

「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

小野寺宏

(独) 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・ナノ構造体と高磁場による神経機能再生～

§1. 研究実施の概要

幹細胞・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る。しかし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神経線維を1ミリさえも伸ばせず、失われた神経機能は回復しない。本研究はこれらの細胞を脊髄外傷やパーキンソン病など運動障害疾患治療に応用すべく、神経接着分子や栄養因子を結合したインテリジェント・ナノ構造体足場を磁力を用いて脳脊髄内の目的部位に正確に配置して神経回路を再構築するという新しい治療技術開発を進めている(特許出願)。

21 年度にスクリーニングを進めた神経線維伸長・接着分子のうち 3 種類について、22 年度には新たに開発した構造の神経線維足場構造体への結合実験を進めた。この様に作成した神経線維足場構造体(胎児ラット由来細胞とともに)を脊髄損傷モデルラットの損傷部位に移植したところ、移植1ヶ月後には非治療群に比して有意の運動機能改善効果を認めた。足場構造体単独移植群および胎児細胞単独移植群の運動機能スコアは“足場+細胞移植”群と非治療群のほぼ中間値であった。神経線維を抗 neurofilament 抗体で染色し3次元フルフォーカス法で解析すると、“足場+細胞移植”群では足場に接着した移植細胞に沿って宿主神経線維が伸長し、その長さは優に1mm を超えた。脊髄損傷等の中核病変の場合には宿主神経線維の伸長は殆ど望めないとされており、我々が新たに開発した神経線維足場構造体と接着分子の組み合わせが神経損傷後の再生医療に極めて有用であることが明らかになった。今後、足場構造体のナノスケールでの三次元構造化処理を加えて臨床応用可能な神経移植方法を確立したい。

奈良先端大学 CREST チームとの異分野 CREST チーム間共同研究により、脳内で長期間電気活動を記録可能で脳にダメージを与えにくい超小型マルチチャンネル電極開発に成功した(新しいブレインマシンインターフェースとして特許出願済)。さらに7mm角の微小電子基板に脳活動

電位増幅アンブと 2.4GHz 帯無線通信機能を搭載することに成功した。これにより総重量2グラムで3日間連続脳活動を記録可能な超省電力無線システムが完成した。

今年度、足場構造体を脳脊髄内に敷設する際の動力源となる極細超強力磁石が完成した。これにより誤差 100 ミクロンの正確さで(理論値)脊髄内で足場構造体を配列させる事が可能となる。23 年度以降、上記技術を統合して ES 細胞・iPS 細胞等による効率的な神経回路再構築法を完成させ臨床応用を目指していく。

脳脊髄内に神経回路再構築に成功しても、患者の ADL と QOL の改善には体外からのアシストが不可欠である。そこで我々が開発したブレインマシンインターフェース装置を活用し、真に実用的なロボット装具の開発を目指している。すでに靴ロボット開発を成功させた(特許出願済)。

§ 2. 研究実施体制

(1)「小野寺」グループ(国立病院機構西多賀病院)

- ① 研究分担グループ長:小野寺宏((独)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(大阪府立大)

- ①研究分担グループ長:中平敦(大阪府立大学工学研究科・教授)
- ②研究項目:磁性ワイヤの製造ならびに機能付加足場構造体制作

(3)「今井」グループ(カン研究所)

- ①研究分担グループ長:今井俊夫((株)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(慶応大学)

- ①研究分担グループ長:中村雅也(慶應大学医学部整形外科・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(東北大学)

- ①研究分担グループ長:上月正博(東北大学大学院医学研究科・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(岡山大学)

- ①研究分担グループ長:金錫範(岡山大学大学院自然科学研究科・准教授)

②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

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1. 神経線維の脳脊髄内足場素材開発

幹細胞・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る。しかし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神経線維を1ミリさえも伸ばせず、失われた神経機能は回復しない。そこで本研究は脊髄外傷やパーキンソン病などの運動障害性疾患を対象に、神経接着分子や栄養因子を結合したインテリジェント・ナノ構造体を脳脊髄内の目的部位に正確に配置し、それを足場に神経回路を再構築するという新しい治療技術の開発を目指している(特許出願)。

本CRESTは磁性体(極細磁性ワイヤ)を用いて脳脊髄内に神経線維の足場となる3次元構造体を敷設する方法を確立することを目的とする。22年度は磁性ワイヤ素材と機能分子結合方法を見直して高品質の磁性ワイヤの生産を目指した。この結果、直径100ミクロンの極細であるにもかかわらず強力な磁力を持つ磁石線の開発に成功した(レアアース不使用)。さらに、神経線維の足場となる機能分子の表面積を数倍に増やすことを可能とする構造も開発した。

21年度に選択した接着分子のうち2種類について22年度は新たに開発した構造の神経線維足場構造体への結合実験を進めた。これにより作成した神経線維足場構造体(胎児ラット由来細胞とともに)を脊髄損傷モデルラットの損傷部位に移植したところ、移植1ヶ月後には非治療群に比して有意の運動機能回復を認めた。足場構造体単独移植群および胎児細胞単独移植群の運動機能スコアは“足場+細胞移植”群と非治療群のほぼ中間値であった。神経線維を抗neurofilament抗体で染色し3次元フルフォーカス法で解析すると、“足場+細胞移植”群では足場に接着した移植細胞に沿って宿主神経線維が伸長し、その長さは優に1mmを超えた(図1)。脊髄損傷など中枢神経障害の場合には宿主神経線維の伸長は殆ど望めないとされるので、我々が開発した新たな足場構造体と接着分子の組み合わせは神経損傷後の再生医療に極めて有用であると考えられる。

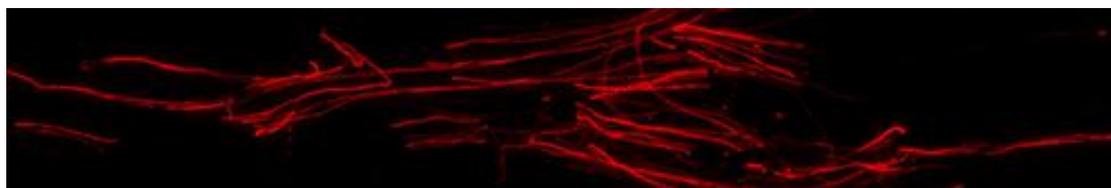


図1 ラット脊髄内に移植した、新たに開発した神経線維足場に沿って宿主神経細胞が神経線維を伸長させている(ホストの神経線維を neurofilament 免疫染色で示す)。

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクタの活性を保持したままワイヤに安定結合させる技術を21年度に確立したので、22年度は神経線維伸長因子等を組み込んだAAVの大量生産を進めた。23年度にその効果(in vivo, in vitro, 及び疾患モデル動物にて)を解析する予定である。21年度に確立した神経細胞移動・神経線維伸長スクリーニング系を用いてAAVベクタによる神経細胞への影

響(毒性等)を検討するとともに最適な感染条件を検討した(23年度も継続)。

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、21年度まではマルテンサイト系ステンレスを使用してきたが、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(神経組織にキズをつける危険)。そこで磁気テープ読み取りヘッド等に用いられるパーマロイ合金に期待したが、磁化率(駆動力)がマルテンサイトの50%と不十分であり断念した。臨床応用時の安全性を考えれば、マルテンサイトに含まれるクロムも問題となる。そこで安全な純鉄を検討してきたが、通常の鉄と異なって極めて柔らかく微細加工が困難であった。そのため従来の超電導磁石・マルテンサイト合金ワイヤ・ネオジム永久磁石の組み合わせを断念し、22年度には新たに電磁石制御装置を設計制作するとともに鉄系の極細強力磁石(直径100ミクロン)を完成させた。超電伝導磁石の場合には急激な磁場の増減が原理的に不可能であるうえ、無理に磁場を変化させた場合にはクエンチによる超伝導磁石の爆発的破壊が生じ極めて危険である。一方、電磁石では一瞬にして磁場をゼロにすることも容易であり、印加電圧等を調節するだけで極性や磁束密度を即座に変更可能である。今回制作した電磁石装置は自動車一台(鉄)をつり下げる磁場強度を有している。本装置と極細磁石線を用いると理論上制御誤差は100ミクロン程度であり、脳脊髄内に神経線維足場素材を正確かつ安全に敷設することができる。23年度はこのシステムにより脳脊髄内への足場構造体の敷設条件(磁場制御ソフトウェア)を決定して移植実験に供する。

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を向上させた(理論上の解像度は10オングストロームであるが、実測解像度は脊髄においては5ミクロン程度であった)。一個の神経細胞や脊髄外傷後の異常血管新生をコンピュータグラフィックスで3D表示することが可能となった。21年度までのspring8放射光CTの最大の難点は撮像範囲が7mm×7mmに制限されラット脳全体を1視野に収められない事であった。そこで新たにタルボ干渉計を制作して放射光CTを撮影した。その結果、ラット脳全体を視野に収めることが可能となり、神経線維の足場構造体と脳脊髄組織を同時に描出することもできた。

理研Spring-8には21年度~23年度の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我々のCREST研究に多大のご援助をいただいている。ここに謝意を表する。

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ブ一体型超小型マルチチャンネル脳電極の開発(CREST異分野チーム共同研究)

従来のマルチチャンネル電極は生花の剣山のように硬く太いため脳ダメージが大きく長期記録は困難であり、しかも脳深部の電気活動記録も不可能である。そこで奈良先端大CREST太田千

ームとの異分野 CREST 共同研究により、極細で柔軟なマルチチャンネル電極を開発した。我々の電極は脳ダメージが軽微であり脳深部に挿入できることが特徴である。さらに電極配置パターンと電極深度は術者が手術の際に自由に決められる。この電極が臨床応用されれば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になるのでブレインマシンインターフェースとして有望である(特許出願)。すでに実験動物(サル, ラット)の脳神経活動記録に活用している(図3, 従来型ワイヤ電極と同等以上の性能かつ3チャンネル同時記録)。

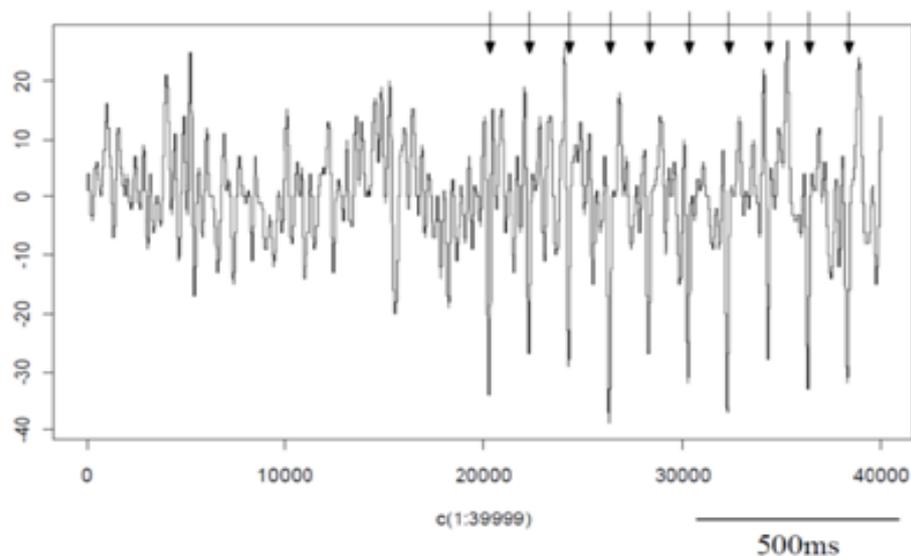


図3 ラット脳(海馬)における神経活動記録例。神経細胞刺激時(矢印)の local field potential.

5. 運動障害時の3次元動作解析, 運動支援用インテリジェント装具開発(文献2)

脳脊髄内に神経回路再構築に成功しても、患者の ADL と QOL の改善には体外からのアシストが不可欠と考えられる。そこで我々が開発したブレインマシンインターフェース装置を活用し、真に実用的なロボット装具の開発を目指して研究を進めた。運動障害患者の日常生活動作、とくに起居動作を支援するための運動解析(運動障害シミュレーション, 転倒危険動作解析)を行った。このデータをもとに運動障害患者の日常生活を支援するインテリジェント装具を設計・制作した。1関節あたり1キログラムの、“真に使えるロボット装具”を目標に研究を進めた。靴ロボットシステムを完成させ、滑り床での方向変換時転倒を有意に減少させることに成功した。この靴ロボットの総重量は電池およびコンピュータ回路を含めてわずか 1.2 キログラムに収めることができた(特許出願済)。

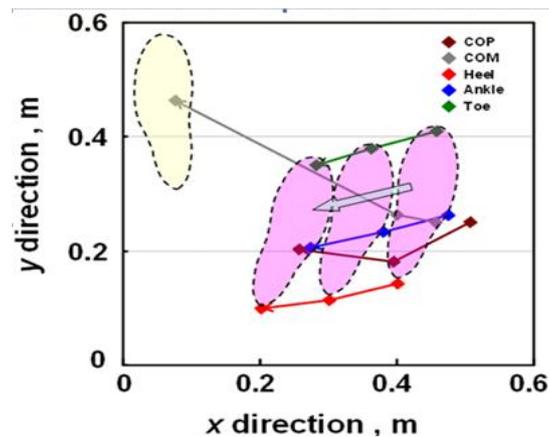


図4 靴ロボットによる滑床方向転換すべり時の center of mass (COM, 地面への重心投影点に対応). 靴ロボットでは図のように COM が支持基底面内(靴底面内)に収まっている. なお通常靴の場合には COP は支持基底面外に飛び出してしまう(=転倒). 黄色の足跡は補償ステップであり, 靴ロボット作動時には体のバランスを補正する時間的余裕が生まれることがわかる.

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Takamasa ONOKI, Shin'ya YAMAMOTO, Hiroshi ONODERA, Atsushi NAKAHIRA. New technique for bonding hydroxyapatite ceramics and magnesium alloy by hydrothermal hot-pressing method Materials Science and Engineering C, (in press)→確定 31, 499-502, 2011. ISSN: 09284931
2. Hiroshi Onodera, Takeshi Yamaguchi, Hiroteru Yamanouchi, Kazumasa Nagamori, Masaru Yano, Yasuhisa Hirata, and Kazuo Hokkirigawa, Analysis of the slip-related falls and fall prevention with an intelligent shoe system, IEEE Biomedical Robotics and Biomechatronics ,vol3, 616 - 620,2010

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 2件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 4件)