

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460360

研究課題名(和文) 神経幹細胞の血管性nicheの解明および血管-神経相互作用物質の研究

研究課題名(英文) Elucidation of the vascular niche for the neural stem cells

研究代表者

山本 誠士 (Yamamoto, Seiji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：10456361

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)：成体脳において神経幹細胞の存在が知られているが、脳梗塞後の神経機能再生に足る神経前駆細胞誘導能は著しく低い。我々は新規血管-神経インタラクション分子を同定し、神経幹細胞の効率良い賦活化誘導を目的として研究を行った。血管内皮細胞由来小胞に含まれるmicro RNAが神経幹細胞の分化抑制に重要であることを見出した。さらに血管内皮細胞由来リガンドによって、神経幹細胞の増殖を活性化することも明らかにした。これらの結果から、脳血管内皮細胞は、神経幹細胞の分化増殖に対して、プレーキとアクセルを使い分けており、それこそが血管内皮細胞が提供する神経幹細胞のniche factorであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been known that adult brain has neural stem cells residing in the niche such as subventricular zone. Cerebral blood vessels are considered to be a source of soluble factors to interact with neural stem cells (NSCs). To clarify this, we conducted coculture experiment using cerebral blood vessel derived endothelial cell line and NSCs. We found that endothelial cell derived extracellular vesicles (E-EVs) included many kind of micro RNAs (miRNAs). In silico and in vitro studies showed that some of them could suppress the expression level of transcription factors that play an important role in neuronal differentiation. By real-time PCR analyses, the endothelial cell line produced a ligand that can activate a receptor type tyrosine kinase (RTK) expressed on the NSCs. Accordingly, we conclude that cerebral endothelial cells supply the two types of soluble factors as a niche for NSCs, which are miRNAs included in E-EVs and the ligand for activating the RTK.

研究分野：血管生物学、神経幹細胞学

キーワード：血管 神経幹細胞 EV niche

### 1. 研究開始当初の背景

神経難病や脳梗塞などによる神経傷害後の神経再生は、他の器官と比較して著しく再生能力が乏しい。成体において、神経幹細胞が脳室下帯(SVZ)や顆粒細胞下帯(SGZ)に存在することが知られており、脳血管との何らかのインタラクションが重要なのではないかと考えられてきた。

我々は新規血管-神経インタラクション分子を同定・解析するために血管内皮細胞と神経幹細胞を用いた *in vitro* での評価系を構築し、脳血管と神経幹細胞とのインタラクション解析の評価系として至適であるか研究を行ってきた。その過程で、血管内皮細胞由来 E-EVs に包含される micro RNA (miRNA) を多数発見し、その中の数種類が神経幹細胞から神経への分化抑制に重要な働きを有する可能性を見出した。

### 2. 研究の目的

脳血管が産生する未知の液性因子が神経幹細胞の stemness 保持や増殖にかかわるのではないかという仮説のもとに、これまでに構築してきた *in vitro* の評価系を用いて液性因子の探索と同定を行い、神経難病や脳梗塞などによる神経傷害後の神経再生に活用することを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

*In vitro* の評価系由来サンプルから、液性因子を分離し、解析を行った。解析対象の液性因子には E-EVs が含まれており、E-EVs に包含されている miRNA も対象とした。また、低分子蛋白質(増殖因子など)も解析対象とした。増殖因子や miRNA のスクリーニングには microarray や real-time PCR を施行した。また、増殖因子の発現の解析では、蛍光多重免疫染色や ELISA 解析を行った。

### 4. 研究成果

E-EVs に包含されている脳血管内皮細胞由来 miRNAs が、神経幹細胞から神経への分化を抑制している可能性について研究を行った。脳血管内皮細胞由来 miRNAs の一部が神経分化に重要である因子の発現を抑制するものと考えられたため、*in silico* 解析を行った。その結果、一部の miRNAs は神経分化に重要な転写因子を阻害する活性を有することが示唆された。そこで、一部の miRNAs が実際に神経分化を阻害する効果があるかを共培養系で確認する目的で、real-time PCR 解析や免疫染色などを施行した。その結果、E-EVs に包含されている一部の miRNAs が神経分化に重要な転写因子の発現情趣を抑制していることが示唆された。本結果より、血管内皮細胞が神経細胞に提供する niche factor として、細胞分化を抑制する液性因子の存在が明らかとなった。

また、*in vitro* 共培養系の結果から、血管内皮細胞の種類によって、receptor type tyrosine

kinase (RTK) に作用するリガンドの種類が異なることが real-time PCR 解析で示唆され、神経幹細胞の増殖に關与すると考えられた。成体内で神経幹細胞が存在する SVZ や SGZ には脳血管が近接している。そこで、*in vitro* 共培養系で絞り込まれたリガンドについて、マウス成体脳を用いて蛍光免疫染色を施行したところ、脳血管内皮細胞には本リガンドが局在していることが明らかとなった。並行して、*in vitro* 共培養系の ELISA 解析の結果も上記結果を支持するものであった。さらに、脳血管内皮細胞に局在している本リガンドを直接神経幹細胞に作用させた場合、容量依存的に RTK の発現量が増加し、転写因子の発現量が亢進し、さらに増殖にかかわるサイクリン遺伝子群の発現上昇が確認された。一方で、神経分化にかかわる転写因子の抑制はそれほど強くないことが示された。

以上の結果から、血管内皮細胞由来 miRNAs によって神経分化に対し負の調節を行い、RTK シグナル増強によって細胞増殖に対し正の調節を行っていることが示唆されることが明らかとなった。従って、脳血管内皮細胞は、神経細胞の分化増殖に対して、ブレーキとアクセルを使い分けており、それぞれが血管内皮細胞が提供する神経幹細胞の niche factor であると考えられた。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, **Yamamoto S**, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, **Sasahara M**, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, Kobayashi N, Saeki K, Usui I, Fujisaka S, Tobe K: CD206<sup>+</sup> M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nat Commun*, 2017, Accepted. 査読有.
2. **Yamamoto S\***, Muramatsu M, Azuma E, Ikutani M, Nagai Y, Sagara H, Koo B-N, Kita S, O'Donnell E, Osawa T, Takahashi H, Takano K, Dohmoto M, Sugimori M, Usui I, Watanabe Y, Hatakeyama N, Iwamoto T, Komuro I, Takatsu K, Tobe K, Niida S, Matsuda N, Shibuya M, **Sasahara M**: A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. *Sci Rep*, 2017, *in press*. 査読有.
3. Ishii Y, Hamashima T, **Yamamoto S\***, **Sasahara M**: Pathogenetic significance and possibility as a therapeutic target of platelet derived growth factor. *Pathol Int* 67, 235-246, 2017. 査読有. doi: 10.1111/pin.12530.
4. Yamazaki T, Nalbandian A, Uchida Y, Li W, Arnold TD, Kubota Y, **Yamamoto S**, Ema M,

- Mukouyama Y: Tissue myeloid progenitors differentiate into pericytes through TGF- $\beta$  signaling in developing skin vasculature. *Cell Rep* 18, 2991-3004, 2017. 査読有. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.069.
5. Onogi Y, Wada T, Kamiya C, Inata K, Matsuzawa T, Inaba Y, Kimura K, Inoue H, **Yamamoto S**, Ishii Y, Koya D, Tsuneki H, **Sasahara M**, Sasaoka T: PDGFR $\beta$  regulates adipose tissue expansion and glucose metabolism via vascular remodeling in diet-induced obesity. *Diabetes* 66, 1008-1021, 2017. 査読有. doi: 10.2337/db16-0881.
  6. Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, **Yamamoto S**, Aminuddin A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, **Sasahara M**, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K: HIF-1 $\alpha$  in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance. *Diabetes* 65, 3649-3659, 2016. 査読有. DOI: 10.2337/db16-0012.
  7. **Yamamoto S\***, Azuma E, Muramatsu M, Hamashima T, Ishii Y, **Sasahara M**: Significance of extracellular vesicles: pathobiological roles in disease. *Cell Struct Funct* 41, 137-143, 2016. 査読有. DOI: 10.1247/csf.16014.
  8. Morita S, Oya T, Ishii Y, Sabit H, Tokunaga A, Ishizawa S, **Yamamoto S**, Hamashima T, Kurashige Y, Matsushima T, Tsukada K, **Sasahara M**: The role of platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  in the activation of mouse hepatic stellate cells. *Toyama Med J*, 2016, *in press*. 査読有.
  9. Saito K, Nakaoka H, Takasaki I, Hirono K, **Yamamoto S**, Kinoshita K, Miyao N, Ibuki K, Ozawa S, Watanabe K, Bowles NE, Ichida F: MicroRNA-93 may control vascular endothelial growth factor A in circulating peripheral blood mononuclear cells in acute Kawasaki Disease. *Pediatr Res* 80, 425-432, 2016 査読有. doi: 10.1038/pr.2016.93.
  10. Zheng Y, **Yamamoto S**, Ishii Y, Sang Y, Hamashima T, De NV, Nishizono H, Inoue R, Mori H, **Sasahara M**: Glioma-derived PDGF-BB recruits oligodendrocyte progenitor cells via PDGFR $\alpha$  and remodels cancer stroma. *Am J Pathol* 186, 1081-1091, 2016. 査読有. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.12.020.
  11. Sato H, Ishii Y, **Yamamoto S\***, Azuma E, Takahashi Y, Hamashima T, Umezawa A, Mori H, Kuroda S, Endo S, **Sasahara M**: PDGFR- $\beta$  plays a key role in the ectopic migration of neuroblasts in cerebral stroke. *Stem Cells* 34, 685-698, 2016. 査読有. doi: 10.1002/stem.2212.
  12. Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, **Yamamoto S**, Hamashima T, Ishii Y, Tanaka M, Suganami T, **Sasahara M**, Miyake K, Takatsu K: Isoliquiritigenin attenuates adipose tissue inflammation in vitro and adipose tissue fibrosis through inhibition of innate immune responses in mice. *Sci Rep* 6, 23097, 2016. 査読有. doi: 10.1038/srep23097.
  13. Horikawa S, Ishii Y, Hamashima T, **Yamamoto S\***, Mori H, Fujimori T, Shen J, Inoue R, Nishizono H, Itoh H, Majima M, Abraham D, Miyawaki T, **Sasahara M**: PDGFR $\alpha$  plays a crucial role in connective tissue remodeling. *Sci Rep* 5, 17948, 2015. 査読有. doi: 10.1038/srep17948.
  14. Sugimori M, Hayakawa Y, Boman BM, Fields JZ, Awaji M, Kozano H, Tamura R, **Yamamoto S**, Ogata T, Yamada M, Endo S, Kurimoto M, Kuroda S: Discovery of power-law growth in the self-renewal of heterogeneous glioma stem cell populations. *PLoS One* 10, e0135760, 2015. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0135760.
  15. **Yamamoto S\***, Niida S, Azuma E, Yanagibashi T, Muramatsu M, Huang TT, Sagara H, Higaki S, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Miyazaki K, Hamashima T, Mori H, Matsuda N, Ishii Y, **Sasahara M**: Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. *Sci Rep* 5, 8505, 2015. 査読有. doi: 10.1038/srep08505.
- 〔学会発表〕(計 17 件)
1. **Yamamoto S**, Azuma E, Ishii Y, Hamashima T, Sato H, **Sasahara M**: PDGFR $\beta$  plays an important role in the ectopic migration of neuroblasts in association with blood vessels in cerebral stroke. The 14th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, December 8-10, 2016, Nagasaki, Japan: Oral Session 2, Aging/Pulmonary hypertension/Others: OS2-2.
  2. **山本誠士**: 中枢神経系ペリサイトの起源に迫る(座長・招待講演演者). 第 39 回日本分子生物学会年会, シンポジウム 1A2 ペリサイトを認識し研究することの重要性, 2016 年 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日, 横浜, 1A2-6.
  3. **Yamamoto S**, Ishii Y, Hamashima T, Sato H, Azuma E, **Sasahara M**: PDGFR $\beta$  plays a key role in the ectopic migration of neuroblasts along with blood vessels in cerebral stroke. The 19th International Vascular Biology Meeting, October 30-November 3, 2016, Boston, Massachusetts, USA: T043.
  4. Kitahara H, **Yamamoto S**, Kajikawa S, Azuma E, Hamashima T, Ishii Y, Sato H, Shimada Y, **Sasahara M**: Developed novel

- rodent model of diabetic retinopathy after conditional Pdgfrb gene targeting. The 19th International Vascular Biology Meeting, October 30-November 3, 2016, Boston, Massachusetts, USA: T107.
5. Satou H, Yamamoto S, Kuroda S, Sasahara M, Watanabe S, Watanabe K: PDGFR-β plays a key role in the ectopic migration of neuroblasts in cerebral stroke. 5<sup>th</sup> Mt.BANDAI & Pan-Pacific Joint Neurosurgical Convention, April 7-10, 2016, Phnom Penh, Cambodia: 8PS3-5.
  6. 山本誠士: Micro RNA による細胞間互恵関係の構築様式(招待講演者). 第45回日本心脈管作動物質学会年会, シンポジウム 4 心脈管作動物質としてのマイクロRNA, 2016年2月5日~6日, 徳島, S4-2.
  7. 山本誠士: 血管炎症モデルにおける血管内皮細胞とペリサイトのインタラクション(座長・招待講演者). 第23回日本血管生物医学会学術集会(CVMW2015), シンポジウム 7 血管・リンパ管のperivascular cellの多面的機能を理解する, 2015年12月10日~12日, 神戸, S7-JV-7.
  8. 山本誠士: 神経発生期における血球系由来ペリサイトの動態(座長・招待講演者). 第38回日本分子生物学会年会(BMB2015), ワークショップ 2W27-p 周皮細胞(pericyte)の病態生理学的重要性, 2015年12月1日~4日, 神戸, 2W27-p-1.
  9. Yamamoto S: Analysis of the inflammation related miRNA encapsulated in the endothelial derived extracellular vesicles. The 13th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, October 16-17, 2015, Busan, Korea: Session I, Vascular Inflammation and Aging; Invited speaker.
  10. Yamamoto S, Azuma E, Hamashima T, Ishii Y, Sasahara M: Secreted miRNA plays an important role in the endothelial vascular niche. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan: P-273.
  11. Azuma E, Yamamoto S, Muramatsu M, Hamashima T, Ishii Y, Niida S, Sasahara M: Multifunctional macrophages contribute to angiogenesis and vascular homeostasis in skin wound healing site. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan: P-107.
  12. Sato H, Yamamoto S, Sasahara M: Redirected migration of the DCX+ cells guided by blood vessels toward ischemic core. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan: P-415.
  13. Horikawa S, Yamamoto S, Hamashima T, Ishii Y, Sasahara M: PDGFR-α is essential

- for the connective tissue remodelling. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan: P-150.
14. Dang TC, Ishii Y, Yamamoto S, Hamashima T, Ohkawa N, Saitoh Y, Inokuchi K, Mori H, Sasahara M: PDGFR-α regulates the dynamism of oligodendrocytes through recruitment of perivascular mesenchymal stem cells in the adult mouse brain. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan: P-279.
  15. Yamada K, Yamamoto S, Hamashima T, Ishii Y, Noguchi M, Sasahara M: PDGF receptor dimers drive distinct migration of the mouse skin fibroblast. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan: P-373.
  16. Shen J, Ishii Y, OuYang X, Yuan J, Zhu R, Xu G, Dang TC, Hamashima T, Matsushima T, Yamamoto S, Sasahara M: Involvement of PDGFR-β in blood-brain barrier function after cerebral ischemia. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan: P-576.
  17. 山本誠士: Pericyte in Health and Disease (招待講演者). 脈管クラスター研究講演会, 2014年3月28日, 旭川医科大学, 旭川.

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pathol2/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山本 誠士 (YAMAMOTO, Seiji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号: 10456361

### (2)研究分担者

笹原 正清 (SASAHARA, Masakiyo)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 20154015

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし