

200400076A

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

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と

臨床応用に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中村 耕三

平成 17 年 (2005) 年 3 月

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

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と  
臨床応用に関する研究  
平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中村 耕三

平成 17 年 (2005) 年 3 月

# 目 次

I.総括研究報告書 .....	1
皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究 .....	1
中村耕三	
II.分担研究報告 .....	8
1. 皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究 .....	8
中村耕三	
2. 皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究 .....	16
高戸 毅	
3. 皮膚の多能性幹細胞の単離・培養と性状解析 .....	21
大河内仁志	
4. 皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究 .....	24
片岡 一則	
5. 骨軟骨細胞増殖・分化に関わる担体の開発 .....	32
岡野 光夫	
6. 皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究 .....	43
川口 浩	
7. 皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究 .....	51
鄭 雄一	
8. 皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究 .....	54
星 和人	
III.研究成果の刊行に関する一覧表 .....	57
IV.研究成果の刊行物・別刷 .....	61

厚生労働省科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
総括研究報告書

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究

主任研究者 中村耕三 東京大学大学院医学系研究科・整形外科教授

研究要旨

本研究は、量的限界のある骨髄間葉系幹細胞を細胞源とした従来の骨・軟骨誘導法に代わり、骨・軟骨分化に必要な十分なシグナル伝達系を確定し、採取が容易で増殖能も高い皮膚線維芽細胞に骨・軟骨分化を誘導し、これを移植することで、新しい骨・軟骨再生治療法を確立することを目的としている。さらに、遺伝子導入における安全性を高めるためナノミセルテクノロジーを用いた人工ウイルスの開発を行い、担体による異物反応や狂牛病などの交差感染を防ぐため細胞シート工学を応用した担体なしの移植片作製法も確立する計画である。平成16年度は本年度の研究課題である、

- 皮膚からの再生用細胞採取・培養法の開発
- 骨・軟骨分化に十分なシグナルの解析
- 人工ウイルスによる遺伝子導入法の開発
- 皮膚線維芽細胞による細胞シート作製法の開発
- 骨・軟骨欠損小動物モデル（マウス・ラット）の作製と長期自然経過の基礎データ収集

を全て達成した。

分担研究者氏名・所属施設名および職名

高戸 毅  
東京大学大学院医学系研究科口腔外科・教授

大河内 仁士  
国立国際医療センター研究所細胞組織再生医学研究部再生医学・部長

片岡 一則  
東京大学大学院工学系研究科ナノ工学・教授

岡野 光夫  
東京女子医科大学先端生命医科学研究所生体材料工学・教授・所長

川口 浩  
東京大学大学院医学系研究科整形外科・助教授

鄭 雄一  
東京大学大学院医学系研究科骨再生医療・助教授

星 和人  
東京大学大学院医学系研究科軟骨再生医療・助教授

A. 研究目的

高齢化社会の到来とともに、骨・軟骨の加齢性疾患は社会経済的に大きな問題となっている。例えば、骨粗鬆症による骨折は高齢者寝たきりの原因第二位であり、歯周病による顎骨萎縮では65歳以上の30%以上が無歯顎となり、関節軟骨の老化疾患である変形性関節症は人口の10%近くが罹患し、多くの高齢者のQOLを著しく損なっている。また老化とともに悪性腫瘍は増加するが、頭頸部腫瘍切除後の、顎・顔面・口腔機能の低下も患者のQOLを著しく低下させている。

これらに対処すべく、組織工学的手法による骨・軟骨組織の再建や、自家及び他家骨・軟骨移植、また近年は骨髄間葉系幹細胞を用いた骨・軟骨再生法等が試みられているが、いずれも問題を解決するには至っていない。特に骨髄間葉系幹細胞から骨・軟骨細胞を誘導する手法は、最近の再生医学の発展とともに大いに期待されて研究されてきたが、分化能を保持して十分量の細胞を得ることは困難で、臨床上十分満足できるような質と量を兼ね備えた骨・軟骨産生法は未だ実現していない。

本研究は、量的限界のある骨髄間葉系幹細胞を細胞源とした従来の骨・軟骨誘導法に代わり、骨・

軟骨分化に必要な十分なシグナル伝達系を確定し、採取が容易で増殖能も高い皮膚線維芽細胞に骨・軟骨分化を誘導し、これを移植することで、新しい骨・軟骨再生治療法を確立することを目的としている。さらに、遺伝子導入における安全性を高めるためナノミセルテクノロジーを用いた人工ウイルスの開発を行い、担体による異物反応や狂牛病などの交差感染を防ぐため細胞シート工学を応用した担体なしの移植片作製法も確立する計画である。

## B. 研究方法

### 皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

術前に承諾の得られた摘出皮膚 (n=5, 40-75歳) およびマウス (CD57BL/6J) の皮膚を用いた。皮膚は細切し、Hanks Balanced Solution (HBSS) で洗い、0.1%トリプシン溶液にて 37℃ 60 分静置した。さらに機械的に細切し、trypsin neutralizing solution (TNS) でトリプシンを中和した。細胞はフィルターで濾過し、遠心にて回収した。培養には 2% B27 supplement を含む DMEM/F12 培地を使用し、表皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor:EGF) を最終濃度 20ng/ml、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor:bFGF) を 10ng/ml となるように添加し CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37 度 5%CO<sub>2</sub> の条件下、浮遊系培養皿で 2 週間培養した。スフェアの形成数およびスフェア 1 個当たりの大きさを検討した。

### 脂肪組織から多能性幹細胞の分離・培養

脂肪組織はコラゲナーゼ処理を行い、遠心すると脂肪細胞は浮遊するので沈殿分画の間葉系幹細胞を分離した。まず FBS 添加 DMEM 培地で T25, T75 の培養皿に培養した。1-3 回継代後、前述の無血清培地で sphere を形成させた。

### 分化条件下における分化マーカーの検討

形成したスフェアを、EGF、bFGF を除いた 1%ウシ血清を含む DMEM/F12 培地で 1-2 週間培養して分化を誘導し、ニューロンのマーカーの  $\beta$  III Tubulin、MAP2、平滑筋のマーカーの  $\alpha$  SMA、脂肪滴を染色する Oil red O を用いて免疫染色を行い各種抗体の陽性細胞の割合を検討した。

### 骨・軟骨の分化増殖に異常を来たす疾患の原因遺伝子の解析 (必要因子の検索)

自然発症の低身長ラットである KMI ラットに着目して、その異常を候補遺伝子解析の手法で検討した。その原因遺伝子が、cGKII であることを同定した。現在ノックアウトマウスを解析中であり、ヒトにおける低身長の原因である可能性を現在検索中である。

### 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす遺伝子の発現ベクター (プラスミド、アデノウイルス、レトロウイルス) の作製とその発現実験

骨分化に関しては、BMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2 シグナルの刺激性あるいは抑制性因子を発現するアデノウイルス及びプラスミドを作製し、軟骨分化に関しては、BMP・IRS・Wnt・TGF- $\beta$ ・Sox シグナルの刺激性あるいは抑制性因子を発現するアデノウイルス及びプラスミドを作製し、その mRNA・蛋白発現・蛋白活性を解析した。

### 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす遺伝子の過剰発現あるいはノックアウトによる、試験管内及び動物モデルの作製とその解析

刺激性 G 蛋白・cGKII・IRS-1・SRC-1 などの因子の、試験管内における Gain-of-function 及び Loss-of-function 実験を行うとともに、そのノックアウトマウスを解析した。

### 人工ウイルスによる遺伝子導入法の開発

#### 1) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの構造最適化

ポリエチレングリコール-ポリ(L-リジン) (PEG-PLL) ブロック共重合体に対し、PLL 側鎖アミノ基の一部をスルフヒドリル基 (SH 基) で置き換えジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内環境変化 (グルタチオン濃度の上昇) に応答して内包 pDNA を制御放出するインテリジェントナノミセル型遺伝子ベクターを構築した。

#### 2) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの機能検証

インテリジェントナノミセル型遺伝子ベクターの細胞内機能は、ルシフェラーゼをコードした pDNA の発現効率から評価した。主として in vitro においては培養 293T 細胞、in vivo においてはマウスの尾静注によりレポーター遺伝子を投与し、肝臓での

遺伝子発現により評価した。また架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターの静脈内投与におけるpDNAの血中安定性をサザンブロット法により評価した。さらに in vivo と in vitro での機能相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試みた。

### 3) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの凍結乾燥製剤化の検討

遺伝子ベクターの臨床応用への展開を考慮した場合には、保存安定性や投与量の幅広い選択性などの製剤学的要件の満足が必要であり、凍結乾燥製剤化が望まれるため、凍結乾燥前後における遺伝子発現効率を株化細胞実験により、また粒径測定を動的光散乱によって評価した。

### 4) 細胞内移行促進機能を有するナノミセル型遺伝子ベクターの構築

本システム構築のため、ブロック共重合体へ細胞内移行促進セグメントを導入した。具体的には PEG-ポリ(β-ベンジルアスパルテート)(PEG-PBLA)ブロック共重合体の側鎖のベンジル基に対する定量的アミノリシスによって、pKa や疎水性などの異なる各種アミノ基を導入する方法を確立し、この手法で合成した種々のブロック共重合体から DNA 内包ナノミセル型遺伝子ベクターを調製した。

### 5) A-B-C 型トリブロック共重合体の合成

全身投与が可能なベクター系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファー効果により細胞内移行能を賦与する pKa の低いポリカチオン、DNA を効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有する A-B-C 型トリブロック共重合体を新規に合成した。

### 6) A-B-C 型トリブロック共重合体によって構築された遺伝子ベクターの担ガンマウスによる in vivo 評価

固形ガン(マウス大腸ガン C-26 細胞)を皮下移植したマウスに対し、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターを尾静脈内投与し、腫瘍部位での遺伝子発現を評価した。

### 7) 表層にリガンド分子を結合した高分子ナノミセル型遺伝子ベクターの構築

リガンドを導入するための反応性基として従来のアセタール基に加え、脱保護に伴う二量化反応が惹起されないベンジルアセタール基を片末端に導入した PEG を合成し、アセタール基およびベンジルアセタール基とポリアミノ酸側鎖の選択的脱保

護を実現するために、温和なアルカリ条件で脱離可能な保護基を有するアミノ酸誘導体(例:ε-トリフルオロアセチル-L-リシン酸無水物)を PEG 末端から重合させた。これにより、従来法では困難であったブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することを試みた。

### 骨軟骨細胞増殖・分化に関わる担体の開発

生分解性高分子性細胞担体としてはポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体、フィブリンゲルを評価した。ポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体は合成直後の状態では非常に疎水性が高く細胞接着性、組織親和性が非常に低いため、アルカリ処理により表面の親水化をおこなった。これらはラット背部ないし腹部皮下に移植し、移植部位の炎症など異物反応を組織学的に評価した。

### 皮膚線維芽細胞シート作製法開発

皮膚線維芽細胞に関しては、上記の用に分離した細胞を、コラーゲンフィルム(高研社製)上に播種し、FBS添加DMEM培地中でコンフルエントになるまで培養下のち、フィルムごと分離し、増殖・分化・基質産生に影響を及ぼすかを分子生物学的・組織学的に評価した。

また、また代替技術として、培養骨膜細胞シートを安定して作製する培養条件を最適化し、生化学的、組織学的に評価すると共に、ラット頭頂骨骨欠損部位に移植した。培養骨膜細胞シートの回収には温度応答性培養皿を用い、低温処理(20℃)により回収した。

### 運動器骨軟骨欠損動物モデルの作製

マウスおよびラットの四肢に臨界骨・軟骨欠損を作製し、放射線学的(X線写真、CT)に1、2、3週間、1、2、3、4、5、6ヶ月とフォローした。

1. 臨界骨欠損モデルでは、マウス及びラット頸骨の中央部3分の1を切除した。
2. 臨界軟骨欠損モデルでは、マウスおよびラットの膝関節軟骨に歯科用ドリルで2mmの円形の穴を全層または半層に穿ち、その時間経過を追った。

### 頭頸部顎顔面骨軟骨欠損動物モデルの作製

マウスおよびラットの頭蓋・顎顔面領域に臨界骨・軟骨欠損を作製し、放射線学的(X線写真、CT)に1、2、3週間、1、2、3、4、5、

6ヶ月とフォローした。

1. 臨界骨欠損モデルでは、マウス及びラットの頭頂骨に4-5mmの骨欠損を作製した
2. 臨界軟骨欠損モデルでは、マウス及びラット耳介軟骨の中央部3分の1を切除した。

#### 「倫理面への配慮」

研究に用いたヒト皮膚および脂肪組織は術前に同意を得た手術標本の一部を使用した。動物実験には齧歯類を用いたが、各研究機関の実験動物委員会の規則に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して十分な倫理的および動物愛護上の配慮のもとに実験を行った。

#### C. 研究結果

マウス皮膚より浮遊培養系を用いて、sphereを形成させ、半年以上の長期継代に成功した。ヒト真皮由来の細胞はマウスに比べると増殖が遅く、sphereの形成率も低かった。そこでまず10%FBS添加DMEM中で接着培養して細胞数を増やすことができたが、同時に角化細胞の増殖もみられた。トリプシンに対する感受性の違いにより継代時にほとんどの角化細胞を除くことは可能であった。接着培養で増やした細胞を浮遊培養にしたところ、sphereの形成率はみられたが、継代により増殖力の低下がみられ、4-5代で増殖が停止した。脂肪組織由来の細胞はコラゲナーゼ処理により成熟脂肪細胞と間葉系幹細胞の分離は容易にできた。ただ初代培養においては紡錘形の細胞に混じって数石状の細胞増殖もみられ、内皮細胞の可能性が示唆された。脂肪組織由来の細胞は長期継代が可能で、骨芽細胞誘導培地にかえるとアルカリフォスファターゼ陽性細胞が多数出現し、4週間後にはカルシウム沈着もみられた。また脂肪細胞誘導培地にてOil Red Oに染まる脂肪滴を含んだ脂肪細胞の分化がみられた。真皮と同様にsphereを形成させて、神経分化条件にするとβIII Tubulin、MAP2陽性細胞が出現した。

KMI ラットの低身長の原因遺伝子が、cGKIIであることを同定した。BMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2シグナルの刺激性あるいは抑制性因子を発現するベクターの作製に成功し、その発現を確認した。刺激性G蛋白・cGKII・IRS-1・SRC-1が、正常な骨・軟骨の分化増殖に必須の因子で

あることを明らかにした。

PEG-PLLブロック共重合体に対し、2種類のSH基導入法(SPDP試薬と2-イミノチオレン試薬による方法)を試み、いずれにおいても導入率を制御してSH基を導入することが可能であった。前者ではSH基の導入により荷電密度が減少し、後者では荷電密度が維持される。これらの手法によりジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内環境変化(グルタチオン濃度の上昇)に応答して内包pDNAを制御放出するインテリジェントナノミセル型遺伝子ベクターを構築した。

架橋高分子ナノミセル型遺伝子ベクターは、細胞外では内包pDNAを安定に保持する一方、細胞内還元環境下では架橋の解離に伴うpDNAの放出制御を通じて、非架橋ナノミセル型遺伝子ベクターに比較して一桁以上高い発現効率を実現した。さらにナノミセル型遺伝子ベクターを構成するブロック共重合体の連鎖長ならびにジスルフィド架橋導入率と構造安定性、遺伝子発現能との間の構造-機能相関を明らかにするための系統的な研究を行い、ナノミセル型遺伝子ベクター内において有効なDNA凝縮を惹起するための臨界鎖長が存在することを明らかにし、DNA凝縮構造の形成と遺伝子発現活性との間の相関も見出した。また架橋導入率には最適値が存在し、その値が細胞種によって異なることも明らかにした。これは細胞内におけるグルタチオン濃度の差などに起因するものと考えられるが、これより架橋導入率の精密な制御によって、特定の細胞集団に遺伝子発現を誘導出来ることを示した。

培養細胞系において良好な遺伝子発現を示した細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターのin vivo機能評価においては、マウスの尾静脈投与によって、肝臓実質細胞に様にレポーター遺伝子を発現させ得ることに成功した。また血管壁への遺伝子導入においては、内皮細胞への遺伝子導入が可能であることを実証した。これらの結果を受け、in vivoとin vitroでの機能相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試み、時間依存的に遺伝子導入が可能であることを見出している。これは、非分裂期にある細胞への遺伝子導入がナノミセル型遺伝子ベクターを用いて行えることを示した点で特筆すべきものであり、ナノミセル型遺伝子ベクターの細胞内核移行についても新しい知見を与えることが期待される。

本システムの臨床応用に向けては、保存安定性や投与量の幅広い選択性などの製剤学的要件の満足が必要であり、凍結乾燥製剤化が望まれるが、ナノミセル型遺伝子ベクターは凍結乾燥に伴う粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められず、将来の臨床展開においても極めて有利な形態であることが明らかとなった。

さらに架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターの静脈内投与における pDNA の血中安定性をサザンブロット法により評価した結果、架橋導入率の上昇に伴う pDNA の血中安定性の向上が確認された。ナノミセル型遺伝子ベクターへの架橋導入は、内包 DNA の血中安定性を向上させるために極めて有用であると考えられる。さらに適用可能な投与方法を拓げる目的で、ナノミセル型遺伝子ベクターの気管内投与を行い、肺における遺伝子発現を評価した。その結果、ナノミセル型遺伝子ベクターは、非架橋ナノミセル型遺伝子ベクターや市販の遺伝子導入試薬であるポリエチレンイミンと比較して、顕著に高い遺伝子発現を導くことに成功した。この様に、架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターは、系中に遊離ポリカチオンを含まないために極めて毒性が低く、*in vivo* 遺伝子導入に適した構造と性能を有することが明らかとなった。

PEG-PBLA ブロック共重合への定量的アミノリシスによって、側鎖構造単位に高 pKa (−9) と低 pKa (−7) の2種類のアミノ基を有する系がスムーズな細胞質移行を示し、良好な遺伝子発現を導くことを見出した。すなわち一つのカチオン性ユニットへ構造の異なる二種類のアミノ基を導入することにより、DNA とのコンプレックス形成とエンドソーム内 pH 低下を防ぐバッファー効果とを両立させる機能分担型の分子設計が合目的性を有することが明らかになった。

また、これらの側鎖に2種類のアミノ基を有するブロック共重合体の中でも、ジエチレントリアミン (DET) を導入したブロック共重合体 (PEG-DET) が、細胞毒性を示すことなく極めて効率的な遺伝子導入を示すことを明らかにした。市販の遺伝子導入試薬は、初代培養細胞に対して顕著な細胞毒性を示したが、PEG-DET は種々の初代培養細胞 (骨芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞) に対して細胞毒性を示すことなく高効率の遺伝子発現を導いた。PEG-DET の遺伝子導入メカニズムに関しては、今後さらなる検討が必要であるが、低毒性と効率的な遺伝子発現を実現した人工遺伝子ベクターとして高い有用性が期待される。

上記の知見に基づいて、さらに、経静脈全身投与が可能なベクター系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファー効果により細胞内移行能を賦与する pKa の低いポリカチオン、DNA を効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有する A-B-C 型トリブロック共重合体を新規に合成した。トリブロック共重合体は、DNA を凝縮した内核、バッファー能を有する中間層、生体適合性の PEG 外殻からなる3層構造を形成し、培養細胞実験において従来の PEG-PLL の50倍以上の遺伝子導入効率を実現した。

さらに固形ガン (マウス大腸ガン C-26 細胞) を皮下移植したマウスに対し、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターを尾静脈内投与した結果、腫瘍部位での選択的かつ効率的な遺伝子導入が確認された。対照的に pDNA のガン組織への直接注射においては、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターの10分の1以下の遺伝子発現しか確認されず、市販の遺伝子導入試薬では投与した全てのマウスの死亡が確認された。人工遺伝子ベクターの静脈内投与により大腸ガンに遺伝子発現を認めたのは、世界的に見てもこの研究が初めての例であり、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターは全身投与による *in vivo* 遺伝子治療を実現する遺伝子デリバリーシステムとしての展開が期待される。

7) 表層にリガンド分子を結合した高分子ナノミセル型遺伝子ベクターの構築

これまでの研究により、遺伝子 DNA やオリゴ核酸を効率良く搭載し、高い生理機能を発現するナノミセル型遺伝子ベクターの構造設計が確立したことを受け、ナノミセル型遺伝子ベクター表層へのリガンド分子装着のための分子設計として、 $\alpha$ -末端に各種のパイロット分子を結合可能なブロック共重合体の新規合成ルートの確立を行った。この場合、数種類の化学反応による修飾を多段階に重ねるという制約のために、リガンドを担持したブロック共重合体の合成は一般には困難を伴うが、既に確立していた合成経路を抜本的に見直し、各々の反応操作が互いに干渉しない新規合成経路を探索することによって、効率良くリガンド導入ブロック共重合体を合成する経路の構築に成功した。これにより、従来法では困難であったブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することに成功した。

この結果、表層にラクトースを導入したナノミセル型遺伝子ベクターが、ラットより調製し



た初代培養肝実質細胞に対して、高い遺伝子発現効率を示すことを確認した。さらに血管内皮細胞や平滑筋細胞など多くの細胞に発現が認められるインテグリンに対して特異的結合能を有する RGD ペプチドを表層に導入したナノミセル型遺伝子ベクターを構築した。RGD ペプチド導入ナノミセル型遺伝子ベクターを、ウサギ頸動脈バルーン擦過モデルの内膜肥厚を形成している動脈壁に対して局所投与を行ったところ、従来のシステムと比較して10倍以上高い遺伝子導入効率を実現された。これによりナノミセル型遺伝子ベクターに導入したリガンド分子が生体内においても有効に機能することを確認した。

ラット皮下に移植した、生分解性高分子性細胞担体はいずれも、分解にともなって強い炎症反応を惹起した。このような炎症反応は軽度あれば毛細血管網の誘導等で、組織再生に関して優位にはたらくことが期待される。実際に、毛細血管網の誘導が生じることを組織学的に明らかにした。しかし、極少数の幹細胞を播種して移植するような系では、強い炎症反応により移植した幹細胞が障害を受けることが懸念される。現在、炎症にともなう移植した細胞に対する細胞障害を定量的に計量化する実験を、引き続き展開している。

アルカリ処理により、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および両者の共重合体の表面を大きく親水化できることが明らかになったが、同時に表面の分解性も著しく増加し、より強い炎症反応が生じることが分かった。今後、アルカリ処理条件の最適化が必要である。

アテロコラーゲンフィルム上に、ヒト皮膚線維芽細胞シートを作製することに成功した。皮膚線維芽細胞を含む間葉系の細胞は、これまで細胞シートに用いられてきた上皮系あるいは筋肉の細胞と異なり、基質を多く産生しその中に埋入しているため、従来のコーティングでは剥離が困難であることが判明した。対処方として、薄いアテロコラーゲンフィルムを底に敷くことで、細胞シートを一塊として取り出すことができた。この細胞シート上で、皮膚線維芽細胞は通常の培養皿と同等によく増殖し、骨分化を誘導した際の分化マーカーおよび石灰化基質の産生も全く遜色なかった。コラーゲンフィルム以外でも、PLGA の不織布でも、同様の良好な結果が得られた。

ラット頭頂骨骨膜より採取した骨膜細胞を酵素処理し初代培養に供した後、継代した2代

目培養骨膜細胞を温度応答性培養皿に播種すると、コンフルエント到達後、低温処理のみで培養骨膜シートとして回収できる条件を確立した。細胞シート中に含まれる培養骨膜細胞をアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色すると、多数の ALP 陽性細胞が確認された。この観察は、本細胞シート内には骨芽細胞の分解時に必要なニッチェとしての条件を最低限有する細胞外マトリックス環境が培養の間に構築されていることを強く示唆している。ラットへの移植実験からは、本細胞シートは、生分解性高分子性担体のような強い炎症反応などの異物反応を惹起しない（少なくともきわめて軽微である）ことが明らかになっており、本細胞シートを新規幹細胞担体として活用しうる可能性を強く示唆している。

脛骨臨界骨欠損モデルでは、放射線学的には、6ヶ月経過しても明らかな治癒は認められなかった。膝関節臨界軟骨欠損モデルは現在経過観察中である。

頭頂骨臨界欠損モデルでは、放射線学的には、術後3ヶ月程度までは自然治癒がなかったが、それ以降若干の骨形成が辺縁から起こることが観察された。耳介軟骨欠損モデルは現在経過観察中である。

#### D. 考察

マウス皮膚より得られるスフェアの形成数は加齢により、減少することを確認している。ヒトの細胞が sphere を形成しにくかったことの原因として、今回用いたドナーの年齢が影響した可能性が考えられる。今後さらに数を増やして検討する予定である。また初代培養では純粋な幹細胞分画を得ることが難しいので、FACS による細胞分取法の検討もこれから必要となる。血清存在下では真皮に比べて脂肪組織由来の細胞は比較的増殖能が保たれた。脂肪組織は採取しやすいという利点があるので、無血清の条件でのさらなる検討が必要である。また分化条件下の培養により多分化能を証明した。本来接着細胞を浮遊状態にして培養している。脱分化しやすくなっている可能性も否定できない。またアポトーシスが抑制された可能性もある。このメカニズムの解明は細胞の可塑性を考える上で非常に重要である。また皮膚組織から皮膚以外の細胞を誘導できる可能性が示唆されたので、自己の細胞を使った再生医療に応用する道がひらける。今後分化効率を高める研究をすすめれば、幹細胞ソースとして皮膚

を用いることができると考えられた。

CGKII は、骨・軟骨を制御する重要な因子である可能性が高く、その活性を制御することで、骨・軟骨分化誘導をより効率的に調節することができるかもしれない。

本研究では実際の治療に用いることが可能な人工遺伝子ベクターを開発するためインテリジェント化ブロック共重合体の分子設計を行い、高機能化ナノミセル型遺伝子ベクターを構築するとともに、レポーター遺伝子をコードするプラスミド DNA を内包する高機能化ナノミセル型遺伝子ベクターの *in vitro* 及び *in vivo* 機能評価を通じて、特に後者においてマウス尾静脈投与により肝臓実質細胞、気管内投与により肺、ラットを用いた血管壁への遺伝子導入により血管内皮細胞における遺伝子発現を確認した。また3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターの尾静脈投与により、固形ガン(マウス大腸ガン C-26 細胞)を皮下移植したマウスの腫瘍部位において選択的かつ効率的な遺伝子導入が確認された。人工遺伝子ベクターの静脈内投与により大腸ガンに遺伝子発現を認めたのは、世界的に見てもこの研究が初めての例である。さらに、より高い標的細胞指向性を兼ね備えた高機能化遺伝子ベクターとして RGD ペプチド導入ナノミセル型遺伝子ベクターを構築し、ウサギ頸動脈バルーン擦過モデルの内膜肥厚を形成している動脈壁に対して局所投与を行ったところ、従来のシステムと比較して10倍以上高い遺伝子導入効率を実現された。

並行して行われたナノミセル型遺伝子ベクターの凍結乾燥製剤化に関する検討により、凍結乾燥の前後で粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められず、将来の臨床展開においても極めて有利な形態であることが明らかとなった。

骨膜由来細胞シート内の細胞外マトリクスを単独で、あるいは生分解性高分子性担体と組み合わせて活用することにより、従来法ではえられなかった生体親和性が高く、幹細胞維持能を有する新規担体が開発しうる事が示唆された。

上皮系でない皮膚線維芽細胞のような場合でも、サポートとなる膜状物質を加えることで、細胞シートを回収できる可能性が示された。

骨軟骨欠損動物モデルによっては完全な不可逆性欠損でないことがあるので、観察期間やコントロールに注意する必要がある。

## E. 結論

皮膚から皮膚以外の細胞に分化する多能性幹細胞を単離・培養することができた。

新たな骨・軟骨分化制御因子を同定し、またそれらの因子の詳細な作用を明らかにした。

上記の通り、複数のインテリジェント機能を融合させたマルチ機能性ブロック共重合体の精密な分子設計により、高機能化インテリジェント高分子ナノミセル型遺伝子ベクターの構築が可能となり、*in vitro* 及び *in vivo* の評価により、本システムを高い臨床応用性を有する人工遺伝子ベクターシステムとして位置づけることが出来ることが明らかとなった。

アテロコラーゲンフィルム上に、ヒト皮膚線維芽細胞シートを作製することに成功し、細胞がその機能を維持していることが明らかとなった。また、骨膜由来細胞シートの新規担体としての有効性を期待しうる結果を得ることができた。

臨界骨・軟骨欠損モデルの長期の自然経過を明らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

分担研究報告書参照

## H. 知的財産権の出願・登録状況

分担研究報告書参照

厚生労働省科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究

分担研究者 中村耕三（東京大学大学院医学系研究科・整形外科 教授）

研究要旨

運動器骨・軟骨欠損小動物モデルの作成と長期自然経過を明らかにした。

A. 研究目的

臨床的に有用な再生医療を開発するためには、使用する動物モデルが妥当に使われているかの検証が重要である。従来げっし類が骨軟骨欠損モデルによく使われているが、彼らの再生能力は旺盛であり、ともすれば自然治癒を観察している可能性があった。今回、自然治癒がどのくらい起こるかを目的として、分担研究者の川口とともにマウスとラットに骨・軟骨欠損モデルを作成し、その自然経過を追うこととした。

B. 研究方法

マウスおよびラットの四肢に臨界骨・軟骨欠損を作製し、放射線学的（X線写真、CT）に1、2、3週間、1、2、3、4、5、6ヶ月とフォローした。

1. 臨界骨欠損モデルでは、マウス及びラット頸骨の中央部3分の1を切除した。
2. 臨界軟骨欠損モデルでは、マウスおよびラットの膝関節軟骨に歯科用ドリルで2mmの円形の穴を全層または半層に穿ち、その時間経過を追った。

C. 研究結果

1. このモデルでは、放射線学的には、6ヶ月経過しても明らかな治癒は認められなかった。
2. このモデルは現在経過観察中である。

D. 考察

モデルによっては完全な不可逆性欠損でないことがあるので、観察期間やコントロールに注意する必要がある。

E. 結論

臨界骨・軟骨欠損モデルの長期の自然経過を明

らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。

F. 健康危険情報

主任研究者が一括して報告。

E. 研究発表

1. 論文発表

Takeshita K, Seichi A, Akune T, Kawamura N, Kawaguchi H, and Nakamura K: Can laminoplasty maintain the cervical alignment even when the C2 lamina is contained. *Spine* (in press).

Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, and Nakamura K: Distinct osteogenic mechanisms of bone of distinct origins. *J Orthop Sci* 9: 410-414, 2004.

Moro T, Ogasawara T, Chikuda H, Ikeda T, Ogata N, Maruyama Z, Komori T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Okayama H, and Kawaguchi H: Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol* (in press).

Anamizu Y, Kawaguchi H, Seichi A, Yamaguchi S, Kawakami E, Kanda N, Matsubara S, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nakamura K, and Oyanagi K: *Klotho* insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells. *Acta Neuropathol* (in press).

Shoda N, Takeshita K, Seichi A, Akune T,

- Nakajima S, Anamizu Y, Nakamura K: Measurement of occipitocervical angle. *Spine* 29: 204-208, 2004
- Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, and Chung UI: Combination of SOX5, SOX6 and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for chondrogenesis. *Arthritis Rheum* 50: 3561-3573, 2004.
- 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* 113: 718-726, 2004.
- 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-gamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113: 846-855, 2004.
- 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.
- Oohori Y, Seichi A, Kawaguchi H, Tajiri Y, Oda H, and Nakamura K: Retroodontoid pseudotumor resected by a high cervical lateral approach in a rheumatoid arthritis patient: a case report. *J Orthop Sci* 9: 90-93, 2004.
- Itaka K, Harada A, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, and 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.
- 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.
- 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* 279: 15314-15322, 2004.
- Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, and Kawaguchi H: Osteoclast differentiation by RANKL requires NF- $\kappa$ B-mediated down-regulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19: 1128-1136, 2004.
- Seichi A, Takeshita K, Kawaguchi H, Nakajima S, Akune T, and Nakamura K: Postoperative expansion of intramedullary high-intensity areas on T2-weighted magnetic resonance imaging after cervical laminoplasty. *Spine* 29: 1478-1482, 2004.
- Ogasawara T, Kawaguchi H, Jinno S, Hoshi K, Itaka K, Takato T, Nakamura K, and Okayama H: Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires smad-mediated down-regulation of cdk6. *Mol Cell Biol* 24: 6560-6568, 2004.
- Yamada T, Kawano H, Sekine K, Matsumoto T, Fukuda T, Azuma Y, Itaka K, Chung UI, Chambon P, Nakamura K, Kato S, and Kawaguchi H: SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J Bone Miner Res* 19: 1452-1461, 2004.

431-435, 2004

Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung UI, and Kawaguchi H: Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev* 18: 2418-2429, 2004.

Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Jang WD, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, and Kataoka K: Supramolecular nanocarrier of siRNA from PEG-based block cationer carrying diamine side-chain distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing. *J Am Chem Soc* 126: 13612-13613, 2004.

Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Takigawa Y, Matsushita T, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nature Mater* 3: 829-836, 2004.

Goto T, Motoi N, Motoi T, Okuma T, Kawano H, Yamamoto A, Nakamura K: Spindle cell lipoma of the knee: a case report. *J Orthop Sci* 9: 86-89, 2004

Goto T, Kawano H, Yamamoto A, Yokokura S, Iijima T, Motoi T, Nakamura K: Simple curettage without bone grafting for enchondromas of the foot. *Arch Orthop Trauma Surg* 124: 301-305, 2004

Saito T, Anamizu Y, Nakamura K, Seichi A: Case of idiopathic thoracic spinal cord herniation with a chronic history. *J Orthop Sci* 9: 94-98, 2004

Kawanishi M, Ushida T, Kaneko T, Niwa H, Fukubayashi T, Nakamura K, Oda H, Tanaka S, Tateishi T: New Type of biodegradable porous scaffolds for tissue-engineered articular cartilage. *Matr Sci Eng C24*:

## 2. 学会発表

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)

茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口浩: 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、千葉).

中村耕三: 関節リウマチにおける骨・軟骨破壊. 第 14 回福島県整形外科医の集い、郡山、2005. 2. 28

中村耕三: 身体障害認定基準に基づく診断等について. 平成 15 年度身体障害者福祉法第 15 条に規定する医師研修会、埼玉  
2005. 3. 5

小笠原徹、川口浩、中村耕三、鄭雄一、高戸毅 星和人: 骨再生医療におけるサイクリン依存性キナーゼ 6 (Cdk6) 応用の試み. 第 3 回日本再生医療学会総会. 2004. 3. 23-25 (幕張メッセ、千葉).

星和人、小笠原徹、劉光耀、高橋嗣明、山岡尚世、川口浩、鄭雄一、朝戸裕貴、中村耕三、高戸毅: ヒト耳介軟骨由来細胞による再生軟骨作製の試み. 2004. 3. 23-25 (幕張メッセ、千葉).

大庭伸介、池田敏之、亀倉暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、Alex C Lichtler、小笠原徹、星和人、川口浩、中村耕三、高戸毅、鄭雄一: COL1-GFP マーカー遺伝子を用いた骨芽細胞分化十分条件の検索. 2004. 3. 23-25 (幕張メッセ、千葉).

中村耕三: 変形性膝関節症の病態解明と治療法の開発. 河合伸也教授退官記念行事: 山口、2004. 3. 20

位高啓史、金山直樹、川口浩、中村耕三、片岡 一則: PEG-polycation ブロック共重合体を用いた siRNA デリバリーシステム. 遺伝子・デリバリー研究会 第 4 回 シンポジウム. 2004. 5. 10 (京

都テルサ、京都).

中村耕三：変形性膝関節症の病態解明と治療への取り組み。第 47 回広島大学開講記念会：広島、2004. 5. 15

星地亜都司、竹下克志、阿久根徹、川口浩、筑田博隆、河村直洋、松平浩、中村耕三：頸部脊髄症の神経学的高位診断 □ MRI からみた検証 -。第 77 回日本整形外科学会学術集会。2004. 5. 20-23 (神戸ポートピアホテル、神戸)。

中村耕三：脊椎疾患における運動機能評価。第 41 回日本リハビリテーション医学会学術集会：東京、2004. 6. 2

中村耕三：損傷脊髄の再生誘導。第 41 回日本リハビリテーション医学会学術集会：東京、2004. 6. 3

中村耕三：損傷脊髄の再生。第 16 回慈恵医大教育研修会：東京、2004. 6. 12

岡敬之、近藤泰児、穂積高弘、星地亜都司、中村耕三：乳癌転移性脊椎腫瘍の予後 第 33 回日本脊椎脊髄病学会、東京、2004. 6. 10 (日本脊椎脊髄病学会雑誌 15 : 354, 2004)

劉光耀、小笠原徹、岸本淳司、高橋嗣明、鄭雄一、川口浩、朝戸裕貴、高戸毅、中村耕三、星 和人：軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の最適化。第 7 回日本組織工学会。2004. 7. 1-2 (砂防

今井一博、大西五三男、別所雅彦、小南尚登、松永繁、中村耕三：有限要素法による脊椎椎体の圧縮強度解析 第 30 回日本骨折治療学会、東京、2004. 7. 2-3

位高啓史、金山直樹、川口浩、中村耕三、片岡一則：siRNA/ブロック共重合体コンプレックスを用いた遺伝子ノックダウン。第 20 回日本 DDS 学会 2004. 7. 15-16 (東京)。

茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、中村耕三、川口浩：MPC ポリマーのナノ表面処理による関節摺動面の人工関節の弛緩防止効果—長寿命型人工関節の開発—。第 2 回 PC サーフェイステクノロジー研究会。2004. 7. 23 (東京ドームホテル、東京)

川口浩、亀倉暁、山田高嗣、河野博隆、星和人、鄭雄一、中村耕三、加藤茂明、丸山善治郎、小守寿文：マウスゲノミクスからの変形性関節症の分子メカニズムの解析。第 22 回日本骨代謝学会(シンポジウム：関節リウマチと変形性関節症における骨破壊分子メカニズムと治療)。2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪)。

亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、丸山善治郎、鄭雄一、小守寿文、中村耕三、川口浩：Runx2 による関節軟骨細胞の病的肥大化が変形性関節症(OA)発症の引き金となる -OA 誘発モデルを用いた Runx2 ヘテロ欠損マウスの解析- (学会奨励賞受賞)。第 22 回日本骨代謝学会。2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪)。

釘宮典孝、亀倉暁、筑田博隆、中村耕三、川口浩、鄭雄一：BMP2 と BMP6 の組合せは生理作用として骨形成に重要である -BMP2;BMP6 ダブルノックアウトマウスの解析 - (学会奨励賞受賞)。第 22 回日本骨代謝学会。2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪)。

釘宮典孝、筑田博隆、池田敏之、星和人、小笠原徹、中村耕三、鄭雄一、川口浩：cGKII は Sox9 の核内移行を抑制することによって軟骨細胞肥大分化への分子スイッチとして働く。第 22 回日本骨代謝学会。2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪)。

山口雅之、篠田裕介、亀倉暁、緒方直史、中村耕三、川口浩：副甲状腺ホルモン (PTH 1-34) の骨同化作用における IGF-I/IRS-1 シグナルの関与 (優秀ポスター賞受賞)。第 22 回日本骨代謝学会。2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪)。

山川聖史、亀井大輔、竹越唯衣、植松智、審良静男、村上誠、工藤一郎、中村耕三、川口浩：膜型プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素-1 (mPGES-1) の炎症性骨破壊への関与 □ mPGES-1 遺伝子欠損マウスの解析 □。第 22 回日本骨代謝学会。2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪)。

大庭伸介、池田敏之、亀倉暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、Alex C Lichtler、小笠原徹、星和人、川口浩、中村耕三、高戸毅、鄭雄一：BMP シグナルと Runx2 シグナルが骨芽細胞への分化のための最低限のシグナルユニットである (優秀演題賞受賞)。第 22 回日本骨代謝学会。2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪)。

矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、池田敏之、緒方

直史、筑田博隆、川口浩、中村耕三、高戸毅、鄭雄一：Wnt- $\beta$ カテニンシグナルは軟骨細胞への分化と肥大化を促進的に制御している。第22回日本骨代謝学会。2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪)。

Guangyao Liu, Kazuto Hoshi, Toru Ogasawara, Tsuyoshi Takato, Hiroshi Kawaguchi, and Kozo Nakamura: Experimental trials to make an implant-type regenerated cartilage by autologous chondrocytes. 第53回東日本整形災害外科学会 (Asia Now)。2004. 9. 24-25 (山形国際交流プラザ、山形)。

中村耕三：変形性関節症の病態解明と新しい治療。沖縄県整形外科学会学術講演会：沖縄、2004. 10. 4

茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、瀧川順庸、高玉博朗、山脇昇、中村耕三、川口浩：ポリエチレンライナーのMPC処理は1000万サイクルまで摩耗を抑制する一ナノ表面制御による長寿命型人工股関節の開発。第31回日本股関節学会学術集会。2004. 10. 15-16 (長崎ブリックホール、長崎)

川口浩、阿久根徹、緒方直史、下赤隆、星和人、鄭雄一、中村耕三：インスリン受容体基質 (IRS) シグナルによる骨代謝調節と骨再生医療への応用。第19回日本整形外科学会基礎学術集会 (シンポジウム：基礎の成果を臨床に：萌芽的最先端医療 □ 運動器の再生医療-)。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

川口浩、岡崎裕司、中村耕三、松下隆：FGF-2の骨形成促進作用と骨延長への応用。第19回日本整形外科学会基礎学術集会 (パネルディスカッション：延長骨の強度を早期に高める)。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、鄭雄一、小守壽文、中村耕三、川口浩：Runx2による関節軟骨細胞の病的肥大化が変形性関節症の発症に重要である—新規OA誘発モデルを用いたRunx2ヘテロ欠損マウスの解析—。第19回日本整形外科学会基礎学術集会。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

釘宮典孝、亀倉暁、筑田博隆、中村耕三、川口浩、鄭雄一：BMP2とBMP6の組合せは生理作用として骨形成の維持に重要である—BMP2; BMP6ダブルノックアウトマウスの解析—。第19回日本整形外科学会基礎学術集会。2004. 10. 21-22 (新高

輪プリンスホテル、東京)。

釘宮典孝、筑田博隆、池田敏之、中村耕三、鄭雄一、川口浩：cGKIIはSox9の核内移行を抑制することによって軟骨細胞の肥大分化への分子スイッチとして働く。第19回日本整形外科学会基礎学術集会。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、瀧川順庸、中村耕三、川口浩：MPCポリマーを用いたナノテクノロジーによる人工股関節の弛みの抑制—耐摩耗性と生体適合性に優れた長寿命型人工股関節の開発—。第19回日本整形外科学会基礎学術集会 (シンポジウム：整形外科における医工連携の課題)。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

山口雅之、篠田裕介、釘宮典孝、緒方直史、中村耕三、川口浩：PTHの骨同化作用におけるIGF-I/IRS-1シグナルの関与。第19回日本整形外科学会基礎学術集会。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

山川聖史、亀井大輔、村上誠、工藤一郎、中村耕三、川口浩：膜型プロスタグランジンE<sub>2</sub>合成酵素-1 (mPGES-1)は疼痛・炎症・関節破壊に重要な酵素である □ mPGES-1遺伝子欠損マウスの解析 □。第19回日本整形外科学会基礎学術集会。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

篠田裕介、緒方直史、鄭雄一、中村耕三、川口浩：PTH (1-34)による*in vitro*での骨形成促進モデルシステムの確立。第19回日本整形外科学会基礎学術集会。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

星和人、鄭雄一、朝戸裕貴、高戸毅、中村耕三、川口浩：ヒト軟骨由来細胞を用いたインプラント型再生軟骨作製法の確立。第19回日本整形外科学会基礎学術集会。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

松原全宏、川口浩、中村耕三、加藤幸夫：歯槽骨骨髓間質細胞の再生医療における細胞源としての可能性。第19回日本整形外科学会基礎学術集会。2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京)。

大庭伸介、池田敏之、亀倉暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、Alex C Lichtler、小笠原徹、星和人、高戸毅、中村耕三、川口浩、鄭雄一：COL1-GFPマーカー遺伝子導入システムを用いた骨芽細胞

への分化シグナルの検索. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).

矢野文子, 大庭伸介, 釘宮典孝, 中村耕三, 川口浩, 鄭雄一: 古典的 Wnt シグナルは軟骨細胞の早期分化と肥大化を促進的に制御している. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).

山本精三, 石橋英明, 川口浩, 鈴木隆雄, 中村耕三. 大腿骨頸部骨折の QOL 評価. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).

中村耕三: 骨系統疾患の診断と治療. 第15回日本小児整形外科学会, 横浜, 2004. 11. 26

中村耕三: 変形性関節症—その病態研究と低摩耗人工関節の開発にむけて—. 高知整形外科集団会, 高知, 2004. 12. 15

Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Kawaguchi H, Nakamura K, Kataoka K: Self-assembled nanocarrier composed of PEG-based block copolymer for effective siRNA delivery. 4<sup>th</sup> Asian International Symposium on Biomaterials (AISB). 2004. 11. 16-18 (Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan)

Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Hiroaki Takadama, Takao Hanawa, Norio Maruyama, Kozo Nakamura and Hiroshi Kawaguchi: Inhibition of aseptic loosening of artificial hip joints by a novel biocompatible polymer MPC. 4<sup>th</sup> Asian International Symposium on Biomaterials (AISB). 2004. 11. 16-18 (Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan)

釘宮典孝, 亀倉暁, 筑田博隆, 中村耕三, 川口浩, 鄭雄一: BMP2 と BMP6 の組合せは生理作用として骨形成に重要である - BMP2; BMP6 ダブルノックアウトマウスの解析 -. 第6回日本骨粗鬆症学会. 2004. 11. 17-20 (大宮ソニックシティ, 埼玉).

大庭伸介, 池田敏之, 亀倉暁, 釘宮典孝, 筑田博隆, 矢野文子, Alex C Lichtler, 小笠原徹, 星和人, 高戸毅, 中村耕三, 川口浩, 鄭雄一: BMP シグナルと Runx2 は骨芽細胞分化の最小かつ十分なシグナルユニットである. 第6回日本骨粗鬆症学会. 2004. 11. 17-20 (大宮ソニックシティ,

埼玉).

山川聖史, 三枝正朋, 亀井大輔, 竹越唯衣, 植松智, 審良静男, 村上誠, 工藤一郎, 中村耕三, 川口浩: 膜型プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素-1 (mPGES-1) の炎症性骨吸収治療のための重要な標的分子である. 第6回日本骨粗鬆症学会. 2004. 11. 17-20 (大宮ソニックシティ, 埼玉).

山口雅之, 篠田裕介, 亀倉暁, 緒方直史, 中村耕三, 川口浩: 副甲状腺ホルモン (PTH 1-34) の骨同化作用において IGF-I/IRS-1 シグナルが重要である. 第6回日本骨粗鬆症学会. 2004. 11. 17-20 (大宮ソニックシティ, 埼玉).

#### 海外学会

Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomoaki Konno, Y. Takigawa, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Inhibition of aseptic loosening of artificial joints by graft polymerization of a novel biocompatible polymer MPC. 50th annual meeting of the Orthopaedic Research Society. 2004. 3. 7-10 (San Francisco, California, USA).

Imai K, Ohnishi I, Bessho M, Sato W, Kominami H, Nakamura K: Nonlinear finite element model predicts vertebral bone strength and fracture site. 50th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2004. 3. 7-10 (San Francisco, California, USA).

Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Kozo Nakamura and Hiroshi Kawaguchi: Improved longevity of the artificial joints by grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner. 7<sup>th</sup> World Biomaterial Congress. 2004. 5. 17-21 (Sydney, Australia)

Maruyama T, Kitagawa T, Takikawa K, Takeshita K, Mochiduki K, Nakamura K: Conservative treatment for adolescent idiopathic scoliosis -Can it reduce the incidence of surgery? - 2004 Meeting of the International Research Society for Spinal Deformities. Vancouver, 2004. 6. 10-12

Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Tomiharu Matsushita, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Biocompatible phospholipid polymer



nano-grafting onto articular surface of the artificial hip joint prevents aseptic loosening. Nano-technology to prolong the longevity of the artificial joint (Best Poster Award). 17th Annual Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty. 2004. 9. 23-25 (Roma, Italy).

Satoru Kamekura, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Hirotaka Chikuda, Ung-il Chung, Zenjiro Maruyama, Toshihisa Komori, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Runx2 contributes to pathogenesis of osteoarthritis through chondrocyte hypertrophy and matrix breakdown in articular cartilage under mechanical stress (Young Investigator Award). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

Fumitaka Kugimiya, Hirotaka Chikuda, Kazuto Hoshi, Toshiyuki Ikeda, Toru Ogasawara, Satoru Kamekura, Kozo Nakamura, Kajuro Komeda, Ung-il Chung, and Hiroshi Kawaguchi: Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through attenuation of Sox9 function (Young Investigator Award). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

Fumitaka Kugimiya, Satoru Kamekura, Hirotaka Chikuda, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, and Ung-il Chung: Physiological role of the combination of BMP2 and BMP6 in bone formation. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

Kiyofumi Yamakawa, Masatomo Saegusa, Daisuke Kamei, Yui Takegoshi, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Makoto Murakami, Ichiro Kudo, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Dysfunction of membrane-bound prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) reduces inflammatory bone resorption. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

Masayuki Yamaguchi, Yusuke Shinoda, Satoru

Kamekura, Naoshi Ogata, Takashi Kadowaki, Yasuo Terauchi, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) is essential for bone anabolic function of parathyroid hormone (1-34). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

Shinsuke Ohba, Toshiyuki Ikeda, Satoru Kamekura, Fumitaka Kugimiya, Fumiko Yano, Alex C. Lichtler, Toshihisa Komori, Toru Ogasawara, Kazuto Hoshi, Kozo Nakamura, Tsuyoshi Takato, Hiroshi Kawaguchi, and Ung-il Chung: Combination of BMP and Runx2 signalings constitute the minimum and sufficient unit for osteogenic differentiation through Cbfb regulation. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

Fumiko Yano, Shinsuke Ohba, Fumitaka Kugimiya, Toshiyuki Ikeda, Naoshi Ogata, Tsuyoshi Takato, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, and Ung-il Chung: The canonical Wnt signaling promotes chondrogenic differentiation and hypertrophy *in vitro*. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

Maruyama Z, Kanatani N, Yoshida C, Nakamura K, Kawaguchi H, and Komori T: Overexpression of CDK6 and CCND1 in chondrocytes induces chondrocyte proliferation and apoptosis and causes dwarfism. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

Saegusa M, Mehrotra M, Nakamura K, Kawaguchi H, and Pilbeam C: Fluid shear stress induces MMP-13 in murine osteoblastic cells. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

Seto H, Kamekura S, Chikuda H, Hiraoka H, Imamura T, Miyazono K, Oda H, Kurosawa H, Nakamura K, Kawaguchi H, and Tanaka S: Distinct roles of Smad pathways and p38 pathways in cartilage-specific gene expression in synovial fibroblasts. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral

Research. 2004. 10. 1-5 (Seattle, Washington, USA).

E. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

発明の名称：脱分化型軟骨細胞の軟骨細胞への再分化用培地

出願：2004年8月24日

特願番号：2004-244114

厚生労働省科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用に関する研究

分担研究者 高戸 毅（東京大学大学院医学系研究科・口腔外科 教授）

研究要旨

頭頸部顎顔面骨・軟骨欠損小動物モデルの作成と長期自然経過を明らかにした。

A. 研究目的

臨床的に有用な再生医療を開発するためには、使用する動物モデルが妥当に使われているかの検証が重要である。従来げっし類が骨軟骨欠損モデルによく使われているが、彼らの再生能力は旺盛であり、ともすれば自然治癒を観察している可能性があった。今回、自然治癒がどのくらい起こるかを目的として、主任研究者の中村とともにマウスとラットに骨・軟骨欠損モデルを作成し、その自然経過を追うこととした。

B. 研究方法

マウスおよびラットの頭蓋・顎顔面領域に臨界骨・軟骨欠損を作製し、放射線学的（X線写真、CT）に1、2、3週間、1、2、3、4、5、6ヶ月とフォローした。

1. 臨界骨欠損モデルでは、マウス及びラットの頭頂骨に4-5mmの骨欠損を作製した。
2. 臨界軟骨欠損モデルでは、マウス及びラット耳介軟骨の中央部3分の1を切除した。

C. 研究結果

1. 放射線学的には、術後3ヶ月程度までは自然治癒がなかったが、それ以降若干の骨形成が辺縁から起こることが観察された。
2. このモデルは現在経過観察中である。

D. 考察

モデルによっては完全な不可逆性欠損でないことがあるので、観察期間やコントロールに注意する必要がある。

E. 結論

臨界骨・軟骨欠損モデルの長期の自然経過を明らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。

F. 健康危険情報

主任研究者が一括して報告。

G. 研究発表

1. 論文発表

Suenaga H., Furukawa S. K., Ushida T., Takato T., Tateishi T. : Aggregate formation of bone marrow stromal cells by rotation culture. Mat. Sci. Eng. C-Bio. S. (in press)

Ung-il Chung, Kawaguchi H., Takato T., Nakamura K. : Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins Journal of Orthopaedic Science (in press)

緒方直史、川口浩、高戸毅、中村耕三、鄭雄一：再生医療の老年医学への応用。老年医学 update2004-05 34-43、(株)メジカルビュー社 東京 2004

江口智明、高戸毅：口腔外傷。第VI部 主要疾患の救急対応 総合臨床 53（増刊）：713-716、2004

鄭雄一、池田敏之、川口浩、中村耕三、高戸毅：骨・軟骨分化決定因子の解析から再生医学へ。特集：骨・軟骨破壊の分子機構から修復再生に向けて分子リウマチ 1（2）：22-26、先端医学社、東京 2004

Ikeda T., Kamekura S., Mabuchi A., Kou I., Seki S., Takato T., Nakamura K., Kawaguchi H., Ikegawa S., and Chung UI. : The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient

for induction of permanent cartilage.  
Arthritis Rheum 50 (11): 3561-73, 2004

Ogasawara T., Kawaguchi H., Jinno S., Hoshi K., Itaka K., Takato T., Nkamura K., and Okayama H. : Bone Morphogenetic Protein 2-Induced Osteoblast Differentiation Requires Smad-Mediated Down-Regulation of Cdk6. Molecular And Cellular Biology 24 (15): 6560-6568, 2004

Hikiji H., Ishii S., Shindou H., Takato T., and Shimizu T. : Absence Platelet-activating factor receptor protects mice from osteoporosis following ovariectomy. The Journal of Clinical Investigation 114 (1): 85-93, 2004

Ogasawara T., Katagiri M., Yamamoto A., Hoshi K., Takato T., Nakamura K., Tanaka S., Okayama H., and Kawaguchi H. : Osteoclast Differentiation by RANKL Requires NF- $\kappa$ B-Mediated Downregulation Cyclin-Dependent Kinase 6 (Cdk6). Journal of Bone and Mineral Research 19 (7): 1128-1136, 2004

Kwase Y., Yanagi Y., Takato T., Fujimoto M., and Okochi H. : Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) facilitates cell growth. Experimental Cell Research 295: 194-203, 2004

Kondoh K., Koyama H., Miyata T., Takato T., Hamada H., Shigematsu H. : Conduction performance of collateral vessels induced by vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor. Cardiovasc. Res. 61 (1): 132-142, 2004

## 2. 学会発表

大庭伸介、池田敏之、亀倉暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、A. C. Lichtler、小笠原徹、星和人、川口浩、中村耕三、高戸毅、鄭雄一: COL1-GFP マーカー遺伝子を用いた骨芽細胞分化十分条件の検索、第3回日本再生医療学

会総会、2004年3月23-25日、東京。

小笠原 徹、川口 浩、中村 耕三、鄭 雄一、高戸 毅、星 和人: 骨再生医療におけるサイクリン依存性キナーゼ (Cdk6) 応用の試み 第3回日本再生医療学会総会 2004年3月24日、千葉。

星 和人、小笠原 徹、劉 光耀、高橋 嗣明、山岡 尚世、鄭 雄一、川口 浩、朝戸裕貴、中村 耕三、高戸毅: ヒト耳介軟骨由来細胞による再生軟骨作製の試み、第3回日本再生医療学会総会 2004年3月24日、千葉。

藤原夕子、西山伸宏、小山博之、高戸毅: 塩基性線維芽細胞増殖因子の遺伝子導入によるラット皮弁生着改善効果-血管新生療法 of 軟部組織再建への応用。第3回日本再生医療学会総会 2004年3月25日、千葉。

森良之、崎山美雪、須佐美隆史、近津大地、小泉敏之、西條英人、松崎雅子、荻原祐二、高戸毅: 輸血拒否患者に対する上下顎移動術-上顎骨延長術と下顎枝垂直骨切り術を行った両側口唇口蓋裂の1例-。A-5-1、第14回日本学変形症学会総会 2004年5月25-26日、福岡。

須佐美隆史、朝日藤寿一、根来武史、北井則行、幸地省子、大塚純正、毛利環、森田修一、小野和宏、館村卓、石井一裕、荻原祐二、寺尾恵美子、高戸毅、高木律男、花田晃治: 日本における片側性唇顎口蓋裂患者治療に関する多施設比較研究-Part 3 咬合状態の評価結果について-。第28回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2004年5月28日、鹿児島。

波田野典子、大橋克巳、森 良之、富塚 健、小泉敏之、近津大地、西條英人、高戸毅: 骨髄移植術後に口蓋に生じた白板症様を呈したGVHDの1例。第177回日本口腔外科学会関東地方会 平成16年6月12日、東京。

荻原祐二、須佐美隆史、松崎雅子、崎山美雪、高戸毅: 片側下顎骨骨延長術を施行した hemifacial microsomia における長期経過の検