

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04170

研究課題名(和文)新規因子による血管成熟機構の解明と、動脈硬化に対する治療法の開発

研究課題名(英文)Ninj1-mediated vascular maturation and development of therapeutic strategy for atherosclerosis

研究代表者

川辺 淳一 (Kawabe, Jun-ichi)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：10400087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,490,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会を背景に増加する心血管疾患の基盤病態といえる動脈硬化がどのように進行するか、従来いわれている病変血管の内膜障害だけでなく、その外膜に形成される微小血管の形成異常が関与していることを証明しました。この微小血管の質的な形成異常(幼若化)の機序として、微小血管の周細胞と内皮細胞との相互作用や、これに伴走する神経形成異常が関与することを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化の病態の場所が、従来から注目されている内膜だけでなく、外膜部(特に微小血管形成異常)にもある、さらに、この微小血管形成異常の機序を明らかにすることにより、従来の動脈硬化治療で克服できなかった「高齢化社会下での動脈硬化」治療戦略の一つの方向性を示せた。また、新生血管の成熟化と平行して、神経線維の伴走化する知見を得たことにより、微小血管形成制御だけでなく、神経再生の機序解明に繋がる糸口となった。

研究成果の概要(英文)：Atherosclerosis is a fundamental condition for cardiovascular diseases. It is well recognized that atherosclerotic events are initiated by damage in inner side of vascular walls. We found that in addition to inner side, event in adventitial side, especially abnormality in the formation of microvasculature closely contribute to progression of atherosclerotic plaque. We also found that abnormality of microvascular formation is due to an interaction of PCs and EC tubes and perivascular wiring of peripheral nerve.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 血管新生 神経再生 体性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は、超高齢化社会を背景に増加し続ける主要な死亡原因疾患—心血管・脳などの虚血性疾患の基礎疾患である。血管リモデリングの病態として、新しく動脈硬化病変の「血管外膜」に発達する幼弱な微小血管(vasa vasorum; VV)がプラーク形成の促進や不安定化をもたらす病態が考えられるようになってきた。

我々は、動脈硬化巢の VV 形成自体でなく、VV の成熟化(構造安定化・機能化)による安全かつ効果的な動脈硬化プラーク制御法の開発にむけて、研究展開してきた。ECs と PCs との接着を介して成熟血管の形成をもたらす接着因子 Ninjurin1(Ninjl)を見出し、今後、血管成熟化に関わる Ninjl の詳細な機序と、動脈硬化を含めて様々な疾患病態における Ninjl の役割を解明していきたい。

動脈硬化病態に、様々な体性幹・前駆細胞が深く関与していることが報告されている。我々は、末梢組織の毛細血管 PCs から新規の周幹細胞(Capillary stem cells(CapSCs)と命名)を同定、分離することに成功した。また、準備実験の知見から、Ninjl の血管成熟化作用の機序として①『ECs-PCs との接合』と共に『CapSCs からシュワン細胞への分化誘導に関与し、結果として、再生末梢神経が微小血管と伴走し、機能的な成熟血管を形成する』という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

### 目的1 周細胞(CapSCsを含む)Ninjlの血管成熟化作用の機序解明にむけて

①PCs の ECs との接着調節と共に ②CapSCs の血管と神経再生能(BVW)の観点で Ninjl の血管成熟化作用およびその機序を解明していく。

### 目的2 Ninjl の Vasa vasorum 血管形成や血管リモデリングにおける役割を明らかにして「VV 安定化」という抗動脈硬化治療コンセプトの妥当性を検証する。

## 3. 研究の方法

### 目的1 周細胞(CapSCsを含む)の Ninjl の血管成熟化作用の機序解明

- (1)毛細血管構築システムを用いて、Ninjl の血管新生、成熟血管形成作用の機序解析を行う。
- (2)CapSCs による血管構築と神経再生(BVW)が、Ninjl の血管成熟化作用に寄与することを証明。

### 目的2 Ninjl の Vasa vasorum 形成および血管リモデリングにおける役割

- (1)Ninjl の障害血管外膜の微小血管形成や末梢神経再生への役割解明
- (2)血管リモデリング(内膜肥厚、プラーク形成)への影響解明

## 4. 研究成果

### (1) 毛細血管幹細胞 (CapSC) の単離と下肢虚血組織における血管新生効果

不死化毛細血管細胞株をもちいた網羅遺伝子解析から、多分化能周細胞(PCs)に特異的なマーカー(EphA7)を見出した[1]。このマーカーを利用して、正常マウス組織(皮下脂肪や骨格筋組織)の微小血管から、多分化能PCsを分離することに成功した[2]。同細胞は、血管内皮および周細胞に分化し、みずから毛細血管を構築する他、間葉系幹細胞あるいは神経幹細胞様の多分化能をもつことを確認し、毛細血管幹細胞(CapSC)と命名した。CapSCは、マウス重症下肢虚血モデルへの導入により、みずから血管形成し、優れた末梢循環改善効果をもつことを明らかにした[2]。

## (2) Ninj1 の血管新生および神経再生における役割の証明

我々は、内皮細胞および周細胞との接着に関与して、毛細血管様の成熟微小血管形成にかかわる接着因子 Ninj1 を見出した[3]。周細胞特異的に Ninj1 遺伝子を欠損誘導できるマウス (NG2CreER/Ninj Flox) を作成し、Tamoxifen により周細胞 Ninj1 発現を抑制すると、マウス下肢虚血モデルにおいて、虚血組織内の血管形成に異常をもたらし (成熟、機能的血管形成の抑制)、結果として末梢循環回復が大幅に遅延することを見出した[4]。

先に見出した CapSC も Ninj1 が発現しており、この遺伝子を抑制すると、CapSC のもつ神経グリア細胞への分化能が著明に低下すること、すなわち CapSC の持つ神経分化能に Ninj1 が重要であることを明らかにした[5]。周細胞特異的な Ninj1 欠損により、周細胞同様に CapSC の Ninj1 発現も抑制し、生体内で同細胞によるシュワン細胞分化が低下する。同モデルを用いて末梢神経—坐骨神経モデルで、再生神経のシュワンミエリン化が抑制され、同神経再生能の低下を明らかにした[5]。

## (3) 内皮チューブおよび周細胞混合による三次元微小血管様構造の構築と、同細胞機能評価システムの開発

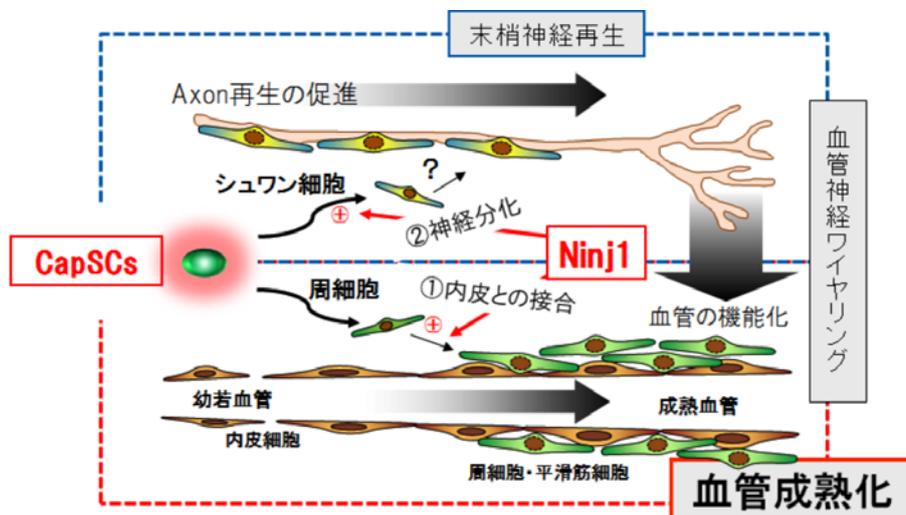
共同研究者である松永行子先生の研究室で、すでに樹立している三次元ゲル内での内皮チューブシステムにおいて、内皮と内皮と接する細胞を観察・評価するシステムを開発した。我々から周細胞あるいは CapSC を提供し、周細胞が内皮に接着し、血管チューブの安定化 (透過性など) をもたらしことを明らかにした[6]。今後、三次元血管チューブで、CapSC および神経根の共培養システムを構築し、血管神経伴走化における CapSC の役割機序解明実験をおこなっていく。

## (4) 血管障害によるリモデリングにおける周細胞 Ninj1 の役割の証明

周細胞特異的に Ninj1 遺伝子を欠損誘導できるマウスでおこす血管新生異常が、障害血管時のリモデリングと共に、形成される障害血管外膜の微小血管においても異常が生じることを明らかにした。同 Ninj1 欠損マウスにおいて、障害血管の外膜に形成される微小血管は幼若で、微小出血、炎症細胞の浸潤、炎症誘発をもたらし、結果として、障害血管の内膜肥厚 (リモデリング) が増悪することを明らかにした。本研究成果は、学会発表で高い評価をされ (2018 年日本高血圧学会 YIA 優秀賞)、現在、論文投稿中である。

同 Ninj1 欠損マウスで、創傷治癒遅延をもたらすことも明らかにしており (論文準備中)、同モデルは、新生血管が伴う組織障害病態モデルで、微小血管形成異常と病態変化を見出す可能性があるとともに、同細胞の Ninj1 の組織再生における重要性をさらに確認、実証していくことが重要である。

末梢組織における血管形成と共に伴走する神経再生に、微小血管の一部である CapSC が重要な役割をもつという仮説の一部立証された (図 1)。今後、CapSC を標的とした遺伝子改変動物などを用いて、末梢神経分布が、新生血管形成 (特に成熟化や機能化など) や組織再生に重要であることを、糖尿病モデルなどでの病態モデルで実証していくプロジェクトへ発展させていく。



**図1 血管成熟化 - 神経再生におけるCapSCs、Ninj1の役割 (仮説)**

**CapSCs**は、周細胞の一つとして微小血管周囲に局在し、①血管内皮や周細胞に分化し毛細血管～成熟血管の形成に関与する一方、②シュワン細胞を供給して、血管と伴走する形で末梢神経の再生を促す。

**Ninjurin 1(Ninj1)**は、周細胞(CapSCsを含む)において、①周細胞と内皮チューブとの接合を促進し、安定した血管を構築する一方、② CapSCsからシュワン細胞分化を促し、末梢神経が血管に沿って再生、より機能的な成熟血管形成に寄与する。

##### 5. 本研究プロジェクト関連業績

1. Kabara M, *et al.* (2014) 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(12):1340-1354.
2. Yoshida Y, *et al.* (2020) Capillary-resident EphA7(+) pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation. *Stem Cells Transl Med* 9(1):120-130.
3. Matsuki M, *et al.* (2015) Ninjurin1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes. *Circ J* 79(6):1363-1371.
4. Minoshima A, *et al.* (2018) Pericyte-Specific Ninjurin1 Deletion Attenuates Vessel Maturation and Blood Flow Recovery in Hind Limb Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(10):2358-2370.
5. Tomita Y, *et al.* (2019) Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun*.
6. Lee E, *et al.* (2018) A 3D in vitro pericyte-supported microvessel model: visualisation and quantitative characterisation of multistep angiogenesis. *J Mater Chem B* 6(7):1085-1094.

## 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 3件）

1. 著者名 Minoshima, A. Kabara, M. Matsuki, M. Yoshida, Y. Kano, K. Tomita, Y. Hayasaka, T. Horiuchi, K. Saito, Y. Aonuma, T. Nishimura, M. Maruyama, K. Nakagawa, N. Sawada, J. Takehara, N. Hasebe, N. Kawabe, J.	4. 巻 38
2. 論文標題 Pericyte-Specific Ninjurin1 Deletion Attenuates Vessel Maturation and Blood Flow Recovery in Hind Limb Ischemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arterioscler ThrombVasc Biol	6. 最初と最後の頁 2358-2370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.118.311375	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 Lee, E, Takahashi H, Pauty J, Kobayashi M, Kato K, Kabara M, Kawabe J, Matunaga YT	4. 巻 6
2. 論文標題 A 3D in vitro pericyte-supported microvessel model: visualization and quantitative characterization of multistep angiogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Material Chem B.	6. 最初と最後の頁 1085-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 -

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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Minoshima, Kawabe J, Matsuki M, Kabara M, Horiuchi K, Hayasaka, T< Shimamura K , Takehara N, Hasebe N.
2. 発表標題 Ninj1 mediates neovessel maturation through angiopoietin 1 expression by pericytes
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K Horiuchi, A Minoshima, M Kabara, T Hayasaka, N Takehara, N Hasebe, J Kawabe
2. 発表標題 Deletion of pericyte-specific Ninjurin1 inhibits the formation of matured vessels in ischemic tissues and attenuated the blood flow recovery in the hind limb ischemia
3. 学会等名 第2回 日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田 有里、鹿原 真樹、鹿野 耕平、早坂 太希、富田 唯、堀内 至、簗島 暁帆、齊藤 幸裕、西村 正人、竹原 有史、東 信良、長谷部 直幸、川辺 淳一
2. 発表標題 Identification of Capillary stem cells having capillary formation and potent regenerative potency
3. 学会等名 第1回日本循環器基礎研究フォーラムBCVR
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawabe J
2. 発表標題 Capillary stem cells, multipotent pericytes resident in microvessels and their clinical application
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawabe J
2. 発表標題 Capillary pericytes provide a new insight in vital phenomenon of multicellular organism.
3. 学会等名 第41回 日本高血圧学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minoshima, Kawabe et al
2. 発表標題 Ninjurin1 mediates vessel maturation through endothelial-pericytes interactions and enhances the blood flow recovery in the hind limb ischemia.
3. 学会等名 第81回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Minoshima, Kawabe et al
2. 発表標題 Ninjurin1 mediates vessel maturation through endothelial-pericytes interactions and enhances the blood flow recovery in the hind limb ischemia.
3. 学会等名 European Society of Cardiology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Horiuchi K, Minoshima A, Tomita Y, Hayasaka T, Takehara A, Hasebe N, Kawabe J
2. 発表標題 Pericyte-specific deletion of Ninjurin1 induces abnormal vasa vasorum formation and persistent inflammation and enhances intimal hyperplasia of injured vasculature.
3. 学会等名 European Society of Cardiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomita Y, Horiuchi K, Kano K, Tatsukawa T, Yoshida Y, Kabara M, Hasebe N, Kawabe J
2. 発表標題 Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2+ neural precursor cells
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horiuchi K, Minoshima A, Tomita Y, Hayasaka T, Takehara A, Hasebe N, Kawabe J
2. 発表標題 Pericyte-specific deletion of Ninjurin1 deteriorates intimal hyperplasia of injured vessels through immature formation of adventitial vasa vasorum.
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 国際出願	発明者 川辺淳一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2016/072259	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	松永 行子 (津田行子)  (Matsunakga Yukiko)  (00533663)	東京大学・生産技術研究所・准教授    (12601)	
研究分担者	甲賀 大輔  (Kouga Daisuke)  (30467071)	旭川医科大学・医学部・准教授    (10107)	