

関節マーカーを用いた早期診断と予後予測の確立に関する研究

研究分担者 岩崎 倫政 北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野准教授

研究要旨: ヒト変形性関節症(OA)の軟骨組織および血清サンプルを採取し、N型糖鎖構造解析を行った。OA軟骨組織ではhigh-mannose型糖鎖が変化していた。OA血清中でも糖鎖構造の変化は認められた。OAの病態においてhigh-mannose型糖鎖は重要な機能を担っていた。

A. 研究目的

OAマーカー探索のためOA軟骨および血清中で変化しているN型糖鎖を同定し、OAの病態におけるその機能的役割を解明する。

B. 研究方法

- 1) ヒト正常群およびOA群の軟骨および血清を採取し、そのN型糖鎖構造解析を行い、OA群において変化している糖鎖を同定する。
- 2) ヒトで同定されたN型糖鎖に注目し、マウスOAモデルを用いてOA発症に関連した糖鎖の機能解析を行う。具体的には同定した糖鎖および関連合成酵素のOA進行過程における発現変化、軟骨細胞において関連合成酵素遺伝子の発現を調節することによるMMP等のOA関連タンパクの発現変化を明らかにする。

(倫理面への配慮)

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

- 1) ヒトOA軟骨においてhigh-mannose型糖鎖が変化していることが明らかとなった。OA血清でも1部のN型糖鎖構造が変化していることが確認された。

- 2) マウスOAモデルにおいてOAの進行に伴い同定されたhigh-mannose型糖鎖が変化し、その関連合成酵素の発現も変化していた。

- 3) 軟骨細胞を単離し、関連合成酵素遺伝子の発現を調節することにより、サイトカイン刺激による軟骨細胞中のMMP-13やADAMTS5の発現も変化した。このことよりhigh-mannose型糖鎖は軟骨細胞とサイトカインのシグナル伝達を制御していることが示唆された。

D. 考察

OA軟骨中ではhigh-mannose型糖鎖が変化していることが明らかとなった。軟骨中または血清中でこの変化を確実に捉えることが出来れば疾患マーカーとして応用することが可能となる。また、同定した糖鎖は軟骨細胞—サイトカイン間のシグナル応答を調節し、OAの病態においても重要な機能的役割を果たしているかと推測される。

E. 結論

- 1) ヒト軟骨中においてN型糖鎖、特にhigh-mannose型糖鎖が変化していた。血清中の糖鎖構造も変化しており、N型糖鎖がOAマーカーとなる可能性が示唆された。
- 2) 同定したhigh-mannose型糖鎖はOA

の病態において重要な機能的役割を果たしていると推測された。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

I. 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
16:772-778, 2008.

2. 岩崎倫政 他
糖鎖による軟骨細胞機能制御の可能性—軟骨変性に伴う N-結合型糖鎖の変化より—。遺伝子医学 MOOK 別冊 .p55-59, 2009

3. Amano M, Iwasaki N, et al.
Threshold in stage specific embryonic glycotype uncovered by a full portrait of dynamic N-glycan expression during cell differentiation. Mol Cell Proteomics 9:523-537, 2010

4. Amano M, Iwasaki N, et al.
Threshold in stage specific embryonic glycotype uncovered by a full portrait of dynamic N-glycan expression during cell differentiation. Mol Cell Proteomics 9:523-537, 2010

2. 学会発表

1. 瓜田淳、岩崎倫政
OA 進行に伴うハイマンノース型糖鎖の変化および糖転移酵素と MMP-13、ADAMTS-5 との関連。瓜田淳、岩崎倫政、他。第 23 回日本軟骨代謝学会
2. 瓜田淳、岩崎倫政、他
OA 進行に伴う高マンノース型糖鎖の

変化および糖転移酵素 (GnT-1) と MMP-13、ADAMTS-5 との関連。

第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会

3. Seito N, Iwasaki N, et al
Glycosphingolipids-deficiency enhances aging-associated osteoarthritis in mice. Seito N, 2011 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society
4. 清藤直樹、岩崎倫政
マウス軟骨組織におけるスフィンゴ糖脂質の欠損は加齢による OA 進行を助長する 第 24 回日本軟骨代謝学会

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
（総合）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）の病態を正確に把握するための 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 OA の病態との相関が報告されている因子を複数測定し、その値の組み合わせによって OA の病態をより高い精度で評価する方法を確立することである。

本研究では膝 OA の症例約 50 例を対象にし、個々の症例を 6 ヶ月ごとにフォローして臨床所見を記録、レントゲンを撮影して血液、尿の検体を採取した。得られた血液、尿それぞれ約 200 の検体について計 19 項目の OA の既知マーカーを計測、その計測値を組み合わせることで（1）OA 症例と健常対照者の識別（2）OA 症例の中で X-p 上の軟骨変性の進行例と非進行例の識別、の 2 つを試みた。結果として（1）血清中のヒアルロン酸、血清ピリジノリン、尿中 II 型コラーゲンの変性断片の 3 つの因子を組み合わせることで非常に高い精度で OA 症例と高齢健常者を識別でき、さらに OA 症例の中で末期の症例とそれ以外の症例を識別することができること、（2）しかし OA 症例の中で関節裂隙の狭小化が進行する症例と進行しない症例の識別は今回検討した因子をどのように組み合わせても困難であることが明らかになった。OA 症例の関節裂隙の狭小化の進行例と非進行例を識別しうる因子の確立は今後の課題と考えられた。

A. 研究目的

変形性関節症（OA）は先進国においても患者数が多い関節疾患であるが、その病態を客観的に評価する方法は確立されていない。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必要である。

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については既に多くの報告があり、病態と相関する因子も今までに 10 を越えるものが報告されている。しかし現在までのところ単独で高い精度で OA の病態を示すことのできるマーカーは確立されていない。本研究の目的は既知の OA のバイオマーカー（以下既知マーカー）を複数測定し、それらを適切に組み合わせることによって OA の病態をより正確に評価する方法を見出すことであった。このため

に本研究では保存的に治療された膝 OA の症例を 2 年間にわたって追跡調査し、この期間 6 ヶ月に一度の頻度で臨床所見を記録、膝関節の単純レントゲンを撮影し、血液および尿を採取した。また OA 症例と同等の年齢の健常者およびそれより若年の症例からも血液、尿を採取して OA 症例の結果と対比した。

B. 研究方法

1. 既知のバイオマーカーの組み合わせによる OA の病態評価法の確立
保存的な治療を受けた膝関節 OA の症例 43 例を 2 年間にわたってフォローし、6 ヶ月ごとに血液（血清、血漿）、尿、画像（片脚立位、膝伸展位と膝関節軽度屈曲位での単純 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した。またこの対照として比較的若年の健常者群(若年対照群:29例、平均53.7歳)、およびOA症例と同等の年齢の健常者群(高齢対照群:30例、平均69.8歳)の二群を設けてそれぞれの被験者から血液と尿を単回採取した。これらの検体において以下に示す合計19項目(血液15項目、尿4項目)の既知マーカーをLuminexあるいは市販および自家作製のELISAキットにより行った。

□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)

本研究では解析を(1)健常者とOA症例の識別、(2)OA症例の中で10症例の識別、(3)OA症例の中でレントゲン上の進行を示す症例の識別、に役立つ因子の組み合わせを見出すことを具体的な目標に行った。いずれの解析においてもROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を手法に用いた。

2. 既知マーカーのOA関節各組織における発現解析

本研究ではまた既知マーカーを含むOA関節各組織における遺伝子発現の解析をcDNAマイクロアレイにより網羅的に行った。この解析では多数の症例について種々

の遺伝子の発現をマイクロアレイにより網羅的に行い、遺伝子相互の発現レベルの関連を見出すことを試みた。研究期間終了までに滑膜については末期OA膝関節20関節(20例)から滑膜を得てRNAを抽出してcDNAマイクロアレイ(Whole Human Genome, Agilent社)による解析を終え、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。

3. 本研究ではまたフォローアップの際に得たデータから、保存的に治療された膝OA症例について臨床症状とレントゲン上のOA変化の進行の関連も検討した。

(倫理面の配慮)

研究への参加に際して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、得られた個人情報の保護など必要な情報を十分説明した上で、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. 膝OA症例のX-p変化と症状の関連

はじめに膝OA症例のレントゲン上の変化と臨床所見の関連に関する結果を示す。今回対象とした症例の中で2年間経過をフォローした症例は43例86関節(平均71.2歳)であった。このうち2年のフォロー期間中に関節裂隙の狭小化が生じた症例は全体の22%(19関節)であり、骨棘スコアの増加が見られた症例は全体の61.6%(53関節)例であった。

つぎにレントゲン上の変化と臨床所見の関連を検討したところ、関節裂隙狭小化が生じた症例ではJKOMスコアで評価した症状の強さが有意に強い傾向があること、しかしそのような傾向は骨棘成長の有無については見られないことが明らかになった(図1)。

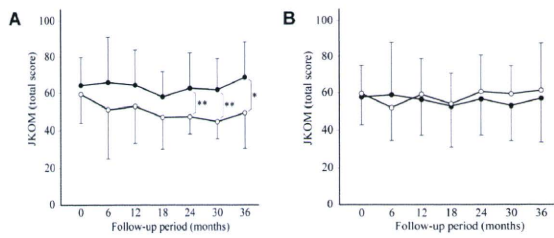


図 1. 関節裂隙の進行した症例 (●) と非進行例 (○) (A) および骨棘スコアの有意な増加がみられた症例 (●) とみられなかった症例 (○) (B) の JKOM スコアの経時的な変化。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

2. 複数の既知マーカーの組み合わせによる OA の病態識別の試み

(1) はじめに実際の計測結果を一部の因子について示す。ヒトから採取した検体の計測では、計測値に大きなばらつきが生じることが多いが本研究でも実際に計測した値には個体間で大きなばらつきが生じた (図 1)。このことを考慮して、病態との関連を検討する場合には計測値を対数変換した上で統計解析を行うこととした。

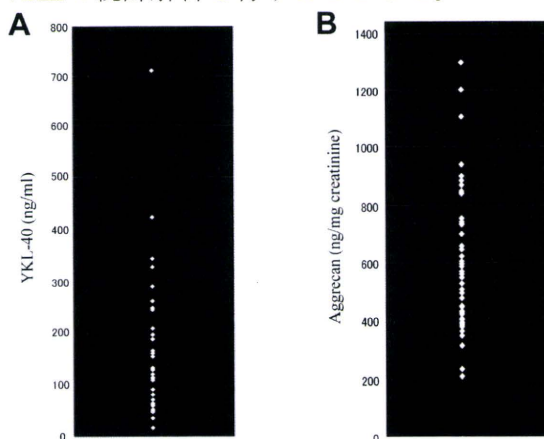


図 1. 採取した血液、尿検体における既知マーカーの計測。血清中 YKL-40 (A) および尿中 aggrecan (B) の計測結果を例として示す。大きな個体差が見られたため、以後の解析では測定値を対数変換したものを用いた。なお尿中 aggrecan については尿中クレアチニン濃度で補正した値を示した。

(2) 次に X-p 上の OA の重症度とマーカー

の関連を検討したところ、血清中の COMP、YKL-40、ヒアルロン酸、PYD、尿中の CIINE について若年または高齢対照群と OA 例の間に有意の差が観察された (図 2)。

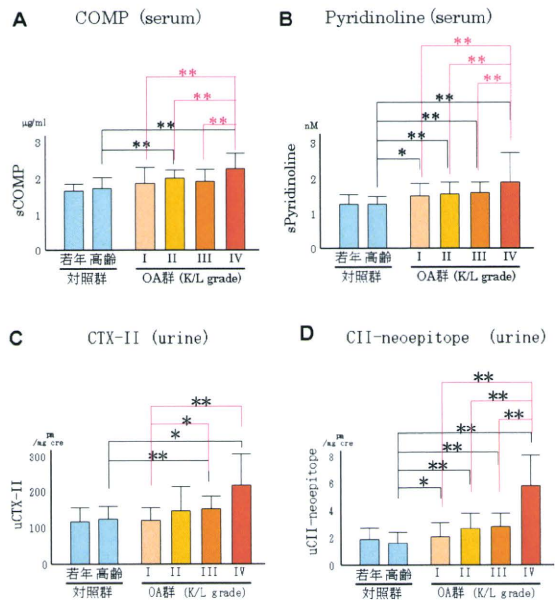


図 2. 血清中 COMP (A)、PYD(B)、尿中 CTX-II (C)、CIINE (D) の対照群と OA の各群における計測値の比較。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

(3) OA 症例と高齢健常対照を識別できるマーカーの組み合わせを探索したところ、血清のデオキシピリジノリン (PYD)、ヒアルロン酸 (HA)、尿中の II 型コラーゲン変性断片 (CIINE) の 3 因子を組み合わせることによって高齢対照群と OA 症例を感度 86.8%、特異度 90.0%で識別することができた (図 2A)。また同じ 3 因子によって OA 症例の中で grade I-III の症例と grade IV の症例を感度 100%、特異度 89.6%で識別することができた (図 2B)。

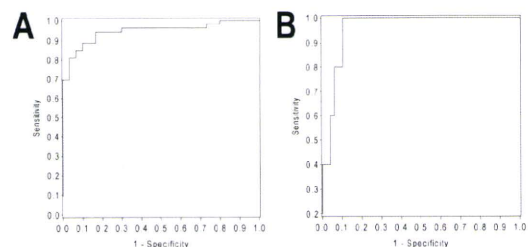


図 3. 多因子による OA 症例の識別。血清

PYD、血清 HA および尿中 CIINE の 3 因子の組み合わせによる OA 症例と健常者 (A)、OA 症例のうち K/L grade I-III の症例と grade IV の症例 (B) の識別能を ROC 解析によって検討した結果を示す。Area under the curve (AUC) の値はそれぞれ 0.946 および 0.958 であった。

(4) 次に OA 症例の進行を予測する因子の組み合わせを探った。当初混合効果モデル、周辺モデルの二つの解析手法によって OA 症例の関節裂隙狭小化の進行例と非進行例の間で有意に異なる因子を選択したところ、それぞれ 7 個および 3 個の因子が選出された。次にこの 2 つの解析で見出された合計 8 個の因子 (2 因子は両解析で共通して見出されたため 2 群間で有意差のある因子の合計は 10 個ではなく 8 個となる) をさまざまに組み合わせて関節裂隙狭小化の進行例と非進行例の識別を試みたが、もっとも識別能が高かった血清中のケラタン硫酸 (KS) と II 型コラーゲン C 端プロペプチド (CIIP) の組み合わせでも感度 86.1%、特異度 36.8%に過ぎず、進行群、非進行群を臨床的に有用なレベルで識別することは困難と思われた (図 4)。

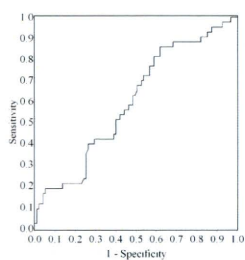


図 4. 多因子による膝 OA 進行例の識別。OA 症例のうち関節裂隙狭小化が生じた症例と生じなかった症例の血清 KS と CIIP による識別能を ROC 解析で検討した結果。AUC は 0.587 であった。

3. マイクロアレイによる OA 関節組織における遺伝子発現の網羅的解析

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 の病態に参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 5)。なおこの解析は現在も症例数を増やして継続中である。

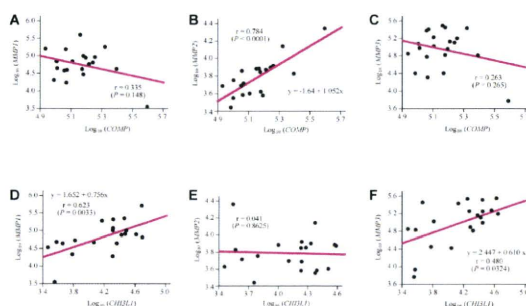


図 5. マイクロアレイの解析結果。20 例の滑膜における COMP と MMP-1~3 の発現 (A-C) および YKL-40 と MMP-1~3 の発現 (D-F) の関連を散布図で示した。COMP と MMP-2 (B), YKL-40 と MMP-1、3 の間 (D, F) に有意の相関が見られた。

D. 考察

この研究では既知の OA マーカーを複数組み合わせることによって OA 症例の病態評価がより正確に行えるのではないかとという仮説を検証した。このために保存的に治療された膝 OA 症例を 2 年間にわたって追跡調査し、レントゲンの変化を調べ、半年後とに採取された血液と尿に置いて既に OA の病態との関連が報告されている既知のマーカーを網羅的に計測した。その結果、OA 症例と健常者を識別することは高い精度で可能であるが、OA 症例の中で進行する症例 (関節裂隙の狭小化が進む症例) と進行しない症例を識別することは今回検討した既知マーカーをどのように組み合わせても困難なことが明らかになった。一方でフォローアップの際に記録した臨床所見から膝 OA の症例の中で関節裂隙の狭小化が進行する症例では強い痛みが持続する傾向があることが明らかになり、これは今後 OA の病態を考える上で重要な手掛かりとなるのではない

かと思われた。

OAの病態と関連する因子を見出すことが困難なことは周知の事実である。しかし今回の結果からOA症例と健常者を識別することは、複数の因子を組み合わせることによって相当に高い確度で可能であることがわかった。またOA症例の中でK/L分類でgrade IVに相当する末期の症例では一部の既知マーカーの値がより早期の症例と有意に異なっており、K/L grade IVの症例はgrade I~IIIの症例から3つの既知因子の組み合わせによって高い確度で識別された。このことは末期OAでは関節内に生じている変化がより早期のOA例とは異なっていることを示唆する。この知見はOAの病態を知る上で重要な手がかりの一つとなるのではないかと思われる。

一方今回の検討から、OA症例の中で関節裂隙が進行する症例を非進行例から見分けることは既知マーカーに頼る方法では極めて困難であると考えられた。OA症例の間には進行や症状に関して大きなheterogeneityがあり、これがOA治療薬を開発する際に大きな制約となっている。今後新規マーカーの探索も含めた新たな手法によってOAの進行例と非進行例を高い確度で区別できるようになることが望まれる。

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高い精度のOAの病態評価の可能性を目指してOA症例と対照群から血液、尿の検体を採取し、19項目に及ぶ既知マーカーを計測して種々の解析を行った結果、OA症例と健常対照者を高い精度で識別できる因子の組み合わせを見出した。しかしOA症例の中で関節裂隙の狭小化が進行する症例と進行しない症例の識別は今回計測した因子をどのように組み合わせても困難であることが明らかになった。このようなOA症例間の識別を可能にするマーカーの確立は今後の課題である。

G. 研究発表

1. 総説

1. Fukui N, Ikeda Y, Tanaka N. The Use of Laser Capture Microdissection on Adult Human Articular Cartilage for Gene Expression Analysis. In. *Laser Microdissection: Methods and Protocols*, Second Edition. Graeme I Murray (ed). Springer Verlag (in press).
2. 福井尚志. 症状から見た変形性関節症の病態. 特集 ロコモティブシンドローム、運動器の基礎研究5. *治療学* 44:762-765, 2010.
3. 福井尚志. 加齢による関節の変化と変形性関節症. 特集 ロコモティブシンドローム、各論—加齢に伴う身体機能の変化とその評価法. *診断と治療* 49:1791-1797, 2010.
4. 福井尚志、渡部欣忍、中野哲雄、澤口毅、松下 隆. 大腿骨頸部・転子部骨折の予後. *整形・災害外科* 53:893-902, 2010.

2. 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* 128 (1 Suppl):e315-324.
 12. Hikita A, Tanaka N, Fukui N, et al. (10 名中ラスト) Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor- α . *Biochemistry and Cell Biology* 87:581-593, 2009.
 13. Mitomi H, Fukui N, Tanaka N, et al. (7 名中 2 番目) Aberrant p16(INK4a) methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *J Cancer Res Clinical Oncol* 136:323-331, 2010.
 14. Fukui S, Ogawa K, Ohtsuka M, Fukui N. Effect of communication skills training on nurses' detection of patients' distress and related factors after cancer diagnosis: a randomized study. *Psychooncology*. 18:1156-1164, 2009.
 15. Nakajima M, Takahashi A, Fukui N, et al. (18 名中 10 番目) New sequence variants in HLA class II/III region associated with susceptibility to knee osteoarthritis identified by genome-wide association study. *PLoS One* 5:e9723, 2010.
 16. Katsuragawa Y, Saitoh K, Fukui N, et al. (14 名中ラスト) . Changes of human menisci in osteoarthritic knee joints. *Osteoarthritis and Cartilage* 18:1133-1143, 2010.
 17. Fukui N, Yamane S, Ishida S, et al. (8 名中 1 番目) Relationship between radiographic changes and symptoms or physical examination findings in subjects with symptomatic medial knee osteoarthritis: a three-year prospective study. *BMC Musculoskelet Disord* 11:269-, 2010.

18. Taketomi S, Nakagawa T, Fukui N, et al. (12名中11番目) Anatomical placement of double femoral tunnels in anterior cruciate ligament reconstruction: anteromedial tunnel first or posterolateral tunnel first? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19:424-431, 2011.
 19. Matsuoka T, Mitomi H, Fukui N, et al. (7名中3番目) Cluster analysis of claudin-1 and -4, E-cadherin and β -catenin expression in colorectal cancers. *J Surg Oncol* (in press).
 20. Fukui N, Ikeda Y, Tanaka N, Fukui N, et al. (14名中1番目) $\alpha v\beta 5$ integrin promotes dedifferentiation of monolayer-cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* (in press).
 21. Fukui S, Fujita J, Fukui N, et al. (6名中6番目) Late referrals to home palliative care service affecting death at home in advanced cancer patients in Japan: a nationwide survey. *Ann Oncol* (in press).
 22. Iwaso H, Uchiyama E, Sakakibara S, Fukui N. Modified double-row technique for arthroscopic Bankart repair: surgical technique and preliminary results. *Acta Orthop Belg* (in press).
3. 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、十字琢夫、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.
 9. 福井尚志. 変形性関節症の病態 – 最近

- の知見と滑膜病変に関する我々の検討結果－第 27 回 日本骨代謝学会 2009.7.23-25 大阪市.
10. 福井尚志、池田泰子、田中信帆、ほか. ヒト変形性関節症罹患軟骨における anabolic factor の発現の検討－変性部における軟骨基質発現低下の機序解明の試み－ 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009.11.5-6 横浜.
 11. 福井尚志、池田泰子、田中信帆、ほか. 変形性関節症における関節液中の軟骨変性因子の探索 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009.11.5-6 横浜.
 12. 福井尚志、山根昌治、田中信帆、ほか. 内側型膝 OA の進行過程－保存的治療例におけるレントゲン、愁訴、臨床所見の経時的変化－. 第 1 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2009.6.25-27、札幌
 13. Fukui N, Yamane S, Tanaka N, et al. Progression of symptomatic medial knee osteoarthritis. Relationship between radiographic changes and symptoms over a 3-year period. 2nd JOSKAS/7th APOSSM. 2010.7.2-4、沖縄市.
 14. Fukui N, Ikeda Y, Tanaka N, et al. Exploration of possible acatabolic factors for cartilage matrix in osteoarthritic synovial fluid. 2010 World Congress on Osteoarthritis. 2010.9.23-26, Brussels, Belgium
 15. Fukui N. Dedifferentiation of monolayer cultured chondrocytes could be promoted by $\alpha v \beta 5$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins. The 1st OARSI China Forum. 2010.10.5-6, Nanjing, People's Republic of China
 16. 福井尚志. レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクションのヒト軟骨組織への応用－変形性関節症の病態解明への試み－. 第 31 回日本レーザー医学会総会 2010.11.13-14、名古屋.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
 1. 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)
 2. 変形性関節症の新規バイオマーカー (特許出願中)

201025008B ($\frac{2}{4}$)

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

膝痛の診断・治療に関する調査研究

－関節マーカーを用いた早期診断と

予後予測の確立に関する研究－

平成20年度～平成22年度 総合研究報告書

(2/4冊)

研究代表者 山田 治基

平成 23 (2011)年 3月

研究成果の刊行に関する一覧表（平成20年度）

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, En-yo 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,	68	1401-1406	2009
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	20	999-1008	2009
Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, Akune T, En-yo 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	61	779-786	2009
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, Hiroshi Kitoh, Karolina Anna Siwicka, Naoki Ishiguro	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
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
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
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 a nterior cruciate ligament transection in rabbits.	Osteoarthritis and Cartilage	16	772-778	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Mauda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, <u>Fukui N</u> , 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://www.journal-inflammation.com/content/5/1/5	2008
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 ? 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
Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Mauda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, <u>Fukui N</u> , 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://www.journal-inflammation.com/content/5/1/5	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kishimoto I, Mitomi H, Ohkura Y, Kanazawa H, Fukui N, 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
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.	Arthritis Rheum	58	3843-3853	2008
Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, 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, Fukui N, 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, Fukui N.	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, Fukui N, 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			

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

extracellular matrix. Thus, the mechanism for healing and self-repair, including cell mobilization and infiltration, is unlikely to occur, even when articular cartilage is impaired or degenerated. To repair articular cartilage injuries, various treatment methods have been attempted, such as a drilling method (Mitchell et al. 1976), which is a bone marrow stimulation method, a microfracture method (Stedman et al. 2001), periosteal/perichondrial transplantation (O'Driscoll et al. 1986), and mosaic plasty (Matsusue et al. 1993), but no method has been established. Regenerative medicine for cartilage tissue repair utilizing cell culture techniques has recently been investigated worldwide: transplantation of cultured autologous chondrocytes (Brittberg et al. 1994; Wakitani et al. 1994; Ochi et al. 2002), and chondrocytes differentiated from tissues other than cartilage, such as bone marrow, synovial cells, and adipocytes; however, problems remain to be resolved: it requires two separate surgeries for cell sampling and transplantation, and long-term maintenance of the characteristics of differentiated chondrocytes is difficult. For these reasons, repair with complete hyaline cartilage has not yet been confirmed (Benya et al. 1982; Sohn et al. 2002).

As a basic study on regenerative medicine of cartilage tissue aiming at future clinical applications, we focused on tissue stem cells (mesenchymal stem cells) present in adipose tissue as cell supply sources other than chondrocytes because they have high proliferative ability and the potential to differentiate into various cell types, such as adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, myofibroblasts, and nerve cells (Caplan 1991; Pittenger et al. 1999; Yamamoto et al. 2007). In this study, we isolated adipose-derived stromal vascular fraction culture cells (ADSVFs) using mesenchymal stem cell markers, and investigated the differentiation of highly pure adipose-derived stem cells (ASCs) with no contaminating vascular endothelial cells or fibroblasts into chondrocytes (Halvorsen et al. 2001; Kino-oka et al. 2005; Xu et al. 2007).

MATERIAL AND METHODS

Cell isolation and culture of adipose tissue

Cells were isolated from lymph node-excised ingui-

nal subcutaneous adipose tissue of ICR mice (4 weeks of age, male, 18-20 g). Briefly, after collagenase treatment, hemolysis, and filtration of adipose tissue, the sample was washed with phosphate-buffered saline (PBS: Sigma, St. Louis, MO) by centrifugation. The cell pellet was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12, Sigma) containing 10% fetal bovine serum (FBS, JRH Biosciences, Adelaide, Australia), 2 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF, Sigma), and 1% penicillin-streptomycin (Sigma) at 37°C in 5% CO₂. After culture for 24 hours, cells adhered to the culture dish were further cultured as ADSVFs for 6 days. All procedures were approved by the Education and Research Center for Animal Models of Human Diseases of Fujita Health University.

Immunohistological staining of adipose tissue

ICR mouse subcutaneous adipose tissue, including inguinal skin tissue, was excised and rapidly fixed with a rapid tissue fixative (Super Fix KY-500; KURABO, Osaka Japan), which rapidly fixes even adipose and eyeball tissues, and paraffin-embedded sections were prepared using the standard method (Yamamoto et al. 2008). Sections were reacted with the following primary antibodies of mesenchymal stem cell markers: rat monoclonal CD90 and CD105 (Thy-1 and Endoglin, respectively; eBioscience, Inc., San Diego, CA) antibodies and rabbit polyclonal p75 neurotrophin receptor (p75NTR, CD271; Chemicon International, Inc., Temecula, CA) antibody. After washing with PBS, the sections were reacted with Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) as the secondary antibody. DAPI (Vectashield H-1200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used for nuclear staining. The sections were then observed under a microscope (Power BX-51; Olympus, Tokyo, Japan).

Flow cytometric analysis

Cells immediately isolated from adipose tissue or after 7 days culture (ADSVFs) were subjected to cell surface marker analysis using a cell analyzer (fluorescence-activated cell sorting: FACS, FACScan, BD Biosciences San Jose, CA). The cells were reacted with primary antibodies of CD11b (Integrin- α M), CD29 (Integrin- β 1, Chemicon), CD31 (PECAM-1), CD34, CD45 (leukocyte common antigen), CD90, CD105, CD106 (VCAM, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), CD117 (c-Kit), CD133 (Prominin-1) (all were purchased from eBioscience, excluding CD29,