

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650173

研究課題名(和文)脳傷害誘導性神経幹細胞の血管分化能に関する検討

研究課題名(英文)Examination of angiogenic potential of brain-derived injury-induced neural stem cells

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳梗塞病態下で誘導される脳傷害誘導性神経幹細胞(iNSPCs)が神経系の細胞のみならず、血管系の細胞にも分化し得る多分化能を有するかどうかに関して検討した。その結果、iNSPCsは虚血負荷にて多能性幹細胞としての特性を獲得し、培養条件により、神経系と血管系の細胞の両方のlineageの細胞に分化することが明らかとなった。以上の所見は脳傷害後の梗塞領域では、神経及び血管の修復機構が同時に起こり得ることを強く示唆しており、iNSPCsは脳梗塞などの脳傷害病態下における神経・血管再生機構にとって重要な役割を果たしているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether injury-induced neural stem/progenitor cells (iNSPCs) that are induced following ischemic stroke have the multipotency to differentiate into vascular cells as well as neural cells. We found that iNSPCs acquire multipotential stem cell activity following ischemic stroke and differentiate into both neural and vascular cells under certain conditions. These findings strongly suggest that neurogenesis and vasculogenesis can occur simultaneously. In addition, this indicates that iNSPCs play an important role in neurovasculogenesis under brain injuries, such as ischemic stroke.

研究分野：再生医学

キーワード：神経再生 血管新生 神経幹細胞 多能性幹細胞 脳梗塞 虚血

## 1. 研究開始当初の背景

脳が虚血/梗塞性変化をきたすと、元々存在していた成熟神経細胞(ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト)は消失する。しかしながら、我々は、脳梗塞領域には、これらの細胞に分化する能力を有する内在性神経幹細胞 [脳傷害誘導性神経幹細胞 (injury-induced neural stem/progenitor cells; iNSPCs)]が誘導されることを、マウス脳梗塞モデル(中大脳動脈永久閉塞モデル)にて発見し、その単離にも成功した (Eur J Neurosci, 2009)。

神経幹細胞(neural stem/progenitor cells; NSPCs)は、狭義には自己増殖能を有し、神経系の細胞にのみ分化可能な幹細胞であると考えられてきた。しかしながら、近年、神経幹細胞(NSPCs)のサブタイプの中には、神経系以外の細胞にも分化可能な多分化能を有する幹細胞が存在することが報告されているが、神経系、血管系の両方の lineage に分化可能な NSPCs の特性や起源に関してはよく知られていない。

## 2. 研究の目的

発生過程における神経幹細胞は外杯葉である神経管(神経上皮細胞)に由来するものの、血管前駆細胞等の血管系の細胞は中杯葉に由来する。しかしながら、我々が脳傷害過程で発見した iNSPCs は外杯葉、中杯葉、内杯葉のいずれでもなく、“第4の杯”とされる神経堤(Neural Crest)を起源とする血管周皮細胞(ペリサイト)に由来する(Stem Cells Dev, 2011)。

ペリサイトは一般的に中杯葉(mesoderma)に由来すると考えられているが、脳のペリサイトは神経堤(neural crest)に由来し、神経堤は間葉系に加え、神経系の特性も有する。ペリサイトは多分化能を有し、神経系以外の細胞にも分

化可能な多能性幹細胞としての特性を有するが、虚血病態下におけるその役割や動態に関しては不明な点が多い。私たちは、ペリサイト由来 iNSPCs が神経系の細胞に分化可能であることを既に明らかにしてきたが、iNSPCs が神経系、血管系の両方の lineage に分化し得るかどうかに関しては不明である。

本研究では、脳梗塞病態下において特異的に誘導される iNSPCs が、神経系、血管系の細胞に分化可能な多能性幹細胞としての特性を有するかどうかに関して検討した。

## 3. 研究の方法

6~10週令の雄CB-17マウスを用い、左中大脳動脈の永久閉塞にて脳梗塞を作製した。脳梗塞後3日目に、iNSPCsの起源である虚血誘導性ペリサイト(ischemic pericytes; iPCs)を脳梗塞領域より単離し、DMEM、EGF、FGF、N2等を添加した培地にて培養した。iPCsを神経、血管分化培養条件にてそれぞれ培養し、得られた細胞の特性を免疫組織化学染色、RT-PCR等にて検討した。また、血管分化能を確認するために、血管分化培養条件にて培養したiPCsをマトリゲルで処理したdish上で分化させ、tube-formationの有無についても検討した。

## 4. 研究成果

iPCsはペリサイトマーカー(PDGFR $\beta$ 、NG2、 $\alpha$ SMA)や神経幹細胞マーカー(nestin)を発現し、同時に、多能性幹細胞のマーカーであるSox2、c-myc、Klf4、Nanog等を発現していた。iPCsはSox2の発現が強くなるに従い、様々な神経系のマーカーを発現し、Sox2を強制発現させると、神経系のマーカーが誘導されることも確認した。また、iPCsは神経系の特性を獲得するに従い、ペリサイトマー

カー (PDGFR $\beta$ 、 $\alpha$ SMA) や間葉系マーカー (Sox9、Twist、Snail、Slug 等) の発現を減弱させることが分かった。以上より、iPCs は Mesenchymal-epithelial transition (MET) 様のメカニズムを介して、神経系の特性を確立することが示唆された。

次に、iPCs の血管系への分化能について検討した。iPCs は CD144 (VE-cadherin) 等のマーカーを同時に発現しており、vascular stem cell としての特性も持つことが分かった。また、血管系への分化培養条件下にて、iPCs は tube-formation を形成し、CD31 陽性血管内皮細胞へも分化した。

以上の所見より、iPCs は神経系のみならず、血管系の細胞へも分化することが明らかとなった。脳のペリサイトは、神経系と血管系の細胞とともに neurovascular unit (NVU) を形成しているが、脳梗塞等の傷害により、NVU は破綻する。脳梗塞後に内在性に誘導される iPCs は、神経系と血管系の両方の lineage に分化可能な幹細胞であるため、今後、生体内における iPCs の分化、増殖因子を同定することにより、iPCs を標的とした NVU の再構築による神経再生療法への応用が期待される。

#### 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. Nakagomi T, Kubo S, Nakano-Doi A, Sakuma R, Lu S, Narita A, Kawahara M, Taguchi A, Matsuyama T. Brain Vascular Pericytes following Ischemia have Multipotential Stem Cell Activity to Differentiate into Neural and Vascular Lineage Cells. Stem Cells, 33, 1962-1974, 2015. 査読有.

2. Nakagomi T, Nakano-Doi A, Kawamura M, Matsuyama T. Do Vascular Pericytes Contribute to Neurovasculogenesis in the CNS as Multipotent Vascular Stem Cells? Stem Cells Dev. 2015, in press. 査読有.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 松山知弘、中込隆之. 脳ペリサイトをめぐる脳保護と再生. 第 26 回日本脳循環代謝学会総会、岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市、2014 年 11 月 22 日.
2. 中込隆之、土居亜紀子、佐久間理香、河原麻衣子、成田彩、田中康恵、柴田啓貴、中田雅代、川村美貴、松山知弘. 脳梗塞後の BBB 再構築能を持つ多能性幹細胞としてのペリサイト. 第 26 回日本脳循環代謝学会総会、岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市、2014 年 11 月 21 日.
3. 中込隆之、松山知弘. 脳梗塞後の修復メカニズムと細胞治療 (Post-Stroke Repairing Mechanism and Cell Therapy) -大脳皮質梗塞巣由来、傷害誘導性神経幹細胞. 第 24 回日本脳循環代謝学会総会、リーガホテル広島、広島県広島市、2012 年 11 月 9 日.
4. 松山知弘、中込隆之. 脳梗塞後に誘導される脳軟膜由来神経幹細胞. 第 37 回日本脳卒中学会総会、福岡国際会議場、福岡サンパレス、福岡県福岡市、2012 年 4 月 27 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
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) 連携研究者

松山 知弘 (MATSUYAMA, TOMOHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10219529

田口 明彦 (TAGUCHI, AKIHIKO)

(財)先端医療振興財団・研究部・  
部長

研究者番号：10359276

相馬 俊裕 (SOMA, TOSHIHIRO)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40273619