

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10310

研究課題名(和文) 神経活動依存的可塑性誘導・再教育を可能にする渦電流収束磁気刺激システムの開発研究

研究課題名(英文) Neuromodulation device for neuronal regeneration

研究代表者

藤木 稔 (Fujiki, Minoru)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90231563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：BDNF発現の条件は神経活動性依存性であること、発現は一過性でかつ神経損傷や痙攣発作は伴わないこと、安全性の確立された抗胃潰瘍薬などにも同様の神経保護効果を有すること、この神経保護効果はphosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathwayを介することを明らかにした。ニューロモデュレーションは脳神経機能再建の新機軸として、これら脳の可塑性に作用する因子誘導が鍵である。すでに非侵襲的遺伝子発現可能な装置を民間企業・他施設と共同で独自デザイン・開発中であり、医工連携の先進医療への足がかりとしての基礎研究は充分行ってきた。

研究成果の概要(英文)：We estimated Brain derived neurotrophic factor(BDNF), Vascular endothelial growth factor(VEGF) expression for neuronal recovery after stroke and spinal cord neuronal functional recovery according with neuronal plasticity. Future developments with technological advantages are necessary.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経保護効果 脳虚血耐性 脊髄損傷 皮質脊髄路 機能再建 脳の非侵襲的的刺激 磁気刺激 医工連携

1. 研究開始当初の背景

当研究室は、脳<sup>1</sup>の非侵襲的<sup>2</sup>刺激を先行させると、非致死<sup>3</sup>的虚血同様に脳虚血耐性を獲得<sup>4</sup>することを見いだした。すなわち、非虚血性の preconditioning による脳虚血耐性獲得の背景を検索することで虚血から「脳を守る」key<sup>5</sup>を見だし、さらには脳虚血の治療応用へと発展させようとするものである。

2. 研究の目的

脳保護・可塑性誘導に有効な遺伝子が発現する条件と同一の刺激条件が、臨床<sup>6</sup>上も同様な脳<sup>7</sup>の再教育<sup>8</sup>効果を有する<sup>9</sup>か否かを当研究室で行ってきた神経生理学的<sup>10</sup>手法で評価・解析する。

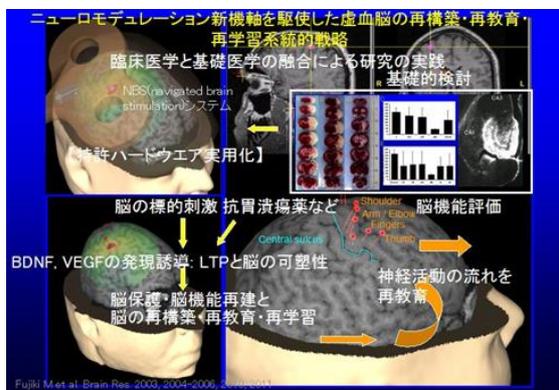


図1 概念図

3. 研究の方法

全脳虚血・脳梗塞動物・脊髓半切断モデルを対象に、虚血脳保護・可塑性誘導に最も有効な高頻度磁気刺激 preconditioning のパラメータと、その背景に発現される遺伝子を検索する。8-9 週齢の砂ネズミをフローゼン麻酔下で両側総頸動脈を一過性に閉塞する。神経細胞の活動性亢進のための conditioning には経頭蓋磁気または電気刺激を用いる。刺激条件：周波数(5, 10, 25, 50, 100, 500Hz), 持続時間(8, 16, 32, 64, 128, 256 秒)及び刺激-虚血間隔の組み合わせ(.25, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 120 時間)を変化させ、sham コントロール(I)、5分間虚血群(II)、磁気・電気刺激先行群(III)、虚血後磁気・電気刺激群(IV) (間隔1~48時間)の4群(各n=10)を作成。総頸動脈再開通後7日目にそれぞれ各群ごとに組織学的検索、分子生物学的検索、行動・電気生理学的検索を行う。中大脳動脈結紮によるラット脳梗塞モデル・脊髓半切断モデルについても同様の検索を行う。

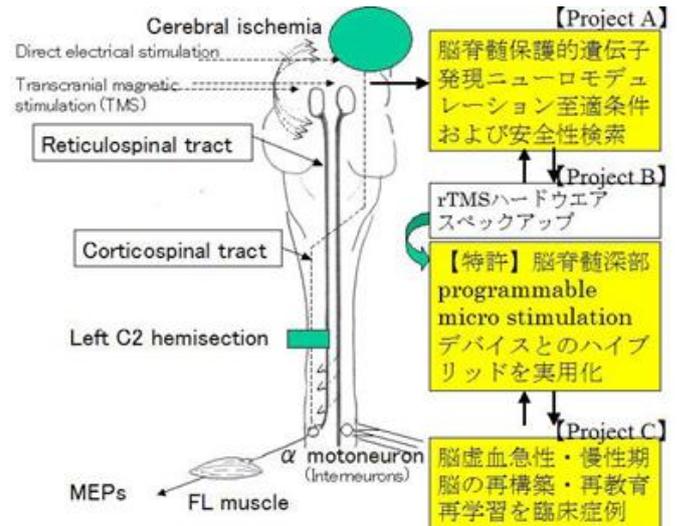


図2 Fujiki M. et al. Immediate plasticity in the motor pathways after spinal cord hemisection: implications for transcranial magnetic motor-evoked potentials. Exp Neurol. 2017 Jun;187(2):468-77. を改変

組織学的検索： 組織学的検索として HE; 海馬 CA1 領域神経細胞密度, TUNEL 陽性細胞, VEGF, c-fos, P53 などの遺伝子発現, GFAP(reactive astrocyte), Mac-1 染色 (macrophages/ microglia), HSP70, 72, 27, TGF- $\beta$  1, NGF, BDNF, NT-3 の免疫組織化学染色、BDNF を最重要因子と考え一部 in situ hybridization を行う。Bodian staining で組織損傷を評価する。

分子生物学的検索： I~IVの各群について発現の変化する遺伝子を Differential Display 法や一度に多数の既存 mRNA の変化を観察できる Atlas cDNA Expression Array を用いて検索する。さらに、虚血早期から新たに発現する mRNA の代表的なものサブクローニング後塩基配列を決定、Homology 検索の結果に基づき、虚血、刺激、刺激+虚血・神経損傷によって新規に発現した mRNA を同定する。

行動・電気生理学的検索： 脳保護的神経栄養因子のタンパク・遺伝子 mRNA 発現に加え、行動学的・電気生理学的評価 ( Beam walking score + MEPs ) で評価する。

#### 4. 研究成果

基礎・工学的実験データから、脳保護的に作用し運動機能再建に最も有効な遺伝子が発現する刺激条件で臨床効果検討した。現在総パルス数を同一にし、この刺激を一日3-4回に分けて刺激する群、2週間連続刺激する群を検討中である。

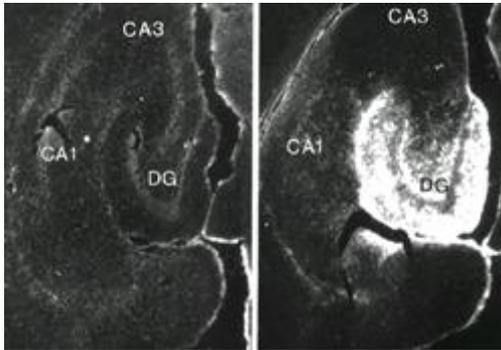


図3 非侵襲的遺伝子発現の実験的検討  
動物レベルで神経保護的遺伝子 BDNF や GFAP を発現できた。

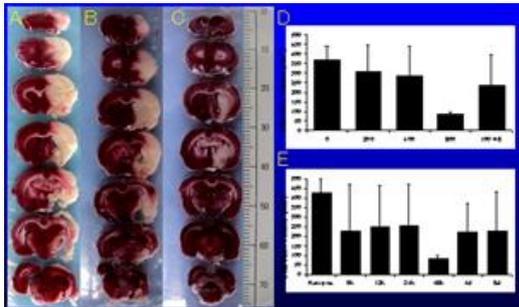


図4 非侵襲的脳刺激先行による脳虚血耐性獲得

基礎実験のレベルでは、iPS 細胞や損傷部位へ人工的に塗布した神経成長因子が損傷部位の再生のみならず、損傷から離れた部位の大脳神経細胞死をも抑制する事が報告されている。これらはいずれも、神経損傷で発現する遺伝子を外部から、移植などの方法で供給することによるもので、方法の侵襲性、倫理的な問題や、移植片の分泌機能維持が持続的にできないなどの技術的な問題がある。われわれはこれまで、これと同様の効果を非侵襲的に、しかも自己の損傷を免れた神経細胞、microglia, astrocyte を高頻度磁気刺激により修飾することで供給できる可能性を検討してきた。神経損傷の後、神経組織の再生を

促す遺伝子 (NGFmRNA, BDNFmRNA) 発現を非侵襲的に、しかも持続的に自己の組織で修飾できれば、損傷部位の再構築のみならず、大脳の神経細胞死も同様に阻止でき、副作用なく良好な運動機能予後を期待できる。

本研究のように非侵襲的的刺激による遺伝子発現を脳保護・可塑性誘導と脳の再教育に応用した基礎・臨床的研究は全く行われておらず、非常に独創的であり、臨床医学に密接した極めて重要な結果の提供を確信する。

本研究は非侵襲的磁気・電気刺激法により発現した遺伝子の脳保護・治療効果に焦点を当てた基礎医学・工学的研究、並びにその結果を踏まえた臨床研究を遂行するものである。脳虚血・脊髄損傷後の行動学的評価、電気生理学的手法 (MEP) を用いた客観的評価、各種免疫組織化学的・分子生物学的手法による評価の方法論は基礎・臨床医学ともに当研究室で充分完成されている。また、工学的研究・磁気刺激装置ハードウェアのスペックアップ、局所神経活動性賦活可能な programmable micro stimulation デバイスの開発は、これまで長年にわたり共同研究をもに行ってきた共同研究者とともに医工連携に万全のチームワークを形成している。1999 年以来、University of California, Irvine, Reeve-Irvine Research Center の Oswald Steward と脊髄損傷・神経損傷の基礎分野の議論を重ねてきた。さらに 2003 年から生体磁気医工学領域の世界的権威、University of Helsinki, Biomag laboratory・Nexstim の Risto Ilmoniemi とも詳細な討論・共同研究を展開中である)。このように、本研究は基礎医学的事実を医用工学へと還元し、さらにその結果を再度基礎医学へと feedback することで、より強固な evidence を形成し、臨床医学への還元を直ちに実行可能にするものである。

#### 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/neurosurgery/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤木 稔 (FUJIKI, Minoru)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90231563

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：