

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	松木 孝樹
<p>学位論文題目</p> <p><b>Ninjurin1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes.</b></p> <p>(Ninjurin1は毛細血管周細胞を介して血管新生を制御する新規因子である)</p> <p>共著者名</p> <p>鹿原 真樹、齊藤 幸裕、島村 浩平、簗島 暁帆、西村 正人 青沼 達也、竹原 有史、長谷部 直幸、川辺 淳一</p> <p>Circulation Journal 平成27年 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>血管新生は、虚血や炎症などの組織障害時に起こる普遍的な反応であり、最近は、新生血管細胞の一部が幹細胞として働き、新生血管が組織再生やリモデリングの病態においても密接に関連することが明らかになってきた<sup>(1)</sup>。また毛細血管の機能異常や脆弱化・消失などの形態異常は、網膜症や癌、さらに動脈硬化や慢性心不全といった難治性慢性疾患の病態に深く関与することが明らかになってきた。したがって、これらの疾患病態の解明や治療開発の上で、血管新生の機序を理解することは重要である。</p> <p>新生血管の最小単位である毛細血管は、内皮細胞の管腔（チューブ）構造に周細胞が取り囲む構造をもつ。周細胞は血管の透過性や収縮性などの毛細血管の機能だけでなく、毛細血管の形成（血管新生）、その維持や成熟化に重要な役割を担っている。血管新生は血管壁から周細胞が離脱するところから開始される。離脱した周細胞は血管増殖因子を産生し、周細胞が剥離した部位からの内皮チューブの発芽と伸長を促す（trophic effects）。その後、伸長した幼若な内皮チューブに接着し、新生血管の構造維持（安定化）やさらに径拡大（成熟化）していくことが知られている<sup>(2)</sup>。しかし、従来の血管新生研究の多くは、内皮細胞を中心として展開されてきており、血管新生で重要な周細胞と内皮細胞とのダイナミックな離合を制御する機序については、十分に明らかにされていない。</p> <p>我々は、血管新生における周細胞の働きを解明するために、樹立した毛細血管細胞株を用いた<sup>(参考文献1)</sup>独自の血管新生アッセイ法を利用して、周細胞機能に関わる新規因子の探索を行った。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### 1. 毛細血管由来細胞株

我々が樹立したマウス毛細血管由来周細胞 (Capillary pericytes; cPCs) および内皮細胞 (Capillary endothelial cells; cECs) を用いた (参考文献1)。細胞の一部は、蛍光物質 (GFPおよびDsRed) 発現レトロウイルスを感染させ、蛍光標識細胞を作成した。また、細胞内の標的遺伝子の発現抑制あるいは過剰発現するために、標的遺伝子特異的な small-interfering RNA (siRNA) あるいは標的遺伝子組み換え発現ベクター (pcDNA3) を、リポフェクション法にて細胞導入した。

### 2. 血管新生評価法

#### ① マウス大動脈血管を用いた *Ex vivo* 血管新生法

C57BL6雄性マウス(10-16週齢)の胸部大動脈を輪状に切断した組織 (Aorta ring; AoR) をMatrigel®に埋包し、vascular endothelial growth factor (VEGF) (10ng/ml) を含む培地下で三次元ゲル培養した。培養5~7日後にAoR外膜部から内皮チューブの発芽が観察される (参考文献2, 3)。形成された新生血管は、Lectin-FITCを用いて内皮を蛍光染色した後、血管形成度を評価した。

#### ② cECsを用いた *In vitro* 血管新生法

cECsをMatrigel®に埋包し、VEGF (10ng/ml) を含む培地で7日間培養した後に、cECsによるチューブ形成度を評価した (参考文献1)。

### 3. 新生血管との共存で変化するcPC内発現遺伝子の網羅的解析

上記 *Ex vivo* 血管新生システムを応用し、蛍光標識したcPCsをAoRとゲル内で共培養し、AoRからの新生血管と共存させた後、蛍光cPCsのみをfluorescence activated cell sorting (FACS) にて分離回収した。cPCsのみ培養した細胞を対照群として、両者の遺伝子発現量についてアレイ解析 (3D-Gene, Toray) を行った。

### 4. 遺伝子発現量評価

細胞から総RNAを精製後、reverse transcription-PCRまたはreal-time PCR法を用いて発現遺伝子量を評価した。特に、血管増殖因子の細胞内遺伝子の発現量の比較は、PCRアレイ法 (RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array, QIAGEN) を用いて行った。

## 成 績

### 1. 血管新生に関連するcPCs内遺伝子の探索

新生血管と共存することにより変化するcPCs内の発現遺伝子を抽出した。この中で既報通りVEGF、hepatocyte growth factor (HGF) などの血管新生に関わる因子が増加していた。また、血管新生への関与が不明な抽出因子の中から、*Ex vivo* 血管新生アッセイを用いたスクリーニングの結果、*Ninjurin1* (*Nerve injury-induced protein1*, *Ninj1*) を見出した。

## 2. 毛細血管細胞におけるNinjl発現

Ninjlは毛細血管細胞（cPCsおよびcECs）に発現を認めるが、特にcPCsにおいて強い発現を示した。「低酸素」培養条件では、上記の「新生血管との共存」同様に、cPCsにおいてVEGFと共にNinjlの遺伝子発現亢進が観察された。

## 3. Ninjlは、cPCによる血管新生促進作用を抑制

毛細血管細胞Ninjlの血管新生に対する効果を観察するため、細胞内Ninjl発現抑制（Ninjl<sup>KD</sup>）あるいは過剰発現（Ninjl<sup>OE</sup>）細胞を用いて各種血管新生アッセイを行った。cECsは三次元ゲル培地で自ら内皮チューブ形成（血管新生）するが、Ninjl<sup>KD</sup>cECsにおいても、その形成能に変化が見られなかった。cPCsは、AoRとの三次元ゲル培養でAoRから発芽する内皮チューブ形成を促進させた。対照cPCsに比べ、Ninjl<sup>KD</sup>cPCsによる血管新生促進作用は有意に亢進し、逆にNinjl<sup>OE</sup>cPCsによる血管新生促進作用は低下した。

## 4. Ninjlは、cPCの血管増殖因子産生を抑制

NinjlのcPCsによる血管増殖因子産生に及ぼす効果を観察するために、Ninjl<sup>KD</sup>cPCsあるいはNinjl<sup>OE</sup>cPCsを用いて、血管新生関連因子に対する遺伝子発現アレイ解析を行った。対照cPCsに比べ、Ninjl<sup>KD</sup>cPCsではVEGF、Angiopoietin1など血管新生に関わる増殖因子の遺伝子発現が上昇し、一方、Ninjl<sup>OE</sup>cPCsでは、それらの発現は抑制された。

## 考 案

Ninjlは、末梢神経損傷時に神経組織に発現し、神経の修復を促す因子として同定された<sup>(3)</sup>。最近では、神経組織のみならず炎症細胞などにも発現し、炎症局所での内皮細胞との接着に関与することが報告されている。本研究において、NinjlがcPCsを介して血管新生を制御することを初めて明らかにした。その機序として、NinjlがcPCsの血管新生促進因子産生能（trophic effects）を抑制することを示した。

血管新生（内皮チューブ発芽）時にcPCsは、trophic effects効果などにより、血管新生を促進することが知られている。このcPCsの役割に合致するように、新生血管との共存、あるいは血管新生が促進する低酸素環境で、cPCsの血管増殖因子産生が亢進していた。この際、並行してNinjl発現が亢進していることから、Ninjlは、cPCsによる血管新生作用を抑制するNegative feedbackとしての役割をもつことが示唆された。

Ninjlの血管新生抑制作用の生体での意義については、現在のところ不明である。Ninjlは、細胞表面に局在し、細胞間の接着に重要な役割を果たす分子である<sup>(3)</sup>。cPCsにおけるNinjlの低下は、cPCsのtrophic effectsを高め内皮チューブの進展を亢進させる一方で、細胞（cECsあるいはcPCs）間の接着性を低下させる可能性がある。この場合、幼弱な内皮チューブ形成は促進するが、成熟した血管形成は抑制されると推測される。今後、虚血疾患などの病態での毛細血管Ninjlの役割を解明するために、現在、周細胞特異的Ninjlノックアウトマウスを作成中である。

## 結 論

我々は、血管新生を制御する毛細血管細胞内の新規因子Ninjurin1を見出した。




## 引 用 文 献

1. J. Kawabe, N. Hasebe. Role of the vasa vasorum and vascular resident stem cells in atherosclerosis. *Biomed Res Int.* 2014; 701571. doi: 10.1155/2014/701571.
2. A. Armulik, G. Genove, C. Betsholtz. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011; 21(2):193-215.
3. T. Araki, J. Milbrandt. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron.* 1996; 17(2):353-61.

## 参 考 論 文

1. 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(12):1340-54.
2. 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 Commun.* 2014; 443(1):150-5.
3. Aburakawa Y, Kawabe J, Okada M, Yamauchi A, Asanome A, Kabara M, **Matsuki M**, Takehara N, Nakagawa N, Okumura S, Minami Y, Mizukami Y, Yuhki K, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation recovery in ischemic hind limb model. *Circ J.* 2013; 77(4):1053-62.
4. Yamauchi A, Kawabe J, Kabara M, **Matsuki M**, Asanome A, Aonuma T, Ohta H, Takehara N, Kitagawa T, Hasebe N. Apurinic/apurimidinic endonuclease 1 maintains adhesion of endothelial progenitor cells and reduces neointima formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; 305(8):H1158-67
5. **Matsuki M**, Sato N, Matsuda K, Yamaki M, Nakagawa N, Sakamoto N, Ota H, Tanabe Y, Takeuchi T, Akasaka K, Kawamura Y, Hasebe N. Brugada syndrome whose ST-segment changes were enhanced by antihistamines and antiallergenic drugs. *Intern Med.* 2009; 48(12):1009-13.

## 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	松木 孝樹
審査委員長 船越 洋  審査委員 東 信良  審査委員 長谷部 直幸 			
学 位 論 文 題 目  Ninjurin1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes.  (Ninjurin1 は毛細血管周細胞を介して血管新生を制御する新規因子である)			
<p>血管病変は、末梢性閉塞性疾患、心筋梗塞、脳梗塞を始めとする種々の疾患の原因となっている。一方で、糖尿病性網膜症など過剰な血管形成も疾患病態を促進することが報告されている。したがって、血管病態の解明と制御が21世紀の重要な医学的課題とされている。微小血管は血管内皮細胞 (ECs) に加えて微小周細胞 (cPCs) が ECs 周囲をとりまくかたちで構成されており、cPC は微小血管の形成や維持への重要な機能を果たしていることが明らかとされてきている。しかしながら、cPC がどのように血管新生を制御しているか、PDGF/PDGF receptor-<math>\beta</math>、angiopoietin1/Tie2 と TGF<math>\beta</math> について若干の知見が報告されているのみで、その分子機序は依然明らかとなっていない。本研究は、cPC の血管新生調節に作用する新規因子を探索し、その機能を明らかにすることにある。</p> <p>本研究では、cPC の血管新生調節作用を示す機能分子を分離・同定するために、まず SV40 T-antigen のトランスジェニックマウスの微小血管から immortalized された内皮細胞と周細胞を樹立し、それぞれ cEC と cPC と名付けた。VEGF 存在下において GFP でラベルした cPCs を Matrigel 内で</p>			

マウス大動脈冠と3次元培養すると、大動脈冠から血管新生が促進し EC-チューブを形成した。EC-チューブ周囲には cPC が観察され毛細血管様構造を示したが、大動脈冠非存在下では毛細血管様構造をとらなかった。そこで cPC の血管新生機能遺伝子の評価系として、大動脈冠血管新生アッセイ系を用いることとし、大動脈冠存在下、非存在下で7日目に Matrigel 中の細胞を回収し、その中から GFP 陽性 cPC 細胞を FACS により選別して、cPC 中で変動する遺伝子を網羅的にマイクロアレイ法により解析した。変動遺伝子の中で、RT-PCR 法においても遺伝子変動の再現が得られた遺伝子の中に、既知の血管新生因子として報告のある VEGF、HGF、MMP などに加えて新規因子として Ninjurin1 (Ninj1) を同定した。

Ninj1 の機能を gain-of-function アッセイと loss-of-function アッセイの両方で解析した。cEC に Ninj1 の siRNA を用いて Ninj1 の発現を低下させた条件で評価すると、Ninj1 の発現低下によって EC-チューブ形成能に差がないことが明らかとなった。一方で、cPC の Ninj1 レベルを siRNA で低下させると、EC-チューブ形成能が更新した。逆に、cPC に Ninj1 を過剰発現させると、EC-チューブ形成能、すなわち cPC 依存的血管新生能が低下した。以上から、Ninj1 は cPC で主に発現し、血管新生を負に制御する機能を持つことが明らかとなった。Ninj1 の機能の分子機序を明らかにするため、Ninj1 が血管新生促進因子の発現に対する効果を解析した。cPC に Ninj1 の過剰もしくは siRNA を導入し2日後に変動遺伝子を解析した結果、VEGF、EGF、angiopoietin1 や IGF1 などの抑制を認めた。以上の結果から、周細胞で発現して血管新生を制御する新規因子として Ninj1 を初めて同定し、その機能解析の結果、Ninj1 は血管新生促進因子の発現を負に制御することで血管新生を負に制御する新規因子であることを明らかにした。本研究は、血管病の病態解明・治療基盤に新展開を示す重要な研究成果である。この論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。