

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	浅野目 晃
<p>学位論文題目</p> <p>Nerve growth factor stimulates regeneration of the perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery. (神経成長因子は末梢神経の再生を介して障害血管周囲の微小血管の成熟化を促進する)</p> <p>共著者名</p> <p>川辺 淳一、松木 孝樹、鹿原 真樹、平 義樹、暮地本 宙巳 山内 敦司、青沼 達也、竹原 有史、渡部 剛、長谷部 直幸、</p> <p>Biochemical and Biophysical Research Communications 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>Vasa vasorumは血管外膜に分布する微小血管網で、血管壁に酸素や栄養を供給している血管である。動脈硬化病変の血管壁の肥厚につれvasa vasorumが増殖する。形成された微小血管が未成熟であるとプラーク内出血や炎症細胞の浸潤などをもたらし、プラークの増大や不安定化をもたらし、心筋梗塞などの重大な疾患を引き起こすことが明らかになってきた¹⁾。従って動脈硬化疾患対策として、vasa vasorum微小血管形成制御が重要な治療標的となる。しかし、血管壁の微小血管を詳細に評価する方法はなく、病的状態でのvasa vasorum血管新生に関して不明な点が多い。</p> <p>血管周囲に分布する末梢神経(perivascular nerve)は、血管の収縮弛緩制御を介して血圧維持に重要な役割を果たしている。一方、胎生発生期において、末梢神経は血管の分枝パターンや動静脈への分化を制御していることが知られている²⁾。しかしながら、成体において、特に病的状態の血管新生において、再生する末梢神経がどのように関与しているのかは不明である。</p> <p>Nerve growth factor (NGF)は、末梢神経や中枢神経細胞の成長とその機能維持、さらに神経再生を促進する因子である。NGFには、神経再生作用に加えて、血管新生作用があることが報告されている。その血管新生作用の機序としては直接血管内皮細胞に働きかける作用やvascular endothelial growth factor (VEGF)など内因性の血管増殖因子を介した作用が考えられている³⁾。しかし、NGFによって促進される末梢神経再生が、血管新生に及ぼすのか不明である。</p> <p>本研究では、成体で形成される微小血管を評価するために開発した新規in vivo血管新生アッセイを用いて、NGFのvasa vasorum血管新生への影響を評価し、血管新生と末梢神経再生との関連性の解明を目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 大腿動脈障害モデル

実験動物は10-12週齢のC57BL/6雄性マウスを用いた。左大腿動脈より直径0.38mmのワイヤーを挿入し1分間留置し、血管内腔内皮の障害を惹起した。障害血管は、その後、障害血管壁のリモデリングに平行して、大腿動脈外膜部にもvasa vasorum微小血管の形成が著明に観察される。微小血管形成が最大となる術後2週間目に、微小血管形成を評価した。

2. Collagen-coated tube (CCT)を用いたIn vivo血管新生アッセイ

ポリエチレン製チューブ(内径1.2mm,長さ3 mm)の表面にcollagen-Iを付着させたCCTを障害血管隣に留置し、術後2週後にCCTを取出し、パラホルム固定した後、CCT上に形成された新生血管を含む被膜(厚さ200~300 um)を取出し、各種検査に供した。VEGFやNGFの障害血管周囲の微小血管形成に与える影響を調べるため、同因子を吸着させた生体吸収性活性物質徐放ゲル(®MedGel)をCCT上に留置した。

3. 組織学的解析

固定したCCT被膜をガラス板に展開し、被膜上に二次元に分布している新生血管について、血管新生ソフトウェア(KURABO)を用いて、新生血管の全長および外径20µm以上の血管の長さをそれぞれ計測した。ヘマトキシエチレン染色あるいは電子顕微鏡を用いて組織学的評価を行った。

3. 免疫組織学的解析

術後2週間後にGFP-Lectin液を尾静脈より注入し血管内皮を染色した後、灌流固定した。その後、CCTから被膜組織を取り出し、各種免疫染色を行った。使用した抗体は、anti-PGP9.5(末梢神経), anti-tyrosine hydroxylase(交感神経), anti-CD31(血管内皮)、anti-NG2(血管周細胞)抗体を用い、confocal蛍光顕微鏡を用いて観察した。前述と同様の方法で、全血管長と神経が伴走している血管の長さをそれぞれ計測した。

4. Aorta Ringを用いたEx vivo血管新生アッセイ

本血管新生アッセイは、内皮チューブの形成とともに、組織内の周細胞による被覆で、ある程度の血管成熟化(外径10 µm以上)も評価できる方法である。マウスから胸部大動脈を摘出し0.7mm長に切断したリング状の組織をマトリゲル内に留置した後、血管新生用培地(VEGF(10ng/ml)あるいはNGF(50 ng/ml)を含む)存在下で培養し、7日後、血管組織から発芽(sprouting)する血管について、全長と径10µm以上の血管の長さをそれぞれ計測した。

成 績

1. 障害血管外膜に形成される微小血管の評価

手術2週間後には障害大腿動脈周囲やCCT表面上に著明な新生血管の増殖が確認できた。薄いCCT被膜内には、新生微小血管のほとんどが二次元に展開しており、本法により、客観的かつ詳細に新生血管を評価することを確認した。微小血管の中で外径20µmに満たない内皮細胞の一部が周細胞に被覆された程度の未熟な毛細血管から外径50µmを超える平滑筋に被覆された細動脈レベルの血管など様々な成熟段階の血管を確認できた。CCT被膜上の血管新生の程度は、障害血管外膜のそれとよく相関し、非障害血管近傍に留置したCCT上では、明らかな新生血管形成は認めなかった。

電子顕微鏡において、血管内皮チューブに一部周細胞が付着している程度の毛細血管の近傍に無髄神経線維が局在していることが頻りに観察された。免疫染色でtyrosine hydroxylase陽性の交感神経の局在を観察すると、驚くことに、外径が10-20 μ m程度の収縮能が完全に備わっていないレベルの幼若微小血管の周囲に交感神経がすでに伴走していることが確認された。

2. 障害血管周辺の血管新生におけるVEGF/NGFの効果

VEGF含む徐放ゲル留置により、CCT被膜内の新生血管は著明に亢進した。新生血管全長は有意に増加したが、外径の大きな成熟した血管の割合は有意に低下していた。被膜内の微小出血数も著明に増加していた。一方、NGF投与群では、血管長は増加傾向にあったものの、成熟血管の割合は著明に増加しており、微小出血数は減少していた。VEGFとNGF投与群では、新生血管全長がVEGF単独群同様に増加し、さらに成熟血管の割合も有意に増加していた。また、VEGF単独投与群で認めた微小出血所見が著明に減少していた。

3. 微小血管周囲の末梢神経再生におけるVEGF/NGFの効果

電顕観察などで観察されたように外径20~50 μ m以上の血管の一部に末梢神経線維が伴走することが観察された。VEGF投与群では、外径20 μ m以下の微小血管形成が著明で、末梢神経と伴走する血管の割合は有意に減少していた。NGF投与群では、VEGF有無関係なく、末梢神経と伴走する新生血管の割合は有意に増加した。

4. Ex vivoでの血管新生におけるVEGF/NGFの効果

末梢神経が存在しない環境下である血管新生における各種増殖因子の効果を観察した。VEGFあるいはNGF投与群において、新生血管の長さは有意に増加した。しかし、NGF投与群において、in vivoで観察された血管成熟効果は観察されなかった。

考 案

我々が開発した CCT血管新生アッセイは、障害血管周辺で生じる新生血管を二次元的に観察することができ、成熟化評価も含め新生血管を定量的に評価することが可能であった。また、薄い被膜組織であるため、免疫染色による機能的評価や電子顕微鏡を用いた詳細な組織的評価も可能となる優れたアッセイ法である。

本アッセイを利用することにより、内皮チューブに周細胞が一部付着する幼若な微小血管レベルで、すでに末梢神経が再生されていることを世界で初めて見出した。成体における血管周囲神経の役割は、血管トーンスを調整するものと認識されているだけに、この発見は驚きであり、また、収縮能を獲得していない幼若血管レベルでの末梢神経再生は、末梢神経が血管新生においても何らかの別の役割を果たすという仮説を想起させた。

同じ血管新生因子でも、VEGFの場合、幼若な血管形成を誘導するのに対し、NGFは、血管新生のなかでも血管成熟化という点で大きな特徴を示すことを明らかにした。この効果は、神経再生が無いEx vivo血管新生アッセイ系では認めず、血管周囲神経の再生促進と並行してみられることから、NGFによる血管の成熟化作用は、血管構造細胞への直接作用ではなく、血管以外の因子、特に末梢神経再生が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、末梢神経再生が、どのように血管成熟化をもたらすのかという機序解明の研究が必要である。

NGFなどの末梢神経再生を伴う血管新生作用は、vasa vasorumの成熟・安定化にも有効

である。本知見を応用して、プラーク形成抑制・安定化制御が可能となれば、プラークに起因する動脈硬化性疾患の新たな治療の選択枝になるものと期待できる。

結 論

我々は、独自に開発したin vivo血管新生アッセイを用いて、障害血管周囲に増殖する微小血管において未熟な血管段階ですでに末梢神経が血管周囲に走行していることを見いだした。血管の成熟化においては、NGFによる末梢神経再生が重要な役割を果たしていると考えられる。




引用文献

1. B.Doyle, N.Caplice *et al.* Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 49(2007) 2073-2080
2. Y.S.Mukouyama, D.Shin, S.Britsch, M.Taniguchi, D.J.Anderson *et al.* Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 109(2002) 693-705
3. B.Nico, D.Mangieri, V.Benagiano, E.Crivellato, D.Ribatti *et al.* Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res* 75(2008) 135-141

参考文献

1. J.Kawabe, K.Yuhki, M.Okada, T.Kannno, A.Yamauchi, N.Tashiro, T.Sasaki, S.Okumura, N.Nakagawa, Y.Aburaakawa, N.Takehara, T.Fujino, N.Hasebe, S.Narumiya, F.Ushikubi, Prostaglandin I2 promotes recruitment of endothelial progenitor cells and limits vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(2010) 464-470
2. Y.Aburaakawa, J.Kawabe, M.Okada, A.Yamauchi, A.Asanome, M.Kabara, M.Matsuki, N.Takehara, N.Nakagawa, S.Okumura, Y.Minami, Y.Mizukami, K.Yuhki, F.Ushikubi, N.Hasebe, Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation recovery in ischemic hind limb model. *Circ J* 77(2013) 1053-1062
3. A.Yamauchi, J.Kawabe, M.Kabara, M.Matsuki, A.Asanome, T.Aonuma, H.Ohta, N.Takehara, T.Kitagawa, N.Hasebe, Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 maintains adhesion of endothelial progenitor cells and reduces neointima formation. *AJP* 305(2013) H1158-1167

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	浅野目 晃
<p>審査委員長 東 信良 </p> <p>審査委員 船越 洋 </p> <p>審査委員 長谷部 直幸 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Nerve growth factor stimulates regeneration of the perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery.</p> <p>(神経成長因子は末梢神経の再生を介して 障害血管周囲の微小血管の成熟化を促進する)</p>			
<p>急性冠症候群の原因となる冠動脈病変の形成過程において、不安定プラークの破綻が重要であることが近年の研究で知られてきた。プラークの不安定化に関与する一因として近年 vasa vasorum という血管の栄養血管が注目され、幼弱な vasa vasorum がプラーク内で破綻することにより炎症が惹起され不安定化につながる事が解明されつつある。これまでの報告では vasa vasorum の新生を抑制することにより動脈硬化が起こりにくくなることは知られているが成体の病的状態下での報告はない。本研究では、従来とは異なる観点で、新生した vasa vasorum を成熟化させることでプラークの安定化を図るというものである。Vasa vasorum は密な分布で評価が難しいものであったが、本研究では大腿動脈をワイヤーで障害する手法を用いて新生血管の評価を行う新たなアッセイ系を開発し、傷害血管周囲における vasa vasorum の新生過程を観察することに成功した。(次頁へつづく)</p>			

その結果、病的状態下で増殖してきた幼弱な血管の周囲にすでに末梢神経が存在していることを世界で初めて発見した。この *In vivo* の実験系で、血管内皮増殖因子 VEGF を加えると、全新生血管長は有意に増加していたが血管構造としては脆弱なものが主に増加していた。神経成長因子 NGF を加えると径の太い成熟した血管が増加しており、VEGF と NGF の両者を加えた群では VEGF による血管増加の効果はそのままに成熟した血管が増加していた。また、NGF 投与により末梢神経が血管のより近傍を走行するようになることが確認された。しかし、神経成長の起こらない *Ex vivo* の実験系では同様の増殖因子・成長因子を加えても、VEGF による血管増加の効果は変わりなく確認されたが、NGF による血管の成熟化はみられず、これらの結果を総合すると、NGF による血管の成熟化は NGF の血管への直接作用ではなく NGF によっておこる神経成長そのものが重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究で、血管の成熟化には末梢神経が重要な役割を果たしていることが推測され、今後さらなるメカニズムの解明が進むことにより、*vasa vasorum* を標的とした新たな動脈硬化の治療の開発へつながることが期待できる。

本論文で得られた新たな知見は、今後の血管新生や動脈硬化研究に新たな展開を期待させる価値ある内容を有している。また、論文提出者に対する論文内容および関連領域に対する諮問に対しては、適切、明解な回答が得られ、研究領域における高い資質を有することが確認された。

以上より、当審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値すると判定した。