

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390388

研究課題名（和文） 生体適合性ポリマーによる高潤滑型関節機能改善剤の基礎的検討

研究課題名（英文） The basic study of the effect of biocompatible phospholipid polymer on the osteoarthritis progression

研究代表者

茂呂 徹 (MORO TORU)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：20302698

研究成果の概要（和文）：変形性関節症は、中高年者の生活の質を低下させ、生活寿命を短縮させる重大な生活習慣病であり、治療法を確立することは緊急の課題である。われわれはこの問題の解決のため、高潤滑性を有する生体適合性ポリマーを関節内に投与する治療法を創案した。本研究では、この治療法を確立するため、効率的に効果を発揮するための至適重合条件を検索した。また、この生体適合性ポリマーを用いて摩擦試験を行い、従来のヒアルロン酸製剤と比較して顕著に摩擦係数を改善することを明らかにした。さらに、これらの試験系で条件を絞り込んだ高潤滑型関節機能改善剤をマウス OA モデルに用い、OA の発症、進行を抑制することを明らかにした。以上の結果は、生体適合性ポリマーによる高潤滑型関節機能改善剤実用化へ向けた基礎検討を推進するための確信を得るに十分な結果であった。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the effect of biocompatible phospholipid polymer on the osteoarthritis progression, we used the ball-on-flat machine, which mimicked a natural joint, and the experimental osteoarthritis model. The friction tests using a ball-on-flat machine revealed that phospholipid polymer extremely improved the friction coefficient as compared to water and hyaluronic acid treatment. In addition, phospholipid polymer prevented the osteoarthritis progression in the experimental osteoarthritis model. From these results of the study, we believe that this new technology will prevent the osteoarthritis progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：① 医療・福祉、② 生体材料、③ ナノバイオ、④ バイオテクノロジー、  
⑤ トランスレーショナルリサーチ

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は、中高年者の関節疾患中で最も頻度の高い疾患の一つであり、膝関節や股関節等の主要な荷重関節に好発することから、中高年者の生活の質 (QOL) を低下させ、生活寿命を短縮させる重大な生活習慣病である。超高齢社会をむかえたわが国の現状を考えると、OA の患者数は今後も増え続けることは確実である。したがって、中高年者の QOL を低下させ医療費の高騰、労働力の低下の一因となる OA の治療法を確立することは、緊急の課題である。OA の中で、臨床症状を伴い日常生活で問題となるものは膝関節に多くみられ、年間約 90 万人もの新たな発症者がいる。膝 OA の治療は保存療法と手術療法に大別できるが、保存療法、特に薬物療法の果たす役割は大きい。薬物療法では一般的に、消炎鎮痛剤の経口投与や外用が頻用されているが、これらの治療が十分な効果を得られない場合、関節内へのヒアルロン酸製剤の注入が行われている。この治療法は、一定の治療成績をあげているものの、1) 1 回の注入で効果を得ることが難しく、また効果が得られた場合でも、持続させることが難しい、2) OA が進行した症例や 65 歳以上の高齢者ではその効果は少ないなど、効果が得られる症例が限定される、という欠点も指摘されている。そこでわれわれは、この治療法の欠点を解決するため、関節軟骨表面の構造に着目した。関節軟骨表面にはナノメートル単位のリン脂質層があり、軟骨表面の保護と関節の潤滑機構の改善に寄与している。そこで、生体内で安全かつ安定に長期間効果を発揮するリン脂質を投与すれば効果を発揮できると考え、生体適合性リン脂質ポリマー・2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) を用いた関節機能改善剤を創案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒアルロン酸・PMPC を用いた関節機能改善剤を実用化するための基礎検討を完成させることである。

## 3. 研究の方法

### 1) ヒアルロン酸-PMPC 共重合体の作製と解析

ヒアルロン酸-PMPC 共重合体の作製はラジカル重合法、あるいはラフト型重合法にて行った。重合時のパラメーターをかえ、軟骨

表面の保護、関節潤滑機構の改善、ヒアルロン酸の安定化・効果増強を効率的に行う共重合体構造を検索した。

### 2) 摩擦試験における摩擦係数の計測

摩擦試験機を用い、摩擦係数を計測した。関節面には金属 (CoCrMo 合金) およびウレタンを用い、ウレタン表面を金属が往復運動する摺動面とした。往復速度はヒトの歩行条件を考え 1 Hz とした。潤滑液には、上記 1) で検索したヒアルロン酸-PMPC 共重合体の他、ヒアルロン酸と PMPC の混合液、ヒアルロン酸溶液、PMPC 溶液、蒸留水 (コントロール群) を使用した。

### 3) マウス OA モデルを用いた関節機能改善剤の効果の検討

われわれが世界に先駆けて開発した、マウス OA モデル (*Osteoarthritis Cartilage*. 13:632, 2005、2004 年度米国骨代謝学会 Young Investigator Award 受賞) を用いて検討した。本モデルは、微小外科 (マイクロサージャリー) 技術を応用したもので、膝関節の靭帯および半月板の切離・切除の組み合わせによって、病期の進行が異なる 4 種類の OA を再現できるものである。まず、本研究開発にマウス OA モデルの評価系を用いるためのバリデーションを行った。続いて上記 1)、2) で条件を絞り込んだ関節潤滑剤を用い、その有効性を検討した。

## 4. 研究成果

### 1) ヒアルロン酸-PMPC 共重合体の作製と解析

ヒアルロン酸-PMPC 共重合体作製のための至適条件について、重合時の修飾比率、重合組成、分子量とその分布、PMPC ユニットの構造などをパラメーターと考え、検討を行った。また、将来の実用化も見据え、ヒアルロン酸、PMPC の低分子化や、ヒアルロン酸のポリオールとしての使用についても検討した。

### 2) 摩擦試験における摩擦係数の計測

まず、静摩擦係数を計測すると、ヒアルロン酸単剤では蒸留水を用いた場合の 49% まで摩擦係数を改善していたが、PMPC 単剤では 23% まで改善していた。また、これらの効果には濃度依存性があった。これに対し、ヒアルロン酸と PMPC の混合液では 14%、ヒアルロン酸-PMPC 共重合体では 32% まで摩擦係数を改善していた。次に動摩擦係数を計測すると、静摩擦係数と同様の傾向が見られ、ヒアルロン酸単剤で 40%、PMPC 単剤で 17%、ヒアルロン酸と PMPC の混合液では 5%、ヒアルロン酸-PMPC 共重合体では 21% まで摩擦係数を改善

していた。

### 3) マウス OA モデルを用いた関節機能改善剤の効果の検討

上記 1)、2)の結果を鑑み、ヒアルロン酸、PMPC 溶液をマウス OA モデルに用い評価検討を行った。生理食塩水を関節内投与したコントロール群では X 線像で軟骨下骨の骨硬化、関節アライメントの変化などの OA 変化がみられたのに対し、PMPC を関節内投与した群ではこれらの変化がみられず、Sham 手術の群と同様であった。また、組織学的所見を検討すると、コントロール群では軟骨細胞の分裂像と大型化がみられた。さらに、superficial zone の脱落と、middle zone の safranin-0 染色性の低下および cellularity の低下がみられ、病変は経時的に深層に及んだ。一方、PMPC を関節内投与した群ではこれらの変化がみられず、軟骨は滑らかな表面を保ち、safranin-0 の染色性は均一で、基質の破壊像や欠損像はみられなかった。また、関節軟骨の superficial zone では扁平な軟骨細胞が関節面と平行に配列しており、tidemark よりも表層の middle zone では円形の軟骨細胞が柱状配列を形成していた。これらの組織学所見は正常軟骨のものと同様と考えられた。

以上の結果は、生体適合性ポリマーによる高潤滑型関節機能改善剤実用化へ向けた基礎検討を推進するための確信を得るに十分な結果であった。今後、長期にわたり治療効果を発揮し、より病期の進んだ症例に有効である関節機能改善剤を実用化することができれば、OA を発症した中高年者ばかりでなく高度の関節変形を伴う関節リウマチの患者の QOL を改善することも期待できる。また、今回基礎検討を行った関節機能改善剤にはドラッグデリバリーシステムの性質を持たせることが可能と考えている (*Int J Pharm* 275:259, 2004)。現時点では、OA により破壊された軟骨を再生させる治療薬は実用化されていないが、将来的には軟骨表面の保護・関節潤滑機構の改善のみならず、軟骨再生や遺伝子治療に応用できる大きな可能性を秘めている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

- 1) Konno T, Ishihara K: Temporal and spatially controllable cell encapsulation using a Photo-immobilization of a water-soluble phospholipid polymer

with phenylboronic acid moiety.

*Biomaterials* 28: 1770-1777, 2007 (査読有).

- 2) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Konno T, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, and Ishihara K: Enhanced wear resistance of orthopaedic bearing due to the cross-linking of poly (MPC) graft chains induced by gamma-ray irradiation. *J Biomed Mater Res B* 84: 320-327, 2008 (査読有).
- 3) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, and Ishihara K: Effect of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine concentration on photo-induced graft polymerization of polyethylene in reducing the wear of orthopaedic bearing surface. *J Biomed Mater Res A* 86: 439-47, 2008 (査読有).
- 4) Fujii K, Matsumoto H, Koyama Y, Iwasaki Y, Ishihara K, Takakuda K: Prevention of biofilm formation with a coating of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer. *J Vet Med Sci* 70(2): 167-173, 2008 (査読有).
- 5) Ishihara K, Ando B, Takai M: Phosphorylcholine Group-immobilized surface prepared on poly(dimethylsiloxane) membrane by in situ reaction for its reduced biofouling. *Nanobiotechnology* 3(2): 83-88, 2008 (査読有).
- 6) Futamura K, Matsuno R, Konno T, Takai M, Ishihara K: Rapid Development of Hydrophilicity and Protein Adsorption Resistance by Polymer Surfaces Bearing Phosphorylcholine and Naphthalene Groups. *Langmuir* 24(18): 10340-10344, 2008 (査読有).
- 7) Kitano K, Matsuno R, Konno T, Takai M, Ishihara K: Nanoscale Structured Phospholipid Polymer Brush for Biointerface. *Tans Mater Res Soc Jpn* 33(3): 771-774, 2008 (査読有).
- 8) Kawaguchi H: Regulation of osteoarthritis development by Wnt- $\beta$ -catenin signaling through the endochondral ossification process. *J Bone Miner Res* 24: 8-11, 2009 (査読有).
- 9) Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K,

- Chung UI, and Kawaguchi H: C/EBP  $\beta$  promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57<sup>Kip2</sup>. *PLoS ONE* 4: e4543, 2009 (査読有).
- 10) Kyomoto M, Moro T, Iwasaki Y, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Superlubricious surface mimicking articular cartilage by grafting poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on orthopaedic metal bearings. *J Biomed Mater Res A* 91(3): 730-41, 2009 (査読有).
  - 11) Kyomoto M, Ishihara K: Self-initiated Surface Graft Polymerization of Phosphorylcholine on Poly(ether-ether-ketone) by Photoirradiation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1(3): 537-542, 2009 (査読有).
  - 12) Xu Y, Takai T, Ishihara K: Protein Adsorption and Cell Adhesion on Cationic, Neutral, and Anionic 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Copolymer Surfaces. *Biomaterials* 30(28): 4930-4938, 2009 (査読有).
  - 13) Seo JH, Matsuno R, Takai M, Ishihara K: Cell Adhesion on Phase-separated Surface of Block Copolymer Composed of Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) and Poly(dimethylsiloxane). *Biomaterials* 30(29): 5330-5340, 2009 (査読有).
  - 14) Kyomoto M, Moro T, Takatori Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K: Self-initiated surface grafting with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on poly(ether-ether-ketone). *Biomaterials* 31(6):1017-1024, 2010 (査読有).
- [学会発表] (計 54 件)
- 1) Ishihara K, Konno T: Cell recoverable polymer hydrogel matrix composed of phospholipid polymers. 7th International symposium on frontiers in biomedical polymers 2007 (FBPS2007). Ghent, Belgium, 2007. 6. 24-27.
  - 2) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Nano-scale modification with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer brings to ultra-longevity for orthopaedic bearing. 3rd UHMWPE International Meeting. Madrid, Spain, 2007. 9. 14-15.
  - 3) Higashikawa A, Saito T, Kamekura S, Ohba S, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Transcriptional regulation of type X collagen by Runx2: Molecular network underlying chondrocyte hypertrophy causing osteoarthritis. 29th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Honolulu, USA, 2007. 9. 16-19.
  - 4) Shimizu S, Asou Y, Itoh S, Chung UI, Kawaguchi H, Shinomiya K, Muneta T: Intra-articular osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin prevents cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis. 29th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Honolulu, USA, 2007. 9. 16-19.
  - 5) Kawaguchi H: Cartilage differentiation and osteoarthritis. 19th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular Cell Biology. Seoul, Korea, 2007. 10. 18-19.
  - 6) Kawaguchi H: Transcriptional regulation of cartilage degeneration from a mouse OA model. 2007 World Congress on Osteoarthritis. Ft. Lauderdale, USA, 2007. 12. 6-9.
  - 7) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Miyaji F, Yamawaki N, Ishihara K: Advanced wear resistance of MPC grafted surface with various phosphate density on cross-linked polyethylene. 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. San Francisco, USA, 2008. 3. 2-5.
  - 8) Futamura K, Ishihara K: Quick Providing of Hydrophilic and Protein Adsorption Resistant Surface by Phospholipid Polymers. 8<sup>th</sup> World Biomaterials Congress (WBC). Amsterdam, The Netherlands, 2008. 5. 28-6. 1.
  - 9) Asanuma Y, Ishihara K: Multi-Biofunctional Phospholipid Block

- Polymer Alloys with Segmented Polyurethane. Amsterdam, The Netherlands, 2008. 5. 28-6. 1.
- 10) Matsuno R, Ishihara K: Well Defined Phospholipid Polymer Grafting over Quantum Dot using RAFT Polymerization. 8<sup>th</sup> World Biomaterials Congress (WBC). Amsterdam, The Netherlands, 2008. 5. 28-6. 1.
  - 11) Kawaguchi H: Transcriptional regulation of osteoarthritis progression (Symposium: Update on Osteoarthritis: from Bench to Bedside -APLAR-OARSI Co-Sponsored Symposium). The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008). Yokohama, Japan, 2008. 9. 23-27.
  - 12) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Brush-like structure only gives high durability to cross-linked polyethylene among various surface-modified layers with MPC polymer. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). Las Vegas, USA, 2009. 2. 22-25.
  - 13) Higashikawa A, Saito T, Kamekura S, Ikeda T, Kan A, Moro T, Ohba S, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Transcriptional Regulation of Type X Collagen Expression and Hypertrophic Differentiation of Chondrocytes by Runx2 during Osteoarthritis Progression. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). Las Vegas, USA, 2009. 2. 22-25.
  - 14) Ishihara K, Matsuno R, Konno T, Takai M, and Asanuma Y: Antithrombogenic Polymer Alloy with Well-defined Block-type Phospholipid Polymer and Segmented Polyurethane for Cardiovascular Medical Devices. 2nd Asian Congress of Biomaterials. Singapore, Singapore, 2009. 6. 26.
  - 15) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Yamawaki N, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Cross-linked brush-like structure of surface-modified layers gives high durability to joint replacement. 22nd Annual conference of the European Society for Biomaterials (ESB). Lausanne, Switzerland, 2009. 9. 7-11.
  - 16) Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Kan A, Higashikawa A, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Distinct transcriptional control of chondrocyte hypertrophy and cartilage degeneration by C/EBP-beta and Runx2 during endochondral ossification. 2009 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). Montreal, Canada, 2009. 9. 10-13.
  - 17) Fukai A, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Akt1 in chondrocytes controls cartilage calcification during osteophyte formation in osteoarthritis. 2009 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). Montreal, Canada, 2009. 9. 10-13.
  - 18) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: High-density brush-like structure mimicking cartilage gives high durability to cross-linked polyethylene. 4th UHMWPE International Meeting. Torino, Italy, 2009. 9. 16-18.
  - 19) Kyomoto M, Moro T, Takatori Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K: Self-initiated surface graft polymerization of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on PEEK and carbon fiber reinforced PEEK for orthopaedic and spinal applications. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). New Orleans, USA, 2010. 3. 6-9.
  - 20) Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Akt1 in chondrocytes controls cartilage calcification during skeletal growth and osteophyte formation in osteoarthritis. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). New Orleans, USA, 2010. 3. 6-9.
  - 21) 川口 浩: 変形性関節症の診断と治療: 最近の進歩. 第81回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京, 2009. 4. 23-26.
  - 22) 茂呂 徹, 高取 吉雄, 石原 一彦, 山脇 昇, 京本 政之, 川口 浩: ミニシンポジウム「骨のバイオマテリアルと医工連携」.

第 27 回日本骨代謝学会学術集会. 大阪,  
7. 23-25, 2009.

- 23) 川口浩: 変形性関節症の治療標的分子へのアプローチ. 第 82 回 日本生化学 (シンポジウム「運動器形成・再生のための分子基盤」). 神戸, 2009. 10. 21-24.

[図書] (計 5 件)

- 1) 片岡一則, 位高啓史, 佐藤香枝, 小泉憲裕, 茂呂徹: 杏林図書, 医療ナノテクノロジー—最先端医学とナノテクの融合—. 2007, 227.
- 2) 金野智浩, 石原一彦: シーエムシー出版, 細胞親和性ソフトバイオマテリアル. 2008, 213-221.
- 3) 石原一彦: コロナ社, ポリマーバイオマテリアル -医療のための分子設計-. 2009.
- 4) Ishihara K, Jiyeon Choi J: Woodhead Publishing Ltd, Biocompatible Polymer Assembly on Metal Surfaces Metals for Biomedical Devices. 2010, 283-302.
- 5) Ishihara K: JAIST PRESS, Phospholipid Polymer Interfaces for Regulating Biological Response in: Nanobio-Interaces in Relation to Molecular Mobility. 2010, 7-14.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

茂呂 徹 (MORO TORU)  
東京大学・医学部附属病院  
・特任准教授  
研究者番号: 20302698

### (2) 研究分担者

高取 吉雄 (TAKATORI YOSHIO)  
東京大学・医学部附属病院  
・特任教授  
研究者番号: 40179461

石原 一彦 (ISHIHARA KAZUHIKO)  
東京大学・大学院工学系研究科・教授  
研究者番号: 90193341

川口 浩 (KAWAGUCHI HIROSHI)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 40282660

星地 亜都司 (SEICHI ATSUSHI)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 70236066  
(平成 19 年度まで、退職による交代)

苅田 達郎 (KARITA TATSURO)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 80359611  
(平成 20 年度より、退職による交代)

金野 智浩 (KONNO TOMOHIRO)  
東京大学・大学院工学系研究科  
・特任准教授  
研究者番号: 80371706