

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	富田 唯
<b>学位論文題目</b> Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2 <sup>+</sup> neural precursor cells (Ninjurin1は、NG2陽性細胞を介して末梢神経再生に関わる)			
<b>共著者名</b> 堀内 至、鹿野 耕平、吉田 有里、竜川 貴光、中島 恵一、早坂 太希、鹿原 真樹、 中川 直樹、竹原 有史、沖崎 貴琢、長谷部 直幸、川辺 淳一			
論文投稿中			
<b>研究目的</b> 末梢神経は中枢神経と異なり、本来、高い再生能をもつシステムであるが、高齢化社会を背景に増加する多くの難治性慢性疾患の病態に、末梢神経系の異常が関連していることが明らかになってきた。しかし、末梢神経の機能維持や再生システムの知見は限られている。			
<p>Ninjurin1 (nerve injury induced protein, Ninj1)は、神経障害時に神経細胞などに発現する因子として発見された細胞接着因子であり<sup>[引用文献1]</sup>、発見当初より神経再生において何らかの役割を果たすと推測されていたが、神経再生における役割は明らかとされていない。一方で、近年はNinj1が神経細胞以外の様々な細胞や組織に発現し、炎症や末梢循環の病態にも関与することが報告されている。我々は、微小血管においてNinj1がNG2陽性周細胞(PCs)を介して血管新生に関わることを明らかにし<sup>[引用文献2]</sup>、NG2細胞特異的にNinj1遺伝子を欠損誘導させるマウス(NG2-NinjK0)を作成して、Ninj1が、虚血組織における血管新生を介して、虚血組織の還流改善に重要な役割を果たすことを明らかにした<sup>[参考文献1]</sup>。</p>			
<p>NG2陽性細胞は、末梢神経組織においては、微小血管のPCs以外に、神経周膜や未熟シュワン細胞などに発現していることが知られている<sup>[引用文献3]</sup>。最近、我々は、末梢組織の微小血管NG2陽性PCsの中からシュワン細胞などへの分化能をもつ神経幹細胞の特徴を持つ周幹細胞を発見した<sup>[参考文献2]</sup>。このことから、末梢神経組織において、NG2陽性細胞は未熟シュワン細胞および多分化能周幹細胞を介して、末梢神経再生の過程において、重要な役割を持つと推測される。</p>			
<p>本研究では、上記の『神経障害直前にNG2陽性細胞特異的にNinj1遺伝子を欠損』できるNG2-NinjK0マウスを用いて、末梢神経再生におけるNinj1の役割を検証した。</p>			

## 材料・方法

【実験1】C57-BL6マウスを用いて、nerve crush法を用いて、坐骨神経障害モデルを作成した。神経傷害1～4週間後に坐骨神経組織を摘出し、qPCR法によりNinj1, NG2遺伝子発現の経時的変化を評価した。

【実験2】NG2陽性細胞を特異的に赤発光して可視化できるNG2<sup>promoter</sup>-DsRed遺伝子改変マウス(NG2-DsRed)を用いて、実験1の方法に準じて坐骨神経障害モデルを作成した。神経傷害1～3週間後にLectin-FITCを循環還流し脈管内皮を染色させた後、組織を摘出・固定し、CUBIC法により組織透明化後、共焦点顕微鏡により神経再生および血管再生の程度や両者の関連性を三次元的に観察・評価した。また、Ninj1抗体を用いた免疫染色を行い、NG2陽性細胞とNinj1発現の関連性を観察した。

【実験3】NG2陽性細胞特異的にNinj1遺伝子をTamoxifen (Tam) 処理により任意にノックアウトするマウス(NG2-CreER/Ninj1-FloxP)を用いた<sup>[参考文献1]</sup>。対照マウスとして、Tam処理を行わない群およびNG2-CreERマウスにTam処理を施した群を用いた。これらのマウス群に対して坐骨神経障害モデルを作成し、障害14日後に組織を摘出し、抗S100 $\beta$ 、MBP、NF-H抗体を用いた免疫染色や、オスミウム染色により軸索再生や再髄鞘化を評価した。

【実験4】マウスの末梢脂肪組織の毛細血管由来のNG2陽性PCsから、EphA7陽性多分化能PCs (Capillary stem cells, CapSCs)を調整した<sup>[参考文献2]</sup>。CapSCs内のNinj1発現をNinj1特異的SiRNAで抑制後、神経分化用培地で処置して、神経分化の程度をS100 $\beta$ およびMBP等の免疫染色で評価した。

## 成績

【実験1】坐骨神経障害組織において神経傷害14日後にNG2陽性細胞の増加と共にNinj1遺伝子発現の有意な増加を認めた。

【実験2】神経傷害7日後と14日後に組織内に微小血管の増殖と共に新生微小血管に付着するNG2陽性PC細胞や、血管に付着しないPC以外のNG2陽性細胞の有意な増加を認めた。障害神経内に増加したNG2陽性細胞に一致して、Ninj1の強発現が観察された。

【実験3】坐骨神経障害14日後には、障害神経軸索が再生し、シュワン細胞によるミエリン形成が観察される。NG2陽性細胞特異的Ninj1ノックアウトマウスでは、対照群と比較して、再生神経軸索数やシュワン細胞量には変化ないが、ミエリン化に関連するMBP発現の低下と共に、髄消化軸索数の低下が認められた。

【実験4】CapSCsは神経分化培地で、シュワン細胞様のS100 $\beta$ およびMBP陽性細胞に分化する。Ninj1-SiRNA処置で細胞内Ninj1発現を抑制させると、CapSCの神経分化能が著明に抑制された。

## 考 案

末梢神経では、軸索の断裂が起こると損傷部位の遠位の軸索が Waller 変性により断片化する。この過程においてシュワン細胞は脱分化し、軸索を離れ、増加した未分化型シュワン細胞は、神経軸索の進展再生を促す。その後、シュワン細胞は、進展した軸索を取巻き、再髄鞘化し機能的な神経再生が完結する。

今回の研究で、坐骨神経障害により NG2 陽性の未分化シュワン細胞あるいは新生血管に付着する PCs が増加することが観察された。坐骨神経障害直前に、NG2 陽性細胞特異的に *Ninj1* 遺伝子を欠損させた場合、神経障害を契機に増加する S100 $\beta$  陽性細胞量や軸索形成量には影響しないが、再生された軸索が成熟化するためのシュワン細胞のミエリン形成とそれに伴う神経軸索の髄鞘化が低下することを明らかにした。また、障害神経組織には微小血管の形成が促進されるが、その一部は、シュワン細胞など神経分化能をもつ CapSCs が増加することを見出し、CapSC の神経分化能は、*Ninj1* に強く依存することを明らかにした。すなわち、*Ninj1* は神経再生の過程、シュワン前駆細胞からのシュワン細胞への分化そしてシュワン細胞の髄消化という再生神経の成熟化に関与することが考えられた。

これまで、古典的な *Ninj1*KO マウスでは神経再生への影響に関する報告がなされておらず、*Ninj1* の神経再生能における役割は不明であった。その主な理由は、標的遺伝子欠損による生体の代償機序が *Ninj1* 本来の機能を不顕性化したためではないかと考えられる。

## 結 論

我々が作成した *Ninj1* 遺伝子をタイムリーに欠損誘導できるマウスにより、末梢神経障害時に増加する NG2 陽性細胞に発現する *Ninj1* が、末梢神経再生に重要な役割を果たすことを初めて明らかにした。今後、本知見からシュワン細胞の分化や髄鞘化の機序解明、さらに末梢神経再生にむけた治療法の開発に繋がることが期待できる。

## 引 用 文 献

- [1] T. Araki, J. Milbrandt, Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth, *Neuron* 17 (1996) 353-361.
- [2] M. Matsuki, M. Kabara, Y. Saito, K. Shimamura, A. Minoshima, M. Nishimura, T. Aonuma, N. Takehara, N. Hasebe, J. Kawabe, Ninjurin1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes, *Circ J* 79 (2015) 1363-1371.
- [3] A. Nishiyama, M. Komitova, R. Suzuki, X. Zhu, Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity, *Nat Rev Neurosci* 10 (2009) 9-22.

## 参 考 文 献

- [1] A. Minoshima, M. Kabara, M. Matsuki, Y. Yoshida, K. Kano, Y. Tomita, T. Hayasaka, K. Horiuchi, Y. Saito, T. Aonuma, M. Nishimura, K. Maruyama, N. Nakagawa, J. Sawada, N. Takehara, N. Hasebe, J.I. Kawabe, Pericyte-Specific Ninjurin1 Deletion Attenuates Vessel Maturation and Blood Flow Recovery in Hind Limb Ischemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38 (2018) 2358-2370.
- [2] Y. Yoshida, M. Kabara, K. Kano, K. Horiuchi, T. Hayasaka, Y. Tomita, N. Takehara, A. Minoshima, T. Aonuma, K. Maruyama, N. Nakagawa, N. Azuma, N. Hasebe and J.I. Kawabe, Capillary-resident EphA7<sup>+</sup> pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation (*submitted*) 国際特許出願 (PCT・JP2016、072259)
- [3] 富田唯, 佐々木智章, 八巻利弘, 渡邊尚史, 藤本弥臣, 石戸谷俊太, 高林江里子, Nabaa Basim Jabber, 高橋康二, 高田延寿, 岩木宏之, 橋口仁喜 肺病変をきたした多包虫症の検討 金原出版株式会社, 臨床放射線, 62 (2)(301 - 306), 2017