

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月 22現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21700363

研究課題名（和文）血管ニッチの有無による脳傷害誘導性神経幹細胞の移植効果の検討

研究課題名（英文）Effect of transplantation of ischemia-induced neural stem cells through vascular niches

研究代表者 中込 隆之 (NAKAGOMI TAKAYUKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：80434950

研究成果の概要（和文）：本研究では、血管ニッチ（血管内皮細胞）の存在が、脳梗塞後に誘導される神経幹細胞（虚血誘導性神経幹細胞）を介した神経再生にいかなる効果を及ぼすかを検討する目的で、血管内皮細胞を脳梗塞後のマウスの脳（大脳皮質）に移植した。その結果、血管内皮細胞を移植した群では、血管内皮細胞非移植群と比較し、同時に移植した虚血誘導性神経幹細胞の生存、増殖、神経分化を促進することが、明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the effect of transplantation of ischemia-induced neural stem cells through vascular niches. We found that endothelial cells support survival, proliferation and neuronal differentiation of transplanted ischemia-induced neural stem/progenitor cells after cerebral infarction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：神経再生、神経幹細胞、脳梗塞、血管ニッチ

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療的手法を用いた治療法が国内外の多数の施設で既に開始されるなど、着実な進歩を遂げているが、脳梗塞をはじめとした脳傷害に対する治療法はほとんど進歩が見られていないのが現状である。基礎研究レベルにおいても、ES細胞由来神経幹細胞、胎児由来神経幹細胞、さらには遺伝子操作に

より作成した神経幹細胞等を用いた研究が盛んに行われている。しかしながら、倫理的問題、移植による拒絶反応、遺伝子導入による発癌性の問題など、解決しなければならない種々の問題点があると同時にそれらの細胞による移植では神経細胞として脳内で生着、成熟し機能することが困難であることも次第に明らかとなりつつある。そこで、

我々は、脳傷害時に生体内で誘導される自己神経幹細胞の存在に着目し、その単離を試みてきた。その結果、脳梗塞後のマウスの大脳皮質（脳梗塞巣）より、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの三系統に分化する能力を有する内因性神経幹細胞を分離、培養することに成功し、現在までにその特性について明らかにしてきた（Eur J Neurosci, 2009）。

本研究では、この神経幹細胞を脳傷害の細胞移植治療として臨床応用することを目指す。本神経幹細胞は梗塞巣といった壊死組織より採取可能なうえ、生体外（vitro）において、容易に培養、増殖させることが可能なため、脳梗塞後のマウスにおいてこの細胞移植の有効性が確認できれば、新たな自己細胞移植療法となり得る。しかし、その一方で脳梗塞後の脳における神経再生に限界があることは周知の事実であり、従来の細胞移植実験が奏功しなかった背景に内在性神経幹細胞を取り巻く様々な因子、環境の存在を軽視してきたことが考えられる。最近、幹細胞の生着、増殖には幹細胞を維持する微小環境である niche（以下ニッチ）の存在が極めて重要であることも明らかになってきており、神経幹細胞においても、血管（血管内皮細胞）等がニッチとしての役割を果たしていることがわかってきた。我々も、血管新生が脳梗塞後の神経再生に重要であることを既に報告しており、vascular niche（以下血管ニッチ）が脳梗塞後の神経幹細胞の生着、増殖に非常に重要であると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が分離培養に成功した脳傷害（梗塞）誘導性神経幹細胞（injury-induced neural stem/progenitor cells; iNSPC）を脳梗塞治療に応用する目的

で、脳梗塞後のマウスに移植し、その生着、分化、機能を検討する。また、近年、成体幹細胞の維持とその後の活性化、分化に幹細胞ニッチの重要性が示されている。そこで、ニッチとして注目されている血管細胞（endothelial cells; EC）との共培養、共移植を行い、その効果を検証することで、脳傷害誘導性神経幹細胞の臨床応用につながる基礎的データを獲得することを目的とする。

3. 研究の方法

我々はマウスの大脳皮質の梗塞巣より取り出した脳傷害誘導性神経幹細胞をEGF(epidermal growth factor)、FGF(fibroblast growth factor)添加培地で培養することで、神経幹細胞塊（ニューロスフィア）を形成、増殖させる技術を確立している。また既に、このニューロスフィアが神経幹細胞のマーカーであるnestinを発現し、ニューロン（MAP-2、Tuj-1陽性細胞）、アストロサイト（GFAP陽性細胞）、及びオリゴデンドロサイト（O4陽性細胞）の三系統に分化することを免疫組織化学染色にて確認している。さらにニューロンは電気生理学的に活動電位を有する機能的な神経細胞であることも確認している。本研究では、この神経幹細胞（iNSPC）を脳梗塞後のマウスに移植し、生体脳における細胞移植の有効性を検討する。次に、神経幹細胞の移植効果のさらなる向上を目指し、ニッチとして血管内皮細胞（EC）も同時に移植し、血管ニッチの有無による移植効果の差を検討する。

4. 研究成果

iNSPC及びiNSPCとECの共移植に先立ち、ECがiNSPCの増殖、神経分化にどのような影響を与えるか、共培養系を用いた実験により検討した。その結果、iNSPCを単独培養した

群(iNSPC群)と比較し、iNSPCをECと共培養した群(iNSPC/EC群)では神経幹細胞のマーカーであるnestin陽性細胞数が約4倍と増加し、BrdU陽性増殖細胞数も約6倍と有意に高値を呈した。また、これらの細胞はTuj-1, GFAP, O4陽性神経細胞にも分化し、iNSPC/EC群ではTuj-1陽性神経細胞数、及びその割合とも、iNSPC群と比較し、有意に高値を呈した。

また、移植実験を行ったところ、iNSPC単独投与群においては、移植後5日目、28日目に生着していた神経幹細胞は、それぞれ、7.6%, 1.3%に過ぎなかった。また、移植後5日目に増殖していた神経幹細胞はわずか、0.3%であった。一方、神経幹細胞と同時に血管内皮細胞を共移植した群(iNSPC/EC群)では、移植後5日目、28日目にそれぞれ、34.1%, 8.3%の神経幹細胞の生着が確認でき、移植後5日目に3.9%の神経幹細胞に増殖が認められた。さらにiNSPC単独投与群においては、移植後28日目に、移植した細胞の1.1%でニューロン分化を認めた。一方、iNSPC/EC群では、3.4%でニューロン分化が認められ、iNSPC単独投与群に比べ、神経機能回復の亢進も確認された。以上の結果より、iNSPCは脳梗塞後の細胞移植治療として応用可能であり、iNSPCによる細胞移植治療における血管ニッチの有効性も本研究により示された。

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10件)

1. Nakagomi T, Molnár Z, Taguchi A, Nakano-Doi A, Lu S, Kasahara Y, Nakagomi N, Matsuyama T. Leptomeningeal-Derived

Doublecortin-Expressing Cells in Poststroke Brain. *Stem Cells and Development*, 2012, in press, 査読有.

2. Takata M*, Nakagomi T*, Kashiwamura S, Nakano-Doi A, Saino O, Nakagomi N, Okamura H, Mimura O, Taguchi A, Matsuyama T. Glucocorticoid-induced TNF receptor-triggered T cells are key modulators for survival/death of neural stem/progenitor cells induced by ischemic stroke. *Cell death and Differentiation*, 19, 756-767, 2012, 査読有. *co-first authors
3. Nakagomi T and Matsuyama T. Neural stem cells after brain injury: Do they originate developmentally from neural tube, neural crest, or both? *Stem Cells Studies*, 1:e21, 148-149, 2011, 査読有.
4. Clausen M, Nakagomi T, Nakano-Doi A, Saino O, Takata M, Taguchi A, Luiten P, Matsuyama T. Ischemia-induced neural stem/progenitor cells express pyramidal cells markers. *Neuroreport*, 22, 789-794, 2011, 査読有.
5. Nakagomi T, Molnár Z, Nakano-Doi A, Taguchi A, Saino O, Kubo S, Clausen M, Yoshikawa H, Nakagomi N, Matsuyama T. Ischemia-induced neural stem/progenitor cells in the pia mater following cortical infarction. *Stem Cells and Development*, 20, 2037-2051, 2011, 査読有.
6. Nakano-Doi A*, Nakagomi T*, Fujikawa M, Nakagomi N, Kubo S, Lu Shan, Yoshikawa H, Soma T, Taguchi A, Matsuyama T. Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells*, 28, 1292-1302, 2010, 査読有. *co-first

- authors
7. Saino O*, Taguchi A*, Nakagomi T*, Nakano-Doi A, Kashiwamura S, Doe N, Soma T, Nakagomi N, Yoshikawa H, Stern DM, Okamura H, Matsuyama T. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell-apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *J Neurosci Res*, 88, 2385-2397, 2010, 査読有. *co-first authors
 8. Nakayama D, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Nakagomi T, Kasahara Y, Hirose H, Kikuchi-Taura A, Stern DM, Mori H, Taguchi A. Injury-induced neural stem/progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex. *Eur J Neurosci*, 31, 90-98, 2010, 査読有.
 9. Nakagomi N*, Nakagomi T*, Kubo S, Nakano-Doi A, Saino O, Takata M, Yoshikawa H, Stern DM, Matsuyama T, Taguchi A. Endothelial cells support survival, proliferation and neuronal differentiation of transplanted adult ischemia-induced neural stem/progenitor cells after cerebral infarction. *Stem Cells*, 27, 2185-2195, 2009, 査読有. *co-first authors
 10. Nakagomi T, Taguchi A, Fujimori Y, Saino O, Nakano-Doi A, Kubo S, Gotoh A, Soma T, Yoshikawa H, Nishizaki N, Nakagomi N, Stern DM, Matsuyama T. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. *Eur J Neurosci*, 29, 1842-1852, 2009, 査読有.

[学会発表] (計 7 件)

1. Momota Y, Nakagomi T, Nakano-Doi A, Saino O, Taguchi A, Takata M, Tsukamoto Y, Miyamae M, Kotani J, Matsuyama T. Expression of neural stem cells induced by transient cortical ischemia in mice. XXXth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & Xth International Conference on Quantification of Brain Function and PET, Barcelona, Spain, 2011, 5/25-28.
2. Clausen M, Nakano-Doi A, Saino O, Takata M, Nakagomi T, Luiten P, Matsuyama T. Ischemia-induced neural stem/progenitor cells express pyramidal cell-markers in vivo and in vitro. XXXth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & Xth International Conference on Quantification of Brain Function and PET, Barcelona, Spain, 2011, 5/25-28.
3. 百田義弘、中込隆之、中野亜紀子、田口明彦、柴田啓貴、田片将士、塚本吉胤、小谷順一郎、松山知弘. 一過性脳虚血誘導性神経幹細胞発現の発現. 第 23 回日本脳循環代謝学会総会、東京、2011、11/4-5.
4. 中込隆之、土居亜紀子、田片将士、盧山、立花久大、田口明彦、土江伸誉、松山知弘. 大脳皮質梗塞後に誘導される脳軟膜由来神経幹細胞の発見. 第 23 回日本脳循環代謝学会総会、東京、2011、11/4-5.
5. 百田義弘、中込隆之、中野亜紀子、沖中由佳、斉野織恵、笠原由紀子、田口明彦、田片将士、盧山、宮前雅見、小谷順一郎、松山知弘. マウス虚血再灌流モデルにおける神経幹細胞発現の検

討. 第22回日本脳循環代謝学会総会、
大阪、2010、11/26-27.

6. Nakano-Doi A, Nakagomi T, Nakagomi N, Saino O, Takata M, Lu S, Tachibana H, Taguchi A, Matsuyama T. Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. 第33回日本神経科学大会, 神戸, 2010, 9/2-4.
7. 中野亜紀子、中込隆之、藤川昌敏、盧山、斎野織恵、田片将士、中込奈美、田浦映恵、田口明彦、松山知弘. 骨髄単核球投与が脳梗塞後の脳血管内皮細胞と神経幹細胞に及ぼす影響の検討. 第21回日本脳循環代謝学会総会、大阪、2009、11/19-20.

[図書] (計1件)

1. Nakagomi T and Matsuyama T. Ischemia-induced neural stem/progenitor cells within the post-stroke cortex in adult brains. *Neural Stem Cells and Therapy*, 2012, Chapter 16.

6. 研究組織

(1) 研究代表者 (NAKAGOMI TAKAYUKI)

中込 隆之

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：80434950

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：