

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18H03129  
研究課題名（和文）移植再生医療リハビリテーションの開発  
  
研究課題名（英文）Development of regenerative 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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、基礎研究の視点から、主として、末梢神経挫滅モデルラットに対する超音波介入の影響を検証した結果、超音波刺激強度は60mW/cm<sup>2</sup>で効果がみられた。また損傷後1週以降ではなく、翌日から1週間または4週間の超音波介入が末梢神経再生を促進し、その再生促進メカニズムの1つとしてマクロファージ表現型の調整が関与していることが明らかとなった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

すでに生体臓器移植・組織移植が行われている中、細胞等を用いる再生医療が実施される新時代が訪れたことから、これら移植再生医療のリハビリテーションも重要となる。今回、末梢神経再生に関するリハビリテーション介入の一つである超音波介入の効果が検証されたこと、およびマクロファージ解析によって得られた成果をもとに今後そのメカニズムを解明する根拠が得られたことは学術的意義および社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：From the viewpoint of basic research, the effects of ultrasonic intervention on peripheral nerve crush model of rats were mainly examined, and the effect was observed at an ultrasonic stimulation intensity of 60 mW/cm<sup>2</sup>. In addition, it is clear that ultrasound intervention for 1 week or 4 weeks from the next day of crush injury, not after 1 week after injury, promotes peripheral nerve regeneration, and that regulation of macrophage phenotype may be involved as one of the regeneration promoting mechanisms.

研究分野：リハビリテーション 理学療法学

キーワード：リハビリテーション 再生医学 理学療法 末梢神経 関節軟骨 トレッドミル 超音波刺激 免荷刺激

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

すでに生体臓器移植・組織移植が行われている中で、細胞等を用いる再生医療が実施される新時代が訪れた。これら移植再生医療においては臓器・組織や細胞が生体に生着、順応、機能分化することが必須であり、それを支援する「移植再生医療リハビリテーション」も重要となる。本研究課題では、基礎研究の視点から「移植再生医療リハビリテーション」を創設、提案、開発することを目的に、物理療法と運動療法の介入を検証することに取組んだ。

### 2. 研究の目的

外傷や手術などによる関節軟骨損傷や末梢神経損傷時のスタンダード治療は自家移植術であるが、これは自己の健全組織を犠牲にして損傷部位に移植する治療方法である。そのため犠牲を伴わない移植再生医療の実用化に向けた研究が進められているが、再生リハビリテーション・プロトコルはまだ構築されていない。

すでに代表者らは、関節軟骨損傷モデルの基礎研究において、細胞移植後の超音波介入や運動介入の影響を調べていることから、本課題では末梢神経損傷モデルのリハビリテーション研究に取組んだ。具体的な目的は以下の通りとした。

- (1)末梢神経再生に及ぼす影響について動物モデルで検証すること
- (2)トレッドミル運動解析と同運動介入の影響を調べる
- (3)バイオ3Dプリンターを用いた人工神経導管の作成を試みる

### 3. 研究の方法

以下の通り、末梢神経再生に及ぼす影響について動物モデルでの検証、トレッドミル運動解析と同運動介入の影響、バイオ3Dプリンターを用いた人工神経導管の作成を試みた。

#### (1) 末梢神経再生に及ぼす影響について動物モデルでの検証

運動機能等への影響の検証： ラット坐骨神経挫滅モデルを作成し、神経再生における超音波照射の影響を検証した。12週齢ラットを超音波照射群とSham群に分けた。超音波照射設定は、1MHz、20% duty cycle、5分/回、毎日照射、照射強度は140mW/cm<sup>2</sup> (SATA)とした。効果検証のための分析は、体重、神経組織の凍結切片の免疫組織化学染色とした。また超音波照射の強度によって0mW群(擬似照射による対照群)、60mW群、140mW群(強度はそれぞれ空間平均時間平均)に分け、運動機能としてSFI (Sciatic Functional Index)を用いて再生を評価した。また歩行中の足関節角度(三次元動作解析装置)、下腿三頭筋および前脛骨筋の湿重量、体重を調べ、電子顕微鏡解析を行った。

抗炎症作用・マクロファージ等への影響の検証： ラット坐骨神経挫滅モデルを作成した。神経再生における超音波照射の抗炎症作用・マクロファージへの影響を検証した。超音波照射設定は、1MHz、20% duty cycle、5分/回、毎日照射、照射強度は140mW/cm<sup>2</sup> (SATA)とした。効果検証のための分析は、体重、神経組織の凍結切片の免疫組織化学染色、PCR解析によるmRNA測定とした。髄鞘厚も調べた。また超音波照射の強度によって0mW群(擬似照射による対照群)、60mW群、140mW群(強度はそれぞれ空間平均時間平均)に分け、運動機能としてSFIを用いて再生を評価した。60mW群で再生効果がみられたため、0mW群と60mW群においてマクロファージの表現型の変化を比較・解析した。

#### (2)トレッドミル運動解析と同運動介入の影響

トレッドミル運動プロトコルを作成した。

#### (3)バイオ3Dプリンターを用いた人工神経導管の作成を試みた。

バイオ3Dプリンターを用いて人工神経導管を試作した。

### 4. 研究成果

以下の成果が得られた。なお新型コロナウイルス感染症 COVID-19の影響により、本課題は2021年度終了予定であったが1年間繰り越し、2022年度終了となった。

(1) 末梢神経再生に及ぼす影響について動物モデルでの検証

図1のように超音波疑似照射 Sham 群、末梢神経挫滅損傷 1 日後から 28 日まで超音波治療する群、同損傷 7 日後から 28 日まで超音波治療する群、同損傷 14 日後から 28 日まで超音波治療する群を比較した結果 (図1)、損傷 1 日後から超音波治療を実施した群では髄鞘厚が大きい傾向がみられた (図2)。超音波治療による歩行機能回復促進効果は認められなかった。

超音波治療期間 (損傷後 1 週間、2 週間、4 週間) を比較した結果、損傷後 1、2、3、4 週に実施した歩行機能解析では影響は認められなかった。その一方で足趾運動の再獲得が早まっている傾向がみられた。損傷後 1 週以降ではなく、翌日から 1 週間または 4 週間の超音波治療が末梢神経再生を促進し、その再生促進メカニズムの 1 つとしてマクロファージ表現型の調整が関与している可能性が明らかとなった。

(2) トレッドミル運動介入の影響の検証

トレッドミル運動介入の影響を検証するまで至らなかったが、本課題で確立したトレッドミル運動解析方法 (図3) を用いた関連研究において Nature Medicine に掲載される研究成果が得られた。

(3) バイオ 3D プリンターを用いた人工神経導管の作成

3D プリンターでの研究においては、挫滅させた坐骨神経の中枢部と末梢部を繋ぐ人工神経導管を作成できないか検討した結果、導管作成で重要となる細胞生存率を今後一層向上させる必要があることが判明した。

(4) その他

3D プリンターでの神経導管の研究は更に時間を要すると見込まれることから、すでに代表者らが取組んできた関節軟骨損傷の研究を発展させ、膝関節圧迫によるモデルラットの作成を試みたところ変形性膝関節症が生じることを確認した (図4)。マウスでの同様の成果は報告されているが、ラットでの検証は世界で初めてとなるので、今後、このモデルの研究についても推進したい。

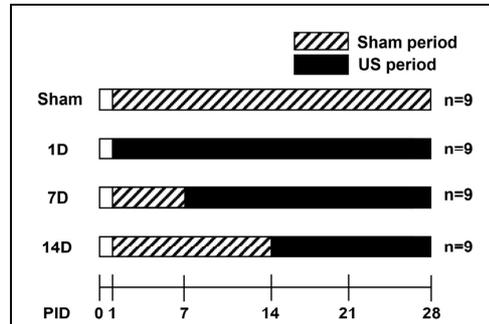


図1 Sham 群、損傷 1 日後から超音波治療を実施した群では髄鞘厚が大きい傾向がみられた

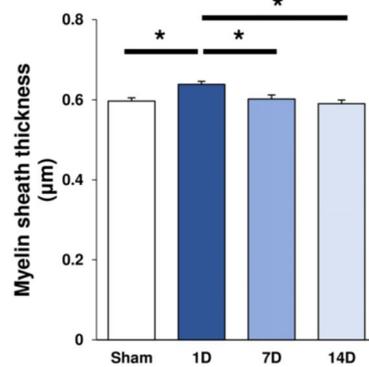


図2 損傷 1 日後から超音波治療を実施した群では髄鞘厚が大きい傾向がみられた

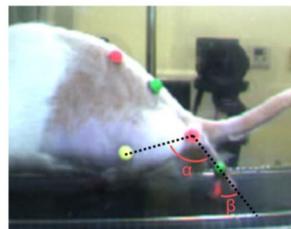


図3 足趾および足関節角度を測定するトレッドミル運動解析

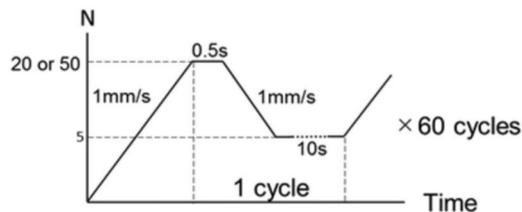
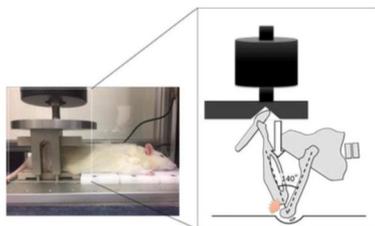


図4 膝関節を 20 または 50N で圧迫するラットのモデル作成を試みたところ変形性膝関節症が生じることを確認した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計22件（うち査読付論文 22件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Inoue S, Hatakeyama J, Aoki H, Kuroki H, Niikura T, Oe K, Fukui T, Kuroda R, Akisue T, Moriyama H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Utilization of Mechanical Stress to Treat Osteoporosis: The Effects of Electrical Stimulation, Radial Extracorporeal Shock Wave, and Ultrasound on Experimental Osteoporosis in Ovariectomized Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Calcif Tissue Int.	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00223-021-00831-6.	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 Inoue S, Hatakeyama J, Aoki H, Kuroki H, Niikura T, Oe K, Fukui T, Kuroda R, Akisue T, Moriyama H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of ultrasound, radial extracorporeal shock waves, and electrical stimulation on rat bone defect healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann N Y Acad Sci.	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nyas.14581.	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 Wang T, Ito A, Xu S, Kawai H, Kuroki H, Aoyama T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Low-Intensity Pulsed Ultrasound Prompts Both Functional and Histologic Improvements While Upregulating the Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression after Sciatic Crush Injury in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ultrasound Med Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ultrasmedbio.2021.02.009.	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 -
2. 論文標題 Disuse Atrophy of Articular Cartilage Induced by Unloading Condition Accelerates Histological Progression of Osteoarthritis in a Post-traumatic Rat Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cartilage	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1947603520982350.	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 Kiyon W, Nakagawa Y, Mukai S, Ito A, Arai T, Kuroki H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Quantitative Parameters for the Degeneration in Cartilage and Subchondral Bone of Human Knee by 3-D Ultrasound Scanning System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ultrasound Med Biol.	6. 最初と最後の頁 3239-3248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.08.024.	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 Ito A, Wang T, Nakahara R, Kawai H, Nishitani K, Aoyama T, Kuroki H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Ultrasound therapy with optimal intensity facilitates peripheral nerve regeneration in rats through suppression of pro-inflammatory and nerve growth inhibitor gene expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0234691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234691.	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 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 Shimogawa T, Sakaguchi H, Kikuchi T, Tsuchimochi R, Sano N, Torikoshi S, Ito A, Aoyama T, Iihara K, Takahashi J	4. 巻 5
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 Ito A, Tianshu W, Tajino J.	4. 巻 14
2. 論文標題 Three-dimensional motion analysis for evaluating motor function in rodents with peripheral nerve injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neural Regen Res	6. 最初と最後の頁 2077-2078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.262581	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 Tajino J, Ito A, Torii Y, Tsuchimoto K, Iijima H, Zhang X, Tanima M, Yamaguchi S, Ieki H, Kakinoki R, Kuroki H	4. 巻 12
2. 論文標題 Lower-body positive pressure diminishes surface blood flow reactivity during treadmill walking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Res Notes	6. 最初と最後の頁 733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-019-4766-2	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 (2020)	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 Willett NJ, Aoyama T, Ito A, Kuroki H, Tajino J, 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

1. 著者名 Ito A, Aoyama T, Iijima H, Nishitani K, Tajino J, Kuroki H.	4. 巻 14
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 Wang T, Ito A, Aoyama T, Nakahara R, Nakahata A, Ji X, Zhang J, Kawai H, Kuroki H.	4. 巻 12
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, Tanima M, Yamaguchi S, Iijima H, Nakahata A, Kiyon W, Aoyama T, Kuroki H.	4. 巻 11
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 Kiyon W, Nakagawa Y, Ito A, Iijima H, Nishitani K, Tanima-Nagai M, Mukai S, Tajino J, Yamaguchi S, Nakahata A, Zhang J, Aoyama T, Kuroki H.	4. 巻 44
2. 論文標題 Ultrasound Parameters for Human Osteoarthritic Subchondral Bone ex Vivo: Comparison with Micro-Computed Tomography Parameters.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ultrasound Med Biol	6. 最初と最後の頁 2115-2130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.06.003	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 Iijima H, Isho T, Kuroki H, Takahashi M, Aoyama T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Effectiveness of mesenchymal stem cells for treating patients with knee osteoarthritis: a meta-analysis toward the establishment of effective regenerative rehabilitation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 NPJ Regen Med	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41536-018-0041-8	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 Junichi, Aoyama Tomoki, Kuroki Hiroshi, Ito Akira	4. 巻 185
2. 論文標題 Comprehensive Understanding of Inactivity-Induced Gait Alteration in Rodents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e63865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/63865	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 Xu Shixuan, Ito Akira, Wang Tianshu, Kawai Hideki, Aoyama Tomoki, Kuroki Hiroshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Ultrasound Therapy of Injury Site Modulates Gene and Protein Expressions in the Dorsal Root Ganglion in a Sciatic Nerve Crush Injury Rat Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ultrasound in Medicine & Biology	6. 最初と最後の頁 2502 ~ 2511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2022.07.015	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 Ito Akira, Araya Yuki, Kawai Hideki, Kuroki Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Ultrasound Stimulation Inhibits Morphological Degeneration of Motor Endplates in the Denervated Skeletal Muscle of Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Insights	6. 最初と最後の頁 eCollection2022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/26331055221138508	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 Zhao Zixi, Ito Akira, Nakahata Akihiro, Ji Xiang, Tai Chia, Saito Motoo, Nishitani Kohei, Aoyama Tomoki, Kuroki Hiroshi	4. 巻 4
2. 論文標題 One session of 20N cyclic compression induces chronic knee osteoarthritis in rats: A long-term study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage Open	6. 最初と最後の頁 100325 ~ 100325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ocarto.2022.100325	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 Nakajima Taiki, Nakahata Akihiro, Yamada Naoki, Yoshizawa Keiko, Kato Tomoaki M., Iwasaki Mio, Zhao Chengzhu, Kuroki Hiroshi, Ikeya Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Grafting of iPS cell-derived tenocytes promotes motor function recovery after Achilles tendon rupture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25328-6	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 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・講師    (14301)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------