

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590262

研究課題名 (和文) 脳血管系を形成できる多能性神経幹細胞

研究課題名 (英文) Angiogenic potential of multipotent neural stem cells

研究代表者

大石 一彦 (OISHI KAZUHIKO)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80203701

研究成果の概要 (和文)：我々は、初代ニューロスフィアから分取したCD44 陽性CD90 陽性 (CD44⁺ CD90⁺)細胞が *in vitro* で血管腔構造を形成することができることを見出した。ニューロスフィアは、マウス胎生大脳皮質から 20 ng/ml bFGF を含む無血清メディウムで培養することで得た。CD44⁺ CD90⁺細胞は、EPICS ALTRA フローサイトメトリーとCD44、CD90 に対する抗体を用いてニューロスフィアから分取した。得られたCD44⁺ CD90⁺細胞はニューロスフィアを形成し、ニューロンとアストロサイトに分化した。この細胞をコラーゲンゲルに包埋し、20%FBS と bFGF 存在下で 7 日間培養すると血管様の構造が形成された。以上のことより、CD44⁺ CD90⁺細胞はニューロスフィアを形成し、血管構造を形成する能力を有することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：We found that CD44⁺ CD90⁺ cells isolated from primary neurospheres can form vascular tube structures *in vitro*. NSCs isolated from the mouse embryonic cortex formed neurospheres when cultured in serum-free medium containing 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF). CD44⁺ CD90⁺ cells were enriched from the neurospheres using an EPICS ALTRA flow cytometer, and antibodies against CD44 and CD90. The purified CD44⁺ CD90⁺ cells generated neurospheres, and differentiated into neurons and astrocytes. When the cells were inoculated into collagen gels and cultured with 20% fetal bovine serum plus bFGF for 7 d, vascular tube-like structures were formed. These results indicate that CD44⁺ CD90⁺ cells have the ability to generate neurospheres and to form vascular tubes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：基礎医学・薬理学一般

キーワード：神経幹細胞、内皮細胞、血管腔構造、三次元培養、分化、脳血管、平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経幹細胞が血管平滑筋様の収縮を発生する平滑筋細胞に機能的分化することは、我々が明らかにした知見であり、未だ他のグループの追従を許していない。

(2) 我々は、その後、神経幹細胞が内皮細胞に分化し血管を形成することを明らかにしている。また、同時期に、Gage のグループは、分化の際内皮細胞との細胞接触を必要とするものの、神経幹細胞が内皮細胞に分化することを報告した (Gage F.H. et al., *Nature*, **430**, 350-356, 2004)。従来、血管内皮細胞と平滑筋細胞の起源は異なる系譜と考えられていたが、これらを考慮すると、神経幹細胞が血管先駆細胞的な役割を担っている可能性を提供する。

(3) 一方で、神経幹細胞の中樞神経系以外の細胞への多分化能に異論を唱える神経科学者は少なくない。この根底には、培養した神経幹細胞はホモの細胞集団ではなく、性質の異なるさまざまな細胞が含まれている事実が絡んでいる (Maric D. and Barker J.L., *Mol. Neurobiol.*, **30**, 49-76, 2004; Price J. and Williams B.P., *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 564-7, 2001.)。

(4) 生体内の神経幹細胞には分化能の異なる複数の亜集団が存在することが複数のグループにより報告された (Pevny L. and Rao M.S., *Trends Neurosci.*, **26**, 351-359, 2003; Doetsch F. et al., *Cell*, **97**, 703-716, 1999; Johansson C.B. et al., *Exp. Cell Res.*, **253**, 733-736, 1999; Aguirre A.A., *J. Cell Biol.*, **165**, 575-589, 2004; Dore-Duffy P. et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **26**, 613-624, 2006.)。以上のことを総合すると、神経幹細胞の血管形成能は、多能性に富む特定の亜集団の性質である可能性を提供する。

2. 研究の目的

一般に、血管内皮細胞と平滑筋細胞の多くは中胚葉に、また、大動脈起始部の血管平滑筋細胞は神経堤細胞 (neural crest cells) に由来すると考えられている。しかしながら、外胚葉由来の中樞神経系に形成される血管の起源は未だ明らかになっていないのが現状である。ニューロンやアストロサイトなどの中樞神経系の細胞に分化することが出来る神経幹細胞は、発生段階において脊椎動物の中樞神経系のさまざまな領域に存在する。また、神経幹細胞はその数は少ないものの、成体の中樞神経系にも存在している。我々は、神経幹細胞が血管前駆細胞的な分化ポテンシャルを持ち合わせていて、神経幹細胞が中

樞神経系の細胞のみならず内皮細胞や平滑筋細胞に分化し脳血管を形成する可能性を世界に先駆けて提供した。本研究では、ニューロンやアストロサイトなどの中樞神経系の細胞に分化する神経幹細胞のうち、多能性に富む特定の亜集団が脳血管前駆細胞的な機能を有し、脳血管の形成や再構築に関与する可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞の調製と多能性神経幹細胞のソーティング

妊娠 13.5 日目の C57BL/6 マウスをエーテルにより深麻酔し、開腹後胎児 (E13.5) を摘出する。胎児脳を開き、ピンセットにより大脳皮質もしくは脳室下帯を摘出する。その後、N2 メディウム中でピペッティングにより細胞を分散させ、増殖因子の bFGF を添加したメディウム中で CO₂ インキュベーター内で培養する。神経幹細胞は増殖し 3 から 4 日後にはニューロスフィア (細胞塊) を形成する。

次に、bFGF 依存性に形成された初代ニューロスフィアをピペッティングにより分散し、さまざまな細胞表面抗原に対する抗体を用いて多重染色を行い、セルソーター (ベックマン・コールター、Epics Altra) で分画する。

(2) 自己複製能と中樞神経系への分化能の検討

(1) で分取した各分画の細胞集団を、セルソーターの付属装置である clonal sort system を用いて clonal density で 96 multi-well plate に蒔き、neurosphere-initiating cell activity を liner regression analysis により求め、ニューロスフィア形成能を比較する。

次に、中樞神経系への分化能を調べる目的で、ニューロスフィア形成能の高かった分画の細胞集団もしくは、clonal sort system を用いてクローン化し数日間培養して形成させたニューロスフィア細胞を、増殖因子の代わりに牛胎児血清 (1%) を添加したメディウム中でポリオルニチン・フィブロネクチンコートした培養シャーレ中で、CO₂ インキュベーター内で高密度 (10⁵ cells/cm²) 培養する。7 日程度培養した細胞群について、その形態を位相差顕微鏡で観察する。また、神経マーカータンパク質の MAP-2 やアストロサイトのマーカータンパク質である GFAP に対する特異抗体を用いた免疫蛍光抗体染色法により、それらのタンパク質の発現を共焦点蛍光顕微鏡 (オリンパス、FluoView 500) で観察する。さらに、RT-PCR 法により内皮マーカー

ータンパク質の発現量を測定する。

(3) 血管構成細胞への分化能と管腔形成能の検討

内皮細胞や平滑筋細胞への分化は、コーティングしていない培養シャーレ中で、牛胎児血清の濃度を10%に増加して低密度 (10^4 cells/cm²) 培養することで誘導できる。同様の方法を用いて、ニューロスフィア形成能の高かった分画の細胞集団もしくは、clonal sort systemを用いてクローン化し数日間培養して形成させたニューロスフィア細胞を分化誘導し、その形態を位相差顕微鏡で観察する。また、内皮マーカータンパク質のPECAM-1とVE-cadherinや、平滑筋マーカータンパク質の α -smooth muscle actinに対する特異抗体を用いた免疫蛍光抗体染色法により、それらのタンパク質の発現を共焦点蛍光顕微鏡 (オリンパス、FluoView 500) で観察する。さらに、RT-PCR法により内皮マーカータンパク質の発現量を測定する。

内皮細胞は、その機能的特徴の一つとして、*in vitro*で血管のモデル構造である管腔構造を形成する。そこで次に、この多能性を有する分画の細胞集団もしくは、clonal sort systemを用いてクローン化し数日間培養して形成させたニューロスフィア細胞をコラーゲン (type I) ゲルに包埋すると血管腔構造を形成するか検討する。なお、その形態を位相差顕微鏡で観察するとともに、内皮マーカータンパク質に対する特異抗体を用いた免疫蛍光抗体染色法で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

(1) CD44⁺ CD90⁺細胞のニューロスフィア形成能と神経系への分化能

マウス胎仔脳より単離した神経幹細胞は、20ng/ml bFGFを含むN2 メディウム中で培養した時ニューロスフィアを形成する。この初代ニューロスフィア細胞をフローサイトメトリーによって分析したところ、ニューロスフィア細胞のうち一部の細胞集団が、CD44とCD90を共に発現していた。CD44⁺ CD90⁺細胞集団が、ニューロスフィア形成能を有する幹細胞か否かを調べるために、表面抗原に対する抗体でラベル化した細胞をEPIC ALTRA フローサイトメーターを使って分取し、EPIC ALTRAオートクローンユニットで1 cell/wellの濃度で96ウェルプレートに撒いた。bFGFを含むN2 メディウム中で2週間インキュベートした。4~7日後、CD44⁺ CD90⁺細胞は増殖し、ニューロスフィアを形成した。

ニューロスフィア形成能を持つ細胞の割合を調べるために、分取した細胞集団をさまざまな希釈倍率で撒き3週間培養した。その後、NS-ICsを限界希釈法に従って算出した。

分取する前の初代ニューロスフィア細胞は、220個の細胞中1個 (NS-ICs; 1/220) の割合でニューロスフィア形成能を持つ細胞が存在した。一方CD44⁺ CD90⁺集団のNS-ICsは1/16であった。CD44⁺ CD90⁻、CD44⁻ CD90⁺、CD44⁻ CD90⁻の各集団でのNS-ICsは、それぞれ1/61、1/157、1/3333であった。これらの結果から、CD44⁺ CD90⁺細胞集団中にニューロスフィア形成細胞が存在することが示された。

クローン化したCD44⁺ CD90⁺細胞の多分化能を調べるために、神経系の細胞への分化能を調べた。ニューロンとアストロサイトへの分化を誘導するために、分散したクローン化したニューロスフィア細胞を高密度 (10^5 cells/cm²) で撒き、bFGF非存在下、1%FBS存在下で7日間培養した。免疫組織染色を行ったところ、細胞はMAP-2陽性のニューロンとGFAP陽性のアストロサイトの両方に分化していることが明らかとなった。

(2) CD44⁺ CD90⁺細胞の血管構成細胞への分化と血管腔形成能

神経幹細胞は、高密度の培養条件下でニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化するが、低密度においては α -smooth muscle actinや塩基性カルポニンを発現する平滑筋細胞に分化する。そこで、CD44⁺ CD90⁺クローンを様々な細胞密度で培養した。10%FBSを加えbFGFを加えない条件で、クローン化細胞を4日間培養すると、中密度 (10^4 cells/cm²) で培養した細胞のほとんどがVE-cadherinに免疫反応性を示した。さらに低い細胞密度 (10^3 cells/cm²) では、VE-cadherin陽性細胞の数は減少し、それに伴い α -smooth muscle actinの免疫反応の増加が見られた。細胞の95%以上が α -smooth muscle actinに免疫反応を示し、VE-cadherinには免疫反応性を示さなかった。フローサイトメトリーを用いて解析したところ、中密度で分化したCD44⁺ CD90⁺クローン由来の細胞は、その40.6%がVE-cadherinを発現し、56.2%がPECAM-1を発現し、45.2%がCD146を発現していた。

次にCD44⁺ CD90⁺クローン由来の内皮細胞が、*in vitro*で血管様の管腔構造を形成する能力があるか検討した。分化した細胞を三次元コラーゲンゲル内で10-20%FBS存在下で4日間培養した。分化した細胞は20 ng/ml bFGF存在下で血管腔様構造を形成した。

ニューロスフィアから得られた未分化なCD44⁺ CD90⁺細胞が、*in vitro*で血管様の管腔構造を形成する能力があるのかを調べるために、分取したそれぞれの細胞集団をコラーゲンゲル内に懸濁し、20%FBS存在下で7日間インキュベートした。分取したCD44⁺ CD90⁺細胞集団は、20 ng/ml bFGF存在下で血

管腔様構造を形成した。管腔形成の程度を、形成された血管腔構造の長さで測定したところ、CD44⁺ CD90⁺細胞集団で形成された血管腔構造の長さの程度は、分取していないコントロールのニューロスフィア細胞での血管腔形成に比べて増大していた。一方、CD44⁻ CD90⁺とCD44⁻ CD90⁻の細胞集団では血管腔形成は見られなかった。CD44⁺ CD90⁺細胞集団でも血管腔構造が形成されたが、血管腔形成の程度はCD44⁺ CD90⁺の場合よりより少なく、コントロールと同程度であった。

次にCD44⁺ CD90⁺クローンの管腔様構造形成能を調べた。CD44⁺ CD90⁺細胞をクローン分取し、増殖させたCD44⁺ CD90⁺ニューロスフィアを機械的に分散した。分散した細胞をコラーゲンゲルに包埋し7日間培養した。CD44⁺ CD90⁺クローンで形成された血管腔様構造は、全長4.14±0.51 mm/mm²で、それはCD44⁺ CD90⁺細胞集団での全長(4.91±0.55 mm/mm²)と同程度であった。

以上のことより、マウス胎児大脳皮質からの初代ニューロスフィアから分離したCD44⁺ CD90⁺細胞が、bFGFの存在下でニューロスフィアとして増殖でき、また、神経系のフェノタイプのみならず、内皮細胞と平滑筋細胞に分化できることを明らかにした。したがって、CD44⁺ CD90⁺細胞が、血管前駆細胞としての特性を持つ多能性中枢神経系幹細胞として機能している可能性が考えられる。

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3件)

①K. Oishi and Y. Ito-Dufros. Angiogenic potential of CD44⁺ CD90⁺ multipotent CNS stem cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, **349**, 1065-1072 (2006).

②K. Oishi, T. Kamiyashiki, and Y. Ito. Isometric contraction of microvascular pericytes from mouse brain parenchyma. *Microvasc Res*. 査読有, **73**, 20-28 (2007).

③Y. Ito-Dufros, Y. Funakoshi, A. Uehara, and K. Oishi. *In vitro* development of gut-like tissue demonstrating rhythmic contractions from embryonic mouse intestinal cells. *Neurogastroenterol Motil*. 査読有, **19**, 288-300 (2007)

[学会発表] (計4件)

①Oishi K. Neuroangiogenic potential of neural stem cells. The JSPS 2nd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Science

Platform Program, 2007/10, Phuket, Thailand (an invited lecture)

②Oishi K. Microvascular Pericytes from Mouse Brain Parenchyma Contract Isometrically. The 15th International Vascular Biology Meeting, 2008/7, Sydney, Australia (workshop)

③大石一彦、iPS細胞の分化と薬理学研究への応用、第36回日本トキシコロジー学会学術年会(日本薬理学会共催シンポジウム)、2009/7、盛岡(シンポジウム講演)

④小川泰弘、大石一彦、幹細胞から作製する再構成組織標本とその薬理的解析への応用、第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会(日本組織培養学会共催シンポジウム)、2009/11、大阪(シンポジウム講演)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 一彦 (OISHI KAZUHIKO)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80203701

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者