

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	松尾 梨沙
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Ninjurin1 deletion in neuron-glia antigen 2-positive pericytes prevents microvessel maturation and delays wound healing (Neuron-glia antigen 2 陽性周細胞における Ninjurin1 の欠損は微小血管の成熟化を抑制し 創傷治癒を遅延させる)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>岸部麻里・堀内 至・鹿野耕平・竜川貴光・早坂太希・鹿原真樹・飯沼 晋・江口良二・井川哲子・ 長谷部直幸・山本明美・川辺淳一</p> <p>JID innovations. 2022 掲載予定</p> <p>研 究 目 的</p> <p>血管は管腔を形成する血管内皮細胞 (endothelial cell : EC) と、管腔を被覆する壁細胞から構成される。壁細胞は血管の種類により形状が異なり、細動脈では血管平滑筋 (vascular smooth muscle cell : VSMC)、毛細血管では周細胞 (pericyte : PC) として血管の安定性や成熟に関わる。組織が虚血に陥った際、既存の血管から新たな血管が生じる血管新生の過程において、新生した未熟な毛細血管に PC が接着することで、血流のある機能的な血管が形成される。</p> <p>Nerve injury-induced protein (Ninjurin-1 : Ninj1) は元来、神経障害時に神経細胞やシュワン細胞に発現する接着分子として同定され、神経再生に関わると考えられていた (引用文献 1)。さらに近年、Ninj1 は PC や EC にも発現し、血管新生の後期において両者の接着を介し機能的血管の形成に関与すると示唆されている (引用文献 2)。しかし皮膚における Ninj1 の発現や機能はこれまでに報告されていない。本研究では皮膚における Ninj1 の発現を解析し、周細胞の主要なマーカーである Neuron-glia antigen 2 (NG2) 特異的に Ninj1 を欠損させたマウスを用いて Ninj1 の創傷治癒への影響について解析した。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### ① NG2 特異的 Ninj1 knockout(KO)マウス

共同研究者である旭川医科大学生化学講座の川辺淳一先生から供与を受け、Tamoxifen (Tam) 誘導により Ninj1 を欠損するトランスジェニックマウス (NG2-CreER×Ninj1 loxP マウス) を使用した。コントロールとして Ninj1 loxP マウス (Tam 投与あり)、NG2-CreER×Ninj1 loxP マウス (Tam 投与なし)、NG2-CreER マウス (Tam 投与あり) の 3 種を用いた。動物実験は旭川医科大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験委員会の承認の下で行われた。

### ② マウス創傷モデル

NG2 特異的 Ninj1KO マウスとコントロールマウス (8~12 週齢、メス) の背部に 3 mm の full-thickness wound を 2 個作成し、上皮化までの創傷面積を測定した。創傷皮膚を採取して病理学的評価を行った。

### ③ 皮膚組織の解析

創傷皮膚における Ninj1 の発現を real time (RT) -PCR、Western blotting (WB) で評価した。また、創傷 5 日目の創傷皮膚をヘマトキシリンエオジン染色および免疫組織化学染色、免疫蛍光染色で解析した。CD31 と NG2 の二重染色を行い、PC が接着した微小血管の占める割合を評価した。さらに機能的血管の評価として、蛍光色素で標識した Lectin を尾静脈投与し、血流を伴う機能的血管を描出した (引用文献 3)。さらに抗 CD31 抗体で Whole-mount staining を行い、透明化処理を行った後、共焦点顕微鏡で 3 次元的に観察した。抗 CD31 抗体陽性の血管と Lectin が灌流された機能的血管の面積比を算出することで創傷辺縁の機能的血管を評価した。ヒトの組織は旭川医科大学倫理委員会の承認の下で旭川医科大学皮膚科に通院中の患者から採取し、同様の解析を行った。

### ④ Lineage tracing を用いた創傷治癒における NG2 陽性細胞の追跡

一部の周細胞が間葉系幹細胞として機能することがこれまでに報告されており、創傷治癒過程における NG2 陽性細胞の Lineage tracing を行った。ある時点での NG2 陽性細胞に赤色蛍光 tdTomato を発現誘導させ、生体内で他細胞に変質しても追跡できる遺伝子改変マウス (NG2CreERT:Rosa26tdTomato マウス) を用いて創傷モデルを作成し、創傷前後の tdTomato 陽性細胞 (NG2 陽性細胞由来の細胞) を観察した。

## 成 績

### ① マウス正常皮膚における周細胞の同定と創傷皮膚における血管新生の観察

野生型マウスの正常皮膚を用いて PC の代表的なマーカーである NG2 の免疫染色を行った。正常皮膚で NG2 は PC に一致して発現し、創傷皮膚では新生した毛細血管に多数の NG2 陽性細胞が接着していた。

### ② マウスおよびヒトの正常皮膚と創傷における Ninj1 の発現解析

次に、マウスおよびヒトの皮膚で Ninj1 の発現を解析した。Ninj1 はマウス正常皮膚において EC および PC/VSMC に一致して発現していた。マウス創傷皮膚では新生血管周囲に Ninj1 陽性細胞が増生しており、RT-PCR と WB ではそれぞれ創傷 3 日目、5 日目をピークに Ninj1 の発現が増加していた。さらにヒトの正常および創傷皮膚を用いた免疫染色でも Ninj1 は血管周囲に発現しており、マウスと同様の結果であった。以上から Ninj1 は PC/VSMC に発現し、創傷治癒過程で発現が増加することが明らかになった。

### ③ NG2 特異的 Ninj1KO マウスを用いた創傷治癒実験

PC に発現する Ninj1 が創傷治癒にどのような影響を与えるかを解析するため、NG2 特異的 Ninj1KO マウスを用いて創傷治癒実験を行った。創傷面積をコントロールマウスと比較したところ、NG2 特異的

Ninj1KO マウスでは創傷 3~7 日目において創傷面積が有意に大きく、創傷治癒が遅延していた。また、創傷 5 日目において NG2 特異的 Ninj1KO マウスでは PC が接着した微小血管が有意に減少しており、PC の接着能の低下が示唆された。創傷辺縁において血流を伴う機能的血管を評価したところ、NG2 特異的 Ninj1KO マウスでは、蛍光色素で標識した Lectin を伴う機能的血管が有意に減少していた。これらの結果より、NG2 特異的 Ninj1KO マウスでは PC の接着の低下により機能的血管の形成が障害され、創傷治癒が遅延すると考えられた。

また創傷 5 日目において、再上皮化や肉芽組織の面積、創傷への炎症細胞浸潤について解析したところ、NG2 特異的 Ninj1KO マウスでは再上皮化が有意に遅延していたが、肉芽形成や炎症細胞浸潤には差がなかった。

#### ④ Lineage tracing を用いた創傷治癒における NG2 陽性細胞の追跡

NG2CreER-tdTomato マウスの正常皮膚では、tdTomato 発現細胞は PC/VSMC に一致していた。創傷 5 日目では、PC 以外に再上皮化した表皮細胞や筋組織にも tdTomato 発現細胞が見られたが、肉芽組織には存在しなかった。以上の結果から、NG2 陽性細胞は血管新生だけでなく再上皮化や創収縮に関与する可能性があるが、一方で肉芽の形成には関与しないことが示唆された。

### 考 案

これまでに下肢虚血モデルや血管内皮障害モデルにおいて Ninj1 が血管新生因子として機能することが示されてきたが、皮膚における Ninj1 の発現や機能についてはこれまで検討されていなかった。今回、我々は、皮膚の創傷治癒においても Ninj1 が血管新生因子としてはたらき、とくに PC と EC の接着に関わり、機能的血管の形成を介して創傷治癒を促進させることを示した。また、Lectin の尾静脈投与と組織透明化、Whole-mount staining の技術を組み合わせて創傷治癒過程の新生血管を 3 次元的に描出する試みを行い、新たな機能的血管の評価法を開発した。

我々は PC の代表的なマーカーの一つである NG2 に着目し、NG2 特異的 Ninj1KO マウスを用いて創傷治癒モデルを作成した。NG2 は皮膚においても PC/VSMC に発現していたが、一部の毛包上皮や筋組織にも発現しており、上皮化や創収縮にも影響している可能性が考えられた。Ninj1 は毛包のバルジ領域において NG2 と共発現しており、病理組織学評価で再上皮化に影響していたことから、今後は毛包上皮における Ninj1 の役割についても解析する必要があると考えた。また、NG2 陽性細胞の追跡実験により肉芽組織で NG2 陽性細胞を認めず、NG2 特異的 Ninj1KO マウスで肉芽の面積に差がなかったことから、Ninj1 は肉芽形成には影響していないと考えた。また創傷への炎症細胞浸潤についても Ninj1KO マウスで有意な差を認めなかった。NG2 が PC 以外の細胞にも発現していることが本研究の限界になったが、少なくとも Ninj1 は創傷治癒の血管新生において機能的血管の形成に影響し、創傷治癒遅延の要因の一つとなることが示された。

### 結 論

NG2 陽性周細胞に発現する Ninj1 は血管の成熟および機能的血管の形成に関与し、創傷治癒を促進させる。

#### 引用文献

1. Araki T, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. Mechanism of homophilic binding mediated by ninjurin, a novel widely expressed adhesion molecule, *J Biol Chem* 1997;272(34):21373-80.
2. Minoshima A, Kabara M, Matsuki M, Yoshida Y, Kano K, Tomita Y, Hayasaka T, Horiuchi K, Saito Y, Aonuma T, Nishimura M, Maruyama K, Nakagawa N, Sawada J, Takehara N, Hasebe N, Kawabe J. Pericyte-specific Ninjurin1 deletion attenuates vessel maturation and blood flow recovery in hind limb ischemia. *Arterioscler Thromb vasc Biology* 2018;38(10):2358-70
3. Morikawa S, Ezaki T. Phenotypic changes and possible angiogenic roles of pericytes during wound healing in the mouse skin. *Histol Histopathol* 2011;26(8):979-95.

#### 参考文献

1. Tomita Y, Horiuchi K, Kano K, Tatsukawa T, Matsuo R, Hayasaka T, Yoshida Y, Kabara M, Yasuda S, Nakajima K, Nakagawa N, Takehara A, Okizaki A, Hasebe N, Kawabe J. Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;519(3):462-8.
2. Horiuchi K, Kano K, Minoshima A, Hayasaka T, Yamauchi A, Tatsukawa M, Matsuo R, Yoshida Y, Tomita Y, Kabara M, Nakagawa N, Takehara A, Hasebe N, Kawabe J. Pericyte-specific deletion of ninjurin-1 induces fragile vasa vasorum formation and enhances intimal hyperplasia of injured vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2021;320(6):H2438-47.
3. Matsuo R, Homma M, Komatsu S, Hori M, Yamamoto A, Iizuka H. External ear canal lesions of crusted scabies: A pitfall of recurrence? *J Dermatol.* 2015 ;42(10):1023-4.

## 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	松尾 梨沙
審査委員長 <u>吉田 成孝</u> (印)			
審査委員 <u>谷野 美智枝</u> (印)			
審査委員 <u>中山 恒</u> (印)			
学位論文題目			
Ninjurin1 deletion in neuron-glia antigen 2-positive pericytes prevents microvessel maturation and delays wound healing (Neuron-glia antigen 2 陽性周皮細胞における Ninjurin1 の欠損は微小血管の成熟化を抑制し、創傷治癒を遅延させる) 掲載雑誌: JID Innovations			
(本論文が評価される点及び審査結果を600字から800字以内で簡潔に記載すること。)			
1. 学位論文の概要 皮膚の創傷過程における血管新生の意義は重要であると思われていたが、その過程は十分に理解されていなかった。申請者らは創傷後の皮膚に微小血管と NG2 陽性の周皮細胞が多数集積することを明らかとし、さらに、Ninj1 が周皮細胞に発現し、創傷後に増加し、3-5 日目で最も高くなることを示した。周皮細胞特異的に Ninj1 を KO したマウスでは、治癒過程が有意に遅延するとともに、周皮細胞と結合している血管の割合が減少し、血管機能が低下していた。また、NG2 陽性細胞をトレースしたところ、創傷時に、周皮細胞はケラチノサイトと皮筋層へとも分化することが明らかになった。これらの結果より、Ninj1 KO における創傷治癒の遅延は、周皮細胞の機能不全を介した、機能的な血管の減少と皮膚組織を構成する細胞への分化異常に起因する可能性が考察された。			
2. 用いられた研究方法は確立されたものであり、統計処理なども適切になされている。得られた結果は十分にノベルティがあり、十分な根拠となるべく明確に記載されている。論文は全体が適切に構成され、十分な考察も行われている。			

### 3. 論文の医学的意義

創傷治癒の過程は臨床的にも重要で、その過程を明らかにすることは今後の治療法の選択や新たな治療法の開発にもつながるものである。

4. 学位申請者は審査委員の試問にも適切に回答し、十分な学力があることが示された。

以上より、本審査委員会はこの論文は博士（医学）の学位論文として認めるに値すると判断した。