

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2007 年～2008 年  
 課題番号： 19790606  
 研究課題名 (和文) ドパミン神経幹細胞移植におけるケトン体の神経保護効果の応用  
 研究課題名 (英文) The effect of ketone body on the transplantation of dopaminergic stem cells  
 研究代表者 今村 恵子 (IMAMURA KEIKO)  
 鳥取大学・医学部付属病院・医員  
 研究者番号： 90379652

## 研究成果の概要：

パーキンソン病動物モデルにおける神経幹細胞移植では、移植細胞の生着率が低いなど、臨床応用に向けて多くの課題が残されている。我々はケトン体が神経保護作用を有することを報告している。本研究では、ドパミン神経幹細胞の移植へのケトン体の神経保護効果の応用を試みた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	210,000	1,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経病態生化学

キーワード：ケトン体，パーキンソン病，神経幹細胞，幹細胞移植，ドパミン神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は中脳ドパミン神経細胞の変性による神経難病で、本邦の有病率は人口 10 万人あたり約 100 名である。病初期には有効な薬剤がすでに臨床応用されているが、進行例に対する有効な治療法の開発が望まれ

ている。

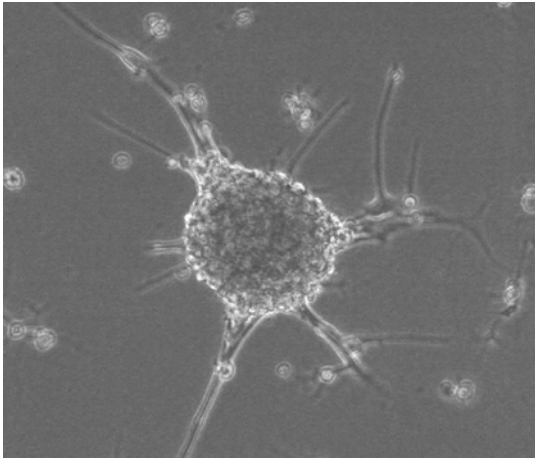
我々はケトン体 (D-β ヒドロ酪酸) がラット中脳培養ドパミン細胞を MPP+ 毒性から保護することを見出し既に報告した (Kashiwaya et al, PNAS 2000)。また、ヒト神経芽腫由来ドパミン系細胞株 SH-SY5Y において、ケト



#### 4. 研究成果

##### I. 神経幹細胞の培養と分化・増殖

胎生ラット中脳を採取し、中脳組織は離散後、プラスチックフラスコで培養し、bFGFを投与して神経幹細胞を育成した。中脳由来神経幹細胞は培養3日目より増殖を始め、9日で増殖細胞塊を形成した。コーティングを施していないプラスチックフラスコにFGF-2添加無血清増殖培地で培養を続けると、神経sphereが形成され、継代増殖可能であった。このsphereは無血清保存液を用いて増殖能・分化能を損なわずに凍結保存が可能であり、効率的に神経幹細胞が得られた。



神経幹細胞の分化・増殖において、ケトン体(D-β hydroxybutyrate; bHB)の中脳由来神経幹細胞の増殖と分化に対する効果および神経栄養因子や刺激シグナル(BDNF, GDNF, dopamine や pramipexol などのドパミン受容体刺激薬, Retinoic acid, forskolin 等)とケトン体の効果を RT-PCR 法および蛍光免疫染色法により分析した。また, pramipexole の神経保護効果の検討も行った。Pramipexole はアストロサイトを介し BDNF をはじめとする神経栄養因子の産生を促進することにより, 神経細胞保護効果を認めた。神経幹細胞は種々の誘導により neurosphere から MAP2 陽性となる神経系細胞へ分化したが, TH 陽性となる細胞の数は少なく, ドパミ

ン系神経細胞への分化は乏しかった。分化過程でケトン体を添加することにより, 細胞の増殖促進傾向はみられたが, ドパミン系神経細胞への分化促進は認めなかった。

##### II. パーキンソン病モデルラットへの神経幹細胞移植

成体雄 SD ラット (200~250g) にネンブタール 40mg/kg の腹腔内注射を用いて麻酔を行なった。固定台を用いてラットを固定し, ドリルで頭蓋骨に直径約 0.5mm の穴を開け, Manipulator を用いて線条体に定位的に (target coordinates: anteroposterior (AP), -4.0; mediolateral (ML), 0.8; dorsoventral (DV), 8.0 mm from bregma), 6-hydroxydopamine (8 μg/3 μl in saline containing 0.2 mg/ml ascorbic acid) をハミルトンシリンジで注入してパーキンソン病モデルラットを作成し, 6-hydroxydopamine 注入と同側線条体 (target coordinates: AP, 0.5; ML, 3.0; DV, 5.0 mm from bregma) に神経幹細胞単独あるいはケトン体 (bHB) を加えた神経幹細胞を移植する神経幹細胞移植におけるケトン体 (bHB) の効果の検討を試みた。種々の調整を検討したが, 移植に関する安定した実験系の確立が困難であり, 有効性を示すことができなかった。

#### 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 1 件)

Imamura K, Takeshima T, Nakaso K, Ito S, Nakashima K. Pramipexole has astrocyte-mediated neuroprotective effects against lactacystin toxicity. *Neurosci Lett.* 2008; 440(2): 97-102. (査読あり)

[学会発表] (計 1件)

Imamura K, Takeshima T, Nakaso K, Ito S, Nakashima K.

Pramipexole has astrocyte-mediated protective effects against lactacystin toxicity. Society for Neuroscience 2008.

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳥取大学・医学部附属病院・医員

今村恵子 (IMAMURA KEIKO)

研究者番号 : 90379652