

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13052

研究課題名(和文) 低出力超音波パルスによる末梢神経再生の促進をめざす新しい理学療法の検討

研究課題名(英文) Developing Novel Physical Therapy for Enhancing Peripheral Nerve Regeneration by Low-Intensity Pulsed Ultrasound

研究代表者

伊藤 明良 (Ito, Akira)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50762134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経の再生を促進させる理学療法を開発するため、骨折治療で既に臨床応用されている低出力超音波パルス治療の再生促進効果を、ラットを用いた研究にて検証した。その結果、超音波照射強度140mW/cm²で最も再生促進効果が認められ、疑似治療群に対して軸索数および髄鞘径が増大することを明らかにした。その神経再生促進作用として、軸索伸長阻害因子及び髄鞘化阻害因子の発現抑制が一部関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、実験動物を用いた手法を用いて末梢神経再生にとって適切な超音波刺激強度を明らかにした。さらに末梢神経再生を促進する超音波治療の作用メカニズムを一部解明していることから、超音波を用いた末梢神経再生治療における基盤的な知見を加えるものとして意義深いと考えられる。また、本研究では新たに三次元動作解析手法を用いた運動機能評価システムを確立した。運動機能評価は治療効果判定の重要な指標となることから、今後の研究においても有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of a low-intensity pulsed ultrasound therapy on the regeneration of the peripheral nerve in rats. We found that 140 mW/cm² intensity of the ultrasound enhanced the regeneration most and increased the number of regenerated axons and the thickness of the myelin sheath compared to those of control group. In addition, we suggested that the suppression of the nerve growth inhibitor gene expression would be, in part, attributed to this effects.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：超音波 物理療法 末梢神経 理学療法 リハビリテーション 三次元動作解析 再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重度末梢神経損傷治療として自家神経移植術がゴールドスタンダードであるが、完全な末梢神経の再生は難しく、さらには数か月単位の長い月日が必要となるため、不可逆的な筋線維化や関節拘縮が生じてしまうことが課題となっている。末梢神経の再生を促進させて神経再支配までの期間を短縮させることが重要となるが、それを実現する理学療法はない。低出力超音波パルス (low-intensity pulsed ultrasound、以下 LIPUS) 治療は骨や軟骨における再生促進効果がすでに認められている。本研究ではこれを応用して、LIPUS の末梢神経に対する再生促進効果を、ラットを用いた研究にて検証することで、臨床応用へ向けた基礎的なデータを得る。

2. 研究の目的

ラット坐骨神経再生に対する LIPUS の至適強度を明らかにすること、および LIPUS の末梢神経再生における作用メカニズムを明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 末梢神経再生における LIPUS 治療の効果検証を行うために、まず末梢神経再生過程の評価システムの検討を行った。これまでの評価では組織学的および電気生理学的な評価が主であったが、運動機能を直接的に評価する方法は限られており、Sciatic Functional Index (以下 SFI) というフットプリントを用いた方法がゴールドスタンダードであった。しかしながら、SFI は損傷後 1~2 週の早期では評価が困難であることなど、課題がいくつか残されていた。そこで我々は、三次元動作解析装置を用いた運動機能評価システムを検討した。具体的には、雄性 Lewis ラット 30 匹を対象に坐骨神経損傷モデルを作成し、損傷から 1、2、3、4、6 週間後にそれぞれ 6 匹ずつ SFI および三次元動作解析を実施し、安楽死後に坐骨神経を摘出し、組織学的解析に供した。なお、対照群として坐骨神経損傷モデルを実施しない正常ラット 6 匹からも同様なデータを得た。

(2) 末梢神経再生に対する LIPUS の至適強度検討を行った。これまで末梢神経損傷に対する LIPUS の至適強度を検討した報告は散見されるが、SFI だけによる評価など、組織学的解析と合わせた詳細な検討はなされていなかった。そこで、雄性 Lewis ラット 36 匹を対象に坐骨神経損傷モデルを作成し、LIPUS を疑似照射するコントロール群 (Ctrl 群: 9 匹)、LIPUS 強度 30 mW/cm² 群 (30 mW/cm² 群: 9 匹)、LIPUS 強度 140 mW/cm² 群 (140 mW/cm² 群: 9 匹)、LIPUS 強度 250 mW/cm² 群 (250 mW/cm² 群: 9 匹) の 4 群に無作為に分けた。なお、LIPUS 強度は空間平均時間平均で表記している。LIPUS 照射は損傷作成の 3 日後から開始し、損傷部に対して経皮的に一日 5 分間、週 5 回の頻度で照射した。その他のパラメータは、難治性骨折治療で既に臨床応用されている条件に合わせた (周波数: 1 MHz、繰り返し周波数: 1 kHz、パルス幅: 200 μ 秒)。損傷作成から 3 週間後、運動機能を SFI にて評価後に坐骨神経を摘出し、組織学的解析に供した。

(3) LIPUS の末梢神経再生に関わる作用メカニズムを明らかにするため、遺伝子発現解析を実施した。具体的には、Lewis ラットを用い坐骨神経損傷モデルを作成した。超音波照射を行う US 群と疑似照射を行う Sham 群を作成し、超音波刺激介入は損傷後 3 日目より開始した。損傷後 7 日目に坐骨神経サンプルを採取し、mRNA の発現解析を定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) 法にて定量解析した。また、当初内部標準化遺伝子として GAPDH を予定していたが、坐骨神経損傷による変動が大きかったため、TaqMan Array Rat Endogenous Control plate を用いて本実験条件において安定的な内部標準化遺伝子候補を網羅的に探索した。

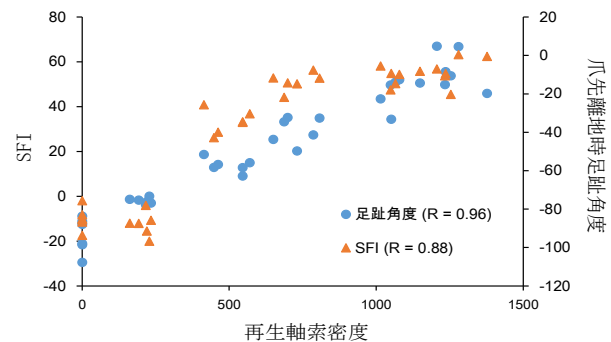


図 1 足趾角度は再生神経密度と相関する

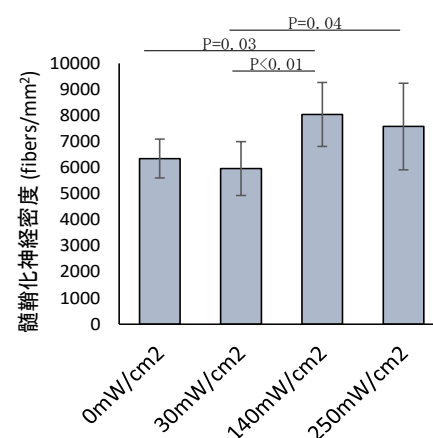


図 2 LIPUS は再生神経密度を増加させる

4. 研究成果

(1) 三次元動作解析手法を用いた運動機能評価システム

三次元動作解析手法を用い、末梢神経損傷モデルラットの歩容解析を行った結果、爪先離地時の足趾角度が時間の経過と共に直線的に回復することが明らかとなった。さらに、再生軸索密度との相関分析を行ったところ、有意に正の相関を有することがわかった (図1)

(2) 末梢神経再生に対する LIPUS の至適強度

LIPUS を 140 mW/cm² 強度で照射すると、再生神経密度が疑似照射群と比較して有意に増加することが明らかとなった (図2)。さらに、透過型電子顕微鏡観察によって再生神経の形態学的な解析を行った結果、LIPUS 照射によって髄鞘厚が疑似照射群と比較して厚くなることが明らかとなった (図3)。

(3) 末梢神経再生に対する LIPUS の作用メカニズム検討

内部標準化遺伝子候補の網羅的探索の結果、PSMC4 が最も安定した遺伝子であることが判明した。mRNA 発現解析の結果、軸索伸長阻害因子である SEMA3A と GSK3beta、及び髄鞘化阻害因子の NT3 の発現が US 群において有意に低いことが明らかとなった。

以上のことから、坐骨神経損傷モデルラットにおいて、140 mW/cm² 強度の超音波刺激で最も末梢神経再生が促進され、その神経再生促進作用として軸索伸長を阻害する SEMA3A、GSK3beta の発現抑制及び髄鞘化を阻害する NT3 の発現抑制が一部関与していることが示唆された。本研究結果は、末梢神経再生を促進する超音波治療の作用メカニズムを一部解明していることから、超音波を用いた末梢神経再生治療における基盤的な知見を加えるものとして意義深いと考えられる。

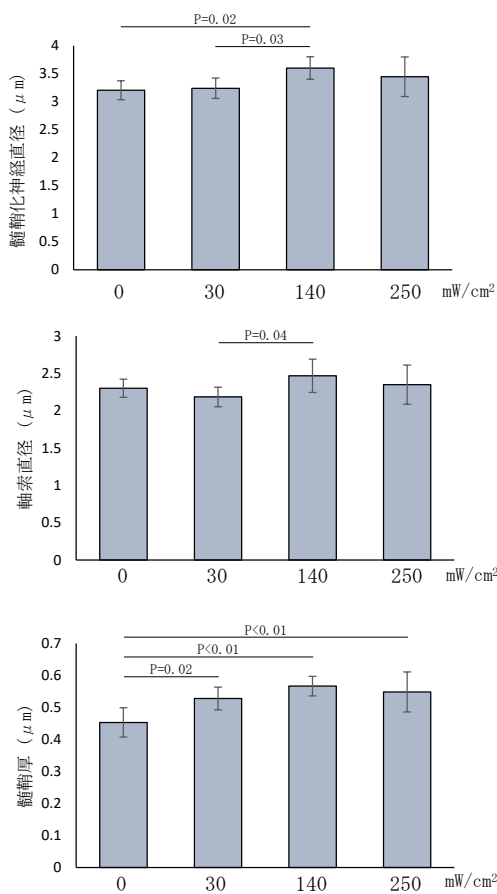


図3 LIPUS は再髄鞘化を促進する

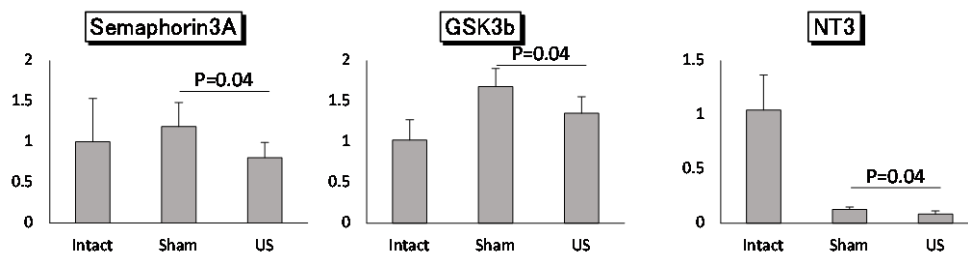


図4 遺伝子発現解析

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

①Wang T, Ito A, Aoyama T, Nakahara R, Nakahata A, Ji X, Zhang J, Kawai H, Kuroki H. Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: A comparison between sciatic functional index and kinematic analysis. PLoS One. 2018 Dec 12;13(12):e0208985. DOI: 10.1371/journal.pone.0208985. 査読有

②Tajino J, Ito A, Nagai M, Yamaguchi S, Iijima H, Nakahata A, Kiyaw W, Aoyama T, Kuroki H. Three-dimensional motion analysis for comprehensive understanding of gait

characteristics after sciatic nerve lesion in rodents. Sci Rep. 2018;8:135852018. DOI: 10.1038/s41598-018-31579-z. 査読有

③伊藤明良, 再生医療におけるリハビリテーション—再生リハビリテーション—. 日本基礎理学療法学雑誌. 日本基礎理学療法学雑誌編集委員会, 2018;21(1):2-8. DOI: 10.24780/jptf.21.1_2. 査読無

④河合秀紀, 伊藤明良, 青山朋樹, 末梢神経再生における細胞移植とリハビリテーション. 日本基礎理学療法学雑誌. 日本基礎理学療法学雑誌編集委員会, 2018;21(1):9-15. DOI: 10.24780/jptf.21.1_9. 査読無

[学会発表] (計 9 件)

①Tianshu Wang, Akira Ito, Ryo Nakahara, Akihiro Nakahata, Xiang Ji, Jue Zhang, Hideki Kawai, Naoko Kubo, Hiroshi Kuroki, Tomoki Aoyama, The correlation of kinematic changes with histomorphometric data in the rat sciatic nerve crush injury model, Seventh Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation, 2018

②Hideki Kawai, Akira Ito, Tomoki Aoyama, Hiroshi Kuroki, Effectiveness of rehabilitation after cell transplantation for peripheral nerve regeneration: protocol for a systematic review, Seventh Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation, 2018

③Akira Ito, Tianshu Wang, Ryo Nakahara, Hideki Kawai, Akihiro Nakahata, Jue Zhang, Naoko Kubo, Junichi Tajino, Tomoki Aoyama, Hiroshi Kuroki, Ultrasound Therapy Suppresses Inflammatory Gene Expression in an Injured Peripheral Nerve after Sciatic Nerve Crush Injury in Rats, Seventh Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation, 2018

④T. Wang, A. Ito, T. Aoyama, R. Nakahara, A. Nakahata, X. Ji, J. Zhang, H. Kawai, H. Kuroki, Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: a comparison between sciatic functional index (SFI) and kinematic analysis, 第23回日本基礎理学療法学会学術大会, 2018

⑤伊藤明良, 王天舒, 中原峻, 中畑晶博, 太治野純一, 張ジュエ, 河合秀紀, 久保菜央子, 青山朋樹, 黒木裕士, 超音波刺激は末梢神経再生を促進する～至適超音波強度の解明と作用メカニズムの探索～, 第23回日本基礎理学療法学会学術大会, 2018

⑥A. Ito, T. Wang, T. Aoyama, R. Nakahara, J. Tajino, A. Nakahata, J. Zhang, H. Kawai, H. Kuroki, Optimum Ultrasonic intensity for Peripheral Nerve Regeneration, Sixth Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation, 2017

⑦R. Nakahara, T. Wang, A. Ito, T. Aoyama, J. Tajino, A. Nakahata, J. Zhang, H. Kawai, H. Kuroki, Toe Angle Analysis during the Sciatic Nerve Regeneration in Rats, Sixth Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation, 2017

⑧長井桃子, 飯島弘貴, 伊藤明良, 太治野純一, 中畑晶博, 喜屋武弥, 張ジュエ, 王天舒, 青山朋樹, 黒木裕士, 末梢神経損傷患者への幹細胞を用いた治療におけるリハビリテーション—システムティックレビューによる現状把握—, 第52回日本理学療法学会学術大会, 2017

⑨伊藤明良, 太治野純一, 飯島弘貴, 長井桃子, 中畑晶博, 張ジュエ, 王天舒, 喜屋武弥, 青山朋樹, 黒木裕士, 環境温度がラット核心温度・外層温度および活動量に及ぼす影響, 第52回日本理学療法学会学術大会, 2017

[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

<http://kuroki-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

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

国際研究集会

Sixth Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation, 2017

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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、研究者個人に帰属されます。