価することにより、骨誘導能があり感染性疾患の伝播の危険のない同種骨の供給が可能となると考えられた。またこの加温処理方法は、悪性腫瘍の手術時における腫瘍細胞を消滅させる加温処理にも応用可能であると思われる。

(2) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：骨髄幹細胞あるいは SOX9 を遺伝子導入した細胞が軟骨細胞に分化しうるということが明らかとなり、これらの細胞が軟骨欠損の修復に活用できることが示された。また軟骨細胞の形質の維持にはコラーゲンゲル培養あるいはアガロース上での浮遊培養が有用であることが明らかとなり、軟骨欠損部に移植する軟骨細胞の有効な培養法が示された。一方転写因子 CRYBP1 と FPM315 が軟骨の変性に関わる可能性が明らかとなり、軟骨欠損部を自家細胞で修復する際、これらの転写因子の発現を調節することで修復軟骨の変性を予防しうる可能性が示された。

## E. 結論

(1) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：本年度の研究により骨全体の温度を短時間で均一にすることが可能となった。

(2) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：本年度の研究により、骨髄幹細胞あるいはSOX9を遺伝子導入した細胞が軟骨欠損の修復に活用できることが示された。また培養法に関しては、コラーゲンゲル培養あるいはアガロース上での浮遊培養が、軟骨欠損部に移植する軟骨細胞の有効な培養法であることが示された。また転写因子CRYBP1とFPM315の発現を調節することで修復軟骨の変性を予防する可能性が示された。

## F. 健康危険情報

本研究に関連して、健康管理上問題となるような事項はなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Izumi T, Tominaga T, Shida J, Onishi F, Itomann M: Chondrocyte transplantation for osteochondral defects with the use of suspension culture. *Cell Tissue Banking* 1:207-212, 2000.

Uchno M, Izumi T, Tominaga T, Wakita R, Minehara H, Sekiguchi M, Itoman M: Growth factor expression in the osteophytes of the human femoral head in osteoarthritis. *Clin Orthop*, 377:119-125, 2000.

Ishiguro N, Ito T, Miyazaki K, Iwata H: Matrix metalloproteinases, tissueinhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 26:34-40, 1999.

Ishiguro N, Ito T, Ito H, Iwata H, Jugessur H, Ionescu M, Pool AR: Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover. *Arthritis Rheum*, 42:129-136, 1999

Ishiguro N, Shimizu T, Ito T, Kojima T,

Iwahori Y, Iwata H: The expression of matrix metalloproteinases and inhibitors in acute rupture of the anterior cruciate ligament. *Mod Rheumatol*, 10:95-102, 2000.

Krokochi K, Kanbe F, Kikumori T, Sakai T, Sarkar D, Ishiguro N, Iwata H, Seo H: Effects of glucocorticoids on tumor necrosis factor  $\alpha$ -dependent activation of nuclear factor  $\kappa$  B and expression of the intercellular adhesion molecule 1 gene in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J Bone Miner Res*, 15:1707-1715, 2000.

Jingushi S, Iwamoto Y. A device for removal of femoral distal cement plug during hip revision arthroplasty. A high-powered drill equipped with a centralizer. *J. Arthroplasty*, 15: 231-233, 2000

Miyanishi K, Noguchi Y, Yamamoto T, Irisa T, Suenaga E, Jingushi S, Sugioka Y, Iwamoto Y. Prediction of the outcome of transtrochanteric rotational osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. *J. Bone. Joint Surg*, 82(B): 512-516, 2000

Nagamine R, Iwamoto Y. Anatomic variations should be considered in total knee arthroplasty. *J. Orthop. Sci*, 5: 232-237, 2000

Zhao H, Shuto T, Hirata G, Iwamoto Y. Aminobisphosphonate (YM175) inhibits bone destruction in rat adjuvant arthritis. *J. Orthop. Sci*, 5: 397-403, 2000

Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Iwamoto Y, Yamada Y. A zinc finger transcription factor,  $\alpha$ A-crystallin binding protein1, is a negative regulator of the chondrocyte-specific enhancer of the  $\alpha$ 1(II) collagen gene. *Mol. Cell Biol*, 20: 4428-4435, 2000

Miyanishi K, Nagamine R, Murayama S, Miura H, Urabe K, Matsuda S, Hirata G, Iwamoto Y. Tibial tubercle malposition in patellar joint instability. *Acta Orthop. Scand*. 7: 286-291, 2000

Noguchi Y, Kubota H, Suenaga E, Iwamoto Y. Pemberton osteotomy and derotation varus osteotomy for the treatment of developmental dysplasia of the hip in older children. *J. Jpn. Paed Orthop Ass*, 9: 165-170, 2000

Miura H, Noguchi Y, Mitsuyasu H, Nagamine R, Urabe K, Matsuda S, Iwamoto Y. Clinical features of multiple epiphyseal dysplasia expressed in the knee. *Clin. Orthop. Related Res.* 380: 184-190, 2000

Fukushi J, Ono M, Morikawa W, Iwamoto Y, Kuwano M. The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 165: 2818-2823, 2000

Jingushi S, Lohmander L.S, Shinmei M., Hoerner L, Lark M.W, Sugioka Y, Iwamoto Y. Markers of joint tissue turnover in joint fluids from hips with osteonecrosis of the femoral head. *J. Orthop. Res.* 18: 728-733, 2000

Teramoto M, Nakamasu K, Noshiro M, Matsuda Y, Gotoh O, Shen M, Tsutsumi S, Kawamoto T, Iwamoto Y, Kato Y. Gene structure and chromosomal location for a human bHLH transcriptional factor DEC1/Stral3 Sharp-2/ BHLHB2. *J. Biochem*, in press.

三浦裕正、高杉紳一郎、岩本幸英、廣田良夫. 変形性膝関節症の疫学. *骨関節靭帯*, 13: 303-310, 2000

長嶺隆二、占部憲、三浦裕正、松田秀一、宮西圭太、平田剛、岩本幸英. 人工膝関節置換術における膝蓋骨の正確な骨切りのための新しい手技. *整形外科と災害外科*, 49 (1): 59-61, 2000  
片山愛子、末永英慈、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、岩本幸英. 変形性股関節症における単純X線Look-up像について. *整形外科と災害外科*, 49 (3): 924-929, 2000

末永英慈、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、山本卓明、宮西圭太、岩本幸英. 大腿骨頭回転骨切り術における栄養血管血流と術後肢位. *整形外科と災害外科*, 49 (3): 951-956, 2000

中島康晴、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、

末永英慈、岩本幸英. 亜脱臼性股関節症の疼痛発症年齢と股関節”向心性”の相関. *Hip Joint*, 26: 166-169, 2000

末永英慈、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、山本卓明、宮西圭太、岩本幸英. 大腿骨頭壊死の股関節鏡所見. *Hip Joint*, 26: 354-358, 2000

## 2. 学会発表

Tanaka K, Tsumaki N, Yamada Y, Iwamoto Y. A zinc-finger transcription factor, FPM315, negatively regulates expression of the  $\alpha 2$  type XI collagen gene. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, Urabe K, Sakai H, Iwamoto Y. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor 1 during rat fracture healing. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Urabe K, Jingushi S, Okazaki K, Ikenoue K, Sakai H, Iwamoto Y. Immature osteoblasts express the pro- $\alpha 2$  (XI) collagen gene during bone formation in vitro and in vivo. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Hirata G, Shuto T, Zhao H, Iwamoto Y. Expression of activin and activin receptors in synovial tissues in rheumatoid arthritis-role of activin in angiogenesis. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Zhao H, Shuto T, Hirata G, Iwamoto Y. Amino bisphosphonate (YM175) suppresses joint inflammation and bone destruction in rat adjuvant arthritis. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Mawatari T, Miura H, Morooka T, Higaki H, Kawano T, Nakamura K, Takamura K,

Murakami T, Iwamoto Y. Effect of intraarticular administration of phospholipid as a boundary lubricant for the treatment of osteoarthritis. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Jingushi S, Noguchi Y, Miura H, Iwamoto Y. Transtrochanteric valgus femoral osteotomy -an option for the treatment of advanced osteoarthritic hips especially in young patients. British orthopaedic association, Japanese orthopaedic association combined congress 2000, London, England, 3-6, October, 2000

Morooka T, Miura H, Takasugi S, Kawano T, Mawatari T, Iwamoto Y. Predictors of knee osteoarthritis: the relationship between knee osteoarthritis and spinal disorders. British orthopaedic association, Japanese orthopaedic association combined congress 2000, London, England, 3-6, October, 2000

Nakashima Y, Maloney W.J, Goodman S.B, Smith R.L, Iwamoto Y. Signaling pathways of wear debris-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 expression in human macrophages. British orthopaedic association, Japanese orthopaedic association combined congress 2000, London, England, 3-6, October, 2000

Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Matsunobu T, Saikimura R, Yamada Y, Iwamoto Y. Coordinate expression of zinc-finger transcription factors, FPM315 and CRYBP1, during cartilage differentiation. 47th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, February 25-28, 2001

Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Matsunobu T, Saikimura R, Yamada Y, Iwamoto Y. A Kruppel-Associated Box-zinc finger protein, FPM315, inhibits tissue specific expression of Col11A2 gene. 4th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of the U.S.A.,

Canada, Europe and Japan, Rhodes, Greece, June 1-3, 2001

内山勝文, 氏平政伸, 馬淵清資, 糸満盛憲ほか. マイクロ波誘電加熱法を用いた同種移植骨の加温殺菌法の開発. 日本機械学会 2000 年度年次大会 No.1 Vol II 147-148

内山勝文, 氏平政伸, 馬淵清資, 糸満盛憲ほか. マイクロ波照射による同種骨加温処理のための基礎的検討. 第 19 回日本骨・関節・軟部組織移植研究会抄録集 P 22, 2000

古川誠治, 越智光夫ほか. 高密度浮遊培養を行った骨髄由来間葉系幹細胞によるアテロコラーゲンゲル培養. 日整会誌. 74(8), 1767, 2000.

石黒直樹, 伊藤隆安, 小嶋俊久, 酒井忠博, 滝川正春, 岩田久. 関節軟骨組織および軟骨細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼと基質合成. 第 72 回日本整形外科学会, 平成 11 年 4 月 4-11 日, 横浜

小林健二, 石黒直樹, 酒井忠博, 黒河内和俊, 神部福司, 岩田久, 妹尾久雄. 模擬微重力環境が骨芽細胞様細胞の NF- $\kappa$ B 活性化に及ぼす影響. 第 14 回日本整形外科学会 基礎学術集会, 平成 11 年 10 月 7-8 日, 奈良

諸岡孝明, 三浦裕正, 長嶺隆二, 占部憲, 松田秀一, 岩本幸英「変形性膝関節症と骨粗鬆症の相互関連性の検討」第 1 回 日本膝関節学会学術集会, 平成 12 年 2 月 18-20 日, 東京  
田仲和宏, 松本嘉寛, 中谷文彦, 山田吉彦, 岩本幸英「CRYBP1 による SOX9 の機能制御」第 13 回 日本軟骨代謝学会, 平成 12 年 3 月 3-4 日, 横浜

寺本全男, 中舛和子, 申 鳴, 能城光秀, 岩本幸英, 加藤幸夫, 松田洋一「bHLH 型転写因子 DEC1 の遺伝子構造」第 13 回 日本軟骨代謝学会, 平成 12 年 3 月 3-4 日, 横浜

末永英慈, 野口康男, 神宮司誠也, 首藤敏秀, 中島康晴, 山本卓明, 宮西圭太, 岩本幸英「大腿骨頭壊死の股関節鏡所見」第 73 回 日本整形外科学会学術集会, 平成 12 年 4 月 6-9 日, 神戸

神宮司誠也, 野口康男, 首藤敏秀, 中島康晴, 岩本幸英「当科における人工股関節再置換術

のタイミング」第73回 日本整形外科学会学術集会、平成12年4月6-9日、神戸  
 野口康男、末永英慈、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、宮西圭太、岩本幸英「亜脱臼性股関節症に対する寛骨臼移動術による関節鏡所見の変化について」第73回 日本整形外科学会学術集会、平成12年4月6-9日、神戸  
 中島康晴、野口康男、神宮司誠也、三浦裕正、窪田秀明、首藤敏秀、末永英慈、岩本幸英「亜脱臼性股関節症の疼痛発症年齢と股関節”向心性”の相関」第73回 日本整形外科学会学術集会、平成12年4月6-9日、神戸  
 山本卓明、宮西圭太、野口康男、入佐隆彦、山下彰久、居石克夫、岩本幸英「ステロイド剤投与骨壊死実験モデルでの骨壊死の病因」第44回 リウマチ学会総会、平成12年5月13-15日、横浜  
 中島康晴、WH.Maloney, SB.Goodman, RL.Smith, 岩本幸英「人工関節周囲骨溶解 (Osteolysis)の発生機序」第44回 リウマチ学会総会、平成12年5月13-15日、横浜  
 趙洪普、首藤敏秀、平田剛、岩本幸英「ビスフォスフォネート(YM-175)による関節炎および骨関節破壊抑制-アジュバント関節炎の発症後投与による検討-」第44回 リウマチ学会総会、平成12年5月13-15日、横浜  
 神宮司誠也、野口康男、首藤敏秀、中島康晴、岩本幸英「同種骨移植を併用した臼蓋側人工股関節再置換術」第99回 西日本整形災害外科学会、平成12年6月3-4日、北九州  
 中山功一、三浦裕正、長嶺隆二、占部憲、松田秀一、岩本幸英「高位脛骨骨切り術における矯正角維持に影響を及ぼす因子についての検討」第99回 西日本整形災害外科学会、平成12年6月3-4日、北九州  
 馬渡太郎、三浦裕正、諸岡孝明、河野勤、日垣秀彦、岩本幸英「骨梁連結性途絶後の Vitamin K2(menatetrenone)の効果」第18回 日本骨代謝学会、平成12年7月19-22日、広島  
 中島康晴、野口康男、神宮司誠也、前田健、長嶺隆二、首藤敏秀、平田剛、岩本幸英「RA股に対する骨移植併用人工股関節の術後成績」第20回 九州リウマチ学会、平成12年9月15-16日、

福岡中島康晴、野口康男、神宮司誠也、前田健、長嶺隆二、首藤敏秀、平田剛、岩本幸英「RA股に対する骨移植併用人工股関節の術後成績」第20回 九州リウマチ学会、平成12年9月15-16日、福岡  
 松尾篤、首藤敏秀、趙洪普、平田剛、岩本幸英「ビスフォスフォネートによる関節炎の骨関節破壊制御」第20回 九州リウマチ学会、平成12年9月15-16日、福岡  
 山本卓明、岩本幸英「特発性大腿骨頭壊死症における虚血エピソード(壊死再発の有無)」第15回 日本整形外科学会基礎学術集会、平成12年9月28-29日、京都  
 松田秀一、田仲和宏、中敬彦、岩本幸英「悪性骨腫瘍切除後におけるパストール処理骨を用いた機能再建の術後成績」第19回 日本骨関節軟部組織移植研究会、平成12年10月14日、加賀  
 神宮司誠也、野口康男、三浦裕正、首藤敏秀、中島康晴、岩本幸英「杉岡式大腿骨転子部外反骨切術の長期成績-特に若年者進行期及び末期変形性股関節症に対する術式として-」第27回 日本股関節学会第27回 日本股関節学会、平成12年11月10-11日、名古屋  
 光安廣倫、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、末永英慈、岩本幸英「骨系統疾患に起因する二次性股関節症の病態」第27回 日本股関節学会、平成12年11月10-11日、名古屋  
 神宮司誠也、Lohmander LS、新名正由、Hoerner LA、Lark MW、杉岡洋一、岩本幸英「大腿骨頭壊死股関節液における軟骨病態マーカー」第27回 日本股関節学会、平成12年11月10-11日、名古屋  
 首藤敏秀、野口康男、神宮司誠也、中島康晴、末永英慈、岩本幸英「亜脱臼性変形性股関節症に対する転子間彎曲内反骨切り術の長期成績」第27回 日本股関節学会、平成12年11月10-11日、名古屋  
 中島康晴、野口康男、窪田秀明、神宮司誠也、首藤敏秀、末永英慈、岩本幸英「ペルテス病に対する大腿骨頭前方回転骨切り術の手術



成績」第 27 回 日本股関節学会、平成 12 年 11 月 10～11 日、名古屋

細川 哲、野口康男、末永英慈、中島康晴、首藤敏秀、神宮司誠也、岩本幸英「大腿骨頭回転骨切り術の長期成績」第 27 回 日本股関節学会、平成 12 年 11 月 10～11 日、名古屋

河野勤、三浦裕正、諸岡孝明、岩本幸英「軟骨下骨組織の動性値の変化が関節軟骨に及ぼす影響についての力学的検討」第 27 回 日本臨床バイオメカニクス学会、平成 12 年 11 月 16～17 日、つくば

松田秀一、田仲和宏、中敬彦、岩本幸英「骨腫瘍切除後の再建：同種骨移植とパストゥール処理骨移植」第 27 回 日本低温医学会総会、平成 12 年 11 月 22～23 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
分担研究報告書

自家細胞を用いた軟骨形成  
主任研究者 糸満盛憲 北里大学医学部教授

研究要旨 動物実験において、軟骨細胞を浮遊培養することにより軟骨細胞の形質を維持でき、軟骨欠損部への移植に応用することができた。

A. 研究目的

種々の疾患による関節軟骨欠損に起因する機能障害に対しては現在、軟骨組織片移植により修復されているが、採取移植される軟骨片はある程度の大きさが必要であり他の正常部分を犠牲にすることが欠点である。自家軟骨細胞あるいはその前駆細胞を増殖させて軟骨欠損部を自己の細胞で修復することは有用であると考えられる。そこで、軟骨細胞を三次元培養することにより細胞の形質を維持しつつ、必要な軟骨組織を作製することによって自家細胞による軟骨欠損部の修復法を確立する。

B. 研究方法

培養法による軟骨細胞形質の維持を検討するために、ラット軟骨細胞をアガロース上にて浮遊培養し、細胞外基質の発現を検討した。また、この培養細胞をラットの関節軟骨欠損部に移植し組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験操作に関しては動物に不必要な不安や苦痛を与えないよう取り扱いに注意した。

C. 研究結果及び考察

ラット軟骨細胞をアガロース上にて浮遊培養することにより軟骨細胞は塊状になり、単層培養と比較して細胞形質は保たれていた。この浮遊軟骨細胞塊をラットの関節軟骨欠損部に移植し、短期的には十分な軟骨の形成を認めた。

軟骨細胞浮遊培養法は、軟骨形成を行う上での一つの培養法であると考えられた。

D. 結論

動物実験において、軟骨細胞を浮遊培養することにより軟骨細胞の形質を維持でき、軟骨欠損部への移植に応用することができた。

E. 研究発表

論文発表

Izumi T, Tominaga T, Shida J, Onishi F, Itoman M: Chondrocyte transplantation for osteochondral defects with the use of suspension culture. Cell Tissue Banking 1:207-212, 2000.

Uchino M, Izumi T, Tominaga T, Wakita R, Minehara H, Sekiguchi M, Itoman M: Growth factor expression in the osteophytes of the human femoral head in osteoarthritis. Clin Orthop, 377: 119-125, 2000.

F. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)  
なし

同種移植骨のウイルス不活化を目的としたマイクロ波誘電加熱技術の確立

主任研究者 糸満 盛憲 北里大学医学部整形外科教授

研究要旨 マイクロ波による加温により処理時間の短縮が可能となり、更に、骨表面を蒸気で加湿することで骨全体温度の均一性を向上させることが出来た。

分担研究者 馬淵 清資

北里大学医療衛生学部教授

A. 研究目的

同種骨移植による感染性疾患の伝播や細菌汚染を克服する新しい方法として、マイクロ波照射による同種骨加温処理法を確立するために、マイクロ波照射による骨の加温特性および骨内部温度の均一化につき検討した。

B. 研究方法

成牛大腿骨から骨頭を切離し、冷凍保存した後、表面から骨頭中心部に向かって約 29mm(骨頭中心)および 20mm、10mm、3mm(骨頭表面)の各深さの穴を開け、光ファイバー温度計センサーを挿入した。

〈実験 1〉骨頭を容器に入れ、電子レンジで加温し温度を計測した。〈実験 2〉温度制御装置を作製し、電力を調節して骨頭中心温度を 80℃に制御し、骨頭の各深さの温度を計測した。〈実験 3〉容器の底に生理食塩水 5ml を入れ加湿し、骨頭中心温度を 80℃に制御して骨頭の各深さの温度を計測した。〈実験 4〉成牛大腿骨から皮質骨のみを切離し骨髓を取り出し、容器の底に生理食塩水 5ml を入れ加湿し、全長の中心を 80℃に制御して 4カ所の温度を計測した。

C. 研究結果

〈実験 1〉マイクロ波照射により牛大腿骨頭は中心より加温された。骨頭中心が 80℃に達したとき各深さの温度は不均一であった。〈実験 2〉骨頭中心は約 15分で 80℃に到達したが、骨頭中心部を 80℃に一定時間加温し続けても、骨頭表面は 60℃以下であった。

〈実験 3〉容器の底に生理食塩水 5ml を入れ加湿すると、各深さの温度をほぼ 80℃に近づける事ができた。〈実験 4〉皮質骨も同様に加湿すると、各深さの温度を 80℃に近づける事ができた。

D. 考察

マイクロ波照射加温処理法は骨を内部より加熱する事が出来る新しい方法であり、電力を制御すれば、温度制御が可能であった。しかし、骨表面は水分が失われ、温度が上昇しない。そこで、骨表面を蒸気で加湿すると骨表面温度は上昇した。マイクロ波による加熱が骨表面で起こり、温度が上昇したと考えられる。

E. 結論

マイクロ波照射加温処理法は電力を制御すれば、温度制御が可能であり、骨表面を蒸気で加湿すると骨全体温度の均一性を向上することができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

内山勝文,氏平政伸,馬淵清資,糸満盛憲ほか. マイクロ波誘電加熱法を用いた同種移植骨の加温殺菌法の開発. 日本機械学会 2000 年度年次大会 No.1 Vol II 147-148

内山勝文,氏平政伸,馬淵清資,糸満盛憲ほか. マイクロ波照射による同種骨加温処理のための基礎的検討. 第 19 回日本骨・関節・軟部組織移植研究会抄録集 P 22,2000

H. 知的財産権の取得状況

特になし

分担研究報告書

自己修復能力を用いた関節軟骨の修復法の確立  
培養軟骨組織の臨床応用

分担研究者 岩本 幸英 九州大学大学院整形外科 教授

研究要旨

関節軟骨は、軟骨細胞の産生するII型コラーゲン(Col2a1)やXI型コラーゲン(Col11a2)などの軟骨マトリックスによって力学的負荷に耐えうるような構造を保っている。変形性関節症や慢性関節リウマチなどの関節疾患の軟骨においては、軟骨細胞の軟骨マトリックス発現は著明に低下しており、このため関節軟骨は機械的負荷に抗することができず、さらに変性摩耗していく。軟骨における軟骨コラーゲンの産生を誘導し、力学的負荷に耐えうる軟骨基質の再構築をはかることができれば、関節破壊の進行を阻止する有効な治療法となる。軟骨コラーゲン遺伝子発現制御機構は未だ不明である。胎生期の軟骨発生過程においては、転写因子SOX9によって軟骨原基でのCol2a1やCol11a2の発現が誘導される。我々は、軟骨以外の組織において転写因子CRYBP1およびFPM315が、Col2a1およびCol11a2の発現を抑制していることを見いだした。SOX9やCRYBP1およびFPM315という正と負の転写制御因子の病的関節軟骨における意義を明らかにし、関節軟骨細胞での軟骨コラーゲン発現が制御可能かを検討する目的で、まずこれらの因子の発現を解析した。CRYBP1およびFPM315に対する抗体を作成し、ウエスタンブロットにてCRYBP1およびFPM315蛋白質が認識されることを確認した。次に、人工関節置換術の際に切除した関節軟骨でのCRYBP1およびFPM315の発現について検討した。正常関節軟骨では、CRYBP1およびFPM315は発現がみられなかったが、変性に陥り軟骨コラーゲンの発現が低下した部分では、CRYBP1およびFPM315の発現は上昇していた。これらの結果は、転写因子CRYBP1およびFPM315の発現増強が、関節軟骨の変性に関わる可能性を示唆する。

A. 研究目的

関節軟骨は、軟骨細胞の産生するII型コラーゲン(Col2a1)やXI型コラーゲン(Col11a2)などを主体とする軟骨基質によって、時に体重の数倍に及ぶ機械的負荷に耐えうるような構造を保っている。その構造の破綻は関節機能を低下させ、関節痛や関節可動域制限の原因となる。変形性関節症(OA)や慢性関節リウマチ(RA)などの関節軟骨の変性摩耗や破壊を主体とする疾患は、関節の疼痛や可動域制限を引き起こすため、患者の日常生活動作に大きな障害をきたし、QOLの低下や寝たきりとなる要因の一つになっている。OAやRAの軟骨でのCol2a1やCol11a2の発現は著明に低下しており、このため関節軟骨は機械的負荷に抗することができず、さらに変性摩耗、破壊されていく悪循環を生じている。いったん変性摩耗した軟骨を再生することは極めて困難である。軟骨再生においては、骨髄から未分化間葉系細胞が遊走し、軟骨細胞へと分化し基質を分泌して新たな軟骨が形成されると考えられている。しかし、一見再生したかに見える軟骨でも、細胞はCol2a1を産生せず代わりにI

型コラーゲンを作るため、再生軟骨は機械的負荷に耐えることができず、すぐに再変性に陥ってしまう。現時点では、OAやRA患者において完全な軟骨を再生させることは不可能であり、これらの関節疾患治療の困難性は、変性破壊された軟骨における軟骨マトリックス産生誘導の困難さ、と言い換えることができる。つまり、OAやRAの軟骨細胞にCol2a1やCol11a2遺伝子発現を再び誘導する遺伝子治療的手法が確立されれば、疾患進行を阻止する有効な治療法となる可能性がある。

発生初期の軟骨原基における軟骨コラーゲン遺伝子発現は、転写活性化因子SOX9によって促進されることが知られている。SOX9は胎生期でのみ発現し生後の関節軟骨では発現しておらず、成人の関節軟骨における軟骨コラーゲン遺伝子発現の調節機構は全くわかっていない。しかし、SOX9は軟骨コラーゲン遺伝子発現を促進することが示された唯一の転写因子であり、変性軟骨においてSOX9を強制発現させることでCol2a1やCol11a2遺伝子発現を誘導できる可能性がある。一方、最近我々は、転写因子CRYBP1および

FPM315がCol2a1およびCol11a2遺伝子発現を抑制することを明らかにした。すなわち、CRYBP1とFPM315は未分化間葉系細胞で強く発現しているが、細胞が軟骨へと分化しCol2a1やCol11a2を産生し始めると発現が消失し、軟骨コラーゲンとCRYBP1、FPM315の発現には逆相関があることが判明した。さらに軟骨細胞にCRYBP1遺伝子を導入し強制発現させると、Col2a1およびCol11a2遺伝子の発現は抑制された。CRYBP1とFPM315は軟骨以外のほとんど全ての組織で発現しており、軟骨細胞以外で軟骨コラーゲンが発現しないよう抑制する働きを持つと考えられる。従って、軟骨再生において、骨髄から遊走してきた未分化間葉系細胞におけるCRYBP1およびFPM315発現を抑制することで、再生軟骨細胞の軟骨コラーゲン発現を誘導できる可能性があると考えられる。

本研究では、変性に陥った軟骨を再生させ、関節軟骨破壊の進行を阻止する遺伝子治療の開発を目的とし、そのための基礎研究として、SOX9およびCRYBP1、FPM315という正と負の転写制御因子の関節軟骨における意義を明らかにし、関節軟骨細胞での軟骨コラーゲン発現が制御可能かを検討する。さらに動物モデルにおいて、SOX9の関節軟骨への導入、アンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるCRYBP1およびFPM315発現抑制によって、軟骨再生が惹起されるかを検討する。

## B. 研究方法

SOX9、CRYBP1およびFPM315のcDNA全長を発現ベクターにサブクローニングし、flag-tag付き発現プラスミドを作成した。CRYBP1およびFPM315のアミノ酸配列を解析し、C末端の抗原性の高い部分のペプチドを作成、これをウサギに接種して抗体を作成した。得られた抗血清から、ペプチドカラムによりアフィニティー精製を行った。また、人工関節置換術の際に切除した変性関節軟骨を採取し、ホルマリン固定後パラフィン包埋し、組織切片を作成、免疫染色およびin-situ hybridizationによるCRYBP1およびFPM315の発現パターンの解析を行った。

### (倫理面への配慮)

変形性膝関節症患者からの関節軟骨の採取にあたっては、人工膝関節置換術の際に切除される関節軟骨を用いるので、患者の不利益は全くなく、インフォームドコンセントにも十分に配慮している。動物実験は全て九州大学医学部動物実験施設において行い、同施設の動物愛護に関する実験指

針に沿って行っているため、この点でも全く問題はない。

## C. 研究結果

作成したC末端部分に対するCRYBP1およびFPM315抗体を用いて、各種細胞株を用いたウェスタンブロットを行い、CRYBP1およびFPM315蛋白質が認識されることを確認した。未分化間葉系細胞では、CRYBP1およびFPM315蛋白質は強く発現しているが、軟骨系の細胞では発現はみられなかった。これは、軟骨コラーゲンの発現とは逆相関を示し、ノーザンブロットやin-situ hybridizationによるmRNA発現パターンの検討結果と一致するものであった。また、人工関節置換術の際に切除した関節軟骨でのCRYBP1およびFPM315の発現についても検討した。変性の及んでいない正常部分の関節軟骨では、CRYBP1およびFPM315は発現がみられず、軟骨下骨組織では発現が認められた。変性に陥り、軟骨コラーゲンの発現が低下した部分では、CRYBP1およびFPM315の発現は上昇していた。

## D. 考察

関節疾患の病因、病態に関しては、従来、主として力学的観点からの研究がなされてきた。このため、関節軟骨への力学的負荷を減少させるような骨切り術が考案され、また、軟骨が高度に変性摩耗した症例には人工関節置換術が行われてきた。しかし、関節軟骨破壊の進行を阻止し、軟骨再生を誘導する有効な治療法の開発は世界的にも全く進んでいない。その原因は、関節軟骨に関する生物学的研究の遅れにある。OAやRAの関節軟骨では、軟骨細胞の軟骨コラーゲン遺伝子発現が著明に低下しており、力学的負荷に耐えうるような軟骨基質の構築ができないことはわかっている。しかし、どのようなメカニズムで関節軟骨の遺伝子発現が制御されているのか、どうすれば変性軟骨での軟骨コラーゲン発現を誘導し正常な軟骨構造を保つことができるのかは不明である。軟骨コラーゲン遺伝子発現制御のメカニズムについては、近年、SOX9が胎生期の軟骨発生過程において促進的に働くことが示された。我々は、CRYBP1およびFPM315が軟骨組織以外での軟骨コラーゲン発現を抑制し、軟骨特異的発現を調節していることを見いだした。こうした研究は最近始まったばかりであり、これらを関節軟骨再生と結びつけた研究は全く行われていない。本研究では、変性に陥った軟骨を再生させ、関節軟骨破壊の進行を阻

止する遺伝子治療の開発を目的とし、そのための基礎研究として、SOX9およびCRYBP1、FPM315という正と負の転写制御因子の関節軟骨における意義を明らかにし、関節軟骨細胞での軟骨コラーゲン発現が制御可能かを検討する。本年度の研究から、我々の作成したCRYBP1およびFPM315に対する抗体は、関節軟骨でのこれらの発現を蛋白質レベルで検出しうる事が判った。正常の関節軟骨では、CRYBP1およびFPM315の発現は認められないが、変性に陥り軟骨コラーゲン発現が低下した部分ではCRYBP1およびFPM315の発現が上昇していた。これらの結果は、転写因子CRYBP1およびFPM315の発現増強が、関節軟骨の変性に関わる可能性を示唆する。今後は、実際にSOX9およびCRYBP1の発現を変化させることで、軟骨細胞の分化が制御できるか、を検討していく。さらに、動物モデルにおいて、SOX9の関節軟骨への導入、アンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるCRYBP1およびFPM315発現抑制によって、軟骨再生が惹起されるかを検討する。本研究によって、全く新しい関節疾患治療の開発の道が開かれれば、患者のQOLの向上、手術的治療を要する患者数の減少、それによる医療コストの削減等、社会的にも極めて大きな利益がもたらされると期待できる。

#### E. 結論

関節軟骨での軟骨コラーゲンの発現は正と負の転写制御機構によりコントロールされているが、軟骨分化や再生にも関与している可能性があり、各種関節疾患における軟骨破壊の進行阻止や軟骨再生に応用できる可能性が考えられる。

#### F. 健康危険情報

本研究に関連して、健康管理上問題となるような事項はなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Jingushi S, Iwamoto Y. A device for removal of femoral distal cement plug during hip revision arthroplasty. A high-powered drill equipped with a centralizer. J. Arthroplasty, 15: 231-233, 2000

Miyanishi K, Noguchi Y, Yamamoto T, Irisa T, Suenaga E, Jingushi S, Sugioka Y, Iwamoto Y. Prediction of the outcome of transtrochanteric rotational osteotomy for osteonecrosis of the

femoral head. J. Bone. Joint Surg, 82(B): 512-516, 2000

Nagamine R, Iwamoto Y. Anatomic variations should be considered in total knee arthroplasty. J. Orthop. Sci, 5: 232-237, 2000

Zhao.H, Shuto T, Hirata G, Iwamoto Y. Aminobisphosphonate (YM175) inhibits bone destruction in rat adjuvant arthritis. J. Orthop. Sci, 5: 397-403, 2000

Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Iwamoto Y, Yamada Y. A zinc finger transcription factor,  $\alpha$ A-crystallin binding protein1, is a negative regulator of the chondrocyte-specific enhancer of the  $\alpha$ 1(II) collagen gene. Mol. Cell.Biol, 20: 4428-4435, 2000

Miyanishi K, Nagamine R, Murayama S, Miura H, Urabe K, Matsuda S, Hirata G, Iwamoto Y. Tibial tubercle malposition in patellar joint instability. Acta Orthop. Scand. 7: 286-291, 2000

Noguchi Y, Kubota H, Suenaga E, Iwamoto Y. Pemberton osteotomy and derotation varus osteotomy for the treatment of developmental dysplasia of the hip in older children. J. Jpn. Paed Orthop Ass, 9: 165-170, 2000

Miura H, Noguchi Y, Mitsuyasu H, Nagamine R, Urabe K, Matsuda S, Iwamoto Y. Clinical features of multiple epiphyseal dysplasia expressed in the knee. Clin. Orthop. Related Res. 380: 184-190, 2000

Fukushi J, Ono M, Morikawa W, Iwamoto Y, Kuwano M. The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. J. Immunol. 165: 2818-2823, 2000

Jingushi S, Lohmander.L.S, Shinmei.M., Hoerner.L, Lark.M.W, Sugioka Y, Iwamoto Y. Markers of joint tissue turnover in joint fluids from hips with osteonecrosis of the femoral head. J.Orthop. Res. 18: 728-733, 2000

Teramoto M, Nakamasu K, Noshiro M, Matsuda Y, Gotoh O, Shen M, Tsutsumi S, Kawamoto T, Iwamoto Y, Kato Y. Gene structure and chromosomal location for a human bHLH transcriptional factor DEC1/Stra13 Sharp-2/BHLHB2. J. Biochem, in press.

三浦裕正、高杉紳一郎、岩本幸英、廣田良夫. 変形性膝関節症の疫学. 骨関節靭帯, 13: 303-310, 2000

長嶺隆二、占部憲、三浦裕正、松田秀一、宮西圭太、平田剛、岩本幸英。人工膝関節置換術における膝蓋骨の正確な骨切りのための新しい手技。整形外科と災害外科、49 (1) : 59-61、2000

片山愛子、末永英慈、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、岩本幸英。変形性股関節症における単純X線Look-up像について。整形外科と災害外科、49 (3) : 924-929、2000

末永英慈、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、山本卓明、宮西圭太、岩本幸英。大腿骨頭回転骨切り術における栄養血管血流と術後肢位。整形外科と災害外科、49 (3) : 951-956、2000

中島康晴、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、末永英慈、岩本幸英。亜脱臼性股関節症の疼痛発症年齢と股関節”向心性”の相関。Hip Joint、26 : 166-169、2000

末永英慈、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、山本卓明、宮西圭太、岩本幸英。大腿骨頭壊死の股関節鏡所見。Hip Joint、26 : 354-358、2000

## 2. 学会発表

Tanaka K, Tsumaki N, Yamada Y, Iwamoto Y. A zinc-finger transcription factor, FPM315, negatively regulates expression of the  $\alpha 2$  type XI collagen gene. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, Urabe K, Sakai H, Iwamoto Y. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor 1 during rat fracture healing. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Urabe K, Jingushi S, Okazaki K, Ikenoue K, Sakai H, Iwamoto Y. Immature osteoblasts express the pro- $\alpha 2$  (XI) collagen gene during bone formation in vitro and in vivo. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Hirata G, Shuto T, Zhao H, Iwamoto Y. Expression of activin and activin receptors in synovial tissues in rheumatoid arthritis-role of activin in angiogenesis. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Zhao H, Shuto T, Hirata G, Iwamoto Y. Amino

bisphosphonate (YM175) suppresses joint inflammation and bone destruction in rat adjuvant arthritis. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Mawatari T, Miura H, Morooka T, Higaki H, Kawano T, Nakamura K, Takamura K, Murakami T, Iwamoto Y. Effect of intraarticular administration of phospholipid as a boundary lubricant for the treatment of osteoarthritis. 46th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, USA, 2-15, March, 2000

Jingushi S, Noguchi Y, Miura H, Iwamoto Y. Transtrochanteric valgus femoral osteotomy—an option for the treatment of advanced osteoarthritic hips especially in young patients. British orthopaedic association, Japanese orthopaedic association combined congress 2000, London, England, 3-6, October, 2000

Morooka T, Miura H, Takasugi S, Kawano T, Mawatari T, Iwamoto Y. Predictors of knee osteoarthritis: the relationship between knee osteoarthritis and spinal disorders. British orthopaedic association, Japanese orthopaedic association combined congress 2000, London, England, 3-6, October, 2000

Nakashima Y, Maloney W.J, Goodman S.B, Smith R.L, Iwamoto Y. Signaling pathways of wear debris-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 expression in human macrophages. British orthopaedic association, Japanese orthopaedic association combined congress 2000, London, England, 3-6, October, 2000

Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Matsunobu T, Saikimura R, Yamada Y, Iwamoto Y. Coordinate expression of zinc-finger transcription factors, FPM315 and CRYBP1, during cartilage differentiation. 47th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, February 25-28, 2001

Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Matsunobu T, Saikimura R, Yamada Y, Iwamoto Y. A Kruppel-Associated Box-zinc finger protein, FPM315, inhibits tissue specific expression of Col11A2 gene. 4th Combined

Meeting of the Orthopaedic Research Societies of the U.S.A., Canada, Europe and Japan, Rhodes, Greece, June 1-3, 2001

諸岡孝明、三浦裕正、長嶺隆二、占部憲、松田秀一、岩本幸英「変形性膝関節症と骨粗鬆症の相互関連性の検討」第1回日本膝関節学会学術集会、平成12年2月18~20日、東京

田仲和宏、松本嘉寛、中谷文彦、山田吉彦、岩本幸英「CRYBP1によるSOX9の機能制御」第13回日本軟骨代謝学会、平成12年3月3~4日、横浜

寺本全男、中舛和子、申 鳴、能城光秀、岩本幸英、加藤幸夫、松田洋一「bHLH型転写因子DEC1の遺伝子構造」第13回日本軟骨代謝学会、平成12年3月3~4日、横浜

末永英慈、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、山本卓明、宮西圭太、岩本幸英「大腿骨頭壊死の股関節鏡所見」第73回日本整形外科学会学術集会、平成12年4月6~9日、神戸

神宮司誠也、野口康男、首藤敏秀、中島康晴、岩本幸英「当科における人工股関節再置換術のタイミング」第73回日本整形外科学会学術集会、平成12年4月6~9日、神戸

野口康男、末永英慈、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、宮西圭太、岩本幸英「亜脱臼性股関節症に対する寛骨臼移動術による関節鏡所見の変化について」第73回日本整形外科学会学術集会、平成12年4月6~9日、神戸

中島康晴、野口康男、神宮司誠也、三浦裕正、窪田秀明、首藤敏秀、末永英慈、岩本幸英「亜脱臼性股関節症の疼痛発症年齢と股関節”向心性”の相関」第73回日本整形外科学会学術集会、平成12年4月6~9日、神戸

山本卓明、宮西圭太、野口康男、入佐隆彦、山下彰久、居石克夫、岩本幸英「ステロイド剤投与骨壊死実験モデルでの骨壊死の病因」第44回リウマチ学会総会、平成12年5月13~15日、横浜

中島康晴、WH.Maloney、SB.Goodman、RL.Smith、岩本幸英「人工関節周囲骨溶解(Osteolysis)の発生機序」第44回リウマチ学会総会、平成12年5月13~15日、横浜

趙洪普、首藤敏秀、平田剛、岩本幸英「ビスフォスフォネート(YM-175)による関節炎および骨関節破壊抑制-アジュバント関節炎の発症後投与による検討-」第44回リウマチ学会総会、平成12年5月13~15日、横浜

神宮司誠也、野口康男、首藤敏秀、中島康晴、岩本幸英「同種骨移植を併用した臼蓋側人工股関節

再置換術」第99回西日本整形災害外科学会、平成12年6月3~4日、北九州

中山功一、三浦裕正、長嶺隆二、占部憲、松田秀一、岩本幸英「高位脛骨骨切り術における矯正角維持に影響を及ぼす因子についての検討」第99回西日本整形災害外科学会、平成12年6月3~4日、北九州

馬渡太郎、三浦裕正、諸岡孝明、河野勤、日垣秀彦、岩本幸英「骨梁連結性途絶後のVitamin K2(menatetrenone)の効果」第18回日本骨代謝学会、平成12年7月19~22日、広島

中島康晴、野口康男、神宮司誠也、前田健、長嶺隆二、首藤敏秀、平田剛、岩本幸英「RA股に対する骨移植併用人工股関節の術後成績」第20回九州リウマチ学会、平成12年9月15~16日、福岡

松尾篤、首藤敏秀、趙洪普、平田剛、岩本幸英「ビスフォスフォネートによる関節炎の骨関節破壊制御」第20回九州リウマチ学会、平成12年9月15~16日、福岡

山本卓明、岩本幸英「特発性大腿骨頭壊死症における虚血エピソード(壊死再発の有無)」第15回日本整形外科学会基礎学術集会、平成12年9月28~29日、京都

松田秀一、田仲和宏、中敬彦、岩本幸英「悪性骨腫瘍切除後におけるパズール処理骨を用いた機能再建の術後成績」第19回日本骨関節軟部組織移植研究会、平成12年10月14日、加賀

神宮司誠也、野口康男、三浦裕正、首藤敏秀、中島康晴、岩本幸英「杉岡式大腿骨転子部外反骨切術の長期成績一特に若年者進行期及び末期変形性股関節症に対する術式として一」、第27回日本股関節学会第27回日本股関節学会、平成12年11月10~11日、名古屋

光安廣倫、野口康男、神宮司誠也、首藤敏秀、中島康晴、末永英慈、岩本幸英「骨系統疾患に起因する二次性股関節症の病態」第27回日本股関節学会、平成12年11月10~11日、名古屋

神宮司誠也、Lohmander LS、新名正由、Hoerner LA、Lark MW、杉岡洋一、岩本幸英「大腿骨頭壊死股関節液における軟骨病態マーカー」第27回日本股関節学会、平成12年11月10~11日、名古屋

首藤敏秀、野口康男、神宮司誠也、中島康晴、末永英慈、岩本幸英「亜脱臼性変形性股関節症に対する転子間彎曲内反骨切り術の長期成績」第27回日本股関節学会、平成12年11月10~11日、名古屋

中島康晴、野口康男、窪田秀明、神宮司誠也、首藤敏秀、末永英慈、岩本幸英「ペルテス病に対す



る大腿骨頭前方回転骨切り術の手術成績」第27回  
日本股関節学会、平成12年11月10～11日、名古屋

細川 哲、野口康男、末永英慈、中島康晴、首藤敏  
秀、神宮司誠也、岩本幸英「大腿骨頭回転骨切り  
術の長期成績」第27回 日本股関節学会、平成12  
年11月10～11日、名古屋

河野勤、三浦裕正、諸岡孝明、岩本幸英「軟骨下  
骨組織の動性値の変化が関節軟骨に及ぼす影響に  
ついての力学的検討」第27回 日本臨床バイオメカ  
ニクス学会、平成12年11月16～17日、つくば

松田秀一、田仲和宏、中敬彦、岩本幸英「骨腫瘍  
切除後の再建：同種骨移植とパスツール処理骨移  
植」第27回 日本低温医学会総会、平成12年11月  
22～23日、東京

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

特になし。

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
分担研究報告書

自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立  
—SOX9の遺伝子導入による軟骨細胞分化に関する研究—

分担研究者 岩田 久 名古屋大学医学部整形外科教授

研究要旨

マウス完全長 SOX9 cDNA を、胎児腎皮質細胞(human embryonic kidney: HEK293)に遺伝子導入して SOX9 蛋白を過剰に発現させたところ、アルシアンブルー陽性の軟骨細胞様細胞に分化した。

A. 研究目的

変形性関節症を初めとする関節症では軟骨組織の欠損が問題となる。又関節症の進行に合わせて軟骨細胞の Apoptosis による減少が見られる。軟骨組織の移植により治療が現在行われつつあるがドナーとなる組織が乏しく大きな問題となっている。再生医学による問題解決が望まれている領域と考えられる。そこで、Tissue engineering の概念に基づく軟骨組織再生を臨床応用するには、採取が容易で欠損による機能障害を生じにくい組織(細胞)を、in vitro で軟骨細胞に分化させ移植することが望ましい。我々は、骨髄間葉系細胞および線維芽細胞をドナーとし、軟骨分化誘導能をもつ転写因子 SOX9 の遺伝子導入により軟骨細胞に分化させ、軟骨組織の再生を図ることを目的とした。

B. 研究方法

マウスの骨、軟骨より mRNA を抽出し、RT-PCR 法により完全長 SOX9 cDNA を精製する。それを骨髄間葉系細胞および線維芽細胞に遺伝子導入し、SOX9 蛋白を過剰に発現させ軟骨細胞へ分化させる。(軟骨細胞への分化は形態学的な変化、アルシアンブルー染色、II 型コラーゲン mRNA の発現などを指標として評価する。)次いで、経時的な Western blotting および Northern blotting により II 型コラーゲンやアグリカンの最も発現している時期を決定し、その時期の細胞を

支持体に封入後、ヌードマウスに移植し、in vivo での軟骨組織形成能を評価する。

C. 研究結果

RT-PCR 法により完全長マウス SOX9 cDNA を精製し、比較的導入が容易な HEK293 に遺伝子導入して SOX9 蛋白を過剰発現する細胞株を作製したところ、アルシアンブルー陽性の軟骨様細胞となった。次いで、完全長 SOX9 cDNA を発現ベクターに組み込み、骨髄間葉系細胞および線維芽細胞にリポフェクションした。蛍光マーカーを指標として SOX9 の導入効率を検討し、リポフェクションにおける至適条件を決定した。

D. 考察

これまでの培養系での軟骨分化に関する研究は、成長因子やホルモンなどの添加によるものが主体であったが、SOX9 は II 型コラーゲン遺伝子に直接結合して転写を調節しており、軟骨分化誘導能はより効率がよいと考えられる。HEK293 への SOX9 の遺伝子導入実験から、SOX9 蛋白の過剰発現は軟骨細胞への分化を強力に誘導するため、ドナー選択の幅が広がる可能性がある。遺伝子導入と再生医学の手法を結びつけることによりドナー確保が難しい軟骨組織の再構築へ一歩進んだと考えている。本法による軟骨細胞誘導は遺伝子の導入が生体外で行われるために安全性も高い。今後は効率よい遺伝子導

入法と組み合わせる事により十分に臨床応用可能と考えている。また本研究の実験手法は、CBFA1 など他の細胞分化に関与する転写因子にも利用可能であり、tissue engineeringにおいて応用範囲が広く発展性が高い。

#### E. 結論

SOX9 の遺伝子導入による SOX9 蛋白の過剰発現は、軟骨分化を誘導する。軟骨組織再生を目的とした軟骨細胞分化誘導に応用可能であると考えている。これによる再生工学を応用した軟骨組織再生の可能性を検討する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Naoki Ishiguro, Takayasu Ito, Kyosuke Miyazaki, Hisashi Iwata

Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis

J Rheumatol 26 : 34-40, 1999

(2) Naoki Ishiguro, Takayasu Ito, Hideo Ito, Hisashi Iwata, Hitenishi Jugessur, Mirela Ionescu, A. Robin Poole

Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover

Arthritis Rheum 42 : 129-136, 1999

(3) Naoki Ishiguro, Takuya Shimizu, Takayasu Ito, Toshiki Kojima, Yusuke Iwahori, Hisashi Iwata

The expression of matrix metalloproteinases and inhibitors in acute rupture of the anterior cruciate ligament

Mod Rheumatol 10 : 95-102, 2000

(4) Kazutoshi Kurokochi, Fukushi Kanbe, Toyone Kikumori, Tadahiro Sakai, Devanand Sarkar, Naoki Ishiguro, Hisashi Iwata, Hisao Seo

Effects of glucocorticoids on tumor necrosis factor  $\alpha$ -dependent activation of nuclear factor  $\kappa$ B and expression of the intercellular adhesion molecule 1 gene in osteoblast-like ROS17/2.8 cells

J Bone Miner Res 15 : 1707-1715, 2000

##### 2. 学会発表

(1) 第 72 回日本整形外科学会 横浜  
1999. 4. 8-4. 11

石黒直樹、伊藤隆安、小嶋俊久、酒井忠博、滝川正春、岩田久

関節軟骨組織および軟骨細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼと基質合成

(2) 第 14 回日本整形外科学会 基礎学術集会  
奈良 1999. 10. 7-10. 8

小林健二、石黒直樹、酒井忠博、黒河内和俊、神部福司、岩田久、妹尾久雄

模擬微小重力環境が骨芽細胞様細胞の NF- $\kappa$ B 活性化に及ぼす影響

自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立

主任研究者 糸満盛憲 北里大学医学部整形外科教授

研究要旨： 家兔間葉系幹細胞を三次元培養することで軟骨細胞へと分化させ、軟骨様組織を作成できることを明らかにした。

分担研究者 越智光夫

島根医科大学整形外科  
教授

間培養後、組織学的評価ならびに HPLC を用いたコンドロイチン硫酸異性体（C6S および C4S）の定量をおこなった。

A. 研究目的

種々の疾患による関節軟骨欠損に対して、いくつかの方法が報告されているが、いまだ確立したものは存在しない。近年、自家関節軟骨細胞をコラーゲンゲル内にて培養し、軟骨様組織を作製、これを軟骨欠損部へ移植する方法が行われ、良好な成績を得ている。しかし、採取可能な自家軟骨細胞には制限があるため、これに変わる細胞から軟骨再生が行うことができれば、今後、有効な方法となり得る。最近、骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)を TGF- $\beta$ 存在下で培養することで軟骨形成が生じることが明らかとなった。軟骨形成した MSCs が軟骨細胞の代用となれば、上記の問題を解決することが可能である。本研究はまず、間葉系幹細胞から軟骨形成させた MSCs が軟骨細胞の代用になるか否かについて検討した。

B. 実験方法

実験 1. 平均体重 1.2-1.5kg の日本白色家兔の脛骨骨髄から骨髄液を採取し、単層培養を行い、継代 3 代目の細胞  $2 \times 10^5$  個を遠沈し、一塊として高密度培養した。培養には ITS; Premix, ビルビン酸(1mM), アスコルビン酸(37.5 $\mu$ g/ml), dexamethasone ( $10^{-7}$ M), TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml)を加えた無血清培地を用い、3 週間培養した。これを組織学的評価にて軟骨形成の有無について確認した。さらに、RT-PCR にてアグリカン mRNA 発現について検討した。

実験 2. 実験 1 にて軟骨形成した細胞を再び単離し、アテロコラーゲンに包埋、4 週

C. 研究結果

実験 1：骨髄液 1.2ml から 3 週間には約  $5 \times 10^5$  個の幹細胞が採取できた。これを高密度培養した場合には組織学的はトルイジンブルー染色にて軟骨様組織の形成が確認できた。またアグリカン mRNA の発現も認め、MSCs から軟骨形成が可能であった。

実験 2：コラーゲンゲル包埋後も組織学的評価にてメタクロマジンを呈する軟骨様組織の形成を認めた。CS 量およびその異性体比は培養後徐々に増加した。

D. 考察

MSCs は 3 週間の高密度培養にて軟骨形成を生じ、さらに、コラーゲンゲル培養することで軟骨基質産生を維持できた。しかし、一部の細胞は線維芽細胞様であったため、軟骨形成を促進する処置が必要であると考えられた。

E. 結論

高密度培養にて軟骨形成させた MSCs はコラーゲンゲル培養において軟骨細胞の代用になる可能性を認めた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

古川誠治, 越智光夫ほか, 高密度浮遊培養を行った骨髄由来間葉系幹細胞によるアテロコラーゲンゲル培養. 日整会誌. 74(8), 1767, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし