

とによって定量的な軟骨削除を作製することができた。

## E. 結論

運動器骨・軟骨欠損小動物モデル（マウス、ラット）を作成し、長期自然経過を明らかにした。また、大動物関節軟骨欠損モデルの長期の自然経過を明らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。

## F. 健康危険情報

主任研究者が一括して報告。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. FASEB J in press, 2007
2. Kawaguchi H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Matsushita T, Nakamura T, Mizuno K, Nakamura T, Nakamura K. Local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone repair: A dose-escalation prospective trial on patients with osteotomy. J Orthop Res. 2007 Jan 4;25(4):480-487
3. Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Nishimura R, Suzuki S, Anzai M, Chung UI, Sasaki N. Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. J Artif Organs. 2006;9(4):234-40.
4. Kugimiya F, Chikuda H, Kamekura S, Ikeda T, Hoshi K, Ogasawara T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Involvement of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase II in chondrocyte hypertrophy during endochondral ossification. Mod Rheumatol. 2005 Dec;15(6):391-6.
5. Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. Bone. 2007 Jan;40(1):68-74.
6. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. Arthritis Rheum. 2006 Aug;54(8):2462-70.
7. 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. 2006;24(4):307-13.
8. Sakanishi H, Hoshi K, Nakajima S, Akune T, Takeshita K, Yamamoto M, Kawaguchi H, Nakamura K, Seichi A. Vertebral hemangioma compressing the thoracic spinal cord: application of computer-aided navigation and intraoperative spinal sonography for surgery through anterior and posterior approaches. J Orthop Sci. 2006 May;11(3):294-7.
9. Seichi A, Takeshita K, Kawaguchi H, Matsudaira K, Higashikawa A, Ogata N, Nakamura K. Neurologic level diagnosis of cervical stenotic myelopathy. Spine. 2006 May 20;31(12):1338-43.
10. 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, Kawaguchi H. Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. Nat Med. 2006 Jun;12(6):665-70.
11. Yoshimura N, Kinoshita H, Hori 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. *Mod Rheumatol*. 2006;16(1):24-9.
12. Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, Hirabayashi S, Sugimori K, Matsumoto M, Kawaguchi H, Takahashi M, Inoue H, Kimura T, Matsusue Y, Inoue I, Baba H, Nakamura K, Ikegawa S. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum Genet*. 2006 Jul;119(6):611-6.
  13. 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, Kawaguchi H. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem*. 2006 Sep 1;99(1):196-208.
  14. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul;78(1):1-11.
  15. Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI. Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J Bone Miner Metab*. 2006;24(2):95-9.
  16. 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, 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*. 2006 Feb;21(2):219-27.
2. 学会発表
1. 山口雅之、篠田裕介、亀倉暁、緒方直史、中村耕三、川口浩:副甲状腺ホルモン(PTH 1-34)の骨同化作用におけるIGF-I/IRS-1シグナルの関与(優秀ポスター賞受賞). 第22回日本骨代謝学会. 2004. 8. 4-7(大阪国際会議場、大阪).
  2. 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:萌芽の最先端医療-運動器の再生医療-). 2004. 10.21-22(新高輪プリンスホテル、東京).
  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. 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).
  5. 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).
  6. 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).
  7. 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).
8. 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).
  9. 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).
  10. 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).
  11. 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).
  12. 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).
  13. 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).
  14. 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).
  15. 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).
  16. 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).
  17. 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).
  18. Satoru Kamekura, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Hirotaka Chikuda, Ung-il Chung, Zenjiro Maruyama, Toshihisa Komori, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Runx2 contributes to pathogenesis of osteoarthritis through chondrocyte hypertrophy and matrix breakdown in articular cartilage under mechanical stress (Young Investigator Award). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
  19. Fumitaka Kugimiya, Hirotaka Chikuda, Kazuto Hoshi, Toshiyuki Ikeda, Toru

- Ogasawara, Satoru Kamekura, Kozo Nakamura, Kajuro Komeda, Ung-il Chung, and Hiroshi Kawaguchi: Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through attenuation of Sox9 function (Young Investigator Award). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
20. 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).
21. 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).
22. 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).
23. Kawasaki, F. Kugimiya, H. Chikuda, T. Ikeda, T. Saito, F. Yano, K. Nakamura, U. Chung, H. Kawaguchi: cGKII Controls Hypertrophic Differentiation of Chondrocytes through Phosphorylation and Inactivation of GSK-3 $\beta$ . (Young Investigator Award) 28th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2006. 9.15-19 (Philadelphia, Pennsylvania, USA).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
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①

分担研究者 鄭 雄一 東京大学大学院医学系研究科骨軟骨再生医療 助教授

研究要旨

- 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

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

B. 研究方法

- A) 骨・軟骨の分化増殖に異常を来たす疾患の原因遺伝子の解析（必要因子の検索）に関しては、自然発症の低身長ラットであるKMIラットに着目して、その異常を候補遺伝子解析の手法で検討した。その原因遺伝子が、cGKIIであることを同定した。ノックアウトマウスを解析し、骨・軟骨分化必須遺伝子遺伝子との相互作用を調べた。そしてヒトにおける低身長の原因である可能性を検索した。
- B) 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす遺伝子の発現ベクター（プラスミド、アデノウイルス、レトロウイルス）の作製とその発現実験については、骨分化に関しては、BMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2シグナルの刺激性あるいは抑制性因子を発現するアデノウイルス及びプラスミドを作製し、軟骨分化に関しては、BMP・IRS・Wnt・TGF- $\beta$ ・Soxシグナルの刺激性ある

いは抑制性因子を発現するアデノウイルス及びプラスミドを作製し、そのmRNA・蛋白発現・蛋白活性を解析した。

- C) 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす遺伝子の過剰発現あるいはノックアウトによる、試験管内及び動物モデルの作製とその解析については、刺激性G蛋白・cGKII・IRS-1・SRC-1・Runx2などの因子の試験管内におけるGain-of-function及びLoss-of-function実験を行うとともに、そのノックアウトマウスを解析した。
- D) 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- $\beta$ ・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。
- E) 皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換については、上記4で最適化されたシグナルをアデノウイ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。
- F) 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。

G) 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 $\beta$ -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。

H) 脱分化した初代軟骨細胞の再分化誘導に十分な液性因子の最適化を行った。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 $\beta$ -エストラジオール, テストステロン) の全ての組み合わせを検討した。

(倫理面への配慮)

DNA組み換え実験、動物実験に関しては、各分担研究者の属する機関の組み換えDNA実験規則および、動物実験実施マニュアルに従って行った。

### C. 研究結果

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

G) 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。

H) BMP2・インスリン・トリヨードサイロニンが脱分化した初代軟骨細胞の再分化に十分な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。特に、CGKII は、骨・軟骨を制御する重要な因子である可能性が高く、その活性を制御することで、骨・軟骨分化誘導をより効率的に調節することができるかもしれない。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た。

### 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

- 論文発表
- Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. FASEB J. in press, 2007
- Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, Amizuka N, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H, Toyama Y, D'Armiento J. Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Mar 23;354(4):846-51.

3. Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Nishimura R, Suzuki S, Anzai M, Chung UI, Sasaki N. Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. *J Artif Organs*. 2006;9(4):234-40.
  4. Kanayama N, Fukushima S, Nishiyama N, Itaka K, Jang WD, Miyata K, Yamasaki Y, Chung UI, Kataoka K. A PEG-based biocompatible block cationomer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells. *ChemMedChem*. 2006 Apr;1(4):439-44.
  5. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2462-70.
  6. Zhao B, Katagiri T, Toyoda H, Takada T, Yanai T, Fukuda T, Chung UI, Koike T, Takaoka K, Kamijo R. Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem*. 2006 Aug 11;281(32):23246-53.
  7. 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, Kawaguchi H. Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):665-70.
  8. 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, Kawaguchi H. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem*. 2006 Sep 1;99(1):196-208.
  9. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul;78(1):1-11.
  10. Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI. Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J Bone Miner Metab*. 2006;24(2):95-9.
  11. Guo J, Chung UI, Yang D, Karsenty G, Bringhurst FR, Kronenberg HM. PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx2-dependent and -independent pathways. *Dev Biol*. 2006 Apr 1;292(1):116-28.
  12. Provot S, Kempf H, Murtaugh LC, Chung UI, Kim DW, Chyung J, Kronenberg HM, Lassar AB. Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Development*. 2006 Feb;133(4):651-62.
  13. 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, 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*. 2006 Feb;21(2):219-27.
2. 学会発表
    1. 小笠原徹、川口浩、中村耕三、鄭雄一、高戸毅、星和人：骨再生医療におけるサイクリン依存性キナーゼ 6(Cdk6)応用の試み：第3回日本再生医療学会総会：千葉県千葉市：2004・3日本再生医療学会雑誌 3suppl: 94, 2004
    2. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、

- 鄭雄一 新規軟骨誘導物質チエノインダゾール誘導体は Sox9 と独立して作用して軟骨分化を促進し肥大分化を抑制する 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P104
3. 大庭伸介、池田敏之、緒方直史、リヒトラアアレックス、小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一 骨形成のための最小十分シグナルの同定と幹細胞を用いない新規骨再生法の開発 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P127
  4. 星和人、亀倉暁、川口浩、鄭雄一、野田政樹、マウス変形性関節症モデルとオステオポンチン遺伝子欠損マウスを用いた変形性関節症の発症機序の解明 第13回代謝性骨疾患研究会：大阪市大阪府：2005・3・19 第13回 代謝性骨疾患研究会 プログラム 抄録集 P16
  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：大阪市大阪府：2005・3・18-19 第18回 日本軟骨代謝学会 プログラム抄録集 P7
  6. 星和人、劉光耀、小笠原徹、高橋嗣明、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩、軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の組み合わせの最適化と相互作用機序の検討：第18回 日本軟骨代謝学会：大阪市大阪府：2005・3・18-19 第18回 日本軟骨代謝学会 プログラム抄録集 P85
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Ohba S., Ikeda T., Kamekura S., Kugimiya F., Yano F., Lichtler AC., Komori T., Ogasawara T., Hoshi K., Nakamura K., Takato T., Kawaguchi H., Chung UI.: Combination of BMP and Runx2 Signalings Constitute the Minimum and Sufficient Unit for Osteogenic Differentiation through Regulation of Cbfb. 26th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Reserch, October 1-5, 2004. Seattle, USA. J Bone Miner Res. 19(suppl 1), s149, 2004.
  13. 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.)
  14. 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.)

15. 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（予定を含む）

1. 特許取得

- 骨再生システム 特願 2005-19812
- 組織癒着防止液及び組織癒着防止方法 特願 2005-168744
- 医療用ゲル形成組成物、その組成物の投与デバイス 特願 2006-09334
- 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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
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②

分担研究者 星 和人 東京大学大学院医学系研究科軟骨再生医療 助教授

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

- ① 骨・軟骨の分化増殖に異常を来たす疾患の原因遺伝子の解析（必要因子の検索）に関しては、自然発症の低身長ラットであるKMIラットに着目して、その異常を候補遺伝子解析の手法で検討した。その原因遺伝子が、cGKIIであることを同定した。ノックアウトマウスを解析し、骨・軟骨分化必須遺伝子遺伝子との相互作用を調べた。そしてヒトにおいての低身長の原因である可能性を検索した。
- ② 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす遺伝子の発現ベクター（プラスミド、アデノウイルス、レトロウイルス）の作製とその発現実験については、骨分化に関しては、BMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2シグナルの刺激性あるいは抑制性因子を発現するアデノウイルス及びプラスミドを作製し、軟骨分化に関しては、BMP・IRS・Wnt・TGF- $\beta$ ・Soxシグナルの刺激性ある

いは抑制性因子を発現するアデノウイルス及びプラスミドを作製し、そのmRNA・蛋白発現・蛋白活性を解析した。

- ③ 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす遺伝子の過剰発現あるいはノックアウトによる、試験管内及び動物モデルの作製とその解析については、刺激性G蛋白・cGKII・IRS-1・SRC-1・Runx2などの因子の試験管内におけるGain-of-function及びLoss-of-function実験を行うとともに、そのノックアウトマウスを解析した。
- ④ 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- $\beta$ ・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。
- ⑤ 皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換については、上記4で最適化されたシグナルをアデノウイ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。
- ⑥ 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。

⑦ 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 $\beta$ -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。

⑧ 脱分化した初代軟骨細胞の再分化誘導に十分な液性因子の最適化を行った。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 $\beta$ -エストラジオール, テストステロン) の全ての組み合わせを検討した。

(倫理面への配慮)

DNA組み換え実験、動物実験に関しては、各分担研究者の属する機関の組み換えDNA実験規則および、動物実験実施マニュアルに従って行った。

#### C. 研究結果

- ① KMI ラットの低身長の原因遺伝子が、cGKIIであることを同定した。
- ② BMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2 シグナルの刺激性あるいは抑制性因子を発現するベクターの作製に成功し、その発現を確認した。
- ③ 刺激性 G 蛋白・cGKII・IRS-1・SRC-1・Runx2 が、正常な骨・軟骨の分化増殖に必須の因子であることを明らかにした。
- ④ 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。
- ⑤ 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。
- ⑥ 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。

⑦ 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。

⑧ BMP2・インスリン・トリヨードサイロニンが脱分化した初代軟骨細胞の再分化に十分な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
  1. Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone*. 2007 Jan;40(1):68-74.
  2. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2462-70.
  3. Sakanishi H, Hoshi K, Nakajima S, Akune T, Takeshita K, Yamamoto M, Kawaguchi H, Nakamura K, Seichi A. Vertebral hemangioma compressing the thoracic spinal cord: application of computer-aided

- navigation and intraoperative spinal sonography for surgery through anterior and posterior approaches. *J Orthop Sci.* 2006 May;11(3):294-7.
4. 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, Kawaguchi H. Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nat Med.* 2006 Jun;12(6):665-70.
  5. 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, Kawaguchi H. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem.* 2006 Sep 1;99(1):196-208.
  6. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A.* 2006 Jul;78(1):1-11.
  7. 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, 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.* 2006 Feb;21(2):219-27.
2. 学会発表
  1. 小笠原徹、川口浩、中村耕三、鄭雄一、高戸毅 星和人：骨再生医療におけるサイクリン依存性キナーゼ 6(Cdk6)応用の試み：第3回日本再生医療学会総会：千葉県千葉市：2004.3 日本再生医療学会雑誌 3suppl: 94, 2004
  2. 星和人、小笠原徹、劉光耀、高橋嗣明、山岡尚世、川口浩、鄭雄一、朝戸裕貴、中村耕三、高戸毅：ヒト耳介軟骨由来細胞による再生軟骨作製の試み：第3回日本再生医療学会総会：千葉県千葉市：2004.3 日本再生医療学会雑誌 3suppl: 96, 2004
  3. 劉光耀、小笠原徹、岸本淳司、高橋嗣明、鄭雄一、川口浩、朝戸裕貴、高戸毅、中村耕三、星和人：軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の最適化：第7回日本組織工学会：東京都千代田区：2004.7 プログラム抄録集 105
  4. 高橋嗣明、小笠原徹、鄭雄一、川口浩、朝戸裕貴、内沼栄樹、高戸毅、星和人 軟骨細胞の増殖・分化を誘導する液性因子の組み合わせの最適化 第13回日本形成外科学会基礎学術集会 千葉県浦安市 日本
  5. 星和人、劉光耀、小笠原徹、浅輪幸世、鄭雄一、川口浩、中村耕三、高戸毅、軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の検索と作用機序の解明 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P104
  6. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一 新規軟骨誘導物質チエノインダゾール誘導体は Sox9 と独立して作用して軟骨分化を促進し肥大分化を抑制する 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P104
  7. 山岡尚世、小笠原徹、朝戸裕貴、鄭雄一、高戸毅、星和人 各種足場素材を用いたインプラント型再生軟骨作製の試み 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P131
  8. 大庭伸介、池田敏之、緒方直史、リヒトラアレックス、小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一 骨形成のための最小十分シグナルの同定と幹細胞を用いない新規骨再生法の開発 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪

- 府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005, P127
9. 星和人、亀倉暁、川口浩、鄭雄一、野田政樹、マウス変形性関節症モデルとオステオポンチン遺伝子欠損マウスを用いた変形性関節症の発症機序の解明 第13回代謝性骨疾患研究会：大阪市大阪府：2005・3・19 第13回 代謝性骨疾患研究会 プログラム 抄録集 P16
  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の発症に重要である—新規 OA誘発モデルを用いた Runx2ヘテロ欠損マウスの解析—：第18回 日本軟骨代謝学会：大阪市大阪府：2005・3・18-19 第18回 日本軟骨代謝学会 プログラム抄録集 P7
  11. 星和人、劉光耀、小笠原徹、高橋嗣明、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩、軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の組み合わせの最適化と相互作用機序の検討：第18回 日本軟骨代謝学会：大阪市大阪府：2005・3・18-19 第18回 日本軟骨代謝学会 プログラム抄録集 P85
  12. 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。
  13. 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- $\beta$  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。
  14. 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。
  15. 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。
  16. 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。
  17. 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。
  18. 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。
  19. 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。
  20. 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。
  21. 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. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the ASBMR, September 23-27, 2005, USA.
  22. 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（予定を含む）

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 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
Kawaguchi H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Matsushita T, Nakamura T, Mizuno K, Nakamura T, Nakamura K.	Local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone repair: A dose-escalation prospective trial on patients with osteotomy.	J Orthop Res	5(4)	480-487	2007
Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI.	Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor	FASEB J	in press		
Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Nishimura R, Suzuki S, Anzai M, Chung UI, Sasaki N.	Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer.	J Artif Organs	9(4)	234-40	2006
Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H.	Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability.	Arthritis Rheum	54(8)	2462-70	2006
Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI.	Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis.	J Bone Miner Metab.	24(2)	95-9	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, Kawaguchi H.	Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification.	Nat Med	12(6)	665-7	2006
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, Kawaguchi H.	Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways.	J Cell Biochem.	99(1)	196-20	2006
Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K.	Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials.	J Biomed Mater Res A.	78(1)	1-11	2006
Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, Amizuka N, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H, Toyama Y, D'Armiento J.	Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice.	Biochem Biophys Res Commun	in press		



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, 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(2)	219-27	2006
Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K, Asashima M, Okochi H.	Isolation of Murine Hair-Inducing Cells Using the Cell Surface Marker Prominin-1/CD133.	J Invest Dermatol	in press		
Nishiyama N, Arnida, Jang WD, Date K, Miyata K, Kataoka K.	Photochemical enhancement of transgene expression by polymeric micelles incorporating plasmid DNA and dendrimer-based photosensitizer.	J Drug Target	14(6)	413-24	2006
Arnida, Nishiyama N, Kanayama N, Jang WD, Yamasaki Y, Kataoka K.	PEGylated gene nanocarriers based on block cationomers bearing ethylenediamine repeating units directed to remarkable enhancement of photochemical transfection.	J Control Release	115(2)	208-15	2006
Kanayama N, Fukushima S, Nishiyama N, Itaka K, Jang WD, Miyata K, Yamasaki Y, Chung UI, Kataoka K.	A PEG-based biocompatible block cationomer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells.	ChemMedChe m.	1(4)	439-44	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kano MR, Bae Y, Iwata C, Morishita Y, Yashiro M, Oka M, Fujii T, Komuro A, Kiyono K, Kaminishi M, Hirakawa K, Ouchi Y, Nishiyama N, Kataoka K, Miyazono K.	Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF- $\beta$ signaling.	Proc Natl Acad Sci U S A.	in press		
Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, S. Sano, T. Okano, S. Kitamura H. Mori	Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction	Nature Medicine	12(4)	459-465	2006
D. Murakami, M. Yamato, K. Nishida, T. Ohki, R. Takagi, J. Yang, H. Namiki, T. Okano	The effect of micropores in the surface of temperature-responsive culture inserts on the fabrication of transplantable canine oral mucosal epithelial cell sheets	Biomaterials	27	5518-5523	2006
T. Shimizu, H. Sekine, J. Yang, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, E. Kobayashi T. Okano	Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues	FASEB J	20(6)	708-710	2006

# Local Application of Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-2 on Bone Repair: A Dose–Escalation Prospective Trial on Patients with Osteotomy

Hiroshi Kawaguchi,<sup>1</sup> Seiya Jingushi,<sup>2</sup> Toshihiro Izumi,<sup>3</sup> Masao Fukunaga,<sup>4</sup> Takashi Matsushita,<sup>5</sup> Takashi Nakamura,<sup>6</sup> Kosaku Mizuno,<sup>7</sup> Toshitaka Nakamura,<sup>8</sup> Kozo Nakamura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sensory & Motor System Medicine, University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo, Tokyo 113-8655, Japan

<sup>2</sup>Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

<sup>3</sup>Saihaku Hospital, Tottori 683-0323, Japan

<sup>4</sup>Kawasaki Medical School, Okayama 701-0192, Japan

<sup>5</sup>Teikyo University, Tokyo 173-8606, Japan

<sup>6</sup>Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>7</sup>Kobe Rosai Hospital, Hyogo 651-0053, Japan

<sup>8</sup>University of Occupational and Environmental Health, Fukuoka 807-8555, Japan

Received 28 December 2005; accepted 4 August 2006

Published online 4 January 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jor.20315

**ABSTRACT:** Based on preclinical evidence in animal models, the present study examined the clinical efficacy and safety of recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) to accelerate bone repair in a dose-escalation prospective trial. One of three dosages (200, 400 or 800 µg) of rhFGF-2 in a biodegradable gelatin hydrogel was injected during surgery into the osteotomy site of 59 knee osteoarthritis patients undergoing high tibial osteotomy, and 57 of them were monitored for 16 weeks. The rhFGF-2 dose dependently increased the percentage of patients with radiographic bone union, and decreased the average time needed for such union. The percentages of patients with an absence of pain and full-weight bearing were also greater in the higher dosage groups than in the low dosage group, especially in the clinically critical periods 6, 8, and 10 weeks. Neither blood chemistries nor clinical adverse events were associated with the rhFGF-2 dosages. We therefore conclude that the rhFGF-2 in gelatin hydrogel dose dependently accelerated radiographic bone union of a surgical osteotomy with a safety profile at least at the dosages used, suggesting the clinical efficacy of this agent for bone repair. © 2007 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 25:480–487, 2007

**Keywords:** fibroblast growth factor; fracture; bone; human

## INTRODUCTION

Development of synthetic materials with osteogenic properties is a major goal of the orthopedic research field. Because growth factors are expressed during various phases of bone repair, there has been considerable interest in their use as therapeutic agents to enhance the repair in accordance with the recent advent of their recombinant proteins.<sup>1</sup> Fibroblast growth factors (FGFs) are a family of 23 structurally related polypeptides that are char-

acterized by their affinity for the glycosaminoglycan heparin-binding sites on cells, and are known to play a critical role in angiogenesis and mesenchymal cell mitogenesis.<sup>2</sup> The most abundant FGFs in normal adult tissue are fibroblast growth factor-1 (FGF-1 or acidic FGF) and FGF-2 (basic FGF), both of which have been identified during the early stages of bone repair, although FGF-2 is a more potent mitogen than FGF-1.<sup>3</sup> In skeletal tissues, FGF-2 is accumulated in bone matrix and acts as an autocrine/paracrine factor.<sup>4</sup> Several genetic diseases with abnormalities in bone and cartilage formation, such as achondroplasia and thanatophoric dysplasia type II, have been shown to be due to mutations of genes for FGFs or their receptors,<sup>5</sup> suggesting the importance of FGFs in bone and

Correspondence to: Hiroshi Kawaguchi (Telephone: (+81)-33815-5411 (ext. 33376); Fax: (+81)-33818-4082; E-mail: kawaguchi-ort@h.u-tokyo.ac.jp)

© 2007 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.

cartilage formation. We and others have reported the anabolic effect of local and systemic administrations of FGF-2 on bone formation using several animal models including nonhuman primates.<sup>6–15</sup> A single local application of FGF-2 facilitated the healing of bone fracture and segmental bone defect in normal and diabetic rats, rabbits, dogs, and monkeys;<sup>6–12</sup> stimulated bone formation in callosities bone lengthening in rabbits;<sup>13</sup> and increased bone mass intraosseously in normal and ovariectomized rats and rabbits.<sup>14</sup> In addition, a daily systemic administration of FGF-2 facilitated endosteal bone formation.<sup>15</sup> Regarding the delivery system for clinical use, previous animal studies have revealed that FGF-2 exerted the most potent anabolic activity when a synthetic bioabsorbable hydrogel prepared through glutaraldehyde crosslinking of gelatin was used as the carrier.<sup>11,16,17</sup> Based on these preclinical studies, the present study for the first time evaluated the efficacy and safety of the use of recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) in the biodegradable gelatin hydrogel for bone repair in a clinical dose-escalation trial.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

rhFGF-2 was provided by Kaken Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Biodegradable gelatin hydrogel was prepared through the glutaraldehyde crosslinking of acidic gelatin that was purified from natural bovine bone, as reported previously.<sup>16,17</sup>

### Study Design

The present study was designed with a reasonable sample size as the first exploratory trial that examined the effects of rhFGF-2 administration in humans with safety and accuracy. Between November 2000 and March 2004, 59 patients (40–74 years old) with osteoarthritis in the medial compartment of the knee, who were planning to undergo closing wedge high tibial osteotomy, were enrolled for this dose-escalation trial at 16 medical centers and hospitals in Japan. Exclusion criteria included use of medications that were known to affect bone and cartilage metabolism (e.g., bisphosphonates, vitamin D derivatives, calcitonin, vitamin K<sub>2</sub>, ipriflavone, estrogen, androgen, calcium supplement, corticosteroids), osteoporosis, diabetes, malignant tumor, and prior surgery on bone or joint. Pain medications were not restricted, and all patients used nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) before or during the observation period, although the duration was not significantly different among the groups. After approval of the protocol by the Institutional Review Boards (IRB) at all participating institutions and after the patients had provided written

informed consent, patients were assigned in order of enrollment to one of three investigational groups that received a total dosage of 200, 400, or 800 µg of rhFGF-2 in a biodegradable gelatin hydrogel carrier (the total reconstituted volume was 1 mL). The rhFGF-2 dosages were determined based on previous preclinical results of osteotomy experiments on rats, rabbits, dogs, and monkeys<sup>7–9,12</sup> through normalizing by the cross section area of the bones. Safety of a dosage was assessed and confirmed before proceeding to a higher trial dosage. For the surgery, through an anterior approach a closing wedge osteotomy was performed, aiming at 164–170° of postoperative femorotibial angle (FTA), with fixations by an external fixator, an internal plate or an internal staple, depending on the institution. Following wound irrigation and hemostasis, the rhFGF-2 hydrogel was injected into the osteotomy site just prior to the soft-tissue closure. A drain without suctioning was placed as far as possible from the osteotomy to avoid the potential consequences on the bioavailability of the agent.

### Radiographic Assessment

Standard X-ray pictures of the anteroposterior and lateral projections were taken immediately after the surgery and at least every 2 weeks thereafter up to 16 weeks postoperatively, even if radiographic bone union was achieved at earlier time points. A panel of two orthopedic surgeons and one musculoskeletal radiologist, blinded to patient data including treatment and time following the surgery, independently assessed the presence or absence of bone union. Radiographic bone union was defined as the existence of apparent bridging by bony beam across the osteotomy gap on anteroposterior and lateral projections in patients with external and internal staple fixations, and on anteroposterior projection in those with internal plate fixation.

### Clinical Assessment

Clinical assessment included the presence of pain at the osteotomy site and the ability for full weight-bearing on the operated leg. Although neither NSAIDs nor analgesics were restricted during the observation period, pain free was defined as no pain at the osteotomy site during daily activities without the pain medications. From 6 weeks after surgery, as much weight bearing as possible was allowed unless the patient felt pain while walking. In addition, clinical healing was defined as both the radiographic bone union and the absence of pain at the osteotomy site. These criteria were evaluated every 2 weeks up to 16 weeks, even if there was no clinical problem at earlier time points.

### Blood Chemistries

The serum calcium and phosphate levels were measured by orthocresolphthalein complexone and direct molybdc method, respectively (SRL Inc., Tokyo, Japan), preoperatively, and 2 and 4 weeks postoperatively. The calcitonin and osteocalcin levels were measured by