

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21059

研究課題名(和文)遊離神経片内motoneuron移植によるfree-design筋移植術の実現

研究課題名(英文)Free-designed muscle reconstruction by motoneuron transplantation in a free nerve graft

研究代表者

中野 智則 (NAKANO, TOMONORI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70738369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遊離神経片を移植細胞のcarrierとして使用し、脱神経筋を再建する技術を確立した。遊離神経片内に移植された胎児脊髄前角細胞は、Waller変性に陥った末梢神経を至適環境として中枢神経系細胞から成る脊髄類似環境を構築した。組織学的評価と運動機能評価では、遊離神経片は任意の位置に設置可能な異所性神経節として脱神経筋の新たな支配神経となっており、電気刺激によって良好な筋収縮も認められた。歩行パターンの解析には至らなかったが、刺激電極や非接触刺激用コイルの開発を始めた結果、臨床を視野に入れた大型動物での実験に向けた基盤となり、骨格筋麻痺に対する再生医療の道を示す技術を開発することができた。

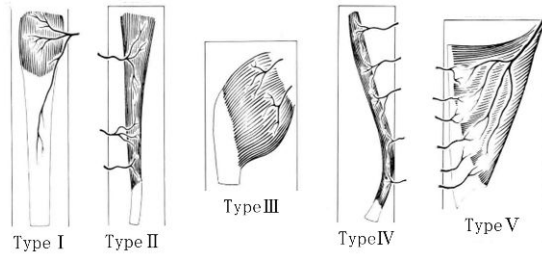
研究成果の概要(英文)：We established a technique to reconstruct the denervated muscle using free nerve graft as a carrier of transplanted cells. Embryonic ventral spinal cord cells were transplanted into free nerve graft and they constructed spinal cord-like structure consisting of central nervous system cells. In the histological and functional evaluation, the free nerve graft became an ectopic neural ganglion and reinnervated the denervated muscle as a new dominant nerve. Muscle contraction was also recognized by electrical stimulation. Moreover, we have been developing the stimulation electrode and coil for the non-contact stimulation. So, we could develop new technology contributing to regenerative medicine for paralyzed muscles.

研究分野：末梢神経

キーワード：末梢神経 運動機能再建 神経幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

(1)骨格筋の神経支配と筋移植術の現状  
運動機能再建法として筋移植術は有効な手段である。1981年にMathesらが報告したように、骨格筋は血行によってType分けすることが出来る(下図)。



現在、臨床的に筋移植術に用いられるのはType IIとIIIで、それは1つの血行によって筋全体の血流が確保されるからである。一方、複数の血行がある筋では血行動態的には区域毎に分割しても筋は生存可能だが、筋の支配神経は通常単一であるために筋を分割して制御することは出来ず、定型的な手法から脱却した自由な発想による筋移植術は実現されていない。必要な数の支配神経を任意に設置することによって、支配神経の存在による制約から解放され、donorとなる筋の選択や再建法の自由度は飛躍的に向上する。

(2)運動神経細胞移植による末梢レベルでの脱神経筋の再建

ES細胞やiPS細胞による神経領域再生医療での当初の適応疾患は脊髄損傷であった。しかし、移植有効期間がグリア瘢痕形成前までと短い上に、中枢神経系の複雑なネットワークの再構築には膨大な移植細胞が必要で、未分化細胞の混入による腫瘍化の問題もあり成功には至っていない。一方、末梢神経レベルでの神経再生医療では、筋萎縮に至るまでのtime windowが広い上に必要移植細胞数も少なく、機能回復の効果判定も容易である。1993年にErbらが報告したように、我々も、ラット坐骨神経切断モデルにおいて本来の支配神経内に胎児ラット由来のmotoneuronを移植すると、生着した1000程度の有髄神経によって脱神経筋は再支配され、小さな電気刺激によってMMT3以上となる機能的な筋収縮を獲得出来ることを確認している。さらに、脱神経筋筋腹へ遊離末梢神経片を移植し、その神経片内にmotoneuronを移植したモデルでも、無数の軸索が縫合部を越えて筋肉内へ入り、アセチルコリンレセプターに達して新たな神経筋接合部を形成することを確認した。これは、骨格筋に設置した遊離末梢神経片がmotoneuron移植によって新たな支配神経として機能することを示している。

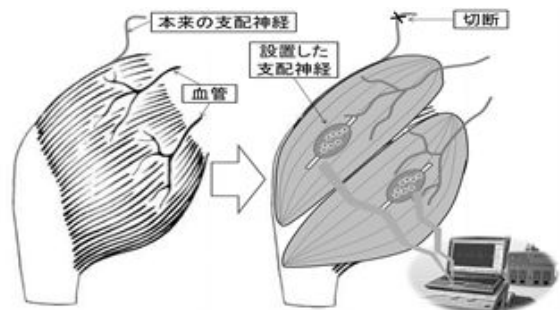
(3)Tacit Learningを取り入れた機能的電気刺激(FES)による筋制御

既に臨床でも実用化されているFESは体外からのコントロールが可能なまでに小型化が進んでいる。中枢から切り離された脱神経筋

では筋萎縮が進行し電気刺激に反応しなくなってしまうが、支配神経を再建しFESと融合させることによってmotor unitが再建される。中枢の支配下でない末梢レベルのmotor unitを制御するにはプログラムが必要であり、従来のロボット技術ではあらかじめ規定されたプログラムで動きを制御していた。一方、生体の状況は随時変化しており、それに応じてプログラムを修正し続ける必要がある。しかし、実際には我々の随意運動は数多くの無意識な運動で成り立っており、同じ動作を繰り返すことによって、脳は体の各所から取得した情報を複合的に判断して全身の行動を制御する運動制御プログラムを意識の外で“感覚”として獲得している。このような生物制御の原理に基づく学習法をTacit Learningという。これは反復動作に基づく自己学習によって無駄を省き最適な行動に収束させていくAI(artificial intelligence)の一つとなる制御プログラムである。下田真吾氏(理化学研究所 自律行動制御連携ユニット)は既にTacit Learningを用いたヒューマノイドロボットの二足歩行動作の獲得に成功しており、さらに我々と共同開発した電動義手は臨床試験の段階に入っている。今回の研究においても、健側や周辺の正常筋肉の動きから状況を的確に判断し、最適な電気刺激によって中枢から切り離された末梢レベルのmotor unitを制御するため、Tacit Learningを用いた自己学習型運動制御プログラムを開発する。

2. 研究の目的

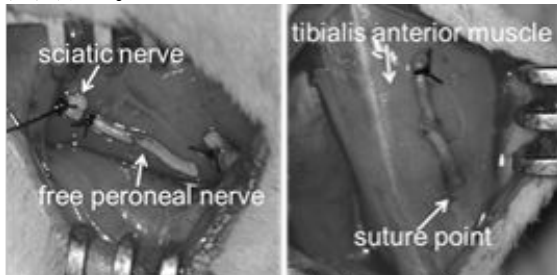
我々はこれまでに脱神経筋の末梢支配神経内にmotoneuronを移植することで神経再支配し、電気刺激によって筋を収縮させる末梢レベルでの機能再建法を確立し、motoneuron integrated striated muscle(MISM)と命名した。本研究ではmotoneuronが移植遊離末梢神経片内にも生着可能で新たな支配神経として脱神経筋を再支配できることを実証し、これにより骨格筋を自由な形状とサイズにカスタマイズして血管柄付き移植を行うfree-design functional muscle graftが可能であることを示す。この技術の確立により骨格筋の解剖学的・生理学的特性に影響されることのない自由な運動機能再建が可能となり、機能再建外科の可能性を飛躍的に拡大させることができる。



### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物モデル

近交系ラットである F344/NS1c をドナー・レシipientとして使用する。7.5 週齢雄ラットの大腿レベルで坐骨神経と脛腓骨神経をそれぞれ結紮・切断して脱神経筋モデルを作成し、10mm 長の腓骨神経を遊離末梢神経片として採取して前脛骨筋の遠位 1/3 に縫合する（文末図）。1 週後、胎生 14 日の胎児ラットから脊髄前角細胞を採取し、分散させた後に培養液中で  $1 \times 10^6$  cells/10 $\mu$ l の濃度に調整する。移植側の遊離神経片内に 30G 針をつけたシリンジを用いて  $1 \times 10^6$  cells (10 $\mu$ l) の細胞を移植し、対象側は培養液のみを 10 $\mu$ l 注入する。



#### (2) 運動機能評価

移植 3 ヶ月後、ラットの両下腿で電気刺激による筋収縮の評価を行う。遊離神経片を露出させ、筋への直接刺激を防ぎながら 60Hz、100ms の矩形波で神経片を刺激し、刺激強度を変化させて、筋収縮を動画撮影した後に足関節角度を解析・評価する。

#### (3) 組織評価

移植から 3 ヶ月後までの神経片、前脛骨筋を主に免疫染色によって、移植部での構造変化と筋線維内の神経筋接合部の形成を蛍光顕微鏡で観察する。経時的に採取する。筋湿重量を測定し、パラフィン包埋、凍結包埋、EPON 包埋をそれぞれ適宜利用して組織切片を作成する。電子顕微鏡を用いて、移植部での構造を詳細に評価した。免疫染色の抗体として、神経系カクテル抗体 FluoroPan neuronal marker、-bungarotoxin、Neural 3-color immunocytochemistry kit、抗 synaptophysin 抗体、抗 Iba1 抗体、抗 nestin 抗体、抗 doublecortin 抗体、抗 S100 抗体を使用する。

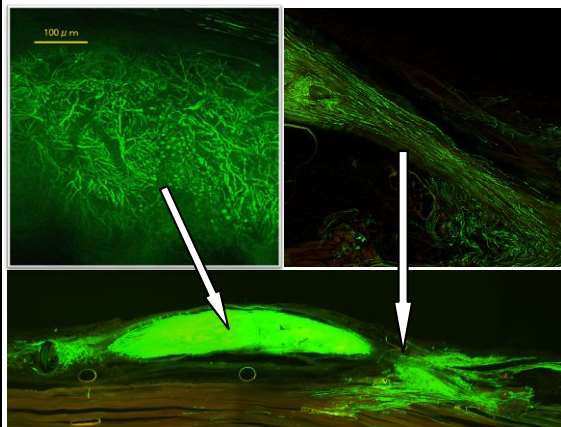
#### (4) 膝屈曲角度と歩行周期の関係の解析

先行研究では、motoneuron 移植によって脱神経筋が神経再支配され、電気刺激により歩行時の前脛骨筋が機能的に収縮することを確認している。刺激のタイミングを制御するプログラムを作成するために歩行解析を行う。正常ラット膝関節に曲がり具合に応じて抵抗が変化する“曲げセンサ”を設置し、歩行時の膝屈曲角度をモニタリングすると共に、膝屈曲角度に対応した足関節の運動パターンを解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) 遊離神経片内の経時的変化

坐骨神経切断後 1 週(移植前)、移植後 1 週、2 週、4 週、3 ヶ月の各時点の評価した。切断後 1 週の Waller 変性を生じた神経内では神経前駆細胞マーカーである nestin が全体に陽性となっていた。正常末梢神経では nestin の発現は見られず、Schwann 細胞の脱分化を示していると考えられた。移植 1 週間後には nestin に加えて未成熟神経細胞マーカーである doublecortin が遊離神経内の中央付近で陽性になっていた。成熟神経細胞マーカーである FluoroPan も陽性になっていたが、細胞体は不明瞭で doublecortin と FluoroPan の一部で共陽性となっていた。移植 2 週間後には nestin の発現が弱くなっており、doublecortin はほぼ消失していた。代わって、FluoroPan 陽性領域は長軸・短軸方向ともに拡大しており、神経細胞の分化と軸索伸長を反映していると考えられたが、細胞体は依然として不明瞭だった。移植 4 週間後には神経片の移植部は膨大して成熟神経細胞を含む結節構造が出来上がっており、nestin 陽性領域は結節の周辺へ圧排されていた。3 ヶ月後、transplantation 群の神経片と前脛骨筋の矢状断切片では、神経片内に 2 つの明らかに異なる構造が確認できた。結節構造は多くの軸索が複雑に絡み合って形成されており、その結節構造の周辺から筋線維への縫合部にかけては正常末梢神経のように方向性を持って軸索が伸びていた（下図）。

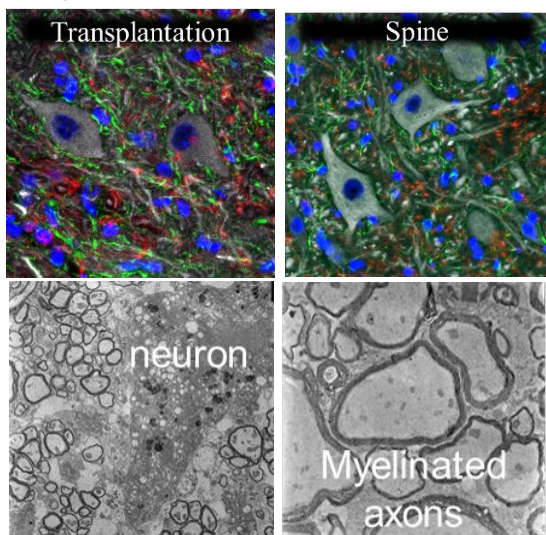


#### (2) 結節構造の形態評価

移植 3 ヶ月後の transplantation 群遊離神経片を surgical control 群遊離神経片、正常脊髄、正常末梢神経と免疫組織学的に比較した。transplantation 群ではマクロファージの活性化を示して Iba1 陽性細胞が増加しており、中枢神経系を構成する神経細胞 (3-tubulin 陽性)、アストロサイト (GFAP 陽性)、オリゴデンドロサイト (O4 陽性) の存在が確認された。また、神経細胞体周囲には synaptophysin が陽性となり、神経細胞間でシナプスネットワークが形成されていることが示された。この構造は正常脊髄に酷似していた（文末図上）。電子顕微鏡による観察でも同様に神経細胞やグリア細胞の存在と

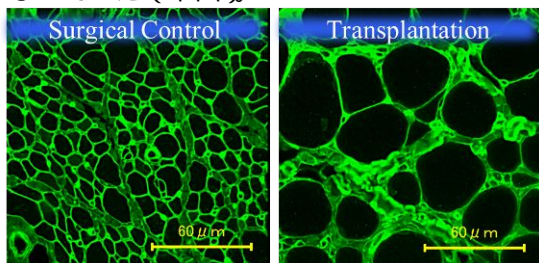


共に、髄鞘の厚みの異なる2種類の有髄軸索がみられた。これらは髄鞘を形成する細胞の起源が異なっていることが考えられた(文末図下)。



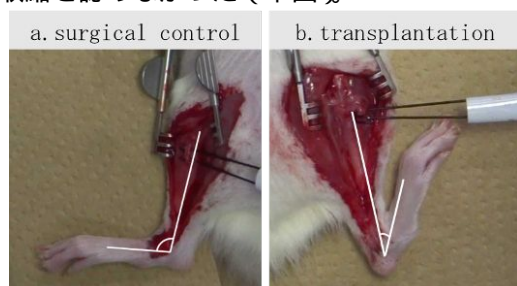
### (3)筋と神経筋接合部の組織学的評価

移植3ヶ月後の前脛骨筋では、遊離神経片縫合部付近に新たなアセチルコリン受容体の形成が認められ、オリジナルのアセチルコリン受容体と共に遊離神経片から伸びた軸索によって神経筋接合部が形成されていた。前脛骨筋の筋湿重量はtransplantation群で重く、筋線維径も太くなっていた(下図)。



### (4)運動機能評価

In vivoで運動機能評価を行った。transplantation群では電気刺激によって足関節の背屈が認め、遊離神経片による脱神経筋の再支配が確認された。一方で、surgical control群ではいずれのラットにおいても筋収縮を認めなかった(下図)。



曲げセンサによる運動解析では下肢皮下にセンサを埋め込み曲がりの程度をモニタリングしたが、ラットの行動を十分に制御することが出来ず、歩行パターンの解析までには

至らなかった。しかし、神経刺激電極と非接触刺激を実現するためのコイルの開発を始め、臨床導入と大型動物での実験を視野に入れた刺激装置の基盤を作成した。

### (5)まとめ

Waller変性を生じた末梢神経内に運動神経幹細胞を含む胎児脊髄前角細胞を移植することによって、中枢神経系外でneurogenesisが生じて異所性神経節を形成することを示した。異所性神経節は組織学的にも機能的にも脱神経筋の再支配神経として機能しており、また、任意の位置に設置可能である。この現象が現在治療に苦慮するような骨格筋麻痺に対する新たな再生医療となることが期待される。

### 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)

[学会発表](計4件)

Tomonori Nakano, Creation of ectopic neural ganglion within peripheral nerve graft, 71th ASSH, 2016年9月29日~10月1日, Austin(USA)

中野智則, 末梢神経内に作成した異所性neural ganglionによる機能再建, 第27回日本末梢神経学会, 2016年8月26日~8月27日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

中野智則, 遊離神経片内に移植したmotoneuronは中枢神経系類似環境を構築し支配神経として機能する, 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015年10月22日~10月23日, 富山国際会議場(富山県富山市)

Tomonori Nakano, The function reconstruction of denervated muscle by reinnervation from an artificial ganglion, 70th ASSH, 2015年9月10日~9月12日, Seattle(USA)

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

中野 智則 (NAKANO, Tomonori)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 70738369

#### (2)研究分担者 なし

#### (3)連携研究者 なし

#### (4)研究協力者

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