

b) シンポジウム, 学術講演等

1. 馬淵昭彦、吉村典子、村木重之、岡敬之、阿久根徹、川口浩、中村耕三：運動器疾患に対する遺伝子診断の現況. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 2008.10 京都 (シンポジウム)
2. 吉村典子、村木重之、岡敬之、阿久根徹、馬淵昭彦、川口浩、中村耕三：変形性関節症の疫学研究：ROAD Project. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2008.4 札幌 (シンポジウム)
3. 中村耕三、川口浩、吉村典子、岡敬之、阿久根徹、村木重之、馬淵昭彦：変形性関節症：その課題とアプローチの現状, 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008.4 札幌 (プレナリーレクチャー)
4. 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. 第81回日本整形外科学会学術総会, 2008.5. 札幌 (シンポジウム)

c) 全国学会

1. 村木重之、岡敬之、阿久根徹、馬淵昭彦、中村耕三、川口浩、吉村典子：高齢者では腰椎椎間狭小化と腰痛との関連は女性のほうが男性よりも強い-ROADプロジェクト. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 2008.10 京都
2. 村木重之、岡敬之、阿久根徹、馬淵昭彦、中村耕三、川口浩、吉村典子：変形性膝関節症における骨棘形成および関節裂隙狭小化の膝痛への影響 -ROADプロジェクト-. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 2008.10 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

軟骨に特異的な糖鎖マーカーによる解析

研究分担者 岩崎 倫政 北海道大学病院整形外科 講師

研究要旨：マウス軟骨中のN型糖鎖構造解析を行い、変形性関節症（OA）の発症早期より糖鎖構造が変化していることを証明し、変化しているN型糖鎖を同定した。さらに、この糖鎖構造の変化を生じさせる糖鎖関連酵素の同定にも成功した。この結果より、N型糖鎖がOAの発症もしくは発症後早期の病態に深く関与していることが示された。

A. 研究目的

マウスOA軟骨のN型糖鎖構造解析を行い、OAの発症・進行に伴い、変化するN型糖鎖とその変化に関連する糖鎖関連酵素を同定すること。

B. 研究方法

in vitro/in vivo 評価系によりマウス正常およびOA軟骨のN型糖鎖構造解析を行い、OA軟骨において変化している糖鎖を同定する。同定された糖鎖に関連する軟骨細胞上の糖鎖関連酵素の遺伝子発現変化をRT-PCRにより解析する。

（倫理面への配慮）

動物実験に関する学内の倫理委員会の承認のもとに研究を施行した。

C. 研究結果

OAの発症早期から軟骨中のN型糖鎖構造に変化を認めた。変化しているN型糖鎖が同定され、その糖鎖変化を生じさせる軟骨細胞上の糖鎖関連酵素遺伝子も同定された。

D. 考察

本研究結果より、OAの発症早期より軟骨細胞中のN型糖鎖関連酵素の発現変化が生じ、それにより軟骨中のN型糖鎖変化が生じていることが証明された。N型糖鎖は、OAの発症もしくは発症後早期の病態に深く関与していると考えられる。OAの進行に伴うN型糖鎖および関連酵素の生体内動態を追跡することにより、これらがOAの早期疾患マーカーになる可能性がある。

E. 結論

OAの発症早期より、軟骨中のN型糖鎖および糖鎖関連酵素の発現変化を求めた。N型糖鎖が、OAの

発症もしくは発症後早期の病態に深く関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuhashi T, Iwasaki N, et al: Alteration of N-glycans related to articular cartilage deterioration after anterior cruciate ligament transection in rabbits. *Osteoarthritis & Cartilage* 16:772-8, 2008.

2. 学会発表

1) 変形性関節症の進行に伴う滑膜組織の糖鎖構造変化. 松橋智弥, 岩崎倫政他, 第23回日本整形外科学会基礎学術集会

2) 軟骨変性に伴う軟骨細胞上の糖鎖構造と糖鎖関連遺伝子の変化. 瓜田淳, 岩崎倫政他, 同上

3) Contribution of N-glycosylation to articular cartilage degradation in mice. Urita T, Iwasaki, et al. 55th ORS Annual Meeting

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II型コラーゲン由来フラグメントによる解析

研究分担者 石黒直樹 名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学専攻運動・形態外科学講座
整形外科学 教授

研究要旨

関節への負担を最小限とし、運動機能の維持および生活習慣病の予防に効果を上げる運動量の定量化をめざし、生活習慣病の予防のための生活習慣を持つ群と持たない群において、軟骨の変性および関節機能を、関節マーカーと精密な関節軟骨画像評価を用いて、比較する。

A. 研究目的

既に運動、食事指導をヘルスアップ事業のなかで受けた人々を対象として、生活習慣病、メタボリックシンドロームに対して運動習慣を含む、生活習慣改善効果があり、維持できているグループと維持できていないグループとで比較することによりそれぞれの運動習慣の差を確認し、グループでの関節マーカーとレントゲン変化、および質問紙による機能評価を行い、関節症の進行と適度な運動習慣について具体的に定量化することを目的とする。

B. 研究方法

岐阜県中津川市、和歌山県太地町でヘルスアップ事業への参加者併せて約150名について、その介入効果があり、維持できているグループと介入効果のなかったおよび維持できなかったグループとで比較検討する。

- 1) 現在の運動、および食習慣を主として生活習慣を詳細にアンケート調査すること
- 2) 血液検査にて、糖、脂質代謝（空腹時血糖、HbA1c T-cho HDL, LDL-cho, TG）などについて状態把握（開始時）と経時的変化（半年ごと）を把握すること
- 3) 尿、血液中のコラーゲン分解産物（C2C）を関節マーカーとして測定。開始時と経時的変化（半年ごと）を解析すること
- 4) 膝立位レントゲンを開始時、および1年ごと

に撮影し、画像解析ソフトを用いて正確に関節裂隙を計測し、膝関節軟骨の状態を経時的に把握すること

- 5) 開始時、3ヶ月ごと 関節の腫脹の有無の確認、関節可動域の測定 疼痛評価（VAS）
- 6) 開始時、半年ごとのWOMACを用いた膝関節痛に対する主観的機能評価を併せて行う。
- 7) 開始時、半年ごとのSF8を用いた主観的QOL評価

（倫理面への配慮）

運動教室で通常行なっている運動量であり、余分に負荷をかけることもない。得られた血液検査などのデータは参加者にも知らせ、健康チェックに役立ててもらおう。また、実施施設、坂下病院での承認も受けている。個人情報についても管理し、倫理面について問題はない。

C. 研究結果

実施施設での研究の承認、質問紙の確定、サンプリング（採血、採尿）、レントゲン撮影測定（抗体などELISAの試薬）の準備が整い、データ集積が順次開始された。20年度内にベースラインサンプルの集積が可能である。

D. 考察

今までも運動、食事療法などへ介入した研究

はあるが、多くは介入方法の比較が行われる。しかしながら、これらの研究では介入などが実際にどれほど行われたか、その効果がどの程度あったかは、検証できない場合もある。本研究では、先行した介入があり、体重、脂質、糖質マーカーなどにより、介入効果が確認、維持されている群、効果がない群とで、関節症の進行を比較でき、生活習慣病予防のための適切な運動量の確立への有用な情報を提供すると考えられる。

E. 今後の予定

21年度に、得られたレントゲン写真の、画像解析（関節裂隙の測定）、関節マーカ（II型コラーゲン分解産物）の測定を行い、ベースラインデータの解析を行う。また同時に半年後、1年後と経時的データを集積する。また、実際に運動教室の前後でも尿サンプルを収集し、関節マーカーへの運動の影響をさらに検討する。

22年度にはこれら経時的データを解析し、総合的検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masayo Kojima, Toshihisa Kojima, Naoki Ishiguro, Takeshi Oguchi, Michinari Oba, Hiroki Tsuchiya, Fumiaki Sugiura, Toshiaki A Furukawa, Sadao Suzuki, Shinkan Tokudome. Psychosocial factors, disease status, and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Psychosomatic Research*. in press (2009)
2. Yuji Hirano, Toshihisa Kojima, Yasuhide Kanayama, Hisato Ishikawa, Naoki Ishiguro. A case of lung tuberculosis in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab after anti-tuberculosis chemoprophylaxis

with isoniazid. *Modern Rheumatology*. in press (2009)

3. T Kojima, M Kojima, K Noda, N Ishiguro, AR Poole. Influences of menopause, aging, and gender on the cleavage of type II collagen in cartilage in relationship to bone turnover. *Menopause* 15:133-137, 2008
4. Y Hirano, N Ishiguro, M Sokabe, M Takigawa, K Naruse. Effects of tensile and compressive strains on response of a chondrocytic cell line embedded in type I collagen gel. *J Biotechnol* 133:245-252, 2008 査読有
5. J Wasa, Y Nishida, Y Suzuki, S Tsukushi, Y Shido, K Hosono, Y Shimoyama, S Nakamura, N Ishiguro. Differential expression of angiogenic factors in peripheral nerve sheath tumors. *Clin Exp Metastasis* 25:819-825, 2008 査読有
6. 石黒直樹. 《特集/関節リウマチの新しい治療方針》II 関節リウマチの最新薬物療法と理学療法 1. 薬物療法の基本原則と効果判定法. *整形外科*. 59:870-875, 2008
7. 石黒直樹. リウマチ性疾患. *整形外科* 59: 740-747, 2008
8. 石黒直樹、小嶋俊久、杉浦文昭、土屋廣起、石川尚人. 関節リウマチ治療の新展開. *日整会誌*. 82: 224-229, 2008
9. Nobunori Takahashi, Toshihisa Kojima, H Ogawa, Naoki Ishiguro. Correlation between parathyroid hormone, bone alkaline phosphatase and N-telopeptide of type I collagen in diabetic and non-diabetic haemodialysis patients. *Nephrology* .12 : 539-545, 2007
10. Koshima H, Kondo S, Mishima S, Choi HR, Shimpo H, Sakai T, Ishiguro N: Expression of interleukin-1beta, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 in a rotator cuff tear in rabbits. *J Orthop Res* 2007, 25:92-97
11. T Yamamoto, F Kambe, X Cho, X Lu, N

- Ishiguro, H Seo. Parathyroid hormone activates phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bad cascade in osteoblast-like cells. *Bone* 40:354-359, 2007 査読有
12. H Kitoh, T Kitakoji, H Tsuchiya, M Katoh, N Ishiguro. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone* 40:522-528, 2007 査読有
13. S Tsukushi, Y Nishida, M Takahashi, N Ishiguro. Clavicle pro humero reconstruction after wide resection of the proximal humerus. *Clin Orthop* 447:132-137, 2006 査読有
14. Masui T, Hasegawa Y, Yamaguchi J, Kanoh T, Ishiguro N, Suzuki S: Increasing postural sway in rural-community-dwelling elderly persons with knee osteoarthritis. *J Orthop Sci* 2006, 11:353-358
15. 石黒直樹. 関節リウマチの画像診断: X線所見とその評価法. *カレントセラピー* 2006, 24:13-17
16. 石黒直樹. 関節マーカーとしてのストロメライシン. *リウマチ科* 2006, 35:537-541
17. 石黒直樹. 骨関節疾患と分子マーカー. *分子リウマチ* 2006, 4:89-90
2. 学会発表
1. Hiroshi Kitoh, Motoaki Kawasumi, Naoki Ishiguro.
Distraction osteogenesis of the lower limbs with transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma. 54 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2008. 3. 2-3. 5, San Francisco (USA)
2. 石黒直樹, 小嶋俊久, Robin Poole
The relationship between the cleavage of type II collagen by collagenase and cartilage destruction in osteoarthritis
第52回日本リウマチ学会
2008. 4. 20-4. 23 (札幌)
3. 小嶋俊久, 金山康秀, 平野裕司, 石川尚人, 小嶋雅代, 石黒直樹. 手術治療を行った関節リウマチ患者における生活の質、抑うつ度の検討.
第81回日本整形外科学会学術総会
2008. 5. 22-5. 25
4. 松山幸弘, 酒井義人, 片山良仁, 今釜史郎, 伊藤全哉, 若尾典充, 石黒直樹, 佐藤公治, 加藤文彦, 湯川泰紹, 神谷光広, 見松健太郎
脊髄内腫瘍はいつ手術をおこなうべきか
第37回日本脊椎脊髄病学会
2008. 4. 24-4. 26 (東京)
5. Hiroshi Kitoh, Naoki Ishiguro.
Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma during distraction. osteogenesis-clinical and experimental study-
15 Triennial Congress of Asia Pacific Orthopaedic Association. 2007. 9. 9 ~ 9. 13, Seoul (Korea)
6. Masayo Kojima, Toshihisa Kojima, Naoki Ishiguro, Takeshi Oguchi, Michinari Oba, Hiroki Tsuchiya, Fumiaki Sugiura, Shinkan Tokudome.
Psychological factors and disease status in rheumatoid arthritis patients.
19 World Congress on Psychosomatic Medicine. 2007. 8. 26-8. 31, Quebec (Canada)
7. 石黒直樹
生物学的製剤と整形外科治療
第40回中国・四国整形外科学会
2007. 11. 24-11. 25 (徳島)
8. 石黒直樹
ヒアルロン酸による関節症治療: 生物学的意義と私の治療戦略
第51回日本リウマチ学会
2007. 4. 26-4. 29 (横浜)
9. 石黒直樹
ヒアルロン酸の生理活性と軟骨欠損治療への応用: ヒアルロン酸合成酵素と HA 分子量変化の意

義

第 19 回日本軟骨代謝学会

2006. 3. 3-3. 4 (横浜)

10. 石黒直樹

サイトカイン制御と関節リウマチ：臨床の現状
と将来の方向性

第 38 回日本結合組織学会

2006. 5. 11-5. 12 (前橋)

11. 石黒直樹

関節リウマチの診断と治療の新展開：今後の治
療の方向性

第 79 回日本整形外科学会学術総会

2006. 5. 18-5. 21 (横浜)

12. Yoshihito Sakai, Yukihiro Matsuyama,
Hisatake Yoshihara, Hiroshi Nakamura,
Yoshito Katayama, Zenya Ito, Naoki Ishiguro.
Effect of eperisone hydrochloride in the
paraspinal muscle blood flow-randomized
controlled trial in patients with chronic low
back pain.

33 Annual Meeting of the International
Society for the Study of the Lumbar
Spine. 2006. 6. 13-6. 17, Bergen (Norway)

13. Yoshihiro Nishida, Yoshihisa Yamada,
Satoshi Tsukushi, Kozo Hosono, Lisheng Zhuo,
Masahiko Yoneda, Koji Kimata, Naoki
Ishiguro.

Significance of serum levels of hyaluronan
and hyaluronan binding protein in patients
with primary bone tumors.

12 Annual Conective Tissue Oncology Society
Meering. 2006. 11. 2-11. 4, Venice (Italy)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2008-241066

「肺炎の治療および予防用医薬組成物」

国立大学法人 名古屋大学

共同出願人：エーザイ・アール・アンド・ディ
ー・マネジメント株式会社

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（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

関節液中間葉幹細胞による解析

研究分担者 宗田 大 東京医科歯科大学 大学院 運動器外科学 教授

研究要旨

前十字靭帯損傷膝、変形性膝関節症膝、正常膝から関節液を採取し、14日間培養し、コロニー形成細胞数を計測した。関節液中のコロニー形成細胞は、正常膝にはほとんど存在せず、前十字靭帯損傷膝や変形性膝関節症膝には数多く存在した。前十字靭帯損傷膝では、関節軟骨の損傷・変性の程度とコロニー形成細胞数は正の相関を示した。関節液中のコロニー形成細胞数は関節軟骨の損傷・変性の程度を予測するための指標となりうる。

A. 研究目的

2004年にMcGonagleらは水腫のある変形性関節症(OA)膝の関節液中にコロニー形成細胞が存在し、間葉幹細胞の特性を有することを報告した。

さらに2008年に関節鏡を施行した膝を、軟骨変性の有無で分類し、変性のある膝の関節液中にコロニー形成細胞が多く存在することを報告した。

私たちは2008年に、前十字靭帯(ACL)損傷膝の関節液中には正常膝よりも多くのコロニー形成細胞が存在し、滑膜由来の間葉幹細胞の特徴を有することを報告した。本研究では、関節液中のコロニー形成細胞を定量することにより、軟骨の損傷や変性の程度を予測できるか検討することを目的とする。

B. 研究方法

ACL損傷に対する再建術時に関節液を採取し、また関節鏡視による軟骨損傷・変性の定量化(関節軟骨スコア)を記録した(n=19)。OA膝から関節液を採取し(n=45)、またXpによるOAの重傷度との関連を解析できるように準備した。ボランティアから正常膝の関節液を採取した(n=4)。

関節液は濾過後、細胞成分を6枚のディッシュに播種し、14日間培養後、3枚をクリスタルバイオレットで染色しコロニー形成数を求め、残りの3枚から細胞数を計測した。

(倫理面への配慮)

ACL損傷膝からは関節鏡施行直前に関節液を採取した。OA膝からは、ヒアルロン酸注射施行前、あるいは人工膝関節置換術時に関節液を採取した。本研究を施行するにあたり、本学の倫理委員会に承認を得た。

C. 研究結果

正常膝の関節液中にコロニー形成細胞を認めたのは4例中1例のみであり、その1例も2個のみであった。ACL損傷膝の関節液中に存在する全コロニー数は平均373±378個であった。ACL再建術時の関節軟骨スコアと全コロニー数は正の相関を示した。またACL再建術時の関節液量と全コロニー数は正の相関を示した。OA膝の関節液中に存在する全コロニー数は平均835±798個であった。OA膝の関節液量とコロニー形成数は正の相関を示した。

D. 考察

コロニー形成細胞は正常膝の関節液中にはほとんど存在しない一方、ACL損傷膝及びOA膝の関節液中にはその数百倍存在した。またACL再建時の軟骨損傷程度とコロニー形成細胞数は相関した。ACL切除モデルは多くの動物で外傷性関節症モデルとして用いられている。これらのことは、コロニー形成細胞数が軟骨損傷の指標となりうることを示す。今後OA膝のXpによる重傷度とコロニー形成細胞数との関係を解析する予定である。

ACL損傷膝、OA膝ともに関節液量とコロニー形成細胞数の間に正の相関を認めた。過去の報告からコロニー形成細胞は滑膜由来の間葉幹細胞であり、膝関節内の組織恒常性や修復に寄与するものと推察される。本研究は水腫を伴う膝には多くの間葉幹細胞が存在し、それが修復に寄与する機序の存在を示唆する。

E. 結論

関節液中のコロニー形成細胞は、正常膝にはほとんど存在せず、ACL損傷膝やOA膝には多く存在した。ACL損傷膝では、軟骨損傷・変性とコロニー形成細胞数は相関した。関節液中のコロニー形成細胞数は関節軟骨の損傷・変性の程度を予測するための指標となりうる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

複数の既知マーカーの組み合わせによる変形性関節症の病態評価
およびバイオマーカーの関節組織における発現の検討

研究分担者 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:変形性関節症(OA)の進行抑止法を確立するためには病態を正確に示す surrogate marker の確立が必要である。OAの病態と関連するマーカーの探索は従来から試みられてきたが、現在までに単独で病態とよく相関する因子は見出されていない。本研究の目的は第一にOAの病態との相関が既に報告されている複数の因子を同時に測定し、その値を組み合わせることによってOAの病態をより高い精度で反映する指標を確立することである。研究初年度の本年は膝関節のOA症例を対象に、病態と臨床所見の経時的変化を知り検体を収集するためのフォローアップを開始した。また得られた検体について予備的な計測を行い、測定可能な項目の絞込みを行った。また本研究ではマーカーのOA関節における発現解析によって、OAの病態を解明するための手がかりを得ることを第2の目的とする。このため20例の末期OA膝関節より滑膜を採取してマイクロアレイによる遺伝子発現の解析を行った。

A. 研究目的

変形性関節症(OA)はわが国においてもっとも患者数が多い関節疾患であるが、その進行を食い止め、自然経過を変えうる治療法は確立されていない。その理由の一つはOAの病態を客観的に評価する方法が確立されていないことにある。OAの進行抑止法を確立するためにも、OAの予後や重症度を高い精度で示すバイオマーカーを確立することが重要である。

OAの病態(重症度あるいは進行速度)と関連するバイオマーカーを見出す試みは従来からなされており、今までに病態と有意に相関する因子が複数報告されている。しかしこれらの因子はいずれも病態との相関がそれほど高いものでなく、現在までのところ単独で高い精度でOAの病態を示しうるマーカーは確立されていない。本研究の目的は第一にすでに報告されたOAのバイオマーカー(以下既知マーカー)を複数測定し、それらを最適な重み付けをした上で組み合わせることによってOAの病態をより正確に評価しうる指数を確立することである。

またOAの病態とよく関連するマーカーが見出された場合、その因子のOA関節の

各組織における発現を探ることでOAの病態が新たな方向から解明されることが期待される。このため本研究では指数の確立とともにOA罹患関節から採取した軟骨、滑膜におけるマーカー因子の発現についても検討することとした。

B. 研究方法

1. 膝関節OAの症例50例を目標に2年間にわたって6ヶ月ごとに血液(血清、血漿)、尿、画像(片脚立位、膝伸展位と45度屈曲位での単純X-p前後像)、専用のチャートによる臨床所見、Japanese Knee Osteoarthritis Measure (JKOM; Akai M, et al. *J Rheumatol* 2005)による患者の自覚的な愁訴を記録する。個々の症例におけるOAの重症度と2年間の進行の速度を単純X-pで評価し、これと血液、尿中の既知マーカーの変動を関連付けてROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を行うことによってOAの進行と最もよく相関するバイオマーカー2~4個程度の組み合わせを見出し、これらによる病態の評価指数を確立する。

計測を予定する既知マーカーは以下に示す19項目(血液15項目、尿4項目)で、

測定はいずれも市販の ELISA キットにより行うこととした。

□血液：MMP-3、MMP-8、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2、COMP、ヒアルロン酸、CPII (C-terminal propeptide of type II collagen)、CIANP (N-terminal propeptide of type IIA collagen)、YKL-40、高感度 CRP、アグリカン*、ケラタン硫酸*、PGE2、CS846、

□尿：CTX-II (C-terminal crosslinking telopeptide of type II collagen)、CII neo-epitope、アグリカン*、ケラタン硫酸*
(注：*の2項目については血液、尿の両方で測定。また尿中のマーカーについては尿中クレアチニン濃度で標準化する)

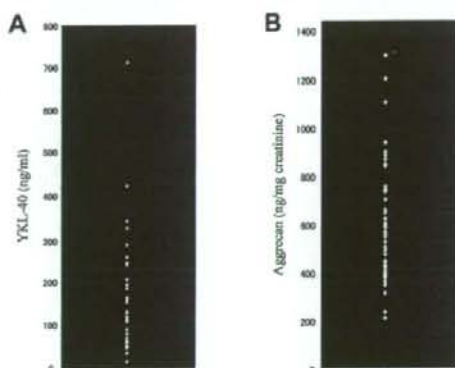
2. 既知マーカーの OA 関節各組織における発現解析は、他の遺伝子とマーカーの発現の関係を網羅的に評価できる利点を考えて cDNA マイクロアレイにより行うこととした。今年度は滑膜に関する解析を行った。末期 OA 膝関節 20 関節 (20 例) から採取した滑膜組織から RNA を抽出して遺伝子発現を cDNA マイクロアレイ (Whole Human Genome, Agilent 社) により包括的に解析し、既知の OA マーカーと OA の進行に関連する可能性のある因子の発現の相関を検討した。

(倫理面の配慮)

研究への参加および血液、尿、組織などの検体の採取は患者本人に対して研究の目的、研究参加に伴う利益・不利益の有無、研究参加拒否が患者本人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、研究参加の同意の撤回が後日でも可能なこと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、個人情報は別に情報管理者を設定して管理した。

C. 研究結果

1. 現在までに膝 OA 症例 46 例についてフォローを始めており、6 ヶ月ごとの血液、尿、画像、臨床情報の取得を開始している。マーカーの計測については本年度は得られた検体の一部 (20~32 検体) について予備的な検討を行った (図 1)。その結果、血清中の MMP-3、MMP-8、MMP-9、CS846、また尿中 C2C について市販の ELISA ではおもに感度の点で計測が十分行えない可能性が明らかになった。これらの因子のうち MMP-3、CS846 については今までに複数の



論文で OA 患者における計測結果が報告されており、計測のプロトコールなどを検討した上で再度測定を試みる予定である。

図 1. 血清中 YKL-40 (A) および尿中 aggrecan (B) の計測結果。後者については尿中クレアチニン濃度で補正した値を示した。

2. 20 症例の滑膜のマイクロアレイのデータから症例間で既知の OA マーカーと OA の病態に關与する可能性のある因子 (タンパク分解酵素と内因性阻害剤、サイトカイン、ケモカインおよびその受容体) の発現の相関を検討した。この結果、OA では滑膜において COMP と MMP-2 の発現、また YKL-40 と MMP-1、3 の発現がそれぞれ有意に相関するという結果を得た (図 2)。

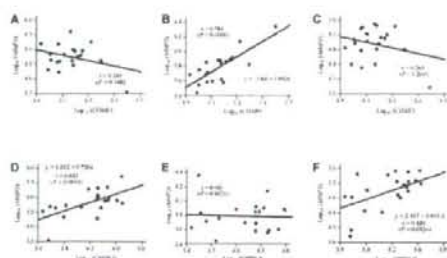


図 2. マイクロアレイの解析結果。20 例の滑膜における COMP と MMP-1~3 の発現 (A-C) および YKL-40 と MMP-1~3 の発現 (D-F) の関連を散布図で示した。COMP と MMP-2 (B), YKL-40 と MMP-1, 3 の間 (D, F) に有意の相関が見られた。

D. 考察

OA の病態、とくに進行と関連するマーカーの確立は、OA の進行が緩やかであることから長期にわたる研究期間を必要とする。本年度は OA 症例からの検体収集を開始したばかりであり、病態と各マーカーとの関連は次年度以降に本格的に検討されることになる。また本年度はマイクロアレイを用いた滑膜における遺伝子発現の解析を行ったが、この結果も今後病態との関連性が高いマーカーが明らかになった段階で定量的 PCR による解析を含めて最終的な検討を行う予定である。今後関節軟骨における遺伝子発現のアレイ解析も行い、軟骨についても滑膜と同様の解析を行うことを予定している。

一方、OA の病態に伴うマーカーの変動を的確に評価するためには OA 症例と同等の年齢の健常者におけるマーカーの値を知ることが必要である。健常者からの検体の採取については現在倫理的な側面も含めて検討を進めているところであり、次年度中の検体の採取・計測を予定している。

E. 結論

既知の複数のバイオマーカーの組み合わせによる OA の病態指数の確立を目指して OA 症例のフォローアップを始め、検体の

収集を開始した。19 個の因子について予備的な計測を行い、うち 14 個について計測が実際に可能なことを確認した。また OA 関節の滑膜における遺伝子発現を cDNA マイクロアレイで網羅的に解析し、既知の OA マーカーと他の遺伝子の発現の関連について予備的な検討を行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, et al. (15 名中 1 番目) Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis. A detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum* 58:154-163, 2008.
2. Yamane S, Ishida S, Fukui N, et al. (13 名中 11 番目). Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. *J Inflamm* 2008 (<http://www.journal-inflammation.com/content/5/1/5>).
3. Ishida S, Yamane S, Fukui N, et al. (9 名中 7 番目). LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritic synovial fibroblasts via lymphotaxin β receptor. *J Rheumatol* 35:960-968, 2008.
4. Miyamoto Y, Shi D, Fukui N, et al. (14 名中 9 番目) Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nat Genet* 40:994-998, 2008.
5. Fukui S, Ogawa K, Ohtsuka M, Fukui N. A randomized study assessing efficacy of communication skill training on patients' psychologic distress and coping: Nurses' communication with patients just after being diagnosed with cancer. *Cancer* 113:1462-1470, 2008.
6. Kishimoto I, Mitomi H, Ohkura Y, Fukui N, et al. (6 名中 5 番目) Abnormal expression of p16^{INK4a}, cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4

and retinoblastoma protein in gastric carcinomas. *J Surg Oncol* 98:60-66, 2008.

7. Fukui N, Miyamoto Y, Nakajima M, et al. (15名中1番目) Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 58:3843-3853, 2008.

8. Tanaka K, Horikawa T, Fukui N, et al. (11名中10番目). Inhibition of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 reduces the severity of collagen-induced arthritis. *J Rheumatol* 35:2316-2324, 2008.

9. Mitomi H, Kishimoto I, Fukui N, et al. (9名中8番目) Advanced gastric cancer showing long-term complete remission in response to S-1 monotherapy: two case reports. *Cases J* 2008 (<http://www.casesjournal.com/content/1/1/405>).

10. Nakajima K, Kakihana W, Fukui N, et al. (10名中ラスト) Addition of an arch support improves the biomechanical effect of a laterally wedged insole. *Gait and Posture* 29:208-213, 2009.

11. Ishida S, Yamane S, Fukui N, et al. (13名中10番目) The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology* (in press)

2. 学会発表

1. Fukui N, Miyamoto Y, Nakajima M, Ikeda Y, Hikita A, Furukawa H, Mitomi H, Tanaka N, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Juji T, Mori T, Suzuki R, Ikegawa S. Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. 2008 World Congress on Osteoarthritis Roma, Italy. September, 2008.

2. Nakajima K, Kakihana W, Nakagawa T, Mitomi H, Hikita A, Suzuki R, Akai M, Iwaya T, Nakamura K, Fukui N. Addition of an arch support improves the biomechanical effect of a laterally wedged insole. 2008 World Congress on Osteoarthritis Roma, Italy. September,

2008.

3. Fukui N. Altered chondrocyte metabolism in osteoarthritic cartilage. Can it be normalized? 13th Congress on the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, September, 2008.

4. 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. 第7回日本再生医療学会総会 2008年3月、名古屋

5. 福井尚志、池田泰子、大貫俊幸、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. ヒト変性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.

6. 福井尚志、池田泰子、疋田温彦、三富弘之、十字塚夫、森俊仁、桂川陽三、宮本恵成、山本精三、鈴木隆二. インテグリンの活性抑制は変形性関節症罹患軟骨における病的コラーゲンの発現を軽減し、培養軟骨細胞の脱分化を抑制する. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会. 2008年10月、京都.

7. 福井尚志、宮本恵成、中島正弘、池田泰子、疋田温彦、三富弘之、森俊仁、鈴木隆二、桂川陽三、山本精三、池川志郎. 変形性関節症罹患軟骨における軟骨細胞の代謝活性の検討 - マイクロアレイによる軟骨各層の遺伝子発現の解析結果から -. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会. 2008年 10月、京都.

8. 福井尚志. 変形性関節症における軟骨細胞の基質産生の変化-軟骨細胞の基質産生の正常化は可能か?- . 第26回日本骨代謝学会学術集会. 2008年10月、大阪.

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)

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishimura D, Yamamoto N, Tajima K, Ohno A, Yamamoto Y, Washimi O, Yamada H	Differentiation of adipose-derived stromal vascular fraction culture cells into chondrocytes using the method of cell sorting with a mesenchymal stem cell marker.	Tohoku J Exp Med.	216	149-156	2008
山田治基, 森田充浩, 金治有彦, 小崎直人, 伊達秀樹, 石村大輔, 前原一之, 早川和恵	変形性関節症 医療現場での最新治療と新薬開発	ファームステージ	7-10	46-51	2008
伊達秀樹, 山田治基, 森田充浩, 金治有彦, 市瀬彦聡, 早川和恵, 田島香里, 宮崎匡輔, 増田広之	血清マーカーによる変形性関節症の病態評価、進行予知	別冊整形外科	53	60-66	2008
山田治基, 森田充浩	股関節疾患由来の股関節痛の治療-変形性股関節症-	MB Orthop	21-8	45-54	2008
森田充浩, 山田治基, 伊達秀樹	軟骨代謝マーカー	THE BONE	22	377-380	2008
Yoshimura N, Kinoshita H, Oka H, Muraki S, Mabuchi A, Kawaguchi H, Nakamura K, Nakamura T	Association between height loss and bone loss, cumulative incidence of vertebral fractures and future QOL: The Miyama Study.	Osteoporos Int	19	21-28	2008
Oka H, Muraki S, Akune T, Mabuchi A, Suzuki T, Yoshida H, Yamamoto S, Nakamura K, Yoshimura N, Kawaguchi H	Fully automatic quantification of knee osteoarthritis severity on standard radiographs.	Osteoarthritis Cartilage	16	1300-1306	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Muraki S, Oka H, Mabuchi A, Akune T, Enyo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N	: Prevalence of radiographic lumbar spondylosis and its association with low back pain in the elderly of population-based cohorts: the ROAD study	Ann Rheum Dis,	in press		
Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kinoshita H, Yoshida M, Mabuchi A, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T	Epidemiology of lumbar osteoporosis and osteoarthritis and their causal relationship - Is osteoarthritis a predictor for osteoporosis, or vice-versa?: The Miyama Study,	Osteoporos Int	in press		
Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, Akune T, Enyo Y, Yoshida M, Saika A, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N	Association of occupational activity with radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in the elderly of population-based cohorts: the ROAD study.	Arthritis Rheum	in press		
吉村典子、岡敬之、村木重之、阿久根徹、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。	Osteoporos Jpn	16	40-44	2008
Matsuhashi T, Iwasaki N, Nakagawa H, Majima T, Hato M, Kurogouchi M, Minami A, Nishimura S	Alteration of N-glycans related to articular cartilage deterioration after anterior cruciate ligament transection in rabbits.	Osteoarthritis and Cartilage	16	772-778	2008
石黒直樹	《特集／関節リウマチの新しい治療方針》Ⅱ関節リウマチの最新薬物療法と理学療法1. 薬物療法の基本原則と効果判定法。	整形外科	59	870-875	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
石黒直樹、小嶋俊久、 杉浦文昭、土屋廣起、 石川尚人	関節リウマチ治療の 新展開	日整会誌	82	224-229	2008
石黒直樹	VI, リウマチ性疾患	整形外科	59	740-747	2008
Karolina Anna Siwicka, Hiroshi Kitoh, Masaki Nishiyama, Naoki Ishiguro	A case of mesomelic dysplasia Kantaputra tyoe- new findngs and a new diagnostic approach	J Pediatric Orthopaedics	17	271-276	2008
Motoaki Kawasumi, Hir oshi Kitoh, Karolina Anna Siwicka, Naoki I shiguro	The effect of the platelet concentration in platelet- rich plasma gel on the regeneration of bone	J BONE JOINT SURG BR	90-B	966-972	2008
Hiroshi Kitoh, Takahiko Kitakoji, Motoaki Kawasumi, Naoki Ishiguro	A histological and ultrastructural study of the iliac crest apophysis in legg-calve-perthes disease	J Pediatr Orthop	28	435-439,	2008
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
Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Mauda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.	Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients.	J Inflamm	http://ww w. journal -inflamma tion.com/ content/5 /1/5		2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, <u>Fukui N</u> , Itoh T, Suzuki R.	LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritic synovial fibroblasts via lymphotaxin β receptor.	J Rheumatol	35	960-968	2008
Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M, Ozaki K, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Tanaka T, <u>Fukui N</u> , Tsunoda T, Takahashi A, Nakamura Y, Jiang Q, Ikegawa S.	Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis.	Nat Genet	40	994-998	2008
Fukui S, Ogawa K, Ohtsuka M, <u>Fukui N</u> .	A randomized study assessing efficacy of communication skill training on patients' psychologic distress and coping: Nurses' communication with patients just after being diagnosed with cancer.	Cancer	113	1462-1470	2008
Kishimoto I, MitomiH, Ohkura Y, Kanazawa H, <u>Fukui N</u> , Watanabe M.	Abnormal expression of p16 ^{INK4a} , cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 and retinoblastoma protein in gastric carcinomas.	J Surg Oncol	98	60-66	2008
<u>Fukui N</u> , Miyamoto Y, Nakajima M, Ikeda Y, Hikita A, Furukawa H, MitomiH, Tanaka N, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Juji T, Mori T, Suzuki R, Ikegawa S.	Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage.	Arthritis Rheum	58	3843-3853	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, <u>Fukui N</u> , Ochi T.	Inhibition of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 reduces the severity of collagen-induced arthritis.	J Rheumatol	35	2316-2324	2008
Mitomi H, Kishimoto I, Amemiya A, Kaneda G, Adachi K, Shimoda T, Takigawa M, <u>Fukui N</u> , Ohkura Y.	Advanced gastric cancer showing long-term complete remission in response to S-1 monotherapy: two case reports.	Cases J	(http://www.casesjournal.com/content/1/1/405).	405	2008
Nakajima K, Kakihana W, Nakagawa T, Mitomi H, Hikita A, Suzuki R, Akai M, Iwaya T, Nakamura K, <u>Fukui N</u> .	Addition of an arch support improves the biomechanical effect of a laterally wedged insole.	Gait and Posture	29	208-213	2009
Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, <u>Fukui N</u> , Itoh T, Ochi T, Suzuki R.	The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction.	Immunology	in press		

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Differentiation of Adipose-derived Stromal Vascular Fraction Culture Cells into Chondrocytes Using the Method of Cell Sorting with a Mesenchymal Stem Cell Marker

DAISUKE ISHIMURA,¹ NAOKI YAMAMOTO,² KAORI TAJIMA,¹ AYUMI OHNO,¹
YASUHIRO YAMAMOTO,¹ OSUKE WASHIMI¹ and HARUMOTO YAMADA¹

¹Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Fujita Health University, Aichi, Japan

²Laboratory of Molecular Biology and Histochemistry, Joint Research Laboratory, Fujita Health University, Aichi, Japan

The incidence of arthritic diseases is rapidly increasing in most advanced countries. Articular cartilage, which is the most important tissue in the joint, consists of chondrocytes and abundant extracellular matrix, including aggrecan, and shows poor self-repair. We studied the potential of stem cells in mouse subcutaneous adipose tissue as a source of cells to regenerate cartilage tissue. Analysis of adipose-derived stromal vascular fraction culture cells (ADSVFs) using mesenchymal stem cell markers showed that CD90-positive cells accounted for 93.8%, CD105-positive cells for 68.5%, and p75 neurotrophin receptor (p75NTR, CD271)-positive cells for 36.1%. These results indicate that cells positive for mesenchymal stem cell markers are present in ADSVFs. The CD105-positive or -negative cells were isolated from ADSVFs by magnetic cell separation (MACS), and the efficiency of differentiation into chondrocytes was compared with using three methods of pellet method, gel-coating method, and gel-embedding sheet method. Using the CD105-positive cells and the gel-embedding sheet method, aggrecan mRNA was detected about three times higher than pellet and gel-coating methods. The above data suggest that ADSVFs could be differentiated into chondrocyte-like cells in the gel-embedding sheet method and could be useful in regenerative medicine to treat cartilage defects or cartilage degenerative disease. The use of cells sorted by mesenchymal stem cell markers from adipose tissue would gain position in the repair of cartilage tissue. ——— chondrocyte; adipose-derived stromal vascular fraction culture cells (ADSVFs); CD105; mesenchymal stem cell; gel-embedding sheet.

Tohoku J. Exp. Med., 2008, 216 (2), 149-156.

© 2008 Tohoku University Medical Press

Articular cartilage is hyaline cartilage consisting of chondrocytes and abundant extracellular matrix (mainly type II collagen and aggrecan).

Blood vessels, nerves, and lymph are absent in cartilage tissues, and the movement of chondrocytes is markedly inhibited by the surrounding

Received June 25, 2008; revision accepted for publication August 28, 2008.

Correspondence: Naoki Yamamoto, Laboratory of Molecular Biology and Histochemistry, Joint Research Laboratory, Fujita Health University, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake-city, Aichi 470-1192, Japan.
e-mail: naokiy@fujita-hu.ac.jp