

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	堀内 至
<p>学位論文題目</p> <p>Pericyte-specific deletion of Ninjurin1 induces fragile vasa vasorum formation and enhances intimal hyperplasia of injured vasculature. (周細胞特異的Ninjurin1欠損は傷害血管において血管外膜毛細血管を脆弱化し、内膜肥厚を増悪させる。)</p> <p>共著者名</p> <p>鹿野耕平、菫島暁帆、早坂太希、山内敦司、竜川貴光、松尾梨沙、吉田有里、富田唯、鹿原真樹、中川直樹、竹原有史、長谷部直幸、川辺淳一</p> <p>American journal of physiology Heart and circulatory physiology</p> <p>受理</p> <p>研究目的</p> <p>動脈硬化は心筋梗塞や脳梗塞など我々の健康を脅かす重大な疾患に関わる基盤病態である。動脈硬化の発生機序として、血管内皮障害を契機とした血管内膜炎症、次いで内膜肥厚や脂質の蓄積が誘発されると考えられてきた (Inside-out説) ^[引用文献1]。この病態理論に基づいた様々な治療法が開発され治療成績も改善してきたが、治療効果は限定的なもので、世界的に動脈硬化性疾患による死亡率は依然として高い状態である。</p> <p>血管外膜に存在する微小血管 (vasa vasorum; VV) は、主要な血管壁へ栄養や酸素の供給を行う役割を担っている。画像解析技術の進歩に伴い、動脈硬化病変部では外膜部のVVが増加していることが明らかになってきた。この際、血管外膜に炎症細胞の集積が認められ、血管外膜の炎症が動脈硬化の増悪に関わるという病態 (Outside-in説) が提唱されている ^[引用文献2]。脆弱なVVと炎症細胞の浸潤や動脈硬化プラークの不安定化との関連性を示唆する報告が相次ぎ、動脈硬化の治療の新たな標的としてVVが注目されている。しかし、VV脆弱化の機序や血管リモデリングに対するVVの詳細な役割について、未だに不明である。</p> <p>Nerve-injury induced protein1 (Ninjurin1; Ninj1) はもともと神経障害に伴い発現する膜蛋白として発見され、神経再生に関わると考えられていた ^[引用文献3]。我々は、Ninj1は、毛細血管周細胞と内皮細胞の相互作用を介して、新生血管の構造安定化・機能化 (血管の成熟化) を調節する新規の新生血管成熟化分子であることを報告した ^[参考論文4]。本研究では、周細胞特異的Ninj1欠損マウスの血管内皮障害モデルを用いて、Ninj1の障害血管の際のVV形成および血管リモデリングへの役割について検討を行った。</p>			

材 料 ・ 方 法

【方法1】 NG2-CreER/*Ninj1*^{loxP}マウスに対し、tamoxifen 2mg/kgを5日間連続で経口投与し、周細胞特異的*Ninj1*欠損を誘導した (NinjKO)。tamoxifen投与の1週間後、全身麻酔下にマウス大腿動脈を露出し、そこへ金属製ワイヤを挿入することにより血管内皮障害モデルを作成した。血管障害の4週間後に、緑蛍光標識した内皮結合蛋白Lectin (FITC-Lectin) を尾静脈より投与し血管内皮を染色し、paraformaldehyde (PFA)で還流固定を行った。その後、大腿動脈を周辺組織と一塊に摘出し、さらにPFA浸潤して固定した。

【方法2】 固定した大腿動脈をOCT包埋し、10 μ m厚の切片を作成した。スライドガラスに固定し、浸潤するマクロファージを確認するために抗F4/80抗体を使用した。二次抗体として蛍光標識抗体を使用しF4/80陽性マクロファージの数を蛍光顕微鏡にて計測した。

【方法3】 大腿動脈に生じた血管リモデリングを観察するために組織透明化技術を利用した。固定した大腿動脈は血管内皮、周細胞および*Ninj1*の発現について評価を行うために抗CD31抗体、抗PDGFR β 抗体、抗*Ninj1*抗体を反応させた。2次抗体として蛍光標識抗体を使用した後、大腿動脈をRapiClear®1.47液内に37°Cで一晩インキュベーションし、組織透明化を行った。透明化組織は共焦点顕微鏡にて3次元画像解析および評価を行った。

【方法4】 血管リモデリングに伴う遺伝子発現を比較するために、摘出した大腿動脈よりmRNAを抽出し、RT-qPCRおよびマイクロアレイ解析を行った。

成 績

【結果1】 金属ワイヤによる内皮障害に伴い外膜の微小血管 (VV) の増殖が観察された。障害血管組織では内皮障害の1週間後に*Ninj1* mRNAの発現がピークとなった。NG2陽性周細胞を赤蛍光標識するNG2-DsRedマウスを用いた組織標本を作成したところ、周細胞やマクロファージを含むNG2陽性細胞は血管外膜周囲に主に観察された。

【結果2】 血管外膜上に増生するVVの総長は、NinjKO群と対照群で差は認めないが、NinjKO群では、4 μ m以下の細い微小血管の割合が有意に増えていた。また、幼若血管の指標となる血管の分岐数もNinjKO群で有意に増加していた。

【結果3】 血管外膜VVにおいてFITC-Lectinの血管外漏出がNinjKO群で有意に増加していた。また、蛍光標識デキストラン (70kDa) を尾静脈投与し、血管外漏出を評価したところ、同様にNinjKO群で有意に増加していた。

【結果4】 内皮障害により、対照およびNinjKOの両群で内膜肥厚が誘導されたが、内膜/中膜面積比 (I/M ratio) および狭窄度による内膜肥厚度は、NinjKO群で有意に増加していた。ただし、血管中膜面積、全体の血管径に有意な差は認められなかった。

【結果5】 血管障害の4週間後、両群で障害血管内膜は修復されていた (再内皮化) が、血管外膜に浸潤するF4/80陽性マクロファージ数はNinjKO群で有意に増加していた。アレイ解析でも、NinjKO群において、血管壁における炎症の亢進や平滑筋細胞の増殖性に関連する遺伝子群の変化が認められた。

考 案

血管内膜障害を契機に血管外膜の増加するVVにおいてNinj1発現が亢進し、周細胞特異的にNinj1を欠損させることにより、障害血管の外膜部で増殖するVVの脆弱化をもたらした。Ninj1欠損によるVVの脆弱化は、炎症細胞の外膜部への浸潤を惹起し、血管障害の契機である内皮障害部が修復（再内皮化）した後も外膜部で炎症が遷延化していた。血管壁での炎症遷延化は、一部、平滑筋細胞の増殖亢進を誘起し、結果として内膜肥厚の増悪をもたらしたと考えられる。

外膜のVVの異常と血管リモデリングとの関係について臨床検体や動物モデルで様々な報告があるが、多くが状況証拠であり、明確な因果関係を示す知見は限られている。本研究では、従来の切片標本による二次元の評価法に比べ、微小血管の形態のみならず機能を詳細に評価できる透明化組織を用いた3次元解析法を開発し、周細胞特異的Ninj1欠損により障害血管で増殖するVVの形成異常をもたらすと共に、血管リモデリングが増悪することを明らかにし、外膜の微小血管の異常が血管リモデリングに直接関与することを実証した。

動物実験モデルにおいて、増殖するVV形成を「抑制」させるという動脈硬化の治療戦略を提案する報告がある。しかし、元来、血管外膜VVの増殖は血管壁の虚血や炎症に反応する代償的現象でありVVを抑制することにより、より虚血や炎症を増悪させ、血管壁自体の脆弱性を誘発する恐れもある。また、先行する癌治療の経験上、新生血管の「抑制」という治療の効果は一時的または限定的なものとなっている。本研究では、単に血管新生を抑制するという「量」の制御でなく、微小血管の成熟化、安定化という新生血管の「質」に介入する動脈硬化の治療戦略の妥当性を示唆するものである。

結 論

- (1) 組織透明化技術を利用した三次元画像解析法は、様々な疾患病態における組織内の微小血管の役割を解析する上で有用なツールである。
- (2) Ninj1は血管外膜に増殖する微小血管の成熟化を介して障害血管のリモデリングを制御する分子の可能性がある。
- (3) 微小血管の成熟化・安定化を狙いとするNinj1を標的とした新しい動脈硬化治療開発が期待される。

引用文献

1. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868-874
2. Kawabe J, Hasebe N. Role of the vasa vasorum and vascular resident stem cells in atherosclerosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:701571
3. Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron*. 1996;17:353-361

参考文献

1. Yoshida Y, Kabara M, Kano K, **Horiuchi K**, Hayasaka T, Tomita Y, Takehara N, Minoshima A, Aonuma T, Maruyama K, Nakagawa N, Azuma N, Hasebe N, Kawabe JI. Capillary-resident epha7(+) pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation. *Stem Cells Transl Med*. **2020**; 9:120-130
2. Kano K, **Horiuchi K**, Yoshida Y, Hayasaka T, Kabara M, Tomita Y, Tatsukawa T, Matsuo R, Sawada J, Nakagawa N, Takehara N, Hasebe N, Kawabe JI. EphA7+ perivascular cells as myogenic and angiogenic precursors improving skeletal muscle regeneration in a muscular dystrophic mouse model. *Stem Cell Res*. **2020**;47:101914
3. Tomita Y, **Horiuchi K**, Kano K, Tatsukawa T, Matsuo R, Hayasaka T, Yoshida Y, Kabara M, Yasuda S, Nakajima K, Nakagawa N, Takehara N, Okizaki A, Hasebe N, Kawabe JI. Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through schwann cell maturation of ng2-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **2019**; 519(3):462-468
4. 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 JI. Pericyte-specific ninjurin1 deletion attenuates vessel maturation and blood flow recovery in hind limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2018**; 38: 2358-2370
5. 堀内至、竹内利治、伊達歩、木谷裕也、杉山英太郎、蓑島暁帆、坂本央、田邊康子、赤坂和美、川村裕一郎、長谷部直幸：主要体肺動脈側副血行路を伴う心室中隔欠損＋肺動脈閉鎖を認めた非手術成人の1例 心臓 2017 ;49(12):1261-1266

