

- の肥厚化”, 抄録集, 149, 2005
- 9) 清水達也, “バイオリアクターを用いた再生心筋組織培養とその形態・機能解析”, 抄録集, 60, 2005 和文
 - 10) 岡野光夫, “厚い再生組織作製への挑戦”, 抄録集, 74, 2005
 - 11) 清水達也, “重症心不全に対する再生医療の現状と展望 -細胞シートを用いた心筋組織再生-”, 抄録集, 95, 2005
 - 12) 大和雅之, “温度応答性培養皿を活用する細胞シート工学と再生医療”, 抄録集, 68, 2005
27. Current Progress in Tissue Engineering and Regenerative Medicine Boston 2005.09.29-30
- 1) N. Yaji, M. Yamato, M. Hiramoto, K. Yamamoto, A. Kikuchi, H. Namiki, S. Hori, T. Okano, “Transplantation of retinal pigment epithelial cell sheets in a rabbit model”
 - 2) T. Ohki, M. Yamato, T. Okano, K. Takasaki, “Treatment of Artificial Esophageal Ulcerations after Endoscopic Submucosal Dissection Using Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets”
28. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (TESI 2005) Shanghai, China 2005.10.22-25
- 1) H. Sekine, T. Shimizu, M. Yamato, J. Yang, A. Kikuchi, E. Kobayashi, T. Okano, “Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering”, Final Program and Abstract Book, 171, 2005
 - 2) K. Ohashi, K. Yokoyama, M. Yamato, H. Kuge, H. Kanehiro, M. Hisanaga, S.H. Ko, T. Okano, H. Nakajima, “Scaffold-Free Hepatic Tissue Engineering Using 2-Dimensional Hepatic Tissue Sheet”, Final Program and Abstract Book, 297, 2005
 - 3) T. Ohki, M. Yamato, D. Murakami, T. Okano, K. Takasaki, “Treatment of Artificial Esophageal Ulcerations after Endoscopic Submucosal Dissection Using Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets”, Final Program and Abstract Book, 298-299, 2005
 - 4) S. Terada, S.J. Shieh, M. Nozaki, T. Okano, J.P. Vacanti, “In Vitro Cartilage Tissue Engineering And Autologous Transplant Using Rabbit Model For Auricular Construction”, Final Program and Abstract Book, 386, 2005
 - 5) D. Murakami, M. Yamato, T. Ohki, T. Okano, H. Namiki, “Fabrication of robust, transplantable oral mucosal epithelial cell sheets without the use of xenogeneic products”, Final Program and Abstract Book, 405-406, 2005
29. American Heart Association Scientific Sessions 2005 Dallas 2005.11.13-11.16
- 1) T. Shimizu, Y. Haraguchi, M. Yamato,

- A. Kikuchi, T. Okano, "Cardiomyocyte sheets couple electrically in extremely short time via rapid formation of functional gap junction", *Circulation*, 112(17), II-115, 2005
- 2) T. Shimizu, H. Sekine, T. Okano, "Bioengineered myocardial tubes pulsate and produce blood pressure changes in vivo", *Circulation*, 112(17), II-741, 2005
- 3) T. Sato, S. Miyoshi, A. Furuta, Y. Itabashi, S. Kira, N. Nishiyama, S. Takatsuki, T. Shimizu, T. Okano, S. Ogawa, "Transplantation of artificial accessory pathway made by 3-D myocardial cell-sheet graft on the rat with complete atrio-ventricular block, in vivo", *Circulation*, 112(17), II-190, 2005
- 30.
31. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 京都
2005.11.28
- 1) 岡野光夫, "細胞療法とバイオマテリアル", 予稿集, 55, 2005
- 2) 大和雅之, "細胞シート工学と組織工学", 予稿集, 48, 2005
- 3) 菊池明彦, 林真由美, 大和雅之, 岡野光夫, "細胞シート工学手法による担癌動物の効率的調製", 予稿集, 262, 2005
32. 第43回日本人工臓器学会大会 東京
2005.11.30-12.02
- 1) 清水達也, "心筋組織再生の現状と展望 (細胞から組織・臓器を造る: ティッシュエン지니어リングの現状と将来展望)", 人工臓器, 34(2), S-13, 2005
- 2) 神崎正人, 大和雅之, 岡野光夫, 大貫恭正, "呼吸器外科への細胞シートの導入とその応用", 人工臓器, 34(2), S-20, 2005
- 3) 関根秀一, 清水達也, 大和雅之, 菊池明彦, 小林英司, 岡野光夫, "細胞シート工学による拍動心筋チューブの作製とその大動脈置換術(JSAO 2005オリジナル賞候補者発表)", 人工臓器, 34(2), S-95, 2005
- 4) 宮川繁, 澤芳樹, 竹谷哲, 近藤晴彦, イムラノモン, 秦広樹, 清水達也, 岡野光夫, 松田暉, "自己筋芽細胞を用いた心筋組織移植による心筋再生療法の開発(JSAO Grant 2003 成果報告)", 人工臓器, 34(2), S-86, 2005
- 5) 秦広樹, 松宮護郎, 宮川繁, 福井信哉, 清水達也, 岡野光夫, 澤芳樹, "重症心不全に対する筋芽細胞シートを用いた心筋再生療法(再生医学・生体組織工学4)", 人工臓器, 34(2), S-160, 2005
- 6) 井坂珠子, 神崎正人, 大和雅之, 河野千夏, 松本卓子, 村杉雅秀, 菊池明彦, 岡野光夫, 大貫恭正, "気漏に対する生物学的組織接着剤塗布後の胸膜表面の超微細形態による検討", 人工臓器, 34(2), S-158, 2005
33. 第5回日本再生医療学会総会 岡山
2006.03.08-09
- 1) 岡野光夫, "細胞シート工学の再生医

- 療への展開”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 73, 2006
- 2) 関根秀一、清水達也、大和雅之、菊池明彦、小林英司、岡野光夫、”細胞シート工学による拍動心筋チューブの作製”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 121, 2006
- 3) 久保寛嗣、清水達也、堀川泰弘、大和雅之、岡野光夫、”細胞シート工学を用いたIn Vitro管状心筋組織再生”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 121, 2006
- 4) 原口裕次、清水達也、大和雅之、菊池明彦、岡野光夫、”心筋細胞シートと非心筋細胞シート間の電気的結合性の解析”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 121, 2006
- 5) 笹川忠、関谷佐智子、清水達也、大和雅之、菊池明彦、岡野光夫、”細胞シート工学に基づいた三次元細胞培養システムの開発”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 127, 2006
- 6) 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、斎藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有紀、宮本真壽、岡野光夫、新岡俊治、”虚血肢に対する細胞シート移植による血管再生療法の比較検討”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 129, 2006
- 7) 野崎貴之、大和雅之、西田幸二、長井慈、菅和俊、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”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 134, 2006
- 8) 黒川真輔、森田辰男、白柳慶之、久保寛嗣、清水達也、大和雅之、岡野光夫、小林英司、”細胞シート工学を利用した尿管再生の試み”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 150, 2006
- 9) 増田信奈子、清水達也、大和雅之、菊池明彦、山下潤、岡野光夫、”細胞シート工学による胚性幹細胞導入組織の構築”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 182, 2006
- 10) 狩野恭子、大和雅之、岡野光夫、”細胞シート工学を用いた内皮細胞シート積層肝細胞の長期機能維持”, 日本再生医療学会雑誌, 5(suppl), 209, 2006
34. The 70th Anniversary Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 名古屋 2006.03
- T. Shimizu, “Myocardial Tissue Regeneration by Cell Sheet Technology”, Circulation Journal, 70(Suppl.), 59, 2006
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

軟骨欠損大動物モデルの作成とその長期自然経過に関する検討

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

軟骨欠損大動物モデル（イヌ）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。そこで、昨年度はマウス・ラットの臨界骨・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。これら小動物の基礎データをもとに、今年度は臨床応用を視野に入れた大動物（イヌ）臨界骨・軟骨欠損モデルの確立を目指した。分担研究者の高戸とともにイヌに骨・軟骨欠損モデルを作製し、その自然経過を追うことで実験を行う場合の至適条件を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

11ヶ月齢—2歳10ヶ月（平均1歳10ヶ月）の健常ビーグル犬の膝関節軟骨にドリルで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。
術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で軟骨欠損部のCT撮影を行った。

C. 研究結果

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。
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

大動物臨界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

【論文発表】

1. 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* 146: 2620-2628, 2005.
2. 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 γ insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab* 23: 275-279, 2005.
3. Yano F, Kugimiya F, Ohba S, Ikeda T, Chikuda H, Ogasawara T, Ogata N, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI: The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 1300-1308, 2005.
4. 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* 204: 927-933, 2005.
5. 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* 13: 632-641, 2005.
6. Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K, Ikegawa S, and

Chung UI: Distinct roles of SOX5, SOX6 and SOX9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab* 23: 337-340, 2005.

7. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, and Kuro-o M: Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 309: 1829-1833, 2005.
8. Kugimiya F, Kawaguchi H, Kamekura S, Chikuda H, Ohba S, Yano F, Ogata N, Katagiri T, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, and Chung UI: Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP)2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem* 280: 35704-35712, 2005.
9. Kugimiya F, Yano F, Ohba S, Igawa K, Nakamura K, Kawaguchi H, and Chung UI: Mechanism of osteogenic induction by FK506 via BMP/Smad pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 872-879, 2005.
10. Masuda H, Chikuda H, Suga T, Kawaguchi H, and Kuro-o M: Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice. *Mech Ageing Dev* 126: 1274-1283, 2005.
11. Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, and Hoshi K: Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant* 14: 683-693, 2005.
12. Katagiri M, Ogasawara T, Hoshi K, Chikazu D, Kimoto A, Noguchi M, Sasamata M, Harada S, Akama H, Tazaki H, Chung UI, Takato T, Nakamura K, and Kawaguchi H: Suppression of adjuvant-induced arthritic bone destruction by cyclooxygenase-2 selective agents with and without inhibitory potency against carbonic anhydrase II. *J Bone Miner Res* 21: 219-227, 2006.

2. 学会発表

【国内学会】

1. 近津大地、大庭伸介、小笠原徹、片桐未佳、川口浩、高戸毅: Combination of platelet-rich plasma (PRP) and COX-2 inhibitor potently stimulates bone marrow stromal cell proliferation. 第5回 COX 研究会. 2005. 2. 5 (千代田放送会館、東京).
2. 星和人、劉光耀、小笠原徹、高橋嗣明、淺輪幸世、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. 2005. 3. 18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪).

3. 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. 2005. 3. 18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪).
4. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、小笠原徹、池田敏之、緒方直史、高戸毅、中村耕三、川口浩、鄭雄一: 古典的 Wnt 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18回日本軟骨代謝学会. 2005. 3. 18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪).
5. 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り軟骨細胞の肥大分化における分子スイッチとして働く. 第18回日本軟骨代謝学会. 2005. 3. 18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪).
6. 瀬戸宏明、亀倉暁、三浦俊樹、山本愛一郎、筑田博隆、緒方徹、平岡久忠、織田弘美、中村耕三、黒沢尚、鄭雄一、川口浩、田中栄: 滑膜線維芽細胞での軟骨特異的遺伝子発現における Smad pathway と p38 pathway の役割について. 第18回日本軟骨代謝学会. 2005. 3. 18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪).
7. 川口浩: マウスゲノミクスからの変形性関節症の分子背景. 文部科学省科学研究費特定領域研究「骨格系の制御プログラムと疾患」平成16年度公開シンポジウム. 2005. 2. 19 (東京大学農学部弥生講堂一条ホール、東京).
8. 川口浩: 骨粗鬆症の病態と治療の最前線 (特別講演). 目黒区医師会整形外科セミナー. 2005. 2. 26 (セルリアンタワー、東京).
9. 川口浩: 変形性関節症の分子メカニズム. 21世紀 COE プログラム「環境・遺伝素因相互作用に起因する疾患研究」平成16年度シンポジウム. 2005. 3. 2 (東京大学医学部附属病院大会議室、東京).
10. 釘宮典孝、筑田博隆、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49回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2005. 4. 17-20 (パシフィコ横浜、神奈川).
11. 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

- (OA) 発症の引き金となる. 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2005. 4.17-20 (パシフィコ横浜、神奈川県).
12. 茂呂徹、高取吉雄、中村耕三、川口浩：関節摺動面の MPC ポリマー処理は人工股関節の弛みを抑制する - 耐摩耗性と生体適合性に優れた新規人工股関節の開発 -. 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2005. 4.17-20 (パシフィコ横浜、神奈川県).
 13. 山田高嗣、河野博隆、亀倉暁、腰塚裕、中村耕三、加藤茂明、川口浩：軟骨特異的遺伝子 Cystatin 10 は軟骨細胞の石灰化を介して変形性関節症・異所性石灰化に関与している. 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2005. 4.17-20 (パシフィコ横浜、神奈川県).
 14. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、高玉博朗、山脇昇、中村耕三、川口浩：シンポジウム「バイオトライボロジーの最前線」MPC ポリマーのナノ表面処理による長寿命型人工股関節の開発 - 耐摩耗性と生体適合性の検討 -. 第 44 回生体医工学会大会 (日本エム・イー学会). 2005. 4.25-27 (つくば、栃木).
 15. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、高玉博朗、山脇昇、中村耕三、川口浩：生体適合性高分子材料・MPC 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 78 回日本整形外科学会学術集会. 2005. 5.12-15 (パシフィコ横浜、神奈川県).
 16. 竹下克志、星地亜都司、河村直洋、東川晶郎、村上元昭、川口浩、中村耕三：Neck Disability Index の有用性. 第 78 回日本整形外科学会学術集会. 2005. 5.12-15 (パシフィコ横浜、神奈川県).
 17. 河野博隆、佐藤隆史、山田高嗣、松本高広、中村耕三、川口浩、加藤茂明：男性ホルモンの骨量維持作用 - 男性ホルモン受容体遺伝子欠損マウスの解析 -. 第 78 回日本整形外科学会学術集会. 2005. 5.12-15 (パシフィコ横浜、神奈川県).
 18. 星地亜都司、竹下克志、松平浩、川口浩、東川晶郎、緒方直史、村上元昭、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 34 回日本脊椎脊髄病学会学術集会. 2005. 6.10-11 (仙台国際センター、仙台).
 19. 星地亜都司、竹下克志、阿久根徹、川口浩、東川晶郎、中村耕三：コンピューターナビゲーションシステムを使用した頸椎部砂時計腫の手術療法. 第 34 回日本脊椎脊髄病学会学術集会. 2005. 6.10-11 (仙台国際センター、仙台).
 20. 川口浩：ここまでわかった骨の不思議！ 第 12 回東京骨を守る会 (特別講演). 2005. 6. 4 (日本女子大学新泉山館、東京).
 21. 川口浩：骨粗鬆症の病態と治療の最前線. 骨粗鬆症学術講演会. 2005. 7. 9 (品川プリンスホテル、東京).
 22. 川口浩、河村直洋、阿久根徹、緒方直史、星和人、鄭雄一、窪田直人、山内敏正、寺内康夫、門脇孝、中村耕三：Insulin/IGF-I・IRS・Akt シグナルによる骨リモデリング調節 (ミニシンポジウム「骨リモデリングの分子メカニズム」). 第 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
 23. 川口浩、篠田裕介、山口雅之、阿久根徹、大庭伸介、緒方直史、鄭雄一、窪田直人、山内敏正、寺内康夫、門脇孝、中村耕三：脂質代謝調節分子による骨代謝制御 (ミニシンポジウム「メタボリックシンドロームと骨」). 第 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
 24. 川口浩：骨量・骨代謝回転・骨質と PTH (ランチオンセミナー). 第 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
 25. 川口浩、神宮司誠也、泉敏弘、福永仁夫、松下隆、中村孝志、水野耕作、中村利孝、中村耕三：リコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子-2 (rhFGF-2) の骨形成促進作用 - 骨切り症例における前向き多施設臨床試験 - (優秀演題賞受賞). 第 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
 26. 河村直洋、釘宮典孝、大庭伸介、緒方直史、山口雅之、福田明、鈴木亮、戸邊一之、門脇孝、中村耕三、鄭雄一、川口浩：Akt1 による生体内骨代謝調節作用とそのメカニズム (優秀演題賞受賞). 第 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
 27. 大庭伸介、池田敏之、釘宮典孝、矢野文子、藤田隆司、小守壽文、小笠原徹、星和人、中村耕三、高戸毅、川口浩、鄭雄一：Runx2 シグナルと BMP シグナルは協調的に Cbfb を制御することによって骨芽細胞分化の最小かつ十分なシグナルユニットとして機能する (優秀演題賞受賞). 第 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
 28. 丸山善治郎、豊澤悟、古市達哉、金谷直子、藤田隆司、中村耕三、川口浩、小守壽文：Osterix の骨芽細胞における過剰発現は、骨芽細胞の増殖を促進、成熟を抑制し、著明な骨減少を引き起こす (優秀演題賞受賞). 第 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
 29. 齊藤琢、池田敏之、中村耕三、川口浩、鄭雄一：S100A1、S100B は SOX9/SOX5/SOX6 (SOX trio) の標的分子として軟骨細胞の肥大化・石灰化を抑制する. 第 23 回日本骨代謝学会.

2005. 7. 21-23 (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、小笠原徹、高戸毅、中村耕三、川口造、鄭雄一：新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体は Sox9 と独立して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 31. 丸山善治郎、酒井暁子、金谷直子、中村耕三、川口造、小守壽文：細胞周期調節分子 Cdk6 と cyclin D1 の軟骨における過剰発現は、軟骨細胞分化を抑制するとともに p53 経路を介してアポトーシスを誘導する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 32. 高石官成、小崎直人、川口造、鄭雄一、宇田川信之、網塚憲生、戸山芳昭：MMP-13 遺伝子欠損マウスでは骨吸収不全により遅発性の大理石骨病を呈する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 33. 山川聖史、亀倉暁、村上誠、工藤一郎、植松智、審良静男、中村耕三、川口造：膜型プロスタグランジン E2 酵素-1 (mPGES-1) の骨折治癒および変形性関節症への関与。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 34. 篠田裕介、山口雅之、緒方直史、阿久根徹、窪田直人、山内敏正、寺内康夫、門脇孝、竹内靖博、福本誠二、星和人、鄭雄一、中村耕三、川口造：Adiponectin の autocrine/paracrine および endocrine 作用による骨代謝調節機構。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 35. 吉村典子、木下裕文、岡敬之、川口造、中村耕三：女性における脊椎椎体骨折発生率の関与：山村コホート 10 年間の追跡。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 36. 小笠原徹、筑田博隆、大庭伸介、近津大地、片桐未佳、矢野文子、中村耕三、鄭雄一、星和人、岡山博人、高戸毅、川口造：細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の Runx2 機能スイッチングによる骨芽細胞分化制御。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 37. 星和人、劉光耀、小笠原徹、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口造：甲状腺ホルモン (T3) は、BMP-2 および insulin と協調し、脱分化型軟骨細胞の理想的な再分化を実現する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 38. 河野慎次郎、星和人、川口造、中村耕三、田中栄：Mitogen activated kinase (MAP キナーゼ) Pathway は ML0-A5 および骨芽細胞の石灰化を抑制する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 39. 片桐未佳、小笠原徹、近津大地、木本愛之、野口正宏、笹又理央、原田俊一、田崎初江、鄭雄一、星和人、高戸毅、中村耕三、川口造：Carbonic anhydrase II 抑制活性の有無による COX-2 阻害剤の炎症性骨破壊抑制効果。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 40. Lee S, Chung UI, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Rhee Y, Lim SK: Experimental Parathyroid Hormone Gene Therapy using Phi C31 Litegrase (Asia Travel Award 受賞)。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
 41. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、鄭雄一、高玉博朗、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口造：生体適合性ポリマーのナノ表面処理による高潤滑インターフェイスは人工関節の弛みを抑制する。第 8 回日本組織工学会。2005. 9. 1-2 (東京)
 42. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Takadama H, Nakamura K, Kawaguchi H: Nano-grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner surface for preventing aseptic loosening of the artificial hip joint. 18th Annual Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty (ISTA). 2005. 9. 30-10. 1 (京都国際会議場)。
 43. 川口造：変形性関節症の病態解明・治療の最前線。沖縄整形外科医会学術講演会 (特別講演)。2005. 9. 15 (ザ・ナハテラス、沖縄)。
 44. 川口造：変形性関節症の病態解明・治療の最前線。痛みの治療フォーラム (特別講演)。2005. 9. 17 (東京プリンスホテル パークタワー、東京)。
 45. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Takadama H, Nakamura K, Kawaguchi H: Nano-grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner for preventing aseptic loosening of the artificial hip joint. 18th Annual Symposium of International Society for Technology in Arthroplasty. 2005. 9. 27-10. 2 (京都国際会議場、京都)。
 46. 川口造：骨粗鬆症の病態解明と治療の最前線。第 9 回青森県骨粗鬆症研究会 (特別講演)。2005. 10. 7 (ホテル青森、青森)。
 47. 川口造、神宮司誠也、松下隆、中村耕三：リコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子-2 (rhFGF-2) の骨形成促進作用 - 骨切り症例にお

- ける前向き多施設臨床試験 - 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
48. 篠田裕介、山口雅之、緒方直史、阿久根徹、中村耕三、川口浩：Adiponectin の autocrine/paracrine および endocrine 作用による骨代謝調節 (優秀ポスター賞受賞). 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 49. 小笠原徹、星和人、筑田博隆、中村耕三、高戸毅、川口浩：細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の Runx2 機能スイッチングによる骨芽細胞分化制御. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 50. 丸山善治郎、金谷直子、前野考史、中村耕三、川口浩、小守壽文：Osterix の骨芽細胞における過剰発現は、骨芽細胞の増殖を促進、成熟を抑制し、著明な骨減少を引き起こす. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 51. 高石官成、Jeanine D' Armientro、小崎直人、川口浩、中村耕三、戸山芳昭：MMP-13 遺伝子欠損マウスでは、骨芽細胞を介した破骨細胞の機能不全により骨量の増加を示す. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 52. 小崎直人、高石官成、亀倉暁、川口浩、中村耕三、戸山芳昭：MMP-13 は骨折治癒過程における軟骨性仮骨吸収に必要である. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 53. 山川聖史、亀倉暁、村上誠、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) の骨折治癒および変形性関節症への関与. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 54. 河村直洋、釘宮典孝、門脇孝、中村耕三、鄭雄一、川口浩：Akt1 による生体内での骨代謝調節作用とそのメカニズム. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 55. 斉藤琢、川口浩、池田敏之、中村耕三、鄭雄一：S100A1、S100B は SOX9/SOX5/SOX6 (SOX trio) の標的分子であり、軟骨細胞に作用してその肥大化・石灰化を抑制する. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 56. 星和人、山岡尚世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩：インプラント型再生軟骨を作製するための足場素材システムの開発. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 57. 位高啓史、大庭伸介、鄭雄一、川口浩、中村耕三、片岡一則：再生医療応用に向けた高分子ミセル型遺伝子ナノキャリア. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 58. 丸山善治郎、酒井暁子、金谷直子、中村耕三、川口浩、小守壽文：細胞周期調節分子 Cdk6 と cyclin D1 の軟骨における過剰発現は、軟骨細胞分化を抑制するとともに p53 経路を介してアポトーシスを誘導する. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重).
 59. 川口浩：FGF-2 の骨形成促進作用の骨再生への応用 (シンポジウム「現在臨床応用されつつある骨再生医療と未来のインプラント」). 第 25 回日本口腔インプラント学会. 2005. 11. 13 (岡山大学 50 周年記念館、岡山).
 60. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、高玉博朗、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口浩：生体適合性リン脂質ポリマーのナノ表面制御による長寿命型人工股関節の開発. 第 32 回日本股関節学会学術集会. 2005. 11. 6-8 (新潟)
 61. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、高玉博朗、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口浩：ポリマーナノグラフト型人工股関節の生体適合機能. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会. 2005. 11. 28-29 (京都).
 62. 石山典幸、茂呂徹、大江隆史、石原一彦、金野智浩、木村美都奈、三浦俊樹、中村耕三、川口浩：生体内解離性リン脂質ポリマーハイドロゲルの癒着防止効果. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会. 2005. 11. 28-29 (京都).
 63. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、高玉博朗、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口浩：シンポジウム「日本発の人工臓器：基盤技術の創出と開発の現況」生体適合性ポリマーのナノ表面処理による長寿命型人工股関節の開発. 第 43 回日本人工臓器学会大会. 2005. 11. 30-12. 2 (東京).
 64. 山川聖史、亀倉暁、亀井大輔、竹越唯衣、村上誠、工藤一郎、植松智、審良静男、中村耕三、川口浩：膜型プロスタグランジン E2 酵素-1 (mPGES-1) の骨・軟骨疾患への関与. 第 10 回プロスタノイド研究会. 2005. 12. 17 (東京医科歯科大学特別講堂、東京).
 65. 川口浩：骨強度と骨粗鬆症治療. 第 2 回順天堂大学骨粗鬆症フォーラム. 2006. 1. 28 (順天堂大学、東京).
 66. 川口浩：変形性関節症治療の標的分子. 第 6

- 回 COX 研究会. 2006. 2. 18 (千代田放送会館、東京).
67. 川口浩: 変形性関節症へ分子生物学的アプローチ. 第 5 回 骨・軟骨広島フォーラム. 2006. 2. 25 (リーガロイヤルホテル広島、広島).
 68. 山川聖史、亀倉暁、村上誠、工藤一郎、植松智、審良静男、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) の骨折治癒および変形性関節症への関与. 第 19 回日本軟骨代謝学会. 2006. 3. 3-4 (はまぎんホールヴィアマール、横浜).
 69. 斉藤琢、池田敏之、鄭雄一、中村耕三、川口浩: S100A1、S100B は SOX9/SOX5/SOX6 (SOX trio) の標的分子であり、軟骨細胞に作用してその肥大化・石灰化を抑制する. 第 19 回日本軟骨代謝学会. 2006. 3. 3-4 (はまぎんホールヴィアマール、横浜).
 70. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、池田敏之、緒方直史、小笠原徹、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一: 新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体は Sox9 と独立に作用して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する. 第 19 回日本軟骨代謝学会. 2006. 3. 3-4 (はまぎんホールヴィアマール、横浜).
 71. 筑田博隆、釘宮典孝、星和人、池田敏之、小笠原徹、河野博隆、亀倉暁、土田温子、横井伯英、中村耕三、米田嘉重郎、鄭雄一、川口浩: 低身長ラット KMI の原因遺伝子 cGMP-dependent protein kinase II (cGKII) は Sox9 の核内移行を抑制し、軟骨細胞の肥大分化への分子スイッチとして働く. 第 19 回日本軟骨代謝学会. 2006. 3. 3-4 (はまぎんホールヴィアマール、横浜).
 72. 川口浩: 骨・軟骨再生医療のための成長因子、シグナル分子. 第 3 回 新潟創傷治癒懇話会. 2006. 3. 25 (有壬記念館、新潟).

【海外学会】

1. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Takadama H, Nakamura K, Kawaguchi H: New biocompatible and wear-resistant articulating surface of artificial joints for preventing aseptic loosening. 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). 2005. 2. 20-23 (Washington D. C., USA)
2. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Nakamura K, Kawaguchi H: Biocompatible polymer grafting inhibits loosening of artificial joint based on macrophage activation. 72nd Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2005. 2. 23-27 (Washington D. C., USA).
3. Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Fukushima S, Yamasaki Y, Oba S, Chung UI, Kawaguchi H, Nakamura K, Kataoka K: Intelligent nanocarrier of plasmid DNA for bone regeneration. 51th annual meeting of the Orthopaedic Research Society. 2005. 3. 5-8 (New Orleans, Louisiana, USA).
4. Ishihara K, Moro T, Takatori Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Konno T: Biomimetic surface on polyethylene liner for obtaining excellent lubrication. 19th European Conference on Biomaterials. 2005. 9. 11-15 (Sorrento, Italy).
5. Kawamura N, Kugimiya F, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Akt1 in osteoblasts and osteoclasts contributes to the maintenance of bone mass and turnover (Young Investigator Award). 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9. 23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
6. Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H: S100A1 and S100B, transcriptional target molecules of SOX5, SOX6 and SOX9 (the SOX trio), inhibit hypertrophic differentiation and calcification of chondrocytes (Young Investigator Award). 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9. 23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
7. Yamakawa K, Kamekura S, Murakami M, Kudo I, Uematsu S, Akira S, Nakamura K, Kawaguchi H: Contribution of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) in fracture healing and osteoarthritis. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9. 23-27 (Nashville,

- Tennessee, USA).
8. Ogasawara T, Chikuda H, Ohba S, Chikazu D, Katagiri M, Yano F, Nakamura K, Chung U, Hoshi K, Takato T, Okayama H, Kawaguchi H: Functional switching of Runx2 by Cdk6 and Cdk4 in regulation of osteoblast differentiation. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
 9. Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Fujita T, Komori T, Ogasawara T, Nakamura T, Takato T, Kawaguchi H, Chung U: Involvement of Cbfb in the cooperative action of BMP and Runx2 signalings on osteogenic differentiation. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
 10. Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Fukumoto S, Hoshi K, Chung U, Nakamura K, Kawaguchi H: Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
 11. Hoshi K, Liu G, Ogasawara T, Asawa Y, Chung U, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H: Thyroid hormone (T3) realizes ideal redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes in cooperation with BMP-2 and insulin. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
 12. Yoshimura N, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Cooper C: Comparing risk factors for hip and knee osteoarthritis in Japan and Britain. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
 13. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of involuntional osteoporosis. The 8th Annual Meeting of the Korean Society of Osteoporosis. 2005. 10. 30 (Seoul, Korea).
 14. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of involuntional osteoporosis from mouse genomic approaches. The Korean Society of Endocrinology 2005. 2005. 11. 19 (Kyungju, Korea).

H. 知的財産権の出願・登録状況
 内容 : 組織癒着・関節拘縮防止材
 番号 : 特願2005-243984

骨・軟骨分化増殖シグナルの最適化と皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換

分担研究者 鄭雄一（東京大学大学院医学系研究科・骨軟骨再生医療寄附講座 助教授）

研究要旨

- 骨・軟骨分化に十分なシグナルの最適化を行った。
- 最適化されたシグナルによる皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換を誘導した。
- 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす因子群の相互作用の解析を行った。
- 軟骨増殖に十分な液性因子の最適化を行った。

A. 研究目的

安全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・増殖誘導因子とそれらの相互作用に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. 骨・軟骨分化に十分なシグナルの最適化については、骨分化に関してはBMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2シグナルの全組合せから、軟骨分化に関してはBMP・IRS・Wnt・TGF- β ・Soxシグナルの全組合せから、骨軟骨分化を特異的に検出する細胞センサーを用いて効率的に分化を誘導する組合せをスクリーニングした。
2. 皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換については、上記1で最適化されたシグナルをアデノウィルスベクターにより皮膚線維芽細胞に導入し、分化マーカーの発現の検討・染色等による基質産生の検討を通じて、その骨軟骨形質転換を検証した。
3. 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす因子群の相互作用については、BMP2/6ダブルノックアウトマウスの解析・PTHの骨同化作用におけるIRS-1の関与に関する解析・WntシグナルとSox9の軟骨分化における役割の*in vitro*解析を行った。
4. 軟骨増殖に十分な液性因子の最適化については、市販されている12種の液性因子（FGF-2, IGF-I, インスリン, BMP2, PTH, 成長ホルモン, デキサメサゾン, 活性型ビタミンD3, トリヨードサイ

ロニン, IL-1 受容体アンタゴニスト, 17 β -エストラジオール, テストステロン）から軟骨細胞を効率的に増殖させる組合せの最適化を行った。

C. 研究結果

1. 骨分化の最適化シグナルは BMP+Runx2 であり、軟骨分化の最適化シグナルは Sox5/6/9 であった。
2. 皮膚線維芽細胞において BMP+Runx2 を活性化させることで骨形質転換が誘導され、Sox5/6/9 を導入することで軟骨形質転換が誘導された。
3. BMP2/6 は共に骨分化に大きく関与すること、Wnt シグナルは Sox9 依存性に軟骨分化を促進すること、PTH の骨同化作用に IRS が関与することが明らかとなった。
4. FGF-2 とインスリン・IGF-I の組合せが軟骨再生に有効な軟骨増殖因子の組合せであることが明らかとなった。

D. 考察

本研究で最適化された増殖・分化に有効な因子を使用することで、皮膚線維芽細胞からの効率的な骨軟骨分化誘導系を確立できることが示唆された。また、さらに有効な因子を求めて分化・増殖シグナルに関する検討を今後も重ねる必要があると思われる。

E. 結論

骨軟骨分化・増殖制御因子の最適化をおこない、またそれらの因子の詳細な作用を明らかにした。さらに皮膚線維芽細胞からの骨・軟骨形質転換を誘導した。

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

Kugimiya F, Takato T, ChungUI, Kawaguchi H, Nakamura K. [BMP mutant animals] *Nippon Rinsho*. 63 Suppl 10:414-7, 2005.

Kugimiya F, Yano F, Ohba S, Igawa K, Nakamura K, Kawaguchi H, ChungUI. Mechanism of osteogenic induction by FK506 via BMP/Smad pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 338(2):872-9, 2005.

Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K, Ikegawa S, ChungUI. Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab*. 23(5):337-40, 2005.

Kugimiya F, Kawaguchi H, Kamekura S, Chikuda H, Ohba S, Yano F, Ogata N, Katagiri T, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, ChungUI. Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem*. 280(42):35704-12, 2005.

Kawaguchi H, Akune T, Yamaguchi M, Ohba S, Ogata N, ChungUI, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K. Distinct effects of PPARgamma insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab*. 23(4):275-9, 2005.

Yano F, Kugimiya F, Ohba S, Ikeda T, Chikuda H, Ogasawara T, Ogata N, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, ChungUI. The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 333(4):1300-8, 2005.

Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Kamekura S, Ogata N, Nakamura K, ChungUI, 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*. 23(3):200-4,

2005.

Moro T, Ogasawara T, Chikuda H, Ikeda T, Ogata N, Maruyama Z, Komori T, Hoshi K, ChungUI, Nakamura K, Okayama H, Kawaguchi H. Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol*. 204(3):927-33, 2005.

Yamaguchi M, Ogata N, Shinoda Y, Akune T, Kamekura S, Terauchi Y, Kadowaki T, Hoshi K, ChungUI, Nakamura K, Kawaguchi H. Insulin receptor substrate-1 is required for bone anabolic function of parathyroid hormone in mice. *Endocrinology*. 146(6):2620-8, 2005.

2. 学会発表

大庭伸介, 池田敏之, 緒方直史, Lichtler Alex, 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4回日本再生医療学会総会, 2004.3.2, 大阪.

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: 新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体はSox9と独立に作用して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する. 第4回日本再生医療学会総会, 2004.3.1, 大阪.

大庭伸介, 池田敏之, 釘宮典孝, 矢野文子, 藤田隆司, 小守壽文, 小笠原徹, 星和人, 中村耕三, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: Runx2シグナルとBMPシグナルは協調的にCbfbを制御することによって骨芽細胞分化の最小かつ十分なシグナルユニットとして機能する. 第23回日本骨代謝学会学術集会, 2005.7.21, 大阪.

河村直洋, 釘宮典孝, 大庭伸介, 緒方直史, 山口雅之, 福田明, 鈴木亮, 戸邊一之, 門脇孝, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: Akt1による生体内骨代謝調節作用とそのメカニズム. 第23回日本骨代謝学会学術集会, 2005.7.21, 大阪.

川口浩, 篠田裕介, 山口雅之, 阿久根徹, 大庭伸介, 緒方直史, 鄭雄一, 窪田直人, 山内敏正, 寺内康夫, 門脇孝, 中村耕三: 脂質代謝調節分子による骨代謝制御. 第23回日本骨代謝学会学術集会, 2005.7.22, 大阪.

大庭伸介, 池田敏之, 矢野文子, Lichtler Alex, 小笠原徹, 星和人, 中村耕三, 川口浩, 高戸毅, 鄭雄一: 骨形成シグナルの最適化と幹細胞を用いない新規骨再生法の開発. 第8回日本組織工学会, 2005.9.1, 東京.

井川和代, 杉森理, 望月学, 佐々木伸雄, 山澤建二, 安斎正博, 清水康太郎, 鈴木茂樹, 大庭伸介, 高戸毅, 鄭雄一: Ink-jet式を用いた人工骨の造形. 第8回日本組織工学会, 2005.9.1, 東京.

小笠原徹, 大庭伸介, 近津大地, 末永英之, 矢野文子, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩, 星和人, 高戸毅: 細胞周期調節因子によるRunx2機能制御機構の解明と骨再生医療への応用可能性. 第8回日本組織工学会, 2005.9.1, 東京.

矢野文子, 大庭伸介, 釘宮典孝, 池田敏之, 緒方直史, 小笠原徹, 中村耕三, 川口浩, 高戸毅, 鄭雄一: 新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体はSox9と独立に作用して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する. 第8回日本組織工学会, 2005.9.1, 東京.

Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Fujita T, Komori T, Ogasawara T, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung U: Involvement of Cbfb in the Cooperative Action of BMP and Runx2 Signalings on Osteogenic Differentiation. 27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2005.9.24, Nashville, Tennessee, USA. (J Bone Miner Res. 20(Suppl 1), S5, 2005.)

Yano F, Ohba S, Kugimiya F, Ikeda T, Ogata N, Ogasawara T, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung U: A New Thienoindazole Derivative Promotes Chondrogenic Differentiation in a Sox-9-Independent Manner without Inducing Hypertrophy. 27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2005.9.25, Nashville, Tennessee, USA. (J Bone Miner Res. 20(Suppl 1), S197, 2005.)

Ogasawara T, Chikuda H, Ohba S, Chikazu D, Katagiri M, Yano F, Nakamura K, Chung U, Hoshi K, Takato T, Okayama H, Kawaguchi H: Functional Switching of Runx2 by Cdk6 and Cdk4 in Regulation of Osteoblast Differentiation. 27th Annual Meeting of the American Society

for Bone and Mineral Research, 2005.9.24, Nashville, Tennessee, USA. (J Bone Miner Res. 20(Suppl 1), S5, 2005.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

鄭雄一他、「骨再生システム」、特願2005-19812

鄭雄一他、「骨補填剤の製造方法、骨補填剤及び三次元細胞培養担体、クロマトグラフィー用分離担体」特願2006-37301

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

骨・軟骨分化増殖シグナルの最適化と皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換

分担研究者 星和人（東京大学大学院医学系研究科・富士ソフトABC軟骨・骨再生医療 助教授）

研究要旨

- 骨・軟骨分化に十分なシグナルの最適化を行った。
- 最適化されたシグナルによる皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換を誘導した。
- 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす因子群の相互作用の解析を行った。
- 軟骨増殖に十分な液性因子の最適化を行った。

A. 研究目的

安全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・増殖誘導因子とそれらの相互作用に関する検討を行った。

B. 研究方法

5. 骨・軟骨分化に十分なシグナルの最適化については、骨分化に関してはBMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2シグナルの全組合せから、軟骨分化に関してはBMP・IRS・Wnt・TGF- β ・Soxシグナルの全組合せから、骨軟骨分化を特異的に検出する細胞センサーを用いて効率的に分化を誘導する組合せをスクリーニングした。
6. 皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換については、上記1で最適化されたシグナルをアデノウィルスベクターにより皮膚線維芽細胞に導入し、分化マーカーの発現の検討・染色等による基質産生の検討を通じて、その骨軟骨形質転換を検証した。
7. 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす因子群の相互作用については、BMP2/6ダブルノックアウトマウスの解析・PTHの骨同化作用におけるIRS-1の関与に関する解析・WntシグナルとSox9の軟骨分化における役割の*in vitro*解析を行った。
8. 軟骨増殖に十分な液性因子の最適化については、市販されている12種の液性因子（FGF-2, IGF-I, インスリン, BMP2, PTH, 成長ホルモン, デキサ

メサゾン, 活性型ビタミンD3, トリヨードサイロニン, IL-1 受容体アンタゴニスト, 17 β -エストラジオール, テストステロン）から軟骨細胞を効率的に増殖させる組合せの最適化を行った。

C. 研究結果

5. 骨分化の最適化シグナルは BMP+Runx2 であり、軟骨分化の最適化シグナルは Sox5/6/9 であった。
6. 皮膚線維芽細胞において BMP+Runx2 を活性化させることで骨形質転換が誘導され、Sox5/6/9 を導入することで軟骨形質転換が誘導された。
7. BMP2/6 は共に骨分化に大きく関与すること、Wnt シグナルは Sox9 依存性に軟骨分化を促進すること、PTH の骨同化作用に IRS が関与することが明らかとなった。
8. FGF-2 とインスリン・IGF-I の組合せが軟骨再生に有効な軟骨増殖因子の組合せであることが明らかとなった。

D. 考察

本研究で最適化された増殖・分化に有効な因子を使用することで、皮膚線維芽細胞からの効率的な骨軟骨分化誘導系を確立できる可能性が示唆された。さらに継続して分化・増殖シグナルに関する検討を続けている。

E. 結論

骨軟骨分化・増殖制御因子の最適化をおこない、またそれらの因子の詳細な作用を明らかにした。さらに皮膚線維芽細胞からの骨・軟骨形質転換を誘導した。

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

Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, Hoshi K. Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant*.14(9):683-93, 2005.

Chikazu D, Li X, Kawaguchi H, Sakuma Y, Voznesensky OS, Adams DJ, Xu M, Hoshi K, Katavic V, Herschman HR, Raisz LG, Pilbeam CC. Bone morphogenetic protein 2 induces cyclo-oxygenase 2 in osteoblasts via a Cbfa1 binding site: role in effects of bone morphogenetic protein 2 in vitro and in vivo. 2002. *J Bone Miner Res*. 20(10):1888-98, 2005.

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*. 13(7):632-41, 2005.

Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Kamekura S, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, 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*. 23(3):200-4, 2005.

Moro T, Ogasawara T, Chikuda H, Ikeda T, Ogata N, Maruyama Z, Komori T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Okayama H, Kawaguchi H. Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol*. 204(3):927-33, 2005.

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*. 146(6):2620-8, 2005.

2. 学会発表

大庭伸介, 池田敏之, 緒方直史, Lichtler Alex, 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4回日本再生医療学会総会, 2004.3.2, 大阪.

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: 新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体はSox9と独立に作用して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する. 第4回日本再生医療学会総会, 2004.3.1, 大阪.

大庭伸介, 池田敏之, 釘宮典孝, 矢野文子, 藤田隆司, 小守壽文, 小笠原徹, 星和人, 中村耕三, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: Runx2シグナルとBMPシグナルは協調的にCbfbを制御することによって骨芽細胞分化の最小かつ十分なシグナルユニットとして機能する. 第23回日本骨代謝学会学術集会, 2005.7.21, 大阪.

小笠原徹, 高橋嗣明, 浅輪幸世, 山岡尚世, 田中庸子, 西澤悟, 劉光耀, 須佐美隆史, 依田哲也, 高戸毅, 星和人: ヒト耳介由来軟骨細胞培養における TGF- β 添加の影響について. 第8回日本組織工学会, 2005年9月1日-2日, 東京.

山岡尚世, 小笠原徹, 朝戸裕貴, 西澤悟, 鄭雄一, 高戸毅, 川口浩, 中村耕三, 中塚貴志, 星和人: 軟骨再生医療に用いる足場素材ハイドロゲルの検討. 第8回日本組織工学会, 2005年9月1日-2日, 東京.

小笠原徹, 大庭伸介, 近津大地, 末永英之, 矢野文子, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩, 星和人, 高戸毅: 細胞周期調節因子による Runx2 機能制御機構の解明と骨再生医療への応用可能性. 第8回日本組織工学会, 2005年9月1日-2日, 東京.

星和人, 劉光耀, 小笠原徹, 高橋嗣明, 浅輪幸世, 鄭雄一, 中村耕三, 川口浩, 高戸毅: 軟骨再生医療に用いる軟骨細胞再分化誘導法の検討と作用機序の解明. 第8回日本組織工学会, 2005年9月1日-2日, 東京.

浅輪幸世, 小笠原徹, 中塚貴志, 鄭雄一, 高戸毅, 星和人: ヒト鼻中隔および耳介由来軟骨細胞の細胞特性の比較検討. 第8回日本組織工学会,

2005年9月1日-2日、東京.

年8月23日

高橋嗣明、小笠原徹、西澤悟、中塚貴志、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培養法の検討と液性因子の最適化。第8回日本組織工学会、2005年9月1日-2日、東京.

末永英之、古川克子、星和人、小笠原徹、牛田多加志、立石哲也、高戸毅：旋回培養を利用した分化促進と組織工学への応用。第8回日本組織工学会2005年9月1日、東京.

小笠原徹、星和人、筑田博隆、中村耕三、高戸毅、川口浩：細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の Runx2 機能スイッチングによる骨芽細胞分化制御(会議録)。第20回日本整形外科学会基礎学術集会、2005年10月20日-21日、三重.

小笠原徹、筑田博隆、大庭伸介、高戸毅、星和人：細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の Runx2 機能制御による骨芽細胞分化調節機構(会議録)。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月7日-10日、福岡.

Ogasawara T., Chikuda H., Ohba S., Chikazu D., Katagiri M., Yano F., Nakamura K., Ung-il Chung, Hoshi K., Takato T., Okayama H., Kawaguchi H.: Functional Switching of Runx2 by Cdk6 and Cdk4 in Regulation of Osteoblast Differentiation. 27th Annual Meeting of the ASBMR, September 23-27, 2005, USA.

Hoshi K., Liu G., Ogasawara T., Asawa Y., Chung U, Takato T., Nakamura K., and Kawaguchi H.: Thyroid Hormone (T3) Realizes Ideal Redifferentiation of Dedifferentiated Chondrocytes in Cooperation with BMP-2 and Insulin. Twenty-Seventh Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 23-27, 2005, Nashville, Tennessee, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 星和人他 脱分化型軟骨細胞の軟骨細胞への再分化培地 特願2004-244114 出願日平成16年8月24日
2. 星和人他 細胞培養用中空糸モジュールおよび細胞培養方法 特願2005-176438 出願日平成17年6月16日
3. 星和人他 脱分化型軟骨細胞の軟骨細胞への再分化培地 PCT出願PCT/JP2005-015280 出願日平成17

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, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K, Ikegawa S, Chung UI.	Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation.	J Bone Miner Metab.	23(5)	337-40	2005
Kugimiya F, Kawaguchi H, Kamekura S, Chikuda H, Ohba S, Yano F, Ogata N, Katagiri T, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Chung UI.	Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation.	J Biol Chem.	280(42)	35704-12	2005
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.	146(6)	2620-8	2005
Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, Hoshi K.	Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes.	Cell Transplant.	14(9)	683-93	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H	Characterization and localization of side population cells in mouse skin	Stem Cells	23	834-841	2005
Yano S, Okochi H	Long-term culture of adult murine epidermal keratinocytes	Br J Dermatol	153	1101-1104	2005
M. Hasegawa, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano and I. Ishikawa	Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model	Tissue Engineering	11(3-4)	469-478	2005
T. Akizuki, S. Oda, M. Komaki, H. Tsuchioka, N. Kawakatsu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano and I. Ishikawa	Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs	J. Periodont. Res.	40(3)	245-251	2005
T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, J. Yang, Y. Tano and T. Okano	Limbic epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state	Stem Cells	24(1)	86-94	2006

MINI REVIEW

Toshiyuki Ikeda · Hiroshi Kawaguchi · Satoru Kamekura
Naoshi Ogata · Yoshiyuki Mori · Kozo Nakamura
Shiro Ikegawa · Ung-il Chung

Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation

Received: February 18, 2005 / Accepted: April 3, 2005

Key words Cartilage · Formation · Regeneration · Sox

Introduction

In mammals, most skeletal elements are formed through endochondral bone formation, which is characterized by the initial formation of cartilage molds from mesenchymal condensations and their subsequent replacement by bones [1]. A small number of skeletal elements, including some craniofacial bones, are formed through intramembranous bone formation, which is characterized by direct transformation of mesenchymal condensations into bones. During the initial step common to both processes, the mesenchyme receives patterning signals that determine the shape, size, and number of mesenchymal condensations [2]. Molecules providing such patterning information are members of the Wnt, hedgehog, and fibroblast growth factor (FGF) families, and the TGF- β superfamily, a series of transcription factors of the Hox, Pax, homeodomain-containing, Forkhead, and basic helix–loop–helix (bHLH) families, and of cell adhesion molecules, including N-cadherin and NCAM [3]. During the endochondral process, cells in the mesenchymal condensations differentiate into chondrocytes, while cells at the periphery become perichondrial cells [4]. Chondrocytes, the primary cell type of cartilage, have a characteristic shape, express a characteristic genetic program, and deposit a characteristic extracellular

matrix rich in type II collagen and the proteoglycan aggrecan. The cartilage enlarges through chondrocyte proliferation and matrix production. Subsequently, chondrocytes in the center of the cartilage stop proliferating, dramatically increase in size (hypertrophy), and change their genetic program to synthesize a matrix rich in type X collagen. Hypertrophic chondrocytes play a pivotal role in coupling chondrogenesis and osteogenesis in the endochondral process; they mineralize a surrounding matrix to provide a scaffold for osteoblasts, direct adjacent cells in the perichondrium and the primary spongiosa to become osteoblasts, and attract blood vessels and blood cells, including osteoclasts [5,6]. Hypertrophic chondrocytes then undergo apoptotic cell death. The pathways of chondrocyte and osteoblast differentiation are thus coordinated in time and space during endochondral bone formation. This review summarizes the roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in the different steps of chondrogenic differentiation.

Roles of Sox9 in chondrogenesis

Sox9 is a member of the Sox family of transcription factors, which are characterized by a high-mobility-group (HMG)-box DNA-binding domain, whose sequence is at least 50% identical with that of the sex determining factor SRY [7]. The Sox family is composed of several subgroups based on sequence homologies both inside and outside the HMG-box domain [8]. Sox9 has a transcription activation domain and binds to a specific sequence in the minor groove of DNA [9]. Sox9 efficiently binds to single and double HMG-box sites in DNA. In mouse embryos, Sox9 is expressed in all chondroprogenitor cells and all chondrocytes, while its expression is dramatically decreased in hypertrophic chondrocytes [10–12].

Physiological roles of Sox9 in chondrogenesis were first demonstrated by the human genetic disease campomelic dysplasia (CD). This disease is caused by heterozygous inactivating mutations in and around the *SOX9* gene and is characterized by hypoplasia of all endochondral skeletal

T. Ikeda · N. Ogata · Y. Mori · U.-i. Chung (✉)
Division of Tissue Engineering, University of Tokyo Hospital, 7-3-1
Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan
Tel. +81-35-800-9891; Fax +81-35-800-9891
e-mail: uichung-tky@umin.ac.jp

H. Kawaguchi · S. Kamekura · K. Nakamura
Division of Motor and Sensory System Medicine, University of
Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

S. Ikegawa
SNP Research Center, RIKEN, Tokyo, Japan

elements [13,14]. Heterozygous *Sox9* mutant (*Sox9*^{+/-}) mice phenocopied CD in the skeletal phenotype, supporting the human data. In *Sox9*^{+/-} mouse embryos, smaller and delayed mesenchymal condensations caused the hypoplasia of endochondral bones and elongation of the hypertrophic layer of the growth plate and premature mineralization in several bones [15]. Taken together, these data suggest that *Sox9* negatively regulates the transition of chondrocyte proliferation into hypertrophy. Since no homozygous *Sox9* (*Sox9*^{-/-}) mutants could be generated, owing to the perinatal lethality and sex reversal of *Sox9*^{+/-} mice, the effects of a complete loss of *Sox9* on chondrogenesis were examined in mouse chimeras containing both *Sox9*^{-/-} and wild-type cells by injecting *Sox9*^{-/-} embryonic stem (ES) cells into wild-type blastocysts [16]. While *Sox9*^{-/-} and wild-type cells were intermingled in chondrogenic fields prior to the formation of mesenchymal condensations, *Sox9*^{-/-} cells were excluded from chondrogenic mesenchymal condensations and never expressed chondrocyte marker genes such as *Col2a1*, *Col9a2*, *Col11a2*, and *aggrecan*. In addition, in teratomas derived from *Sox9*^{-/-} ES cells, no cartilage formed. Inactivation of the *Sox9* gene in limb buds using the Cre recombinase/loxP recombination system before chondrogenic mesenchymal condensations resulted in the complete absence of mesenchymal condensations with abolished expression of chondrocyte marker genes [17]. These data demonstrate an important role of *Sox9* in the initial step of chondrogenesis, that is, mesenchymal condensations (Fig. 1).

Chondrocyte-specific enhancers of the *Col2a1*, *Col11a2*, and *CDRAP* genes contain *Sox9* binding sites [9,10,18,19]. These enhancers were activated by *Sox9* in transfection experiments and also in vivo for the *Col2a1* enhancer [20]. In addition, enhancer mutations that abolished DNA binding of *Sox9* inactivated these enhancers in vivo. These data suggest that *Sox9* has a role in regulating chondrocyte marker genes after mesenchymal condensations. When *Sox9* was deleted by using the Cre recombinase/loxP recom-

bination system after chondrogenic mesenchymal condensations, severe generalized chondrodysplasia occurred with a severe reduction of cartilage-specific matrix production and lack of proliferating chondrocytes [17]. These data demonstrate an important role of *Sox9* in chondrogenesis after mesenchymal condensations as well (Fig. 1).

The expression and function of *Sox9* is not restricted to chondrogenesis [13,14], suggesting that other transcription factors may cooperate with *Sox9* to specifically activate chondrocyte marker genes. Other *Sox* proteins interact with transcription factors of different families, and those interactions may increase the specificity of these *Sox* proteins in activating target genes [21–23].

Roles of *Sox5* and *Sox6* in chondrogenic differentiation

Sox5 and *Sox6*, which have a high degree of sequence identity with each other, belong to a different subgroup of *Sox* proteins and present no sequence homology with *Sox9* except for the HMG-box. *Sox5* and *Sox6* are coexpressed with *Sox9* during chondrogenic differentiation [24]. Both genes are expressed in several nonchondrogenic tissues [25]. Owing to the presence of a highly conserved coiled-coil domain, *Sox5* and *Sox6* form homodimers and heterodimers with each other, which bind much more efficiently to pairs of HMG-box binding sites than to single binding sites. Unlike *Sox9*, *Sox5* and *Sox6* do not contain a transcriptional activation domain. *Sox5* and *Sox6* cooperate with *Sox9* to activate the *Col2a1* enhancer and the *Col2a1* and *aggrecan* genes in vitro.

Physiological roles of *Sox5* and *Sox6* in chondrogenic differentiation were demonstrated by genetically manipulated mice. Although homozygous *Sox5* mutant (*Sox5*^{-/-}) mice and *Sox6* mutant (*Sox6*^{-/-}) mice were born with relatively mild skeletal anomalies, double mutant

Fig. 1. Diagram of the actions of *Sox5*, *Sox6*, and *Sox9* in different steps of chondrogenic differentiation

