

G. 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（特許出願中）

変形性関節症の治療・予防法の開発（1）：外磁場発生装置を利用した軟骨修復法

分担研究者 越智光夫（広島大学大学院医歯薬学総合研究科整形外科・教授）

研究要旨：関節軟骨はその解剖学的特徴より、自己修復能に著しく乏しい組織である。我々はより低侵襲で効率的な軟骨再生を目指し、組織幹細胞に磁性体を導入し、体外から磁力をかけることにより、幹細胞を軟骨欠損部に効率的に集積させ、軟骨修復を図る方法に着目した。細胞源としては、最も臨床に近いと思われる間葉系幹細胞（MSC）を用いた。磁気標識の方法としては、MRIの造影剤として用いられている Ferumoxides を培養液に加える方法を採用した。ヒトの軟骨修復を目的とした外磁場発生装置を作成し、in vitro, in vivo の細胞集積実験を行った。in vitro, in vivo 実験において磁気標識した幹細胞は、目的の部位に集積させることが可能であった。また骨軟骨欠損を作成した関節内で行うことも可能であった。本法は全く新しい低侵襲な Cell Delivery System であり、今後の臨床応用が期待される。

A. 研究目的

近年、失われた組織や臓器を自身の細胞を用いて再生させようとする再生医療の研究や臨床応用がすすんでおり、適切な移植細胞と細胞増殖の足場である scaffold を使用し、組織工学的手法を用いて作成した組織移植による再生医療が注目されている。しかし、生体外で再構築された組織を移植する治療法は、その移植方法に問題があり、特に関節内に移植する場合には、関節切開を要する侵襲の大きい手術になる傾向がある。一方、細胞の単独移植は関節内注入が可能で、低侵襲であるが、大量の細胞の関節内注入は癒痕組織や遊離体形成の原因となり、少量の細胞を効果的に損傷部に集積させる方法の開発が求められている。

我々は磁性体で幹細胞を標識し、独自に開発した外磁場発生装置を使用して体外から磁場を作用させることにより、幹細胞を目的の部位に効果的に集積させる方法（磁力を使用した Cell Delivery System）を考案し、関節内でこのシステムを実現し、損傷した関節軟骨を修復することを試みている。今回は我々が開発している磁場を利用した Cell Delivery System について報告する。

B. 研究方法

（in vitro 実験）前十字靭帯再建術中に採取した骨髓液を培養皿上で培養し、接着細胞である骨髄間葉系幹細胞（MSC）を得た。MRI の造影剤である Ferumoxides ($(\text{Fe}_2\text{O}_3)_m(\text{FeO})_n$) を MSC の培養液中に添加し、一晩培養することにより磁気標識した MSC を作成した。我々が独自に開発した外磁場発生装置の影響下で、リン酸緩衝

液を満たしたフラスコ内に磁気標識した MSC を注入し、磁場の方向に誘導できるかを検討した。コントロール群は磁力をかけない群とした。

（in vivo 実験）2.5-3.0kg の日本白色家兔の膝蓋骨に骨軟骨欠損を作成し、関節外から膝蓋骨の方向に磁力をかけた状態で、関節内に磁気標識したヒト MSC を注入した後、外磁場を 4 時間照射した。これらの膝関節の膝蓋骨及びその周辺組織について肉眼所見と組織学的所見を検討した。コントロール群は磁力をかけない群とした。

（倫理面への配慮）

本基礎研究は広島大学動物実験施設の基準に従い行い、動物愛護に配慮した。

C. 結果

（In vitro 実験）磁気標識した MSC はリン酸緩衝液中で磁場の方向に誘導することが可能であり、磁場を作用させた方向の側壁に集積した。コントロール群では磁気標識した MSC は重力の影響を受け、垂直に落下した。

（in vivo 実験）実験群では、肉眼的に骨軟骨欠損部に磁気標識した MSC が集積していた。

また組織学的にも磁気標識した MSC の集積が確認でき、この細胞は鉄染色で陽性であった。コントロール群では、骨軟骨欠損部への磁気標識した MSC の集積は認められなかった。

D. 考察

MSC は骨髓穿刺液から容易に分離・培養することが可能で、自己の細胞を用いるため免疫拒絶反応が少なく、胚性幹（ES）細胞のように生殖細胞を扱わないため倫理的問題が少ない。また

増殖能が高く、体外で大量の細胞を得ることが可能で、遺伝子操作もしやすいといった多くの利点を有している。これらの利点から組織再生の細胞源として非常に有用な細胞であり、現在、臨床応用されている。本研究結果から磁気標識した MSC と外磁場による新たな cell delivery system の有効性が示された。本システムは細胞採取が簡単であり、手術時も関節切開を必要とせず、非常に低侵襲で繰り返して行うことが出来る。また、磁気標識の方法が簡便で、関節以外の組織でも、損傷した組織の再生に対して有用と考えられる。実際に永久磁石を使用し、ラットの脊髄腔内で磁気標識した幹細胞を、目的とした脊髄レベルに集積させることを証明した当科の西田らの報告もある。我々の磁場を利用した Cell Delivery System は、さらに心血管系や悪性腫瘍の治療にも応用可能と考えられ、今後の発展が非常に期待される。

E. 結論

磁気標識した骨髄間葉系幹細胞と外磁場発生装置を用いた新しい Cell Delivery System の有効性を報告した。本法は低侵襲で反復治療が可能であり、今後の再生医療における新機軸となりうるものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Koji Nishida, Mitsuo Ochi, et. al.
Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord through cerebrospinal fluid. *Neuroreport* vol. 17 No12 21 (8) 1269-1272, 2006.

Shinobu Yanada, Mitsuo Ochi, Nobuo Adachi, et. al. Effects of CD44 antibody- or RGDS peptide-immobilized magnetic beads on cell proliferation and chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. vol. 77 No4 773-784, 2006.

2. 学会発表

(招待講演)

Mitsuo OCHI
Tissue-engineering Orthopaedic Surgery.
3rd International Symposium for Orthopaedic Sports Medicine.
2006. 5. 6, Taipei, Taiwan.

(招待講演)

Mitsuo OCHI
Regeneration and transplantation of articular cartilage.
FIMS World Congress of Sports Medicine 2006. 2006. 6. 16, Beijing, China.

(招待講演)

Mitsuo OCHI
Tissue-engineering in Orthopaedic Surgery.
Update in Knee surgery.
2006. 9. 8, Heidelberg, Germany.

(招待講演)

Mitsuo OCHI
Tissue Engineering in Orthopaedic Surgery-Present Status and Future Direction.
4th Congress of Asia-Pacific Knee Society.
2006. 9. 23, Seoul, Korea.

(招待講演)

Mitsuo OCHI
Emerging technology in cartilage repair.
4th Meeting of the European Federation of National Associations of Orthopaedic Sports Traumatology.
2006. 9. 29, Pavia, Italy.

(招待講演)

越智光夫
教育研修講演 軟骨の再生医療 -現状と未来-
第 79 回日本整形外科学会学術総会 2006. 5. 20
横浜市。

(招待講演)

越智光夫
再生医療が先導する運動器治療の近未来
第 15 回日本形成外科学会基礎学術集会
2006. 10. 12 大宮市

(招待講演)

越智光夫
軟骨再生 -世界の動向-
第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会
2006. 10. 20 長崎市

(招待講演・シンポジウム)

関節軟骨再生

越智光夫

第6回日本再生医療学会総会

2007.3.14 横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 : 記載事項なし
2. 実用新案登録 : 記載事項なし
3. その他 : 記載事項なし

変形性関節症の治療・予防法の開発（2）：ナノミセル人工ウイルスの開発

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。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。また転写因子等の遺伝子導入によって、他の遺伝子導入試薬と比べても効率よい骨芽細胞分化誘導が観察された。ナノミセルによる持続的な遺伝子発現プロファイルが関係していることが示唆された。また、リン酸カルシウム担体内包キャリアによる *in vivo* 遺伝子導入にて、マウス頭蓋骨骨欠損モデルにおいて、明瞭な骨新生が確認された。これはごく少量の遺伝子使用量で達成されており、臨床への応用の観点からは重要なポイントと考えられた。

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、これまで設計最適化を進めた新規カチオン性ブロック共重合体を用い、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、*in vitro* および *in vivo* での遺伝子発現の解析を進めるとともに、将来の臨床応用を視野に入れて、転写因子遺伝子導入による骨欠損モデル動物に対する骨再生を行い、治療効果を評価した。

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

新生マウス頭蓋骨より未分化骨芽細胞を採取、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。導入遺伝子はホタル発光リ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導入効率を評価した。

また、遺伝子導入条件における細胞への毒性、生理的機能への影響を評価するため、細胞毒性試験、内在性遺伝子発現評価を行った。

3) ナノミセル型キャリアによる細胞分化誘導

同細胞に対して膜受容体タンパク caALK6 および転写因子 Runx2 を組み合わせる遺伝子導入し、骨芽細胞への分化を誘導した。分化は骨芽細胞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した。

4) リン酸カルシウム担体内包キャリアによる *in vivo* 遺伝子導入

骨親和性材料であるリン酸カルシウム担体に遺伝子内包した本キャリアを含有させた移植用担体を用いて、骨欠損モデル動物に対する骨再生を行った。上記転写因子等を骨欠損部に留置し、骨形成を組織学的に評価した。

C. 研究結果

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、未分化骨芽細胞に対してほとんど毒性を示すことなく遺伝子発現が確認された。リ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 3 日で約 50% の細胞に遺伝子発現が観察された。導入後 6 日で約 20% の細胞に遺伝子発現を認めた。

またこの条件で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による細胞分化誘導

未分化骨芽細胞に対して、膜受容体タンパク caALK6 および転写因子 Runx2 を組み合わせて遺伝子導入すると、良好なオステオカルシン（骨芽細胞分化マーカー）の発現が誘導された。市販の遺伝子導入試薬（FuGENE6 など）を用いても、一定の分化誘導は観察されるが、特に本ナノキャリアを用いた際、高いオステオカルシン誘導が得られた。FuGENE6 では遺伝子導入自体が達成されていないわけではなく、実際ネガティブコントロールとして用いた GFP 遺伝子導入群では、蛍光顕微鏡下の観察で良好な GFP 蛍光の発現が見られる。また、ポリエチレンジアミンでは、GFP 発現はほぼ同等に得られるにもかかわらず、転写因子等導入によるオステオカルシン誘導は全く見られなかった。即ち、外来遺伝子の導入自体は可能であっても、例えばこれを細胞分化制御に用いることを目的とする場合は、さらに次元の異なる別の条件が必要となることが示唆された。

このメカニズムのひとつの可能性として、遺伝子導入後の発現パターン・持続性を評価した。先の caALK6, Runx2 の発現を mRNA レベルで定量 PCR により評価すると、FuGENE6 を用いた導入では初期に高い一過性発現が観察されるものの、その後急激に減少する。一方本キャリアでは、初期の発現は低い、導入 5 日目以降でむしろ FuGENE6 を上回る発現が維持される。同様の傾向はルシフェラーゼ遺伝子を mRNA レベルで評価しても確認され、同時に通常のタンパクレベル（発光定量）の評価では、FuGENE6 でも比較的高いレベルの発現が続き、むしろ本キャリアとの違いは見えにくい。細胞分化は種々の細胞内プロセスを経る現象であり、この遺伝子発現プロファイルの違いが分化誘導能に関係しているものと推測した。

3) リン酸カルシウム担体内包キャリアによる in vivo 遺伝子導入

先の転写因子等遺伝子内包ナノミセル型キャリアを移植用担体に含有させ、マウス頭頂骨に作成した骨欠損部に留置したところ、4 週でコントロールでは見られない明瞭な骨新生が担体周囲を取り囲むように観察された。GFP 遺伝子を同様の手法で導入すると、担体周囲組織に確かに発現

は観察され、転写因子等の遺伝子が担体周囲組織の細胞に導入され、骨芽細胞分化を誘導することにより骨新生が促進されたことが強く示唆された。

D. 考察

本研究では実際の治療に用いることが可能な遺伝子デリバリーシステム開発を目的とする。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。また、長期間にわたる遺伝子発現（核内転写）の持続という特徴も併せ持つことが明らかとなった。分化誘導の結果から、これが細胞に分化誘導因子遺伝子を導入し機能させる際に、重要なポイントとなる可能性が示唆された。

さらに本キャリアにより in vivo での効率よい骨芽細胞分化誘導、骨新生が確認された。本キャリアは周囲を PEG で覆われたミセル構造により生体内環境での安定性に優れることが分かっており、局所における安定かつ持続的な遺伝子導入に寄与したものと考えられる。注目すべきは本システムで使用したプラスミド DNA は 1 マウスあたりわずか 1 μ g 強と非常に少ない（他の報告例ではオーダーの大きく異なる量の DNA を投与しての実験系が多い）。その理由として、骨芽細胞への分化誘導としてシグナル最適化されていることに加えて、ナノキャリアへ内包された DNA の安定性、徐放性が効果を示している可能性が考えられるが、臨床への応用の観点からは重要なポイントと考えられる。

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、初代培養株細胞への低毒性かつ効率よい遺伝子導入が確認された。同キャリアによる機能性遺伝子の導入により、細胞の分化誘導、in vivo 骨再生が可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) J. -S. Park, Y. Akiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Preparation and

- characterization of polyion complex micelles with a novel thermosensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) shell via the complexation of oppositely charged block ionomers. *Langmuir* 23 (1) 138-146 (2007)
- 2) Arnida, N. Nishiyama, N. Kanayama, W. -D. Jang, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated gene nanocarriers based on block cationomers bearing ethylenediamine repeating units directed to remarkable enhancement of photochemical transfection. *J. Control. Release* 115 (2) 208-215 (2006)
 - 3) J. -S. Park, K. Kataoka, Precise control of lower critical solution temperature of thermosensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) via gradient copolymerization with 2-ethyl-2-oxazoline as a hydrophilic comonomer. *Macromolecules* 39 (19) 6622-6630 (2006)
 - 4) 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.* 14 (6) 413-424 (2006)
 - 5) W. -D. Jang, Y. Nakagishi, N. Nishiyama, S. Kawauchi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, K. Kataoka, Polyion complex micelles for photodynamic therapy: incorporation of dendritic photosensitizer excitable at long wavelength relevant to improved tissue-penetrating property. *J. Control. Release* 113 (1) 73-79 (2006)
 - 6) W. Kim, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Development of a fitting model suitable for the isothermal titration calorimetric curve of DNA with cationic ligands. *J. Phys. Chem. B* 110 (22) 10919-10925 (2006)
 - 7) A. Koide, A. Kishimura, K. Osada, W. -D. Jang, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Semipermeable polymer vesicle (PICsome) self-assembled in aqueous medium from a pair of oppositely charged block copolymers: physiologically stable micro-/nanocontainers of water-soluble macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (18) 5988-5989 (2006)
 - 8) M. M. Ali, M. Oishi, F. Nagatsugi, K. Mori, Y. Nagasaki, K. Kataoka, S. Sasaki, Intracellular inducible alkylation system that exhibits antisense effects with greater potency and selectivity than the natural oligonucleotide. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (19) 3136-3140 (2006)
 - 9) M. Oishi, K. Kataoka, Y. Nagasaki, pH-responsive three-layered PEG-ylated polyplex micelle based on a lactosylated ABC triblock copolymer as a targetable and endosome-disruptive nonviral gene vector. *Bioconjugate Chem.* 17 (3) 677-688 (2006)
 - 10) Y. Kakizawa, S. Furukawa, A. Ishii, K. Kataoka, Organic-inorganic hybrid-nanocarrier of siRNA constructing through the self-assembly of calcium phosphate and PEG-based block anionomer. *J. Control. Release* 111 (3) 368-370 (2006)
 - 11) N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W. -D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U. -I. Chung, K. Kataoka, A PEG-based biocompatible block cationomer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells. *ChemMedChem* 1 (4) 439-444 (2006)
2. 学会発表
 - 1) 片岡 一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDS-ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計, 第6回 Cardiovascular Frontier Conference, 六本木フォーラム 東京, 2006. 4. 22 (招待講演)
 - 2) 片岡 一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDS-ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計, 慶應義塾大学 21世紀 COE プログラム 『機能創造ライフコンジュゲートケミストリー』(LCC) 講演会, 慶應義塾大学理工学部矢上キャンパス 横浜, 2006. 5. 10 (招待講演)
 - 3) 片岡 一則, バイオマテリアルが先導するナノ医療-ピンポイント診断・治療のためのナノキャリア設計, 平成 18 年度関東東治会, 東京大学山上会館大会議室, 2006. 5. 12 (招待講演)
 - 4) K. Kataoka, Novel supramolecular assemblies from block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, Quadruple Research Network Opening Symposium -Fusion of

- Biotechnology and Biomaterials-, Hanyang University, Seoul, Korea, 2006.05.19 (招待講演)
- 5) 片岡 一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDS-ピンポイント診断・治療のための高分子ミセル型ナノキャリア設計-, 第54回循環力学研究会, 興和株式会社東京支店11階大ホール, 2006.5.20 (招待講演)
 - 6) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, 11th International Symposium on Colloidal and Molecular Electronics (ELOPTO 2006), Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji City, Kyoto, Japan, 2006.05.23 (招待講演)
 - 7) K. Kataoka, Smart nano-assemblies of block copolymers for gene and nucleic acid delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, 3rd IUPAC-sponsored International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials (MAM-06): Practical Nano-Chemistry and Novel Approaches, Waseda, Tokyo, Japan, 2006.05.29 (基調講演)
 - 8) 片岡 一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療-超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療-, 第8回 阪大医療組織工学フォーラム, 銀杏会館 大阪大学吹田キャンパス 大阪府, 2006.6.8 (招待講演)
 - 9) K. Kataoka, Smart polymeric conjugates and micelles for nucleic acid delivery, 2006 AAPS National Biotechnology Conference Biomaterials for Site Specific Delivery of Oligonucleotides and siRNA, Boston, Massachusetts, USA, 2006.06.20 (招待講演)
 - 10) K. Kataoka, Self-organized nanodevices of block copolymers for gene and drug delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, SONS Conference 2006 (Conference on Self-Organized Nanostructure sponsored by European Science Foundation), San Giuliano Terme, Italy, 2006.07.01 (基調講演)
 - 11) 片岡 一則, DDSのためのドラッグデザイン-主薬とキャリアーの適合性を高めるために-, 第22回日本Drug Delivery System (DDS)学会, 東京国際交流会館 東京, 2006.7.7 (招待講演)
 - 12) K. Kataoka, Smart nano-assemblies of block copolymers for gene and nucleic acid delivery, The 1st FIP-APSTJ Joint Workshop in Gene DeliveryHokkaido University, Sapporo, Japan, 2006.7.10 (基調講演)
 - 13) 片岡 一則, 遺伝子ベクターとして機能するナノ構造デバイスの創製, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ成果報告会, 東京国際フォーラム ホールB7, 2006.7.15 (招待講演)
 - 14) 片岡 一則, 遺伝子・核酸医薬デリバリーのためのインテリジェント・ナノキャリア設計, 第12回日本遺伝子治療学会総会, 日本医科大学 東京, 2006.8.24 (教育講演)
 - 15) K. Kataoka, Novel supramolecular assemblies from block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery, Novel Polymers and Supramolecular Structure, 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society, Austria Center, Vienna, Austria, 2006.07.25 (招待講演)
 - 16) K. Kataoka, Smart nano-assemblies of block copolymers for drug and gene delivery, 7th Asian Symposium on Biomedical Materials (Conjunction with the 10th Anniversary Meeting of the Korean Society for Biomaterials), Jeju Grand Hotel, Jeju Island, Korea, 2006.08.21 (基調講演)
 - 17) 片岡 一則, DDS: その設計と現象解明, ナノビット検討会, 科学技術振興機構研究開発戦略センター 東京, 2006.8.25
 - 18) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, 19th International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC 2006), Istanbul Convention and Exhibition Center (ICEC), Istanbul, Turkey, 2006.08.30 (招待講演)
 - 19) 片岡 一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDS-ピンポイント診断・治療のための高分子ミセル型ナノキャリア設計-, 動脈硬化 Update2006, 東京プリンスホテル 東京, 2006.9.2 (招待講演)
 - 20) 片岡 一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療-超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー-, 第1回次世代バイオナノ研究会, 産業技術総合研究所 四国センター 高松市, 2006.9.4 (招待講演)

- 21) 片岡 一則, 超分子ナノデバイス:最近の話題, 第6回遺伝子・デリバリー研究会夏期セミナー, みのお山荘風の杜 箕面市 大阪, 2006.9.7 (招待講演)
- 22) K. Kataoka, Nanobiotechnology-based pharmaceuticals in the medical frontier ~Supramolecular assembly of block copolymers as nanocarriers for smart drug delivery~, Barré Award Lecture 1, University of Montreal, Montreal, Canada, 2006.09.14 (受賞講演)
- 23) K. Kataoka, Novel supramolecular assemblies from block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery, 12th Samsung International Symposium on Molecular Medicine (SISMM) "Nanomedicine in Cancer", Samsung Medical Center, Seoul, Korea, 2006.09.23 (招待講演)
- 24) K. Kataoka, Novel supramolecular assemblies from block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery, 7th France-Japan DDS Symposium "Recent Trends in Gene and Drug Delivery", Biwako Hotel, Otsu, Japan, 2006.09.25 (招待講演)
- 25) 片岡一則 西山伸宏, ピンポイント診断・治療のためのナノキャリア設計, 第65回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 2006.9.28 (招待講演)
- 26) K. Kataoka, Nanobiotechnology-based pharmaceuticals in the medical frontier ~Supramolecular assembly of block copolymers as nanocarriers for smart drug delivery~, Latta Lecture, University of Nebraska Medical Center, Omaha, USA, 2006.10.06 (Latta 記念講演)
- 27) K. Kataoka, Smart supra-macromolecular assemblies as nanocarriers for gene and drug delivery, 4th International Nanomedicine and Drug Delivery Symposium (NanoDDS' 06), Embassy Suites Hotel Downtown/Old Market, Omaha, Nebraska, USA, 2006.10.08 (招待講演)
- 28) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, IUPAC International Symposium on Advanced Polymers for Emerging Technologies - Commemorating the 30th Anniversary of the Polymer Society of Korea (PSK30), BEXCO, Busan, Korea, 2006.10.13 (招待講演)
- 29) 片岡 一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療ー超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療ー, 第44回日本癌治療学会総会シンポジウム13「細胞内デリバリーの現状と未来」, 京王プラザホテル 東京, 2006.10.19
- 30) 片岡 一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療ー超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療ー, 新拠点形成シンポジウム「次世代先端医療の創出と産学官連携ーナノバイオ標的医療の融合的創出拠点の形成ー」, 岡山コンベンションセンター 岡山市, 2006.10.24 (招待講演)
- 31) 片岡 一則, 高分子が先導するナノバイオテクノロジーーピンポイント診断・治療のための高分子ナノデバイス設計ー, 2006年度若手社員のための高分子基礎講座(高分子学会関東支部), 横浜ゴム湘南セミナーハウス 平塚市, 2006.10.26 (招待講演)
- 32) K. Kataoka, Smart self-assemblies of block copolymers as nanocarriers for drug and gene delivery, AsiaNANO 2006 (Asian Conference on Nanoscience & Nanotechnology), Busan, Korea, 2006.11.02 (招待講演)
- 33) K. Kataoka, Nanobiotechnology in the medical frontier ~Supramolecular assembly of block copolymers as nanocarriers for smart drug delivery~, Seminar, Ajou University, 2006.11.03
- 34) 片岡 一則, 次世代の産業技術創出を担うマイクロ・ナノものづくり拠点の構築を目指して, 仙台国際フォーラム2006 マイクロ・ナノ異分野システム融合国際フォーラム 仙台サンプラザ 宮城県, 2006.11.6 (パネルディスカッション)
- 35) K. Kataoka, Smart supra-macromolecular assemblies as nanocarriers for gene and drug delivery, 4th Sweden-Japan Workshop on Bio-Nanotechnology, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan, 2006.11.13 (招待講演)
- 36) K. Kataoka, Self-organized nanodevices of smart block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery ~Challenge to intracellular nanomedicine~, 13th Yonsei International Symposium for Cancer Research: Emerging Role of Nanomedicine: Opportunities and Challenges, Yonsei University, Seoul, Korea, 2006.11.17 (招待講演)
- 37) 片岡 一則, ピンポイント薬物・遺伝子治療の

- ための超分子ナノデバイス・デザインーナノバイオテクノロジーが先導する未来医療の実現に向けてー, 第67回高分子若手研究会(関西), 大阪大学吹田キャンパス コンベンションセンターM0 ホール 吹田市 大阪府, 2006. 11. 18 (招待講演)
- 38) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療ー超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリーー, かわさきサイエンス&テクノロジーフォーラム 2006, かながわサイエンスパーク KSP ホール 川崎市, 2006. 11. 20 (招待講演)
- 39) K. Kataoka, Self-organized nanodevices of smart block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery ~Challenge to intracellular nanomedicine~, Public Research Lecture, The University of Hong Kong, Hong Kong, China, 2006. 11. 24
- 40) 片岡一則, ピンポイント薬物・遺伝子デリバリーのための高分子ミセル設計ーナノバイオテクノロジーが先導する未来医療の実現に向けてー, オレオナノサイエンスシンポジウム 2006, 東京理科大学森戸記念館第1フォーラム, 2006. 11. 28 (招待講演)
- 41) 片岡一則, 高分子ナノミセルによるがんの標的治療, 文部科学省科学研究費補助金がん特定領域研究「発がん」A01/A02 研究成果合同発表会, せとうち児島ホテル 倉敷市, 2006. 11. 30
- 42) K. Kataoka, Self-organized nanodevices from block copolymers for gene and drug delivery ~Challenge to intracellular nanomedicine~, Biomaterials From 2D to 3D to Larger Than Life Symposium on the Future of Biomaterials to celebrate Buddy Ratner's 60th Birthday "Sheraton Hotel Kaanapali, Maui, Hawaii, 2006. 12. 16 (招待講演)
- 43) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療ー超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療ー, 先端医療開発研究ク
- ラスターシンポジウム(第3回)第2回疾患生命工学センター 第2回22世紀医療センター第4回医工連携研究会 合同シンポジウム, 東大病院中央診療棟 2-7階, 2006. 12. 21
- 44) 片岡一則, DDSが拓く未来医療, 第1回ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会超早期診断と低侵襲医療の実現と一体化 生活の安全・安心を目指して日本科学未来館みらいCANホール 東京都, 2006. 12. 21 (招待講演)
- 45) 片岡一則, セル・セラピーのためのナノテクノロジー材料技術ー超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療ー, 近畿化学協会第3回フロンティア材料セミナー「新しい材料が拓くバイオメディカルの世界」, 大阪科学技術センター 大阪, 2007. 1. 23 (招待講演)
- 46) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療ー高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリーー, エーザイ研究技術交流会講演会, エーザイ株式会社川島工園 各務原市 岐阜, 2007. 1. 29 (招待講演)
- 47) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, International Symposium on Polymer Therapeutics (ISPT-07), Freie University Berlin, Germany, 2007. 2. 20 (基調講演)
- G. 知的所有権の出願・取得状況
- 1) 片岡一則、山崎裕一、高江誓司、核酸内包高分子ミセル複合体、特願2006-54332
- 2) 片岡一則、山崎裕一、アルニダ アンワール、張祐銅、西山伸宏、核酸内包高分子ミセル複合体、特願2006-54327

変形性関節症の診断法の開発（1）：MRIによる画像診断

分担研究者 守屋秀繁（千葉大学大学院医学研究院整形外科・教授）

研究要旨：OAの重症度の画像評価は従来レントゲン検査によっていたが、信頼度が必ずしも高いものではない。そこで、MRIを用いOAの重症度に関連があると考えられる軟骨下骨領域の不整度を測定する新しいソフトウェア（version 2）を開発し、膝機能スコアと不整度の関係を調べた。その結果、両者に高い相関が見られ、臨床応用できるものであることがわかった。また、免疫組織学的検討によりOAでは病変部の軟骨下骨領域にTNF-alpha, COX-2が存在することを示し、軟骨下骨が疼痛発生の場となっている可能性があるという新しい知見を得た。

A. 研究目的

1. MRIを用い、OA膝の重症度を客観的に示すような指数を確立すること。我々が着目したのは大腿骨顆部の輪郭の不整度である。この不整度を専用にプログラミングしたソフトウェアにて自動的に計算し、得られた不整度を表す指数が臨床的な膝スコアと相関を有するかどうか検討すること。

2. また、不整を呈している輪郭は軟骨下骨に相当するが、同部の免疫組織学的検討により、軟骨下骨領域が膝の疼痛と関連するかどうかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 内側型変形性膝関節症の症例の内側コンパートメントのMRI矢状断像より、大腿骨内側顆の輪郭のみを抽出し、ソフトウェアにて輪郭の不整度を測定した。ソフトウェアはプログラミングソフトMatlab 6.5 (Cyber net systems, Tokyo)を用い作成した。計測したのは不整度に関係する3つのパラメータである。また、各症例の膝機能をLysholm score、JOAスコアで評価し、疼痛の強さをVisual Analogue Scale (VAS)で評価した。

2. 人工膝関節置換術時の大腿骨遠位骨切り時に得られる試料に対し、抗COX-2および抗TNF-alpha抗体による免疫染色を施行し、これら疼痛関連分子が軟骨下骨に存在するかどうか調べた。

C. 結果

内側型変形性膝関節症56膝に対し、不整度を表す3つのパラメータとLysholm score、JOAスコア、VASの3つの値はそれぞれ高い相関を有していた。よって不整度はOAの重症度を表す指数として臨床応用可能であると考えられた。また、軟骨下骨に形成された嚢包性病変部にはCOX-2および抗TNF-alphaが陽性であった。嚢包性病変自体は外側コンパートメントにも存在はするが、陽性であ

ったのは内側コンパートメントのみであった。このことは内側の軟骨下骨が疼痛発生の場となっている可能性を示唆し、不整度を測定する意義の病理学的な裏づけとなるものである。

D. 考察

OAの重症度の客観的な評価法としてはレントゲン検査が汎用されており、世界的なスタンダードとなっているが、様々な重症度を有する患者群を肉眼的に4ないし5段階に分類する方法は第一に再現性において問題がある。第二にレントゲンで末期であるからといって必ずしも膝機能が低いものではないという事実のため、信頼度が高いものとは言えない。疾患の治療には疾患自体の進行度や重症度の評価が必須であるが、現時点ではあまりよい指標がないということになる。我々が本研究で提唱した不整度の計測は測定そのものが半自動的にコンピュータで施行されるものであるため、検者間の差異が生じにくいこと、また、連続指数で患者を評価できるという長所を持つ。併せて病理学的な裏づけもあり、今後の臨床応用が期待できるものである。

E. 結論

OA膝の客観的な重症度評価を可能とするシステムを提唱し確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe A, Wada Y, Obata T, Ueda T, Tamura M, Ikehira H, Moriya H. Delayed Gadolinium-enhanced MR to determine glycosaminoglycan concentration in reparative cartilage after autologous chondrocyte implantation. Radiology 239(1): 201-208, 2006.
- 2) Tsukeoka T, Suzuki M, Ohtsuki C, Sugino A,

- Tsuneizumi Y, Miyagi J, Kuramoto K, Moriya H. Mechanical and histological evaluation of PMMA-based bone cement modified with gamma-methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium acetate. *Biomaterials* 27: 3897-3903, 2006.
- 3) Yamaguchi S, Sasho T, Tsuchiya A, Wada Y, Moriya H. Long term results of anterior cruciate ligament reconstruction with iliotibial tract: 6-, 13-, 24-year longitudinal follow-up. *Knee Surg Traumatol Arthrosc* 14: 1094-1100, 2006.
- 4) Murata R, Ohtori S, Ochiai N, Takahashi N, Saisu T, Moriya H, et al. Extracorporeal shockwaves induce the expression of ATF3 and GAP-43 in rat dorsal root ganglion neurons. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 128: 96-100, 2006.
- 5) 佐粧孝久, 中川晃一, 鈴木昌彦, 田原正道, 落合信靖, 萩野修平, 守屋秀繁, 他. MRIを用いた変形性膝関節症の客観的な重症度評価指数の確立. *日整会誌* 81: 29-35, 2007.
2. 学会発表
- 1) Moriya H. Development of Hi-tech knee II-an original TKA model- 4th Asian Pacific Knee Society. 2006.9.21-23. (Seoul Korea)
- 2) Moriya H., Sasho T. Arthroscopic treatment of medial-type OA knee. 4th Asian Pacific Knee Society. 2006.9.21-23. (Seoul, Korea)
- 3) Ogino, S; Sasho, T; Suzuki, M; Nakagawa K; Ochiai, N; Wada Y, Moriya, H. Origin of osteoarthritic knee pain : immunohistochemical analysis of subchondral bone -second report- Orthopaedic Research Society. 2007.2.11-14 (San Diego, USA)
- 4) Sasho T, Ochiai N, Wada Y, Tahara M, Iwasaki J, Yamaguchi S, Moriya H. New computer software to assess severity of medial-type osteoarthritis of knee on MRI. World Congress on Osteoarthritis. 2006.12.7-10 (Prague, Czech Republic)
- 5) Ogino S, Sasho T, Nakagawa K, Ochiai N, Moriya H. Origin of osteoarthritic knee pain: Immunohistochemical analysis of subchondral bone. World Congress on Osteoarthritis. 2006.12.7-10 (Prague, Czech Republic)
- G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

変形性関節症の診断法の開発（2）：生化学マーカーによる診断

分担研究者 山田 治基（藤田保健衛生大学整形外科 教授）

研究要旨：変形性膝関節症(OA)の血清マーカーと本症の病態との関係、および関節破壊進行の予知の可能性について検討した。その結果、初診時血清中 COMP 濃度によって1年後の関節裂隙狭小化の進行が予知可能であることが示され、本マーカーの有用性が明かとなった。

A. 研究目的

OAにおける病態評価は画像を用いて行われることがほとんどであるが、関節構成体代謝を反映するバイオロジカルマーカーの関節液中や血液中濃度の定量化が可能となりOAに対しても有用であることが報告されている。高齢者に有病率の高いOAでは、将来のOA発症や進行予知を検診などでスクリーニング的に行うことによって高リスク患者群を的確に抽出しておき、これらのOA発症・進行予備軍に対して集約的な予防・治療を施行していくことが医療経済的にも必要である。関節構成体の代謝を正確に反映するには罹患関節に最も密接な体液である当該関節液の採取が望ましいが、関節穿刺を必要とするため高侵襲性は否めず、マーカー診断普及の妨げとなっている。本研究の目的は膝OA患者の血清中で測定可能なマーカー分子を定量することによってOA病態評価における有用性を検証し、更にこれらの血清マーカーが臨床的にOAの診断や進行予知などに有用化か否かを検討することである。

B. 研究方法

膝OA患者126例(男性28例、女性98例)を対象とした。血清を採取し主に関節軟骨マトリックスに由来し軟骨代謝を反映するとされるCOMP(cartilage oligomeric matrix protein)、主に滑膜に由来し関節炎を反映するとされるHA(ヒアルロン酸)をそれぞれsandwich ELISA法、inhibition binding protein法にて測定した。また荷重位膝正面の単純X線像を用いてOAの病期(Kellgren and Lawrence grade)を判定するとともに関節裂隙を測定した。膝OAの臨床評価は疼痛VASスコアとLequesne indexを用いて行い、これらの臨床評価と血清マーカー値との関係について統計学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は院内倫理委員会の許可に基づき同意書を患者より得て行った。

C. 結果

COMPは男性 $10.81 \pm 3.6 \mu\text{g/ml}$ 、女性 $12.13 \pm 4.1 \mu\text{g/ml}$ ($P=0.485$)と明らかな性差はなく、さらに肥満度の指標であるbody mass index(BMI)とも相関は認めなかった($P=0.924$)。COMPはX線上の関節裂隙(grade 4除く)とはゆるい負の相関($P=0.233$)を認めた。病期別ではgrade 1群 $11.77 \pm 2.4 \mu\text{g/ml}$ 、grade 2群 $11.79 \pm 3.5 \mu\text{g/ml}$ 、grade 4群 $11.04 \pm 4.1 \mu\text{g/ml}$ に比して、grade 3は $14.08 \pm 4.7 \mu\text{g/ml}$ と高値を示した($P < 0.05$ grade 3 v. s. grade 2, 4)。COMPは疼痛VASスコア($P=0.774$)、Lequesne index($P=0.852$)などの臨床スコアとの間に有意の相関は認めなかった。HAは男性 $68.64 \pm 26.8 \text{ng/ml}$ 、女性 $100.36 \pm 82.4 \text{ng/ml}$ ($P=0.079$)とやや女性に高い傾向を認めた。HAはBMI($P=0.595$)、膝関節裂隙($P=0.978$)とも相関は認めず、病期別でもgrade 1群 $69.67 \pm 24.1 \text{ng/ml}$ 、grade 2群 $83.68 \pm 81.9 \text{ng/ml}$ 、grade 3群 $81.31 \pm 38.6 \text{ng/ml}$ 、grade 4群 $105.77 \pm 78.3 \text{ng/ml}$ と有意な相関は認めなかった。HAは臨床評価との関係では疼痛VASスコア($P=0.066$)、Lequesne index($P=0.014$)と相関を認め、臨床スコアの悪い症例で高値を示した。

D. 考察

血清COMP値はX線病期のgrade 3で最も高値を示し、grade 4で逆に低値を示した。この結果は膝OAでは進行期までは軟骨代謝回転の亢進が存在するが、末期に至っては残存軟骨量の減少や軟骨細胞の代謝回転が低下することを示している。また、血清HA値の上昇は疼痛VASやLequesne indexなどの臨床評価と有意に相関していた。臨床評価と血清COMP値は全く相関せず、血清HA値が有意な相関を認めたという本結果はOAの臨床症状は関節軟骨の状態もさることながら、共存する二次性滑膜炎の影響を強く受けることを示唆している。

E. 結論

OA において血清マーカーが病態の客観的評価法および将来の関節破壊進行予知法として有用なことが示された。ただし血清マーカーを単関節の評価として用いる際には他関節や脊椎椎間関節の影響も十分に考慮する必要がある。関節マーカーは現時点では OA 診断、評価の補助的手段とみなされているが、簡便性においては本法に優る手法はなく有病率の高い OA に対する有用性は高い。単一のマーカーの能力には限界があるが、反映する病態の異なる複数のマーカーを組み合わせることによって OA 発症や進行の予知、病態判断もより正確に可能になると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugimoto H, Yamada H, Terada N, Kanaji A, Kato S, Date H, Ichinose H, Miyazaki K. Intraarticular injection of high molecular weight hyaluronan for osteoarthritis of the knee -Prediction of the effectiveness with biological markers-. *J Rheumatology* . 33:2527-2531, 2006
2. 山田治基, 金治有彦, 加藤慎一, 杉本春夫, 市瀬彦聡, 伊達秀樹, 吉原愛雄, 小林龍生, 森田充浩, 菊地寿幸, 宮崎匡輔. アグリカン由来マーカー. *リウマチ科* vol. 35 (6) :571-577, 2006
3. 山田治基, 金治有彦, 加藤慎一, 伊達秀樹, 市瀬彦聡, 杉本春夫. III実践される治療法 関節軟骨破壊と修復の関節マーカーによる評価. *関節外科* vol. 25:145-150, 2006. 4

4. Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Chwan L S, J K Yeh. Comparative effects of alendronate and alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass and bone mechanical properties in ovariectomized rats. *Exp. Anim.* vol. 55 (4) :357-367, 2006.
5. Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Chwan L S, J K Yeh: Preventive effects of risedronate and calcitriol on cancellous osteopenia in rats treated with high-dose glucocorticoid. *Exp. Anim.* 55 (4) : 349-355, 2006

2. 学会発表

伊達秀樹 山田治基ほか: 変形性膝関節症における血清 COMP 値・HA 値の検討 第19回日本軟骨代謝学会. 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Fukui N, Sandell L J	Anabolic aspects of cartilage repair. Topics in Bone Biology.	Bronner F and Farach-Carson MC	Bone and Osteoarthritis.	Springer	Berlin	2007	(in press)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. M. Ali, M. Oishi, F. Nagatsugi, K. Mori, Y. Nagasaki, K. Kataoka, S. Sasaki	Intracellular inducible alkylation system that exhibits antisense effects with greater potency and selectivity than the natural oligonucleotide.	Angew. Chem. Int. Ed.	45 (19)	3136-3140	2006
Yoshimura N, Kinoshita H, Oka H, Muraki S, Mabuchi A, Kawaguchi H, Nakamura K.	Cumulative Incidence and Changes in Prevalence of Vertebral Fractures in a Rural Japanese Community: A 10-year Follow-up of the Miyama Cohort.	Archives Osteoporos	DOI 10	1007/s11657-006-0007-0	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, and Kawaguchi H:	Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. Runx2 contributes to pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability.	Arthritis Rheum	54	2462-2470	2006
Murata R, Ohtori S, Ochiai N, Takahashi N, Saisu T, Moriya H, et al. ns. : 128: 96-100, 2006.	Extracorporeal shockwaves induce the expression of ATF3 and GAP-43 in rat dorsal root ganglion neuro	Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical	128	96-100	2006
Tsukeoka T, Suzuki M, Ohtsuki C, Sugino A, Tsuneizumi Y, Miyagi J, Kuramoto K, Moriya H.	Mechanical and histological evaluation of PMMA-based bone cement modified with gamma-methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium acetate	Biomaterials	27	3897-3903	2006
N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K.	A PEG-based biocompatible block cationer with high buffering capacity for the con	ChemMedChem	1 (4)	439-444	2006

Itaka, W. -D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U. -I. Chung, K. Kataoka	struction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells				
Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Nakamura K, and Kawaguchi H	Grafting of biocompatible polymer for longevity of artificial hip joints.	Clin Orthop Rel Res	453	58-63	2006
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	15	1521- 1528	2006
Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Chwan L S, J K Yeh	Therapeutic effect of risedronate on cancellous and cortical bone in ovariectomized osteopenic rats: a comparison with the effects of	Exp. Anim	55 (4)	333-342	2006
Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Chwan L S, J K Yeh	Preventive effects of risedronate and calcitriol on cancellous osteopenia in rats treated with high-dose glucocorticoid.	Exp. Anim.	55 (4)	349-355	2006
Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Chwan L S, J K Yeh	Comparative effects of alendronate and alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass and bone mechanical properties in ovariectomized rats.	Exp. Anim.	55 (4)	357-367	2006
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	119	611-616	2006
M. Oishi, K. Kataoka, Y. Nagasaki	pH-responsive three-layered PEG-ylated polyplex micelle based on a lactosylated ABC triblock copolymer as a targetable and endosome-disruptive nonviral gene vector.	Bioconjugat e Chem.	17 (3)	677-688	2006
Fukui N, Ikeda T, Ohnuki T, Tanaka S,	Pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α	J Biol Chem	281	27229- 27241	2006

Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T.	induces bone morphogenetic protein-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation				
Yanada S, Ochi M, Adachi N, Nobuto H, Agung M, Kawamata S.	Effects of CD44 antibody- or RGDS peptide-immobilized magnetic beads on cell proliferation and chondrogenesis of mesenchymal stem cells.	J Biomed Mater Res A.	77	773-784	2006
Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, and Hoshi K	Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials.	J Biomed Mater Res A	78	1-11	2006
Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, Kawaguchi H, and Chung UI	Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis.	J Bone Miner Metab	24	095-99	2006
Hashimoto J, Ohno I, Nakatsuka K, Yoshimura N, Takata S, Zamma M, Yabe H, Abe S, Terada M, Yoh K, Fukunaga M, Cooper C, Morii H, Yoshikawa H	Prevalence and clinical features of Peget's disease of bone in Japan.	J Bone Miner Metab	24	186-190	2006
Oka H, Yoshimura N, Kinoshita H, Saiga A, Kawaguchi H, and 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	24	307-313	2006
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
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	Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways.	J Cell Biochem	99	196-208	2006

UI, Nakamura K, and Kawaguchi H					
Y. Kakizawa, S. Furukawa, A. Ishii, K. Kataoka	Organic-inorganic hybrid-nanocarrier of siRNA constructing through the self-assembly of calcium phosphate and PEG-based block anioner.	J. Control. Release	111 (3)	368-370	2006
Sugimoto H, Yamada H, Terada N, Kanaji A, Kato S, Date H, Ichinose H, Miyazaki K	Intraarticular injection of high molecular weight hyaluronan for osteoarthritis of the knee -Prediction of the effectiveness with biological markers-	J Rheumatology	33	2527-2531	2006
A. Koide, A. Kishimura, K. Osada, W. -D. Jang, Y. Yamasaki, K. Kataoka	Semipermeable polymer vesicle (PICsome) self-assembled in aqueous medium from a pair of oppositely charged block copolymers: physiologically stable micro-/nanocontainers of water-soluble macromolecules.	J. Am. Chem. Soc.	128 (18)	5988-5989	2006
W. -D. Jang, Y. Nakagishi, N. Nishiyama, S. Kawauchi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, K. Kataoka	Polyion complex micelles for photodynamic therapy: incorporation of dendritic photosensitizer excitable at long wavelength relevant to improved tissue-penetrating property	J. Control. Release	113 (1)	73-79	2006
Arnida, N. Nishiyama, N. Kanayama, W. -D. Jang, Y. Yamasaki, K. Kataoka	PEGylated gene nanocarriers based on block cationers bearing ethylenediamine repeating units directed to remarkable enhancement of photochemical transfection.	J. Control. Release	115 (2)	208-215	2006
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	14 (6)	413-424	2006
W. Kim, Y. Yamasaki, K. Kataoka	Development of a fitting model suitable for the isothermal titration calorimetric curve of DNA with cationic ligands.	J. Phys. Chem. B	110 (22)	10919-10925	2006
Yamaguchi S, Sasho T, Tsuchiya A, Wada Y, Moriya H.	Long term results of anterior cruciate ligament reconstruction with iliotibial tract: 6-, 13-, 24-year longitudinal follow-up.	Knee Surg Traumatol Arthrosc	14	1094-1100	2006
J. -S. Park, K. Kataoka	Precise control of lower critical solution temperature of thermosensitive	Macromolecules	39 (19)	6622-6630	2006
Yoshimura N, Kinoshita H, Hori	Risk factors for knee osteoarthritis in Japanese	Mod Rheumatol	16	24-29	2006

N, Nishioka T, Ryujin M, Mantani Y, Miyake M, Takeshita T, Ichinose M, Yoshida M, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Cooper C	men: a case-control study.				
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.	Nature Med	12	665-670	2006
Nishida K, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Hamasaki T, Yanada S, Mochizuki Y and Ochi M	Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord :through cerebrospinal fluid	Neuroreport	17 (12)	1269-1272	2006
Watanabe A, Wada Y, Obata T, Ueda T, Tamura M, Ikehira H, Moriya H.	Delayed Gadolinium-enhanced MR to determine glycosaminoglycan concentration in reparative cartilage after autologous chondrocyte implantation.	Radiology	239 (1)	201-208	2006
Kawaguchi H	Molecular backgrounds of age-related osteoporosis from mouse genetics approaches.	Rev Endocr Metab Disord	7	17-22	2006
吉村典子, 雑賀明宏, 岡敬之	骨粗鬆症と変形性関節症の因果関係に関する研究 (報告)	Osteoporos Jpn	14	25-29	2006
山田治基, 金治有彦, 加藤慎一, 伊達秀樹, 市瀬彦聡, 杉本春夫	Ⅲ実践される治療法 関節軟骨破壊と修復の関節マーカーによる評価	関節外科	25	145-150	2006
大森 豪 他	疫学調査から見た内側型変形性膝関節症の発症要因	日本整形外科学会誌	80	927-932	2006
山田治基, 金治有彦, 加藤慎一, 杉本春夫, 市瀬彦聡, 伊達秀樹, 吉原愛雄, 小林龍生, 森田充浩, 菊地寿幸, 宮崎匡輔	アグリカン由来マーカー	リウマチ科	35 (6)	571-577	2006
大森 豪 他	変形性膝関節症の疫学	臨床整形外科	42	7-14	2006
Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, Amizuka N, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H, Toyama Y, and D' Armiento J	Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice.	Biochem Biophys Res Commun	354	846-851	2007