脳由来虚血誘導性多能性幹細胞

中込 隆之

要 旨

脳がひとたび梗塞性変化をきたすと、その変化は不可逆的であり、脳梗塞巣には壊死組織や炎症細胞しか存在しないという考えがこれまでの通説であった。しかし、我々は、マウス大脳皮質脳梗塞モデルを用い、脳梗塞巣には幹細胞が誘導されていることを発見した。この幹細胞は神経系の細胞に分化可能であったことから、我々は脳傷害誘導性神経幹細胞(injury-induced neural stem/progenitor cells; iNSPCs)と命名してきたが、その後の研究により、iNSPCsは神経系以外の細胞にも分化可能な多能性幹細胞であることが明らかとなった。本稿では、我々がこれまでに得た知見をもとに、この脳由来虚血誘導性多能性幹細胞(Brain-derived ischemia-induced multipotent stem cells; BiSCs)に関する特性やその起源を中心に、BiSCsを介した再生治療の展望に関して紹介する。

(脳循環代謝 26: 203~206, 2015)

キーワード: 脳梗塞, 虚血, 神経幹細胞, 多能性幹細胞

1. はじめに

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¹⁾。

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subtypes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相次いで報告されており^{2,3)}、NSPCsは広義には神経系以外の細胞にも分化可能な多能性幹細胞であると解釈することができる。我々も、

iNSPCsとして分離培養してきた細胞の中には、神経系以外のlineageの細胞にも分化可能な多能性幹細胞が存在することを最近明らかとした⁴⁾。そこで、本稿では、脳由来虚血誘導性多能性幹細胞(Brain-derived ischemia-induced multipotent stem cells; BiSCs)という観点より、本幹細胞について紹介する。

2. BiSCsの起源・特徴

脳梗塞後の虚血領域(脳梗塞巣)に誘導されるBiSCsは、神経幹細胞のマーカーであるnestinを強発現しているが、in vivoにおけるnestin陽性細胞の局在を調べたところ、その細胞は脳表を取り巻く脳軟膜(pia mater)から脳実質(大脳皮質)にかけて血管壁に沿って分布していることが明らかとなった。しかも、この細胞はNG2やPDGFR β といったペリサイト(血管周皮細胞)のマーカーも同時に発現していることから、BiSCsの起源は、虚血領域の脳軟膜や脳実質に存在するペリサイトであると考えられた⁵⁾。

脳のペリサイトは神経、血管系の細胞とともにneurovascular unit(NVU)を形成し、脳血流量(cerebral blood flow; CBF)の調節やNVUの恒常性の維持に関与し、NVUの機能にとって重要な役割を果たしている

兵庫医科大学先端医学研究所
〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町 1-1
TEL: 0798-45-6821 FAX: 0798-45-6823
E-mail: nakagomi@hyo-med.ac.jp

ことは、以前よりよく知られていたが、近年、多能性幹細胞としての特性を有することも明らかとなった⁶⁾。しかし、成体マウスを用いた我々の研究では、nestinをはじめとした幹細胞マーカーは脳梗塞領域のペリサイトではみられるものの、正常病態下の脳ではほとんど発現していない^{4,5)}。このことは、正常病態下と傷害病態下におけるペリサイトでは、その特性は完全に異なっており、成体脳においては傷害病態下におけるペリサイトがBiSCsとしての能力を有すると考えられる。

ペリサイト由来と考えられるBiSCsは、神経系の細胞に分化するが、中枢神経系以外の臓器(組織)に存在するペリサイトは骨、軟骨、脂肪細胞などへの多分化能は有するものの、神経系への分化能力は低い。脳のペリサイトが神経系の細胞に分化可能な理由は不明であるが、その理由のひとつとして発生学的な特徴が考えられる。即ち、ペリサイトは一般的に中胚葉(mesoderm)に由来すると考えられているが、脳のペリサイトの一部は神経堤(neural crest)に由来する点である⁷⁾。神経堤は間葉系に加え、神経系の特性も有するため、脳のペリサイトは他の臓器に存在するペリサイトに比べると神経系に分化しやすい特性を有しているのかもしれない。

3. BiSCs と鑑別すべき多能性幹細胞

BiSCsは神経系以外に血管系の細胞にも分化する⁴⁾。従来、血管系の細胞に分化する幹細胞の起源として造血幹細胞などの骨髄由来幹細胞の存在が注目されてきたが、最近では、全身の臓器に存在する血管壁そのものに神経系、血管系、骨、軟骨、脂肪等、様々な細胞に分化可能な多能性幹細胞が存在することが次々と報告されている。それらの幹細胞は、vascular stem cells, vascular wall-resident stem cells等の名称で呼ばれてきたが、Linらは、これらの細胞が多能性幹細胞としての能力を有するペリサイトである可能性が高いことを報告している⁸⁾。

一般的にペリサイトは、毛細血管のような末梢血管の周囲に存在する細胞を指すのに対し、より太い血管の周囲に存在する多能性幹細胞は、adventitial progenitor cells(APCs)との名称で呼ばれている⁸⁾。しかしながら、両者とも多能性幹細胞としての特性を有し、共通したマーカーを発現しており、極めて類似性の高い細胞であると考えられる。

ペリサイトと同様に、グリア細胞は神経幹細胞の起源と考えられている。とくに、オリゴデンドロサイト前駆細胞(oligodendrocyte precursor cells; OPCs)はペリ

サイトと同様にNG2等のマーカーを発現し、特殊な条件下で神経幹細胞となり得る⁹⁾。したがって、ペリサイトと血管周囲に存在するOPCsを区別することは、非常に重要であるが、最近ではグリア細胞の中にはペリサイトに分化する細胞が存在するとの報告もある¹⁰⁾。したがって、ペリサイトとOPCs等のグリア細胞が全く異なる細胞であるのか、それらの名称で呼んできた細胞の中には同じ細胞が含まれているのか、今後、さらなる検討が必要である。

ペリサイトは、血管の周囲に存在する多能性幹細胞であるが、血管の周囲にはこれまでも様々なタイプの多能性幹細胞の存在が示唆されてきた。その一つとして間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells; MSCs)があげられる。MSCsはペリサイトと同様に多分化能を有し、骨、軟骨、脂肪などの細胞に分化することはよく知られているが、一般的に神経系への分化能力は高くない¹¹⁾。しかし、近年、脳の血管周囲にもMSCs(perivascular MSCs)が存在し、そのMSCsは脳のペリサイトと共通する様々なマーカーを発現し、神経系にも分化することが報告されている¹²⁾。また、発生学的にペリサイトはMSCsの起源であると考えられていることから¹³⁾、ペリサイトを起源とするBiSCsとperivascular MSCsは元々類似した細胞特性を有する細胞である可能性がある。しかしながら、その詳細に関しては、今後さらなる研究が必要である。

4. BiSCs の誘導因子

脳梗塞領域より単離した細胞をReynoldsらの方法に準拠し¹⁴⁾、basic fibroblast growth factor(bFGF)、epidermal growth factor(EGF)添加培地で培養することで、BiSCsは非常に容易に得ることができる。しかしながら、非虚血領域の対側の正常脳を単離、培養してもBiSCsは得られない¹⁾。このことは、脳虚血による刺激がBiSCsの誘導に必要な不可欠であることを示している。実際、我々も正常の脳由来ペリサイトをoxygen-glucose deprivation(OGD)条件下にて培養したところ、幹細胞マーカーの発現が亢進することを、最近、明らかにした。また、BiSCsの起源が血管の周囲に存在するペリサイトであることから、BiSCsの幹細胞化には、隣接して存在する血管内皮細胞も重要な役割を果たしている可能性がある。そこで、我々はOGD条件下でペリサイトを培養する際に、血管内皮細胞由来のtrophic factorが、ペリサイトの幹細胞化に与える影響について調べた。その結果、trophic factorを添加した群では、trophic factorを添加しない群と比較して幹細胞化が亢進されることをつきとめた⁴⁾。したがっ

て、BiSCs はペリサイトが脳虚病態下に血管内皮細胞の影響下を受けながら、幹細胞としての性質を獲得することで誘導されるものと推測される。

また、BiSCs は様々な幹細胞・未分化細胞マーカー (nestin, Sox2, Klf4, c-myc, Nanog 等) を発現しているものの、山中 4 因子のひとつである Oct4 の発現は認めなかった^{4,5)}。このことは、虚血負荷によってペリサイトは幹細胞化するものの、BiSCs は embryonic stem (ES) 細胞や induced pluripotent stem (iPS) 細胞のような万能幹細胞とは異なる特性を有する幹細胞であることを示している。

5. おわりに

脳のペリサイトは、神経系と血管系の細胞とともに 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。しかし、近年、脳梗塞後の動物に神経系と血管系の細胞を共移植することで NVU の再構築が可能であることが報告された¹⁵⁾。脳梗塞後に内在性に誘導される BiSCs 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、BiSCs の活用により、脳傷害後の NVU の再構成を標的とした臨床応用が期待できる。

BiSCs はペリサイト系の細胞を起源とする傷害誘導性多能性幹細胞と考えられるが、ペリサイトは全身の臓器の血管壁に存在するため、病態下においてペリサイトが幹細胞化することは生体にとって合理的なことであると思われる。その正確な起源や特性、誘導メカニズムなどに関しては、まだまだ不明な点が多い。今後、これらの点を一つ一つ、明らかにしていくことで、BiSCs を介した神経再生療法の発展が期待される。

文 献

- 1) Nakagomi T, Taguchi A, Fujimori Y, Saino O, Nakano-Doi A, Kubo S, Gotoh A, Soma T, Yoshikawa H, Nishizaki T, 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
- 2) Ii M, Nishimura H, Sekiguchi H, Kamei N, Yokoyama A, Horii M, Asahara T: Concurrent vasculogenesis and neurogenesis from adult neural stem cells. *Circ Res* 105: 860–868, 2009
- 3) Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, Gage FH: Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 430: 350–356, 2004
- 4) 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
- 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 Dev* 20: 2037–2051, 2011
- 6) Dore-Duffy P, Katychew A, Wang X, Van Buren E: CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 613–624, 2006
- 7) Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF: The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* 128: 1059–1068, 2001
- 8) Lin CS, Lue TF: Defining vascular stem cells. *Stem Cells Dev* 22: 1018–1026, 2013
- 9) Kondo T, Raff M: Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289: 1754–1757, 2000
- 10) Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD, Min W, McLendon RE, Rich JN, Bao S: Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153: 139–152, 2013
- 11) Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B: A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3: 301–313, 2008
- 12) Paul G, Özen I, Christophersen NS, Reinbothe T, Bengzon J, Visse E, Jansson K, Dannaeus K, Henriques-Oliveira C, Roybon L, Anisimov SV, Renström E, Svensson M, Haegerstrand A, Brundin P: The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* 7: e35577, 2012
- 13) Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT: Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 6503–6508, 2011
- 14) Reynolds BA, Weiss S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707–1710, 1992
- 15) Li J, Tang Y, Wang Y, Tang R, Jiang W, Yang GY, Gao WQ: Neurovascular recovery via co-transplanted neural and vascular progenitors leads to improved functional restoration after ischemic stroke in rats. *Stem Cell Reports* 3: 101–114, 2014

Abstract

Brain-derived ischemia-induced multipotent stem cells

Takayuki Nakagomi

Institute for Advanced Medical Sciences, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan

It is an established concept that damaged brains undergo irreversible change after cerebral infarction and that only necrotic and inflammatory cells are observed within post-ischemic areas. However, using a mouse model of cortical infarction, we have shown that endogenous neural stem/progenitor cells (NSPCs) are activated within post-ischemic areas following cerebral infarction. We named these cells injury/ischemia-induced NSPCs (iNSPCs) because they can differentiate into neural lineages. However, we recently found that iNSPCs exhibit multipotent stem cell activity and that they can differentiate into not only neural but also non-neural lineage cells. In this article, we introduce the origin and characterization of these brain-derived ischemia-induced multipotent stem cells (BiSCs) based on our reports and recent viewpoints. We also refer to possible regeneration by BiSCs following cerebral infarction.

Key words: cerebral infarction, ischemia, neural stem cells, multipotent stem cells