

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく  
診断・治療へ向けた新技術の創出」  
平成20年度採択研究代表者

平成 21 年度  
実績報告

小野寺 宏

独立行政法人国立病院機構 西多賀病院・副院長

脊髄外傷および障害脳における神経回路構築による治療法の開発  
～インテリジェント・ナノ構造物と高磁場による神経機能再生～

## § 1. 研究実施の概要

iPS細胞技術を用いた脳脊髄疾患の移植医療に期待が集まっていますが、現行技術では移植された神経細胞は阻害因子に邪魔されて機能回復に寄与できません。本研究では脊髄外傷やパーキンソン病を対象に、神経接着分子や栄養因子を結合したナノ素材を脳脊髄の特定部位に磁力により配置し、それを足場として移植神経細胞に回路を再構築させるという新しい治療技術を開発します。このような脳の内側からの機能回復（神経回路再構築）とともに、体の外側からの機能支援技術開発（ブレインマシンインターフェース、インテリジェント装具）をともに進めることにより総合的な運動機能回復を目指します。

21 年度、神経細胞の脳脊髄内線維伸長を誘導するための機能性分子（神経接着分子、誘導因子）を選定し磁性ワイヤに結合させる技術を開発しました。アデノ随伴ウイルスベクターの活性を保持したままワイヤに結合させる技術も確立し、神経細胞に遺伝子を長期間発現させることが可能となりました（21 年度特許出願）。移植神経細胞の脳脊髄内輸送と神経線維の足場となる有機繊維素材を制作し、その表面加工技術を確立しました（低温プラズマ処理による生体機能分子の脳内 DDS の開発）。また、神経線維の足場を脳脊髄内で正確に配列させるため、髪の毛よりも細い強力磁石を開発しました。放射光 CT（Spring-8）を用いて脳脊髄組織内の神経細胞を描出することに成功し、病理標本を作ることなく移植神経細胞と神経線維足場素材の位置を3次元的に把握することが可能になりました。

奈良先端大学 CREST チームとの異分野共同研究により、神経組織にダメージを与えにくい埋め込み用のアンプ一体型超小型マルチチャンネル電極を開発しました（サル脳の電気活動記録に成功）。この切手サイズのアンプ一体型電極は新しいブレインマシンインターフェースとしての応用が期待されます。体の外からの機能支援技術開発として、脊髄障害患者の手術前後の脳活動

を機能的MRIにより、また運動機能を3次元運動解析装置により検討し、その知見を運動機能支援インテリジェント装具の開発に生かしています。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「小野寺」グループ

① 研究分担グループ長:小野寺 宏(国立病院機構西多賀病院、副院長)

#### ② 研究項目

機能的ワイヤの脳障害モデル動物への適用による神経回路再構築の検討, および患者における運動機能解析, インテリジェント装具・器具の開発

### (2)「中平」グループ

① 研究分担グループ長:中平 敦(大阪府立大学、教授)

#### ② 研究項目

磁性ワイヤの製造ならびに機能付加ワイヤの開発と制作

### (3)「今井」グループ

① 研究分担グループ長:今井 俊夫(カン研究所、所長)

#### ② 研究項目

神経線維伸展因子効果を有する機能的ワイヤの開発, 培養神経細胞における評価

### (4)「中村」グループ

① 研究分担グループ長:中村 雅也(慶応大学、講師)

#### ② 研究項目

外傷性脊髄障害における機能的ワイヤによる神経機能回復の評価

### (5)「上月」グループ

① 研究分担グループ長:上月 正博(東北大学、教授)

#### ② 研究項目

脳移植動物における機能的ワイヤによる神経機能回復の評価

### (6)「金」グループ

① 研究分担グループ長:金 錫範(岡山大学、准教授)

#### ② 研究項目

機能的ワイヤの脳脊髄内移動のための超高磁場装置の開発

### § 3. 研究実施内容

平成20年秋のCREST研究スタートから1年半、神経細胞移植のためのナノ素材選定、磁性体選定、接着分子ならびにウイルスベクタ選定、材料結合方法等の基盤技術蓄積により、脳脊髄疾患モデルへの神経細胞移植準備を整えた。

#### 1. 機能的磁性体・移植用素材開発

X線結晶構造解析装置を導入し、機能分子のワイヤ結合率および不純物混入等を正確に測定できる体制を整えた。脳内神経回路配線用の磁性ワイヤ・脳内溶解型合成繊維に機能分子を結合させる方法を開発し、これにより神経線維の足場となる機能分子の表面積を飛躍的に増大させることが可能となった。繊維メーカーの協力により制作した溶解型中空糸の内部を神経線維が伸長できるので、ナノDDS技術を併用することにより更に効率的な神経線維配線が可能になる。20年度に開発した磁性ワイヤ格子培養法を用いて神経細胞移動性と神経線維伸長度をスクリーニングし、神経線維伸長分子を2群に絞り込んだ。これらの分子の生理活性を失わせることなく磁性ワイヤに結合させる技術確立し、一個の神経細胞の神経線維を2日間で数百ミクロン伸長させることに成功した(図1)。

磁性ワイヤに結合させて神経細胞に遺伝子を導入するウイルスベクタとして、アデノ随伴ウイルス(AAV2)を選択した。感染活性を保ったままウイルスベクタを磁性ワイヤに長期間結合させる技術確立した(21年度特許出願)。AAV2はワイヤから溶出することなく結合状態を保てるため、AAV2結合ワイヤに接触した神経細胞のみに遺伝子を発現させることができた(図2はGFP発現ベクタの例;感染ニューロンの全ての神経線維が緑色蛍光を発する)。従来のウイルスベクタ脳内導入方法は単にベクタを脳に注入するものであり、ベクタの局在化が困難なうえに目的外部位にも遺伝子が発現してしまうという問題を抱えていた。我々が開発したベクタ結合ワイヤ(糸)は必要部位に局限した遺伝子発現を可能にするので、新しい神経系への遺伝子導入法として応用が可能である。

#### 2. 脊髄と脳内の目的部位に磁性構造物を整列させる磁場制御技術の開発

磁性ワイヤ素材としてマルテンサイト系ステンレスを使用しているが残磁性が比較的大きいため磁化された磁性体が凝集しやすいという欠点を有していた。また超電導磁石による制御装置の動物実験室内持ち込みが現実的に不可能であるため、電磁石と永久磁石を併用した強力磁場の開発が必要となった(超小型の超電導磁石の開発は平行して進めているが、磁場強度の急速な変化によるクエンチングの危険もネックとなった)。超伝導磁石を用いずに十分なワイヤ駆動力を得るため、極細磁石そのものを脳内に注入する方法を検討した。鉄コバルト系の磁石極細線ならびに白金合金磁石、ネオジム磁石について検討し、微細加工性と防錆性ならびに長軸方向への磁化特性にすぐれる鉄コバルト磁石に絞った。直径200ミクロンの鉄コバルト極細磁石を完成させたが駆動力は十分大きく、ラット脊髄内において正確な神経足場の配置が可能になるものと期待される。

### 3. Spring-8 放射光によるラット、マウス脳・脊髄3次元解析

20年度、放射光CTにより神経核（海馬，小脳，視床等）の層構造描出に成功したが，21年度には画像処理方法を改良して撮像時間短縮と解像度向上につとめた．通常よりも放射光エネルギーの大きいビームを用いて脳脊髄CT撮像を実施し，脊髄外傷後の異常血管新生や組織障害の3次元観察に成功した（図3）．21年度～24年度 Spring8 バイオメディカル部門長期利用ユーザとして優先枠を設定していただくなど CREST 研究に多大な援助をいただいている．

### 4. 新しいブレインマシンインターフェースとしてのアンプ一体型超小型マルチチャンネル脳電極の開発（CREST チーム間の医工連携共同研究）

従来の太くて硬いマルチチャンネル電極（ミシガン電極等）では脳ダメージが大きく，長期使用や脳深部記録は不可能である．そこで奈良先端大 CREST 太田チームとの異分野チーム共同研究により，アンプ一体型の極細マルチチャンネル電極を開発した．厚さ 20 ミクロンのフレキシブル基板そのものを電極基材とし，半導体製造技術を用いて微細加工を行った．脳ダメージを抑えつつ脳深部に磁力を用いて挿入することが可能で，サル補足運動野における電気活動記録に成功している（図4）．電極とアンプを一体型にすることにより外来ノイズも極めて小さくなっている．脳損傷のリスクを減らしつつ長期の神経活動記録が可能なので，ブレインマシンインターフェースとしても有望である．

### 5. 運動障害時の3次元動作解析，脳機能評価，運動支援インテリジェント装具開発

前年度に引き続き，脊髄障害患者の術前・術後の運動機能変化を functional MRI を用いて解析した．運動障害者の起居動作を支援するための運動解析結果（運動障害シミュレーション，転倒危険動作解析）をもとに，運動障害者の日常生活を支援する靴型ロボットを開発した．本装置の装着により立位・歩行バランスは有意に改善したが，駆動メカニズムとセンサ，マイコン，モータ，バッテリー等の総重量を 500 グラムに抑えることにも成功している．

図1 ラミニン結合特殊繊維上に培養した海馬神経細胞．インテリジェント機能分子上を神経線維が伸長している．

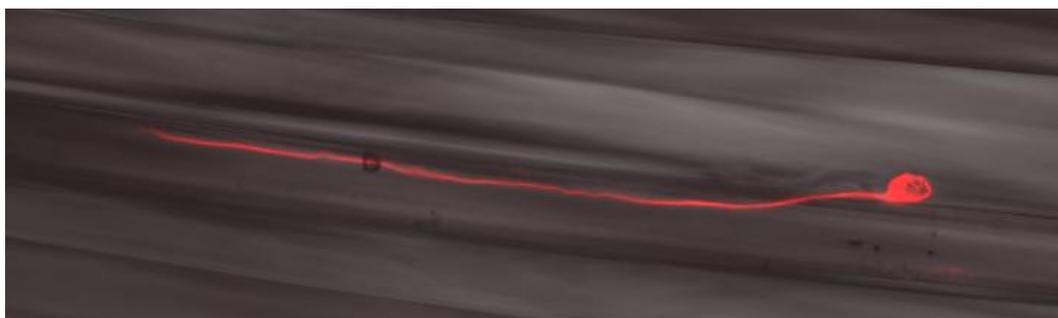


図2 GFP 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクタ(AAV2)を結合する磁性ワイヤの存在下で腎細胞(上), ラット海馬神経細胞(下)を培養した. ワイヤに結合した細胞のみに GFP が発現している, ワイヤからの AAV2 ベクタ溶出は認められない. ワイヤに接触した海馬神経細胞の細胞体と神経線維全長が GFP 緑色蛍光を発しており, 細胞障害も認めない.

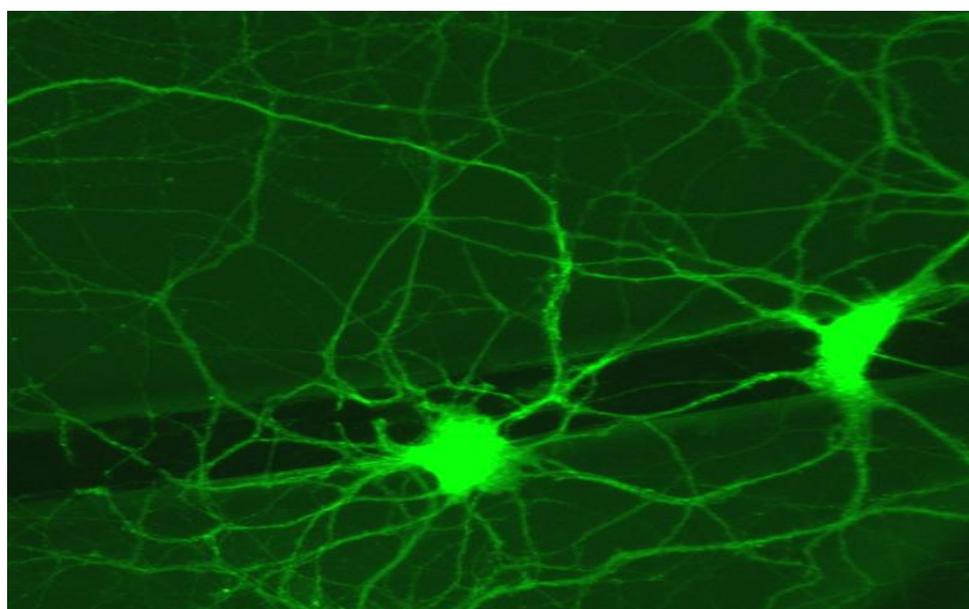
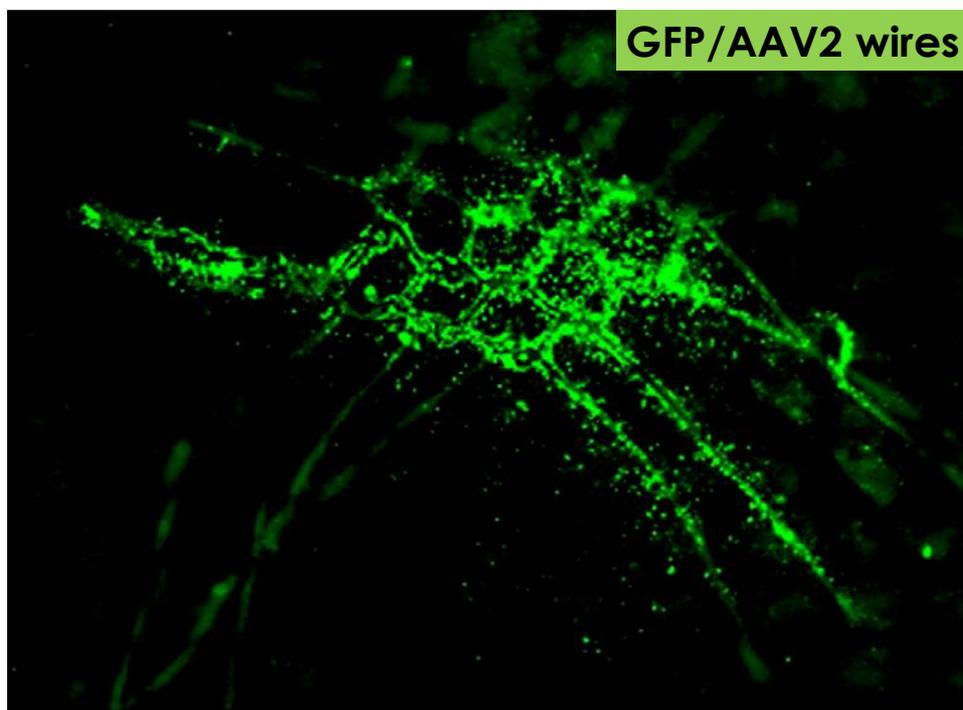


図3

放射光 CT によるマウス脊髄の 3 次元撮像. (左) 脊髄外傷 2 日後, (右) 10 日後. 病変は脊髄全体に及んでいる. 10 日後の異常血管新生が明瞭に描出されている.

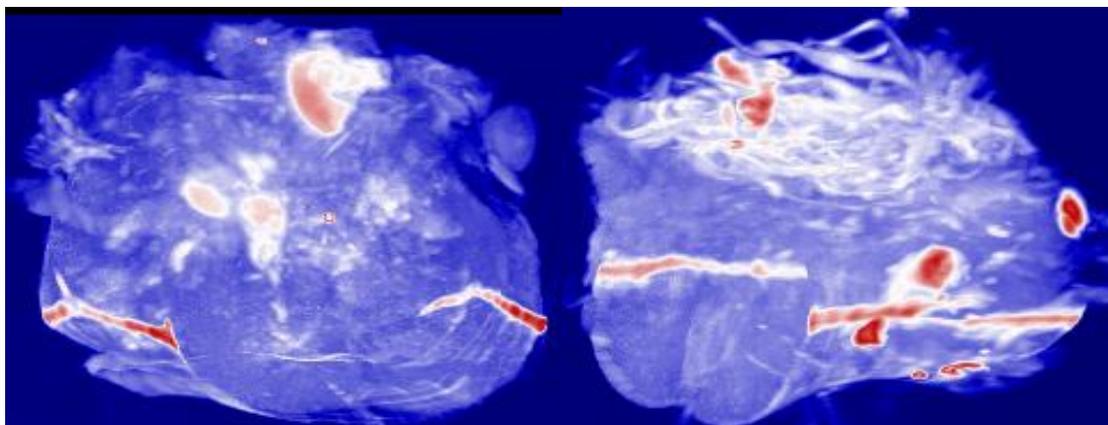
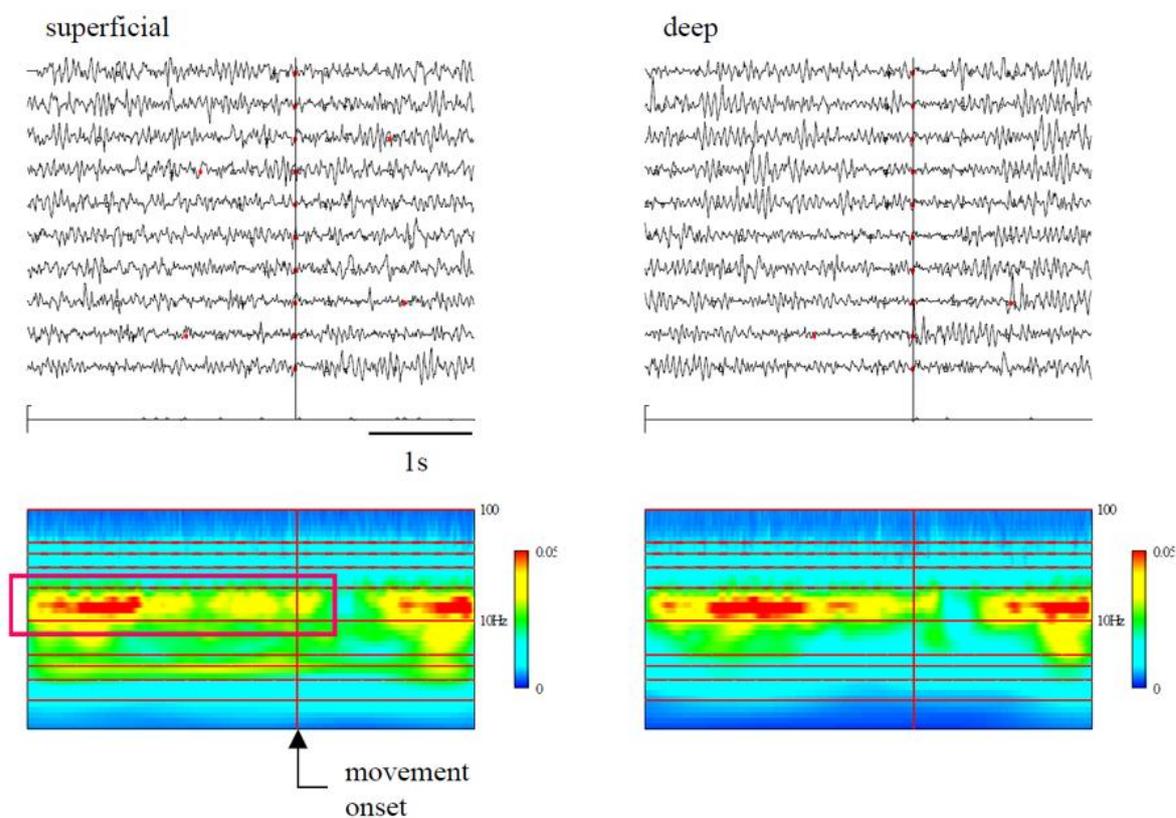


図4 CREST チーム間共同研究の成果.

アンプ一体型超小型マルチチャンネル脳電極によるサル脳(補足運動野)での電気活動記録. 運動開始による desynchronization が明瞭に観察されている (local field potential).



## § 4. 成果発表等

### (4-1) 知財出願

- ① 平成 21 年度特許出願件数(国内 1 件)
  
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)