

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19793

研究課題名(和文)末梢神経損傷に対する人工神経導管移植術と超音波治療の相乗効果検証

研究課題名(英文) Synergistic effects of artificial nerve conduit transplantation and therapeutic ultrasound on peripheral nerve injury

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経再生を促進させる人工神経導管の改良をするために、三次元バイオプリンターを用いた神経導管の作成を試みた。アルギン酸とナノセルロースを含有したバイオインクおよびゼラチンメタクリレートを用いて内径2.5mmの筒状の形状を造形することができた。造形した神経導管の細胞生存率を確認したところ、培養3日後までは生存性が減少していき50%程度となるが、その後は回復傾向が認められた。次に、超音波刺激による神経栄養因子の発現変化を検証した。その結果、末梢神経再生における超音波治療の作用メカニズムの一つとして、脳由来神経栄養因子の発現上昇が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、三次元バイオプリンターを用いた細胞含有神経導管の作成に成功した。これは末梢神経再生医療の発展における基盤となる成果となる。また、超音波治療による末梢神経再生に寄与する作用メカニズムとして、脳由来神経栄養因子の発現上昇の関与を示唆し、さらにその経時的変化を明らかにした。この成果は、超音波治療の開始時期や継続期間の設定におけるエビデンスを提供する。

研究成果の概要(英文)：In order to improve artificial nerve conduits to promote peripheral nerve regeneration, we attempted to create a nerve conduit using a three-dimensional bioprinter. Using bioink containing alginate and nanocellulose and gelatin methacrylate, we were able to form a cylindrical shape with an inner diameter of 2.5 mm. The cell viability of the sculpted nerve conduits was checked, and the viability decreased to about 50% until 3 days after incubation, after which a recovery trend was observed.

Next, we examined the changes in the expression of neurotrophic factors by ultrasound stimulation. As a result, it was suggested that increased expression of brain-derived neurotrophic factor was involved as one of the mechanisms of action of ultrasound therapy in peripheral nerve regeneration.

研究分野：理学療法学

キーワード：超音波 物理療法 理学療法 末梢神経損傷 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

再生医療分野におけるリハビリテーション科学の貢献が期待されている。特に、理学療法などによるメカニカルストレスの負荷や調整が、移植された細胞の生着・増殖・分化・機能化を促進させる“治療”として作用する可能性が報告されるようになった。しかしながら、細胞移植後にどのようなメカニカルストレスを負荷すればよいのか、さらにはその背景にある作用メカニズムについては不明な点が多く、実験動物を用いた基礎的なデータの蓄積が必須である。重篤な末梢神経損傷の際には、自家神経移植術が選択されるが未だ課題が多い。自家神経を用いることなく、さらに高い治療効果を生み出す方法の開発が求められている。また、超音波治療（以下、US治療）はこれまで末梢神経を含む様々な組織において再生促進効果が既に報告されているが、未だその詳細な作用メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、末梢神経再生を促進させる人工神経導管の改良をするために、三次元バイオプリンターを用いた神経導管の作成を試みた。また、US治療による末梢神経再生促進メカニズムについて、経時的な遺伝子発現解析によって解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)三次元バイオプリンターを用いた神経導管の作成

末梢神経再生を促進させる人工神経導管の改良をするために、三次元バイオプリンターを用いた神経導管の作成を試みた。三次元CADデータを基に、内径2.5mmの筒状の形状をアルギン酸とナノセルロースを含有したバイオインクを用いて造形した。クロスリンク剤には塩化カルシウム水溶液を用いた。細胞生存性を確認するため、ラット大腿骨由来の間葉系間質細胞を15万細胞/ml濃度でバイオインクに混合し、導管をプリント後に培養液中で培養した。培養3時間後、1日後、および7日後の細胞生存率を確認した。続いて生体組織に近いバイオインクを用いて神経導管を作成するために、ゼラチンメタクリレートを用いた造形を試みた。細胞生存性を確認するために、300万細胞/ml濃度でゼラチンメタクリレートに混合し、導管を造形後、培養液中で培養した。培養3時間後、1～14日後に細胞生存率を確認した。

(2)US治療による末梢神経再生促進メカニズムの解明

人工神経移植治療とUS治療の併用による相乗治療効果を検討するための基礎として、US治療の末梢神経再生作用メカニズムを経時的な遺伝子発現解析にて検討した。

実験動物として12週齢のLewis系雄性ラットを用いた。麻酔下で片側の坐骨神経に対して鉗子で2mm幅の挫滅損傷を作成した。損傷作成後、無作為にUS群と疑似照射群（Sham群）の2群に振り分けた。損傷から3、7、14、30日後に坐骨神経を回収し、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応によって遺伝子発現解析を実施した。また、正常コントロールラット（Ctrl群）からも坐骨神経を回収し、同様に遺伝子発現解析を実施した。

4. 研究成果

(1)三次元バイオプリンターを用いた神経導管の作成

アルギン酸とナノセルロースを含有したバイオインクを用いて造形した人工神経導管は、壁の厚みの不均一性が確認され、特にプリントベッド側の壁が薄くなってしまいう現象が認められた。培養3時間後、1日後、および7日後の細胞生存率を確認したところ、すべておよそ100%の生存率を確認した。ゼラチンメタクリレートを用いた人工神経導管の細胞生存率は、培養3日後までは生存率が減少していき50%程度となるが、その後は回復傾向が認められた（図1）。単位面積当たりの生存細胞数は全期間においてほぼ変化しなかったことから、細胞増殖も同時に生じていることが示唆された。本神経導管は、ピ

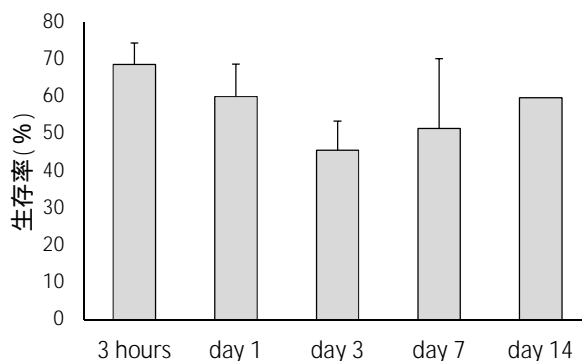


図1. 細胞生存率

ンセットなどでハンドリング可能であり、移植術に耐えられると考えられる。

(2) US 治療による末梢神経再生促進メカニズムの解明

遺伝子発現解析の結果、神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現は、損傷 14 日後にピークを迎え、損傷 30 日後には減弱する傾向が認められた。損傷 30 日後、Sham 群では Ctrl 群と比較して有意差が認められなくなったが、US 群では依然として Ctrl 群よりも有意に高い発現を示した。さらに US 群では、損傷 30 日後における発現が Sham 群と比較して有意に高かった。神経成長因子 (NGF) の発現は、Ctrl 群と比較して US 群において損傷 3 日後から高い発現傾向を示し、損傷 7 日後にピークを迎えて減少した。低親和性神経成長因子受容体 (NGFR) の発現は、US 群と Sham 群の間に有意な差は認められなかった。以上のことから、Sham 群と比較して US 群は、BDNF の発現がより長期にわたって高発現を維持する傾向が認められた。

以上のことから、末梢神経再生に対する US の作用メカニズムの一つとして、BDNF の発現上昇が関与していることが示唆され、臨床応用するためのエビデンスを提供する。今後は、開発した人工神経導管の移植術と US の相乗治療効果を検証し、末梢神経再生医療の発展に貢献する。

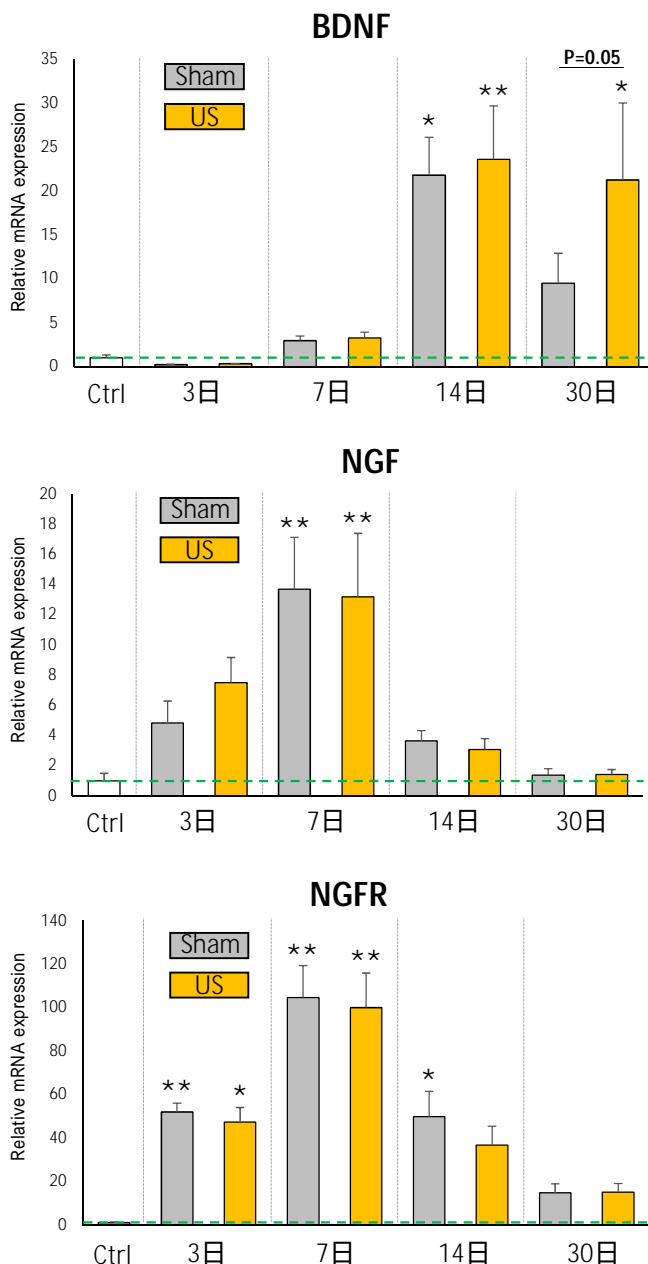


図 2 . 経時的な遺伝子発現解析

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ito Akira, Tianshu Wang, Tajino Junichi	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 Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 2077 ~ 2077
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 Wang Tianshu, Ito Akira, Tajino Junichi, Kuroki Hiroshi, Aoyama Tomoki	4. 巻 -
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 Journal of Visualized Experiments	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) 10.3791/60267	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 Tianshu, Ito Akira, Xu Shixuan, Kawai Hideki, Kuroki Hiroshi, Aoyama Tomoki	4. 巻 47
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 in Medicine & Biology	6. 最初と最後の頁 1586 ~ 1595
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Akira, Wang Tianshu, Nakahara Ryo, Kawai Hideki, Nishitani Kohei, Aoyama Tomoki, Kuroki Hiroshi	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 -
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ito A, Aoyama T, Tajino J, Kuroki H.
2. 発表標題 Three-dimensional analysis to evaluate effects of rehabilitation and cell therapy on functional motor recovery after peripheral nerve injury in rodents.
3. 学会等名 13th International Society of Physical and Rehabilitation Medicine World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tianshu Wang, Akira Ito, Ryo Nakahara, Akihiro Nakahata, Jue Zhang, Hideki Kawai, Naoko Kubo, Hiroshi Kuroki, Tomoki Aoyama.
2. 発表標題 Both functional and histological recovery are not completed within six weeks after sciatic nerve crush injury: a comprehensive 3D kinematic analysis on rats.
3. 学会等名 Eighth Annual International Symposium on Regenerative Rehabilitation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tianshu Wang, Akira Ito, Ryo Nakahara, Akihiro Nakahata, Xiang Ji, Jue Zhang, Hideki Kawai, Naoko Kubo, Hiroshi Kuroki, Tomoki Aoyama.
2. 発表標題 Kinematic Analysis for Understanding Functional Changes Over Time and Correlations between Functional and Histomorphometric Data Following Sciatic Nerve Crush Injury in Rats.
3. 学会等名 13th International Society of Physical and Rehabilitation Medicine World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤明良, 王天舒, 中原峻, 中畑晶博, 張ジュエ, 河合秀紀, 久保菜央子, 新家佑基, 青山朋樹, 黒木裕士.
2. 発表標題 ラット坐骨神経挫滅損傷モデルに対する超音波刺激効果検証.
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤明良, 王天舒, 徐仕軒, 青山朋樹, 黒木裕士.
2. 発表標題 ラット坐骨神経挫滅損傷モデルに対する超音波刺激効果のメカニズム検証 遺伝子発現の経時的变化に着目して.
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河合秀紀, 伊藤明良, 王天舒, 中畑晶博, 中原峻, 徐仕軒, 青山朋樹, 黒木裕士.
2. 発表標題 坐骨神経挫滅損傷モデルラットに対する運動機能回復促進に最適な超音波照射開始時期の検証.
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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/ 京都大学再生リハビリテーションユニット http://regenerative-rehabilitation.com/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

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
---------	---------