

- ト工学による血管付心筋グラフトの作製”, 炎症・再生, 24 (4), 442 (2004).
- 3) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 桜井靖久, 梅津光生, 岡野光夫, “温度応答性パターン化培養皿による高機能化共培養細胞シートの作製”, 炎症・再生, 24 (4), 451 (2004).
 - 4) 井手 武, 西田幸二, 大和雅之, 角出泰造, 前田直之, 渡辺 仁, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, “培養角膜内皮細胞シートのバリア機能の検討”, 炎症・再生, 24 (4), 452 (2004).
 - 5) 神崎正人, 大和雅之, 関根秀一, 清水達也, 菊池明彦, 岡野光夫, 大貫恭正, “細胞シート移植による新規気漏閉鎖術の開発”, 炎症・再生, 24 (4), 452 (2004).
 - 6) 野崎貴之, 大和雅之, 西田幸二, 串田 愛, 長井 慈, 田野保雄, 岡野光夫, “温度応答性培養皿上で作製した培養角膜上皮細胞シートの凍結保存方法の検討”, 炎症・再生, 24 (4), 453 (2004).
 - 7) 林田康隆, 西田幸二, 大和雅之, 渡辺克彦, 前田直之, 渡辺 仁, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, “遺伝子治療への細胞シート応用の可能性”, 炎症・再生, 24 (4), 473 (2004).
 - 8) 笹川 忠, 清水達也, 佐藤和也, 笠原直子, 大和雅之, 菊池明彦, 藤本哲男, 岡野光夫, “ヒト筋芽細胞シート重層化による移植用グラフト作製の試み”, 炎症・再生, 24 (4), 473 (2003).
 - 9) 梅本晃正, 大和雅之, 西田幸二, 河野千夏, 田野保雄, 岡野光夫, “角膜輪部上皮SP細胞における幹細胞/前駆細胞マーカーの発現解析”, 炎症・再生, 24 (4), 500 (2004).
8. 17th Annual Meeting World Society of Cardio-Thoracic Surgeons (WSCTS) 2004. 7. 14-16 Yokohama
 - M. Kanzaki, M. Yamato, H. Sekine, T. Isaka, T. Matsumoto, M. Sakuraba, T. Ikeda, T. Shimizu, K. Oyama, A. Kikuchi, T. Okano and T. Onuki, “Development of a novel air leak sealant with cell sheet engineering”, Japan chapter, 75 (2004).
 9. 第33回医用高分子シンポジウム 2004. 7. 26-27 東京
 - 1) 畠山英之, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “細胞増殖を誘導する機能的温度応答表面の調製と細胞シート工学への応用”, 講演要旨集, 69-70 (2004).
 - 2) 井戸田直和, 菊池明彦, 小林 純, 酒井清孝, 岡野光夫, “温度応答性高分子の高密度グラフト表面の調製 -高分子層厚みの細胞接着挙動に与える影響”, 講演要旨集, 71-72 (2004).
 10. 第1回日英ナノテクノロジー・サマースクール (1st Japan-UK Nanotechnology students' Summer School) 2004. 7. 26-30 茨城
 - Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, G. Chen and T. Okano, “Intelligent patterned nano-surfaces for tissue-mimicked cell sheets”, Abstract, 8 (2004). (Best presentation award)
 11. 第53回高分子討論会 2004. 9. 15-17 北海道

- 1) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 埴 隆夫, 岡野光夫, “パターン化温度応答性表面上のパターン化共培養系に与えるパターンサイズの検討”, Preprints, Japan, 53 (2), 4364-4365 (2004).
 - 2) 畠山英之, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “温度応答性高分子表面への細胞接着・増殖因子の共固定と細胞応答”, Preprints, Japan, 53 (2), 4412 (2004).
 - 3) 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “親水性表面上における温度応答性グラフトゲル作製の検討”, Preprints, Japan, 53 (2), 4414 (2004).
12. Micro Total Analysis Systems 2004 (μTAS 2004) 2004. 9. 26-30 Malmö, Sweden
- 1) J. Kobayashi, M. Yamato, K. Itoga, A. Kikuchi and T. Okano, “Rapid prototyping of PDMS microchannels using a liquid crystal projector-modified maskless photopolymerization device”, Proceedings, 1, 545-547 (2004).
 - 2) N. Idota, A. Kikuchi, J. Kobayashi, K. Sakai and T. Okano, “Hermetic control of aqueous fluidics in microchannels grafted with thermoresponsive polymer”, Proceedings, 1, 584-586 (2004).
 - 3) Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, “Ultra thin poly(N-isopropylacrylamide) grafted for cell adhesion / detachment control by temperature change”, Proceedings, 2, 118-120 (2004).
13. 第42回日本人工臓器学会大会 2004. 10. 5-7 東京
 - ・井坂珠子, 神崎正人, 大和雅之, 関根秀一, 菊池明彦, 岡野光夫, 大貫恭正, “皮膚線維芽細胞シートを用いた新規肺漏閉鎖術”, 人工臓器, 33 (2), S-138 (2004).
 14. 第57回日本胸部外科学会定期学術集会 2004. 10. 20-22 札幌
 - 1) 神崎正人, 大和雅之, 大和雅之, 梅本晃正, 長井 慈, 関根秀一, 小山邦広, 池田豊秀, 井坂珠子, 菊池明彦, 岡野光夫, 大貫恭正, “ハイブリッド型人工気管の開発および内腔への気管上皮細胞シートの導入”, The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 52 (Suppl. 2004), 546 (2004).
 - 2) 松本卓子, 神崎正人, 大和雅之, 井坂珠子, 岡野光夫, 大貫恭正, “温度応答性培養皿による肺細胞シート作成と細胞シートによる気漏閉鎖の試み”, The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 52 (Suppl. 2004), 548 (2004).
 15. 「ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ」ナノメディスン 2004. 11. 10 東京
 - 1) 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “温度応答性グラフトゲルの基材表面物性による影響” (2004).
 - 2) 畠山英之, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “細胞培養・増殖を促進する温度応答性ナノバイオ表面を用いた細胞シート工学” (2004).
 - 3) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫,

“温度応答性ナノバイオインターフェイスによる生体組織を模倣した構造と機能を発現する細胞シートの調整”, (2004).

16. 日本バイオマテリアル学会 シンポジウム2004
2004. 11. 15-16 つくば

- 1) 谷口彰良, 高山 剛, 岡野光夫, “細胞シート工学を用いた組織再構築での遺伝子発現の変化”, 予稿集, 52 (2004).
- 2) 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “細胞が接着、脱着可能な温度応答性グラフトゲル作製条件の検討”, 予稿集, 57 (2004).
- 3) 西田幸二, 大和雅之, 林田康隆, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, “細胞シート工学による角膜再生”, 予稿集, 85 (2004).
- 4) 畠山英之, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “培養細胞の接着・増殖能を亢進しうる新規温度応答性表面の調製”, 予稿集, 113 (2004).
- 5) 武田直也, 吉田貴恒, 菊池明彦, 岡野光夫, “温度応答性培養皿表面へのDNA固定と細胞への遺伝子導入の検討”, 予稿集, 126 (2004).
- 6) 関根秀一, 清水達也, 磯井由紀, 大和雅之, 菊池明彦, 小林英司, 岡野光夫, “温度応答性培養皿を用いた心筋細胞シートによる血管付心筋グラフトの作製”, 予稿集, 185 (2004).

招待講演

1. Experimental Biology “Translating the Genome” 2004 2004. 4. 17-21
Washington, DC
 - Teruo Okano, “Cell sheet technology”, Program, 114 (2004).

2. 7th World Biomaterials Congress 2004.
5. 17-21 Sydney

- Teruo Okano, “Cell sheet engineering for tissues and organs regeneration”, Transactions [CD-ROM], 130 (2004)
3. Regenerate Tissue Engineering The Human Body 2004. 6. 9-12 Seattle, Washington
 - 1) T. Okano, “Cell sheet engineering: intelligent biointerface for tissue and organ regeneration”, Program, 5 (2004).
 - 2) Y. Shiroyanagi, “Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps”
 - 3) T. Shimizu, “Myocardial tissue reconstruction by cell sheet engineering”
 - 4) M. Yamato, “Clinical applications of transplantable corneal epithelial cell sheets and oral mucosal epithelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture dishes”
 4. 第6回JCHシンポジウム「材料開発の将来像を探る 素材、機能そしてマテリアル・ソリューションへ」 2004. 6. 16 東京
 - 岡野光夫, “インテリジェント表面の設計とその細胞シート工学への応用”, 講演予稿集, 4-5 (2004).
 5. 第26回ラピッド・プロトタイピングシンポジウム 2004. 6. 15 埼玉
 - 大和雅之, “再生医療における三次元組織の再構築の重要性と細胞シート工学”, プログラム・抄録集, 85 (2004).

6. 独立行政法人 日本学術振興会 薄膜第131委員会 第221回研究会 2004. 6. 17 大阪
- ・岡野光夫, “細胞を増殖、脱着させる再生医療用のインテリジェント薄膜表面技術”, 研究会資料, 24-29 (2004).
7. 神経組織の成長・再生・移植研究会 第19回学術集会 2004. 6. 19 岐阜
- ・岡野光夫, “細胞シート工学:細胞からの組織・臓器の再生”, プログラム (2004)
8. European Cells & Materials. ECM V The cell biomaterials reaction 2004. 6. 28-30 Davos, Switzerland
- ・M. Yamato, “Smart biomaterials achieve smart tissue regeneration with cell sheet engineering”
9. 第24回日本核医学技術学会総会学術大会 2004. 7. 24-25 千葉
- ・岡野光夫, “細胞シート工学を基盤とする再生医療”, 22-23 (2004).
10. Advances in Tissue Engineering 2004, 12th Annual Short Course 2004. 8. 11-14 Houston, Texas
- ・M. Yamato, “Cell Sheet Engineering Using Intelligent Materials”
11. Bio Japan 2004 2004. 9. 28-30 東京
- ・Okano Teruo, “Cell sheet engineering for tissue and organ regeneration”, Proceedings, 181-182 (2004).
12. 共立薬科大学 特別講演会「再生医療から未来医療を展望する」 2004. 10. 10 東京
- ・大和雅之, 岡野光夫, “組織から細胞・臓器を再生するテクノロジー”, プログラム, 4-6 (2004).
13. 第48回日本学術会議 材料研究連合講演会 2004. 10. 20-21 東京
- ・大和雅之, 清水達也, 菊池明彦, 岡野光夫, “温度応答性培養皿を用いた細胞シート工学による組織・臓器再生”, 講演論文集, 15 (2004).
14. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery・49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons 2004. 10. 20-23 Tokyo
- ・T. Okano, “Cell sheet engineering for tissue and organ regeneration”, Program and Abstracts, 76 (2004).
15. 「ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ」ナノメディシン 2004. 11. 10 東京
- 1) 大和雅之, “ナノ加工表面を活用する細胞シート工学による再生医療”, 要旨集, 23-26 (2004).
 - 2) 大和雅之, “パネルディスカッション:ナノテクノロジーが拓く未来医療” (2004).
16. 日本バイオマテリアル学会 2004. 11. 15-16 つくば
- ・岡野光夫, “組織工学及びバイオテクノロジー推進:細胞マニピュレーションを行う表面”, 予稿集, 34-36 (2004).
17. 4th Asian International Symposium on Biomaterials (AISB4) and 2nd International Symposium on Fusion of Nano and Bio Technologies (FNB2004)

2004. 11. 16-18 Tsukuba

- 1) T. Okano, “Intelligent biomaterials for cell sheet engineering”, Proceedings, 41 (2004).
- 2) K. Nishida, M. Yamato, T. Okano and Y. Tano, “Corneal reconstruction using tissue-engineered cell sheets”, Proceedings, 42-43 (2004).
18. 第10回新潟移植再生研究会 2004. 11. 25
新潟
・岡野光夫, “細胞から臓器をつくる再生医療”
19. 第19回「大学と科学」公開シンポジウム「人体にやさしい医療材料」 2004. 12. 4-5 東京
・岡野光夫, “細胞シート工学による組織再生”, 予稿集, 46-47 (2004).
20. 最近の化学工学56講習会「先端医療における化学工学」 2004. 12. 9 東京
・大和雅之, “細胞シート工学を用いた組織・臓器再生”, 最近の化学工学56 先端医療における化学工学, 67-78 (2004).
21. Bayer・RTI Symposium 2004 2004. 12. 11 東京
・岡野光夫, “細胞から組織・臓器を作る再生医療”, 抄録集 (2004).
22. 第42回日本生物物理学会年会 2004. 12. 13-15 京都
・岡野光夫, “インテリジェント・ナノバイオインターフェースの設計と再生医療への応用”, 生物物理, 44 (Suppl. 1), S23 (2004).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 川口 浩（東京大学大学院医学系研究科・整形外科 助教授）

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、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. 臨界荷骨欠損モデルでは、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

Kawaguchi H: Reverse and forward genetic approaches to the pathophysiology of osteoporosis. *Geriatr Gerontol Int* (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).

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.

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.

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 α 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.

Sakuma Y, Li X, Pilbeam CC, Alander CB,

Chikazu D, Kawaguchi H, and Raisz LG: Stimulation of cAMP production and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E₂ and selective prostaglandin receptor agonists in murine osteoblastic cells. *Bone* 34: 827-834, 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- κ 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, Jinnō 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.

Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-ishi S, Yasui H, Azuma Y, Hirasawa N, Ohuchi K, Ohuchi K, Kawaguchi H, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Murakami M, and Kudo

I: Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J Biol Chem* 279: 33684-33695, 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 cationic polymer carrying diamine side-chain distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing. *J Am Chem Soc* 126: 13612-13613, 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.

Bastepe M, Ogata N, Kawaguchi H, Weinstein LS, Juppner H, Kronenberg HM, and Chung UI: Stimulatory G protein directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14794-14799, 2004.

Kawaguchi H, Katagiri M, and Chikazu D: Osteoclastic bone resorption through receptor tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase signaling in mature osteoclasts. *Mod Rheumatol* 14: 1-5, 2004.

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

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関節の弛みを抑制する ー長寿命型人工関節の開発ー. 第34回日本人工関節学会.

2004. 1. 30-31 (幕張メッセ、千葉).

川口浩: 変形性関節症の病態解明・治療への分子生物学からのアプローチ. 東海炎症研究会. 2004. 2. 19 (ホテルグランコート名古屋、愛知).

川口浩: RA 関節破壊治療のターゲット分子. 第32回愛媛リウマチ研究会. 2004. 2. 21 (松山医師会館、愛媛).

川口浩: 骨粗鬆症の病態解明と治療の最前線. 栃木県整形外科医会研修会. 2004. 2. 26 (小山グランドホテル、栃木).

川口浩: 骨粗鬆症の分子メカニズムと治療の最前線. 第27回骨・カルシウム代謝研究会. 2004. 3. 5 (ホテルグランヴィア京都、京都).

川口浩: 骨粗鬆症の分子メカニズム. 第15回腰痛シンポジウム. 2004. 3. 6 (東京国際フォーラム、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).

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).

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にMRIからみた検証 ー. 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).

川口浩: マウスゲノミクスからの骨粗鬆化の分

子メカニズムへのアプローチ. 第3回東京骨軟骨フォーラム(招待講演). 2004. 6. 5(東京コンファレンスセンター, 東京).

川口浩: 加齢に伴う骨粗鬆化の分子メカニズム. 第46回日本老年医学会学術集会総会(シンポジウム: 高齢者の健康増進におけるトランスレーションリサーチ). 2004. 6. 16-18(幕張メッセ, 千葉).

川口浩: 関節リウマチおよび人工関節弛緩に対する分子生物学的アプローチ. 金沢整形外科初夏セミナー(特別講演). 2004. 6. 17(金沢全日空ホテル, 石川).

Hiroshi Kawaguchi: Molecular backgrounds of involuntal osteoporosis from mouse genomic approaches. The First International Workshop on Advanced Bone and Joint Science (ABJS) (Invited Lecture). 2004. 6. 22 (Tokyo Garden Palace Hotel, Tokyo, Japan).

川口浩: 変形性関節症への分子生物学的アプローチ. 第7回日本組織工学会(ランチョンセミナー). 2004. 7. 1-2(砂防会館, 東京).

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(砂防会館, 東京).

川口浩: 変形性関節症の病態・治療への分子生物学的アプローチ. 第5回日本リウマチ財団 中国・四国リウマチ外科セミナー(特別講演). 2004. 7. 10(大和屋本店, 愛媛).

川口浩: COX-2 阻害剤と骨吸収. 第25回日本炎症・再生医学会(シンポジウム: COX-2 インヒビターの最近の話題とその功罪). 2004. 7. 13-14(京王プラザホテル, 東京).

川口浩: 膜型プロスタグランジン E2 合成酵素-1 (mPGES-1) の炎症性骨吸収における関与. 第25回日本炎症・再生医学会(ワークショップ: プロスタグランジンと炎症制御). 2004. 7. 13-14(京王プラザホテル, 東京).

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: 変形性関節症への分子生物学的アプローチ. 第34回南大阪リウマチ・関節外科学会(特別講演). 2004. 7. 24(ホテルヒルトン大阪, 大阪).

川口浩: マウスゲノミクスからの骨粗鬆化の分子背景へのアプローチ. 第10回ROD21(特別講演). 2004. 7. 31(ホテルコンコルド浜松, 静岡).

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 E₂ 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-□ 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).

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 万サイクルまで摩擦を抑制する—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：延長仮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 E₂ 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).

川口浩：骨粗鬆症の病態と治療の最前線. 第8回東京都臨床整形外科医会南多摩ブロック研修会 (特別講演). 2004. 10. 23 (パレスホテル立川、東京).

川口浩：COX-2 と関節破壊. 第6回臨床プロスタノイド・COX 研究会 (特別講演). 2004. 11. 5 (ホテル阪急インターナショナル、大阪).

Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Kawaguchi H, Nakamura K, Kataoka K: Self-assembled nanocarrier composed of PEG-based block cationer for effective siRNA delivery. 4th 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. 4th 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 E₂ 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-1/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).

川口浩：NSAID と関節破壊. 第19回日本臨床リウマチ学会総会 (シンポジウム：関節炎における NSAID の最近の考え方). 2004. 11. 26-27 (京王プラザホテル、東京).

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).

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. 7th World Biomaterial Congress. 2004. 5. 17-21 (Sydney, Australia)

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).

Daichi Chikazu, Shinsuke Ohba, Toru Ogasawara, Mika Katagiri, Hiroshi Kawaguchi, and Tsuyoshi Takato: Combination of platelet-rich plasma (PRP) and COX-2 inhibitor potently stimulates mesenchymal stem cell proliferation. 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 鄭 雄一（東京大学大学院医学系研究科・骨軟骨再生医療 助教授）

研究要旨

1. 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）を明らかにした
2. 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）を作成し、機能を確認した。
3. 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を行った

A. 研究目的

安全安心かつ低侵襲な再生医療を実現するためには、骨・軟骨分化の十分条件を知る必要がある。複数のシグナル因子の組合せによって細胞株や皮膚線維芽細胞などを骨・軟骨様細胞に形質転換できることを既に発見しているが、今後さらに分化効率を高め分化状態を長く保つ技術を開発するために、分担研究者の星と共同して骨・軟骨分化誘導因子の探索を行った。

B. 研究方法

1. 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）に関しては、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。
2. 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については、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- β ・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。

3. 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については、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。

C. 研究結果

1. 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。
2. 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。
3. 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。

D. 考察

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。

E. 結論

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

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

Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, Chung U. The combination of SOX5, SOX6 and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 50:3561-3573, 2004.

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

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

Bastepe M, Weinstein LS, Ogata N, Kawaguchi H, Jüppner H, Kronenberg HM, Chung U. Stimulatory G protein (Gs) directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA* 101:14794-14799, 2004.

Long F, Chung U (Co-first), Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP. Genetic Evidence That Ihh Signaling Is Directly Required For The Osteoblast Lineage In The Endochondral Skeleton. *Development* 131:1309-1318, 2004.

Seto H, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Hiraoka H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, Tanaka S. Distinct Role of Smad Pathways and p38 Pathways in Cartilage-specific Gene Expression in Synovial Fibroblasts. *J Clin Invest* 113:718-726, 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, H Kawaguchi. Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* 279:15314-15322, 2004.

Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113:846-855, 2004.

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

Yamada T, Kawano H, Sekine K, Matsumoto T, Fukuda T, Azuma Y, Chung U, Chambon P, Nakamura K, Kato S, 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.

Hoshi K, Ogata N, Shimoaka T, Terauchi Y, Kadowaki T, Kenmotsu S, Chung U, Ozawa H, Nakamura K, 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.

Chung U. Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocrine Journal* 51:19-24, 2004.

2. 学会発表

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-b カテニンシグナルは軟骨細胞への分化と肥大分化を促進的に制御している」第22回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集 2004: 97.

大庭伸介、池田敏之、亀倉 暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、Lichtler Alex、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分化のための最低限のシグナルユニットである」第22回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集 2004: 142.(優秀演題賞受賞)

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」日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集 2004: 122.(奨励賞受賞)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願2003-059692 (平成15年3月6日出願)

「軟骨様細胞およびその製造法ならびに軟骨様細胞誘導用組成物」

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 星 和人（東京大学大学院医学系研究科・メニコン軟骨骨再生医療 助教授）

研究要旨

1. 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）を明らかにした
2. 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）を作成し、機能を確認した。
3. 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を行った

A. 研究目的

安全安心かつ低侵襲な再生医療を実現するためには、骨・軟骨分化の十分条件を知る必要がある。複数のシグナル因子の組合せによって細胞株や皮膚線維芽細胞などを骨・軟骨様細胞に形質転換できることを既に発見しているが、今後さらに分化効率を高め分化状態を長く保つ技術を開発するために、分担研究者の鄭と共同して骨・軟骨分化誘導因子の探索を行った。

B. 研究方法

1. 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）に関しては、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、ヒトにおいての低身長の原因である可能性を現在検索中である。
2. 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については、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- β ・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。

3. 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については、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。

C. 研究結果

1. 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。
2. 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。
3. 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。

D. 考察

cGKIIは、骨・軟骨を制御する重要な因子であり、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できる可能性を示した。

E. 結論

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。

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

1. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*. in press.

2. Hosoya A, Hoshi K, Sahara N, Ninomiya T, Akahane S, Kawamoto T, Ozawa H. Effects of fixation and decalcification on the immunohistochemical localization of bone matrix proteins in fresh-frozen bone sections. *Histochem Cell Biol*. in press

3. Yamaguchi M, Ogata N, Shinoda Y, Akune T, Kamekura S, Terauchi Y, Kadowaki T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Insulin Receptor Substrate-1 Is Required for Bone Anabolic Function of Parathyroid Hormone in Mice. *Endocrinology*. in press

4. Tazawa K, Hoshi K, Kawamoto S, Tanaka M, Ejiri S, Ozawa H. Osteocytic osteolysis observed in rats to which parathyroid hormone was continuously administered. *J Bone Miner Metab* 22:524-529, 2004

5. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung UI, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Matsumoto M, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H. Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* 279:15314-15322, 2004

6. Ogasawara T, Kawaguchi H, Jinno S, Hoshi K, Itaka K, Takato T, Nakamura K, Okayama H. Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires Smad-mediated down-regulation of Cdk6. *Mol Cell Biol* 24:6560-6568, 2004

7. Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, Kawaguchi H. Osteoclast Differentiation by RANKL Requires NF-kappaB-Mediated Downregulation of

Cyclin-Dependent Kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19:1128-1136, 2004

8. Hoshi K, Ogata N, Shimoaka T, Terauchi Y, Kadowaki T, Kenmotsu S, Chung UI, Ozawa H, Nakamura K, 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

9. 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, 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

2. 学会発表

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：千葉県千葉市：2004・3

日本再生医療学会雑誌 3suppl: 94, 2004

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：第 3 回日本再生医療学会総会：千葉県千葉市：2004・3

日本再生医療学会雑誌 3suppl: 96, 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：東京都千代田区：2004・7

プログラム抄録集 105

劉 光耀、星 和人、小笠原 徹、高戸 毅、川口 浩、中村 耕三 Experimental trials to make implant-type regenerated cartilage by autologous chondrocytes. 第 53 回東日本整形災害外科学会：山形県山形市：2004・9

東日本整形災害外科学会雑誌 16 (3) 2004、
P354

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 東京
都 日本

山岡尚世、小笠原徹、中塚貴志、朝戸裕貴、高
戸 毅、星 和人 インプラント型再生軟骨作
製のための足場素材の検討 第 13 回日本形成
外科学会基礎学術集会 千葉県浦安市 日本

高橋嗣明、小笠原徹、鄭雄一、川口浩、朝戸裕
貴、内沼栄樹、高戸 毅、星 和人 軟骨細胞
の増殖・分化を誘導する液性因子の組み合わせ
の最適化 第 13 回日本形成外科学会基礎学
術集会 千葉県浦安市 日本

星 和人、劉 光耀、小笠原 徹、浅輪 幸世、
鄭 雄一、川口 浩、中村 耕三、高戸 毅、
軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の検索
と作用機序の解明 第 3 回日本再生医療学会総
会：大阪市大阪府：2005・3・1-2
日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P104

矢野 文子、大庭 伸介、釘宮 典孝、小笠原
徹、星 和人、中村 耕三、川口 浩、高戸 毅、
鄭 雄一 新規軟骨誘導物質チエノインダゾ
ール誘導体は Sox9 と独立して作用して軟骨分
化を促進し肥大分化を抑制する 第 3 回日本再
生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2
日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P104

山岡 尚世、小笠原 徹、朝戸 裕貴、鄭 雄
一、高戸 毅、星 和人 各種足場素材を用い
たインプラント型再生軟骨作製の試み 第 3 回
日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・
3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、
P131

大庭 伸介、池田 敏之、緒方 直史、リヒト
ラーアレックス、小笠原 徹、星 和人、中村
耕三、川口 浩、高戸 毅、鄭 雄一 骨形
成のための最小十分シグナルの同定と幹細胞

を用いない新規骨再生法の開発 第 3 回日本再
生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2
日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P127

高橋 嗣明、小笠原 徹、鄭 雄一、川口 浩、
中村 耕三、内沼 栄樹、高戸 毅、星 和人
ヒト軟骨細胞の増殖促進と再分化抑制を実現
する培養方法の検討 第 3 回日本再生医療学会
総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2
日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P175

星 和人、亀倉 暁、川口 浩、鄭 雄一、野
田 政樹、マウス変形性関節症モデルとオステ
オポンチン遺伝子欠損マウスを用いた変形性
関節症の発症機序の解明 第 13 回代謝性骨疾
患研究会：大阪市大阪府：2005・3・19
第 13 回 代謝性骨疾患研究会 プログラム
抄録集 P16

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 18 回 日本軟骨代謝学会：大阪市
大阪府：2005・3・18-19 第 18 回 日本軟骨
代謝学会 プログラム抄録集 P7

星 和人、劉 光耀、小笠原 徹、高橋 嗣明、
浅輪 幸世、鄭 雄一、高戸 毅、中村耕三、
川口 浩、軟骨細胞の再分化を誘導する液性因
子の組み合わせの最適化と相互作用機序の検
討：第 18 回 日本軟骨代謝学会：大阪市大阪
府：2005・3・18-19 第 18 回 日本軟骨代謝
学会 プログラム抄録集 P85

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2004-244114「脱分化型軟骨細胞の軟骨細
胞への再分化用培地」

出願者 星 和人、鄭 雄一、川口 浩、高戸
毅、中村 耕三

出願日 2004 年 8 月 24 日

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
Bastepe M, Ogata N, Kawaguchi H, Weinstein LS, Juppner H, Kronenberg HM, and Chung UI	Stimulatory G protein directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage in vivo.	Proc Natl Acad Sci USA	101	14794-14799	2004
Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, Okochi H	Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor-beta (TGF-beta) facilitates cell growth	Exp Cell Res	295 (1)	194-203	2004
Ura H, Takeda F, Okochi H	An in vitro outgrowth culture system for normal human keratinocytes	J Dermatol Sci.	35 (1) :	19-28	2004
Itoh M, Hiraoka Y, Kataoka K, Huh NH, Tabata Y, Okochi H	Novel collagen sponge reinforced with polyglycolic acid fiber produces robust, normal hair in murine hair reconstitution model.	Tissue Eng	10	818-24.	2004
大河内仁志	皮膚の多能性幹細胞	医学のあゆみ	211	824-825	2004