

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300199

研究課題名(和文) 軟骨幹細胞をモチーフとしたマルチモダルリハビリテーション手法の確立

研究課題名(英文) A multi-modal rehabilitation approach that used cartilage stem cell as a subject

研究代表者

青山 朋樹 (Aoyama, Tomoki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90378886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：これまでリハビリテーション領域においては個体や集団を対象にした解析が主に行われ、統計手法になじまないエビデンスは構築しにくく、他の領域との相互性が乏しかった。本研究は関節軟骨における軟骨幹細胞の存在を明らかにし、軟骨幹細胞に発現している受容体を介して、エクササイズや超音波刺激などで放出される生体内シグナルによる生体内軟骨再生を証明することで集団～個体～器官(組織)～細胞～生体内シグナルまでを研究対象とする新たな集学的リハビリテーションの確立を目的とする。

研究成果の概要(英文)：In the field of rehabilitation, the analysis was carried out mainly for an individual and the group. It was hard to build the evidence not to adjust to statistics technique, and the compatibility with other domains was poor. This study aimed for establishment of new multidisciplinary rehabilitation, clarifying the existence of the cartilage stem cell and receptor signalling, when performing exercise. This approach may produce the new aspect of rehabilitation targeting the individual, organ, cell, and molecules.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学

キーワード：リハビリテーション マルチモダル 軟骨幹細胞 生体内シグナル

1. 研究開始当初の背景

これまでリハビリテーション領域においてはエビデンスを構築する手法として、個体集団における統計学的有意差をもって行われていた。このため統計手法になじまないエビデンスは構築しにくく、他の領域との相互性も乏しかった。

かたや関節軟骨は一度傷害されると治癒が困難であることが知られている。しかしながら臨床現場においてはスクワットや等尺性筋力強化訓練により症状が軽減される例が散見される。これは単に関節周辺の筋組織が強化され、安定性が増すことにより疼痛が緩和するだけでなく、関節軟骨においても関節軟骨再生が促されている結果を示唆する結果であるが、これまでの研究手法ではその有効性を証明することができなかった。一方で細胞生物学の分野では関節軟骨においては他の組織幹細胞と同様に軟骨幹細胞 (cartilage stem cell) の存在が指摘され (Grogan SP 2009)、生体内シグナルにより関節軟骨の再生が促され自己修復を促している可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究はリハビリテーションによって促される関節軟骨再生をモチーフに、関節軟骨における軟骨幹細胞 (cartilage stem cell) の存在を明らかにし、軟骨幹細胞に発現している受容体を介して、エクササイズや超音波刺激などで放出される生体内シグナル (intrinsic regeneration factor) による生体内軟骨再生 (in situ cartilage regeneration) を証明することで集団～個体～器官 (組織)～細胞～生体内シグナルまでを研究対象とする新たな集学的リハビリテーションの確立を目的として実施した。

3. 研究の方法

・組織学的アプローチ: 軟骨幹細胞の存在、周辺構造物の組織構造学解析を行う。
・細胞生物学的アプローチ: 軟骨細胞二、物理刺激を付加した際に起きる細胞内 mRNA 発現変化や基質形成能変化、細胞間シグナリングを解析する。
・実験生物学的アプローチ: ラットにおいて軟骨損傷疾患モデルを作成し、物理刺激、エクササイズを実施した際の生体内反応を組織学的、行動学的に解析する。

4. 研究成果

・軟骨最表層構造の解析
関節軟骨最表層の構造を免疫電子顕微鏡観察により明らかにした。このことから関節軟骨の構造体の構成が明らかになり、軟骨幹細胞の周辺構造を明らかにできた (Fijioka R; Osteoarthritis Cartilage)。
・物理刺激による軟骨細胞の基質変化
軟骨細胞に超音波刺激を加えた際に、基質破壊が抑制され (Ito A; Ultrasound Med

Biol) 基質産生を促進することを明らかにした (Ito A; Int J Hyperthermia)。

・生体内細胞間シグナリングの解析
関節軟骨最表層の細胞が PGE2 受容体の売り EP2 受容体を発現していることを明らかにし、EP2 受容体を刺激することで、変形性膝関節症モデルで変性が抑制される事を報告した (Mitsui H; Arthritis Res Ther)。

また運動療法によって変形性膝関節症モデルラットの治癒促進が認められた (Yamaguchi S; Journal Orthop Res)。

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 6 件)

Mitsui H, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, Maruyama T, Kanaji T, Fujimura S, Sugihara H, Nishiura A, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. Prostaglandin E2 receptor type 2-selective agonist prevents the degeneration of articular cartilage in rabbit knees with traumatic instability. Arthritis Res Ther. 2011;13(5):R146.

Ito A, Aoyama T, Yamaguchi S, Zhang X, Akiyama H, Kuroki H. Low-intensity pulsed ultrasound inhibits messenger RNA expression of matrix metalloproteinase-13 induced by interleukin-1 in chondrocytes in an intensity-dependent manner. Ultrasound Med Biol. 2012 Oct;38(10):1726-33.

Fujioka R, Aoyama T, Takakuwa T. The layered structure of the articular surface. Osteoarthritis Cartilage. 2013 Aug;21(8):1092-8.

Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Zhang X, Tajino J, Kuroki H. Effects of exercise level on biomarkers in a rat knee model of osteoarthritis. J Orthop Res. 2013 Jul;31(7):1026-31.

Ito A, Aoyama T, Iijima H, Nagai M, Yamaguchi S, Tajino J, Zhang X, Akiyama H, Kuroki H. Optimum temperature for

extracellular matrix production by articular chondrocytes. Int J Hyperthermia. 2014 Mar;30(2):96-101.

Iijima H, Aoyama T, Ito A, Tajino J, Nagai M, Zhang X, Yamaguchi S, Akiyama H, Kuroki H. Immature articular cartilage and subchondral bone covered by menisci are potentially susceptible to mechanical load. BMC Musculoskelet Disord. 2014 Mar 26;15(1):101.

[学会発表](計 20 件)

Akira Ito, Tomoki Aoyama, Hiroto Mitsui, Makoto Ishibashi, Shoki Yamaguchi, Xiang Kai Zhang, Hiroshi Kuroki, Low-intensity pulsed ultrasound downregulates the messenger RNA expression of the matrix metalloproteinases on an articular cartilage explants model. 2011 World Congress on Osteoarthritis, September 15-18, 2011, San Diego, CA.

Hiroshi Kuroki, Kouji Tsuchimoto, Mikiko Kobayashi-Miura, Tomoki Aoyama, Akira Ito, Koujiro Hshimoto, Makoto Ishibashi, Shoki Yamaguchi, Xiang Kai Zhang. Analysis of meniscus using fourier transform infrared imaging spectroscopy. 2011 World Congress on Osteoarthritis, September 15-18, 2011, San Diego, CA.

伊藤明良、山口将希、張 項凱、青山朋樹、秋山治彦、黒木裕土. IL-1 により惹起された MMP13 mRNA 発現亢進に対する低出力超音波パルスの即時的効果. 第 25 回日本軟骨代謝学会. 2012.3.9-10. 名古屋市

藤岡瑠音、青山朋樹、高桑徹也. 免疫組織化学的手法を用いた関節軟骨最表層の観察. 第 25 回日本軟骨代謝学会. 2012.3.9-10. 名古屋市

Fujioka R, Aoyama T, Takakuwa T. Analyses of cartilage superficial layer using immunohistochemical staining. 2012 World congress on osteoarthritis. 2012.4.26-29, Barcelona, Spain.

Yamaguchi S, Kuroki H, Aoyama T, Ito A,

Zhang K, Tazino Z, Nagai M, Iijima H. The effect of exercise levels on biomarker in a knee osteoarthritis model of rats. the 1st Joint Conference for the partnership between JPTA and KPTA. 2012.11.17-11.18. Nagasaki city, Japan

A Ito, T Aoyama, J Tajino, M Nagai, S Yamaguchi, H Iijima, X Zhang, H Akiyama, H Kuroki. Culturing temperature affects chondrocyte differentiation and extracellular matrix formation. 2013 World Congress on Osteoarthritis. 2013.4. 18-21, 2013, Philadelphia, USA.

M Nagai, A Ito, X Zhang, S Yamaguchi, H Iijima, J Tajino, T Aoyama, H Kuroki. Changes on the expression of CD44 in immobilized knee in rats. 2013 World Congress on Osteoarthritis. 2013.4. 18-21, 2013, Philadelphia, USA.

H Iijima, T Aoyama, A Ito, J Tajino, M Nagai, X Zhang, S Yamaguchi, H Akiyama, H Kuroki. Is cartilage and subchondral bone covered by menisci weak? 2013 World Congress on Osteoarthritis. 2013.4. 18-21, 2013, Philadelphia, USA.

飯島弘貴、青山朋樹、伊藤明良、太治野純一、長井桃子、張項凱、山口将希、秋山治彦、黒木裕土. 半月板被覆部軟骨は脆弱であるのか. 第 26 回日本軟骨代謝学会. 2013.3.1-3.2. 大阪市

伊藤明良、青山朋樹、長井桃子、山口将希、飯島弘貴、張項凱、太治野純一、秋山治彦、黒木裕土. 温度環境が軟骨細胞外基質形成に与える影響. 第 26 回日本軟骨代謝学会. 2013.3.1-3.2. 大阪市

伊藤明良、青山朋樹、長井桃子、山口将希、飯島弘貴、太治野純一、張項凱、井上大輔、広瀬太希、秋山治彦、黒木裕土. 軟骨細胞に対する長期温熱刺激の安全性と軟骨基質合成へ与える影響の検討. 第 48 回日本理学療法学会大会, 2013.5.24-26, 名古屋市

飯島弘貴、青山朋樹、伊藤明良、太治野純一、張項凱、長井桃子、山口将希、広瀬太希、井上大輔、秋山治彦、黒木裕土. 膝半月板被覆部の軟骨・骨複合体は構造的に脆弱で

ある．第 48 回日本理学療法学会，
2013.5.24-26，名古屋市．
長井桃子、伊藤明良、山口将希、飯島弘貴、
太治野純一、張項凱、井上大輔、広瀬太希、
青山朋樹、黒木裕士．膝関節不動が関節軟
骨における CD44 発現に及ぼす影響．第 48
回日本理学療法学会，2013.5.24-26，
名古屋市．
山口将希、伊藤明良、長井桃子、張項凱、飯
島弘貴、太治野純一、青山朋樹、秋山治彦、
広瀬太希、井上大輔、黒木裕士．寒冷刺激
が変形性膝関節症ラットの関節軟骨に及ぼ
す影響．第 48 回日本理学療法学会，
2013.5.24-26，名古屋市．
青山朋樹、藤岡瑠音、高桑徹也．関節軟骨の
最表層は 3 層の構造で構成される．第 28 回
日本整形外科学会基礎学術集
会．2013.10.17-10.18.千葉市
張項凱、青山朋樹、伊藤明良、山口将希、長
井桃子、飯島弘貴、太治野純一、黒木裕士．
膝関節半月板の部位特性に関する研究．
第 27 回日本軟骨代謝学会．2014.2.28-29.
京都市．
飯島弘貴、青山朋樹、伊藤明良、太治野純一、
長井桃子、張項凱、山口将希、黒木裕士．ラ
ット OA モデルに対する運動の軟骨変性予防
効果．第 27 回日本軟骨代謝学会．
2014.2.28-29.京都市．
長井桃子、伊藤明良、太治野純一、飯島弘貴、
山口将希、張項凱、青山朋樹、秋山治彦、黒
木裕士．膝関節拘縮後の軟骨基質変化 超
微細構造からの検討-．第 27 回日本軟骨代
謝学会．2014.2.28-29.京都市．
伊藤明良、青山朋樹、長井桃子、太治野純一、
山口将希、飯島弘貴、張項凱、秋山治彦、黒
木裕士．温度環境は軟骨外基質能に影響を
与える-ヒト軟骨細胞を用いた in vitro 研究
-．第 27 回日本軟骨代謝学会．
2014.2.28-29.京都市．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://humanalysis-square.com/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
青山朋樹(京都大学・准教授)
研究者番号：90378886
- (2) 研究分担者
高桑徹也(京都大学・教授)
研究者番号：40244933
- (3) 研究分担者
黒木裕士(京都大学・教授)
研究者番号：20170110
- (4) 研究分担者
三浦美樹子(島根大学・助教)
研究者番号：40447925