

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

いなだ まこと

稲田 真

(眼科学専攻)

防衛医科大学校

令和2年度

目次

第1章 背景と目的

1.1	はじめに	1 頁
1.2	脳と網膜における組織低酸素を来す病態	3 頁
1.3	HIF-VEGF系を介した血管バリアの破綻	4 頁
1.4	低酸素性血管バリア破綻に関するこれまでの研究の概要	6 頁
1.5	本研究の目的	7 頁

第2章 実験動物における低酸素性血管バリア破綻

第1節 イントロダクション

2.1.1	血管バリアの構造と機能	9 頁
2.1.2	低酸素性血管バリア破綻のメカニズムの概要	12 頁
2.1.3	低酸素によるミクログリアの活性化	13 頁
2.1.4	マウス網膜の構造	13 頁
2.1.5	本章の目的	14 頁

第2節 材料と方法

2.2.1	実験動物	15 頁
2.2.2	低酸素曝露	16 頁
2.2.3	エバンスブルー色素漏出実験	16 頁
2.2.4	遺伝子の発現解析	18 頁
2.2.5	ヘマトキシリン/エオジン染色	18 頁
2.2.6	パラフィン切片の免疫組織化学染色	18 頁
2.2.7	網膜伸展標本の免疫組織化学染色	19 頁
2.2.8	透過型電子顕微鏡観察とランタントレーザー実験	19 頁
2.2.9	眼底の観察	20 頁
2.2.10	Iba-1 陽性細胞（ミクログリア）の数の測定	20 頁
2.2.11	統計解析	20 頁

第 3 節	結果	
2.3.1	低酸素による脳血管バリアの機能低下	21 頁
2.3.2	低酸素による脳の病理変化	21 頁
2.3.3	低酸素による網膜の病理変化	22 頁
2.3.4	低酸素による網膜血管バリアの機能低下	23 頁
2.3.5	低酸素による網膜血管バリアの各層での変化	24 頁
2.3.6	低酸素によるミクログリアの活性化	25 頁
2.3.7	ミクログリア減少マウスを用いた実験	26 頁
第 4 節	考察	28 頁

第 3 章 脳血管内皮細胞における低酸素性タイトジャンクション破綻

第 1 節	イントロダクション	
3.1.1	タイトジャンクション (TJ) 構造	34 頁
3.1.2	低酸素による TJ 破綻	35 頁
3.1.3	本章の目的	38 頁
第 2 節	材料と方法	
3.2.1	細胞の単培養	40 頁
3.2.2	バリア細胞シートの作成	41 頁
3.2.3	BV2 との共培養	41 頁
3.2.4	バリア機能評価	41 頁
3.2.5	LDH 測定	42 頁
3.2.6	低酸素培養	42 頁
3.2.7	免疫細胞化学染色 (ICC)	42 頁
3.2.8	遺伝子の発現解析	43 頁
3.2.9	IL-1 β の培地への添加	44 頁
3.2.10	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	44 頁
3.2.11	統計解析	44 頁
第 3 節	結果	

3.3.1	bEnd.3 単層細胞シートの観察	45 頁
3.3.2	bEnd.3 単層細胞シートの BV2 との共培養	46 頁
3.3.3	bEnd.3 単層細胞シート培養液への IL-1 β 添加の影響	47 頁
3.3.4	バリア細胞シートの作成	48 頁
3.3.5	バリア細胞シートの BV2 共培養および IL-1 β 添加	49 頁
3.3.6	QMMuC-1 による VEGF 産生	50 頁
第 4 節	考察	52 頁

第 4 章 まとめ

4.1	研究成果のまとめ	56 頁
4.2	本研究による貢献	67 頁
4.3	研究の限界と今後の課題	58 頁
	謝辞	60 頁
	略語	61 頁
	引用文献	63 頁
	図表	85 頁

第 1 章

背景と目的

1.1 はじめに

本稿においては、以下の通り用語を定義する。

低酸素空気/低酸素環境：酸素濃度が 18%以下の空気/環境

低酸素曝露：低酸素空気/環境への曝露

組織低酸素：特定の器官またはその局所において酸素消費が酸素供給を上回った状態

低酸素性血管バリア破綻：組織低酸素状態における血管バリアの破綻

血管バリア：血液脳関門および血液網膜関門

ヒトは呼吸活動により大気中から酸素を取り込むことによって生命活動を維持している。脳は生命活動の中心を担う器官であるが、大気中から血液中に取り込まれた酸素のうち約 20～25%を消費しており、酸素の不足により最も重篤な障害を受ける器官の 1 つとしても知られている(1, 2)。脳が組織低酸素状態に至る原因として、低酸素空気への曝露による酸素欠乏症が考えられる。臨床的には酸素欠乏症は穀物倉庫や汚水タンク等の閉所での作業に伴って発症することが多いが、この他にも与圧機能を有さない航空機への搭乗や高所地域での滞在などによってもそれぞれ特有の酸素欠乏症状が生じる。自衛隊には多くの職種が有るが、その中には燃料や混合ガス製造に関わるもの、艦内作業のような閉所で行われるもの、山岳救助や航空機搭乗など低酸素曝露が前提となっているものなどがあり、一般人と比して低酸素環境に曝露される可能性が高い。しかしながら、これまで自衛隊衛生において低酸素曝露の職務遂行への影響が着目されることは少なかった。なかでも高所地域での部隊活動は航空機搭乗以上の長時間の低酸素曝露が予想

されるにも関わらず、高山病予防に着目した研究は皆無である。筆者は2015年に自衛隊医官として初めて国際認定山岳医(DiMM; Diploma in Mountain Medicine)資格を取得したこともあり、この分野に焦点を当てた研究を進めていきたいと考えている(3)。

さて、脳が組織低酸素状態に陥る原因は低酸素曝露だけではない。心肺機能の著しい低下によっても脳は組織低酸素状態に陥り、脳浮腫などを発症する。さらに、脳は、脳梗塞や脳外傷などの疾患においても二次的な組織低酸素状態を生じる。また、組織低酸素が問題となるのは脳だけではない。網膜は生体で最も酸素消費が盛んな器官であり、重量当たりの酸素消費量は脳の4倍にもなると言われているため(4-6)、他器官と比較して容易に組織低酸素状態に至る。網膜は発生学的に脳の一部と捉えることができ、脳と同様、組織低酸素は神経伝達機能の維持に重大な影響を与えることが知られている。

以上のように組織低酸素状態が生じる原因は様々だが、組織低酸素状態に陥った脳や網膜では血管バリアが破綻し、組織浮腫を生じることが共通している(7-9)。脳や網膜における浮腫は生命予後を脅かし、また生活の質(QOL; quality of life)を著しく低下させる重大な要因となるため、我々は低酸素性血管バリア破綻に着目した。

低酸素性血管バリア破綻の発症機序として、低酸素誘導性因子(HIF; hypoxia-inducible factor)を介した炎症プロセスの活性化が知られているが(10)、その際の血管バリアを構成する各細胞における細胞生物学的な動態についての知見は乏しい。これまでに脳および網膜における低酸素性血管バリア破綻のメカニズム解明のために様々な実験モデル動物が確立されてきた(11)。しかし、そのほとんどが組織損傷や血管病変に付随する特定の疾患に着目した実験モデル動物であった。実際には、低酸素性血管バリア破綻は酸素欠乏症や高山病を含めた多くの疾患に共通した基本的病態であるにも関わらず、正常血管における低酸素曝露による血管バリア破綻に関する報告は少ない。そこで我々は、低酸素に曝露した実験動物の脳および網膜を詳細に観察すること、また血管バリアの構成細胞を低酸素環境で培養し解析することにより、未だ明

らかではない神経組織における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。これにより本研究が低酸素関連疾患に関する基礎的理解の深化に貢献すると共に、自衛隊衛生の向上の一助となることを願っている。

1.2 脳と網膜における組織低酸素を来す病態

脳と網膜は人体のうちで最も代謝が活発な組織であり、多くのエネルギーを必要とする(4-6)。これらの組織では酸素供給不足による組織低酸素を来たしやすく、そのような低酸素状態の組織では血管バリアの破綻が生じる(7-9)。

脳や網膜が組織低酸素に陥る原因として、低酸素曝露による酸素欠乏症がある。厚生労働省によると、平成 21 年から平成 30 年までの 10 年間における酸素欠乏症による労働災害の死亡率は 63%以上（被災者数 60 人、死亡者数 36 人）であり、全労働災害における死亡率（約 1%）と比べると非常に高い。また、高山病の最も重篤な病態として高所脳浮腫（HACE; high altitude cerebral edema）が知られている。高所に順応していない人が登山活動などにより標高 4000~5000 m に至ると 0.5~1%が数時間から数日のうちに HACE を発症し生命の危機に陥る(12)。

低酸素曝露以外にも様々な病態で組織低酸素に至ることが知られている。脳梗塞や脳出血または網膜動脈閉塞症などの疾患では病変部位より末梢の血流が途絶えるため局所的な組織低酸素状態に陥る。また、脳外傷においても損傷部位に生じる炎症が組織低酸素状態を惹起することが知られている。さらに、いかなる病態であれ心肺停止によって脳は組織低酸素状態に至り、蘇生に成功したとしても、約 7 割は低酸素脳症で死に至ると言われている(13)。これに加え、糖尿病網膜症（DR; diabetic retinopathy）、加齢性黄斑変性（AMD; age-related macular degeneration）、網膜静脈閉塞症（RVO; retinal vein occlusion）など多くの眼科疾患では局所的な組織低酸素が病態形成の主要な原因となっている。これらの眼科疾患において低酸素性血管バリア破綻により黄斑浮腫が生じた場合、中心視力が障害されるため QOL が著しく損なわ

れる(14)。

このように、脳および網膜における組織低酸素は多岐にわたる疾患で認められ、いずれの疾患においても後述する共通の低酸素応答により血管バリア破綻が生じる。

1.3 HIF-VEGF 系を介した血管バリアの破綻

細胞の低酸素応答には HIF が重要な役割を果たしている。HIF は、肝がん細胞株 Hep3B において「低酸素依存的にエリスロポエチンを誘導する因子」として 1992 年に Semenza らによって発見された(15)。そして 1995 年に HIF は α と β のヘテロ二量体からなることが報告された(16, 17)、その後 α サブユニットの種類により HIF-1~3 が同定された(18, 19)。通常環境では水酸化酵素 PHD (prolyl hydroxylase) が HIF α の 2ヶ所のプロリン残基を水酸化する。プロリン残基に水酸化を受けた HIF α は pVHL (von Hippel Lindau 遺伝子産物) によりユビキチン化され、プロテアソームで分解される。一方、低酸素環境では PHD の働きが抑えられることにより HIF α は安定化し、HIF β との二量体を形成する。これが DNA 上の低酸素応答性領域(HRE; Hypoxia Responsive Element)に結合し 800 個以上の様々な遺伝子の発現を誘導する(20, 21) (図 1)。

HIF の機能は、嫌気性代謝への切り替え(22)、活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) 発生の抑制(23)、細胞内 pH 調整(24)など多岐にわたるが、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF; vascular endothelial growth factor) の発現を誘導することで血管形成を亢進し最終的に酸素環境を改善する作用も有する(25)。VEGF の主な機能は血管新生、血管内皮細胞の増殖促進だが、それと同時に強い血管透過性亢進作用も持つため、低酸素状態の組織では浮腫を来す可能性がある。VEGF には VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PlGF (placenta growth factor) の 5 つのファミリーがあるが、血管内皮に対する作用が最も強いのは VEGF-A であるため(26)、本稿において VEGF は VEGF-A を表すものとする。

HIF による低酸素応答と炎症とが密接な関係にあることも明らかになっている。炎症細胞の中でもマクロファージやミクログリアは低酸素部位に集積し炎症性サイトカインを産生する性質があるが、このような炎症プロセスの活性化によっても血管透過性が亢進する(27)。炎症局所では血流の途絶などによる酸素供給の低下に加え、細胞浸潤による酸素消費の増加が引き起こされ、組織低酸素状態が助長されるため、HIF はますます安定する(28)。さらに、炎症反応に関わる転写因子である核内因子 κ B (NF- κ B; nuclear factor-kappa B) も HIF によって誘導される。NF- κ B は多くの炎症関連タンパクを誘導するが、これらのタンパクに加え HIF もまた NF- κ B によって誘導されるため、HIF と NF- κ B はポジティブフィードバックループを形成している(10, 29)。さらに、HIF だけでなく VEGF にも炎症を誘導する作用があることが知られている(30)。つまり、低酸素状態にある組織では、HIF、VEGF、炎症性サイトカインが互いに刺激しながら血管透過性を亢進させている。

低酸素によって血管透過性亢進が生じる要因として、血管内皮細胞のタイトジャンクション (TJ; tight junction) 破綻が知られている。TJ は全身の上皮細胞に存在する細胞間結合の 1 つで、様々な分子が細胞間を通過することを防いでいる。脳と網膜においては、血管内皮細胞の TJ に加え、グリア細胞が血管を包み込むことで構成される血液脳関門 (BBB; blood-brain barrier) / 血液網膜関門 (iBRB; inner blood-retinal barrier) と呼ばれる血管バリア構造がそれぞれ存在する。これらの組織においては、血管バリアにより組織の恒常性が厳密に保たれているが、ひとたび低酸素性血管バリア破綻が生じると、命に関わるような、または著しい QOL 低下を引き起こすような重要な病態となり得る。

BBB/iBRB については第 2 章で、TJ については第 3 章で詳述する。

なお、網膜には outer BRB (oBRB) も存在するが、これは網膜色素上皮細胞の TJ によるバリアであり、血管バリアとは異なる機能・構造を有するため本稿では oBRB については論じない。

1.4 低酸素性血管バリア破綻に関するこれまでの研究の概要

低酸素性血管バリア破綻のメカニズムについて詳細に調べることは、多岐にわたる疾患の病態解明や新たな治療戦略の開発において重要であろう。この目的達成のためにこれまでに多くの実験モデル動物が確立された。

脳における血管バリア破綻を来す実験モデル動物の1つに凍結脳損傷モデルマウスがある。このモデルマウスでは、BBB 破綻を伴う脳浮腫や炎症所見が認められた(31, 32)。また、流体衝撃による脳外傷モデルマウスも主要な脳浮腫モデルの1つである。このモデルマウスでは、炎症所見や血管基底膜の変性を伴う BBB 破綻が認められた(33, 34)。さらに様々な方法で脳出血モデル動物が作成され、これらのモデル動物を解析することで、活性化したグリア細胞による二次的な BBB 破綻などが明らかになってきた(35, 36)。

網膜での血管バリア破綻を来す実験モデル動物も数多く報告されている。例えば、レーザーを用いた光凝固血栓による RVO モデルマウスが確立され、血管からの漏出、重篤な浮腫、血管変異などの網膜病変が認められた(37, 38)。また、生理食塩水を眼内に注入し眼圧を調節することによる網膜梗塞再灌流モデルラットでは、網膜浮腫、TJ 破綻、色素漏出が観察された(39)。さらに、様々な糖尿病モデルマウスで BRB 破綻による浮腫を含む網膜の変化が報告されている(40-42)。

しかしながら、これらの実験モデル動物では2次的な病態として組織低酸素を来すため、低酸素曝露の直接的な影響を調べるには不向きである。低酸素曝露による直接的な血管バリア破綻に関する報告として、実験動物を7%酸素に6時間曝露することによる脳での色素漏出の増加や(43)、8%酸素に24時間曝露することによるフルオレセインイソチオシアネート (FITC; fluorescein-5-isothiocyanate) の脳での血管からの漏出増加(44, 45)、などがあるが、報告数は少なく、メカニズムの詳細に関しては明らかではない。特に網膜における直接的な低酸素の影響に関する報告は限定的である。1969年に初めて高所における網膜浮腫が報告されてから(46, 47)、低酸素による網膜浮腫に関するい

くつかの研究が行われた(48, 49)。近年では網膜における低酸素性血管バリア破綻の細胞生物学的な研究も報告されている(50, 51)。特に Kaurらは低酸素性の iBRB 障害では TJ 破壊およびアストロサイト/ミュラー細胞足突起の腫脹を認めることを示した(50)。しかしながら、網膜の層構造に着目し、層ごとの低酸素による血管構造変化を示した研究例は我々が知る限り無い。

また、低酸素環境での培養細胞の TJ 破綻も多く報告されているが、これらの報告では培養システム、細胞種、酸素濃度、解析方法などが大きく異なるので実験結果を一般化することは難しい。しかし、内皮細胞の TJ 破綻は 1%程度の低酸素曝露開始後 30 分から 48 時間以内に生じることが確からしい(52-55)。これらはいずれも内皮細胞の単独培養による報告だが、実際の血管バリアは内皮細胞だけでなく周皮細胞やグリア細胞など種々の細胞が連携して機能を維持しているため、共培養実験も行われている。特にアストロサイトは内皮細胞の TJ 維持に重要な役割を果たしていることが確かめられている(56, 57)。しかしながら、低酸素環境でのアストロサイトの TJ への影響に関しては定まった見解が得られていない。アストロサイトは低酸素環境で TJ タンパクの局在を維持するなどして TJ を保護するという報告があるが(58-60)、一方、VEGF や炎症性サイトカインを産生することで TJ 破綻に寄与するという報告もある(7, 61, 62)。

1.5 本研究の目的

前述の通り、これまでに低酸素に関わる様々な実験モデル動物が確立されてきた。しかしながら、正常血管における急性かつ直接的な低酸素の影響に関する報告は少ない。なぜなら、これまでに報告された殆どの実験モデル動物の病態は、血管病変が先行する二次的な低酸素によるものだからである。そこで我々は、野生型マウスを 6%酸素に 24 時間曝露することで直接的な低酸素性血管バリア破綻モデルマウスを作成し、脳および網膜における血管バリア破綻について詳細に観察した。特に網膜では各層における血管バリア破綻について評価した。また、炎

症プロセスの中心となるミクログリアに着目し、低酸素環境でのミクログリアの血管バリア破綻への関与について報告する。これらの実験動物を用いた研究の詳細は第2章で論ずる。

また、血管周囲の細胞が変化することによって血管バリア機能に異常が生じると考えられているにも関わらず、血管バリア構成細胞間での相互作用の詳細は未だ不明な点が多い。前述の通り、低酸素環境での細胞培養実験は多数報告されているものの、複数種の血管バリア構成細胞を共培養することによる血管バリアモデルを用いた低酸素曝露実験の報告は少なく、定まった見解も得られていない。そこで我々は、低酸素性血管バリア破綻における各細胞の影響を明らかにするために、脳血管内皮細胞株と網膜ミュラー細胞株を用いて、血管バリアを模した2層の細胞シート（以下、「血管バリアを模した2層の細胞シート」を「バリア細胞シート」と記す）を作成し、これを低酸素環境で培養した。さらに、バリア細胞シートのミクログリアとの共培養や、炎症性サイトカインの1つである interleukin (IL) -1β の培地への添加を行った。このような条件での TJ 構造およびバリア機能の変化を詳細に調べることによって、低酸素性血管バリア破綻における各細胞の影響を明らかにした。これらの培養細胞を用いた研究の詳細は第3章で論ずる。

以上の実験動物および培養細胞を用いた実験により、脳および網膜における低酸素曝露による血管バリア破綻メカニズムの一端を明らかにすることが本研究の目的である。TJ を取り巻く細胞間の相互作用への理解を深めることは、低酸素性血管バリア破綻を伴う多くの病態の解明に貢献し、血管バリア安定化に焦点を当てた新たな細胞特異的な治療戦略の開発につながる可能性がある。また、これらの知見は、これまで自衛隊衛生において注目されることの少なかった高所医学の基盤の構築に資するものである。

第 2 章

実験動物における低酸素性血管バリア破綻

第 1 節 イントロダクション

2.1.1 血管バリアの構造と機能

脳や網膜において神経細胞の興奮や刺激伝導が円滑に行われるためには、神経系の細胞内外の環境を一定に保つ必要がある。このため、神経系組織の液性環境は血液から厳密に分けられており、血中に存在する物質が容易に神経系組織へ到達することを防いでいる。このバリア機能を担っているのが BBB/iBRB であり、毒物や外来微生物などが脳や網膜へ侵入するのを防ぎ、組織の恒常性を維持することに寄与している (63, 64)。BBB/iBRB はバリアとして働くのみならず様々なトランスポーターを発現しており、神経系に有害な薬剤の汲み出しや必要な栄養を神経組織に供給する役割も持っている (65)。しかし、どのようにバリア機能が維持されているのかに関しては未だ不明な点が多い。

2.1.1a 基本構造

BBB は血管内皮細胞の TJ を中心に、アストロサイト、周皮細胞、基底膜から構成される。iBRB はこれらに加えミューラー細胞も構成に関わる。血管内皮細胞と周皮細胞は直接接触しており基底膜を共有している (57, 63)。血管内皮細胞と神経線維は 2 つの層で隔てられている。内側の層は内皮細胞の基底側に存在する基底膜で、外側の層は血管を覆うアストロサイトまたはミューラー細胞の足突起である (66, 67)。脳実質における血管の 99% はアストロサイトの足突起に被覆されており (68)、大部分の神経線維は血管への直接のコンタクトはなく、アストロサイト足突起は血管と神経線維の共通領域を構成している (69)。これはアス

トロサイトが毛細血管レベルでの物質輸送に関与している可能性を示す。すなわち BBB の脳内への不要な物質の制限と必要な物質の通過という関門としての機能はアストロサイトが担っていると予想される。一方、網膜においてアストロサイトは表層に存在するため(70)、表層の血管のみがアストロサイト足突起に覆われている。網膜にはアストロサイトの他に組織特異的グリア細胞であるミュラー細胞が存在する。ミュラー細胞は網膜の厚さ全体に広がり、あらゆる種類の神経細胞体と接すると共に、足突起が網膜血管を覆っている(71)。ミュラー細胞の機能については不明な点も多いが、アストロサイトと同様、iBRB 維持に重要な役割を担っていると考えられている (図 2-1)。

2.1.1b アストロサイトと血管バリア

BBB/iBRB のバリア機能は主に内皮細胞に存在する TJ タンパクの発現と局在化によって調整されるが (TJ については第 3 章で詳述する)、これは BBB/iBRB 構成細胞が互いに協調することにより維持されている。特にアストロサイトは古くから血管内皮細胞の TJ タンパクを誘導する上で重要な役割を果たしていることが知られている(72)。

アストロサイトは脳や網膜表層に存在するグリア細胞の 1 つで、多数の突起を持ち、これらの突起の間に近傍を走行する神経線維が配置され、細胞ごとに自らの領域内の神経線維の構造を維持している。近年、アストロサイトは神経線維を構造面で支えるだけでなく、神経伝達のためのエネルギーや基質の供給を通じて神経機能の維持に関与していることがわかってきた(73, 74)。また、アストロサイト足突起と血管が隣接していることからアストロサイトが血管バリア調節に関わっていることが約 50 年前に予想されていた(75)。その後、多くの動物実験によってアストロサイトによる血管バリアの誘導と調節が示されてきた(72, 76, 77)。また、アストロサイトと内皮細胞の共培養によって経上皮電気抵抗 (TEER; Trans-endothelial electrical resistance) (TEER については第 3 章で詳述する) の上昇や低分子量トレーサーの透過性低下を認めることから、アストロサイトによるバリア機能強化の可能性

が示された(58, 60, 78, 79)。現在は研究が進み、アストロサイトによるバリア誘導は、内皮細胞の TJ の数、長さ、複雑さの向上によること(80)、また、クローディン、オクルディン、zonula occludens (ZO) タンパクのような関連タンパク発現の調節(81, 82)および再分配によること(82, 83)が明らかになってきた。さらに、アストロサイトは多くの伝達物質の特異的な輸送体を発現すると共に(83, 84)、BBB 特異的酵素の局在調節により血管バリアの関門としての機能を担っていること(85, 86)が報告されている。

近年は、アストロサイトはどのように TJ タンパク、輸送体、酵素などの調節を行っているのかの解明に力がそそがれてきた。アストロサイトは多くのペプチド、成長因子、ケモカインを分泌することが知られているが(87)、そのうちのいくつかはバリア機能を調節することがわかっている。例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF; basic fibroblast growth factor) は細胞実験でバリア機能を向上させることが示されている(88, 89)。bFGF をノックアウトした動物実験ではアルブミンの BBB 透過性が亢進し、ZO-1 とオクルディンの発現が低下した(90)。また、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF; glial cell derived neurotrophic factor) を血管内皮細胞株に作用させると、クローディン-5 の遺伝子発現およびタンパク発現が増加し、バリア機能が向上した。一方、抗 GDNF 中和抗体によってこれらが減少した(91)。

ここに示した通り、ここ 20 年で、血管バリア調節に関するアストロサイトの重要性とバリア調節のメカニズムに対する理解は急激に進歩している。しかし、複雑な分子生物学的パスウェイは未だ未解明の部分が多い。

2.1.1c ミュラー細胞と血管バリア

ミュラー細胞はアストロサイトと同様、グリア細胞の 1 つだが、網膜特異的に存在し、網膜の内境界膜 (ILM; internal limiting membrane) から視細胞層までの広範囲を 1 つの細胞体で覆っている(71)(網膜構造の詳細は後述)。このような構造によって網膜の支持組織として機能し

ていると考えられているが、それ以外にもアストロサイトと同じように様々な機能を有することが最近の研究で明らかになってきた。例えば、変性網膜の修復機能、神経細胞を標的とする神経栄養因子の分泌機能、神経伝達物質の代謝機能などが着目されているが、血管バリア維持機能に関しても報告されている(92)。アストロサイトは網膜の表層にしか存在しないため、網膜の中層や深層の血管はアストロサイトではなくミュラー細胞の足突起によって覆われている。すなわち、これらの血管ではアストロサイトの代わりにミュラー細胞が血管バリア機能の維持を担っていると考えられる(8)。これらの裏付けとして、ラットの前房にミュラー細胞を注射することによる血管バリア機能の向上や(93)、ミュラー細胞が産生する GDNF による BRB 機能維持などが報告されている(94)。

2.1.2 低酸素性血管バリア破綻のメカニズムの概要

血管バリアは前述の通り数種類の細胞によって構成されているが、低酸素は血管バリアの機能維持に必要なこれらの構造を破壊する主要な要因として知られている。低酸素性血管バリア破綻は水やイオンの分配変化、炎症、酸化ストレス、浮腫、末梢免疫細胞の浸透、血液タンパクの組織への漏出などの重大な引き金となる(57, 95)。

低酸素性血管バリア破綻のメカニズムは盛んに研究されており、多くの異なる分子レベルで生じていることが明らかになっている。特に TJ は低酸素性血管バリア破綻の主要な標的だと考えられている。低酸素は TJ を構成するタンパク質であるクローディン、オクルディン、ZO-1、の発現調節と再分配を行い、これにより TJ の機能が制御されている(44, 96-99)。TJ タンパクの再分配はおそらくセリン、トレオニン、チロシン残基のリン酸化によると考えられ、PKC (protein kinase C)、ミオシン軽鎖キナーゼ、RhoA などを介して調節されている(100)。このような血管バリア破綻には活性化したアストロサイトおよびミュラー細胞が関わっていることが知られている(101, 102)。なお、アストロサイト/ミュラー細胞による低酸素環境での血管バリアへの影響は第 3

章で詳述する。

2.1.3 低酸素によるミクログリアの活性化

神経系組織におけるマクロファージ様細胞として知られるミクログリアは、抗原提示、異物に対する自然免疫応答、死細胞などの貪食、神経回路形成への関与など多彩な役割を持ち、組織の恒常性維持に重要な役割を担っている(103, 104)。正常時におけるミクログリアは小さな細胞体から多数の突起を伸ばしている形態をしており「ラミファイド型」と呼ばれる。傷害、感染、低酸素などに反応してミクログリアは活性化し、短縮した突起と肥大化した細胞体を有する「アメボイド型」となり、炎症性サイトカインをはじめ様々な液性因子の産生放出を引き起こす(103)。このような活性化ミクログリアは神経系組織における病態メカニズムに大きく寄与しており、その活性調節は治療薬開発における有望なターゲットとして注目されている(105-107)。

2.1.4 マウス網膜の構造

マウスの網膜層構造はヒトと同じく10層からなり、硝子体側(表層)から内境界膜、神経線維層(NFL; nerve fiber layer)、神経節細胞層(GCL; ganglion cell layer)、内網状層(IPL; inner plexiform layer)、内顆粒層(INL; inner nuclear layer)、外網状層(OPL; outer plexiform layer)、外顆粒層(ONL; outer nuclear layer)、外境界膜、視細胞層、網膜色素上皮層である。網膜には5種類の神経細胞が確認されており、それぞれ神経節細胞層には神経節細胞、内顆粒層にはアマクリン細胞と双極細胞、外顆粒層には双極細胞と視細胞の核がそれぞれ存在する。また、内境界膜から視細胞層までを貫くようにミュラー細胞が、NFLにはアストロサイトが存在し、それぞれ足突起を伸ばし、周囲の血管を覆っている。さらにIPLとOPLを中心にミクログリアが存在する(図2-2a)。

また、マウス網膜には解剖学的に3層の血管叢(VPL; vascular plexus layer)を認め、表層血管叢(superficial VPL; SVPL)はNFLとGCL

に、中層血管叢 (intermediate VPL; IVPL) は IPL と INL の境界に、深層血管叢 (deep VPL; DVPL) は IPL と OPL の境界にそれぞれ存在する (図 2-2b)。

2.1.5 本章の目的

我々は、低酸素性血管バリア破綻モデルマウスを作成し、脳および網膜における低酸素の血管バリアへの影響について形態学的変化を含めて詳細に調べた。特に網膜においては、それぞれの VPL で血管を取り囲むグリア細胞の種類 (アストロサイトもしくはミュラー細胞) が異なることから、各 VPL で血管の低酸素刺激に対する感受性は異なると考え、低酸素の血管バリアへの影響を各 VPL で比較した。

また、デキサメタゾン は低酸素による中枢神経系における組織の浮腫を、VEGF や炎症性サイトカインを抑制することにより軽減することが知られている (45, 108, 109)。そこで我々は、作成したモデルマウスにおいてデキサメタゾンが低酸素性血管バリア破綻を軽減するかどうかを調べた。

さらに、低酸素によりミクログリアが活性化することで血管バリア破綻を誘導することが知られている。そこで我々は、ミクログリア減少モデルマウスを作成し、低酸素性血管バリア破綻に関するミクログリアの影響について調べた。

第2節 材料と方法

2.2.1 実験動物

以下、本研究における全ての動物実験は防衛医科大学校倫理に関するガイドラインと ARVO Statement for Use Animals に則って実施した。実験動物として野生型 C57BL/6 マウスを SLC（静岡）より購入した。マウスは通常の概日リズム(明暗各 12 時間サイクル)の下で飼育され、自由に食事と水を与えられた。実験動物はイソフルラン(Wako, 大阪)の吸入麻酔下で、過量のペントバルビタール(ソムノペンチル®; 共立製薬, 東京)を腹腔内注射することで安楽死させた。全ての実験において 8~10 週齢の雄マウスのみを使用した。各実験では各群 3~8 匹のマウスを用いた。

2.2.1a デキサメタゾン投与実験

マウスを以下の通り 4 つのグループに分けた。1) Air-PBS 群: 空気曝露 + リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Phosphate- buffered saline) 腹腔内注射、2) Air-Dex 群: 空気曝露 + デキサメタゾン腹腔内注射、3) Hypox-PBS 群: 低酸素曝露 + PBS 腹腔内注射、4) Hypox-Dex 群: 低酸素曝露 + デキサメタゾン腹腔内注射。それぞれの群において、100 μ l の PBS もしくはデキサメタゾン (デカドロン®, Aspen Japan, 東京) 16.5 μ g を腹腔内注射した後、室内の空気もしくは低酸素混合ガスに 24 時間曝露した。デキサメタゾンの投与量は脳浮腫に対するヒトへの投与量を基準に決定した(110)。

2.2.1b コロニー刺激因子 1 受容体阻害薬投与実験

マウスを以下の通り 4 つのグループに分けた。1) Air-cont 群: 空気曝露 + 通常餌、2) Air-PLX 群: 空気曝露 + PLX5622 含有餌、3) Hypox-cont 群: 低酸素曝露 + 通常餌、4) Hypox-PLX 群: 低酸素曝露 + PLX5622 含有餌。PLX 群は、コロニー刺激因子 1 受容体 (CSF1R; Colony stimulating factor 1 receptor) 阻害薬 (PLX5622, Chemgood LLC, VA,

USA)を餌に 1200 ppm 混入し 9 日間投与することでミクログリアを減少させた。その際、薬剤を dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させたが、DMSO 濃度は 2%未満とし、cont 群の餌にも同濃度の DMSO を混入した。餌投与開始後、9 日目から 10 日目にかけて室内の空気もしくは低酸素混合ガスに 24 時間曝露した。

2.2.2 低酸素曝露

Hypox 群のマウスを、6%酸素 94%窒素混合ガスシリンダーに接続された透明なプラスチック性の常圧低酸素チャンバー（幅 25 cm×奥行き 26 cm×高さ 23 cm）内で 24 時間飼育することにより低酸素曝露を行なった（図 2-3a）。なお、1 回につき 2~4 匹のマウスに対し低酸素曝露した。その間、Air 群のマウスは通常の室内空気で飼育した。低酸素チャンバー内の酸素および二酸化炭素濃度は、2 時間ごとにガス検知管（Gastec, 神奈川）（図 2-3b）により測定され、それぞれ 6.0-6.5%および 0.1%以下に維持された（図 2-3c）。

2.2.3 エバンスブルー色素漏出実験

エバンスブルー色素（EB; Evans blue）が血清アルブミンと結合する性質を利用して(111)、脳および網膜の血管からの漏出量を、既報(112)を参考に測定した。デキサメタゾン投与実験における各群のマウスにイソフルランの吸入麻酔下でペントバルビタール（50 mg/kg）の腹腔内注射を行い、空気もしくは低酸素曝露の 1 時間前に EB(20 mg/ml, 0.15 ml; Sigma-Aldrich, MO,USA)を尾静脈注射した。空気もしくは低酸素曝露直後に再び麻酔をかけ、0.1~0.2 ml の血液を左心室から採取した。PBS を灌流した後、リン酸緩衝 1%パラホルムアルデヒド（PFA; paraformaldehyde）で灌流固定を行い、脳および網膜を摘出した。これらの組織の乾燥重量を測定した後、ジメチルフォルマミドに 75 °C で一晩処理することで EB を溶出した。18,800 G で 15 分間の遠心を行い、上清の吸光度（740 nm-620 nm）を測定した。血液サンプルは 4000 G で 15 分間の遠心を行い、上清を 1000 倍に希釈した後、同様に吸光

度を測定した。組織 EB 量は EB スタンダード曲線を元に算出し、血管透過性を以下の計算式を用いて定量化した。

$$[\text{組織 EB}(\mu\text{g})/\text{組織重量}(\text{mg})] / [\text{血液 EB 濃度}(\text{mg}/\text{ml}) \times \text{循環時間}]$$

脳および網膜における EB 色素の血管からの漏出の様子を観察するために、同様の方法で、各群のマウスに EB を尾静脈注射した。空気もしくは低酸素曝露直後に、過量のペントバルビタールによる深麻酔を行い、リン酸緩衝 4%PFA で灌流固定した。脳を採取し、肉眼で色調の変化を観察した。また、網膜を採取し、スライドガラス上で伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡(Keyence BZ-8000, 大阪)の Z スタック機能を用いて観察した。

2.2.4 遺伝子の発現解析

空気または低酸素曝露後に、イソフルラン吸入および過量のペントバルビタールによる深麻酔下で、各群のマウスから脳および網膜を採取し、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて全 RNA を抽出した。続いて SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて RNA に対応する cDNA を作成した。使用したプローブ (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) は以下の通りである。VEGF (Vegfa, Mm00437304_m1)、tumor necrosis factor α (TNF α) (Tnf, Mm00443260_g1)、IL-1 β (Il1b, Mm00434228_m1)、monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) (Ccl2, Mm00441242_m1) (CSF1R 阻害薬投与実験においては IL-1 β のみ測定した)。また、18S rRNA (Rn18s, Mm03928990_g1) を内在性コントロールとして用いた。

7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) を用いて $\Delta\Delta\text{CT}$ 法により逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR; reverse transcription- polymerase chain reaction) 解析を行なった。各因子の mRNA レベルは 18S rRNA を基準とした相対発現量で示した。

2.2.5 ヘマトキシリン/エオジン染色

空気または低酸素曝露後に、各群のマウスをイソフルラン吸入下、過量のペントバルビタールによる深麻酔下で、リン酸緩衝 4%PFA で灌流固定した。脳および眼球を摘出し、眼球から角膜と水晶体を除去した後、同じ固定液に 4°Cで一晩浸漬固定した。次に標本をパラフィン包埋した後、5 μ m ないし 10 μ m 厚の切片を作成し、ヘマトキシリン/エオジン (HE; hematoxylin and eosin) 染色と後述の免疫組織化学染色 (IHC; immunohistochemistry) に供した。網膜各層の厚さを 3箇所 (視神経乳頭から 250 μ m、300 μ m、400 μ m) で測定し、これらの平均値をデキサメタゾン投与実験における各群で比較した。

2.2.6 パラフィン切片の免疫組織化学染色

アストロサイト/ミュラー細胞はグリア細胞特有の中間径フィラメントタンパク質の1つである GFAP (glial fibrillary acidic protein) を発現しており、環境の変化に応じて GFAP 強陽性を特徴した活性化を示すため、GFAP は両細胞の活性化マーカーとして広く用いられている (113)。

またミクログリアのマーカーとして ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) (114)、CD11b、CD45、CX3CR1、F4/80、CD68、CD40 などが知られているが、活性化の有無に関わらず恒常的に発現し、多くの研究でミクログリアの形態変化の観察に利用されていることから、我々は Iba-1 をミクログリアのマーカーとして用いた。なお、Iba-1 はアクチン構造再編成の調節に作用し、ミクログリアの細胞運動能を制御する分子であることが知られている (115)。

各群から得られたパラフィン切片を用いて、GFAP および Iba-1 を用いた IHC を行なった。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンした後、脱マスキング剤 (Vector, CA, USA) に浸し、1分間オートクレーブ (120 °C) を行なった。冷却と PBS での洗浄の後、内因性ペルオキシターゼ阻害剤 (Dako, Golstrup, Denmark) と共に 15分間、続いて 2.5% ウマ血清と共に 45分間、室温でインキュベートした。1次抗体反応は、

抗 GFAP 抗体 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) (1:250 希釈) および抗 Iba-1 抗体 (Wako,大阪) (1:1000 希釈) を 4 °C で一晩行った。PBS で洗浄した後、スライドをペルオキシダーゼ結合ポリマー 2 次抗体 (ImmPRESS reagent; Vector, CA, USA) と共に室温で 45 分間インキュベートし、3,3'-ジアミノベンゼンで発色させ、核をヘマトキシリンで対比染色した。

2.2.7 網膜伸展標本の免疫組織化学染色

上述と同様の方法でデキサメタゾン投与実験における各群から眼球を摘出し、網膜を採取した。網膜を 0.1% tween-20 含有 PBS (PBT) で洗浄し、2.5%ウマ血清と共に 3 時間インキュベートした。1 次抗体反応は、Iba-1 抗体 (1:2000 希釈) を 4 °C で 3 日間行なった。PBT で洗浄した後、FITC 結合 2 次抗体(Vector) (1:200 希釈) と共に暗所で 1 時間インキュベートした。標本を PBT でよく洗浄した後、Fluoromount-G (Southern Biotech, AL, USA) を乗せたスライドガラス上で伸展させ、蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-8000) を用いて観察した。

2.2.8 透過型電子顕微鏡観察とランタントレーサー実験

血管バリア破綻の様子を画像で確認するために、高電子密度のランタン塩を血管内トレーサーとして用いた透過型電子顕微鏡 (TEM; transmission electron microscope) 観察を行なった。

空気または低酸素曝露後に、デキサメタゾン投与実験における各群のマウスをイソフルラン吸入下、過量のペントバルビタールによる深麻酔下で既報(116)を参考に灌流固定した。まず、1% NaNO₃(2ml)を灌流し、次に 10 ml のランタン溶液(20 mM La(NO₃)₃ · 6H₂O、80 mM NaCl、3.5 mM KCl、1.0 mM CaCl₂、1.0 mM MgCl₂、1.0 mM glucos ; pH 7.4)を 10 分かけて灌流した。続いて硫酸塩 (43 mM Na₂SO₄、16 mM NaHCO₃、10 mM sodium acetate、3.5 mM KCl、1.0 mM CaCl₂、1.0 mM glucose、1.6 mM Na₂HPO₄、0.4 mM NaH₂PO₄、33 mM sucrose;pH 7.4)を含む 10 ml の 2%グルタルアルデヒドおよび 2%PFA

で灌流固定した。眼球を摘出し、角膜と水晶体を除去した後、同じ固定液に 4°Cで一晩浸漬固定した。次に 2%四酸化オスミウム水溶液中で 1.5 時間固定した。Epon812 に包埋した後、酢酸ウラニルで染色した超薄切片を TEM (Type 1400plus; JOEL,東京) で観察した。

2.2.9 眼底の観察

空気または低酸素曝露後に、デキサメタゾン投与実験における各群のマウスをイソフルラン吸入下、ペントバルビタール (50 mg/kg) の腹腔内注射を行い、0.5%トロピカミド点眼 (ミドリン-P®; 参天製薬, 大阪) を用いて散瞳した。ヒドロキシエチルセルロースゲル (スコピゾル®; 千寿製薬, 大阪) を眼に点入し、網膜イメージング顕微鏡 (Micron IV®; Phoenix Research Laboratories, CA, USA) で眼底写真 (FP; fundus photography) を撮影した。その後、FITC (100 mg/ml) (Fluorescite®; ノバルティスファーマ, 東京) を 0.05 ml 腹腔内注射し、蛍光眼底血管造影 (FFA; fluorescein fundus angiography) を施行した。FFA で得られた画像を元に、視神経乳頭から等距離 (視神経乳頭の直径の 2 倍) における乳頭周囲の血管径 (太い順に 8 本) を測定した。

2.2.10 Iba-1 陽性細胞 (ミクログリア) の数の測定

空気または低酸素曝露後に、上述と同様の方法で CSF1R 阻害薬投与実験における各群マウスから脳と網膜を採取し、Iba-1 の IHC を行なった。1 つの脳サンプル (右または左半球) から 3 つのエリア (海馬周辺、小脳、大脳白質) の画像を取得し、各画像内の Iba-1 陽性細胞の数を測定した。

2.2.11 統計解析

全ての統計解析には jmp pro14 (SAS institute inc., NC, USA) を使用した。データは平均値±標準偏差で示した。平均値の比較は、対応のない一元配置分散分析により有意性を確認したのち、多重比較には Tukey 検定を用いた。有意水準は 5%未満とした。

第3節 結果

2.3.1 低酸素による脳血管バリアの機能低下

低酸素による脳の血管バリアの機能低下を評価するために、デキサメタゾン投与実験における各群において EB 投与後の脳の肉眼的観察および脳における EB 漏出量の測定を行なった。

2.3.1a 脳の肉眼的観察

EB 投与後のマウスの脳の代表的な肉眼的組織像を図 2-4a に示す。Hypox-PBS 群では Air-PBS 群と比較して色調が変化し、これはデキサメタゾン投与によって抑制された。

2.3.1b 脳の EB 漏出

EB が血清アルブミンと結合する性質を利用することで、血管バリア破綻を検知できる(111)。バリア機能の破綻した血管では血管内の EB 結合アルブミンが周囲の組織に漏出するが、正常の血管では漏出はほとんど無く EB は灌流液により除去される。各群の脳 EB 漏出量を Air-PBS 群と比較した結果を図 2-4b に示す。Hypox-PBS 群では有意に増加し($p < 0.01$ 、 1.36 ± 0.24 倍)、Air-Dex 群(0.96 ± 0.06 倍)および Hypox-Dex 群 (0.99 ± 0.10 倍) では有意差は認められなかった。

2.3.2 低酸素による脳の病理変化

低酸素による脳の血管バリアの病理変化を評価するために、脳血管の TEM 観察および BBB 構成細胞のアストロサイトのマーカーである GFAP の染色を行なった。

2.3.2a 脳血管の TEM 観察

デキサメタゾン投与実験における各群のマウスの脳における代表的な毛細血管の微細構造を図 2-5 に示す。Air-PBS 群および Air-Dex 群では、明らかな異常所見は観察されなかった。Hypox-PBS 群では、ア

ストロサイト足突起の空砲を伴う膨化（図 2-5a：*）、血小板由来と考えられる小胞集合体の血管内皮への付着（図 2-5a: 矢印）が認められた。これらの所見は Hypox-Dex 群では認められなかった。さらに Hypox-PBS 群では血管内皮細胞の基底膜の肥厚が認められた（図 2-5b: 矢頭）。また、アストロサイトのミトコンドリアに明らかな変化は認められなかった（図 2-5b：M）。

2.3.2b 脳切片の HE 染色と GFAP 染色

デキサメタゾン投与実験における各群のマウスの脳（海馬周辺部）の代表的な組織像を図 2-6 に示す。HE 染色では各群で明らかな組織学的変化は観察されなかった（図 2-6a）。GFAP 抗体を用いた IHC では、全ての群で血管周囲の陽性領域が認められ、これは BBB を構成するアストロサイトの足突起を示していると考えられた。Hypox-PBS 群においては他群と比較して GFAP の発現が強いことが弱拡大での観察で確認された。また強拡大での観察によって、毛細血管周囲において突起状の GFAP 陽性領域の顕著な拡大が確認された（図 2-6b）。

2.3.3 低酸素による網膜の病理変化

低酸素曝露によって、脳血管と同等の変化が網膜血管でも生じていることを確認するために、デキサメタゾン投与実験における各群のマウスの網膜を観察した。

2.3.3a 眼底写真

低酸素による網膜血管の変化を生きた状態で確認するために眼底観察を行なった。Air-PBS 群および Hypox-PBS 群のマウスの代表的な FP および FFA の画像を図 2-7a に示す。Air-Dex 群および Hypox-Dex 群はそれぞれ Air-PBS 群、Air-Dex 群と同様の所見を得られた。Hypox 群において血管拡張が認められたが、全てのグループにおいて白斑、異常血管、出血等の病理所見は認められなかった。

2.3.3b 網膜の血管径

各群において網膜の血管径を測定したところ、Air-PBS 群と比較して Hypox-PBS 群 (1.35 ± 0.01 倍, $p < 0.05$) および Hypox-Dex 群 (1.28 ± 0.08 倍, $p < 0.05$) で有意な血管拡張が認められた (図 2-7b)。

2.3.3c 網膜の病理切片

各群のマウス網膜の代表的な組織像を図 2-8a に示す。Air-PBS 群、Air-Dex 群では異常な組織学的所見は観察されなかったが、Hypox-PBS 群では網膜表層に浮腫性変化が観察された (図 2-8a: 矢印)。低酸素曝露前にデキサメタゾンを投与した Hypox-Dex 群ではこのような所見は認められなかった。NFL と GCL を合わせた厚さは Air-PBS 群 ($11.95 \pm 0.71 \mu\text{m}$) と比べ Hypox-PBS 群 ($16.39 \pm 3.92 \mu\text{m}$) で有意に大きかった ($p < 0.05$) (図 2-8b)。

2.3.3d 網膜切片の GFAP 染色

各群のマウス網膜の代表的な GFAP 抗体を用いた IHC 像を図 2-8c に示す。全ての群で主に NFL および GCL に陽性領域が認められ、Hypox-PBS 群では、これに加え IPL および OPL にも陽性領域が認められた。さらに強拡大での観察により Hypox-PBS 群では他群と比べ網膜表層における突起状の GFAP 陽性領域の顕著な拡大が観察された (図 2-8c: 矢頭)。

2.3.4 低酸素による網膜血管バリアの機能低下

低酸素による網膜の血管バリアの機能低下を評価するために、デキサメタゾン投与実験における各群において、網膜での EB 漏出量の測定および血管内トレーサー漏出の確認を行なった。

2.3.4a 網膜の EB 漏出

各群の網膜 EB 漏出量を Air-PBS 群と比較した結果を図 2-9a に示す。網膜の EB 漏出量は Air-PBS 群 ($3.43 \pm 1.0 \mu\text{l/g/h}$)、Air-Dex 群 (3.18

$\pm 0.95 \mu\text{l/g/h}$)、Hypox-Dex ($2.75 \pm 0.97 \mu\text{l/g/h}$) と比較し、Hypox-PBS 群 ($5.32 \pm 1.75 \mu\text{l/g/h}$) で有意に高かった ($p < 0.05$)。

2.3.4b ランタントレーサー実験

低酸素により網膜の血管バリア機能が低下している様子を画像で確認するために、ランタン塩を血管内トレーサーとして用いた TEM 観察を行なった (図 2-9b)。

各群において、ランタン塩の血管内腔への沈着が認められた。Air-PBS 群では、正常な TJ がランタン塩の細胞間隙通過を防いでいることが確認できたが、一方、Hypox-PBS 群では、ランタン塩が TJ を通過し、細胞間隙まで深く浸透していることが確認できた (図 2-9b: 矢頭)。このようなランタン塩の TJ 通過は Hypox-Dex 群では認められなかった。

また、全ての群において oBRB のランタン塩の透過は認められなかった。

2.3.5 低酸素による網膜血管バリアの各層での変化

低酸素による網膜の血管バリア破綻の詳細を知るために、デキサメタゾン投与実験における各群において、漏出が生じている層の特定と各 VPL における血管微細構造の観察を行なった。

2.3.5a 層の特定

血管から漏出した EB は灌流後にも局所に貯留していることから、漏出が生じている層を特定した。図 2-10 に示す通り、Air-PBS 群では EB は血管内に留まっているが、一方、Hypox-PBS 群では局所的な血管からの漏出が認められた (図 2-10: 矢頭)。網膜全層での Z 軸解析を行なったところ、Hypox-PBS 群における EB 漏出は網膜表層で生じていることがわかった。

2.3.5b 各層の血管微細構造

各群のマウス網膜における代表的な血管周囲の微細構造を VPL ごとに図 2-10b に示す。Air-PBS 群では全ての VPL において異常な所見は観察されなかったが、Hypox-PBS 群では、SVPL の毛細血管において、基底膜の肥厚 (図 2-11a: 矢頭)、アストロサイト足突起の空砲を伴う膨化 (図 2-11a: *)、血小板由来と考えられる小胞集合体の血管内皮への付着 (図 2-11a: 矢印) が認められた。これらの所見は IVPL、DVPL では認めず、また、Hypox-Dex 群においても、これらの所見は認められなかった。

2.3.5c oBRB の観察

低酸素による EB 漏出が iBRB だけでなく oBRB からも生じている可能性があるため oBRB の微細構造を観察した。Hypox-PBS 群において色素上皮細胞の細胞間隙は広がっているものの TJ は保たれており、網膜視細胞層の異常所見は認められなかった (図 2-11b)。

2.3.6 低酸素によるミクログリアの活性化

低酸素性血管バリア破綻へのミクログリアの関与を調べるために、デキサメタゾン投与実験における各群において、ミクログリアの形態および炎症関連遺伝子の発現を調べた。

2.3.6a 脳ミクログリアの形態変化

脳でのミクログリアの形態を調べるために Iba-1 抗体を用いた IHC を行なった。各群においてミクログリアの数に有意差は認められなかった。図 2-12a に示す通り、Air-PBS 群の全てのミクログリアが、複数の細かく枝分かれした突起を特徴したラミファイド型ミクログリアであったのに対し、Hypox-PBS 群では突起の短縮と細胞体の肥大化を特徴としたアメボイド型ミクログリアが多数認められた。Hypox-Dex 群ではアメボイド型ミクログリアはほぼ認められなかった。

2.3.6b 脳の遺伝子発現変化

VEGF、TNF α 、MCP1 の Air-PBS 群に対する相対的遺伝子発現量は、Hypox-PBS 群（それぞれ 7.14 ± 0.21 倍、 4.67 ± 0.23 倍、 8.35 ± 0.05 倍）において有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。TNF α 、MCP1 の Air-PBS 群に対する相対遺伝子発現量は、Hypox-Dex 群において Hypox-PBS 群と比較して有意に抑制された（図 2-12b）。

2.3.6c 網膜ミクログリアの形態変化

網膜でのミクログリアの形態を調べるために Iba-1 抗体を用いた網膜伸展標本における IHC を行なった。各群においてミクログリアの数に有意差は認められなかった。図 2-13a に示す通り、脳と同様、Air-PBS 群の全てのミクログリアが、複数の細かく枝分かれした突起を特徴としたラミアイド型ミクログリアであったのに対し、Hypox-PBS 群では突起の短縮と細胞体の肥大化を特徴したアメボイド型ミクログリアを多数認め、Hypox-Dex 群ではアメボイド型ミクログリアはほぼ認められなかった。

2.3.6d 網膜の遺伝子発現変化

VEGF、TNF α 、IL-1 β 、MCP1 の Air-PBS 群に対する相対的遺伝子発現量は、Hypox-PBS 群（それぞれ 3.56 ± 0.44 倍、 2.29 ± 0.35 倍、 1.68 ± 0.68 倍、 2.37 ± 1.12 倍）において有意に高く（ $p < 0.05$ ）、Hypox-Dex 群（それぞれ 1.23 ± 0.26 倍、 0.64 ± 0.14 倍、 0.84 ± 0.40 倍、 1.04 ± 0.83 倍）では Air-PBS 群と同等に抑えられていた（図 2-13b）。

2.3.7 ミクログリア減少マウスを用いた実験

低酸素性血管バリア破綻におけるミクログリアの影響を明確にするために、CSF1R 阻害薬である PLX5622 を用いてミクログリア減少マウスを作成し、病理学的変化、アストロサイト/ミューラー細胞の活性および炎症性サイトカインの遺伝子発現を調べた。

2.3.7a CSF1R 阻害薬投与によるミクログリアの減少

ミクログリアの減少を確認するために、各群の脳切片に対し Iba-1 抗体を用いた IHC を行い、Iba-1 陽性細胞の数を測定した。脳の 3 つのエリア（海馬周辺、小脳、大脳白質）において Iba-1 陽性細胞の数は有意に減少した（図 2-14a）。

2.3.7b 脳および網膜での遺伝子発現変化

IL-1 β の Air-PBS 群に対する他群の相対的遺伝子発現量は、Hypox-cont 群 (1.95 ± 1.13 倍) において高い傾向にあり、Hypox-PLX 群 (0.94 ± 0.2 倍) では Air-cont 群と同等に抑えられていたが、有意差は認められなかった（図 2-14b）。

2.3.7c 脳の Iba-1 および GFAP 染色

各群のマウスの脳の代表的な組織像を図 2-15a に示す。Iba-1 抗体を用いた IHC では Air-PLX 群および Hypox-PLX 群で陽性細胞が減少した。GFAP 抗体を用いた IHC では、Air-cont 群および Air-PLX 群と比較し、Hypox-cont 群では血管周囲の陽性領域の拡大が認められた。Hypox-PLX 群では Air 群と同等の陽性領域が認められた。

2.3.7d 網膜の Iba-1 および GFAP 染色

各群のマウスの網膜の代表的な組織像を図 2-15b に示す。Iba-1 抗体を用いた IHC では Air-PLX 群および Hypox-PLX 群で陽性細胞が減少した。GFAP 抗体を用いた IHC では、全ての群で主に NFL および GCL に陽性領域が認められた。Hypox-cont 群では、さらに IPL および OPL にも陽性領域が認められ、SVPL における血管周囲の陽性領域が他群と比べ広いことが観察された。また、拡大した GFAP 陽性領域には Iba-1 陽性細胞が存在することが確認された。

第 4 節 考察

本研究では、脳および網膜における低酸素性血管バリア破綻の詳細を調べるためにマウスを用いた実験を行なった。まず最初に各群のマウスに EB を投与し脳を観察したところ、Hypox-PBS 群では脳の色調が肉眼的に変化し、EB 漏出量が増加していた (図 2-4)。これは低酸素により脳の血管バリア破綻が生じ、アルブミンが脳実質に漏出したことが原因だと考えられる。このような低酸素性血管バリア破綻にアストロサイトが関与することがいくつかの研究で示されている。通常環境ではアストロサイト足突起が血管を包み込むことで BBB 機能が維持されているが(117, 118)、低酸素環境ではアストロサイトは血管バリアを破綻させるような種々のサイトカインを放出することが知られている(61, 119)。さらに、低酸素環境ではアストロサイト足突起の膨化が起こり(50)、これが血管透過性亢進に関与することが報告されている(120)。そこで、本研究では、TEM を用いた脳血管周囲の微細構造の観察を行なった。すると、Hypox-PBS 群の血管周囲でアストロサイト足突起の空胞化と考えられる所見が認められた (図 2-5a)。次にアストロサイトの活性化マーカーである GFAP を染色したところ、Hypox-PBS 群では血管周囲の陽性領域が広がっていることが確認できた (図 2-6)。これは、アストロサイト足突起の膨化を示す所見である。本研究で認められた脳における低酸素によるアストロサイトの変化は低酸素性血管バリア機能低下の原因の 1 つだと考えられる。

低酸素性血管バリア破綻が問題となるのは脳だけではない。網膜は発生学的には脳の一部と捉えられ、両者とも神経と血管が密接に関係する神経血管ユニットを形成しているため、血管バリア破綻は神経系の機能維持に重大な影響を与えることが知られている。特に失明の原因となる DR や AMD などの疾患では低酸素性血管バリア破綻が病態の中心を成す。網膜は脳と比べ血管走行などの構造が単純なため血管バリアに関する研究が行いやすく、さらに、網膜は脳と違い、眼底鏡を用いることで実験動物を殺さずに容易に観察できるという点でも有利

であるため、中枢神経系の血管に関する研究で多く用いられる。そこで、本研究では網膜における低酸素性血管バリア破綻についても調べた。

まず、眼底観察を行なったところ、図 2-7 に示す通り、FP および FFA で低酸素曝露による網膜血管の拡張が観察された。これまでに、高所滞在による網膜における動静脈の血管拡張が報告されており(49, 121)、本研究の結果はこれらの報告と矛盾しない。脳においても、網膜と同様に低酸素による血管拡張が生じている可能性があり、これは組織低酸素における脳圧亢進に寄与すると考えられる。また、ヒト(47)および実験動物(122)において、数週間の低酸素曝露で網膜出血が報告されている。本研究では白斑や出血は認めていないが、おそらく 24 時間の低酸素曝露では白斑、微小動脈瘤、出血などの病理変化が生じるには十分な時間ではないのだろう。次に、EB 投与実験を行なったところ、網膜血管からの EB 漏出量も、脳血管と同様、低酸素曝露によって増加することが確かめられた。TEM による血管微細構造観察と GFAP の染色では、Hypox-PBS 群でアストロサイト/ミュラー細胞の足突起の膨化および GFAP 陽性領域の拡大が認められた。ここまでの結果は脳と同様であるが、網膜においてはこれらの結果に加え、各層で低酸素による血管バリアへの影響が異なることが示唆されたため、層ごとの低酸素曝露の影響を比較した。

その結果、低酸素曝露によって網膜表層(NFL および GCL)の浮腫性変化と、これらの層の肥厚を認め、他の層では厚さの変化は認められなかった(図 2-8a,b)。すなわち、網膜中層や深層から浮腫を生じる DR や RVO と異なり、24 時間の低酸素曝露ではこれらの層での細胞外浮腫は生じないことが明らかになった。さらに、Hypox-PBS 群において GFAP 陽性領域は浮腫性変化と一致して網膜表層を中心に増加した(図 2-8c)。TEM で網膜微細構造を観察すると、網膜表層において毛細血管周囲を取り囲む細胞(アストロサイトもしくはミュラー細胞と思われる)の空胞化が認められたが(図 2-11a)、このような所見は網膜中層および深層では認められなかった。これまでに、糖尿病モデル動物などいくつかの実験動物で網膜血管の透過性変化について報告されてい

る(123, 124)。新生仔マウスにおいて低酸素曝露後の TJ タンパクの再分配が透過性亢進に寄与しているとの報告があるが(51)、野生型成獣マウスにおける低酸素の網膜血管バリアに対する直接的な影響は報告されていない。野生型成獣マウスを用いた本研究では、低酸素曝露により網膜表層のみでの血管からの漏出が確認された(図 2-10a)。また、図 2-10c で示した通り、Air-PBS 群においても oBRB の TJ は保たれているように見える。oBRB は iBRB と比べ低酸素への耐性があることが知られており(50, 125)、本研究の結果と矛盾しない。すなわち、図 2-9a に示した EB 漏出増加は、おそらく網膜表層の血管からの漏出が主な原因だろう。さらに、高電子密度のランタン塩をトレーサーとした TEM 観察で、トレーサーの TJ を通過する様子が観察されたが、この所見は Hypox-PBS 群の表層のみで認め、他の群、および中層・深層では認められなかった(図 2-9b)。これらの所見から、低酸素による iBRB 破綻は網膜表層のみで生じていることが初めて明らかになった。また、このモデルマウスで生じている網膜表層の浮腫は、黄斑浮腫の初期病態の可能性もある。網膜表層の病態変化をより詳しく調べることは、低酸素が関係する病態の診断および治療の発展に寄与するだろう。

低酸素によって網膜表層のみで血管バリア破綻が生じる理由としてアストロサイトの影響が考えられる。アストロサイトは網膜表層にのみ存在することから(70)、SVPL ではアストロサイトが低酸素により活性化および膨化し、表層の浮腫性変化を引き起こしたと考えて矛盾しない。これは網膜表層の血管バリアは他の層と比べて低酸素への感受性が高いと言い換えることができるだろう。しかしながら、本研究では IVPL や DVPL においても Hypox-PBS 群での GFAP 陽性領域の増加を認めており、これは表層にのみ存在するアストロサイトだけではなく全層に存在するミューラー細胞も活性化していることを示している(図 2-8c)。これまでの報告では、アストロサイトとミューラー細胞の iBRB 維持への役割の違いは明らかにされていないが、低酸素によるバリア破綻においてはアストロサイトの影響が大きい可能性が示唆された。

本研究では、デキサメタゾンにより低酸素性血管バリア破綻が抑制

されたが、そのメカニズムとして炎症性サイトカインの阻害が考えられる(126)。炎症性サイトカインは脳および網膜において主にミクログリアによって産生され、炎症プロセスを促進すると共に、HIF-1 α および VEGF を活性化することで血管バリア破綻を促すことが知られている(127-130)。そこで、本研究では、ミクログリアと炎症性サイトカインに焦点を当て観察を行なった。その結果、脳および網膜において低酸素曝露によるミクログリアの形態変化と炎症性サイトカインの遺伝子発現の増加およびデキサメタゾンによる抑制効果が観察された(脳においては IL-1 β の遺伝子発現の変化は認められなかったが、これは脳における IL-1 β の発現量が極めて微量であり、本研究で行なった方法では遺伝子発現量の変化を感知できなかったことが原因だと考えられる)(図 2-12, 図 2-13)。炎症性サイトカインによる血管バリア破綻に関する報告は多い。例えば、TNF α は VEGF 同様、内皮細胞の透過性を上げ(131)、脳浮腫形成の重要な役割を担っていることが報告されている(132)。また、TNF α の硝子体注射により iBRB の破綻をきたすことや(133)、IL-1 β も iBRB 破綻に関与することが知られている(134)。さらに、低酸素による TNF α や IL-1 β の網膜での増加や、これによる iBRB 破壊が報告されている(50, 135)。これらの炎症性サイトカインは主にミクログリアによって産生されたと考えられる。ミクログリアは脳および網膜の主要な免疫担当細胞で、脳の恒常性をモニターしており、微生物の侵入や低酸素曝露などの刺激に直ちに反応し、炎症プロセスを促進させる(その影響は有益にも有害にもなる)(136, 137)。例えば、RVO モデル動物ではミクログリアの活性化を伴う iBRB 破綻が観察された(138)。また、虚血再灌流モデル動物において、活性化ミクログリアが産生する炎症性サイトカインを抑制すると BRB 破綻が軽減された(139)。これらの既報から、低酸素環境ではミクログリアが産生する炎症性サイトカインによって血管バリア破綻が生じることが理解できる。これに加え、低酸素により活性化したミクログリアは自ら炎症性サイトカインを放出するだけでなく、血管バリア構成細胞での VEGF や炎症性サイトカイン産生を高めることが知られている(140)。つまり、

本研究で観察された低酸素による GFAP 陽性細胞（アストロサイト/ミューラー細胞）の活性化はミクログリアを介した現象の可能性がある。この仮説を立証するために細胞実験を行なったが、その詳細は第 3 章で論述する。

デキサメタゾン
は脳浮腫に対して最も一般的に使用される副腎皮質ステロイドである(126)。副腎皮質ステロイドの主要な機能は炎症性サイトカインを抑制することである。副腎皮質ステロイドによって抑制される最も代表的なサイトカインの 1 つが MCP1 で、デキサメタゾンによってミクログリアにおける MCP1 産生が抑制されることが知られている(141)。さらに、低酸素に曝露したラットにおいて、MCP1 を阻害することで血管透過性亢進が抑制されることが報告されている(142)。また、デキサメタゾンは炎症性サイトカインを抑制するだけでなく、HIF-1 の核内への移動を阻害することで、VEGF などの標的遺伝子の転写を抑制することも知られている(143)。デキサメタゾンによって脳のアストロサイトと周皮細胞での VEGF 産生が減少し、血管透過性亢進を抑制したとの報告がある(109)。また、糖尿病モデルラットの網膜において、ステロイドによる VEGF の調節と BRB の安定化が知られている(144)。我々は、これらの既報を支持する結果として、デキサメタゾンによる VEGF や炎症性サイトカインの発現抑制を確認したが、これに加え、低酸素性のアストロサイト/ミューラー細胞足突起膨化がデキサメタゾン投与によって抑えられることも合わせて確認した。さらに、我々は、デキサメタゾンは炎症プロセスの中心を担うミクログリアの活性化を抑制することを明らかにした。つまり、低酸素環境においてミクログリアの活性化を抑制することが、血管バリア維持に重要かもしれない。

この仮説を証明するために、CSF1R 阻害薬を用いてミクログリア減少モデルマウスを作成し、ミクログリアの低酸素性血管バリア破綻への影響を調べた。作成した実験動物の数が少なかった為、血管バリア機能の変化を直接確認することはできなかった。ミクログリア減少による IL-1 β 発現の抑制傾向を認めたものの有意差は確認できなかった

(図 2-14)。ミクログリア減少モデルマウスにおいてはアストロサイト/ミュラー細胞における GFAP 活性も抑制されていることが観察された (図 2-15)。すなわち、ミクログリアは低酸素環境で炎症プロセスを促進させると共に、アストロサイト/ミュラー細胞を活性化させることで血管バリア破綻に寄与している可能性が示唆された。

第 3 章

脳血管内皮細胞における

低酸素性タイトジャンクション破綻

第 1 節 イントロダクション

3.1.1 タイトジャンクション (TJ) 構造

3.1.1a 基本構造

TJ は、1963 年に Farquhar と Palade が発表した 3 種類の細胞間接着分子構造の 1 つで (図 3-1)、隣り合う上皮細胞同士を膜状に密着させた形態で、透過性バリアとして膜の内側と外側を隔てる機能を有することが報告された(145)。TJ を構成する最も代表的な分子がクローディンとオクルディンである。クローディンは、哺乳動物においては 27 種類が確認されており、発現するクローディンの組み合わせによりバリアの特性が決定されると考えられている(146)。発現するクローディンの組み合わせは臓器や細胞によって異なるが、血管内皮細胞においては、主にクローディン-5 が発現していることが報告されている(147-158) (表 1)。クローディン-5 ノックアウトマウスでは BBB が破綻して脳血管の透過性が著しく亢進し、生後 1 日以内に致死となるなどの報告があり(156)、クローディン-5 は BBB 機能に不可欠な分子で、その発現量が BBB のバリア強度を決定するというのが定説となっている。また、オクルディンはそのリン酸化によってバリア機能をきめ細かく調節しているものと考えられている(159)。さらに、ZO タンパクがクローディンおよびオクルディンに結合し細胞骨格アクチンに連結させることで細胞質側を裏打ちし、様々な分子と相互作用をすることが知られている(160)。ZO タンパクは 3 種類 (ZO-1, ZO-2, ZO-3) が知ら

れているが、その役割の違いはわかっていない。最も初期に同定された ZO-1 は、TJ への濃縮が極めてよいことから TJ 形成のすぐれたマーカーとして多くの研究で利用されている。

3.1.1b 周囲の細胞との相互作用

TJ は流動的な構造で、タンパク相互作用によって細胞内での再分配、発現量変化、翻訳後修飾が素早く行われる(161, 162)。また、第 2 章で論じた通り、血管周囲の細胞も TJ 発現とバリア機能に影響を与えることが知られている。その例として、血管内皮細胞は自発的に TJ を多くは発現しないが血管周囲のアストロサイトや周皮細胞などによって誘導されるなどの報告がある(161, 163, 164)。我々はその中でもアストロサイトおよびミューラー細胞に着目している。なぜならこれらの細胞は足突起で血管を覆うことで、神経線維の状態をモニターしながら TJ の恒常性を維持していると考えられているからである。

3.1.2 低酸素による TJ 破綻

培養された内皮細胞を低酸素に曝露すると、ZO-1 とクローディン-5 のタンパク発現が減少し透過性亢進が生じた、などの報告はあるものの(165) (98)、低酸素による TJ 破綻に関する詳細なメカニズムは解明されていない(本章第 4 節にて論じる)。最近の研究で、内皮細胞だけでなく、血管周囲の細胞が TJ に影響を与えることが明らかになりつつある。低酸素による VEGF の増加は TJ 破綻を引き起こす最も重要な要因の 1 つであるが、VEGF はアストロサイト/ミューラー細胞などのグリア細胞で多く産生されることが知られている。これらの細胞は脳および網膜で最もありふれたグリア細胞で TJ 維持に必須であるが(92, 166-168)、脳や網膜における主要な VEGF 供給源としても知られているため(169)、低酸素による TJ 破綻に深く関与していることが示唆される。さらに、低酸素環境では活性化したミクログリアが炎症プロセスを促進し、TJ 破綻を助長することが知られている。以下、低酸素環境での各細胞の TJ への影響を論じる。

3.1.2a 低酸素環境でのアストロサイトと TJ

アストロサイトは、動物実験において低酸素により活性化し、神経保護および神経障害に関わる多くの因子を放出することが報告されている(7, 170-172)。ヒトアストロサイトにおける低酸素反応性遺伝子についてマイクロアレイで解析したところ、1100 以上の遺伝子が活性化し、これは抑制された遺伝子の 5 倍以上の数であった。特に、解糖と血管新生に関わる遺伝子発現が増加した(173)。

このように、低酸素により活性化したアストロサイトは TJ 保護と TJ 破綻の両面に関わることが知られているが、ここに TJ 保護に関する報告をいくつか示す。アストロサイトと内皮細胞の共培養では内皮細胞の単培養と比べて、低酸素環境で抗酸化酵素が活性化し、酸化物質による内皮細胞の障害が軽減した(56, 57)。別の細胞実験でも、アストロサイトと内皮細胞の共培養によって、低酸素環境下での内皮細胞のバリア機能が向上した(58-60)。これらの報告ではいずれも、アストロサイトは ZO-1 やクローデイン-5 のような TJ 関連タンパクの局在を保護していた(60, 83)。また、アストロサイト存在下では低酸素によるカドヘリン（細胞接着分子の 1 つ）の減少が部分的に改善した(174)。低酸素処理したアストロサイトの培養液で内皮細胞を処理すると、内皮細胞におけるオクルディンの発現が上昇した(175)。さらに、アストロサイトとの共培養で低酸素での内皮細胞の caspase3 活性を和らげた(58, 176)。

一方、低酸素により活性化したアストロサイトが TJ 破綻に関与することを示した報告も多い。アストロサイトは脳における主要な VEGF の源で、低酸素に反応しより多くの VEGF を誘導し放出する。VEGF は強力な血管新生分子であると同時に血管透過性を強く誘導する(45, 55)。低酸素環境でのアストロサイトとの共培養はバリア保護作用を有するにも関わらず、同時に VEGF シグナルの阻害もバリア機能維持に貢献する(83)。この結果を支持するように、アストロサイト由来の VEGF は低酸素曝露(7)や脳の炎症(177)で BBB 破綻を引き起こすこと

が報告されている。また、低酸素環境でのアストロサイトからの matrix metalloproteinase (MMP) 分泌もバリア機能低下を誘導することが知られている。MMP2,9,13 の活性上昇が低酸素でのアストロサイト培養液で認められ、この上清で処理された内皮細胞は MMP13 依存性に ZO-1 の再分配とカドヘリンの破綻を誘導した(178)。さらに、アストロサイトは低酸素に反応して様々なサイトカインを放出する。例えば、IL-1 β は HIF-1 の標的遺伝子の 1 つで(61)、これはアストロサイト内で VEGF 発現を NF- κ B 依存的に活性化し、血管安定化因子 (vessel-stabilizing factor; SSeCKs) を減少させる(177)。また、HIF-1 依存的に MCP-1 がアストロサイトで産生されることも報告されている(179)。MCP1 は炎症局所に白血球を呼び寄せる機能の他にも、Rho シグナルを通じて内皮細胞の透過性を亢進させる機能を有することが示されている(62, 180)。

3.1.2b 低酸素環境でのミュラー細胞と TJ

ミュラー細胞は網膜組織におけるグリア細胞の一種であり、その機能はアストロサイトと類似している(117)。すなわち、低酸素環境での TJ への影響もアストロサイト同様、TJ 保護と TJ 破綻の両面を有すると考えられる。低酸素環境下におけるミュラー細胞の TJ への影響に関する直接的な報告は少ないが、ミュラー細胞由来の VEGF が低酸素関連網膜疾患において重要な因子となっていることが明らかになってきた。DR、AMD、未熟児網膜症 (ROP; retinopathy of prematurity) などの低酸素関連網膜疾患において、VEGF が血管からの漏出と網膜血管新生の重要な役割を担うことが知られているが(181-185)、特にミュラー細胞由来の VEGF は BRB 破壊の刺激として重要だということが報告されている。例えば、VEGF の遺伝子発現およびタンパク発現は ROP モデルマウスにおいてミュラー細胞に限局していた(166)。また、ミュラー細胞由来の VEGF が、ROP や DR における網膜血管新生と血管からの漏出の主要な要因かどうかを確かめる為、ミュラー細胞特異的に VEGF をノックアウトしたマウスを作成したところ、通常酸素環境およ

び ROP モデルマウスと糖尿病モデルマウスで大幅な VEGF 消失が認められた(102, 167, 186, 187)。この結果はミュラー細胞が VEGF の主要供給源である可能性を示唆している。ミュラー細胞由来 VEGF の血管新生への関与を調べたところ、ミュラー細胞特異的 VEGF ノックアウト ROP モデルマウスでは血管新生が 40%減少し、血管からの漏出は 56%減少した(167)。同様にミュラー細胞特異的 VEGF ノックアウト DM モデルマウスでは血管からの漏出が 59%減少した(102)。また、ミュラー細胞由来 VEGF は DR 関連タンパクの発現および修飾と炎症反応を引き起こすことがわかった。これらは血管からの漏出や網膜出血といったより深刻な病態の引き金になる可能性がある(188-190)。さらに、angiopoietin-like4 もまた低酸素によりミュラー細胞での産生が増え、内皮細胞におけるクローデイン-5 の発現を減少させることで透過性亢進に寄与することが知られている(191)。これに加え、最近の研究で、ミュラー細胞はミクログリアと共培養することでより多くの VEGF を産生することが報告された(192)。

3.1.2c 低酸素環境でのミクログリアと TJ

第 2 章で論じた通り、低酸素環境においてミクログリアは活性化し、TNF α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインを産生することで血管バリア破綻に寄与すると考えられている(127-130) (本章第 4 節にて詳述)。しかしながら、低酸素環境でこれらの細胞が TJ 構造およびバリア機能にどのような影響を及ぼすかはわかっていない。

3.1.3 本章の目的

そこで我々は、低酸素性の TJ 破綻における各細胞の影響を明らかにするために、脳血管内皮細胞株 (bEnd.3) と網膜ミュラー細胞株 (QMMuC-1) を用いて血管バリアを模した 2 層の細胞シート (バリア細胞シート) を作成した。本研究ではバリア細胞シートを低酸素環境で培養し、さらに、脳ミクログリア細胞株 (BV2) と共培養した。また、IL-1 β をバリア細胞シートの培地に加えた。このような条件での TJ 構

造およびバリア機能の変化を詳細に調べることで、低酸素性血管バリア破綻における各細胞の影響を明らかにすることが本章の目的である。

第 2 節 材料と方法

3.2.1 細胞の単培養

3.2.1a bEnd.3

bEnd.3 (マウス脳血管内皮不死化細胞株) を American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 450 mg/dl グルコースおよび 10% ウシ胎児血清 (FCS; fetal calf serum) を添加した培養液中で、37 °C・湿潤・95% 空気・5% 二酸化炭素の条件を満たすチャンバー内で培養され、3 日ごとに培地交換が行われた。80% コンフルエントに達したら 0.25% トリプシン/EDTA 溶液を用いて細胞を剥がし、1 : 5 の割合で継代した。

3.2.1b BV2

BV2 (マウスミクログリア不死化細胞株) を American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。この細胞は表現形、機能共にミクログリアの特徴を示し、炎症に関する研究で多く用いられている。細胞は DMEM に 10% FCS を添加した培養液中で、37 °C・湿潤・95% 空気・5% 二酸化炭素の条件を満たすチャンバー内で培養され、3 日ごとに培地交換が行われた。1 週間に 2 回、0.1% トリプシン/EDTA 溶液/EDTA 溶液を用いて細胞を剥がし、1 : 10 の割合で継代した。

3.2.1c QMMuC-1

Queen's University Murine Müller glia Clone-1 (QMMuC-1、マウス網膜ミユラー不死化細胞株) を使用した。この細胞は、初代培養ミユラー細胞と同様の性質を持ち、かつ複数回の継代後もその性質は保持されることが確認されている(193)。細胞は DMEM に 10% FCS を添加した培養液中で、37 °C・湿潤・95% 空気・5% 二酸化炭素の条件を満たすチャンバー内で培養され、3 日ごとに培地交換が行われた。80% コンフルエントに達したら 0.1% トリプシン/EDTA 溶液を用いて細胞を剥

がし、1 : 6 の割合で継代した。

3.2.2 バリア細胞シートの作成

バリア細胞シートを bEnd.3 および QMMuC-1 を用いて作成した。血管バリアの血管内側と血管外側を表現するために、 $0.4 \mu\text{m}$ の小孔を持つカルチャーインサート半透膜 (Corning Inc., ME, USA) の底面に QMMuC-1 (5.0×10^4 細胞/ cm^2) を播種し、2 時間後に転倒させ、上面に bEnd.3 (1.0×10^5 cells/ cm^2) を播種した。QMMuC-1 と bEnd.3 はカルチャーインサート半透膜の小孔を介して連絡できる。このモデルは DMEM に 10% FCS を添加した培養液中で作成された (図 3-2)。

3.2.3 BV2 との共培養

カルチャーインサート半透膜上で培養された bEnd.3 単層細胞シートおよびバリア細胞シートを BV2 培養中の培養液に浸すことにより、BV2 との共培養を行い、24 時間後に各実験を開始した (図 3-2)。

3.2.4 バリア機能評価

カルチャーインサート半透膜上で作成された bEnd.3 単層細胞シートおよびバリア細胞シートのバリア機能を以下の 3 つの方法で評価した。

3.2.4a EB 色素の透過性

EB 色素を用いてアルブミンに対するバリア機能の経時的变化を評価した。bEnd.3 単層細胞シートが完成した後、DMEM+10%FCS に溶解した EB (0.67 mg/mL) を膜の上側に添加した。低酸素で 2 時間あるいは 6 時間培養した後、膜の下側から培養液 $100 \mu\text{L}$ を採取し、 620 nm に対する吸光度を測定することで、膜を通過した EB の量を評価した。

3.2.4b FITC の透過性

FITC を用いてより詳細なバリア機能の評価した。bEnd.3 単層細胞シートおよびバリア細胞シートが完成した後、DMEM に溶解した

FITC(100 µg/mL)を膜の上側に添加した。低酸素で6時間培養した後、膜の下側から培養液 100 µL を採取し、これに 492 nm の励起光を照射し 520 nm の蛍光波長を測定することで膜を透過した FITC の量を評価した。測定結果は、細胞を含まないカルチャーインサート半透膜での結果と比較した。

3.2.4c TEER

上皮細胞では、タイトジャンクションによって頂上側と基底側との間でイオンの透過が制限されているため、TEER（経上皮電気抵抗）が生じる。TEER は測定法も簡便なことから、透過性の指標として広く用いられている(194)。

TEER を、epithelial volt-ohm meter (EVOM; LMS Co., 東京)を用いて、膜が完成するまでは 24 時間ごとに、低酸素培養中は 2 時間ごとに測定した。測定結果から細胞を含まないカルチャーインサート半透膜での結果を減ずることで TEER の値を補正した。

3.2.5 LDH 測定

IL-1 β の細胞障害性を調べるために、培養細胞から培養液中に放出された Lactate dehydrogenase (LDH) を Cytotoxicity Detection Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いて測定した。結果はコントロールと比較することで評価した。

3.2.6 低酸素培養

温度コントロール可能で湿潤な低酸素チャンバー(Coy Laboratories, MI, USA)を用いて、細胞を 37 °C、1%酸素で培養した。その際、1%酸素と平衡状態となった培養液を用いることで、細胞を瞬時に低酸素に曝露した。また、これらの細胞に対して用いられた全ての試薬類は 1%酸素と平衡状態とした。

3.2.7 免疫細胞化学染色 (ICC)

ウェルおよびカルチャーインサート半透膜上で培養された bEnd.3 を 1.5% PFA で 10 分間固定した後、免疫細胞化学染色 (ICC; immunocytochemistry) を行なった。カルチャーインサート半透膜の場合は、膜を切り取り、別のウェルに移した後、以後の手順を行なった。PBT で洗浄の後、0.1% Triton x-100 で 10 分間処理し、1% ウシ血清アルブミンと共に室温で 30 分間インキュベートした。1 次抗体反応は、抗 HIF-1 α 抗体 (Invitrogen, CA, USA) (1:100 希釈)、抗 ZO-1 抗体 (Invitrogen) (1:250 希釈) および抗クロードイン-5 抗体 (Invitrogen) (1:100 希釈) を 4 °C で一晩行った。PBT でよく洗浄した後、Alexa-Fluor 546 もしくは 488 結合 2 次抗体 (Invitrogen) (1:200 希釈) と共に室温で 1 時間インキュベートした。核を Vectashield medium-containing DAPI (Vector Laboratories, Brulingame, CA, USA) で対比染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica SP8, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

3.2.8 遺伝子の発現解析

サンプルとする細胞を 24 ウェルで培養した。共培養を行う場合は、カルチャーインサート半透膜上でサンプル以外の細胞を培養し、低酸素曝露の 24 時間前にサンプルを培養しているウェルに挿入することで共培養を開始した。コントロール群についても同様の処置を行なった。サンプル細胞の全 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて抽出し、続いて SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて RNA に対応する cDNA を作成した。使用したプローブ (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) は以下の通りである。VEGF (Vegfa, Mm00437304)、ZO-1 (Tjp1, Mm00493699_m1)、クロードイン-5 (Cldn5, Mm00727012_s1)、GFAP (Gfap, Mm01253033)、IL-1 β (Il1b, Mm00434228)、TNF α (Tnfa, Mm00443258_m1)。また、18S rRNA (Rn18s, Mm03928990_g1) を内在性コントロールとして用いた。7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems,

Massachusetts, USA) を用いて $\Delta\Delta$ CT 法により定量 RT-PCR 解析を行った。各因子の mRNA レベルは 18S rRNA を基準とした相対発現量で示した。

3.2.9 IL-1 β の培地への添加

bEnd.3 を 24 ウェルで培養しコンフルエントを確認後、1) コントロール群 (通常培養)、2) IL-1 β 添加群 (IL-1 β (10 ng/ml) を培地に添加)、の 2 群に分け、6 時間培養した後、上述の方法で ZO-1 に対する ICC を行なった。

3.2.10 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

培地中の IL-1 β および VEGF のタンパク濃度をそれぞれ IL-1 β ELISA kit (ELISA MAX Deluxe Set, Biolegend, california, USA) および VEGF ELISA kit (DuoSet, R&D Systems, Minnesota, USA) を用いて測定した。

3.2.11 統計解析

全ての統計解析には jmp pro14 を使用した。データは平均値 \pm 標準偏差で示した。平均値の比較は、対応のない一元配置分散分析により有意性を確認したのち、多重比較には Tukey 検定を用いた。有意水準は 5%未満とした。

第3節 結果

3.3.1 bEnd.3 単層細胞シートの観察

脳血管内皮細胞の低酸素によるバリア破綻を確認するために、bEnd.3 単層細胞シートを用いて、通常環境および低酸素環境での TJ 構造およびバリア機能を評価した。

3.3.1a HIF-1 α 発現 (bEnd.3 単層細胞シート)

bEnd.3 単層細胞シートに対し、HIF-1 α 抗体を用いた ICC を行なったところ、通常環境では陽性領域はほとんど認められなかったが、低酸素曝露後 2 時間および 6 時間では核および細胞質での陽性領域が認められた (図 3-3a)。

3.3.1b 低酸素曝露による TJ 構造の変化 (bEnd.3 単層細胞シート)

bEnd.3 単層細胞シートにおける TJ 構造を調べるために、通常環境および低酸素曝露後 2 時間および 6 時間に TJ タンパク質の局在を観察した。ZO-1 抗体およびクローディン-5 抗体を用いた ICC では、通常環境では細胞境界に一致した陽性領域が認められた。一方、低酸素曝露後 2 時間および 6 時間では陽性領域の細胞境界からの逸脱 (図 3-3b: 矢印) および細胞質での蓄積 (図 3-3b: 矢尻) が認められたが、これらの変化は微小であった。

3.3.1c 低酸素曝露による TJ 機能の変化 (bEnd.3 単層細胞シート)

bEnd.3 単層細胞シートにおけるバリア機能を調べるために、通常環境および低酸素曝露後 2 時間と 6 時間での EB 透過性、および低酸素曝露後 2 時間ごとの TEER を測定した。bEnd.3 単層細胞シートでのアルブミン結合 EB の透過性は、6 時間の低酸素曝露による有意な変化は認められず (図 3-3c)、また、TEER も有意な変化は認められなかった (図 3-3d)。

3.3.2 bEnd.3 単層細胞シートの BV2 との共培養

脳血管内皮細胞の低酸素によるバリア破綻へのミクログリアの影響を確認するために、bEnd.3 単培養群と bEnd.3+BV2 共培養群について、通常環境と低酸素環境での TJ 構造およびバリア機能を評価した。

3.3.2a 低酸素曝露による TJ 構造の変化(bEnd.3 単層細胞シート+BV2)

bEnd.3 単層細胞シートにおける TJ 構造変化への BV2 の影響を調べるために、単培養群と共培養群における TJ タンパク質の局在を通常環境および低酸素曝露後 6 時間で観察した。ZO-1 抗体を用いた ICC では、低酸素曝露前は両群（単培養群・共培養群）ともに細胞境界に一致した陽性領域が認められた。低酸素曝露後 6 時間では両群ともに陽性領域の細胞境界からの逸脱（図 3-4a: 矢印）および細胞質での蓄積（図 3-4a: 矢尻）が認められたが、共培養群においてその傾向は強く、部分的には細胞境界が不明瞭であった（図 3-4a: 矢頭）。

3.3.2b 低酸素曝露による TJ 機能の変化(bEnd.3 単層細胞シート+BV2)

bEnd.3 単層細胞シートにおけるバリア機能への BV2 の影響を調べるために、通常環境および低酸素曝露後 6 時間での FITC の透過性を両群で測定し、通常環境での単培養群と比較した。FITC の透過性は、通常環境では両群で有意差は認められなかったが、6 時間の低酸素曝露後には共培養群（ 1.77 ± 0.19 倍）が単培養群（ 1.22 ± 0.02 倍）に比べ有意に亢進した（ $p < 0.05$ 、図 3-4b）。

3.3.2c 低酸素曝露による遺伝子発現の変化（bEnd.3 単層細胞シート+BV2）

bEnd.3 単層細胞シートにおける TJ 関連遺伝子発現への BV2 の影響を調べるために、単培養群と共培養群での VEGF、ZO-1、クロードイン-5 の遺伝子発現を通常環境および低酸素曝露後 6 時間で比較した（図 3-5a）。bEnd.3 における VEGF の遺伝子発現は単培養群（ 3.67 ± 0.38 倍）、共培養群（ 2.09 ± 0.26 倍）ともに低酸素曝露により有意に増大し

た ($p < 0.01$)。ZO-1 およびクローデイン-5 の遺伝子発現は単培養群では低酸素曝露による変化は認められなかった。一方、共培養群では低酸素曝露による有意な減少が認められた ($p < 0.05$ 、ZO-1: 0.42 ± 0.10 倍、クローデイン-5: 0.41 ± 0.05 倍)。

3.3.2d 低酸素曝露によりミクログリアが産生する炎症性サイトカインの遺伝子発現

bEnd.3 と共培養した際の、BV2 における炎症性サイトカインの遺伝子発現を調べたところ、IL-1 β 遺伝子の発現は低酸素曝露により有意な増加が認められた ($p < 0.05$ 、 1.87 ± 0.41 倍)。TNF α 遺伝子の発現は変化しなかった (図 3-5b)。

3.3.3 bEnd.3 単層細胞シート培養液への IL-1 β 添加の影響

脳血管内皮細胞のバリア破綻への IL-1 β の影響を確認するために、コントロール群と IL-1 β 添加群について、TJ 構造およびバリア機能を評価した。

3.3.3a IL-1 β 添加による TJ 機能の変化 (bEnd.3 単層細胞シート + IL-1 β)

bEnd.3 単層細胞シートにおけるバリア機能への IL-1 β の影響を調べるために、IL-1 β の濃度を段階的に変化させた培養液中で bEnd.3 を培養した。FITC の透過性を IL-1 β 無添加での培養と比較すると、IL-1 β 濃度が 10 ng/ml での培養において透過性が最も亢進 (1.13 ± 0.01 倍) した (図 3-6a)。この際、細胞障害の指標となる LDH 放出量に有意差は認められなかった (図 3-6b)。以後の IL-1 β を用いた実験ではこの濃度を採用した。

また、bEnd.3 単層細胞シートにおけるバリア機能への IL-1 β の影響を調べるために、IL-1 β (10 ng/ml) を培地に添加してから 2 時間ごとの TEER を測定し、IL-1 β 無添加群と比較した。TEER は IL-1 β 投与から 2 時間後に有意に低下し、6 時間後まで有意な低下が続いた (図 3-

6c)。

3.3.3b IL-1 β 添加による TJ 構造の変化 (bEnd.3 単層細胞シート +IL-1 β)

bEnd.3 単層細胞シートにおける TJ 構造変化への IL-1 β の影響を調べるために、IL-1 β (10 ng/ml) を培地に添加してから 6 時間後に ZO-1 抗体を用いた ICC を行なった。コントロール群では ZO-1 は細胞境界に一致した局在が認められた。一方、IL-1 β 投与群では ZO-1 が細胞境界から逸脱し、細胞境界が不明瞭であった (図 3-6d)。

3.3.4 バリア細胞シートの作成

脳血管内皮細胞のバリア機能および低酸素によるバリア破綻へのグリア細胞の影響を確認するために、bEnd.3 単層細胞シートと、bEnd.3/QMMuC-1 の共培養で作成した血管バリアを模した 2 層の細胞シート (バリア細胞シート) について、通常環境と低酸素環境での TJ 構造およびバリア機能を評価した。

3.3.4a 低酸素曝露による TJ 構造の変化 (バリア細胞シート)

1 つのカルチャーインサート半透膜の各面で bEnd.3 と QMMuC-1 をそれぞれ培養することで血管バリアを模した 2 層の細胞シート (バリア細胞シート) を作成した。バリア細胞シートの低酸素による TJ 構造変化を調べるために、通常環境および低酸素曝露後 6 時間における TJ タンパク質の局在を観察した (図 3-7a)。カルチャーインサート半透膜の染色は通常のウェルの染色と比べ観察が困難であったものの、ZO-1 抗体を用いた ICC で、通常環境では細胞境界に一致した陽性領域が認められた。一方、低酸素曝露後 6 時間では陽性領域の細胞境界からの逸脱 (図 3-7a: 矢印) および細胞質での蓄積 (図 3-7a: 矢尻) を認め、部分的には細胞境界が不明瞭であった。

3.3.4b 低酸素曝露による TJ 機能の変化 (バリア細胞シート)

バリア細胞シートにおける TJ 機能を調べるために、通常環境および低酸素曝露後 6 時間での FITC の透過性、および低酸素曝露後 2 時間ごとの TEER を測定した。

FITC の透過性を細胞の存在しない blank 膜と比較すると、QMMuC-1 単層細胞シートでは通常環境 (1.01 ± 0.00 倍) および低酸素環境 (0.98 ± 0.00 倍) において有意差は認められなかった。通常環境ではバリア細胞シート (0.82 ± 0.00 倍) は、bEnd.3 単層細胞シート (0.86 ± 0.01 倍) と比べ有意にバリア機能が向上しているのに対し ($p < 0.05$)、低酸素環境ではバリア細胞シート (0.87 ± 0.01 倍) は、bEnd.3 単層細胞シート (0.84 ± 0.00 倍) と比べ有意にバリア機能が抑制された ($p < 0.05$) (図 3-7b)。

また、TEER では、バリア細胞シートは、通常環境では bEnd.3 単層細胞シートと比べ有意にバリア機能が向上しているのに対し、低酸素環境では有意な透過性亢進が認められた (図 3-7c)。

3.3.5 バリア細胞シートの BV2 共培養および IL-1 β 添加

血管バリアへのミクログリアおよび炎症性サイトカインの影響を確認するために、バリア細胞シートを BV2 と共培養し、または IL-1 β を培地に加え、バリア細胞シートの TJ 構造およびバリア機能を評価した。

3.3.5a 低酸素曝露による TJ 構造の変化 (バリア細胞シート+BV2)

バリア細胞シートにおける BV2 および IL-1 β の TJ 構造変化への影響を調べるために、単培養群、共培養群、IL-1 β 添加群における TJ タンパク質の局在を通常環境および低酸素曝露後 6 時間に観察した (図 3-8a)。カルチャーインサート半透膜の染色は通常のウェルの染色と比べ観察が困難であったものの、ZO-1 抗体を用いた ICC で、通常環境では単培養群、共培養群において細胞境界に一致した陽性領域が認められた。一方、低酸素曝露後 6 時間では共培養群において陽性領域の細胞境界からの逸脱および細胞質での蓄積を認め、部分的には細胞境界が不明瞭 (図 3-8a: 矢印) であった。また、IL-1 β 投与群では、通常環境

/低酸素曝露後 6 時間ともに細胞境界が不明瞭であった。

3.3.5b 低酸素曝露による TJ 機能の変化 (バリア細胞シート+BV2)

バリア細胞シートにおけるバリア機能への BV2 の影響を調べるために、通常環境および低酸素曝露後 6 時間での FITC の透過性を単培養群と共培養群で測定した。FITC の透過性は、通常環境では両群で有意差は認められなかったが、低酸素曝露 6 時間後には共培養群が単培養群の 1.16 ± 0.01 倍と有意に亢進した ($p < 0.05$)。また、両環境で、IL-1 β 添加によりバリア細胞シートの透過性が有意に亢進した ($p < 0.05$ 、通常環境： 1.17 ± 0.01 倍、低酸素環境： 1.08 ± 0.05 倍) (図 3-8b)。

3.3.5c BV2 との共培養による IL-1 β 濃度の変化 (バリア細胞シート+BV2)

BV2 と共培養することによる培地中の IL-1 β 濃度の変化を観察するために ELISA を行なった。通常環境 (104.4 ± 10.2 pg/ml) での共培養と比較し、低酸素環境 (297.2 ± 32.6 pg/ml) で BV2 と共培養すると、培地中の IL-1 β 量が有意に増加した ($p < 0.001$ 、図 3-8c)。

3.3.6 QMMuC-1 による VEGF 産生

ミューラー細胞の VEGF 産生へのミクログリアの影響を確認するために、QMMuC-1 単培養群と QMMuC-1/BV2 共培養群について、通常環境および低酸素曝露後 6 時間での QMMuC-1 の VEGF 遺伝子発現を評価した。またミューラー細胞の VEGF 産生への IL-1 β の影響を確認するために、QMMuC-1 の培地に IL-1 β を加え、通常環境および低酸素曝露後 6 時間での培地中の VEGF 濃度を評価した。

3.3.6a 遺伝子発現

QMMuC-1 単培養での VEGF および GFAP の遺伝子発現を調べたところ、両遺伝子とも低酸素曝露による有意な発現減少が認められた ($p < 0.05$ 、それぞれ 0.48 ± 0.14 倍、 0.08 ± 0.06 倍)。BV2 と共培養した

際の QMMuC-1 における VEGF および GFAP の遺伝子発現は、両遺伝子とも低酸素曝露により有意な増加が認められた ($p < 0.05$ 、それぞれ 1.74 ± 0.35 倍、 9.35 ± 2.96 倍、図 3-9a)。

3.3.6b VEGF の濃度変化

QMMuC-1 の培地に IL-1 β を加え、通常環境および低酸素曝露後 6 時間での培地中の VEGF 濃度の変化を観察するために ELISA を行なった。通常環境 (478.7 ± 24.8 pg/ml) と比較し、低酸素環境 (574.7 ± 13.2 pg/ml) では培地中の VEGF は増加する傾向が認められた。培地中に IL-1 β を添加した場合は、通常環境 (622.9 ± 18.8 pg/ml) であっても培地中の VEGF 濃度は増加する傾向を示し、低酸素環境 (661.0 ± 8.1 pg/ml) ではさらに増加する傾向を認めたが、いずれも統計解析において有意差は認められなかった。(図 3-9b)。

第 4 節 考察

本研究では、低酸素による TJ の破綻におけるミクログリアの影響を調べるために培養細胞株を用いた *in vitro* 実験を行なった。まず始めに脳血管内皮細胞株 bEnd.3 を低酸素環境で培養したところ、2 時間ないし 6 時間の低酸素曝露により軽微な TJ の局在変化が認められた (図 3-3a)。しかし、TJ バリア機能に変化は認められなかった (図 3-3b)。また、TJ を構成する代表的なタンパク質である ZO-1 およびクロードイン-5 の bEnd.3 における遺伝子発現にも変化は認められなかった (図 3-3c)。これまでに低酸素曝露による内皮細胞単層細胞シートの TJ 構造およびバリア機能の変化について報告されているが、未だ定まった見解は得られていない。Ma らは、bEnd.3 を 1%酸素で 24 時間培養した結果、ZO-1 とクロードイン-5 の遺伝子発現およびタンパク発現が減少し透過性が亢進したことを報告している (195)。また、Hao らは、ヒト脳微小血管内皮細胞株 (hCMEC/D3) を 2%酸素で 24 時間培養した結果、ZO-1 とオクルディンのタンパク発現が抑制され TEER が減少したことを報告している (196)。さらに Hu らは、マウス網膜微小血管内皮細胞株 (mRMECs) を 1%酸素で 24 時間培養した結果、TEER が低下したことを報告している (165)。これら 3 つの報告と我々の実験結果は一致していないが、これは使用している細胞が異なることや低酸素曝露時間が我々の実験よりも長いことが原因と思われる。しかし、我々の実験と同様に bEnd.3 を 1%酸素で培養した実験において、低酸素曝露後わずか 30 分でクロードイン-5 の発現減少および TEER 低下を示した報告もある (197)。一方、ウシ脳微小血管内皮細胞株 (BBMEC) を 1%酸素で 24 時間培養した結果、TJ 構造と透過性は変化しなかったとの報告もある (97)。このように血管内皮細胞の TJ に対する低酸素の影響には様々な報告がある。

しかし、生体内での TJ の恒常性は他の細胞からの影響を受けるため、他の細胞と共培養しながら TJ に対する低酸素の影響を調べるのが重要であろう。特にミクログリアは低酸素環境で HIF 依存的に活性化し、

IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインを産生することで炎症プロセスを発動することが知られている(128-130, 198)。脳梗塞、脳腫瘍、神経変性疾患などの病態では、ミクログリアの凝集を伴う BBB 破綻を示すことや(199, 200)、BBB 破綻部位に凝集したミクログリアが血管内皮細胞を貪食することでさらなる血管からの漏出を招くことが報告されている(201)。これらの報告は、低酸素が関連する病態においてミクログリアが血管バリア破綻に寄与している可能性を示唆している。しかし、これらの報告の多くは実験動物を用いた研究であり、培養細胞を用いた血管バリアを構成する各細胞とミクログリアの相互作用についての詳細な研究は少ない。LPS (lipopolysaccharide) 刺激により活性化したミクログリアが内皮細胞の TJ タンパクを減少させるなどの報告はあるものの(202)、低酸素曝露により活性化したミクログリアによる TJ への影響を調べた研究は我々の知る限り無い。本研究では、低酸素環境において bEnd.3 を BV2 と共培養することで TJ 構造の破壊および明らかなバリア機能低下が認められた(図 3-4)。さらに、ZO-1 およびクローデイン-5 の bEnd.3 における遺伝子発現は、単培養では低酸素の影響を受けないが BV2 との共培養では低酸素により発現が低下した(図 3-5a)。すなわち、低酸素曝露によって活性化したミクログリアが血管内皮細胞の TJ 破綻を引き起こしたと考えられる。

ここまでの議論で、bEnd.3 のバリア機能低下は、低酸素環境で BV2 と共培養することにより生じることが確認されたが、このメカニズムを探るため、BV2 の低酸素による遺伝子発現変化を調べた。代表的な炎症性サイトカインである TNF α と IL-1 β について解析したところ、TNF α 遺伝子の発現は変化せず、IL-1 β 遺伝子の発現亢進が認められた(図 3-5b)。そこで、bEnd.3 の TJ における IL-1 β の影響を調べるために、bEnd.3 の培地に IL-1 β を添加し、TJ の構造および機能の変化を観察した。その結果、TJ 構造の破壊およびバリア機能の低下が IL-1 β によって生じることが確認された(図 3-6)。すなわち、低酸素性血管バリア破綻は、低酸素により活性化したミクログリアが産生する IL-1 β によって誘導された可能性が示された。

BBB および iBRB のバリア機能は血管内皮細胞だけではなく血管周囲のグリア細胞によって維持されることが知られている(63, 64)。そこで、血管内皮細胞と網膜の代表的なグリア細胞であるミュラー細胞を1つのカルチャーインサート半透膜の各面でそれぞれ培養することでバリア細胞シートを作成し、低酸素性血管バリア破綻におけるグリア細胞の影響を調べた。低酸素によるバリア細胞シートの TJ 構造の変化を、ZO-1 を染色することで観察したが、カルチャーインサート半透膜の染色は通常のウェルの染色と比べ、観察が困難であった。しかしながら、6 時間の低酸素曝露による構造変化を認め、その度合いは bEnd.3 単層細胞シートよりも重度であることが観察された (図 3-7a)。また、bEnd.3 単層細胞シート、QMMuC-1 単層細胞シート、バリア細胞シートの透過性を調べたところ、QMMuC-1 そのものにバリア機能がないこと、および通常環境では QMMuC-1 によって bEnd.3 のバリア機能が增强されていることが示された。しかし、低酸素環境では、QMMuC-1 と共培養することで、むしろ透過性が亢進していることが観察された (図 3-7b, c)。bEnd.3 単層細胞シートと同様、バリア細胞シートは低酸素環境において BV2 によってバリア機能低下を来すこと、また、IL-1 β の添加によって低酸素環境だけでなく通常環境においても透過性が亢進することが観察された (図 3-8b)。各群において培地中の IL-1 β の濃度を測定すると、低酸素環境で BV2 と共培養することで IL-1 β の濃度が増加していることが確認された (図 3-8c)。すなわち、低酸素によって活性化したミクログリアが産生する IL-1 β 、または活性化ミクログリアを介した内皮細胞やミュラー細胞が産生する IL-1 β が増加した可能性が示唆された。

ここまでの議論を総合すると、本来はバリア機能を補強しているミュラー細胞が低酸素環境では逆にバリア機能を減弱させていることがわかった。このような現象が生じる主要な原因として、ミュラー細胞が産生する VEGF が考えられたため、QMMuC-1 の VEGF 発現について調べた。QMMuC-1 単培養では VEGF の遺伝子発現は低酸素により減少したのに対し、BV2 と共培養することで低酸素での VEGF の遺伝子

発現が亢進した (図 3-9a)。単培養では低酸素曝露により VEGF 遺伝子発現が減少した理由はわからないが、同時に測定した GFAP の遺伝子発現も顕著に減少していることから、細胞全体の活性が低下した可能性が考えられた。VEGF のタンパク定量では、IL-1 β を添加することで通常環境でも VEGF が増加することが示された (図 3-9b)。これらの結果から、ミューラー細胞は、低酸素により活性化したミクログリアが産生する IL-1 β によって VEGF 産生が誘導され、内皮細胞の TJ 破綻を引き起こした可能性が示唆された。

第4章

まとめ

4.1 研究成果のまとめ

低酸素により神経組織の血管バリアが破綻することはよく知られている。近年、血管内皮細胞だけでなく血管バリアを構成するアストロサイトやミュラー細胞が低酸素性血管バリア破綻に重大な影響を与えていることがわかってきた。さらに、低酸素によるミクログリアの活性化が炎症プロセスを促進させることで血管バリア破綻に寄与することが報告されている。我々は、これらの報告を参考にマウスを用いた研究（第2章）および培養細胞を用いた研究（第3章）を行い、さらなる知見を得ることができた。

マウスを用いた研究では、低酸素曝露によって生じた全身の病理学的変化のうち、脳および網膜での血管バリア破綻について詳細な観察を行なった。組織低酸素に関連する網膜疾患では多くの場合、浮腫は網膜の中層や深層で生じるにも関わらず、今回の動物実験での直接的な低酸素曝露では網膜の浅層のみで血管バリア破綻が生じていることを発見した。また、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を確認した。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、低酸素性のアストロサイト/ミュラー細胞の活性化の抑制が認められることを明らかにした。

マウスにおける低酸素性血管バリア破綻の様子を観察した結果、血管バリア構成細胞の相互作用を理解することの重要性を認識した。そこで、培養細胞を用いることで、生体内で生じている複雑な低酸素性血管バリア破綻のメカニズムの中の細胞相互作用に焦点を当てた研究を行った。その結果、低酸素による TJ 機能の低下は TJ 関連タンパクの局在が変化することによって生じ、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 破壊に関与することが確認された。我々はこれらに加え、低酸素環境においてミクログリア存

在下ではミューラー細胞による TJ 破綻の影響はさらに大きくなることを明らかにした。このようなミューラー細胞による TJ 破綻には、低酸素曝露により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。

これらの研究成果を総合した結果、低酸素性血管バリア破綻は、低酸素曝露により活性化したミクログリアが産生する IL-1 β などの炎症性サイトカインがアストロサイトやミューラー細胞における VEGF 産生を促し、血管内皮細胞の TJ タンパクの局在を変化させることで、バリア機能を低下させていることが示唆された (図 4)。

4.2 本研究による貢献

本研究は低酸素性血管バリア破綻のメカニズム解明の一端を担うものである。低酸素性血管バリア破綻は DR や AMD などの特定の疾患で認められるだけでなく、脳梗塞や脳損傷後の二次性の病態として広く認められる。さらに、低酸素性血管バリア破綻は高山病などの低酸素曝露に起因する疾患においても、組織浮腫を形成することで重篤な機能障害を引き起こす。これまで低酸素性血管バリア破綻を来たす様々な実験モデル動物が確立されてきたが、そのほとんどが組織損傷や血管病変に付随する 2 次的な組織低酸素を呈するような、特定の疾患に着目した実験モデル動物であった。実際には、低酸素性血管バリア破綻は酸素欠乏症や高山病を含めた多くの疾患に共通した基本的病態であるにも関わらず、正常血管における低酸素曝露による血管バリア破綻に関する報告は少ない。我々は、マウスを 6%酸素に曝露することで低酸素性血管バリア破綻モデルマウスを作成することに成功した。このモデルマウスで認められる脳や網膜における病理変化は低酸素関連疾患や二次的な脳浮腫における基本的病態を反映していると考えられるが、なかでも数時間から数日の高所における低酸素曝露によって発症する高所脳浮腫 (HACE) の病態を最もよく反映していると考えられ、HACE 治療薬であるデキサメタゾンの効果も確認された。すなわち、本研究で確立した低酸素性血管バリア破綻モデルマウスの解析を進めることは、

低酸素関連疾患に対する理解の深化に貢献するだけでなく、高所滞在を余儀なくされる自衛隊の活動への基礎的知見の一助となるだろう。

また、本研究によってアストロサイト/ミユラー細胞およびミクログリアが低酸素性血管バリア破綻へ強く関与していることが明らかになった。この結果はこれらの細胞が新たな治療標的となり得ることを示している。網膜浮腫治療薬として用いられる抗 VEGF 製剤は血管バリア破綻抑制効果が期待されるものの、VEGF は血管の恒常性維持に不可欠な因子であり、長期間の抗 VEGF 製剤の全身投与によって高血圧、虚血性心疾患、脳梗塞、創傷治癒遅延など生命に関わる重篤な合併症の発生が報告されている(203)。また、抗 VEGF 抗体の局所投与によっても全身の副作用を呈する可能性があることや、抗 VEGF 療法 5 年目の AMD の 36%で網膜の全層が薄くなることなども報告されている(204)。これらの理由から、網膜全体において VEGF を抑制するのではなく、VEGF 産生細胞を治療標的とすることで VEGF の生理的な必要量を維持しつつ血管バリア破綻抑制効果を生み出す新たな治療戦略が望まれている。本研究の結果から、低酸素環境においてはミユラー細胞由来の VEGF が血管バリア破綻に関与することが明らかになった。また、ミクログリアの数的抑制によってアストロサイト/ミユラー細胞の活性化が抑制された。これらの結果から、アストロサイト/ミユラー細胞およびミクログリアを標的とした新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。

4.3 研究の限界と今後の課題

本研究ではマウスを 6%酸素に 24 時間曝露したが、この酸素濃度ではヒトは数分しか生存できない。つまりマウスとヒトの酸素欠乏に対する耐性や感受性が異なることを考慮する必要があるだろう。また、アストロサイトとミユラー細胞の血管バリア保護(もしくは破綻)に関する役割の違いもわかっていないため、本研究における細胞実験では両細胞を同等のものとみなし、ミユラー細胞を用いて実験を行なった。しかしながらミユラー細胞は網膜特異的なグリア細胞であるため、より

一般的なグリア細胞であるアストロサイトをを用いるべきだろう。さらに、本稿第2章において網膜表層のみで血管バリア破綻が生じている理由をアストロサイトとミュラー細胞の違いであると仮定しており、第3章で示したミュラー細胞に関する実験結果をアストロサイトに単純に置き換えて考えることはできない。また、周皮細胞も血管バリア機能維持への重要な役割を担っていることが知られているが、本研究では周皮細胞を用いた実験は行なっていない。すなわち、低酸素性血管バリア破綻のメカニズムをさらに詳細に検討するためには、より多くの動物種や細胞種を用いた実験を行う必要がある。

また、本研究では、低酸素性バリア破綻を引き起こす原因としてミクログリアが産生する IL-1 β の関与が示唆されたが、他の炎症性サイトカインの影響も否定できない。今後は低酸素性血管バリア破綻に対し真に影響力を持った炎症性サイトカインを探るべく、各種サイトカインの抑制実験を含めた更なる研究が求められる。

さらに、本研究では、ミクログリアを減少させることによりアストロサイト/ミュラー細胞の活性化が抑制されることを示したが、これによる血管バリア機能の変化は確認していない。薬剤の経口投与によるミクログリア減少モデルの作成と、血管バリア機能評価を含めた詳しい解析は、血管バリア破綻のメカニズム解明だけでなく、ミクログリアを標的とした新たな治療戦略の可能性を探ることにも繋がるだろう。

最後に、自衛隊には高所滞在や航空機搭乗など低酸素曝露が前提となる任務が少なからず存在するため、低酸素曝露による血管バリア破綻に関するより臨床的な研究が求められる。特に、高所へ派遣される隊員の選別に関する知見や、それらの隊員に対して行うべき低酸素性血管バリア破綻の予防法に関する研究が今後の課題として残されている。

謝 辞

本論文は筆者が防衛医科大学校医学研究科眼科学専攻に在籍中の研究成果をまとめたものです。稿を終えるにあたり、本研究実施の機会を与えていただき、また、その遂行にあたって終始ご指導いただいた防衛医科大学校眼科学講座 竹内大教授に多大なる感謝の念を捧げます。同内科学講座 木村文彦教授には審査委員長としてご助言をいただき、また、同再生発生学講座 伊藤正孝准教授には審査委員として本論文の細部にわたりご指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

快く留学を受け入れて下さり、親身にご指導いただいた Queen's University Belfast, School of Medicine, Dentistry and Biomedical Sciences, Wellcome-Wolfson Institute for Experimental Medicine の Heping Xu 教授、Mei Chen 先生、並びにラボメンバーの皆様に深謝の意を表します。

資機材の準備や実験の手伝いにご尽力いただいた唐沢容子助教、西尾佳明先生、田口麻美氏に感謝の意を表します。本眼科学講座の各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言をいただいたことに対しここに謝意を表します。

最後に、いつも応援してくれた妻の千秋に感謝いたします。

略 語

AMD; age-related macular degeneration
BBB; blood-brain barrier
bFGF; basic fibroblast growth factor
BRB; blood-retinal barrier
CSF1R; colony stimulating factor 1 receptor
DM; diabetes mellitus
DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO; dimethyl sulfoxide
DR; diabetic retinopathy
DVPL; deep vascular plexus layer
EB; Evans blue
ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay
EVOM; epithelial volt-ohm meter
FCS; fetal calf serum
FFA; fundus fluorescein angiography
FITC; fluorescein-5-isothiocyanate
FP; fundus photography
GCL; ganglion cell layer
GDNF; glial cell derived neurotrophic factor
HACE; high altitude cerebral edema
HE; hematoxylin and eosin
HIF; hypoxic inducible factor
HRE; hypoxia responsive element
iBRB; inner blood-retinal barrier
Iba-1; ionized calcium binding adapter molecule 1
ICC; immunocytochemistry
IHC; immunohistochemistry
IL; interleukin

ILM; internal limiting membrane
INL; inner nuclear layer
IPL; inner plexiform layer
IVPL; intermediate vascular plexus layer
LDH; lactate dehydrogenase
MCP1; monocyte chemoattractant protein 1
MMP; matrix metalloproteinase
NFL; nerve fiber layer
NF- κ B; nuclear factor kappa B
oBRB; outer blood-retinal barrier
ONL; outer nuclear layer
OPL; outer plexiform layer
PBS; phosphate- buffered saline
PFA; paraformaldehyde
PHD; prolyl hydroxylase
QMMuC-1; Queen's University Murine Müller glia Clone-1
QOL; quality of life
ROP; retinopathy of prematurity
ROS; reactive oxygen species
RT-PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction
RVO; retinal vein occlusion
SSeCKs; vessel-stabilizing factor
SVPL; superficial vascular plexus layer
TEER; trans-endothelial electrical resistance
TEM; transmission electron microscope
TJ; tight junction
VEGF; vascular endothelial growth factor
VHL; von Hippel Lindau
VPL; vascular plexus layer
ZO-1; zonula occludens-1

引用文献

1. Cohen PJ, Alexander SC, Smith TC, Reivich M, Wollman H. Effects of hypoxia and normocarbica on cerebral blood flow and metabolism in conscious man. *Journal of applied physiology*. 1967;23(2):183-9.
2. Lin W, Powers WJ. Oxygen metabolism in acute ischemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2018;38(9):1481-99.
3. Makoto Inada, Chiaki Inada, Ito M. What is "mountain doctor"? : Possible contributions to JSDF by doctors with Diploma in Mountain Medicine. *National defense medical journal*. 2017;64(5):139-48.
4. Werkmeister RM, Schmidl D, Aschinger G, Doblhoff-Dier V, Palkovits S, Wirth M, Garhofer G, Linsenmeier RA, Leitgeb RA, Schmetterer L. Retinal oxygen extraction in humans. *Scientific reports*. 2015;5:15763.
5. Haugh-Scheidt LM, Linsenmeier RA, Griff ER. Oxygen consumption in the isolated toad retina. *Experimental eye research*. 1995;61(1):63-72.
6. Wong-Riley MT. Energy metabolism of the visual system. *Eye and brain*. 2010;2:99-116.
7. Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(3):1126-41.
8. Inada M, Taguchi M, Harimoto K, Karasawa Y, Takeuchi M, Ito M. Protective effects of dexamethasone on hypoxia-induced retinal edema in a mouse model. *Experimental eye research*. 2018;178:82-90.
9. Josko J, Knefel K. The role of vascular endothelial growth factor in cerebral oedema formation. *Folia neuropathologica*. 2003;41(3):161-6.
10. Bruning U, Fitzpatrick SF, Frank T, Birtwistle M, Taylor CT, Cheong A. NFkappaB and HIF display synergistic behaviour during hypoxic inflammation.

Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2012;69(8):1319–29.

11. Michinaga S, Koyama Y. Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(5):9949–75.
12. Hackett PH, Roach RC. High altitude cerebral edema. *High altitude medicine & biology*. 2004;5(2):136–46.
13. Berdowski J, Berg RA, Tijssen JG, Koster RW. Global incidences of out-of-hospital cardiac arrest and survival rates: Systematic review of 67 prospective studies. *Resuscitation*. 2010;81(11):1479–87.
14. Wako R, Yasukawa T, Kato A, Omori T, Ishida S, Ishibashi T, Ogura Y. [Causes and prevalence of visual impairment in Japan]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi*. 2014;118(6):495–501.
15. 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. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(12):5447–54.
16. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(3):1230–7.
17. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(12):5510–4.
18. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 α . *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;287(4):808–13.
19. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development*. 1997;11(1):72–82.
20. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*. 2008;30(4):393–402.
21. Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*.

2011;117(23):e207-17.

22. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*. 2010;40(2):294-309.

23. Tello D, Balsa E, Acosta-Iborra B, Fuertes-Yebra E, Elorza A, Ordonez A, Corral-Escariz M, Soro I, Lopez-Bernardo E, Perales-Clemente E, Martinez-Ruiz A, Enriquez JA, Aragonés J, Cadenas S, Landazuri MO. Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1alpha decreases oxygen consumption by inhibiting Complex I activity. *Cell metabolism*. 2011;14(6):768-79.

24. Rademakers SE, Lok J, van der Kogel AJ, Bussink J, Kaanders JH. Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1alpha, CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC cancer*. 2011;11:167.

25. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovascular research*. 2010;86(2):236-42.

26. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004;25(4):581-611.

27. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*. 2004;104(8):2224-34.

28. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *The New England journal of medicine*. 2011;364(7):656-65.

29. Dignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses. *The FEBS journal*. 2016;283(3):413-24.

30. Capitaó M, Soares R. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. *Journal of cellular biochemistry*. 2016;117(11):2443-53.

31. Oury TD, Piantadosi CA, Crapo JD. Cold-induced brain edema in mice. Involvement of extracellular superoxide dismutase and nitric oxide. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(21):15394-8.

32. Murakami K, Kondo T, Yang G, Chen SF, Morita-Fujimura Y, Chan PH. Cold injury in mice: a model to study mechanisms of brain edema and neuronal apoptosis.

Progress in neurobiology. 1999;57(3):289–99.

33. Donkin JJ, Vink R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Current opinion in neurology*. 2010;23(3):293–9.

34. Nag S, Kapadia A, Stewart DJ. Review: molecular pathogenesis of blood–brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2011;37(1):3–23.

35. Yang GY, Betz AL, Chenevert TL, Brunberg JA, Hoff JT. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood–brain barrier permeability in rats. *Journal of neurosurgery*. 1994;81(1):93–102.

36. Keep RF, Zhou N, Xiang J, Andjelkovic AV, Hua Y, Xi G. Vascular disruption and blood–brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage. *Fluids and barriers of the CNS*. 2014;11:18.

37. Chen W, Wu Y, Zheng M, Gu Q, Zheng Z, Xia X. Establishing an experimental rat model of photodynamically–induced retinal vein occlusion using erythrosin B. *International journal of ophthalmology*. 2014;7(2):232–8.

38. Ho JK, Stanford MP, Shariati MA, Dalal R, Liao YJ. Optical coherence tomography study of experimental anterior ischemic optic neuropathy and histologic confirmation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(9):5981–8.

39. Tong N, Zhang Z, Zhang W, Qiu Y, Gong Y, Yin L, Qiu Q, Wu X. Diosmin alleviates retinal edema by protecting the blood–retinal barrier and reducing retinal vascular permeability during ischemia/reperfusion injury. *PloS one*. 2013;8(4):e61794.

40. Han Z, Guo J, Conley SM, Naash MI. Retinal angiogenesis in the Ins2(Akita) mouse model of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(1):574–84.

41. Kim JH, Kim JH, Yu YS, Min BH, Kim KW. Protective effect of clusterin on blood–retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(3):1659–65.

42. Rakoczy EP, Ali Rahman IS, Binz N, Li CR, Vagaja NN, de Pinho M, Lai CM. Characterization of a mouse model of hyperglycemia and retinal neovascularization. *The American journal of pathology*. 2010;177(5):2659–70.

43. Li MM, Wu LY, Zhao T, Wu KW, Xiong L, Zhu LL, Fan M. The protective role of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) against acute hypobaric hypoxia. *Cell stress & chaperones*. 2011;16(5):529-37.
44. Bauer AT, Burgers HF, Rabie T, Marti HH. Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(4):837-48.
45. Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain : a journal of neurology*. 2002;125(Pt 11):2549-57.
46. Singh I, Khanna PK, Srivastava MC, Lal M, Roy SB, Subramanyam CS. Acute mountain sickness. *The New England journal of medicine*. 1969;280(4):175-84.
47. Frayser R, Houston CS, Bryan AC, Rennie ID, Gray G. Retinal hemorrhage at high altitude. *The New England journal of medicine*. 1970;282(21):1183-4.
48. Wiedman M, Tabin GC. High-altitude retinopathy and altitude illness. *Ophthalmology*. 1999;106(10):1924-6; discussion 7.
49. Willmann G, Gekeler F, Schommer K, Bartsch P. Update on high altitude cerebral edema including recent work on the eye. *High altitude medicine & biology*. 2014;15(2):112-22.
50. Kaur C, Sivakumar V, Yong Z, Lu J, Foulds WS, Ling EA. Blood-retinal barrier disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats: the beneficial effect of melatonin administration. *The Journal of pathology*. 2007;212(4):429-39.
51. Rathnasamy G, Sivakumar V, Foulds WS, Ling EA, Kaur C. Vascular changes in the developing rat retina in response to hypoxia. *Experimental eye research*. 2015;130:73-86.
52. Kuhlmann CR, Tamaki R, Gamerding M, Lessmann V, Behl C, Kempfski OS, Luhmann HJ. Inhibition of the myosin light chain kinase prevents hypoxia-induced blood-brain barrier disruption. *Journal of neurochemistry*. 2007;102(2):501-7.
53. Fleegal MA, Hom S, Borg LK, Davis TP. Activation of PKC modulates blood-

brain barrier endothelial cell permeability changes induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;289(5):H2012–9.

54. Yamagata K, Tagami M, Takenaga F, Yamori Y, Itoh S. Hypoxia-induced changes in tight junction permeability of brain capillary endothelial cells are associated with IL-1beta and nitric oxide. *Neurobiology of disease*. 2004;17(3):491–9.

55. Fischer S, Clauss M, Wiesnet M, Renz D, Schaper W, Karliczek GF. Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. *The American journal of physiology*. 1999;276(4):C812–20.

56. Schroeter ML, Mertsch K, Giese H, Muller S, Sporbert A, Hickel B, Blasig IE. Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. *FEBS letters*. 1999;449(2–3):241–4.

57. Ogunshola OO, Al-Ahmad A. HIF-1 at the blood-brain barrier: a mediator of permeability? *High altitude medicine & biology*. 2012;13(3):153–61.

58. Al Ahmad A, Gassmann M, Ogunshola OO. Maintaining blood-brain barrier integrity: pericytes perform better than astrocytes during prolonged oxygen deprivation. *Journal of cellular physiology*. 2009;218(3):612–22.

59. Brown RC, Mark KS, Egleton RD, Huber JD, Burroughs AR, Davis TP. Protection against hypoxia-induced increase in blood-brain barrier permeability: role of tight junction proteins and NFkappaB. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 4):693–700.

60. Fischer S, Wobben M, Kleinstuck J, Renz D, Schaper W. Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;279(4):C935–44.

61. Zhang W, Petrovic JM, Callaghan D, Jones A, Cui H, Howlett C, Stanimirovic D. Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures. *Journal of neuroimmunology*. 2006;174(1–2):63–73.

62. Stamatovic SM, Shakuji P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal*

of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2005;25(5):593–606.

63. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of disease*. 2010;37(1):13–25.

64. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood–brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain research reviews*. 2010;64(2):328–63.

65. Abbott NJ. Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of inherited metabolic disease*. 2013;36(3):437–49.

66. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiological reviews*. 2005;85(3):979–1000.

67. Paolinelli R, Corada M, Orsenigo F, Dejana E. The molecular basis of the blood brain barrier differentiation and maintenance. Is it still a mystery? *Pharmacological research*. 2011;63(3):165–71.

68. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*. 2010;58(9):1094–103.

69. Garcia–Marin V, Garcia–Lopez P, Freire M. Cajals contributions to glia research. *Trends in neurosciences*. 2007;30(9):479–87.

70. Trivino A, Ramirez JM, Ramirez AI, Salazar JJ, Garcia–Sanchez J. Comparative study of astrocytes in human and rabbit retinae. *Vision research*. 1997;37(13):1707–11.

71. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*. 2006;25(4):397–424.

72. Stewart PA, Wiley MJ. Developing nervous tissue induces formation of blood–brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail–chick transplantation chimeras. *Developmental biology*. 1981;84(1):183–92.

73. Wang F, Smith NA, Xu Q, Fujita T, Baba A, Matsuda T, Takano T, Bekar L,

Nedergaard M. Astrocytes modulate neural network activity by Ca^{2+} -dependent uptake of extracellular K^+ . *Science signaling*. 2012;5(218):ra26.

74. Tanaka M, Shih PY, Gomi H, Yoshida T, Nakai J, Ando R, Furuichi T, Mikoshiba K, Semyanov A, Itohara S. Astrocytic Ca^{2+} signals are required for the functional integrity of tripartite synapses. *Molecular brain*. 2013;6:6.

75. Davson H, Oldendorf WH. Symposium on membrane transport. Transport in the central nervous system. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1967;60(4):326–9.

76. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. 1987;325(6101):253–7.

77. Willis CL, Nolan CC, Reith SN, Lister T, Prior MJ, Guerin CJ, Mavroudis G, Ray DE. Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood–brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia*. 2004;45(4):325–37.

78. Rist RJ, Romero IA, Chan MW, Couraud PO, Roux F, Abbott NJ. F-actin cytoskeleton and sucrose permeability of immortalised rat brain microvascular endothelial cell monolayers: effects of cyclic AMP and astrocytic factors. *Brain research*. 1997;768(1–2):10–8.

79. Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass–production method to study the blood–brain barrier in vitro. *Journal of neurochemistry*. 1990;54(5):1798–801.

80. Tao–Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1987;7(10):3293–9.

81. Siddharthan V, Kim YV, Liu S, Kim KS. Human astrocytes/astrocyte–conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain research*. 2007;1147:39–50.

82. Colgan OC, Collins NT, Ferguson G, Murphy RP, Birney YA, Cahill PA, Cummins PM. Influence of basolateral condition on the regulation of brain microvascular endothelial tight junction properties and barrier function. *Brain research*.

2008;1193:84–92.

83. Al Ahmad A, Taboada CB, Gassmann M, Ogunshola OO. Astrocytes and pericytes differentially modulate blood–brain barrier characteristics during development and hypoxic insult. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(2):693–705.

84. Berezowski V, Landry C, Dehouck MP, Cecchelli R, Fenart L. Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood–brain barrier. *Brain research*. 2004;1018(1):1–9.

85. Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H. Induction of various blood–brain barrier properties in non–neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*. 1997;19(1):13–26.

86. Meyer J, Rauh J, Galla HJ. The susceptibility of cerebral endothelial cells to astroglial induction of blood–brain barrier enzymes depends on their proliferative state. *Journal of neurochemistry*. 1991;57(6):1971–7.

87. Nico B, Ribatti D. Morphofunctional aspects of the blood–brain barrier. *Current drug metabolism*. 2012;13(1):50–60.

88. Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada–Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N. Glial cell line–derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood–brain barrier. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;261(1):108–12.

89. Sobue K, Yamamoto N, Yoneda K, Hodgson ME, Yamashiro K, Tsuruoka N, Tsuda T, Katsuya H, Miura Y, Asai K, Kato T. Induction of blood–brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neuroscience research*. 1999;35(2):155–64.

90. Reuss B, Dono R, Unsicker K. Functions of fibroblast growth factor (FGF)–2 and FGF–5 in astroglial differentiation and blood–brain barrier permeability: evidence from mouse mutants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society*

for Neuroscience. 2003;23(16):6404–12.

91. Wu S, Li G, Li X, Lin C, Yu D, Luan S, Ma C. Transport of glial cell line–derived neurotrophic factor into liposomes across the blood–brain barrier: in vitro and in vivo studies. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(3):3612–23.

92. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Muller cells. *Glia*. 2013;61(5):651–78.

93. Abukawa H, Tomi M, Kiyokawa J, Hori S, Kondo T, Terasaki T, Hosoya K. Modulation of retinal capillary endothelial cells by Muller glial cell–derived factors. *Molecular vision*. 2009;15:451–7.

94. Igarashi Y, Chiba H, Utsumi H, Miyajima H, Ishizaki T, Gotoh T, Kuwahara K, Tobioka H, Satoh M, Mori M, Sawada N. Expression of receptors for glial cell line–derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood–retinal barrier of rats. *Cell structure and function*. 2000;25(4):237–41.

95. Stanimirovic DB, Friedman A. Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012;32(7):1207–21.

96. Fischer S, Wobben M, Marti HH, Renz D, Schaper W. Hypoxia–induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF–mediated changes in the expression of zonula occludens–1. *Microvascular research*. 2002;63(1):70–80.

97. Mark KS, Davis TP. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia–reoxygenation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;282(4):H1485–94.

98. 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. *The American journal of pathology*. 2007;170(4):1389–97.

99. Willis CL, Meske DS, Davis TP. Protein kinase C activation modulates reversible increase in cortical blood–brain barrier permeability and tight junction

protein expression during hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(11):1847–59.

100. Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids and barriers of the CNS*. 2012;9(1):23.

101. Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human blood–brain barrier. *Glia*. 2001;36(2):145–55.

102. Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ. Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes*. 2010;59(9):2297–305.

103. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. 2011;91(2):461–553.

104. Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, Tsirka SE. Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PloS one*. 2013;8(2):e56293.

105. Hayakawa K, Kato TA, Imamura S, Kasai N, Kanba S. Progressive brain atrophy and cognitive decline along with multiple episodes of delirium. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 2017;71(6):418–9.

106. Seki Y, Kato TA, Monji A, Mizoguchi Y, Horikawa H, Sato-Kasai M, Yoshiga D, Kanba S. Pretreatment of aripiprazole and minocycline, but not haloperidol, suppresses oligodendrocyte damage from interferon-gamma-stimulated microglia in co-culture model. *Schizophrenia research*. 2013;151(1–3):20–8.

107. Wes PD, Sayed FA, Bard F, Gan L. Targeting microglia for the treatment of Alzheimers Disease. *Glia*. 2016;64(10):1710–32.

108. Tang E, Chen Y, Luo Y. Dexamethasone for the prevention of acute mountain sickness: systematic review and meta-analysis. *International journal of cardiology*. 2014;173(2):133–8.

109. Kim H, Lee JM, Park JS, Jo SA, Kim YO, Kim CW, Jo I. Dexamethasone coordinately regulates angiopoietin-1 and VEGF: a mechanism of glucocorticoid-induced stabilization of blood–brain barrier. *Biochemical and biophysical research*

communications. 2008;372(1):243–8.

110. Fisher O, Benson RA, Wayte S, Kimani PK, Hutchinson C, Imray CHE. Multimodal analysis of the effects of dexamethasone on high-altitude cerebral oedema: protocol for a pilot study. *Trials*. 2019;20(1):604.

111. Wolman M, Klatzo I, Chui E, Wilmes F, Nishimoto K, Fujiwara K, Spatz M. Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta neuropathologica*. 1981;54(1):55–61.

112. Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(3):789–94.

113. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochemical research*. 2000;25(9–10):1439–51.

114. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;224(3):855–62.

115. Gheorghe RO, Deftu A, Filippi A, Grosu A, Bica-Popi M, Chiritoiu M, Chiritoiu G, Munteanu C, Silvestro L, Ristoiu V. Silencing the Cytoskeleton Protein *Iba1* (Ionized Calcium Binding Adapter Protein 1) Interferes with BV2 Microglia Functioning. *Cellular and molecular neurobiology*. 2020.

116. Xu J, Ling EA. Studies of the distribution and functional roles of transitory amoeboid microglial cells in developing rat brain using exogenous horseradish peroxidase as a marker. *Journal fur Hirnforschung*. 1994;35(1):103–11.

117. Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2007;245(5):627–36.

118. Zhang Y, Stone J. Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1997;38(9):1653–66.

119. Stone J, Itin A, Alon T, Peer J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. Development

of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(7 Pt 1):4738-47.

120. Stepinac TK, Chamot SR, Rungger-Brandle E, Ferrez P, Munoz JL, van den Bergh H, Riva CE, Pournaras CJ, Wagnieres GA. Light-induced retinal vascular damage by Pd-porphyrin luminescent oxygen probes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2005;46(3):956-66.

121. Rennie D, Morrissey J. Retinal changes in Himalayan climbers. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 1975;93(6):395-400.

122. Osada H, Kanamaru Y, Maruyama S. Retinal haemorrhage during sustained hypobaric hypoxia in rats. *Acta physiologica Scandinavica*. 1995;155(4):463-74.

123. Hossain A, Tauhid L, Davenport I, Huckaba T, Graves R, Mandal T, Muniruzzaman S, Ahmed SA, Bhattacharjee PS. LRP-1 Pathway Targeted Inhibition of Vascular Abnormalities in the Retina of Diabetic Mice. *Current eye research*. 2017;42(4):640-7.

124. Xiao X, Cai J, Xu J, Wang R, Cai J, Liu Y, Xu W, Sun X, Li R. Protective effects of hydrogen saline on diabetic retinopathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2012;28(1):76-82.

125. Johnson NF, Grierson I. Post-mortem changes in the rabbit retina. A study by light microscopy. *Acta ophthalmologica*. 1976;54(5):529-41.

126. Kaal EC, Vecht CJ. The management of brain edema in brain tumors. *Current opinion in oncology*. 2004;16(6):593-600.

127. Dudvarski Stankovic N, Teodorczyk M, Ploen R, Zipp F, Schmidt MHH. Microglia-blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta neuropathologica*. 2016;131(3):347-63.

128. Yang Z, Zhao TZ, Zou YJ, Zhang JH, Feng H. Hypoxia Induces autophagic cell death through hypoxia-inducible factor 1alpha in microglia. *PloS one*. 2014;9(5):e96509.

129. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and

their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2013;39(1):3–18.

130. Patel AR, Ritzel R, McCullough LD, Liu F. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. 2013;5(2):73–90.

131. Abe Y, Sekiya S, Yamasita T, Sendo F. Vascular hyperpermeability induced by tumor necrosis factor and its augmentation by IL-1 and IFN-gamma is inhibited by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1990;145(9):2902–7.

132. Lv S, Song HL, Zhou Y, Li LX, Cui W, Wang W, Liu P. Tumour necrosis factor-alpha affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in acute liver failure. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2010;30(8):1198–210.

133. Viores SA, Xiao WH, Shen J, Campochiaro PA. TNF-alpha is critical for ischemia-induced leukostasis, but not retinal neovascularization nor VEGF-induced leakage. *Journal of neuroimmunology*. 2007;182(1–2):73–9.

134. Martiney JA, Litwak M, Berman JW, Arezzo JC, Brosnan CF. Pathophysiologic effect of interleukin-1b in the rabbit retina. *The American journal of pathology*. 1990;137(6):1411–23.

135. Kaur C, Rathnasamy G, Ling EA. Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2013;8(1):66–78.

136. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* (New York, NY). 2005;308(5726):1314–8.

137. Maki T, Hayakawa K, Pham LD, Xing C, Lo EH, Arai K. Biphasic mechanisms of neurovascular unit injury and protection in CNS diseases. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2013;12(3):302–15.

138. Ebnetter A, Kokona D, Schneider N, Zinkernagel MS. Microglia Activation and

- Recruitment of Circulating Macrophages During Ischemic Experimental Branch Retinal Vein Occlusion. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017;58(2):944–53.
139. Goncalves A, Lin CM, Muthusamy A, Fontes-Ribeiro C, Ambrosio AF, Abcouwer SF, Fernandes R, Antonetti DA. Protective Effect of a GLP-1 Analog on Ischemia-Reperfusion Induced Blood-Retinal Barrier Breakdown and Inflammation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(6):2584–92.
140. Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T. Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF- α in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2004;242(5):409–13.
141. Zhou Y, Ling EA, Dheen ST. Dexamethasone suppresses monocyte chemoattractant protein-1 production via mitogen activated protein kinase phosphatase-1 dependent inhibition of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in activated rat microglia. *Journal of neurochemistry*. 2007;102(3):667–78.
142. Chao J, Viets Z, Donham P, Wood JG, Gonzalez NC. Dexamethasone blocks the systemic inflammation of alveolar hypoxia at several sites in the inflammatory cascade. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;303(2):H168–77.
143. Wagner AE, Huck G, Stiehl DP, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Dexamethasone impairs hypoxia-inducible factor-1 function. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;372(2):336–40.
144. Zhang X, Bao S, Lai D, Rapkins RW, Gillies MC. Intravitreal triamcinolone acetonide inhibits breakdown of the blood-retinal barrier through differential regulation of VEGF-A and its receptors in early diabetic rat retinas. *Diabetes*. 2008;57(4):1026–33.
145. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology*. 1963;17:375–412.
146. Liu F, Koval M, Ranganathan S, Fanayan S, Hancock WS, Lundberg EK, Beavis

RC, Lane L, Duek P, McQuade L, Kelleher NL, Baker MS. Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *Journal of proteome research*. 2016;15(2):339–59.

147. Yang L, Sun X, Meng X. Differences in the expression profiles of claudin proteins in human gastric carcinoma compared with nonneoplastic mucosa. *Molecular medicine reports*. 2018;18(2):1271–8.

148. Liu H, Jiang F, Jia X, Lan J, Guo H, Li E, Yan A, Wang Y. Cycling hypoxia affects cell invasion and proliferation through direct regulation of claudin1 / claudin7 expression, and indirect regulation of P18 through claudin7. *Oncotarget*. 2017;8(6):10298–311.

149. Sun J, Wang X, Shi Y, Li J, Li C, Shi Z, Chen Y, Mao B. EphA7 regulates claudin6 and pronephros development in *Xenopus*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;495(2):1580–7.

150. Senga K, Mostov KE, Mitaka T, Miyajima A, Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Molecular biology of the cell*. 2012;23(15):2845–55.

151. Avanthi SU, Ravi Kanth VV, Agarwal J, Lakhtakia S, Gangineni K, Rao GV, Reddy DN, Talukdar R. Association of claudin2 and PRSS1-PRSS2 polymorphisms with idiopathic recurrent acute and chronic pancreatitis: A case-control study from India. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(12):1796–801.

152. Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, Yamazaki Y, Watanabe S, Suzuki K, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Rakugi H, Isaka Y, Tsukita S. Deficiency of claudin-18 causes paracellular H⁺ leakage, up-regulation of interleukin-1beta, and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology*. 2012;142(2):292–304.

153. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *The Journal of cell biology*. 2005;169(3):527–38.

154. Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie

- CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ, Wilcox ER, Rasmussen J, Anderson JM, Dolan DF, Forge A, Raphael Y, Camper SA, Friedman TB. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Human molecular genetics*. 2003;12(16):2049–61.
155. Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell*. 1999;99(6):649–59.
156. 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. *The Journal of cell biology*. 2003;161(3):653–60.
157. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of cell biology*. 2002;156(6):1099–111.
158. Venugopal S, Anwer S, Szaszi K. Claudin-2: Roles beyond Permeability Functions. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(22).
159. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology*. 1993;123(6 Pt 2):1777–88.
160. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *The Journal of surgical research*. 2007;140(1):12–9.
161. Ogunshola OO. In vitro modeling of the blood-brain barrier: simplicity versus complexity. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(26):2755–61.
162. Forster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and cell biology*. 2008;130(1):55–70.
163. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7(1):41–53.
164. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*.

2004;16(1):1–13.

165. Hu Y, Yang B, Xu Y, Jiang L, Tsui CK, Liang X. FK506 suppresses hypoxia-induced inflammation and protects tight junction function via the Ca²⁺/NFATc1 signaling pathway in retinal microvascular epithelial cells. *Molecular medicine reports*. 2017;16(5):6974–80.

166. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(3):905–9.

167. Bai Y, Ma JX, Guo J, Wang J, Zhu M, Chen Y, Le YZ. Muller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *The Journal of pathology*. 2009;219(4):446–54.

168. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia–neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in retinal and eye research*. 2016;51:1–40.

169. Watkins WM, McCollum GW, Savage SR, Capozzi ME, Penn JS, Morrison DG. Hypoxia-induced expression of VEGF splice variants and protein in four retinal cell types. *Experimental eye research*. 2013;116:240–6.

170. Schmid–Brunclik N, Burgi–Taboada C, Antoniou X, Gassmann M, Ogunshola OO. Astrocyte responses to injury: VEGF simultaneously modulates cell death and proliferation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;295(3):R864–73.

171. Trendelenburg G, Dirnagl U. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia*. 2005;50(4):307–20.

172. Vangeison G, Rempe DA. The Janus–faced effects of hypoxia on astrocyte function. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2009;15(6):579–88.

173. Mense SM, Sengupta A, Zhou M, Lan C, Bentsman G, Volsky DJ, Zhang L. Gene expression profiling reveals the profound upregulation of hypoxia–responsive genes in primary human astrocytes. *Physiological genomics*. 2006;25(3):435–49.

174. Abbruscato TJ, Davis TP. Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/aglycemia: influence of astrocyte contact. *Brain research*. 1999;842(2):277-86.
175. Song HS, Son MJ, Lee YM, Kim WJ, Lee SW, Kim CW, Kim KW. Oxygen tension regulates the maturation of the blood-brain barrier. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;290(1):325-31.
176. Zehendner CM, Librizzi L, de Curtis M, Kuhlmann CR, Luhmann HJ. Caspase-3 contributes to ZO-1 and Cl-5 tight-junction disruption in rapid anoxic neurovascular unit damage. *PloS one*. 2011;6(2):e16760.
177. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, Mahase S, Dutta DJ, Seto J, Kramer EG, Ferrara N, Sofroniew MV, John GR. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(7):2454-68.
178. Lu DY, Yu WH, Yeh WL, Tang CH, Leung YM, Wong KL, Chen YF, Lai CH, Fu WM. Hypoxia-induced matrix metalloproteinase-13 expression in astrocytes enhances permeability of brain endothelial cells. *Journal of cellular physiology*. 2009;220(1):163-73.
179. Mojsilovic-Petrovic J, Callaghan D, Cui H, Dean C, Stanimirovic DB, Zhang W. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *Journal of neuroinflammation*. 2007;4:12.
180. Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction opening: signaling via Rho and Rho kinase. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 22):4615-28.
181. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *The New England journal of medicine*. 1994;331(22):1480-7.
182. Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, Folkman J, Dvorak HF, Brown LF, Berse B, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular

permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *The American journal of pathology*. 1994;145(3):574–84.

183. Alon T, Hemo I, Itin A, Peer J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature medicine*. 1995;1(10):1024–8.

184. Kvanta A, Algvere PV, Berglin L, Seregard S. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1996;37(9):1929–34.

185. Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1996;37(5):855–68.

186. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development (Cambridge, England)*. 1999;126(6):1149–59.

187. Ueki Y, Ash JD, Zhu M, Zheng L, Le YZ. Expression of Cre recombinase in retinal Muller cells. *Vision research*. 2009;49(6):615–21.

188. Wang JJ, Zhu M, Le YZ. Functions of Muller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *World journal of diabetes*. 2015;6(5):726–33.

189. El-Remessy AB, Behzadian MA, Abou-Mohamed G, Franklin T, Caldwell RW, Caldwell RB. Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. *The American journal of pathology*. 2003;162(6):1995–2004.

190. Kowluru RA, Koppolu P, Chakrabarti S, Chen S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free radical research*. 2003;37(11):1169–80.

191. Li X, Liu J, Hoh J, Liu J. Muller cells in pathological retinal angiogenesis. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2019;207:96–

- 106.
192. Nurnberg C, Kociok N, Brockmann C, Lischke T, Crespo-Garcia S, Reichhart N, Wolf S, Baumgrass R, Eming SA, Beer-Hammer S, Joussem AM. Myeloid cells contribute indirectly to VEGF expression upon hypoxia via activation of Muller cells. *Experimental eye research*. 2018;166:56–69.
193. Augustine J, Pavlou S, OHare M, Harkin K, Stitt A, Curtis T, Xu H, Chen M. Characterization of a Spontaneously Immortalized Murine Muller Glial Cell Line QMMuC-1. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2018;59(3):1666–74.
194. Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA. In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2011;71(1):113–28.
195. Ma X, Zhang H, Pan Q, Zhao Y, Chen J, Zhao B, Chen Y. Hypoxia/Aglycemia-induced endothelial barrier dysfunction and tight junction protein downregulation can be ameliorated by citicoline. *PloS one*. 2013;8(12):e82604.
196. Hao L, Guo X, Zou C, Zhou H, Tian H, Zhang Y, Song C, Liu L. Hyperbaric oxygen preconditioning ameliorates blood-brain barrier damage induced by hypoxia through modulation of tight junction proteins in an in vitro model. *Croatian medical journal*. 2016;57(1):51–7.
197. Cui D, Arima M, Takubo K, Kimura T, Horiuchi K, Minagawa T, Matsuda S, Ikeda E. ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function. *Scientific reports*. 2015;5:12796.
198. Bok S, Kim YE, Woo Y, Kim S, Kang SJ, Lee Y, Park SK, Weissman IL, Ahn GO. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates microglial functions affecting neuronal survival in the acute phase of ischemic stroke in mice. *Oncotarget*. 2017;8(67):111508–21.
199. Barkauskas DS, Dixon Dorand R, Myers JT, Evans TA, Barkauskas KJ, Askew D, Purgert R, Huang AY. Focal transient CNS vessel leak provides a tissue niche for sequential immune cell accumulation during the asymptomatic phase of EAE induction. *Experimental neurology*. 2015;266:74–85.
200. Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Sumi N, Machida T, Takahashi H, Yamauchi A, Kataoka Y. Lipopolysaccharide-activated microglia lower P-glycoprotein

function in brain microvascular endothelial cells. *Neuroscience letters*. 2012;524(1):45–8.

201. Jolivel V, Bicker F, Biname F, Ploen R, Keller S, Gollan R, Jurek B, Birkenstock J, Poisa-Beiro L, Bruttger J, Opitz V, Thal SC, Waisman A, Bauerle T, Schafer MK, Zipp F, Schmidt MHH. Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra. *Acta neuropathologica*. 2015;129(2):279–95.

202. Hu Y, Wang Z, Pan S, Zhang H, Fang M, Jiang H, Zhang H, Gao Z, Xu K, Li Z, Xiao J, Lin Z. Melatonin protects against blood–brain barrier damage by inhibiting the TLR4/ NF–kappaB signaling pathway after LPS treatment in neonatal rats. *Oncotarget*. 2017;8(19):31638–54.

203. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti–VEGF therapy for cancer. *British journal of cancer*. 2007;96(12):1788–95.

204. Amadio M, Govoni S, Pascale A. Targeting VEGF in eye neovascularization: Whats new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide–based interventions under development. *Pharmacological research*. 2016;103:253–69.

图 表

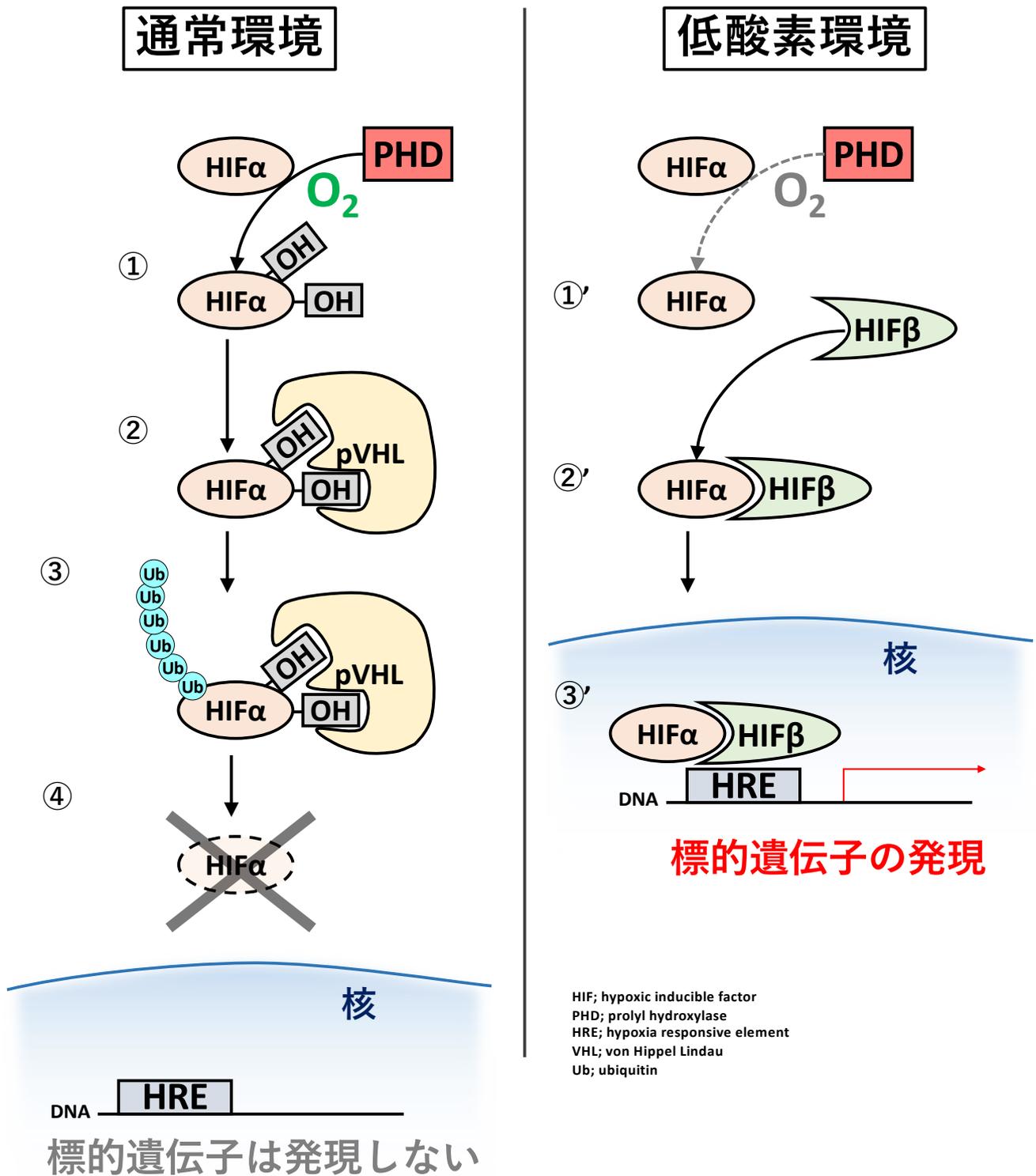


図1 低酸素誘導性因子（HIF）による低酸素応答

HIFによる低酸素応答の仕組みを示した模式図。通常環境では水酸化酵素PHDがHIFαの2ヶ所のプロリン残基を水酸化する（①）。プロリン残基に水酸化を受けたHIFαはpVHLが結合することで（②）ユビキチン化され（③）、プロテアソームによって分解される（④）。一方、低酸素環境ではPHDの働きが抑えられることによりHIFαは安定化し（①'）、HIFβとの2量体を形成する（②'）。これがDNA上の低酸素応答性領域（HRE）に結合し標的遺伝子の発現を誘導する（③'）。

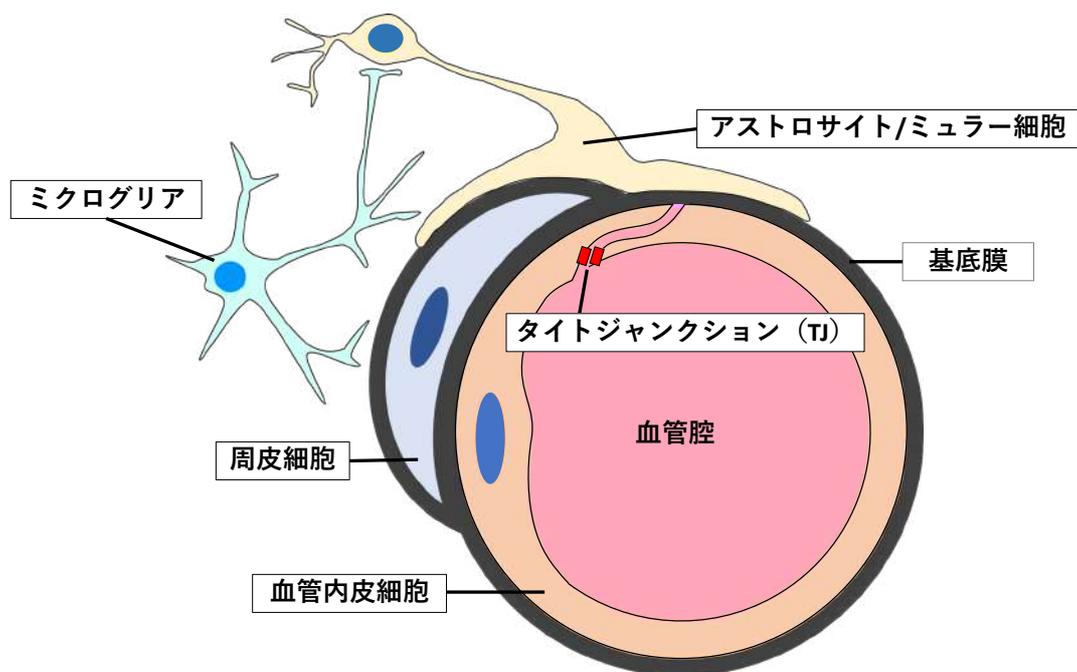


図2-1 脳/網膜における血管バリア構造

脳および網膜における血管バリア構造の模式図。脳における血管バリア構造は血管内皮細胞のTJを中心に、アストロサイト、周皮細胞、基底膜から構成される。網膜ではこれらに加えミューラー細胞も構成に関わる。血管内皮細胞と周皮細胞は直接接触しており基底膜を共有している。基底膜の外側はアストロサイトまたはミューラー細胞の足突起で覆われている。また、血管バリア機能の維持にミクログリアが重要な役割を果たしていると考えられている。

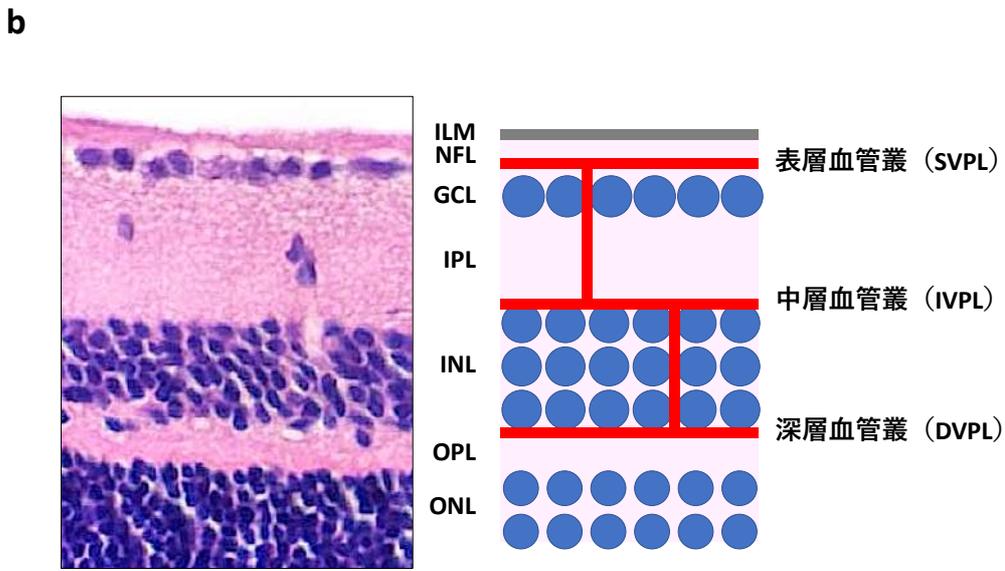
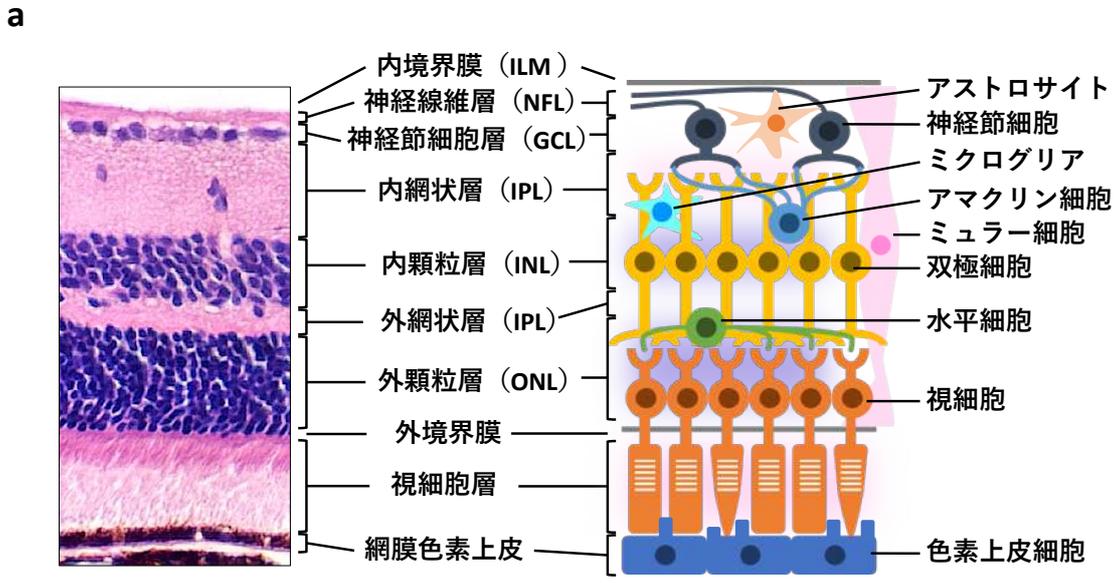


図2-2 マウスの網膜構造

- a. マウスの網膜構造の模式図。マウスの網膜はヒトと同じく10層からなり、神経細胞の他に、ミュラー細胞、アストロサイトおよびミクログリアが存在する。
- b. マウスの網膜血管叢 (VPL) の模式図。マウス網膜の表層・中層・深層にそれぞれVPLが存在する。

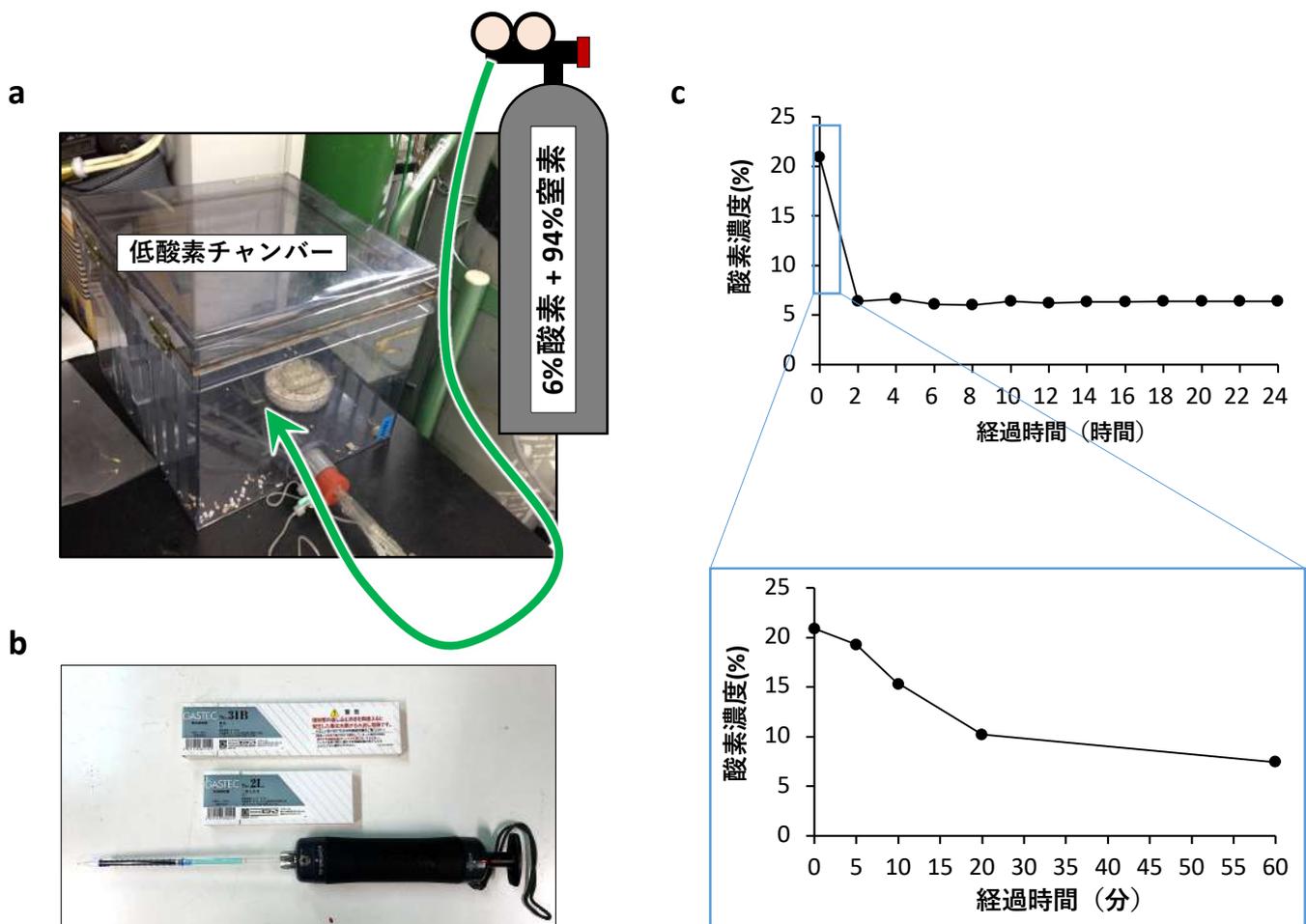
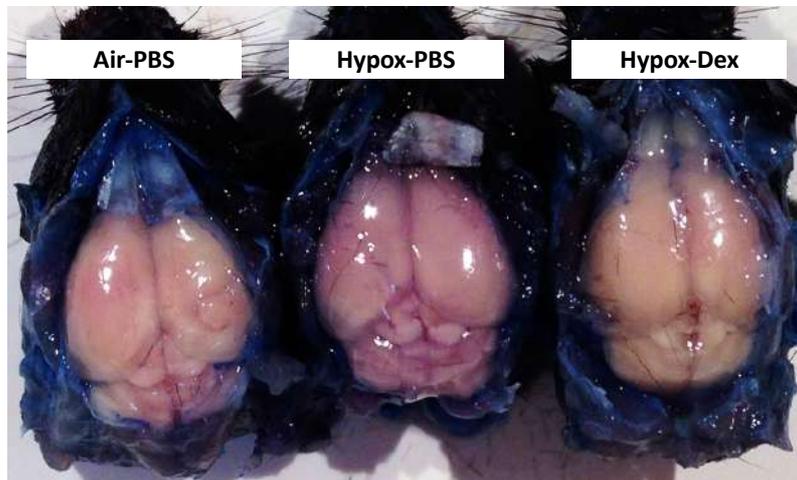


図2-3 低酸素曝露

- 低酸素曝露に使用した低酸素チャンバー。マウスを、6%酸素94%窒素混合ガスシリンダーに接続された透明なプラスチック性の常圧低酸素チャンバー内で24時間飼育することにより低酸素曝露を行なった。
- 低酸素チャンバー内の酸素および二酸化炭素濃度の測定に使用したガス検知器。低酸素チャンバー内の酸素および二酸化炭素濃度は2時間ごとにガス検知管により測定された。
- 低酸素チャンバー内の酸素濃度の推移。低酸素チャンバー内の酸素濃度は実験開始から2時間以内に約6%まで低下し、その後は6.0-6.5%に維持された。

a



b

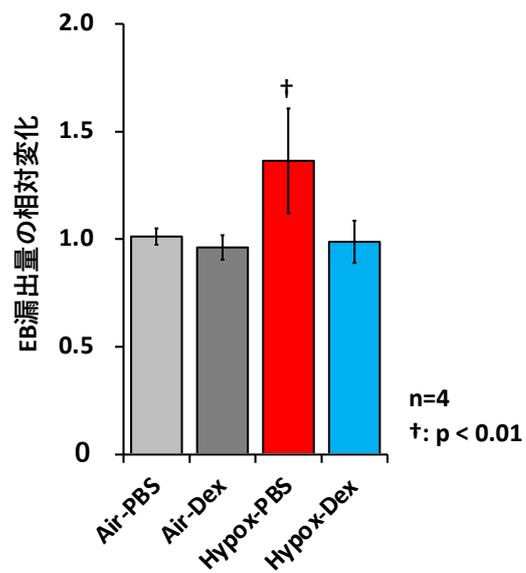
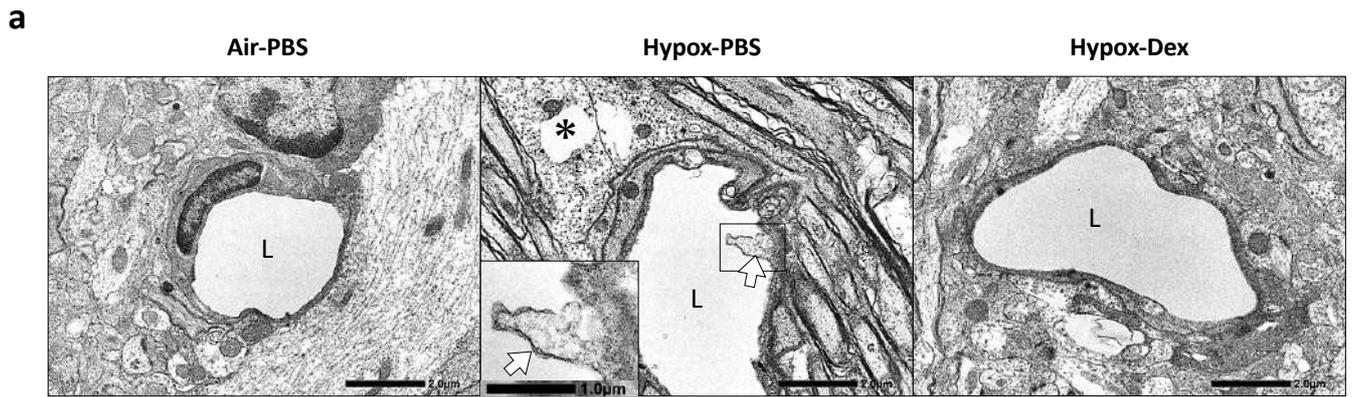


図2-4 低酸素による脳血管バリアの機能低下

- エバンスブルー（EB）投与後のマウス脳。Hypox-PBS群ではAir-PBS群と比較して色調が変化し、これはデキサメタゾン投与によって抑制された。
- 脳でのEB漏出量の相対変化。各群の脳におけるEB漏出量をAir-PBS群と比較したところ、Hypox-PBS群では有意に増加し、Air-Dex群およびHypox-Dex群では有意差は認められなかった。



L: 血管内腔
 *: アストロサイト足突起の空砲を伴う膨化
 〆: 血管内腔の小胞集合体

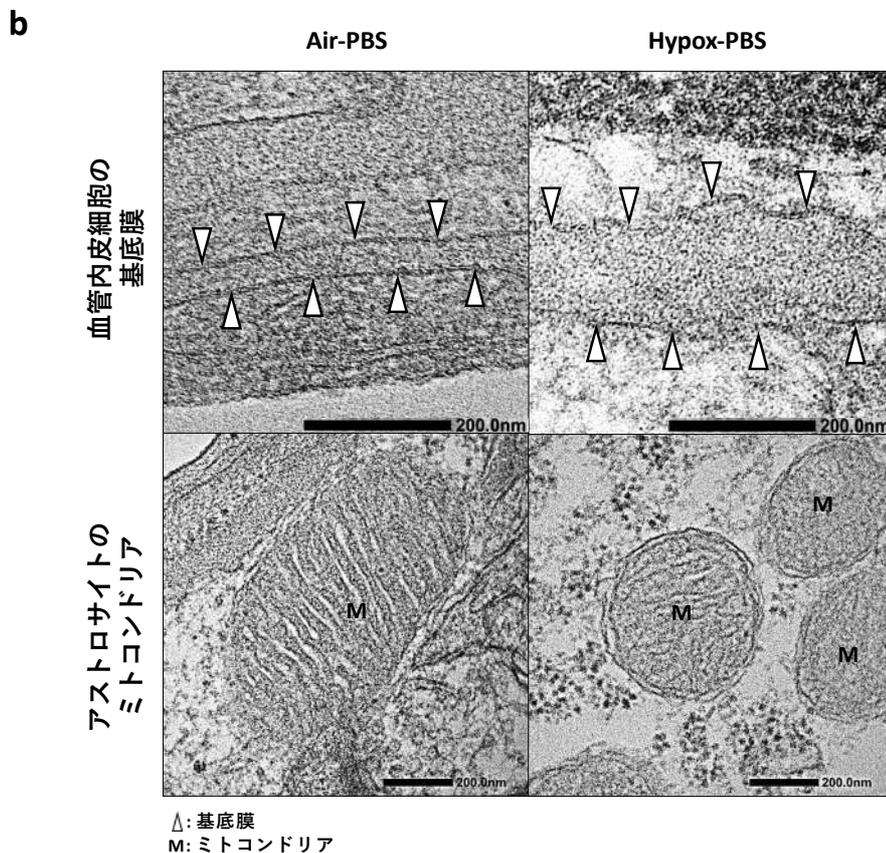


図2-5 低酸素による脳血管の微細構造変化

- a. マウス脳における毛細血管の微細構造。Air-PBS群およびAir-Dex群では、明らかな異常所見は観察されなかった。Hypox-PBS群では、アストロサイト足突起の空砲を伴う膨化（*）、血小板由来と考えられる小胞集合体の血管内皮への付着（矢印）が認められた。またこれらの所見はHypox-Dex群では認められなかった。
- b. マウス脳における基底膜およびミトコンドリアの微細構造。Hypox-PBS群では血管内皮細胞の基底膜の肥厚が認められた（矢頭）。また、アストロサイトのミトコンドリアに明らかな変化は認められなかった（M）。

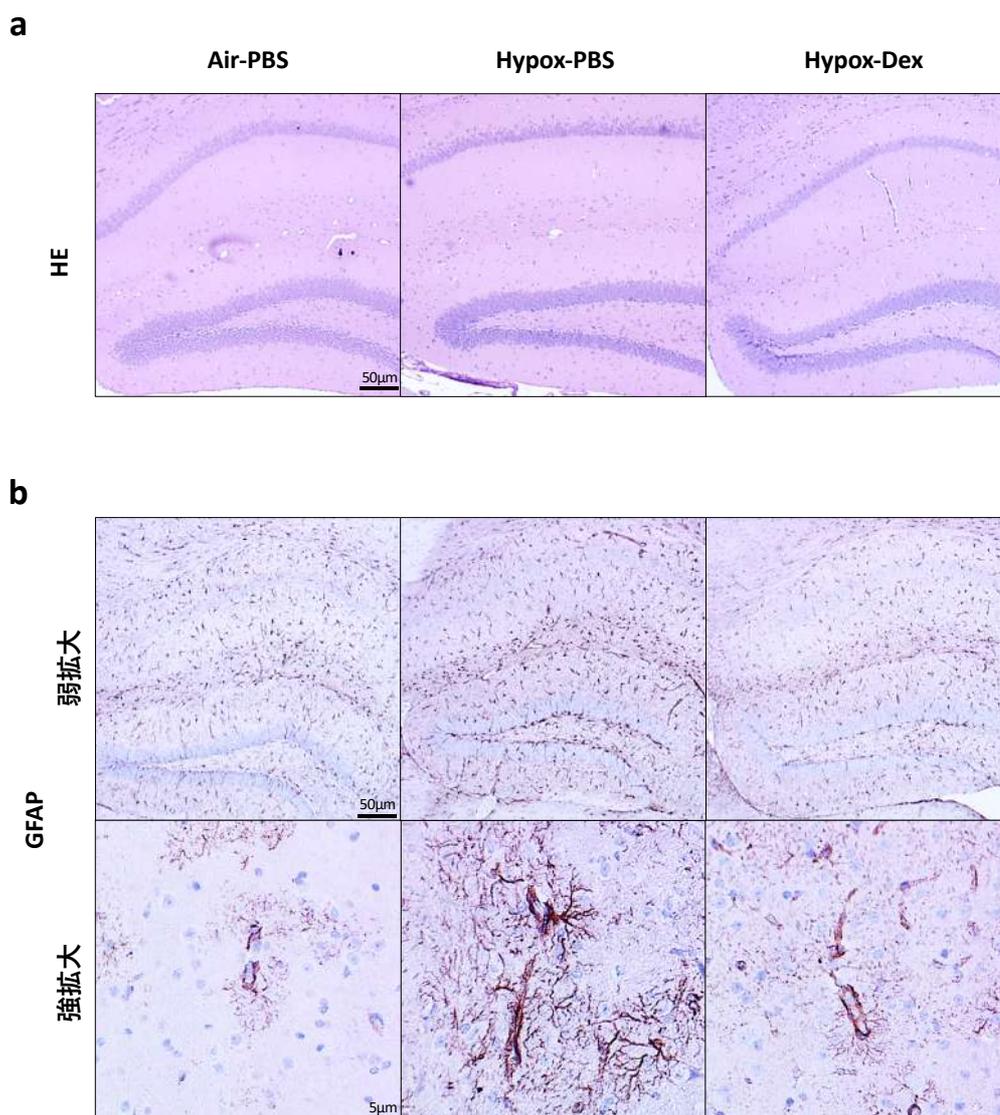


図2-6 低酸素によるアストロサイトの活性化

- a. マウス脳（海馬周辺部）における病理切片。HE染色では各群で明らかな組織学的変化は観察されなかった。
- b. マウス脳のパラフィン切片に対するGFAP抗体を用いたIHC。全ての群で血管周囲の陽性領域が認められた。Hypox-PBS群においては他群と比較してGFAPの発現が強いことが弱拡大での観察で確認された。また強拡大での観察によって、毛細血管周囲において突起状のGFAP陽性領域の顕著な拡大が確認された。

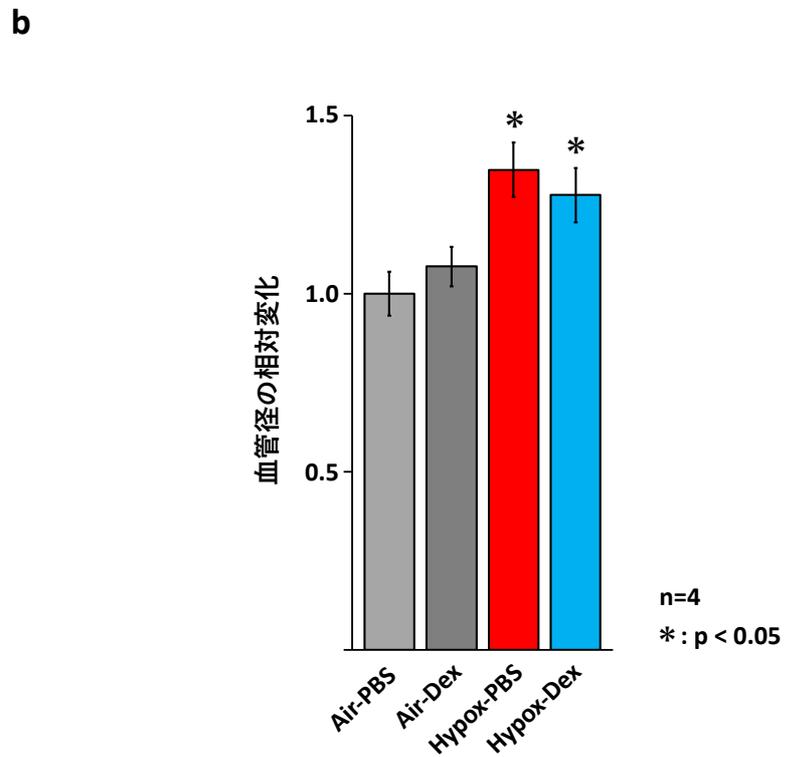
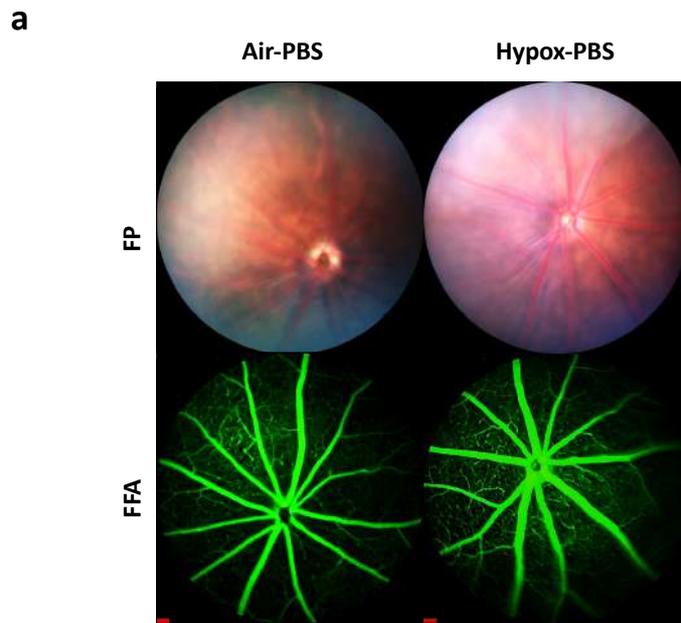


図2-7 低酸素による眼底変化

- a. マウスの眼底における眼底鏡 (FP) および蛍光眼底造影 (FFA)。Hypox群において血管拡張が認められたが、全てのグループにおいて白斑、異常血管、出血等の異常所見は認められなかった。
- b. 網膜の血管径の相対変化。Air-PBS群と比較してHypox-PBS群およびHypox-Dex群で有意な血管拡張が認められた。

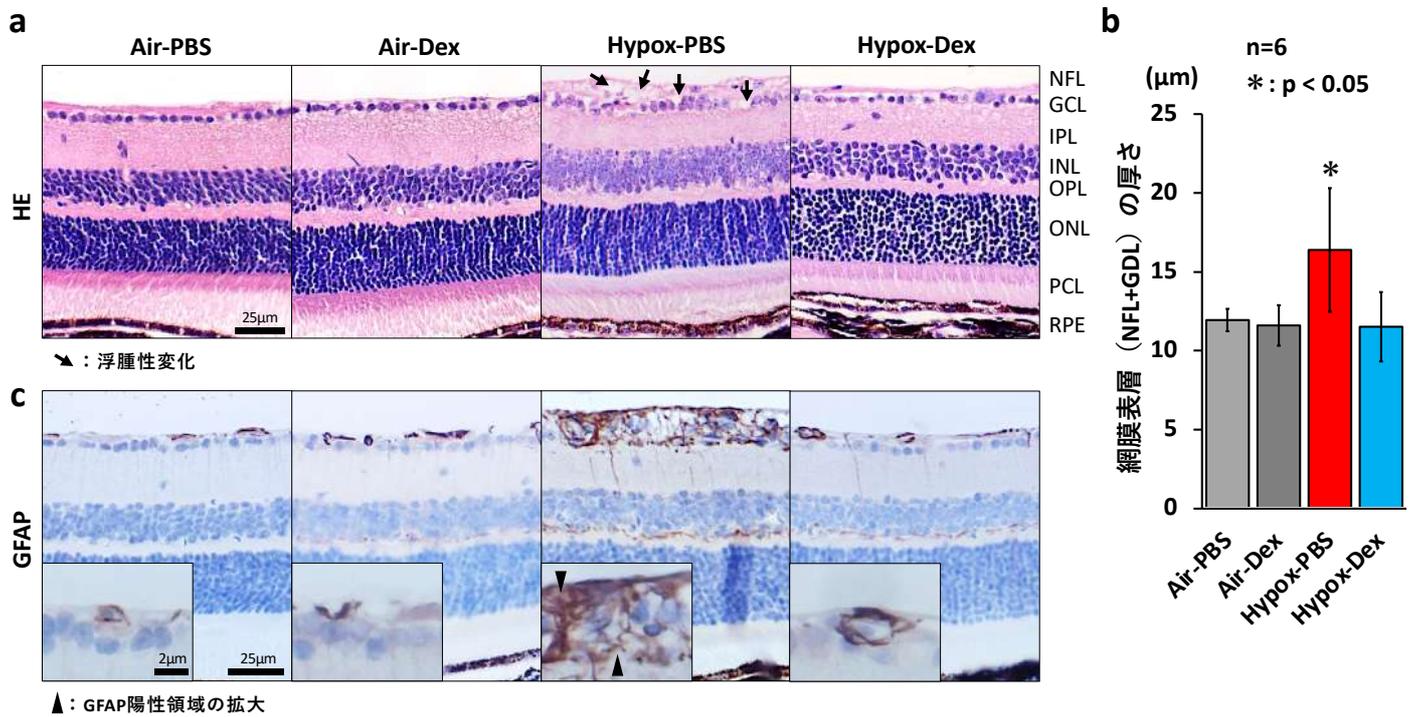
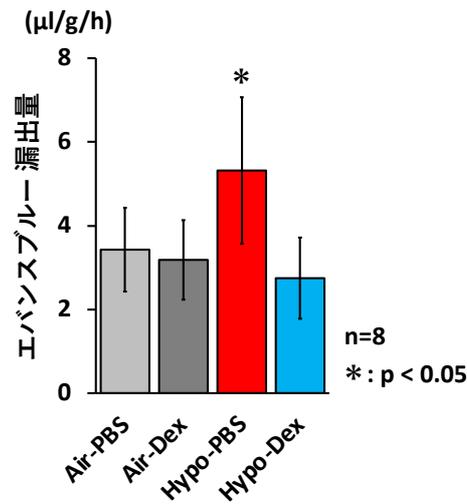


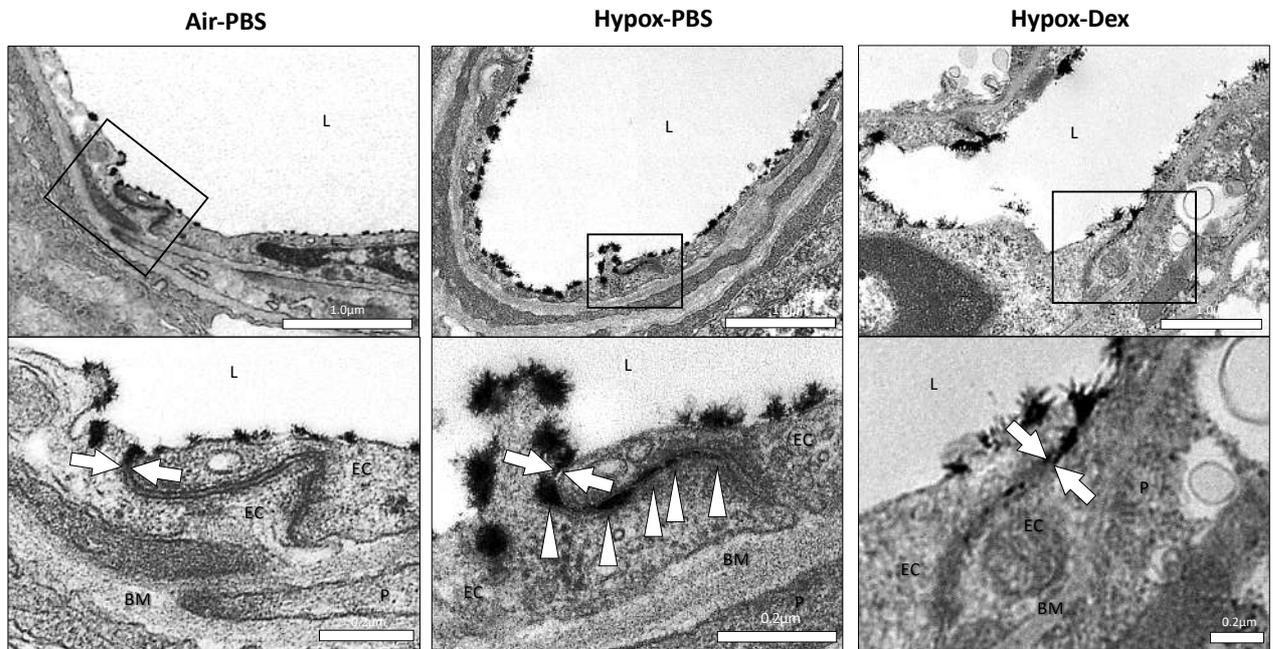
図2-8 低酸素による網膜の病理変化

- マウス網膜の病理切片。Air-PBS群、Air-Dex群では異常な組織学的所見は観察されなかったが、Hypox-PBS群では網膜表層の浮腫性変化が観察された（矢印）。Hypox-Dex群ではこのような所見は認められなかった。
- 網膜表層の厚さの比較。NFLとGCLを合わせた厚さはAir-PBS群と比べHypox-PBS群で有意に大きかった。
- マウス網膜のパラフィン切片に対するGFAP抗体を用いたIHC。全ての群で主にNFLおよびGCLに陽性領域が認められ、Hypox-PBS群では、これに加えIPLおよびOPLにも陽性領域が認められた。さらに強拡大での観察により、Hypox-PBS群では他群と比べ網膜表層における突起状のGFAP陽性領域の顕著な拡大（矢頭）が観察された。

a



b



L: 血管内腔
 EC: 血管内皮細胞
 BM: 基底膜
 P: 周皮細胞
 ⇔: タイトジャンクション
 ▲: タイトジャンクションを通過したランタントレーサー

図2-9 低酸素による網膜血管バリアの機能低下

- 網膜におけるEB漏出量の比較。網膜におけるEB漏出量は他群に比して、Hypox-PBS群で有意に高かった。
- ランタン塩を血管内トレーサーとして用いたTEM観察。各群において、ランタン塩の血管内腔への沈着が認められた。Air-PBS群では、正常なTJがランタン塩の細胞間隙通過を防いでいることが確認できたが、Hypox-PBS群では、ランタン塩がTJを通過し、細胞間隙まで深く浸透していた（三角）。このようなランタン塩のTJ通過はHypox-Dex群では認められなかった。

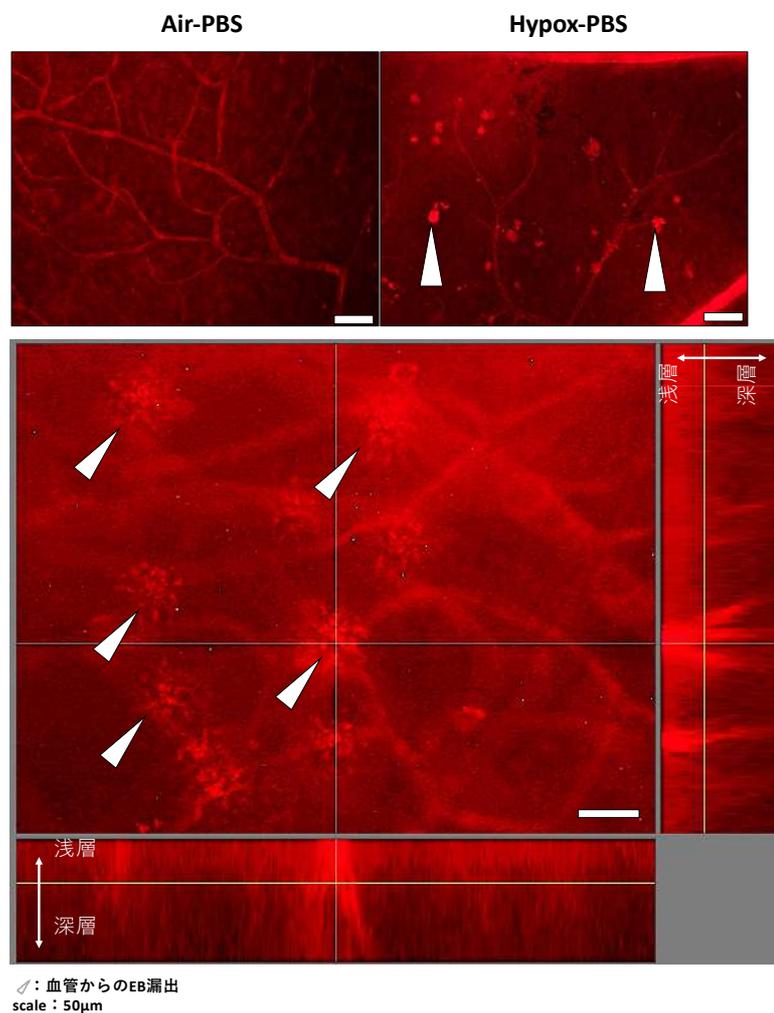


図2-10 低酸素による網膜表層でのEB漏出

マウス網膜におけるEB漏出の様子。血管から漏出したEBは灌流後にも局所に貯留していることから、漏出が生じている層を特定した。Air-PBS群ではEBは血管内に留まっているが、Hypox-PBS群では局所的な血管からの漏出が認められた（矢頭）。網膜全層でのZ軸解析を行なったところ、Hypox-PBS群におけるEB漏出は網膜表層で生じていた。

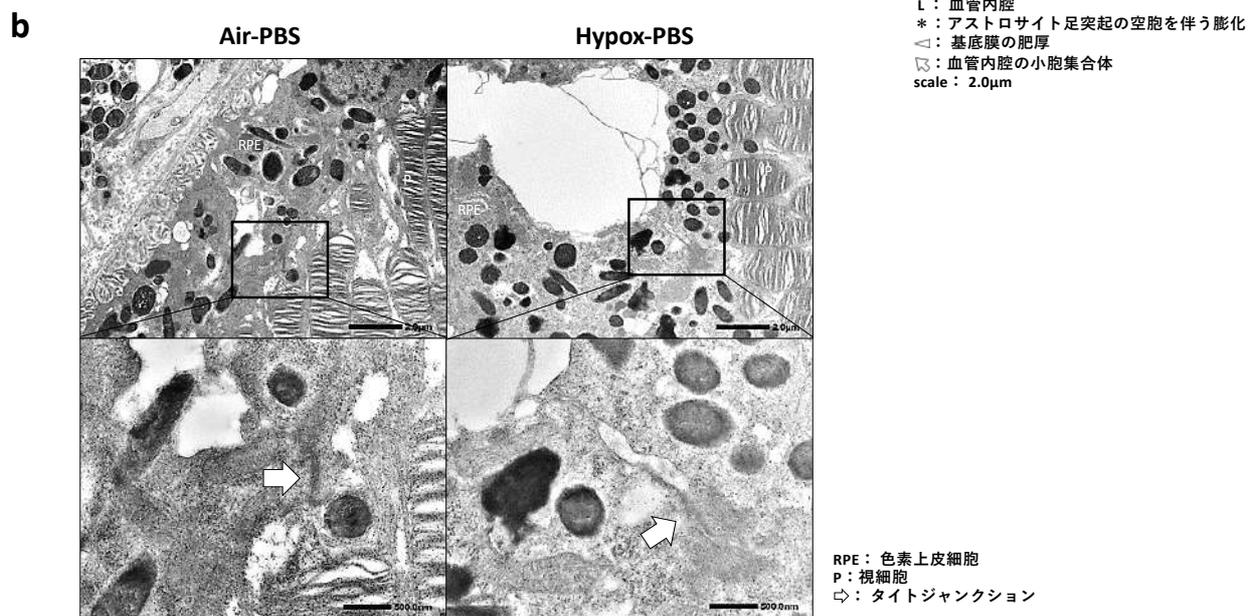
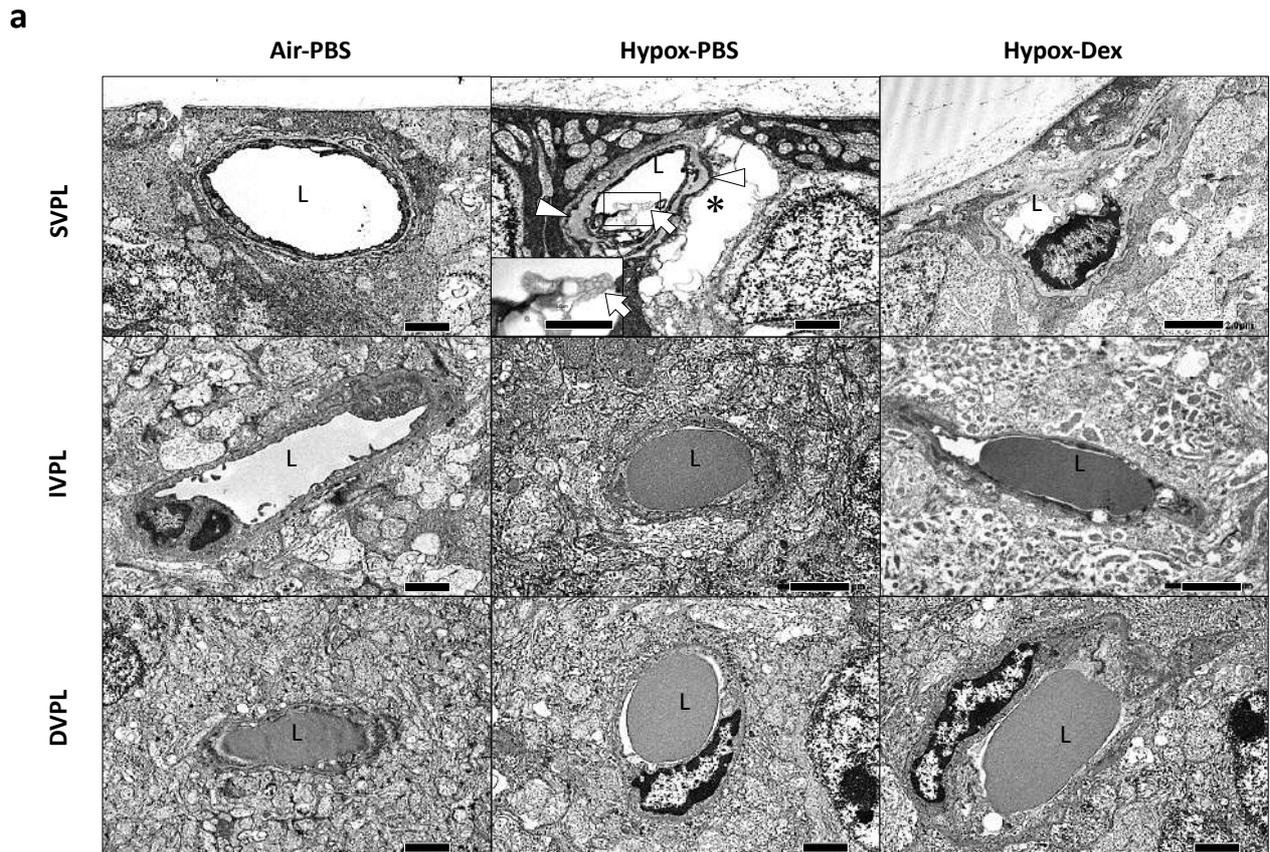


図2-11 低酸素による網膜毛細血管の各層での変化

- a. マウス網膜における毛細血管の微細構造。各群のマウス網膜における血管周囲の微細構造を血管叢（VPL）ごとに観察したところ、Air-PBS群では全てのVPLにおいて異常な所見は観察されなかったが、Hypox-PBS群では、SVPLの毛細血管において、基底膜の肥厚（矢頭）、アストロサイト足突起の空泡を伴う膨化（*）、血小板由来と考えられる小胞集合体の血管内皮への付着（矢印）が認められた。これらの所見はIVPL、DVPLでは認めず、また、Hypox-Dex群においても、これらの所見は認められなかった。
- b. マウス網膜におけるoBRBの微細構造。Hypox-PBS群において色素上皮細胞（RPE）の細胞間隙は広がっているもののTJ（矢印）は保たれていた。

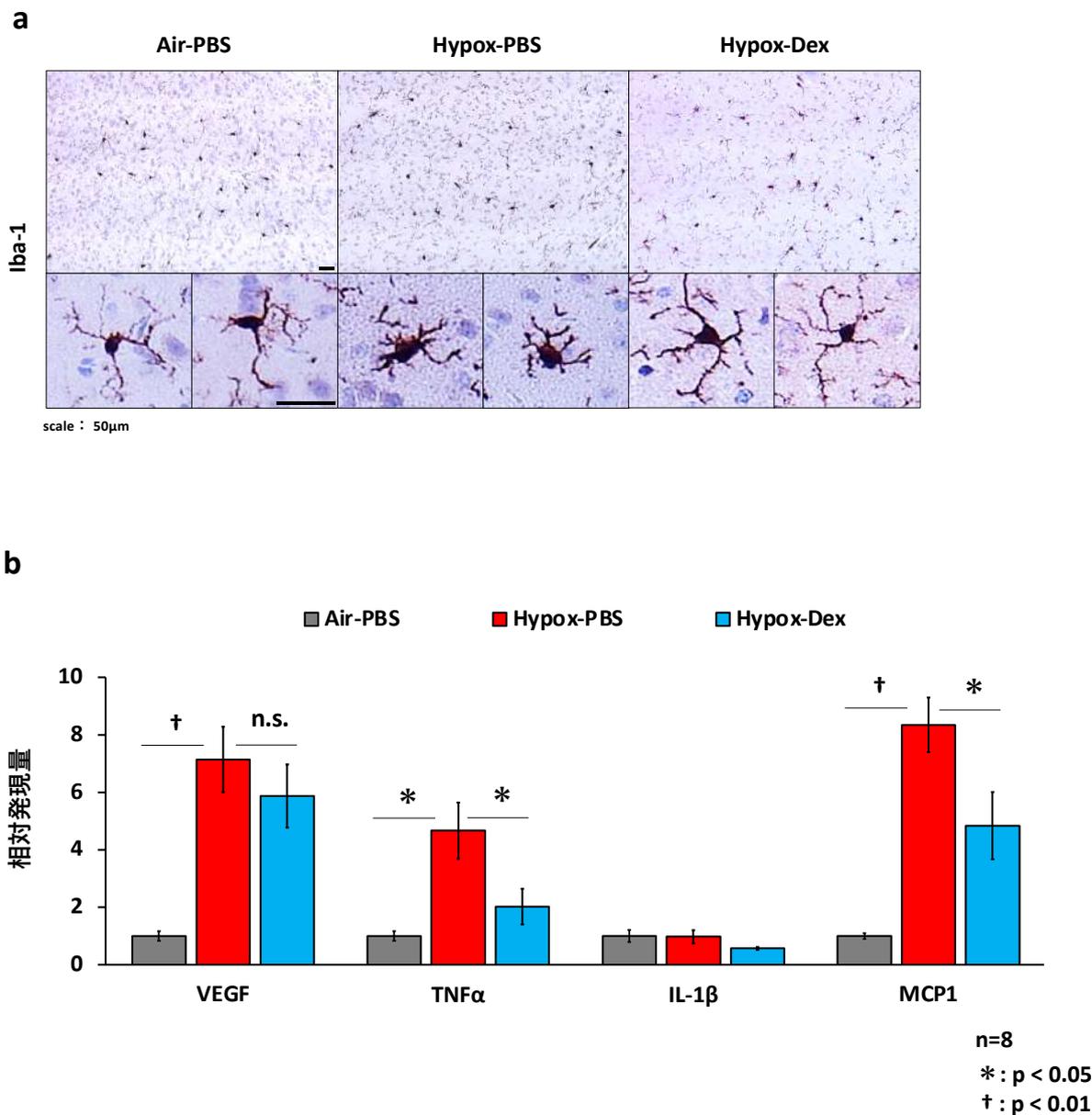


図2-12 脳での低酸素によるミクログリアの活性化

- a. マウス脳のパラフィン切片に対するIba-1抗体を用いたIHC。各群においてIba-1陽性細胞の数に変化は認めなかった。Air-PBS群の全てのミクログリアが、複数の細かく枝分かれした突起を特徴したラミファイド型ミクログリアであったのに対し、Hypox-PBS群では突起の短縮と細胞体の肥大化を特徴としたアメボイド型ミクログリアが多数認められた。Hypox-Dex群ではアメボイド型ミクログリアはほぼ認められなかった。
- b. 脳における炎症性サイトカインの遺伝子発現。脳におけるVEGF、TNFα、MCP1の遺伝子発現量はHypox-PBS群で有意に高く、Hypox-Dex群では抑制された。

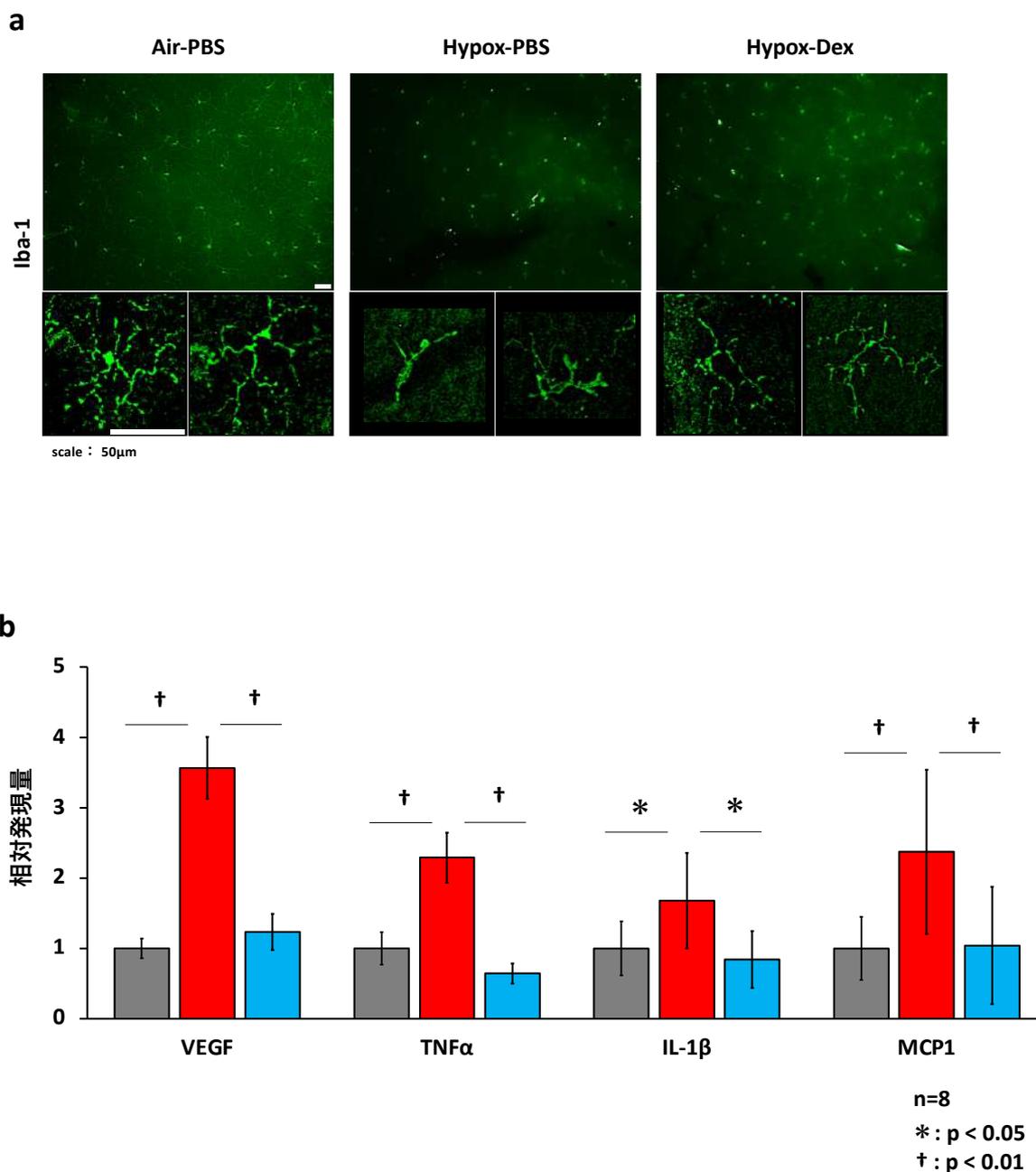
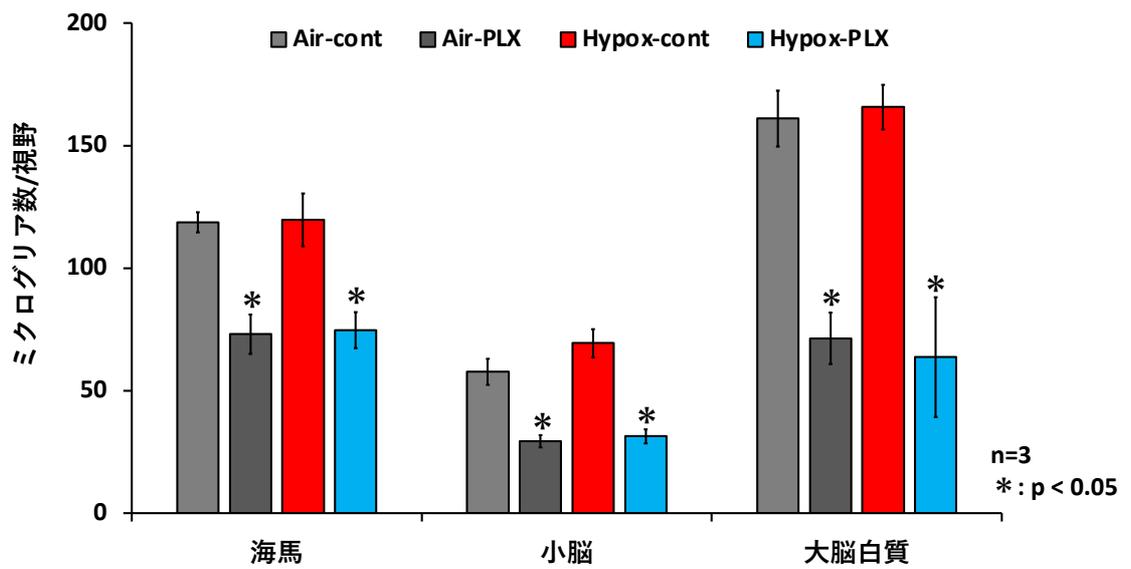


図2-13 網膜での低酸素によるミクログリアの活性化

- a. マウス網膜の伸展標本に対するIba-1抗体を用いたIHC。各群においてIba-1陽性細胞の数に変化は認めなかった。脳と同様、Air-PBS群の全てのミクログリアが、複数の細かく枝分かれした突起を特徴したラミファイド型ミクログリアであったのに対し、Hypox-PBS群では突起の短縮と細胞体の肥大化を特徴としたアメボイド型ミクログリアを多数認め、Hypox-Dex群ではアメボイド型ミクログリアはほぼ認められなかった。
- b. 網膜における炎症性サイトカインの相対遺伝子発現量。VEGF、TNF α 、IL-1 β 、MCP1の遺伝子発現量は、Hypox-PBS群において有意に高く、Hypox-Dex群ではAir-PBS群と同等に抑えられた。

a



b

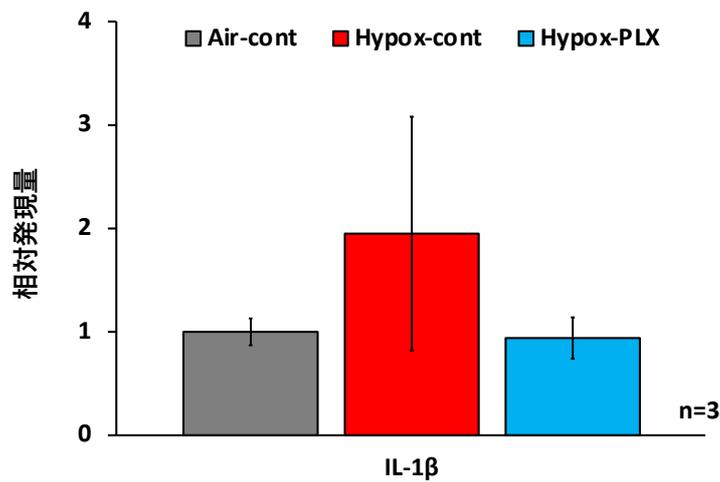


図2-14 CSF1R阻害剤 (PLX) 投与によるミクログリア減少とIL-1β発現の変化

- CSF1R阻害剤 (PLX) 投与によるミクログリアの減少。各群の脳パラフィン切片に対しIba-1抗体を用いたIHCを行い、Iba-1陽性細胞の数を測定した。脳の3つのエリア (海馬周辺、小脳、大脳白質) においてIba-1陽性細胞の数は有意に減少した。
- 脳におけるIL-1βの遺伝子発現。Hypox-cont群において高い傾向であった。

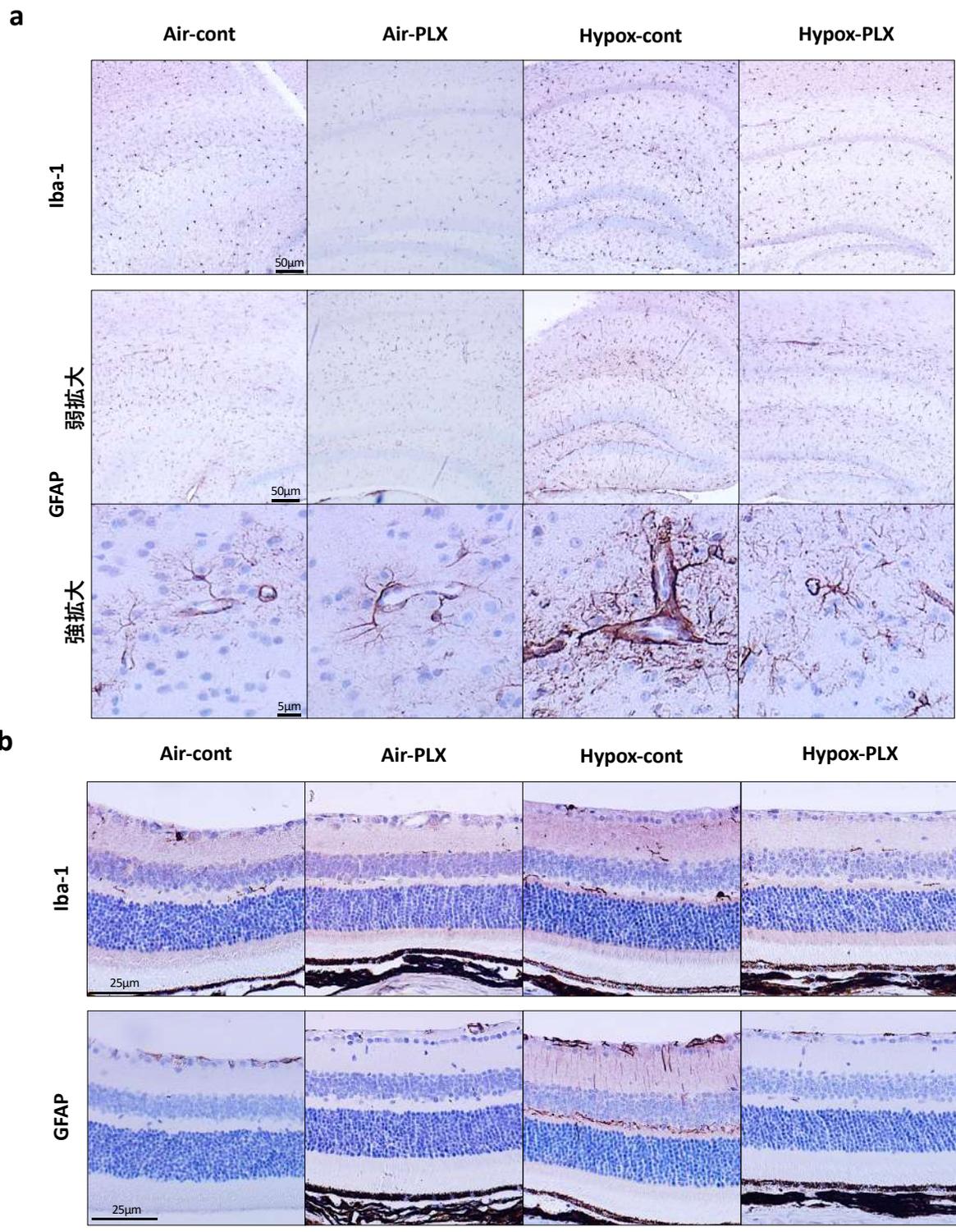


図2-15 ミクログリアの減少によるアストロサイト/ミュラー細胞の活性抑制

- a. マウス脳（海馬周辺部）の病理切片に対するIba-1抗体およびGFAP抗体を用いたIHC。Iba-1抗体を用いたIHCでは、Air-PLX群およびHypox-PLX群で陽性細胞が減少した。GFAP抗体を用いたIHCでは、Air-cont群およびAir-PLX群と比較し、Hypox-cont群では血管周囲の陽性領域の拡大が認められた。Hypo-PLX群ではAir群と同等の陽性領域が認められた。
- b. マウス網膜の病理切片に対するIba-1抗体およびGFAP抗体を用いたIHC。Iba-1抗体を用いたIHCでは、Air-PLX群およびHypox-PLX群で陽性細胞が減少した。GFAP抗体を用いたIHCでは、全ての群で主にNFLおよびGCLに陽性領域が認められた。Hypox-cont群では、さらにIPLおよびOPLにも陽性領域が認められ、SVPLにおける血管周囲の陽性領域が他群と比べ広いことが観察された。

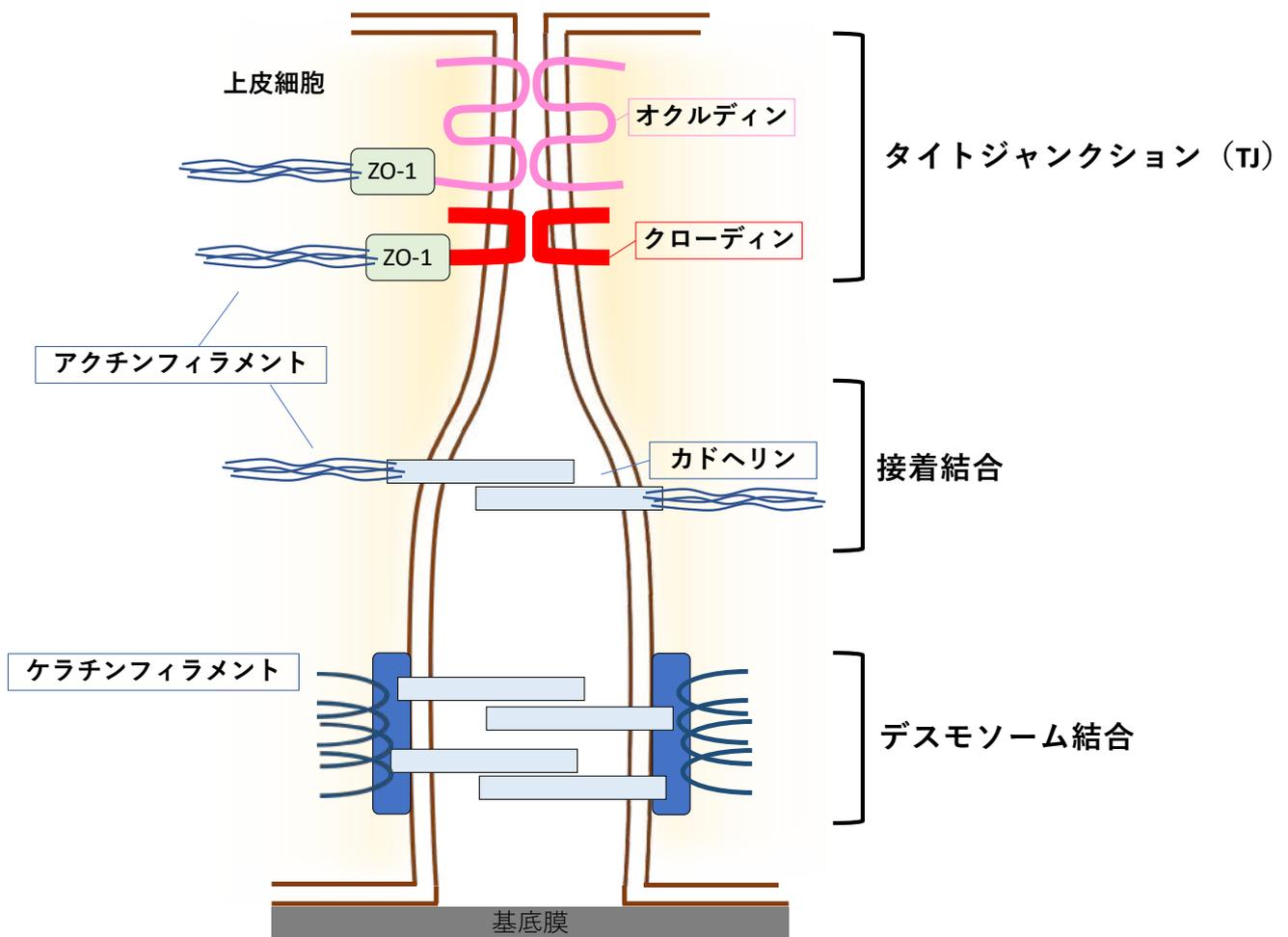


図3-1 タイトジャンクション (TJ) およびその他の細胞間接着分子構造

3種類の細胞間接着分子構造の模式図。上皮細胞にはタイトジャンクション (TJ)、接着結合、デスモソーム結合が存在する。その中でもTJは、透過性バリアとして膜の内側と外側を隔てる機能を有する。TJを構成する最も代表的な分子がクローディンとオクルディンである。さらに、ZO-1がクローディンおよびオクルディンに結合し細胞骨格アクチンに連結させることで細胞質側を裏打ちしている。

表1 代表的なクローディンと主な発現部位

	番号	主な発現場所	参考文献
クローディン	-1	皮膚・肝臓	157
	-2	膵臓	158
	-3	肺・肝臓・腎臓	150
	-4	肺・大腸	150
	-5	血管内皮細胞	156
	-6	胎児の全身	149
	-7	大腸・咽頭・腎臓	148
	-8	腎臓	147
	-11	セルトリ細胞	155
	-14	内耳有毛細胞	154
	-18	胃・肺	152
	-19	シュワン細胞	153

代表的なクローディンと主な発現部位。クローディンは、これまでに27種類が報告されており、発現するクローディンの組み合わせによりバリアの特性が決定されると考えられている。代表的なクローディンの主な発現部位を表に示した。血管内皮細胞においては、主にクローディン-5が発現していることが報告されている

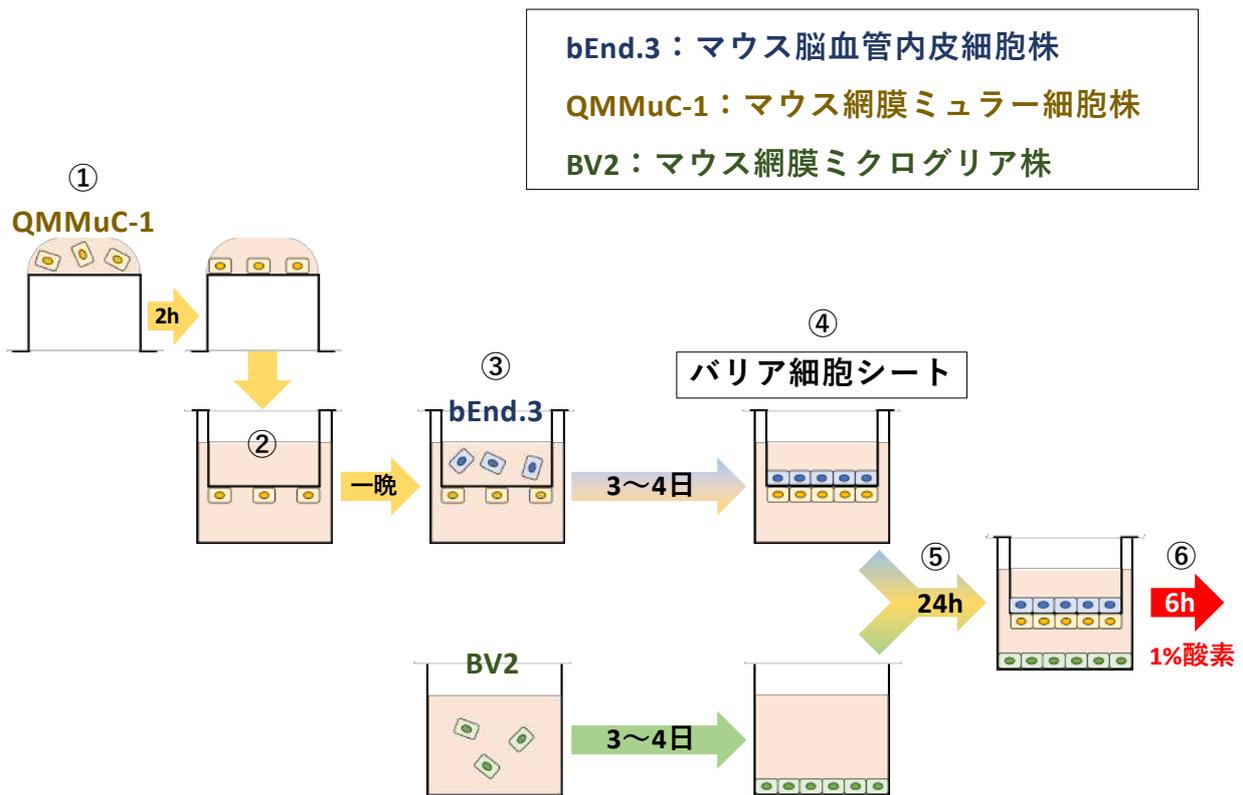


図3-2 バリア細胞シートの作成とBV2（ミクログリア）との共培養

バリア細胞シートとBV2（ミクログリア）を用いた実験の流れ。バリア細胞シートをbEnd.3（血管内皮細胞）およびQMMuC-1（ミュラー細胞）を用いて作成した。血管バリアの血管内側と血管外側を表現するために、0.4 μ mの小孔を持つカルチャーインサート半透膜の底面にQMMuC-1を播種し（①）、2時間後に転倒させ（②）、上面にbEnd.3を播種した（③）。3~4日間培養することでバリア細胞シートを完成させた（④）。また、カルチャーインサート半透膜上で培養されたbEnd.3単層細胞シートおよびバリア細胞シートをBV2培養中の培養液に浸すことによりBV2との共培養を行い（⑤）、24時間後に各実験を開始した（⑥）。

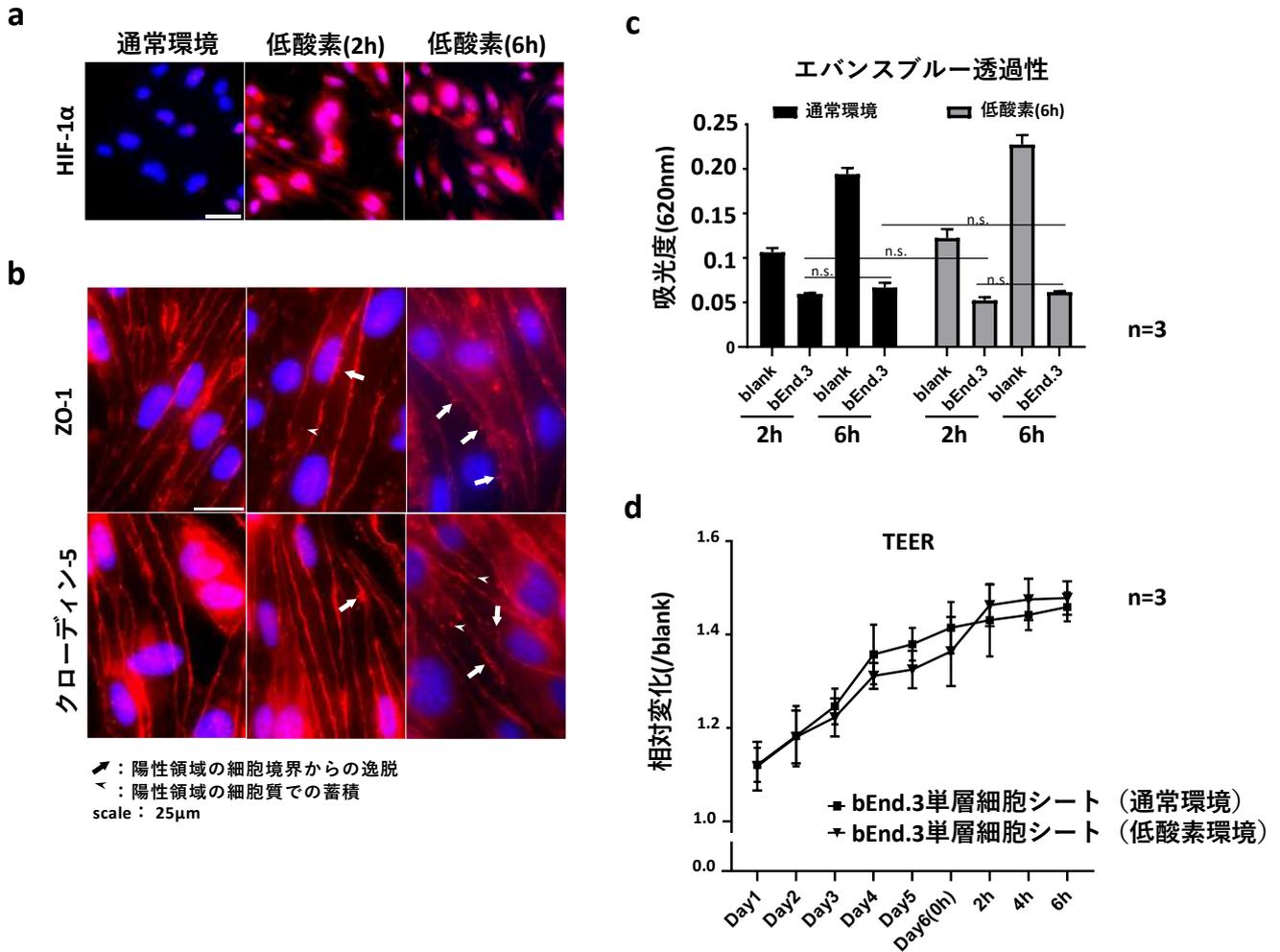
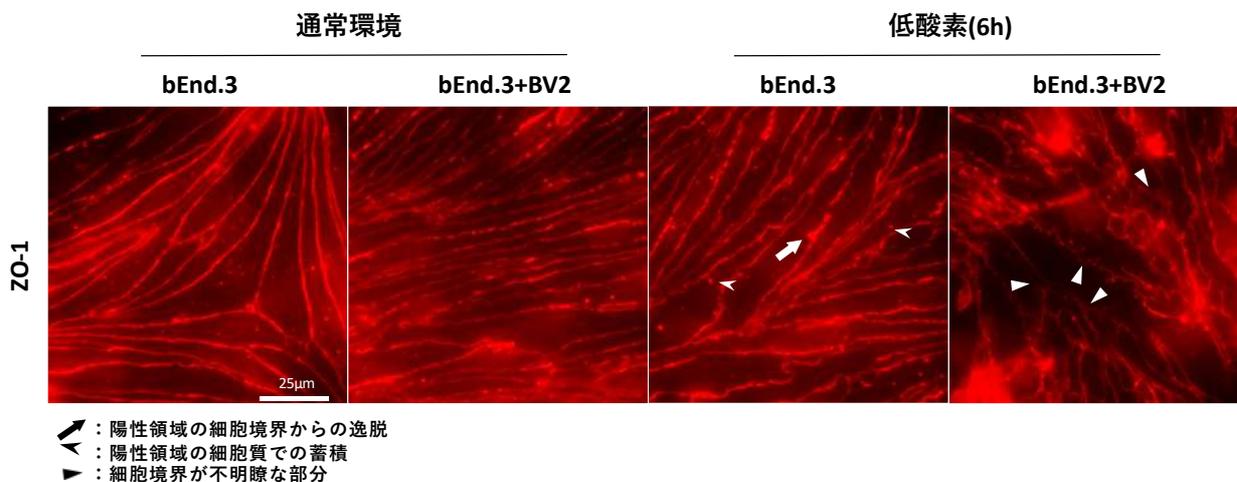


図3-3 bEnd.3 (血管内皮細胞) 単層細胞シートの観察

- a. bEnd.3単層細胞シートに対するHIF-1 α 抗体を用いたICC。通常環境では陽性領域はほとんど認められなかったが、低酸素曝露後2時間および6時間では核および細胞質での陽性領域が認められた。
- b. bEnd.3単層細胞シートに対するZO-1抗体およびクローデイン-5抗体を用いたICC。通常環境および低酸素曝露後2時間および6時間にTJタンパク質の局在を観察した。ZO-1抗体およびクローデイン-5抗体を用いたICCでは、通常環境では細胞境界に一致した陽性領域が認められた。一方、低酸素曝露後2時間および6時間では陽性領域の細胞境界からの逸脱 (矢印) および細胞質での蓄積 (矢尻) が認められたが、これらの変化は微小であった。
- c. bEnd.3単層細胞シートでのEBの透過性。6時間の低酸素曝露による有意な変化は認められなかった。
- d. bEnd.3単層細胞シートでのTEER。6時間の低酸素曝露による有意な変化は認められなかった。

a



b

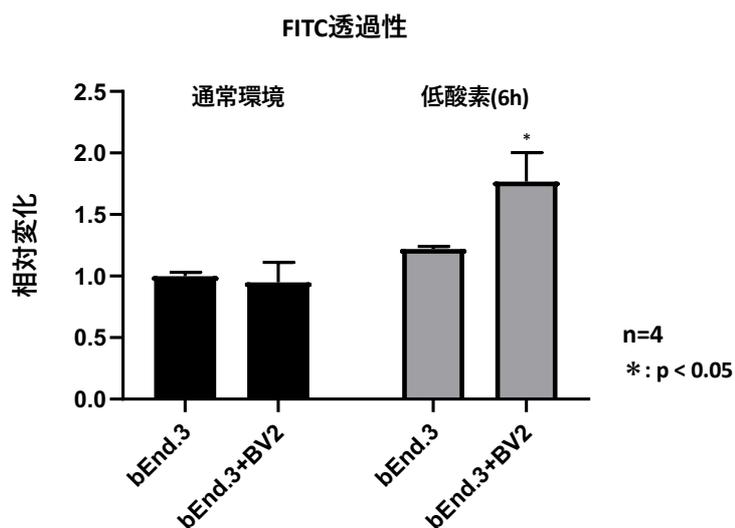
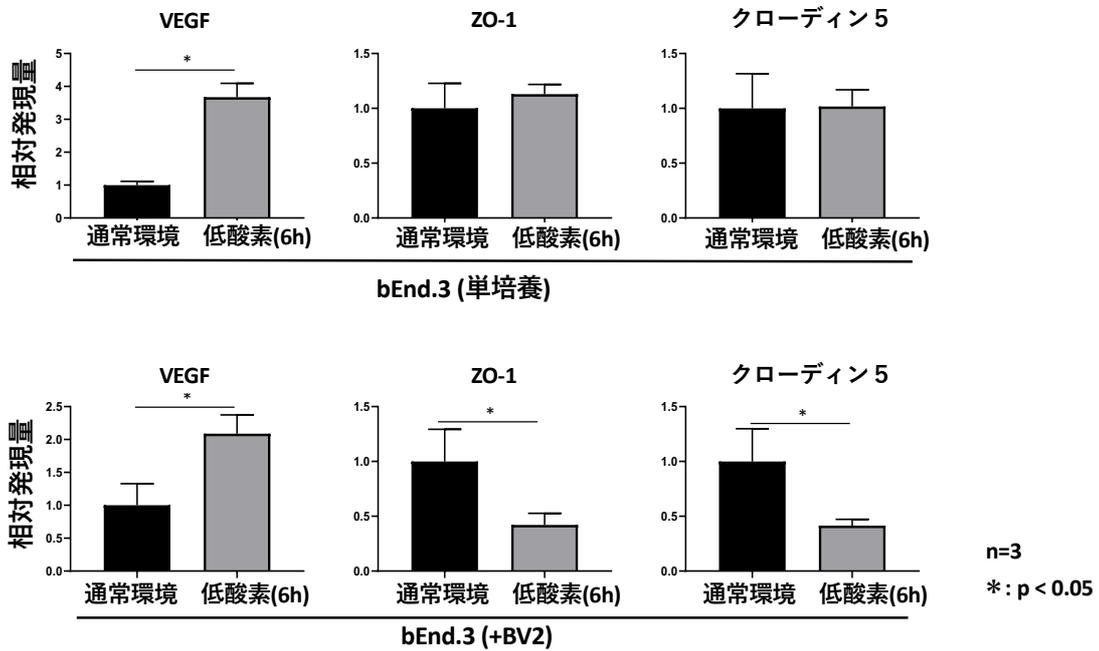


図3-4 bEnd.3単層細胞シートのBV2（ミクログリア）との共培養によるTJの変化

- bEnd.3単層細胞シートに対するZO-1抗体を用いたICC。低酸素曝露前は両群（単培養群・共培養群）ともに細胞境界に一致した陽性領域が認められた。低酸素曝露後6時間では両群ともに陽性領域の細胞境界からの逸脱（矢印）および細胞質での蓄積（矢尻）が認められたが、共培養群においてその傾向は強く、部分的には細胞境界が不明瞭であった（三角）。
- bEnd.3単層細胞シートにおけるFITC透過性の相対変化。FITCの透過性は、通常環境では両群で有意差は認められなかったが、6時間の低酸素曝露後には共培養群が単培養群に比べ有意に亢進した。

a



b

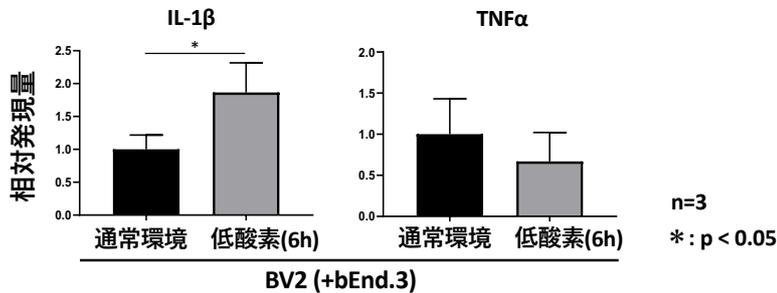


図3-5 bEnd.3のBV2（ミクログリア）との共培養による遺伝子発現変化

- bEnd.3におけるTJ関連遺伝子の発現変化。bEnd.3におけるVEGFの遺伝子発現は単培養群、共培養群ともに低酸素曝露により有意に増大した。ZO-1およびクローディン-5の遺伝子発現は単培養群では低酸素曝露による変化は認められなかった。一方、共培養群では低酸素曝露による有意な減少が認められた。
- BV2における炎症関連遺伝子の発現変化。bEnd.3と共培養した際のBV2におけるIL-1β遺伝子の発現は低酸素曝露により有意な増加が認められた。TNFα遺伝子の発現は変化しなかった。

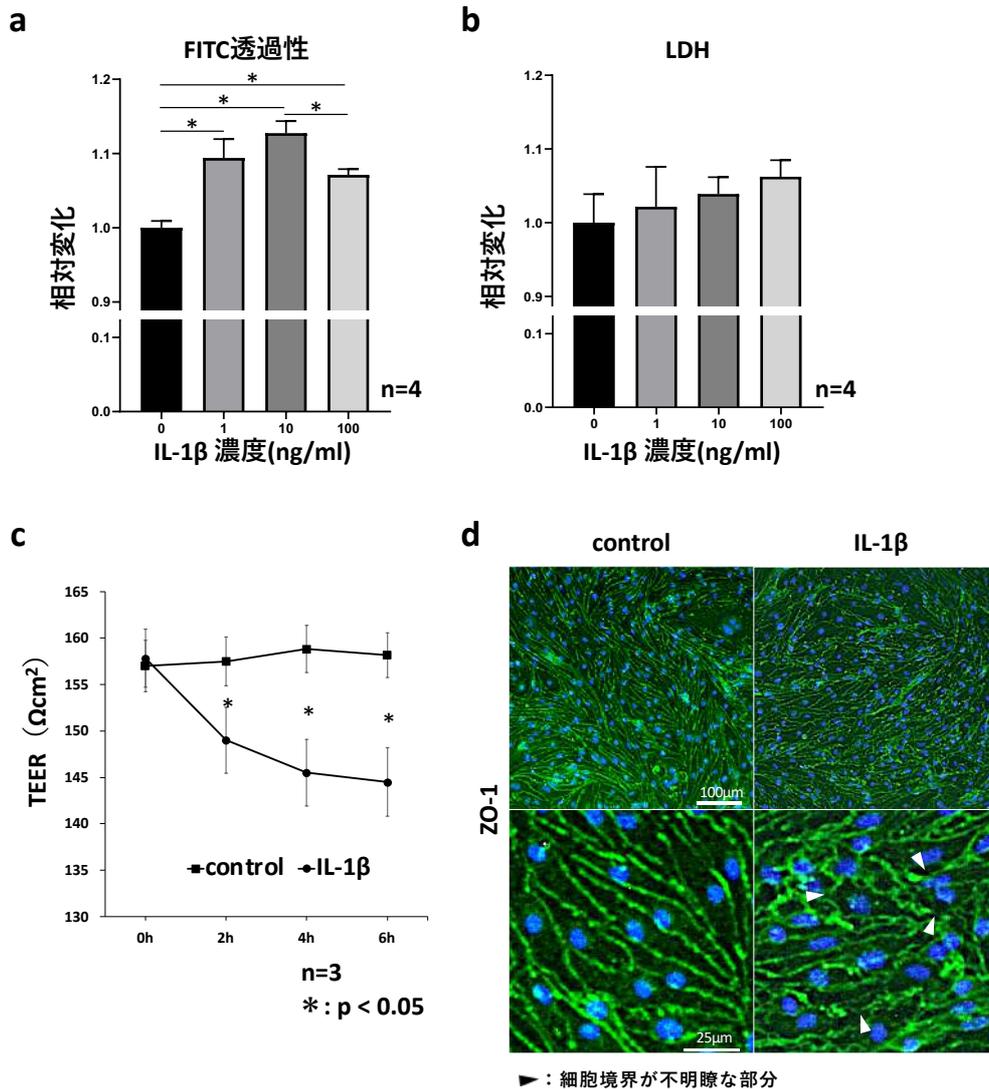


図3-6 bEnd.3単層細胞シート培養液へのIL-1 β 添加

- bEnd.3単層細胞シートにおけるFITC透過性の相対変化。FITCの透過性をIL-1 β 無添加での培養と比較すると、IL-1 β 濃度が10ng/mlでの培養において透過性が最も亢進した。
- bEnd.3におけるLDH放出量の相対変化。IL-1 β 添加によるLDH放出量（細胞障害の指標）に有意な変化は認めなかった。
- bEnd.3単層細胞シートにおけるTEERの変化。TEERはIL-1 β 投与から2時間後に有意に低下し、6時間後まで有意な低下が続いた。
- bEnd.3単層細胞シートに対するZO-1抗体を用いたICC。コントロール群ではZO-1は細胞境界に一致した局在が認められた。一方、IL-1 β 投与群ではZO-1が細胞境界から逸脱し、細胞境界が不明瞭であった（三角）。

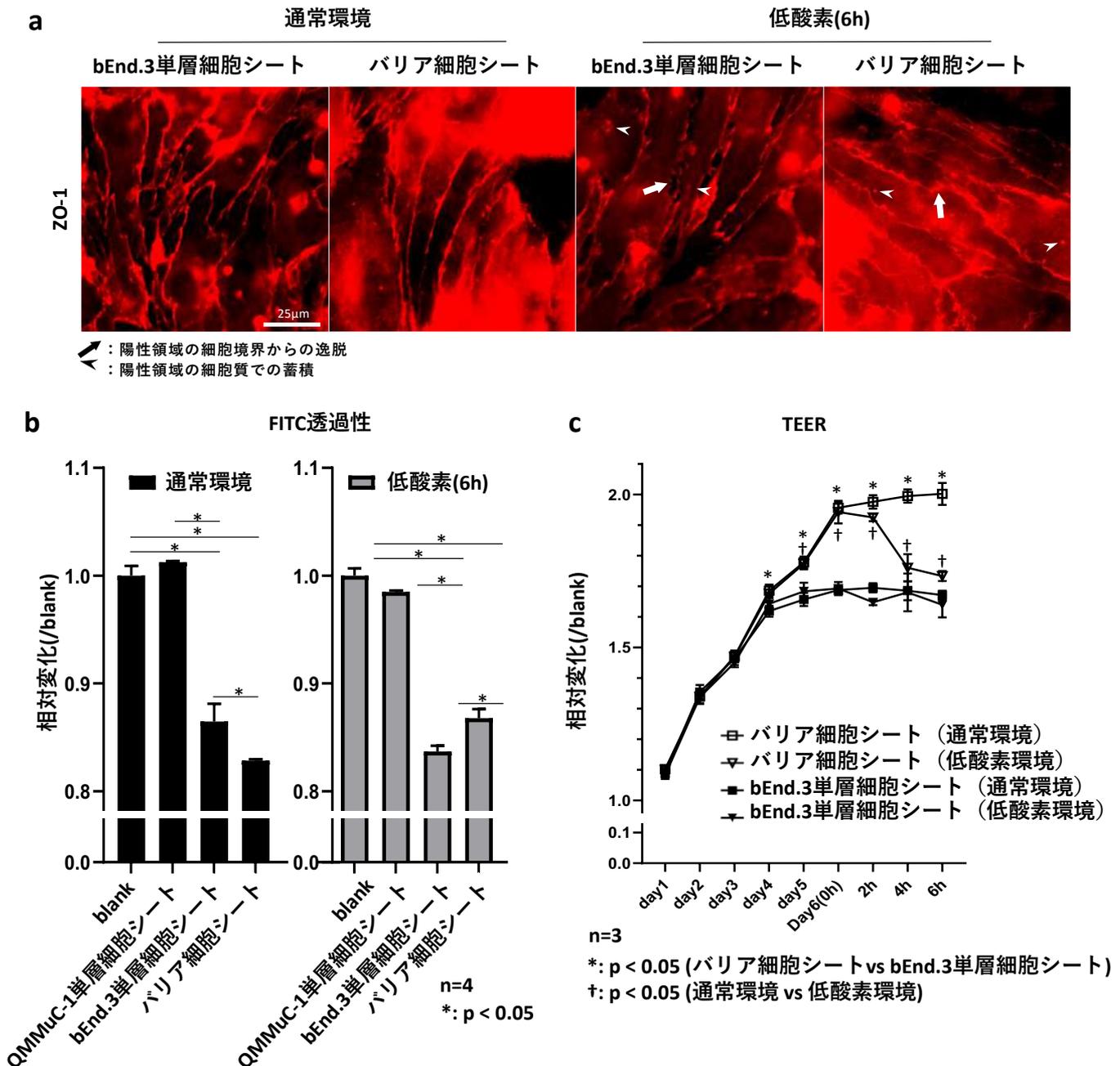


図3-7 bEnd.3 (血管内皮細胞) とQMMu-1 (ミューラー細胞) の共培養によるバリア細胞シート

- バリア細胞シートに対するZO-1抗体を用いたICC。カルチャーインサート半透膜の染色は通常のウェルの染色と比べ観察が困難であったものの、ZO-1抗体を用いたICCで、通常環境では細胞境界に一致した陽性領域が認められた。一方、低酸素曝露後6時間では陽性領域の細胞境界からの逸脱および細胞質での蓄積を認め、部分的には細胞境界が不明瞭であった。
- バリア細胞シートにおけるFITC透過性の相対変化。FITCの透過性を細胞の存在しないblank膜と比較すると、QMMu-1単層細胞シートでは通常環境および低酸素環境において有意差は認められなかった。通常環境ではバリア細胞シートは、bEnd.3単層細胞シートと比べ有意に透過性が低下しているのに対し、低酸素環境ではバリア細胞シートは、bEnd.3単層細胞シートと比べ有意な透過性亢進を認めた。
- バリア細胞シートにおけるTEERの相対変化。バリア細胞シートは通常環境ではbEnd.3単層細胞シートと比べ有意にTEERが向上しているのに対し、低酸素環境では有意なTEER低下が認められた。

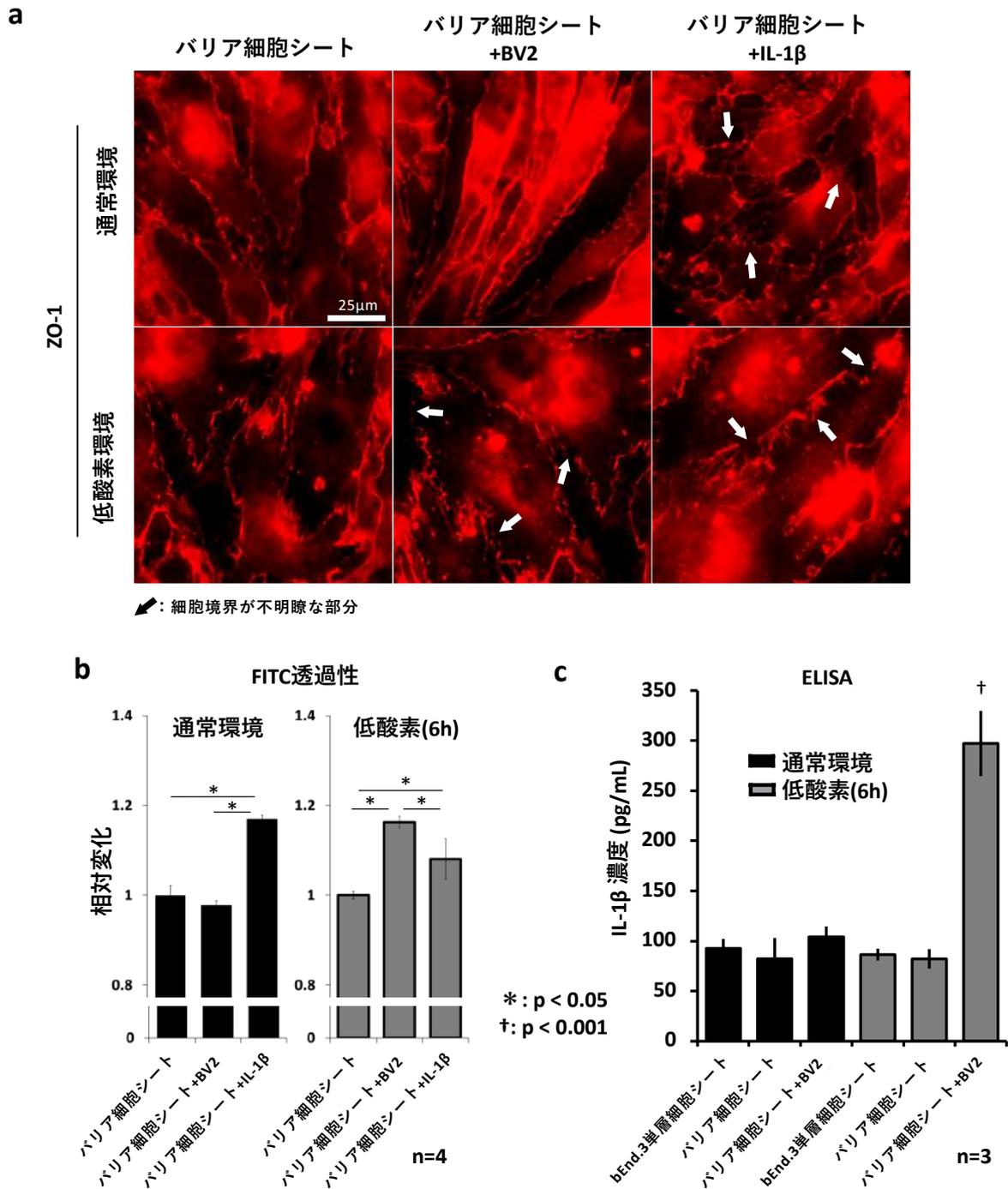


図3-8 バリア細胞シートのBV2との共培養およびIL-1 β 添加

- バリア細胞シートに対するZO-1抗体を用いたICC。カルチャーインサート半透膜の染色は通常のウェルの染色と比べ観察が困難であったものの、ZO-1抗体を用いたICCで、通常環境では単培養群、共培養群において細胞境界に一致した陽性領域が認められた。一方、低酸素曝露後6時間では共培養群において陽性領域の細胞境界からの逸脱および細胞質での蓄積を認め、部分的には細胞境界が不明瞭であった。また、IL-1 β 投与群では、通常環境/低酸素曝露後6時間ともに細胞境界が不明瞭であった。
- バリア細胞シートにおけるFITC透過性の相対変化。FITCの透過性は、通常環境では両群で有意差は認められなかったが、低酸素曝露6時間後には共培養群が単培養群と比べ有意に亢進した。また、両環境で、IL-1 β 添加によりバリア細胞シートの透過性が有意に亢進した。
- 培地中のIL-1 β 濃度の変化。通常環境での共培養と比較し、低酸素環境でBV2と共培養すると、培地中のIL-1 β 量が有意に増加した。

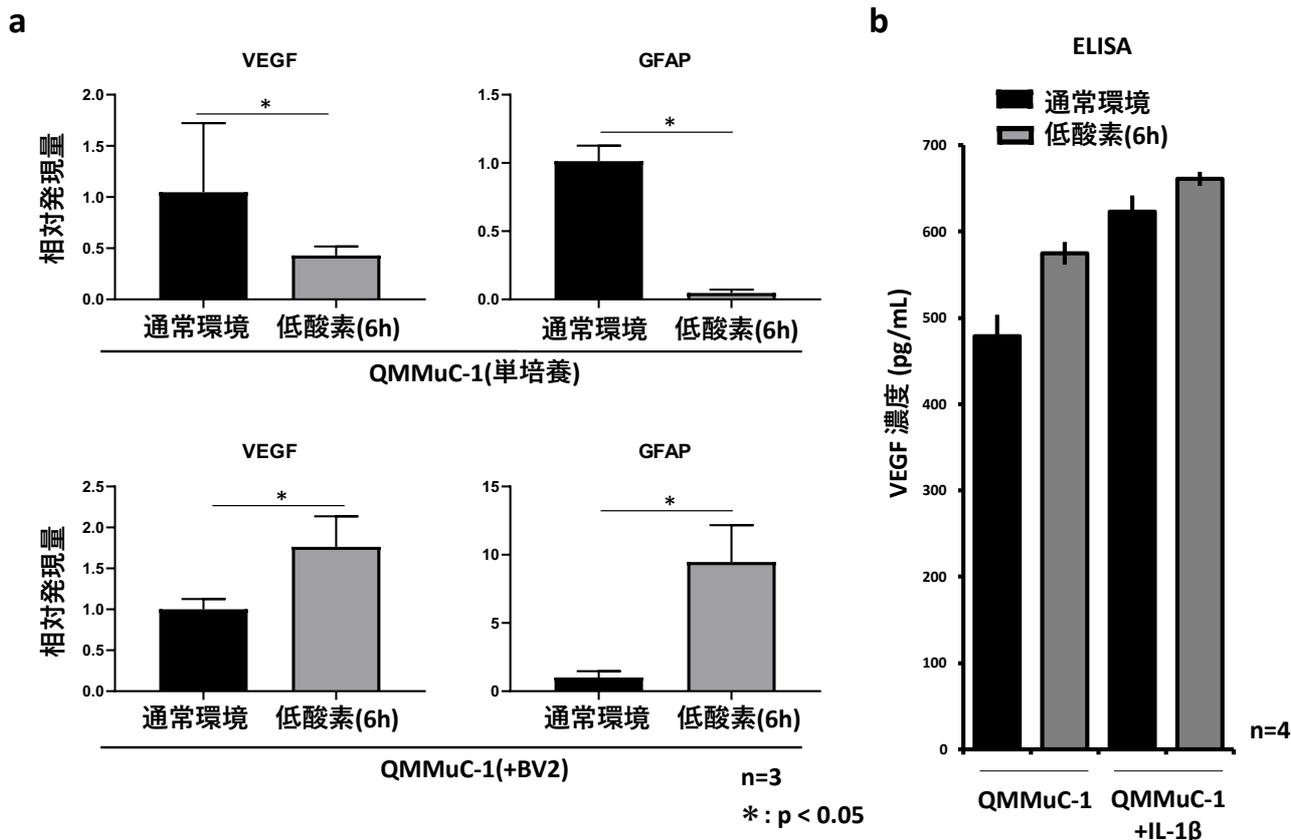


図3-9 QMMuC-1 (ミューラー細胞) によるVEGF産生

- QMMuC-1におけるVEGFおよびGFAP遺伝子の発現変化。両遺伝子とも低酸素曝露による有意な発現減少が認められた。BV2と共培養した際のQMMuC-1におけるVEGFおよびGFAPの遺伝子発現は、両遺伝子とも低酸素曝露により有意な増加が認められた。
- 培地中のVEGF濃度の変化。QMMuC-1の培地にIL-1βを加え、通常環境および低酸素曝露後6時間での培地中のVEGF濃度の変化を観察するためにELISAを行なった。通常環境と比較し、低酸素環境では培地中のVEGFは増加が認められた。培地中にIL-1βを添加した場合は、通常環境であっても培地中のVEGF濃度は増加し、低酸素環境ではさらに増加した。

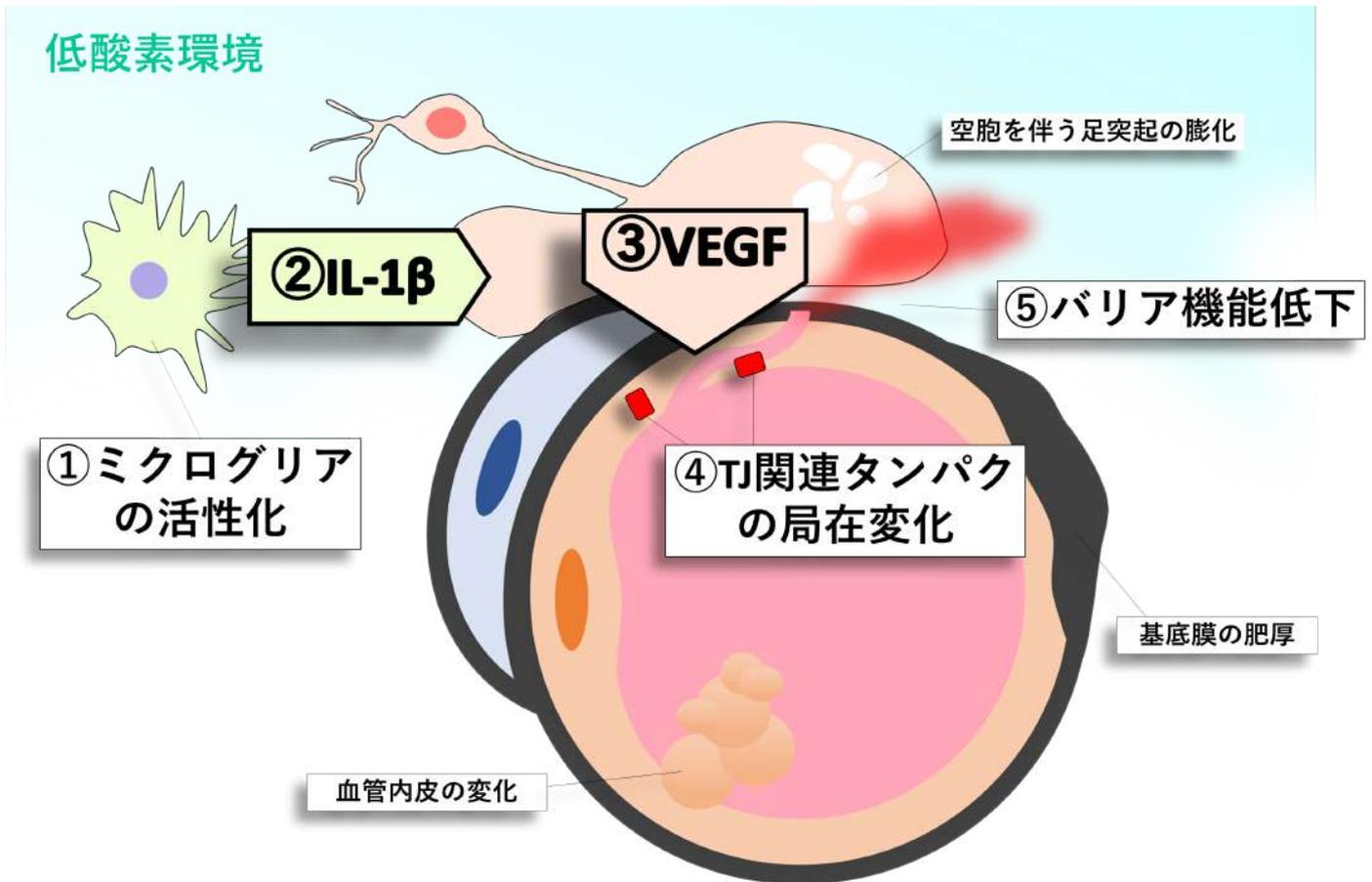


図4 低酸素性血管バリア破綻のメカニズム

低酸素性血管バリア破綻のメカニズムを示した模式図。低酸素性血管バリア破綻は、低酸素曝露により活性化したミクログリア (①) がIL-1 β などの炎症性サイトカインを産生し (②)、これがアストロサイトやミュラー細胞におけるVEGF産生を促すことで (③)、血管内皮細胞のTJ関連タンパクの局在が変化し (④)、バリア機能が低下する (⑤) ことが示唆された。