

論文の内容の要旨

- 1 申請者
防衛医科大学校 稲田 真
- 2 論文題目
低酸素曝露による血管バリアの破綻に関する細胞生物学的研究
- 3 論文の内容の要旨（博士：2, 000字程度）

（1）目的

脳および網膜は、人体の中で最も低酸素状態に陥りやすい器官である。低酸素状態に陥った脳/網膜では血管バリアが破綻し、生命の危機やQOLの著しい低下を招く恐れがある。それゆえ、低酸素性血管バリア破綻に関する多くの研究がなされてきたが、血管バリアを構成する種々の細胞の相互作用に着目した研究は少ない。特に、低酸素により活性化したグリア細胞の血管バリアへの影響は明らかにされていない。そこで我々は、低酸素に曝露した実験動物の脳/網膜を詳細に観察し、また血管バリア構成細胞の低酸素環境下での相互作用を解析することにより、未だ明らかではない低酸素性血管バリア破綻のメカニズムの一端を明らかにすることを目指し研究に取り組んだ。

（2）対象並びに方法

①動物実験

野生型マウスを対照群および低酸素群に分け、低酸素群は6%酸素に、対照群は空気にそれぞれ24時間曝露した後、脳/網膜を摘出した。脳/網膜における血管バリアについて、a. 血管透過性、b. 組織学的所見、c. 微細構造、d. 遺伝子発現を両群で比較した。さらに、コロニー刺激因子受容体阻害薬を投与することでミクログリアを減少させ、低酸素性血管バリア破綻へのミクログリアの影響（e）を評価した。

②細胞実験

マウス脳内皮細胞株(bEnd.3)単層膜およびbEnd.3とマウス網膜ミューラー細胞株(QMMuC-1)を共培養することで作成した血管バリアモデル膜(BBモデル膜)を、1%酸素に6時間曝露した(f)。また、マウス脳ミクログリア細胞株(BV2)との共培養(g)および培地へのIL-1 β 添加(h)を行った。bEnd.3単層膜およびBBモデル膜において、タイトジャンクション(TJ)構造を免疫染色で、TJ機能を経上皮電気抵抗および色素透過性で評価した。さらに、低酸素曝露によるBV2におけるIL-1 β の発現変化(i)や、IL-1 β 添加によるQMMuC-1におけるVEGFの発現変化(j)をqPCRおよびELISAで評価した。

(3) 成績

①動物実験

- a. 低酸素群において、脳/網膜血管からの色素漏出量が増加した。
- b. 低酸素群において、以下の組織学的所見が認められた。
 - ・アストロサイト/ミュラー細胞の活性化マーカー（GFAP）の発現亢進
 - ・ミクログリアの形態変化を伴う活性化
 - ・網膜表層の浮腫性変化および色素の漏出
- c. 低酸素群において、以下の微細構造変化が認められた。
 - ・アストロサイト/ミュラー細胞の足突起の空胞を伴う膨化
 - ・血管内皮細胞の基底膜の肥厚
 - ・トレーサーの血管外漏出
- d. 低酸素群において炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加した。
- e. ミクログリア減少マウスでは、脳での IL-1 β の発現および脳/網膜でのアストロサイト/ミュラー細胞の活性が抑制された。

②細胞実験

- f. bEnd.3 単層膜において、低酸素による明らかな TJ 破綻は認められなかったが、BB モデル膜において、低酸素による TJ 破綻が認められた。
- g. bEnd.3 単層膜および BB モデル膜において、低酸素環境で BV2 と共培養することによる TJ 破綻が認められた。
- h. bEnd.3 単層膜および BB モデル膜において、通常環境で培地に IL-1 β を添加することによる TJ 破綻が認められた。
- i. 低酸素によって BV2 の IL-1 β 遺伝子発現およびタンパク発現が亢進した。
- j. IL-1 β 添加によって QMMuC-1 の VEGF 遺伝子発現およびタンパク発現が亢進した。

(4) 考察

動物実験において、低酸素によるアストロサイト/ミュラー細胞の活性化が血管バリア破綻に関与していることが確認された。これに加え、ミクログリアの数を減少させることによって、アストロサイト/ミュラー細胞の活性化が抑制されることが示唆された。

また細胞実験において、ミュラー細胞は通常環境では TJ の機能強化に貢献しているが、低酸素環境では TJ 破綻に関与することが確認された。さらに、ミクログリア存在下ではミュラー細胞による TJ 破綻の影響はさらに大きくなることを明らかにした。このようなミュラー細胞による TJ 破綻には、活性化したミクログリアが産生する IL-1 β が関与している可能性が示唆された。

(5) 結論

脳/網膜における低酸素性血管バリア破綻は、活性化したミクログリア由来の炎症性サイトカインがアストロサイト/ミュラー細胞における VEGF 産生を促し、血管内皮細胞の TJ を破綻させることで生じることが示唆され、グリア細胞が低酸素性組織浮腫の新たな治療標的となり得る可能性が示された。