

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03302

研究課題名(和文)非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルラットに対する理学療法介入効果研究

研究課題名(英文)Study of physical therapy intervention in a rat model of non-surgical focal knee cartilage compression injury

研究代表者

伊藤 明良 (Ito, Akira)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50762134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、理学療法介入は変形性膝関節症(膝OA)治療の第一選択肢として挙げられてきた。しかしながら、膝OA病態へ及ぼす効果は不明なままである。本研究では申請者らが開発した非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルラットに対して自発走行運動効果を検証した。その結果、圧迫損傷後の自発走行運動介入は、関節軟骨変性を抑制しないが、助長もしないことが示唆された。また、運動介入と細胞移植治療の併用効果を検討する探索的な実験として、間葉系幹細胞の関節内移植実験を実施した。その結果、細胞移植治療は関節軟骨変性を有意に抑制することが明らかとなった。今後、運動介入と細胞移植治療との相乗効果検証が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルの長期的な病態について解析することで、膝OAの発症・進行機序の理解につながり、理学療法介入の標的候補分子を探索できる。本モデル動物がヒトで観察されるような長期的な膝OA発症表現型を呈するユニークなモデルと成り得ることを示唆したことは、これまで解明されていない早期膝OAの病態解明の強力なツールとなることが期待され、その学術的意義は高い。さらに、2,500万人を超えるとされる膝OA患者の発症予防・遅延を実現する手段としての細胞移植治療効果を示したことは、社会的および経済的な意義が高いと言える。

研究成果の概要(英文)：Physiotherapy intervention has been the first option for the treatment of knee osteoarthritis (knee OA). However, their effect on knee OA pathology remains unclear. To address this, the present study examined the effects of spontaneous running exercise on a rat model of non-surgical focal knee cartilage compression injury. The results suggest that spontaneous running exercise intervention after compression injury does not inhibit but does not contribute to articular cartilage degeneration. As an exploratory experiment to investigate the combined effects of exercise intervention and cell transplantation treatment, an intra-articular transplantation experiment of mesenchymal stem cells was conducted. The results showed that cell transplantation treatment significantly suppressed articular cartilage degeneration. In the future, the synergistic effect of exercise intervention and cell transplantation treatment is expected to be verified.

研究分野：理学療法学

キーワード：変形性関節症 理学療法 リハビリテーション ラット 関節軟骨 細胞移植

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を突き進む本邦において、変形性膝関節症 (Knee osteoarthritis: 以下、膝 OA) を発症する者は多く、診断上の患者数が 2,500 万人を超えると推定されている。膝 OA はその成因により、明らかな原因が無いものを「一次性」、病気や怪我など原因が明らかなものを「二次性」として分けられ、「一次性」が大部分を占めていると考えられている。関節軟骨は一度損傷されると自己再生せず、病態が進行して最終的には関節破壊にまで及び、膝痛、歩行障害、日常生活動作障害に至るため、膝 OA の発症・進行をより早期から防止することが非常に重要であり、研究の推進が強く求められている。

膝 OA 治療の第一選択肢として、運動療法や物理療法を主体とする理学療法が挙げられる。これまでウォーキングや大腿四頭筋エクササイズなどの運動療法の臨床において疼痛や活動制限といった「症状」に対する明確なエビデンスが構築されてきた。しかしながら、関節軟骨を中心としたヒト膝 OA の「病態」自体に与える影響は、その解析の難しさから未だ不明である。これを解決するため、近年実験動物を用いた膝 OA 病態に対する理学療法介入効果検証が精力的に進められている。しかし、二次性膝 OA についてはモデル動物が確立されているが、患者の大部分を占める一次性膝 OA のモデル動物は確立されていない。よって、一次性膝 OA に対する理学療法介入の効果・作用メカニズム検証はこれまで成されておらず、不明である。

2. 研究の目的

一次性膝 OA 発症・進行のリスク因子として、加齢、女性、遺伝といった要因の他に、肥満、下肢アライメント、膝への負担が大きい生活・仕事などがあり、局所の関節圧迫力の上昇が関与している。この局所関節圧迫負荷を実験動物で再現するため、申請者らはラットを対象とした非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルを開発した (Ji X, Ito A, et al. J Orthop Res 2020)。本研究では開発したモデルラットに対して理学療法介入効果を検証し、その作用メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作製

麻酔下のラット膝関節に対して定量的に圧迫負荷を付与することで、非外科的に局所的な膝関節軟骨損傷を作製した。ラット膝関節に対して 20N の負荷を与えてモデルを作製するが、この負荷は前十字靭帯が断裂する 1/3 以下の負荷に該当し、ヒトにおいてもスポーツ活動などで生じ得る負荷量とした (図 1)。

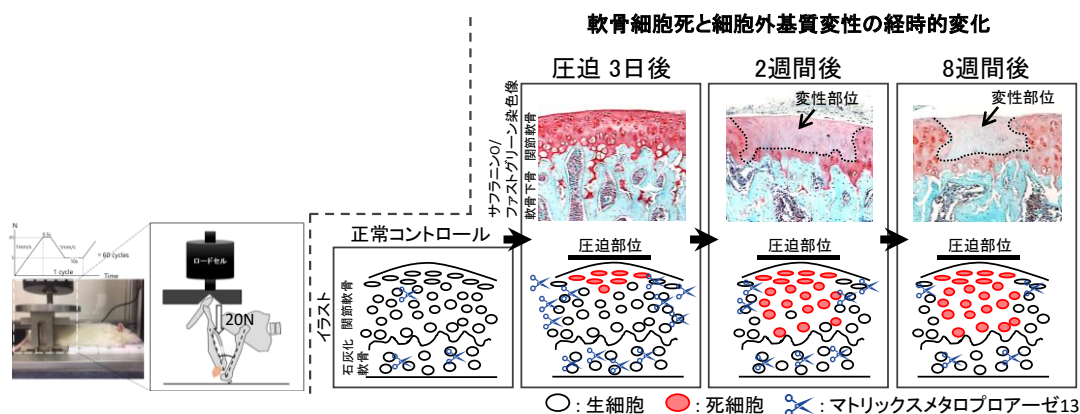


図 1. 非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルの作製方法

(2) 走行運動負荷

運動介入として、回転かご付きケージを用いた自発走行運動介入を行った。Wistar 雄性ラットを 1 週間回転かご付きケージに慣らした後に非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルを作製し、4 週間回転かご付きケージ内で飼育した。対照群として、通常ケージ内で 4 週間飼育する群を設けた。活動量を比較するために、損傷を与えない健常ラットも同様に回転かご付きケージ内で 4 週間飼育した。

(3) 間葉系幹細胞移植

運動介入と細胞移植治療の併用効果を検討する探索的な実験として、間葉系幹細胞の関節内移植実験を実施した。ラット大腿骨から採取した間葉系幹細胞を拡大培養し、非外科的局所膝関節

軟骨圧迫損傷モデルの膝関節内に 1×10^6 細胞を移植した (PC+BMSCs 群)。移植された細胞を追跡するために、PHK26 にて細胞を標識した。対照群として、介入しない群 (PC 群) およびリン酸緩衝液を注入する群 (PC+PBS 群) を作製した。

(4) 非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルの長期観察

非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルラットの長期的な病態解明を行った。損傷モデル作成後、1 週～1 年間経過後に脛骨関節軟骨の組織学的観察を行った。また、網羅的な遺伝子発現解析によって、細胞レベル変化が生じていると考えられた 12 週間後と、組織学的構造変化が生じている 6 ヶ月後のデータを比較検討した。

4. 研究成果

(1) 走行運動負荷

興味深いことに、非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷を与えたラットの方が、健常ラットよりも回転かごの回転数が多く、活動量が多かった。しかしながら、圧迫損傷が生じた大腿骨関節軟骨部における変性の進行は短期的には観察されなかった (図 2)。以上のことから、本モデルにおいて圧迫損傷後の関節軟骨に対する自発走行運動介入は、関節軟骨変性を助長しないことが示唆された。

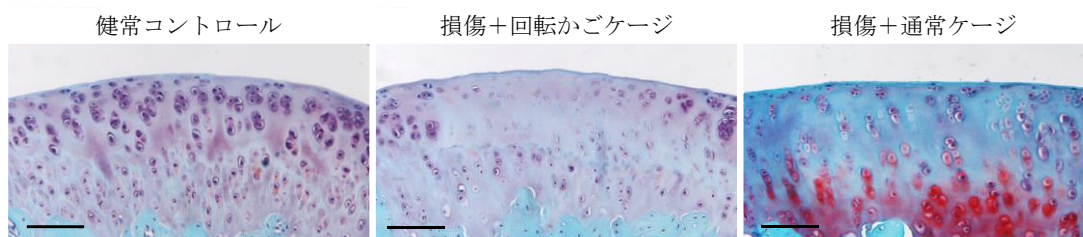


図 2. 代表的な関節軟骨のサフラニン O/ファストグリーン染色像

(2) 間葉系幹細胞移植

走行運動負荷において明瞭な影響が観察されなかったことを受け、細胞移植治療効果検証を実施した。PHK26 で標識された移植細胞は、移植後 2 週では明瞭に関節内で観察され、8 週間後においてもわずかに関節内で観察された。

Histologic/Histochemical Grading System (HHGS) を用いて関節軟骨変性を定量判定した結果、骨髄由来間葉系幹細胞移植は対照群と比較して有意に変性が抑制されることが示唆された (図 3)。免疫組織学的に変性抑制機序を検討したところ、マトリックスメタロプロテアーゼ 13 およびカスパーゼ 3 の生成抑制が PC+BMSCs 群で観察された。

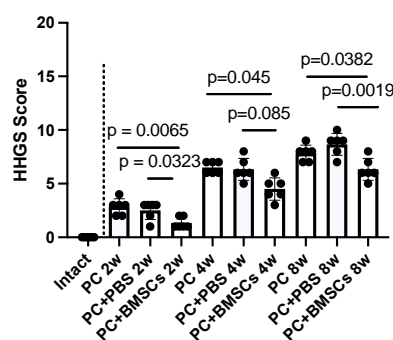


図 3. HHGS スコア

(3) 非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルの長期観察

非外科的局所膝関節軟骨圧迫損傷モデルの長期的な病態について解析することで、OA の発症・進行機序の理解につながり、理学療法介入の標的候補分子を探索できる。損傷モデル作成後、1 週～1 年間病態変化を組織学的に観察したところ、圧迫刺激を受けていない脛骨関節軟骨中央部にて OA 様変性が、6 ヶ月以降に発症することが示唆された。この変化は同週齢で生じないことを確認し、圧迫刺激に起因するものと推測された。これは、本モデル動物がヒトで観察されるような長期的な OA 発症表現型を呈するユニークなモデルと成り得ることを示唆している。

さらに、組織学的な変性が観察されない 12 週と、組織学的な変性が観察される 6 ヶ月の脛骨関節軟骨をサンプルとして、RNA シークエンス解析を実施した。その結果、585 個の異なる発現遺伝子が明らかになり、579 個が発現低下、6 個が発現上昇した。エンリッチメント解析とクラスタリング解析により、主な分子クラスターは細胞周期制御と免疫応答に関与していることが明らかになった。さらに、ハブ遺伝子である *Csf1r*、*Cxcr4*、*Cxcl12*、*Ptpcr* は免疫応答に関連していた。

以上のことから、局所膝関節軟骨圧迫損傷後の自発走行運動介入は、関節軟骨変性を助長しないことが示唆された。また、本モデルに対する間葉系幹細胞移植治療効果検証を行ったところ、圧迫損傷による関節軟骨変性が抑制されることが明らかとなった。今後、運動介入と細胞移植治療との相乗効果検証が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zhao Zixi, Ito Akira, Kuroki Hiroshi, Aoyama Tomoki	4. 巻 -
2. 論文標題 Analysis of Molecular Changes and Features in Rat Knee Osteoarthritis Cartilage: Progress From Cellular Changes to Structural Damage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 CARTILAGE	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） 10.1177/19476035231213174	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 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 ~ 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 Iijima Hirotaka, Gilmer Gabrielle, Wang Kai, Bean Allison C., He Yuchen, Lin Hang, Tang Wan-Yee, Lamont Daniel, Tai Chia, Ito Akira, Jones Jeffrey J., Evans Christopher, Ambrosio Fabrisia	4. 巻 14
2. 論文標題 Age-related matrix stiffening epigenetically regulates -Klotho expression and compromises chondrocyte integrity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 18 ~ 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-35359-2	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Zixi Zhao, Akira Ito, Chia Tai, Ryo Nakahara, Shixuan Xu, Hiroshi Kuroki, Tomoki Aoyama
2. 発表標題 Molecular Changes in Rat Knee Articular Cartilage after One Session Low-Force Cyclic Compression: Progress from Cellular Changes to Structural Damage
3. 学会等名 2024 OARIS World Congress on Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Zixi Zhao, Akira Ito, Chia Tai, Ryo Nakahara, Shixuan Xu, Hiroshi Kuroki, Tomoki Aoyama
2. 発表標題 Exploring Long-Term Effects of Low-Force Compression on the Knee
3. 学会等名 Tenth Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Chia Tai, Akira Ito, Zixi Zhao, Ryo Nakahara, Shixuan Xu, Hiroshi Kuroki, Tomoki Aoyama
2. 発表標題 Mitigating Cartilage Degeneration in a Low Mechanical-Compression Rat Model through Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Intra-Articular Injections
3. 学会等名 Tenth Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryo Nakahara, Akira Ito, Momoko Nagai-Tanima, Zixi Zhao, Chia Tai, Shixuan Xu, Fumika Miyamoto, Tomoki Aoyama, Hiroshi Kuroki
2. 発表標題 Ultrasound therapy affects the development of intraarticular adhesions in rats
3. 学会等名 Tenth Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮本史佳, 中原峻, 徐仕軒, 戴嘉, 趙梓汐, 谷間桃子, 黒木裕士, 伊藤明良
2. 発表標題 ヒト骨髄由来およびヒトiPS細胞由来間葉系幹細胞の軟骨分化過程における培養温度の影響
3. 学会等名 日本物理療法合同学会大会2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮本史佳, 中原峻, 徐仕軒, 戴嘉, 趙梓汐, 谷間桃子, 黒木裕士, 伊藤明良
2. 発表標題 培養温度がヒト骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨分化能に与える影響の検討
3. 学会等名 第28回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chia Tai, Akira Ito, Zixi Zhao, Ryo Nakahara, Hideki Kawai, Hiroshi Kuroki
2. 発表標題 Decelerating the process of articular cartilage degeneration in a non-invasive mechanical compression-induced rat model via intra-articular injections of allogeneic BMSCs
3. 学会等名 Ninth Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Nakahara, Akira Ito, Momoko Nagai-Tanima, Hideki Kawai, Zixi Zhao, Chia Tai, Hiroshi Kuroki
2. 発表標題 Analysis of gene expression after ultrasound therapy for intraarticular adhesion model in rats
3. 学会等名 Ninth Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中原峻, 伊藤明良, 谷間桃子, 河合秀紀, 趙梓汐, 徐仕軒, 戴嘉, 安孫子幸子, 青山朋樹, 黒木裕士
2. 発表標題 ラット膝関節の術後癒着に対する超音波照射強度と時間の影響の検証
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 趙 梓汐, 伊藤 明良, 中畑 晶博, 中原 峻, 西谷 江平, 黒木 裕士
2. 発表標題 非外科的な圧縮がラット膝関節に及ぼす長期的な影響の検討
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zhao Z, Ito A, Nakahata A, Nakahara R, Nagai-Tanima M, Nishitani K, Kuroki K
2. 発表標題 20N Cyclic Compression Induced Slow Osteoarthritis Development in Rats
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞構造体の製造方法、培養治具および培養基材	発明者 伊藤明良	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-032396	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

京都大学大学院医学研究科人間健康科学系リハビリテーション科学コース運動機能解析学分野
<https://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	黒木 裕士 (Kuroki Hiroshi) (20170110)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	西谷 江平 (Nishitani Kohei) (70782407)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	

	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
研究協力者	青山 朋樹 (Aoyama Tomoki)		

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