

第8号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	平田 潤子
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	今泉 和則	
審査委員	教授	田代 聡	
審査委員	講師	高橋 哲也	
〔論文審査の要旨〕			
<p>加齢黄斑変性（AMD）は欧米や日本などの先進国において失明原因の主要な疾患である。網膜の最外層にある網膜色素上皮（RPE）は視細胞を栄養し、また、視細胞の外節を貪食しながら視細胞を支持することで視機能を維持している。このため RPE 細胞の変性が AMD の発症につながると考えられている。年齢、喫煙や光刺激を含めた複合的な要素は酸化ストレスを誘発する。AMD ではこのように生じる酸化ストレスが RPE 細胞の機能を低下させ発症を引き起こすと考えられているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。</p> <p>RPE 細胞は、細胞間接着装置が発達しており血液網膜関門を形成している。細胞間接着には Tight-junction、Adherens-junction など様々な接着機構がある。Tight-junction は、ZO-1 (zonula occludens-1)、occludin、claudin など、Adherence-junction は N-cadherin、E-cadherin などの接着蛋白質から構成されている。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。</p> <p>そこで、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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激に対する接着蛋白質 ZO-1、claudin-1、N-cadherin の発現変化を以下の方法で調べた。ARPE 19 を 70-80%コンフルエントまで培養し、血清を除いて 24 時間後に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μM) を添加した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加後 8、12、24 時間に ARPE 19 の生存数を Coulter Counter Z1 を用いて測定するとともに、RT-PCR、Real time PCR、Western Blot 法、蛍光抗体法で接</p>			

着蛋白質の発現解析を実施した。バリア機能は経上皮電気抵抗を用いて検討した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加後 12 時間までは細胞増殖や生存率に変化はなかった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加 8 時間後、12 時間後の時点で claudin-1 の発現量は mRNA、蛋白質ともに有意に増加した。しかし、ZO-1 や N-cadherin には変化がなかった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加 24 時間、48 時間の時点では、claudin-1 の mRNA、蛋白質ともに発現が減少した。蛍光抗体法で claudin-1 の細胞内局在を調べたところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加 8 時間後には ARPE 19 細胞-細胞間の接着部位に claudin-1 の強いシグナルが観察された。しかし、24 時間後にはそのシグナルは弱くなり、claudin-1 の発現は減少した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加 8 時間後の時点では、経上皮電気抵抗は酸化刺激のないものと比較して増加傾向を示したが有意な差は観察されなかった。

角膜上皮細胞の ZO-1、connexin43 の発現制御に mitogen-activated protein kinase (MAPK) が関与していることが報告されている。これを参考に、claudin-1 の発現制御に MAPK シグナル経路が関与しているか Western Blot 法で検討した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激 6-12 時間後では p38 のリン酸化は増加したが、ERK (extracellular signal-regulated kinase) や JNK (c-JUN NH2-terminal kinase) のリン酸化に変化は認められなかった。さらに、p38 のリン酸化の阻害剤である SB203580 によって、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。

一般に、酸化ストレスやサイトカインの刺激、熱ストレスによる外界からの刺激により p38 が活性化されるが、p38 の上流にある MKK (MAP kinase kinase) 3、MKK6 がリン酸化されて活性化し、これらが直接 p38 を活性化すると考えられている。これまで claudin-1 の発現制御機構の全容は解明されておらず、今回著者らは、ARPE 19 において酸化ストレスによる刺激の早期に p38MAPK を介して claudin-1 の発現が増加することを初めて示した。本研究では株化された RPE 細胞を用いているため、今後は生体組織から採取した初代培養 RPE 細胞を用いて、このようなメカニズムの確認及び、新たなシグナル経路の解明が急がれる。

以上の結果から、本論文は網膜色素上皮細胞で酸化ストレスの初期段階に p38MAPK を介して claudin-1 の発現が増加することを示し、このことは初期 AMD の病態解明につながる と考える。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与する に十分な価値あるものと認めた。