

200/0472

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 糸満盛憲

平成14(2002)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.....	9
	・新しい移植担体と細胞源の検討に関する研究・	
	糸満盛憲	
2.	同種移植骨の殺菌と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.....	12
	馬淵清資	
3.	培養軟骨組織の臨床応用	15
	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.....	20
	石黒直樹	
5.	自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立.....	23
	越智光夫	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表.....	26
IV.	研究成果の刊行物・別刷（添付）	

I. 総括研究報告書

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教授

研究要旨 (1) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：本年度は工業用のマイクロ波加熱装置に変更することで、性質、形状の異なる骨全体の温度を均一にする事ができる処理条件をほぼ確立した。(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、軟骨細胞の三次元培養法が確立された。骨髄由来未分化間葉系細胞、臍帯血由来未分化間葉系細胞あるいはSOX9を遺伝子導入した骨髄細胞が軟骨欠損の修復に活用できることが示された。また細胞培養の鋳型として、生体分解性ポリマー、II型コラーゲンスポンジの有用性が検討された。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。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関
における職名

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
石黒直樹
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

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よ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

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、慢性関節リウマチ、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

(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。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る。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：(1)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、ポリグリコール酸、生体吸収性ポリマー、II型コラーゲンスポンジを用いる。移植細胞としては、動物（ラット、ウサギ）やヒトの軟骨細胞、骨髄由来未分

化間葉系細胞、臍帯血由来未分化間葉系細胞、遺伝子導入した細胞などを三次元培養する。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、免疫組織化学的方法などを用いる。また軟骨細胞あるいは軟骨細胞に分化しうる細胞を、成長因子、ホルモン、ヒアルロン酸などの生化学的因子や、静水圧、超音波などの物理学的因子を加えることで効率的に増殖、分化させ、またこれらの細胞の細胞外基質産生を促進させ、適切な担体の中で軟骨様組織を形成させる。次に生体における移植軟骨の有効性を検討する。動物の骨軟骨欠損モデルにこれらの軟骨様組織を移植し、移植組織の短期及び長期の力学的及び生化学的特性を評価する。評価には polymerase chain reaction (PCR) 法、ノーザンブロット法、免疫組織化学的方法など、各種の力学試験機を用いる。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、適切な自家細胞と適切な鋳型を用いた移植軟骨様組織による移植実験を行い、その有用性を検討する。

(II) CRYBP1 および FPM315 に対するポリクローナル抗体を用いて、初代培養軟骨細胞、骨髄由来未分化間葉系幹細胞、未分化間葉系細胞 ATDC5 での蛋白発現を調べる。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、免疫染色による CRYBP1 および FPM315 の発現パターンの解析を行う。また、アデノウイルスベクターに CRYBP1、FPM315 cDNA を組み込み、発現ベクターシステムを構築する。これらを軟骨細胞や各種細胞株に感染させ、導入効率と遺伝子発現を調べる。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物実験規則(各大学の動物実験指針)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(各大学医学部・病院の研究倫理基準)、提供者の自由意思による同意を

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:平成12年度は民生用電子レンジと電力調節器を組み合わせ、温度調節が可能なシステムを構築した。生理食塩水により加湿することで、海綿骨と皮質骨が別々であれば、温度を均一に近づけることができた。しかし、民生用電子レンジは低出力のコントロールに限界があるため、海綿骨と皮質骨の温度を同時に均一化する事はできなかった。平成13年度は既成の工業用のマイクロ波加熱装置に変更した。その結果、骨全体の温度を均一にする事ができる処理条件をほぼ確立した。また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シミュレーションしたところ骨が中心より温められていることを確認できた。

(2) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立:1)ヒト及び動物の軟骨細胞のアテロコラーゲンゲル内での三次元培養法を確立した。動物の軟骨細胞では、ヒアルロン酸や basic fibroblast growth factor (bFGF) などのサイトカインや超音波照射が移植組織の質的向上をもたらすことを確認した。また単層培養と三次元培養の適切な組み合わせ方法を確認した。2)ウサギの骨髄より未分化間葉系細胞を単離し、軟骨細胞への分化誘導を確認し、三次元培養にて軟骨組織作製のための適切な細胞密度を確認した。3)生体分解性ポリマー及びII型コラーゲンスポンジにて軟骨細胞を培養し、軟骨細胞の形質が維持されることを確認した。4)完全長 SOX9 cDNA を骨髄由来未分化間葉系細胞に遺伝子導入し、この細胞が分化し軟骨の細胞外基質を発現、産生することを確認した。5)臍帯血由来未分化間葉系細胞が単層培養にて軟骨細胞に分化しうることを確認した。6)CRYBP1, FPM315 は正常軟骨では発現せず、変性した軟骨にて強く発現することを確認した。7)アデノウイルスベクターを用い CRYBP1, FPM315 遺伝子を軟骨細胞で強制発現させると、ほとんどの細胞が形質を失い細胞死にいたることがわかった。

D. 考察

(1) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：本年度は工業用のマイクロ波加熱装置に変更することで、性質、形状の異なる骨全体の温度を均一にする事ができる処理条件をほぼ確立した。今後は温度制御可能なマイクロ波加温処理技術をさらに確立し、骨処理に最適な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。プロトタイプを使用し、ヒトの骨での評価を行う。また骨の温度分布の測定結果を基に、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、様々な大きさ・形状・性状の骨における処理条件を求める。本研究により、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。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。

(2) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：本年度までの研究により、軟骨細胞の形質を維持しうる三次元培養法が確立された。また三次元培養された移植材料の質を向上させる培養条件が明らかとなった。軟骨細胞以外では、骨髄由来未分化間葉系細胞、臍帯血由来未分化間葉系細胞、SOX9 を遺伝子導入した骨髄細胞が細胞移植に使用可能であることが確認された。三次元培養を行う鋳型としては、アテロコラーゲン以外に、生体分解性ポリマー、II型コラーゲンスポンジが使用可能であることが確認された。これらの細胞、鋳型、細胞条件を使用することで、関節軟骨をドナーとして使用することなく、骨軟骨欠損を修復する新しい方法が確立しうる可能性が示された。またCRYBP1、FMP315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：工業用のマイクロ波加熱装置に変更することで、性質、形状の異なる骨全体の温度を均一にする事ができる処理条件をほぼ確立した。

(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、軟骨細胞

の三次元培養法が確立された。骨髄由来未分化間葉系細胞、臍帯血由来未分化間葉系細胞あるいはSOX9を遺伝子導入した骨髄細胞が軟骨欠損の修復に活用を示した。細胞培養の鋳型としては、生体分解性ポリマー、II型コラーゲンスポンジの有用性を検討した。また転写因子CRYBP1とFMP315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を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahira N, Shindo M, Tanaka K, Nishimaki H, Ohwada T, Itoman M: Gluteal muscle necrosis following transcatheter angiographic embolisation for retroperitoneal haemorrhage associated with pelvic fracture. *Injury* (2001) 32 (27-32)
2. Yokoyama K, Itoman, Nakamura K, Tsukamoto T, Saita Y, Aoki S, .: Free vascularized fibular graft vs. Ilizarov method for post-traumatic tibial bone defect. *J Reconstr Microsurg.* (2001) 17(17-25)
3. Nakamura K, Yokoyama K, Nakamura K, Itoman M.: Changes in nitric oxide, superoxide, and blood circulation in muscles over time after warm ischaemic reperfusion in rabbit rectus femoris muscle. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* (2001) 35(13-17)
4. 占部憲、糸満盛憲：関節の再生医学 *Clinical Calcium* 12(2):22-28, 2002.
5. Yuko Mikuni-Takagaki, Kouji Naruse, Yoshiaki Azuma and Akimitsu Miyauchi, The Role of Calcium Channels in Osteocyte Function, *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* (2002) 2(255-258).
6. 小向 啓, 笹田 直, 大田未知, 馬瀧清資：In vivo パパイン投与で変性させた家兔膝関節の摩擦測定. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, 22: 65-68,

- 2001.10.1
7. 酒井利奈, 馬淵清資: 等価数理モデルに基づく人工股関節固定方針の再考察. 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 22: 415-420, 2001.10.1
 8. 酒井利奈, 品田尚孝, 糸満盛憲, 興津健吾, 馬淵清資: 等価数理モデルに基づく人工股関節固定法の理念の再考察. 日本人工関節学会誌, 31: 249-250, 2001.12.1
 9. 新栄俊尊, 湯山加奈子, 氏平政伸, 馬淵清資: 医療器具の加振による生体組織への押し込み力の低減. 医用電子と生体工学, 39(4):292-296, 2002.2.8.
 10. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue-engineering for the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg. Br.* (in press).
 11. Nakanishi T, Kawasaki K, Uchio Y, Kataoka H, Ochi M. AG-041R, a Cholecystokinin-B /Gastrin Receptor antagonist, stimulates the repair of osteochondral defect in rabbit model. *Eur J Pharmacol.* (in press).
 12. Tobita M, Ochi M, Uchio Y, Mori R, Iwasa J, Katsube K, Motomura T. Treatment of growth plate injury with autologous chondrocytes. *Acta Orthop Scand.* (in press).
 13. Yamamoto T, Katoh M, Fukushima R, Kurushima T, Ochi M. Effect of glycosaminoglycan production on hardness of cultured cartilage fabricated by the collagen-gel embedding methods. *Tissue Engineering.* (in press).
 14. Kuriwaka M, Ochi M, Uchio Y, Maniwa M, Adachi N, Mori R, Kawasaki K, Kataoka H. The optimum combination of monolayer and three-dimensional cultures for cartilage-like tissue by tissue engineering. *Tissue Engineering.* (in press).
 15. Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Kataoka H, Kawasaki K, Katsube K, Kuriwaka M. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen® gel *J Biomed Mat Res.* 59: 201-206, 2002.
 165. Maniwa S, Ochi M, Motomura T, Nishikori T, Chen J, Naora H. Effects of hyaluronic acid and basic fibroblast growth factor on motility of chondrocytes and synovial cells in culture. *Acta Orthop Scand* 72(3): 299-303, 2001.
 17. Ochi M, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artificial Organs.* 25(3):172-9, 2001.
 18. Ochi M, Kawasaki K, Kataoka H, Uchio Y, Nishi H. AG-041R, a gastrin/CCK-B antagonist, stimulates chondrocyte proliferation and metabolism in vitro. *Biochem Biophys Res Com.* 283(5):1118-23, 2001.
 19. Maniwa S, Nishikori T, Furukawa S, Kajitani K, Ochi M. Alteration of collagen network and negative charge of articular cartilage surface in the early stage of experimental osteoarthritis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 121(4):181-5, 2001.
 20. 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.* 129: 391-396, 2001.
 21. Kurata K, Uemura T, Nemoto A, Tateishi T, Murakami T, Miura H, Iwamoto Y. Mechanical strain effect on bone-resorbing activity and mRNA expressions of marker enzymes in isolated osteoclast culture. *J. Bone Miner. Res.*, 16: 722-730, 2001.
 22. Shida J, Jingushi S, Izumi T, Ikenoue

- T, Iwamoto Y. Basic fibroblast growth factor regulates expression of growth factors in rat epiphyseal chondrocytes. *J. Orthop. Res.*, 19: 259-264, 2001.
23. Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y, Takayanagi R. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 287: 337-342, 2001.
24. Miyanishi K, Yamamoto T, Nakashima Y, Shuto T, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. Subchondral changes in transient osteoporosis in the hip. *Skeletal Radiol.*, 30: 255-261, 2001.
25. Maeda T, Yamada H, Nagamine R, Shuto T, Nakasima Y, Hirata G, Iwamoto Y. Involvement of CD4+CD57+T cells in the disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumat.*, in press.
26. Yamashita A, Yonemitsu Y, Okano S, Nakagawa K, Nakashima Y, Irisa T, Iwamoto Y, Nagai Y, Hasegawa M, Sueishi K. Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Immunol.*, in press.
27. Urabe K, Jingushi S, Ikenoue T, Okazaki K, Sakai H, Li C, Iwamoto Y. Immature osteoblastic cells express the pro- $\alpha 2(XI)$ collagen gene during bone formation in vitro and in vivo. *J. Orthop. Res.*, 19: 1013-1020, 2001.
28. 河野勤、三浦裕正、馬渡太郎、諸岡孝明、岩本幸英. 軟骨下骨組織の物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. *日本臨床バイオメカニクス学会誌* 22 : 45-49, 2001.
29. 松田秀一、岩本幸英. 軟骨欠損修復の現況. *骨・関節・靭帯* 14: 797-800, 2001.
30. Naoki Ishiguro, Takayasu Ito, Takeshi Oguchi, Toshihisa Kojima, Hisashi Iwata. Mirela Ionescu and A. Robin Poole. Relationships of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors to Cartilage Proteoglycan and Collagen Turnover and Inflammation revealed by Analyses of Synovial fluids from Patients with Rheumatoid. *Arthritis Arthritis & Rheumatism* 44 : 2503-2511, 2001
31. Naoki Ishiguro, Hideki Takagi, Takayasu Ito, Takeshi Oguchi, Junki Takamatsu, Hisashi Iwata Rapidly Destructive arthropathy of the hip in hemophilia. *Haemophilia* 7 :127-130, 2001
32. Yukio Hirashima, Naoki Ishiguro, Seiji Kondo, Hisashi Iwata. Osteoclast induction from bone marrow cells is due to pro-inflammatory mediator from macrophages exposed to polyethylene particles. A possible mechanism of osteolysis in failed THA *Journal of Biomedical Material Research* 56 : 177-183, 2001
33. Sakai T, Kambe F, Mitsuyama H, Naoki Ishiguro, Kurokouchi K, Takigawa M, Iwata H, Seo H. TNF- α induces expression of genes for matrix degradation in human chondrocyte-like HCA-2/8 cells through activation of NF- κ B: Abrogation of the TNF- α effect by proteasome inhibitors. *Journal of Bone Mineral Research* 16 : 1272-1280, 2001
34. 石黒直樹. 背を伸ばす再生術、開発：自骨髓から骨芽細胞培養、移植. *読売新聞中部* 2002.1.16 掲載

2. 学会発表

- 成瀬 康治ら、低出力超音波パルスによる骨形成 - 分化段階と共に変化する骨髓細胞の応答、第19回日本骨代謝学会(名古屋)、平成13年8月8日
- 成瀬 康治ら、超音波パルスに対するラット骨髓細胞、骨芽細胞、骨細胞の

- 反応、第14回日本整形外科学会基礎学術集会(奈良)、平成13年10月18日
3. 成瀬 康治ら、超音波パルスに対するラット骨髄細胞、骨芽細胞、骨細胞の反応、第5回超音波骨折治療研究会(東京)、平成14年1月19日
 4. 向井田智之ら、II型コラーゲンスポンジ内における軟骨細胞培養の検討、第15回日本軟骨代謝学会(群馬)、平成13年3月8-9日
 5. 小林菜央、内山勝文、高畑英美、糸満盛憲、氏平政伸、馬淵清資：マイクロ波照射による同種移植骨加温処理法のための基礎的検討—ウシ大腿骨頭の加温特性—。第40回日本エム・イー学会大会、名古屋、2001.5.9-11.発表9,抄録p.237.
 6. 馬淵清資：関節と人工関節のトライボロジー。科研費基盤研究企画調査研究会摩擦の物理、大阪、2001.8.20-22.発表21.
 7. 大田未知、小向啓、笹田直、藤江裕道、馬淵清資：パブリン注入による軟骨変性の関節潤滑機能への影響。第16回生体・生理工学シンポジウム、相模原、2001.8.29-31.発表31,講演論文集p.357-360.
 8. Sakai R, Yamani A, Amai K, Mabuchi K: Chaos at the stress field at the fixation site of a joint prosthesis. (5) The 14th Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty (ISTA 2000), Maui, USA, 2001.9.26-29, presentation 9/27. Abstracts p.44.
 9. 馬淵清資：ロボットという便利な道具。ロボフェスタ神奈川2001,医療・福祉フォーラム,相模原,2001.10.13.
 10. 大田未知、小向啓、鈴木陽二、笹田直、藤江裕道、馬淵清資：摩擦測定による変性関節の潤滑機能に関する研究。トライボロジー会議2001秋宇都宮,2001.11.8,抄録p.389-390.
 11. 酒井利奈、山二綾子、馬淵清資：人工関節固定部の総接触面積と応力場のカオス生成の関係。トライボロジー会議2001秋宇都宮,2001.11.8,抄録p.403-404.
 12. 大田未知、馬淵清資、小向啓、鈴木陽二、藤江裕道：変形性関節症モデルにおける膝関節の摩擦特性。第28回臨床バイオメカニクス学会,大阪,2001.11.16-17.発表16,抄録p.108.
 13. 馬淵清資、酒井利奈、大田未知：セラミックス人工股関節摩擦面におけるスクイズ流体膜の形成。第28回臨床バイオメカニクス学会,大阪,2001.11.16-17.発表16,抄録p.61.
 14. 内山勝文、糸満盛憲、高畑英美、氏平政伸、馬淵清資：マイクロ波加温による海綿骨および骨皮質の内部温度均一化の検討。第28回臨床バイオメカニクス学会,大阪,2001.11.16-17.発表16,抄録p.125.
 15. 酒井利奈、馬淵清資、雨尾公暁：人工関節固定部の総接触面積と応力場のカオス生成の関係。第28回臨床バイオメカニクス学会,大阪,2001.11.16-17.発表17,抄録p.155.
 16. 大田未知、鈴木陽二、小向啓、藤江裕道、馬淵清資：変性動物関節の潤滑機能評価。第14回バイオエンジニアリング講演会,東京,2002.3.5-6.発表6,講演論文集No.02-04,p.77-78.
 17. 野川悟史、氏平政伸、名越貴子、馬淵清資、高密度人工組織の凍結保存において冷却速度が解凍後生存率に与える影響,日本機械学会第14回バイオエンジニアリング学術講演会(東京)2002.3.5, [講演論文集 No.02-04 p.39-40 2002.3].
 18. 岡庭功治、氏平政伸、和田隆顕、板谷靖子、馬淵清資、有効温度伝導率の測定による生体組織の凍結保存法の評価,日本機械学会2001年度年次大会(福井)2001.8.30, [講演論文集 No.01-1 Vol.VI p.109-110 2001.8].
 19. 野川悟史、木村圭多、氏平政伸、岡庭功治、馬淵清資、高密度人工組織の凍結保存後生存率に及ぼす冷却速度の影響,日本機械学会2001年度年次大会(福井)2001.8.30, [講演論文集 No.01-1 Vol.VI p.107-108 2001.8].
 20. 古川誠治、越智光夫 ほか。ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞のアテロコラーゲンゲル培養における細胞密度による影響。

- 日整会誌. 75(8), S931, 2001.
21. 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
 22. Miyanishi K, Tanaka K, Irisa T, Yamasita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. Histomorphometric changes of bone marrow fat cells in corticosteroid-treated rabbits with osteonecrosis. 47th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, February 25-28, 2001
 23. Mawatari T, Miura H, Moro-oka T, Kawano T, Higaki H, Kawamura H, Iwamoto Y. Effect of VITAMIN K2 after the trabecular connectivity was lost in ovariectomized rats. 47th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, February 25-28, 2001
 24. Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Sakimura R, Matsuda S, Iwamoto Y. VEGF stimulates chemotaxis of osteoclast precursor cells via FLT1-P13K-FAT pathway. 47th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, February 25-28, 2001
 25. Maeda T, Yamada H, Nagamine R, Shuto T, Nakashima Y, Hirata G, Iwamoto Y. Relabance of CD4+CD57+T cells to the activity of rheumatoid arthritis. 47th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, February 25-28, 2001
 26. 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
 27. Hirata G, Shuto T, Matsuo A, Zhao H, Iwamoto Y. Activin inhibits angiogenesis-possible involvement of activin in pathogenesis in rheumatoid arthritis. 4th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of the U.S.A., Canada, Europe and Japan, Rhodes, Greece, June 1-3, 2001
 28. 田仲和宏、松本嘉寛、中谷文彦、崎村陸、松延知哉、山田吉彦、岩本幸英. Zinc finger 型転写因子 CRYBP1 による II 型コラーゲン遺伝子エンハンサーの負の制御機構. 第 14 回日本軟骨代謝学会、2001 年 3 月 9-10 日、岐阜
 29. 松尾篤、首藤敏秀、平田剛、岩本幸英. ビスフォスフォネートの TNF- α 産生に及ぼす影響. 第 45 回リウマチ学会総会、2001 年 5 月 14-16 日、東京
 30. 平田剛、首藤敏秀、松尾篤、岩本幸英. 慢性関節リウマチにおける滑膜炎でのアクチビンの関与. 第 45 回リウマチ学会総会、2001 年 5 月 14-16 日、東京
 31. 田仲和宏、松本嘉寛、中谷文彦、崎村陸、松延知哉、山田吉彦、岩本幸英. 転写因子 CRYBP1 と FPM315 の軟骨分化における共発現. 第 33 日本結合組織学会、2001 年 6 月 7-9 日、東京
 32. 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および骨関節破壊制御：アジュバント関節炎ラット発症後投与による検討. 第 101 回 西日本整形災害外科学会、2001 年 6 月 30 日-7 月 1 日、久留米
 33. 平田剛、首藤敏秀、松尾篤、趙洪普、岩本幸英. 慢性関節リウマチ滑膜における血管新生制御因子アクチビンとそのレセプターの発現. 第 19 回日本骨代謝学会、2001 年 8 月 9-11 日、名古屋

34. 田仲和宏、松本嘉寛、中谷文彦、崎村陸、松延知哉、山田吉彦、岩本幸英. 軟骨分化における Zinc-finger 型転写因子 CRYBP1 と FPM315 の共同発現. 第 16 回日本整形外科学会基礎学術集会、2001 年 10 月 18-19 日、広島
35. 第 44 回日本リウマチ学会 横浜 2000.5.7-5.9 石黒直樹、伊藤隆安、高木英希、小口武、岩田久 慢性関節リウマチ患者での肺合併症スクリーニングとしての KL-6, SP-D 値の意義
36. 第 16 回日本整形外科学会 基礎学術集会 広島 2001.10.18-10.19 辻太一、近藤精司、石黒直樹、斉藤伸一郎、松山幸弘、岩田久 Prostaglandin E2 選択的 Agonist による椎間板由来細胞の Apoptosis

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
加温処理装置に関しては、すでに株式会社アイメディックより特許を出願している（特願 2000-210932/出願日平成 12 年 7 月 12 日）。
2. 実用新案登録
3. その他

II. 分担研究報告書

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
—新しい移植担体と細胞源の検討に関する研究—

主任研究者 糸満 盛憲 北里大学医学部整形外科教授

研究要旨 II 型コラーゲンスポンジを開発し、スポンジ内でマウス軟骨細胞培養を行い、軟骨細胞の形質が維持されることを示した。また、ラット胎児血に未分化間葉系細胞が含まれ、軟骨細胞様細胞への分化能を有することを示した。

A. 研究目的

変形性関節症、慢性関節リウマチ、外傷、骨軟骨腫瘍の切除などにより、四肢の関節に大きな骨軟骨欠損が生じる。これらの骨軟骨欠損に対し、骨軟骨移植によって修復する試みがなされてきたが、各治療方法には未だ多くの問題が残されている。関節軟骨より自家軟骨細胞を採取し、生体外で増殖させたのちに骨軟骨欠損部に補填する試みは 1994 年から報告が見られる。近年、軟骨細胞を採取する代わりに、未分化間葉系細胞を含む骨髓液を採取し、これらの未分化間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させ軟骨細胞移植に使用する方法が動物実験にて試みられている。この方法は、移植のために正常軟骨を採取する必要がないという利点がある。一方、これらの未分化間葉系幹細胞は骨髓だけでなく、末梢血や臍帯血にも存在することが知られている。1999 年 Alejandro らは、臍帯血より得られた未分化間葉系幹細胞が骨芽細胞と脂肪細胞に分化することを示した。このことより、臍帯血より得られる未分化間葉系細胞は軟骨細胞にも分化する可能性が考えられる。また、臍帯血より得られる造血幹細胞は、多分化能と自己複製能を併せ持つ細胞であり、移植することにより長期にわたる個体の造血を維持することが示されている。故に臍帯血より得られた未分化間葉系細胞も、体外で増幅・分化させ移植に使用することのできる細胞であると考えられる。また、自家軟骨細胞を生体外で増殖させたのちに骨軟骨欠損部に補填するための移植担体は、より生体組織に近い生化学特性を有するものが望ましい。本研究の目的は、I) 本来軟骨組織に存在する軟骨基質 (Type II collagen) で作成した担体の有用性の検討、II) 胎児血由来の未分化間葉系細胞の軟骨細胞分化能の

検討である。

B. 研究方法

I) ラット肋軟骨より軟骨細胞を採取し、a. I 型コラーゲンスポンジ内、b. II 型コラーゲンスポンジ内、c. I 型コラーゲンシート上、d. プラスチック培養皿上に播種し培養した。培養開始後 5、10 日で MTT assay による細胞増殖能を検討した。また、培養開始後 14 日の時点で total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて GAPDH を基準に Type I, II, X コラーゲンおよび MMP-2, 13 の mRNA 発現を観察した。培養開始後 3 週でサフラニン-O 染色にて組織学的検討を行った。さらに、培養で用いたスポンジの硬度を培養開始後 5 日、10 日、3 週、4 週で測定し比較した。II) 妊娠 18 日目のラット胎児より胎児血を採取し、リンパ球分離液を用いて有核細胞のみを遠心分離した。その後 10 % FCS を含む α -MEM 培地とともに培養皿に播種し、接着した細胞を継続培養した。培養後 2 週で細胞を継代し、 α -MEM 培地と脂肪細胞分化誘導培地 (methyl-isobutylxanthine, dexamethasone, insulin, indomethacin + insulin (MDI+I) 培地) で培養した。継続培養後 3 週で total RNA を抽出し RT-PCR 法にて ALP, PTHr, Osteocalcin (OCN), Type II collagen, Type X collagen, PPAR g2 の遺伝子発現を検討した。また、von Kossa 染色、Oil Red O 染色にて組織学的検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物実験規則 (北里大学の動物実験指針) 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北里大学病院内の倫理委員会の承認を得て (北里大学医学部・病院の研究倫理基準)、提供者の自由意思による同意を得て行う。

C. 研究結果

I) 細胞増殖能においてb群は、a. c. d. 群に比べて低下していた。mRNA 発現の結果では、Type I コラーゲン発現においてc群がa. b. 群に比して増加していた。組織学的検討では、a. b. 群ともにポア内に細胞を認め、細胞周囲にサフラニンに濃染する細胞外基質の産生を認めた。スポンジの硬度を比較したところ a. b. 群間に差はなかったが、3 週後で最も硬度は高く 4 週後で低下した。II) α -MEM 培地で培養した細胞の ALP, PTHr, OCN 遺伝子発現は頭蓋冠より採取した骨芽細胞とほぼ同等であった。また、Type II, Type X collagen の遺伝子発現は肋軟骨より採取した肋軟骨細胞とほぼ同等であった。一方、 α -MEM 培地で培養した細胞では PPAR g2 の遺伝子発現は認めなかったが、MDI+I 培地で培養した細胞では PPAR g2 の遺伝子発現を認めた。 α -MEM 培地で培養した細胞は von Kossa 染色陽性の結節を形成し、MDI+I 培地で培養した細胞は Oil Red O 染色陽性の脂肪滴を認めた。

D. 考察

I) b. 群での MTT assay の結果は、成熟軟骨細胞の形質を維持できたものと考えられた。また、mRNA 発現、組織学的検討で得られた結果は、II 型コラーゲンスポンジが、今後移植担体として使用し得る可能性を持っていることを示唆するものと考えられた。

II) α -MEM 培地で培養した場合、胎児血由来の細胞は、骨芽細胞様細胞と軟骨細胞様細胞に分化した。また、MDI+I 培地で培養した細胞は脂肪細胞様細胞に分化した。以上より胎児血由来の細胞は、多分化能を持つ未分化間葉系細胞を含んでおり、軟骨欠損の修復に用いることのできる細胞のひとつである、と考えられた。また本研究で得られた胎児血由来細胞は、心筋細胞、神経細胞など他の細胞への分化能を有する可能性があり、今後の tissue engineering において応用範囲が広く発展性が高い。

E. 結論

II 型コラーゲンスポンジは、今後軟骨細胞の移植担体として使用し得るものと考えられた。また、胎児血由来の細胞は、多分化能を持つ未分化間葉系細胞を含んでおり、軟骨細胞様細胞に分化することを示した。胎児血由来の細胞は、軟骨欠損の修復に用いることのできる細胞のひとつであることを示した。今後、臍帯血バンクの整

備が整えば早期に臨床応用が可能で、軟骨欠損を有する関節症に対する治療法となり得るものとする。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahira N, Shindo M, Tanaka K, Nishimaki H, Ohwada T, Itoman M: Gluteal muscle necrosis following transcatheter angiographic embolisation for retroperitoneal haemorrhage associated with pelvic fracture. *Injury* (2001) 32 (27-32)
2. Yokoyama K, Itoman, Nakamura K, Tsukamoto T, Saita Y, Aoki S,.: Free vascularized fibular graft vs. Ilizarov method for post-traumatic tibial bone defect. *J Reconstr Microsurg.* (2001) 17(17-25)
3. Nakamura K, Yokoyama K, Nakamura K, Itoman M.: Changes in nitric oxide, superoxide, and blood circulation in muscles over time after warm ischaemic reperfusion in rabbit rectus femoris muscle. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.*(2001) 35(13-17)
4. 占部憲、糸満盛憲: 関節の再生医学 *Clinical Calcium* 12(2):22-28, 2002.
5. Yuko Mikuni-Takagaki, Kouji Naruse, Yoshiaki Azuma and Akimitsu Miyauchi, The Role of Calcium Channels in Osteocyte Function, *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* (2002) 2(255-258).

2. 学会発表

1. 成瀬 康治ら、低出力超音波パルスによる骨形成 分化段階と共に変化する骨髄細胞の応答、第 19 回日本骨代謝学会 (名古屋)、平成 13 年 8 月 8 日
2. 成瀬 康治ら、超音波パルスに対するラット骨髄細胞、骨芽細胞、骨細胞の反応、第 14 回日本整形外科学会基礎学術集会 (奈良)、平成 13 年 10 月 18 日
3. 成瀬 康治ら、超音波パルスに対するラット骨髄細胞、骨芽細胞、骨細胞の反応、第 5 回超音波骨折治療研究会 (東京)、平成 14 年 1 月 19 日
4. 向井田智之ら、II 型コラーゲンスポンジ内における軟骨細胞培養の検討、第 15 回日本軟骨代謝学会 (群馬)、平成 13 年 3

月 8-9 日

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

同種移植骨の殺菌と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

分担研究者 馬淵清資 北里大学医療衛生学部教授

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、海面骨、皮質骨および両者を含む複雑な形状の骨であるウシ中足骨の内部温度の均一化が図れた。

A. 研究目的

現在、同種骨移植による感染性疾患の伝播を予防するために、移植骨の加温処理が行われている。移植骨の骨誘導能を温存しつつ細菌汚染、HIV、HCVなどのウイルス感染にも有効な加温条件は、60℃-10時間、80℃-10分間であるとされている。しかし、現在用いられている加温型処理装置では、大きさや形状の異なる骨の処理が不可能であり、更に骨全体が均一に加温されるまでに94分間かかることが問題となっている。

これまでの実験においてはマイクロ波による誘電加熱を利用して、様々な骨の加温時間の短縮と均一な加熱を図ってきた。ところが、海綿骨と皮質骨の両者を含む複雑な形状のウシ中足骨の均一な加熱をうまく行うことができなかった。

そこで、今年度は新たに既製の工業用マイクロ波加熱装置を用い、このウシ中足骨の温度の均一化を図ることを目的とする。

B. 研究方法

実験装置は、既製の工業用マイクロ波加熱装置（Micro Denshi MOH-1500E）、光ファイバー温度計（FISO UM18, 8channel）、パーソナルコンピュータ（IBM Think Pad A30）で構成した。光ファイバー温度計で検出したデータを温度記録専用ソフトウェア（FISO Commander）にて記録・解析を行った。

ウシから中足骨（全長約150mm、重量約300g）を採取し冷凍保存（-80℃）した。室温に解凍し、電動ドリルにて実験試料各部6ヶ所に穴を開け、温度計プローブを挿入し、容器に入れた。マイクロ波加熱装置にて加温し、各点の温度を計測した。出力は100Wより開始し、温度経過を見ながら一定になるように手動で制御した。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては、動物実験規則（北里大学の動物実験指針）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取り扱いに注意する。また、ヒトの組織を扱う場合には北里大学病院内の倫理委員会の承認を得て（北里大学医学部・病院の研究倫理基準）、提供者の自由意思による同意を得て行う。

C. 研究結果

中足骨の全ての測定点が約13分で80℃に達し、その後10分以上80~85℃を維持した。

D. 考察

これらの結果を得るための工夫を以下に述べる。

1) 民生用のマイクロ波加熱装置は出力を正確に出すことができず、電界密度も不均一であった。工業用マイクロ波加熱装置を使用することで低出力を正確に出すことができ、電界密度もより均一である。

2) 装置の底面部から熱が逃げやすく、しかも庫内の下方では電界密度にムラができ、試料の底部は温まりにくかった。そこで熱伝導率と誘電体損失係数の小さいテフロンブロックをスペーサーとして用い、高さを与えることでマイクロ波を均一にあてることができ、同時に容器の底面から熱が逃げるのを防ぐことが出来た。

3) 容器内に生理食塩水10mlを入れることで容器内に蒸気が発生し、骨表面の熱が保たれた。

4) 庫内に90℃の熱風を流すことにより、容器内の熱を維持することが出来た。

E. 結論

電界強度をより均一にし、容器内の蒸気による加湿と熱風による庫内の外部加熱とを併用することにより、誘電率の異なる海綿骨と皮質骨の両者を含む複雑な形状のウシ中足骨の均一な加熱を行うことができた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表 論文発表

- (1) 小向 啓, 笹田 直, 大田未知, 馬淵清資: In vivo パバイン投与で変性させた家兎膝関節の摩擦測定. 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 22: 65-68, 2001.10.1
- (2) 酒井利奈, 馬淵清資: 等価数理モデルに基づく人工股関節固定方針の再考察. 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 22: 415-420, 2001.10.1
- (3) 酒井利奈, 品田尚孝, 糸満盛憲, 興津健吾, 馬淵清資: 等価数理モデルに基づく人工股関節固定法の理念の再考察. 日本人工関節学会誌, 31: 249-250, 2001.12.1
- (4) 新栄俊尊, 湯山加奈子, 氏平政伸, 馬淵清資: 医療器具の加振による生体組織への押し込み力の低減. 医用電子と生体工学, 39(4):292-296, 2002.2.8.

学会発表

- (1) 小林菜央, 内山勝文, 高畑美美, 糸満盛憲, 氏平政伸, 馬淵清資: マイクロ波照射による同種移植骨加温処理法のための基礎的検討—ウシ大腿骨頭の加温特性—. 第40回日本エム・イー学会大会, 名古屋, 2001.5.9-11. 発表9, 抄録 p. 237.
- (2) 馬淵清資: 関節と人工関節のトライボロジー. 科研費基盤研究企画調査研究会摩擦の物理, 大阪, 2001.8.20-22. 発表21.
- (3) 大田未知, 小向啓, 笹田直, 藤江裕道, 馬淵清資: パバイン注入による軟骨変性の関節潤滑機能への影響. 第16回生体・生理工学シンポジウム, 相模原, 2001.8.29-31. 発表31, 講演論文集

p.357-360.

- (4) Sakai R, Yamani A, Amao K, Mabuchi K: Chaos at the stress field at the fixation site of a joint prosthesis. (5) The 14th Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty (ISTA 2000), Maui, USA, 2001.9.26-29, presentation 9/27. Abstracts p.44.
- (7) 馬淵清資: ロボットという便利な道具. ロボフェスタ神奈川 2001, 医療・福祉フォーラム, 相模原, 2001.10.13.
- (8) 大田未知, 小向啓, 鈴木陽二, 笹田直, 藤江裕道, 馬淵清資: 摩擦測定による変性関節の潤滑機能に関する研究. トライボロジー会議 2001 秋 宇都宮, 2001.11.8, 抄録 p.389-390.
- (9) 酒井利奈, 山二綾子, 馬淵清資: 人工関節固定部の総接触面積と応力場のカオス生成の関係. トライボロジー会議 2001 秋 宇都宮, 2001.11.8, 抄録 p.403-404.
- (10) 大田未知, 馬淵清資, 小向啓, 鈴木陽二, 藤江裕道: 変形性関節症モデルにおける膝関節の摩擦特性. 第28回臨床バイオメカニクス学会, 大阪, 2001.11.16-17 発表16, 抄録 p.108.
- (11) 馬淵清資, 酒井利奈, 大田未知: セラミックス人工股関節摩擦面におけるスクイズ流体膜の形成. 第28回臨床バイオメカニクス学会, 大阪, 2001.11.16-17 発表16, 抄録 p.61.
- (12) 内山勝文, 糸満盛憲, 高畑美美, 氏平政伸, 馬淵清資: マイクロ波加温による海綿骨および骨皮質の内部温度均一化の検討. 第28回臨床バイオメカニクス学会, 大阪, 2001.11.16-17 発表16, 抄録 p.125.
- (13) 酒井利奈, 馬淵清資, 雨尾公暁: 人工関節固定部の総接触面積と応力場のカオス生成の関係. 第28回臨床バイオメカニクス学会, 大阪, 2001.11.16-17 発表17, 抄録 p.155.
- (14) 大田未知, 鈴木陽二, 小向啓, 藤江裕道, 馬淵清資: 変性動物関節の潤滑機能評価. 第14回バイオエンジニアリング講演会, 東京, 2002.3.5-6 発表6, 講演論文集 No. 02-04, p.77-78.

- (14) 野川悟史, 氏平政伸, 名越貴子, 馬淵清資, 高密度人工組織の凍結保存において冷却速度が解凍後生存率に与える影響, 日本機械学会 第14回バイオエンジニアリング学術講演会(東京) 2002.3.5, [講演論文集 No. 02-04 p.39-40 2002.3].
- (15) 岡庭功治, 氏平政伸, 和田隆顕, 板谷靖子, 馬淵清資, 有効温度伝導率の測定による生体組織の凍結保存法の評価, 日本機械学会 2001年度年次大会(福井) 2001.8.30, [講演論文集 No. 01-1 Vol. VI p.109-110 2001.8].
- (16) 野川悟史, 木村圭多, 氏平政伸, 岡庭功治, 馬淵清資, 高密度人工組織の凍結保存後生存率に及ぼす冷却速度の影響, 日本機械学会 2001年度年次大会(福井) 2001.8.30, [講演論文集 No. 01-1 Vol. VI p.107-108 2001.8].

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

加温処理装置に関しては、すでに株式会社アイメディックより特許を出願している(特願 2000-210932/出願日平成12年7月12日)。

2. 実用新案登録

3. その他

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が低下しており、関節軟骨は機械的負荷に抗することができず変性摩耗していく。自家軟骨細胞や間葉系幹細胞を用いて軟骨欠損を修復するという試みがなされているが、軟骨細胞の分化誘導法、用いる scaffold の材質や周囲の組織との固着など、問題点が多い。軟骨形質を長期間安定的に維持できる培養の方法を検討し、周囲の組織との固着性の良い移植法を開発する目的で、日本白色家兎から単離・培養した関節軟骨初代培養細胞や未分化間葉系幹細胞を、生体分解性ポリマー上で培養する系を確立した。軟骨細胞は軟骨形質を維持したまま培養可能であり、さらに至適条件を検討中である。一方、軟骨コラーゲン遺伝子発現制御機構は未だ不明であるが、近年、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、軟骨以外の組織においては転写因子 CRYBP1 および FPM315 によって抑制されることが示された。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する目的で、まず関節軟骨での CRYBP1 および FPM315 の発現について検討した。正常関節軟骨では、これらの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。軟骨細胞に CRYBP1 および FPM315 を強制発現させると軟骨の性質を失うことも判明し、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が示唆された。

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。近年、自家軟骨細胞や間葉系幹細胞を用いて軟骨欠損を修復するとい

う試みがなされているが、軟骨細胞の分化誘導法、軟骨形質を長期間安定的に維持できる培養の方法、用いる scaffold の材質、周囲の組織との固着など、問題点が多い。また、一見再生したかに見える軟骨でも、細胞は十分な 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、やがて再変性に陥ってしまう。すなわち、OA や RA の軟骨細胞に Col2a1 や Col11a2 遺伝子発現を再び誘導する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。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、FPM315 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。

本研究においては、1) 日本白色家兎の自家軟骨細胞および間葉系幹細胞を分離し、各種の scaffold 内で培養して立体的な軟骨を形成させる系を確立し、2) この培養軟骨を軟骨欠損モデルの欠損部位に移植し、その軟骨の組織学的および力学的検討を行う。また、3) 軟骨細胞分化に関わる転写因子 (SOX9 や CRYBP1 および FPM315 という正と負の転写制御因子) の意義を明らかにし、4) これらの転写因子の導入および阻害により、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。

B. 研究方法

日本白色家兎の関節軟骨から軟骨細胞を単離し、単層およびコラーゲンゲル内で培養した。これらの培養系での Col2a1 の発現について検討した。また、培養上清中に TGF- β を投与した際の影響も検討した。また、日本白色家兎の骨髄内から未分化間葉系幹細胞の単離・培養を行い、骨、軟骨細胞などへの分化誘導を行った。次に、生体分解性のポリマー上でも軟骨細胞や未分化間葉系幹細胞を培養し、その増殖、分化に与える影響を調べた。

CRYBP1 および FPM315 に対するポリクローナル抗体を用いて、初代培養軟骨細胞、骨髄未分化間葉系幹細胞、未分化間葉系細胞

ATDC5 での蛋白発現を調べた。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、免疫染色による CRYBP1 および FPM315 の発現パターンの解析を行った。また、アデノウイルスベクターに CRYBP1、FPM315 cDNA を組み込み、発現ベクターシステムを構築した。これらを軟骨細胞や各種細胞株に感染させ、導入効率と遺伝子発現を調べた。

(倫理面への配慮)

九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査を受け、「九州大学医学部における動物実験に関する指針」、「動物の保護及び補完に関する法律」(法律第 105 号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(総理府告示第 6 号)の規制に基づき行っている。特に動物に苦痛のないように麻酔、鎮痛に配慮している。また、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。

C. 研究結果

日本白色家兎の関節軟骨から単離・培養した軟骨細胞は、コラーゲンゲル内での Col2a1 を発現し、軟骨の形質を維持していた。また、日本白色家兎の骨髄内から単離・培養した未分化間葉系幹細胞は、BMP の添加によって骨芽細胞へ、TGF- β の添加によって軟骨細胞へと分化誘導できることを確認した。コラーゲンゲル内においても、未分化間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化を確認した。また、生体分解性ポリマー上でも、軟骨細胞は軟骨の性質を維持したまま培養可能であり、さらに未分化間葉系幹細胞のポリマー上での培養条件を検討中である。

一方、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すものであった。また、関節軟骨における免疫染色の結果、CRYBP1 および FPM315 の発現は、正常部分の関節軟骨ではみられず、変性に陥り、軟骨コラーゲンの発現が低下した部分では強く認められた。CRYBP1 および FPM315 アデ