

- Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* (in press).
2. Seto H, Fujii T, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Imamura T, Miyazono K, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, and Tanaka S: Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts: segregation of the roles of Smad pathways and p38 MAP kinase pathways. *J Clin Invest* (in press).
 3. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, and Kawaguchi H: PPAR α insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* (in press).
 4. Hoshi K, Ogata N, Shimoaka T, Terauchi Y, Kadowaki T, Kenmotsu S, Chung U, Ozawa H, Nakamura K, and Kawaguchi H: Deficiency of insulin receptor substrate-1 impairs skeletal growth through early closure of epiphyseal cartilage. *J Bone Miner Res* 19: 214-223, 2004.
 5. Itaka K, Harada A, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K: In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *J Gene Med* 6: 76-84, 2004.
 6. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, and Kato Y: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 503-508, 2004.
 7. Koshizuka Y, Yamada T, Hoshi K, Ogasawara T, Chung U, Kawano H, Nakamura Y, Nakamura K, Ikegawa S, and Kawaguchi H: Cystatin 10, a novel chondrocyte-specific protein, may promote the last steps of the chondrocyte differentiation pathway. *J Biol Chem* 278: 48259-48266, 2003.
 8. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung U, Fukuda A, Hikita A, Seto H, Okada T, Inaba T, Sanjay A, Baron R, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K, Strasser A, and Tanaka S: Regulation of

- osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J* 22: 6653-6664, 2003.
9. Saegusa M, Murakami M, Nakatani Y, Yamakawa K, Katagiri M, Matsuda K, Nakamura K, Kudo I, and Kawaguchi H: Contribution of membrane-associated prostaglandin E₂ synthase (mPGES) to bone resorption. *J Cell Physiol* 197: 348-356, 2003.
 10. Itaka K, Yamauchi K, Harada A, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K: Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly (ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials* 24: 4495-4506, 2003.
 11. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, Nakamura T, Fukuda T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Aihara K, Yamamoto Y, Nakamichi Y, Metzger D, Chambon P, Nakamura K, Kawaguchi H, and Shigeaki Kato: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9416-9421, 2003.
 12. Seichi A, Nakajima S, Takeshita K, Kitagawa T, Akune T, Kawaguchi H, and Nakamura K: Image-guided resection of the thoracic ossification of the ligament flavum. *J Neurosurg* 99: 60-63, 2003.
 13. Ogihara S, Seichi A, Iwasaki M, Kawaguchi H, Kitagawa T, Tajiri Y, and Nakamura K: Concurrent spinal schwannomas and meningiomas. Case illustration. *J Neurosurg* 98: 300, 2003.
 14. Seichi A, Nakajima S, Kitagawa T, Takeshita K, Iwasaki M, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K: Image-guided surgery for cervical disorders in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 12: 329-332, 2002.
2. 学会発表
 1. 星地亜都司、竹下克志、川口浩、中島勲、阿久根徹、筑田博隆、中村耕三: 頸椎椎弓形成術後にみられるMRI 髄内変化の拡大 - 前向き研究 -. 第 32 回日本脊椎脊髄病学会. 2003. 4. 4-6 (福岡).
 2. 星地亜都司、中島勲、北川知明、竹下克志、阿久根徹、筑田博隆、川口浩、中村耕三: コンピューターナビ

- ゲーショシステムを用いた頸椎
インストルメンテーション再手術.
第 32 回日本脊椎脊髄病学会.
2003. 4. 4-6 (福岡)
3. 川口浩、亀倉暁、池田敏之、池川志
郎、中村耕三：Reverse & forward
genetics を用いた変形性関節症の
病態解明へのアプローチ. 第 47 回
日本リウマチ学会総会 (シンポジウ
ム:変形性関節症の発症機序と治療).
2003. 4. 24-25 (京王プラザホテル、
東京).
 4. 位高啓史、原田敦史、山崎裕一、中
村耕三、川口浩、片岡一則：
fluorescence resonance energy
transfer (FRET)を用いた
polyethylenimine/DNA polyplex
の細胞内挙動の観察. 第 3 回遺伝
子・デリバリー研究会. 2003. 5. 9
(KKR ホテル東京、東京).
 5. 星地亜都司、竹下克志、川口浩、中
島勸、阿久根徹、筑田博隆、中村耕
三：頸椎椎弓形成術後の上肢麻痺 -
MRI による検討 -. 第 76 回日本整
形外科学会学術集会. 2003. 5.
22-25 (石川県立音楽堂、金沢).
 6. 竹下克志、星地亜都司、岩崎元重、
阿久根徹、川口浩、中村耕三：頸椎
砂時計腫に対する片側椎弓・椎間関
節切除に固定は必要か. 第 76 回日
本整形外科学会学術集会. 2003. 5.
22-25 (石川県立音楽堂、金沢).
 7. 阿久根徹、川口浩、緒方直史、星
地亜都司、大西五三男、中村耕三：
脊椎後縦靱帯骨化症の骨化傾向と
糖代謝関連因子の検討. 第 76 回
日本整形外科学会学術集会.
2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、
金沢).
 8. 松田浩一、井上耕一、阿久根徹、
星和人、河野博隆、山川聖史、中
村祐輔、中村耕三、川口浩：メカ
ニカルストレスに反応して骨量維
持に働く新規遺伝子 Znt5 (Zinc
transporter 5) の単離と機能解析
(学会奨励賞受賞). 第 21 回日本
骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003).
2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大
阪).
 9. 池田敏之、馬淵昭彦、亀倉暁、福
田明、平岡久忠、鄭雄一、川口浩、
高取吉雄、滝川正春、木村友厚、
須藤啓広、内田淳正、中村耕三、
池川志郎：Sox9 による IX 型コラ
ーゲン α 3 鎖遺伝子の転写誘導は
変形性膝関節症の発症に関与する
(学会奨励賞受賞). 第 21 回日本
骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003).
2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大
阪).
 10. 亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博
隆、鄭雄一、中村耕三、川口浩：
マウス変形性関節症(OA)誘発モデル
の確立とこれを用いた OA 発症
における MMP-13 の関与. 第 21
回日本骨代謝学会
(IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6.
3-7 (大阪国際会議場、大阪).
 11. 池田敏之、亀倉暁、馬淵昭彦、関
庄二、黄郁代、筑田博隆、鄭雄一、
木村友厚、川口浩、中村耕三、池
川志郎：軟骨再生医療を目指した

- SOX9/SOX5/SOX6 の遺伝子同時導入による軟骨誘導. 第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
12. 大庭伸介、池田敏之、矢野文子、釘宮典孝、筑田博隆、高戸毅、中村耕三、Alex Lichter、川口浩、鄭雄一：COL1-GFP マーカー遺伝子導入による幹細胞から骨芽細胞への分化モニタリングシステムの開発. 第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
13. Hirotaka Chikuda, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Toru Akune, Hirotaka Kawano, Ken-ichi Kawano, Kozo Nakamura, Kajuro Komeda, Ung-il Chung, Hiroshi Kawaguchi: Dysfunction of cGMP-dependent protein kinase 2 causes dissociation of proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in Minature rat Ishilawa (Travel Award 受賞). IBMS-JSBMR 2003. 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
14. 位高啓史、原田敦史、山崎裕一、中村耕三、川口浩、片岡一則：Linear ポリエチレンイミンの高遺伝子発現メカニズム- FRET を用いた細胞内観察. 第 19 回日本 DDS 学会. 2003. 6. 19-20 (国立京都国際会館、京都).
15. Koichi Matsuda, Koichi Inoue, Kiyofumi Yamakawa, Hirotaka Kawano, Toru Akune, Kazuto Hoshi, Yusuke Nakamura, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Zinc transporter 5 (Znt5) is an essential molecule for mechanical stress signaling in bone (Young Investigator Award). 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
16. Takashi Yamada, Hirotaka Kawano, Toru Fukuda, K. Yoshimura, Takashi Nakamura, Satoru Kamekura, Ung-il Chung, Yu Koshizuka, Kozo Nakamura, Shigeaki Kato, Hiroshi Kawaguchi: Cystatin 10, a novel chondrocyte-specific protein, contributes to pathogenesis of osteoarthritis and ectopic ossification through chondrocyte calcification (Young Investigator Award). 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
17. Satoru Kamekura, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Ung-il Chung, Hirotaka Chikuda, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Establishment of novel

- experimental osteoarthritis models in mice. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
18. Toshiyuki Ikeda, Akihiko Mabuchi, Akira Fukuda, Satoru Kamekura, Ikuko Kou, S. Seki, Hisatada Hiraoka, Alira Kawakami, Seizo Yamamoto, Ung-il Chung, Yoshio Takatori, M. Takigawa, Hiroya Sakai, A. Sudo, A. Uchida, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, Shiro Ikegawa: Transcriptional induction of the gene encoding $\alpha 3$ chain of type IX collagen (*COL9A3*) by SOX9 contributes to the susceptibility of knee osteoarthritis. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
19. Toshiyuki Ikeda, Hiroshi Kawaguchi, Satoru Kamekura, Akihiko Mabuchi, I. Kou, Kazuto Hoshi, Kozo Nakamura, Shiro Ikegawa, Ung-il Chung: Combination of SOX5, SOX6 and SOX9 is sufficient for chondrogenesis. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
20. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩：生体適合性に優れた人工材料・MPCによるナノ表面処理を用いた人工関節の弛緩防止—耐摩耗特性と摩耗粉に対する生体反応の評価—。第18回日本整形学会基礎学術集会。2003.10.16（北九州国際会議場、小倉）。
21. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩：ライナー表面のMPCポリマー処理は人工股関節のlooseningを抑制する。第30回日本股関節学会学術集会。2003.10.31-11.1（ホテル日航東京、東京）。
22. 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇：ポリエチレンライナー表面のMPCポリマー処理による人工関節の長寿命化。第25回バイオマテリアル学会。2003. 12. 16-17（大阪国際会議場、大阪）。
23. 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇：MPCポリマーによる関節摺動面のナノ表面処理は人工股関節の弛みを抑制する—長寿命型人工股関節の開発—。第34回日本人工関節学会。2004.1.30-31（幕張メッセ国際会議場、千葉）

24. Moro, T; Takatori, Y; Ishihara, K; Kawaguchi, H; Konno, T; Takigawa, Y; Matsushita, T; Yamawaki, N; Nakamura, K :
Grafting of biocompatible polymer on the polyethylene liner for improving longevity of the artificial joints. 50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2004.3.6-10 (Moscone West Convention Center, San Francisco, California, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

人工関節周囲の骨吸収にMPCポリマー摩耗粉が与える影響に関する研究

分担研究者 高取吉雄（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 助教授）

分担研究者 川口浩（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 講師）

研究要旨：本研究では、MPC ポリマーの摩耗粉が人工関節周囲の骨吸収（osteolysis）、弛み（loosening）に与える影響を検討するため、主任研究者 中村耕三が作製した MPC ポリマー処理したナノ微粒子を、*in vitro* osteolysis model、*in vivo* osteolysis model の実験系に導入して、研究を行った。*in vitro* osteolysis model を用いた研究では、まず、MPC ポリマー処理/未処理微粒子をマウスマクロファージ細胞株に暴露し、24 時間後にその培養上清を回収して conditioned medium を作製した。conditioned medium を、マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系に用いると、MPC ポリマー処理微粒子を暴露した群では、破骨細胞の形成が著しく抑制された。*in vivo* osteolysis model を用いた研究では、MPC ポリマー処理/未処理微粒子をマウス calvalia 上に移植し、calvalia における破骨細胞数を測定すると、MPC ポリマー処理微粒子を移植した群では、破骨細胞形成が抑制された。本研究の結果は MPC ポリマーの摩耗粉が人工関節周囲の骨吸収を惹起しないことを示唆するものであり、長寿命型人工関節の達成の可能性を支持するものである。

A. 研究目的

人工関節手術は優れた治療法として確立されている一方で、手術後約 10 年で生じるとされる人工関節の弛み（loosening）は、最大の合併症であり、その抑制は不可避の課題である。この対策手法は従来、1) 摩耗粉を減少させる、2) 骨吸収を抑制する、の 2 つの方向性で検討されてきたが、1)、2) の条件を同時に満たす研究開発は

行われていない。例えば近年実用化されたポリエチレンライナー表面に γ 線を照射し、ポリエチレン分子間をクロスリンクしたクロスリンクポリエチレンは、確かに摩耗粉の減少は達成したものの、摩耗粉自体が引き起こす骨吸収の問題は依然として解決されていない。

今回我々は、生体適合性に優れた biomaterial、MPC ポリマーを人工関

節の関節摺動面に導入する方法を考案した。主任・分担研究者によってその摩耗抑制効果が検討され、優れた結果を獲得している。そこで、本研究では、MPC ポリマーの摩耗粉が人工関節周囲の骨吸収 (osteolysis)、弛み (loosening) に与える影響を検討するため、主任研究者 中村耕三が作製した MPC ポリマー処理したナノ微粒子を、*in vitro* osteolysis model、*in vivo* osteolysis model の実験系に導入して、研究を行った。

B. 研究方法

① conditioned medium の作製

マクロファージは、マウスマクロファージ細胞株・J774.1 細胞を使用した (Riken Cell Bank, 埼玉)。ナノ微粒子は主任研究者 中村耕三が作製した MPC ポリマー処理したナノ微粒子と未処理微粒子を用い、溶液のみを暴露した群をコントロール群とした。J774.1 細胞を 10%の牛血清を含む RPMI-1640 medium 中で培養後、(0.1% wt/vol)。微粒子溶液を暴露、24 時間後に 0.22 μm のフィルターを通し (Corning Corster Japan, 東京)、培養上清を回収し、これらを conditioned medium として、以下の研究に使用した。

② *in vitro* osteolysis model における検討

人工関節周囲の骨吸収 (osteolysis) は、摩耗粉を貪食したマクロファージが分泌した液性因子により形成され

た破骨細胞により惹起される。そこで、①で作製した conditioned medium を *in vitro* osteolysis model の実験系に用い、MPC ポリマー摩耗粉が人工関節の弛み (loosening) に与える影響を検討した。

マウス骨芽細胞は、1~4 日齢のマウス calvaria より、コラゲナーゼ処理 (Sigma, type 7) にて採取した。

マウス骨髄細胞は、8 週齢の ddy マウスの脛骨髄腔を flush out して回収したものを使用した。

マウス骨芽細胞 (2×10^4 cells/well)、マウス骨髄細胞 (1×10^6 cells/well) を①で作製した conditioned medium 中で共存培養した。培養後 6 日目で tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行い、3 核以上が TRAP 染色陽性を示す細胞を破骨細胞と判定し、その数を計測した。

さらに、上記の共存培養を、抗 TNF- α 抗体 (5 $\mu\text{g/ml}$)、抗 IL-1 抗体 (5 $\mu\text{g/ml}$)、抗 IL-6 抗体 (5 $\mu\text{g/ml}$)、celecoxib (1 μM)、osteoprotegerin (10 ng/ml) の存在下で行い、同様に 6 日後に破骨細胞数を計測した。

③ *in vivo* osteolysis model における検討

in vivo osteolysis model の実験系は、各群 5 匹ずつの 6 週齢の ddy マウスを用いて行った。70-80 mg/kg の Ketamine と 5-7 mg/kg の Xylazine で麻酔後、マウスの calvaria 上に、MPC ポリマー処理 / 未処理のナノ微粒子を移植した。7 日後に calvaria を採取し、固定、脱灰

(EDTA) 処理後、冠状断の標本を作製した。この標本をトルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡下に、イメージアナライザー (System Supply Co., 長野) を用いて骨形態計測を行った。形態計測は midsagittal suture から 2.4 mm 外側の部位で行い、破骨細胞数 (Oc.N/B.Pm) を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

① Conditioned medium の作製

作製した conditioned medium を以下に用いた。

② *in vitro* osteolysis model における検討

MPC ポリマー処理ナノ微粒子を暴露した conditioned medium を用いた共存培養では、未処理のナノ微粒子を暴露した群と比して破骨細胞の形成を約 1/7 に抑制した (Figure 1-A)。

また、MPC ポリマー処理微粒子暴露群の破骨細胞形成能を、溶液のみを暴露した conditioned medium を用いた共存培養と比較して有意な差が見られなかった (Figure 1-B)

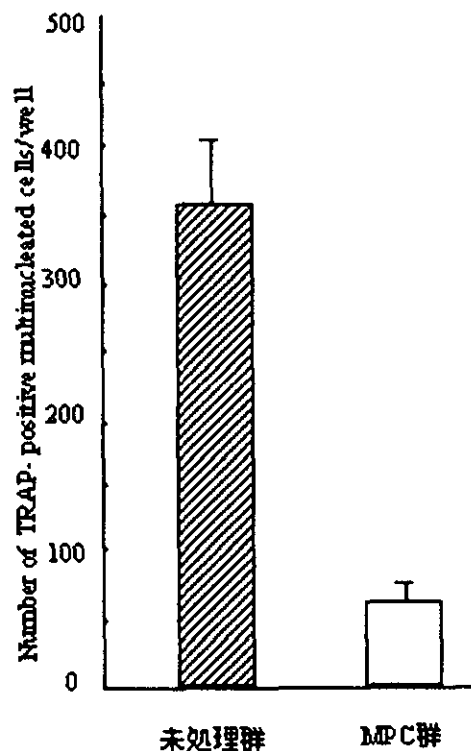


Figure 1-A 破骨細胞形成能・1

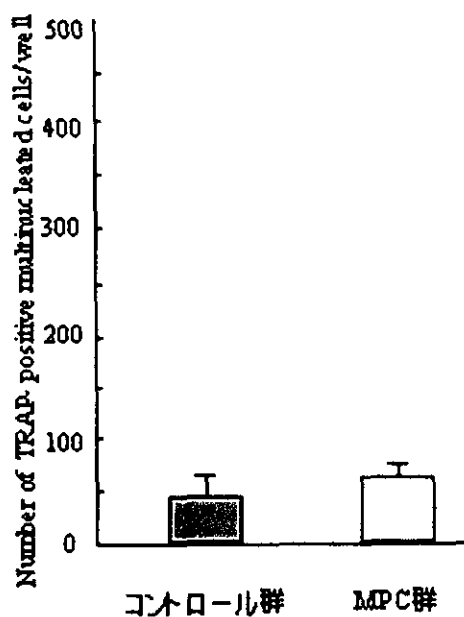


Figure 1-B 破骨細胞形成能・2

conditioned medium に抗 TNF- α 抗体、抗 IL-1 抗体、抗 IL-6 抗体、celecoxib、osteoprotegerin をそれぞれ添加して行った共存培養においては、全ての抗体で破骨細胞の形成が抑制されたが、この抑制効果は、MPC ポリマー処理微粒子を暴露した conditioned medium を加えた場合と有意な差が見られなかった (Figure 1-C, D)。

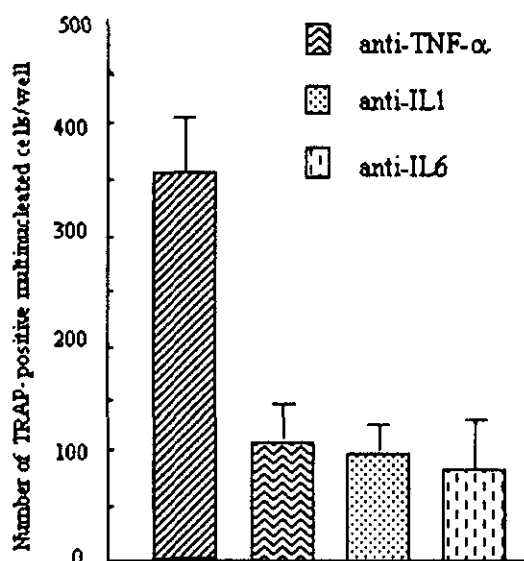


Figure 1-C 抗サイトカイン抗体の効果

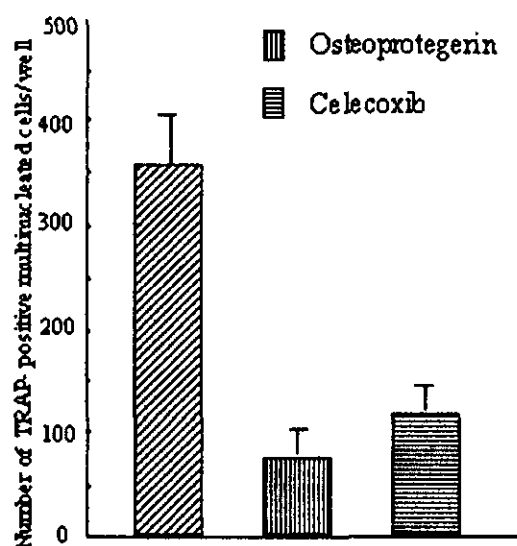


Figure 1-d 阻害剤の効果

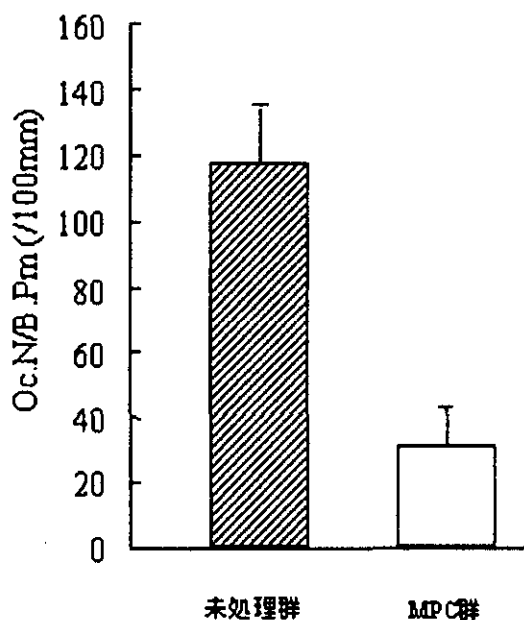


Figure 2 破骨細胞数

③ *in vivo* osteolysis model における検討

未処理の微粒子を移植したマウス calvaria では骨吸収が生じたが、MPC ポリマー微粒子を移植したマウス calvaria では骨吸収が見られなかった。

MPC ポリマー微粒子移植群における破骨細胞形成は、未処理微粒子暴露群の約 1/4 に抑制されていた (Figure 2)。

D. 考察

本研究では、MPC ポリマーの摩耗粉が人工関節周囲の骨吸収

(osteolysis)、弛み (loosening) に与える影響を検討するため、主任研究者 中村耕三が作製した MPC ポリマー処理したナノ微粒子を、*in vitro* osteolysis model、*in vivo* osteolysis model の実験系に導入して、研究を行った。

in vitro osteolysis model を用いた研究では、未処理微粒子を暴露した培養上清を用いた群では強力に破骨細胞の形成が誘導されたのに対し、MPC ポリマー処理微粒子を暴露した培養上清を用いた群では破骨細胞の形成が抑制されていた。また、この抑制効果は、骨吸収を誘導する抗サイトカイン抗体、NSAIDs の阻害剤、receptor of NF- κ B ligand (RANKL) の阻害剤を用いた場合の抑制効果と有意な差が見られなかった。近年、こういった抗体・阻害剤の内服による人工関節の弛み (loosening) の抑制という研究が

なされている。これらは確かに loosening を抑制するものの、人工関節が体内にある限り薬剤を一生飲み続ける必要があり、また薬剤自体の副作用の問題もある。人工関節摺動面の MPC ポリマー処理はこれらと同等の破骨細胞形成効果があり、かつ MPC ポリマーを用いた他の医療材料が認可をうけ臨床応用されるなど、生体内での安全性がすでに確認されており、有望な治療法と考えることができる。

in vivo osteolysis model を用いた研究では、MPC ポリマー処理/未処理微粒子をマウス calvaria 上に移植し、calvaria における破骨細胞数を測定すると、MPC ポリマー処理微粒子を移植した群では、破骨細胞形成が抑制された。

これらの *in vitro/ vivo* osteolysis model の結果は、MPC ポリマーの摩耗粉が人工関節周囲の骨吸収を惹起しないことを示唆するものと考えられる。

E. 結論

本研究の結果は MPC ポリマーの摩耗粉が人工関節周囲の骨吸収を惹起しないことを示唆するものであり、長寿命型人工関節の達成の可能性を強く支持するものである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung U, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Matsumoto M, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, and Kawaguchi H: Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* (in press).
2. Seto H, Fujii T, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Imamura T, Miyazono K, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, and Tanaka S: Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts: segregation of the roles of Smad pathways and p38 MAP kinase pathways. *J Clin Invest* (in press).
3. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, and Kawaguchi H: PPAR α insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* (in press).
4. Hoshi K, Ogata N, Shimoaka T, Terauchi Y, Kadowaki T, Kenmotsu S, Chung U, Ozawa H, Nakamura K, and Kawaguchi H: Deficiency of insulin receptor substrate-1 impairs skeletal growth through early closure of epiphyseal cartilage. *J Bone Miner Res* 19: 214-223, 2004.
5. Itaka K, Harada A, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K: In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *J Gene Med* 6: 76-84, 2004.
6. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, and Kato Y: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 503-508, 2004.
7. Koshizuka Y, Yamada T, Hoshi K, Ogasawara T, Chung U, Kawano H, Nakamura Y, Nakamura K, Ikegawa S, and Kawaguchi H: Cystatin 10, a novel chondrocyte-specific protein, may promote the last steps of the chondrocyte differentiation pathway. *J Biol Chem* 278: 48259-48266, 2003.
8. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung

- U, Fukuda A, Hikita A, Seto H, Okada T, Inaba T, Sanjay A, Baron R, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K, Strasser A, and Tanaka S: Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J* 22: 6653-6664, 2003.
9. Saegusa M, Murakami M, Nakatani Y, Yamakawa K, Katagiri M, Matsuda K, Nakamura K, Kudo I, and Kawaguchi H: Contribution of membrane-associated prostaglandin E₂ synthase (mPGES) to bone resorption. *J Cell Physiol* 197: 348-356, 2003.
10. Itaka K, Yamauchi K, Harada A, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K: Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly (ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials* 24: 4495-4506, 2003.
11. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, Nakamura T, Fukuda T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Aihara K, Yamamoto Y, Nakamichi Y, Metzger D, Chambon P, Nakamura K, Kawaguchi H, and Shigeaki Kato: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9416-9421, 2003.
12. Seichi A, Nakajima S, Takeshita K, Kitagawa T, Akune T, Kawaguchi H, and Nakamura K: Image-guided resection of the thoracic ossification of the ligament flavum. *J Neurosurg* 99: 60-63, 2003.
13. Ogihara S, Seichi A, Iwasaki M, Kawaguchi H, Kitagawa T, Tajiri Y, and Nakamura K: Concurrent spinal schwannomas and meningiomas. Case illustration. *J Neurosurg* 98: 300, 2003.
14. Seichi A, Nakajima S, Kitagawa T, Takeshita K, Iwasaki M, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K: Image-guided surgery for cervical disorders in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 12: 329-332, 2002.
2. 学会発表
1. 星地亜都司、竹下克志、川口浩、中島勲、阿久根徹、筑田博隆、中村耕三: 頸椎椎弓形成術後にみられるMRI 髄内変化の拡大 - 前向き研究

- ・ 第 32 回日本脊椎脊髄病学会。
2003. 4. 4-6 (福岡)。
2. 星地亜都司、中島勲、北川知明、竹下克志、阿久根徹、筑田博隆、川口浩、中村耕三: コンピューターナビゲーションシステムを用いた頸椎インストルメンテーション再手術。第 32 回日本脊椎脊髄病学会。2003. 4. 4-6 (福岡)
3. 川口浩、亀倉暁、池田敏之、池川志郎、中村耕三: Reverse & forward genetics を用いた変形性関節症の病態解明へのアプローチ。第 47 回日本リウマチ学会総会 (シンポジウム: 変形性関節症の発症機序と治療)。2003. 4. 24-25 (京王プラザホテル、東京)。
4. 位高啓史、原田敦史、山崎裕一、中村耕三、川口浩、片岡一則: fluorescence resonance energy transfer (FRET) を用いた polyethylenimine/DNA polyplex の細胞内挙動の観察。第 3 回遺伝子・デリバリー研究会。2003. 5. 9 (KKR ホテル東京、東京)。
5. 星地亜都司、竹下克志、川口浩、中島勲、阿久根徹、筑田博隆、中村耕三: 頸椎椎弓形成術後の上肢麻痺 - MRI による検討 -。第 76 回日本整形外科学会学術集会。2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、金沢)。
6. 竹下克志、星地亜都司、岩崎元重、阿久根徹、川口浩、中村耕三: 頸椎砂時計腫に対する片側椎弓・椎間関節切除に固定は必要か。第 76 回日本整形外科学会学術集会。2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、金沢)。
7. 阿久根徹、川口浩、緒方直史、星地亜都司、大西五三男、中村耕三: 脊椎後縦靭帯骨化症の骨化傾向と糖代謝関連因子の検討。第 76 回日本整形外科学会学術集会。2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、金沢)。
8. 松田浩一、井上耕一、阿久根徹、星和人、河野博隆、山川聖史、中村祐輔、中村耕三、川口浩: メカニカルストレスに反応して骨量維持に働く新規遺伝子 Znt5 (Zinc transporter 5) の単離と機能解析 (学会奨励賞受賞)。第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS・JSBMR 2003)。2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪)。
9. 池田敏之、馬淵昭彦、亀倉暁、福田明、平岡久忠、鄭雄一、川口浩、高取吉雄、滝川正春、木村友厚、須藤啓広、内田淳正、中村耕三、池川志郎: Sox9 による IX 型コラーゲン α 3 鎖遺伝子の転写誘導は変形性膝関節症の発症に関与する (学会奨励賞受賞)。第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS・JSBMR 2003)。2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪)。
10. 亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、鄭雄一、中村耕三、川口浩: マウス変形性関節症(OA)誘発モデルの確立とこれを用いた OA 発症における MMP-13 の関与。第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS・JSBMR 2003)。2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪)。
11. 池田敏之、亀倉暁、馬淵昭彦、関

- 庄二、黄郁代、筑田博隆、鄭雄一、木村友厚、川口浩、中村耕三、池川志郎：軟骨再生医療を目指した SOX9/SOX5/SOX6 の遺伝子同時導入による軟骨誘導. 第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
12. 大庭伸介、池田敏之、矢野文子、釘宮典孝、筑田博隆、高戸毅、中村耕三、Alex Lichter、川口浩、鄭雄一：COL1-GFP マーカー遺伝子導入による幹細胞から骨芽細胞への分化モニタリングシステムの開発. 第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
13. Hirotaka Chikuda, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Toru Akune, Hirotaka Kawano, Ken-ichi Kawano, Kozo Nakamura, Kajuro Komeda, Ung-il Chung, Hiroshi Kawaguchi: Dysfunction of cGMP-dependent protein kinase 2 causes dissociation of proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in Minature rat Ishilawa (Travel Award 受賞). IBMS-JSBMR 2003. 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
14. 位高啓史、原田敦史、山崎裕一、中村耕三、川口浩、片岡一則：Linear ポリエチレンイミンの高遺伝子発現メカニズム- FRET を用いた細胞内観察. 第 19 回日本 D D S 学会. 2003. 6. 19-20 (国立京都国際会館、京都).
15. Koichi Matsuda, Koichi Inoue, Kiyofumi Yamakawa, Hirotaka Kawano, Toru Akune, Kazuto Hoshi, Yusuke Nakamura, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Zinc transporter 5 (Znt5) is an essential molecule for mechanical stress signaling in bone (Young Investigator Award). 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
16. Takashi Yamada, Hirotaka Kawano, Toru Fukuda, K. Yoshimura, Takashi Nakamura, Satoru Kamekura, Ung-il Chung, Yu Koshizuka, Kozo Nakamura, Shigeaki Kato, Hiroshi Kawaguchi: Cystatin 10, a novel chondrocyte-specific protein, contributes to pathogenesis of osteoarthritis and ectopic ossification through chondrocyte calcification (Young Investigator Award). 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
17. Satoru Kamekura, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Ung-il

- Chung, Hirotaka Chikuda, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Establishment of novel experimental osteoarthritis models in mice. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
18. Toshiyuki Ikeda, Akihiko Mabuchi, Akira Fukuda, Satoru Kamekura, Ikuko Kou, S. Seki, Hisatada Hiraoka, Alira Kawakami, Seizo Yamamoto, Ung-il Chung, Yoshio Takatori, M. Takigawa, Hiroya Sakai, A. Sudo, A. Uchida, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, Shiro Ikegawa: Transcriptional induction of the gene encoding $\alpha 3$ chain of type IX collagen (*COL9A3*) by SOX9 contributes to the susceptibility of knee osteoarthritis. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
19. Toshiyuki Ikeda, Hiroshi Kawaguchi, Satoru Kamekura, Akihiko Mabuchi, I. Kou, Kazuto Hoshi, Kozo Nakamura, Shiro Ikegawa, Ung-il Chung: Combination of SOX5, SOX6 and SOX9 is sufficient for chondrogenesis. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
20. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩: 生体適合性に優れた人工材料・MPCによるナノ表面処理を用いた人工関節の弛緩防止—耐摩耗特性と摩耗粉に対する生体反応の評価—. 第18回日本整形学会基礎学術集会. 2003.10.16 (北九州国際会議場、小倉).
21. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩: ライナー表面のMPCポリマー処理は人工股関節のlooseningを抑制する. 第30回日本股関節学会学術集会. 2003.10.31-11.1 (ホテル日航東京、東京).
22. 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇: ポリエチレンライナー表面のMPCポリマー処理による人工関節の長寿命化. 第25回バイオマテリアル学会. 2003. 12. 16-17 (大阪国際会議場、大阪).
23. 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇: MPCポリマーによる関節摺動面のナノ表面処理は人工股関節の弛みを抑制する —長寿命型人工股関節の開

発一、第34回 日本人工関節学会、
2004.1.30-31 (幕張メッセ国際会
議場、千葉)

24. Moro, T; Takatori, Y; Ishihara,
K; Kawaguchi, H; Konno, T;
Takigawa, Y; Matsushita, T;
Yamawaki, N; Nakamura, K :
Grafting of biocompatible
polymer on the polyethylene
liner for improving longevity of
the artificial joints. 50th
Annual Meeting of the
Orthopaedic Research Society.
2004.3.6-10 (Moscone West
Convention Center, San
Francisco, California, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿総合研究事業）

分担研究報告書

MPC ポリマーでナノスケールの処理を施した PE ライナー表面の耐摩耗特性
— 股関節シミュレーターによる評価 —

分担研究者 安富義幸 （財団法人ファインセラミックスセンター試験研究所
副所長）
瀧川順庸 （財団法人ファインセラミックスセンター試験研究所
副主任研究員）

研究要旨：生体適合性ポリマーである MPC ポリマーでナノスケールの処理を施した PE ライナー表面を創製し、その耐摩耗特性を、股関節シミュレーターを用いて評価した。この結果、MPC ポリマー処理は、PE ライナーの摩耗を著しく抑制すること、股関節シミュレーター試験終了時も MPC ポリマー処理効果が残存することが明らかになった。また、MPC ポリマー処理効果は、滅菌のための γ 線処理による影響をうけなかった。本研究の結果により、長寿命型人工関節の開発が期待できる。

A. 研究目的

人工股関節置換術（THR）は、高齢者に多い大腿骨頸部骨折・変形性股関節症・関節リウマチ患者に対し、疼痛の改善、ADL・QOL の獲得に大きな役割を果たしており、その手術件数は年率約 8% の割合で増加している。しかしながら、手術後約 10 年で生じる弛み（loosening）は、常にその予後を決定する最大の合併症である。Loosening は人工関節周囲の骨吸収を伴い進行性であるため、再置換手術を余儀なくされ、人口の高齢化が進む我が国においてはその件数は今後増加し続けると予想される。したがって、

長寿命型の人工関節を開発することは、患者自身の ADL・QOL、医療費の問題、労働力という社会資本を考えた場合、医療行政における緊急かつ重要な検討課題である。

Loosening は関節摺動面を構成するポリエチレン（PE）の摩耗粉をマクロファージ（MΦ）が貪食して液性因子を分泌し、これが破骨細胞の形成・活性化を促進して人工関節周囲の骨吸収が生じる結果として発生する。そこで我々は、loosening の抑制を達成するため、生体適合性ポリマーである MPC ポリマーでナノスケールの処理を施した PE 表面を創製した。

我々はこれまでの先行研究で、摺動面の MPC ポリマー処理が、摺動面に潤滑性を付加することを明らかにしてきた。しかしながら、実際の生体内における使用条件下では、人工関節の摺動面には周期的に体重の数倍の負荷がかかるという厳しい条件にさらされることとなる。本研究の目的は、より生体に近い環境下で行うため、生体内の歩行周期を再現した股関節シミュレーターを用い、MPC ポリマーでナノスケールの処理を施した PE 表面の耐摩耗性の評価を行うことである。

B. 研究方法

1. 摩耗試験は MTS 社製の Multi-Station Hip Simulator (図 1-A,B) を用いて行った。

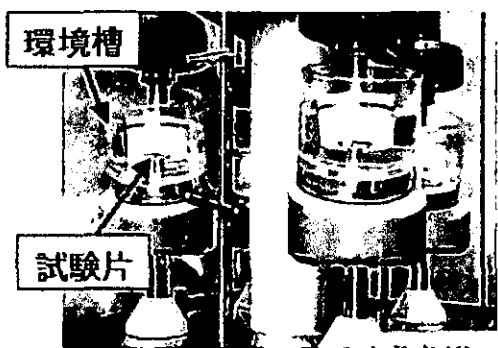
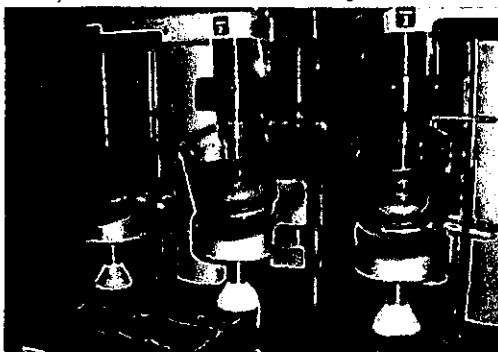


図 1-A,B シミュレーターの外観

PE ライナー (K-MAX®) およびクロスリンク PE ライナー(K-MAX Excellink®)は、神戸製鋼所の製品を使用した。ライナー表面を MPC ポリマー処理し、対照には未処理ライナーを用いて直径 22 mm のコバルトクロムモリブデン合金製骨頭との間で試験を行った。臼蓋カップの直径は 42 mm であり、PE ライナーの厚みは 10 mm とした。試験条件は ISO/DIS 14242-1 に準じ、潤滑液に 25%牛血清を用い、毎秒 1 回の歩行周期 (1Hz) に 183 kgf と 280 kgf の 2 つのピークをもつ Double Peak Paul の

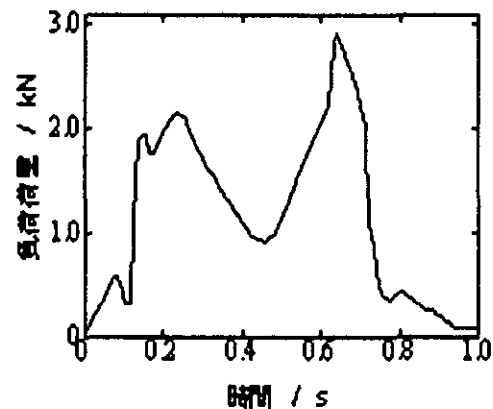


図 1-c 荷重波形

歩行条件で (図 1-C) 、300 万サイクルの連続試験を行った。

50 万サイクル毎に潤滑液の交換とライナーの回収を行い、ライナーの乾燥重量の変化から、ライナーの摩耗量を計測した。

2. 長寿命型人工関節が実際に生体に使用される場合、2.5 Mrad の γ

線滅菌処理を行う必要があり、この処理により MPC ポリマーが影響を受ける可能性が危惧された。そこで、MPC ポリマー処理をしたライナー表面に γ 線を用いて滅菌を行い、1. と同じ条件下でシミュレーター試験を行った。なお、滅菌操作後のライナー表面の性状については分担研究者の石原一彦が本報告所内で報告しているが、XPS による解析で、滅菌操作の前後で MPC ポリマーの性状に変化はみられなかった。

C. 研究結果

1. 300 万サイクル終了時の PE の摩耗量は 79.935 mg、クロスリンクポリエチレン (CL-PE) の摩耗量は 9.720 mg であり、PE のクロスリンクによりライナーの摩耗が抑制されていたがこの CL-PE 表面を MPC ポリマー処理すると 2.560 mg と、さらに摩耗量が約 1/4 に抑制された (図 2-A)。

50 万サイクルごとの摩耗量を、MPC ポリマー処理 CL-PE と未処理 CL-PE で比較すると、未処理群では徐々に摩耗量が増加したのに対し、MPC ポリマー処理群では摩耗量の約 60% が試験開始後 100 万サイクルに集中しており、徐々に摩耗量が減少していた。試験終了直前の 50 万サイクル (250 ~ 300 万サイクル) の MPC 処理群の摩耗量は、未処理群の約 1/10

で、試験終了時にも MPC ポリマー処理効果が残存していた (図 2-B)。

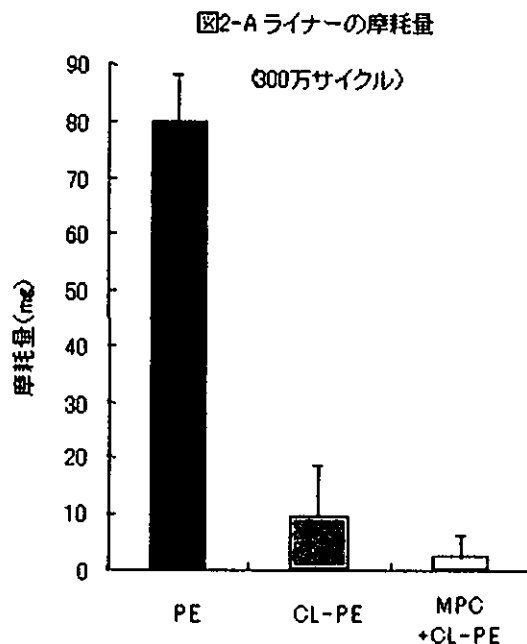
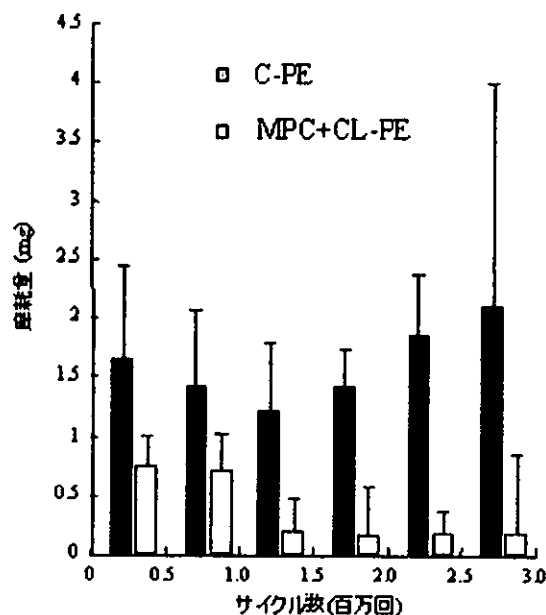


図 2-B 50 万サイクル毎の摩耗量の比較



2. 1. の結果を解析し、ライナーの MPC ポリマー処理を行う際、分子