

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19255

研究課題名(和文)超音波メカノバイオロジーによる神経軸索の伸展制御

研究課題名(英文) Sono-mechanotherapy for neurite outgrowth

研究代表者

滝口 満喜 (Mitsuyoshi, Takiguchi)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：70261336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経再生の第1ステップである神経突起の伸展と発芽を低強度パルス超音波で制御する試みを行った。ラット初代培養神経細胞に軸索進展阻害因子を作用させ、神経突起を萎縮させた。そこへ低強度パルス超音波を照射し、神経突起の様子を経時的に観察した。低強度パルス超音波により、1つの神経細胞あたりの神経突起は長くなったが、神経突起の起始点の数には変化がなかった。また、生きた細胞の細胞骨格を染色し、低強度パルス超音波照射中の細胞変形の観察に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超音波の刺激に対する細胞応答メカニズムである「メカノバイオロジー」に注目し、その機構を探索した。本研究により、低強度パルス超音波を従来の理学療法から科学的な裏付けのある治療法へと昇華させる可能性を示すことができた。本研究で超音波によるメカノバイオロジーの一端を明らかにすることは、低強度パルス超音波治療法の研究に明確な指針を与え、今後の研究の発展に大きく貢献する。また、低侵襲かつ簡便に繰り返しが可能な超音波を使用する、新たな脊髄損傷治療法の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Axon regeneration is crucial for the functional recovery after spinal cord injury. Myelin-related growth inhibitors, such as Nogo-A, inhibit neurites regrowth and elongation. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) is known to show neuroprotective effects in neurodegenerative diseases. In the present study, we evaluated the feasibility of LIPUS for enhancing axon regeneration in the presence of Nogo-A. Low-intensity pulsed ultrasound was exposed to rat cortical neurons in vitro after Nogo-A treatment. The total length of neurites per cell in LIPUS group was significantly larger than that of non-LIPUS group. There was no significant difference in the number of neurites. The results suggest that LIPUS may enhance the elongation of neurites in the presence of Nogo-A while may not affect on neurites sprouting and branching. This preliminary study implies the feasibility of LIPUS for axonal regeneration.

研究分野：超音波治療

キーワード：超音波メカノバイオロジー 脊髄損傷

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

獣医療でも、医療でも椎間板ヘルニアや骨折などによる脊髄損傷が起こった際の根本的な治療は存在していない。圧迫を解除し、機能の回復を待つ、もしくはリハビリや種々の理学療法で残存機能の強化を図るのが一般的である。幹細胞を用いる細胞移植療法が検討されているものの、治療法として確立には至っていない。一方で、同じ神経系でも末梢神経の再生は実現しつつある。末梢神経に比較して中枢神経の再生が困難な理由は、

(1) 中枢神経の神経細胞の成長は緩やか

(2) 損傷部位の神経軸索阻害物質が多く、神経再生に重要な神経軸索の伸展を阻むからとされる。したがって、神経細胞を活性化し軸索を伸展させる手段は中枢神経再生の根本的治療へと発展できると考えた。

超音波などの「力」に対する細胞応答「メカノバイオロジー」は近年注目されている。低強度パルス超音波には生体の治癒能力を高める効果があり、理学療法に利用されてきた。近年では、難治性骨折の癒合促進に対する利用で保険収載を果たした。したがって、低強度パルス超音波により中枢神経の治癒力を高める手法には実現可能性があると考えられた。一方で、低強度パルス超音波による治療の機序はあまり解明されているとは言い難かった。

### 2. 研究の目的

中枢神経の再生には

(1) 神経軸索の伸展

(2) 軸索のターゲット細胞までの誘導

(3) 誘導後のシナプス形成

(4) ミエリン形成

のステップが必要である。しかし脳や脊髄では障害を受けた神経細胞周囲に軸索伸展阻害物質が多く存在するために、再生が極めて困難となる。阻害物質の影響を排除可能なレベルまで神経細胞を活性化させ、軸索を伸展させることが中枢神経再生の第一歩となる。そこで、低強度パルス超音波を利用して中枢神経の治癒力を高める脊髄損傷治療法の開発に挑戦することとした。本研究ではその第1段階として、中枢神経再生に最も重要である軸索伸展を低強度パルス超音波で制御を目指した。

### 3. 研究の方法

ラットI型コラーゲンによりコーティングした培養ディッシュの上にラット初代培養神経細胞を播種して用いた。細胞が定着し神経突起を伸長後、ラットNogo-Aを作用させた。Nogo-Aは軸索再生阻害因子である。Nogo-A作用後に低強度パルス超音波を単回照射した。超音波条件は中心周波数1MHz、デューティ比10% (100パルス、繰り返し周波数1kHz)、強度20mW/cm<sup>2</sup>とし、5分間照射した。照射後に経時的に細胞を観察し、神経突起の伸長および神経細胞間ネットワークの面積をImage Jにて計算した。

低強度パルス超音波照射中の細胞の動きを観察するため、シリコンローダミンプローブ SiR-Tubulin および SiR-Actin により細胞骨格のチューブリン (微小管) およびアクチンを染色し、生細胞イメージングを行った。

### 4. 研究成果

ラット初代培養神経細胞をコラーゲンコーティングディッシュ上で培養することで、神経突起の伸長を確認できるようになった。Nogo-Aを作用させることで、神経突起の萎縮が確認された。また、低強度パルス超音波照射により神経突起の伸長ならびに複雑化が観察された (図1)。

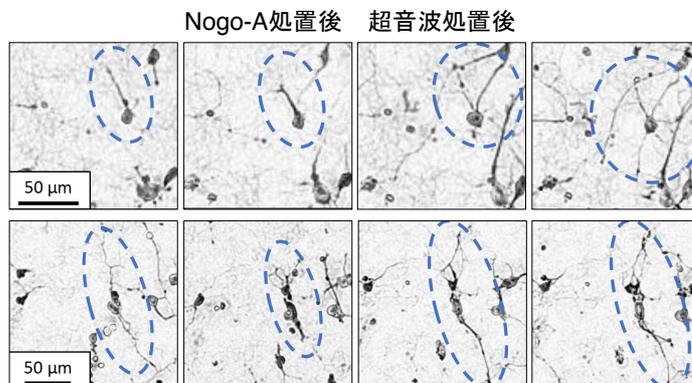


図1 神経細胞の経時的観察

上段が低強度パルス超音波照射群、下段が非照射群。点線内は同一の神経細胞を示す。

顕微鏡画像をImage Jで解析したところ、低強度パルス超音波照射群では1神経細胞当たりの神経突起の長さが非照射群に比較して優位に長かった。しかし、神経突起の複雑さを示す指標

である神経突起の起始点数には差がなかった (図 2)。

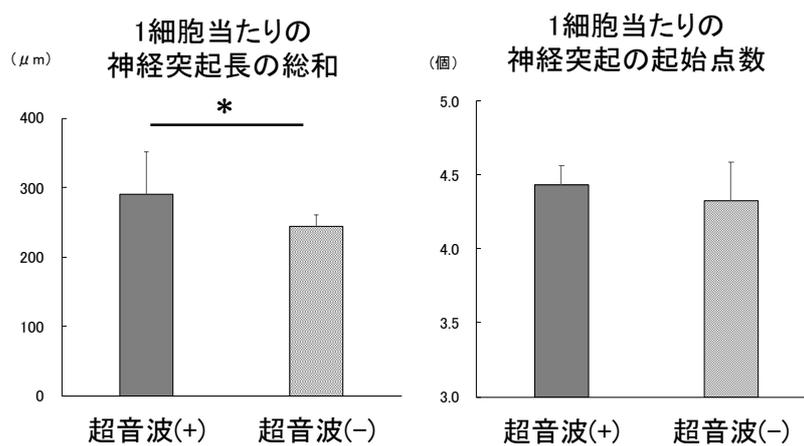


図 2 神経突起の定量的評価

生細胞の細胞骨格を染色することで、低強度パルス超音波照射中の細胞骨格の動きが明らかになった。低強度パルス超音波照射により細胞骨格のダイナミックな動きが観察される一方、非照射群でも細胞骨格の動きが観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Noboru, Kudo Nobuki, Ohta Hiroshi, Takiguchi Mitsuyoshi	4. 巻 2019
2. 論文標題 Low-intensity pulsed ultrasound modifies effects of a myelin-related growth inhibitor and enhances neurite re-growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ultrasonics, IEEE Symposium (IUS)	6. 最初と最後の頁 1308-1310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/ULTSYM.2019.8926300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木東、大村侑己、工藤信樹、大菅辰幸、森下啓太郎、大田寛、滝口満喜
2. 発表標題 低強度パルス超音波による初代培養細胞の神経突起制御の試み
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noboru Sasaki, Nobuki Kudo, Hiroshi Ohta, Mitsuyoshi Takiguchi
2. 発表標題 Low-intensity pulsed ultrasound modifies effects of a myelin-related growth inhibitor and enhances neurite re-growth
3. 学会等名 IEEE IUS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 東  (Sasaki Noboru)  (00754532)	北海道大学・獣医学研究院・助教    (10101)	

