

# 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	藪島 暁帆
学位論文題目			
<b>Pericyte-specific Ninjurin1 deletion attenuates vessel maturation and blood flow recovery in hind limb ischemia</b>			
(周細胞特異的Ninjurin1欠損は下肢虚血において血管成熟化と血流回復を減弱させる)			
共著者名			
鹿原真樹 松木孝樹 吉田有里 鹿野耕平 富田唯 早坂太希 堀内至 齊藤幸裕 青沼達也 西村正人 丸山啓介 中川直樹 澤田潤 竹原有史 長谷部直幸 川辺淳一			
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 平成30年 掲載予定			
研究目的			
<p>血管新生は、組織の虚血に対する重要な防御反応である。「虚血」に反応して既存血管から伸展した新生内皮 (EC) チューブの周囲に周細胞 (PC) が覆い、結果として構造的に安定し、機能的には血流を伴う成熟した血管を形成する<sup>[1]</sup>。この新生血管の成熟化の過程で、ECとPCとの相互作用が重要であるが、その制御機序について不明な点が多い。</p> <p>Nerve injury-induced protein1 (Ninjurin1; Ninj1) は、もともと神経組織の傷害を契機に発現し神経再生に関わる接着分子として同定されていた<sup>[2]</sup>。我々は、独自に開発した<i>in vitro</i> 血管新生システムによる網羅的遺伝子発現解析により、ECとPCとの接着を介して成熟血管形成に関与する新規因子としてNinj1を見出した<sup>[参考文献1]</sup>。</p> <p>本研究は、組織の虚血病態下の血管新生におけるNinj1の役割を明らかにするため、マウス下肢虚血モデル(Hind Limb Ischemia, HLI)を用いて虚血組織での血液再灌流や血管新生に及ぼすPC特異的Ninj1欠損の効果を解析した。</p>			
材料・方法			
<p><b><i>in vivo</i> 下肢虚血(HLI)モデル</b>； C57BL/6マウス(雄性、12週齢)の左下肢の大腿動静脈を結紮し、同部位の皮下脂肪とともに摘除した。術後、4週間にわたり経時的にレーザードップラーを用いて下肢の血流を計測し、健側肢との比を算出し下肢還流度を評価した。Ninj1遺伝子発現抑制のため、①Ninj1特異的siRNA徐放ゲルを下肢組織に注入した(Ninj1 knockdown (KD)モデル)、②NG2-CreER × Ninj1 loxPマウスを作製し、tamoxifen(tam)処理した(周細胞(NG2陽性細胞)特異的Ninj1 knockdown (KD)モデル)を用意した。対照群として、それぞれ①control siRNAゲル投与群、②tam未処置群あるいは、tam処置Ninj1 loxP群を用意した。術後2、4週後に、血流を伴う血管を染色するために尾静脈から蛍光レクチンを導入した後、パラホルムアルデヒドで還流固定し、各種の組織学および生化学的解析を行った。</p>			
<p><b><i>in vitro</i> 血管新生アッセイ</b>； マウスの皮下脂肪組織より磁気細胞分離法(MACS®)で単離調整したNG2陽性PC、あるいは、本研究施設で樹立した不死化した毛細血管由来PCおよびEC株を用いた<sup>[参考文献2]</sup>。使用する細胞に、標的遺伝子のsiRNAあるいは発現用遺伝子組換えplasmidを導入して該当遺伝子のKDあるいはoverexpression (OE)した後、三次元ゲル内で共培養し、血管形成能を評価した。</p>			

## 成 績

**マウスHLIモデル実験:** HLI虚血組織において微小血管細胞においてNin1の発現が亢進した。Nin1特異的siRNA含有徐放粒子により下肢組織でのNin1をKDさせると、HLI後の下肢虚血回復度が対照群に比べ、有意に低下した。また周細胞特異的なNin1 KOマウスにおいて、同様に下肢虚血回復度が著明に低下した。虚血組織におけるCD31 (ECマーカー) 陽性微小血管総数の増加は、Nin1KD/KO群でも対照群と同等に観察されたが、血流を認める機能的成熟血管の割合やPCと接着するCD31陽性血管の割合は、Nin1KD/KO群で有意に低下していた。

**血管形成アッセイ実験:** ECとPCを三次元ゲル内で共培養すると、ECチューブの周りにPCが接着して毛細血管様構造を形成する。ECあるいはPCのNin1をKDさせると、EC-PC間の接着が低下し、ECチューブは形成するが毛細血管様構造の形成が著明に抑制された。

Nin1KDあるいはOEさせたPCにおいて、血管新生に関与する既知の因子の遺伝子発現をqPCRで評価すると、PCにおける血管成熟化因子angiopoietin1(ang1)発現はNin1 OEで上昇し、ang1の抑制因子であるang2の発現はNin1 KDで上昇した。PCにおいてang2をKDさせると、Nin1抑制による毛細血管形成低下効果が減弱した。

## 考 案

従来の血管新生研究は、ECによるチューブ形成 (血管新生の初期) が主体で、PCが接着して、さらに成熟した機能的血管形成 (血管新生の後期) に至る研究が不足していた。今回、我々が作成した周細胞特異的Nin1 KOマウスモデルで、虚血組織において、血管新生の初期と後期の過程が分断され、虚血回復の遅延という形質変化が観察され、血管新生における成熟化の過程の重要性とそれに関わる新規因子Nin1を明らかにした点で大きな意義があると考えられる。

Nin1の血管成熟化作用機序については、接着因子としてEC/PCの接合に直接作用する機序と、一部はECとPCの両細胞の接合・血管成熟化を制御する因子として知られているang1/2<sup>[1]</sup>の発現制御を制御する機序を介して、血管成熟化に関与していると考えられた。また、我々はこれまで、新生血管の成熟に末梢神経の伴走化が重要であることを報告している<sup>[3]</sup>。PCの一部に神経細胞に分化する幹細胞が含まれ<sup>[参考文献2]</sup>、Nin1 KDにより同細胞の神経系分化能が抑制されることから、PCのNin1は末梢神経再生にも関与し、結果として血管の成熟化にも寄与していると可能性もあり、今後検討していきたい。

## 結 論

Nin1は、ECチューブとPCとの接合促進を介して、血管新生の成熟化の過程に重要な血管新生制御因子の一つである。虚血組織で発現が亢進するNin1は、新生血管の成熟化を介して、虚血組織の血流改善に重要な役割をはたすことが示唆され、各種の虚血疾患の治療標的として注目される。




引 用 文 献

- 1) Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003;9:685-693
- 2) Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron.* 1996;17:353-361
- 3) Asanome A, Kawabe J, Matsuki M, Kabara M, Hira Y, Bochimoto H, Yamauchi A, Aonuma T, Takehara N, Watanabe T, Hasebe N. Nerve growth factor stimulates regeneration of perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery. *Biochem Biophys Res Comm.* 2014; 443: 150-155

参 考 論 文

- 1) Matsuki M, Kabara M, Saito Y, Shimamura K, Minoshima A, Nishimura M, Aonuma T, Takehara N, Hasebe N, Kawabe J. Ninjurin1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes. *Circ J.* 2015;79:1363-1371
- 2) Kabara M, Kawabe J, Matsuki M, Hira Y, Minoshima A, Shimamura K, Yamauchi A, Aonuma T, Nishimura M, Saito Y, Takehara N, Hasebe N. Immortalized multipotent pericytes derived from the vasa vasorum in the injured vasculature. A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration. *Lab Invest.* 2014;94:1340-1354

## 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	篠島 暁帆
		審査委員長	東 信良 
		審査委員	牛首 文隆 
		審査委員	長谷部 直幸 
学位論文題目			
<p><b>Pericyte-specific Ninjurin1 deletion attenuates vessel maturation and blood flow recovery in hind limb ischemia</b></p> <p>(周細胞特異的 Ninjurin1 欠損は下肢虚血において血管成熟化と血流回復を減弱させる)</p> <p>掲載雑誌：</p>			

(審査評価・結果のみとし、800字以内で提出すること。)

血管新生の早期において、周細胞は既存の血管の内皮細胞から離れ、そこから内皮の発芽進展がおこる。一方後期においては、周細胞は進展した内皮に再度接着し、内皮の増殖を抑制し成熟血管を形成すると考えられているが、その機序に関する知見は限定的である。周細胞と内皮細胞が接合することで発現亢進する遺伝子群の中から Ninjurin1(Ninj1)に着目し、血管新生における Ninj1 の役割を明らかにする目的で、本研究が行われた。

実験1として、下肢虚血における周細胞の Ninj1 欠損の影響をみるため、周細胞特異的 Ninj1 ノックアウト(KO)マウスを作製し、虚血肢モデルにおいて、Ninj1 KO マウスとコントロールマウスを比較した。その結果、Ninj1KO マウスでは、control と比べ血流改善が有意に障害された。この機序を、組織学的に評価したところ、血流を有する機能的血管の割合は、Ninj1 KO にて有意に低下し、かつ、Ninj1 KO 群では、周細胞と接着している内皮細胞の割合も同様に低下していた。

続いて実験2として、Ninj1 の血管成熟化の機序を解明すべく、周細胞と内皮細胞を3Dゲル内で共培養する系において、Ninj1 発現を抑制すると、成熟血管様構造形成が抑制された。さらに、周細胞の Ninj1 を過剰発現させると血管成熟因子 Angiotensin II の発現は亢進し、Ninj1 を抑制させると Anpt1 のアンタゴニストである Anpt2 の抑制は、Ninj1 の発現抑制による血管成熟能低下の効果を減弱させた。

本研究によって、血管新生の後期に発現が亢進する Ninj1 は内皮と周細胞との接合により、機能的な成熟血管形成を促進させ、結果として虚血組織の環流を改善させるものと考えられた。本知見は各種の虚血や血管新生が関わる病態の解明と、その治療開発の標的となり得る画期的な成果であると考えられた。

なお、論文提出者に対する論文内容および関連領域の質問に対して、適切、明快な回答が得られ、学力も十分であると判断された。

以上より、審査委員会として、本論文は博士(医学)に値すると判定した。