

# 論文内容要旨

Oxidative stress regulates expression of claudin-1  
in human RPE cells

(酸化ストレスによる網膜色素上皮細胞内の  
接着蛋白質 claudin-1 の発現変化)

Central European Journal of Biology, in press.

主指導教員：木内 良明教授

(統合健康科学部門 視覚病態学)

副指導教員：近間 泰一郎准教授

(統合健康科学部門 視覚病態学)

副指導教員：北台 靖彦准教授

(統合健康科学部門 腎泌尿器科学)

平田 潤子

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

加齢黄斑変性 (AMD) は先進国において、高齢者で失明に至る主な疾患である。網膜色素上皮細胞 (RPE)、ブルッフ膜、脈絡膜は視機能の維持に重要な役割を担い、その損傷は、網膜の視細胞の欠損を生じる。RPE は神経網膜の視細胞と脈絡膜毛細管板の間に存在し、単層に並ぶ細胞で、レチノイドサイクルに関与し、血液網膜関門 (BRB) を形成して、視細胞の維持、生存に重要な役割を果たす。BRB は、脈絡膜毛細管板と網膜の視細胞の間を物質やイオンが選択されながら移動し、正常の視機能を維持している。AMD では、RPE が変性すると BRB が損傷し、視細胞死を生じ視機能が障害される。酸化ストレスによる RPE の細胞死のメカニズムは不明な点があるが、酸化ストレスは AMD の進展に関与するといわれている。

RPE には、分化した細胞間接着が存在し BRB を形成し、細胞間接着は tight-junction、Adherens-junction など様々な接着機構に依存している。特に、tight-junction は組織の強度を維持し、正常の RPE の形態を維持するのに重要な役割を果たす。しかし、RPE の接着蛋白質の発現の調節機構については不明な点が多い。

酸化ストレスの積み重ねが AMD の進展に関与すると考え、株化されたヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE 19) を用いて、短時間、あるいは長時間の  $H_2O_2$  刺激に対する様々な接着蛋白質の発現変化を調べた。

ARPE 19 を培養し、血清を除いて 24 時間経過した後に  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ) で刺激した。 $H_2O_2$  刺激した後、細胞生存を Coulter Counter Z1 を用いて測定した。また、ZO-1 (zonula occludens-1)、claudin-1、N-cadherin などの接着蛋白質の発現を検討した。検討方法として、RT-PCR, Real time PCR, Western Blot 法、免疫染色法、経上皮電気抵抗 (TER) を用いた。

$H_2O_2$  刺激後、12 時間までは細胞増殖や生存率に影響はなかった。RT-PCR、ウェスタンブロット法では、claudin-1 は mRNA、蛋白質ともに  $H_2O_2$  刺激から 8-12 時間後では有意に増加することが明らかになった。しかし、このような変化は ZO-1 や N-cadherin では変化はみられなかった。長時間 (24-48 時間)  $H_2O_2$  で刺激すると、claudin-1 は mRNA、蛋白質ともに発現は減少した。その時間では、細胞増殖や生存率が減少し、長時間の酸化ストレスによる細胞毒性の関与も考えられた。

さらに、 $H_2O_2$  刺激 8 時間後に ARPE 19 細胞-細胞間の接着部位に claudin-1 の抗体により強く反応することが免疫染色法により明らかになった。しかし、claudin-1 は酸化刺激が 24 時間持続すると反応は弱くなった。一方、ARPE 19 のバリア機能について、 $H_2O_2$  刺激し 8 時間後、TER は酸化刺激のないものと比較して増加傾向だったが、有意な差はなかった。

次に、接着蛋白質のシグナル伝達として、従来の報告にある mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル経路の関与について、Western Blot 法で検討した。MAPK の p38 のリン酸化について、 $H_2O_2$  で 6-12 時間刺激すると発現は増加したが、ERK や JNK のリン酸化は変化しなかった。さらに、p38 のリン酸化を抑制する SB203580 により、

claudin-1 の発現増加が抑制された。これらの結果から、p38 が酸化ストレスの初期段階の claudin-1 の発現増加に関与していることが示された。

これまで、RPE では酸化ストレスにより claudin のアイソフォームの発現がさまざまな影響を受けることが報告されている。しかし、酸化ストレスによる刺激の早期での claudin-1 の発現や、このような変化の細胞間のシグナル伝達はこれまでに報告がない。我々は ARPE-19 において酸化ストレスの初期段階で接着蛋白質の発現が様々な制御を受けることが明らかにした。

RPE では、酸化ストレスの初期段階に p38MAPK を介して claudin-1 の発現が増加し、このことは初期 AMD の病態解明につながると考える。