

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19359

研究課題名(和文)血管新生における新規因子Ninjurin1の機能解明

研究課題名(英文)To clarify the role of Ninjurin 1 in vascular maturation.

研究代表者

鹿原 真樹 (KABARA, Maki)

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：20596267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：微小血管新生・成熟化の過程において周細胞と内皮細胞の相互作用が重要である。本研究ではその相互作用に関わる候補因子としてNinj1(Nerve injury-induced protein 1; Ninj1)を見出し、その機能の評価した。マウス下肢虚血モデルを用いた検討では、Ninj1特異的siRNAの投与で虚血部のNinj1発現を抑制することにより、虚血部位の血流回復が低下した。これらの結果から、毛細血管細胞に発現するNinj1は血管新生・成熟化に関わり、虚血改善に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the process of angiogenesis and vascular maturation, the interaction between pericytes (PC) and endothelial cells (EC) is important step. Here, we have focused on Ninj1 (Nerve injury-induced protein 1; Ninj1) as a novel factor to regulate PC-EC interaction and investigated the role of Ninj1 in angiogenesis. Then we prepared murine model of hind limb ischemia. By reduction of Ninj1 expression in ischemic tissue using Ninj1-siRNA, blood flow recovery was significantly reduced. Accordingly, we have proposed that Ninj1 mediates angiogenesis and vessel maturation, and contributes to improve blood flow in ischemic tissues.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管成熟化 周細胞 内皮細胞 毛細血管

1. 研究開始当初の背景

微小血管は内皮細胞チューブの外側を基底膜を介して周細胞が覆う構造をとる。周細胞は微小血管の安定化や透過性の調節などに寄与し、血管成熟化の重要なプレイヤーである。

微小血管の脆弱化や異常は、虚血性疾患をはじめとして、心不全や悪性腫瘍など多くの慢性難治性疾患の病態形成に関与することが明らかとなっている。従って、微小血管の安定化は治療の有効な戦略となりうる。しかし、周細胞と内皮細胞の相互作用は未だ不明な点が多い。

その研究を阻む要因のひとつとして、微小血管由来細胞の分離・調整が技術的に難しいことが挙げられる。そこで我々はSV40T抗原トランスジェニックマウスを利用して、末梢血管外膜の微小血管から毛細血管由来周細胞および内皮細胞株を樹立した^{引用文献}。

この樹立した細胞株を利用し、周細胞と内皮細胞の相互作用に関わる新規因子を見出すため、新生血管内皮と接触する周細胞において遺伝子発現量が変化する因子を網羅的に検索した。その中から、細胞接着分子Ninjurin1 (Nerve injury-induced protein 1; Ninj1) に着目し、検討を行った。

Ninj1は細胞表面に存在する接着分子であり、末梢神経の傷害時に神経細胞において上昇する因子として同定された^{引用文献}。最近では炎症細胞や上皮細胞への発現が報告されている^{引用文献}。しかし、Ninj1の血管新生・血管成熟化における役割や虚血病態下での挙動・意義は全く不明である。

2. 研究の目的

前述の背景を受けて我々は、毛細血管細胞でのNinj1の血管新生・成熟化における役割を明らかにすることを目的とし、以下の具体的な目標を立てた。

- 目標(1) 血管新生におけるNinj1の作用解析
- 目標(2) Ninj1の血管新生作用の機序解析
- 目標(3) 下肢虚血組織内におけるNinj1の役割解析

3. 研究の方法

(1) 血管新生におけるNinj1の作用解析

申請者が樹立した、微小血管由来周細胞および内皮細胞株^{引用文献}を用いた。以下の条件下で培養し、Ninj1遺伝子発現量をreal-time PCRで測定した。

低酸素培養下(O₂ 6-12%)で1・3・5日目の細胞を回収し、RNAを抽出して評価

した。

TNF-alpha添加条件下(10, 50, 100 μM)で培養開始後3日目の細胞を回収し、RNAを抽出して評価した。

(2) Ninj1の血管新生作用の機序解析

前項に記載した細胞を用いて、Ninj1発現プラスミド、Ninj1特異的siRNAをlipofectionで導入し、Ninj1の過剰発現・ノックダウンを行った。トランスフェクション後48-72時間の細胞を用い、以下のアッセイを施行した。

in vitro EC tube assay

微小血管由来内皮細胞をMatrigelに埋包し、VEGF(10 ng/mL)の存在下で7日間培養した。毛細血管様構造の長さ・分岐を解析し、内皮細胞のチューブ形成能を検討した。

aorta ring assay

C57BL/6マウス(10-16週齢、雄)から摘出したマウス胸部大動脈を輪状に切断し、Matrigelに包埋した後にVEGF(10 ng/mL)の存在下で3次元培養を行った。これにDsRedで標識した微小血管由来周細胞を加え、共培養を行った。Lectin-FITCにより血管内皮を蛍光染色し、新生血管の長さ・数を測定し、周細胞の血管新生促進作用を検討した。

(3) 下肢虚血組織内におけるNinj1の役割解析

C57BL/6マウス(12週齢、雄)に対し、大腿動静脈結紮による下肢虚血モデルを作成した。以下の項目につき検討した。

虚血肢におけるNinj1発現を免疫染色法で検討した。また、虚血肢骨格筋におけるNinj1遺伝子発現量を経時的にreal-time PCRで検討した。

虚血肢にNinj1特異的siRNAを含有した徐放性ゲルを投与し、病態改善への効果を検討した。虚血肢の新生血管・組織再生を免疫染色法により評価した。また、ドップラー計測法により、虚血肢の血流の改善度を測定した。

4. 研究成果

(1) 血管新生におけるNinj1の作用解析

Ninj1は周細胞・内皮細胞ともに発現を認めるが、特に周細胞において発現量が多い。

低酸素培養条件では周細胞においてNinj1発現亢進を認めた(図1)。

また、TNF-alpha添加によってもNinj1の遺伝子発現量の増強を認めた。

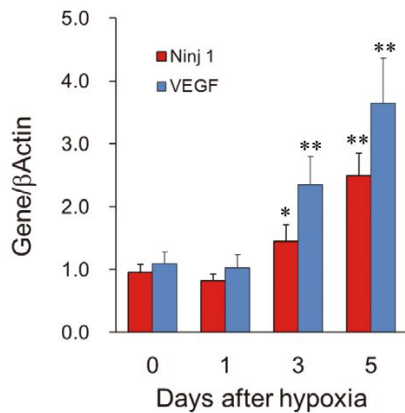


図 1 毛細血管周細胞において、低酸素培養下では Ninj1 の遺伝子発現量が増加する (引用文献 より引用)

(2) Ninj1 の血管新生作用の機序解析

in vitro EC tube assay

毛細血管由来内皮細胞は通常三次元ゲル培養で内皮チューブを形成する。Ninj1 をノックダウンした内皮細胞では、コントロールと比べその形成能に有意な差を認めなかった。

一方、Ninj1 を過剰発現させた内皮細胞では、内皮チューブの長さの減少を認められた (図 2)。

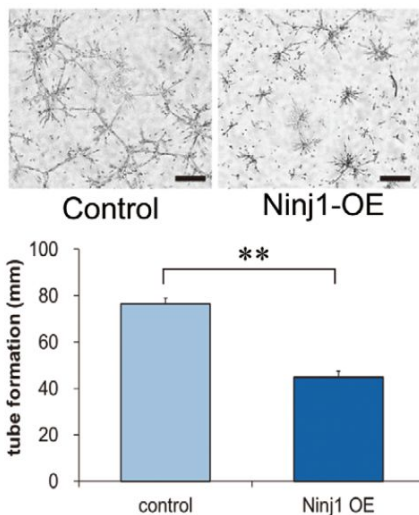


図 2 Ninj1 を過剰発現させた毛細血管内皮細胞では 3 次元培養下での内皮チューブの長さが減少する (引用文献 より引用)

aorta ring assay

毛細血管由来周細胞は、マウス胸部大動脈との共培養により、大動脈からの血管新生を促進する。Ninj1 をノックダウンした周細胞ではコントロールと比べ血管新生促進作用は有意に亢進していた (図 3)。また、Ninj1 を過剰発現させた周細胞

では、コントロールと比べ有意な差を認めなかった。

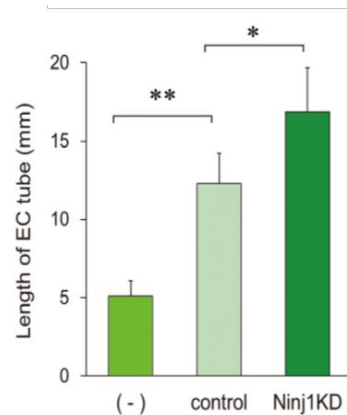


図 3 Ninj1 をノックダウンした周細胞は aorta ring からの血管新生を促進させる (引用文献 より引用)

(3) 下肢虚血組織内における Ninj1 の役割解析

虚血肢における Ninj1 発現

免疫染色による検討では、Ninj1 は微小血管細胞に発現していた。また、大腿動静脈結紮後 7 日目をピークに Ninj1 遺伝子発現量は増加した。

虚血肢における Ninj1 発現抑制の効果

Ninj1 特異的 siRNA 含有徐放性ゲルの投与により、循環のある機能的新生血管の形成、血流の回復が低下した。

以上の結果から、Ninj1 は内皮細胞の増殖を抑制する一方で、周細胞 - 内皮細胞で構成する機能的血管形成を促進し、組織虚血病態改善に寄与することが示唆された。

< 引用文献 >

Kabara M, Kawabe J, et al. A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration. *Lab Invest*. 2014 Dec;94(12):1340-54.

Araki T, et al. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron*. 1996;17(2):353-61.

Ahn BJ, et al. Ninjurin1 is expressed in myeloid cells and mediates endothelium adhesion in the brains of EAE rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Sep 18;387(2):321-5.

Matsuki M, Kabara M, et al. Ninjurin1 is a novel factor to regulate

angiogenesis through the function of pericytes. *Circ J.* 2015;79(6):1363-71.

旭川医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：20596267

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Matsuki M, Kabara M, Saito Y, Shimamura K, Minoshima A, Nishimura M, Aonuma T, Takehara N, Hasebe N, Kawabe J. Ninjurin1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes. *Circ J.* 2015;79(6):1363-71. doi:10.1253/circj.CJ-14-1376.
査読有

(2)研究協力者

川辺 淳一 (KAWABE, Jun-ichi)
旭川医科大学・医学部・特任教授
研究者番号：10400087

〔学会発表〕(計3件)

Akiho Minoshima, Jun-ichi Kawabe, Motoki Matsuki, Maki Kabara, Tatsuya Aonuma, Kohei Shimamura, Naofumi Takehara, Naoyuki Hasebe. Ninjurin1 mediates vessel maturation through endothelial-pericytes interactions and enhances the blood flow recovery in the hind limb ischemia. 第81回日本循環器学会学術集会、2017年3月17日、金沢市教育プラザ此花(石川県・金沢市)

Akiho Minoshima, Jun-ichi Kawabe, Motoki Matsuki, Yukihiro Saito, Maki Kabara, Tatsuya Aonuma, Kohei Shimamura, Naofumi Takehara, Naoyuki Hasebe. Ninjurin1 is a novel factor to mediate vessel maturation through endothelial-pericytes interactions. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2016年9月26日、Seoul(Korea)

蓑島暁帆、川辺淳一、松木孝樹、齊藤幸裕、鹿原真樹、島村浩平、西村正人、青沼達也、竹原有史、長谷部直幸. 血管成熟化に関わる新規因子 Ninjurin1 の同定と、虚血組織における役割、第23回血管生物医学会学術集会、2015年12月10日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鹿原 真樹 (KABARA, Maki)