

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09329

研究課題名(和文) 骨髄由来ペリサイト前駆細胞の解析と脳梗塞細胞治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of bone marrow-derived progenitor pericytes and their therapeutic application for cerebral infarction

研究代表者

松山 知弘 (Matsuyama, Tomohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10219529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管障害後の神経機能回復を目的として、種々の幹細胞を用いた再生医療的手法が注目されている。我々は脳梗塞の細胞治療に有効な細胞分画の候補として、Neurovascular unitを構成する血管周皮細胞(ペリサイト)に分化しうる血管周皮細胞前駆細胞が、骨髄細胞内にあるCD45<sup>low</sup>/CD44<sup>(-)</sup>のHemangioblast様の分画であるという研究成果を得た。本細胞はペリサイトのみならず血管内皮細胞にも分化するため、脳梗塞の血管再生を目指した細胞治療に役立つ細胞であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Stem cell-based regenerative medicine has been well documented to improve the neurological outcome of post-stroke patients. We recently have found a new candidate of stem cells from the post-infarct bone marrow (BM), which can differentiate into pericytes forming neurovascular unit in the brain. The current study was performed to analyze the BM-derived progenitor pericytes (PPCs) and their therapeutic application for cerebral infarction was noted. FACS analysis revealed that the PPCs were divided into two subclasses, CD45<sup>high</sup>/CD44<sup>(+)</sup> and CD45<sup>low</sup>/CD44<sup>(-)</sup>, both of which differentiated into blood cells and vascular cells showing capillary formation under specific culture medium. However, the latter showed the tube formation, the primitive vascular lumen. These findings suggest that CD45<sup>low</sup>/CD44<sup>(-)</sup> subclass are hemangioblast-like cells differentiating into both endothelial and pericytes, which may accomplish therapeutic angiogenesis for stroke.

研究分野：再生医学

キーワード：ペリサイト 造血幹細胞 細胞治療 脳梗塞

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、動物モデルを用いた脳梗塞の細胞治療の検討に際して、骨髄中の CD34 陽性細胞分画が有効であることを報告しているが、CD34 陰性分画にも十分な治療効果をもつ細胞群が存在することも示している [ *J Clin Invest* 2004;114:330 ]。一方、我々がヒトの細胞治療に用いている骨髄単核球細胞は骨髄細胞を単純に比重遠心法で分離したものであり、有効な分画の詳細は検討されていない。さらに、骨髄細胞と内因性神経再生との関わりも不明である。

内因性の神経幹細胞に関しては、我々は、脳梗塞後に特異的に産生される傷害誘導性神経幹細胞 (injury-induced Neural Stem/Progenitor Cell: iNSPC) を発見しており、その後これが脳血管内皮細胞に接する血管周皮細胞 (Pericyte) を起源とする多能性幹細胞 (ischemic injury-induced multipotent stem cell: iSC) であることが判明した [ *Stem Cell Dev* 2011;20:2037. *Stem Cells Dev* 2012;21:2350 ]。

Pericyte は血液脳関門の構成細胞で、Neurovascular unit の維持や機能発揮に重要な働きを果たしている。一方 Pericyte が多分化能をもつ間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) のひとつで、骨髄細胞から分化するとの報告がある [ *Nature* 2010;468:557 ]。また、脳血管障害後に投与された骨髄細胞が Pericyte に分化するとの報告もある [ *Stroke* 2010;41:2938 ]。従って、骨髄細胞中のある分画は、まず Pericyte として脳に生着し、Neurovascular unit の構成細胞として神経障害を抑制し、脳梗塞治療効果に関与すると推測される。また、この Pericyte を起源とする iNSPC が神経再生に関与する可能性も考えられる。

我々は、iNSPC と脳梗塞病態下における骨髄細胞の解析から、Pericyte に分化する細胞分画を同定した。本研究では、骨髄細胞の MSC 分画のうち、iNSPC 産生に関わる血管周皮細胞前駆細胞が脳修復の鍵を握る幹細胞ではないかと考え、その解析と治療細胞としての有効性を検討する。

## 2. 研究の目的

脳梗塞の細胞治療に有効な細胞分画の候補として、Neurovascular unit を構成する血管周皮細胞 (ペリサイト) に分化しうる前駆細胞分画が骨髄細胞内にあることを見いだした。当初、この前駆細胞は Pericyte にのみ分化すると考えていたが、血管系としては内皮細胞と Pericyte 双方に分化する Hemangioblast 様の細胞であることが判明したので、本研究で

はこの分画の特性をより詳細に解析して、脳梗塞の細胞治療に応用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ペリサイト前駆細胞の特性解析

脳梗塞マウスの骨髄細胞を神経幹細胞の調整法 (特許第 4905719 号) に準拠して 2%FBS/FGF/EGF を含む DMEM 培地で培養することで幹細胞特有の Spheroid が得られる。これらに関して、gene tip で発現蛋白を網羅的に検討するとともに、FACS や免疫組織化学、PCR などで細胞の特性を解析し、成熟 Pericyte や MSC との異同を検討した。

### (2) ペリサイト前駆細胞の分化能解析 (in vitro)

培養条件を変えることにより、いかなる細胞に分化するかを検討した。候補細胞を、コロニーアッセイ培地 (MethoCult) あるいは Matrigel 培地で分化させ、血管・血球系の細胞への分化を検討した。分化細胞を CD31 あるいは PDGFR $\beta$  に対する免疫組織化学にて血管内皮細胞か Pericyte かを鑑別した。

## 4. 研究成果

脳梗塞マウスの骨髄細胞を 2%FBS/FGF/EGF を含む DMEM 培地で培養することで Hemangioblast 様の細胞が得られた。この細胞の特性解析および機能解析の目的で FACS 解析すると、CD45 陽性/CD44 陽性~陰性/CD105 陰性/PDGFR $\beta$  陰性の細胞であり Flk1 陽性の造血幹細胞の特性を持つ細胞集団であることがわかった。しかし、その後の検討で、CD45 陽性分画はさらに CD45<sup>high</sup>/CD44(+) と CD45<sup>low</sup>/CD44(-) 分画に区別できることが判明した。この両分画をコロニーアッセイ培地 (MethoCult) で培養すると双方ともコロニー形成を示して好中球、マクロファージを含む血球細胞に分化し、Matrigel 培地で分化させると、Capillary formation (管腔形成) して CD31 陽性血管内皮細胞あるいは PDGFR $\beta$  陽性のペリサイトになるが、より新生血管に近い Tube formation を示すのは CD45<sup>low</sup>/CD44(-) 分画の方であった。以上のことより、本研究の主目的である骨髄中の血管新生にかかわる血管周皮細胞前駆細胞は、CD45<sup>low</sup>/CD44(-) の Hemangioblast 様の分画にあるという研究成果を得た。本細胞はペリサイトのみならず血管内皮細胞にも分化するため、脳梗塞の血管再生を目指した細胞治療に役立つ細胞であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文など

(雑誌論文)(計15件)(すべて査読有)

1. Nakano-Doi A, Sakuma R, Matsuyama T, Nakagomi T. Ischemic stroke activates the VE-cadherin promoter and increases VE-cadherin expression in adult mice. *Histology and Histopathology* 2018;33:507-521. doi: 10.14670/HH-11-952. [Epub ahead of print]
2. Tatebayashi K, Tanaka Y, Nakano-Doi A, Sakuma R, Kamachi S, Shirakawa M, Uchida K, Kageyama H, Takagi T, Yoshimura S, Matsuyama T, Nakagomi T. Identification of multipotent stem cells in human brain tissue following stroke. *Stem Cells Dev* 2017;26(11):787-797. doi: 10.1089/scd.2016.0334
3. Uemura M, Ihara M, Maki T, Nakagomi T, Kaji S, Uemura K, Matsuyama T, Kalaria R, Kinoshita A, Takahashi R. Pericyte-derived bone morphogenetic protein 4 underlies white matter damage after chronic hypoperfusion. *Brain Pathology* 2017 May 4. doi: 10.1111/bpa.12523. [Epub ahead of print]
4. Kasahara Y, Yamahara K, Soma T, Stern DM, Nakagomi T, Matsuyama T, Taguchi A. Transplantation of hematopoietic stem cells: intra-arterial versus intravenous administration impacts stroke outcomes in a murine model. *Transl Res*. 2016 Oct;176:69-80. doi: 10.1016/j.trsl.2016.04.003
5. Wada T, Sawano T, Tanaka T, Furuyama T, Fukumoto M, Yamaguchi W, Saino O, Takeda Y, Kogo M, Matsuyama T, Inagaki S. Absence of Sema4D improves oligodendrocyte recovery after cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Neurosci Res*. 2016 Jul;108:6-11. doi:10.1016/j.neures.2015.12.016.
6. Nakata M, Nakagomi T, Maeda M, Nakano-Doi A, Momota Y, Matsuyama T. Induction of Perivascular Neural Stem Cells and Possible Contribution to Neurogenesis Following Transient Brain Ischemia/Reperfusion Injury. *Transl Stroke Res*. 2017 Apr;8(2):131-143. doi: 10.1007/s12975-016-0479-1. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27352866
7. Nakano-Doi A, Nakagomi T, Sakuma R, Takahashi A, Tanaka Y, Kawamura M, Matsuyama T. Expression patterns and phenotypic changes regarding stemness in brain pericytes in health and disease. *Journal of stem cell research & therapy*, 6, 3, 2016. Volume 6 • Issue 3 • 1000332J Stem Cell Res Ther ISSN: 2157-7633 JSCRTI
8. Akiko Nakano-Doi, Takayuki Nakagomi, Rika Sakuma, Ai Takahashi1, Yasue Tanaka1, Miki Kawamura1, and Tomohiro Matsuyama. Expression patterns and phenotypic changes regarding stemness in brain pericytes in health and disease. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, accepted on Mar 16, 2016
9. Sakuma R, Kawahara M, Nakano-Doi A, Takahashi A, Tanaka Y, Narita A, Kuwahara-Otani S, Hayakawa T, Yagi H, Matsuyama T, Nakagomi T. Brain pericytes serve as microgliagenerating multipotent vascular stem cells following ischemic stroke. *J Neuroinflammation* 2016;13:57. DOI 10.1186/s12974-016-0523-9
10. Taguchi A, Sakai C, Soma T, Kasahara Y, Stern D, Kajimoto K, Ihara M, Daimon T, Yamahara K, Doi K, Kohara N, Nishimura H, Matsuyama T, Naritomi H, Sakai N, Nagatsuka K. Intravenous Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Stroke: Phase1/2a Clinical Trial in a Homogeneous Group of Stroke Patients. *Stem Cells Dev*. 2015 Oct 1;24(19):2207-18. doi:10.1089/scd.2015.0160. Epub 2015 Aug 17.
11. Maki T, Maeda M, Uemura M, Lo EK, Terasaki Y, Liang AC, Shindo A, Choi YK, Taguchi A, Matsuyama T, Takahashi R, Ihara M, Arai K. Potential interactions between pericytes and oligodendrocyte precursor cells in perivascular regions of cerebral white matter. *Neurosci Lett*. 2015 Jun 15;597:164-9.
12. 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 Aug 1;24(15):1730-9. doi: 10.1089/scd.2015.0039. Epub 2015 Jun 3.
13. 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 [Running title: Brain Vascular Pericytes and Neurovasculogenesis] *Stem Cells* 2015 Jun;33(6):1962-74. doi: 10.1002/stem.1977. Epub 2015 Apr 23.
14. Nakagomi T, Nakano-Doi A, Narita A, Matsuyama T. Are Stimulated Somatic Cells Truly Reprogrammed into an ES/iPS-Like Pluripotent State? Better Understanding by Ischemia-Induced Multipotent Stem Cells in a Mouse Model of Cerebral Infarction. *Stem Cells Int.* 2015;2015:630693. doi: 10.1155/2015/630693. Epub 2015 Apr 6. Review.
  15. Nakagomi T, Nakano-Doi A, Matsuyama T. Leptomeninges: a novel stem cell niche harboring ischemia-induced neural progenitors. *Histol Histopathol.* 2015 Apr;30(4):391-9. Epub 2014 Oct 22. Review.
- (学会発表)(計 21 件)
1. Tatebayashi K, Takagi T, Nakano-Doi A, Sakuma R, Tanaka Y, Kamachi S, Shirakawa M, Uchida K, Kageyama H, Nakagomi T, Matsuyama T, Yoshimura S. Ischemia-induced multipotent stem cells in human cerebral infarction. *International Stroke Conference 2018, 2018. Los Angeles, USA*
  2. 宮谷尚伽, 百田義弘, 蒲池紗英子, 土居亜紀子, 中込隆之, 松山知弘. 脳梗塞巣における LPGDS の発現. 第 43 回日本脳卒中学会学術集会 (STROKE 2018), 2018.3.17. 福岡
  3. 松山知弘, 中込隆之. Pericyte と脳梗塞治療. (指定講演)特別企画「脳卒中と細胞治療: 臨床への諸問題」, 第 43 回日本脳卒中学会学術集会 (STROKE 2018), 2018.3.17. 福岡
  4. 松山知弘. 脳卒中の幹細胞治療. (特別講演)第 22 回口腔顔面神経機能学会, 2018.3.3. 西宮
  5. 高木俊範, 立林洸太郎, 別府幹也, 蔵本要二, 土居亜紀子, 佐久間理香, 中込隆之, 松山知弘, 吉村紳一. ヒト脳傷害誘導性多能性幹細胞の性状とその特徴. 第 17 回日本再生医療学会総会, 2018. 神奈川
  6. 高木俊範, 立林洸太郎, 別府幹也, 蔵本要二, 中込隆之, 松山知弘, 吉村紳一. ヒト脳梗塞巣における脳傷害誘導性幹細胞の確立. 第 18 回日本分子脳神経外科学会, 2017. 甲府
  7. 澤田里佳子, 佐久間理香, 土居亜紀子, 高橋 愛, 蒲池紗英子, 中込隆之, 松山知弘. 脳梗塞後の CD44 の局在と傷害誘導性多能性幹細胞の神経系への分化. 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会, 2017.11. 大阪
  8. 松山知弘, 中込隆之. ペリサイトの起源と脳組織再生への関与. シンポジウム 5 「Brain science を探る: 血液脳関門を中心に」, 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会, 2017.11. 大阪
  9. 中込隆之, 土居亜紀子, 佐久間理香, 松山知弘. 発生期及び梗塞脳における VE-cadherin の発現に関する検討. 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会, 2017.11. 大阪
  10. 立林洸太郎, 高木俊範, 土居亜紀子, 佐久間理香, 田中康江, 白川 学, 陰山博人, 内田和孝, 蒲池紗英子, 中込隆之, 松山知弘, 吉村紳一. ヒト脳梗塞組織における多能性幹細胞の同定. 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会, 2017.11. 大阪
  11. 澤田里佳子, 佐久間理香, 土居亜紀子, 高橋愛, 蒲池紗英子, 中込隆之, 松山知弘. Brain endogenous multipotent stem cells following ischemia express CD44 and differentiate into oligodendrocytes. 第 40 回神経科学大会, 2017. 7.20-23. 千葉
  12. 湊雄介, 高橋愛, 加藤歩, 大谷佐知, 田中宏一, 前田誠司, 中込隆之, 松山知弘, 八木秀司. Analysis of the characterization of ischemic pericyte. 第 40 回神経科学大会, 2017. 7.20-23. 千葉
  13. 上村麻衣子, 猪原匡史, 眞木崇州, 中込隆之, 梶 誠兒, 松山知弘, 植村健吾, 木下彩栄, 高橋良輔. Pericyte-derived bone morphogenic protein 4 underlies white matter damage after chronic hypoperfusion. 第 40 回神経科学大会, 2017. 7.20-23. 千葉
  14. 高橋愛, 中込隆之, 土居亜紀子, 佐久間理香, 澤田里佳子, 松山知弘. 脳ペリサイト由来多能性幹細胞、間葉系幹細胞、脂肪組織由来幹細胞の特性に関する比較検討. 第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会 2016.11.11-12 徳島
  15. 中田雅代, 中込隆之, 前田光代, 土居 亜紀子, 百田義弘, 松山知弘. 神経再生療法は脳虚血再灌流病態時でも可能か. 第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会 2016.11 徳島
  16. 覚道知樹, 岸本直隆, 土居亜紀子, 中込隆之, 百田義弘, 松山知弘,

脱分化脂肪細胞の神経系分化とマウス脳梗塞モデルへの細胞移植による脳分布, 第59回日本脳循環代謝学会学術集会 2016.11 徳島

17. 土居亜紀子, 中込隆之, 佐久間理香, 高橋愛, 田中康恵, 川村美貴, 松山知弘, 虚血ペリサイトの発生学的見地から見た特性の検討, シンポジウム3「再生医療の基礎と臨床 UP to DATE」, 第59回日本脳循環代謝学会学術集会 2016.11 徳島
18. Rika Sakuma, Maiko Kawahara, Akiko Doi, Ai Takahashi, Yasue Tanaka, Aya Narita, Sachi Otani, Tetsu Hayakawa, Hideshi Yagi, Tomohiro Matsuyama, Takayuki Nakagomi, PDGFR $\beta$ -expressing brain pericytes following ischemia acquire microglia-generating multipotent stem cell activity. The 39th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016.7 Yokohama
19. Maiko Uemura, Masafumi Ihara, Takayuki Nakagomi, Takakuni Maki, Seiji Kaji, Kengo Uemura, Kazuyuki Nagatsuka, Tomohiro Matsuyama, Raj Kalaria, Ayae Kinoshita, Ryosuke Takahashi, BMP-4 expression by pericytes after chronic ischemia aggravates white matter damage. The 39th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016.7, Yokohama
20. 松山知弘, 中込隆之, 内在性神経幹細胞による脳梗塞の再生治療, シンポジウム・セッションタイトル: 脳梗塞の創薬と次世代医療, 第57回神経学会学術大会, 2016.5, 神戸
21. 上村麻衣子, 猪原匡史, 中込隆之, 眞木崇州, 梶誠兒, 植村健吾, 長束一行, 松山知弘, Kalaria Raj, 木下彩栄, 高橋良輔, BMP-4 expression by pericytes after ischemia aggravates white matter damage. 第57回神経学会学術大会, 2016.5, 神戸

中込 隆之 (NAKAGOMI, Takayuki)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 80434950

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松山 知弘(MATSUYAMA, Tomohiro)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10219529

### (2) 研究分担者

藤盛 好啓 (FUJIMORI, Yoshihiro)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20229058