

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590366  
 研究課題名（和文）低酸素刺激下の脳血管内皮細胞における claudin-5 発現制御機構の解析  
 研究課題名（英文）Expression of claudin-5 in brain vascular endothelial cells under hypoxia  
 研究代表者  
 池田 栄二（IKEDA EIJI）  
 山口大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：30232177

研究成果の概要：神経組織の微小環境は、血管が形成するバリアー機能により至適状態に維持されるが、糖尿病網膜症・虚血性脳疾患などの疾患では、局所の低酸素状態により血管バリアー機能が障害され病態を悪化させる。本研究では、低酸素刺激下の脳血管内皮細胞における tight junction 構成分子 claudin-5 の発現変化が血管バリアー機能障害の主因であり、その発現制御に ubiquitin-proteasome 系が関与していることを示唆する研究成果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：低酸素、claudin-5、血液脳関門、糖尿病、網膜症

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の血管は組織特異的な分化を示し、血液脳関門・血液網膜関門などのバリアー機能を有する。このバリアー機能により中枢神経系の至適な組織微小環境が維持され、神経細胞が正常に機能できる。一方、糖尿病網膜症・虚血性脳疾患などの疾患では、血管のバリアー機能が破綻し病態悪化の大きな要因となる。しかしながら、中枢神経系の血管におけるバリアー機能の誘導あるいは破綻機構については、国内・国外において多くの研究が行われてきたにもかかわらず、いまだその全容解明には至っていない。我々は、糖尿病網膜症・虚血

性脳疾患などの疾患における血管バリアー機能の破綻に組織低酸素状態が大きな誘因として関与していることに注目し、病的状態における血管バリアー機能破綻について、組織低酸素状態 → 血管バリアー機能破綻 → 病態悪化という視点から解析を進め、糖尿病網膜症などの難治性疾患に対する新たな治療戦略のターゲットの特定を試みている。

我々はこれまで、個体発生過程および種々の疾患(糖尿病網膜症、他)にみられる血管の新生・分化機構を、基礎生物学的側面とともに臨床病理学的側面の双方から解析を行ってきた。まず、個体発生過程にお

いて血管新生を惹起する因子として局所組織の低酸素状態に着目、組織低酸素状態による血管新生因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現誘導に焦点をあてた解析を行った。そして、ヒト VEGF 遺伝子上に低酸素反応性エンハンサーを特定して世界に先駆け報告し、さらにエンハンサーへの結合因子が転写因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) と AP1 であることも明らかにした [J Biol Chem 270:19761-19766, 1995, Biochem J 327:419-423, 1997]。網膜血管の新生と血管バリアー機能破綻が病態の本態である糖尿病網膜症について、我々は糖尿病網膜症患者から手術的に切除された血管新生病変(線維血管性組織)の解析を行い、VEGF、特に isoform VEGF<sub>165</sub> の産生亢進が網膜グリア細胞に起こることにより誘導される血管新生活性と、網膜グリア細胞における MT1-MMP 産生亢進の結果として MMP-2 の活性化が起こり誘導される細胞外マトリックス分解活性が、血管新生病変の形成機構に重要であることを示した [Invest Ophthalmol Vis Sci 41:1649-1656, 2000; Invest Ophthalmol Vis Sci 44:2163-2170, 2003]。糖尿病網膜症と同様に、関節リウマチ・肺高血圧症の病的血管病変形成においても、病変部局所での VEGF、特に isoform VEGF<sub>165</sub> の産生亢進が key step となることを、臨床検体の解析を通じて明らかにした [J Pathol 191:426-433, 2000; Pathol Int 50:472-479, 2000]。また、糖尿病網膜症や関節リウマチの血管新生病変部の細胞に HIF-1 の局在を見出し、病変形成における組織低酸素状態の関与を強く示唆する所見と考えた。さらに、それらの研究成果に基づき、糖尿病網膜症の病態を *in vitro* 系にて解析を進めるため、家兎網膜からグリア細胞を単離・培養する系を確立し解析を進めた。その結果、低酸素状態下の網膜グリア細胞において VEGF<sub>165</sub> と MT1-MMP の産生亢進が起こることが証明された [Invest Ophthalmol Vis Sci 46:3817-3824, 2005]。即ち、糖尿病網膜症患者の網膜に存在する組織低酸素状態がこれら責任因子の産生誘導を通じて血管新生病変の形成に関与すること示す知見を得ている。また、この網膜グリア細胞における MT1-MMP の産生誘導が VEGF<sub>165</sub> を介した間接的なものであることも明らかにした [Invest Ophthalmol Vis Sci 46:3817-3824, 2005]。

中枢神経系血管におけるバリアー機能誘導機構の解明に向けた研究として、我々は、ニワトリウズラ胎児間異種移植系を用いた実験系を確立し解析を始め、個体発生過程におけるバリアー機能誘導が局所組織の微小環境に依存することを明らかにした [Neurosci Lett 209:149-152, 1996]。そして、糖尿病網膜症・虚血性脳疾患において血管バリアー機能を破綻させ病態を悪化させる誘因として、患者の網膜・脳組織に存在する低酸素状態という組織微小環境の変化に注目し解析を進

めた。また、tight junction 構成蛋白質 claudin family の一つである claudin-5 のノックアウトマウスにおいて中枢神経系血管のバリアー機能が障害されるとの報告がなされたため、病的状態での血管バリアー機能破綻にも claudin-5 が重要な役割を演ずるとの仮説を立て解析を行った。そして、マウス脳血管由来の内皮細胞株 bEND.3 を用い、低酸素刺激により血管内皮細胞での claudin-5 の発現と細胞膜への局在が低下すること、その claudin-5 の発現・局在変化に依存して bEND.3 細胞層の電気抵抗値の低下(バリアー機能の低下)が起こることを示した。また、低酸素状態にある *in vivo* 中枢神経組織として、低酸素環境下(7-9% 酸素濃度、7日間)に飼育したマウス (C57BL/6J) の網膜組織を用い解析したところ、*in vivo* においても *in vitro* と同様、血管内皮細胞における claudin-5 の発現と細胞膜への局在が低下し、この claudin-5 発現変化が血管の低分子量物質に対する透過性亢進と相関することを明らかにした。低分子量物質に対する選択的な透過性亢進所見は、claudin-5 ノックアウトマウスの中枢神経系血管の形質と同質であり、低酸素状態下での血管バリアー機能破綻における claudin-5 発現変化の重要性を示す興味深い知見と考えた。また、これらの claudin-5 発現変化が転写後の段階 (post-transcriptional) で制御されていることも明らかにした [Am J Pathol 170:1389-1397, 2007]。また、この claudin-5 発現変化における ubiquitin-proteasome 系の関与を示唆する研究成果も得られ、本研究計画の立案に至った。

## 2. 研究の目的

以上に記載した我々の研究成果は、血管新生・血管バリアー機能破綻といった血管病変が本態となる疾患(糖尿病網膜症など)において、血管新生や血管バリアー機能破綻をきたす誘因として組織低酸素状態が重要であること、claudin-5 が中枢神経系血管のバリアー機能破綻において中心的役割を演ずる分子であることを示している。特に、血管バリアー機能破綻については、「組織低酸素状態 → 血管内皮細胞における claudin-5 の発現変化 → 血管バリアー機能破綻 → 病態悪化」というカスケードの重要性を示す知見と考えている。これらの知見に立脚し、本研究計画では、低酸素状態下の血管内皮細胞における claudin-5 の発現動態変化の制御機構に焦点を絞った解析を行い、糖尿病網膜症・虚血性脳疾患などの難治性疾患に対する新たな治療戦略の確立のためのターゲット分子を特定することを目的とした。具体的には、ユビキチン

ープロテアソーム系をはじめとした蛋白質分解系の関与を中心に解析した。

### 3. 研究の方法

(1)細胞培養: マウス脳血管由来の内皮細胞 bEND. 3 細胞 (ATCC より購入) および遺伝子導入後 bEND. 3 細胞 (下記(2)を参照)を、ubiquitin-proteasome 系阻害剤 MG-132 の存在下・非存在下、正常酸素濃度下 (20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) あるいは低酸素濃度下 (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) に培養した。培養液は DMEM/10% FBS を用いた。低酸素濃度下での培養には oxygen-regulated incubator (Astec) を用いた。低酸素刺激実験を行う際には、刺激開始 24 時間前に培養液を無血清の状態にした。

(2)遺伝子導入: Claudin-5 分子の C 末端に GFP タグを付加した蛋白質 [CL5-GFP] の発現コンストラクト [pEGFP-N1-CL5-GFP]、および ubiquitin 分子の N 末端に FLAG タグを付加した蛋白質 [FLAG-Ub] の発現コンストラクト [pcDNA3.1-FLAG-Ub] を作製した。これらのコンストラクトの bEND. 3 細胞への導入には、FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent (Roche Applied Science) を用いた。bEND. 3 細胞に pEGFP-N1-CL5-GFP と pcDNA3.1-FLAG-Ub を導入し 48 時間後に、種々の条件 (MG-132 存在下・非存在下、正常酸素濃度下・低酸素濃度下) にての培養を開始した。pEGFP-N1-CL5-GFP については、bEND. 3 細胞への導入後、CL5-GFP を恒常的に発現するクローン [bEND. 3/ CL5-GFP 細胞] を選択した。

(3)免疫細胞化学的検索: 培養 bEND. 3 細胞を 100% methanol で 5 分間、室温にて固定後、5% 正常ブタ血清にて 30 分間、室温にて処理した。その後、細胞を polyclonal antibody against claudin-5 (1/25 dilution; Zymed) と一晩、4°C にて反応させた。続いて、FITC-conjugated swine polyclonal antibody against rabbit immunoglobulins (DakoCytomation Denmark A/S) と 6 時間、室温にて反応させた後、染色細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 510 META, Carl Zeiss) を用い観察した。

(4)Western blotting: 培養 bEND. 3 細胞蛋白質抽出液を調整した。Lysis buffer としては、10% Triton X-100, 0.2% SDS, 1 mM sodium vanadate, 10 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μg/ml of leupeptin, 1 μg/ml of pepstatin を含む PBS 溶液を用いた。抽出液 (20 μg protein) を 12.5% SDS-PAGE にて電気泳動し、polyvinylidene difluoride membrane

(ATTO) に写した。Block Ace (Dainippon Pharmaceutical) にて非特異的結合を阻害後、polyclonal antibody against claudin-5 (1/250 dilution; Zymed) あるいは polyclonal antibody against β-actin (1/5000 dilution; Abcam) と 1 時間、室温にて反応させた。続いて二次抗体 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1/15000 dilution; Amersham Biosciences Corp.) と 30 分、室温にて反応させた後、Chemiluminescence reagent ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences Corp.) にて発色反応を行った。検出されたバンド濃度の定量化には、NIH Image 1.41 program (available at ftp from zippy.nimh.nih.gov/or from http://rsb.info.nih.gov/nih-image; developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いた。Claudin-5 バンド濃度は β-actin バンド濃度にて標準化した。

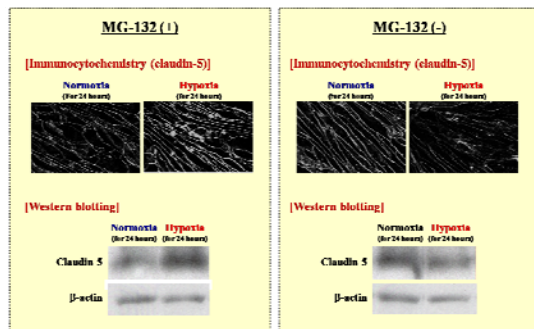
(5)免疫沈降: 細胞蛋白質抽出液を Protein G Sepharose Beads と 45 分間、4°C にて反応させ非特異的結合を阻害した後、polyclonal antibody against GFP (1/200 dilution; Living Colors<sup>®</sup> A.V. Full-Length A.v. Polyclonal Antibody; Clontech) を加え、2 時間、4°C にてインキュベーションした。そして、Protein G Sepharose Beads を加え overnight、4°C にて反応後、遠心し Beads を洗浄、2x sample buffer を加え 5 分間、95°C 反応させた。反応後、12.5% SDS-PAGE にて電気泳動し、monoclonal antibody against FLAG (1/500 dilution; SIGMA) にて blotting を行った。二次抗体としては、horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1/10000 dilution; DakoCytomation) を用いた。(詳細は Western blotting の項を参照)。

### 4. 研究成果

(1)低酸素下の bEND. 3 細胞における claudin-5 発現制御への ubiquitin-proteasome 系の関与

これまでの我々の研究により、confluent 状態に達した bEND. 3 細胞をさらに 7 日間、正常酸素濃度下に培養すると、claudin-5 の発現が細胞膜に局在するとともに、bEND. 3 細胞層にバリア機能が誘導されること、そして低酸素刺激を加えると、転写後の制御機構により細胞膜から claudin-5 が消失し、bEND. 3 細胞層バリア機能が障害されることが示されている [Am J Pathol 170:1389-1397, 2007]。そこで、

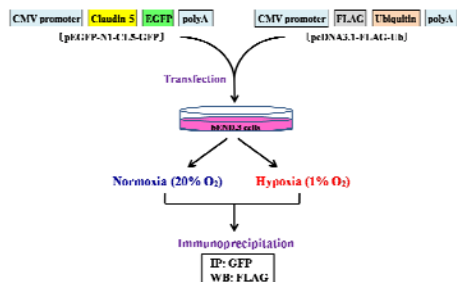
この bEND. 3 細胞における claudin-5 発現変化に ubiquitin-proteasome 系が関与しているかについて、ubiquitin-proteasome 系の阻害剤である MG-132 を用いて検索した。その結果、MG-132 の存在により低酸素刺激による細胞膜からの claudin-5 の消失が抑制されるとともに、細胞の全 claudin-5 蛋白質量の低下も阻害されることが示された(図 1)。即ち、低酸素刺激による claudin-5 発現変化を転写後の段階で制御する機構として、ubiquitin-proteasome 系が関与していることが示唆された。また、わずかではあるが、MG-132 の存在により、正常酸素下の bEND. 3 細胞においても、claudin-5 分子の細胞膜への局在が亢進している傾向がみられ、ubiquitin-proteasome 系が生理的状态における claudin-5 分子の turnover を制御している系である可能性を示す知見と考えている。



(図 1) 低酸素刺激による claudin-5 発現変化に対する MG-132 の作用 [免疫染色および Western blotting]

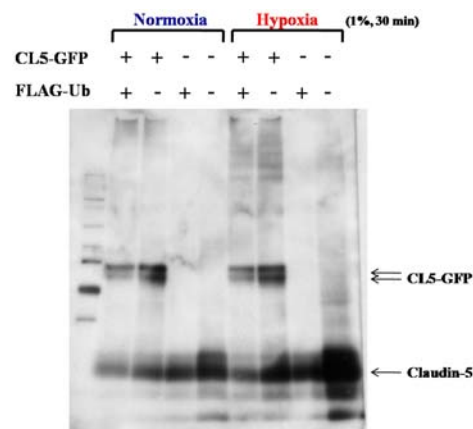
(2) Claudin-5 分子の ubiquitin 化について

続いて、bEND. 3 細胞において、claudin-5 分子が ubiquitin 化を受けるか否か、また、その ubiquitin 化が酸素濃度に依存するか否かについて検索した。C 末端に GFP タグを付加した claudin-5、および N 末端に FLAG タグを付加した ubiquitin を発現するコンストラクト (pEGFP-N1-CL5-GFP、pcDNA3.1-FLAG-Ub) を、bEND. 3 細胞に導入し、正常酸素濃度下および低酸素濃度下に培養した(図 2)。

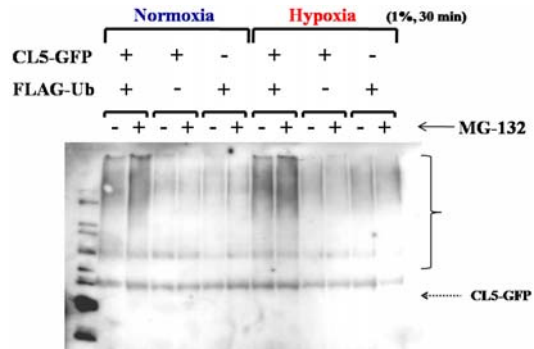


(図 2) Claudin-5 分子の ubiquitin 化についての解析

正常酸素濃度下および低酸素濃度下の bEND. 3 細胞から調整した蛋白質抽出液について、Western blotting(図 3)にて claudin-5 分子を検出するとともに、免疫沈降(抗 GFP 抗体にて免疫沈降、抗 FLAG 抗体にて blotting)(図 4)にて claudin-5 分子の ubiquitin 化について検索した。その結果、高 claudin-5 抗体と反応する高分子量のバンドが検出され(図 3)、免疫沈降にて高 FLAG 抗体と反応する高分子量 CL5-GFP 分子が検出された(図 4)。Claudin-5 分子が ubiquitin 化修飾を受けることが示唆されるが、現時点では、claudin-5 分子自体の ubiquitin 化、claudin-5 分子と複合体を形成する分子の ubiquitin 化のいずれの可能性も考えられ、今後の更なる解析が必要である。



(図 3) Claudin-5 (内因性 claudin-5 および外来性 CL5-GFP) (Western blotting)

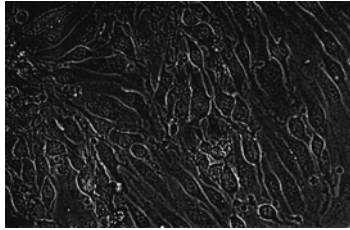


(図 4) CL5-GFP 分子の修飾 [免疫沈降 (IP:GFP, WB:FLAG)]

(3) CL5-GFP 発現 bEND. 3 細胞の樹立

中枢神経系血管のバリア機能は、内皮細胞間に tight junction が複雑な strand 網を形成することに依存する。そこで我々は、claudin-5 分子が細胞膜へ局在した後、複雑な tight junction strand 形成へと至る機構の解明を視野に入れ、tight junction 構築を strand レベルで、リアルタイムにモニターできる系を確立すべく研究を進めている。

pEGFP-N1-CL5-GFP を bEND.3 細胞へ導入し、CL5-GFP を恒常的に発現する細胞クローン [bEND.3/CL5-GFP 細胞] を選択した。Confluent 状態において、CL5-GFP 蛋白質の細胞膜への局在が確認され(図 5)、現在、このクローンを用いて、tight junction strand の動的制御機構の解析を進めている。



(図 5) bEND.3/CL5-GFP 細胞クローンにおける CL5-GFP 癒合蛋白質の局在

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Minagawa T, Matsuda S, Koto T, Okada Y, Ikeda E: Hypoxia disrupts the blood-brain barrier through modification of claudin-5 molecules in neural vascular endothelial cells. 15th International Vascular Biology Meeting (Sydney, Australia, June 2, 2008)
- ② 池田栄二、皆川卓也、厚東隆志、岡田保典：低酸素刺激下の脳血管内皮細胞における claudin-5 蛋白質の動態. 第 97 回日本病理学会総会、平成 20 年 5 月 16 日、金沢

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 栄二 (IKEDA EIJI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30232177

### (2) 研究分担者

岡田 保典 (OKADA YASUNORI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00115221