

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 05 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590820

研究課題名（和文） 障害血管リモデリングおよび血管外膜微小血管新生における神経再生因子の役割

研究課題名（英文） Role of neural regenerative factors on vasa vasorum angiogenesis and remodeling of injured vasculature.

研究代表者

川辺 淳一（KAWABE JUNICHI）

旭川医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：10400087

研究成果の概要（和文）：

本研究において、1 障害血管壁に増加する微小血管の成熟度や安定度と、その周囲に再生する末梢神経の関連性を明らかにし、2. 同部位に末梢神経再生促進させる因子により、神経再生とともに微小血管の安定化成熟化が亢進することを見出した。

以上、成体の病態血管新生において、毛細血管レベルから、すでに周囲に末梢神経線維の再生が始まり、これにより新生された血管がさらに成熟化が進んでいくことを初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We showed that relationship between vascular maturation/stabilization of microvasculature within injured arterial walls and regeneration of peri-vascular peripheral nerve, and that nerve regenerative factors induced the reinnervation around the neovessels and subsequently vascular maturation/stabilization of microvessels.

We demonstrated for the first time that peripheral nerves fibers were already regenerated around the microvessels in patho-physiological condition to induce the vascular maturation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学、血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化を障害血管壁における慢性炎症と捉えることができるが、炎症の発症、持続には、炎症細胞や酸化脂質などの血管内側内皮からの進入が主な機序と考えられてきた。最近のイメージング技術の発達によ

り、本来、血管壁への栄養供給の役割をもつ血管外膜の微小血管（vasa vasorum）は、動脈硬化の進展と共に幼弱かつ脆弱な血管発達し、血管壁外側からプラーク内に非選択的に炎症細胞や脂質を供給し、プラーク内出血

を起こし、動脈硬化病態の進展あるいはプラークの不安定化をもたらし、急性冠症候群の一因と考えられている。

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)は強力な血管新生因子で、VEGF 遺伝子療法は難治性虚血疾患における治療法として期待されたが、一方で過剰の VEGF により幼弱な vasa vasorum 血管新生が促進され、動脈硬化の進展、プラークの不安定化をもたらすことが報告された。また、血管新生抑制薬によりプラーク内微小血管抑制と共にプラーク退縮することが動物実験で示され、『vasa vasorum 血管新生抑制』による動脈硬化・プラーク安定化という新しい治療応用として期待されている。しかし、動脈硬化病変で発現亢進している VEGF などの血管新生因子は、障害された血管内皮修復や正常血管の維持に関与しているという側面もあり、又、新生内膜肥厚に伴う虚血に応じて発達している vasa vasorum の形成抑制は、さらにプラークの肥厚をもたらすという報告もあり、単に vasa vasorum 血管新生を抑制するという治療戦略には問題が多い。

血管は末梢神経と発生過程で機能的に連携し、末梢神経との併走により動脈系血管への分化と成熟を誘導することが報告されている。また、神経網形成・再生に関与する神経増殖因子や神経軸索誘導因子などの神経再生因子は、血管内皮細胞や平滑筋細胞への直接作用もあり、血管新生に重要な役割を果たすことも報告されている。動脈硬化巣では血管内・中膜部位の血管細胞の増殖や遊走、さらに外膜部の vasa vasorum 新生などダイナミックなリモデリングが生じており、また、障害血管壁において神経再生因子あるいはその受容体発現が増強していることを見出し、神経再生因子は、血管細胞への作用、末梢神経の再生による新生微小血管

の形態に影響を与え、さらには血管リモデリングの病態に関与する可能性が十分考えられる。

血管外膜という不安定な支持組織内の vasa vasorum は、従来、詳細な病理・生化学的解析が困難であった。そこで、我々は、Collagen-coating tube (CCT)を作成、障害血管近傍に留置することにより、障害血管外膜に発達した新生血管の一部を CCT 薄膜上に形成させる方法を開発した。

## 2. 研究の目的

我々は以下の仮説をたて、その検証実験(目的)を遂行する。

仮説； 神経再生因子は、障害血管における vasa vasorum の成熟化、安定化を促進し、血管壁リモデリングを制御する役割をもつ。  
目的1 血管内皮障害動物モデルを用いて、神経再生因子による vasa vasorum 血管周囲の末梢神経再生と新生血管の形態との関連性を明らかにする。

目的2 同モデルを用いて、神経再生因子による vasa vasorum 新生血管形態と血管リモデリングとの関連性を明らかにする。

目的3 *Ex vivo* 血管組織を用いた血管新生モデルを用いて、神経再生因子による新生血管形成への作用を明らかにする。

神経再生因子として、神経増殖因子 NGF の他に、血管新生に対する役割について、未だ一定の見解が得られていない神経軸索誘導因子 Netrin および Slit2 の二因子についても解析を行っていく。

## 3. 研究の方法

すでに予備実験で検討中の NGF に加え、障害血管組織において、その因子および受容体の発現亢進を認めている神経軸索誘導促進および抑制因子として知られる Netrin や Slit2 についても解析した。神経再生因子の

多くは血管新生に関して一定の見解が得られていないが、これは標的細胞に発現する受容体の違いに起因していると考えられている。そこで、shRNA を利用した血管・神経再生因子の受容体の発現の影響も解析した。また、神経再生因子の血管細胞への直接作用については、*Ex vivo* 培養システムを利用し、末梢神経非存在下での血管新生への神経再生因子の効果を解析した。

#### 実験方法

**A.** 内皮障害-血管リモデリングモデル；雄マウスの大腿動脈内皮をワイヤー障害し、*vasa vasorum* 形態評価は血管新生が最大となる術後 1-2 週後、新生内膜肥厚リモデリング評価は、内膜肥厚が落ち着く術後 3 週後に行った。

**B.** 障害血管部における血管・神経再生因子の抑制、増強法；

(1) 徐放ゲル留置法 大腿動脈近傍に 2-3 週間にわたりペプチドを徐放する体内吸収性ゲル (MedGel®) を留置した。①外因性因子として recombinant mouse VEGF、NGF、Netrin および Slit2、②内因性因子抑制を目的として、各因子に対する中和抗体をゲルに封入した。

(2) ShRNA レトロウイルス感染法 障害血管組織内で発現が確認されている NGF (TrkA, p75NTR)、Netrin(UNC5)、Slit2(Robo4) に対する特異的受容体遺伝子発現を抑制する ShRNA 発現レトロウイルス (pSIREN-RetroQ-DsRed®) を作成、血管組織に感染させた。

**C.** コラーゲンコーティングチューブ (CCT) 留置法；表面に collagen を付着させた Polyethylen tube (id=0.76) を障害血管近傍に留置した。留置後 1-2 週後、CCT を固定、新生血管を含む薄膜を剥離、スライドガラス上に展開・乾燥させた後、免疫学的解

析を行った。

**D.** 組織・免疫学的解析；摘出血管の短軸凍結切片を HE 染色し、新生内膜肥厚度を評価。血管切片組織あるいは CCT 薄膜を対象に、血管内皮 (CD31) および平滑筋細胞 (αSMA)、炎症細胞 (Mac3 陽性マクロファージ、総白血球 (CD45 陽性細胞) の集積を同定した。CCT 留置法に加え、血管外膜中の *vasa vasorum* の解析には、従来の全血管組織染色法 (whole mount staining) を利用した。末梢神経線維を tyrosin hydroxylase (TH)、protein gene product (PGP) 9.5 および CGRP に対する抗体を用いた免疫染色あるいは電子顕微鏡解析を行った。

**E.** 新生血管解析法；成熟度、安定度評価に関しては、血管径ごとに分類した血管長さの測定の他に血管周囲平滑筋 (周) 細胞の分布を評価し、血管透過性評価には Evans Blue 染色液を静注後、PBS 還流で血管内腔の染色液を除き、血管外透過した染色量を定量した。

**F.** 生化・分子学的解析法；障害血管組織および CCT 薄膜組織の血管、神経再生因子およびその受容体の発現量の経時変化、shRNA の効果確認のため、Real Time PCR により測定。

**G.** *Ex vivo* 血管新生アッセイ；血管障害後、2-3 週目の血管を摘出、短軸に切り出し、コラーゲンコーティング培養皿で培養し、血管外膜より sprouting してくる新生血管を観察する。培養液中に VEGF および神経再生因子を添加、その新生血管の形態を上記評価法で解析した。

*in vivo* 障害血管モデルおよび *Ex vivo* 組織培養血管新生における神経再生因子の役割についての解析実験を行った。特に外因性因子 (recombinant peptides) の効果に関

する結果を踏まえ、中和抗体を用いた内因性神経因子の役割の解明を行う。また、前年度から作成準備した shRNA-レトロウイルスを用いた実験も行った。

(1) 新生血管の成熟度評価について  
血管成熟度の評価は、主に病理学的解析に頼るところが大きく定量的解析が乏しい。CCT 薄膜上には新生血管のほか線維芽細胞や炎症細胞が少数含まれるだけで、新生血管由来以外の血管細胞が殆ど無い標本である。そこで新鮮薄膜から mRNA 抽出、血管内皮細胞、平滑筋細胞および末梢神経由来の特異的遺伝子発現量を real time PCR 法で評価し、内皮細胞由来遺伝子に対する平滑筋細胞由来遺伝子の発現比率を算出し、血管成熟度の客観的評価法として利用した。

(2) 神経再生因子による新生血管以外の細胞への影響

2-1 障害血管壁—内皮・平滑筋細胞への作用  
血管リモデリングへの効果を見る場合、新生内膜肥厚に影響する血管壁の平滑筋細胞や血管内腔側の内皮細胞への直接作用も考慮する必要がある。我々は、選択的な神経再生因子受容体発現の抑制のため、shRNA によるレトロウイルスの感染方法を①障害血管内腔のみ（血管壁内側細胞を標的）、②障害血管周囲のみ（主に vasa vasorum を含む血管外膜を標的）に分けて、比較検討した。

2-2 骨髄由来内皮前駆細胞（EPC）への作用  
我々は、血管リモデリング病態に大きな役割をもつ EPC にも NGF や Slit2 の受容体が発現していることを確認しており、障害血管部位で増加していつ同因子が EPC への作用を介して血管リモデリングの病態に影響している可能性は十分考えられる。我々は、①単離培養 EPC を用いて EPC 機能に対する神経再生因子の作用解明と共に、②shRNA レトロウイ

ルスにより神経再生因子受容体発現を抑制させた EPC の血管障害マウスへの導入実験により、障害血管リモデリングへの役割を解析した。導入 EPC の体内局在評価のため GFP 発現マウス由来の EPC を用いた。

#### 4. 研究成果

障害血管プラークの進展過程において、プラーク内に増加する微小血管の性状が大きく関与することが報告されている。我々は、この微小血管の安定化・成熟化に血管周囲末梢神経再生が関与していることを明らかにし、動脈硬化プラーク治療開発につながる成果をあげた。

本研究において、1 障害血管壁に増加する微小血管の成熟度や安定度と、その周囲に再生する末梢神経の関連性を明らかにし、2. 同部位に末梢神経再生促進させる因子を投与することにより、神経再生とともに微小血管の安定化成熟化が亢進することを見出した。本研究により、成体の病態血管新生において、毛細血管レベルから、すでに周囲に末梢神経線維の再生が始まり、これにより新生された血管がさらに成熟化が進んでいくことを初めて明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

投稿中

〔学会発表〕（計 4 件）

①. Multi-potent capillary pericytes can form matured capillary-like structure by themselves M Kabara, J Kawabe, M Matsuki, A Yamauchi, A Asanome, T Aonuma, A Minoshima, N Nkagawa, N Takehara, N Hasebe  
日本循環器学会 日本（横浜） 2013

②. Peripheral nerve is critical for vasa vasorum maturation in injured vascular walls - effects of substance P on

pericyte-mediated vascular maturation-  
A Asanome, **J Kawabe**, M Kabara, M Matsuki,  
A Yamauchi and N Hasebe 日本循環器学会,  
日本 (福岡) 2012

③. Nerve growth factor induces  
maturation of vasa vasorum neovasculature  
in injured vascular walls A Asanome, **J  
Kawabe**, M Kabara, M Matsuki, A Yamauchi and  
N Hasebe AHA (アメリカ心臓病学会) 米国  
(Orland) 2011

④. Nerve growth factor induces  
maturation of vasa vasorum neovasculature  
in injured vascular walls **J Kawabe**, A Akira,  
A Yamauchi, N Takehara, N Hasebe 日本血  
管生物医学会学術集会 (第 18 回) Dec1-3,  
2010 (大阪、日本)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 末梢組織の毛細血管構成細胞の不死化  
細胞株

発明者: 川辺淳一

権利者: 旭川医科大学

種類: 特願

番号: 2012-024854

出願年月日: 平成 24 年 2 月 8 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川辺 淳一 (KAWABE JUNICHI)  
旭川医科大学・医学部・特任准教授  
研究者番号: 10400087

### (2) 研究分担者

平 義樹 (HIRA YOSHIKI)  
旭川医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70199024

岡田 基 (OKADA MOTOI)  
旭川医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 80431427

竹原 有史 (TAKEHARA NAOFUMI)  
旭川医科大学・医学部・特任講師  
研究者番号: 90374793

### (3) 連携研究者 なし ( )

研究者番号: