

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06723

研究課題名(和文) ヒト由来脳傷害誘導性神経幹細胞による新規神経再生療法の基盤的研究

研究課題名(英文) Novel regenerative therapies based on injury-induced neural stem cells obtained from patients with stroke

研究代表者

中込 隆之 (Nakagomi, Takayuki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80434950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、外減圧術のみならず、内減圧術が必要となった脳梗塞患者より梗塞巣のサンプルを採取し、ヒト由来(脳傷害/虚血誘導性幹細胞：injury/ischemia-induced neural stem cells: iNSPCs)の単離およびその特性に関して検討した。単離した脳梗塞巣は病理組織学的に壊死に陥っていたが、免疫組織化学染色にて神経幹細胞のマーカーであるnestin陽性細胞の発現を認めた。梗塞巣から単離した細胞を培養すると、高い増殖能を示し、その細胞はnestinを強発現していた。また、これらの細胞は、neurosphere様の細胞塊を形成し、神経細胞に分化することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of cerebral infarction, we have previously demonstrated that neural stem/progenitor cells (NSPCs) develop within ischemic areas. The injury/ischemia-induced NSPCs (iNSPCs) likely originate in part from brain pericytes and they have the potential to differentiate into neural lineages. However, it is essential to understand the traits of iNSPCs in human brain for possible applications in stem cell-based therapies for stroke patients. To examine this, putative iNSPCs were extracted from ischemic brain tissue obtained from elderly stroke patients requiring decompressive craniectomy and partial lobectomy for diffuse cerebral infarction. Immunohistochemistry showed that nestin+ iNSPCs were localized near blood vessels within ischemic areas. Isolated iNSPCs also expressed nestin and demonstrated high proliferative potential. Furthermore, they formed neurosphere-like cell clusters and differentiated into neuronal lineages in vitro.

研究分野：再生医療

キーワード：脳梗塞 幹細胞 神経再生

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでにマウス脳梗塞モデルを用い、脳傷害病態時に誘導される、新たなタイプの神経幹細胞 (脳傷害誘導性神経幹細胞、injury induced-Neural Stem/Progenitor Cells: iNSPCs) を発見し、その細胞が神経再生の鍵を握る幹細胞であり得ることを世界に先駆けて報告してきた。

しかしながら、今後、iNSPCs を介した神経再生療法を臨床応用に発展させていくためには、脳梗塞患者より単離したヒト由来 iNSPCs を用いた検討をさらに行う必要性がある。

2. 研究の目的

本研究では、内減圧術の適応となった脳梗塞患者の梗塞巣より、ヒト由来 iNSPCs の単離を試み、その特性を検討することで、iNSPCs を基盤とした新規神経再生療法の臨床応用を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

当大学の脳神経外科学と共同で、外減圧術のみならず、内減圧術が必要となった脳梗塞患者より梗塞巣のサンプルを採取し、ヒト由来 (脳傷害/虚血誘導性幹細胞: injury/ischemia-induced neural stem cells: iNSPCs) の単離およびその特性に関して検討する。

4. 研究成果

大脳から4例の脳梗塞巣サンプルを得ることができ、最初の2例のサンプルを中心に詳細な解析を行った。両症例とも、梗塞巣は病理組織学的に壊死に陥っていたが、免疫組織化学染色にて梗塞領域に神経幹細胞のマーカである nestin 陽性細胞の発現を認めた。nestin 陽性細胞はペリサイトマーカである NG2 や α SMA を発現していた。梗塞巣から単離した細胞を DMEM/F12, EGF, bFGF 等を添加した接着系培地で培養

すると、nestin を発現する細胞の増殖を認め、それらも in vivo の所見と同様にペリサイトマーカを発現していた。さらに、RT-PCR にて、それらの細胞は nestin 以外にも、c-myc, Klf4, Sox2 といった多能性幹細胞のマーカを発現していることが確認できた。FACS にて表面マーカを調べたところ、間葉系幹細胞 (MSC) のマーカである CD44, CD90, CD105, CD166 を発現していることが分かったが、その割合は MSC に比べて低かった。

これらの細胞を浮遊系で培養すると、neurosphere 様の細胞塊を形成し、Tuj1 陽性神経細胞に分化することも確認できた。また、この幹細胞は神経系以外の中杯葉系 (脂肪、骨、軟骨等) にも分化することから、多能性幹細胞 (ischemia-induced multipotent stem cells: iSCs) としての特性も有すると考えられた。

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 2件)

1. Tatebayashi K, Tanaka Y, Nakano-Doi A, Sakuma R, Kamachi S, Shirakawa M, Uchida K, Kageyama H, Takagi T, Yoshimura S, Matsuyama T, Nakagomi T. Identification of multipotent stem cells in human brain tissue following stroke, *Stem Cells and Development*, 26, 787-797, 2017. 査読有
2. Takagi T, Yoshimura S, Sakuma R, Nakano-Doi A, Matsuyama T, Nakagomi T. Novel regenerative therapies based on regionally induced multipotent stem cells in post-stroke brains: their origin, characterization, and perspective, *Translational Stroke*

Research, 8, 515-528, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

1. 高木俊範、立林洸太郎、別府幹也、蔵本要二、土居亜紀子、佐久間理香、中込隆之、松山知弘、吉村紳一. ヒト脳傷害誘導性多能性幹細胞の性状とその特徴、第17回日本再生医療学会総会、神奈川県横浜市、2018年3月21日
2. 松山知弘、中込隆之. Pericyte と脳梗塞治療、(指定講演)第43回日本脳卒中学会学術集会、福岡国際会議場、福岡県福岡市、2018年3月17日.
3. Kotaro Tatebayashi, Toshinori Takagi, Akiko Nakano-Doi, Rika Sakuma, Yasue Tanaka, Saeko Kamachi, Manabu Shirakawa, Kazutaka Uchida, Hiroto Kageyama, Takayuki Nakagomi, Tomohiro Matsuyama, Shinichi Yoshimura. Ischemia-induced multipotent stem cells in human cerebral infarction, International Stroke Conference 2018, Los Angeles Convention Center, Los Angeles, USA, 2018年1月24日.
4. 松山知弘、中込隆之. ペリサイトの起源と脳組織再生への関与、(シンポジウム)第60回日本脳循環代謝学会、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市、2017年11月4日.
5. 立林洸太郎、高木俊範、土居亜紀子、佐久間理香、田中康江、白川学、影山博人、内田和孝、蒲地紗栄子、中込隆之、松山知弘. ヒト脳梗塞組織における多能性幹細胞の同定、第60回日本

脳循環代謝学会、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市、2017年11月3日.

〔図書〕(計 3件)

1. 松山知弘、中込隆之、高木俊範、吉村紳一. 血行再建療法時代の脳保護療法と再生医療：虚血誘導性多能性幹細胞とその臨床応用への展開、分子脳血管病、vol. 17、No.1、21-25、2018. 査読無
2. 高木俊範、吉村紳一、中込隆之、松山知弘. 神経筋細胞による研究：傷害誘導性神経・多能性幹細胞、Clinical Neuroscience. 中外医学社、Vol. 36、No. 3、346-350、2018. 査読無
3. 中込隆之、佐久間理香、松山知弘. ニューロサイエンスの最新情報 脳虚血時の血管周皮細胞(ペリサイト)の役割、Clinical Neuroscience—細胞移植と神経再生—. 中外医学社、Vol. 34 No. 10、1174-1175、2016. 査読無

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中込 隆之 (NAKAGOMI, TAKAYUKI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80434950

(2) 研究分担者

松山 知弘 (MATSUYAMA, TOMOHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10219529

吉村 紳一 (YOSHIMURA, SHINICHI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40240353