

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590447

研究課題名(和文) 血液脳関門形成血管内皮細胞におけるタイト結合構成分子クローディン5の発現制御解析

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanism for claudin-5 expression in vascular endothelial cells

研究代表者

崔丹(CUI, Dan)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40346549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：種々の難治性神経系疾患では、組織低酸素状態を誘因とする血液脳関門、血液網膜関門の破綻が起こり、病態悪化の要因となる。しかし、これら血管バリアー破綻機構の詳細は解明されていない。本研究では、低酸素状態における神経系血管バリアー破綻機構について *in vitro* および *in vivo* 実験系を用いて解析を行った。結果として、低酸素状態における血管バリアー破綻の責任因子として、血管内皮細胞に発現するM1およびM2を特定した。(特許取得申請中のため、M1、M2と称する)

研究成果の概要(英文)：Tissue hypoxia is known to accelerate the progression of intractable neural diseases through the breakdown of neural vascular barrier including the blood-brain barrier and the inner blood-retinal barrier. However, the mechanisms underlying the hypoxia-induced breakdown of vascular barrier remain unclarified. Here, using the *in vitro* and *in vivo* models of neural vascular barrier, we have specified two molecules, M1 and M2, as the indispensable molecules for hypoxia-induced breakdown of neural vascular barrier, and therefore the candidate molecules for new therapeutic targets of intractable neural diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 実験病理学

キーワード：血液脳関門 血液網膜関門 タイト結合 低酸素 クローディン5

1. 研究開始当初の背景

脳、網膜などの神経組織は、組織特異的に分化した血管系の有するバリアー機能により他組織から区画化され、神経細胞が正常に機能するための至適組織微小環境が維持されている。糖尿病網膜症、虚血性脳疾患をはじめとした種々の難治性神経疾患では、血管バリアー機能が破綻し病態悪化の大きな要因となることが知られている。しかしながら、神経系血管バリアー機能の破綻機構については全容解明には至っていない。

神経系血管バリアーの本体は血管内皮細胞間に形成される複雑なタイトジャンクション網である。タイトジャンクションを構成する分子として occludin, claudins, junction adhesion molecules (JAM)などの膜貫通蛋白が知られている。それらのなかでも、27種類の分子からなる遺伝子ファミリーを形成する claudins はタイトジャンクション形成に必須な分子である。脳血管内皮細胞では claudin-1、claudin-3、claudin-5、claudin-12 の発現が報告されているが、ノックアウトマウスを用いた解析により、神経系血管バリアー機能に claudin-5 が重要な役割を果たすことが報告された。

我々は、糖尿病網膜症や虚血性脳疾患などの難治性神経疾患における神経系血管バリアー破綻の誘因として、病変部組織に存在する低酸素状態に着目し、組織低酸素刺激が血管バリアーを破綻させる機構について解析を進めてきた。これまで、我々はマウス脳血管内皮細胞 bEND.3 を用い、低酸素刺激により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すること、この claudin-5 の発現変化、特に細胞膜からの消失に依存して、bEND.3 細胞層のバリアー機能障害が起きることを示した。これらの claudin-5 の発現変化が、遺伝子転写後の段階で制御されていることも明らかにした。一方、低酸素環境下に飼育したマウスを用いた in vivo 実験系でも詳細な解析を行った。マウスを低酸素環境下(7~9%酸素濃度)で7日間飼育することにより、低酸素代謝状態にある網膜組織を解析したところ、in vivo においても in vitro と同様に、血管内皮細胞における claudin-5 発現変化、特に細胞膜からの消失に相関して網膜血管の低分子量分子に対する透過性が亢進することを明らかにし報告した(Am J Pathol 170: 1389-1397, 2007)。

以上の知見に基づき、神経系難治疾患における血管バリアー破綻機構の解明に向け、本研究計画では、低酸素刺激下の血管内皮細胞における claudin-5 発現変化に焦点を絞った解析を行った。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究成果から、「組織低酸素状態 血管内皮細胞の細胞膜からの claudin-5 消失 血管バリアー機能破綻 難治性神経疾患の病態悪化」というカス

ケードが示された。そこで本研究では、低酸素状態下の血管内皮細胞における claudin-5 の発現変化の制御機構に焦点を絞って解析を行い、糖尿病網膜症・虚血性脳疾患などの難治性神経疾患の病態解明とともに新規治療法開発のための標的分子を特定することを目的とした。具体的には、特異的タンパク質分解系である ubiquitin-proteasome 系および種々の生理的・病的状態への関与が報告されている metalloproteinase 活性分子を中心に解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養: マウス脳血管内皮細胞 bEND.3 細胞 (ATCC より購入) を正常酸素濃度下 (20% O₂, 5% CO₂) あるいは低酸素濃度下 (1% O₂, 5% CO₂, 30min) 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。

(2) 細胞層の電気抵抗(TEER)値測定: bEND.3 細胞を 0.4mm の孔を有する cell insert 上にて confluent 状態で培養し、細胞層の TEER 値を Millicell ERS Voltohmmeter (Millipore)を用いて測定した。

(3) 細胞膜に発現する claudin-5 の解析: bEND.3 細胞を PBS で洗浄後、100% methanol で 5 分間、室温にて固定した。その後、10% 正常ヤギ血清で室温 30 分処理を行い、Rabbit Anti-Claudin-5 Polyclonal Antibody (1:25 dilution; Zymed)と一晚、4 にて反応させた。その後、Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (Life Technologies)を二次抗体として、1 時間、室温にて反応させた。染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM Pascal)を用い観察した。細胞膜に発現した claudin-5 を定量するため、蛍光免疫染色した細胞を焦点レーザー顕微鏡で撮影し、細胞膜に発現する claudin-5 の蛍光強度を測定し定量化した。

(4) RNA 抽出および Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR): Confluent 状態後 7 日目の bEND.3 細胞から RNase Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、total RNA を抽出した。0.1µg total RNA から StrataScript First Strand Synthesis System (STRAT AGENE, Cedar Creek, TX, USA)を使用し、cDNA を合成した。(特許出願中のため、プライマーの配列を公表しない)。PCR 産物を Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany)を用いて可視化した。

(5) Small interfering RNA (siRNA)の導入: Confluent 状態後 5 日目の bEND.3 細胞に、Lipofectamine RNAiMAX を用い siRNA (20nM; Invitrogen; 特許出願中のため、配列を公表しない)を導入した。陽性対照として

GAPDH siRNA、陰性対照として non-silence siRNA を bEND.3 細胞に導入した。siRNA 導入 48 時間後に、total RNA を抽出し、StepOne リアルタイム PCR システムにて、標的分子の発現抑制の評価を行った。

(6) 動物実験：7～10 週齢の C57BL/6J マウスを、正常酸素環境下（大気下）あるいは低酸素環境下（4～7%）に 36 時間～48 時間飼育した。低酸素環境下での飼育には酸素濃度調節可能な飼育装置を使用した。飼育後、速やかに眼球を摘出、網膜伸展標本を作製し、網膜血管における claudin-5 発現、網膜血管の透過性について解析した。低酸素環境下に飼育したマウス網膜の低酸素状態の確認は、腹腔内に pimonidazole hydrochloride (60 mg/kg; ChemiconInternational)の腹腔内投与により行った。

(7) マウス硝子体内への siRNA 投与：マウスを 10%のソムノペンチルで麻酔し、片眼の硝子体内に標的分子に対する siRNA を投与し、反対側の硝子体内に non-silence siRNA を投与した。マウスが麻酔から覚醒した後、正常酸素環境下または低酸素環境下で飼育した。

(8) マウス網膜の血管透過性評価：siRNA をマウス硝子体内に投与した後、マウスを正常酸素環境下あるいは低酸素環境下に 2 日飼育した。2 日後、マウスの左心室内に FITC-dextran (10 kDa)および Hoechst stain H33252 (534Da)をトレーサーとして投与し、網膜伸展標本を作製し、焦点レーザー顕微鏡下に観察した。

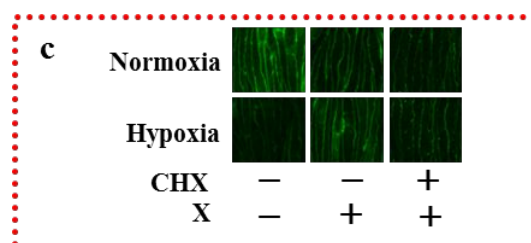
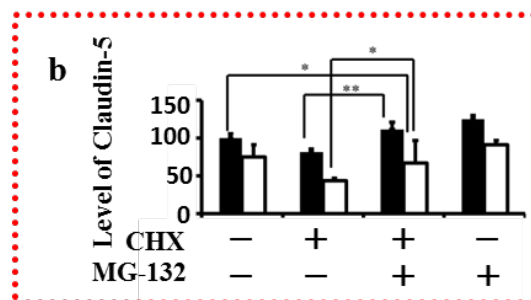
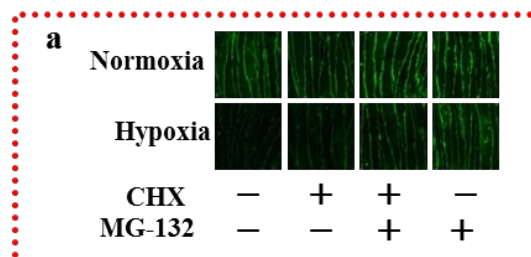
4. 研究成果

(1) 正常酸素環境下および低酸素環境下の神経系血管内皮細胞膜における claudin-5 発現調節機構について

これまでの我々の研究により、正常酸素環境下において bEND 細胞を confluent 状態で 7 日間培養すると、claudin-5 が細胞膜に局在し、bEND.3 細胞層にバリアー機能が誘導される。その後、低酸素刺激を加えると、遺伝子転写後の制御機構により、細胞膜に発現した claudin-5 が減少し、細胞層のバリアー機能が障害されることが示されている。そこで、本研究では、この低酸素刺激下における細胞膜からの claudin-5 消失機構について詳細な解析を行った。bEND.3 細胞に低酸素刺激（1%、30 分間）を加えると細胞膜の claudin-5 が速やかに減少し、細胞層のバリアーが障害された。細胞膜からの claudin-5 消失が、細胞の全 claudin-5 タンパク質の減少を伴っていることから、タンパク質分解系の関与が示唆された。タンパク質分解系として、ubiquitin-proteasome 系と metalloproteinase 活性分子の関与について検討した。

タンパク質翻訳阻害剤 cycloheximide (CHX)の存在下では、正常酸素環境下におい

ても細胞膜の claudin-5 が減少したが、ubiquitin-proteasome 系阻害剤 MG-132 を添加することにより、その減少は完全に抑制された（図 1a, b）。また、CHX 非存在下では、正常酸素環境下の細胞膜における claudin-5 分子量が増加する傾向がみられた（図 1a, b）。一方、低酸素環境下では、CHX 存在下の細胞膜からの claudin-5 消失は、正常酸素環境下に比して亢進していること、その低酸素環境下での亢進は、MG-132 添加によっても阻害されないことが示された（図 1a, b）。以上の結果から、ubiquitin-proteasome は正常酸素環境下における claudin-5 の turnover に関与し、低酸素環境下では、ubiquitin-proteasome 以外のタンパク質分解系が誘導される可能性が考えられた。そこで、低酸素環境下における細胞膜からの claudin-5 消失への metalloproteinase 活性の関与について検討した。正常酸素環境下においては、CHX 存在下の細胞膜からの claudin-5 消失には、metalloproteinase 系阻害剤 X（特許出願中のため、実在の分子名を仮に X と称する）の添加は有意な影響を及ぼさなかった（図 1c, d）。一方、X 添加により、低酸素刺激による細胞膜からの claudin-5 消失は、CHX 存在下・CHX 非存在下ともに、正常酸素環境下のレベルまで回復した（図 1c, d）。以上の結果から、metalloproteinase 系は低酸素環境下での細胞膜からの claudin-5 消失に関与することが示唆された。



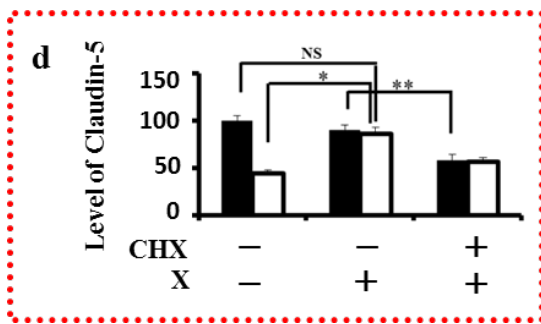


図 1. 低酸素刺激による claudin-5 発現変化に対する MG-132 (a, b) および X (c, d) の作用。[免疫染色および細胞膜の claudin-5 分子の定量。NS: not significant, * P<0.01, ** P<0.05, t-test]

(2) 低酸素環境下の細胞膜からの claudin-5 消失における M1 および M2 の関与について

bEND.3 細胞に発現する metalloproteinase 活性を有する分子の発現状況を検索し、低酸素環境下における細胞膜からの claudin-5 消失の責任因子候補を絞り込んだ。候補分子の発現を特異的に阻害する siRNA を bEND.3 細胞に導入した。図 2a に示すように、M1 または M2 特異的 siRNA を導入した細胞では低酸素環境下での細胞膜からの claudin-5 消失が抑制された。さらに、M1 または M2 特異的 siRNA を導入した細胞層では、低酸素環境下でのバリアー機能障害も抑制された(図 2b)。

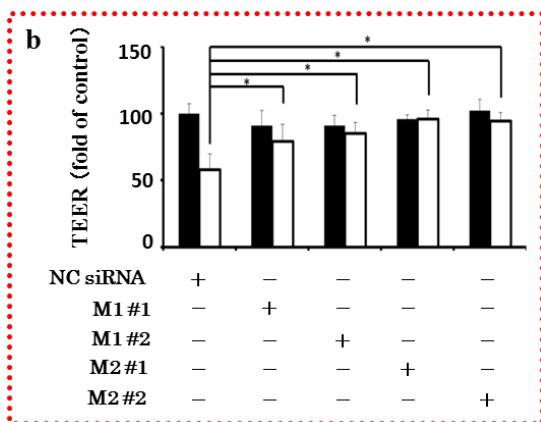
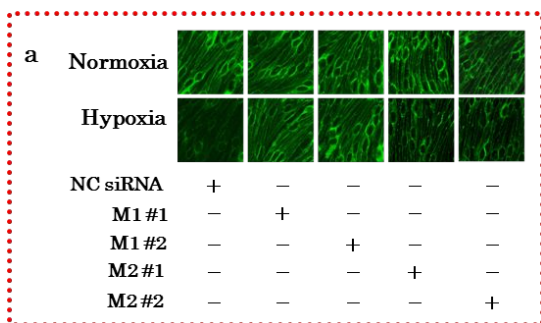


図 2. 低酸素刺激による claudin-5 発現変化に対する M1 または M2 の siRNA の効

果。[a. 免疫染色 (NC siRNA: Non-silencing siRNA); b. bEND.3 単細胞層の電気抵抗。* P<0.05, t-test.]

(3) 低酸素環境下に飼育したマウスの硝子体内への M1 または M2 特異的 siRNA 投与による網膜血管透過性亢進阻害について

In vitro 実験系にて得られた(1)(2)の知見について、in vivo 実験系を用いた解析を行った。正常酸素状態または低酸素状態の網膜組織を用いた。マウスの硝子体内に M1 または M2 特異的 siRNA、および陰性対照として non-silence siRNA を投与した後、正常酸素環境下または低酸素環境下に 2 日間飼育した。まず、網膜組織が低酸素状態であるか否かについて、低酸素代謝マーカー pimonidazole hydrochloride で評価したところ、低酸素環境下にて飼育したマウスの網膜組織に pimonidazole の有意な取り込みが確認され(図 3a)、網膜組織が低酸素代謝状態であることが示された。続いて、これらのマウスの網膜血管における claudin-5 分子の発現・局在および網膜血管透過性を解析した。Non-silence siRNA 投与マウス眼では、蛍光免疫染色において、正常酸素環境下にある網膜血管の内皮細胞の細胞膜には claudin-5 の連続性・直線状シグナルが得られたのに対し、低酸素環境下にある網膜血管内皮細胞の細胞膜では、claudin-5 シグナルは減弱し不連続性であった(図 3b)。しかし、M1 または M2 特異的 siRNA 投与マウス眼では、低酸素環境下にある網膜血管内皮細胞の細胞膜においても claudin-5 シグナルは連続性・直線状であり、正常酸素環境下の網膜血管との差は認められなかった(図 3b)。さらに、それらの網膜組織における血管透過性について、dextran (10kDa) および Hoechst attain H33258 (534Da) をトレーサーとして解析を行った。その結果、Non-silence siRNA 投与マウス眼では、正常酸素環境下にある網膜組織と比較し、低酸素環境下にある網膜組織では Hoechst attain H33258 に対する血管透過性が有意に亢進することが示された(図 3c)。この低酸素環境下における網膜血管の透過性亢進は、M1 または M2 特異的 siRNA の硝子体内投与により、有意に抑制された(図 3c)。一方、正常酸素環境下および低酸素環境下ともに、FITC-dextran の血管外への漏れは観察されなかった(図 3c)。

本研究計画において、組織低酸素状態を誘因とした神経系血管バリアー破綻に必須な分子として M1 および M2 を特定した。さらに、siRNA を用いた解析により、M1 または M2 の特異的発現抑制により、低酸素状態を誘因とする神経系血管バリアー破綻が阻害されることが示された。本研究成果は、難治性神経疾患に対する新たな治療法開発の標的分子としての M1 および M2 の有用性を示唆する意義ある成果と考えられ、トランスレ

ーショナルリサーチとしての展開が期待される。

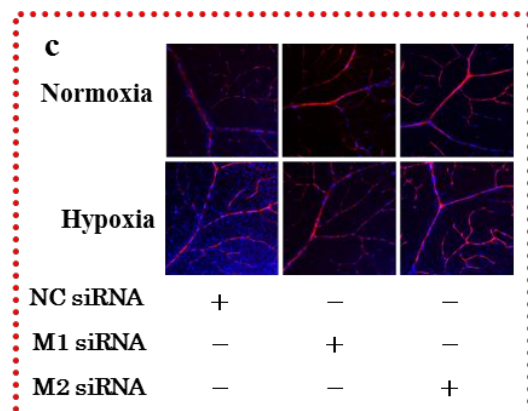
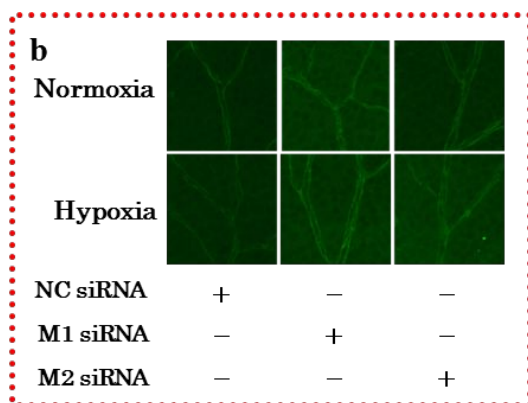
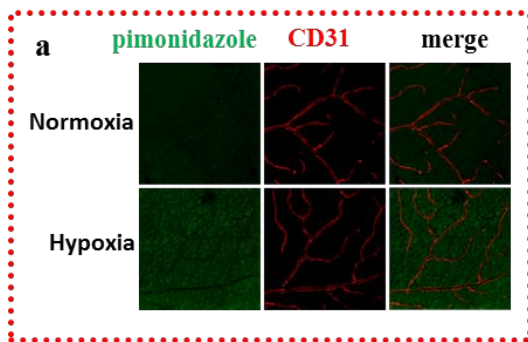


図 3. 低酸素状態にあるマウス網膜における M1 または M2 の siRNA の効果。[a. は pimonidazole (green)および CD31 (red)に対する免疫染色; b.は claudin-5 に対する免疫染色; c.は Hoechst attain H33258 (blue)および dextran (red)に対する透過性の実験。NC siRNA: Non-silencing siRNA]

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 3 件)

池田栄二
疾患生物学ワークショップ 1AW11 低

酸素バイオロジーの最前線; 代謝調節による細胞機能制御 神経系血管バリアー機能の酸素濃度依存性調節機構
第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日~6 日、神戸、神戸ポートアイランド、

池田栄二、崔丹

血液脳関門の酸素濃度依存性調節機構、
第 102 回日本病理学会総会、2013 年 06 月 06 日~08 日、北海道、ロイトン札幌

岩本沙也加、崔丹、高橋睦夫、河野裕夫、池田栄二

Deferoxamine 刺激下の脳血管内皮細胞における claudin-5 発現解析、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 04 月 26 日~28 日、東京、京王プラザホテル

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 神経疾患治療剤

発明者: 池田栄二、崔丹

権利者: 山口大学

種類: 特許

番号: 2013-093071

出願年月日: 2013 年 4 月 25 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

崔丹 (CUI, Dan)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 40346549

(2)研究分担者

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