

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293093

研究課題名(和文) PDGFが誘導する幹細胞を標的とした神経組織の再生と修復

研究課題名(英文) Involvement of PDGF in stem-cell based neural regeneration

研究代表者

笹原 正清 (SASAHARA, Masakiyo)

富山大学・医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：20154015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中、外傷、種々の変性疾患など、多数の神経組織疾患のほとんどが重篤で機能回復が困難です。本研究課題では、マウスを用いた研究において、脳に豊富に発現する血小板由来増殖因子が神経細胞の幹細胞を刺激し、脳卒中後の神経細胞の再生を誘導しました。さらに血小板由来増殖因子が動員する新しい幹細胞が、神経細胞の活動に必須である髄鞘を形成する細胞の維持や再生に関与しました。今後の神経疾患の治療に向けて、血小板由来増殖因子は重要な標的であり、さらに研究を継続することが必要です。

研究成果の概要(英文)：Many of neurological diseases including stroke, trauma, and degenerative diseases are serious and incurable. In the present study, platelet-derived growth factor (PDGF) expressed in the brain was involved in the robust neurogenesis observed after experimentally induced stroke in mouse brain. Myelin is a crucial component of the brain for the neurological activities, and is often damaged in stroke, demyelinating diseases and in others. PDGF further mediated novel homeostatic control of myelin forming cells, in which, extensive cellular dynamics of myelin forming cells were induced by recruitment of new stem cells in a PDGF dependent manner in adult mouse brain.

After all, the present project uncovered the involvement of PDGF in the novel regenerative mechanism of brain through multiple pathways. Therefore, PDGF is a hopeful target for regenerative medicine of the nervous system, and further studies are required to establish regenerative medicine of the nerve tissue.

研究分野：実験病理学

キーワード：血小板由来増殖因子 受容体 神経賦活因子 再生 虚血 髄鞘 稀突起膠細胞 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

虚血等の種々の損傷局所から放出された因子が血管周囲や骨髄に分布する幹細胞を動員することが主たる生体に内在する再生・修復機構の一つであり、その機序の解明と促進が再生医療の推進に必須である。梗塞脳では、脳室下帯 (SVZ) において神経幹細胞の増殖と分化が生じ、これらが病変部へ動員される。多発性硬化症のみならず虚血等の多数の神経疾患で髄鞘形成性の稀突起膠細胞 (OL) が最初に障害される細胞となりこれを補うため前駆細胞 (OPC) が病変に動員される機序が想定されている。これらの幹細胞や前駆細胞の動員とともに、血管の新生をともなう組織変化が持続的な組織再生には必須である。しかしながらこれらの修復、再生機能は明らかに不十分であり、損傷脳の機能回復や多数の難治性神経疾患の治療には、脳に内在すると推定される再生機序を大幅に活性化させる戦略の樹立が喫緊の課題である。

血小板由来増殖因子 (PDGF) は受容体 (PDGFR) とともに脳に発現し、神経賦活因子としての役割が期待されている。PDGFR β は神経幹細胞や血管周囲細胞に発現する。同様に PDGFR α は OPC に特異的に発現している。これらの PDGFR は、発達脳において神経や OL 細胞分化と成熟、脳血液関門の樹立を含む血管の成熟に関与している。しかしながらいずれの PDGFR とも、特に成熟神経組織の再生、修復における役割は未解明である。同様に全身臓器の組織修復や変化に関与する骨髄幹細胞も両 PDGFR を発現するがそれらの役割は不明である。

2. 研究の目的

脳神経幹細胞や血管周囲細胞に高発現する PDGFR β 、さらに OPC 特異的に高発現する PDGFR α が、様々な侵襲に対する神経組織変化に於いて果たす役割を明らかにする。成体に内在する未解明の再生能力を明らかにし、脳梗塞や脱髄性疾患等により損傷された神経組織への再生や修復の誘導のための手がかりを得ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

Cre-loxP 法により作製した PDGFR 遺伝子の条件的ノックアウト (KO) モデルを使用した実験を行う。Cre recombinase 発現を誘導する Promoter の選択により発現部位を制限することや、誘導型の Cre により遺伝子 KO 時期の調整などを実施することにより、元来の単純な KO が新生仔期に致死であることを回避して、成体での PDGFR の機能解析を可能とする実験モデルである。

4. 研究成果

神経系細胞特異的に PDGFR β KO を誘導したマウスの脳梗塞巣周囲に、これまでに報告のない高度の神経新生が見られることを見

出した。神経幹細胞での Integrin 発現の亢進による細胞遊走能の亢進と、脳梗塞巣での神経幹細胞の増殖因子である CXCL12 発現の亢進が複合して神経新生を誘導した事が推定された。梗塞脳にはこれまでの報告を超えた再生能力があり、これが PDGFR β により制御されていることを示した。Media にも取り上げられ、患者様からの問い合わせなど大きな社会的反響があった。同時に、ヒト脳梗塞急性期には血中に間葉系幹細胞 (Muse 細胞) が増加していることを示した。これらが損傷脳の機能回復に寄与することが期待される。

当該マウスの解析では、PDGFR β が線条体淡蒼球の中型有棘神経細胞において、ドーパミン受容体による樹状突起上のスパイン形成と ERK シグナル惹起に関与した。加えて、当該マウスは自閉症や統合失調症に類似する行動異常を示しており、パルプアルブミン陽性神経細胞の減少や特徴的な脳波の異常を伴っていた。

血管周囲細胞には PDGFR β が高発現している。PDGFR β KO マウスの解析では、さらに、血管壁から当該細胞が遊離し線維芽細胞様細胞に形質変換する機序 (PFT) に PDGFR β が関与することを明らかにした。PFT は病変局所で惹起される PDGFB が活性化する PDGFR β により誘導され、腫瘍転移の促進、脂肪組織における血管新生による二次性糖尿病の増悪、網膜血管の機能障害に基づく糖尿病性網膜症に類似した高度の眼病変の形成に関与した。

PDGFR α は OPC に高発現している。マウスに薬剤を投与して全身性に PDGFR α KO を誘導する実験から、自己増殖能を保持する OPC の維持には PDGFR α シグナルが必須であること、さらに OPC には自己増殖のみならず、脳に内在する幹細胞により PDGFR α シグナル依存性に補充される機序があることを示した。OPC および OPC が成熟して形成される OL は様々な疾病の標的となる細胞であることから、成体脳において明らかとなった高い OPC の再生能力は脳に再生医療を導入する基盤となる現象である可能性がある。

さらに PDGFR α シグナルは血管制御にも関与した。同シグナル依存性に OPC が移植された PDGFB 産生性の Glioma 周囲に集簇し、OPC 由来の Matrix metalloprotease が腫瘍特異的な異常血管を誘導した。PDGFR α シグナルは皮膚線維芽細胞での Hepatocyte growth factor やコラーゲン産生を介して皮膚の血管新生を誘導した。

本プロジェクトは PDGF シグナルが関与し、神経、血管系細胞および幹細胞を含む細胞からなる脳に内包される再生機構を明らかにした。再生医療のためのさらなる研究が必要である。

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 50 件)

1. Yamamoto S, Sasahara M(25/25 人). 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
2. Onogi Y, Yamamoto S(9 番), Ishii Y(10 番), Sasahara M(13/14 人). PDGFR Regulates Adipose Tissue Expansion and Glucose Metabolism via Vascular Remodeling in Diet-Induced Obesity. Diabetes. 66(4): 1008-1021. 2017. 査読有 DOI: 10.2337/db16-0881
3. Yokose J, Sasahara M(12/14 人). Overlapping memory trace indispensable for linking, but not recalling, individual memories. Science. 355(6323): 398-403. 2017. 査読有 DOI: 10.1126/science.aal2690
4. Ishii Y, Hamashima T, Yamamoto S, Sasahara M. Pathogenetic significance and possibility as a therapeutic target of platelet derived growth factor. Pathol Int. 67(5): 235-46. 2017. 査読有 DOI: 10.1111/pin.12530
5. Shioda N, Sasahara M(9/10 人). Endocytosis following dopamine D2 receptor activation is critical for neuronal activity and dendritic spine formation via Rabex-5/PDGFR signaling in striatopallidal medium spiny neurons. Mol Psychiatry. 2016 in press. 査読有 DOI: 10.1038/mp.2016.200
6. Hori E, Sasahara M(9/10 人). Mobilization of Pluripotent Multilineage-Differentiating Stress-Enduring Cells in Ischemic Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 25(6): 1473-81. 2016. 査読有 DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.12.033
7. Saito K, Yamamoto S(5/12 人). MicroRNA-93 may control vascular endothelial growth factor A in circulating peripheral blood mononuclear cells in acute Kawasaki disease. Pediatr Res. 80(3): 425-32. 2016. 査読有 DOI: 10.1038/pr.2016.93
8. Takikawa A, Yamamoto S(6 番), Sasahara M(18/24 人). HIF-1 in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. Diabetes. 65(12): 3649-3659. 2016. 査読有 DOI: 10.2337/db16-0012
9. Tsuneki H, Ishii Y(7 番), Sasahara M(8/12 人). Timed Inhibition of Orexin System by Suvorexant Improved Sleep and Glucose Metabolism in Type 2 Diabetic db/db Mice. Endocrinology. 157(11): 4146-4157. 2016. 査読有 DOI: 10.1210/en.2016-1404
10. Hosaka K, Ishii Y(10 番), Sasahara M(11/16 人). Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 113(38): E5618-27. 2016. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1608384113
11. Watanabe Y, Yamamoto S(5 番), Hamashima T(6 番), Ishii Y(7 番), Sasahara M(10/12 人). Isoliquiritigenin Attenuates Adipose Tissue Inflammation in vitro and Adipose Tissue Fibrosis through Inhibition of Innate Immune Responses in Mice. Sci Rep. 6, Article number: 23097. 2016. 査読有 DOI: 10.1038/srep23097
12. Zheng Y, Yamamoto S(2 番), Ishii Y(3 番), Hamashima T(5 番), Sasahara M(10/10 人). Glioma-Derived Platelet-Derived Growth Factor-BB Recruits Oligodendrocyte Progenitor Cells via Platelet-Derived Growth Factor Receptor- and Remodels Cancer Stroma. Am J Pathol. 186(5): 1081-91. 2016. 査読有 DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.12.020
13. Sato H, Ishii Y(2 番), Yamamoto S(3 番), Hamashima T(6 番), Sasahara M(11/11 人). PDGFR- Plays a Key Role in the Ectopic Migration of Neuroblasts in Cerebral Stroke. Stem Cells. 34(3): 685-98. 2016. 査読有 DOI: 10.1002/stem.2212
14. Yamamoto S(1 番), Hamashima T(4 番), Ishii Y(5 番), Sasahara M(6/6 人). Significance of extracellular vesicles: pathobiological roles in disease. Cell Struct Funct. 41(2):

- 137-43. 2016. 査読有 DOI: 10.1247/csf.16014
15. Horikawa S, Ishii Y(2番), Hamashima T(3番), Yamamoto S(4番), Sasahara M(14/14人). PDGFR plays a crucial role in connective tissue remodeling. *Sci Rep.* 5, Article number: 17948. 2015. 査読有 DOI: 10.1038/srep17948
16. Yamamoto S, Hamashima T(13番), Ishii Y(16番), Sasahara M(17/17番). Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. *Sci Rep.* 5, Article number: 8505. 2015. 査読有 DOI: 10.1038/srep08505
17. Nakamura T, Ishii Y(4番), Sasahara M(5/7人). Relationships among parvalbumin-immunoreactive neuron density, phase-locked gamma oscillations, and autistic/schizophrenic symptoms in PDGFR- knock-out and control mice. *PLoS One.* 10(3): e0119258. 2015. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0119258
18. Sameshima A, Ishii Y(8番), Sasahara M(9/11人). Tenelegliptin improves metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *J Endocrinol.* 227(1): 25-36. 2015. 査読有 DOI: 10.1530/JOE-15-0239
19. Akao T, Ishii Y(4番), Sasahara M(5/5人). Metabolism of dextran sulfate sodium by intestinal bacteria in rat cecum is related to induction of colitis. *Biol Pharm Bull.* 38(4): 566-70. 2015. 査読有 DOI: 10.1248/bpb.b14-00708
20. Sugimori M, Yamamoto S(8/13人). Discovery of Power-Law Growth in the Self-Renewal of Heterogeneous Glioma Stem Cell Populations. *PLoS One.* 10(8):e0135760. 2015. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0135760
21. Hayashi S, Ishii Y(7番), Sasahara M(8/9人). Nicotine suppresses acute colitis and colonic tumorigenesis associated with chronic colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 307(10): G968-78. 2014. 査読有 DOI: 10.1152/ajpgi.00346.2013
22. Suzuki H, Ishii Y(4番), Sasahara M(8/9人). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (Thr286Asp) transgenic mice: a novel mouse model of severe insulin-dependent diabetes. *Austin J Endocrinol Diabetes.* 1(1): 1002. 2014. 査読有 <http://austinpublishinggroup.com/endocrinology-diabetes/fulltext/ajed-v1-id1002.php>
23. Kuroda N, Hamashima T(3/11人). Review of small cell carcinoma of the kidney with focus on clinical and pathobiological aspects. *Pol J Pathol.* 65(1): 15-9. 2014. 査読有 DOI:10.5114/pjp.2014.42664
24. Funa K, Sasahara M. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 9(2): 168-81. 2014. 査読有 DOI: 10.1007/s11481-013-9479-z
25. Zheng LS, Ishii Y(2番), Sasahara M(5/5人). PDGF suppresses oxidative stress induced Ca²⁺ overload and calpain activation in neurons. *Oxid Med Cell Longev.* Article ID 367206. 2013. 査読有 DOI: 10.1155/2013/367206
26. Zhao J, Ishii Y(5番), Sasahara M(6/9人). Changes in Otx2 and Parvalbumin Immunoreactivity in the Superior Colliculus in the Platelet-Derived Growth Factor Receptor- Knockout Mice. *Biomed Res Int.* Article ID: 848265. 2013. 査読有 DOI: 10.1155/2013/848265
27. Wada T, Ishii Y(6番), Sasahara M(7/13人). Eplerenone ameliorates the phenotypes of metabolic syndrome with NASH in liver-specific SREBP-1c Tg mice fed high-fat and high-fructose diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 305(11): E1415-25. 2013. 査読有 DOI: 10.1152/ajpendo.00419.2013
28. Wada T, Ishii Y(6番), Sasahara M(7/9人). Cilostazol ameliorates systemic insulin resistance in diabetic db/db mice by suppressing chronic inflammation in adipose tissue via modulation of both adipocyte and macrophage functions. *Eur J Pharmacol.*

- 707(1-3): 120-129. 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.03.016
29. Ichihara Y, Ishii Y(4 番), Sasahara M(5/7 人). SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2 (SHIP2) selectively impaired hypothalamic insulin signalling and regulation of food intake in mice. *J Neuroendocrinol.* 25(4): 372-82. 2013. 査読有 DOI: 10.1111/jne.12014
 30. Xu G, Ishii Y(3 番), Hamashima T(7 番), Sasahara M(11/11 人). Functional Analysis of Platelet-Derived Growth Factor Receptor- in Neural Stem/Progenitor Cells. *Neuroscience.* 238: 195-208. 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.02.021
 31. Ichikawa T, Sasahara M(16/17 人). Sirtuin 1 activator SRT1720 suppresses inflammation in an ovalbumin-induced mouse model of asthma. *Respirology.* 18(2): 332-9. 2013. 査読有 DOI: 10.1111/j.1440-1843.2012.02284.x
 32. Xu G, Sasahara M(4/5 人). Cancer stem cells: the 'heartbeat' of gastric cancer. *J Gastroenterol.* 48(7): 781-97. 2013. 査読有 DOI: 10.1007/s00535-012-0712-y
 33. Kuroda N, Hamashima T(12/14 人). Chromophobe renal cell carcinoma, oncocyctic variant: a proposal of a new variant giving a critical diagnostic pitfall in diagnosing renal oncocyctic tumors. *Med Mol Morphol.* 46(1): 49-55. 2013. 査読有 DOI: 10.1007/s00795-012-0007-7
 34. 他 (合計 50)
- [学会発表] (計 93 件)
1. 笹原正清. 成体 (体性) 幹細胞を標的とした細胞診の可能性. 第 58 回日本臨床細胞学会春期大会; 2017 年 5 月 26 日-28 日; 大阪. (招待講演)
 2. 山本誠士. 中枢神経系ペリサイトの起源に迫る. 第 39 回日本分子生物学会年会; ペリサイトを認識し研究することの重要性. 2016 年 11 月 30-12 月 2 日; 横浜. (招待講演)
 3. Yamamoto S, Ishii Y(2 番), Hamashima T(3 番), Sasahara M(6/6 人). PDGFR plays a key role in the ectopic migration of neuroblasts along with blood vessels in cerebral stroke. The 19th International Vascular Biology Meeting; 2016 Oct 30-Nov 3; Boston, USA.
 4. Kitahara H, Yamamoto S(2 番), Hamashima T(5 番), Ishii Y(6 番), Sasahara M(9/9 人). Developed novel rodent model of diabetic retinopathy after conditional Pdgfrb gene targeting. The 19th International Vascular Biology Meeting; 2016 Oct 30-Nov 3; Boston, USA.
 5. 笹原正清. 血小板由来増殖因子の作用機序と生体での役割. 第 105 回日本病理学会総会 (宿題報告); 2016 年 5 月 12 日-14 日; 仙台. (招待講演)
 6. 濱島 丈, 石井陽子(2 番), 山本誠士(3 番), 笹原正清(8/8 人). 条件的 PDGFR-ノックアウトマウスにおける稀突起膠細胞の発生. 第 105 回日本病理学会総会; 2016 年 5 月 12 日-14 日; 仙台
 7. De NV, 石井陽子(2 番), 山本誠士(3 番), 濱島 丈(4 番), 笹原正清(8/8 人). ネスチン陽性の未熟な細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞の再生に関与する. 第 105 回日本病理学会総会; 2016 年 5 月 12 日-14 日; 仙台.
 8. Satou H, Yamamoto S(2 番), Sasahara M(4/6 人). PDGFR- plays a key role in the ectopic migration of neuroblasts in cerebral stroke. 5th Mt. BANDAI & Pan-Pacific Joint Neurosurgical Convention; 2016 Apr 7-10; Phnom Penh, Cambodia.
 9. 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. CVMW2015 心血管代謝週間; 2015 年 12 月 10 日-12 日; 神戸. (招待講演)
 10. 山本誠士. 周皮細胞 (ペリサイト) の病態生理学的重要性. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会); 2015 年 12 月 1 日-4 日; 神戸. (招待講演)
 11. 笹原正清. 脳の新しい再生様式と PDGF の関与. 第 27 回日本脳循環代謝学会総会; 2015 年 10 月 30 日-31 日; 富山. (招待講演)
 12. Yamamoto S. Analysis of the

- inflammation related miRNA encapsulated in the endothelial derived extracellular vesicles. Asia-Australia Vascular Biology Meeting (AAVBM) and the 13th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology; 2015 Oct 15-17; Busan, Korea. (Invited lecture)
13. Yamamoto S, Hamashima T(3 番), Ishii Y(4 番), Sasahara M(5/5 人). Secreted miRNA plays an important role in the endothelial vascular niche. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014 Apr 14-17; Kyoto.
14. Dang CT, Ishii Y(2 番), Yamamoto S(3 番), Hamashima T(4 番), Sasahara M(9/9 人). PDGFR- regulates the dynamism of oligodendrocytes through recruitment of perivascular mesenchymal stem cells in the adult mouse brain. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014 Apr 14-17; Kyoto.
15. Yamada K, Yamamoto S(2 番), Hamashima T(3 番), Isii Y(4 番), Sasahara M(6/6 人). PDGF receptor dimers drive distinct migration of the mouse skin fibroblast. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014 Apr 14-17; Kyoto.
16. Sato H, Yamamoto S, Sasahara M. Redirected migration of the DCX + cells guided by blood vessels toward ischemic core. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014 Apr 14-17; Kyoto.
17. Horikawa S, Yamamoto S, Hamashima T, Ishii Y, Sasahara M. PDGFR- is essential for the connective tissue remodeling. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014 Apr 14-17; Kyoto.
18. Shen J, Ishii Y(2 番), Hamashima T(8 番), Yamamoto S(10 番), Sasahara M(11/11 人). Involvement of PDGFR- in blood-brain barrier function after cerebral ischemia. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014 Apr 14-17; Kyoto.
19. 笹原正清. 条件的ノックアウトマウスを用いた脳 PDGF の研究. 第 46 回北陸実験動物研究会; 2014 年 1 月 25 日; 富山. (特別講演)
20. 笹原正清. 幹細胞～癌幹細胞と細胞診について 血小板由来増殖因子(PDGF)は神経幹細胞の制御に関与する. 第 52 回日本臨床細胞学会秋期大会; 2013 年 11 月 2 日-3 日; 大阪. (招待講演)
21. 他 (合計 93)
- 〔図書〕(計 1 件)
- 1) 石井陽子, 笹原正清. サイトカイン・増殖因子キーワード事典. 宮園浩平他編. 東京: 羊土社; 2015. PDGF ファミリーと受容体; p. 234-41.
- 〔産業財産権〕(計 0 件)
- 〔その他〕
- ホームページ等
富山大学 研究者総覧
http://evaweb.u-toyama.ac.jp/html/241_ja.html?k=%E7%AC%B9%E5%8E%9F%E3%80%80%E6%AD%A3%E6%B8%85
- 富山大学 病態・病理学講座
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pathol2/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
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
- (2) 研究分担者
石井 陽子 (Ishii Yoko)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授
研究者番号: 00361949
- 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
- 濱島 丈 (Hamashima Takeru)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教
研究者番号: 80467092
- (3) 連携研究者 なし
(4) 研究協力者 なし