

令和 4 年 6 月 13 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：19K17547

研究課題名(和文) 動脈硬化プラーク病変の進展制御に関する新規血管成熟化因子Ninjurin1の役割

研究課題名(英文) Role of Ninjurin1, a novel vascular maturation factor, in the regulation of atherosclerotic plaque.

研究代表者

蓑島 暁帆 (Akiho, Minoshima)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90645962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究は血管成熟化を制御する新規分子Ninjurin1(Ninj1)が、血管外膜から血管壁を栄養しプラークへのびる微小血管(vasa vasorum, VV)の成熟、安定化を介して、プラーク安定化に寄与していることを証明することを目的としている。マウスを用いた実験では周細胞特異的にNinj1を欠損することにより、VV形成の幼弱化、脆弱化を起し、血管のリモデリングの病態が悪化することを確認した。臨床の冠動脈プラーク組織を用いた評価では、LDLコレステロール高値の症例では、プラーク内の微小血管の血管径が小さく密集している傾向があり、この血管の幼弱化がプラーク不安定化に影響を及ぼす可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管や脳虚血疾患の基盤病態である動脈硬化症の発症進展に関して、従来の『血管内膜の障害』に加え、『血管外膜の栄養微小血管(vasa vasorum, VV)の形成異常』がプラーク増悪や不安定化に関連することが推測されている。

これは臨床的な状況知見から推測されてきたものであるが、両者の因果関係を明確に示すエビデンスは少なく、結果として、その先にある「血管外膜部を標的とする動脈硬化治療の開発」に至っていない。Ninj1を介した血管外膜の微小血管VVの成熟化が、プラーク形成や不安定化に関与することを証明することにより、Ninj1を治療、検査のターゲットとした新たな治療戦略につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： This study aims to demonstrate that Ninjurin1 (Ninj1), a novel molecule that regulates vascular maturation, contributes to plaque stabilization through the maturation and stabilization of microvessels (vasa vasorum, VV) that nourish the vessel wall and extend from the outer vascular membrane to the plaque.

In experiments using mice, we confirmed that pericyte-specific knocked out of Ninj1 causes juvenile and fragile VV formation and worsens the pathogenesis of vascular remodeling.

Evaluation using clinical coronary plaque tissue showed that microvessels within the plaque tended to be smaller and denser in patients with high LDL cholesterol levels, suggesting that this vascular infantilization may influence plaque destabilization.

研究分野：循環器内科

キーワード：虚血性心疾患 vasa vasorum 不安定プラーク 血管成熟化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心血管や脳虚血疾患の基盤病態である動脈硬化症の発症進展に関して、従来の『血管内膜の障害』に加え、『血管外膜の栄養微小血管(vasa vasorum, VV)の形成異常』がプラーク増悪や不安定化に関連することが推測されている。

我々は、新生血管の成熟化メカニズムを解明するために、血管形成の過程で毛細血管の構成細胞の一つである周細胞内に発現する接着因子の一つである Ninjurin1(Ninj1)に着目した。周細胞特異的に Ninj1 遺伝子を欠損誘導 (KO) させるマウス(NG2-CreERT/Ninj1-floxp mouse)を作製し、Ninj1 は周細胞と新生血管内皮との接合を介して成熟血管形成を促進することを明らかにした。

臨床的な状況知見から「血管外膜の微小血管 VV の異常とプラーク形成との関係」が推測されてきたが、両者の因果関係を明確に示すエビデンスは少なく、結果として、その先にある「血管外膜部を標的とする動脈硬化治療の開発」に至っていない。

Ninj1 を介した血管外膜の微小血管 VV の成熟化が、プラーク形成や不安定化に関与する可能性があり、この機能を評価、解析することにより新たな治療戦略につながる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が見出した血管成熟化因子 Ninj1 に着目し、動脈硬化実験モデルを用いて、障害血管外膜の VV 形成異常が動脈硬化プラーク形成に関連しているのか証明すると共に、実際の臨床での動脈硬化プラーク検体を用いて同因子の関与を明らかにする。

そのために、以下の達成目標をたて、三年の研究期間のなかで遂行する。

目標1 血管特異的 Ninj1 欠損による動脈硬化巣の VV 形成とプラーク形成への影響を評価する。これまで作成した周細胞特異的 Ninj1 欠損モデルマウスを用いて、VV 形成とプラーク形成の因果関係を評価する。プラーク内の微小血管形成は血管プラーク組織を透明化させ、三次元的に描出し評価する。

目標2 臨床の冠動脈プラーク組織における微小血管形成と Ninj1 発現との関連性を評価する。冠動脈疾患患者から採取したプラーク組織において、透明化処理し組織の三次元解析を利用して、従来の組織学的解析を超えた微小血管形成や Ninj1 の発現などを評価し、臨床病像との因果関係を証明する。

### 3. 研究の方法

本研究では以下の目標二つをかねて、遂行していく。

目標1 血管特異的 Ninj1 欠損による動脈硬化巣の VV 形成とプラーク形成への影響を評価する。

CreER-loxP 部位特異的組換えシステムを用いて、周細胞マーカーである NG2 をプロモーターとして、周細胞特異的に Ninj1 を tamoxifen 投与時にノックアウトさせるマウスを使用する。Ninj1 のノックアウトにより、VV の微小血管の成熟化とプラークの形成の因果関係について、観察する。組織透明化および三次元画像解析は CUBIC 法を用いて組織透明化を行い、組織内血管を固定前の蛍光ラベル lectin 還流あるいは CD31 免疫染色で可視化後に共焦点顕微鏡を利用して三次元的に評価する。微小血管の形態以外に、微小出血や炎症細胞集積なども評価する。

プラーク形成のモデルとしては、大腿動脈へのガイドワイヤー挿入による血管内膜障害により内膜肥厚モデルに加えて、アポE欠損マウスを掛けあわせ、ダブルノックアウトマウスを作成する。作成した周細胞特異的 Ninj1、アポEダブルノックアウトマウスを作成し行う。

目標2 臨床の冠動脈プラーク組織における微小血管形成と Ninj1 発現との関連性を評価する。

当院での冠動脈インターベンションにおいて Direct Coronary Atherectomy (DCA) を用いた加療を行った患者を対象とし、得られたプラーク組織において上記のように組織透明化を行い、免疫染色で標的蛋白を可視化後に共焦点顕微鏡を利用して三次元的に評価する。

検体のプラーク内の血管内皮細胞 (CD31 陽性細胞)、周細胞 (NG2 陽性細胞)、Ninj1、赤血球 (glycophorin A) を免疫染色する。周細胞と接着している内皮細胞 (周細胞被覆率) を血管成熟の、赤血球を出血の指標とする。臨床症状から不安定狭心症群と安定狭心症群に分けて評価、比較し、安定狭心症群で Ninj1 の発現および周細胞被覆率が高く、プラーク内出血が少ないことを証明する。

また組織上のプラークの所見と、臨床上の画像所見や、プラーク進展に影響する併存疾患や内服を含めた臨床像を対比させることにより、不安定プラークの早期診断につながる臨床所見を同定する。

#### 4. 研究成果

結果1 周細胞特異的 Ninj1 欠損マウスを用いた、VV 形成とプラーク形成への影響の評価。

コロナ禍における当院での新規動物実験の制限により、新たに周細胞特異的 Ninj1 欠損マウスにアポE 欠損マウスをかけあわせた、ダブルノックアウトマウスの作成が困難であったため、大腿動脈へのガイドワイヤー挿入による血管内膜障害モデルを用いて評価を行った。

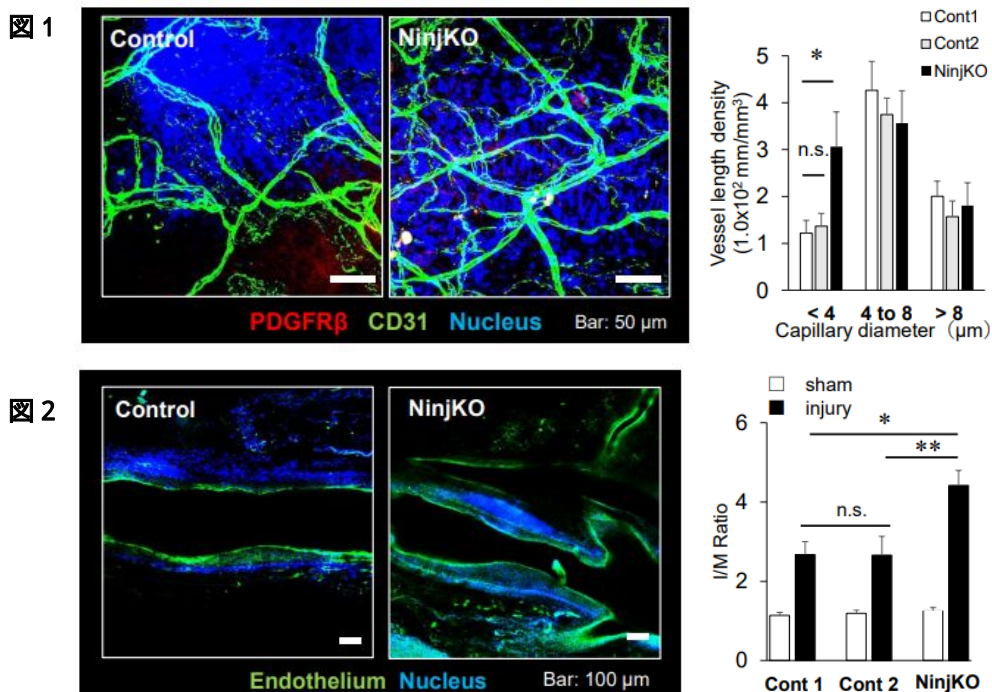
周細胞特異的 Ninj1 欠損マウスおよびコントロールマウスに大腿動脈のwire 障害手技を施行、CUBIC 法による組織透明化を行い、血管外膜の毛細血管を評価した。wire による大腿動脈内皮障害により、血管外膜の vasa vasorum の増生を認め、Ninj1 の発現の増加がみられた。

周細胞特異的 Ninj1 欠損マウスでは血管外膜に増生した毛細血管の血管径が有意に小さく、枝分かれが多く認めており、より幼弱な新生血管の増生を認めていることがわかった(図1)。また lectin をマウス尾静脈から注入、灌流染色を行うと、周細胞特異的 Ninj1 欠損マウスで血管外への lectin の露出がより多く認め、新生血管がより脆弱であることが示唆された。

また周細胞特異的 Ninj1 欠損マウスでは、内皮障害に伴う内膜肥厚の増悪が認められ(図2)、さらにマクロファージの浸潤の亢進を伴っていた。

以上より、内膜障害により外膜の VV の増生が引き起こされ、この際に周細胞特異的に Ninj1 を欠損すると外膜 VV の形成異常が起こり、外膜の炎症細胞の浸潤が亢進する。外膜の炎症により内膜肥厚が増悪することが示唆された。

本知見は外膜の VV 異常が血管リモデリングに關与する強力な証拠になる。

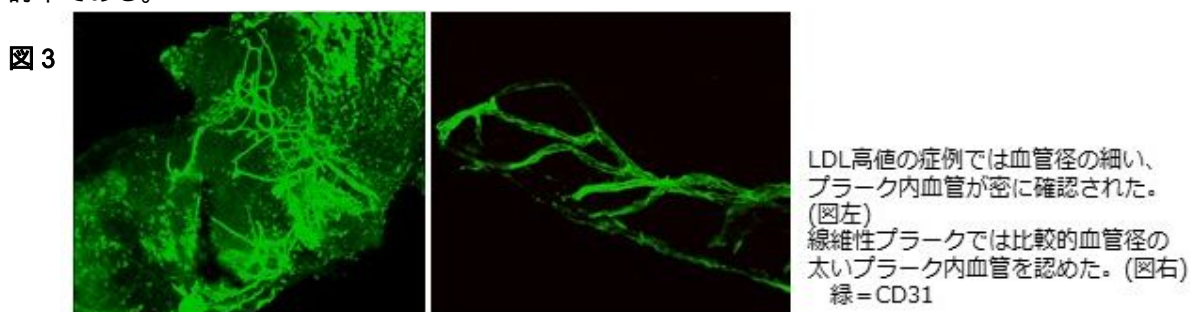


#### 結果2 臨床の冠動脈プラーク組織の解析

冠動脈インターベンションに際し、DCA 治療によりヒトの冠動脈病変から摂取したプラーク組織を、CUBIC 法にて透明化し、プラーク内の微小血管の形成を確認することに成功した。

LDL コレステロール高値の症例では、プラーク内の微小血管の血管径が小さく密集している現象を認め、また安定した先生プラークでは比較的太い微小血管の形成を認めた。(図3) プラーク内の微小血管の形成、成熟化とプラークの安定化が関連している可能性が示唆された。

プラーク内における Ninj1 の発現と微小血管の成熟性、プラークの安定化についての関与の評価は、症例数が十分に確保できていないこともあり、現在証明できず、さらに症例を重ねて検討中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kiwamu Horiuchi, Kohei Kano, Akiho Minoshima, Taiki Hayasaka, Atsushi Yamauchi, Takamitsu Tatsukawa, Risa Matsuo, Yuri Yoshida, Yui Tomita, Maki Kabara, Naoki Nakagawa, Naofumi Takehara, Naoyuki Hasebe, and Jun-ichi Kawabe	4. 巻 -
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 -
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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kiwamu Horiuchi, Akiho Minoshima, Maki Kabara, Kohei Kano, Yui Tomita, Yuri Yoshida, Taiki Hayasaka, Naofumi Takehara, Naoyuki Hasebe, Jun-ichi Kawabe
2. 発表標題 Pericyte-specific deletion of Ninjurin1 induces abnormal vasa vasorum formation and enhances intimal hyperplasia
3. 学会等名 European Society of Cardiology（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------