

## 総 説

## 低酸素刺激による血管系の改築と疾患

池田栄二

山口大学医学部情報解析医学系・病理学第一講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 低酸素, 血管新生, 血液網膜関門, 糖尿病網膜症

## 和文抄録

我々ヒトの生命活動は、主として酸素をエネルギー源とした細胞の代謝により維持されている。そして、細胞・組織・生体は、周囲酸素濃度の低下に対し様々な反応を示す。それらの反応は、低酸素環境においても細胞・組織・生体が機能するための代償性反応機構とみなされるが、ヒトの疾患においては病態を悪化させる要因として働く場合が多い。酸素を末梢組織へ運ぶ通路である血管は、酸素濃度変化に対し敏感に反応し、様々な改築を示し種々の疾患の病態に深く関与することが知られている。我々は、網膜血管の改築が本態である糖尿病網膜症の病態について、基礎生物学的ならびに臨床病理学的側面から解析を行ってきた。糖尿病網膜症では、病変部局所の低酸素状態を誘因とした血管新生および網膜血管バリアー機能破綻が生じる。我々は、組織低酸素状態により誘発される血管新生が、vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNAの安定化およびhypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathwayの活性化を介したVEGF遺伝子の転写亢進に担われることを明らかにした。そして、臨床病理検体の解析を通じ、糖尿病網膜症の網膜血管新生病変形成には、低酸素状態にある病変部局所のグリア細胞に産生が誘導されるVEGF、特にアイソフォームVEGF<sub>165</sub>と、細胞外マトリックス分解酵素matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)の活性化因子であるmembrane-type1 matrix metalloproteinase (MT1-

MMP)が主役を演ずることが示唆された。一方、網膜血管バリアー機能の破綻については、血管内皮細胞間tight junctionの構成分子であるclaudin-5に焦点を当てた解析を行い、これまでに低酸素刺激によるclaudin-5発現変化が主因であることを示す知見を得ている。本稿では、これまでの我々の研究成果について、文献的考察をまじえて概説する。

## はじめに

ヒトは、肺から取り込まれた酸素をエネルギー源として利用し生命活動を維持している。十分な酸素供給が得られず低酸素状態に陥った組織は正常な機能を営むことが困難となり、高度の低酸素状態は組織の壊死さらには生体の死へとつながる。低酸素刺激が加わった急性期には、生体は呼吸容量を増してより多くの酸素を生体内に取り入れるとともに、細胞の代謝を好気性から嫌気性に変化させる(図1)。そして、低酸素状態が持続すると、末梢組織への酸素運搬効率を上げるため、赤血球の産生亢進、局所組織への血管新生が惹起される(図1)。これらは、細胞・組織・生体が低酸素環境下においても生存するために獲得した代償性反応機構ととらえられるが、種々の疾患においては病態を悪化させる要因として働くという一面も有している。

我々は、低酸素刺激に対する細胞・組織反応を、特に血管系の改築を中心に、疾患の病態との関連において解析を進めてきた。本稿では、これまで我々が行ってきた研究につき、文献的考察をまじえて概説する。

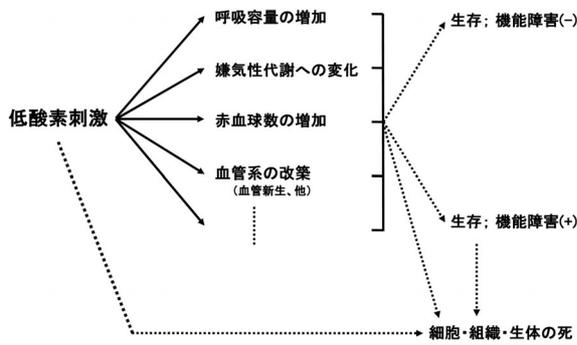


図 1

低酸素刺激に対する細胞・組織・生体の反応。酸素濃度の低下した環境において生存するため、細胞・組織・生体は様々な反応を示す。低酸素刺激に反応した血管系の改築は、種々の疾患においては病態悪化に働くという一面を有している。

1. 低酸素誘発性血管新生のメカニズム解析

成人の血管系は比較的静的な状態にあるが、固形腫瘍などの病的状態においては、病変部局所における組織低酸素状態に反応した血管新生が惹起される。これまで、血管新生を促進あるいは抑制する活性を示す多くの制御因子が特定・単離されたが、局所組織における血管の増生状態は、それら血管新生促進因子と血管新生抑制因子の活性のバランスに依存する。いわゆる血管新生病と称される固形腫瘍、関節リウマチ、糖尿病網膜症などの病態について、臨床検体を用いた多くの解析結果が報告され、病変部の血管新生は、主として、血管新生因子vascular endothelial growth factor (VEGF) の活性に依存することが明らかにされた。さらに、それらの疾患におけるVEGF産生亢進には、病変部局所組織の低酸素状態が重要な誘因として働いていることが示された<sup>1)</sup>。そこで、我々は、低酸素誘発性血管新生のメカニズムを明らかにすべく、低酸素刺激によるVEGF産生亢進過程に焦点を絞った解析を開始した。

ラット・グリオーマ細胞株を低酸素濃度下(1%酸素)に培養すると、VEGFタンパク質の産生亢進が認められ、この低酸素刺激によるVEGF産生亢進が、VEGF遺伝子の転写亢進とVEGF mRNAの安定化の両方に担われていることを見出した(図2 A)。さらに、VEGF遺伝子の5'領域の解析を通じ、低酸素刺激に反応してVEGF遺伝子の転写を亢進させるエンハンサー配列を特定した<sup>2)</sup>。そのエンハン

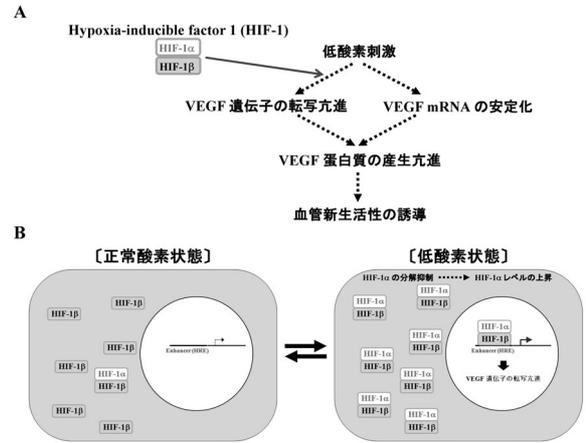


図 2 低酸素誘発性血管新生のメカニズム

- (A) 低酸素刺激下にある細胞では、VEGF遺伝子の転写亢進とVEGF mRNAの安定化を介してVEGF蛋白質の産生が亢進することにより血管新生活性が誘導される。低酸素刺激によるVEGF遺伝子の転写亢進は、転写因子hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) の制御下にある。HIF-1は、HIF-1αとHIF-1βのヘテロダイマーからなる。
- (B) 正常酸素濃度下にある細胞ではHIF-1αは速やかに分解されるため、HIF-1α蛋白質レベルは低い。一方、低酸素濃度下の細胞ではHIF-1αの分解抑制によりHIF-1α蛋白質が上昇し、HIF-1βとダイマーを形成し、VEGF遺伝子のエンハンサー領域へ結合する。その結果、VEGF遺伝子の転写亢進が起こり、血管新生活性が誘導される。

サー領域に結合する因子がhypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) とAP1であること、低酸素刺激によるVEGF遺伝子の転写亢進には、エンハンサー領域へのHIF-1の結合が必須であることを明らかにした(図2 A, B)<sup>3)</sup>。

低酸素環境下に生活する生体では赤血球の産生が亢進していることが知られている。HIF-1は、低酸素刺激に反応しerythropoietin (EPO) 遺伝子の転写を亢進させる活性を持った転写因子として特定された<sup>4)</sup>。HIF-1は、HIF-1αとHIF-1βからなるヘテロダイマーを形成する。HIF-1βタンパク質レベルは酸素濃度に依存せず一定であるが、HIF-1αタンパク質レベルは酸素濃度依存性に変化する。低酸素状態下では、HIF-1αタンパク質の分解が抑制されることによりHIF-1αタンパク質レベルが上昇し、HIF-1αとHIF-1βからなるダイマーが形成されるとともに、HIF-1αタンパク質と転写補助因子との結合も促進され、転写因子HIF-1としての活性が誘導される(図2 B)。HIF-1は、EPO、VEGF産生の他にも多くの分子の産生を制御していることが報告

され、低酸素刺激に対する細胞反応の中核に位置する重要なpathwayを形成していることが明らかにされた<sup>1)</sup>。

## 2. 糖尿病網膜症における血管系改築

我々は、基礎生物学的解析と並行し、種々の疾患の病態解析について、臨床病理組織検体を用いた解析を進めた。本稿では、糖尿病網膜症についての病態解析成果を紹介する。

糖尿病網膜症は、先進国における成人の中途失明原因の上位に位置する疾患であり、網膜血管の改築が病態の中核となっている。初期には網膜血管バリアー機能（血液網膜関門機能）の破綻、そして病期が進むと網膜血管新生を併発する。特に後者は、網膜から硝子体に及ぶ血管新生病変である線維血管性組織を形成することにより、牽引性網膜剥離の原因となり視力予後を規定する。

まず、糖尿病網膜症患者から手術的に切除された線維血管性組織について、HIF-1 $\alpha$ タンパク質の発現を解析したところ、病変部においてHIF-1 $\alpha$ タンパク質の発現亢進所見が認められた。組織低酸素状態が網膜血管病変形成の誘因として重要な役割を担っていることを示す知見と考え、組織低酸素状態という側面から糖尿病網膜症の病態解析を進めてきた。以下に、線維血管性組織形成および網膜血管バリアー機能破綻のメカニズムについて、これまでの我々の研究成果を紹介する。

### 1) 網膜血管新生病変（線維血管性組織）形成のメカニズム

線維血管性組織は、網膜から硝子体に及ぶ血管新生により形成される。従って、病変形成には、局所における血管新生活性とともに、網膜前基底膜組織に対する蛋白分解活性の誘導が必須であり、我々は、両者の活性誘導機構について解析を進めた。血管新生活性の誘導については、HIF-1 pathwayにより発現が制御される血管新生因子VEGFの関与に焦点をあて解析を進めた。VEGF遺伝子は8個のexonからなり、alternative splicingにより生化学的・生物学的特性の異なる複数のisoformが生成されることが報告されている。我々は、手術的に採取された線維血管性組織検体の解析を行い、血管新生病変として

の線維血管性組織の活動性が、グリア細胞におけるisoform VEGF<sub>165</sub>の産生と相関することを見出した<sup>2)</sup>。網膜前基底膜組織に対する蛋白分解活性については、種々の生理学的・病理学的組織改築において中心的役割を演ずる蛋白分解酵素familyであるmatrix metalloproteinase (MMP) familyに注目し解析を進めた。硝子体内における蛋白質レベルを測定したところ、線維血管性組織の形成を伴った糖尿病網膜症症例においてMMP-2とMMP-9の蛋白質レベルが有意に上昇していることが判明した。MMPの活性は、蛋白質のレベルとともに活性化の有無に依存するため、硝子体内および線維血管性組織におけるMMP-2とMMP-9の活性化状態につき検索を加えた。その結果、硝子体および線維血管性組織ともにMMP-2の活性化率が高く、特に線維血管性組織におけるMMP-2の活性化が顕著であることが示された。すなわち、MMP-2が線維血管性組織形成に働く蛋白分解活性の責任因子であることが強く示唆された。MMP-2は潜在型として産生され、膜型MMPの一つであるmembrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)により活性型MMP-2へと変換される。このMMP-2活性化過程では「潜在型MMP-2/MT1-MMP/TIMP-2」からなる複合体形成が必須であるが、これらの因子が線維血管性組織に存在するグリア細胞に共存しており、糖尿病網膜症の病変形成部位では、グリア細胞におけるMMP-2活性化機構が亢進していることを示す知見と考えられた。病変形成部位局所において活性化されたMMP-2が、網膜前基底膜の分解を介して線維血管性組織形成に働いていることが示唆された<sup>3)</sup>。

続いて、線維血管性組織形成における「組織低酸素状態 → HIF-1 pathway活性化」というカスケードの重要性を検証すべく、網膜グリア細胞の単離・培養系を確立し解析を進めた。培養グリア細胞に低酸素刺激を加えると、VEGF<sub>165</sub>の発現とともにMT1-MMPの発現が亢進することが示された。MMP-2には有意な発現誘導は認められなかった。即ち、線維血管性組織形成の責任因子として我々が特定した血管新生因子VEGF<sub>165</sub>の産生と、蛋白分解酵素MMP-2の活性化因子MT1-MMPの産生が、低酸素状態にある網膜グリア細胞において誘導されることが明らかになった。さらに、低酸素刺激によるMT1-MMP産生誘導が、VEGFを介した間接的な機

構によることも見出した。即ち、「組織低酸素状態 → HIF-1 pathway活性化 → VEGF<sub>165</sub> 産生亢進 → MT1-MMP産生亢進 (→ MMP-2活性化 → 線維血管性組織形成 → 視力障害)」という機構が、糖尿病網膜症の病態悪化の一端を担うという興味深い知見が得られた (図3)<sup>7)</sup>。

2) 網膜血管バリアー機能破綻のメカニズム

網膜には血液網膜関門が存在し、網膜組織の微小環境を至適状態に維持している。血液網膜関門は、色素上皮細胞の形成するバリアーと網膜血管内皮細胞の形成するバリアーとからなり、後者は血液脳関門の本態である血管バリアーと同質と考えられている。糖尿病網膜症では、病初期より網膜血管バリアー機能の破綻が起こり視力障害の原因となることが知られているが、その誘因としては、種々のサイトカイン・糖化蛋白質 (advanced glycation endproduct, AGE) などとともに、組織低酸素状態が挙げられている。これまで我々は、低酸素状態にある脳や網膜などの神経系組織において、血管バリアー機能が障害される機構につき解析を進めた。

血管バリアー機能は、主として内皮細胞間に形成されるtight junction網に担われている。Tight junction構成分子としてoccludin, claudin, junctional adhesion moleculeなどが特定・単離されているが、なかでも24種類の分子からなるclaudin

familyがtight junctionの構築と機能に重要な役割を果たしている。神経系組織の毛細血管内皮細胞では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の解析からは、血管バリアー機能におけるclaudin-5の関与が注目されている<sup>8)</sup>。そこで我々は、*in vitro*および*in vivo*低酸素実験系を確立し、低酸素刺激による血管バリアー機能の破綻機構について、claudin-5の発現動態に焦点を絞った解析を行った。*In vitro*低酸素実験系としては、マウス脳血管由来の内皮細胞株bEND.3を用いた。Confluent状態のbEND.3細胞を正常酸素濃度下に培養すると、細胞膜に局限したclaudin-5の発現が認められた。一方、低酸素濃度下では、bEND.3細胞におけるclaudin-5発現レベルが低下するとともに、細胞膜へのclaudin-5分子の局在が抑制されることを見出した。さらに、バリアー機能の指標としてbEND.3細胞層の電気抵抗値 (transendothelial electrical resistance ; TEER) を測定したところ、claudin-5の発現・局在変化に依存してTEERが低下することが示された。正常酸素濃度下あるいは低酸素濃度下 (7-9%酸素濃度, 7日間) に飼育したマウスの網膜組織を用いた*in vivo*低酸素実験系においても、正常酸素代謝状態にあるマウスの網膜組織では血管内皮細胞の細胞膜に局在したclaudin-5の発現がみられるのに対し、低酸素代謝状態に陥った網膜組織では、血管内皮細胞に

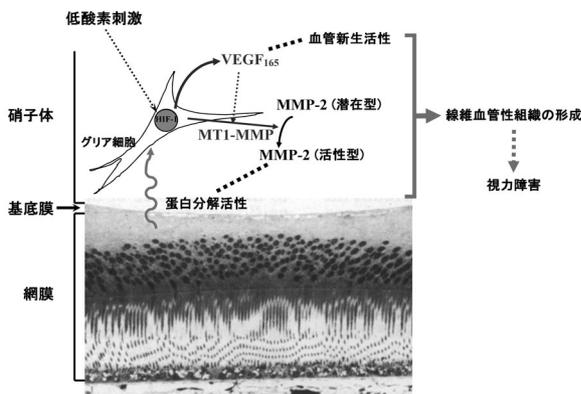


図3

糖尿病網膜症における網膜血管新生病変 (線維血管性組織) 形成のメカニズム。網膜グリア細胞が、周囲組織の低酸素状態に反応してVEGF<sub>165</sub>の産生が亢進することにより血管新生活性が誘導される。さらに、VEGF<sub>165</sub>がMMP-2活性化酵素であるMT1-MMPの産生を惹起し、病変部局所に蛋白分解活性が誘導される。その結果、網膜から硝子体に及ぶ血管新生病変が形成される。

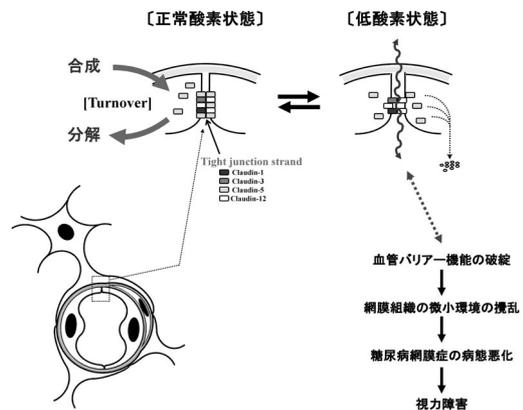


図4

糖尿病網膜症における網膜血管バリアー機能破綻のメカニズム。神経系組織の血管内皮細胞間に形成されるtight junctionの構成分子として、claudin-1, claudin-3, claudin-5, claudin-12が報告されている。糖尿病網膜症の病変部では、低酸素状態にある血管内皮細胞においてclaudin-5の細胞膜への局在が低下し血管バリアー機能が障害される。

おける細胞膜へのclaudin-5の局在が低下していた。そして、低酸素代謝状態では、血管透過性、特に低分子量分子に対する透過性が選択的に亢進していることが示された。この低分子量分子に対する透過性亢進は、claudin-5ノックアウトマウスの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の責任因子としてのclaudin-5の重要性を示す所見と考えられる。すなわち、糖尿病網膜症の病態における「組織低酸素状態 → 血管内皮細胞におけるclaudin-5の発現変化 → 血管バリアー機能の破綻 → 網膜組織の微小環境の攪乱 → 病態悪化」という機構の重要性を示す興味深い知見が得られた(図4)<sup>9)</sup>。今後、claudin-5をターゲットとした新たな治療法開発の可能性が期待される。

#### おわりに

低酸素組織に起こる血管系の改築について、血管新生と神経系血管バリアー機能の破綻を中心に概説した。基礎生物学的解析成果とともに、血管系の改築という側面から進めてきた疾患病態解析成果について、糖尿病網膜症を例にあげて紹介した。

#### 参考文献

- 1) Ikeda E. Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression. *Pathol Int* 2005 ; **55** : 603-610.
- 2) Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995 ; **270** : 19761-19766.
- 3) Damert A, Ikeda E, Risau W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J* 1997 ; **327** : 419-423.
- 4) Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992 ; **12** : 5447-5454.
- 5) Ishida S, Shinoda K, Kawashima S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E. Co-expression of VEGF receptors VEGF-R2 and neuropilin-1 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 ; **41** : 1649-1656.
- 6) Noda K, Ishida S, Inoue M, Obata K, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E. Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 ; **44** : 2163-2170.
- 7) Noda K, Ishida S, Shinoda H, Koto T, Aoki T, Tsubota K, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E. Hypoxia induces the expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005 ; **46** : 3817-3824.
- 8) Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 2003 ; **161** : 653-660.
- 9) Koto T, Takubo K, Ishida S, Shinoda H, Inoue M, Tsubota K, Okada Y, Ikeda E. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *Am J Pathol* 2007 ; **170** : 1389-1397.

# Hypoxia-induced Remodeling of Vasculature and Its Involvement in Disease Progression

Eiji IKEDA

*Department of Pathology I. and Radiological and Pathological Sciences, Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

## SUMMARY

Human cells utilize oxygen as the source of energy, and show various reactions when they are exposed to the environment with decreased oxygen concentration. These reactions enable the cells to survive under hypoxic conditions, whereas they often accelerate the progression of diseases such as diabetic retinopathy. Vasculature, the pathways for oxygen delivery to peripheral tissues, is sensitive to the changes in surrounding oxygen concentration, and the remodeling of retinal vasculature by hypoxia is known to determine the progression of diabetic retinopathy. Vascular remodeling in diabetic retina includes the angiogenesis and the breakdown of blood-retinal barrier function. Our studies have indicated that the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF), especially its isoform VEGF<sub>165</sub>, and membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in retinal glial cells is responsible for the formation of angiogenic lesion in diabetic retinopathy. On the other hand, the breakdown of barrier function of diabetic retinal vessels is attributable to the hypoxia-induced changes in the expression of a tight junction protein, claudin-5, in endothelial cells. In this review, I summarize the data of our studies on the mechanisms underlying the hypoxic remodeling of vasculature and its involvement in disease progression of diabetic retinopathy.