

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

変形性膝関節症の生活機能維持・再建に関する研究

平成14年度～平成16年度

総合研究報告書

主任研究者 守屋 秀繁

平成17(2005)年 4月

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

変形性膝関節症の生活機能維持・再建に関する研究

平成14年度～平成16年度

総合研究報告書

主任研究者 守屋 秀繁

平成17(2005)年 4月

目 次

I. 総合研究報告書	
変形性膝関節症の生活機能維持・再建に関する研究	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
III. 研究成果の刊行物・別刷	32

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

総合研究報告書

変形性膝関節症の生活機能維持・再建に関する研究

主任研究者 守屋秀繁

千葉大学大学院医学研究院整形外科学教授

研究要旨

急速に高齢化へと移行している我が国において、大きな社会問題の一つは生活機能低下をきたす慢性運動器疾患いわゆる生活機能病の増大である。中でも変形性関節症は日本人に特に多く、その数は正確には把握されていないが、約700万人から1000万人とも推定されている。本症は主として加齢変性と軟骨組織の損傷により生じ、進行すれば歩行などの日常生活動作にも支障を来す重大な疾患である。変形性膝関節症による生活機能上の障害とは慢性の膝痛とそれによる歩行障害であり、ひいては歩行不能による車いす生活を余儀なくされることである。その社会的損失は今後の高齢化の進行に伴い益々増大していくものと考えられる。従って変形性膝関節症の原因究明、早期診断、早期診断に基づく機能障害の予防、さらには著しい機能障害に陥ってしまった患者に対する機能回復術の確立は今後さらに重要な意義を持つものであり、従来行われてきた治療法の再検証を行うと共に、新しい治療法としての軟骨再生、関節鏡視下手術、人工関節置換術に関しても研究をおこなう。

分担研究者

中村耕三

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻
感覚運動機能医学講座整形外科学教授

井上 一

岡山大学大学院医歯学総合研究科
機能再生・再建科学専攻生体機能再生・再建学
講座教授

西田 圭一郎

岡山大学大学院医歯学総合研究科
機能再生・再建科学専攻生体機能再生・再建学
講座助教授

松本秀男

慶応義塾大学医学部整形外科助教授

池平博夫

放射線医学研究所画像医学部分子情報研究室
室長

牛田多加志

東京大学大学院医学系研究科附属
疾患生命工学センター
医療材料・機器工学部門教授

A. 研究目的

変形性膝関節症の病因としては遺伝的素因、環境的素因を含めて多くの因子が考えられているが、いずれにしても軟骨基質の変性が一次的な原因と考えられる。これには加齢に伴うコラーゲンなど軟骨基質の組成変化に加えて機械的ストレスの蓄積などが素因となるものと考えられる。初期には、主として軟骨の色調の変化やfibrillationなどの微弱な変性像を呈するにとどまり、正確な早期診断のなされぬまま最終的には軟骨基質の消失と骨棘形成など骨の変形へと進行していく。従って本研究の目的は、1) 変形性膝関節症の遺伝分子生物学的背景、2) 変形性膝関節症の発症における生化学的要因（メカニカルストレスを中心に）、3) 変形性膝関節症発症のバイオメカニクスの要因を解明することにより、我が国における変形性膝関節症発症の原因を明確にし、4) 変形性膝関節症の非侵襲的、かつ質的な早期診断法を開発することにより的確な病期診断と初期治療を可能とすることであり、さらに5) 軟骨再生医学の基礎検討より臨床応用を図り、6) 重症変形性膝関節症に対する機能再建術の研究により医療経済上の損失を最小限に食い止め、高齢化社会における国民福祉の向上を目指すものである。

B. 研究方法

1) 変形性膝関節症の原因究明

①分子遺伝学的素因の解明…変形性関節症(OA)は高齢者のQOLを低下させている主要な要因のひとつであるが、その細胞・分子レベルのメカニズムについては殆ど解明されていない。この要因のひとつとして、遺伝子改変のシステムが確立されているマウスにおいて適当なOA誘発モデルが存在しなかったことが挙げられる。そこで下記の検討をおこなった。

a) マウス OA 誘発モデルの確立

マウスを全身麻酔下にて顕微鏡手術によって、膝蓋靭帯、ACL、PCLの切離とMM、LMの切除を行い、これをsevereモデルとした。また、ACLのみ切離したものをmildモデル、ACL切離とMMを切除したものをmoderateモデル、MCL切離とMMを切除したものをmedialモデルとした。これらのモデルを用い、不安定性の程度による、OAの進行過程を免疫染色、in situ hybridizationを用いて経時的に解析した。

b) OA候補遺伝子の遺伝子改変マウスへの応用
これらのモデルを候補遺伝子の遺伝子改変マウスに应用することによって、OAの発症における各遺伝子の関与を検討した。

②メカニカルストレスと一酸化窒素(NO)との関連の解明

a) ラット軟骨細胞を用いた in vitro 実験

ラット培養軟骨細胞に対するメカニカルストレス負荷後の遺伝子発現について、マイクロアレイ法による解析を行い、NOの発現に関与するとされるiNOSなどの種々の因子の検討を行なった。生後1週齢のウイスターラット膝より、軟骨細胞を採取し、5日間培養後、36時間Rat rhIL-4 (10ng/ml)で前処置した。この培養細胞に対し、Flexercell 2000を用いた伸長ストレス(0.5 Hz, 7%伸張)を負荷し、負荷前後での遺伝子発現の変化をcDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。マイクロアレイで得られた結果の一部をRT-PCRを用いて検証した。

b) ラット OA モデルを用いた解析

変形性関節症(OA)モデルをラット膝関節に確実かつ効率的に作成する手法(ACL・MCL切離、MM切除)を確立し、IL-4 (100 ng/day)の関節内直接投与によるIL-4のin vivoにおける効果を組織学的に検討した。ラットOAモデルにおけるIL-4の効果を変えて検討すること、モデル動物より得られた軟骨サンプルにおいて上記PCRの結果が再現されているか、について組織学および免疫組織学的に検討し

た。メカニカルストレスに加えて、重要な酸化ストレスの指標で、NOと密接な関係のある因子であるH2O2の発現についても検討を加えた。

③バイオメカニクスの要因の解明

変形性膝関節症患者の日常生活動作中の膝関節負荷を計測することにより、病態の把握や治療効果について検討する。具体的には、歩行や床からの立ち上がり動作における膝関節の力学的負荷、筋活動の評価を行う。また、動作中に膝関節を含む下肢のアライメントがどのように変化するかを解析する。さらにこれらのデータを下にも、装具による治療効果を生体工学的に考察する。加えて変形性膝関節症に対して施行した人工関節置換術により、日常生活動作における関節負荷がどのように変化するかを検討する。Kellgren-Lawrence分類でgrade3以上の歩行可能な内側型変形性膝関節症患者26名52膝(うち14膝は人工関節置換術後)および健常者として60歳以上の8名16膝を対象とした。4台の特殊カメラおよび床反力計からなる3次元動作解析装置(Qualysis)を用いて10m平地歩行、および最大屈曲からの片脚起立動作を計測した。被験者の下肢に合計6つの表面マーカーを添付し、マーカーの3次元位置および動作中の床反力を120Hzで計測した。膝関節の負荷算出にはInverse Dynamics法を用い、データを被験者の体重および身長で標準化し、比較検討した。動作中の大腿四頭筋モーメント、膝関節内反モーメントおよび下肢内反角を患者群と健常群と比較した。また患者群において、裸足、外側楔状型足底挿板および足関節固定バンドつき外側楔状型足底挿板の3種類における膝関節内反モーメントの変化を検討した。手術による影響の検討では、片側にのみ人工関節を施行した患者群で手術側と非手術側の動作中の大腿四頭筋モーメントおよび膝関節内反モーメントを比較した。

2) 変形性膝関節症の早期診断法の確立

GAGは陰性荷電する高分子であり、この濃度の高い正常軟骨では陰性荷電量が大きい。軟骨変性に伴い減少する。ここに同じく陰性荷電する造影剤Gd-DTPA²⁻を投与すると、静電気力による相互作用により造影効果が関節軟骨の陰性荷電量により変化することを応用している。本研究では陰イオン性造影剤Gd-DTPA²⁻を用いて関節軟骨中のGlycosaminoglycan(GAG)濃度の評価を行った。

検査法は、Gd-DTPA²⁺を経静脈投与し、関節軟骨に浸透するまで待機させた後、1.5 T の臨床 MRI 装置を使用して T1 計算画像作成のための撮像を行う。得られた画像データは、T1 計算画像作成プログラムを使用して画像処理し、健康軟骨の T1 値と修復軟骨の T1 値を比較することにより関節軟骨の GAG 濃度を評価する。本法により評価された GAG 濃度と、組織生検の際に採取された組織の実際の GAG 濃度を比較することにより、本法の有用性を客観的に検証する。

3) 変形性膝関節症の治療の確立

①軟骨損傷、破壊に対する再生医学…軟骨は無血管、無神経で比較的単純な組織構造をもっていることから、再生医学において臨床応用され得る有力な組織の一つであると考えられている。静水圧は軟骨組織が生理的に負荷されている物理的刺激の一つであり、静水圧負荷は軟骨細胞のマトリックス産生を促進させることが知られている。一方で、再生医学においては軟骨細胞を生体外培養すると脱分化するため、硝子軟骨の再生に問題を抱えており、軟骨細胞を増殖させることにより不可避に起こると考えられている脱分化を、如何に生体外で再分化させ 3 次元培養担体に播種するかが重要な問題になってくる。そこで静水圧刺激に対する関節軟骨細胞の応答のメカニズムにどのようなシグナル応答のメカニズムが関与するかを探り、長期静水圧負荷培養システムの構築を目指した。

a) 静水圧と ERK signal の関与

軟骨細胞は、生後一ヶ月の子牛の肘関節より軟骨片を採取し、コラゲナーゼを用いて分離した。分離した後、F-12 培地 10%FBS で培養を行った。軟骨細胞を 3-5 継代した後、コラーゲンコートした dish に細胞を播種した。1 日培養した後、無血清培地に替えさらに 2 日培養した。静水圧負荷カラム内に細胞が播種された dish を入れ HEPES 溶液で満たした。静水圧は 5MPa、0.5Hz で負荷したグループ（間欠的圧力）と 5MPa で一定圧に負荷したグループ（一定圧）とポジティブコントロールとして IL-1 を添加したグループから、それぞれ 5 分、15 分、30 分後に細胞をサンプリングした。それぞれのサンプルから、Western Blotting によりリン酸化 ERK およびリン酸化 JNK を検出し、NIH Image により解析を行なった。同様な方法で、

静水圧を 5MPa、0.1Hz 負荷したグループ（間欠的圧力）とポジティブコントロールとして bFGF を添加したグループから、4 時間、8 時間後に細胞を採取し Northern Blotting により Sox9 の発現を検証した。

b) 細胞内外の Ca²⁺濃度変化の関与

種々の静水圧刺激に対する関節軟骨細胞の応答のメカニズムへの細胞内外の Ca²⁺の関与を報告した。Ca²⁺蛍光指示薬 fura2 によって染色した軟骨組織を圧力カラムにセットし、中を HEPES 溶液で満たす。そして静水圧チャンバーを倒立型顕微鏡のステージ上に置き、周囲を固定する。静水圧負荷装置を用いて軟骨組織に間欠的静水圧を負荷し、それに応じた細胞内 Ca²⁺ 蛍光画像を ARGUS Ca²⁺解析システムに取り込み、解析した。細胞内 Ca²⁺濃度は（340nm 励起光による蛍光量/380nm 励起光による蛍光量）の比から予測した。

c) 長期静水圧負荷培養システムの構築

ウシ正常膝関節軟骨から軟骨細胞を、0.2% コラゲナーゼ溶液を用いて抽出し、10%のウシ胎児血清を含む F12 培地を用いて混合し、細胞懸濁液を調製した。さらに、培養 dish に 2*10⁶cells/9.6cm² の密度で播種し、12 時間静置した後、1 バッグに 2 枚の dish を封入し、バッグ内を 20ml の培地で満たした。さらにバッグをステンレスカラム（φ50、L300）に入れ、カラム内を R0 水で満たした。1/2、1/10、1/60、1/600Hz、5MPa の静水圧を 1 日に 4 時間負荷し、このパターンをくり返しながら 4 日間培養した。細胞を播種した dish を封入したバッグを静水圧負荷なしにインキュベーター内で培養したものをコントロールとした。培養後、軟骨細胞を Trizol 処理し、m-RNA を抽出した。さらに、GAPDH、aggrecan、type I collagen、type II collagen、type X collagen の m-RNA の発現量を RT-PCR 法を用いて検出し、解析をおこなった。得られた PCR のバンドを NIH Image にて半定量的に解析した。今回構築した静水圧負荷システムを示す。水を循環させエアアクチュエーター弁の開閉により、耐圧カラム内に高圧を実現した。さらにパソコンにより周期 [ms]、負荷時間 [ms]、圧力 [MPa] を制御可能とした。また、細胞を播種した dish を、ガス透過性の高いポリオレフィン製血液バッグに封入し、バッグ内を培地で充填して実験に供した。バッグ内細胞

環境のガス分圧はインキュベーター内のそれと一致させることができること、良好なガス透過性を有することを確認した。負荷パターンも任意の波形の実現を確認した。

②変形性膝関節症による重度破壊関節に対する機能再建術に関する研究

重度の変形性膝関節症による疼痛、関節拘縮に関しては保存的治療では症状の改善が得られず、最終的に人工膝関節置換術に至ることが多い。しかし、手術侵襲、それに伴う比較的長期の治療期間など患者側が戸惑う面が存在するのは否めない。そこで通常であれば人工膝関節置換術を施行しうる程度の、屈曲拘縮を伴う重度の変形性膝関節症に対してわれわれは、関節鏡視下にデブリードマンを施行した後に、骨膜剥離鉗子などを用いて、脛骨から内側の関節包を剥離する関節鏡視下後内側切離術 (Arthroscopic Posterior-medial release 以下 PMR) をおこなってきた。今回は PMR の長期的効果、適応の検討をおこなった。

a) PMR の長期成績の検討

対象は 1997 年より 2001 年 10 月までに PMR を受けた、屈曲拘縮を伴う比較的重度の変形性膝関節症患者のうち術後経過観察期間が 2 年以上の 51 例で、女性 38 例、男性 13 例である。手術時平均年齢は 71.3 歳であった。臨床成績の評価には日整会膝治療成績判定基準 (JOA スコア)、Verbal Rating Score を用い、患者の満足度と夜間痛の有無などを聞き取り調査した。一部の症例においては、手術の前後 1 週間で歩容を比較した。

b) PMR の適応の検討

2001 年 4 月より 2002 年 12 月までに鏡視下後内側切離術 (PMR)、高位脛骨骨切り術 (以下 HTO)、人工膝関節全置換術 (以下 TKA) を受けた比較的重度の変形性膝関節症患者 149 名 187 膝で、女性 131 名 164 膝、男性 18 名 23 膝である。手術時平均年齢は 71.0 歳であり、平均経過観察期間は 1 年 7 ヶ月であった。レントゲン重症度の評価には、Kellgren & Lawrence 分類、Ahlback 分類を用い、臨床成績の評価には日整会膝治療成績判定基準 (JOA score)、Visual Analog Scale (VAS)、Japan Knee Osteoarthritis Measure (JKOM) を用いた。統計学的検討を JOA score、VAS のスコアの改善量、最終術後スコアに関して Mann-Whitney U

検定および Kruskal-Wallis の検定を用いて行なった。JKOM に関しては主成分分析、赤池の情報量基準を用いて解析した。

3) MRI を用いた検討

PMR の手術適応を、MRI 画像を用いて検討した。対象は千葉大学医学部附属病院整形外科において PMR を施行した比較的重度の内側型変形性膝関節症患者 59 名 66 膝である。手術時年齢は 47-85 歳で平均 71.5 歳であり、経過観察期間は 2 年以上が 52 膝、2 年以内が 14 膝であった。レントゲン重症度の評価には、Kellgren & Lawrence 分類を用い、MRI 所見の評価にはプロトン強調画像矢状断像を、臨床成績の評価には日整会膝治療成績判定基準 (JOA OA knee score) を用いた。統計学的検討を各スコアの改善量、最終術後スコアに関して Wilcoxon 符号付順位の検定を用いて行なった。P<0.01 を有意と判定した。

尚、本研究において提供された生体試料及び実験動物を研究に使用する部分の倫理面には十分に配慮する。すなわち、採血等、生体試料を用いた実験及び実験動物を用いた実験は、すべてそれぞれの研究者の所属する機関の倫理委員会等で承認され、患者の同意を得ることを前提としている。また、ヒトゲノム・遺伝子解析研究にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、被験者の人権を保護する目的から説明文と同意書を文書の形で残り、説明文の中に DNA 研究もしくは遺伝子研究という文書を含むものとする。

C. D. 研究結果および考察

1) 変形性膝関節症の原因究明

①遺伝分子生物学的素因の解明

a) マウス変形性関節症誘発モデルの確立

これらのモデルは、病期の進行速度は異なるものの、いずれも同様の OA 所見を呈した。Severe モデルでは軟骨の変性・脱落から骨棘形成に至る OA の後期変化が術後 2 週以後に見られた。一方 mild モデルは術後 6 週まで軟骨細胞の増殖・肥大化などの初期変化を詳細に観察出来た。また moderate モデルでは術後 2 週までは初期変化を、それ以降は後期変化が観察できた。本モデルを用い、OA の進行過程を免疫染色、in situ hybridization を用いて経時的に解析した。本モデルの初期像では後方の関節腔が狭小

化してストレスが集中しており、局所の軟骨細胞は不規則な配列を示しながら増殖していた。増殖した細胞の一部は type X collagen を発現する肥大化細胞様の所見を呈し、同時に MMP-13 が他の MMP-2, 3, 9, 14 に比べ強力に誘導されていた。一方、成長板では MMP-2, 9, 13 が発現・局在し、特に MMP-13 は肥大軟骨細胞において type X collagen よりも遅れて石灰化する直前に発現・局在していた。以上より OA 関節軟骨では成長軟骨と類似した分化像が見られるが、増殖と分化の時系列が不規則となっており、さらに局所における MMP-13 の発現調節機構が異なることが明らかとなった。このように、マウス膝関節 OA の進行を、軟骨破壊および骨棘形成それぞれに grading するシステムを樹立した。

b) OA 候補遺伝子の遺伝子改変マウスへの応用 〈cystatin10 (Cst10) 遺伝子の関与〉

食餌中のリン濃度によって *ttw* マウスの耳介軟骨における発現が異なる遺伝子を differential display 法により解析した。その結果、全身の組織の中で軟骨でのみ特異的に発現している 1 種類の遺伝子を特定した。この遺伝子 Cst10 は、cysteine proteinase inhibitor の family に属し、*ttw* の耳介軟骨での発現はリン負荷により著明に亢進した。マウス軟骨細胞様細胞株 ATDC5 培養系においては、分化誘導後に X 型コラーゲンの発現に先立って現れ、その後分化の進行に伴って発現量は増加した。マウスの成長板の免疫組織染色では、分化の進んだ肥大細胞層に強い染色性が認められた。Cst10 の機能解析のために、ATDC5 に Cst10 を遺伝子導入したところ、Cst10 導入細胞では II 型コラーゲンの発現と Alcian blue の染色性は対照細胞と同程度であったが、Alizarin red および von Kossa の染色性は著明に亢進していた。より発現の強い導入細胞クローンでは早期にアポトーシスの誘導が見られた。

そこで、Cst10 の生体内高次機能を解明することを目的として、Cst10 遺伝子欠損マウス (Cst10KO) を作出した。8 週齢の全身 X 線像では雄雌共に、Cst10KO と WT の間に全身骨格の形態に大きな差はなかった。成長板軟骨の厚さや軟骨細胞の柱状配列も正常に保たれていたが、成長板下端の肥大軟骨細胞層での石灰化が Cst10KO で低下していた。マウス成長板から

単離した軟骨細胞培養において、Alcian blue 染色では差は見られなかったが、Alkaline phosphatase 染色や Alizarin red 染色では Cst10KO で染色性の低下が見られた。この 8 週齢の Cst10KO に上記の OA モデルを作成したところ、軟骨の破壊や軟骨細胞の肥大化は WT と同様に見られたが、骨棘形成が低下していた。3 次元 CT にて骨棘の体積を測定したところ、Cst10KO では WT の約 1/3 に減少していた。また、12 ヶ月齢の生理的条件下の WT の全身 X 線撮影では、膝蓋靭帯やアキレス腱部の異所性石灰化が観察されたが、Cst10KO ではこれらの石灰化が著明に抑制されていた。3 次元 CT により、アキレス腱部の異所性石灰化部分の体積を測定したところ、Cst10KO では WT と比較して約 60% 減少していた。以上、新規遺伝子である cystatin 10 が、骨棘の形成に関与していることを、ホモ欠損マウスに上記 OA 負荷を与えることによって解明した。

〈Runx2 遺伝子の関与〉

またさらに、マウスモデル OA 関節軟骨の初期に COL10 陽性の病的肥大軟骨細胞の出現と、MMP-13 の発現による軟骨基質の分解が見られたことより、その背景分子の候補として COL10 および MMP-13 の共通の上流転写因子として知られている Runx2 (Cbfa1) に注目した。Runx2 ホモ欠損マウスは軟骨の肥大化障害による骨化不全のために胎生致死となるため、Runx2 ヘテロ欠損マウス (Runx2^{+/-}) (長崎大学解剖学の小守寿文教授より供与) に上記 OA 誘発モデルを作製した。生理的条件下では Runx2^{+/-} マウスは既知の通り鎖骨頭蓋異形成を示したが、関節軟骨は正常であった。また、成長軟骨も正常で成長障害も見られなかった。OA モデルを作成したところ、WT の関節軟骨では、術後 4 週より safranin-O 染色性の低下と表層・中層の破壊が観察され、12 週では破壊が深層 (tidemark の下) にまで達していた。また 8 週から脛骨内側縁に骨棘形成が観察された。一方、Runx2^{+/-} では術後 12 週においても染色性の低下は軽度で軟骨破壊は表層内に止まっており、骨棘形成は見られなかった。12 週後の Mankin score は、WT が 9.2 ± 0.7 点、Runx2^{+/-} が 4.3 ± 0.5 点 (mean ± SEM) であった。COL10 と MMP-13 の免疫染色を行ったところ、WT では表層・中層での軟骨細胞の病的肥大分化に伴って両者の発現が術後 4 週から見られたが、Runx2^{+/-} では肥大分化は殆ど見られず、COL10 の発現のみならず MMP-13 の発現

も著明に抑制されていた。Runx2の機能不全が、OAにおける関節軟骨の病的肥大化のみならず、軟骨基質の分解をも著明に抑制することが示された。以上より、Runx2による病的肥大化がOA発症の引き金となることが示唆された。この早期変化は、OA関節軟骨の中心部にも辺縁部にも共に認められ、その後は中心部では軟骨破壊が進行し、辺縁部では骨棘形成に移行した。この差については、軟骨の肥大化に引き続いて中心部では血管新生を伴わないが辺縁部では血管新生を伴って骨化を誘導するためと考えられた。

(中村ら)

②メカニカルストレスとの関連の解明

a) ラット軟骨細胞を用いた *in vitro* 実験

検討した1081の遺伝子のうち、伸張ストレスによってiNOS, Cathepsin B, c-myc, TIMP-1, TGF- β 3, VCAM-1を含む37遺伝子の発現が有為に増強し、IGFBP-5, MMP-3を含む46遺伝子の発現が低下することを確認した。また実際にiNOSおよびCathepsin Bの発現が、ストレス負荷後により亢進し、さらに種々の濃度でIL-4を培養液中加入することにより減弱することをリアルタイムPCRにて確認した。本負荷はaggrecan, Type II コラーゲン, MMP-3の発現に影響を与えなかった。Cathepsin Lの発現は負荷前後で認めなかった。一方、MMP-1, -13およびCathepsin Dの発現はメカニカルストレス負荷24時間後に有意に亢進し、rhIL-4 (10 ng/ml)によって強く抑制された。

b) ラットOAモデルを用いた解析

ラット実験的OA膝の肉眼的観察ではSham群では術後4週でも光沢に富む正常軟骨が観察されたのに対し、OA群では2週で関節軟骨表面の粗造化が、また4週では軟骨変性に加え、大腿骨および脛骨に骨棘形成が認められ、6週では特に脛骨内側顆部に強い軟骨破壊を認めた。一方でIL-4投与群では軟骨の粗造化、破壊は各週において抑制されていた。

組織学的検討を大腿骨遠位内側顆部の荷重部で行ったところ、サフラニン染色ではSham群では正常の細胞配列と全層性の強い染色性を認めたのに対し、OA群では2週から6週にかけて修正Mankin score 0-14にいたる種々の程度の組織学的進行度を呈していた。Mankin scoreの平均は2週で 2.28 ± 1.89 、4週で 5.11 ± 2.47 、6週で 5.88 ± 2.80 と有意に進行した。一方IL-4の関節内投与により治療群では2週で表層のみ

のサフラニン0に対する染色性の低下、4週で軟骨細胞の軽度増殖、6週で中間層に至るサフラニン0の染色性低下を認めたが、強い軟骨破壊には至らなかった。修正Mankinスコアは2、4、6週において10 ng/kg/day投与群でそれぞれ 1.28 ± 1.38 、 3.00 ± 0.70 、 3.42 ± 0.78 点、50 ng/kg/day投与群でそれぞれ 0.85 ± 0.07 、 2.66 ± 1.21 、 2.85 ± 3.33 点、100 ng/kg/day投与群でそれぞれ 0.66 ± 0.57 、 2.57 ± 3.91 、 3.12 ± 1.35 点であり、治療群で有意に軟骨破壊が抑制されていた。一方、治療群において軟骨破壊の抑制程度に差はみられなかった。

免疫染色ではOA変化に伴い、ニトロチロシン陽性細胞率は増加した。一方でCathepsin Bの発現は関節炎惹起後早期に上昇し、進行すると低下する傾向にあった。このCathepsin Bの発現は*in vitro*同様、IL-4の関節内投与により有意に抑制された。酸化ストレスの指標の一つとしてのHO-1は進行期に強く、早期、末期の軟骨組織では発現が低下していた。

IL-4はB細胞、T細胞、肥満細胞、マクロファージといった主に免疫、アレルギーに関与する細胞に働く多面性を持ったサイトカインである。近年、軟骨細胞は正常状態でIL-4を発現、産生しており、膜表面のインテグリンを介したメカニカルストレスに対する反応に関与することが分かってきた。

ラット膝関節において前十字靭帯切離、内側側副靭帯切離、内側半月板切除を加えると、軟骨破壊は6週までに急速に進行することからも、加齢とは関係なく、程度によってはメカニカルストレスのみでOA病態の再現が可能であることが示された。また、*in vitro*でメカニカルストレスにより発現が亢進するNO合成酵素の遺伝子発現がIL-4添加により容量依存性に発現が抑制されること、またNO₂/NO₃ assayにより培養液中のNO_x濃度もIL-4添加により有意に減少することを初めて示した。

ラット膝関節に作成したOAに対しては、IL-4の関節内投与により治療群ではコントロール群に比べて組織学的関節軟骨破壊は有意に抑制されていた。一方で用量依存性の抑制は認められず、IL-4の関節内投与はラット実験的OAにおける軟骨破壊をある程度抑制し得るが完全ではないことも判明した。Yehらは、IL-4はIL-1、IL-1+TNF、あるいはLPSによるプロテオグリカ

ンの変性をMMPやTIMPの発現レベルを変えることなく抑制することから、アグリカナーゼ、カルパイン、カテプシン、プラスミノゲンアクチベーターなどの発現抑制を制御する可能性を示唆している。我々の一連の研究結果からはIL-4が力学的ストレスにより亢進するカテプシンB、Dの発現を*in vitro*および*in vivo*で抑制することが判明した。カテプシンB、Dは各種ストレスにより引き起こされる小胞体ストレスによるアポトーシスで重要な役割を担っている事がわかっており、上記のOA抑制効果はアポトーシス抑制による結果である可能性もある。さらに、IL-4の添加が軟骨細胞におけるメカニカルストレスにより誘導されたMMP-1、-13といったコラゲナーゼの発現を抑制する結果も、*in vivo*におけるIL-4の軟骨破壊抑制効果の機序の一つになっている可能性がある。(井上、西田ら)

③ バイオメカニクスの要因の解明

変形性膝関節症患者の関節負荷の検討では、患者群における特徴的なデータが明らかとなった。動作中の大腿四頭筋モーメントは、立ち上がり動作において健常群5.5(%体重x身長)、患者群3.9(%体重x身長)であり、患者群での負担の大きい動作における大腿四頭筋モーメントの低下が明らかであった。また膝関節内反モーメントは、歩行中に2群間の差が大きく、健常群1.6(%体重x身長)、患者群4.3(%体重x身長)と患者群において増大していた。また関節負荷の差は、より重度の変形性膝関節症において顕著であった。歩行中の内反角の変化は、健常群では0.4度であったのに対し中等度の変形性膝関節症では1.9度、重度変形性膝関節症では3.1度とやはり変形が重度になるほど大きい結果を示した。足底挿板使用による影響の検討では、裸足に比べ外側楔状型足底挿板および足関節固定バンドつき外側楔状型足底挿板の使用により歩行中の膝関節内反モーメントがそれぞれ4.4%、7.9%減少した。

人工膝関節による検討では、立ち上がり動作における大腿四頭筋モーメントが手術側4.0(%体重x身長)、非手術側3.1(%体重x身長)であり、手術側でのモーメントが増大していた。一方、歩行中の膝関節内反モーメントは、手術側2.6(%体重x身長)、非手術側4.0(%体重x身長)と手術側において減少していた。

動作解析装置による関節負荷計測により、変形

性膝関節症患者の病態が明らかとなった。今回検討した関節負荷はそれぞれ、筋活動や荷重状態を反映する。大腿四頭筋モーメントは動作中の外力に拮抗するモーメントであり、膝伸展筋活動の指標となる。また膝関節内反モーメントは、動作中の外力が膝を内反しようとする力に等しく、膝関節内側にかかる荷重に比例する。すなわち、変形性膝関節症患者では負担の大きい動作における大腿四頭筋活動の低下や、歩行における関節内側負荷の増大が生じていることが示された。また変形が高度になるに従い、その傾向が顕著となることも明らかになった。加えて、歩行中におこる下肢の内反(0脚)変形も、変形が高度な症例において大きくなることがわかった。また、研究により変形性膝関節症に対する治療法の有効性を示した。特に異なる足底挿板の使用により、関節内側の負荷を有意に減少させられることがわかった。この結果は、足底挿板の生体力学的効果を示している。加えて、人工膝関節手術により関節負荷が健常のパターンに近くなることも明らかとなった。このことから、手術により筋活動や荷重状態が改善することが定量的に示された。(松本ら)

2) 変形性関節症の早期診断法の確立

関節軟骨の質的評価を非侵襲的におこなうため、軟骨基質を構成する分子の一つであるグリコサミノグリカン(GAG)濃度の測定をMRIを用いておこなう方法を検討した。63症例に対し評価を行なった。造影前のR1(=1/T1)値と造影後のR1値の差を用いて求めた、軟骨組織内の浸透した造影剤濃度と、実際の軟骨組織におけるGAG濃度に相関関係を認めた。またこの方法によりレントゲンや従来のMRI撮像により異常を捉えられない膝蓋大腿関節障害の症例の早期の軟骨変性を捉えることに成功した。

現在まで関節軟骨のMRI評価の対象は主に形態的評価であり、質的評価を行うことは困難と考えられていた。今回用いた方法では、関節軟骨中のGAG濃度を評価することが可能であり、この結果は、関節軟骨の機に強い相関を示すものと考えられる。

(池平ら)

3) 変形性膝関節症の治療法の確立

① 軟骨損傷、破壊に対する再生医学

a) 静水圧とERK signalの関与

静水圧の負荷や IL-1 の添加による ERK のリン酸化を、それらの刺激が無い状態でのリン酸化の程度との比をとることにより Ratio とした。一定圧力負荷 (Constant), 間欠的圧力負荷 (Intermittent), IL-1 共に 5, 15 分後にはそれぞれの Ratio 値が増加し, 30 分後には開始時に近い値に戻るという一過性の ERK リン酸化が起こっていることがわかった。一方, JNK のリン酸化は IL-1 のみに一過性に生じ, 一定圧力負荷 (Constant), 間欠的圧力負荷 (Intermittent) には起こらなかった。また, 間欠的静水圧負荷により 8 時間後の Sox9 の発現が, bFGF 添加と同等に増加した。静水圧負荷, 特に間欠的静水圧を軟骨細胞 (この場合, 脱分化した軟骨細胞) に負荷することにより, ERK が有意に一過的にリン酸化され, 一方で JNK をリン酸化しないことがわかった。このことは, 静水圧負荷が, ERK, JNK 共にリン酸化させる IL-1 ではなく, ERK をリン酸化し, JNK をリン酸化しない bFGF 添加の効果に, 少なくとも ERK, JNK に限っては同等であることを示していると考えられる。また, 本研究で負荷された生理的な範囲の静水圧は, JNK をリン酸化させるような (例えば UV 照射のような) 物理的障害としては, 軟骨細胞には認識されないと考えられた。一方, ERK のリン酸化により活性化されるシグナル伝達経路の下流に存在する Sox9 は, Type II コラーゲンの発現を調節する転写因子の一つであることから, 静水圧負荷による ERK の活性化, Sox9 の発現, type II コラーゲンの発現により, 脱分化した軟骨細胞を再分化させる可能性のあることが示唆された。

b) 細胞内外の Ca^{2+} の関与

短時間負荷については, 軟骨組織に間欠的静水圧を 5 分負荷し, その後 10 分無負荷状態として, この 15 分間に Ca^{2+} 濃度の一過性上昇を示したものを細胞の応答とみなし, 軟骨の表層, 中層, 深層ごとに応答率を検討した。その結果, 軟骨組織に負荷する間欠的圧力の周波数と細胞の応答率の関係については表層, 中層, 深層のいずれにおいても周波数 0.2Hz において最も高い応答率を示した。一方, 軟骨組織に負荷する間欠的圧力の振幅と細胞の応答率との関係については, 表層は 5MPa, 中層と深層は 2MPa において最も高い応答率を示した。また, 細胞外液の Ca^{2+} を除去した Ca^{2+} free HEPES, 機械刺

激受容チャネルの働きを阻害する gadolinium イオン, 細胞内 Ca^{2+} ストアの一つである小胞体内の Ca^{2+} を枯渇させる thapsigargin の三つの薬剤を個別に作用させながら軟骨組織に振幅 5MPa, 0.5Hz 周期の間欠的圧力を負荷したときの細胞の応答率については, Ca^{2+} free HEPES, thapsigargin は細胞の応答率を下げ, また gadolinium イオンも若干の減少を見せた。この実験結果から軟骨細胞は静水圧刺激に対して細胞外液, 小胞体, 機械刺激受容チャネルからの流入が絡んだ応答を示すと考えられた。一方, 長時間負荷については, 軟骨組織に最小 0MPa 最大 5MPa の間欠的静水圧を 0.5Hz 周期で 60 分加え続けている最中に, 周期的な Ca^{2+} 濃度の上昇下降 (オシレーション) を示したものを細胞の応答とみなし, 細胞の応答率を検討した。結果, 無負荷状態ではオシレーションは全く観測されなかったが, 間欠的静水圧負荷を加えると 20.2% の細胞で, 振幅と周期が異なる数タイプのオシレーションが起きることを確認した。 Ca^{2+} free HEPES, gadolinium イオン, thapsigargin のいずれかを作用させるとオシレーションは唯一約 7min 周期のものに限定された。このオシレーションは細胞間で同期しているのが特徴で, 細胞が間欠的静水圧を感知し, 細胞間同士で何らかの手段でシグナル伝達をおこなっていないければ不可能な現象である。 Ca^{2+} によるシグナル伝達においては, 情報がオシレーションの振幅や周波数にコードされる例が知られており, その可能性を示唆するものであった。

c) 長期静水圧負荷培養システムの確立

ウシ正常膝関節軟骨から軟骨細胞を, 0.2% コラゲナーゼ溶液を用いて抽出し, 10% のウシ胎児血清を含む F12 培地を用いて混合し, 細胞懸濁液を調製した。さらに, 培養 dish に 2×10^6 cells/9.6cm² の密度で播種し, 12 時間静置した後, 1 バッグに 2 枚の dish を封入し, バッグ内を 20ml の培地で満たした。さらにバッグをステンレスカラム ($\phi 50$, L300) に入れ, カラム内を R0 水で満たした。1/2, 1/10, 1/60, 1/600Hz, 5MPa の静水圧を 1 日に 4 時間負荷し, このパターンをくり返ししながら 4 日間培養した。細胞を播種した dish を封入したバッグを静水圧負荷なしにインキュベーター内で培養したものをコントロールとした。培養後, 軟骨

細胞より RNA を抽出した後、GAPDH, aggrecan, type I collagen, type II collagen, type X collagen の m-RNA の発現量を RT-PCR 法を用いて検出し、解析をおこなった。得られた PCR のバンドを NIH Image にて半定量的に解析した。水を循環させエアアクチュエーター弁の開閉により、耐圧カラム内に高圧を実現した。さらにパソコンにより周期 [ms], 負荷時間 [ms], 圧力 [MPa] を制御可能とした。また、細胞を播種した dish を、ガス透過性の高いポリオレフィン製血液バッグに封入し、バッグ内を培地で充填して実験に供した。バッグ内細胞環境のガス分圧はインキュベーター内のそれと一致させることができること、良好なガス透過性を有することを確認した。負荷パターンも任意の波形の実現を確認した。RO 水を循環させエアアクチュエーター弁を開閉することにより、耐圧カラム内に 5MPa の静水圧を実現することができた。さらに周波数 (周期 [ms]), 負荷時間 [ms], 圧力 [MPa] を制御できるようにした。またコンタミリスクを軽減し、培地を交換しながら長期で培養できるよう、細胞を播種した dish を、ガス透過性の高いポリオレフィン製血液バッグに封入し、バッグ内を培地で充填して実験に供した。構築したシステムにおいて、バッグ内の細胞環境のガス分圧はインキュベーター内のそれと一致させることができることが確認された。静水圧負荷パターンも、5MPa, 0.5Hz の実現を確認し、この系で 10MPa, 1Hz までの静水圧負荷が確認された。一方、aggrecan の m-RNA の発現において、静水圧条件下で抑制される傾向が見られたものの、顕著な差が見られなかった。また、type I collagen の m-RNA の発現については、静水圧条件下 1/2Hz において有意に抑制された (64%)。さらに、type II collagen の m-RNA の発現については、1/2Hz において有意に促進されることが分かった (160%)。最後に、type X collagen の m-RNA の発現については、静水圧条件下 1/60, 1/600Hz において有意に抑制された (62, 48%)。以上のことから、総合的に判断して 1/2Hz 条件での静水圧負荷刺激が軟骨細胞機能の分化を最も維持できることが示唆された。(牛田ら)

②変形性膝関節症による重度破壊関節に対する機能再建術に関する研究

a) 関節鏡視下後内側解離術 (PMR) の長期成績

手術時 Kellgren & Lawrence の X 線分類では、グレード III が 32%、グレード IV が 66% と、進行した変形性膝関節症が大多数であった。JOA スコアは術前平均 56.3 点が術後平均 71.6 点に改善していた。特に歩行に関しては 43%、階段昇降で 63% の改善度を示していた。術前夜間痛を訴えていた症例の 80% 以上が完全に消失していた。関節可動域の改善は 5%、関節腫脹は 30% の改善を示した。手術侵襲が少ないため術翌日よりリハビリを行い、関節可動域の改善は著明ではないものの、ほとんどの症例で歩容が改善した。術後 1 週間以内の入院期間中に、半数以上の患者が「よく眠れるようになり、歩くのが楽になった」と答えていた。

b) PMR の適応の検討

手術法の内訳は PMR が 27 例、HTO が 24 例、TKA が 136 例であった。手術時 Kellgren & Lawrence の X 線分類では、Grade2 が 2 膝、Grade3 が 17 膝、Grade4 が 168 膝、Ahlback 分類では Gradel が 11 膝、Grade 2 が 12 膝、脛骨荷重面の骨の摩滅が認められ始める Grade3 が 55 膝、Grade4 が 57 膝、Grade5 が 52 膝であり、進行した変形性膝関節症が大多数であった。Ahlback 分類 Gradel, 2 群と Grade3, 4, 5 群に分けて、それぞれに関して術式間での臨床症状に関して検討したところ、Grade3, 4, 5 群では改善したスコア量、最終術後スコアに関しては JOA score、VAS とともに術式間に有意差を認めたが、Gradel, 2 群ではそれらに関しては術式間で有意差を認めなかった。JKOM を用いた解析では、主成分分析にて“膝の痛みやこわばり”および“日常生活の状態”に関する質問群が術前後でその成績への関与が大きいことの結果を受け、さらに同質問群の項目に絞って、赤池の情報量基準を用いて解析を進めたところ、『術前階段昇降困難度』、『術前立位時疼痛』、『術前しゃがみ込み・立ち上がりでの疼痛』の項目で PMR の適応を決定する上で重要度が高かった。

c) MRI を用いた検討

手術時 Kellgren & Lawrence の X 線分類では、Grade2 が 1 例、Grade3 が 18 膝、Grade4 が 47 膝であり、進行した内側型変形性膝関節症が大多数であった。MRI (プロトン強調画像) 所見による分類としては、内側コンパートメントの中央を通るようなプロトン強調像矢状断像を画像処理し、大腿骨内側顆の輪郭のみを抽出し、

不整がないかあるいはわずかな不整を認める群を Smooth/minimum irregularity 群 (以下 S 群)、中等度から明らかに不整になっているものを Moderate/obvious irregularity 群 (以下 IR 群) として区別した。その結果、S 群、34 例、IR 群、32 例であり、術後成績による評価では、術後 2 年以上の患者群では、IR 群のみが PMR の術後成績においてその改善度に有意な差を認めなかった。

(守屋ら)

E、結論

以上三年間の研究により、変形性膝関節症の発症およびその進行に関わる分子学的病態、メカニカルストレスの生化学的メカニズム、運動力学的特性がさらに明らかになった。また診断面に関しても、ごく早期での軟骨変性の把握が可能になり、予防医学の発展につながっていくものと確信する。また、大量の組織再生が困難である軟骨組織の静水圧を用いた長期、大量再生の可能性がさらにすすみ、最小侵襲手術の代表である関節鏡視下手術の適応が確立されていくことは、今後激増していくと思われる変形性膝関節症による日常生活動作障害の根絶につながっていく治療法の確立につながる研究成果であると思われる。

F、健康危険情報

なし

G、研究発表

1. 論文発表

1. Moriya H, Sasho T, Sano S, Wada Y. Arthroscopic posteromedial release for osteoarthritic knees with flexion contracture. *Arthroscopy*. 2004 Dec;20(10):1030-9.
2. 佐粧孝久、守屋秀繁: 変形性膝関節症の基本戦略と目標 *日本医師会雑誌* 2004, 第 132 巻、第 7 号、974-976
3. 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.

4. 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 \cdot insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113: 846-855, 2004.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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).
 15. 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).
 16. Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Kamekura S, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Mutation in cGMP-dependent protein kinase II causes dwarfism in a rat mutant KMI through uncoupling of proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Bone Miner Metab* (in press).
 17. Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, and Hoshi K: Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant* (in press).
 18. Yamaguchi M, Ogata N, Shinoda Y, Akune T, Kamekura S, Terauchi Y, Kadowaki T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Insulin receptor substrate-1 is required for bone anabolic function of parathyroid hormone in mice. *Endocrinology* (in press).
 19. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung UI, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, and Kawaguchi H: Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* (in press).
 20. Kawaguchi H, Akune T, Yamaguchi M, Ohba S, Ogata N, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, and Nakamura K: Distinct effects of PPAR α insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab* (in press).
 21. 西田圭一郎, 松尾真嗣, 井上 一: 変形性関節症軟骨にみられる軟骨破壊機序. NEW MOOK 整形外科 リウマチ類縁疾患. 越智隆弘, 菊池臣一編, 金原出版: pp250-54, 2004.
 22. 西田圭一郎, 依光正則, 土井英之, 井上 一, 清水 晃: 軟骨細胞保護における IL-4 の役割. 臨床免疫 41(5):551-555, 2004.
 23. 西田圭一郎, 清水 晃, 依光正則, 土井英之, 相賀礼子, 井上 一: 変形性関節症の発症機序- NO からみた OA 治療へのアプローチ. リウマチ科 31(2):199-205, 2004.
 25. 名倉武雄ほか, 変形性膝関節症患者の動作解析. 日本膝関節学会誌28, p14-16, 2003.
 26. 畔柳裕二ほか, 変形性膝関節症患者における

- 歩行時の膝関節内反角度の変化 -動的FTA評価の試み。日本膝関節学会誌29, p123-126, 2004.
27. 畔柳裕二ほか、外側楔状補高足底挿板の膝・足関節に及ぼす力学的負荷 -足関節バンド固定型足底挿板の効果の検討。靴の医学18, in press, 2005.
 28. Nagura T, et al. Is high flexion following total knee arthroplasty safe? Evaluation of knee joint loads in the patients during maximal flexion. *Journal of Arthroplasty*, in press, 2005.
 29. Watanabe A, Wada Y, Obata T, Sasho T, Ueda T, Tamura M, Ikehira H, Moriya H. Time-course Evaluation of Reparative Cartilage with MR Imaging after Autologous Chondrocyte Implantation. *Cell Transplantation* 2005 in press
 30. 佐粧孝久、和田佑一、守屋秀繁：変形性膝関節症に対する鏡視下手術- 鏡視下後内側解離術の適応と成績- リウマチ科, 30 (2) : 120-128, 2003
 31. 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).
 32. 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).
 33. 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).
 34. 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.
 35. 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.
 36. 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.
 37. 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.
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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.
42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 西田圭一郎、土井英之、藤原一夫、井上一: 変形性関節症における軟骨破壊と NO. In: 平澤泰介、井上一、高岡邦夫ほか・編. 先端医療シリーズ 22: 「整形外科の最新医療」、東京: 先端医療技術研究所; 2003, pp. 81-87.
 46. Hiroo Ikehira, Atsuya Watanabe, Takayuki Obata, Hiroshi Tsujii, Kenneth M. Jones, Li Shun, Hideshige Moriya: The development of three-dimensional T₁ image calculation program in proportion to the DICOM data of any marketing clinical MRI systems. *Magnetic Resonance Imaging* (in press).
 47. 牛田多加志: 工学的アプローチによる細胞分化・組織形成のコントロール日本再生医療学会雑誌 2, 4, 33-39 (2003)
 48. Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, Kawano K, Koshizuka Y, Hosoi T, Nakamura K, Kuro-o M, and Kawaguchi H: Association of *Klotho* gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women, *Bone* 31:37-42, 2002.
 49. Akune T, Ogata N, Hoshi K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Takagi H, Azuma Y, Kadowaki T, Nakamura K, and Kawaguchi H: Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts. *J Cell Biol* 159:147-156, 2002
 50. Shimoaka T, Kawano H, Yonamine A, Chikazu D, Kawano H, Nakamura K, Itoh N, and Kawaguchi H: Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor(FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J Biol Chem* 277:7493-7500, 2002
 51. Ikeda T, Junsei Z, Chano T, Mabuchi A, Fukuda A, Kawaguchi H, Nakamura K, and Ikegawa S: Identification and characterization of the human long form of Sox5(L-Sox5) gene. *Gene* 298:59-68, 2002.
 52. 名倉武雄ほか、深屈曲動作における PCL の重要性。膝, Vol 27, p87-89, 2003.
 53. 名倉武雄ほか、深屈曲動作における PCL の負荷 - 拮抗筋の影響。日本臨床バイオメカニクス学会誌、in press, 2003
 54. Yoshimasa Ishii, Takashi Ushida, Tetsuya Tateishi, Hitoshi Shimojo, Yutaka Miyanaga: Effects of different exposures of hyperbaric oxygen on ligament healing in rats *J Orthop Res*, 2002. 20: 353-356
 55. Kensuke Ochi, Guoping Chen, Takashi Ushida, Hitoshi Abe, Satoshi Gojo, Kaoru Segawa, Hitoshi Tai, Kenju Ueno, Yoshiaki Toyama, Junichi Hata and Akihiko Umezawa: Use of Isolated Mature Osteoblasts in Abundance Acts as Disired Shaped Bone Regeneration in Combination with a Modified Poly-DL-Lactic-Co-Glycolic Acid(PLGA)-Collagen Sponge *J Cell Physiol*, 2002.194:45-53.
 56. Shuichi Mizuno, Tetsuya Tateishi, Takashi Ushida, Jurie Glowacki : Hydrostatic Fluid Pressure Enhances Matrix Synthesis and Accumulation by Bovine Chondrocytes in Three-dimentional Culture. *J Cell Physiol*, 2002.193:319-327.
 57. Katsuko S Furukawa, Takashi Ushida, Kenshi Toda, Yasuyuki Sakai, Tetsuya Tateishi: Hybrid of gel-cultured smooth muscle cells with PLLA sponge as a scaffold towards blood vessel

- regeneration. *Cell Transplantation*, 2002. 11(5):475-480
58. Takashi Ushida, Katsuko Furukawa, Kenshi Toita, Tetsuya Tateishi, Three dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds. *Cell Transplantation*, 2002. 11(5): 489-494.
 59. Guoping Chen, Takashi Ushida, Tetsuya Tateishi, Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromole. Biosci.* 2002. 2:67-77.
2. 研究発表
1. Sasho, T; Wada, Y; Suzuki, M; Tahara, M; Moriya, H: IRREGULARITY OF MEDIAL FEMORAL CONDYLE ON MRI IS AN INDICATOR FOR ASSESSING DISEASE SEVERITY OF MEDIAL-TYPE OSTEOARTHRITIC KNEE, ORS 2004
 2. M Tahara, T Sasho, Y Wada, M Suzuki, H Moriya Evaluation of the indicators of the arthroscopic postero-medial release of varus knee osteoarthritis by using X-ray grading and Japan Knee Osteoarthritis Measure. Osteoarthritis research society international World Congress. Chicago, USA, 2004/12/2-5 2004.
 3. 佐粧孝久、和田佑一、田原正道、守屋秀繁: シンポジウム「膝関節鏡視下手術のトピックスと問題点」変形性膝関節症に対する鏡視下後内側解離術の適応と問題点 東日本整形災害外科学会
 4. 田原正道 佐粧孝久 和田佑一 鈴木昌彦 大河昭彦 守屋秀繁: 近交系マウスを用いた関節不安定性による変形性関節症 (OA) モデル作成とその評価, 第19 回日本整形外科学会基礎学術集会
 5. Keiji Itaka, K. Kanayama, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, Kazunori Kataoka: An effective siRNA delivery system based on self-assembly with PEG-polycation block copolymer. 31st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. 2004. 6.12-16 (Honolulu, Hawaii, USA).
 2. 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).
 3. 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)
 4. 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).
 5. Satoru Kamekura, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Hiroataka 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).
 6. Fumitaka Kugimiya, Hiroataka 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).
7. 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).
 8. 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).
 9. 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).
 10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
 13. 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).
 14. 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).
 15. 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).
 16. 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).
 17. 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).
 18. 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).
 19. 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).
20. 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).
 21. 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).
 22. 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 サーフェステクノロジー研究会. 2004. 7. 23 (東京ドームホテル, 東京).
 23. 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).
 24. 亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、丸山善治郎、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 (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).
 25. 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).
 26. 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).
 27. 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-1/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).
 28. 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).
 29. 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).
 30. 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-s 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).
 31. 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).
 32. 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—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).
 33. 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).
 34. 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).
35. 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).
 36. 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).
 37. 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).
 38. 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).
 39. 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).
 40. 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).
 41. 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).
 42. 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).
 43. 松原全宏、川口浩、中村耕三、加藤幸夫: 歯槽骨骨髄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).
 44. 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).
 45. 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).
 46. 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).
 47. Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Kawaguchi H, Nakamura K, Kataoka K: Self-assembled nanocarrier composed of PEG-based block cationomer for effective siRNA delivery. 4th Asian International Symposium on Biomaterials (AISB). 2004.11.16-18 (Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan)
 48. 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)
 49. 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