

プラニン発現株に対し、高いADCC活性やCDC活性を示した。さらに、ポドプラニン発現株を用いたマウス移植片モデルにおいては、NZ-8抗体は高い抗腫瘍活性を示した(図3)。このことから、抗ポドプラニン抗体(NZ-8)は、ポドプラニンによる血小板凝集やがん転移を抑制するだけでなく、ADCC/CDC活性による抗腫瘍活性を持ち、抗体医薬として有望な候補であることがわかった。

5. おわりに

これまで述べてきたように、抗体医薬の開発のためには、標的分子を徹底的に理解する必要がある。本稿では、ポドプラニンを題材として取り上げたが、他の糖タンパク質や糖脂質についても同様の戦略が必要となる。一方で、ポドプラニンは正常細胞にも発現が認められるため、副作用の低減のためには、腫瘍特異的な抗体を開発する必要がある。現在我々は、戦略的に腫瘍特異的な抗体を作製する技術を開発しており、ポドプラニンに対する腫瘍特異的なモノクローナル抗体の臨床応用に向けて研究を遂行している。

- 1) Kato, Y., Fujita, N., Kunita, A., Sato, S., Kaneko, M., Osawa, M., & Tsuruo, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 51599–51605.
- 2) Kaneko, M.K., Kato, Y., Kitano, T., & Osawa, M. (2006) *Gene*, **378**, 52–57.
- 3) Kaneko, M., Kato, Y., Kunita, A., Fujita, N., Tsuruo, T., & Osawa, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 38838–38843.
- 4) Kaneko, M.K., Kato, Y., Kameyama, A., Ito, H., Kuno, A., Hirabayashi, J., Kubota, T., Amano, K., Chiba, Y., Hasegawa, Y., Sasagawa, I., Mishima, K., & Narimatsu, H. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 331–336.
- 5) Kato, Y., Kaneko, M.K., Kuno, A., Uchiyama, N., Amano, K., Chiba, Y., Hasegawa, Y., Hirabayashi, J., Narimatsu, H., Mishima, K., & Osawa, M. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 1301–1307.
- 6) Suzuki-Inoue, K., Kato, Y., Inoue, O., Kaneko, M.K., Mishima, K., Yatomi, Y., Narimatsu, H., & Ozaki, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 25993–26001.
- 7) Kato, Y., Kaneko, M.K., Kunita, A., Ito, H., Kameyama, A., Ogasawara, S., Matsuura, N., Hasegawa, Y., Suzuki-Inoue, K., Inoue, O., & Ozaki, Y., & Narimatsu, H. (2008) *Cancer Sci.*, **99**, 54–61.
- 8) Kato, Y., Sasagawa, I., Kaneko, M., Osawa, M., Fujita, N., & Tsuruo, T. (2004) *Oncogene*, **23**, 8552–8556.
- 9) Kato, Y., Kaneko, M., Sata, M., Fujita, N., Tsuruo, T., & Osawa, M. (2005) *Tumor Biol.*, **26**, 195–200.
- 10) Mishima, K., Kato, Y., Kaneko, M.K., Nishikawa, R., Hirose, T., & Matsutani, M. (2006) *Acta Neuropathol.*, **111**, 483–488.
- 11) Mishima, K., Kato, Y., Kaneko, M.K., Nakazawa, Y., Kunita, A., Fujita, N., Tsuruo, T., Nishikawa, R., Hirose, T., & Matsutani, M. (2006) *Acta Neuropathol.*, **111**, 563–568.
- 12) Kato, Y., Vaidyanathan, G., Kaneko, M.K., Mishima, K., Sri-

- vastava, N., Chandramohan, V., Pegram, C., Keir, S.T., Kuan, C.T., Bigner, D.D., & Zalutsky, M.R. (2010) *Nucl. Med. Biol.*, **37**, 785–794.
- 13) Chandramohan, V., Bao, X., Kaneko, M.K., Kato, Y., Keir, S. T., Szafranski, S., Kuan, C.T., Pastan, I., & Bigner, D.D. (2013) *Int. J. Cancer*, **132**, 2339–2348.
 - 14) Kaneko M.K., Kunita, A., Abe, S., Tsujimoto, Y., Fukayama, M., Goto, K., Sawa, Y., Nishioka, Y., & Kato, Y. (2012) *Cancer Sci.*, **103**, 1913–1919.

加藤 幸成

(東北大学大学院医学系研究科)

Characterization of platelet aggregation-inducing factor podoplanin and development of its antibodies
Yukinari Kato (Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan)

血管リモデリングにおける T 細胞の低酸素応答性転写因子の役割

1. はじめに

多細胞生物は、常に変動する生体内局所の酸素分圧に対して様々な機構を介して適応する。近年、低酸素に対する生体適応の異常や破綻が多くの疾患や病態の成立とその進展に密接に関わることが明らかになってきており、臨床医学的にも生体低酸素応答制御機構の本質的理解が要求されている。疾患に伴う低酸素環境は、虚血性疾患や腫瘍をはじめ代謝性疾患や炎症性疾患を含め多くの疾患で観察され、疾患の発動因子のみならず修飾因子として病態に関与している。低酸素応答性転写因子(hypoxia inducible factor: HIF)は、そのような生体内の酸素分圧の低下に伴い活性化される生体の低酸素ストレスに対する適応性を規定する分子として発見された¹⁾。

一方、近年、動脈硬化をはじめ血管病変の進展機序には、局所の炎症病態が深く関与していることが明らかになってきた。特に、このような病態局所では、細胞の増殖および代謝亢進に伴う細胞内のエネルギー消費が低酸素環境を引き起こし、その結果様々な細胞内シグナルを介してHIFが活性化されることが報告されている。我々は、動脈硬化や血管新生の病態において、血管リモデリングに関与する細胞群に発現するHIFがどのように機能し病態に関与するのかを分子レベルで理解するために、個体の細胞系

譜別に HIF 遺伝子を欠損した疾患モデル動物を作製し、病態生理学的環境下に観られる HIF の機能解析を行っている。本稿では、血管リモデリングの病態における HIF を介する低酸素応答について、我々が行ってきた研究を中心に紹介する。

2. 血管リモデリングに伴う病態局所の低酸素環境の存在

低酸素環境は、細胞の酸素供給の低下あるいは酸素需要の増加した場合に形成される。これまでに、アテローム性あるいは血管傷害性の動脈硬化において、動脈壁の酸素分圧は通常の血管壁のものより相対的に低いことが酸素分圧の直接測定あるいは酸素分圧感受性試薬標識により明らかにされている²⁻⁴。また、これら血管壁や血管構築細胞における低酸素環境の成因については、血管リモデリングに伴う新生内膜増生や血管石灰化による酸素拡散障害に加え、血管周囲に浸潤する炎症性細胞内の代謝亢進に伴う酸素要求性の増加に起因するものが含まれる。事実、血管壁周囲の酸素環境は、組織内血管からの最大酸素拡散距離である 100~250 μm を超えると低酸素状況になると考えられているが、アテローム性動脈硬化のプラークや血管腔傍のマクロファージは、血管内側からの最大酸素拡散距離より近くに位置するにもかかわらず、低酸素マーカーが陽性であることが報告されている。したがって、低酸素閾値は、酸素拡散距離のみならず患部の局所炎症性環境により決定されると考えられる。

さらに、動脈硬化に伴う低酸素環境は、炎症の惹起を介して、病態増悪の一因になると考えられる。例えば、低酸素条件下のマクロファージは炎症性サイトカインの産生や細胞外マトリックス関連酵素の分泌が促進されていることが報告されている。また、低酸素環境は、マクロファージの遊走を抑制することにより同細胞を患部に停滞させて局所的な活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の産生増加を引き起こし、結果的に免疫応答を亢進させる。したがって、局所の ROS の産生増加を介する血管リモデリングの発症と増悪に低酸素環境が関与することが示唆されるが、血管リモデリングの病態にどのように低酸素環境が関与するのかその詳細はまだ十分理解されていない。

3. 血管傷害性血管リモデリングに観られる免疫応答

血管リモデリングの病態形成における免疫応答の関与については、免疫不全動物の血管傷害モデル実験により明らかにされてきた。つまり、免疫応答不全マウスでは、血管

傷害によって形成される新生内膜の増生が抑制されている。それに関与する特異抗原は明らかになっていないが、細胞傷害の結果、尿酸、熱ショックタンパク質やクロマチン関連タンパク質 (high-mobility group box 1 : HMGB1) などを含む細胞内物質が放出され、このような細胞障害関連分子パターン (damage associate molecular patterns : DAMPs) が、その受容体を介して炎症性応答を惹起することがわかっている^{5,6}。

また、最近の報告では、angiotensin II 負荷や食塩感受性高血圧に引き続く血管リモデリングモデルの病態において、免疫担当細胞がその病態形成に深く関与することが明確になってきている⁷。免疫担当細胞が産生する炎症性サイトカイン interferon- γ (IFN- γ) は、各種細胞を活性化して主要組織適合性抗原や共刺激分子の発現や各種サイトカイン、ケモカイン、接着分子や細胞外マトリックス関連分子の産生を促進する。また、IFN- γ は、活性化されたマクロファージや、IL-12 や IL-18 によって活性化された平滑筋細胞においても産生されることが報告されている。このことより、動脈傷害性血管リモデリングは、少なくともマクロファージや平滑筋細胞の活性化による免疫応答の亢進により調節されることが考えられる。

4. 低酸素微小環境を伴う血管リモデリングにおける T 細胞に発現する HIF-1 の役割

動脈硬化やステント留置に伴う局所血管リモデリング形成過程において、血管およびその周囲組織の低酸素条件が、筋線維芽細胞の増殖や血管外膜における細胞外マトリックス成分の増加の一因と考えられている。また、多くの研究報告より、ヒトのアテローム性動脈硬化症やその動物モデルの動脈壁では酸素分圧の低下が観察されており、低酸素条件はアテローム性動脈硬化症の病態を促進することが報告されている^{2,8,9}。これら病態局所における酸素分圧変化は、病態に関わる免疫担当細胞の活性化に大きく影響すると考えられている。何故なら、免疫担当細胞はしばしば異なる酸素分圧にさらされるからである。これらの事実を考えれば、血管リモデリングにおいて、免疫担当細胞の酸素分圧の変化への適応能力は、その病態生理を制御する上で大変重要な位置づけとなる。しかしながら、血管リモデリングの病態において、低酸素環境が免疫応答に与える詳細なメカニズムはこれまで十分理解されておらず、治療標的としての意義についても考慮されていない。特に獲得免疫応答の司令塔的役割である T 細胞の病態に対する低酸素応答の解析は不十分である。

T細胞の血管リモデリングへの関与については、障害された血管組織にT細胞が観察されるまで否定的であった。その後、T細胞欠失マウスや無胸腺ラットの血管傷害モデルにおいて、新生内膜の増生が対照群に比較して抑制されていることが報告されている¹⁰⁾。これらの初期の報告は、動脈の傷害に対する免疫応答システムの機能的関与を示している。一方、我々は、マウス大腿動脈に対するポリエチレンカフ傷害性血管リモデリングモデルにおいて、患部局所に構築される低酸素微小環境に集積するT細胞にHIF-1 α が発現することを確認している¹¹⁾。このことは、これら集積するT細胞の機能は、患部局所の酸素分圧の低下とそれに引き続くHIF-1 α の発現によって影響を受ける可能性を示している。興味深いことには、末梢のT細胞のHIF-1 α の発現タンパク質量の増加は、低酸素環境だけでは不十分であり、T細胞受容体からのシグナルが必要であることが認められている。このことは、T細胞の活性化に

HIF-1 α の機能が関与することを期待させる。事実、慢性関節性リウマチの患者の炎症局所に集積しているT細胞では、HIF-1 α が発現していることが報告されている¹²⁾。

また、我々は、T細胞特異的HIF-1 α 欠失マウスを用いた上述の実験モデルにおいて、T細胞を介する免疫応答の亢進が認められるとともに新生内膜の増生が亢進することを見だしている(表1)。さらに、本変異マウスの表現型の解析結果より、T細胞のHIF-1 α は、炎症性サイトカインや特異抗原に対する抗体の産生を抑制的に制御する可能性が示されている¹¹⁾。別のグループの研究では、LPS投与による急性炎症モデルにおいてもT細胞のHIF-1 α が機能不全になると敗血症病態は悪化することが観察されている¹³⁾。以上のことより、血管リモデリングに関わる免疫応答は、T細胞のHIF-1 α を介して厳密に制御されていると考えられる(図1)。

また、最近、T細胞やB細胞が血管リモデリングの病

表1 T細胞特異的HIF-1 α 欠失マウスの表現型(野生型マウスと比較)

T細胞特異的HIF-1 α 欠失マウス	
末梢リンパ節T細胞数(CD4陽性細胞, CD8陽性細胞)	増加
末梢リンパ節B細胞数(B220陽性細胞)	変化なし
T細胞受容体刺激によるT細胞の活性化	増強
T細胞受容体刺激による炎症性サイトカイン産生	増加
T細胞受容体刺激によるリンパ球増殖	増強
特異抗原に対する抗体産生	増加
血管傷害による新生内膜形成	増強
血管傷害による中膜肥厚	増強
血管傷害による血管周囲のリンパ球集積	増加

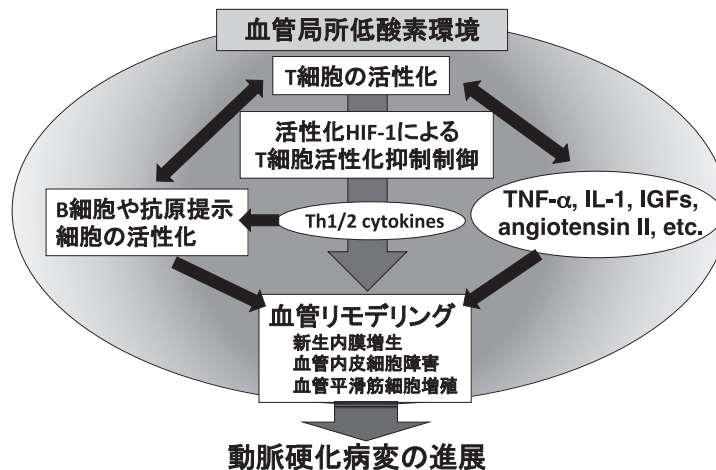


図1 低酸素微小環境におけるT細胞応答を介する血管リモデリング進展モデル

T細胞のHIF-1 α は、血管リモデリングの進展に対して、T細胞の免疫応答を抑制的に制御している。

態形成過程において、傷害された血管組織を介する獲得免疫応答の制御不全が、血管傷害に引き続くその修復過程を遅延させることも示唆されている^{10,14,15}。それは、T細胞を介するIFN- γ や傷害組織からの内因性抗原に対する抗原抗体反応による血管平滑筋の増殖抑制によるものかもしれない。したがって、著者らの実験結果も含めると、T細胞のHIF-1 α は、細胞性免疫および液性免疫を含む獲得免疫応答の制御に関与していることが考えられる。

これまでに、Th1サイトカインであるIFN- γ は、血管内膜増生を含む血管モデリングを促進することが報告されている。このことは、本変異マウスを使用した実験でも、活性化されたHIF-1 α 欠失T細胞におけるIFN- γ の産生が増加することからも考えられる。また、HIF-1 α 欠損T細胞を活性化した場合のIL-2産生の増加は、本変異マウスのリンパ節のT細胞の増加の一因になっている可能性がある。一方、Th2サイトカインであるIL-4やIL-13の発現量の変化について障害は認められなかった。これらの結果を合わせると、マウスT細胞に発現するHIF-1 α の欠失が引き起こす血管リモデリングの増悪には、障害された血管組織局所のサイトカイン産生増加が関与していることが考えられる。さらに、HIF-1 α 欠失マウスで観られる特異抗原に対する抗体産生量の増加は、本変異マウスにおける血管リモデリング病態の増悪の一因に自己応答性の増強がある可能性を示している。また最近、T細胞のHIF-1 α が、炎症性サイトカイン産生細胞であるTh17細胞の分化制御に関与することが報告され¹⁶、病態形成とT細胞分化の関係が少しずつ明らかになりつつある。

5. おわりに

生体にとって、酸素分子は、エネルギー産生、殺菌作用や各種酵素の活性化作用を介して生体維持に必須であると同時に、反応性の高い物質である活性酸素に代表されるように細胞障害性を備えている。したがって、生体内における酸素の分圧変化に適応することは生体維持に必須であり、細胞から個体の様々なレベルで多様な機能制御が必要とされると考えられる。その機能制御が各種疾患によって破綻した場合には、HIF関連分子の発現制御を介して生体の機能を維持することにより、血管関連疾患のみならず様々な疾患の病態改善が期待できると考えている。

- 1) Wang, G.L. & Semenza, G.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4304–4308.
- 2) Björnheden, T., Levin, M., Evaldsson, M., & Wiklund, O.

- (1999) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 870–876.
- 3) Jurrus, E.R. & Weiss, H.S. (1977) *Atherosclerosis*, **28**, 223–232.
- 4) Zemlenyi, T., Crawford, D.W., & Cole, M.A. (1989) *Atherosclerosis*, **76**, 173–179.
- 5) Bianchi, M.E. (2007) *J. Leukoc. Biol.*, **81**, 1–5.
- 6) Takaoka, M., Nagata, S., Kihara, S., Shimomura, I., Kimura, Y., Tabata, Y., Saito, Y., Nagai, R., & Sata, M. (2009) *Circ. Res.*, **105**, 906–911.
- 7) Schiffrin, E.L. (2010) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **19**, 181–186.
- 8) Sluimer, J.C., Gasc, J.M., van Wanroij, J.L., Kisters, N., Groeneweg, M., & Sollewijn Gelpke, M.D. (2008) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **51**, 1258–1265.
- 9) Vink, A., Schoneveld, A.H., Lamers, D., Houben, A.J., van der Groep, P., van Diest, P.J., & Pasterkamp, G. (2007) *Atherosclerosis*, **195**, e69–e75.
- 10) Hansson, G.K., Holm, J., Holm, S., Fotev, Z., Hedrich, H.J., & Fingerle, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10530–10534.
- 11) Kurobe, H., Urata, M., Ueno, M., Ueki, M., Ono, S., Izawa-Ishizawa, Y., Fukuhara, Y., Lei, Y., Ripen, A.M., Kanbara, T., Aihara, K., Ishizawa, K., Akaike, M., Gonzalez, F.J., Tamaki, T., Takahama, Y., Yoshizumi, M., Kitagawa, T., & Tomita, S. (2010) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30**, 210–217.
- 12) Makino, Y., Nakamura, H., Ikeda, E., Ohnuma, K., Yamauchi, K., Yabe, Y., Poellinger, L., Okada, Y., Morimoto, C., & Tanaka, H. (2003) *J. Immunol.*, **171**, 6534–6540.
- 13) Thiel, M., Caldwell, C.C., Kreth, S., Kuboki, S., Chen, P., Smith, P., Ohta, A., Lentsch, A.B., Lukashev, D., & Sitkovsky, M.V. (2007) *PLoS ONE*, **2**, e853.
- 14) Dimayuga, P.C., Li, H., Chyu, K.Y., Fredrikson, G.N., Nilsson, J., Fishbein, M.C., Shah, P.K., & Cercek, B. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 2528–2534.
- 15) Remskar, M., Li, H., Chyu, K.Y., Shah, P.K., & Cercek, B. (2001) *Circ. Res.*, **88**, 390–394.
- 16) Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.R., Luo, W., Zeller, K., Shimoda, L., Topalian, S.L., Semenza, G.L., Dang, C.V., Pardoll, D.M., & Pan, F. (2011) *Cell*, **146**, 772–784.

富田 修平¹, 木平 孝高², 玉置 俊晃²

¹ 鳥取大学医学部分子薬理学分野,

² 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
薬理学分野)

Pathophysiological responses to hypoxia in vascular remodeling by hypoxia-inducible factor-1

Shuhei Tomita¹, Yoshitaka Kihira², and Toshiaki Tamaki²
(¹Division of Molecular Pharmacology, Tottori University Faculty of Medicine, 86 Nishi-cho, Yonago 683-8503, Japan; ²Department of Pharmacology, Institute of Health Bioscience, The University of Tokushima Graduate School of Medicine, 13-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan)