

厚生労働科学研究費補助金（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

A. 研究目的

現在、わが国では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、従来用いられている温水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ることが問題となっており、更に、骨全体が80℃・10分以上、均一に加温されるまでに94分間かかる。

昨年度は、既製の工業用マイクロ波加熱装置を用い、様々な工夫を行い、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加温が可能となった。

そこで、今年度は工業用マイクロ波加温装置を利用して、装置の実用化に向け、(1) マイクロ波加温処理したウシ皮質骨の力学的強度につき検討し、(2) マイクロ波加温による80℃・10分間の加温処理の殺菌効果につき検討した。

B. 研究方法

(1) ウシ大腿骨の骨幹部中央より約80mmの皮質骨を中央より2等分し、未処理群、処理群とした。加温処理には工業用マイクロ波発生装置

(Micro Denshi MOH-1500E)を用い、光ファイバー温度計(FISO OSR System)を使用し、骨の内部温度が80℃・10分間維持されたことを確認した。静的荷重試験は精密万能試験機(INSTRON 4467)を、硬度試験はビッカース微小硬さ試験機(Akashi MVK-H0)を用いた。

(2) 表皮ブドウ球菌、MRSA・Mu50、腸球菌γ型、黄色ブドウ球菌、大腸菌を培養し、生理食塩水(100ml)に懸濁した。試薬ビンに、サンプリングチューブ6本、温度センサ、攪拌用チューブを挿入し、サンプリングチューブの一方は外に出し、シリンジを装着し懸濁液を経時的に採取した。装置内を熱風により80℃に加温しておき、懸濁液温度を80℃まで加温後、出力を手動制御にて80℃に保持した。実験開始時、懸濁液の温度が40℃、

50℃、60℃、80℃、80℃・10分(加温過程)、加温処理後24時間、48時間にサンプリングし、希釈、培養、コロニー数をカウントした。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、実験動物規則(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に取り扱いに注意した。

C. 研究結果

(1) 圧縮強度・最大歪・ヤング率は、未処理群と統計学的有意差を認めなかった。ビッカース硬さはマイクロ波処理群で4.1%低下した。

(2) 全ての菌において、60℃で急激に生菌数が減少し、80℃に達した時点で菌は認められなかった。80℃・10分処理、加温処理後24時間、48時間にも菌が増殖することはなかった。

D. 考察

(1) 加温温度による骨の力学的影響について、従来の研究における家兔を用いた実験で、強度は60℃、80℃、100℃・30分間の加温および120℃・10分間の加温では低下せず、硬度は80℃以上・30分間の加温で約10%低下したと報告されている。これは今回のビッカース硬さでマイクロ波処理群が4.1%低下した結果とほぼ同様であり、マイクロ波による80℃・10分間の加温が力学的強度に与える影響は少ないと考えられる。

(2) マイクロ波加温による殺菌効果は、従来の外部加熱と同様の結果であり、加熱による蛋白質の変性(分子立体構造の不可逆的破壊)が主な作用であると考えられる。

E. 結論

80℃・10分間のマイクロ波加温が骨の力学的強度に与える影響は少ないことがわかった。そして、80℃・10分間のマイクロ波による加温処理条件により、移植骨の殺菌処理が可能であることを確認した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) 内山勝文, 糸満盛憲, 氏平政伸, 馬淵清資: マイクロ波加温による海綿骨および皮質骨の内部温度均一化の検討. 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 23:81-86, 2002.11.1.
- 2) 酒井利奈, 馬淵清資, 雨尾公暁, 糸満盛憲: 人工股関節固定部の総接触面積と応力場のカオス生成の関係. 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 23:179-184, 2002.11.1.
- 3) 馬淵清資, 森田真史, 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. 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 23:323-328, 2002.11.1.
- 4) Mabuchi K, Ujihira M, Sakai R, Ota M: Squeeze-film formation between bearing surfaces of ceramic-on-ceramic total hip prostheses. Proceedings of International Congress on Biological and Medical Engineering, CD-ROM, 2002.12.4.
- 5) Amao K, Sakai R, Yoshino H, Mabuchi K, Mishina H: Optical stress distribution of the fixation area of a joint prosthesis. Proceedings of International Congress on Biological and Medical Engineering, CD-ROM, 2002.12.4.
- 6) Sakai R, Mabuchi K: Identification of the factors on stress fluctuation around the fixation site of femoral stem. International Congress on Biological and Medical Engineering, Singapore, 2002.12.4-7, (12.6) Abstract p. 94.
- 7) Mabuchi K, Ujihira M, Sakai R, Ota M: Squeeze-film formation between bearing surfaces of ceramic-on-ceramic total hip prostheses. International Congress on Biological and Medical Engineering, Singapore, 2002.12.4-7, (12.6) Abstract p. 94.
- 8) Amao K, Sakai R, Yoshino H, Mabuchi K, Mishina H: Optical stress distribution of the fixation area of a joint prosthesis. International Congress on Biological and Medical Engineering, Singapore, 2002.12.4-7, (12.6) Abstract p. 95.5.1
- 9) 内山勝文, 氏平政伸, 高平尚伸, 峰原宏昌, 小宮宏一郎, 馬淵清資, 仙田和章, 姜慶愛, 糸満盛憲. マイクロ波による同種移植骨加温処理法の開発 - 移植骨の加温処理条件 -. マイクロ波効果・応用国際シンポジウム, 奈良, 2002. 11.21-23 講演要旨集 P60-61, 2002.
- 10) Katsufumi Uchiyama, Naonobu Takahira, Masanobu Ujihira, Kiyoshi Mabuchi, Hiroaki Minehara, Nao Kobayashi, Moritoshi Itoman, Development of Microwave Low-Heating Method for Bone Allografts: Investigation for Heating Condition of Various Bone Allografts during Microwave Heating, 9th International Conference on Tissue Banking Asia Pacific Association of Surgical Tissue Banks. Korea. 2002.9.28-29. Abstract p.107, 2002.
- 11) Ujihira M, Sukegawa Y, Nogawa S, Nagoshi T and Mabuchi K: Effect of Cell Density on Viability of Artificial Tissue after Cryopreservation, Fourth World Congress of Biomechanics, Canada, 2002.8.4-9 (8.5), Proceedings (Index, CD-ROM) p.31 2002.8.

口頭発表

- 1) 内山勝文, 長江祐吾, 西かおり, 氏平政伸, 馬淵清資, 仙田和章, 姜慶愛, 糸満盛憲: マイクロ波照射による皮質骨および海綿骨を含むウシ中足骨の内部温度均一化の検討, 日本機械学会 2002 年度年次大会, 東京, 2002.9.25-27, 講演論文集 No.02-4, p. 19-20, 2002.
- 2) 酒井利奈, 雨尾公暁, 糸満盛憲, 馬淵清資: 人工関節固定部応力場におけるカオス生成. 日本機械学会 2002 年度年次大会, 東京, 2002.9.25-27, 発表 27, 講演論文集 No.02-1, p.151-152.
- 3) 酒井利奈, 馬淵清資, 糸満盛憲, 高平尚伸, 雨尾公暁: 人工股関節ステム固定部の不規則応力振動を励起する因子の推定. 第 29 回日本臨床バイオメカニクス学会, 千葉, 2002.9.28-29, 発表 28, 抄録 p.69.
- 4) 尾公暁, 三科博司, 酒井利奈, 吉野 洋, 馬淵清資: 圧力分布の最適化を尺度とした人工股関節固定法の評価. 第 29 回日本臨床バイオメカニクス学会, 千葉, 2002.9.28-29, 発表 28, 抄録 p.71.

H. 知的所有権の出願・取得状況

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)。

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

主任研究者 岩本 幸英 九州大学医学部整形外科教授

研究要旨 感温性ゼラチン内で軟骨細胞を3次元培養し、軟骨欠損部へ移植することで、軟骨欠損部位を周囲組織との連続性を保った硝子軟骨様組織で修復することができた。

皮膚線維芽細胞に、間葉系幹細胞と同等の間葉系への分化能が存在することが示唆された。

A. 研究目的

[研究1]

関節軟骨再生の際、in situ でゲル化する液状の骨格基材 (scaffold) は複雑な形状を呈する軟骨欠損部を完全に補填することができる。この概念を基に我々は、室温では液体であり、34℃以上でゲル化するという特徴をもつ感温性ゼラチンである poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted gelatin (PNIPAAm-gelatin) を用い、軟骨欠損部の複雑な形状に適合することができる、新しい軟骨再生技術の開発を試みた。

[研究2]

間葉系幹細胞 (以下 MSC) は従来、骨髄中にのみ存在すると考えられていたが、近年、他の分化した組織にも存在する可能性が指摘されてきた。臨床応用を視野に入れた際、比較的侵襲で細胞を採取する方法を確立することが望ましい。われわれは皮膚線維芽細胞にも MSC と同等の分化能力があるのではないかと考え、ヒト正常皮膚由来の線維芽細胞株である NB1RGB を用いて、間葉系の主要な細胞である、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化誘導実験を行った。

B. 研究方法

[研究1]

(実験1: In vitro での PNIPAAm-gelatin を用いた軟骨様組織の再構築)

まず、PNIPAAm-gelatin を以下の手順で合成した。主鎖のゼラチン (分子量: 約 9.5×10^4) のリジン残基のアミノ基に感温性のポリマーである PNIPAAm ポリマー (分子量: 約 1.3×10^5) を UV を用いて重合した。この PNIPAAm ポリマーがゼラチン1分子当たり約 33.5個 (全アミノ基の約 91%) 導入された PNIPAAm-gelatin を実験に用いた。

10 週齢の日本白色家兔の関節軟骨より単

離した軟骨細胞を単層培養にて増殖させた後、この細胞を 5%PNIPAAm-gelatin-DMEM 溶液 (細胞密度: 1.5×10^7) と懸濁し、37℃でゲル化させた後、培養を行った。培養組織の評価を、細胞レベルでは細胞生存率 (相対的 DNA 量)、細胞形態 (共焦点レーザー走査型顕微鏡)、細胞周期 (フローサイトメーター)、細胞外マトリックス (タイプ II コラーゲン、硫酸化グリコサミノグリカン: s-GAG) の定性、また、組織レベルでは細胞外マトリックスの定量、荷重・除重に対する力学的特性の測定 (クリープメーター) にて行った。全ての計測は n=3 で行った。

(実験2: In vivo での PNIPAAm-gelatin を用いた関節軟骨修復)

体重約 4Kg の日本白色家兔の膝関節軟骨に直径 3.5mm の軟骨欠損を作製した。欠損部位に予め 2 週間培養した軟骨様組織を入れ、この組織と周囲組織 (周辺軟骨、軟骨下骨) の間に細胞-PNIPAAm-gelatin 懸濁液を入れゲル化した後、脛骨より採取した骨膜で被覆し、更にフィブリングルーシートで縫い目を密閉した。

これらの組織を術後 5 週目に採取し、関節の拘縮・滑膜炎の有無、関節表面の外観、組織の組織学的・免疫組織化学的評価を行なった。実験は n=9 で行った。

[研究2]

ヒト正常皮膚由来の線維芽細胞株である NB1RGB を用いて実験を行った。コントロールとして、Poietics 社の正常ヒト骨髄細胞由来 MSC (以下 pMSC) を同様の培養条件で誘導し、さらに、それぞれの群で、通常の 10% ウシ血清添加 DMEM で培養し非誘導群とした。

(1) 脂肪細胞誘導: NB1RGB が単層培養で 100% コンフルエントになった状態で、デキサメサゾン、インドメタシン、インシュリンを主成分とする脂肪分化培地にて培養液を置換し、

週に 2 回程度の培地交換を行った。組織学的評価にはオイルレッド染色を行った。

(2) 骨芽細胞誘導: NB1RGB が単層培養で 100% コンフルエントになった状態で、デキサメサゾン、グリセロフォスファイトを主成分とする骨芽細胞分化培地にて培養液を置換し、週に 2 回程度の培地交換を行った。組織学的評価には Von Kossa 染色を行った。

(3) 軟骨細胞誘導: NB1RGB のペレット培養を行い、デキサメサゾン、TGF- β を中心とする軟骨誘導培地にて培養を行った。評価には、RT-PCR による 2 型コラーゲン、アグリカンの mRNA の発現、サフラニン O 染色、トルイジンブルー染色の組織学的評価、および、抗 2 型コラーゲン抗体による免疫染色を行った。

C. 研究結果

[研究 1]

(実験 1: In vitro での PNIPAAm-gelatin を用いた軟骨様組織の再構築)

生細胞数は培養期間 3 週間の間、ほぼ一定であり増殖も死滅もしなかった。細胞形態は球状の細胞形態が経時的に増え、培養 3 週間目には殆どの細胞が球形であった。細胞周期は G0/G1 期にある細胞の全細胞数に対する割合が 3 次元培養 (ゲル内) においては単層培養時に比較し有意に多かった。また、分化型軟骨細胞の特異的マーカーであるタイプ II コラーゲンと s-GAG を共に認めた。以上の事実は、単層培養にて一旦脱分化傾向にあった細胞は再分化したことを示唆している。

培養組織内の細胞外マトリックス (タイプ II コラーゲン、s-GAG) 量は共に経時的に増加し、タイプ II コラーゲンは培養 12 週目に正常軟骨の約 1/5、s-GAG の量は正常軟骨とほぼ同等量に達した。また、培養組織の力学的特性は培養 8 週目までは正常軟骨に近づく傾向にあったが、その後はあまり変化がなかった。

(実験 2: In vivo での PNIPAAm-gelatin を用いた関節軟骨修復)

術後 5 週目の時点で全ての膝関節において拘縮、関節炎は認めなかった。また、外観にて関節面は周囲組織との連続性を保ち、陥凹変形も殆ど認めなかったが、やや不整な表面を呈した。組織標本の HE 染色において移植組織内に炎症細胞の浸潤を認めず、周囲にも壊死、被包化などの強い炎症反応は認めなかった。サフラニン O 染色による s-GAG の存在と免疫染色によるタイプ II コラーゲンの存在も確

認できたが、その分布濃度は正常軟骨には及ばなかった。

[研究 2]

(1) 脂肪細胞誘導: NB1RGB、pMSC とともに、2 週間の誘導で、偏光顕微鏡下で脂肪滴と思われる細胞内器官を認めた。さらに、オイルレッド染色にて、脂肪滴と思われる部位が赤染された。

(2) 骨芽細胞誘導: NB1RGB、pMSC とともに、細胞形態は紡錘状から、立方状に徐々に変化した。2 週間の培養後、Von Kossa 染色を行ったところ、カルシウムの沈着を認めた。

(3) 軟骨細胞誘導: NB1RGB、pMSC とともに、誘導開始翌日より、ペレットを形成した。2 週間後の組織学的評価でも軟骨への分化が認められ、RT-PCR でもタイプ II コラーゲンの発現を認めた。

D. 考察

[研究 1]

(実験 1: In vitro での PNIPAAm-gelatin を用いた軟骨様組織の再構築)

PNIPAAm-gelatin ゲル内で細胞が生存でき、一旦脱分化した軟骨細胞が再分化できることが確認できた。培養組織は生化学的には軟骨組織様であったが、力学的特性が正常軟骨に及ばなかった。その原因として、静置培養された組織においては、組織内の分泌された細胞外マトリックス分子の量、凝集状態、配向などが荷重に耐えうる物理的構造を構築できなかったためと推測された。

(実験 2: In vivo での PNIPAAm-gelatin を用いた関節軟骨修復)

術後 5 週の時点では、材料に対する拒絶反応は巨視的にも組織学的にも認めなかったもので、PNIPAAm-gelatin は生体適合性を持つと考えられた。また、関節軟骨は硝子軟骨として再生され関節面としての機能を果たしていると考えられた。

[研究 2]

本研究の結果、皮膚線維芽細胞にも MSC と同等の間葉系への分化転換能力が存在することが示唆された。皮膚線維芽細胞は局所麻酔で比較的容易に採取可能であり、間葉系組織へ分化可能な細胞として臨床応用できる可能性が示唆された。

E. 結論

[研究 1]

PNIPAAm-gelatin ゲルを用いた軟骨細胞の 3

次元培養によって軟骨様組織が再構築できた。また、*in vivo* で軟骨欠損部位を周囲組織との連続性を保った硝子軟骨様組織で修復することが可能であった。

[研究 2]

皮膚線維芽細胞にも、MSC と同等の間葉系細胞への再分化能が存在することが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

Ibusuki S, Iwamoto Y, et al. Tissue-engineered cartilage using an injectable and *in situ* gelable thermoresponsive gelatin: Fabrication and *in vitro* performances. Tissue Engineering, *in press*

Ibusuki S, Iwamoto Y, et al. System engineered cartilage using PNIPAAm-gelatin as *in situ* formable scaffold: *In vivo* performance. Tissue Engineering, *in press*

Matsuda S, Iwamoto Y, et al. Tibial shaft axis does not always serve as a correct coronal landmark in total knee arthroplasty for varus knees. J. Arthroplasty, *in press*

Matsuda S, Iwamoto Y, et al. A comparison of rotational landmarks in the distal femur and the tibial shaft. Clin. Orthop. Related Res., *in press*

Ide Y, Iwamoto Y, et al. Characterization of the genomic structure and expression of the mouse Apex2 gene. Genomics, *in press*

Tanaka K, Iwamoto Y, et al. A Kruppel-Associated Box-Zinc finger protein, NT2, represses cell Type-Specific promoter activity of the α (XI) collagen gene. Mol. Cell. Biol., 22(12): 4256-4267, 2002

Yamashita A, Iwamoto Y, et al. Fibroblast growth factor-2 determines severity of

joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats.

J. Immunol., 168: 450-458, 2002

Maeda T, Iwamoto Y, et al. Involvement of CD4+CD57+T cells in the disease activity of rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism, 46(2): 379-384, 2002

Matsumoto Y, Iwamoto Y, et al. Possible involvement of the vascular endothelial growth factor-Flt-1-Focal adhesion kinase pathway in chemotaxis and the cell proliferation of osteoclast precursor cells in arthritic joints. J. Immunology, 168: 5824-5831, 2002

Kawano T, Iwamoto Y, et al. Factors affecting patellar tracking after total knee arthroplasty. J. Arthroplasty, 17(7): 942-947, 2002

Jingushi S, Iwamoto Y, et al. Intramuscular bone induction by human recombinant bone morphogenetic protein-2 with beta-tricalcium phosphate as a carrier: *in vivo* bone banking for muscle-pedicle autograft. J. Orthop. Sci., 7: 490-494, 2002

Miyagi T, Iwamoto Y, et al. Changes in patellar tracking after total knee arthroplasty : 10-year follow-up Miller-Galante I knees. Orthopedics, 25(8): 811-813, 2002

Miura H, Iwamoto Y, et al. Prediction of total knee arthroplasty polyethylene wear using the wear index. J. Arthroplasty, 17(6): 760-766, 2002

Kurata K, Iwamoto Y, et al. Influences of newly formed woven bone on tissue stresses in rat dorsal vertebrae subjected to mechanical loading. JSME Int. J., 45(2): 558-566, 2002

Moro-oka T, Iwamoto Y, et al. Patellar tracking and patellofemoral geometry in deep knee flexion. Clin. Orthop. Related Res., 394 : 161-168, 2002

Jingushi S, Iwamoto Y, et al. Transtrochanteric valgus osteotomy for the treatment of osteoarthritis of the hip secondary to acetabular dysplasia. J. Bone Joint Surg. (B), 84(4): 535-539, 2002

Miyaniishi K, Iwamoto Y, et al. Bone marrow fat-cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. Bone, 30: 185-190, 2002

Sakai H, Iwamoto Y, et al. Fibroblasts from the inner granulation tissue of the pseudocapsule in hips at revision arthroplasty induce osteoclast differentiation, as do stromal cells. Ann. Rheum. Dis., 61: 103-109, 2002

国際学会発表

Matsumoto Y, Iwamoto Y, et al. Possible involvement of VEGF-FLT-1-FAK Pathway in the Arthritic Joint Destruction. The 48th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Dallas, Texas, Feb. 10-13, 2002

Matsuo A, Iwamoto Y, et al. The bone and joint protective and anti-inflammatory effects of newly developed third-generation bisphosphonate in experimental arthritis. The 48th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Dallas, Texas, Feb. 10-13, 2002

Kawano T, Iwamoto Y, et al. Effect of hyaluronic acid gel sheet as a bioresorbable barrier on adhesion prevention. The 48th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Dallas, Texas, Feb. 10-13, 2002

Nabeyama R, Iwamoto Y, et al. The Accuracy of computed tomography-based image-guided knee replacement. The 2nd Annual Meeting of the International Society for Computer Assisted Orthopaedic Surgery, Santa Fe, New Mexico, USA, June 19-22, 2002

Yamamoto T, Iwamoto Y, et al. Clinicopathologic characteristics of subchondral insufficiency fracture of the femoral head resulting in rapid destruction of the hip joint. The 49th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, New Orleans, LA, Feb. 2-5, 2003

国内学会発表

松本嘉寛、田仲和宏、花田麻須大、首藤敏秀、平田剛、神宮司誠也、岩本幸英
発症機序の解析に基づいた関節疾患の抑制法の開発 (第1報) 炎症性骨破壊における VEGF による破骨細胞前駆細胞の動員
第1回 Biomatrix Forum、平成14年1月26日(東京)

田仲和宏、松本嘉寛、中谷文彦、崎村陸、松延知哉、花田麻須大、李旭、山田吉彦、岩本幸英
KRAB ドメインを介する FPM315 による XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子の発現抑制
第15回日本軟骨代謝学会、平成14年3月8日-9日(前橋)

指宿真一、藤井康雄、岩本幸英、松田武久
感温性ゼラチンを用いる軟骨の Tissue Engineering
第15回日本軟骨代謝学会、平成14年3月8日-9日(前橋)

高尾恒彰、岩城徹、前田健、齋藤太一、神宮司誠也、岩本幸英、白澤建蔵
ヒト椎間板および椎間板変性における chondromodulin-I の免疫組織化学的検討
第15回日本軟骨代謝学会、平成14年3月8日-9日(前橋)

原田洋、首藤敏秀、前田健、中島康晴、馬渡太郎、平田剛、松尾篤、岩本幸英
破骨細胞における ICAM-1、LFA-1 の発現とその機能
第46回日本リウマチ学会総会、平成14年4月22日-25日(神戸)

山下彰久、米満吉和、中島豊、岩本幸英、長谷川護、居石克夫
血管新生因子 FGF-2 はアジュバント関節炎における関節腫脹、滑膜増生、骨破壊の増悪因子である
第46回日本リウマチ学会総会、平成14年4月22日-25日(神戸)

松尾篤、首藤敏秀、平田剛、陳維嘉、岩本幸英
アミノビスフォスフォネートの抗炎症効果- Dexamethasone との比較検討-
第46回日本リウマチ学会総会、平成14年4月

22日～25日(神戸)

平田剛、首藤敏秀、安田幸一郎、松尾篤、中島康晴、馬渡太郎、前田健、岩本幸英
滑膜細胞培養系における pit formation の程度と手術前後の骨関節破壊の進行に関する検討
第46回日本リウマチ学会総会、平成14年4月22日～25日(神戸)

松本嘉寛、田仲和宏、平田剛、花田麻須大、中谷文彦、松延知哉、崎村陸、李旭、首藤敏秀、松田秀一、岩本幸英
炎症性骨破壊における VEGF-Flt-1-FAK 経路の関与
第2回西日本骨・関節関連疾患懇話会、平成14年7月20日(福岡)

神宮司誠也、占部憲、岡崎賢、平田剛、坂井宏旭、池ノ上貴、陳維嘉、岩本幸英
B-TCP をキャリアーとした BMP-2 による筋組織内異所性骨化を用いた血行を伴って移動可能な移植用自家骨組織誘導の試み
第2回西日本骨・関節関連疾患懇話会、平成14年7月20日(福岡)

馬渡太郎、三浦裕正、河野勤、首藤敏秀、日垣秀彦、岩本幸英
慢性関節リウマチ患者における骨質評価 一高分解能 CT を用いた in vivo ヒト骨微細構造解析一
第20回日本骨代謝学会、平成14年7月25日～27日(岡山)

陳維嘉、神宮司誠也、平田剛、松本嘉寛、加藤浩、岩本幸英
Bisphosphonate による BMP-2 誘導骨組織維持の試み
第20回日本骨代謝学会、平成14年7月25日～27日(岡山)

河野勤、三浦裕正、馬渡太郎、諸岡孝明、塚本伸章、岩本幸英、日垣秀彦、中西義孝
ヒアルロン酸ゲルシートの間接癒着に対する防止効果の検討一第二報一
第29回日本臨床バイオメカニクス学会、平成14年9月28日～29日(幕張)

石川格、村上輝夫、澤江義則、三浦裕正、河野勤、岩本幸英
変形性膝関節症における関節軟骨表面性状変化の AFM による評価
第29回日本臨床バイオメカニクス学会、平成14年9月28日～29日(幕張)

松本嘉寛、田仲和宏、平田剛、花田麻須大、中谷文彦、松延知哉、崎村陸、李旭、松田秀一、首藤敏秀、岩本幸英
炎症性骨破壊における VEGF-Flt-1-FAK 経路の関与

第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日(青森)

松尾篤、首藤敏秀、平田剛、松本嘉寛、陳維嘉、花田麻須大、本村悟朗、岩本幸英
ビスフォスフォネートの抗炎症作用 一ステロイドとの比較検討一
第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日(青森)

中島康晴、松尾篤、首藤敏秀、岩本幸英
ビスフォスフォネートによる Periprosthetic Osteolysis の抑制効果
第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日(青森)

馬渡太郎、三浦裕正、河野勤、諸岡孝明、日垣秀彦、松田秀一、岩本幸英
変形性膝関節症に対するリン脂質添加ヒアルロン酸の効果
第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日(青森)

中島康晴、神宮司誠也、首藤敏秀、山本卓明、野口康男、岩本幸英
ハイドロキシアパタイト (HA) コーティングの生体内での変化 一抜去インプラントを用いた検討一
第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日(青森)

陳維嘉、神宮司誠也、平田剛、松本嘉寛、加藤浩、岩本幸英
Bisphosphonate による BMP-2 誘導骨組織維持の試み
第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日(青森)

田仲和宏、松本嘉寛、中谷文彦、崎村陸、松延知哉、花田麻須大、李旭、山田吉彦、岩本幸英
II 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子エンハンサー結合因子の同定と解析
第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日(青森)

神宮司誠也、占部憲、岡崎賢、平田剛、坂井宏旭、池ノ上貴、岩本幸英
血行を伴って移動可能な移植用自家骨組織誘導の試み
第38回日本移植学会、平成14年10月17日～19日(東京)

陳維嘉、神宮司誠也、平田剛、松本嘉寛、岩本幸英
Bisphosphonate による BMP-2 誘導骨組織維持の

試み

第21回日本運動器移植・再生医学研究会、平成14年10月19日（東京）

河野勤、三浦裕正、高杉紳一郎、真鍋尚至、増本賢治、河野一郎、細川哲、岩本幸英

手指の変形性関節症と generalized osteoarthritis の関連についての疫学的検討

第104回西日本整形・災害外科学会、平成14年11月16日～17日（熊本市）

H. 知的財産権の出願・登録状況

国内特許出願中（名称：軟骨組織再生用補助材、軟骨組織再生用キット及び軟骨組織再生方法・発明者：松田武久、岩本幸英、指宿真一）

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 石黒 直樹 名古屋大学大学院医学研究科機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座整形外科学教授

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ることにより、アルシアンブルー陽性の軟骨細胞様細胞に分化した。SOX9 の軟骨分化誘導能を明らかとした。そこで SOX9 を骨髄間葉系細胞に導入し、in vitro で培養条件を検討し、高密度で培養することにより、アルシアンブルー陽性の軟骨細胞様細胞を得た。従来軟骨細胞分化には TGF β , BMP 等のサイトカインとデキサメサゾンが必要としたが、この方法では必要がないことを確認した。遺伝子導入された骨髄細胞を高密度下に diffusion chamber に封入し、ヌードマウスの背部皮下に移植したところ、4 週後にアルシアンブルー陽性の肉眼的に確認可能な軟骨塊が形成された。家兎の軟骨欠損モデルを作製し、in vitro で分化させた培養細胞の注入による軟骨再生を検討し、これら分化軟骨細胞は非常に高い軟骨組織修復能を持つことを明らかとした。

A. 研究目的

変形性関節症をはじめとする関節症では、軟骨組織の欠損が問題となる。現在では、軟骨組織の移植による治療が行われつつあるが、ドナー組織の量に限界がある。そこで再生医学による問題解決が望まれるが、Tissue engineering の概念に基づく軟骨組織再生を臨床的に応用するには、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、骨髄間葉系細胞をドナーと

し、軟骨分化誘導能をもつ転写因子 SOX9 をそれらに遺伝子導入して軟骨細胞に分化させ、軟骨組織を再生させることを目的とした。新たな軟骨欠損をつくることなく、自家組織により損傷された軟骨組織の修復を目的とした本研究は、外傷や加齢変性による損傷軟骨に対する画期的な治療法として期待される。

B. 研究方法

マウスの骨、軟骨より mRNA を抽出し、RT-PCR 法により完全長マウス SOX9 cDNA を

精製した。それを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 GFP を含む発現ベクターに組み込み、リポフェクション法により骨髄間葉系細胞に遺伝子導入した。蛍光マーカー (GFP) を指標として SOX9 遺伝子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。in vitro で遺伝子導入された骨髄間葉系細胞は、条件を設定して培養を行うことによりアルシアンブルー陽性の軟骨様細胞となり、これら細胞では、RT-PCR 法により II 型コラーゲン、アグリカンの発現を確認した。次いで、軟骨様細胞に分化した骨髄細胞を diffusion chamber に封入し、ヌードマウスの皮下に移植したところ、4 週後にアルシアンブルー陽性の軟骨塊を得た。これらの結果を元にウサギ膝関節に骨軟骨欠損を作成し、分化軟骨細胞を移植し、骨膜にて封入した。同様に分化誘導前の骨髄細胞及び細胞移植せず、骨膜のみで欠損部を被った 3 群を作成した。これを経時的に組織学的、免疫組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は名古屋大学動物実験施設内にて、動物実験実施規則に従い、審査を受けた上で行った。動物に対しては可能な限り愛護的に行った。

C. 研究結果

完全長 SOX9 cDNA を含む発現ベクターを、リポフェクション法により骨髄間葉系細胞に遺伝子導入した。蛍光マーカー (GFP) を指

標として SOX9 遺伝子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。至適条件で遺伝子導入された SOX9 タンパクを過剰に発現する骨髄細胞は、in vitro で高密度での培養を行うことにより、アルシアンブルー陽性の軟骨細胞様細胞に変化した。さらに、SOX9 遺伝子の導入骨髄細胞を高密度に diffusion chamber に封入し、ヌードマウスの皮下に移植したところ、4 週後にアルシアンブルー陽性の軟骨塊を得た。これはアグリカン陽性、2 型コラーゲン陽性、10 型コラーゲン陰性で、関節軟骨組織の特徴を示した。種々条件を変化させ SOX9 遺伝子の導入骨髄細胞を高密度にて培養したときのみ軟骨分化、脱分化抑制が起こりうることを確認した。この細胞を用いてウサギ膝軟骨欠損修復を行ったところ、骨髄細胞移植群、無移植群に比して良好な軟骨組織再生を確認した。また従来軟骨分化誘導細胞で問題となっていた肥大軟骨、骨への過分化は起こらず、関節軟骨細胞の性格を保つ事が示された。

D. 考察

広範な軟骨欠損を生じる関節症に対する新しい治療戦略として、再生医学による軟骨組織再生は画期的な方法であるが、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必要となる。従来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、転写因子である 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く、ドナー選択の幅が広が

る可能性がある。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ことが明らかとなった。そこで、次に臨床的に採取が容易な骨髄細胞をドナーとして同様の研究を行ったところ、in vitro で軟骨細胞様細胞を、in vivo においても軟骨組織の形成を認めた。またこの細胞は動物モデルではあるが軟骨組織の修復のドナー細胞として用いることが出来ることを確認した。今後はさらに効率の良い遺伝子導入法と組み合わせることにより、この方法は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。今後は組織工学的手法を用いてこの細胞から軟骨組織を作り、組織修復に用いる可能性を検討する予定である。

E. 結論

SOX9 の遺伝子導入による SOX9 タンパクの過剰発現は軟骨分化を誘導する。骨髄間葉系細胞に対する遺伝子導入と高密度培養の組み合わせは関節軟骨様細胞への分化を可能とした。本細胞はウサギ軟骨欠損モデルで旺盛な軟骨修復能を待つことが示された。軟骨細胞への骨髄間葉系細胞への SOX9 の遺伝子導入による軟骨組織再生は臨床応用が可能で、広範な軟骨欠損を有する変形性関節症に対する画期的な治療となり得るものと考えられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Naoki Ishiguro, Toshihisa Kojima, A. Robin Poole. Mechanism of Cartilage Destruction in Osteoarthritis. Nagoya J Med Sci 65:73-84, 2002

(2) Shin-ichiro Saito, Seiji Kondo, Shinji Mishima, Naoki Ishiguro, Yukiharu Hasegawa, Linda J. Shandell, Hisashi Iwata. Analysis of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) in synovial fluid from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. J Bone Joint Surg (Br) 84:1066-1069, 2002

(3) Hidefumi Inoh, Naoki Ishiguro, Shin-Ichi Sawazaki, Hideki Amma, Motoi Miyazu, Hisashi Iwata, Masahiro Sokabe, Keiji Naruse. Uni-axial cyclic stretch induces the activation of transcription factor nuclear factor κ B in human fibroblast cells. FASEB Journal 16:405-407, 2002

(4) Ho-Rim Choi, Seiji Kondo, Kazuyoshi Hirose, Naoki Ishiguro, Yukiharu Hasegawa, Hisashi Iwata. Expression and enzymatic activity of MMP-2 during healing process of the acute supraspinatus tendon tear in rabbits. J Orthop Res 20:927-933, 2002

2. 学会発表

(1)第 17 回日本整形外科学会 基礎学術集会
青森 2002.10.11-10.12 土屋廣起、鬼頭浩史、
近藤精司、三島真爾、石黒直樹
変形性関節症治療を目的とした軟骨再生：遺
伝子導入によるアプローチ

(2)第 17 回日本整形外科学会 基礎学術集会
青森 2002.10.11-10.12 小嶋俊久、A. R. Pool、
石黒直樹
関節軟骨破壊でのアグリカン代謝

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（申請中）

- ・軟骨細胞様細胞、及びその作製方法

特願 2002-175920

- ・リウマチの診断法 特願 TM-004

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

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：関節軟骨修復には *c-fos* 遺伝子および Adenosine triphosphate (ATP) が細胞間の情報伝達や細胞増殖の亢進に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、骨髄由来間葉系幹細胞から軟骨細胞へ分化させるためには単層培養下での FGF 添加後、3次元培養下での TGF- β , dexamethazone 添加による方法が良質な硝子軟骨様組織の作製には良いことが分かり、軟骨修復に対する骨髄由来間葉系幹細胞応用の可能性が示された。

分担研究者 越智光夫

広島大学大学院整形外科

教授

A. 研究目的

これまで、自己修復能の乏しい関節軟骨損傷に対する治療法として、我々は自家軟骨細胞とアテロコラーゲンゲルから組織工学的技術によって生体外で軟骨様組織を作製・培養して移植する方法を開発し、臨床応用を行い、短期ではあるが比較的良好な成績が得られることを報告してきた。しかし、本法には 1) 採取可能な自家軟骨細胞数が制限されること、2) 軟骨採取術と軟骨移植術の 2 段階手術が必要なこと、3) 関節切開を要する侵襲的な手術であること、などの問題がある。今回、これらの問題点を克服するために、1) 胎仔軟骨においては修復能力が高いことに着目して、胎仔軟骨と成体軟骨の修復機序の相違を詳細に分析することにより、軟骨の修復に関わる遺伝子、因子を検討した。また、2) 骨髄由来間葉系幹細胞の多分化能に着目して、同細胞を用いた培養軟骨移植への応用についても検討した。

B. 実験方法

実験 1. 胎仔軟骨修復能の分析

実験 1-1: ラット胎仔軟骨損傷における *c-fos* 遺伝子の発現

Wister 系ラット母獣(生後 12 週齢、体重 350-450g、n=6)の妊娠 19 日に胎仔の後肢を子

宮内より大腿部まで引き出して、膝関節荷重部の軟骨に半層欠損を作製した。手術終了後、後肢を子宮内に返納し子宮壁を縫合した。一方、生後 12 週齢の成熟 Wister ラット(n=6)の膝関節荷重部の軟骨にも同様に半層欠損を作製した。術後 1,3,6,12,24,48 時間後にそれぞれ損傷させた膝関節を摘出した。また、損傷を加えなかった対側の膝関節を同様に摘出し対照とした。摘出直後に膝関節軟骨より total RNA を抽出し、RT-PCR によって胎仔および成体における *c-fos* 遺伝子の発現を調べた。また、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン切片を作製し、*in situ* hybridization (ISH) によって *c-fos* mRNA の発現を観察した。

実験 1-2. ラット軟骨における *c-fos* 遺伝子の発現と細胞内カルシウムイオン濃度との関係

生後 5 週の Wister 系ラットの肩、股、膝関節から軟骨片を採取し、軟骨細胞を単離し培養した。細胞を Adenosine triphosphate (ATP) (10 μ M)、カルシウムイオノフォア A23187 (20 μ M)、細胞内カルシウムイオン(Ca²⁺)キレーター BAPTA-AM (10 μ M)、BAPTA-AM (10 μ M) +ATP (100 μ M)をそれぞれ含む 5 群の DMEM 培地に 10 分間培養した後、これらを含まない DMEM 培地で 1 時間培養した。その後、培養細胞から total RNA を抽出し、*c-fos* 遺伝子の発現を RT-PCR で調べた。

実験 1-3. ラット軟骨に対する ATP 投与と細

研究要旨：関節軟骨修復には *c-fos* 遺伝子および Adenosine triphosphate (ATP) が細胞間の情報伝達や細胞増殖の亢進に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、骨髄由来間葉系幹細胞から軟骨細胞へ分化させるためには単層培養下での FGF 添加後、3次元培養下での TGF- β , dexamethazone 添加による方法が良質な硝子軟骨様組織の作製には良いことが分かり、軟骨修復に対する骨髄由来間葉系幹細胞応用の可能性が示された。

胞内カルシウムイオン濃度との関係

生後 12 週齢の Wister 系ラットと妊娠 19 日目の胎仔膝関節から採取した軟骨片に Fura-2 AM を負荷した後、ATP を 1~100 μ M の濃度で添加して、蛍光像の画像解析により軟骨細胞の細胞内カルシウムイオン濃度が上昇するか否かを調べた。

実験 1-4. 軟骨細胞の増殖に対する機械的刺激と ATP の効果

体重 1.2kg 日本白色家兎の膝関節軟骨を採取し、軟骨細胞を単離して培養した。(1)細胞 1 個を機械的刺激して発生するカルシウム波を Fura-2 蛍光法で観察した。細胞間が十分離れている場合と、コロニーを形成して細胞同士が接着している場合で、カルシウム波の伝播の違いを比較した。(2)細胞増殖に及ぼす ATP の効果を調べるために、軟骨細胞培養開始後 2 日目に 1, 10, 100 μ M の ATP を含んだ DMEM 培地に 1 分間だけ浸し、その後 ATP を含まない DMEM 培地に培養して 7 日目に細胞数を計測した。ATP を与えなかった群を対照として細胞数に比較を行った。

実験 2. 家兎骨髄由来間葉系幹細胞のコラーゲンゲル培養における軟骨基質産生

10 週齢の日本白色家兎の脛骨より採取した骨髄液を採取して培養し、培養皿に付着した細胞を間葉系幹細胞として単層培養系で増殖させた。三代の継代培養の後、以下の四群に

分けた。(1) FGF-2 (1ng/mL) を加えた群 (F 群)、(2) TGF- β 1 (5ng/mL) を加えた群 (T 群)、(3) FGF-2 (1ng/mL) と TGF- β 1 (5ng/mL) を加えた群 (FT 群)、(4) 無添加群 (C 群)。これらの条件で 1 週間の単層培養後、コラーゲンゲルに 2x10⁶ cell/mL で包埋し、以後 TGF- β 1、dexamethasone 存在下に 2 週間培養した。単層培養終了時の細胞数、細胞の形態、このときの mRNA の発現(コラーゲン I, II, X 型、PPAR γ)を RT-PCR によって比較した。次いで、コラーゲンゲル培養後 2 週目での細胞数、組織学的変化(トルイジンブルー、サフラニン O)を比較するとともに、コンドロイチン 6 硫酸 (C6S) および 4 硫酸 (C4S) の定量を高速液体クロマトグラフィー法によって行い、C6S 量に対する C4S 量の比率を算出し比較した。さらにコラーゲンゲル培養後の mRNA の発現(コラーゲン I, II, X 型、PPAR γ)も比較した。

C. 研究結果

実験 1. 胎仔軟骨修復能力の分析

実験 1-1: ラット胎仔軟骨損傷における *c-fos* 遺伝子の発現

軟骨損傷作製 48 時間後には胎仔関節軟骨では組織学的に修復が得られていた。RT-PCR による *c-fos* mRNA の発現は胎仔、成体とも損傷を加えなかった対照群では時間的变化は見られなかった。しかし、胎仔損傷群では、損傷後 1 時間で発現量がすでに上昇し、6 時間後では約 5 倍まで上昇した。12 時間後には対

研究要旨：関節軟骨修復には c-fos 遺伝子および Adenosine triphosphate (ATP) が細胞間の情報伝達や細胞増殖の亢進に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、骨髄由来間葉系幹細胞から軟骨細胞へ分化させるためには単層培養下での FGF 添加後、3次元培養下での TGF- β , dexamethazone 添加による方法が良質な硝子軟骨様組織の作製には良いことが分かり、軟骨修復に対する骨髄由来間葉系幹細胞応用の可能性が示された。

照群と同等の発現量まで低下した。これに対して、成体損傷群では損傷後1時間後に対照群の約4倍の発現量を認めたが、3時間後には対照群と同等のレベルまで低下した。ISHでは胎仔軟骨に損傷後3時間で損傷部位を囲む軟骨細胞に局在して c-fos mRNA が周囲組織より高い発現量を示した。

実験 1-2. ラット軟骨における c-fos 遺伝子の発現と細胞内カルシウムイオン濃度との関係

ATP または A23817 添加し細胞内カルシウムイオン濃度を上げると c-fos 遺伝子発現量が上昇した。一方、BAPTA-AM を添加すると ATP による c-fos 発現は抑制された。

実験 1-3. ラット軟骨における ATP 投与と細胞内カルシウム濃度との関係

胎仔軟骨では 1-100 μ M の ATP を添加すると、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する細胞が多数観察された。これに対して、成熟軟骨片では ATP が 1mM の濃度でこの現象は漸く観察された。

実験 1-4. 軟骨細胞の増殖に対する機械的刺激と ATP の効果

培養軟骨細胞のコロニーの一部を機械刺激することによってカルシウム波が発生し伝播することが確認された。培養軟骨細胞間が離れている場合にもカルシウム波が伝播した。1 μ M の ATP を含む培地で5日間培養を続ける

と軟骨細胞は増殖したが、10,100 μ M の ATP では増殖が抑制された。これに対して1日1分間 ATP を含む培地で刺激した場合はどの濃度でも細胞増殖は亢進した。

実験 2. 家兎骨髄由来間葉系幹細胞のコラーゲンゲル培養における軟骨基質産生

単層培養終了後の細胞形態は F 群では線維芽細胞様で、T 群は多角形に細胞質が広がった形態であった。単層培養後の細胞数は F 群が他の群に比して有意に多く、T 群は少なかった。単層培養後、II型コラーゲン mRNA の発現は T, FT 群が良好に発現していた。コラーゲンゲル培養後では細胞数では F 群は増加したが、FT 群は減少していた。コンドロイチン硫酸産生量は F 群が C 群に比べ2倍に増加していた。また T 群、FT 群のコンドロイチン産生量は C 群に比べ有意に低値であった。コンドロイチン 6 硫酸 4 硫酸比は F 群では C 群と比較しわずかに高く、T 群では低かった。コラーゲンゲル培養後では II 型コラーゲン mRNA の発現は F 群、C 群で良好であった。

D. 考察

実験 1 の結果から、胎仔の関節軟骨では損傷後周囲に c-fos 遺伝子が成体の関節軟骨に比べ、長時間継続して発現することが明らかになり、この遺伝子発現のトリガーが ATP であることが分かった。また、胎仔軟骨では成体に比して低濃度の ATP によって細胞間の情

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：関節軟骨修復には c-fos 遺伝子および Adenosine triphosphate (ATP) が細胞間の情報伝達や細胞増殖の亢進に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、骨髄由来間葉系幹細胞から軟骨細胞へ分化させるためには単層培養下での FGF 添加後、3次元培養下での TGF- β , dexamethazone 添加による方法が良質な硝子軟骨様組織の作製には良いことが分かり、軟骨修復に対する骨髄由来間葉系幹細胞応用の可能性が示された。

報伝達が可能であることも判明した。この相違が胎仔と成体との軟骨損傷時の自己修復能の高低を示すものと考え。さらに、この ATP によって軟骨細胞の P2 受容体が刺激され、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、再び ATP を介して周辺の軟骨細胞に伝播（カルシウム波）することが明らかとなった。加えて、軟骨細胞増殖亢進には ATP の至適濃度や至適投与方法が存在することが示された。これらの軟骨修復機序の相違やその条件を明らかにすることによって、自己修復能の乏しい成体関節軟骨の修復能を高める方法を開発することが可能になるものと考え。

また、実験 2 の結果から、骨髄由来間葉系幹細胞を用いる場合、単層培養下に FGF を添加して培養した後に 3次元コラーゲン培養下で TGF- β 1 と dexamethazone を添加した無血清培地で培養すれば、良好な軟骨基質を形成できることが判明した。以上の結果から、今後、培養軟骨移植の際の軟骨細胞に替わる細胞源として、骨髄由来間葉系幹細胞による培養軟骨作製の可能性が示された。

E. 結論

軟骨の修復には c-fos 遺伝子、トリガーとしての ATP が関与する。ATP は細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、ATP を介したカルシウム波を伝播させ細胞間の情報伝達に関与させるとともに、細胞増殖を促進させる。

骨髄由来間葉系幹細胞から良好な軟骨基質

をもった硝子軟骨様組織を作製するためには単層培養下では FGF 添加培地を用いた後、コラーゲン培養下では TGF- β 1 と dexamethazone 添加培地を用いた方が良いと考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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]* 84(4): 571-578, 2002.

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 Mater Res* 59:201-206, 2002.

Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Kataoka H, Maniwa S: Effects of different embedding gels on periosteal chondrogenesis in vitro. *APMIS*. 110: 340-346, 2002.

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 method.

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：関節軟骨修復には c-fos 遺伝子および Adenosine triphosphate (ATP)が細胞間の情報伝達や細胞増殖の亢進に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、骨髄由来間葉系幹細胞から軟骨細胞へ分化させるためには単層培養下での FGF 添加後、3次元培養下での TGF- β , dexamethazone 添加による方法が良質な硝子軟骨様組織の作製には良いことが分かり、軟骨修復に対する骨髄由来間葉系幹細胞応用の可能性が示された。

Tissue Engineering 8(1): 119-129, 2002.

Tobita M, Ochi M, Uchio Y, Mori R, Iwasa J, Katsube K, Motomura T: Treatment of growth plate injury by transfer of autogenous cultured chondrocytes embedded collagen gel into the physical defect. A study in rabbits. Acta Orthop Scand 73(3): 352-358, 2002.

Nakanishi T, Kawasaki K, Uchio Y, Kataoka H, Terashima M, Ochi M: AG-041R, a CCK₁ gastrin receptor antagonist, stimulates the repair of osteochondral defect in rabbit model. Eur J Pharmacol 439: 135-140, 2002.

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).

2. 学会発表

Nishikori T, Enomoto K, Kataoka H, Uchio Y, Maniwa S, Kohno T, Ochi M: Factors contributing to signal transductions in cultured chondrocytes. 7th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International (OARSI). Sydney, September 2002.

Kumahashi N, Ochi M, Kataoka H, Uchio Y, Kakimaru H, Enomoto K: Difference in early expression of c-fos gene via increase of intracellular CA²⁺ ion reflects repair potentials of superficial defects on articular cartilage in fetal

and adults rats. 7th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International (OARSI). Sydney, September 2002.

熊橋伸之、越智光夫ほか：ラット胎児軟骨損傷における細胞内カルシウム濃度を介した c-fos 遺伝子の発現。日整会誌 76(8), S1097, 2002.

古川誠治、越智光夫ほか：家兎骨髄由来間葉系幹細胞のコラーゲンゲル培養における軟骨基質産生—単層培養時に TGF- β 1、FGF-2 を添加することの影響—日整会誌 76(8), S1106, 2002.

河野大助、越智光夫ほか：ウサギ培養軟骨細胞の細胞増殖における機械的刺激と ATP の効果。日整会誌 76(8), S1109, 2002.

G. 知的財産権の出願・登録状況

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ibusuki S, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	Tissue-engineered cartilage using an injectable and <i>in situ</i> gelable thermoreponsive gelatin: Fabrication and <i>in vitro</i> performances.	Tissue Engineering			<i>in press</i>
Ibusuki S, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	System engineered cartilage using PNIPAAm-gelatin as <i>in situ</i> formable scaffold: <i>In vivo</i> performance.	Tissue Engineering			<i>in press</i>
Matsuda S, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	Tibial shaft axis does not always serve as a correct coronal landmark in total knee arthroplasty for varus knees.	J. Arthoroplasty			<i>in press</i>
Matsuda S, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	A comparison of rotational landmarks in the distal femur and the tibial shaft.	Clin. Orthop. Related Res.			<i>in press</i>
Ide Y, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	Characterization of the genomic structure and expression of the mouse Apex2 gene.	Genomics,			<i>in press</i>

Tanaka K, <u>Iwamoto Y,</u> et al.	A Kruppel-Associated Box-Zinc finger protein, NT2, represses cell Type-Specific promoter activity of the α (XI) collagen gene.	Mol. Cell. Biol.	22(12)	4256-4267	2002
Yamashita A, <u>Iwamoto Y,</u> et al.	Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats.	J. Immunol.	168	450-458	2002
Maeda T, <u>Iwamoto</u> <u>Y,</u> et al.	Involvement of CD4+ CD57+T cells in the disease activity of rheumatoid arthritis.	Arthritis & Rheumatism	46(2)	379-384	2002
Matsumoto Y, <u>Iwamoto Y,</u> et al.	Possible involvenent of the vascular endothelial growth factor-Flt-1-Focal adhesion kinase pathway in chemotaxis and the cell proliferation of osteoclast precursor cells in arthritic joints.	J. Immunology	168	5824-5831	2002
Kawano T, <u>Iwamoto Y,</u> et al.	Factors affecting patellar tracking after total knee y arthroplasty.	J., Artholoplast	17(7)	942-947	2002

Jingushi S, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	Intramuscular bone induction by human recombinant bone morphogenetic protein-2 with beta-t ricalcium phosphate as a carrier: in vivo bone banking for musle-pedicle autograft.	J. Orthop. Sci.	7	490-494	2002
Miyagi T, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	Changes in patellar tracking after total knee arthroplasty : 10-year follw-up Miller-Galante I knees.	Orthopedics	25(8)	811-813	2002
Miura H, <u>Iwamoto</u> <u>Y</u> , et al.	Prediction of total knee arthoroplasty polythelene wear using the wear index.	J. Arthroplasty	17(6)	760-766	2002
Kurata K, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	Influences of newly formed woven bone on tisuute stresses in rat daudal vertebrae subjected to mechanidal lording.	JSME Int. J.	45(2)	558-566	2002
Moro-oka T, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	Patellar tracking and patellofemoral geometry in deep knee flexion.	Clin. Orthop. Related Res.	394	161-168	2002
Jingushi S, <u>Iwamoto Y</u> , et al.	Transtrochanteric valgus osteotomy for the treatment of osteoarthritis of the hip secondary to acetabulr dysplasia.	J. Bone Joint Surg. (B)	84(4)	535-539	2002