

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282154

研究課題名(和文)再生医療の第四の要素としての再生リハビリテーションの開発

研究課題名(英文) Development of regenerative rehabilitation as the fourth element of regenerative medicine

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) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：現状における再生医療を構成する三大要素は、細胞、足場材料、栄養である。これらは細胞や組織再生という単位に主眼が置かれているが、移植を受ける宿主個体や移植部位といった一つ上の階層には対応できていない。そこで本研究においては細胞移植時の個体や臓器の最適環境化のためにリハビリテーションの手法を用いる事の有用性を検討することを目的とした。関節軟骨欠損モデルを作成して、間葉幹細胞移植に加えてエクササイズや物理療法を行った際に、間葉系幹細胞単独移植と比較して良好な軟骨再生を認めることができた。これらのリハビリテーションプログラムをメソッド化することで再生医療の効果を高める可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cell, scaffold, and nutrition are the three essential elements of regenerative medicine. However, these elements focus only on cells or tissues, but not organs and individuals. The purpose of this study was to develop and show the usefulness of rehabilitation resource to promote the regenerative effect of regenerative medicine. The osteochondral defect on rat knee joint was additively regenerated by mesenchymal stromal cell transplantation when combined with exercise or low-intensity pulsed ultrasonographic stimulation. These data suggest that rehabilitation programs can be the fourth element to promote the effect of regenerative medicine.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医療 リハビリテーション 関節軟骨再生 エクササイズ 物理療法

1. 研究開始当初の背景

現状において再生医療を構成する三大要素は細胞, 足場材料, 栄養である. この三大要素は再生医療を展開するうえでは必ず考慮すべき基本要素ではあるが, それらが対象としている再生範囲の単位は移植する細胞あるいは移植母床組織までで, 移植された細胞が個体の中に有効な組織として順応するための周囲組織あるいは個体という一つの階層を対象にしているわけではない. そもそも病巣部は劣悪な環境であることから傷病が発生するため, 細胞が生着し, 機能発揮するためには条件が悪い. そこで移植する細胞はもちろんであるが, 移植母床および周辺組織への働きかけが必要であるが, そのような視点から再生医療研究が成されていないのが現状である.

2. 研究の目的

上述したような状況を踏まえて, 再生医療において移植母床や個体の最適化のためにリハビリテーションの手法を用いて細胞, 足場材料, 栄養に加えてリハビリテーションを第4の要素とすることの意義を検討することを本研究の目的とする. このためには基礎的な研究でそのエビデンスを確立しながら, 同時に橋渡し研究への展開, 研究成果の発信を行う3つのパートに分けた研究展開を行う.

(1) 関節軟骨再生をモチーフにしたリハビリテーションプログラム開発

関節軟骨が損傷を受けた際に自己再生は困難である. そこで間葉系幹細胞や軟骨細胞を移植する再生医療が盛んに試みられている. そこで本研究においては既に臨床でも行われている細胞移植による関節軟骨再生にリハビリテーションを加えた際の効果検証を主目的とする.

(2) 再生医療におけるリハビリテーションプログラムのシステマティックレビュー

再生医療はいくつかの領域では既に臨床応用がされているが, そのリハビリテーションの実態については明らかにされていない. 基礎研究によるエビデンスが固まり次第, 橋渡し研究にスムーズに移行するため, 再生医療におけるリハビリテーションプログラムのシステマティックレビューを行い, 現状の把握を行う事を本研究の副次的目的とする.

(3) 再生リハビリテーション研究の促進

現状では再生医療のリハビリテーション研究は世界的にも乏しく, 従来の学会活動では研究情報を交換する機会も少ない. 研究活動は世界的に同様の研究を行っている研究者とコアな情報交換を行うことで研究促進される. そこで再生リハビリテーション研究の促進を図る目的で国外の大学, 研究組織と共同研究体制を構築することを第3の目的とする.

3. 研究の方法

(1) 関節軟骨再生をモチーフにしたリハビリテーションプログラム開発

Wister ラットの膝関節に直径1mm, 深さ1mmの骨軟骨欠損を作成し, 膝関節内に 1×10^6 個の間葉系幹細胞を移植注入した. その後臨床でもよく用いられるエクササイズとしてトレッドミルエクササイズを行い, その効果を組織化学染色, 免疫化学染色にて比較, 評価した.

また同様にラット膝関節骨軟骨欠損モデルに間葉系幹細胞を注入し, 低周波超音波治療器 Low Intensity Pulsed Ultrasound を用いて関節軟骨の刺激を行なった. その効果については同様に組織化学染色, 免疫化学染色にて比較, 評価した.

(2) 再生医療におけるリハビリテーションプログラムのシステマティックレビュー

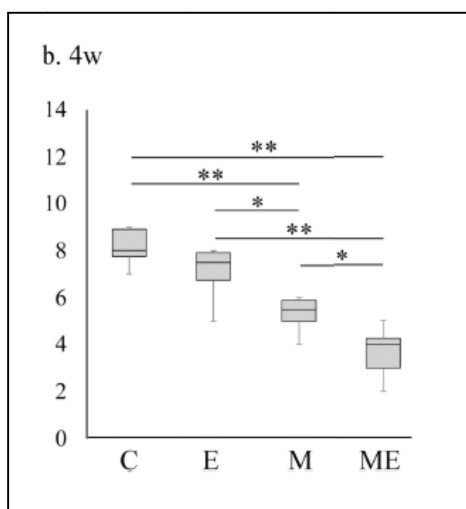
大腿骨頭壊死症に対する間葉系幹細胞移植治療は1900年代から臨床応用され, その成果も多数報告されている. そこで大腿骨頭壊死症に対する再生治療におけるリハビリテーションの現状を1995年~2015年に掲載された論文のレビューを行うことで実施した. キーワードは Osteonecrosis femoral head, cell therapy, English[la], from 1/1/1995 to 12/31/2015 で Pubmed にて検索した.

(3) 再生リハビリテーション研究の促進

米国においてはピッツバーグ大学を中心に米国, 欧州の大学, 研究所が Regenerative Rehabilitation コンソーシアムを組織している. そこで同コンソーシアムの主催するシンポジウムに参加し, 研究発表, 研究評価を受けることで, 研究内容の深化を行い, 研究チームのプレゼンスを高めることとした.

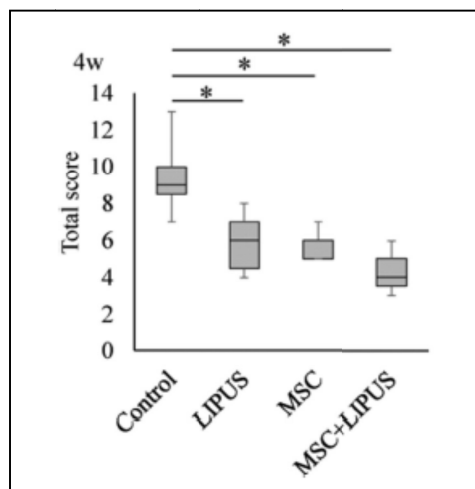
4. 研究成果

(1) 関節軟骨再生をモチーフにしたリハビリテーションプログラム開発



骨軟骨欠損後 4 週.

コントロール(C)群と比較してエクササイズ(E)群, MSC 注入(M)群は良好な関節軟骨の形成が認められるが, MSC 注入にエクササイズを併用した(ME)群は相加的に良好な関節軟骨の再生を認めた (Yamaguchi S, Aoyama T. PLOS One 2016).



骨軟骨欠損後 4 週.

コントロール群と比較してLIPUS群, MSC注入群, MSC+LIPUS 群はそれぞれ有意差を持って良好な軟骨再生を認めた. 統計的有意差は認めなかったが, MSC+LIPUS 群は最も良好な軟骨再生を認めた (Yamaguchi S, Aoyama T. Ultrasound in Med & Biol. 2016).

(2) 再生医療におけるリハビリテーションプログラムのシステマティックレビュー

PubMedより検索された論文は121本であったが, 除外基準により除外を行い, 最終的には17本の論文を対象にレビューを行った. しかしながらリハビリテーションプログラムについては研究代表者が記載している論文(Aoyama T. Arch Phys Med Rehabil 2015)のみが最も詳細な記載しているだけで, 基礎研究のみならず臨床研究においても, 再生医療におけるリハビリテーションプログラムの検討が必要なことが示唆された(Aoyama T. Int J Phys Med Rehabil 2016).

(3) 再生リハビリテーション研究の促進

米国ではピッツバーグ大学を中心にAlliance for Regenerative Rehabilitation Research and Training (AR3T)大学コンソーシアムを構成している. この一員に京都大学も加わることで, International Regenerative Rehabilitation Symposiumの開催や研究交流, America Physical Therapy Associationが発行する教科書の共同執筆などを行った. 現在, ピッツバーグ大学と京都大学で学術提携締結に向けて準備作業が進められており, 今後の国際共同研究への発展が期待される.



またアウトリーチ活動の一環として, Tissue Engineering International & Regenerative medicine Society (TERMIS)の分科会を受け持ち, TERMIS Asia Pacificの分科会代表に就任した.

今後はこれらの学会活動を通じて再生医療分野におけるプレゼンスを高めていくが, 一般的なアウトリーチ活動としてホームページ《再生リハビリテーション; 日本語版, 英語版, 中国語版》を開設した.

<http://regenerative-rehabilitation.com/jp/>

今後はこのホームページを通じて研究成果を世界に対して発信していく予定である.

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11件)

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;30(2):96-101. 査読有.

Aoyama T, Goto K, Kakinoki R, Ikeguchi R, Ueda M, Kasai Y, Maekawa T, Tada H, Teramukai S, Nakamura T, Toguchida J. An exploratory clinical trial for idiopathic osteonecrosis of femoral head by cultured autologous multipotent mesenchymal stromal cells augmented with vascularized bone grafts. Tissue Eng Part B Rev.

2014;20(4):233-42. 査読有.

2014;20(4):233-42. 査読有.

Aoyama T, Fujita Y, Madoba K, Nankaku

M, Yamada M, Tomita M, Goto K, Ikeguchi R, Kakinoki R, Matsuda S, Nakamura T, Toguchida J. Rehabilitation program after mesenchymal stromal cell transplantation augmented by vascularized bone grafts for idiopathic osteonecrosis of the femoral head: A preliminary study. Arch Phys Med Rehabil. 2015;96(3):532-9. 査読有.

Ito A, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, Aoyama T, Kuroki H. Culture temperature affects human chondrocyte messenger RNA expression in monolayer and pellet culture systems. PLoS One. 2015;10(5):e0128082. 査読有.

Ito A, Aoyama T, Yoshizawa M, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, Kuroki H. 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. J Stem Cells Regen Med. 2015;11(1):25-31. eCollection 2015. 査読有.

Zhang X, Aoyama T, Yasuda T, Oike M, Ito A, Tajino J, Nagai M, Fujioka R, Iijima H, Yamaguchi S, Kakinuma N, Kuroki H. Effect of microfabricated microgroove-surface devices on the morphology of mesenchymal stem cells. Biomed Microdevices. 2015;17(6):116. 査読有.

Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Tajino J, Zhang X, Kiyan W, Kuroki H. The effect of exercise

on the early stages of mesenchymal stromal cell-Induced cartilage repair in a rat osteochondral defect model. PLoS One. 2016;11(3):e0151580. 査読有.

Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Tajino J, Zhang X, Wataru K, Kuroki H. Effect of low-intensity pulsed ultrasound after mesenchymal stromal cell injection to treat osteochondral defects: An In Vivo study. Ultrasound Med Biol. 2016 42(12):2903-2913. 査読有.

Aoyama T. Rehabilitation program after cell therapy for treatment of femoral head osteonecrosis: A narrative review of literature. Int J Phys Med Rehabil. 2016; 4 (4), 354. 査読有.

南角学, 青山朋樹, 黒田隆. 先端医療と理学療法. 理学療法ジャーナル. 2016; 50(1), 77-79. 査読有.

南角学, 伊藤明良, 黒田隆, 青山朋樹. 骨軟骨再生治療. 総合リハビリテーション. 2017; 45(1), 13-19. 査読有.

〔学会発表〕(計19件)

A. Ito, S. Yamaguchi, J. Tajino, M. Nagai, H. Iijima, X. Zhang, T. Aoyama, H. Kuroki. Mild thermal environment enhances redifferentiation and cartilage extracellular matrix formation of expanded elderly human chondrocytes. Third Annual Symposium on Regenerative Rehabilitation, 2014.4.10-11, San Francisco, CA.

S. Yamaguchi, T. Aoyama, A. Ito, M. Nagai, H. Iijima, J. Tajino, X. Zhang, H. Akiyama, H. Kuroki. Efficacy of exercise following bone marrow

mesenchymal stromal cell transplantation in an osteochondral defect model of rats. Third Annual Symposium on Regenerative Rehabilitation, 2014.4.10-11, San Francisco, CA.

M. Nagai, T. Aoyama, A. Ito, J. Tajino, S. Yamaguchi, H. Iijima, X. Zhang, H. Akiyama, H. Kuroki. Cartilage degeneration in immobilization rat knee joint deteriorated with re-mobilization. Third Annual Symposium on Regenerative Rehabilitation, 2014.4.10-11, San Francisco, CA.

S. Yamaguchi, T. Aoyama, A. Ito, M. Nagai, H. Iijima, J. Tajino, X. Zhang, H. Akiyama, H. Kuroki. Treadmill exercise post bone marrow mesenchymal stromal cells transplantation stimulated the regeneration of articular cartilage on rat knee joint osteochondral defect. 2014 World Congress on Osteoarthritis, April 24-27, 2014, Paris, France.

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, 黒木裕土. 関節軟骨基質再生のための至適温度の探究_三次元培養を用いたin vitro 研究_第49回日本理学療法学会学術大会. 2014.5.30-6.2. 横浜市.

山口将希, 青山朋樹, 伊藤明良, 長井桃子, 太治野純一, 飯島弘貴, 張項凱, 秋山治彦, 黒木裕土. 骨髄由来間葉系間質細胞移植治療と運動との併用は骨軟骨欠損した関節軟骨の再生を促進する. 第49回日本理学療法学会学術大会.

2014.5.30-6.2. 横浜市.

青山朋樹, 藤田容子, 窓場勝之, 南角学, 富田素子, 後藤公志, 柿木良介, 中村孝志, 戸口田淳也. 大腿骨頭壊死症に対する自己骨髄由来間葉系幹細胞を用いた臨床試験におけるリハビリテーション. 第49回日本理学療法学会学術大会. 2014.5.30-6.2. 横浜市.

窓場勝之, 藤田容子, 青山朋樹, 富田素子. 大腿骨頭壊死に対しての自己骨髄由来間葉系幹細胞を用いた再生医療治療後にリハビリテーションを施行した一事例 今後の再生医療におけるリハビリテーションの可能性. 第49回日本理学療法学会学術大会. 2014.5.30-6.2. 横浜市.

張 項凱, 安田 崇志, 尾池 真, 藤岡 瑠音, 伊藤 明良, 長井 桃子, 太治野純一, 山口 将希, 飯島 弘貴, 柿沼 憲宏, 青山 朋樹, 黒木 裕土. 培養皿微細加工による間葉系幹細胞配向性変化の検討. 日本バイオマテリアル学会 第9回関西若手研究発表会. 2014.8.5.京都市.

青山朋樹, 戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた骨壊死治療. 第88回日本整形外科学会学術総会. 2015.5.21-5.24. 神戸市.

青山朋樹, 池口良輔, 柿木良介, 富田素子, 松田秀一, 中村孝志. 大腿骨頭壊死症に対する間葉系幹細胞移植治療時のリハビリテーションのフィージビリティスタディ. 第52回日本リハビリテーション医学会学術集会. 2015.5.28-5.30. 新潟市.

山口将希, 伊藤明良, 太治野純一, 長井桃子, 飯島弘貴, 張項凱, 喜屋武弥, 青山朋樹, 黒木裕土. 骨軟骨欠損モデルラットに対する間葉系間質細胞移植と低出力超音波パルス治療の併用による骨軟骨再生効果の検討第50回日本理学療法学会

術集会 . 2015 . 6.5 - 6.7. 東京都.
S. Yamaguchi, T. Aoyama, A. Ito, M. Nagai, H. Iijima, J. Tajino, X. Zhang, W. Kiyam, H. Kuroki. The effect of low intensity pulsed ultrasound treatment combined with mesenchymal stromal cell injection for cartilage regeneration in a knee osteochondral defect model of rats. 2015 World Congress on Osteoarthritis, April 30-May 3, 2015, Seattle, WA.
T. Aoyama. Feasibility study of rehabilitation program after mesenchymal stromal cell transplantation for idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Fourth Annual symposium on Regenerative rehabilitation. 2015.9.24-26, Rochester, USA.
A. Ito, H. Iijima, J. Tajino, M. Nagai, S. Yamaguchi, X. Zhang, T. Aoyama, H. Kuroki. Periodic heat stimulus for extracellular matrix production on human chondrocytes. Fourth Annual Symposium on Regenerative Rehabilitation, September 24-26, 2015, Rochester, MN.
H. Iijima, T. Aoyama, A. Ito, J. Tajino, S. Yamaguchi, M. Nagai, X. Zhang, W. Kiyam, H. Kuroki. Dynamic regulation of bone morphogenetic proteins by gentle treadmill walking potentially prevent progression of osteoarthritis in a rat model of destabilized medial meniscus. Fourth Annual Symposium on Regenerative Rehabilitation, September 24-26, 2015, Rochester, MN.
S. Yamaguchi, T. Aoyama, A. Ito, M. Nagai, H. Iijima, J. Tajino, X. Zhang,

W.Kiyam, H. Kuroki. Efficacy of LIPUS treatment following mesenchymal stromal cell intra-articular injection in an osteochondral defect model rats. Fourth Annual Symposium on Regenerative Rehabilitation, September 24-26, 2015, Rochester, MN.
J.Tajino, A. Ito, H. Yurie, R. Ikeguchi, S. Akieda, M. Tsuji, T. Aoyama. Scaffold-Free Bio 3D Conduits for the Peripheral Nerve Regeneration. McGowan Institute Retreat. 2016.3.6-8. Farmington, PA.
青山朋樹,池口良輔,松田秀一 .大腿骨頭壊死症に対する細胞治療におけるリハビリテーションのフィージビリティ調査 . 第 16 回日本再生医療学会総会 . 2017.3.7-9. 仙台市 .

〔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

《再生リハビリテーション》

<http://regenerative-rehabilitation.com/jp/>

《Humanalysis Square》

<http://humanalysis-square.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青山朋樹 (AOYAMA Tomoki)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90378886

(2)研究分担者

黒木裕士 (KUROKI Hiroshi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：20170110