

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19591702
 研究課題名 (和文) 自己細胞由来の生理活性物質を利用した内在性神経幹細胞の活性化と神経再生誘導
 研究課題名 (英文) Activation of intrinsic neural stem cells and induction of neural regeneration using a biologic molecule derived from cells in the brain
 研究代表者
 並木 淳 (NAMIKI JUN)
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号： 20189195

研究成果の概要 (和文) : 脳損傷後の機能回復を可能にする新規治療法の開発を目標として、実験動物を用いた基礎研究を行った。成体哺乳類の脳内に存在する内在性神経幹細胞からの新生神経細胞の産生が、脳脊髄液中あるいは血管網周囲に分泌される可溶性蛋白質による制御を受けているとの仮説に基づき、新生血管の内皮細胞が産生する生理活性物質を同定し、その神経幹細胞に対する活性化の作用を明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : To aim for a novel therapeutic approach that accomplishes functional recovery after brain injury, we performed basic research using experimental animals. We hypothesized that production of new neurons from intrinsic neural stem cells of the adult mammalian brain was regulated by soluble proteins secreted into the cerebrospinal fluid or parenchyma around vascular networks. We identified a biologic molecule that was secreted from endothelial cells of newly generated vasculature, and showed its effect of activation for neural stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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： 再生医学、生理活性、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷や脳虚血などの脳損傷に対する現在の治療法は、頭蓋内圧のコントロールを主体とした 2 次的な脳損傷の抑制であり、不可

逆的に傷害された 1 次的脳損傷に対する根本的な治療手段は未だ開発されていない。げっ歯類において、胎生期に限らず成体になっても嗅球あるいは海馬に持続的に新生ニュー

ロンを供給する神経幹細胞の存在が明らかとなり (Lois and Alvarez-Buylla, *Science* 1994; Gage et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 1995)、さらに成体ヒトでの神経幹細胞の発見により (Pincus et al, *Annals of Neurology* 1998)、中枢神経系においても神経再生の可能性が示された。しかし、内在性神経幹細胞が有する新生ニューロン産生能は乏しく、損傷脳ではそれを阻害する脳内環境が存在する。さらに、細胞移植により供給された新生ニューロンでは、既存ニューロンとの機能的神経回路網の構築という大きな課題を克服しなければならない。Nakatomi ら (Nakatomi et al, *Cell* 2002) は、増殖因子を脳室内に投与することによって神経前駆細胞の増殖を促し、脳虚血後の海馬で新生ニューロンが産生されることを報告した。研究代表者の所属する研究グループは、増殖因子 epidermal growth factor (EGF) 投与後のニューロン新生の促進が、脳室下帯の transit-amplifying cell の増殖によることを明らかにした (Ninomiya et al, *Neurosci Lett* 2006)。しかしこれらの報告は、神経幹細胞からのニューロン新生を選択的に促進しているわけではなく、投与された増殖因子は未分化細胞の非選択的な細胞増殖をもたらすため、臨床応用に際しては悪性細胞を増殖誘導する危険性を否定できない。また、われわれの研究グループでは、マウス脳虚血後に脳室下帯の神経幹細胞から分化した新生ニューロンが、線条体のニューロンとシナプスを形成することを報告した (Yamashita et al, *J Neurosci* 2006)。すなわち、成体脳が有している内在性神経幹細胞からの新生ニューロン産生能を選択的に促進することにより、損傷脳において失われたニューロンを補充し、2 次的脳損傷を免れたニューロンとのシナプス形成による、機能的神経回路網の構築が可能になると推測される。このためには、成体脳における内在性神経幹細胞からの新生ニューロン産生 (adult neurogenesis) の制御メカニズムを明らかにする必要がある。

神経幹細胞が存在する側脳室の脳室下帯 (subventricular zone; SVZ) の細胞構築は、マウスにおいて電子顕微鏡学的に詳細に検討されている (Doetsch et al, *J Neurosci* 1997)。成体の内在性神経幹細胞は、脳室壁を構成する上皮細胞により脳室と隔てられている。上皮細胞は脳室内へ向け多数の cilia を有するが、神経幹細胞も上皮細胞の間に細い細胞突起を伸ばして脳脊髄液と接触し、1 本の cilium を伸ばしていることが示された (Doetsch et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999)。しかし、神経幹細胞が脳脊髄液と接触していることの生理学的意義については明らかにされていない。一方、内在性神経幹細胞の活性化や新生ニューロンの産生に関

与する内在性因子としては、側脳室上皮細胞に発現する Noggin (Lim et al, *Neuron* 2000)、血管内皮細胞から産生される未知の生理活性物質 (Shen et al, *Science* 2004)、そして上皮細胞・血管内皮細胞・アストロサイトに発現している pigment epithelium-derived factor (PEDF) (Ramirez-Castillejo et al, *Nat Neurosci* 2006) が報告された。ところが、これらの可溶性蛋白質が脳脊髄液を介することによって、神経幹細胞の neurogenesis を制御するメカニズムが存在する可能性については報告がない。

2. 研究の目的

本研究は、外傷性および虚血性脳損傷後の機能回復を可能にする新規治療法の開発を目標として、側脳室周囲に存在する内在性神経幹細胞からの新生ニューロンの産生が、脳脊髄液中あるいは血管網周囲に分泌される可溶性蛋白質による制御を受けているとの仮説に基づき、新生血管や脈絡叢の血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell, EPC) が産生する生理活性物質を利用した細胞療法へ向けた基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 成体マウス骨髄単核球から血管内皮細胞の選択的培養条件にて EPC の初代培養を行う。EPC の形成は免疫組織学的に確認する。増殖因子を含有しない神経幹細胞増殖培地に交換し、EPC から分泌される可溶性蛋白質を培養上清中に採取する (EPC-CM)。胎仔マウス線条体細胞を用いた neurosphere 法にて、EPC-CM を作用させた神経幹細胞/前駆細胞塊を得る。それらの細胞をさらに継代して神経幹細胞の増殖培養条件にて neurosphere 形成率を算出することにより、神経幹細胞に対する自己複製の促進効果を検討する。骨髄間質細胞 (marrow stromal cell, MSC) が分泌する液性蛋白質 (MSC-CM)、および増殖因子を加えた神経幹細胞増殖培地 (MHM+GF) を対照群として比較する。

EPC-CM を濃縮し、浸透圧ミニポンプを用いて成体マウスの側脳室内に持続投与する。神経幹細胞を BrdU の long labeling により選択的に標識し (Doetsch et al, *Cell* 1999)、脳室下帯における BrdU 陽性細胞数をカウントする。神経幹細胞の非対称性分裂により産生される transit-amplifying cell を BrdU の short labeling により標識し (Chiasson et al, *J Neurosci* 1999)、両者の陽性細胞数を溶媒投与の対照群と比較することにより、神経幹細胞の自己複製の促進効果について検討する。

(2) EPC-CM を 2 次元電気泳動し、MSC-CM を対照として発現量の差の認められたスポットについて質量分析を行い、蛋白質の同定を行う。

(3) EPC 由来の神経幹細胞活性化因子として同定された蛋白質 "EPC niche factor" について、リコンビナント蛋白質を作成する。*In vitro* で胎仔マウス線条体細胞を用いた neurosphere 法により、神経幹細胞の自己複製に対する促進効果を検証する。

(4) 同定された蛋白質 "EPC niche factor" に対する抗体を用いて *in vivo* における発現を免疫組織学的に検討し、脳実質内や側脳室脈絡叢の血管内皮細胞での発現を確認する。

4. 研究成果

(1) EPC が産生する生理活性物質が有する、神経幹細胞に対する niche factor としての作用を *in vitro* ならびに *in vivo* で検討した。

Neurosphere 法にて、EPC-CM では増殖因子の存在なしに小さな neurosphere の形成が可能で、それらの細胞の neurosphere 形成率は、MSC-CM あるいは MHM+GF の対照群と比較して有意に高かった (図 1)。すなわち、EPC-CM は神経幹細胞の維持と自己複製を促進する作用を有することが示された。

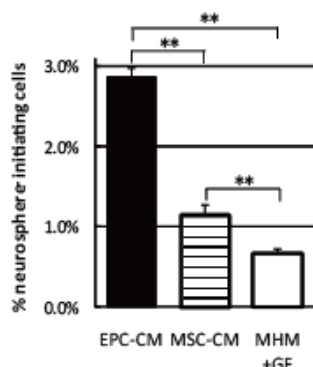


図 1

EPC-CM をマウス側脳室内に 7 日間持続投与すると、BrdU の長期投与 (BrdU long) によりラベルされる側脳室周囲の神経幹細胞の数は、対照群に比べて有意に増加していた。一方、BrdU の 1 回投与 (BrdU short) によりラベルされる transit-amplifying cell の数は減少し、投与終了の 1 日後 (BrdU short-1d) で増加が認められた (図 2)。以上の結果から、EPC が分泌する可溶性蛋白質は、神経幹細胞の維持と自己複製に関わる niche factor としての性質を有していることが示された。

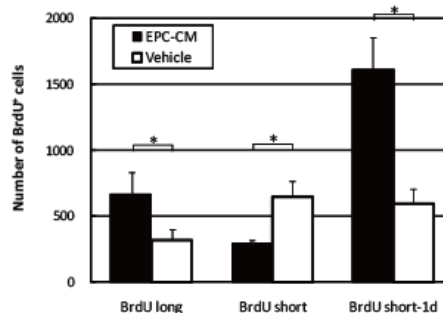


図 2

(2) EPC-CM と MSC-CM の 2 次元電気泳動の結果を比較した (図 3)。EPC から特異的に分泌された因子のうち、発現の高かったスポット (図 3、矢印) について質量分析を行い、神経幹細胞に対する niche factor として、骨髄由来の EPC が特異的に分泌する 45kD の蛋白質 EPC niche factor を同定した。

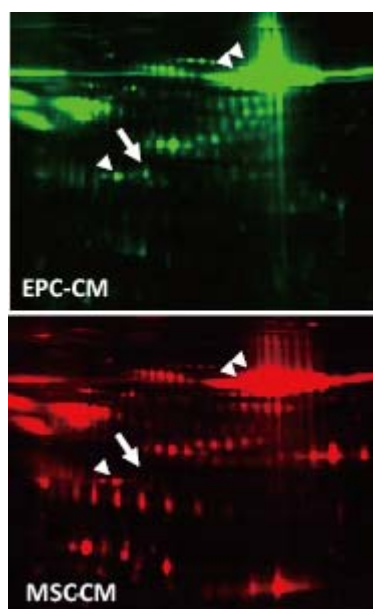


図 3 (矢頭は β -actin。2 重矢頭は transferrin)

EPC niche factor のアミノ酸配列はこれまでに神経幹細胞に対する niche factor の候補蛋白質として脳内の血管内皮細胞に発現が報告されている PEDF (Ramirez-Castillejo et al, *Nat Neurosci* 2006) とは異なり、niche factor としては新規の蛋白質であった。EPC niche factor の発現は、成熟血管内皮細胞や MSC、血管内皮細胞セルラインでは認められず、幼若新生血管に特異的であった (図 4)。



図 4

(3) EPC 由来の神経幹細胞活性化因子として同定された蛋白質 "EPC niche factor" のリコンビナント蛋白質を作成し、*in vitro* で神経幹細胞の自己複製への効果を検証した。胎仔マウス線条体細胞を用いた neurosphere 法にて、そのリコンビナント蛋白質を添加した培地では、EPC-CM と同様、増殖因子の存在なしに小さな neurosphere の形成が可能で、それらの細胞の neurosphere 形成率は、対照群と比較して有意に高かった (図 5)。EPC niche factor の siRNA を EPC にトランスフェクトさせ、EPC からの EPC niche factor の産生を阻害することにより、神経幹細胞に対する自己複製促進効果は消失した。

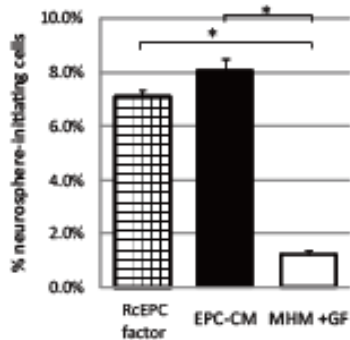


図 5

(4) 同定された EPC niche factor に対する抗体を用いて、野生型マウスの新生ニューロン産生領域 (neurogenic niche) における *in vivo* で発現を免疫組織学的に検討した。生体内においても、成体マウス側脳室下帯の EPC に EPC niche factor の発現が認められることを免疫組織学的に検出した (図 6)。

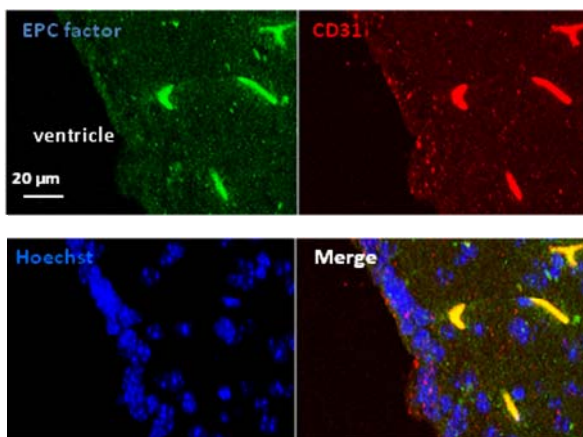


図 6

(5) 神経幹細胞のマーカー蛋白質として知られる nestin が、マウス骨髄由来の EPC においても発現していることを、EPC niche factor に関する一連の研究により発見した (図 7)。

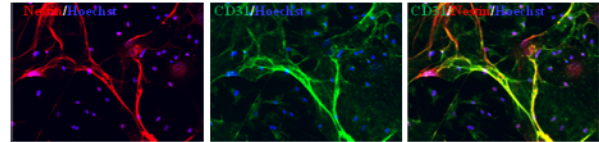


図 7

神経幹細胞において特異的に nestin の発現を誘導する nestin 遺伝子の第 2 イントロンエンハンサーは、EPC においては発現していないことを遺伝子改変動物 (E/nestin:EGFP mouse, Kawaguchi et al. *Mol Cell Neurosci* 2001) による実験から明らかにした (図 8)。

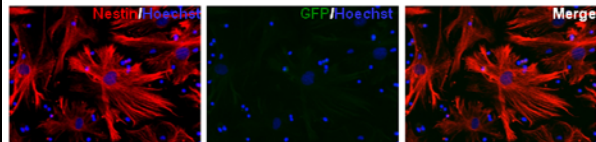


図 8

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)

- ① Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Matsuzaki Y, Okano H: The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem*, 査読あり, 2010 Apr 26 [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 2 件)

- ① 並木淳, 鈴木さゆり, 松崎有未, 岡野栄之: 血管内皮細胞におけるネスチン発現. 第 9 回日本再生医療学会総会, 2010 年 3 月 18 日, 広島市
- ② Namiki J, Suzuki S, Shibata S, Matsuzaki Y, Okano H: A vascular niche factor for neural stem cells. The 7th Stem Cell Research Symposium, 2009 年 5 月 15 日, 東京都

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称： 神経幹細胞に対する新規ニッシェ蛋白質

発明者： 並木 淳

権利者： 学校法人慶應義塾

種類： 特許

番号： 特願 2010-101415

出願年月日： 2010年4月26日

国内外の別： 国内

○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

並木 淳 (NAMIKI JUN)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20189195

(2) 研究分担者

松崎 有未 (MATSUZAKI YUMI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：50338183

(3) 連携研究者

船曳 知弘 (FUNABIKI TOMOHIRO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90317256