

II. 分担研究報告

変形性関節症の大規模臨床統合データベースの確立

分担研究者 吉村典子（東京大学大学院医学系研究科関節疾患総合研究講座 客員助教授）

研究要旨：一般住民における変形性膝関節症（膝 OA）の有病率及び危険因子の解明およびその後の追跡による自然経過の観察と発生率と危険因子の解明を目的として、東京都板橋区の 65 歳以上の高齢者を対象とした都市型コホートを設定した。初回調査において本調査への参加を承諾した 667 人（男性 257 人、女性 410 人、平均年 77.2 歳）の膝の X 線写真から Kellgren-Lawrence 分類の grade2 以上のものを OA ありとすると、OA ありの頻度は 66.1%と高かった。OA の頻度を性別にみると男性で 122 人（47.5%）、女性で 319 人（77.8%）と女性に有意に多かった（ $P < 0.001$ ）。また左右差をみると、右のみ 23 人（3.5%）、左のみ 31 人（4.7%）、両側性が 387 人（58.0%）と圧倒的に両側性が多かった。

A. 研究目的

変形性関節症は、加齢とともに進行する膝の腫脹と疼痛により、高齢者の歩行能力や生活機能を低下させ、健康寿命を短縮させる重大な生活習慣病である。しかしながら変形性関節症の予防を目的として疫学的アプローチを行った研究は現在までほとんど行われていない。そのため、その発生数やその年齢別頻度、性差、地域差など疾病予防のために必要な基本的疫学指標が得られておらず、発症の危険因子についてもほとんどわかっていないのが現状である。

本研究では、一般住民における変形性膝関節症の有病率及び危険因子の解明およびその後の追跡研究による変形性膝関節症の自然経過の観察と発生率と危険因子の解明を目的として変形性関節症の大規模の都市型および地方型コホートを設定し、詳細な問診票調査、整形外科専門医による臨床情報、膝レントゲンなど画像診断の臨床統合データベースの構築を行う。続いて

ゲノム疫学的手法を用いて、その背景にある遺伝因子・環境因子を系統的・網羅的に抽出・解析することによって OA 治療の標的分子を同定することを目的とする。本年度はすでにデータの集積がはじまっている都市型コホート初回調査の結果について報告する。

B. 研究方法

東京都板橋区の東京都老人総合研究所では、板橋区在住の 65 歳以上の高齢者を対象として平成 14 年（2002 年）に「お達者検診」として総合検診を行い、参加者 1154 名を得た（ベースライン調査）。今回ベースライン調査参加者に骨関節検診への参加を依頼し、承諾を得られた対象者に、身体計測、身体機能検査、QOL に関する問診票調査を行った。同時に膝レントゲン撮影を行い、Kellgren-Lawrence の分類に従って grading を行い、2 度以上を OA ありと判定した。

分析には統計ソフト STATA を用いた。

C. 結果

ベースライン調査参加者のうち、骨関節検診への参加を承諾したものは 667 人(男性 257 人、女性 410 人)であった。検診参加者の平均年齢は 77.2 歳 (SD 3.8 歳 age range 69-88 歳)であった。これら対象者で膝の X 線写真で Kellgren-Lawrence の grade の分布をみると、0-1 が 226 人 (33.9%)、2 が 369 人 (55.3%)、3-4 が 72 人 (10.8%) であり、grade 2 以上の OA ありの頻度は 66.1%と高かった (図 1)。

OA の頻度を性別にみると男性で 122 人 (47.5%)、女性で 319 人 (77.8%) と女性に有意に多かった ($P < 0.001$)。また左右差をみると、右のみ 23 人 (3.5%)、左のみ 31 人 (4.7%)、両側性が 387 人 (58.0%) と圧倒的に両側性が多かった。

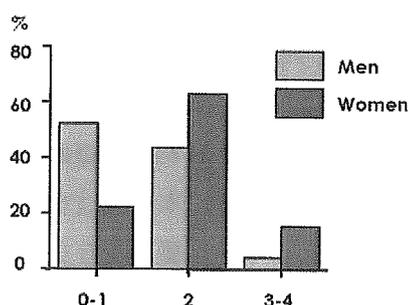


図 1. Kellgren-Lawrence grading の性別分布

D. 考察

都市部に在住する一般在宅高齢者における膝 OA の頻度を明らかにした。本研究はランダムサンプリングを行わず、調査協力者の参加を得て行った調査であり、参加希望者というサンプリングバイアスは排除できていないものの、検診参加者は非参加者よりも健康意識が高いとされており、本調査結果は過小評価になることはあっても過大評価にはなっていないと考える。さらにそのベースとなるお達者検診参加者においては地域代表

性が確認されており、今回検診を行った集団は身体計測値、QOL とともに国民標準値と近い集団であることを確認している。

本調査における都市在宅高齢者のうち約 7 割がエックス線膝 OA ありと診断されることがわかった。さらに膝 OA の頻度は女性に有意に多いことも明らかになった。今後骨関節検診時の身体計測値、身体機能検査、問診票調査の結果を解析し、さらにお達者検診の結果もレコードリンケージする事によって、都市部住民の膝 OA の危険因子について検討を加えたい。加えて農村、漁村における骨軟骨変性疾患調査もすでに進捗中であり、都市と地方における変形性関節症の有病率の違いについても今後明らかにする予定である。

E. 結論

都市部在住一般在宅高齢者を対象としてコホートを設定し、初回調査の結果を報告した。その結果、都市部在住の 69 歳以上の高齢者においては、約 7 割がエックス線膝 OA をみとめており、その頻度は女性に多いことがわかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshihura N, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H: Epidemiology of hip fracture in Japan: Incidence and risk factors. *J Bone Miner Metab* 23 suppl, 78-80, 2005
2. Fujiwara S, Sone T, Yamazaki K, Yoshimura N, Nakatuska K, Masunari N, Fujita S, Kushida K, Fukunaga M. Heel Bone Ultrasound Predicts Non-spine Fracture in Japanese Men and Women.

Osteopos Int 16: 2107-2112, 2005

3. Yoshimura N, Kinoshita H, Horii N, Nishioka T, Ryujin M, Mantani Y, Miyake M, Takeshita T, Ichinose M, Yoshiida M, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Cooper C: Risk factors for knee osteoarthritis in Japanese men: A case control study. *Modern Rheumatology* 16: 24-29, 2006
4. Oka H, Yoshimura N, Kinoshita H, Saiga A, Kawaguchi H, Nakamura K. Decreased activities of daily living and associations with bone loss among aged residents in a rural Japanese community: The Miyama Study. *J Bone Miner Metab*, in press, 2006
5. 吉村典子: 高齢者の身長低下、骨密度低下とQOL- 地域コホートでの検討-. *Osteoporos Jpn* 13, 545-548, 2005
6. 吉村典子、岡敬之、中塚喜義、西沢良記、川口浩、中村耕三: 一般住民における血清 β -isomerized cross-linked C-telopeptide of type I collagen (β -CTX) 及び total osteocalcin (total OC) の性・年齢別変化からみた基準値設定の試み. *Osteoporos Jpn* 13, 759-765, 2005
7. 吉村典子、中塚喜義: 骨代謝マーカーによる骨粗鬆症及び骨粗鬆症性骨折の予測 (報告). *Osteoporos Jpn* 13, 903-910, 2005
8. 吉村典子: 骨粗鬆症のEBM: 2. 骨粗鬆症による椎体・非椎体骨折の生命予後のEBM. *医学のあゆみ* 212, 143-148, 2005
9. 吉村典子: 骨粗鬆症と骨折の医療・社会的影響. *日本内科学会雑誌* 94, 619-625, 2005
吉村典子: QUS使用の実際. 臨床応用-スクリーニング-
10. 吉村典子: 骨を守る生活習慣を学ぶ. *ホルモンと臨床* 53, 449-454, 2005
11. 吉村典子: 生活習慣介入による骨折・骨粗鬆症予防についての勧告 (運動・喫煙・飲酒). *Clinical Calcium* 15, 1399-1408, 2005

12. 吉村典子: 男性の骨粗鬆症診断・治療のピットフォールとは? *骨粗鬆症治療* 4, 217-223, 2005

13. 吉村典子、岡敬之: 日本における骨粗鬆症のリスクファクターの考え方- 欧米との比較も含めて. *Clinical Calcium* 15, 1457-1462, 2005
14. 吉村典子、中塚喜義、中村利孝、折茂肇: 骨粗鬆症の病型分類の考え方-Back to Albright. *Osteoporos Jpn* 13, 839-845, 2005

2. 学会発表

1. Yoshimura N, Takijiri T, Saiga A, Oka H, Takeshita T: Prevalence and cumulative incidence of vertebral fractures in a rural Japanese community. The Miyama study, ECTS/IBMS meeting, Geneva, Switzerland, 2005. 6
2. Yoshimura N, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Cooper C: Comparing Risk Factors for Hip and Knee Osteoarthritis in Japan and Britain. Annual Meeting, American Society for Bone and Mineral Research, Nashville, USA, 2005. 9
3. 吉村典子、木下裕文、岡敬之、川口浩、中村耕三: 地域住民における脊椎椎体骨折の累積発生率: 山村コホート 10年間の追跡. 骨形態計測学会 2005. 6 (東京都、シェーンバッハ砂防)
4. 吉村典子、木下裕文、岡敬之、川口浩、中村耕三: 女性における脊椎椎体骨折発生率への骨密度の関与: 山村コホート 10年間の追跡. 日本骨代謝学会 2005. 7 (大阪府、大阪国際会議場)
5. 吉村典子、岡敬之: 脊椎椎体骨折発生に対する既存骨折の影響. 日本公衆衛生学会総会 2005. 9 (北海道、札幌コンベンションセンター)
6. 岡敬之、吉村典子、鈴木隆雄、鈴木英世: 都市部に在住する在宅高齢者の特性 (骨軟骨変性疾患予防の基礎調査). 日本公衆衛生学会総会 2005. 9 (北海道、札幌コンベンションセンター)

7. 吉村典子、岡敬之、木下裕文、川口浩、中村耕三：骨代謝マーカーは将来の骨折を予知するか？山村コホート 10 年間の追跡調査より. 日本骨粗鬆症学会. 2005. 10（大阪府、大阪国際会議場）
8. 岡敬之、吉村典子、吉田英世、鈴木隆雄、川口浩、中村耕三：都市部に在住する在宅高齢者における歩行能力と健康関連 QOL の関係. 日本骨粗鬆症学会, 2005. 10（大阪府、大阪国際会議場）

II. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

変形性関節症の標的分子の解明（1）：マウスゲノミクスによる解析

分担研究者 川口 浩（東京大学医学部附属病院・整形外科 助教授）

研究要旨：我々が確立したマウス変形性関節症（OA）モデルの関節軟骨を観察することによって、軟骨破壊の初期にⅩ型コラーゲン（COL10）とマトリックスメタロプロテアーゼ-13（MMP-13）が発現誘導されることを示した。これらの分子の上流に位置する転写因子である Runx2 と、我々が同定した軟骨の後期分化促進遺伝子である carminerin のそれぞれの欠損マウスに上記 OA モデルを作成したところ、Runx2 が軟骨破壊に carminerin が骨棘形成にとって重要なシグナル分子であることが示された。

A. 研究目的

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。我々は最近、微小外科手術手技を応用し膝関節の靭帯と半月板の切除の組み合わせによって関節不安定性を加えることで4つのタイプのマウス膝 OA 誘発モデルを作製した（*Osteoarthritis Cart* 13:632, 2005）。更に、このマウス膝関節 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。本研究では、これらのマウスにおいて OA 関節を組織学的に観察することによって OA 進行に関与している分子を同定し、更にこ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することを目指している。

B. 研究方法

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、候補遺伝子の遺伝子改変マウスに作成し、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。

（倫理面への配慮）

本研究は、東京大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て行っている。

C. 結果

OA 関節軟骨の初期にⅩ型コラーゲン（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。そこで、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（Cbfal）に注目した。Runx2 ホモ欠損マウス（Runx2^{-/-}）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^{+/-}）に上記 OA 誘発モデルを作製した。同胞野生型（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 \pm SEM）であった。

更に、我々が同定した、軟骨の後期分化促進遺伝子である carminerin（cystatin 10）の OA への関与を検討するために、欠損マウス（Cmr^{-/-}）を作出した。8週齢の Cmr^{-/-} 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、Cmr^{-/-} 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、Cmr^{-/-} 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、Cmr^{-/-} では WT と比較して約 60% 減少していた（*Nature Medicine*, in press）。

D. 考察

マウス OA モデルの組織学的解析から、OA 変化の背景にはメカニカルストレスに対する関節軟骨細胞の特異的な肥大分化反応の存在が明らかとなり、この変化に MMP-13 が関与している可能性が示された。

Runx2 による病的肥大化が OA 発症の引き金となること、また新規遺伝子 carminerin は OA 負荷や老化などの病的条件下における石灰化に重要であることが示された。Carminerin は、変形性脊椎症など、その骨棘形成が臨床問題となる病態において有効な治療の標的分子になることが期待される。

E. 結論

マウスゲノミクスを用いた検討で、Runx2 が軟骨破壊に、carminerin が骨棘形成にとって重要なシグナル分子であることが示された。今後は、これらの分子と、MMP-13、VEGF などの分子との発現・機能における関連を検討することによって、OA における肥大化・軟骨破壊・骨棘形成に関する分子ネットワークを解明したいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 23: 200-204, 2005.
2. Takeshita K, Seichi A, Akune T, Kawamura N, Kawaguchi H, and Nakamura K: Can laminoplasty maintain the cervical alignment even when the C2 lamina is contained. *Spine* 30: 1294-1298, 2005.
3. 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* 109: 457-66, 2005.
4. 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.
5. 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 \cdot insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab* 23: 275-279, 2005.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Seichi A, Takeshita K, Nakajima S, Akune T, Kawaguchi H, Nakamura K: Revision cervical spine surgery using transarticular or pedicular screws under a computer-assisted image-guidance system. *J Orthop Sci* 10: 385-390, 2005.
10. Seichi A, Takeshita K, Kawaguchi H, Kawamura N, Higashikawa A, and Nakamura K: Image-guided surgery for thoracic ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Neurosurg Spine* 3: 165-168, 2005.
11. 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.
12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Kugimiya F, Chikuda H, Kamekura S, Ikeda T, Hoshi K, Ogasawara T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Involvement of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase II in chondrocyte hypertrophy during endochondral ossification. *Mod Rheumatol* 15: 391-396, 2005.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, Kawaguchi H, and Chung UI: Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J Bone Miner Metab* 24: 95-99, 2006.
 20. Chikazu D, Ohba S, Ogasawara T, Saijo H, Mori Y, Tomizuka K, Kawaguchi H, Yonehara Y, Susami T, and Takato T: Combination of platelet-rich plasma and cyclooxygenase-2 inhibitor potently stimulates bone marrow stromal cell proliferation in vitro. *Asian J Oral Maxillofac Surg* (in press).
 21. Ogata N, Roth SI, Kawaguchi H, and Segre GV: Continuous activation of PKC by $G\alpha_q$ in osteoblasts results in osteopenia by blocking osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* (in press).
 22. Koshizuka Y, Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Seichi A, Takeshita K, Nakamura K, and Kawaguchi H: Distinct association of gene polymorphisms of estrogen receptor and vitamin D receptor with lumbar spondylosis in postmenopausal women. *Eur Spine J* (in press).
 23. Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kubota N, Yamauchi T, Terauchi Y, Kadowaki T, Takeuchi Y, Fukumoto S, Ikeda T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem* (in press).
 24. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, and Kazuto Hoshi: Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res* (in press).
 25. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Nakamura K, and Kawaguchi H: Grafting of biocompatible MPC polymer on cross-linked polyethylene liner surface for extending longevity of artificial hip joints. *Clin Orthop Rel Res* (in press).
 26. Seichi A, Takeshita K, Kawaguchi H, Matsudaira K, Higashikawa A, Ogata N, and Nakamura K: Neurological level diagnosis

- of cervical stenotic myelopathy. *Spine* (in press).
27. Yamada T, Kawano H, Koshizuka Y, Fukuda T, Yoshimura K, Kamekura S, Saito T, Ikeda T, Kawasaki Y, Azuma Y, Ikegawa S, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kato S, and Kawaguchi H: Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification under physiological and pathological conditions. *Nat Med* (in press).
 2. 学会発表
 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. 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. 2005. 3. 18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター, 大阪).
 5. 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).
 6. 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).
 7. 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).
 8. 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).
 9. 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, 神奈川県).
 10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
 13. 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）.
14. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、高玉博朗、山脇昇、中村耕三、川口造：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）.
 15. 竹下克志、星地亜都司、河村直洋、東川晶郎、村上元昭、川口造、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）.
 16. 河野博隆、佐藤隆史、山田高嗣、松本高広、中村耕三、川口造、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）.
 17. 星地亜都司、竹下克志、松平浩、川口造、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）.
 18. 星地亜都司、竹下克志、阿久根徹、川口造、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）.
 19. 川口造、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）.
 20. 川口造、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）.
 21. 川口造：骨量・骨代謝回転・骨質とPTH（ランチョンセミナー）. 第23回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23（大阪国際会議場、大阪）.
 22. 川口造、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）.
 23. 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、川口造：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）.
 24. 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、川口造、鄭雄一：Runx2シグナルとBMPシグナルは協調的にCfbf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）.
 25. 丸山善治郎、豊澤悟、古市達哉、金谷直子、藤田隆司、中村耕三、川口造、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）.
 26. 斉藤琢、池田敏之、中村耕三、川口造、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）.
 27. 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）.
 28. 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）.
 29. 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）.

30. 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 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).
31. 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、川口浩：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).
32. 吉村典子、木下裕文、岡敬之、川口浩、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).
33. 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 23 回日本骨代謝学会. 2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪).
34. 星和人、劉光耀、小笠原徹、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩：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).
35. 河野慎次郎、星和人、川口浩、中村耕三、田中栄：Mitogen activated kinase (MAP キナーゼ) Pathway は MLO-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).
36. 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、川口浩：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).
37. 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).
38. 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、川口浩：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)
39. 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).
40. 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).
41. 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).
42. 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).
43. 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).
44. 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).
45. 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).
 46. 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).
 47. 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).
 48. 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).
 49. 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).
 50. 川口浩, 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).
 51. 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).
 52. 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).
 53. 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).
 54. 高石官成, Jeanine D' Armiento, 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).
 55. 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).
 56. 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).
 57. 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).
 58. 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).
59. 星和人, 山岡尚世, 鄭雄一, 高戸毅, 中村耕三, 川口造: 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).
 60. 位高啓史, 大庭伸介, 鄭雄一, 川口造, 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).
 61. 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).
 62. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of involutional osteoporosis. The 8th Annual Meeting of the Korean Society of Osteoporosis. 2005. 10. 30 (Seoul, Korea).
 63. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of involutional osteoporosis from mouse genomic approaches. The Korean Society of Endocrinology 2005. 2005. 11. 19 (Kyungju, Korea).
 64. 川口造: 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).
 65. 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, 川口造: 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).
 66. 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, 川口造: 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).
 67. 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, 川口造: 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).
 68. 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, 川口造: 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).
 69. 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, 川口造: 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).
 70. 川口造: 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).
 71. 川口造: 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).
 72. 川口造: 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).
 73. 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 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レ, 横浜).
 74. 斉藤琢, 池田敏之, 鄭雄一, 中村耕三, 川口造: 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レ, 横浜).
 75. 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, 川口造, 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レ, 横浜).
 76. 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, 川口造: 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レ、横浜).

- 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

変形性関節症の標的分子の解明（2）

：ヒト OA 罹患軟骨のレーザー・キャプチャード・マイクロダイセクションによる解析

分担研究者 福井尚志（国立病院機構相模原病院臨床研究センター 部長）

研究要旨：変形性関節症に罹患した関節軟骨では軟骨変性部において軟骨細胞に機能的な異常が生じており、正常な軟骨基質の産生が低下するとともに正常軟骨では発現がみられないかきわめて限られている基質の発現が誘導されていることが明らかになった。また肉眼的に変性が観察されない部位においては軟骨細胞の基質産生が全般に高度に亢進しているが、軟骨構成要素間の発現比は正常軟骨とは異なっており、変形性関節症では産生される基質が質的に正常の軟骨より劣るものである可能性が示唆された。

A. 研究目的

変形性関節症（OA）は先進国においても患者数が多い関節疾患である。わが国でも社会の高齢化とともに患者数は増加しており、治療を要する OA 患者の総数は現在全国で 800 万人と推定されている。OA は高齢者において ADL の制限をもたらす、QOL を低下させる大きな要因である。しかし OA に対する治療は現時点では対症的なものしかなく、疾患の自然経過を変えうる治療法は確立されていない。このため OA 患者には長期にわたる消炎鎮痛療法や人工関節置換がしばしば行われており、これは医療経済的な観点からも容認されるものではない。

OA に対する本質的な治療法の確立が立ち遅れている理由はその病態の解明が未だに不十分であることにある。変形性関節症の本態は関節軟骨の変性・消失にある。この過程には炎症性サイトカインや MMP などのタンパク分解酵素が関与することが知られており、従来これらの作用が軟骨基質の変性をもたらす

ものと考えられてきた。しかし一方 OA では軟骨細胞において疾患に伴う機能的な変化が生じ、正常な軟骨基質の産生が行われなくなっていることが知られており、これも疾患進行の一因となっている可能性がある。しかし OA における軟骨細胞の基質産生能の変化は十分に解明されていない部分が多い。

OA の病態を解明する場合の大きな問題は、病変が部位によって大きく異なることである。たとえば末期 OA 関節においても軟骨の一部では高度な変性が観察される半面、とくに非荷重部の軟骨は少なくとも肉眼的にはほとんど変性がないままの状態を保っていることが多い。実際、従来の組織学的な研究からも OA

罹患軟骨における軟骨細胞の変化が部位によって大きく異なることが明らかにされている。しかし OA 罹患軟骨の特定の部位において軟骨細胞が機能的にどのような変化を生じているのかを包括的に明らかにする研究は今まで行われてこなかった。本研究の目的はレーザ

ー・キャプチャード・マイクロダイセクションを応用することにより OA 罹患軟骨における軟骨細胞の機能的な変化を軟骨変性との部位的な関係を考慮した上で明らかにすることである。

B. 研究方法

人工膝関節置換術の際に末期 OA 膝関節 32 関節より採取した OA 罹患軟骨(平均年齢 71 歳)を用い、関節疾患の既往のない同等の年齢の剖検例において肉眼的に異常所見を認めない膝関節 11 関節より採取した軟骨(平均年齢 79 歳)をこの対照として用いた。関節軟骨は OA 罹患軟骨、対照軟骨とも大腿骨顆部から得たが、OA 罹患軟骨は肉眼的な変性の程度の異なる部位から一検体あたり 2~5 個を採取し、解析に用いた。軟骨は採取直後に OCT コンパウンドに包埋して液体窒素で凍結し、解析まで -80°C で保存した。

実際の解析では検体から $40\sim 60\text{ }\mu\text{m}$ の厚さの凍結切片を作成し、これを EDTA、エタノール、キシレンで処理したのちレーザー・マイクロダイセクション装置(PixCell Iie, Arcuturus 社)を用い、LCM 上で軟骨変性の有無とその程度を確認したうえで関節軟骨を浅層、中間層、深層の 3 つの層に分離し、それぞれの層から RNA を抽出した。この RNA から逆転写反応により cDNA を合成し、real-time PCR により種々の遺伝子の発現を定量的に解析した。今回の検討では軟骨細胞の基質産生の変化に特に着目し、軟骨基質の本来の構成要素として II 型、IX 型、XI 型コラーゲンとアグリカン、リンクプロテインを、また OA 変化に伴って発現が誘導される遺伝子として I 型コラーゲン、IIA 型コラーゲン、III 型コラーゲン、ファイブロネクチンについてそれ

ぞれの発現を定量的に解析した。また軟骨細胞の表現型への関与がよく知られている転写因子 Sox9 についても OA 軟骨における発現レベルを検討した。

(倫理面の配慮)

検体の採取は OA 軟骨については本人に対し、対照軟骨採取の場合は遺族に対して研究の目的、研究参加に伴う利益・不利益の有無、研究不参加が患者または遺族に対してなんの不利益ももたらさないこと、得られた個人情報の保護および使途、研究参加の取りやめなどについて書面をもって説明したのち、研究参加への同意を書面により得て行った。検体の解析は連結可能な形で匿名化して行い、個人情報情報は情報管理者を設定して管理した。

C. 結果

OA 罹患軟骨では検討を行った軟骨基質の構成要素はすべて、OA 罹患軟骨のほとんどの領域で発現が大幅に亢進していた。亢進の程度は II 型コラーゲンがもっとも顕著で対照軟骨の 10~20 倍にも及んだ。しかし部位別に遺伝子の発現を観察すると、軟骨変性部の表層では軟骨基質の構成要素の発現が全体的に低下する傾向がみられた。低下の程度は遺伝子間で差があり、アグリカンおよびリンクプロテインの低下がもっとも著しく、II 型および IX 方コラーゲンがこれに次ぎ、XI 型コラーゲンの低下は比較的軽度であった。一方意外なことに Sox9 の発現レベルは OA 軟骨と対照軟骨の間で有意の差は見られず、また OA 軟骨においても部位による発現レベルの差は観察されなかった。このことから OA 軟骨における軟骨基質関連の遺伝子の発現の変動には Sox9 が関与していない可能性が考えられた。

一方、OA に伴って発現が誘導されることが

報告されている遺伝子のうち、III型コラーゲンとファイブロネクチンは軟骨変性部のとくに表層において強く発現が誘導されていた。またこの2つの遺伝子の発現は今回検討を加えたOA罹患軟骨のすべてにおいて程度の差はあるものの例外なく発現が亢進しており、これらの遺伝子の発現誘導はOA変化に伴う普遍的な変化であると考えられた。これに対してI型コラーゲンはOAにおいて発現が誘導されている症例があるものの、個体差が大きく、発現が弱い検体ではごくわずかの発現誘導しか観察されなかった。また発現が見られた個体でも発現は主に軟骨の肉眼的非変性部の表層で観察され、軟骨変性との直接的な関連は観察されなかった。IIA型コラーゲンはOA軟骨において発現が全般に亢進していたが、従来の知見と異なりII型コラーゲンに対する発現比は必ずしもOAで亢進しておらず、OA軟骨におけるIIA型コラーゲンの発現はII型コラーゲンの発現亢進に伴う現象である可能性が示された。

D. 考察

OA軟骨において軟骨基質の産生が全般に亢進していることは従来多くの研究によって示されてきたが、本研究の結果も基本的には従来の知見と一致するものであった。しかし今回の検討の結果から発現亢進は軟骨全体にわたるものではないことが示され、とくに軟骨変性部表層では軟骨細胞は特有の表現型の変化を生じて軟骨本来の基質の発現が低下するとともに正常軟骨では観察されない、いわば病的な基質の産生を行うようになっていることが明らかとなった。OA罹患関節において軟骨基質の喪失が軟骨変性部において進んでいくことを考慮すると、変性部の表層におけ

る軟骨細胞の基質産生能の変化は、OAの進行と密接に関連した現象である可能性がある。われわれは現在行っている研究において軟骨変性部における軟骨細胞の機能変化にはシグナル伝達の変化が関与している可能性を見出しており、今後はさらにシグナル伝達の変化の詳細とシグナルの変化をもたらすメカニズムの解明を目指して研究を進める予定である。軟骨変性部表層における細胞の機能的変化が何らかの手法により正常化できれば、これによってOAの進行が抑制しうるかもしれない。

E. 結論

OAにおいて軟骨細胞は基質産生能に大きな変化を生っており、肉眼的には変性が観察されない部位においても正常な基質産生が行われなくなっている可能性が示された。また軟骨変性部表層において軟骨細胞は固有の表現型の変化を生じてOAの進行に関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tashiro T, Hiraoka H, Ikeda Y, Ohnuki T, Suzuki R, Ochi T, Nakamura K, Fukui N. Effect of GDF-5 on ligament healing. *J Orthop Res* 24:71-79, 2006.
2. Hiraoka H, Kuribayashi S, Fukuda A, Fukui N, Nakamura K. Endoscopic anterior reconstruction using a computer-assisted fluoroscopic navigation system. *J Orthop Sci* 11:159-166, 2006.
3. Tanaka K, Mori T, Juji T, Suzuki S, Watanabe J, Goto A, Shiobara N, Yamane S, Fukui N, Suzuki R, Ochi T.

Production of interleukin-6 and interleukin-8 by nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients after stimulation with monocytes. *Mod Rheumatol* 15:415-422, 2005.

2. 学会発表

1. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Yamane S, Suzuki R, Yamamoto S, Katsuragawa Y, Sandell LJ, Ochi T. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ may be responsible for the induction of type I and type III collagen during dedifferentiation in the monolayer cultured adult human articular chondrocytes. 10th World Congress on Osteoarthritis Boston, MA, USA. December, 2005.
2. 福井尚志、池田泰子、大貫俊幸、鈴木隆二、山本精三、越智隆弘. IX 型および XI 型コラーゲンの相対的な産生低下が変形性関節症の進行に關与する. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005 年 10 月、三重.
3. 田中こなき、大貫俊幸、池田泰子、山本精三、福井尚志. 変形性関節症由来軟骨細胞の初代培養系を用いた軟骨細胞脱分化の評価. 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2005 年 10 月、三重.
4. 福井尚志、池田泰子、大貫俊幸、山根昌治、鈴木隆二、桂川陽三、山本精三、沢辺元治、Linda J Sandell、越智隆弘. IX 型および XI 型コラーゲンの相対的産生低下が変形性関節症の進行に關与する. 第 19 回軟骨代謝学会. 2006 年 3 月、横浜.
5. 桂川陽三、福井尚志、池田泰子、大貫俊幸、山本精三、沢辺元治. 変形性関節症における半月の変化に關する組織学および分子生物学的検討. 第 19 回軟骨代謝学会. 2006 年 3 月、横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

培養関節軟骨細胞の表現型維持に関する新規の方法（特許出願予定）

変形性関節症の治療・予防の開発（1）：ナノミセル人工ウィルスの開発

分担研究者 片岡一則（東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科 教授）

研究要旨：本分担研究においては、高分子ナノミセルを用いた、骨軟骨細胞に対する効率よい遺伝子導入方法の開発を目指している。本分担研究で取り組んでいる高分子ナノミセルは、ウイルス（～50ナノメートル）と同等という微小サイズでありながら、分子認識能や環境応答能などのマルチ機能を搭載可能な超機能化システムであり、表面を生体適合化する事も可能である。これまでに確立したアミノリシス法によるブロック共重合体合成技術により、側鎖にエチレンジアミン構造を有するポリマーを合成し、マウス未分化骨芽細胞を含む複数の初代培養株細胞に対する効率的な遺伝子導入を実現した。また、*in vivo*でも、マウス頭蓋骨骨欠損モデルに対して、転写因子遺伝子導入による骨芽細胞分化誘導により、骨新生の誘導が可能となることも確認した。

A. 研究目的

本分担研究は、新規OA治療への応用を目的とする遺伝子導入システムの開発研究である。低毒性かつ生体適合性にすぐれた高分子ナノミセルを用い、骨軟骨、滑膜細胞への効率よい遺伝子導入方法の開発を目指している。

本年度は、新規カチオン性ブロック共重合体の分子設計・合成、これら高分子とレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドDNA (pDNA) からなるナノミセル型遺伝子キャリアの特性解析、培養細胞系での遺伝子発現、および骨誘導因子遺伝子導入による骨芽細胞分化誘導の評価を行った。

B. 研究方法

1) ポリカチオンの合成とポリプレックスの調製
アミノリシス法によるブロック共重合体合成を行った。ポリアスパラギン酸 (P [Asp]) 側鎖にジエチレントリアミン (DET) を導入した P [Asp (DET)] ポリマーとポリエチレングリコール (PEG) とのブロック共重合体 (PEG-DET) を合成した (PEG分子量12000, ポリアミノ酸重合度98)。ナノミセル型キャリアはトリスバッファー中でDNA とポリマー溶液を混合することによって調製した。

2) 初代培養株細胞への遺伝子導入

新生マウス頭蓋骨由来の未分化骨芽細胞を採取し、6穴プレートに播種、培養し、ナノミセル型キャリアによる遺伝子導入を行った。同様にマウス皮膚組織より皮膚線維芽細胞に対する遺伝子導入も行った。導入遺伝子はホタル発光ル

シフェラーゼおよび蛍光タンパクである YFP を用い、それぞれルミノメーター、蛍光顕微鏡にて遺伝子発現を評価した。

また、遺伝子導入条件における細胞への毒性を評価するため、生細胞数の計測を MTT アッセイにより行った。

3) ナノミセル型キャリアの細胞内挙動観察

DNA を2種の波長の異なる蛍光分子で標識することにより、DNA がナノミセルに内包されると、2分子間の蛍光エネルギー移動により波長が変化する。一方 DNA がキャリア外に放出されるとこのエネルギー移動は解消されるため、その変化を観察することにより、細胞内でのキャリア挙動、DNA 放出をレーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。

4) 転写因子遺伝子導入による骨芽細胞分化誘導、*in vivo* 骨新生

骨芽細胞への分化誘導に働く転写因子遺伝子 (Runx2) を未分化骨芽細胞に導入し、分化をオステオカルシン発現により評価した。また、*in vivo* 遺伝子導入として、ナノミセルをヒドロキシアパタイトを主成分とするマトリックス中に包含し、マウス頭頂骨骨欠損モデルに対し適用した。

C. 結果

1) 初代培養株細胞への遺伝子導入

PEG-DET/DNA ナノミセル型キャリアにより、未分化骨芽細胞、皮膚線維芽細胞いずれにおいてもほとんど毒性を示すことなく遺伝子発現が確認された。ルシフェラーゼ遺伝子による評価で、

ポリマーのカチオン電荷対 DNA の電荷比を 80 (N/P=80) にて調製したナノミセルにおいて最も優れた遺伝子発現が得られることが確認され、YFP 遺伝子発現の蛍光顕微鏡による観察では、導入後 6 日で約 50% の細胞に遺伝子発現を認めた。

何れの細胞においても細胞は形態的に遺伝子導入を行っていないコントロール細胞とくらべほとんど影響は見られず、MTT アッセイによる生細胞数計測にても、コントロールとの有意差を認めなかった。代表的な遺伝子導入用カチオンポリマーであるポリエチレンジアミンでは、強い毒性が生じており、対照的な結果となった。

2) ナノミセル型キャリアの細胞内挙動観察

フルオレセインおよび Cy3 のふたつの蛍光分子で標識した DNA をナノミセル型キャリアに内包し、24 時間後にレーザー共焦点顕微鏡にて観察した。

PEG-DET/DNA ナノミセル型キャリアにより遺伝子導入で、24 時間後明らかに細胞質内での DNA の効率よい放出が観察され、本キャリアにより効率よい DNA の細胞内デリバリーが達成されていることが確認された。これは同様の効率的細胞内遺伝子デリバリーが可能なポリエチレンジアミンの結果と相関するものであり、本キャリアによっても、細胞内に取り込まれた後、効率よいエンドソーム脱出の起こっていることが示唆された。

3) 遺伝子発現の持続性評価

ナノミセル型キャリアでは非常に低毒性で細胞へ遺伝子導入することが可能のため、細胞の正常機能を損なうことなく、導入遺伝子を機能させることが可能となる。骨芽細胞への分化誘導に働く転写因子遺伝子 (Runx2) を導入し、骨芽細胞特異的な分化マーカーであるオステオカルシン発現によって評価すると、ナノミセル型キャリアでは、効率的な分化誘導が観察された。興味深い点として、ポリエチレンジアミン等ではコントロールとして用いたレポーター遺伝子は同等に発現しているにもかかわらず、分化誘導は観察されにくい場合が多かった。すなわち、遺伝子導入による細胞の機能制御を目的とする場合は、単純にその遺伝子を発現させるのみでなく、低毒性、適切な発現パターンといったキャリア性能が必要となることが示唆された。

また、*in vivo* モデルとして、ヒドロキシアパタイトを主成分とするマトリックス中に包含し、マウス頭頂骨骨欠損モデルに対し適用すると、投与後 4 週で担体周囲に新生骨形成が観察された。同一の条件で GFP 遺伝子を *in vivo* 導

入し、GFP に対する蛍光抗体にて観察すると、担体周囲に明瞭な GFP 発現が観察され、確かに本キャリアによって遺伝子導入の達成されていることが確認された。

D. 考察

本研究では実際の治療に用いることが可能な人工遺伝子ベクター開発を目的とする。そのための要件として、高い遺伝子導入効率とともに、ほとんど細胞毒性を示さないことが不可欠となる。特に生体由来の初代培養株細胞は、市販遺伝子導入試薬を用いる際も細胞毒性の影響を受けやすいことが知られており、毒性の少なさは重要なポイントとなる。

今回評価を行った PEG-DET/DNA ナノミセル型キャリアは、ほとんど細胞への毒性を示すことなく、良好な遺伝子導入を実現しており、臨床応用を視野に入れたキャリアとして非常に有望なシステムといえる。これは例えば細胞分化誘導を行う目的に治療用遺伝子を機能させる際には、非常に重要なポイントとなることである。さらにポリマーの構造、鎖長と最適化することにより、生体組織内での遺伝子発現を時間的、空間的にコントロールすることの出来るインテリジェント化遺伝子デリバリーシステムへの展開が期待される。

E. 結論

新規合成、最適化したブロック共重合体を用いたナノミセル型遺伝子キャリアにより、各種初代培養株細胞および *in vivo* 動物モデルに対する効率よい遺伝子導入が確認された。

F. 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性は皆無である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) N. Nishiyama, Arnida, W. -D. Jang, K. Date, K. Miyata, K. Kataoka, Photochemical enhancement of transgene expression by polymeric micelles incorporating plasmid DNA and dendrimer-based photosensitizer. *J. Drug Target.* in press
- 2) N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W. -D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U. Chung, K. Kataoka, PEG-based biocompatible block cationer with high-buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing