

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25242055

研究課題名(和文) 関節軟骨および軟骨細胞に対する物理的刺激を用いたリハビリテーションの基礎的研究

研究課題名(英文) effect of rehabilitation using mechanical stimuli on articular cartilage and chondrocyte

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) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養温度が軟骨細胞と細胞外基質に与える影響を検討すること、間葉系間質細胞(MSC)を移植した後に低出力超音波(LIPUS)が軟骨再生および軟骨下骨再生に及ぼす影響を検証すること、および変形性膝関節症(膝OA)に対するトレッドミル運動が及ぼす影響を検討することを目的として研究を行った。その結果、37℃で細胞外基質が最も形成されること、MSC移植にLIPUSを併用すると効果があること、ならびに運動を適切な時期に行うと骨形成蛋白の発現増大を介して膝OA進行を予防することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Purpose of the study was to verify the effect of culture temperature on chondrocyte and extracellular matrix, the effect of application of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) after mesenchymal stromal cell (MSC) transplantation on regeneration of articular cartilage and subchondral bone, and the effect of treadmill walking (TW) on knee osteoarthritis. The 37 centigrade was effective to generate extracellular matrix, LIPUS was effective after MSC transplantation, and TW increased the expression of Bone Morphogenetic Proteins and prevented the progression of knee OA.

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 物理的刺激 関節軟骨 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

自己再生能に乏しい関節軟骨は、損傷を放置すると自然治癒せず変形性関節症に至る。そのため種々の治療法とリハビリテーション法が検討されている。代表者らはこれまで骨軟骨移植術の動物実験を実施してきたが、免荷状態で飼育する影響は検証していなかった。軟骨細胞の研究を推進してきたが培養過程の軟骨細胞の脱分化が解決すべき課題である。移植後の物理刺激介入やリハビリテーションの有効性・安全性を調べた研究はほとんどない。変形性膝関節症 (Knee Osteoarthritis: 膝 OA) のモデル動物を用い研究してきたが膝 OA 進行予防のリハビリテーションはまだ遅れている。

これらの背景から研究 ~ を実施した。

2. 研究の目的

研究 では骨軟骨移植術モデルに対する免荷の影響を検討すること、研究 では異なる培養温度が軟骨細胞の再分化と細胞外基質形成に与える影響を検討すること、研究 では、低出力超音波 (LIPUS) が間葉系間質細胞 (MSC) を移植した後の骨軟骨再生に及ぼす影響を検証すること、研究 では膝 OA に対する緩徐トレッドミル運動 (Treadmill Walking: TW) が及ぼす影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

動物実験委員会の承認を得て行った。

研究 では、日本白色家兔に骨軟骨移植術を施し、術直後からハンモック型スーツを着用させ免荷状態で飼育した。

研究 では、32、37、41 の3条件で最大 21 日間ペレット培養した。軟骨細胞の分化状態と細胞外基質形成を、湿重量測定、遺伝子発現解析、組織学的観察、超微細構造観察、および生化学的解析によって検討した。

研究 では、ラットの両膝に骨軟骨欠損を作成し 4 週間の自由飼育後、MSC を右膝関節に注入し、左膝関節には対照膝としてリン酸緩衝液を注入した。LIPUS 照射群と非照射群に分けた。Control 群、LIPUS 群、MSC 群、MSC+LIPUS (MSCL) 群の 4 群に分け介入開始から 4、8 週後に膝関節を摘出し、micro-CT にて解析し欠損修復部分の骨密度 (BV/TV) を算出した。ALP 染色、サフラン O 染色、HE 染色、I 型および II 型コラーゲンを観察した。

研究 では、ラットに外傷性膝 OA を惹起する内側半月板不安定性 (Destabilized Medial Meniscus: DMM) モデルを作成した。8 週間の自然飼育を行う DMM 群、術後 2 日目から 8 週間の TW を行う DMM+TW(0-8) 群、術後 2 日目から 4 週間の TW を行う DMM+TW(0-4) 群、術後 4 週時から 4 週間の TW を行う DMM+TW(4-8) 群に分け、術後 8 週時に膝関節を摘出し μ -Computed Tomography (μ -CT) を用いて軟骨下骨の変化

を観察した。関節軟骨、軟骨下骨の変化を観察した。軟骨細胞と骨芽細胞における骨形成蛋白 (Bone Morphogenetic Proteins: BMPs) の陽性細胞率を評価した。

4. 研究成果

研究 は、当初予想していない、免荷状態の飼育により、家兔の体重が激減する事態が生じたことから中止した。

研究 では、37 条件において型コラーゲンの mRNA 発現が最も高くなり、細胞外基質も最も形成されることが示唆された。

研究 では、介入 4 週後、BV/TV は Control 群と MSC 群と比べ、LIPUS 群と MSCL 群で有意に高かった。Control 群に比べ LIPUS、MSC、MSCL の 3 群では修復軟骨部の II 型コラーゲン発現は増加した。Wakitani スコアは Control 群に比べて LIPUS、MSC、MSCL の 3 群で有意に改善した。介入 8 週後では修復軟骨部における II 型コラーゲンの発現は Control 群に比べて LIPUS、MSC、MSCL の 3 群で著明に発現した。

研究 では、 μ -CT 上では DMM 群の内側脛骨関節面に多数の骨吸収像が観察されたが TW はその骨吸収像の拡大を予防した。DMM 群では内側脛骨側の関節軟骨変性ならびに軟骨下骨破壊像が観察されたが TW はいずれも予防した。TW は関節軟骨表層の軟骨細胞や軟骨下骨の骨芽細胞における BMP-2、BMP-6 の陽性細胞率を増大させた。TW による BMP 発現増大効果は運動開始時期によって異なり DMM+TW(4-8) 群において BMP 陽性細胞率の増大や OA 進行予防効果が最も顕著であった。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 3 3 件)

- 1) Induction of osteoarthritis by injecting monosodium iodoacetate into the patellofemoral joint of an experimental rat model. Takahashi I, Matsuzaki T, **Kuroki H**, Hosono M. PLoS One. 2018; 13(4):e0196625. doi: 10.1371/journal.pone.0196625. eCollection 2018. 査読有
- 2) Pathohistological investigation of osteochondral tissue obtained during total knee arthroplasty after osteochondral autologous transfer: a case report. Tanimura-Nagai M, Harada H, **Aoyama T**, Yamaguchi S, **Ito A**, Tajino J, Iijima H, Zhang X,

- Kuroki H**, Kobayashi M. BMC Res Notes. 2017 Jun 6;10(1):194. doi: 10.1186/s13104-017-2513-0. 査読有
- 3) Coexisting lateral tibiofemoral osteoarthritis is associated with worse knee pain in patients with mild medial osteoarthritis. Iijima H, **Aoyama T**, Nishitani K, **Ito H**, Fukutani N, Isho T, Kaneda E, **Kuroki H**, Matsuda S. Osteoarthritis Cartilage. 2017 Aug;25(8):1274-1281. doi: 10.1016/j.joca.2017.02.801. 査読有
- 4) Physiological exercise loading suppresses post-traumatic osteoarthritis progression via an increase in bone morphogenetic proteins expression in an experimental rat knee model. Iijima H, **Ito A**, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Kiyan W, Nakahata A, Zhang J, Wang T, **Aoyama T**, Nishitani K, **Kuroki H**. Osteoarthritis Cartilage. 2017 Jun;25(6):964-975. doi: 10.1016/j.joca.2016.12.008. 査読有
- 5) Mechanical Stress by Spasticity Accelerates Fracture Healing After Spinal Cord Injury. Sakitani N, Iwasawa H, Nomura M, Miura Y, **Kuroki H**, Ozawa J, Moriyama H. Calcif Tissue Int. 2017 May 22. doi: 10.1007/s00223-017-0293-0. 査読有
- 6) Thinning of articular cartilage after joint unloading or immobilization. An experimental investigation of the pathogenesis in mice. Nomura M, Sakitani N, Iwasawa H, Kohara Y, Takano S, Wakimoto Y, **Kuroki H**, Moriyama H. Osteoarthritis Cartilage. 2017 May;25(5):727-736. doi: 10.1016/j.joca.2016.11.013. 査読有
- 7) Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound after Mesenchymal Stromal Cell Injection to Treat Osteochondral Defects: An In Vivo Study. Yamaguchi S, **Aoyama T**, **Ito A**, Nagai M, Iijima H, Tajino J, Zhang X, Wataru K, **Kuroki H**. Ultrasound Med Biol. 2016 Dec;42(12):2903-2913. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.07.021. 査読有
- 8) Remobilization causes site-specific cyst formation in immobilization-induced knee cartilage degeneration in an immobilized rat model. Nagai M, **Ito A**, Tajino J, Iijima H, Yamaguchi S, Zhang X, **Aoyama T**, **Kuroki H**. J Anat. 2016 Jun;228(6):929-39. doi: 10.1111/joa.12453. 査読有
- 9) The Effect of Exercise on the Early Stages of Mesenchymal Stromal Cell-Induced Cartilage Repair in a Rat Osteochondral Defect Model. Yamaguchi S, **Aoyama T**, **Ito A**, Nagai M, Iijima H, Tajino J, Zhang X, Kiyan W, **Kuroki H**. PLoS One. 2016 Mar 11;11(3):e0151580. doi: 10.1371/journal.pone.0151580. eCollection 2016. 査読有
- 10) Exercise intervention increases expression of bone morphogenetic proteins and prevents the progression of cartilage-subchondral bone lesions in a post-traumatic rat knee model. Iijima H, **Aoyama T**, **Ito A**, Tajino J, Yamaguchi S, Nagai M,

- Kiyan W, Zhang X, Kuroki H. Osteoarthritis Cartilage. 2016 Jun;24(6):1092-102. doi: 10.1016/j.joca.2016.01.006. Epub 2016 Jan 19. 査読有
- 11) Effect of microfabricated microgroove-surface devices on the morphology of mesenchymal stem cells. Zhang X, Aoyama T, Yasuda T, Oike M, Ito A, Tajino J, Nagai M, Fujioka R, Iijima H, Yamaguchi S, Kakinuma N, Kuroki H. Biomed Microdevices. 2015 Dec;17(6):116. doi: 10.1007/s10544-015-0016-0. 査読有
 - 12) Subchondral plate porosity colocalizes with the point of mechanical load during ambulation in a rat knee model of post-traumatic osteoarthritis. Iijima H, Aoyama T, Tajino J, Ito A, Nagai M, Yamaguchi S, Zhang X, Kiyan W, Kuroki H. Osteoarthritis Cartilage. 2016 Feb;24(2):354-63. doi: 10.1016/j.joca.2015.09.001. 査読有
 - 13) The effects of short-term hypoxia on human mesenchymal stem cell proliferation, viability and p16(INK4A) mRNA expression: Investigation using a simple hypoxic culture system with a deoxidizing agent. Ito A, Aoyama T, Yoshizawa M, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, Kuroki H. J Stem Cells Regen Med. 2015 May 30;11(1):25-31. eCollection 2015. 査読有
 - 14) Culture temperature affects human chondrocyte messenger RNA expression in monolayer and pellet culture systems. Ito A, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, Aoyama T, Kuroki H. PLoS One. 2015 May 26;10(5):e0128082. doi: 10.1371/journal.pone.0128082. eCollection 2015. 査読有
 - 15) Alteration of cartilage surface collagen fibers differs locally after immobilization of knee joints in rats. Nagai M, Aoyama T, Ito A, Tajino J, Iijima H, Yamaguchi S, Zhang X, Kuroki H. J Anat. 2015 May;226(5):447-57. doi: 10.1111/joa.12290. 査読有
 - 16) Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Yamaguchi S, Nagai M, Tajino J, Zhang X, Kuroki H. Osteoarthritis Cartilage. 2015 Sep;23(9):1563-74. doi: 10.1016/j.joca.2015.04.015. 査読有
 - 17) Intermittent application of hypergravity by centrifugation attenuates disruption of rat gait induced by 2 weeks of simulated microgravity. Tajino J, Ito A, Nagai M, Zhang X, Yamaguchi S, Iijima H, Aoyama T, Kuroki H. Behav Brain Res. 2015;287:276-84. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.030. 査読有
 - 18) Discordance in recovery between altered locomotion and muscle atrophy induced by simulated microgravity in rats. Tajino J, Ito A, Nagai M, Zhang X, Yamaguchi S, Iijima H, Aoyama T, Kuroki H. J Mot Behav. 2015;47(5):397-406. doi: 10.1080/00222895.2014.1003779. 査

- 読有
- 19) Culture temperature affects redifferentiation and cartilaginous extracellular matrix formation in dedifferentiated human chondrocytes. **Ito A, Aoyama T, Iijima H, Tajino J, Nagai M, Yamaguchi S, Zhang X, Kuroki H.** J Orthop Res. 2015 May;33(5):633-9. doi: 10.1002/jor.22808. 査読有
- 20) Regional comparisons of porcine menisci. Zhang X, **Aoyama T, Ito A, Tajino J, Nagai M, Yamaguchi S, Iijima H, Kuroki H.** J Orthop Res. 2014 Dec;32(12):1602-11. doi: 10.1002/jor.22687. 査読有
- 21) Contributions of biarticular myogenic components to the limitation of the range of motion after immobilization of rat knee joint. Nagai M, **Aoyama T, Ito A, Iijima H, Yamaguchi S, Tajino J, Zhang X, Akiyama H, Kuroki H.** BMC Musculoskelet Disord. 2014 Jul 7;15:224. doi: 10.1186/1471-2474-15-224.
- 22) Destabilization of the medial meniscus leads to subchondral bone defects and site-specific cartilage degeneration in an experimental rat model. Iijima H, **Aoyama T, Ito A, Tajino J, Nagai M, Zhang X, Yamaguchi S, Akiyama H, Kuroki H.** Osteoarthritis Cartilage. 2014 Jul;22(7):1036-43. doi: 10.1016/j.joca.2014.05.009. 査読有
- 23) Evaluation of reference genes for human chondrocytes cultured in several different thermal environments. **Ito A, Aoyama T, Tajino J, Nagai M, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, Akiyama H, Kuroki H.** Int J Hyperthermia. 2014 May;30(3):210-6. doi: 10.3109/02656736.2014.906048. 査読有
- 24) Immature articular cartilage and subchondral bone covered by menisci are potentially susceptible to mechanical load. Iijima H, **Aoyama T, Ito A, Tajino J, Nagai M, Zhang X, Yamaguchi S, Akiyama H, Kuroki H.** BMC Musculoskelet Disord. 2014 Mar 26;15:101. doi: 10.1186/1471-2474-15-101. 査読有
- 25) Optimum temperature for extracellular matrix production by articular chondrocytes. **Ito A, Aoyama T, Iijima H, Nagai M, Yamaguchi S, Tajino J, Zhang X, Akiyama H, Kuroki H.** Int J Hyperthermia. 2014 Mar;30(2):96-101. doi: 10.3109/02656736.2014.880857. 査読有
- 26) Effects of the thermal environment on articular chondrocyte metabolism: a fundamental study to facilitate establishment of an effective thermotherapy for osteoarthritis. **Ito A, Aoyama T, Tajino J, Nagai M, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, Akiyama H, Kuroki H.** J Jpn Phys Ther Assoc. 2014;17(1):14-21. doi: 10.1298/jjpta.17.14. 査読有
- 27) Effects of exercise level on biomarkers in a rat knee model of osteoarthritis. Yamaguchi S, **Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Zhang X, Tajino J, Kuroki H.** J Orthop Res. 2013 Jul;31(7):1026-31. doi:

- 10.1002/jor.22332. 査読有
- 28) Low-intensity pulsed ultrasound inhibits messenger RNA expression of matrix metalloproteinase-13 induced by interleukin-1 β in chondrocytes in an intensity-dependent manner. **Ito A**, **Aoyama T**, Yamaguchi S, Zhang X, **Akiyama H**, **Kuroki H**. *Ultrasound Med Biol*. 2012 Oct;38(10):1726-33. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.06.005. 査読有
- 29) Evaluation of reference genes for human chondrocytes cultured in several different thermal environments. **Ito A**, **Aoyama T**, Tajino J, Nagai M, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, **Akiyama H**, **Kuroki H**. *Int J Hyperthermia*. 2014 May;30(3):210-6. doi: 10.3109/02656736.2014.906048. 査読有
- 30) Immature articular cartilage and subchondral bone covered by menisci are potentially susceptible to mechanical load. Iijima H, **Aoyama T**, **Ito A**, Tajino J, Nagai M, Zhang X, Yamaguchi S, **Akiyama H**, **Kuroki H**. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014 Mar 26;15:101. doi: 10.1186/1471-2474-15-101. 査読有
- 31) Optimum temperature for extracellular matrix production by articular chondrocytes. **Ito A**, **Aoyama T**, Iijima H, Nagai M, Yamaguchi S, Tajino J, Zhang X, **Akiyama H**, **Kuroki H**. *Int J Hyperthermia*. 2014 Mar;30(2):96-101. doi:

- 10.3109/02656736.2014.880857. 査読有
- 32) Effects of the thermal environment on articular chondrocyte metabolism: a fundamental study to facilitate establishment of an effective thermotherapy for osteoarthritis. **Ito A**, **Aoyama T**, Tajino J, Nagai M, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, **Akiyama H**, **Kuroki H**. *J Jpn Phys Ther Assoc*. 2014;17(1):14-21. doi: 10.1298/jjpta.17.14.
- 33) Effects of exercise level on biomarkers in a rat knee model of osteoarthritis. Yamaguchi S, **Aoyama T**, **Ito A**, Nagai M, Iijima H, Zhang X, Tajino J, **Kuroki H**. *J Orthop Res*. 2013 Jul;31(7):1026-31. doi: 10.1002/jor.22332. 査読有

{学会発表}(計12件)

{図書}(計0件)

{産業財産権}

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

{その他}

ホームページ等

(1)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

(1)研究代表者

黒木裕士 (KUROKI HIROSHI) 京都大学・大学院医学研究科・教授 研究者番号: 20170110

(2)研究分担者

秋山治彦 (AKIYAMA HARUHIKO) 岐阜大学・大学院医学研究科・教授 研究者番号: 60402830 青山朋樹 (AOYAMA TOMOKI) 京都大学・大学院医学研究科・准教授 研究者番号: 90378886

長井桃子 (NAGAI MOMOKO) 京都大学・大学院医学研究科・研究員 研究者番号: 50755676 (H27~28年度)

伊藤明良 (ITO AKIRA) 京都大学・大学院医学研究科・助教 研究者番号: 50762134 (H28~29年度)