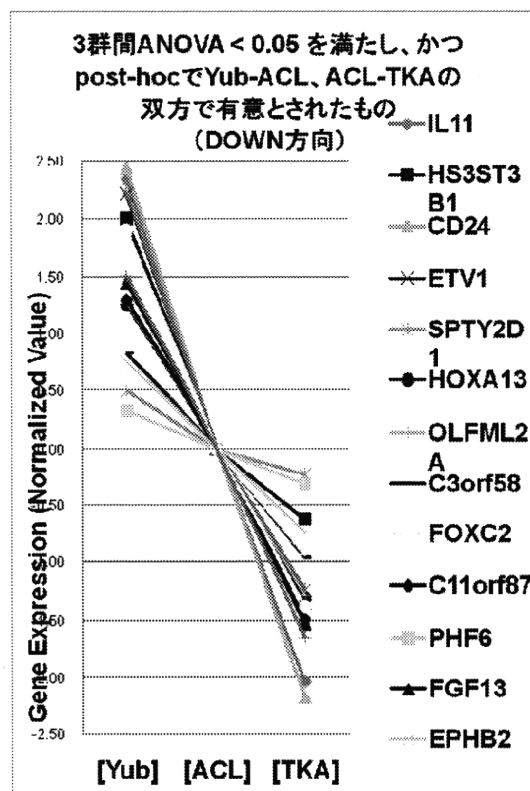


(Fig.1)



(Fig2)

Gene name	Gene symbol	Fold change
signal peptide CUB domain EGF-like 1	SCUBC1	3.56/2.33
acyl-CoA thioesterase 4	ACOT4	1.41/1.68
transmembrane protein 140	TMEM140	1.83/1.63
integral membrane protein 28	ITM28	1.36/1.21
piggyBac transposable element derived 3	PGBD3	1.26/1.45
uncharacterized serine/threonine-protein kinase Sgk494	FLJ25006	1.51/1.30
Notch homolog 2	NOTCH2	1.18/1.25
stromal antigen 3-like 2	STAG3L2	1.43/1.44
hypothetical LOC79150	MGC4859	1.26/1.18
highly accelerated region 1B	HAR1B	1.83/1.57
adrenergic, alpha-2A	ADRA2A	4.02/3.38
KIAA1377	KIAA1377	1.41/1.45
protocadherin beta 2	PCDH2	1.92/1.83
MAP7 domain containing 3	MAP7D3	1.28/1.32
small nucleolar RNA H/ACA box 53	SNORA53	1.58/1.58

(Yub<ACL<TKAと発現が上昇する遺伝子)

(Fig3)

Gene name	Gene symbol	Fold change
interleukin 11	IL11	0.20/0.24
heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 3B1	HS3ST3B1	0.25/0.65
CD24 molecule	CD24	0.18/0.22
ets variant 1	ETV1	0.22/0.39
SPT2 Suppressor of Ty domain containing 1	SPTY2D1	0.71/0.85
homeobox A13	HOXA13	0.42/0.40
olfactomedin-like 2	OLFML2A	0.35/0.41
chromosome 3 open reading frame 58	C3orf58	0.57/0.51
forkhead box C2	FOXC2	0.41/0.52
chromosome 11 open reading frame 87	C11orf87	0.41/0.35
PHD finger protein 6	PHF6	0.80/0.80
fibroblast growth factor 13	FGF13	0.37/0.35
EPH receptor B2	EPHB2	0.60/0.60
formin 2	FMN2	0.21/0.42
chromosome 4 open reading frame 22	C4orf22	0.27/0.40
HCG2045830	HCG_2045830	0.35/0.32

(Yub<ACL<TKAと発現が上昇する遺伝子)

(Fig4)

2. GE と miRNA の統合結果

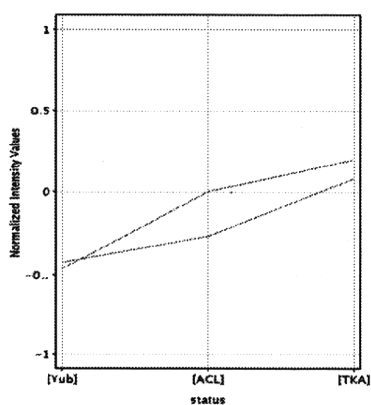
GE と miRNA の相関関係を確認するために GE と miRNA で共通して変動するプローブを抽出したところ Yub・ACL・TKA の 3 群間で ANOVA 検定を行い有意差の出るプローブを抽出し 3695 プローブが検出された。この 3695 プローブについて変動一貫性を有するプローブを抽出したところ段階的に上昇していくプローブとして 1051 プローブ、段階的に低下していくプローブとして 707 プローブが抽出された。

miRNA でも同様に Yub・ACL・TKA の

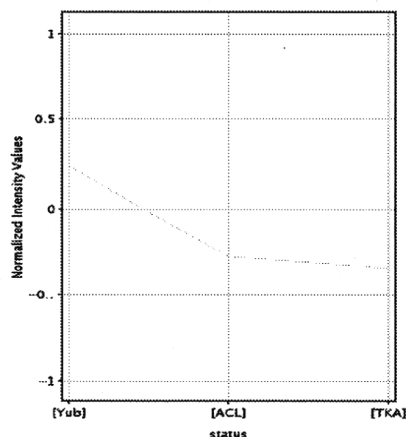
3 群間で ANOVA 検定を行い有意差の出るプローブを抽出したところ 29 のプローブが抽出され、この 29 のプローブのうち変動一貫性を有するプローブを抽出したところ段階的に上昇していくプローブとして 2 プローブが (Fig5)、段階的に減少していくプローブとして 1 プローブが検出された (Fig6)。

GE・miRNA 解析結果を統合し共通して変動するプローブを抽出したところ GE で低下し miRNA で上昇するプローブは 22 プローブであり (Fig7) 17 遺伝子が検出された。この 17 遺伝子のうち hsa-miR-a に制御されているのが 7 遺伝子、hsa-miR-b に制御されているのが 10 遺伝子であった (Fig9)。

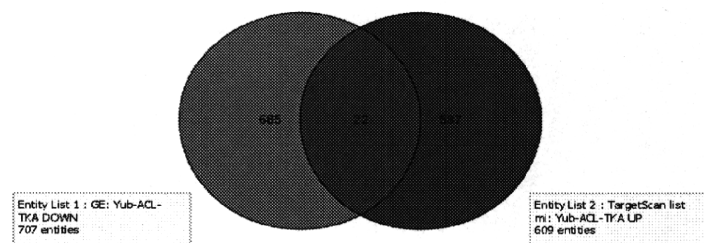
GE で上昇するプローブと miRNA で低下するプローブを統合したところ 19 プローブ (Fig8) 19 遺伝子が抽出された。この 19 遺伝子は hsa-miR-c の 1 つにより制御されていた (Fig10)。



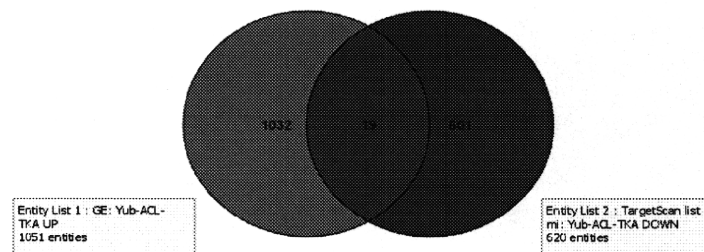
(Fig5)



(Fig6)



(Fig7)



(Fig8)

Probe name	miRNA	Gene Symbol
A_33_P3619171	hsa-miR-b	PMAIP1
A_23_P19987	hsa-miR-a	IGF2BP3
A_23_P134125	hsa-miR-a	MAP3K5
A_23_P47614	hsa-miR-b	PH-LDA2
A_33_P3357949	hsa-miR-b	ETV1
A_32_P78491	hsa-miR-b	ETV1
A_23_P502312	hsa-miR-b	CD97
A_33_P3401156	hsa-miR-b	ETV1
A_23_P307392	hsa-miR-a	DPP3
A_33_P3389188	hsa-miR-a	TFAM
A_32_P192376	hsa-miR-b	LYPP1
A_23_P30655	hsa-miR-b	NFKB1
A_33_P3276475	hsa-miR-a	C17orf113
A_23_P48339	hsa-miR-b	IFIT8
A_33_P3408320	hsa-miR-b	LASS1
A_23_P30995	hsa-miR-a	CY5B1
A_33_P3377130	hsa-miR-a	MAP3K5
A_32_P12620	hsa-miR-b	L2f6
A_33_P3357054	hsa-miR-b	ETV1
A_23_P88580	hsa-miR-b	ARID3B
A_32_P160883	hsa-miR-a	NLDD4
A_23_P156880	hsa-miR-a	ENPP1

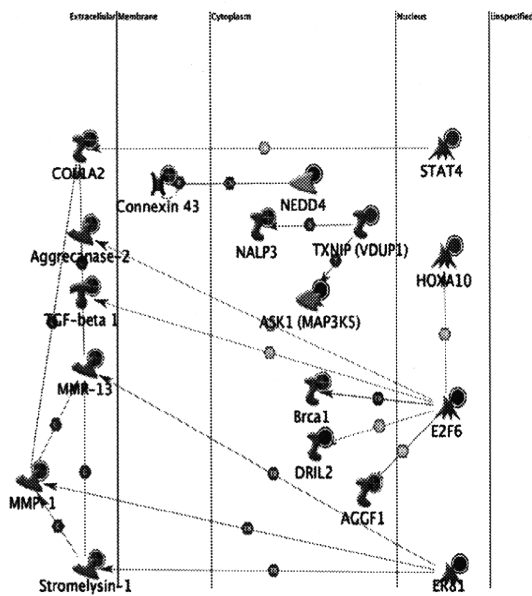
(Fig9)

Probe name	miRNA	Gene Symbol
A_23_F329158	hsa-miR-c	ODF2A
A_32_F181638	hsa-miR-c	SVE5
A_23_F06031	hsa-miR-c	SIAI4
A_33_F3312162	hsa-miR-c	C10orf47
A_23_F62590	hsa-miR-c	DGN
A_33_F3519683	hsa-miR-c	ZBTB305
A_23_F77904	hsa-miR-c	HQSA10
A_33_F3231297	hsa-miR-c	CHEG1
A_23_F09838	hsa-miR-c	ZNF223
A_23_F127140	hsa-miR-c	DAB1IP2
A_23_F215084	hsa-miR-c	ZNF3
A_33_F3259113	hsa-miR-c	COX11
A_23_F309865	hsa-miR-c	ZNF449
A_23_F81550	hsa-miR-c	LSO1L5
A_33_F3304272	hsa-miR-c	MEM134
A_23_F97700	hsa-miR-c	TXNP
A_23_F12896	hsa-miR-c	PARE1
A_23_F343396	hsa-miR-c	CCR7
A_33_F352537	hsa-miR-c	TK2

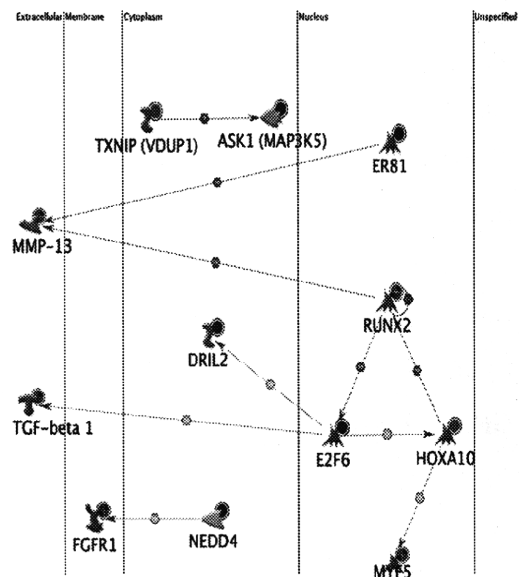
(Fig10)

3. 段階的に変動していく miRNA と OA 関連遺伝子・軟骨関連遺伝子とのパスウェイ解析

Metacore より検出した OA 関連遺伝子・軟骨関連遺伝子と miRNA が制御している遺伝子との関連を解析し GenMAPP のパスウェイ情報を用いてパスウェイ解析を行った。



(Fig11)



(Fig12)

D. 考察

マイクロアレイの結果 Yub<ACL>TKA と発現が上昇していく遺伝子が 17 遺伝子、Yub> ACL>TKA と発現が低下していく遺伝子が 16 遺伝子抽出できた。抽出された遺伝子のうち文献的に軟骨代謝に関与していると確認できたのは 4 種類であった。Foxc2 は胚形成や細胞分化を制御する転写因子であり、BMP2,4,7 によって発現が制御され幹細胞にも存在し早期の軟骨分化に関与している。[4] IL11 は TGFβ1、IL1β により誘導され軟骨細胞や滑膜細胞でのメタロプロテアーゼの産生を刺激させる。しかし、軟骨細胞の増殖やストロムライシンの活性化を上昇させることには影響せずに関節保護作用に寄与している。[5] FGF13 は軟骨・骨形成に関与する遺伝子で他にも神経分化や胚形成にも関与しているとされている。OA 軟骨では中間層に多

く発現している。^[6] FGF13 は OA 膝の正常部軟骨部と軟骨損傷部では正常軟骨の FGF13 発現が損傷軟骨部に比べて 4.47 倍高かったとされており、いずれも OA との関連性が報告されている。^[6]

ETV1 は MSC 特有の転写因子として報告されており、繊維芽細胞・軟骨細胞・滑膜細胞・脂肪細胞と比べて約 5~10 倍発現が上昇している。^[7] また、ETV1 を Si によるノックダウンをしたところ MSC の自己再生能が抑制された。^[7]

Yub・ACL・TKA間で共通して変動する遺伝子・miRNA を抽出するため GE-miRNA 統合解析を行ったところ Yub>ACL>TKA と発現が上昇していく miRNA は 1 種類であり hsa-miR-c により 19 種類の遺伝子が制御されていた。Yub<ACL<TKA と発現が上昇していく miRNA は 2 種類であり hsa-miR-a により 7 種類の遺伝子が、hsa-miR-b により 10 種類の遺伝子が制御されていることが明らかとなった。

そこで、OA 関連遺伝子・軟骨関連遺伝子と miRNA に制御されている遺伝子の関係性を調べるためにパスウェイ解析を行ったところ (Fig11) hsa-miR-b に制御されている ER81 (ETV1) は OA 関連遺伝子である MMP-1, Stromelysin-1, PLAU, MMP-13 を positive feedback していた。同様に hsa-miR-b に制御されている E2F6 遺伝子については経路不明であるが

aggrecanase-2, TGFβ1 の feedback に関与している可能性があり、hsa-miR-b は軟骨代謝に関与している可能性が示唆された。また、hsa-miR-a に制御されている NEDD4 は OA 関連遺伝子である Connexin43 を negative feedback しており軟骨代謝に影響している可能性が考えられた。さらに、miRNA に制御されている遺伝子と軟骨関連遺伝子とのパスウェイ解析では (Fig12) hsa-miR-c に制御されている HOXA10 は RUNX2 を介して MMP13 を制御しており軟骨代謝に関与している可能性が考えられた。

最近の研究でいくつかの miRNA は組織特異的に発現し、発育やガン・心臓病・糖尿病・リウマチなどの疾病に様々な生物学的事象に大きな影響を与えていることが明らかになってきている。^[8-12] しかし、miRNA に制御されている分子についてはあまりわかっていない。miRNA は組織特異的に発現しているものもあり軟骨と関連がある miRNA についても報告はされている。miR140 は IGFBP-5 を制御しており miR27a は IGFBP-5 と MMP13 を制御し変形性関節症の発症に影響していると言われている。^[13] miR140 は OA で発現が低下し、軟骨細胞に miR 140 を導入したところ IL-1β により活性化された ADAMTS5 の発現が抑制されたなど軟骨細胞を保護していると報告されている。^[14]

miRNA の中でも miRNA-a はマウスモデルにて Smad 1 を介して軟骨分化を抑制していると報告されており^[15] 今回の結果と

同様なものとなっている。miRNA-a過剰発現マウスではCol2A1・COMP・SOX9の発現を抑制し、miRNA-a抑制マウスではこれらの発現が上昇していたことから主にanabolic factorに大きく関与している。^[15]miRNA-aは軟骨変性に寄与しておりヒトにおいても軟骨代謝に影響している可能性が考えられ、miR-b・miR-cは現在どのような経路で軟骨関連に影響しているかは不明であるが年齢により発現が変化しており軟骨代謝に寄与している可能性が示唆された。今後は、今回抽出されたmiRNAがヒトでの軟骨組織に影響を与えているかを検討するため、追加実験として段階的に変動するmiRNAの発現を増加・低下させ、遺伝子発現をReal time PCR、細胞増殖能をMTTassay、細胞外基質産生能をGAGassayなどで評価していく予定である。

E. 結論

年齢により発現が変動する遺伝子とmiRNAを抽出することができた。抽出されたmiRNAであるhsa-miR-a、hsa-miR-b、hsa-miR-cのうちhsa-miR-aはマウスでの軟骨代謝に関与しておりヒトの軟骨代謝にも影響している可能性が示唆された。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 参考文献

1.Ikegawa S et al: An aspartic acid repeat polymorphism in asporin

negatively affects chondrogenesis and increase susceptibility to osteoarthritis. Nat Genet 37:138-144,2005.

2.Mototani H et al: A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. Hum Mol Genet 14:1009-1017,2005

3.Lewis BP et al: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are micro RNA targets. Cell 2005;120:15-20

4.Nifuji A et al: Bone Morphogenetic Protein Regulation of Forkhead/Winged Helix Transcription Factor Foxc2(Mfh1) in a Murine Mesodermal Cell Line C1 and in Skeletal Precursor Cells: Journal of bone and mineral research 2001;16:1765-1771

5.Rainer M et al: Interleukin-11, an Inducible Cytokine in Human Articular Chondrocyte and Synoviocytes, Stimulates the Production of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases; 1993;268:21527-2153

6. Sato T et al: Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in Intact and Damaged Regions of Human Osteoarthritic Cartilage: Arthritis & Rheumatism 2006;54:808-817

7.Esqueda-Kerscher A et al: microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer

2006;6:259-69.

8. Van Rooij E et al: A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:18255-60

9. Poly MN et al: A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;432:226-30

10. Nasaka T et al: Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2008;58:1284-92

11. Stanczyk J et al: Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1001-9

12. Kubo H et al: Identification of mesenchymal stem cell(MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analysis, and signature molecule-marked msc in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes to Cells* 14:407-424, 2009

13. Ginette T et al: Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskeletal Disorders* 10:148,1471-2474. 2009

14. Elisa A et al: MicroRNA-140 and the silencing of osteoarthritis. *Genes and development* 24:1075-1080, 2010

15. Edward A et al: miR-199a, a Bone Morphogenic Protein 2-responsive MicroRNA, Regulates Chondrogenesis via Direct Targeting to Smad1

H. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

- 1) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient Generation of Hepatoblasts From Human ES Cells and iPS Cells by Transient Overexpression of Homeobox Gene HEX. *Mol Ther.* 2011; 19(2): 400-407.
- 2) Chowdhury MM, Katsuda T, Montagne K, Kimura H, Kojima N, Akutsu H, Ochiya T, Fujii T, Sakai Y. Enhanced effects of secreted soluble factor preserve better pluripotent state of embryonic stem cell culture in a membrane-based compartmentalized micro-bioreactor. *Biomed Microdevices.* 2010; 12(6):1097-1105.
- 3) Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A,

- Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 401(3):480-486.
- 4) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One.* 2010; 5(9): e13017.
- 5) Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2010; 106(6): 860-870.
- 6) Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2010; 465(7295):175-181.
- 7) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(3):480-493.
- ## 2.学会発表
- 1) H Akutsu. “Xeno-Free Growth and Expansion of Human Pluripotent Stem Cells”, Commercial Tutorial Directory; ISSCR 8th annual meeting, San Francisco, CA USA. 18th Jun, 2010.
- 2) 阿久津英憲：「臨床グレード幹細胞樹立の試み」第28回日本ヒト細胞学会学術集会シンポジウム，つくば市，8月23日，2010年。
- 3) H Akutsu. “xeno-free growth and expansion of human pluripotent stem cells”, Symposium 7; The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Sapporo, 1st-4th Sep, 2010.
- 4) 阿久津英憲：「網羅的発現解析から見出したES細胞とiPS細胞の相関性と研究者」第28回JMACワーキンググループ会議，東京，9月22日，2010年。

- | | |
|---|--------|
| 5) <u>阿久津英憲</u> ：「臨床応用に使える、ヒト ES細胞とヒトiPS細胞とは何か？」BTJ プロフェッショナルセミナー iPS細胞 /ヒトES細胞臨床研究の落とし穴、次世代の医療に必要な技術突破、東京、12月21日、2010年. | なし |
| 6) <u>阿久津英憲</u> ：「ヒトES細胞の臨床応用を可能にする技術開発と課題」 再生医療の実現化プログラム関連事業・公開ワークショップ ヒト多能性幹細胞の医療応用と輪唱研究指針の改訂一研究開発と規制のシンクロニーを目指して、神戸、2月17日、2011年. | 3. その他 |
| 7) 鶴養拓、佐藤正人、 <u>阿久津英憲</u> 、田中麻衣子、持田譲治：マイクロアレイを用いた各種軟骨細胞の遺伝子発現解析.第24回軟骨代謝学会 2011年3月、福岡 | 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 | |

IV. 研究成果の刊行（平成22年度）
に関する一覧表

書籍

出版	書籍名 (出版社)	タイトル	ページ	出版地	著者氏名 (編集者名)
2010年	Tissue Engineering. (In Tech Publisher)	Scaffold-free Cartilage Tissue by Mechanical Stress Loading for Tissue Engineering.	409-428	UK	Furukawa KS, Sato M, Nagai T, Ting S, Mochida J, Ushida T (Eberli D)

雑誌

出版	発表誌名	論文タイトル	ページ	巻号	著者氏名
2011年	BMC Biotechnology 2011	Measurement of diffusion in articular cartilage using fluorescence correlation spectroscopy		2011. 11:19	Lee JI, Sato M, Ushida K, Mochida J
2010年	整形・災害外科	分子レベルからみた整形外科疾患—シリーズⅧ；関節軟骨損傷修復のための軟骨細胞シート	1554-1555	53(13)	佐藤正人, 三谷玄弥, 伊藤聡, 鶴養拓, 小久保舞美, 持田讓治
2010年	Arthritis Research & Therapy	Intravenous administration of anti-VEGF humanized monoclonal antibody bevacizumab improves articular cartilage repair		12(5) : R178	Nagai T, Sato M, Kutsuna T, Kokubo M, Ebihara G, Ohta N, Mochida J
2010年	日本レーザー医学会誌	レーザー照射が椎間板細胞に与える影響—PLDD への警鐘—	146-151	31(2)	佐藤正人, 石原美弥, 荒井恒憲, 菊地眞, 持田讓治
2010年	東日本整災会誌	関節軟骨修復・再生を目指した軟骨滑膜混合細胞体の開発.	207-213	22	李禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 持田讓治

2010年	リウマチ科	関節鏡視下軟骨機能診断システムの開発と臨床応用	497-506	43(5)	佐藤正人, 石原美弥, 三谷玄弥, 杓名寿治, 芹ヶ野健司, 持田讓治, 菊地眞
-------	-------	-------------------------	---------	-------	--

学会発表

発表	発表学会名	タイトル	著者氏名
研究代表者 佐藤正人			
2011年 3月	The 3rd Combined Meeting of the Japanese and American Orthopaedic Societies for Sports Medicine	Investigation of Cell Sheets Derived From Anterior Cruciate Ligaments for Tissue Engineering	Mitani G, <u>Sato M</u> , Kokubo M, Nakamura Y, Mochida J
2011年 3月	第24回軟骨代謝学会	【シンポジウム】細胞シートによる関節軟骨治療－臨床応用を目指した取り組み－	佐藤正人, 持田讓治
2011年 3月	第24回軟骨代謝学会	<i>in vitro</i> における培養軟骨細胞の免疫反応におよぼす影響	加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 持田讓治, 松岡厚子
2011年 3月	第24回軟骨代謝学会	軟骨細胞初代培養時におけるアスコルビン酸の影響とその添加時期の検討	小久保舞美, 佐藤正人, 内山善康, 繁田明義, 伊藤 聡, 鶴養 拓, 持田讓治
2011年 3月	第24回軟骨代謝学会	培養軟骨細胞におけるクラゲ由来ムチンとヒアルロン酸の相互作用の検討	高垣智紀, 佐藤正人, 伊藤聡, 馬場崇行, 木平孝治, 持田讓治
2011年 3月	第24回軟骨代謝学会	マイクロアレイを用いた各種軟骨細胞の遺伝子発現解析	Mitani G, <u>Sato M</u> , Kokubo M, Nakamura Y, Mochida J
2011年 3月	第10回日本再生医療学会総会	再生医療に向けた前十字靭帯、滑膜由来細胞シートの検討	三谷玄弥, 佐藤正人, 小久保舞美, 宿南知佐, 持田讓治
2011年 3月	第10回日本再生医療学会総会	血管新生阻害薬(Bevacizumab)静脈内投与による関節軟骨修復の検討	長井敏洋, 佐藤正人, 杓名寿治, 海老原吾郎, 持田讓治
2011年 3月	第10回日本再生医療学会総会	積層化軟骨細胞シートが産生する液性因子に関する検討	浜橋恒介, 佐藤正人, 小久保舞美, 三谷玄弥, 伊藤 聡, 長井敏洋, 海老原吾郎, 杓名寿治, 持田讓治

2011年 3月	第10回日本再生医療 学会総会	家兔膝軟骨損傷モデルを用いた積 層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移 植による治療効果の検討	伊藤 聡, <u>佐藤正人</u> , 小 久保舞美, 鶴養 拓, 長 井敏洋, 三谷玄弥, 持田 讓治
2011年 1月	2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society	Repair of articular cartilage with anti-VEGF antibody bevacizumab	Nagai T, <u>Sato M</u> , Kutsuna T, Ito S, Kokubo M, Mochida J
2010年 11月	The 4 th International Cell Therapy Symposium	【特別講演】 Chondrocyte Sheet for Articular Cartilage Regeneration	<u>Sato M</u>
2010年 11月	第31回日本レーザー 医学会総会	【シンポジウム】 光音響計測技術 の軟骨再生医療への可能性と展開	石原美弥, <u>佐藤正人</u> , 沓 名寿治, 三谷玄弥, 持田 讓治, 菊地眞
2010年 11月	第31回日本レーザー 医学会総会	軟骨再生医療研究における Bioluminescence Imaging の有用 性	高久裕子, 村井邦彦, 村 上孝, <u>佐藤正人</u> , 持田讓 治
2010年 10月	第140回神奈川整形 災害外科研究会	【パネルディスカッション】 東海 大学における整形外科医の育成	<u>佐藤正人</u> , 渡辺雅彦, 持 田讓治
2010年 10月	第25回日本整形外科 学会基礎学術集会	積層化軟骨細胞シートの液性因子 の解析	海老原吾郎, <u>佐藤正人</u> , 小久保舞美, 三谷玄弥, 伊藤 聡, 太田直司, 長 井敏洋, 沓名寿治, 持田 讓治
2010年 10月	第25回日本整形外科 学会基礎学術集会	【シンポジウム】 ナノ秒パルスレ ーザーによる関節軟骨の機能評価	<u>佐藤正人</u> , 石原美弥, 三 谷玄弥, 沓名寿治, 芹ヶ 野健司, 菊地眞, 持田讓 治
2010年 10月	第25回日本整形外科 学会基礎学術集会	滑膜細胞と軟骨細胞の複合細胞移 植体による軟骨再生効果	李 禎翼, <u>佐藤正人</u> , 三 谷玄弥, 伊藤 聡, 小久 保舞美, 持田讓治
2010年 10月	第25回日本整形外科 学会基礎学術集会	関節軟骨細胞初代培養時の ascorbic acid の影響	小久保舞美, <u>佐藤正人</u> , 内山善康, 繁田明義, 持 田讓治
2010年 10月	第25回日本整形外科 学会基礎学術集会	クラゲ由来ムチンとヒアルロン酸 の相互作用に関する研究 第1報	伊藤 聡, <u>佐藤正人</u> , 太 田直司, 馬場崇行, 木平 孝治, 持田讓治
2010年 10月	第25回日本整形外科 学会基礎学術集会	再生医療に向けた前十字靭帯, 滑 膜由来細胞シートの検討	三谷玄弥, <u>佐藤正人</u> , 小 久保舞美, 宿南知佐, 持 田讓治
2010年 10月	第25回日本整形外科 学会基礎学術集会	抗VEGF ヒト化モノクローナル 抗体(Bevacizumab)による骨軟骨 修復効果の検討	長井敏洋, <u>佐藤正人</u> , 沓 名寿治, 小久保舞美, 海 老原吾郎, 太田直司, 持 田讓治

2010年 10月	第25回日本整形外科学会基礎学術集会	旋回培養法における至適旋回数について時間分解自家蛍光スペクトル測定 (TR-LIFS) による評価	杓名寿治, <u>佐藤正人</u> , 石原美弥, 古川克子, 長井敏洋, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治
2010年 10月	第25回日本整形外科学会基礎学術集会	軟骨細胞シート評価のためのハイパースペクトル顕微鏡システムの構築	石原美弥, <u>佐藤正人</u> , 谷川待子, 松村耕治, 持田讓治, 菊地眞
2010年 10月	第29回日本運動器移植・再生医学研究会	血管新生阻害効果による関節軟骨修復の検討	長井敏洋, <u>佐藤正人</u> , 古川克子, 杓名寿治, 海老原吾郎, 太田直司, 伊藤聡, 小久保舞美, 鶴養拓, 牛田多加志, 持田讓治
2010年 9月	第59回東日本整形災害外科学会	血液透析患者の腰椎病変における脊椎手術成績の検討	檜山明彦, 渡辺雅彦, <u>佐藤正人</u> , 酒井大輔, 山本至宏, 長井敏洋, 持田讓治
2010年 7月	第2回日本関節鏡, 膝, スポーツ整形外科学会 (2nd JOSKAS)	ヒト膝関節内組織における Tenomodlin, Scleraxis の発現状況	三谷玄弥, <u>佐藤正人</u> , 小久保舞美, 金城永俊, 宿南知佐, 持田讓治
2010年 10月	第139回神奈川整形災害外科研究会	頸椎砂時計種に対する治療戦略	渡辺雅彦, 山本至宏, 酒井大輔, <u>佐藤正人</u> , 持田讓治
2010年 10月	第62回日本細胞生物学会	【シンポジウム】クラゲ由来ムチンを用いた関節治療の可能性	<u>佐藤正人</u> , 太田直司, 馬場崇行, 木平孝治, 丑田公規, 持田讓治
2010年 10月	第83回日本整形外科学会学術総会	脊椎手術における術後感染発生危険因子 (術中洗浄の重要性)	渡辺雅彦, 山本至宏, 酒井大輔, <u>佐藤正人</u> , 持田讓治
2010年 10月	第39回日本脊椎脊髄病学会	上位頸椎損傷の年代別特徴—高齢者に着目して—	渡辺雅彦, 山本至宏, 酒井大輔, 長井敏洋, <u>佐藤正人</u> , 持田讓治
研究分担者 加藤俊一			
2011年 2月	2011 BMT Tandem Meeting	High incidence of radiation induced cavernous hemangioma in long term survivors who underwent BMT with radiation therapy during childhood or adolescence	Koike T, Yanagimachi N, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Ishiguro H, Takakura H, <u>Kato S</u>
2010年 10月	22nd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium	Long-term follow-up after unrelated bone marrow transplantation in a patient with dyskeratosis congenita	Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, <u>Kato S</u> and Yabe M

2010年 10月	22 nd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium	Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for Fanconi anemia	Koike T, Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, <u>Kato S</u> and Yabe M.
2010年 10月	22 nd International Congress of Pediatrics	Cord blood banking and cord blood transplantation in children in Japan	<u>Kato S</u>
2010年 9月	33 rd International Congress on Microbial Ecology and Disease	Biofilm formation by <i>Helicobacter pylori</i> and its pathogenesis	Kamiya S, Yonezawa H, Woo T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, <u>Kato S</u> , Osaki T
2010年 9月	第72回日本血液学 会総会	Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for aplastic anemia	Yabe H, Yabe M, <u>Kato S</u> , Koike T, Takakura H, Hyodo H, Tomita Y, Ishiguro H, Shimizu T, Morimoto T and Akiba T
研究分担者 阿久津英憲			
2011年 2月	再生医療の実現化プ ログラム関連事業・ 公開ワークショップ ヒト多能性幹細胞の 医療応用と輪唱研究 指針の改訂—研究開 発と規制のシンクロ ニーを目指して—	ヒト ES 細胞の臨床応用を可能に する技術開発と課題	<u>阿久津英憲</u>
2010年 12月	BTJプロフェッショ ナルセミナー iPS 細胞/ヒト ES 細胞臨 床研究の落とし穴、 次世代の医療に必要 な技術突破	臨床応用に使える、ヒト ES 細胞 とヒト iPS 細胞とは何か？	<u>阿久津英憲</u>
2010年 9月	第28回 JMAC ワー キンググループ会議	網羅的発現解析から見出した ES 細胞と iPS 細胞の相関性と研究者	<u>阿久津英憲</u>
2010年 9月	The 23 rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology	xeno-free growth and expansion of human pluripotent stem cells	<u>Akutsu H</u>

2010年 8月	第28回日本ヒト細胞学会学術集会シンポジウム	臨床グレード幹細胞樹立の試み	<u>阿久津英憲</u>
2010年 6月	Commercial Tutorial Directory; ISSCR 8 th annual meeting	Xeno-Free Growth and Expansion of Human Pluripotent Stem Cells	<u>Akutsu H</u>
研究分担者 長嶋比呂志			
2011年 3月	京都臓器保存セミナー	哺乳動物卵・初期胚および組織のガラス化保存について	前原美樹, 松成ひとみ, 中野和明, 落合恵子, 本田香澄, 竹内靖浩, 池澤有加, 池田有希, <u>長嶋比呂志</u>
2011年 3月	日本セラミックス協会	機械粉碎アパタイトとキトサン溶液を利用したキレート硬化型セメントの作製とその生体適合性	水本みのり, 吉川哲史, 小西敏功, 本田みちよ, 松成ひとみ, 竹内靖浩, <u>長嶋比呂志</u> , 相澤守
2011年 3月	日本セラミックス協会	クサビラオレンジ蛍光遺伝子を導入したブタを用いた二極化した細孔構造を備えた b-リン酸三カルシウム多孔体の in vivo 評価	重光勇介, 本田みちよ, 水本みのり, 松成ひとみ, 竹内靖浩, <u>長嶋比呂志</u> , 相澤守
2011年 3月	日本セラミックス協会	クサビラオレンジブタ脛骨埋入による高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの生体適合性評価	鳩本拓也, 島田愛生, 安富由美子, 本田みちよ, 水本みのり, 松成ひとみ, 竹内靖浩, <u>長嶋比呂志</u> , 相澤守
2011年 3月	第10回日本再生医療学会	ブタを scaffold とする腎臓再生: IV. ネコにおけるエリスロポエチン療法の開発	岩井聡美, 横尾隆, 松成ひとみ, 田中友加, 寺岡義布史, 大段秀樹, <u>長嶋比呂志</u> , 小林英司
2011年 3月	第10回日本再生医療学会	ブタを scaffold とする腎臓再生: III. Suicide gene を発現する遺伝子改変ブタの作出	松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 渡邊将人, 梅山一大, <u>Medin JA</u> , <u>長嶋比呂志</u> , 小林英司
2011年 3月	第10回日本再生医療学会	ブタを scaffold とする腎臓再生 II: エリスロポエチン(EPO)産生組織の体内発生法の開発	横尾隆, 松成ひとみ, 岩井聡美, 松本啓, 辻収彦, 岡野 James 洋尚, 岡野栄之, <u>長嶋比呂志</u> , 小林英司
2011年 3月	第10回日本再生医療学会	ブタを scaffold とする腎臓再生: I. クローンブタを利用した腎臓原基の発達能の検証	<u>長嶋比呂志</u> , 松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 小林英司

2011年 2月	Keystone Symposia: Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease	The generation of “mouse-type” porcine induced pluripotent stem cells	Fujishiro S, Mizukami Y, Ishino R, Nishimura T, Matsunari H, Nakano K, <u>Nagashima H</u> , Hanazono Y
2011年 1月	2011 Annual Conference of the International Embryo Transfer Society	Large-scale production of cloned transgenic pigs: efficiency and side effects	Kurome M, Kessler B, Klymiuk N, Wiensch A, Zackhartchenko V, <u>Nagashima H</u> , Wolf E
2011年 1月	第8回北関東甲信越 肝移植談話会	【招待講演】ブタ体細胞クローン 技術を基盤とした移植・再生医学 への取り組み.	<u>長嶋比呂志</u>
2010年 12月	5th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials	Cell proliferation, morphology and differentiation of transgenic-cloned pig calvarial osteoblasts on the silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray-pyrolysis technique	Honda M, Konishi T, Mizumoto M, Matsunari H, <u>Nagashima H</u> , Aizawa M
2010年 12月	第33回日本分子生 物学会年会	Zinc-finger nucleases(ZFNs) -driven gene disruption can work in porcine primary cultured cells	Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, Takayanagi S, Haruyama E, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nakauchi H, <u>Nagashima H</u>
2010年 12月	第33回日本分子生 物学会年会	Characterization of transgene-free porcine iPS cell	正木英樹, 濱仲早苗, 脇 山由起子, 山口智之, <u>長 嶋比呂志</u> , 中内啓光
2010年 12月	第14回生体関連セラ ミックス討論会	クサビラオレンジブタ頭蓋骨より 単離した骨芽細胞の骨分化過程の 解析	本田みちよ, 水本みの り, 小西敏功, 松成ひと み, <u>長嶋比呂志</u> , 相澤守
2010年 9月	第13回日本IVF学会	胚と中空糸膜をユニットとしたヒ ト胚の超急速凍結	天羽杏実, 橋本周, 右島 理可, 山中昌哉, 中野和 明, <u>長嶋比呂志</u> , 高橋昌 志, 笹山典久, 森本義晴
2010年 9月	第103回日本繁殖生 物学会	中空糸法を用いたブタMII期卵 及び初期胚のガラス化保存	中野和明, 松成ひとみ, 前原美樹, 竹内靖浩, 小 川武甲, 藤原主, 池澤有 加, 本田香澄, 荻原由以, 笹山典久, 白数昭雄, 大 田久由, 高橋昌志, <u>長嶋 比呂志</u>

2010年 9月	第103回日本繁殖生物学会	トランジェニックブタ凍結精子の卵管内人工授精	本田香澄, 松成ひとみ, 藤原主, 竹内靖浩, 中野和明, 池澤有加, 前原美樹, 梅山一大, 渡辺将人, <u>長嶋比呂志</u>
2010年 9月	第103回日本繁殖生物学会	中空糸法によるマウス胚のガラス化保存	松成ひとみ, 前原美樹, 池澤有加, 中野和明, 落合恵子, 竹内靖浩, 本田香澄, 笹山典久, 白数昭雄, 荻原由以, 高橋昌志, <u>長嶋比呂志</u>
2010年 9月	第103回日本繁殖生物学会	臓器再生研究に向けた膀胱形成不全トランスジェニックブタの作出	松成ひとみ, 小林俊寛, 渡邊将人, 梅山一大, 高柳就子, 中野和明, 藤原主, 池澤有加, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 須磨崎亮, 中内啓光, <u>長嶋比呂志</u>
2010年 9月	第103回日本繁殖生物学会	糖尿病モデルトランスジェニッククローンブタの作出 IV. 変異型ヒト HNF-1a 遺伝子を導入した Dominant-negative 変異体の後代産仔作出	梅山一大, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 藤原主, 日高龍路, 竹内靖浩, 望月寛徳, 関口溪人, <u>長嶋比呂志</u>
2010年 9月	第103回日本繁殖生物学会	ブタ細胞における Zinc finger nuclease (ZFN)による EGFP 遺伝子のノックアウト (KO)	渡邊将人, 梅山一大, 松成ひとみ, 高柳就子, 春山エリカ, 中野和明, 藤原主, 池澤有加, 中内啓光, <u>長嶋比呂志</u>
2010年 6月	26th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology	Increased longevity of old mice after allo-transplantation of young mice ovaries	<u>Ikeda Y, Kagawa N, Kuwayama M, Nagashima H, Silber S, Kato K, Kato O</u>
2010年 6月	第28回日本受精着床学会総会・学術講演会	胚操作性の高い中空糸膜を用いた超急速凍結後のヒト胚の発育能力	天羽杏実, 橋本周, 右島理可, 山中昌哉, 中野和明, <u>長嶋比呂志</u> , 高橋昌志, 笹山典久, 森本義晴
2010年 6月	第28回日本受精着床学会総会・学術講演会	【招待講演】クローンブタの aging 研究への応用の可能性	<u>長嶋比呂志</u>
2010年	2010 Seoul Forum on Xenotransplantation	Necessity and possibility of serial cloning in development of advanced genetically engineered pigs for xenotransplantation	<u>Nagashima H., Matsunari H., Ikezawa Y., Nakao K., Kurome M., Watanabe M., Umeyama K., Miyagawa S</u>

研究分担者 石原美弥			
2010年 10月	第2回 BioOpto Japan 2010	光音響原理を利用した非侵襲的診断法	石原美弥
2010年 10月	日本レーザー医学会	光音響断層画像化技術による機能診断イメージング	石原美弥, 平沢壮, 北垣学, 番作勲, 藤田真敬, 菊地眞

V. 研究成果の刊行物・別刷

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Intravenous administration of anti-vascular endothelial growth factor humanized monoclonal antibody bevacizumab improves articular cartilage repair

Toshihiro Nagai, Masato Sato*, Toshiharu Kutsuna, Mami Kokubo, Goro Ebihara, Naoshi Ohta, Joji Mochida

Abstract

Introduction: In this study, we investigate the efficacy of repairing an osteochondral defect in rabbit knee joints by administering bevacizumab, a humanized monoclonal anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody.

Methods: An osteochondral defect was created on the patellar groove of 20 Japanese white rabbits that were classified into two recipient groups: group B, administration of bevacizumab (100-mg intravenous injection on the day of surgery and 2 weeks later), and a control group (defect only). Rabbits were killed 1 and 3 months postoperatively. Sections were stained with safranin O. Repair sites were evaluated using the modified O'Driscoll International Cartilage Repair Society grading system. The expression of chondromodulin (ChM)-I and VEGF was evaluated using immunohistochemical analyses.

Results: At 1 month postoperatively, the repair site in group B was filled with cartilaginous tissue. At 3 months, the repair site retained this cartilage phenotype. At 1 month in the controls, the defects were mainly filled with fibrous tissue. At 3 months, the defect was replaced by fibrous tissue and bone. Over the 3-month period, histological scores were significantly higher in group B than in the controls. At 1 month, group B showed intense positive results for ChM-I in the bottom of the repair tissue. VEGF was also identified in the same area. In the controls, no ChM-I was observed in the repair tissue. Conversely, the remodeling hypertrophic chondrocyte layer stained intensely for VEGF.

Conclusions: Intravenous administration of bevacizumab contributes to better repair of articular cartilage in an osteochondral defect model. We suggest the possibility of facilitating articular cartilage repair with anti-VEGF antibody rather than using cultured cells or artificial scaffolds.

Introduction

Mature articular cartilage shows limited capacity for regeneration after degeneration or injury [1]. For this reason, various treatments have been developed in anticipation of restoration by regenerative medicine. At present, techniques using penetration of subchondral bone [2-5], microfracture [6-9], mosaicplasty [10-12], cell transplantation [13-16], and implantation of tissue-engineered cartilage with various scaffold materials [17-22] or without scaffold [23-27] have been developed

to overcome this obstacle. Penetration of subchondral bone such as drilling and microfracture to be filled with reparative cells from bone marrow is a method that has been developed to stimulate spontaneous healing [18]. This procedure attempts to achieve repair via the mechanism of endochondral ossification. However, the defect to be filled with reparative cells shows a large amount of vascular invasion, and the tissue tends to be replaced by bone and a surface of fibrocartilaginous repair tissue [28].

Successful regeneration of any tissue requires the presence of reparative cells with the potential to differentiate into the phenotypes required to restore the damaged

* Correspondence: sato-m@is.icc.u-tokai.ac.jp

Department of Orthopaedic Surgery, Surgical Science, Tokai University
School of Medicine, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan