

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17997

研究課題名（和文）難治性麻痺克服を目指した再生医療と埋込型神経刺激デバイスによる運動機能再建

研究課題名（英文）Reconstruction of Motor Function by Regenerative Medicine and Implantable Neurostimulator Device for Overcoming Intractable Paralysis

研究代表者

徳武 克浩 (Tokutake, Katsuhiro)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：90822289

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：難治性麻痺である下位運動ニューロン損傷モデルラットに対し、末梢神経内への神経幹細胞移植と開発した電気刺激制御システムを併用した。その結果、本来であれば動くことのない脱神経筋を再支配し、複数の神経を刺激して再支配筋を制御することで、健康ラットと同様につま先の目標位置への追従を可能とした。またトレッドミル歩行の際に、予備動作に付随して刺激するシステムを構築し、麻痺足を制御できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷や広範囲腕神経叢損傷、神経変性疾患などにより生じる下位運動ニューロンの脱落は筋の不可逆的な筋萎縮を引き起こし、麻痺患者に生じる身体的制限及び精神的な負担、また社会的損失は計り知れない。今回の再生医療と工学技術を融合した運動機能再建技術は、未だ治療法のない下位運動ニューロン疾患・損傷による広範な麻痺に対し新たな治療技術となりうる重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A rat model of lower motor neuron injury was used as intractable paralysis. We combined nerve stem cell transplantation into peripheral nerves with an electrical stimulation control system we developed. As a result, denervated muscles that normally do not move were reinnervated. The strategy of stimulating multiple nerves to control reinnervated muscles allowed them to follow the target position of the toe as well as healthy rats. During treadmill walking, the paralyzed leg could be controlled by constructing a system of stimulation accompanying the preliminary movement.

研究分野：運動機能再建

キーワード：機能的電気刺激 運動麻痺 再生医療 neuro-modulation 神経幹細胞移植 運動制御

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や広範囲腕神経叢損傷、神経変性疾患などにより生じる下位運動ニューロンの脱落は筋の不可逆的な筋萎縮を引き起こす。重度神経損傷の場合、可能な範囲での神経縫合術や神経移植術、神経交差縫合術、筋腱移行術など様々な外科的治療を駆使して運動器の機能再建を試みるが、治療成績は決して満足なものではないのが現状である。また筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの進行性の運動神経疾患では、呼吸や嚥下といった生命を維持するための基盤となる組織をも影響を及ぼすが、今日でも解決には至っていない。

近年、iPS 細胞を含む幹細胞移植による研究が盛んに行われているが、その目的は中枢神経組織へ投与することによる神経細胞の置換や中継、または神経栄養因子や再髄鞘化を促すことである。ただ脊髄損傷の中でも "True complete injury" と呼ばれる病態を理論的に解決できる方法は中継メカニズムのみであるが、上位ニューロンが移植細胞を介して下位ニューロンに橋渡しされていることを直接示す報告はまだなく、亜急性期 (受傷後数週間以内) を過ぎるとさらなる複数の難題が出現する。また ALS での幹細胞治療戦略はすでに置換ではなく微小環境を維持することでのサポートの役割がメインとなっている。一方で、脊髄損傷による下肢麻痺患者に対し、残存する下位運動ニューロンをターゲットとした硬膜外電気刺激デバイスによる制御を用いてヒトでの歩行補助に成功したという報告がなされており、神経工学の革新的な進歩が新たな治療法の糸口になってきている。ただこの治療戦略も、損傷・変性した神経細胞に対しては不可能であり、下位運動ニューロンの広範損傷や神経変性疾患は未だ解決できていない大きな課題として残っている。

2. 研究の目的

そこで我々のグループは、未だ治療法のない下位運動ニューロン疾患・損傷により生じる広範囲麻痺を、末梢神経内に固有の神経節を作成し、これを機能的電気刺激により制御するという、新たな麻痺治療技術の開発に取り組んでいる (図1)。

現在、Waller 変性を生じた末梢神経内に胎児脊髄前角細胞由来の神経幹細胞を移植することで、脊髄と酷似した構造と機能を有する異所性神経節を形成することに成功し、これにより不可逆性の筋萎縮が予防され電気刺激を併用すれば筋収縮の制御が可能となっている。ただ現状では、長期的な電気刺激ができず、有線により感染症のリスクがあり、神経の選択的刺激が困難である、などの課題が残存している。この新たな麻痺治療法を完結するためにはより高度な機能を有するマイクロ・ナノ電気刺激デバイスの開発が必須である。

末梢神経は体内のいたるところに存在しており、自在に神経節を構築しデバイスを用いて複数神経への刺激を自由に制御出来れば、重篤な難治性麻痺疾患に苦しむ患者の画期的な治療法となりうる。また、末梢神経に対するデバイスが進歩することにより、四肢感覚運動機能の回復だけでなく、呼吸循環、嚥下、直腸膀胱、内分泌系といった神経によって調節される重要な臓器機能障害を、薬剤ではなくデバイスを用いて選択的に調整できる可能性も広がる。そこで、現在のデバイスの課題克服を目的として、名古屋大学大学院工学研究科マイクロ・ナノ機械理工学の協力を得て、生体親和性をもち長期間に渡り神経への刺激が可能かつ、生体内への完全な埋め込み、複雑な運動制御を可能とする多チャンネル埋め込み型 Nerve machine interface を開発し、再生医療との融合による新しい難治性麻痺治療体系の確立を図る (図2)。

3. 研究の方法

(1) 新規神経刺激デバイスの開発

新規神経刺激デバイスを開発するにあたり現状のデバイスの課題を考え、a) 低侵襲で刺激安定性の高いインターフェイス、b) 生体内埋込を可能とするワイヤレス化を目指した技術、c) 単一のオンオフ制御ではなく複数神経を迅速かつ高精度に制御可能なシステム開発、の3つを目標とした。

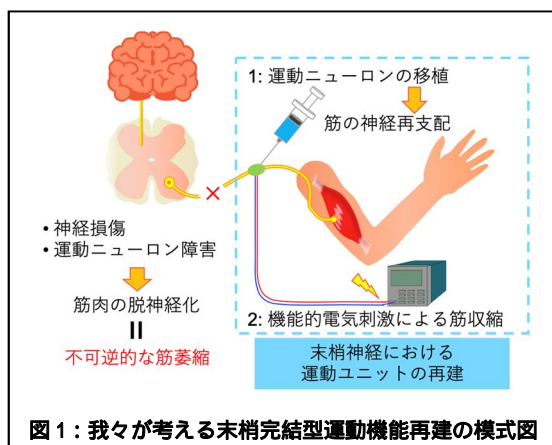


図1: 我々が考える末梢完結型運動機能再建の模式図

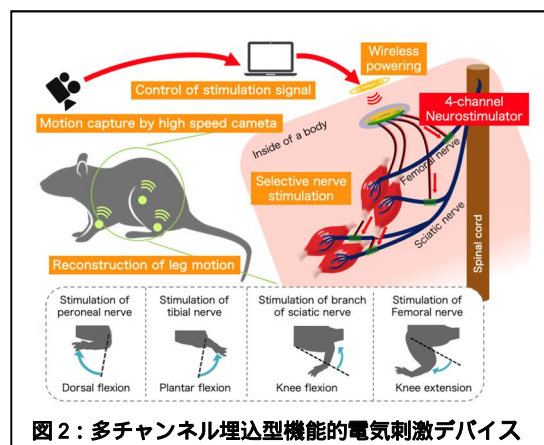


図2: 多チャンネル埋込型機能的電気刺激デバイス

末梢神経とのインターフェイスとして微細加工技術であるフォトリソグラフィを用いてシリコンカフ型電極を作成し、また埋込に向けた技術開発としては送電/受電デバイスを別に作成しデバイス間をコイルによる無線給電で伝達する仕組みを目指した(図3)。

複数神経の選択的な刺激方法としては、基準とした周波数からの送電周波数の増減に基づき神経の選択的な刺激を実装できるように計画した。

この神経刺激装置を、ラットの脛骨および総腓骨神経にカフ電極をインターフェイスとして接続して生体システムに組み込み、視覚的に捉えた足関節角度情報を入力信号として各神経への送電周波数と電流強度を調整しアクチュエーターとしての各筋肉の収縮程度を微調整する、というビジュアルフィードバック制御によって目的とする運動を遂行するシステムを構築した(図4)。

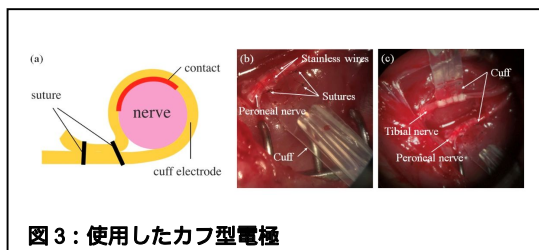


図3：使用したカフ型電極

(2)再支配脱神経筋の評価および新規デバイスを用いた運動制御

実験動物・モデル作成

近交系ラットである F 344 / NS1c をドナー・レシピエントとして使用し、全ての実験は吸入麻酔下(2%イソフルラン)で施行した。8週齢雄ラット6匹を使用し、後肢大腿レベルで坐骨神経と脛骨神経・総腓骨神経をそれぞれ5-0nylonで結紮・切離(坐骨神経断端は殿筋内に埋没)し、脱神経筋モデルを作成した。1週後、胎生14日目の胎児ラットから前角を含む脊髄組織を採取し、神経細胞用分散液を用いて分散し、神経細胞用培地中で 1×10^6 cells/10 μ l の濃度に調整した細胞混濁液を作成した。脱神経筋モデルラットの神経を切離した側の後肢を transplantation 群(n=6)として、中枢との連続性を断たれている脛骨および総腓骨神経遠位断端内に30G針をつけたシリンジを用いて 1×10^6 個(10 μ l)の細胞を移植した。対側の後肢の神経は特に処置を施行せず、naïve 群(n=6)とした(図5)。

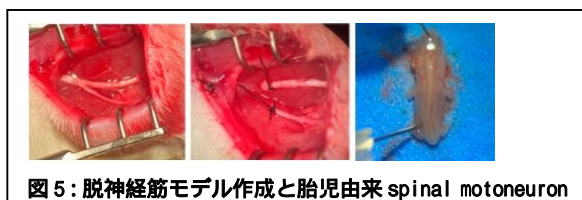


図5：脱神経筋モデル作成と胎児由来 spinal motoneuron

電気生理学的評価および運動機能評価
移植3か月後、6匹の両大腿部を切開し、脛骨神経および総腓骨神経を露出した。双極刺激電極を小型マニピレーター付固定台で把持固定し、周波数50Hz、持続時間0.2msの矩形波で各神経を刺激した。刺激電流量を0.0mAから2.0mAまで0.2mA毎に増強し、足関節背屈および底屈角度変化と最大上刺激での複合筋活動電位(CMAP)の振幅を記録した。足関節角度変化は、足先、踵、膝にそれぞれマーカーをつけて、下腿と足部のなす角度を直上からカメラで記録することで測定した(足関節背屈が増強するにつれ0に近づくよう定義した)。

ビジュアルフィードバック制御実験と神経インピーダンスチェック

中枢との連続性を断たれた各移植神経に対し前述したカフ型電極を顕微鏡下で8-0nylonにて縫合・装着し、システムによる安定した刺激が可能であることを確認後にビジュアルフィードバック制御を行った。制御実験後に神経のインピーダンスをインピーダンスアナライザを用いて測定した。

細胞移植部/神経筋接合部の組織学的評価

2%イソフルラン麻酔下に総腓骨神経支配である長母趾伸筋(EHL)を神経付で採取し、4%PFAを垂らしたスライドガラス上で潰したのちに、抗Tuj1抗体および抗-bungarotoxin抗体、また核染色としてHoechstを用いてWhole mount免疫染色を行った。また、EHL採取後にラット胸部を切開し心臓を露出し、18G針で左室を穿刺した後に生食50ml、4%PFA200mlの順に注入し、灌流固定を行った。その後、細胞移植を行った神経を採取し、浸漬固定を追加後に15%、30%の順にスクロースで置換後にドライアイスで冷却したイソペンタン内で凍結包埋とした。30 μ mに薄切し、移植環境での中枢神経系細胞の評価を行うために抗Tuj1抗体、抗GFAP抗体、抗MBP抗

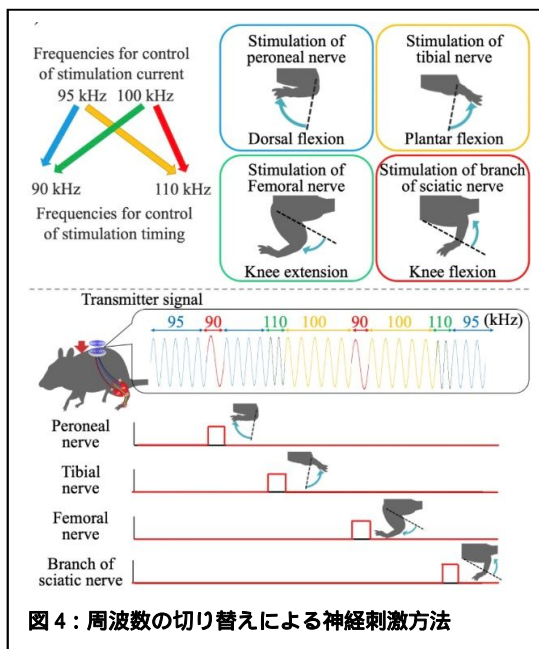


図4：周波数の切り替えによる神経刺激方法

体、抗 ChAT 抗体、核染色として Hoechst を用いて免疫染色を行った。これらの切片に対し共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫組織学的評価を行った。

4channel を用いた膝関節・足関節同時制御

足関節の脱神経筋モデルにおける脛骨神経と総腓骨神経に加えて、大腿神経および坐骨神経大腿二頭筋枝も同様に切離することにより、膝関節も含めた脱神経筋モデルを作成した。1週間後に、足関節モデルと同様に胎児由来神経前駆細胞を移植した。再支配後、二関節に対してビジュアルフィードバック制御によって目的とする運動が可能か評価した。

歩行における予備動作に付随した運動刺激

足関節の脱神経筋モデルに対し移植による再支配を行い、デバイスを装着してトレッドミル上を歩行させた。その際に、右前肢の動きのタイミングを感知して左足関節の背屈を行うことで歩容の改善を図れるかを検証した。

4. 研究成果

(1)細胞移植部神経組織片および神経筋接合部での免疫組織学的評価

細胞移植を行った遠位末梢神経断端内の免疫染色では、中枢神経系の細胞である神経細胞(Tuj1; 3tubulin 陽性)、アストロサイト(GFAP 陽性)、オリゴデンドロサイトまたはシュワン細胞と考えられる MBP 陽性細胞の存在が確認でき、結節構造を形成していた。また神経細胞の中には運動ニューロンと考えられる ChAT/Tuj1 陽性細胞も存在していることが確認された。Naïve である末梢神経内では軸索を示す Tuj1 陽性の線状構造体のみが染色されるだけであり、移植によって中枢神経系類似の異所性神経節が形成されたことが示された。また神経筋接合部を確認すると、アセチルコリンレセプターに神経軸索が入り込んでおり、移植細胞からの脱神経筋に対する神経再支配が生じていた(図6)。

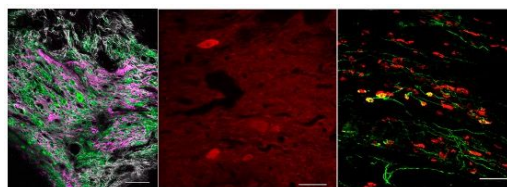


図6：神経移植部(左/中)と神経筋接合部染色結果

(左) Tuj1(green), GFAP(white), MBP(purple)

(中) Chat 陽性神経細胞 (red)

(右) BTX(red), Tuj1(green)

(2)電気生理学的評価および運動機能評価

naïve 群(n=6)と比較すると CMAP の振幅は 1/15-20 程度ではあったが、transplantation 群(n=6)の神経刺激により全ての筋で筋収縮が確認された。刺激時の足関節最大角度変化を確認すると、transplantation 群の背屈可動域はその変化量も含め naïve 群と同等に刺激前よりも大きく(p<0.001)、必要電流量も有意差はなかった(transplantation 群 $0.43 \pm 0.08\text{mA}$, naïve 群 $0.55 \pm 0.006\text{mA}$, p=0.15)。

底屈運動も6匹全てで確認できたが、可動域の変化量は naïve 群と比較して有意に小さかった。必要な電流量は差がなかった(transplantation 群 $0.60 \pm 0.07\text{mA}$, naïve 群 $0.54 \pm 0.01\text{mA}$, p=0.50)。

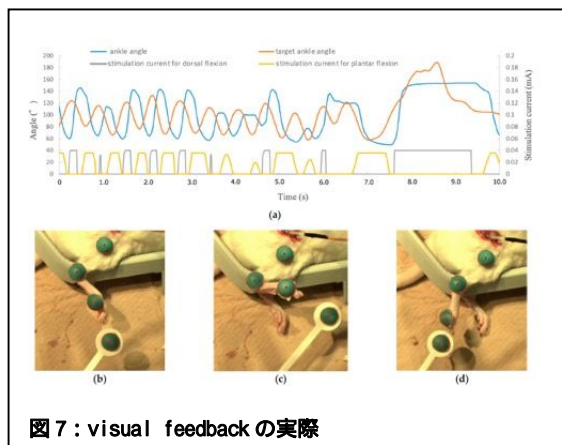


図7：visual feedback の実際

(3)ビジュアルフィードバック制御実験と神経インピーダンスチェック

6肢中5肢で naïve での足関節角度制御と遜色なくターゲットマーカーへの追従・制御が可能であった。1肢で底屈可動域が不足しており、追従はするものの底屈指令時の角度変化が少なかった(図7)。刺激した神経のインピーダンスは、transplantation 群と naïve 群で統計学的有意差はなかった(総腓骨神経; transplantation 群 $12.9 \pm 2.3\text{k}$, naïve 群 $9.5 \pm 1.5\text{k}$, p=0.23。脛骨神経; transplantation 群 $11.9 \pm 1.2\text{k}$, naïve 群 $10.6 \pm 1.7\text{k}$, p=0.56)。

(4)4channel による二関節筋制御と歩行補助刺激実験

足関節時と同様に、二関節筋でもターゲットマーカーへの追従・制御が可能であった。また予備動作に付随して麻痺肢の背屈運動の入力が可能であった。

(5)まとめ

2017年に Lancet にて高位脊髄損傷四肢麻痺患者の Brain machine interface (BMI) と機能的電気刺激の融合によるリーチングとグラスピングの獲得による実証実験(Proof of Concept)が報告されている。これは脳から抽出された運動企図をトリガーとして末梢をコントロールできれ

ば運動可能なことを示している。Bouton らは BMI などを用いたこのような抽出から刺激のプロセスを Electronic neural bypass といい、幹細胞移植が目指す中継の役割を電気信号でバイパスするという発想でありテクノロジーの進化で今後発展しうると述べている。ただこの治療戦略は下位運動ニューロンの刺激伝導性が温存された場合のみ適応となり、下位運動ニューロン疾患や損傷には使用できない。

我々が今回示した末梢神経内幹細胞移植は、中枢と連続性を断たれ不可逆性の筋萎縮をきたす運命の脱神経筋に対して、中枢神経系の細胞集団からなる異所性神経節を末梢神経内に作成し刺激反応性を保持したユニットを再形成するというユニークな技術である。また

我々は遊離神経片をターゲットとする脱神経筋に縫合し幹細胞移植することでも再支配が可能なることを報告している。今回、このユニットに対し高度な制御システムを組み合わせることで、足関節、さらには膝関節を含む二関節においても目的とする運動を迅速かつ高精度に制御可能であることを示すことができた。また予備動作に付随する刺激も可能であった。刺激に対する反応強度の問題や移植細胞源、長期における刺激安定性の担保や筋疲労の問題など解決すべき課題は複数あるが、この技術を併用すれば Electronic neural bypass の治療適応外である下位運動ニューロン疾患や損傷に対しても適応の拡大が可能であり、未だ解決策のない難治性疾患の運動や呼吸・嚥下機能に対する新たな治療法創発のきっかけとなりうると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Asano Kenichi, Nakano Tomonori, Tokutake Katsuhiko, Ishii Hisao, Nishizuka Takano, Iwatsuki Katsuyuki, Onishi Tetsuro, Kurimoto Shigeru, Yamamoto Michiro, Tatebe Masahiro, Hirata Hitoshi	4. 巻 52(6)
2. 論文標題 Innervation of Meissner's corpuscles and Merkel cells by transplantation of embryonic dorsal root ganglion cells after peripheral nerve section in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 586-595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.3196	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 Sawada Hideyoshi, Kurimoto Shigeru, Tokutake Katsuhiko, Saeki Sota, Hirata Hitoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Optimal conditions for graft survival and reinnervation of denervated muscles after embryonic motoneuron transplantation into peripheral nerves undergoing Wallerian degeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 763-775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.3223	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 Masaru Takeuchi, Keita Watanabe, Kanta Ishihara, Taichi Miyamoto, Katsuhiko Tokutake, Sota Saeki, Tadayoshi Aoyama, Yasuhisa Hasegawa, Shigeru Kurimoto, Hitoshi Hirata	4. 巻 20(8)
2. 論文標題 Visual Feedback Control of a Rat Ankle Angle Using a Wirelessly Powered Two-Channel Neurostimulator	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors (Basel)	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s20082210	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 Katsuhiko Tokutake, Masaru Takeuchi, Shigeru Kurimoto, Sota Saeki, Yuta Asami, Keiko Onaka, Masaomi Saeki, Tadayoshi Aoyama, Yasuhisa Hasegawa, Hitoshi Hirata	4. 巻 23(15)
2. 論文標題 A Therapeutic Strategy for Lower Motor Neuron Disease and Injury Integrating Neural Stem Cell Transplantation and Functional Electrical Stimulation in a Rat Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158760	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 Masaru Takeuchi, Katsuhiko Tokutake, Keita Watanabe, Naoyuki Ito, Tadayoshi Aoyama, Sota Saeki, Shigeru Kurimoto, Hitoshi Hirata, Yasuhisa Hasegawa	4. 巻 22(19)
2. 論文標題 A Wirelessly Powered 4-Channel Neurostimulator for Reconstructing Walking Trajectory	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors (Basel)	6. 最初と最後の頁 7198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s22197198	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 Sota Saeki, Katsuhiko Tokutake, Masaki Takasu, Shigeru Kurimoto, Yuta Asami, Keiko Onaka, Masaomi Saeki, Hitoshi Hirata	4. 巻 23(15)
2. 論文標題 Functional Reconstruction of Denervated Muscle by Xenotransplantation of Neural Cells from Porcine to Rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158773	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 徳武 克浩 佐伯 総太 浅見 雄太 栗本 秀 平田 仁 竹内 大 長谷川 泰久
2. 発表標題 難治性麻痺克服を目指した多チャンネル機能的電気刺激デバイスの開発
3. 学会等名 第64回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳武 克浩 佐伯 総太 浅見 雄太 栗本 秀 平田 仁 竹内 大 長谷川 泰久
2. 発表標題 ロボット制御技術を用いた神経刺激装置は末梢神経内胎子由来神経幹細胞移植によって再支配された脱神経筋の高度制御を可能とする
3. 学会等名 第32回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳武 克浩 佐伯 総太 浅見 雄太 栗本 秀 平田 仁 竹内 大 長谷川 泰久
2. 発表標題 ロボット制御技術を用いた神経刺激装置は末梢神経内胎由来神経幹細胞移植によって再支配された脱神経筋の高度制御を可能とする
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 神経刺激装置および神経刺激システムおよび神経刺激方法	発明者 竹内大、徳武克浩、 青山忠義、長谷川泰 久、栗本秀、平田仁	権利者 東海国立大学機 構
産業財産権の種類、番号 特許、2021-168453	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 神経刺激システム	発明者 竹内大、徳武克浩、 青山忠義、長谷川泰 久、栗本秀、平田仁	権利者 東海国立大学機 構
産業財産権の種類、番号 特許、2020-71547	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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
研究協力者	竹内 大 (Takeuchi Masaru) (20713374)	名古屋大学・工学研究科マイクロ・ナノ機械理工学専攻・助教 (13901)	

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