

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390383

研究課題名（和文）ES細胞移植による神経再生医療実現化にむけてのホスト脳環境の最適化

研究課題名（英文）Optimization of the host brain environment for the cell replacement therapy using ES cells

研究代表者：高橋 淳（TAKAHASHI JUN）

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：10270779

研究成果の概要（和文）：

本研究の達成目標はES細胞移植臨床応用のためにホスト脳環境を最適化することであり、以下のような目標を定めた。① IL-6 シグナルがES細胞由来神経幹細胞の分化に与える影響を明らかにする。② 抗原抗体反応の側副経路を修飾することにより、ホストの免疫寛容状態を誘導する。③ 慢性炎症が移植細胞に与える影響を明らかにする。

マウスES細胞由来神経幹細胞の脳内移植時において、抗IL-6受容体抗体の局所同時投与①やCTLA-4Igの全身投与②によって炎症反応が抑制され移植細胞の神経分化が促進されることを明らかにした。また、低用量テルミサルタン投与によってマウス慢性脳低灌流モデルにおける脳組織障害が軽減されることを明らかにした③。

これらの成果は、幹細胞移植治療において移植細胞の性質のみならずホスト脳の環境も移植細胞の生着や分化に重要な働きをしていることを意味し、今後の細胞移植治療の発展に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The final goal of this study was to optimize the host brain environment for the cell replacement therapy using ES cells. By this study, we have obtained the following results: 1) Single and local blockade of IL-6 signaling promoted neuronal differentiation of transplanted ES cell-derived neural precursor cells. 2) Systemic administration of CTLA4-Ig promoted neuronal differentiation of transplanted ES cell-derived neural precursor cells. 3) Nonhypotensive dose of Telmisartan attenuated cognitive impairment partially due to peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation in mice with chronic cerebral hypoperfusion.

These results suggest that the host brain environment plays an important role in a transplantation of ES cell-derived neural cells, and also that we need to control the inflammation in the host brain for the efficient transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
21年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
22年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計			19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：実験脳外科学

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、ES 細胞からのドーパミン産生神経誘導ならびにその移植治療への応用を検討してきた。カニクイザル ES 細胞からドーパミン産生神経を誘導しパーキンソン病モデルカニクイザルの脳に移植したところ、脳内でドーパミン神経として機能し約3か月後に症状改善をもたらした。つまり、霊長類においても ES 細胞からのドーパミン産生神経誘導、その移植による神経機能改善が可能であることを明らかにした。さらにヒト ES 細胞からのドーパミン神経細胞誘導を行いながら ES 細胞移植の有効性と問題点を確認し、マウスの系においてその解決を行っている。その中でホスト脳環境が移植細胞に与える影響の重要性を強く感じ、細胞移植後の急性炎症や免疫反応が移植神経幹細胞の分化傾向にも影響を及ぼすことを明らかにした。これらの背景のもと、ホスト脳環境の移植細胞に対する影響をさらに明らかにするために以下の研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の達成目標は ES 細胞移植臨床応用のためにホスト脳環境を至適化することであり、以下のような目標を定めて実験を進めている。① IL-6 シグナルが ES 細胞由来神経幹細胞の分化に与える影響を明らかにする。② 抗原抗体反応の側副経路を修飾することにより、ホストの免疫寛容状態を誘導する。③ 慢性炎症が移植細胞に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために以下の実験を行った。

①マウス ES 細胞から神経前駆細胞を誘導

しマウス線条体に移植。移植後早期に周囲脳で発現するサイトカインを調べたところ、IL-1 β 、IL-4、IL-6 の上昇が確認された。そこで、神経前駆細胞からの *in vitro* での神経分化培養にこれらのサイトカインを加えたところ IL-6 が神経分化を抑制しグリア分化を促進することが明らかとなった。さらにこの効果は抗 IL-6 受容体抗体によって抑制された。そこで、細胞と一緒に抗 IL-6 受容体抗体を局所投与し、移植片内部や周囲の炎症細胞集積や移植細胞の神経/グリア細胞への分化を8週間にわたり比較検討した。

②同様にマウス ES 細胞から神経前駆細胞を誘導しマウス線条体に移植。以前の実験でサイクロスポリンによる免疫抑制が移植片への炎症細胞浸潤を抑え移植細胞の神経分化を促進することが分かっていたので、今回は抗原抗体反応の側副経路の抑制を試みた。抗原抗体反応には T 細胞抗体を介する直接経路以外に CD28 と CD80/86 との結合などの側副経路も必要である。そこで我々は CD80/86 に結合してこの側副経路を阻害する CTLA4-Ig によって抗原抗体反応の抑制を試みた。細胞移植と同時に CTLA4-Ig の全身投与を行い、移植片内部や周囲の炎症細胞集積や移植細胞の神経/グリア細胞への分化を6週間にわたり比較検討した。

③まず10週齢 C57BL/6J マウスの両側総頸動脈に径 0.18mm のマイクロコイルを外側から装着することにより血管性認知症モデルであるマウス慢性脳低灌流モデルを作成した。さらに降圧剤（アンギオテンシン II 受容体拮抗薬）であるテルミサルタンを投与したのち、免疫染色や qPCR によって白質でのグリア細胞活性化、オリゴデンドロサイト脱落、脱髄性変化および血管内皮の酸化ストレス障害を比較検討した。さらに作業記憶に対す

るテルミサルタンの効果も検討した。

4. 研究成果

平成 20～22 年度の本基盤研究ではそれぞれ以下のような成果を得た。

①マウス ES 細胞由来神経幹細胞の脳内移植時に抗 IL-6 受容体抗体を同時投与すると炎症細胞の集積や周囲脳のグリオシスが抑制されることが明らかとなった。さらに 8 週後の移植片内の神経細胞が有意に増加しグリア細胞が減少した。この効果はサイクロスポリンを全身性に継続投与した場合と同程度であった（発表論文②）。

②CTLA4Ig を用いて抗原抗体反応の側副経路を修飾することにより、移植片周囲の炎症・免疫反応が抑制されることが明らかとなった。さらに 6 週後の移植片においてドーパミン神経細胞（TH 陽性細胞）の生着数も有意に増加することが明らかとなった（現在投稿中）。

③マウス慢性脳低灌流モデルにおける白質でのグリア細胞活性化、オリゴデンドロサイト脱落、脱髄性変化および血管内皮の酸化ストレス障害が低用量テルミサルタンにより有意に改善されることが明らかとなった。さらに脳低灌流によって引き起こされる記憶障害がテルミサルタン投与によって改善されることも明らかとなった（発表論文①）。

これらの成果は、幹細胞移植治療において移植細胞の性質のみならずホスト脳的环境も移植細胞の生着や分化に重要な働きをしていることを意味する。実際にホスト脳の炎症を抑えることによって移植の効果を高めることを実証できたことは今後の細胞移植治療の発展に寄与するものと考えられる。

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）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

- ① Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially due to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activation in Mice with Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Stroke*. 2010; 41: 1798-1806. (2010)
- ② Gomi M, Aoki T, Takagi Y, Nishimura M, Ohsugi Y, Mihara M, Nozaki K, Hashimoto N, Miyamoto S, Takahashi J. Single and local blockade of IL-6 signaling promotes neuronal differentiation of transplanted ES cell-derived neural precursor cells. *J Neurosci Res*, in press (2011)

〔学会発表〕（計 12 件）

- ① 五味正憲、篠山瑞也、高橋 淳 : Interleukin-6 の ES 細胞由来神経幹細胞の分化・遊走に対する影響 第 9 回日本分子脳神経外科学会 (2008. 8. 30-31. 京都)
- ② 五味正憲, 高橋 淳, 丸茂 岳, 高木康志 : マウス局所脳虚血モデルへの ES 細胞由来神経幹細胞移植における Anti-interleukin-6 receptor antibody の効果. 第 34 回日本脳卒中学会 (2009. 3. 22. 松江)
- ③ 鷲田和夫, 猪原匡史, 高橋淳, 山下潤, 伊東秀文, 富本秀和 高橋良輔 : マウス慢性脳低灌流モデルに対する血管前駆細胞移植の効果. *日本神経学会総会* (2009. 5. 20. 仙台)
- ④ 鷲田和夫, 猪原匡史, 西尾佳子,

藤田裕之, 高橋淳, 吳曉峰, 木原武士, 伊東秀文, 富本秀和, 高橋良輔. マウス慢性脳低灌流モデルに対するテルミサルタンの効果. 京都脳腎連関分子病態研究会 (2009. 9. 10. 京都)

- ⑤ Washida K, Ihara M, Takahashi J, Yamashita J, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R. The effect of telmisartan on chronic cerebral hypoperfusion mouse model. Neuroscience 2009 (2009.10.19 Chicago)
- ⑥ Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially due to PPAR- γ Activation in Mice with Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 35th Japanese Congress of Stroke (2010.4.16 morioka).
- ⑦ Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially due to PPAR- γ Activation in Mice with Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 51st Annual Meeting of Japanese Society of Neurology (2010.5.20 Tokyo)
- ⑧ Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially Due to Peroxisome Proliferator-Activated- γ Activation in Mice With Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 1st Annual Neuroscience Conference (2010.9.7. Nairobi, Kenya)
- ⑨ Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially Due to Peroxisome Proliferator-Activated- γ Activation in Mice With Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (2010.9.19 Kobe)
- ⑩ Washida K, Ihara M, Okamoto Y, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nifedipine, a calcium-channel blocker attenuates cognitive impairment and white matter damages in a mice with chronic cerebral hypoperfusion. Neuroscience 2010 (2010.11.15 San Diego)
- ⑪ Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially Due to Peroxisome Proliferator-Activated- γ Activation in Mice With Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 2nd Kyoto Neuropathology Conference (2010.11.25 Kyoto)
- ⑫ Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially Due to Peroxisome Proliferator-Activated- γ Activation in Mice With Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 22nd Annual Meeting of the Japanese Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism (2010.11.27 Osaka)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 淳 (TAKAHASHI JUN)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：10270779

(2) 研究分担者

橋本信夫 (HASHIMOTO NOBUO)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40135570

高橋良輔 (TAKAHASHI RYOSUKE)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90216771

(3) 連携研究者

なし ()