

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19739

研究課題名（和文）一体的、連続的なニッチ・リハビリテーションとセルラー・リハビリテーションの研究

研究課題名（英文）Research on niche- and cellular-rehabilitation

研究代表者

黒木 裕士（Kuroki, Hiroshi）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：20170110

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラットの尾部懸垂を行って後肢に体重を負荷しない免荷が膝関節軟骨に及ぼす影響、ラットの坐骨神経挫滅後の機能評価について三次元動作解析による歩行解析を用いる影響、細胞をペレット培養中に与える温度刺激が細胞外基質の合成に及ぼす影響、細胞移植とトレッドミル運動を組み合わせる介入がラットの機能回復に及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リハビリテーションで用いられる物理的刺激である荷重・免荷、および温熱、ならびに細胞移植とリハビリテーションで用いられる運動療法の併用治療が及ぼす影響について、動物を用いて明らかにした点に学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：This study revealed the effect of unloading by tail suspension on knee articular cartilage in rats, that of three-dimensional motion analysis of gait on functional evaluation outcomes after nerve crush injury in rats, that of heat stimuli during cell pellet culture on extracellular matrix synthesis, and that of combined therapy of cell transplantation and locomotor training on functional recovery in rats.

研究分野：リハビリテーション、理学療法

キーワード：リハビリテーション 理学療法学 再生医療 移植医療 関節軟骨 神経

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療とリハビリテーションの融合を再生リハビリテーションと呼ぶが (American Physical Therapy Association, <http://www.apta.org/regenerativerehab/>)、この領域で世界的潮流ができるのはこれからである (Perez-Terzic, 2014)。

とくに細胞移植を用いる再生医療では、細胞移植前にはニッチ (ニッチェ)・リハビリテーションすなわち移植しようとする細胞の環境を制御するリハビリテーションが、移植後はセラー・リハビリテーションすなわち移植した細胞が生体内で生着、順応、機能分化して役割を果たすことを促すリハビリテーションが必要である。

そこで、ニッチとセラーの各リハビリテーションを行う新たな方法論を開発することを目的として本課題に取り組んだ。

具体的には、リハビリテーションの方法は物理療法や運動療法など種々あることから、またリハビリテーションの成果を機能評価する指標は種々あることから、本課題では、ニッチとして物理療法のひとつ、温度刺激を、セラーとして運動療法のひとつ、トレッドミル運動による適度なメカニカル刺激を与え、また関節への体重不可をゼロにしてメカニカルストレスを完全に除く免荷を行い、これらの介入が及ぼす影響を検討した。

## 2. 研究の目的

上記の目的を達成するために、いくつかの小目的を定めた。

具体的には、リハビリテーション方法論の中から探索的に、目的 ~ とした。

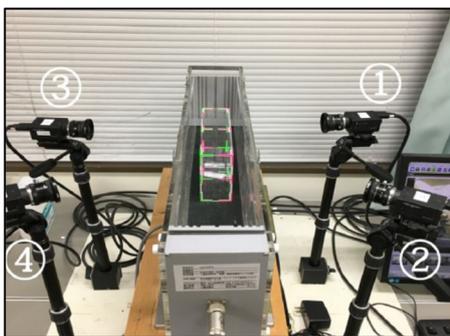
- (1) 目的 : 関節症の関節軟骨に対する物理的刺激を減じる免荷介入の影響を調べること。
- (2) 目的 : 動物の運動機能回復を判定するアウトカムとして従来は実施されていなかった歩行解析を導入すること。
- (3) 目的 : 細胞移植前段階で、培養した細胞への物理的刺激として温熱の影響を調べること。
- (4) 目的 : 細胞移植と物理的刺激介入の併用の影響について調べること。

## 3. 研究の方法

実験動物実験委員会および倫理委員会の承認を得て研究を行った。

(1) 研究 ではラット膝関節にモノヨード酢酸を関節内注射して関節症を発症させ、その後ケージ内で飼育する SE (sedentary) 群と、尾部を懸垂して後肢の関節に荷重しない免荷状態で飼育する HU (hindlimb unloading) 群に分け、膝関節への物理的刺激としてのメカニカルストレスを減じる介入の影響を調べた。具体的には膝関節組織標本を作製して組織像を観察し、変形性膝関節症の状態を評価する修正 Mankin 法と OARSI スコア法の結果を両群で比較した。

(2) 研究 では、下図 (左) のように ~ の 4 台のカメラを使用する三次元動作解析による歩行解析で、坐骨神経挫滅ラットの運動機能回復過程を調べた。具体的には下図 (右) のように下肢に数か所マーカーを付け、ankle angle および toe angle を計測し、それを挫滅手術の 1 ~ 6 週後に比較した。



(3) 研究 では、軟骨細胞に対し、物理的刺激としての温熱刺激を与える影響を調べた。具体的には、軟骨細胞を 37 で 3 日間ペレット培養した後、そのペレットを 3 群に分け、さらに 3 週間培養した。3 群は、32 のみで培養し 41 の温熱刺激を加えない群、32 で培養しながら 41 で 1 日 20 分間、週当たり 6 回の温熱刺激を加える群、37 のみで培養する群とした。各群のペレットの湿重量平均値、細胞外基質のコラーゲンタイプ 2 (COL2A1)、コラーゲンタイプ 1 および アグリカンの mRNA 発現を調べ比較した。また DNA 量、DNA 当たりのコラーゲン量を比較した。

(4) 研究 では、当初は、ラットの両膝に骨軟骨欠損を作成し、欠損部に細胞移植後に、物理

的刺激としてトレッドミル運動介入を行う計画であった。ラット大腿骨から採取した間葉系細胞の分化能の確認し、この細胞を培養して移植に必要な十分量の 1,000,000 個を確保可能であることを確認したが、この移植する細胞の培養が安定せず、たびたび細胞汚染が認められた。

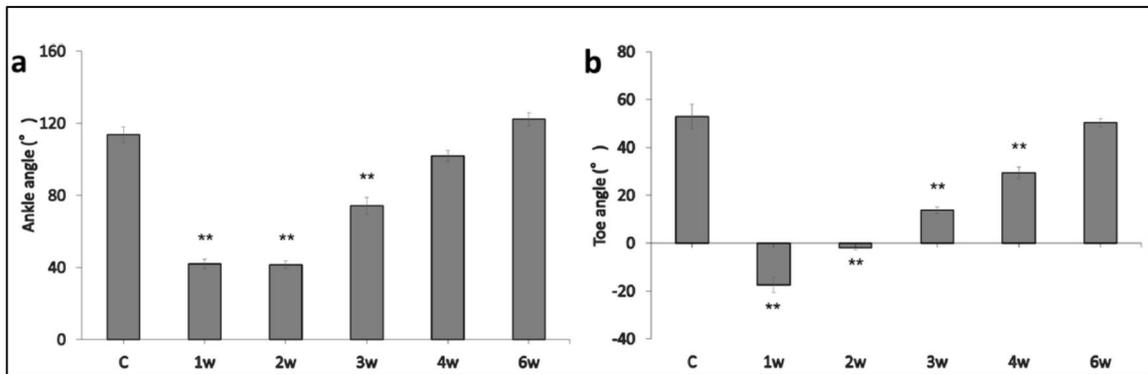
そこでこのラット膝関節研究を断念し、その代替研究として、ラット脳損傷後に神経細胞を移植し、その後、物理的刺激として 14 日間のトレッドミル運動介入を行った。

前頭葉に脳損傷をつくった 3 週齢のラットに神経細胞を移植し、その神経突起が線条体、内包、大脳脚、脊髄のどこで観察されるか評価した。また foot fault test で運動機能回復を評価した。

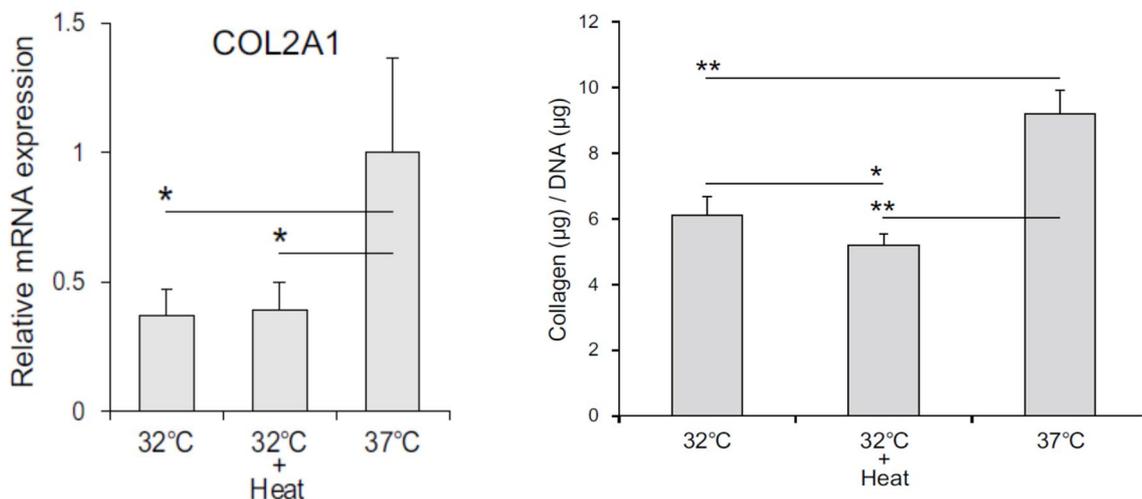
#### 4. 研究成果

(1) 研究 では、HU 群は SE 群よりも、修正 Mankin 法、OARSI スコア法のどちらも点数が低く、変形性膝関節症の悪化（進行）が抑制されている可能性があることが示唆された。

(2) 研究 では、ankle angle（下図の a）は、神経挫滅手術の 1~3 週後は対照群(C)に比べて有意に小さいが、4 週の時点で有意差がなくなり、6 週では対照群(C)の値まで回復した。Toe angle（下図の b）は、神経挫滅手術の 1~4 週後は対照群(C)に比べて有意に小さいが、6 週の時点で有意差がなくなり対照群(C)の値まで回復した。Ankle angle と Toe angle はいずれも経時的に回復した。この三次元動作解析による歩行解析は、包括的に歩行障害をとらえることができることから、再生医療とその後のリハビリテーション介入の効果判定をする上で重要であることが示唆された。



(3) 研究 では、下図（左）に示すように、培養 7 日後の COL2A1 の mRNA 発現は 37 で培養した群（37）が他の群よりも有意に高かった。また下図（右）の中央に示されている 32 で培養しながら 41 で 1 日 20 分間の温熱刺激を週当たり 6 回与える群（32 +Heat）では、培養 21 日後のコラーゲン量は、他の群に比較して有意に低いことが明らかとなった。



(4) 研究 では、神経細胞移植単独の群では、移植した神経細胞の神経突起が線条体と内包だけに伸びていたのに対し、神経細胞移植に加えてトレッドミル運動を組み合わせる介入を行った群では、移植した神経細胞の神経突起が線条体、内包、大脳脚および脊髄まで伸びていた。また foot fault test の成績は神経細胞移植単独群に比べて有意に良い成績であった。したがって、脳損傷ラットに対する神経細胞移植後にトレッドミル運動をおこなうリハビリテーション治療は、機能回復を促進する可能性があることが示唆された。

これら研究 ~ の結果を基礎として、現在、代表者らは International Consortium for Regenerative Rehabilitation (国際再生リハビリテーション・コンソシアム) に参画し、以下の国際共同研究を行う成果を得ている。

Willett NJ, Boninger ML, Miller LJ, Alvarez L, Aoyama T, Bedoni M, Brix KA, Chisari C, Christ G, Dearth CL, Dyson-Hudson TA, Evans CH, Goldman SM, Gregory K, Gualerzi A, Hart J, Ito A, Kuroki H, Loghmani MT, Mack DL, Malanga GA, Noble-Haeusslein L, Pasquina P, Roche JA, Rose L, Stoddart MJ, Tajino J, Terzic C, Topp KS, Wagner WR, Warden SJ, Wolf SL, Xie H, Rando TA, Ambrosio F. Taking the Next Steps in Regenerative Rehabilitation: Establishment of a New Interdisciplinary Field. **Arch Phys Med Rehabil**. 2020;101(5):917-923. doi: 10.1016/j.apmr.2020.01.007. (査読有)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahashi I, Matsuzaki T, Kuroki H, Hosono M	4. 巻 26
2. 論文標題 Induction of osteoarthritis by injecting monosodium iodoacetate into the patellofemoral joint of an experimental rat model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0196625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pone.0196625	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi I, Matsuzaki T, Kuroki H, Hosono M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Joint unloading inhibits articular cartilage degeneration in knee joints of a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Osteoarthritis Cartilage	6. 最初と最後の頁 1084-1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joca.2019.03.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimogawa T, Sakaguchi H, Kikuchi T, Tsuchimochi R, Sano N, Torikoshi S, Ito A, Aoyama T, Koji Iihara K, Takahashi J.	4. 巻 4
2. 論文標題 Therapeutic Effects of Combined Cell Transplantation and Locomotor Training in Rats With Brain Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NPJ Regen Med	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41536-019-0075-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wang T, Ito A, Tajino J, Kuroki H, Aoyama T.	4. 巻 156
2. 論文標題 3D Kinematic Analysis for the Functional Evaluation in the Rat Model of Sciatic Nerve Crush Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Vis. Exp.	6. 最初と最後の頁 e60267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/60267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tajino J, Ito A, Tanimura M, Yamaguchi S, Iijima H, Nakahata A, Kiyama W, Aoyama T, Kuroki H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Three-dimensional motion analysis for comprehensive understanding of gait characteristics after sciatic nerve lesion in rodents	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31579-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang T, Ito A, Aoyama T, Nakahara R, Nakahata A, Ji X, Zhang J, Kawai H, Kuroki H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: A comparison between sciatic functional index and kinematic analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0208985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0208985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito A, Aoyama T, Iijima H, Nishitani K, Tajino J, Kuroki H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Periodic mild heat stimuli diminish extracellular matrix synthesis in pellet cultured human chondrocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Res Notes	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-019-4058-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Willett NJ, Ito A, Kuroki H, Ambrosio F, et al.	4. 巻 101
2. 論文標題 Taking the Next Steps in Regenerative Rehabilitation: Establishment of a New Interdisciplinary Field	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arch Phys Med Rehabil	6. 最初と最後の頁 917-923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apmr.2020.01.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ

- 1) [http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human\\_health/pt0102/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/pt0102/)
- 2) <http://kuroki-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	伊藤 明良  (Ito Akira)  (50762134)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	