

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23700664

研究課題名（和文）

MISMによる局所分散型筋制御システムの開発

研究課題名（英文）

Motoneuron Integrated Striated Muscle Restores Motor Function in Rats after Transection of the Sciatic Nerve

研究代表者

栗本 秀 (KURIMOTO SHIGERU)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70597856

研究成果の概要（和文）：

末梢神経内へ運動神経細胞を移植し、神経再支配した骨格筋（MISM）を作成した。成体ラットの坐骨神経を切離し、胎児ラット脊髄神経細胞を、切断した末梢神経内に移植した。MISMの支配神経へ電極を留置し、体外より電気刺激を行い、坐骨神経切断ラットの歩容が改善することを確認した。今まで治療が困難であった広範な末梢神経損傷や中枢神経障害に対し、すでに実用化されている機能的電気刺激（FES）技術と組み合わせることで、全く新しい麻痺筋の機能再建を可能にする。中枢神経系に対する細胞移植と比べ不可逆な変性に陥るまでの治療可能期間が広く、少数の細胞で麻痺筋の機能回復を実現できるため、ES/iPS細胞を用いた再生医療の臨床応用に近い技術開発であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Reinnervation of denervated muscle by motoneurons transplanted into the peripheral nerve may provide the potential to excite muscles artificially with functional electrical stimulation (FES). Here we investigated if transplantation of embryonic motoneurons into peripheral nerve combined with FES restored functional muscle activity in adult Fischer 344 rats after transection of the sciatic nerve. One week after sciatic nerve transection, medium with (cell transplantation group, n=6) or without (surgical control group, n=6) dissociated embryonic spinal neurons was transplanted into the distal stump of the tibial and peroneal nerves. Electrophysiological and tissue analyses were performed in the cell transplantation and surgical control groups twelve weeks after transplantation, as well as a naïve control group (n=6) that received no surgery. In the cell transplantation group, ankle angle was measured during gait with and without FES of the peroneal nerve. Transplanted motoneurons survived in the peripheral nerve and formed functional motor units. In the cell transplantation group, ankle angle at mid-swing was more flexed during gait with FES than gait without FES, indicating that transplanted motoneurons in conjunction with FES restored ankle flexion in gait, even though no neural connection between central nervous system and muscle was present. These results indicate that transplantation of embryonic motoneurons into peripheral nerve combined with FES can provide a new treatment strategy for paralysed muscles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

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：神経再生、機能再建、末梢神経、再生医療、機能的電気刺激、歩行解析、運動神経細胞移植

1. 研究開始当初の背景

初期胚由来の多能性幹細胞である ES 細胞や体細胞から人工的に誘導した多能性幹細胞である iPS 細胞の樹立により、幹細胞研究の領域は in vitro での分化誘導や組織再生を含め急速に発展している。ES/iPS 細胞を用いた再生医療は、今日治療困難な様々な外傷や疾患に対する新たな治療技術として多くの期待が寄せられている。

実際すでに、米国では human embryonic stem cell (hESC) を用いた、網膜と脊髄への臨床試験が開始されている。いずれも最初の適応疾患は神経系であった。特に Advanced Cell Technology 社が行った加齢黄斑変性症とシュタルガルト病に対する hESC-derived retinal pigment epithelium (RPE) 移植は、わずかながら視力回復が得られるという有望な結果が示された。しかし一方で、脊髄損傷に対して Geron 社が行っていた oligodendrocyte progenitor cell (OPC) の移植においては、臨床試験の打ち切りが決定された。これらの治療は中枢神経組織が対象であるが、神経細胞移植ではない。それぞれ網膜色素上皮細胞とオリゴデンドロサイトで、神経細胞をサポートする役割の細胞であり、どこまでの機能回復を望めるかは移植細胞ではなく、神経細胞の状況によって決定される部分が多い。神経細胞そのものの移植も試みられており、動物実験での効果は報告されているが、脊髄再生や脳再生といった中枢神経系の複雑な神経回路網を再形成するのは未だに困難な状況にある。さらに、脊髄損傷では、幹細胞移植治療の有効性が期待できるのはグリア瘢痕の形成に至る前の損傷直後に限られ、中枢神経系の再生戦略においては "windows of opportunity for the treatment" が大きな障壁となっている。

一方、末梢神経系に対する神経再生医療では、中枢神経系のように複雑な情報処理システムを再構築する必要がない。1993年に Erbらが、末梢神経に胎児脊髄神経細胞を移植する実験を行い、移植した神経細胞は末梢でも長期間生存し、脱神経筋と神経筋接合部を形成することを報告した。その後も末梢での神経細胞の生存と軸索伸長を改善させるための研究が少数ではあるが行われてきた。

2. 研究の目的

脊髄前角細胞や軸索損傷後、ワーカー変性を起こした末梢神経内に、運動神経細胞を移植し脱神経筋を神経再支配したものを Motor

Neuron Integrated Striated Muscle / MISM と名付けた。再生した遠位軸索を電気刺激することで、中枢との連続性なしに、骨格筋の運動機能再建が可能になると考えた。本研究の目的は、中枢性神経損傷による機能障害の回復に有用な治療手段としてすでに実用段階にある機能的電気刺激(FES)と、脱神経筋の末梢神経へ運動神経細胞を移植し機能再建した骨格筋 (MISM) とを融合することで、全く新しい麻痺筋に対する機能再建の確立を目指すことである。

3. 研究の方法

8週齢のFischer344 ラットを使用し次の3群を作成した。(1) cell transplantation群、(2) surgical control群、(3) naive control群。Cell transplantation群では成体ラットの坐骨神経を切離し、両端を結紮した。切断一週間後に切断した脛骨神経と腓骨神経の遠位断端神経内に運動神経細胞を移植した。運動神経細胞は、胎生14日目のラット脊髄腹側を採取し、濃度勾配法により運動神経細胞を分離した。移植細胞数は 1×10^6 個とした。surgical control群では、同様に坐骨神経を切離し、培地を投与した。naive control群は手術を行わずに電気生理学的・組織化学的評価のみを行った。

(1) 電気生理学的評価

12週後に3群を吸入麻酔下に評価した。腓腹筋外側頭部のcompound muscle action potential (CMAP)をNeuropack (MEB-5504; 日本光電社製)を用いて測定した。

(2) 坐骨神経切断モデルラット歩行の解析

移植後12週のcell transplantation群に対して行った。stainless steel wire (Bioflex wire AS633: Cooner Wire 社製)を腓骨神経と脛骨神経にシリコンゲルを用いて固定した。頸部背側の皮下より体外に出したwireを電気刺激器により麻酔下に刺激し、足関節の動きを確認した。麻酔覚醒後にビデオによる歩行解析をおこなった。電気刺激の有無で歩容を比較した。足関節の背屈角はYuらの方法を用いた。mid-swing pointでの中足骨頭と足関節、膝関節と足関節のなす角をもちいた。歩行は各々5回行わせてその平均値を用いて評価した。比較のためにnaive control群の足関節背屈角度も同様に評価した。

(3) 組織化学的評価

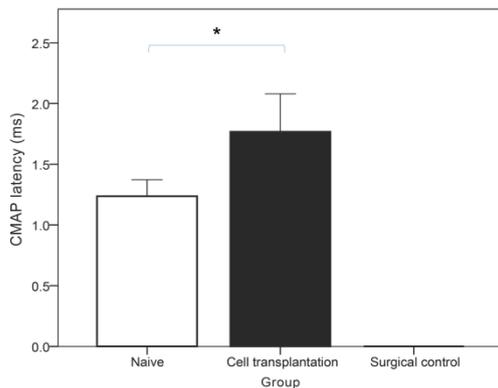
Paraformaldehydeによる灌流固定後、3群の脛骨神経、腓腹筋、前脛骨筋を用いて組織化学的評価をおこなった。脛骨神経の一部はEpon包埋後Toluidine blue染色をおこない、有髄軸索数を3群間で比較した。また、脛骨神経内での運動神経細胞の生存や神経筋接合部の再構築を確認するため、SMI-32 (Covance, Emeryville, CA)、ChAT (Millipore, Billerica, MA)、抗neurofilament H抗体 (Millipore, Billerica, MA)、 α -bungarotoxin (Molecular Probes, Eugene, OR)を用いて免疫組織化学染色をおこなった。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的評価

surgical control群ではCMAPは誘発されなかったが、すべてのcell transplantation群では中枢との軸索の連続性が無いにも関わらず、CMAPが坐骨神経切断後13週の時点で誘発された。しかし、naïve control群と比較すると潜時は優位に延長し、電位は低かった(図1)。

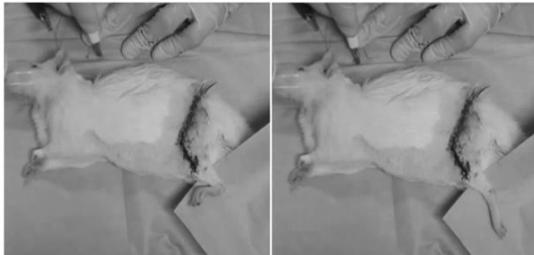
図1



(2) 坐骨神経切断モデルラット歩行の解析

脛骨神経と腓骨神経の神経細胞移植部に電極を留置し、体外より電気刺激を交互におこなうことで、足関節の底背屈といったsimple behaviorを再現することができた(図2)。

図2



さらに、ビデオを用いた歩行解析では、腓骨神経内に移植した運動神経細胞を歩行遊脚期に体外より電気刺激することで、足関節の

有意な背屈改善が得られた(図3、4)。

図3

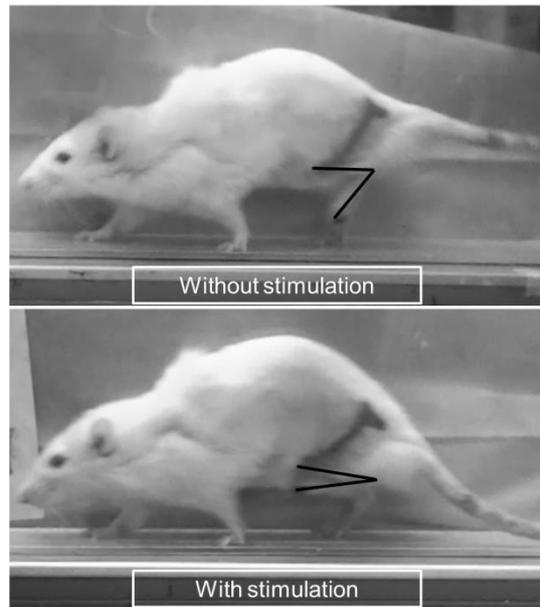
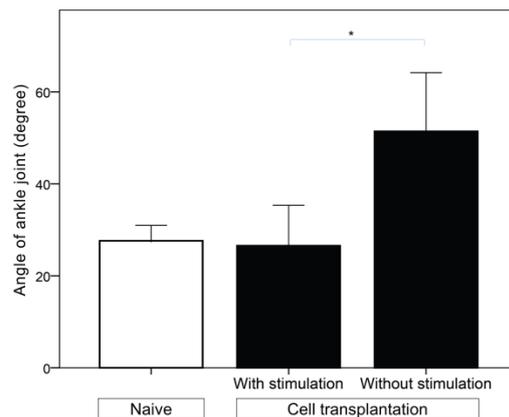


図4



(3) 組織化学的評価

胎児脊髄由来の運動神経細胞は、移植後12週の時点で、末梢神経内で成熟し生存していた。また、有髄軸索を伸ばすことで、筋神経接合部を形成していることを確認した。有髄軸索数はnaïve control群と比較すると半数以下であった。surgical control群では有髄軸索を脛骨神経内に認めなかった(図5、6)。

図5

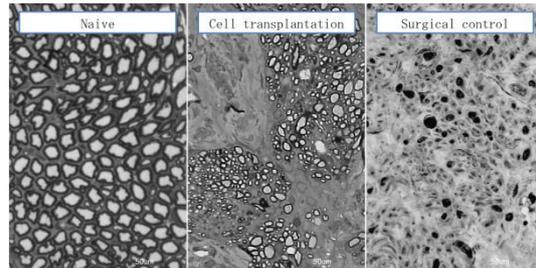
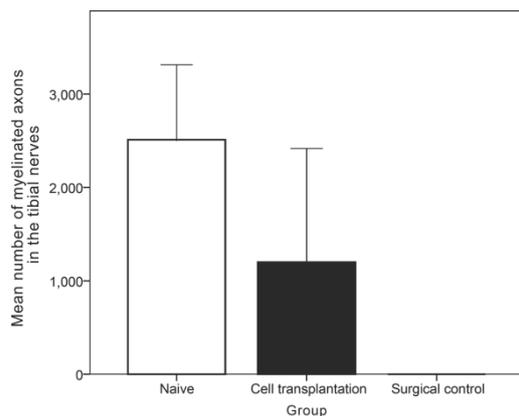


図6



この研究より、末梢神経内でも運動神経細胞は生存し、機能的な筋神経接合部を形成することが分かった。さらに、FES と組み合わせることで、脱神経筋の機能回復が可能となることが動物実験において確認できた。

一般的に骨格筋を支配する末梢神経の運動線維は数百から数千程度であり、少数の運動神経細胞を移植することで十分な機能再建が可能である。また、ワーラー変性をおこした末梢神経と脱神経筋では不可逆な変性に陥るまでの"windows of opportunity for the treatment"が広いという利点がある。上記の理由より、末梢神経内への神経細胞や神経幹細胞移植は、再生医療のターゲットとしては理想的であると考えられる。

近年の先端医用工学の発展により、FES の実用的なシステムが開発されてきている。特に、磁気刺激駆動型電極の開発により、体内埋め込み電極は直径 2 mm、長さ 16 mm と注射可能なサイズまで小型化され、電気刺激を外部よりコントロール可能となっている。しかし従来の FES システムは臨床適用が限られていた。脳血管障害による下垂足歩行の矯正や頸髄損傷による四肢麻痺の手指の把持機能再建では、筋紡錘からの Ia 線維が刺激により興奮しやすいため、痙性の強い患者への使用が難しい。また、下位運動神経細胞を侵す筋萎縮性側索硬化症等の変性疾患や広範な末梢神経損傷では、骨格筋は脱神経され、経時的に骨格筋は不可逆な変性を起こし電気刺激に反応しなくなってゆく。

そこで我々は、すでに実用段階にある FES と MISM とを融合することで、全く新しい麻痺筋に対する機能再建の確立を目指している。現時点で確立されている神経細胞への分化誘導法を組み合わせ、麻痺筋の機能回復を実現できる本法は、ES/iPS 細胞の臨床応用に近い技術開発と考える。さらに、複雑な中枢神経系の影響を受けることがないため、単純な feedback loop を有する open なシステ

ムを局所で構築でき、体外のさまざまなシステム情報と連動させることが可能となる。feedback system を用いることで、姿勢の傾斜角センサや加速度センサからの情報をもとに移植運動神経細胞を刺激し歩行制御をおこなったり、外部の触覚センサと電気刺激を連動させ把持力を制御したりするといった、宿主の情報を感じし連動して働く全く新しい FES システム開発を可能とする。さらに、脳活動の計測用デバイスの小型化・無線化・低侵襲化や信号処理手法の発達に伴い、Brain-Machine Interface の一部として、本システムを用いた随意的な麻痺筋の機能再建も可能となるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

栗本 秀、加藤 宗一、山本 美知郎、篠原 孝明、建部 将広、平田 仁、新しい医療技術：幹細胞移植を用いた麻痺筋の再建、整形・災害外科、査読有、55 巻、2012、pp.895-898

〔学会発表〕(計 9 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. ORS (Orthopaedic Research Society) ANNUAL MEETING. 2013. 1. 26-29. San Antonio, TX, USA.
- ② 栗本 秀. MISM (Motoneuron integrated striated muscle)による運動機能再建. 第 39 回 日本マイクロサージェリー学会 (招待講演). 2012. 12. 6-7. 北九州市.
- ③ 平田 仁, 栗本 秀. 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
- ④ 栗本 秀. 末梢神経内神経細胞移植を用いた麻痺筋の再建. 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.
- ⑤ Kurimot S. Motoneuron Integrated Striated Muscle Restores Motor Function in Denervated Rats. ORS (Orthopaedic Research Society) ANNUAL MEETING. San Francisco, USA. 2012. 2. 4-7
- ⑥ Kato S, Kurimot S. Percutaneous Electrical Stimulation to Motoneuron Integrated Striated Muscles (MISM). ORS (Orthopaedic Research Society) ANNUAL

MEETING. 2012.2.4-7. San Francisco, U.S.A.

- ⑦ 栗本 秀. MISM (Motoneuron integrated striated muscle)による局所筋制御システムの開発. 第26回日本整形外科基礎学術集会. 2011.10.21. 前橋市.
- ⑧ 栗本 秀. Motoneuron integrated striated muscle(MISM)による局所筋制御システムの開発. 第2回名古屋大学医学部・生理学研究所合同シンポジウム 2011.8.20.名古屋.
- ⑨ 栗本 秀. 末梢への神経細胞移植による脱神経筋の再建. 第54回日本手外科学会学術集会. 2011.4.16. 青森.

〔図書〕(計1件)

平田仁, 他, はる書房、暮らしのなかにある最先端医療の姿 人工臓器は、いま 日本人人工臓器学会編、2012、379-394

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗本 秀 (Shigeru Kurimoto)
名古屋大学 医学部附属病院 医員
研究者番号：70597856

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし