

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590996

研究課題名（和文）マウス慢性脳低灌流モデルに対するヒト胚性幹細胞由来血管前駆細胞移植  
 研究課題名（英文）Transplantation of vascular progenitor cells derived from human ES cells in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion.

研究代表者

富本 秀和（Hidekazu Tomimoto）

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80324648

研究成果の概要（和文）：ヒト人工多能性幹細胞(iPS)由来血管前駆細胞（VPC）をマウス慢性脳灌流モデルに移植し、その生着条件を検討した。VPCを定位脳手術で慢性低灌流動物、偽手術動物の大脳皮質または線条体に投与したところ、慢性低灌流動物の線条体でのみVPCの生着と血管様構造の形成が確認された。虚血条件下で血管形成に必要な因子の存在が示唆される。

研究成果の概要（英文）：Vascular progenitor cells (VPC) derived from human iPS cells were transplanted into the striatum or cerebral cortex in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion, or sham-operation. Vessel-like structure were found exclusively in the striatum of the mice subjected to chronic cerebral hypoperfusion. In the striatum under chronic cerebral ischemia, there may be some factors to facilitate survival of VPC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：慢性脳虚血、血管前駆細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

長期にわたる脳血流の低下は虚血性白質病変、血管性認知症の原因となる。実際、両側頸動脈を慢性的に狭窄させて作成するマウス慢性脳低灌流モデル(Bilateral carotid artery stenosis;BCAS)では、1カ月の間、脳血流を正常の7割程度に低下させることで白質病変が作成可能であり、行動学的解析ではワーキングメモリの選択的低下が認められる。

いっぽう、近年アルツハイマー病の発症機

序においても血管因子の関与が指摘されている。血管因子がアルツハイマー病の病態に関与する機序は種々想定されているが、高血圧症などによって細動脈硬化が生じた結果、脳組織が慢性脳低灌流状態に曝されて病変が増悪する可能性が指摘されている。前記のBCASモデルにおいて脳血流の低下が8カ月間の長期にわたった場合には、海馬萎縮とともに参照記憶の障害が出現することが明らかになり（Nishio K et al., Stroke 2010）、慢性脳低灌流は血管性、変性性といった原因を問わず、認知症全般に関与することが明らか

になった。

慢性脳低灌流を改善する方策は、今後わが国で400万人に達すると予測される認知症患者の予防、治療を進める上で重要である。

認知症の原因になる脳血流低下に対して、血管再建効果が期待できる治療法として血管再生治療が挙げられる。特に、近年ES細胞より血管を構成する内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方に分化する血管前駆細胞 (Vascular Progenitor Cells; VPC) が同定されている。VPCをマウス慢性脳低灌流モデルに対して頸動脈的に投与することにより、脳内血管が新生し、慢性虚血脳の血管床が増加して脳血流が改増加することが期待できる。

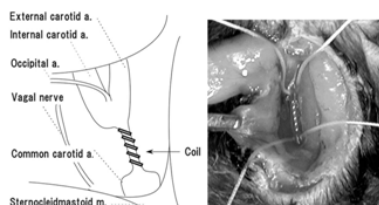
## 2. 研究の目的

本研究は申請時点では、マウス慢性脳低灌流モデルに対して胚性幹細胞 (ES細胞) 由来の血管前駆細胞を移植することを計画していた。しかし、膨大な患者数のある認知症患者を対象とする研究である点を考慮し、倫理的制約の少ない人工多能性幹細胞を用い、慢性脳虚血に対する血管前駆細胞移植の効果を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

C57BL/6Jマウスの両側頸動脈を露出し、内径0.18mmのマイクロコイルを外側から装着して狭窄させた (Fig. 1、BCAS)。左頸動脈狭窄と右頸動脈狭窄の間に30分間をおいて急激な血流の低下を回避した。術中の直腸温は36.5-37.5°Cにコントロールした。脳血流はレーザードップラー血流計で測定し、脳血流を手術前値の70-80%に低下させた。BCASによる術中死亡は、12匹中2匹 (17%) であった。

Fig. 1: Mouse model of chronic cerebral hypoperfusion

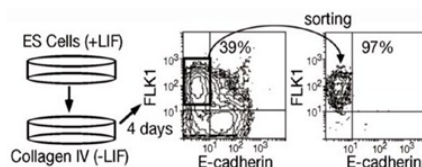


Cerebral blood flow can be controlled by placing microcoils with several inner diameters on bilateral common carotid arteries.

IV型コラーゲンで被覆した培養皿に leukemia Inhibitory Factor (LIF) 非存在下で

幹細胞を4日間培養し、Flk-1を発現した細胞をフローサイトメトリーで分画する。さらに3日間培養した後、50ng/ml VEGFを添加して of CD31 +陽性細胞をvascular progenitor cells (VPCs) として用いた (Fig. 2)。

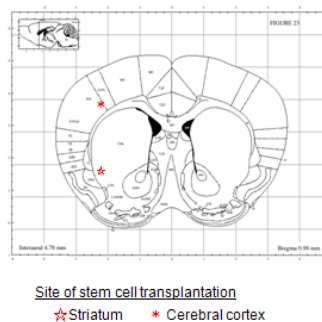
Fig. 2: Infection protocol of vascular progenitor cells.



Differentiation of Flk-1+ cells into endothelial and mural cells.

被移植マウスへのVPCs投与は定位脳手術装置を用いて行った。頭皮を切開し、径頭蓋的に大脳皮質、または、線条体にそれぞれ $1.0 \times 10^5$ この細胞をVPCs浮遊液として投与した。投与は定位脳手術台で麻酔下に行い、BCAS群 (N=5) および偽手術群 (N=5) に細胞を移植した。Fig. 3は移植部位を示す。

Fig. 3: Transplantation Protocol

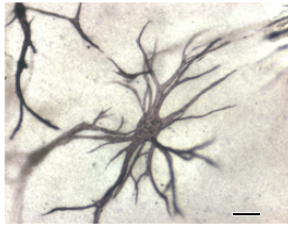


7日後に灌流固定して脳を取り出し、パラフィン切片を作成してHE染色、CD31免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

VPCは培養条件下におくと徐々に血管様の構造を形成した。Fig. 4にVPCの血管様構造をCD31免疫染色で示した。

Fig. 4: Vascular formation from vascular progenitor cells.

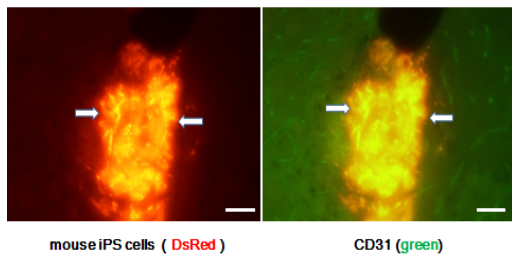


Vascular formation from vascular progenitor cells in 3-dimensional culture. Indicated by CD31-positive vascular endothelial cell. Scale bar: 100µm

BCAS群では移植細胞の生着を大脳皮質および線条体で認めたが、偽手術群では生着をまったく認めなかった。

蛍光二重標識を行うと、BCAS群の線条体で赤色に標識されるiPS由来VPCは移植細胞集団の内部に血管様構造を認め、その大部分はCD31と二重標識された (Fig. 5、矢印は血管様構造を示す)。

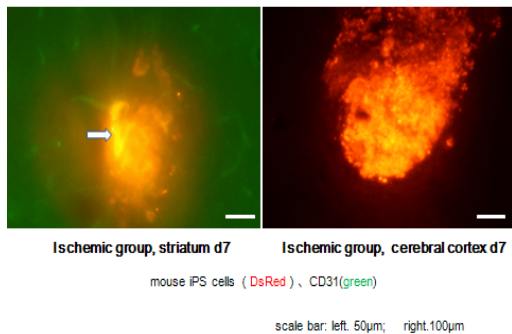
Fig. 5: Vascular formation in the Striatum



Seven days after transplantation, vascular formation could be achieved by transplanting iPS cells-derived VPCs into the chronically ischemic mouse brain predominantly in the striatum. scale bar: 100µm

いっぽう、BACS群の大脳皮質、偽手術群の線条体、大脳皮質ではこのような構造は認められず、血管様構造の形成はBCASの線条体に特徴的であった (Fig. 6、矢印は血管様構造を示す)。

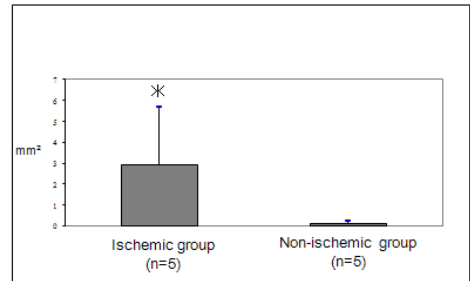
Fig. 6: Vascular formation by mouse iPS cells



Ischemic group, striatum d7 Ischemic group, cerebral cortex d7  
mouse iPS cells (DsRed), CD31(green)  
scale bar: left, 50µm; right, 100µm

血管様構造が形成された陽性面積を画像解析装置で定量評価したが、大脳皮質ではBCAS群/偽手術群とも血管構造を認めず、BCAS群の線条体でのみ、有意な血管構造の増加を認めた (Fig. 7)。

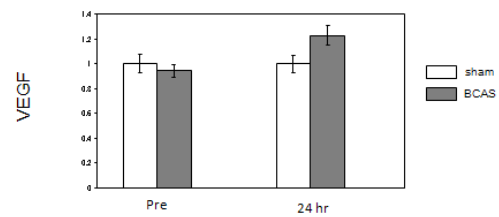
Fig. 7: Vascular formation area in the striatum



Vascular formation area in ischemic group are significantly greater than that in non-ischemic group.

血管構造の構築には血管新生因子の関与が示唆されており、実際に急性虚血脳ではVEGFやbFGFの増加が報告されている。このため、RT-PCRでVEGFを定量したが、大脳皮質・線条体のいずれの部位においても有意なVEGF mRNAの増加を認めなかった (Fig. 8)。

Fig. 8: mRNA expression of VEGF after BCAS.



Real time RT-PCR analysis demonstrated that mRNA expression of VEGF 24 hours after BCAS operation tended to be upregulated than non-ischemic group.

n=5  
p=0.09 compared with sham.

以上の結果から、慢性虚血脳では正常では起こらない VPCs の生着が認められること、特に線条体では血管様構造の形成が認められること、慢性虚血脳における VPCs の生着に VEGF 以外の血管新生因子が関与する可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Maki T, Ihara M, Fujita Y, Nambu T, Miyashita K, Yamada M, Washida K, Nishio K, Ito H, Harada H, Yokoi H, Arai H, Itoh H, Nakao K, Takahashi R, Tomimoto H. (査読あり) Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke*, 42:1122-1128, 2011
2. Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H., Takahashi R. (査読あり) Nonhypotensive dose of telmisartan attenuates cognitive impairment partially due to peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*, 41: 1798-1806, 2010
3. Nishio K, Ihara M, Yamasaki N, Kalaria RN, Makia T, Fujita Y, Ito H, Oishi N, Fukuyama H, Miyakawa T, Takahashi R, Tomimoto H. (査読あり) A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* 2010 Jun; 41(6): 1278-1284
4. Kitaguchi H, Tomimoto H., Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, Takahashi R. (査読あり) Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid deposition in APPSwInd transgenic mice. *Brain Research* 1294: 202-210, 2009
5. 鷺田和夫、猪原匡史、富本秀和：脳血管性認知症の分子病態。(査読なし) *Medical Science Digest* 34: 391-394, 2008

[学会発表] (計 1 件)

1. 鷺田和夫、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、仙台市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

富本 秀和 (Hidekazu Tomimoto)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80324648

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

鷺田 和夫 (Kazuo Washida)  
京都大学・大学院医学研究科神経内科・  
大学院生