

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390288

研究課題名（和文）

ES 細胞由来運動神経を組み込んだニューロチップによる次世代 FES システムの開発

研究課題名（英文）

Development of next generation FES equipped with ES-cell derived motoneuron

研究代表者

平田 仁（HIRATA HITOSHI）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80173243

研究成果の概要（和文）：

心筋や平滑筋と異なり、骨格筋は機能のみならず生存という観点からも運動ニューロンの再支配が不可欠である。しかし、脊髄損傷など高位における重度神経損傷では神経組織の再構築は極めて困難であり、万一再生医療技術により再構築できたとしても神経ネットワークの再構築に要する時間が良好な機能回復を困難にする。この研究において我々はこのような状況においても速やかな神経再支配と早期の機能回復を可能とする技術の開発を試みた。

研究成果の概要（英文）：

In contrast to cardiac muscle or smooth muscles, re-innervation is a prerequisite not only for functional recovery but also for survival of striated muscles. However, severe neuronal damage at higher levels such as complete spinal cord injury has little chance of recovery. Should the damaged nerve tissue be reconstructed by means of regenerative medicine technologies, optimal functional recovery would be less likely to occur due to extremely long recovering time of neural network. In this experimental study, we tried to develop a technology that allows swift re-innervation and functional recovery of striated muscles even in such situations by implanting motoneurons near paralyzed striated muscles. We first developed an ES-cell derived motoneuron integrated microelectrode array, however, due to difficulty of long time maintaining of cells on chips in vivo, we abandoned the technology. We then developed a novel technology named motoneuron integrated striated muscles (MISM). Development of MISM technology consists of 4 parts, i.e. induction of motoneurons that can stably form functional neuromuscular junctions from pluripotent stem cells, transplantation of induced motoneurons into Wallerian degenerated peripheral nerve trunk, development of implantable FES system that , and motion control by tacit learning program based functional electrical stimulation.

交付決定額-

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：手外科学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：健康・福祉工学、機能的電気刺激

### 1. 研究開始当初の背景

(1)多能性幹細胞を用いる再生医療は従来不  
治の病と考えられてきた疾患や外傷の治療  
に一筋の光明を齎している。神経損傷による  
高度の運動麻痺に対しても ES 細胞や iPS 細胞  
を用いた研究が急速に拡大してきており、  
臨床応用に向けた取り組みも始まっている。  
しかし、多能性幹細胞には常に腫瘍化の問題  
が付きまとう。この為多能性幹細胞を用いる  
再生医療の成功には安全なクローンの確保  
という問題に加え、少数の細胞移植により大  
きな成果を生む治療ターゲットを発掘する  
必要がある。脊髄損傷を対象にした研究の多  
くは脊髄内に多能性幹細胞或はそれに由来  
する細胞を移植する手法をとるが、脊髄再生  
には極めて多様かつ多数の細胞が必要とな  
り、成功のハードルは高い。これに対し、各  
筋の支配神経機能を代償する分散型再建は  
一筋当たり数百程度の神経細胞で十分な筋  
力が期待でき「少数の細胞移植で大きな成果」  
という条件により合致する。我々は既に微小  
電極基盤上に神経細胞を培養し、軸索突起の  
配列を制御する特殊コーティング技術を開  
発していた。また、筋衛星細胞と人工基質を  
組み合わせて人工筋肉を作成する技術も確  
立していた。そこで、これらの技術を組み合  
わせて ES 細胞由来運動ニューロンを組み込  
んだニューロチップを作成し、筋活動を制御  
する次世代型 FES 技術を開発し、これによ  
り麻痺筋の運動制御を行う事を目指した。微  
小電極基盤上に胎児脊髄由来運動ニュー  
ロンを培養する事は早い段階で成功したが、  
生体内で長時間維持する事が極めて困難であ  
った。この為方針を転換し運動ニューロンを  
ワーラー変性に陥った神経幹内に移植し、麻  
痺筋を神経支配させ、移植神経細胞を FES  
により制御する事を目指した。

### 2. 研究の目的

- (1)ES 細胞および iPS 細胞由来運動ニュー  
ロンを作成し、骨格筋との共培養系を作成し、  
神経筋接合部を形成できる事を確認する。
- (2)胎児脊髄由来運動ニューロン、或は多能性  
幹細胞由来運動ニューロンの神経幹移植法  
を確立する。
- (3)自動歩行解析装置 CatWalk およびモー  
ションキャプチャー法により運動ニュー  
ロン末梢神経管内移植による麻痺肢の運動制御  
を定量的に評価する。
- (4)FES による運動制御を円滑化するための  
運動制御プログラムの開発をする

### 3. 研究の方法

(1)ラット由来 ES 細胞、マウス由来 iPS 細胞  
を用いた。ハンギングドロップ法により胚様  
体を作成し、Wichterle の方法に準じてレチ  
ノイン酸とソニックヘッジホッグを用いて  
運動ニューロンへと分化させた。運動ニュー  
ロンへの分化マーカーは *ilet1* と *TUJ1* を用

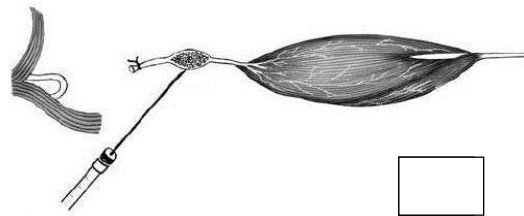
いた。胎児脊髄由来運動ニューロンは  
Sauvageot の方法に従い胎生 14 日の胎児脊髄  
を採取し、手術用顕微鏡下に前角のみを採取  
し、分散培養により得た。(図 1)ラミニコ  
ートをした培養皿上で筋芽細胞樹立株であ



る C2C12 とそれぞれ共培  
養し、 $\alpha$   
BTX, synaptophysin およ  
び peripherin を用いて行  
った。

(2)運動ニューロン神経幹  
内移植法の確立はラット  
坐骨神経切断モデルを用  
いた。11 週齢の F344 ラッ  
トの坐骨神経を全身麻酔

下に切断し Waller 変性を誘発し、1 週後に  
再度展開して 31G 針を装着したハミルトンシ  
リンジにより運動ニューロンを神経幹内に  
移植した。(図 2)



移植後 12 週に後述する歩行解析と電気生理  
学的評価を行った上で屠殺し、4%PFA を用い  
灌流固定後に神経と筋を採取して筋湿重量、  
筋繊維束径のヒストグラム解析、神経内有髓  
軸索数および軸索径ヒストグラム解析を行  
った。

(3)ラットの正常歩行パターンの解析は  
Parrot の方法に準じラット体表に 22 個のマ  
ーカーを設置し、6 台のビデオカメラを用い  
て motion capture 法により解析した。(図 3)  
また、麻痺筋の回復状況の評価は Thota の方  
法に準じて CatWalk の歩行トラック上で側方  
よりビデオ撮影を行い、hindlimb hip 角を計  
測した。同時に CatWalk により SFI、足底接  
地圧等のパラメーターを自動解析した。(図  
4)



図 3

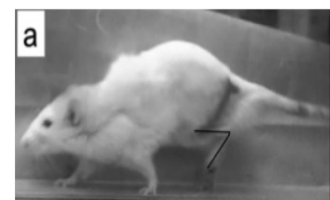


図 4

(4)FES による麻痺肢の動作を円滑化するた  
めの FES 制御プログラムは下田らの報告した  
tacit learning プログラムに従って開発をし

た。研究は健康者ボランティア10名と片手前腕切断者ボランティア3名を対象に実施した。通常の手指の開閉のみが可能な筋電義手に前腕回旋制御用アクチュエーターを追加し、肩甲帯に設置したセンサーの情報を元に tacit learning プログラムにより前腕回旋角度を自動調整する事を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1)

2日間のハンギングドロップ法により胚様体形成を行い、その後3日間レチノイン酸存在下に浮遊培養を行う事で神経前駆細胞への分化誘導を行った。細胞の純化には NCAM 抗体を用いた磁気ビーズ法を行い、その後ラミニコート培養皿上でレチノイン酸、ソニックヘッジホッグ存在下に分散培養を行う事で運動ニューロンへの分化を誘導する事ができた。(図5) C2C12 との共培養系では  $\alpha$  BTX および peripherin により神経筋接合部の形成を確認できた。(図6)

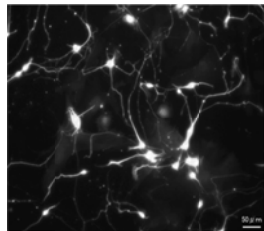


図 5

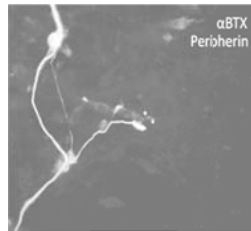


図 6

##### (2)

12 週後の標本では脛骨神経内に生着した運動ニューロンを確認できた。(図7) また、髄鞘染色にて多数の有随線維が確認された。(図8) 軸索数の定量解析では健側の約4割程の有随軸索を認めた。(図9) 軸索径は健側の60%程度であった。(図10) 筋線維束横断面積では vehicle のみを入れた naïve 群に対し、運動ニューロンを移植した MISM 群では大径線維群の占める比率が有意に高かった。(図11) 生着した運動ニューロンの数は1000個程度に留まっており、移植細胞数が1000000個の細胞を移植していた事から生着率は0.1%と推定された。移植細胞数と回復状態との関係を明らかにするために1000000個移植群と200000個移植群の2群間で電気生理学的評価と筋湿重量を比較した。その結果1000000個移植群がいずれのパラメーターも有意に回復が良好であった。(図12, 13) 以上の結果は運動ニューロンの末梢神経幹内移植が有用な麻痺筋再建法であり、1000個程度の細胞が生着する事で十分な筋力の回復を齎すが、細胞生着率には0.1%程度と著しく低く、少数の細胞移植により大きな効果を期待するには細胞生着率を高める方法を確立する必要がある事を示していた。

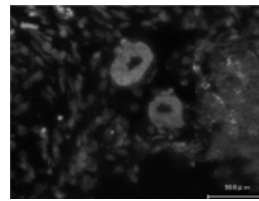


図 7

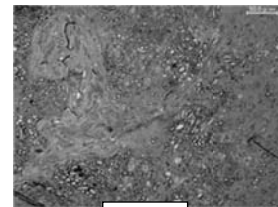


図 8

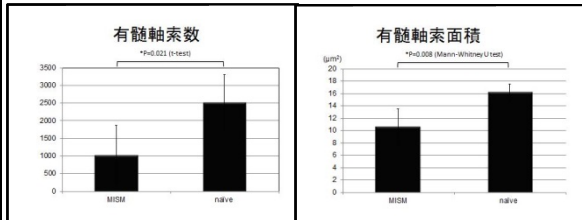


図 9

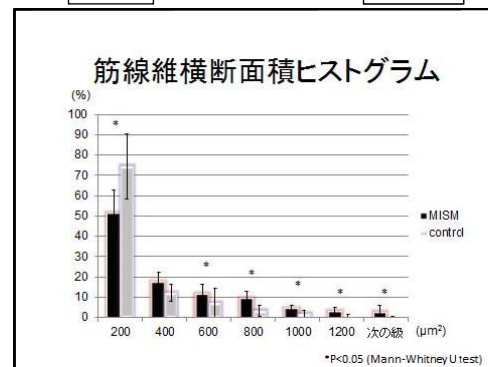


図 11

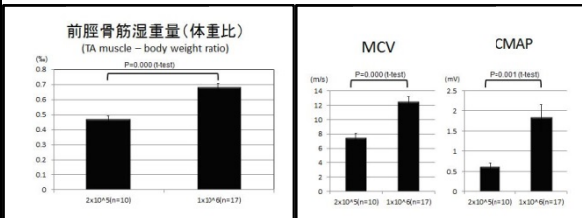
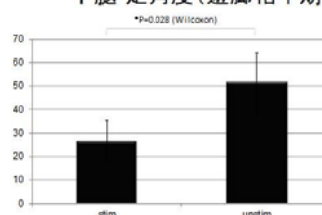


図 12

##### (3)

6台のビデオカメラを用い体表に20個のマーカーを設置して正常ラットの歩行パターンを motion capture 法により解析する事ができた。その上で齧歯類の自動歩行解析装置である CatWalk 上での歩行パターンをビデオ撮影し、hindlimb hip 角の計測を行った。その結果歩行周期のうち遊脚相中期における足関節の背屈が有意に改善した事が示された。(図14)

#### 下腿-足角度 (遊脚相中期)



(4) 動力源が一つしかない自動車と異なり、人を含む動物の動きは多数の筋の協調した活動により生み出される。しかし、体を動かす際にこれらの筋総ての動きを意識する事はなく、動作に関与するほとんどの筋活動は不随意に制御される。多能性幹細胞由来運動ニューロンの末梢神経幹内移植と FES による運動制御を円滑に行うには患者の意識する筋活動を最小限とし、協調的に作動する多くの筋活動を自動制御する技術の確立が不可欠である。我々はこれを実現するため、複数のアクチュエータを有するヒューマロイドロボットに歩行を自動学習させる事が可能な tacit learning program を発展させた FES 制御プログラムの開発を行った。体幹周囲の動作から使用者の意図を読み取り、自動的に前腕での回旋を補正する tacit learning program を開発し、健康体ボランティア 10 名と片側前腕切断患者 3 名に対し有用性を評価した。(図 15)その結果、筋電義手による摘み動作に伴う体幹の捻れは経時的に現象し、使用者も顕著に肉体的な負担の軽減を体感できた。



図 15

## 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 4 件)

① Y. Pei, Y. Kim, G. Obinata, E. Genda and D. Stefanov, “Comparison of Robot-Aided Shoulder Exercise to Weight-Based Exercise”, *International Journal of Advanced Robotic Systems*, 査読有 Vol.9, No.86, pp.1-12, 2012.

② Y. Ito, Y. Kim, C. Nagai and G. Obinata, “Vision-Based Tactile Sensing and Shape Estimation Using a Fluid-Type Touchpad”, *IEEE Transaction on Automation Science and Engineering*, 査読有 Vol.9, No.4, pp.737-744, 2012

③ 栗本秀、加藤宗一、平田仁、他. 新しい医療技術 幹細胞移植を用いた麻痺筋の再建 (解説) 整形・災害外科. 査読無 55: 895-898, 2012.

④ Ninagawa N, Murakami R, Isobe E, Tanaka Y, Nakagawa H, Torihashi S. Mesenchymal stem cells originating from ES cells show high telomerase activity and therapeutic benefits. *Differentiation*. 査読有 82(3);153-64, 2011

[学会発表] (計 6 件)

① Kato S, Kurimot S, Hirata H et al. Transplanted cell number is a key factor for success of ambulation function restoration by motoneuron integrated striated muscles. *Orthopaedic Research Society*. 2013/1/26-29, San Antonio, TX, USA.

② G. Obinata, C. Nagai, Y. Kim, Y. Uchiyama, K. Hase, “Design of Powered Orthosis Based on 3D Neuro-musculo-skeletal Human Model (invited)”, *The 10th IFAC Symposium on Robot Control (SYROCO’ 12)*, 2012/9/5-7, Dubrovnik, Croatia

③ 平田仁. Motoneuron integrated striated muscle (MISM) による麻痺筋の機能再構築. 日本末梢神経学会 (シンポジウム) 2012/8/31-9/1. 北九州市 (九州大学医学部百年講堂)

④ 栗本秀, 平田仁 他. Motoneuron integrated striated muscle (MISM) による局所制御システムの開発. マイクロナノメカトロニクス GCOE シンポジウム (招待講演) 2012/3/8, 名古屋市 (名古屋大学医系研究棟 1 号館地下会議室)

⑤ Kato S, Kurimot S, Hirata H, et al. Percutaneous electrical stimulation to motoneuron integrated striated muscles. *Orthopaedic Research Society*. 2012/2/4-7. San Francisco, CA, USA.

- ⑥ Kurimot S, Hirata H, Kato S, et al. Transplantation of embryonic neurons into peripheral nerve forms functional motor units. Orthopaedic Research Society. 2011/1/13-16. Long Beach CA, USA.

〔図書〕(計 1件)

- ① 平田仁. 人工神経. 「人工臓器は、いま」日本人工臓器学会編. はる書房. P379-394, 2012. (増補新訂版)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平田 仁 (HIRATA HITOSHI)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：80173243

### (2) 研究分担者

建部 将広 (TATEBE MASAHIRO)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60420349

篠原 孝明 (SHINOHARA TAKAAKI)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00378209

山本 美知郎 (YAMAMOTO MICHIRO)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教  
研究者番号：90528829

大日方 五郎 (OBINATA GORO)  
名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授  
研究者番号：50111315

鳥橋 茂子 (TORIHASHI SHIGEKO)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：90112961

奥井 伸幸 (OKUI NOBUYUKI)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教  
研究者番号：70547554

### (3) 連携研究者 なし