

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16905

研究課題名(和文)末梢神経再生における神経と血管の伴走化現象および毛細血管幹細胞の役割

研究課題名(英文)The role of nerve-vascular wiring and perivascular stem cells in peripheral nerve regeneration

研究代表者

富田 唯(TOMITA, YUI)

旭川医科大学・大学病院・助教

研究者番号：50836450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：先行実験で毛細血管を構成する周細胞の一部に神経分化能を持つ幹細胞(CapSCs)、さらに同細胞のシュワン細胞分化能を制御する因子(Ninjurin1(Ninj1))を見出した。本研究では、NG2陽性細胞特異的蛍光発光マウス、Tamoxifen誘導によるNG2陽性細胞特異的Ninj1knockout(KO)マウス、培養シュワン細胞、培養CapSCsなどを用いた検証により、末梢神経障害時に増加するNG2陽性細胞に発現するNinj1が神経の髄鞘化に重要な役割を果たすことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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知られているが、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。末梢神経は毛細血管と伴走し、その機能維持や再生に密接に関与していることが知られているが、神経と血管の伴走化がどのように成立するのかという根本的な課題は解明されていない。本研究では「神経に伴走する毛細血管」や「毛細血管に局在する新規の幹細胞」に着目し、末梢神経の髄鞘化にNinjurin1が重要な役割を示すことを示した。末梢神経再生の機序解明および治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Ninjurin 1 (Ninj1) was originally identified as a protein induced by peripheral nerve injury. Schwann cells (SCs) and microvasculature are critical for peripheral nerve regeneration. Recent studies including ours have shown that some perivascular mural cells (PCs) are multipotent and contribute to tissue regeneration as a source of regenerative cells. Multipotent PCs, namely capillary stem cells (CapSCs) have a high potential to differentiate into neuronal lineages. Nerve/glial antigen 2 (NG2)-positive cells are recognized as immature Schwann cells and microvascular pericytes (PCs) in the peripheral nervous system. In this study, we investigated the role of Ninj1 in peripheral nerve regeneration using NG2-Ds red mice, NG2+cell-specific inducible deletion of Ninj1 mice, SC cell lines, and CapSC cell lines. We demonstrated that Ninj1 plays an important role particularly in the myelination process of regenerating nerves through NG2 positive cells including CapSCs.

研究分野：末梢神経再生

キーワード：末梢神経再生 NG2 Ninjurin1

1. 研究開始当初の背景

末梢神経再生研究の重要性：末梢神経は再生能が高い臓器であり、中枢神経系と比較して末梢神経の維持および再生に関する医学研究や知見は限られている。近年、末梢神経機能異常が動脈硬化や心不全などの心血管疾患、糖代謝異常などの難治性慢性疾患の病態に深く関与することが明らかとなっている。末梢神経の機能や再生能は加齢とともに低下することが知られており、高齢化社会を背景として末梢神経の機能維持や再生機序の解明が一層重要になってきた。

末梢血管と毛細血管の相互作用：末梢神経と微小血管が伴走する現象 (Neuro-Vascular Wiring; NVW) は古くから知られているが、近年は両者が相互に作用して、それぞれの機能維持や再生に密接に関与することが認識されてきた。我々も障害組織で生じる新生血管が、末梢神経と伴走化することにより構造的に安定化・成熟化することを報告している¹。高齢化社会で増加の一途をたどる糖尿病において基本病態である微小血管と末梢神経の障害は必発であることも、この両者の相互補助の関係を示唆している。NVW がどのように成立するのかを解明するところに、末梢神経の機能維持や再生の機序解明の糸口が見えてくると考えた。

新生血管の成熟化を制御する新規因子の発見：新生血管は、形成された内皮 (endothelial cells; EC) チューブに周細胞 (pericytes; PC) が覆って機能的な微小血管に成熟する。我々は EC チューブと PC の接合を促し、新生血管の成熟を促す新規の因子として **Ninjurin1 (Ninj1)** を見出した²。さらに PC 特異的に Ninj1 欠損を誘導するマウスのお下肢虚血モデルを用いて、Ninj1 が新生血管の成熟化に加え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³。Ninj1 はもともと、神経障害時に神経細胞などに発現する接着因子として報告され⁴、神経再生における役割が想定されたが未だ明らかになっていない。

毛細血管由来の神経幹細胞の発見：我々は、独自に樹立した多分化能を有する PC 株⁵ を利用して、多分化能を有する PC に特異的なマーカー (EphA7) を選定した。同マーカーを利用してマウスおよびヒト末梢組織の毛細血管から**多分化能周細胞 (CapSCs; Capillary Stem Cells と命名)** を同定、分離することに成功した⁶。CapSCs は毛細血管壁に存在し、間葉系細胞に加えてシュワン細胞など神経系細胞への高い分化能を有する、間葉系および神経系幹細胞の特徴を併せ持つ PC であることを明らかにした⁶。

2. 研究の目的

一連の毛細血管研究^{3,6}に携わっていく中で、『末梢組織の毛細血管 PC の一部になぜ、高い神経分化能を持つ細胞 (CapSCs) が存在しているのか?』という疑問を持ち、NVW システムにおける **CapSCs の役割** という仮説を着想するに至った (図 1)。

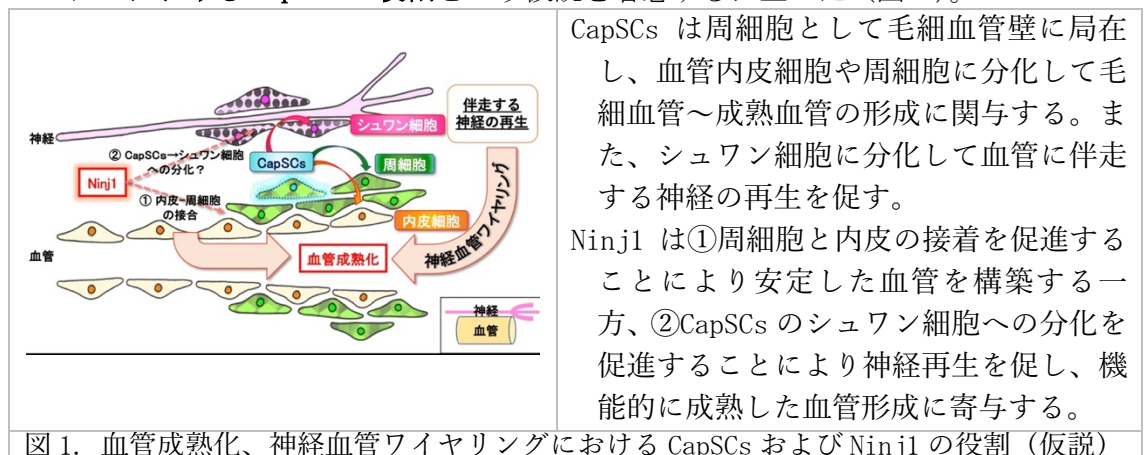


図 1. 血管成熟化、神経血管ワイヤリングにおける CapSCs および Ninj1 の役割 (仮説)

『障害神経組織に増殖する毛細血管内 CapSCs は、Ninj1 を介してシュワン細胞に分化し、神経再生に寄与する』という仮説をたて、下記の具体的作業仮説を検証した。

- 作業仮説(1) NG2 陽性細胞特異的蛍光発光マウスの障害神経組織において増殖する NG2 陽性 PC の中でも CapSCs が増殖し、さらに同細胞での Ninj1 発現が亢進する。
- 作業仮説(2) NG2 陽性細胞トレーシング (追跡) マウスの障害神経組織において NG2 陽性細胞由来の血管やシュワン細胞が確認できる。
- 作業仮説(3) Tamoxifen 誘導による NG2 陽性細胞特異的 Ninj1 knockout (KO) マウスでは、障害坐骨神経の髄鞘化や軸索進展が抑制される。
- 作業仮説(4) Ninj1 発現抑制はシュワン細胞分化能を低下させる。

3. 研究の方法

実験 1 (作業仮説 1 の証明: 障害神経組織における標的細胞・遺伝子の局在・発現の評価)

- 神経傷害モデルの作成: C57-BL6 マウスおよび NG2 陽性周細胞が赤く発光する NG2^{promoter}-DsRed 遺伝子改変マウス (NG2-DsRed) を用いて坐骨神経障害モデルを作成した。坐骨神経の障害方法としては nerve crush 法を用いた。
- 障害神経の組織学的・生化学的解析: 神経傷害後 1~4 週間後の各時期において組織を摘出し、各種解析を行った。免疫組織学的解析として、S100, MBP, NF-H および NG2, EphA7, CD31 を用いた免疫染色により、それぞれ軸索再生や再髄鞘化、PC/EC の発現性やその局在を経時的に評価した。さらにトルイジンブルーおよびマッソントリクローム染色により組織形態学的評価を行った。また、Lectin-FITC 循環染色および CUBIC 法による組織透明化処理後の免疫染色を併用し、共焦点顕微鏡を用いて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評価した。生化学的解析として、qPCR 法や Western blot 解析により障害神経における CapSC マーカー (NG2, EphA7) および Ninj1 の発現性を評価した。

実験 2 (作業仮説 2 の証明: 神経再生における周細胞の寄与を確認する)

- 周細胞由来細胞追跡マウスの作成: PC 由来細胞の生体内追跡を可能にする NG2-CreERT/tdTomato マウスを準備した。本マウスは、Tamoxifen (Tam) 処理により NG2 陽性 PC に蛍光タンパクを発現させ、PC が他細胞に分化しても蛍光しつづけ、PC 由来の細胞・組織を追跡することができる。本マウスは本講座で自家繁殖したものを利用した。
- 神経組織における周細胞由来細胞の追跡: 上記で準備したマウスに坐骨神経障害を加え、NG2 陽性細胞の動態を実験 1-②に準じて、経時的に蛍光顕微鏡で観察評価した。

実験 3 (作業仮説 3 の証明: 周細胞特異的 Ninj1KO による影響の評価)

- Ninj1 欠損マウスモデルの作成: PC に発現している Ninj1 を Tam 処理により特異的にノックアウトするマウス (NG2-CreER/Ninj1-FloxP) を用いた^[3]。対照マウスとして、NG2-CreER マウスに Tam 処理を施した群と Tam 処理を行わない群を用いた。Tam 処置は 5 日間連続で行い、処置開始から 1 週間後に神経障害手術を施行した。
- 神経障害・再生度の評価: 実験 1-①②に準じて、対照マウス群と比較検討した。

実験 4 (作業仮説 4 の証明: 神経細胞分化における Ninj1 の関与評価)

- シュワン細胞および CapSCs において、Ninj1 発現を特異的 siRNA で抑制し、神経分化用培地で培養した後、成熟シュワン細胞への分化能を S100, MBP などの発現性を免疫染色あるいは RT-PCR を用いて評価した。

4. 研究成果

(下記研究成果は参考文献[7]Tomita Y, Horiuchi K, Kano K, et al. Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;519(3):462-468. doi:10.1016/j.bbrc.2019.09.007にて発表した。)

実験 1)

- 障害坐骨神経の共焦点顕微鏡での観察では、NG2 陽性細胞の増加および神経周囲の血管増生が認められた (図 1(a))。
- qPCR 法では神経障害後の末梢神経組織において NG2、Ninj1 および EphA7 の発現が増加した(図 1(b))。
- Ninj1 および EphA7 は障害神経内に増加した Ng2 陽性細胞に一致して発現が認められた (図 1(c))。

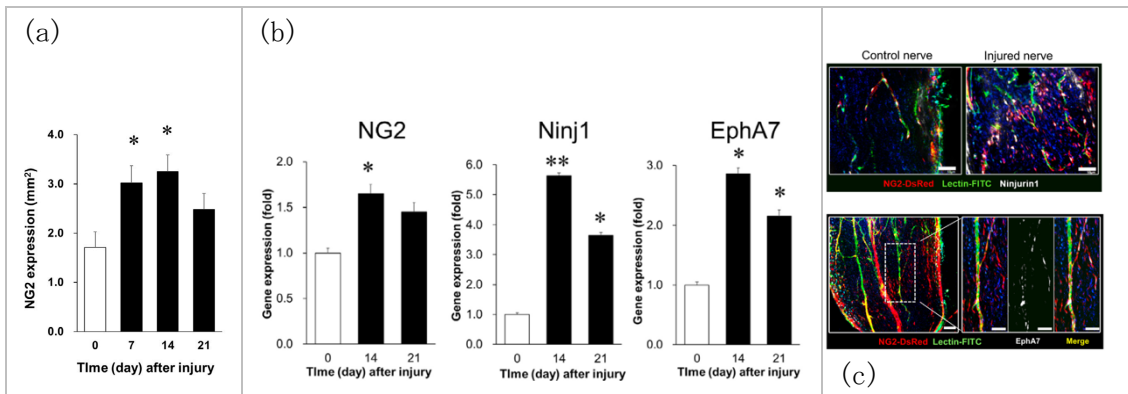


図 1. 障害坐骨神経における NG2 陽性細胞および Ninj1, EphA7 の発現

実験 2)

- 障害坐骨神経において Td-tomato 発現細胞 (周細胞由来細胞) は豊富に認められ、その多くは S100 陽性を示した (図 2)。

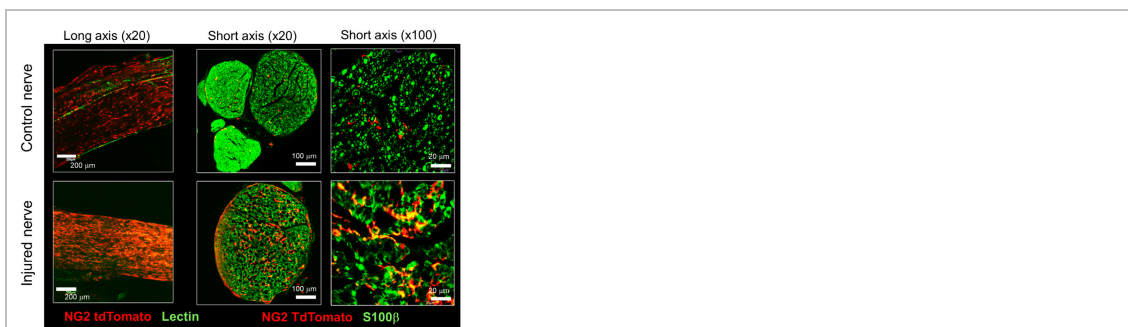


図 2. 障害坐骨神経組織における周細胞由来細胞の追跡

実験 3)

- NG2 陽性細胞特異的 Ninj1 KO マウスでは、神経傷害 14 日後の評価で MBP 発現が低下し(図 3(a))、組織学的観察で髄鞘化神経の減少が認められた(図 3(b))。

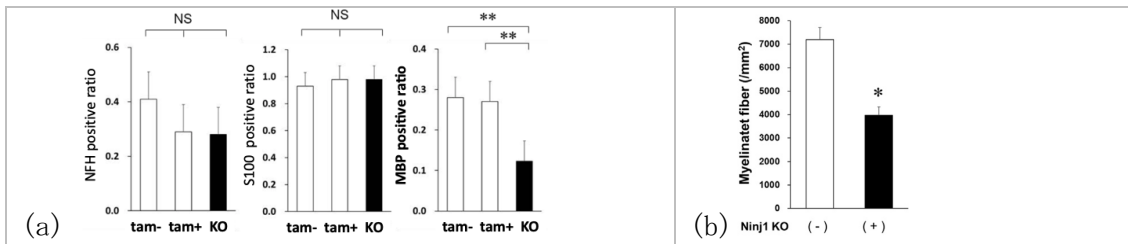


図 3. NG2 陽性細胞特異的 Ninj1 KO マウスにおける神経障害後の再生神経髄鞘化の抑制

実験 4)

- 培養シュワン細胞で Ninj1 発現を抑制すると MBP 発現が低下した (図 4(a))。
- CapSCs で Ninj1 発現を抑制すると神経分化が抑制された (図 4(b))。

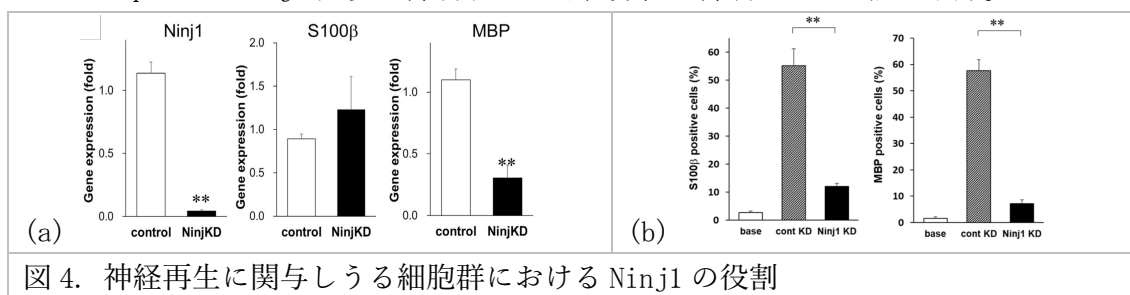


図 4. 神経再生に関与しうる細胞群における Ninj1 の役割

<まとめ>

- 障害神経組織では NG2 および Ninj1 の増加を認めた。また、増加した NG2 陽性細胞に一致して Ninj1 の発現を認めた。
- Ng2 陽性細胞の Ninj1 遺伝子を欠損すると髄鞘化の抑制が認められた。
- 障害神経組織では、神経細胞への分化能を有する毛細血管周細胞である CapSCs の増加を認めた。
- CapSCs で Ninj1 の発現を抑制すると神経細胞への分化が抑制された。
- これらの実験結果より、NG2 陽性細胞における Ninj1 は未分化シュワン細胞が再髄鞘化に至るプロセスに関与する可能性が示唆された。また、Ninj1 は障害神経組織で増加した血管周囲に存在する CapSCs を介して神経再生に関与している可能性がある。
- さらに障害大血管⁸や障害骨格筋⁹、皮膚創傷治癒など様々な病態モデルにおいて CapSC および Ninj1 の関与を検討をすすめている。

<参考文献>

1. Asanome, A. et al. Nerve growth factor stimulates regeneration of perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 150-155 (2014).
2. Matsuki, M. et al. Ninjurin1 Is a Novel Factor to Regulate Angiogenesis Through the Function of Pericytes. *Circ. J.* 79, 1363-1371 (2015).
3. Minoshima, A. et al. Pericyte-Specific Ninjurin1 Deletion Attenuates Vessel Maturation and Blood Flow Recovery in Hind Limb Ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 2358-2370 (2018).
4. Araki, T. & Milbrandt, J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron* 17, 353-361 (1996).
5. Kabara, M. et al. Immortalized multipotent pericytes derived from the vasa vasorum in the injured vasculature. A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration. *Lab. Invest.* 94, 1340-1354 (2014).
6. Yoshida, Y. et al. Capillary-resident EphA7+ pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation. *Stem Cells Transl. Med.* 9, 120-130 (2020).
7. Tomita, Y. et al. Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 519, 462-468 (2019).
8. Horiuchi, K. et al. Pericyte-specific deletion of ninjurin-1 induces fragile vasa vasorum formation and enhances intimal hyperplasia of injured vasculature. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 320, H2438-H2447 (2021).
9. Kano, K. et al. EphA7+ perivascular cells as myogenic and angiogenic precursors improving skeletal muscle regeneration in a muscular dystrophic mouse model. *Stem Cell Res.* 47, 101914 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kano Kohei, Horiuchi Kiwamu, Yoshida Yuri, Hayasaka Taiki, Kabara Maki, Tomita Yui, Tatsukawa Takamitsu, Matsuo Risa, Sawada Jun, Nakagawa Naoki, Takehara Naofumi, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-ichi	4. 巻 47
2. 論文標題 EphA7+ perivascular cells as myogenic and angiogenic precursors improving skeletal muscle regeneration in a muscular dystrophic mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101914 ~ 101914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101914	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomita Yui, Horiuchi Kiwamu, Kano Kohei, Tatsukawa Takamitsu, Matsuo Risa, Hayasaka Taiki, Yoshida Yuri, Kabara Maki, Yasuda Satoshi, Nakajima Keiichi, Nakagawa Naoki, Takehara Naofumi, Okizaki Atsutaka, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-ichi	4. 巻 519
2. 論文標題 Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 462 ~ 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiuchi Kiwamu, Kano Kohei, Minoshima Akiho, Hayasaka Taiki, Yamauchi Atsushi, Tatsukawa Takamitsu, Matsuo Risa, Yoshida Yuri, Tomita Yui, Kabara Maki, Nakagawa Naoki, Takehara Naofumi, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-ichi	4. 巻 320
2. 論文標題 Pericyte-specific deletion of ninjurin-1 induces fragile vasa vasorum formation and enhances intimal hyperplasia of injured vasculature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H2438 ~ H2447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00931.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yuri, Kabara Maki, Kano Kohei, Horiuchi Kiwamu, Hayasaka Taiki, Tomita Yui, Takehara Naofumi, Minoshima Akiho, Aonuma Tatsuya, Maruyama Keisuke, Nakagawa Naoki, Azuma Nobuyoshi, Hasebe Naoyuki, Kawabe Jun-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Capillary-resident EphA7+ pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 120 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.19-0148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鹿野耕平、堀内 至、吉田有里、早坂太希、鹿原真樹、富田 唯、竜川貴光、松尾梨沙、安田 哲、澤田 潤、中川直樹、竹原有史、長谷部直幸、川辺淳一
2. 発表標題 EphA7陽性周細胞は、筋ジストロフィーモデルマウスの病態を改善する
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 Kohei Kano, Kiwamu Horiuchi, Yuri Yoshida, Taiki Hayasaka, Maki Kabara, Yui Tomita, Takamitsu Tatsukawa, Risa Matsuo, Satoshi Yasuda, Jun Sawada, Naoki Nakagawa, Naofumi Takehara, Naoyuki Hasebe, and Jun-ichi Kawab
2. 発表標題 Transplantation of capillary stem cells improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 富田 唯
2. 発表標題 Ninjurin1は、NG2陽性シュワン前駆細胞の成熟化を調整することにより末梢神経再生に関わる
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 毛細血管由来幹細胞、その用途、および、その製造方法	発明者 川辺淳一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6777323	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------