

- Lauderdale, Florida, USA).
26. 石山典幸、茂呂徹、大江隆史、三浦俊樹、川口浩：生体適合性ポリマーゲルのニワトリ腿損傷モデルにおける癒着防止効果学会名。第50回日本手の外科学会学術集会。2007. 4. 19-20 (山形国際ホテル、山形)。
  27. 星地亜都司、竹下克志、筑田博隆、原慶宏、川口浩、中村耕三：RA 頸椎病変に対するコンピュータ支援インストルメンテーション手術。第36回日本脊椎脊髄病学会学術集会。2007. 4. 26-27 (金沢、石川)。
  28. 星地亜都司、竹下克志、緒方直史、筑田博隆、原慶宏、川口浩、中村耕三：脳性麻痺に合併する頸椎病変に対するインストルメンテーション手術。第36回日本脊椎脊髄病学会学術集会。2007. 4. 26-27 (金沢、石川)。
  29. 竹下克志、星地亜都司、松平浩、小山友里江、筑田博隆、原慶宏、村上元昭、緒方直史、川口浩、中村耕三：効用値からみた新日整会スコア (JOACMEQ) の意義。第36回日本脊椎脊髄病学会学術集会。2007. 4. 26-27 (金沢、石川)。
  30. 延與良夫、吉田宗人、安藤宗治、吉村典子、馬淵昭彦、岡敬之、村木重之、川口浩、中村耕三：腰部脊柱管狭窄の山村地域での発生頻度。第36回日本脊椎脊髄病学会学術集会。2007. 4. 26-27 (金沢、石川)。
  31. 高取吉雄、茂呂徹、山本基、苅田達郎、伊藤英也、京本政之、川口浩、中村耕三：人工股関節の耐久性とMPC処理。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  32. 川口浩：変形性関節症の最近の話題 - OARSI (OsteoArthritis Research Society International) のトピックスから - (instructive Course Lecture)。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  33. 菅哲徳、斎藤琢、中村耕三、川口浩：軟骨分化蛍光リアルタイムモニタリング細胞株 ATDC5-S2RD5 の樹立と新規軟骨分化誘導因子 SNX19 の同定 (優秀演題賞受賞)。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  34. 川崎洋介、釘宮典孝、筑田博隆、斎藤琢、中村耕三、川口浩：cGMP-dependent kinase II (cGKII) は GSK3 $\beta$  のリン酸化を介して軟骨細胞の肥大分化を制御する。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  35. 星和人、中村耕三、川口浩：永久軟骨を再生させるための軟骨細胞増殖・基質産生培養法の開発とその作用機序。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  36. 斎藤琢、中村耕三、川口浩：Hypoxia-inducible factor (HIF) ファミリー分子 HIF2 $\alpha$  と ARNT は 10 型コラーゲンの転写・発現を誘導する。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  37. 篠田裕介、山田高嗣、釘宮典孝、中村耕三、川口浩：転写因子 KLF5 による軟骨内骨化の制御とそのメカニズム。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  38. 岡敬之、吉村典子、村木重之、馬淵昭彦、川口浩、中村耕三：変形性膝関節症 X 線画像自動読影システムの開発とその信頼性。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  39. 村木重之、吉村典子、岡敬之、馬淵昭彦、川口浩、中村耕三：変形性膝関節症および変形性腰椎症の痛みへの影響：The Research on Osteoarthritis Against Disability (ROAD) Study。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  40. 馬淵昭彦、村木重之、岡敬之、吉村典子、徳永勝士、川口浩、中村耕三：日本人における変形性膝関節症感受性遺伝子の関連解析。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  41. 吉村典子、村木重之、岡敬之、馬淵昭彦、川口浩、中村耕三：都市部、山村部における変形性膝関節症および腰椎症の有病率とその地域差：Research on Osteoarthritis Against Disability (ROAD) プロジェクト。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  42. 岡敬之、吉村典子、村木重之、馬淵昭彦、川口浩、中村耕三：変形性膝関節症と生活習慣との関係：ROAD プロジェクト山村部コホートにおける検討。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  43. 石山典幸、茂呂徹、中村耕三、川口浩：術後癒着防止効果を有する生体内解離性ゲル。第51回日本リウマチ学会総会・学術集会。2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜、横浜)。
  44. Kawaguchi H, Kamekura S, Yamada T, Koshizuka Y, Nakamura K: Molecular basis

- of osteoarthritis from mouse genetics approach. 第16回国際リウマチシンポジウム. 2007. 4. 26-29 (パシフィコ横浜, 横浜).
45. 川口浩: マウスジェネティクスからの変形性関節症の分子背景へのアプローチ (シンポジウム: マウスの関節炎モデル). 第54回日本実験動物学会総会. 2007. 5. 23-25 (江戸区民ホール, 東京).
  46. 星地亜都司, 竹下克志, 川口浩, 筑田博隆, 原慶宏, 中村耕三: コンピュータ支援脊椎手術. 第80回日本整形外科学会学術総会. 2007. 5. 24-27 (神戸交際会議場, 神戸).
  47. 吉村典子, 岡敬之, 村木重之, 馬淵昭彦, 川口浩, 中村耕三: 骨粗鬆症と変形性関節症に因果関係は存在するか? - 美山コホート長期追跡調査から -. 第80回日本整形外科学会学術総会. 2007. 5. 24-27 (神戸交際会議場, 神戸).
  48. 延與良夫, 吉田宗人, 川上守, 安藤宗治, 吉村典子, 岡敬之, 村木重之, 馬淵昭彦, 川口浩, 中村耕三: 腰部脊柱管狭窄の山村地域での発生頻度: Research on Osteoarthritis against Disability. 第80回日本整形外科学会学術総会. 2007. 5. 24-27 (神戸交際会議場, 神戸).
  49. 川口浩, 亀倉暁, 山田高嗣, 中村耕三: マウスジェネティクスを用いた変形性関節症の分子メカニズムの解明 (パネルディスカッション: OA研究の現状と治療展望). 第80回日本整形外科学会学術総会. 2007. 5. 24-27 (神戸交際会議場, 神戸).
  50. 竹下克志, 星地亜都司, 田中太郎, 村上元昭, 筑田博隆, 原慶宏, 川口浩, 中村耕三: 頸胸椎疾患における Simple Walking Test (30 m 歩行テスト) の有用性. 第80回日本整形外科学会学術総会. 2007. 5. 24-27 (神戸交際会議場, 神戸).
  51. 村木重之, 吉村典子, 岡敬之, 馬淵昭彦, 山本精三, 鈴木隆雄, 延與良夫, 吉田宗人, 川口浩, 中村耕三: 変形性膝関節症および変形性腰椎症の痛みへの影響: The Research on Osteoarthritis against Disability (ROAD) Study. 第80回日本整形外科学会学術総会. 2007. 5. 24-27 (神戸交際会議場, 神戸).
  52. 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 金野智浩, 京本政之, 山脇昇, 山本基, 苅田達郎, 中村耕三, 川口浩: ポリエチレン表面の MPC グラフト処理による長寿命型人工関節の開発 - 処理密度の制御と耐摩耗効果 -. 第80回日本整形外科学会学術総会. 2007. 5. 24-27 (神戸国際会議場, 神戸).
  53. 川口浩, 河村直洋, 緒方直史, 阿久根徹, 山口雅之, 星和人, 門脇孝, 中村耕三: 糖代謝と骨代謝に関連する Akt シグナル (シンポジウム: 生活習慣病と骨代謝). 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  54. 川口浩, 中村耕三: 変形性関節症研究の現状と限界 (ミニシンポジウム: 変形性関節症 up-to-date). 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  55. 馬淵昭彦, 吉村典子, 岡敬之, 村木重之, 川口浩, 中村耕三: 変形性関節症研究の病因解明・治療標的分子同定のための統合研究: ROAD (Research on Osteoarthritis Against Disability) プロジェクト (ミニシンポジウム: 変形性関節症 up-to-date). 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  56. 松田浩一, 井上耕一, 中村祐輔, 中村耕三, 川口浩: メカニカルストレスに反応して骨量維持に働く新規遺伝子 Znt5 (Zinc transporter 5) の単離と機能解析. (ミニシンポジウム: メカニカルストレスと骨代謝). 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  57. 岡敬之, 村木重之, 馬淵昭彦, 鈴木隆雄, 吉田英世, 山本精三, 川口浩, 中村耕三, 吉村典子: 単純 X 線画像における変形性膝関節症のコンピュータ支援診断システムの開発 - ROAD (research on osteoarthritis against disability) プロジェクト - (学会奨励賞受賞). 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  58. 池田敏之, 川口浩, 斎藤琢, 菅哲徳, 牛田正宏, 中村耕三, 鄭雄一: 新規軟骨分化転写因子 ZFPAC は C/EBP $\beta$  と協調的に作用して軟骨分化を誘導する (優秀演題賞受賞). 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  59. 池田敏之, 川口浩, 斎藤琢, 矢野文子, 菅哲徳, 川崎洋介, 牛田正宏, 平田真, 中村耕三, 鄭雄一: p63 は軟骨の初期分化から後期分化までを統一的に支配するマスター転写因子である. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  60. 大庭伸介, 藤井克則, 宮島剛, 倉持朗, 宮下俊之, 織田弘美, 中村耕三, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: Patched1 機能不全による Hedgehog シグナルの活性化は, Runx2 の DNA 結合・転写活性を競合阻害している抑制型

- Gl $\beta$ 3産生を低下させることによって骨量を増加させる. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
61. 吉村典子, 村木重之, 岡敬之, 馬淵昭彦, 延與良夫, 吉田宗人, 雑賀明宏, 鈴木隆雄, 吉田英世, 石橋英明, 山本精三, 川口浩, 中村耕三: 特性の異なる3地域における変形性膝関節症および変形性腰椎症の有病率の検討: Research on Osteoarthritis Against Disability (ROAD) プロジェクトより. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  62. 村木重之, 岡敬之, 馬淵昭彦, 延與良夫, 吉田宗人, 雑賀明宏, 川口浩, 中村耕三, 吉村典子: 大規模住民コホートにおける変形性膝関節症および変形性腰椎症の危険因子 - ROAD (research on osteoarthritis against disability) プロジェクト -. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  63. 菅哲徳, 池田敏之, 斎藤琢, 牛田正宏, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: 軟骨分化をリアルタイムにモニタリングする細胞株 ATDC5-S2RD5 の樹立と, これを用いた新規軟骨分化誘導因子 sorting nexin 19 (SNX19) の同定. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  64. 牛田正宏, 池田敏之, 斎藤琢, 菅哲徳, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: NF- $\kappa$ Bファミリー分子 RelA は Sox9 の promoter に作用してその発現を誘導する. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  65. 東川晶郎, 斎藤琢, 亀倉暁, 大庭伸介, 池田敏之, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: Runx2 による10型コラーゲンの転写メカニズムの解明 - 変形性関節症を誘導する軟骨細胞肥大化の分子ネットワーク -. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  66. 田宮寛之, 大庭伸介, 斎藤琢, 池田敏之, 崔齋容, 川口浩, 鄭雄一: Runx2 P1 promoter は組織特異性の高い領域と基本的転写領域に分けられ, HIF2A は後者の強力な制御因子である. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  67. 緒方直史, 篠田裕介, 矢野文子, 鄭雄一, 中村耕三, 川口浩: 骨芽細胞における G $\alpha$ q シグナルは骨形成抑制に働き, その阻害により PTH の骨同化作用が増強される. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  68. 平田真, 釘宮典孝, 河村直洋, 大庭伸介, 中村耕三, 川口浩, 鄭雄一: GSK-3 $\beta$  は Runx2 を特定の部位でリン酸化して転写活性を阻害することにより骨芽細胞による骨形成を抑制する. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  69. 太田憲和, 高石官成, 滝戸二郎, 木村徳宏, 岡田保典, 保田尚孝, 川口浩, 戸山芳昭: Osteoprotegerin は内軟骨性骨化の開始点における軟骨吸収を抑制的に制御する. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  70. 吉村典子, 岡敬之, 村木重之, 馬淵昭彦, 川口浩, 中村耕三: 男性骨粗鬆症の累積発生率と内因性ホルモン値との関連. 第25回日本骨代謝学会. 2007. 7. 19-21 (大阪国際会議場, 大阪).
  71. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of degenerative skeletal disorders from mouse genetics approach. 4th Meeting of Bone Biology Forum. 2007. 8. 24-25 (富士教育研修所, 静岡).
  72. 川口浩: 変形性関節症. 第4回 六甲カンファレンス. 2007. 9. 1-2 (六甲山ホテル, 兵庫).
  73. 川口浩: 変形性関節症・脊椎症の病因解明・診断・治療の最前線. 和歌山県医師会医学会整形外科部会講演会. 2007. 9. 27 (アバローム紀ノ国, 和歌山).
  74. 川口浩: 変形性関節症研究の新世紀. 第29回 山形整形外科セミナー. 2007. 10. 3 (ホテルメトロポリタン山形, 山形).
  75. 川口浩: 変形性関節症 up-to-date: その病態解明・診断・治療の最前線 (ランチオンセミナー). 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  76. 河村直洋, 釘宮典孝, 門脇孝, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: 骨芽細胞および破骨細胞における Akt1 シグナルによる骨代謝調節. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  77. 岡敬之, 村木重之, 馬淵昭彦, 吉村典子, 川口浩, 中村耕三: 変形性膝関節症における単純 X 線コンピュータ支援診断システムの開発と各重症度指標の痛みとの相関. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  78. 緒方直史, 篠田裕介, 矢野文子, 鄭雄一, 中村耕三, 川口浩: G $\alpha$ q シグナルは骨芽細胞において骨形成抑制に働き, その阻害に

- よりPTHの骨同化作用が増強される. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡)
79. 平田真, 釘宮典孝, 河村直洋, 中村耕三, 川口浩, 鄭雄一: GSK-3 $\beta$ による骨芽細胞分化の制御とそのメカニズム. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  80. 石山典幸, 茂呂徹, 三浦俊樹, 大江隆史, 中村耕三, 川口浩: 生体内解離性ポリマーゲルによる腱癒着防止効果. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  81. 菅哲徳, 池田敏之, 斎藤琢, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: 関節軟骨再生を目指したWnt9a, GDF5プロモーターの機能解析. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  82. 牛田正宏, 池田敏之, 斎藤琢, 菅哲徳, 中村耕三, 川口浩: NF- $\kappa$ Bファミリー分子RelAはSox9を転写制御する. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  83. 菅哲徳, 池田敏之, 斎藤琢, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: 新規軟骨分化誘導因子SNX19の同定と機能解析. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  84. 東川晶郎, 斎藤琢, 亀倉暁, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: 軟骨細胞肥大分化によって変形性関節症を誘導するRunx2の10型コラーゲンプロモーターに対する応答領域の同定. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  85. 太田憲和, 高石官成, 滝戸二郎, 池上博泰, 川口浩, 戸山芳昭: Osteoprotegerinは内軟骨性骨化の開始点における軟骨吸収を抑制的に制御する. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  86. 位高啓史, 鄭雄一, 川口浩, 中村耕三, 片岡一則: ナノミセル型遺伝子キャリアの再生医療への応用. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  87. 吉村典子, 村木重之, 岡敬之, 馬淵昭彦, 川口浩, 中村耕三: 変形性膝関節症および変形性腰椎症の有病率の検討 - Research on Osteoarthritis Against Disability (ROAD) プロジェクトより -. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡)
  88. 村木重之, 吉村典子, 岡敬之, 馬淵昭彦, 川口浩, 中村耕三: 部位による変形性関節症の危険因子の相違 - ROAD (research on osteoarthritis against disability) プロジェクト -. 第25回日本骨代謝学会. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007. 10. 25-26 (アクトシティ浜松, 静岡).
  89. Hiroshi Kawaguchi: Transcriptional regulation of cartilage degeneration during osteoarthritis. The 2007 International Symposium-Workshop on Advanced Bone and Joint Science (ABJS). 2007. 10. 28-31 (Tokyo Medical & Dental University, Tokyo, Japan).
  90. Hiroshi Kawaguchi: Bone and cartilage regeneration by FGF signaling. The 2007 International Symposium-Workshop on Advanced Bone and Joint Science (ABJS). 2007. 10. 28-31 (Tokyo Medical & Dental University, Tokyo, Japan).
  91. 星和人, 川口浩, 鄭雄一, 高戸毅, 中村耕三: 関節軟骨再生の現状と展望 (シンポジウム: 骨関節老化の基礎と現状). 第9回日本骨粗鬆症学会. 2007. 11. 14-16 (京王プラザホテル, 東京).
  92. 川口浩, 阿久根徹, 緒方直史, 星和人, 篠田裕介, 河村直洋, 山口雅之, 鄭雄一, 門脇孝, 中村耕三: 糖代謝・脂質代謝調節分子による骨代謝調節: マウスジェネティクスからのアプローチ (シンポジウム: 骨粗鬆症と骨関節疾患の遺伝学). 第9回日本骨粗鬆症学会. 2007. 11. 14-16 (京王プラザホテル, 東京).
  93. 田宮寛之, 大庭伸介, 斎藤琢, 池田敏之, 崔齋容, 川口浩, 鄭雄一: Runx2 P1 promoterは組織特異性の高い領域と基本的転写領域に分けられ, HIF2Aは後者の強力な制御因子である (学術奨励賞受賞). 第9回日本骨粗鬆症学会. 2007. 11. 14-16 (京王プラザホテル, 東京).
  94. 吉村典子, 岡敬之, 村木重之, 馬淵昭彦, 川口浩, 中村耕三: 骨粗鬆症の発生率と骨代謝マーカー, 内因性ホルモンとの関連: 漁村コホート10年間の追跡 (優秀演題賞受賞). 第9回日本骨粗鬆症学会. 2007. 11. 14-16 (京王プラザホテル, 東京).
  95. 村木重之, 岡敬之, 馬淵昭彦, 延與良夫, 吉田宗人, 雑賀明宏, 川口浩, 中村耕三, 吉村典子: 膝関節および腰椎における変形性関節症の危険因子の相違 - ROAD

- (research on osteoarthritis against disability)プロジェクト - 第9回日本骨粗鬆症学会, 2007. 11. 14-16 (京王プラザホテル, 東京).
96. 京本政之, 岩崎泰彦, 茂呂徹, 宮路史明, 金野智浩, 川口浩, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦: 長寿命人工関節のためのリン脂質グラフトポリマーによる高潤滑性 Co-Cr-Mo 合金の創製. 第29回日本バイオマテリアル学会. 2007. 11. 26-27 (千里ライフサイエンスセンター, 大阪).
  97. 石山典幸, 茂呂徹, 三浦俊樹, 大江隆史, 伊藤祥三, 金野智浩, 吉河美都奈, 大山但, 中村耕三, 川口浩, 石原一彦: 生体内解離性リン脂質ポリマーハイドロゲルによる組織癒着防止材の開発. 第29回日本バイオマテリアル学会大会. 2007. 11. 26-27 (千里ライフサイエンスセンター, 大阪).
  98. Hiroshi Kawaguchi: Bone and cartilage regeneration by FGF-2 (Luncheon Seminar). TERMIS-AP 2007. 2007. 12. 3-5 (Grand Prince Hotel Akasaka, Tokyo, Japan).
  99. 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 山本基, 苅田達郎, 伊藤英也, 中村耕三, 川口浩: 長寿命型人工股関節の開発—生体適合性ポリマーによるポリエチレンライナーのナノ表面処理— (シンポジウム: 人工股関節の開発課題とバイオメカニクス). 2007. 12. 7-8. 第34回日本臨床バイオメカニクス学会. (早稲田大学国際会議場, 東京).
  100. 京本政之, 茂呂徹, 宮路史明, 上野勝, 橋本雅美, 川口浩, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦: 高密度生体適合性リン脂質ポリマー表面による長寿命型人工関節. 2007. 12. 7-8. 第34回日本臨床バイオメカニクス学会. (早稲田大学国際会議場, 東京).
  101. 川口浩: マウスジェネティクスを用いた変形性関節症の分子メカニズムの解明 (シンポジウム: 骨・軟骨疾患の分子生物学). 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 合同大会 (BMB2007). 2007. 12. 11-15 (パシフィコ横浜, 神奈川).
  102. 川口浩: 変形性関節症研究の新世紀. 群馬県学術講演会. 2007. 12. 15 (マーキュリーホテル, 群馬).
  103. 川口浩: 変形性関節症研究の現状と問題点. 第9回 創薬ビジョンシンポジウム (日本薬学会 薬学研究ビジョン部会). 2008. 1. 24-25 (東京大学鉄門講堂, 東京).
  104. 川口浩: 糖代謝・脂質代謝シグナルによる骨代謝制御. The 6th Annual Meeting of Japan Conference on Bone & Joint Diseases. 2007. 2. 2 (海運クラブ, 東京).
  105. 川口浩: 変形性関節症: その病因解明, 診断, 治療の最前線. 倉敷関節症セミナー. 2008. 2. 7 (倉敷国際ホテル, 岡山).
  106. 高取吉雄, 茂呂徹, 山本基, 苅田達郎, 伊藤英也, 斎藤貴志, 京本政之, 川口浩, 中村耕三: 耐久性に優れた人工股関節の開発 - ポリエチレンライナーの MPC 処理 -. 第38回日本人工関節学会. 2008. 2. 29-3. 1 (沖縄コンベンションセンター, 沖縄).
  107. 斎藤琢, 池田敏之, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: S100A1, S100B は SOX trio の標的分子であり, 軟骨細胞の後期分化を抑制する (第13回日本軟骨代謝学会賞受賞). 第21回日本軟骨代謝学会. 2008. 3. 21-22 (京都テルサ, 京都).
  108. 菅哲徳, 池田敏之, 斎藤琢, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: 関節軟骨再生を目指した WNT9A, GDF5 プロモーターの機能解析. 第21回日本軟骨代謝学会. 2008. 3. 21-22 (京都テルサ, 京都).
  109. 東川晶郎, 斎藤琢, 亀倉暁, 池田敏之, 大庭伸介, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: Runx2 による 10 型コラーゲンの転写メカニズムの解明: 変形性関節症を誘導する軟骨細胞肥大化の分子メカニズム. 第21回日本軟骨代謝学会. 2008. 3. 21-22 (京都テルサ, 京都).
  110. 大島寧, 秋山達, 中村耕三, 川口浩, 田中栄: Bcl-2 family 分子 Bcl-xL および Bnip3 相互作用による軟骨細胞アポトーシス制御. 第21回日本軟骨代謝学会. 2008. 3. 21-22 (京都テルサ, 京都).
  111. 川口浩, 岡敬之, 村木重之, 阿久根徹, 馬淵昭彦, 吉村典子, 中村耕三: 変形性関節症の疫学研究の現状と問題点: ROAD (Research on Osteoarthritis against Disability) プロジェクト (シンポジウム: 変形性膝関節症のマネージメント - 最新の臨床エビデンスとエキスパートオピニオン -). 第81回日本整形外科学会学術総会. 2008. 5. 22-25 (北海道厚生年金会館, 北海道).
  112. 川口浩, 村木重之, 岡敬之, 阿久根徹, 馬淵昭彦, 中村耕三, 吉村典子: 変形性関節症の大規模臨床統合データベースの構築と, これを用いた観察疫学・ゲノム疫学研究 (シンポジウム: 学術プロジェクト課題の研究成果報告). 第81回日本整形外科学会学術

- 総会. 2008. 5. 22-25 (北海道厚生年金会館、北海道).
113. 竹下克志、星地亜都司、緒方直史、筑田博隆、正田修己、川口浩、中村耕三：頸部脊椎症評価質問票(JOACMEQ)の一致妥当性. 第81回日本整形外科学会学術総会. 2008. 5. 22-25 (北海道厚生年金会館、北海道).
114. 延興良夫、吉田宗人、吉村典子、村木重之、岡敬之、馬淵昭彦、中村耕三、川口浩：頸椎症における高位別有病率と頸部痛との関係 - Research on Osteoarthritis against Disabilit (ROAD) プロジェクト -. 第81回日本整形外科学会学術総会. 2008. 5. 22-25 (北海道厚生年金会館、北海道).
115. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、山本基、荻田達郎、伊藤英也、金野智浩、京本政之、山脇昇、中村耕三、川口浩：人工股関節のポリエチレンライナーにMPC処理を加える範囲が摩耗抑制効果に与える影響. 第81回日本整形外科学会学術総会. 2008. 5. 22-25 (北海道厚生年金会館、北海道).

出願日：2007. 2. 5

2. 「生体材料、及びそれを用いた人工関節並びにその製造方法」

出願国：国際出願（出願国未定）

発明者：京本政之、石原一彦、茂呂徹、岩崎泰彦、茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、金野智浩

出願者：日本メディカルマテリアル株式会社、国立大学法人東京大学、

国立大学法人東京医科歯科大学

PCT出願：PCT/ JP2007/ 56235

出願日：2007. 3. 6

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 国内出願

###### 1. 出願番号：特願出願 2007-260191

発明者：京本政之、石原一彦、中村耕三、川口浩、高取吉雄、茂呂徹

発明の名称：生体適合性および低摩擦性部材及びそれを用いた人工関節並びにその製造方法

出願者：日本メディカルマテリアル株式会社、国立大学法人東京大学

出願日：2007年10月3日

###### 2. 特願出願 2007-303389

発明者：茂呂徹、中村耕三、川口浩、石山典幸、石原一彦、金野智浩、科研製薬

発明の名称：組織癒着および関節拘縮防止材

出願者：国立大学法人東京大学、科研製薬

出願日：2007年11月22日

##### 国際出願

###### 1. 「低摩耗性摺動部材及びそれを用いた人工関節」

出願国：国際出願（出願国未定）

発明者：京本政之、茂呂徹、石原一彦、金野智浩、中村耕三、高取吉雄、川口浩、

高玉博朗、近藤誠、山脇昇、二塚健

出願者：日本メディカルマテリアル株式会社、茂呂徹、石原一彦、金野智浩、中村耕三、高取吉雄、川口浩、高玉博朗

PCT出願：PCT/ JP2007/ 51923

## 変形性関節症の標的分子の解明（2）：LCMによるヒトOA軟骨の解析

分担研究者 福井尚志（独）国立病院機構相模原病院臨床研究センター研究部長）

研究要旨：レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクションを用いた前年度までの研究によって変形性関節症に罹患した関節軟骨の変性部では軟骨細胞の基質産生が低下していることが明らかになった。軟骨変性部における基質産生の低下は変形性関節症の進行の要因の一つと考えられるが、その機序は今のところ不明である。今年度はこの点を明らかにする目的でcDNA マイクロアレイとレーザー・キャプチャー・マイクロダイセクションを用いた研究を行い、変性部の軟骨細胞ではIGF-2の発現低下と複数のIGF結合タンパクの発現が亢進しており、またIGF受容体とinsulin receptor substrateの発現が低下していることを見出した。

### A. 研究目的

変形性関節症（OA）では軟骨細胞に機能的な変化が生じて基質産生が変化することが進行の一因と考えられる。前年度までの研究でレーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション

（LCM）を用いてOAに罹患した関節軟骨の基質産生の変化を部位別に詳細に検討した結果、軟骨の肉眼的変性部の上部において軟骨細胞の代謝活性が特に変化し、軟骨基質の産生が低下していることを明らかにした（Fukui, et al. *Arthritis Rheum* 2008）。本年度はこの知見に基き、軟骨変性部で軟骨基質の産生が低下する機序を明らかにするための研究を行った。

### B. 研究方法

研究には人工膝関節置換術の際に得られたOA罹患軟骨を用い、この対照としてOA症例と同等の年齢の剖検例において病的所

見のない膝関節から採取した膝関節軟骨を用いた。

軟骨変性部、非変性部における軟骨細胞の代謝活性の違いを包括的に解析するために両部位における遺伝子発現プロファイルをcDNA マイクロアレイにより解析、比較した。この解析には10例のOA膝関節から脛骨の関節軟骨を採取し、肉眼的変性部と非変性部からそれぞれRNAを採取した。前年度までの研究により軟骨浅層では遺伝子の発現プロファイルが中間層、深層と相当に異なることが明らかになったため、非変性部から得た軟骨では浅層を実体顕微鏡下に取り除いて中間層と深層のみからRNAを抽出した。変性部の軟骨は浅層が既に失われ中間層と深層が直接露出している部位から採取した。得られ

たRNAを用いてAffymetrix社製cDNA マイクロアレイ（U133 Plus 2.0）による解析を行った。マイクロアレイの結果はレーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション（LCM）とreal-time PCRを用いた解析により検証した。

上記の実験の結果を検証するために、OA軟骨から獲られた軟骨細胞を器官と単層培養の2通りの方法で維持し、種々の実験を行った。培養細胞はウシ血清（10%）とアスコルビン酸（25・g/ml）を加えたDMEM/F-12培地を用いて行い、細胞の応答はmRNAの発現レベルの変化によって評価した。

（倫理面への配慮）

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用途、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、個人情報は情報管理者を置いて管理した。

### C. 研究結果

#### 1. cDNA マイクロアレイによる軟骨変性部、非変性部の遺伝子発現の比較

マイクロアレイによる解析の結果、OA軟骨の肉眼的変性部と非変性部の間で発現が2倍以上変化していた遺伝子は合計1811個あった（表1）。このうち軟骨細胞に対して基質産生を亢進させる可能性がある因子15個について遺伝子発現を軟骨変性部と非変性部で比較したところ、変性部で有意に発現が低下している因子として

IGF-2 と TGF- $\beta$ 1 が見出された。

## 2. 培養細胞に対する IGF-2、TGF- $\beta$ 1 の作用

マイクロアレイの解析によって見出されたこれらの因子が軟骨細胞の基質産生に実際にどのような影響を与えるかを知るために単離した軟骨細胞を単層培養で維持して IGF-2、TGF- $\beta$ 1 を添加し、種々の遺伝子の発現を評価したところ、IGF-2 によって II 型コラーゲン、アグリカン遺伝子の発現が亢進し、一方 TGF- $\beta$ 1 ではこれらの遺伝子の発現がむしろ低下する傾向があることがわかった。

次に OA 軟骨を器官培養で維持して IGF 受容体に対する特異的阻害剤である PQ401 を培養液に添加したところ、OA 軟骨における II 型コラーゲン、アグリカンの発現はいずれもこの阻害剤によって有意に低下した。このことから OA 軟骨において IGF シグナリングは軟骨細胞の基質産生に有意に関与していると考えられた。

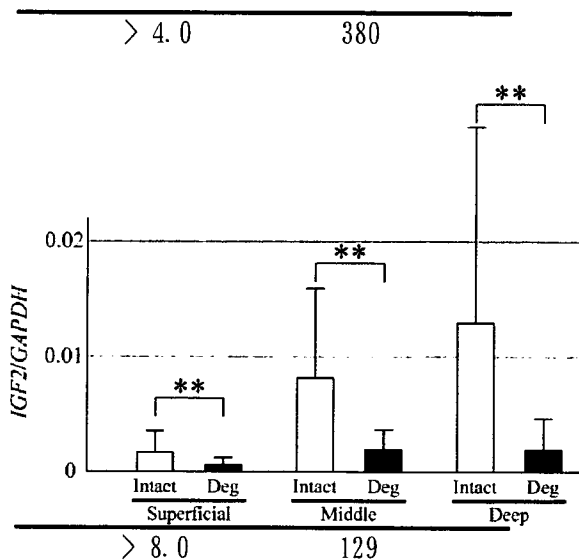
これらの結果から以後の解析は IGF-2 に着目して行った。

## 3. IGF-2 およびその活性発現に関連する遺伝子の発現の解析

マイクロアレイのデータにおいて IGF-2 に関連する遺伝子の発現を変性部と非変性部で比較したところ、IGF 結合タンパクをコードする 6 つの遺伝子の発現はすべて変性部で相対的に亢進していること、IGF 受容体 (*IGF1R*) および IGF が活性を発現するための key molecule である insulin receptor substrate (*IRS1*, *IRS2*) の発現はいずれも変性部で有意に低下していることがわかった。この結果から LCM と real-time PCR を用いて軟骨の変性部、非変性部の間で *IGF2*、IGF 結合タンパク、*IGF1R*、*IRS1*、*IRS2* の発現を比較した。この結果 *IGF2* の発現は軟骨変性部で有意に低下していること (図 1)、*IGFBP1*、*IGFBP4*、*IGFBP5* の発現は変性部で上昇していること、*IGF1R*、*IRS1*、*IRS2* の発現は変性部で低下していることが確認された。

表 1. 軟骨の変性部、非変性部間で発現レベルの異なっていた遺伝子の個数

シグナル比*	遺伝子数
< 1/8	26
< 1/4	112
< 1/2	651
> 2.0	1160



\*非変性部のシグナル強度に対する変性部のシグナル強度の比の値。

図 1. OA 罹患軟骨における IGF-2 の発現。IGF-2 mRNA の変性部と非変性部における発現を軟骨の表層、中間層、深層それぞれにおいて比較した。\*\*,  $p < 0.01$ 。

## D. 考察

OA 軟骨の軟骨変性部において軟骨基質産生が低下していることは以前から複数の研究者によって報告されている。このような軟骨変性部における基質産生の低下は OA が進行する重要な要因の一つと考えられるが、その機序は今まで未解明であった。今回の検討の結果から変性部の軟骨細胞では IGF-2 の発現が低下していること、IGF 結合タンパクの発現亢進によって IGF が受容体に結合しにくい状態になっていること、また軟骨細胞において IGF に対する受容体の発現が低下しており、さらに IGF によるシグナル伝達に重要な IRS の発現低下によって IGF に対する細胞の応答性が低下している可能性があることが明らかになった。今後さらにタンパクレベルでの検討を行う必要があるが、今回の結果はこれら複数の要因による IGF シグナリングの低下が、軟骨変性部における基質産生の低下の原因であることを示唆するものである。また要因が複雑であるため軟骨変性部における軟骨細胞の基質産生の回復は容易ではないと推測され、このような方法による OA の進行抑止法の開発は実現が難しいのではないかと考えられた。

## E. 結論

OA において軟骨細胞は軟骨変性部において IGF-2 の発現低下、IGF 結合タンパクの発現亢進、IGF-1 受容体および IRS の発現低下によって軟骨



基質の産生が低下していると考えられた。

## G. 研究発表

### 論文発表

5. Fukui N and Sandell LJ. Anabolic mediators of cartilage healing. Bronner F and Farach-Carson MC eds. Bone and Osteoarthritis Vol. 4. Springer-Verlag, London, 2007.
6. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Hikita A, Mitomi H, Mori T, Juji T, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T. Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis. A detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum* 58:154-163, 2008.
7. Ishida S, Yamane S, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R, Ochi T. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin · receptor. *J Rheumatol* (in press).
2. 学会発表
2. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Ishida S, Yamane S, Mitomi H, Hikita A, Yamamoto S, Katsuragawa Y, Suzuki R. Identification of possible regulatory molecules for chondrocyte anabolism in osteoarthritic cartilage. 2007 World Congress on Osteoarthritis. Ft. Lauderdale, FL, USA. December 2007.
3. Katsuragawa Y and Fukui N. Change of human menisci in osteoarthritis. 2007 World Congress on Osteoarthritis. Ft. Lauderdale, FL, USA. December 2007.
4. Hikita A, Suzuki R, Tohma S, Tanaka S, Fukui N. Identification of TNF- · shedding enzyme in macrophages. ASBMR 29<sup>th</sup> Annual Meeting. Honolulu, HI, USA. September, 2007.
5. 福井尚志. 関節軟骨再生の課題. -OA 罹患軟骨の解析結果から-. シンポジウム 関節軟骨の変性と再生機序-再生医療は可能か? 第51回日本リウマチ学会総会. 2007年4月、横浜.
6. 福井尚志. 単層培養された関節軟骨細胞の脱分化には少なくとも2種のインテグリン・ヘテロダイマーが関与し、それぞれ脱分

化の異なる局面を司る. シンポジウム 軟骨の再生. 第7回日本再生医療学会総会. 2008年3月、名古屋.

7. 疋田温彦、福井尚志. TNF- · 切断酵素の同定. 第25回骨代謝学会. 2007年7月、大阪.
8. 福井尚志、池田泰子、鈴木隆二、疋田温彦、桂川陽三、山本精三. 単層培養された関節軟骨細胞の脱分化には少なくとも2種のインテグリンヘテロダイマーが関与する. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007年10月、浜松.
9. 疋田温彦、鈴木隆二、當間重人、福井尚志、田中 栄. TNF- · 切断酵素の検索. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会. 2007年10月、浜松.
10. 福井尚志、池田泰子、大貫俊之、田中信帆、石田 暁、山根昌治、疋田温彦、桂川陽三、山本精三、宮本恵成、鈴木隆二. ヒト変形性関節症罹患軟骨における anabolic factor の探索. 第21回日本軟骨代謝学会. 2008年3月、京都.

## 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 (特許出願中)

## 変形性関節症の治療・予防法の開発（1）：軟骨再生システムの確立に関する研究

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運動機能再建学・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 を培養液中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）SD ラットから骨髄間葉系細胞（MSC）を採取し、MSC と免疫磁気ビーズ（IMB：Ferri Spherel00C）で複合体（MIC）を作製した。軟骨分化培地に磁気標識させた TGF- $\beta$  を 1ng/ml 加え、培養スピッツの側壁に磁石を設置し、磁石の部位に MIC と TGF- $\beta$  を集積させ、軟骨分化培養を行った。コントロール群は TGF- $\beta$

を 10ng/ml 含む軟骨誘導培地で培養したものとした。

（in vivo 実験）関節軟骨欠損モデルとして凍結豚膝を解凍し、膝蓋骨に軟骨全層欠損（ $\phi$ 10mm）を作製した。外磁場発生装置により軟骨欠損部に 0.6 テスラの磁場を 90 分かけた磁場群と磁場をかけないコントロール群を作製し、関節鏡視下に軟骨欠損部に向けて磁気標識 MSC を注入し（ $8 \times 10^5$  個/100 $\mu$ l PBS）、注入直後と 90 分後に軟骨欠損部の評価を行った。

（in vitro 実験）人工膝関節置換術の際に変性した軟骨を採取し、培養フラスコの側壁に接着した。フラスコに磁気標識した幹細胞を満たした後、変性した軟骨の方向に磁場をかけた（0.6 テスラ、6 時間）。この軟骨を 3 週間軟骨分化培地中で培養した後、組織学的な評価を行った。コントロール群はフラスコに磁場をかけずに放置した後、同様に変性した軟骨を軟骨分化培養したものとした。

（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って行い、動物愛護に配慮した。

### C. 研究結果

（in vitro 実験）実験群では、培地中の TGF- $\beta$  が 1/10 であったにもかかわらず、磁場を用いて磁気標識した TGF- $\beta$  を集積することにより、コントロール群と同等の軟骨分化が可能であった。

（In vivo 実験）磁場をかけないコントロール群では注入された MSC は関節内に拡散するのが観察された。一方、磁場群では注入された MSC は注入針の先端から軟骨欠損部に誘導され、同部

に集積することを確認した。また 90 分後に再鏡視を行った磁場群では、注入した MSC は軟骨欠損部に残存しており、灌流液を流しても軟骨欠損部にとどまっていた。

(in vitro 実験) コントロール群では、変性した軟骨層の表面に細胞を認めなかった。また軟骨表面はトルイジンブルー、サフラニンO染色で染色性が低下していた。一方磁場をかけた実験群では、トルイジンブルーやサフラニンOで染色性が低下した変性軟骨層の表面に、細胞層が形成されていた。この細胞層はトルイジンブルーやサフラニンOで染色され、2型コラーゲンも陽性であった。我々の方法は、*in vitro* ではあるが加齢により変性したヒト関節軟骨の表面に硝子軟骨様の細胞層を作ることができた。

#### D. 考察

MSC は骨髄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、*in vitro* ではあるがヒト変性軟骨の表面に硝子軟骨様の細胞層を作ることができたことから、変形性関節症への応用も期待される。さらには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。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、変形性関節症にも応用できる可能性があり、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. 健康危険情報

分担報告書のため記載なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kobayashi, T. ; Ochi, M. ; Yanada, S. ; Ishikawa, M. ; Adachi, N. ; Deie, M. ; and Arihiro, K. : A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair. *Arthroscopy*, 24 (1) : 69-76, 2008.

Motoyama, M. ; Deie, M. ; Kanaya, A. ; Nishimori, M. ; Miyamoto, A. ; Yanada, S. ; Adachi, N. ; and Ochi, M. : *In vitro* cartilage formation using TGF- $\beta$ -immobilized magnetic beads and mesenchymal stem cell-magnetic bead complexes under magnetic field conditions. *J Biomed Mater Res A*, in press

##### 1. 学会発表

(招待講演・シンポジウム)

関節軟骨再生

第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会  
2007. 4. 27, 横浜市

(招待講演)

Cartilage regeneration—novel approach.  
XXV Arthroscopy Spanish association  
Congress.

2007. 5. 16, Sevilla, Spain.

(招待講演・Instructional Course Lectures #16)

Emerging Technologies.

6<sup>th</sup> BIENNIAL ISAKOS CONGRESS.

2007. 5. 30, Florence, Italy.

(招待講演・Instructional Course Lectures #24)

Tissue Engineering of Cartilage for  
Clinical Defect.

6<sup>th</sup> BIENNIAL ISAKOS CONGRESS.

2007. 5. 31, Florence, Italy.

(招待講演・Highlight Lecture #4)

Clinically Related Cartilage Engineering.  
6<sup>th</sup> BIENNIAL ISAKOS CONGRESS.

2007. 5. 31, Florence, Italy.

(招待講演)

Emerging technology for cartilage repair.  
The 1st Stockholm Arthroscopy Conference.

2007. 9. 7, Stockholm, Sweden.

(招待講演)

Chondrocyte transplantation, Japanese

(招待講演)

Cartilage repair.

Clinical results after transplantation of tissue-engineered cartilage and distraction arthroplasty.

Annual Fall Congress of the Korean Arthroscopy Association.

2007. 10. 5, Seoul, Korea.

(招待講演)

Cartilage repair -Basic research-

Annual Fall Congress of the Korean Arthroscopy Association.

2007. 10. 5, Seoul, Korea.

(招待講演)

Tissue engineering for cartilage defects-present status and future direction.

RCOST Annual Meeting.

2007. 10. 20, Pattaya, Thailand.

(招待講演)

Cartilage repair.

RCOST Annual Meeting.

2007. 10. 21, Pattaya, Thailand.

(招待講演)

Emerging technology of tissue engineering for cartilage repair.

2008 Annual Meeting of Formosa Association of Regenerative Medicine.

2008. 2. 23, Taipei, Republic of China.

(招待講演)

How will we treat articular cartilage injuries in athletes in the future?

Current trend in Sports Medicine.

AAOS 75<sup>th</sup> Annual Meeting.

2008. 3. 9, San Francisco, U. S. A.

experience.

Finish 2<sup>nd</sup> Knee Arthroscopy Course.

2007. 9. 10, Tampere, Finland.

### 3. その他

記載事項なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

記載事項なし

### 2. 実用新案登録

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に加え、細胞の生理的機能にほとんど影響しない遺伝子導入、効率よい分化誘導に寄与していることが示唆された。また、*in vivo* 遺伝子により、マウス頭蓋骨骨欠損モデルにおける骨新生誘導、ウサギ血管壁への遺伝子導入に成功し、身体各所に対するナノミセルデリバリーの有効性が示唆された。

### 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、モデル動物に対する遺伝子導入実験を行った。

### 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い、さらに *in vivo* 腹腔内投与による血清サイトカイン産生誘導の評価を行った。

#### 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 を組み合わせて遺伝子導入し、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。

#### 5) 血管壁への遺伝子導入

ナノミセル型キャリアの *in vivo* 展開のひとつとして、ウサギ頸動脈壁に対する動脈内投与による遺伝子導入を行い、遺伝子発現を評価した。

### C. 研究結果

#### 1) *in vivo* 局所投与による骨形成

リン酸カルシウムにナノミセルを内包した GAM (gene activated matrix) を作成し、マウス頭頂骨骨欠損モデルに対して骨芽細胞への分化誘導因子遺伝子を *in vivo* 投与すると、著明に骨形成が促進された。タイプ I コラーゲン抗体による免疫染色を行うと、新生骨は担体を取り囲むように均一に形成されており、周囲への

培養細胞に対する安定した遺伝子導入・細胞分化の促進されたことが示唆された。

## 2) 遺伝子持続発現の評価

良好な骨芽細胞分化誘導、骨形成のメカニズムとして、遺伝子発現の持続性を *in vitro* 遺伝子導入によって調べると、ナノミセルでは導入2日目までは発現は低いものの、その後徐々に発現が増加し、1週以上発現が維持されることが分かった。GAM化したナノミセルからも3週以上に渡る遺伝子発現が観察され、ナノミセルが長期の遺伝子持続発現に優れた性質を持つことが確認された。これは慢性疾患でありかつ持続的な治療効果を必要とする変形性関節症への展開に向けて有意義な性質と考えられる。

## 3) 細胞正常機能への影響

ナノミセルによる遺伝子導入後、細胞に恒常的に発現しているハウスキーピング遺伝子の解析を網羅的に行ったところ、他の遺伝子導入試薬とくらべ、ナノミセルではほとんどハウスキーピング遺伝子発現に変動が生じないことが分かった。さらにナノミセルの免疫反応惹起を確認するため、*in vivo* 腹腔内投与後の血清での炎症性サイトカイン濃度を評価したところ、ナノミセルではほとんどその上昇は見られなかった。非致死性疾患である変形性関節症への展開には、システムの安全性は本質的に重要であり、ナノミセルの有用性が示唆された。

## 4) 血管壁への遺伝子導入

ウサギの総頸動脈に対するバルーン擦過内膜肥厚モデルを作製し、内膜肥厚を惹起した頸動脈壁に対し、動脈内投与により遺伝子導入を行ったところ、内膜肥厚した頸動脈壁に閉塞を惹起することなく効率的な遺伝子導入が確認された。身体各所に対するナノミセルデリバリーの有効性が示唆された。

## A. 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。また血管壁に対しても効率よい遺伝子導入可能であることが明らかとなり、炎症を惹起することなく用いることが出来る本システムの有用性が示唆された。

## A. 結論

(PEG-P [Asp (DET)]) /DNA からなる高分子ナノミセルは、効率的かつ生体に優しい遺伝子導入システムとして、大きな可能性を持つものであることが明らかとなった。

## 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) Jang WD, Nishiyama N, Kataoka K: Preparation of naphthalocyanine dendrimer loaded polyion complex micelle for photodynamic therapy. *Key Eng. Mater.* 342-343: 465-468, 2007
- 2) Park JS, Akiyama Y, Yamasaki Y, Kataoka K: 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: 138-146, 2007
- 3) Kumagai M, Imai Y, Nakamura T, Yamasaki Y, Sekino M, Ueno S, Hanaoka K, Kikuchi K, Nagano T, Kaneko E, Shimokado K, Kataoka K: Iron hydroxide nanoparticles coated with poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer as novel magnetic resonance contrast agents for *in vivo* cancer imaging. *Colloids Surf., B Biointerfaces* 56: 174-181, 2007
- 4) Kano MR, Bae Y, Iwata C, Morishita Y, Yashiro M, Oka M, Fujii T, Komuro A, Kiyono K, Kamiishi 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.* 104: 3460-3465, 2007
- 5) Lee Y, Fukushima S, Bae Y, Hiki S, Ishii T, Kataoka K: A protein nanocarrier from charge-conversion polymer in response to endosomal pH. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 5362-5363, 2007
  - 6) Park JS, Kataoka K: Comprehensive and accurate control of thermosensitivity of poly(2-alkyl-2-oxazoline)s via well-defined gradient or random copolymerization. *Macromolecules* 40: 3599-3609, 2007
  - 7) Akagi D, Oba M, Koyama H, Nishiyama N, Fukushima S, Miyata T, Nagawa H, Kataoka K: Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation. *Gene Ther.* 14: 1029-1038, 2007
  - 8) Oishi M, Hayashi H, Itaka K, Kataoka K: Y. Nagasaki, pH-Responsive PEGylated nanogels as targetable and low invasive endosomolytic agents to induce the enhanced transfection efficiency of nonviral gene vectors. *Colloid. Polym. Sci.* 285: 1055-1060, 2007
  - 9) Satomi T, Nagasaki Y, Kobayashi H, Otuka H, Kataoka K: Density control of poly(ethylene glycol) layer to regulate cellular attachment. *Langmuir* 23: 6698-6703, 2007
  - 10) Itaka K, Ohba S, Miyata K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Chung U, Kataoka K: Bone regeneration by regulated in vivo gene transfer using biocompatible polyplex nanomicelles. *Molecular Ther.* 15: 1655-1662, 2007
  - 11) Bae Y, Nishiyama N, Kataoka K: In Vivo Antitumor activity of the folate-conjugated pH-sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments. *Bioconjugate Chem.* 18: 1131-1139, 2007
  - 12) Takae S, Akiyama Y, Yamasaki Y, Nagasaki Y, Kataoka K: Colloidal Au Replacement Assay for Highly Sensitive Quantification of low molecular weight analytes by surface plasmon resonance. *Bioconjugate Chem.* 18: 1241-1245, 2007
  - 13) Han M, Bae Y, Nishiyama N, Miyata K, Oba M, Kataoka K: Transfection study using multicellular tumor spheroids for screening non-viral polymeric gene vectors with low cytotoxicity and high transfection efficiencies. *J. Control. Release* 121: 38-48, 2007
  - 14) Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K: Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane)platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity. *J. Control. Release* 121: 146-155, 2007
  - 15) Oba M, Fukushima S, Kanayama N, Aoyagi K, N Nishiyama, Koyama H, Kataoka K: Cyclic RGD peptide-conjugated polyplex micelles as a targetable gene delivery system directed to cells possessing alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins. *Bioconjugate Chem.* 18: 1415-1423, 2007
  - 16) Miyata K, Fukushima S, Nishiyama N, Yamasaki Y, Kataoka K: PEG-based block cationomers possessing DNA anchoring and endosomal escaping functions to form polyplex micelles with improved stability and high transfection efficacy. *J. Control. Release* 122: 252-260, 2007
  - 17) Oishi M, Nagasaki Y, Nishiyama N, Itaka K, Takagi M, Shimamoto A, Furuichi Y, Kataoka K: Enhanced growth inhibition of hepatic multicellular tumor spheroids by lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate formulated in PEGylated polyplexes. *ChemMedChem* 2: 1290-1297, 2007
  - 18) Li Y, Jang WD, Nishiyama N, Kishimura A, Kawauchi S, Morimoto Y, Miake S, Yamashita T, Kikuchi M, Aida T, Kataoka K: Dendrimer Generation effects on photodynamic efficacy of dendrimer porphyrins and dendrimer-loaded supramolecular nanocarriers. *Chem. Mater.* 19: 5557-5562, 2007
  - 19) Masago K, Itaka K, Nishiyama N, Chung U, Kataoka K: Gene delivery with biocompatible cationic polymer: Pharmacogenomic analysis on cell bioactivity. *Biomaterials* 28:

- 5169-5175, 2007
- 20) Nakanishi M, Park JS, Jang WD, Oba M, Kataoka K: Study of the quantitative aminolysis reaction of poly(beta-benzyl L-aspartate) (PBLA) as a platform polymer for functionality materials. *React. Funct. Polym.* 67: 1361-1372, 2007
  - 21) Xiong MP, Bae Y, Fukushima S, Forrest ML, Nishiyama N, Kataoka K, Kwon GS: pH-Responsive multi-PEGylated dual cationic nanoparticles enable charge modulations for safe gene delivery. *ChemMedChem* 2: 1321-1327, 2007
  - 22) Nishiyama N, Jang WD, Kataoka K: Supramolecular nanocarriers integrated with dendrimers encapsulating photosensitizers for effective photodynamic therapy and photochemical gene delivery. *New J. Chem.* 31: 1074-1082, 2007
  - 23) Nishiyama N: Nanomedicine: Nanocarriers shape up for long life. *Nature Nanotechnol.* 2: 203-204, 2007
  - 24) Wu S, Murai S, Kataoka K, Miyagishi M: Yin Yang 1 induces Transcriptional Activity of p73 through Cooperation with E2F1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, in press
  - 25) Sugisaki K, Usui T, Nishiyama N, Jang WD, Yanagi Y, Yamagami S, Amano S, Kataoka K: Photodynamic therapy for corneal neovascularization using polymeric micelles encapsulating dendrimer porphyrins. *Invest. Opth. Vis. Sci.* 2007, in press
2. 学会発表
- 1) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療  
ルセラピー, 第27回日本医学会総会, 大阪国際会議場, 大阪, 2007. 4. 8, 基調講演
  - 2) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療: ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計, 第4回「東京大学の生命科学」シンポジウム, 安田講堂, 東京大学, 2007. 4. 14
  - 3) Kazunori Kataoka, Light-induced Gene and Drug Delivery by Supramolecular Nanocarrier, 3rd Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC2007), Amsterdam RAI, The Netherlands, 2007. 4. 24, 基調講演
  - 4) 片岡一則, 遺伝子デリバリーのための超分子ナノデバイス設計, 第23回日本DDS学会, ホテル日航熊本, 熊本, 2007. 6. 15
  - 5) Kazunori Kataoka, Engineered Supra-macromolecular Assemblies as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, Rainer Symp: workshop on Polymers in Medicine and Biology, the Sonoma Valley (Hilton Hotel, Santa Rosa, CA), 2007. 6. 19, 2007. 6. 15
  - 6) 片岡一則, Polymeric-micellar nanodevice for smart gene vector, 第13回日本遺伝子治療学会, 愛知県がんセンター国際医学交流センター, 愛知, 2007. 6. 28, 招待講演
  - 7) Kazunori Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, International Conference on Materials for Advanced Technologies 2007 (ICMAT2007), Singapore, SuntecSingapore International Convention and Exhibition Center, 2007. 7. 2, 基調講演
  - 8) 片岡一則, Light-induced gene and drug delivery by supramolecular nanocarrier, Keio International Symposium on "Photonics and Molecular Therapy", 慶応義塾大学医学部(信濃町), 東京, 2007. 8. 6, 招待講演
  - 9) Kazunori Kataoka, Multimolecular-Assembly of Smart Block Copolymers as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, GelSympo2007, 東京大学, 2007. 8. 7
  - 10) Kazunori Kataoka, Engineered supra-macromolecular assemblies as nanocarriers for gene and drug delivery, The 3rd SBE International Conference on Bioengineering and Nanotechnology (ICBN 2007), Biopolis, Singapore, 2007. 8. 13, 招待講演
  - 11) Kazunori Kataoka, Nanocarriers for Gene and Drug Delivery Advances in Tissue Engineering 2007, 15th Annual Short Course, in Duncan Hall, Rice University, Houston, Texas, 2007. 8. 18
  - 12) Kazunori Kataoka, Supramolecular nanocarriers assembled from block copolymers for gene and drug delivery, Polypeptide and Protein Materials, the 234th ACS National Meeting, Westin Boston



- Waterfront, Boston, 2007. 8. 21, 招待講演
- 13) 片岡一則, Supra-molecular nanodevices for gene and drug delivery ~Challenge to smart molecular therapy~The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 早稲田大学国際会議場井深大記念ホール, 東京, 2007. 9. 7, 招待講演
  - 14) 片岡一則, ナノマテリアルによるドラッグデリバリー特別講演会, 国立医薬品食品衛生研究所, 東京, 2007. 9. 12, 招待講演
  - 15) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療  
遺伝子のピンポイントデリバリー, 第11回 Molecular Cardiovascular Conference, 小樽キロロ, 北海道, 2007. 9. 14, 基調講演
  - 16) 片岡一則, 薬物・遺伝子デリバリーと高分子ゲル-ナノバイオインターフェイスに挑む-, ゲルワークショップ イン 名古屋, KKR ホテル名古屋, 愛知, 2007. 9. 22, 基調講演
  - 17) 片岡一則, ナノ構造デバイスによる標的治療, 第66回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 神奈川, 2007. 10. 4
  - 18) 片岡一則, 高分子ミセル型制がん剤の技術開発と臨床展開, 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会(合同総会), パシフィコ横浜, 神奈川, 2007. 10. 11
  - 19) 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる DDS イノベーション, NEDO 公開シンポジウム「ダブルターゲティング DDS-次世代 DDS 型治療システム-, 東京女子医大弥生記念講堂, 東京, 2007. 10. 13
  - 20) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療, 第7回次世代医療システム産業化フォーラム, 大阪商工会議所7階国際会議ホール, 大阪, 2007. 10. 15
  - 21) Kazunori Kataoka, Supramolecular assemblies of smart block copolymers for nanomedicine, Xiangshan Science Conference on Functional Supramolecular Systems: Self-assembly and Nanotechnology 2007, FRAGRANT HILL HOTEL in Beijing, 2007. 10. 22, 招待講演
  - 22) 片岡一則, 高分子が先導するナノバイオテクノロジー: 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, 若手社員のための高分子基礎講座, 横浜ゴム湘南セミナーハウス, 神奈川, 2007. 10. 25
  - 23) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療, 第48回日本脈管学会総会, 松本ホテルブエナビスタ, 長野, 2007. 10. 26, 教育講演
  - 24) 片岡一則, Novel Supramolecular Nanovector for Non-viral Gene Therapy, 第4回21世紀 COE 国際シンポジウム, ヒルトン名古屋, 愛知, 2007. 10. 26
  - 25) 片岡一則, ナノバイオマテリアルが拓く未来医療, 本多記念会創立50周年記念事業, 学士会館(神田錦町), 東京, 2007. 11. 16, 一般講演
  - 26) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーと高分子の融合による未来医療の開拓, 第25回医用高分子研究会講座, 山上会館大会議室, 東京大学, 2007. 11. 19
  - 27) 片岡一則, ナノバイオ・インテグレーションが拓く未来医療, 第8回ナノ工学セミナー 京都大学桂キャンパス, ローム記念館大ホール, 2007. 11. 21, 特別講演
  - 28) 片岡一則, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery: Challenge to Smart Molecular Therapy, 台湾工業技術研究院との共同シンポジウム, 鉄門記念講堂, 東京大学, 2007. 11. 27
  - 29) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療-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-, 第49回下野整形懇談会, 宇都宮市東日本ホテル, 栃木, 2007. 11. 28
  - 30) 片岡一則, ナノメディスンが拓く未来医療: ピンポイント診断・治療の実現を目指して, 第133回日本医学会シンポジウム, 日本医師会館大講堂, 東京, 2007. 12. 6
  - 31) 片岡一則, バイオマテリアルが先導する未来医療-高分子ミセル型ナノキャリアによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー-, 東大, 武田先端知ホール, 東京大学, 2007. 12. 10, 基調講演
  - 32) 片岡一則, 高分子ミセル型超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子デリバリー, 第6回遺伝子治療シンポジウム, 千里阪急ホテル, 大阪, 2008. 2. 1
- H. 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 佐粧孝久（千葉大学大学院整医学研究院整形外科学 助教）

研究要旨：膝 OA の重症度の客観的評価法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大腿骨顆部の輪郭の不整度を測定する新しいソフトウェア（version 3）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。本法は半自動的に指数が計測されるため、検者間のばらつきが少ない。また、本法により計測された指数に応じて外科的治療法を選択すべきであることも併せて示した。

### A. 研究目的

高齢社会において、膝 OA の客観的な重症度評価法の確立が社会的要請となっている。信頼できる評価法を確立することは治療体系の作成や治療効果の判定を可能とする。画像評価もそのひとつである。従来はレントゲン検査が汎用されてきたが、信頼度は高くなかった。本研究の目的は MRI を用い膝 OA の重症度を客観的に示すことのできる指数を確立すること。またその指標を治療法の選択の目安とできるか否かの検討をすることである。

### B. 研究方法

1. 本研究で着目したのは内側型変形性膝関節症の内側コンパートメントの MRI 矢状断像において OA が進行すると明らかとなってくる大腿骨顆部輪郭の不整である。そこでこの不整の程度を数値で表現する方法を考案した。計測の手順であるが、まずは MRI 画像より、大腿骨内側顆の輪郭のみを抽出する。その後不整度に関与する4つのパラメータを計測した。輪郭の厚みの平均（Average Thickness of Subchondral plate: ATS）、厚みのばらつき（Standard Deviation of the thickness of the Subchondral plate: SDS）、厚みの2乗の平均（Average Squared Thickness of the Subchondral plate: ASTS）、輪郭の上縁の長さとは下縁の長さの比（Ratio of the length of Upper surface and the Lower surface of the subchondral plate: RUL）である。これらを測定するために専用のソフトウェア（IR index version3）を開発した。ソフトウェアはプログラミングソフト Matlab 6.5（Cyber net systems, Tokyo）を用い作成された。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に得られた大腿骨内側顆の骨軟骨片につき組織学的検討を加えた。調べたのは OA が進行してくると増加する軟骨下骨から石灰化軟骨層へと進入してくる Vascular channel の密度である。

3. 関節鏡手術を受けた症例の術前の不整度と術後成績の関係を調べ、不整度が手術の適応の目安となるかを検討した。

### C. 研究結果

1. 内側型変形性膝関節症 56 膝を検討したところ、不整度を表す4つのパラメータと Lysholm score、JOA スコア、VAS の4つの値のいずれとも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。

#### 2. 軟骨下骨領域の組織学的検討

Vascular channel の密度と不整度に相関のあることがわかり、不整度は軟骨下骨領域に生じている病理学的な変化の強さを反映しているものであることがわかった。

#### 3. 関節鏡手術と不整度

関節鏡手術の術後成績に不整度が関与していることがわかった。このことからある一定の不整度を超えた症例について手術的な治療法を選択する場合には人工膝関節置換術が望ましい、すなわち関節鏡手術のものはや適応ではないということが言えることがわかった。

### D. 考察

膝 OA の重症度を客観的に示す画像評価としてレントゲン検査が汎用されており、世界的にスタンダードとされているが、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であり検者間のばらつきが生じ易いなど再現性に問題がある。さらにレントゲン所見と

膝機能が必ずしも相関しないため、信頼度が高いものとは言えない。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、連続指数での評価法であり、経時的な変化も数値で表すことが可能である。

本研究ではOAが進行するにつれて明らかになってくる不整とは病理学的検討からはvascular channelの密度の増大であることがわかり、不整度計測の意義が病理学的にも明らかとなった。

さらには症例数が少ないものの手術適応の決定に不整度の計測が使用できることもわかり、将来的には必要となってくる適切な治療体系の確立に、本研究で提唱した不整度計測が有用であることが示唆された。

#### A. 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。治療体系の確立に有用となると考えられた。

#### B. 健康危険情報

特になし。

#### C. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Murata R, Nakagawa K, Ohtori S, Ochiai N, Arai M, Saisu T, Sasho T, Takahashi K, Moriya H. The effects of radial shock waves on gene transfer in rabbit chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007

Nov;15(11):1275-82.

2) Iwasaki J, Sasho T, Nakagawa K, Ogino S, Ochiai N, Moriya H. Irregularity of medial femoral condyle on MR imaging serves as a possible indicator of objective severity of medial-type osteoarthritic knee—a pilot study. *Clin Rheumatol*. 2007 Oct;

26(10):1705-8.

3) Ochiai N, Ohtori S, Sasho T, Nakagawa K, Takahashi K, Takahashi N, Murata R, Takahashi K, Moriya H, Wada Y, Saisu T. Extracorporeal shock wave therapy improves motor dysfunction and pain originating from knee osteoarthritis in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Sep; 15(9):1093-6.

4) Moriya T, Wada Y, Watanabe A, Sasho T, Nakagawa K, Mainil-Varlet P, Moriya H. Evaluation of reparative cartilage after autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans: histology,

biochemistry, and MR imaging. *J Orthop Sci*. 2007 May; 12(3):265-73.

5) 佐粧孝久 疼痛の原因組織からみた変形性膝関節症の手術療法選択

臨床整形外科 42(1) 29-34, 2007

6) 佐粧孝久、中川晃一、鈴木昌彦、田原正道、落合信靖、荻野修平、守屋秀繁、和田佑一、中口俊哉、三宅洋一 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(1): 29-35, 2007

##### 2. 学会発表

1) Sasho T, Nakagawa K, Nagashima R. Gene Profile Analysis of Subchondral Bone of Osteoarthritic Knee (7th World Congress on Cartilage Repair International Society, 2007. 9. 29-10. 2 ワルシャワ、ポーランド)

2) Sasho T, Ogino S, Nakagawa K, et al. Spontaneous Haemarthrosis of the knee: etiology and treatment. (6<sup>th</sup> ISAKOS biennial Congress フィレンツェ、イタリア 2007. 5. 27-31)

3) Sasho T, Nakagawa K, Wada Y. Irregularity of condyle on MRI determines the clinical outcome of arthroscopic procedure. (World Congress on osteoarthritis 2007. 12. 5-12. 9, フォートローダレール、USA)

4) Nagashima R, Sasho T, Nakagawa K, et al. Gene expression profiling of human knee osteoarthritic subchondral bone. (54<sup>th</sup> Orthopaedic Research Society, サンフランシスコ USA)

5) Nakagawa K, Sasho T, Arai M, et al. Effects of autologous platelet-rich plasma on the metabolism of articular chondrocytes in osteoarthritis patients. (54<sup>th</sup> Orthopaedic Research Society, サンフランシスコ USA)

6) 佐粧孝久 高齢者の関節鏡. 第56回東日本整形災害外科学会 (9/21-22, 軽井沢)

7) 佐粧孝久 MRIを用いた重症度評価法に基づく治療法の選択 (第35回日本・リウマチ関節外科学会, 11/9-10 品川)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）の血清マーカーがOAの病態をいかに反映するか、また進行の予知は可能かについて2年間の経過で検討した。初診時COMP濃度は2年後までの関節裂隙狭小化（軟骨破壊）が高度な群で有意に高く、OAの進行予知マーカーとして有用であった。

### A. 研究目的

変形性関節症（OA）における病態評価はX線やMRIなどの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。OAにおいても各種マーカーを応用することによって画像では得られない病態についての情報を提供できる可能性がある。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。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134例（男性28例、女性106例、平均年齢68.3歳）を対象とした。人工膝関節置換術などの手術に至った例はベースラインのみ、それ以外は続く3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月時に経時的血清採取を行い、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、inhibition binding assay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続く12ヶ月、24ヶ月時の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。（倫理面での配慮）本研究における検体採

取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. 研究結果

COMPはX線病期別でgrade1群 $12.3 \pm 4.4$  U/L、grade2群 $13.3 \pm 5.0$  U/L、grade4群 $11.0 \pm 4.0$  U/Lに比して、grade3群は $14.8 \pm 7.1$  U/Lと高値を示した（ $P < 0.05$  grade3 v. s. grade4）。臨床評価とは有意な相関は認めなかった〔疼痛VASスコア（ $P = 0.08$ ）、Lequesne index（ $P = 0.15$ ）〕。HAはX線病期別でgrade1群 $77.3 \pm 41.9$  ng/ml、grade2群 $92.9 \pm 91.2$  ng/ml、grade3群 $96.6 \pm 39.5$  ng/ml、grade4群 $109.2 \pm 76.6$  ng/mlと有意な相関は認めなかった。臨床スコアの悪化と有意な正の相関を認めた〔疼痛VASスコア（ $P = 0.07$ ）、Lequesne index（ $P < 0.01$ ）〕。また初期OA（grade1、2群）でベースラインのマーカーレベルとOA進行との関係は、①関節裂隙狭小化進行が1mm未満の群 $12.3 \pm 3.6$  U/Lに比して、②24ヶ月で1mm以上進行した群 $17.1 \pm 5.6$  U/L、③12ヶ月で1mm以上進行した群 $22.0 \pm 10.6$  U/Lが有意に高値を示した（ $P < 0.05$  ① v. s. ②、③）。この3群の12ヶ月間の経時的変化をみると、1mm以下の群は低値で安定していたが、進行群は変動をともないつつ高値を保っていた。HAについては狭小化進行と有意な関係は認めなかった。

### D. 考察

血清COMP値はX線病期のgrade3で最も高値を示し、grade4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、末期関節症では残存軟骨量の減少や軟骨細胞の代謝活性が低下することを示している。血清HA値の上昇は臨床スコアの悪化と相関していた。この結果は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。初期OAにおいて12ヶ月、24ヶ月で関節裂隙狭小化が1mm以上進行したものは血清COMPが高く、