

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293335

研究課題名(和文) 不治の病である運動ニューロン疾患に対するiPS細胞による新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of iPS cell based novel treatment technology for currently untreatable motor neuron diseases

研究代表者

平田 仁(Hirata, Hitoshi)

名古屋大学・予防早期医療創成センター・教授

研究者番号：80173243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：運動ニューロン疾患では体全体の骨格筋が徐々に変性し、生活の質を損なうだけでなく、呼吸や嚥下などの生命維持に不可欠な身体システムの機能が侵される。現在、進行を抑制し、患者の身体活動を維持可能な治療法はない。本研究では、運動ニューロン喪失を伴う様々な状態の患者に適用可能なiPS細胞に基づく新しい再生医療技術を開発した。我々は麻痺筋を支配する運動神経内に移植した誘導神経幹細胞が神経発生を経て脊髄に似た異所神経節を形成することを見出した。創発を実現したAI「暗黙の学習」を制御器に採用することで齧歯類モデルでは歩行制御を実現し、ミニブタモデルでは呼吸筋麻痺を治療可能なことが示された。

研究成果の概要(英文)：In motor neuron diseases, skeletal muscles throughout the body gradually degenerates and necroses, thereby not only impaires quality of life but also eventually dysfunctioning body systems indispensable for maintaining life such as respiration and swallowing. Currently there is no cure that suppresses the progression of the condition or maintains patient's physical activity. In this study, we developed a new regenerative medicine technology based on iPS cells applicable to patients with a variety conditions involving motor neuron loss. We found that induced neural stem cells tansplanted into the motor nerves supplying affected muscles go through neurogenesis and form an ectopic neural ganglion resembling spinal cord. By employing "the tacit learning", an AI with emergence capability, as control system, We showed that walking control is realized in rodents and that respiratory muscle paralysis can be treated in miniature swine model.

研究分野：整形外科分野

キーワード：motor neuron disease cell therapy regenerative medicine iPS cell skeletal muscle respiratory system swallowing system physical activity

1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究、とりわけ iPS 細胞を活用する再生医療技術により脳・脊髄損傷あるいは神経変性疾患などの今日でも対応が困難な状況に対する治療技術の開発が国内外各所で試みられるようになっていた。多くの研究は障害された中枢神経組織を幹細胞より誘導した神経幹細胞、あるいはグリア系細胞の幹細胞から誘導した細胞により置換し、神経ネットワークを再構築させることを目指していた。しかし、1000 億個とも推定される極めて多くの神経細胞により構成され、しかも個々の神経細胞がそれぞれ 1000 もの神経細胞と複雑にシナプスを形成してネットワークを構成する中枢神経系において replacement therapy は単に必要な数の神経細胞を再生すれば実現するというものではない。その実現には 1. 巨大で緻密な神経ネットワークを寸分の狂いもなく復旧させる軸索再生制御技術の確立、2. 巨大組織構築時でも安全性を保證できる多能制幹細胞の腫瘍化制御技術の確率、3. 脊髄から四肢末梢に及ぶような生理的限界を超えた長距離での軸索再生限界の延伸技術、など現在においても全く克服の目処が立たない多くの開発課題が存在していた。このため多能性幹細胞を用いて実用的な再生医療技術を実現するためには極少数の iPS 細胞を移植することにより障害された機能が大幅に改善できるような状況を前提に治療技術の開発を目指さなくてはならないと考えた。理化学研究所は加齢黄斑変性症に対する再生医療開発を、京都大学はパーキンソン病に対する再生医療技術開発を、夫々 iPS 細胞により目指していたが、少数細胞による機能代償という観点からは極めて合理的な選択であった。我々は中枢神経障害により齎される広範な麻痺を、麻痺組織内に固有の神経節を誘導し、これを人の脳と連動する人工知能により制御することで機能代償させる技術の開発を目指した。これは昆虫では一般的な分散制御システムをヒトで実現させるバイオミメティックアプローチによる麻痺機能再建技術である。実際にはヒトでも腸管・心臓などでは分散型制御により脳のゆるい支配のもとに独立した神経節による分散制御がなされている。これら器官は同種臓器移植により中枢との神経ネットワークを再構築せず機能できることが実証されており、骨格筋にも独自の神経節を付加すれば同様の状況を実現できる。我々が目指す末梢組織内神経節新生による分散型制御技術は運動のみならず感覚・自律神経機能の異常にも適応可能であり、ほかに類似の技術開発を認めない極めてユニークな麻痺治療技術の開発と位置付けた。

2. 研究の目的

我々は、申請時点までに iPS 細胞から安定的に運動ニューロンへと分化誘導させる技術は確立していた。また、Waller 変性の進行する末梢神経片内では神経幹細胞から運動・感

覚ニューロンや中枢神経型グリア細胞が安定的に分化誘導され、軸索が末梢神経内を伸長して麻痺筋内の神経筋接合部を再支配できることを確認していた。この方法では各筋に 1000 個程度の運動ニューロンを確保できれば機能的電気刺激を活用して MMT3 を十分に超える筋力を意のままに発生させることが可能であった。我々はこの技術を Motoneuron Integrated Striated Muscle (MISM) technology と命名していた。一方、理化学研究所の下田らは脳における知能行動や細胞の分子制御に共通する‘複合制御’のアルゴリズムを理論化し、人工頭脳の基本要件である‘創発’を実現できる人工知能 tacit learning を開発しており、すでにこれを用いた制御により歩行を自動学習できるヒューマノイドロボットを実現していた。そこで、これら二つの技術を融合して麻痺筋を再生させ、生体のホメオスタシス維持機構に自然に連動し、運動ニューロン疾患患者の呼吸・嚥下といった生命維持の根幹に関わる障害を治療可能な技術確立することを目指した。

3. 研究の方法

本研究で目指す運動ニューロン疾患治療技術の確立に必要な次の 3 要素に関して夫々研究開発を行い最終年にそれらを統合した大型動物での実証試験を実施した。

(1) MISM technology による神経新生機序の詳細な解明と長期安定性の確認

シナプスを介した神経ネットワークが構築され、長期間安定的に維持される真の neurogenesis は人を含む哺乳類では脳の海馬と側脳室下層でのみ、しかも極僅かに観察される現象である。MISM technology では神経新生が大規模にしかも中枢神経外で観察されたが、これが真の神経新生であることを実証するには神経組織構築過程の詳細と、長期安定性を実証する必要がある。

(2) 制御用人工知能 tacit learning の開発

制御用人工知能 tacit learning は歩行アルゴリズムの自動学習という比較的単純な動作制御を対象に実証されてきた。しかし、生体内では遥かに複雑で突発的な変化を伴う動作への対応が可能なものへと進化させる必要がある。そこで、歩行よりも遥かに運動制御アルゴリズムが複雑な上肢の運動制御へも対応可能なものへと tacit learning をバージョンアップさせ、人を対象とする試験によりその有用性を実証する。

(3) ヒト iPS 細胞の導入と、大型動物での実証試験

従来 MISM technology はマウス ES 細胞、およびラット胎児神経幹細胞を用いて研究を実施してきた。しかし、人への応用には京都大学 CiRA にて樹立され、安全性を保證されたヒト iPS 細胞株を用いた実証試験が不可欠であり、かつ、大型動物における有用性を確認する必要がある。慶應大学で岡野英之教授とともにヒト iPS 細胞を用いた脊髄損傷患者

の治療技術開発を行い、とりわけ iPS 細胞から運動ニューロンをはじめとする各種神経細胞への分化誘導技術の開発を手がけてきた愛知医科大学神経内科岡田洋平准教授に技術指導をいただきヒト iPS 細胞を用いた MISM technology をげっ歯類で実現し、その上でミニブタの横隔膜神経に対して異所性神経節誘導を行い、これを FES により制御する呼吸ペースメーカーの実現を目指した。制御用 tacit learning の開発も並行して実施した。

4. 研究成果

(1) MISM technology による神経新生機序の詳細な解明と長期安定性の確認(平田、栗本、山本、鳥橋)

ラット胎児由来脊髄幹細胞と、マウス iPS 細胞、ヒト iPS 細胞を用いてげっ歯類による末梢神経内神経新生のメカニズムを詳細に解析した。実験には蛍光タンパク質融合ルジフェラーゼ fLUC 遺伝子を導入したヒト iPS 細胞を新たに樹立し、IVIS を用いて神経節誘導過程を詳細に観察し、また、ラット胎児神経幹細胞を GFP 遺伝子導入ラット末梢神経内に移植することで神経幹細胞の文化誘導過程を詳細に観察した。その結果、移植細胞の大半がアストロサイト、オリゴデンドロサイトを含むグリア系細胞へと分化しており、運動ニューロンはレシピエントの幹細胞に由来していること、神経節は3次元構造解析より脊髄に極めて近似した構造を取っており、周辺のシュワン管へと再生軸索を送っていること、神経節内では介在ニューロンも多く含まれ、神経細胞は密なシナプス形成を介して他の神経細胞とネットワークを形成していること、を明らかにした。また、従来 MISM 技術は in vivo 環境で開発されてきたが、ex vivo 環境でも成立し、同様の神経節構造を誘導できること、ex vivo で製造した神経節組織は in vivo 環境に移植しても生着し、末梢組織を神経支配できること、げっ歯類では神経節構造は移植後1年を経過しても構造と機能を維持していること、を明らかにした。また、従来 MISM 技術は運動ニューロンを対象に開発を進めて来たが各種感覚神経へと分化誘導された際には末梢の感覚受容器や筋紡錘の神経再支配をできることも明らかとなり、sensory motor integration に必要となる神経ループを異所性神経節内で構成可能なことも明らかにした。現在これらの成果を論文投稿中である。以上の結果は MISM construct を必要に応じて大量に製造しておき、機能再建を必要とする患者に対して何らの遅延も必要とせず、必要な部位に異所性神経節形成を誘導し、MISM technology により機能回復を誘導できることを示していた。

(2) 制御用人工知能 tacit learning の開発(平田、岩月、下田、大日方)

上肢、とりわけ手による物体のマニピレーションではリーチングの段階から歩行と比較

して3次元空間内ではるかに多様な運動パターンが存在し、その選択も反射ではなく、ユーザーの意図が大きく反映されるもので、人工知能による運動制御の複雑さは遥かに高い。上肢制御には名称分類だけでも40を超える筋が存在し、これらが複雑にシナジーすることでユーザーの意図する運動が構成されており、機能再建においては残存部分の動作と整合する運動制御をどのように再建部分で実現するかが最も大きな課題となっている。それ故上肢部分切断患者用多機能能動義手は正に我々が tacit learning と呼ぶ、人工知能による患者の脳と協調できる動作制御プログラムの技術開発にはうってつけの研究対象である。我々は tacit learning の実証モデルとして前腕切断患者用多機能能動義手を独自に開発し、倫理委員会の承認を得て9名の前腕切断患者に対して tacit learning の実証試験を実施した。その結果、tacit learning は筋電信号によるハンドユニットでの把持動作制御と整合したリーチング動作制御を1時間程度で自動学習し、患者は多様な状況でのリーチング動作制御を違和感なく実施可能となることを実証した。これら患者を対象に脳磁計、NIRS による脳のネットワーク解析を実施し、tacit learning により制御される前腕義手を用いることで患者脳では上肢運動制御に關与する脳領域間での connectivity の有為な増強が短時間に誘導されていることも明らかにした。以上の結果は tacit learning で用いられている学習アルゴリズムが患者脳による身体制御と自動的に同調できる motion learning を実現できる点で極めてすぐれた AI システムであること有力な根拠を与えた。現在 AI では deep learning に代表される統計分析に基づく機械学習をベースに開発が進み、自動運転技術などの実用化が目指されているが、big data の存在を前提に教師あり学習をするもので求められる運動が明確に予測できる際には極めてうまく機能する。しかし、自然環境では未体験な事態、予測困難な状況が頻繁に発生し、これらに柔軟に対処することが求められる。big data も活用できず、教師信号も存在しない状況での motion learning が tacit learning の最も目指すところである。一方で、日常生活の多くの場面では deep learning による動作制御を適用できる機会も少なくない。現在下田は東北大学の林部と連携してこの二つの AI 技術を並列で活用する新たな AI 技術開発に取り組んでいる。これは人の脳が古皮質・小脳を中心にした動作制御により小さなエラー修正には adaptation を、より大きなエラーには motion learning を介して動作の修正を逐次的に実施している状況と酷似した運動制御技術を目指すもので究極の動作制御 AI 技術になると考えている。

(3) ヒト iPS 細胞の導入と、大型動物での実証試験(平田、鳥橋、山本)

実証試験は愛知医科大学の岡田洋平准教授に支援を受けて実施した。げっ歯類モデルはマウスとラットの2種類で実施し、いずれも坐骨神経切断モデルを作成し、ffLucを導入したマウス ES 細胞により胎児脊髄由来神経幹細胞移植により末梢神経内に誘導された脊髄様構造を有する異所性神経節が形成され、さらに麻痺筋を再支配できることを組織学的、電気生理学的に確認した。次に愛知医科大学よりヒト iPS 細胞 (201B7) の提供を受け、これに ffLuc を遺伝子導入した上で NOD/SCID mouse と Nude rat をレシピエントとして同様の実験を行い、In vivo bioluminescent imaging にて移植細胞の動態を経時的に追跡をし、また、異所性神経節形成と麻痺筋際支配の状況を組織学的、電気整理的に確認した。また、SD ラットを用いて免疫抑制療法下での実験でも同様の結果が得られることを確認した。

以上のげっ歯類での成果を踏まえて 12 週齢 NBS mini pig を用いて横隔膜神経切断モデルを作成し、FK506, MMF, ステロイドの3者による免疫抑制下に横隔膜神経内にヒト iPS-ffLuc 細胞を移植する実験を開始した。はじめに3頭を用いて免疫抑制療法の最適化と細胞移植手技を確立した上で、呼吸ペーシングを目的とする in vivo study を開始した。現在1ヶ月モデルの解析のみが完了している状況であり、神経節構造の形成と再生軸索の存在を確認したが、機能回復に至るにはさらに2ヶ月程度の観察が必要な段階である。科学研究費補助金による支援は終了したが、引き続き in vivo model での実証試験を継続する予定である。

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)

全て査読あり

[雑誌論文](計 13 件)

Oyama S, Shimoda S, Alnajjar F, Iwatsuki K, Hoshiyama M, Tanaka H, Hirata H.

Front.Neurorobot/Biomechanical Reconstruction Using the Tacit Learning System: Intuitive Control of Prosthetic Hand Rotation.Vol.10 p19 November,2016

Kurimoto S, Kato S, Nakano T, Yamamoto M, Takanobu N, Hirata H. J Tissue Eng Regen Med /Transplantation of embryonic motor neurons into peripheral nerve combined with functional electrical stimulation restores functional muscle activity in the rat sciatic nerve transection model.Vol.10(10) E477-E484 October, 2016

Urano H, Iwatsuki K, Yamamoto M, Ohnisi T, Kurimoto S, Endo N, Hirata H. PLoS One/Novel Anti-Adhesive CMC-PE Hydrogel Significantly Enhanced Morphological and Physiological Recovery after Surgical Decompression in an Animal Model of Entrapment Neuropathy.Vol.11(10) doi: 10.1371/journal.pone.0164572. eCollection October,2016

Kurahashi T, Iwatsuki K, Onishi T, Arai T, Teranishi K, Hirata H. J Biomed Opt/Near-infrared indocyanine dye permits real-time characterization of both venous and lymphatic circulation.Vol.21(8)doi:10.1117/1.JBO.21.8.086009 August ,2016

Iwatsuki K, Yoshida A, Shinohara T, Nakano T, Uemura J, Goto S, Hirayama M, Hoshiyama M, Hirata H. Clin Neurophysiol/Recovery function of somatosensory evoked brain response in patients with carpal tunnel syndrome: A magnetoencephalographic study.Vol.127(8)2733-2738 August ,2016

Tatebe M, Iwatsuki K, Hirata H, Oguchi T, Tanaka K, Urata S. Bone Joint J /Effects of depression and inflammatory factors on chronic conditions of the wrist.Vol. 98-B(7) 961-968 July,2016

Yamamoto M, Murakami Y, Iwatsuki K, Kurimoto S, Hirata H. BMC Musculoskelet Disord/Feasibility of four-dimensional preoperative simulation for elbow debridement arthroplasty.Vol.17doi:10.1186/s12891-016-0996-9.April,2016

Maroukis BL, Shauver MJ, Nishizuka T, Hirata H, Chung KC. Injury/Cross-cultural variation in preference for replantation or revision amputation: Societal and surgeon views.Vol. 7(4) 818-823 April,2016

Shauver MJ, Nishizuka T, Hirata H, Chung KC. Plast Reconstr Surg/Traumatic Finger Amputation Treatment Preference among Hand Surgeons in the United States and Japan.Vol. 37(4) 1193-1202 April,2016

Nishizuka T, Shauver MJ, Zhong L, Chung KC, Hirata H. J Hand Surg Am /A Comparative Study of Attitudes Regarding Digit Replantation in the United States and Japan.Vol. 40(8) 1646-1656 August,2015

Hara T, Nishizuka T, Yamamoto M, Iwatsuki K, Natsume T, Hirata H. Injury/ Teletriage for patients with traumatic finger injury directing emergency medical transportation services to appropriate hospitals: A pilot project in Nagoya City, Japan.Vol. 46(7) 1349-1353 July,2015

Kurimoto S, Jung J, Tapadia M, Lengfeld J, Agalliu D, Waterman M, Mozaffar T, Gupta R. Neuroscience /Activation of the Wnt/ β -catenin signaling cascade after traumatic nerve injury. Vol.294 101-108 May, 2015

Kato S, Kurimoto S, Nakano T, Yoneda H, Ishii H, Mita-Sugiura S, Hirata H. Nagoya J Med Sci/Successful transplantation of motoneurons into the peripheral nerve depends on the number of transplanted cells/253-263 February,2015

[学会発表](計 9件)

Shinkai H, Kurimoto S, Hirata H. Reconstruction of Denervated Muscles Using Motor Neurons Derived from Mouse ES Cells/Annual meeting of Orthopaedic Research Society/San Diego (USA) Sep 19-22, 2017

Kurimoto S, Nakano T, Shinkai H, Niwa S, Tatebe M, Hirata H. Transplanted Neurons in Peripheral Nerve Provide a Novel Treatment Strategy for Paralyzed Muscles/Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand /Austin (USA) September 29-October 1, 2016

Yamamoto M, Natsume T, Nishizuka T, Iwatsuki K, Kurimoto S, Hirata H. Benign hand tumors have a clear

indication for surgery according to the patient-rated outcome measures/Federation of European Societies for Surgery of the Hand/Santander(UK)June 22-25, 2016

Kurimoto S, Yamamoto M, Niwa Y, Yoneda H, Tatebe M, Hirata H. Reliability of a Illustrated Self-Administered Questionnaire for Upper Extremity Disorders in the Elderly/Federation of European Societies for Surgery of the Hand /Santander (UK) June 22-25, 2016

Kurimoto S, Yamamoto M, Murakami Y, Iwatsuki K, Hirata H. Feasibility of four-dimensional preoperative simulation for elbow debridement arthroplasty/Asia Pacific Orthopaedic association congress /Melbourne (Australia)March 29-April 1,2016

Kurimoto S, Yamamoto M, Yukimi M, Iwatsuki I, Hirata H. Feasibility of four-dimensional preoperative simulation for elbow debridement arthroplasty/Asia Pacific Orthopaedic Association Congress /Melbourne (Australia)March 30, 2016

Shinkai H, Kurimoto S, Hirata H. Reconstruction of Denervated Muscles Using Motor Neurons Derived from Mouse ES Cells/Annual Meeting of Orthopaedic Research Society /San Diego (USA)March 19 – 22, 2016

Iwatsuki K, Houshiyama M, Yoshida A, Shinkai T, Hirata H. Somatosensory evoked responses by the median nerve stimulation for carpal tunnel syndrome/ Orthopaedic Research Society Annual Meeting / Orlando (USA)March 5-8, 2016

Kurimoto S, Nakano T, Nishizuka T, Iwatsuki K, Yamamoto M, Hirata H. Patient-friendly questionnaire using touch-screen computers for upper extremity disorders: comparison with standardized paper questionnaires/ Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand /Seattle (USA) Sep 10-12 2015

[産業財産権]

出願状況(計 1件)
名称: 被服、解析装置および被験者の関節回

動角を計測する方法

発明者：平田仁、下田真吾、岩月克之、山田整、大野健介、鈴木陽久、吉田統
権利者：国立大学法人名古屋大学、独立行政法人理化学研究所、トヨタ自動車株式会社、株式会社榎屋
種類：特許
番号：特開 2017-249306
出願年月日：平成 29 年 12 月 26 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 1 件）
名称：義肢及び義手

発明者：平田仁、下田真吾、岩月克之、大山慎太郎、宮川拓也、山本貴史
権利者：国立大学法人名古屋大学、独立行政法人理化学研究所、トヨタ自動車株式会社
種類：特許
番号：特許第 6315543 号
出願年月日：平成 30 年 4 月 6 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 仁 (Hirata, Hitoshi)

(名古屋大学・予防早期医療創成センター・教授)

研究者番号：80173243

(2) 研究分担者

下田 真吾 (SHIMODA, Shingo)

(国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・連携ユニットリーダー)

研究者番号：20415186

(3) 研究分担者

栗本 秀 (KURIMOTO, Shigeru)

(名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師)

研究者番号：70597856

(4) 研究分担者

山本 美知郎 (YAMAMOTO, Michiro)

(名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師)

研究者番号：90528829

(5) 研究分担者

岩月 克之 (IWATSUKI, Katsuyuki)

(名古屋大学・医学部附属病院・講師)

研究者番号：90635567