

20020659

---

# 糖尿病網膜症の発生メカニズム に関する研究

---

(研究課題番号 14110401)

平成14年度厚生労働科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)

総括研究報告書

平成15(2003)年3月

主任研究者 澤田典均

(札幌医科大学医学部)

# 目 次

## I. 総括研究報告

糖尿病網膜症の発生メカニズムに関する研究 澤田 典均

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

## III. 研究成果の刊行物・別刷

# I. 総括研究報告

糖尿病網膜症の発生メカニズムに関する研究

澤田 典均

(札幌医科大学医学部病理学第二講座教授)

総括研究報告書

糖尿病網膜症の発生メカニズムに関する研究

主任研究者 澤田 典均 札幌医科大学医学部病理学第二講座教授

研究要旨 糖尿病性網膜症の初期から、毛細血管の透過性が亢進する。毛細血管の透過性は、細胞間接着装置タイト結合によって調節されている。本研究の目的は、血液網膜関門の inner barrier を形成する網膜毛細血管のタイト結合の制御機構と、糖尿病性網膜症におけるタイト結合の変化を明らかにすることである。本年度は、以下の点を明らかにした。

- 1) 血液網膜関門という血管内皮細胞とグリア細胞からなる生体機能ユニットでは、高血糖によって生じる AGE の標的細胞はグリア細胞である。
- 2) 各種の AGE のうち、glyceroaldehyde を付加した AGE がアストロサイトに作用する。血管透過性を制御する GDNF と VEGF の分泌が変化することが示唆された。
- 3) PKA は、血管内皮細胞に特異的に発現するタイト結合蛋白 claudin-5 の C 末細胞内ドメインのスレオニンをリン酸化し、血管内皮細胞のバリア機能を上昇させる。

A. 研究目的

糖尿病網膜症は、現在我が国における後天性失明原因の第一位を占め、その本態は網膜血管の透過性亢進、網膜血管の内腔閉塞および血管新生といった網膜血管病変である。網膜血管の内皮細胞は、脳の血管内皮細胞と同様に連続性で細胞間にタイト結合が存在し、血管周囲にはアストロサイトが取り囲み、血管の透過性が調節され、網膜や脳の恒常性を維持している。このバリア機構は、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) にならって、血液網膜関門 (blood-retinal barrier: BRB) と呼ばれている。糖尿病網膜症では、病態初期から BRB が破綻する。その病態形成には、高血糖に伴うサイトカインの発現異常、代謝異常、血流動態異常が複雑に絡み合っているが、現在最も注目されている成因の一つに、網膜における血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現上昇がある。VEGF は、血管透過性因子 (vascular

permeability factor: VPF) とも呼ばれ、血管新生を促進するばかりでなく血管透過性も亢進させる。VEGF の発現は、虚血あるいは低酸素で誘導されることが広く知られ、虚血網膜における VEGF 産生細胞は網膜のグリア細胞と考えられている。しかし、臨床的には明らかな網膜血管の内腔閉塞が生じる前から VEGF の発現と血管の透過性亢進が起こっており、その発現因子として、慢性的な高血糖によってもたらされる後期グリケーション終末産物 (advanced glycation endproducts: AGE) の関与が示唆されている。網膜内のグリア細胞には、ミューラー細胞、アストロサイト、ミクログリアがあるが、実際、AGE がミューラー細胞に作用すると、VEGF の発現が亢進することが報告されている。

一方我々は、神経細胞に対し生存維持作用を持つグリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF) が、BBB を構成する脳血管内皮細胞のタイト結合バリア

機能を亢進することを明らかにした。さらに、網膜グリア細胞からもGDNFが分泌されていることを確認し、GDNFが網膜血管のバリア機能を亢進させる可能性があることを示した。

我々は、糖尿病網膜症の初期変化である網膜血管の透過性亢進が起こる機序として、AGEにより網膜グリア細胞でのVEGFの分泌が亢進する一方で、もともと分泌していたGDNFが減少するという仮説を立て、研究を進めている。AGEは、グリケーション反応（非酵素的糖化反応）の最終産物であるが、その反応の性質上、単一の物質ではなく多様なものと考えられている。実際、糖尿病患者の血清に少なくとも5種類のAGEと、carboxymethyl-lysine (CML)、carboxyethyl-lysine (CEL)が存在することを報告している。

本研究では、グリア細胞がGDNFを産生するという形質を失う機構を明らかにしようとするものである。さらに糖尿病網膜症の初期変化である血管透過性の亢進は、血管内皮細胞のタイト結合の機能が低下するために起こることから、VEGF、GDNFを含めた各種サイトカインによる血管内皮細胞のタイト結合の機能調節を調べる。これらの研究成果は、糖尿病網膜症の初期変化である血管透過性の亢進という症状に対して、タイト結合機能を正常状態にまで高めるといふ根治療法の開発に大きく寄与すると考えられ、さらに糖尿病網膜症による後天性失明を激減させるのと期待される。

本年度は、1. 7種のAGEをグリア細胞や毛細血管内皮細胞に作用させ、VEGFとGDNF発現および内皮細胞のタイト結合バリア機能の変化を検討した。2. 血管内皮細胞ではclaudin-1, claudin-5などが発現していることが知られているが、血管内皮のタイト結合の形成、維持、制御の分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで、wild-typeあるいはmutant claudin-1の発現を誘導できる肺血管内皮細胞株 (RLE) を樹立し、タイト

結合が再構成されるかを、またclaudin-1がシグナル伝達分子の一つであるMAPキナーゼの標的分子であるかを検討した。

## B. 研究方法

本研究の第一の目的は、網膜グリア細胞の形質が糖尿病によって変化し、血液網膜関門の透過性を亢進させることを実証することにある。従って以下の点を2年以内に明らかにする。

- 1) 糖尿病による網膜毛細血管の変化を引き起こす糖化終末産物 (advanced glycation end-product:AGE) のタイプを明らかにする。
- 2) これらのAGEの標的が血管内皮細胞かグリア細胞かを明らかにする。
- 3) グリア細胞では、AGEによってGDNFやVEGFの発現が変化するか。
- 4) AGEのシグナル伝達がMAPK, PI3K, p38MAPKのいずれによるか。
- 5) GDNFやVEGFなどによる血管内皮細胞のタイト結合蛋白の変化を検討する。

これらを念頭に置いて、本年度は、以下のことを実施した。

1. AGE蛋白の作成：AGEには多様な種類が報告されるようになった(Curr Mol Med 2001, 1:287-297)。そこで7種のAGEをアルブミンを用いて合成した。
2. 市販されているヒトグリア細胞とブタ大脳皮質毛細血管内皮細胞をconfluent densityまで培養し、各種AGEを作用させた。ヒトグリア細胞では、GDNF, VEGFの発現レベルをRT-PCRによって検討し、ブタ大脳皮質毛細血管内皮細胞ではタイト結合バリア機能の指標であるtranscellular electrical resistance (TER)を測定し、いずれの細胞がAGEに対して感受性があるか、さらにどのタイプのAGEが最も生物学的に活性があるかを検討した。
3. cAMPなどによる初代培養ブタBBB構成血管内皮細胞のタイト結合蛋白の変化を、免疫沈降法を用いてとくにリン酸化状態の変化や相互作用

を調べた。

4. ドキシサイクリン(Dox)依存性転写因子を導入した血管内皮細胞に、claudin-1やclaudin-5及びそれらの変異遺伝子を導入し、タイト結合機能への影響を検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、大部分が培養細胞を用いて行われ、ヒト細胞も市販された細胞を用いることにより、倫理上の問題が生じることを極力避けた。実験動物に対しては、十分な麻酔薬投与などを行い、苦痛を最小限に抑えるよう努力した。

### C. 研究結果

1. ブタ脳血管内皮細胞を継代し、各種のAGEを100  $\mu$ g/mlの濃度で作用させ、TERを計測した。

しかし、いずれのAGEを作用させても、24時間後のTERはコントロールと有意差はなかった。一方、ヒト脳アストロサイトに同様の処理をしたところ、glyceradehydeを付加したAGE-2がGDNGFの発現を最も低下させ、46% ( $p < 0.01$ )となった。さらにVEGF121とVEGF165mRNAについて検討したところ、AGE-2が最も亢進させ、それぞれ128% ( $p < 0.01$ )、140% ( $p < 0.01$ )であった。

ヒト脳アストロサイトに、10, 50, 100, 200  $\mu$ g/mlのAGE-2を8時間処理した後、RNAを抽出し、RT-PCRにてGDNF mRNAの発現を調べた。10  $\mu$ g/mlの濃度から発現が有意に低下し始め、100  $\mu$ g/mlでは約50%にまで低下した。次に、100  $\mu$ g/mlのAGE-2を2, 8, 24時間処理したところ、処理後4~8時間で最も低下し、24時間まで持続した。

2. ブタ脳血管内皮細胞にcAMPを作用させると、3-4倍TERが上昇した。このとき、protein kinase A (PKA)阻害剤(H-89)を作用させた結果、claudin-5は、PKA依存性リン酸化を受けることが明らかになった。さらにclaudin-5の転写も上昇したが、その上昇は、H-89の投与に影響を受けずPKA非依存

性であることが明らかになった。

3. MAPキナーゼのコンセンサスリン酸化候補部位Thr<sup>203</sup>に変異を加えたmutant claudin-1発現ベクター(pUHD10-3-KmCL1T203A)を導入したRLE細胞株を樹立した。RLE:rtTA:CL1, RLE:rtTA:CL1T203A細胞株いずれも、Dox処置によってclaudin-1の発現が細胞境界の最もapical側にみられた。Western blot法では、claudin-1の発現量は、Doxの処置時間、濃度依存性に増加し、TERも増加した。したがった両細胞株において機能的タイト結合が再構成されたと考えられた。しかしRLE:rtTA:CL1T203A細胞では、バリア機能がRLE:rtTA:CL1細胞に比べて有意に低く、この理由について現在検討中である。

### D. 考察

これまで我々は、GDNFがBBBを構成するブタ大脳皮質毛細血管内皮細胞のバリア機能を亢進させること、ラット網膜のグリア細胞にもGDNFが発現し、かつBRBを構成する血管内皮細胞にGDNFレセプターが発現していることを明らかにしてきた。BBBやBRBを構成する血管内皮細胞とグリア細胞は、ひとつの生体機能ユニットとして働き、グリア細胞から分泌されるGDNFにより、血管のバリア機能を維持していると考えられる。本研究では、糖尿病網膜症の血管透過性亢進に着目し、BRBの解析を行うために、BRBと極めて類似したBBBを構成するブタ大脳皮質毛細血管内皮細胞とヒト脳アストロサイトを用いて実験を行った。

作製した7種のAGE、すなわちAGE1~5, CML, CELをブタ脳血管内皮細胞に投与し、透過性の変化を検討した。AGE-2は臍帯静脈内皮細胞や大動脈内皮細胞の透過性を亢進させるとされているが、本研究で用いた脳血管内皮細胞に対して、AGE-2による透過性の変化はみられなかった。これは、臍帯静脈や大動脈といったもともとバリア機能の低い内皮細胞では、AGE-2

による透過性の亢進が出現しやすいが、バリア機能の高い脳毛細血管内皮細胞では、AGE-2による透過性の亢進は出現しにくく、タイト結合機能の調節機構が異なる可能性が考えられた。

次に、ヒト脳アストロサイトに7種のAGE-2を投与した実験では、AGE-2がGDNF mRNAの発現を最も低下させ、ついでAGE3～5も低下させることが明らかとなった。糖尿病患者の血清中のAGE-2濃度は、25～80 $\mu$ g/mlと報告されており、本研究でも、AGE-2は、10 $\mu$ g/mlの濃度からGDNFの発現を低下させ、糖尿病状態を反映していると考えられた。AGE-2によるVEGFの発現について、VEGF121と165のmRNAの変化を検討したところ、AGE-2が発現を亢進させた。以上より、AGE-2に対する感受性は、脳の毛細血管内皮細胞よりもグリア細胞の方が明らかに高かった。従って、BRBという血管内皮細胞とグリア細胞から成る生体機能ユニットにおけるAGE-2の標的細胞は、グリア細胞であると考えられた。

AGEは、グリケーション反応により生成されるが、その反応の性質上、多種類の分子が生成される。グリケーション反応は、メイラード反応とも呼ばれ、還元糖のアルデヒド基がアミノ酸あるいはタンパク質のアミノ基と反応して、 Schiff塩基を形成した後、アマドリ転位生成物となる前期反応と、それがさらに脱水、転位反応を繰り返し最終的にAGEに至る後期反応に分けられる。しかし、最近この経路以外に、グリセルアルデヒドなどの中間代謝産物が分離し、この中間代謝産物が再びタンパク質と結合してAGEを形成する経路が示唆されている。本研究では、7種のAGE2を用いたが、AGE-2が最もグリア細胞の性質を変化させた。一方、ラット脳皮質細胞に対する毒性を調べたところ、AGE-2が最も毒性が高いと報告されている。しかし、今回の実験に用いた濃度では、AGE-2によるグリア細胞や毛細血管内皮細胞の細胞死は確認され

なかった。AGE-2は、*in vitro*でグリア細胞でのVEGF発現を亢進させるが、さらに*in vivo*でも、AGE-2をラットの硝子体や腹腔内へ注入すると、網膜グリア細胞を中心にVEGFの発現が亢進することが報告されている。また、ヒト糖尿病網膜におけるAGE-2とVEGFの免疫組織化学的な検索でも、AGE-2の沈着は網膜血管壁や網膜周囲のグリア細胞にみられ、その分布はVEGFタンパクの発現に類似しているとされており、AGE-2の標的細胞がグリア細胞であることを示している。

VEGFは、VPFとも呼ばれるように、ヒスタミンの約5万倍の強い透過性亢進作用をもつ。糖尿病ラット網膜では、血管透過性亢進を示すアルブミンの血管外漏出がみられるとともに、VEGFの発現が著明に亢進している。VEGFの血管透過性亢進作用機序については、いまだ不明な点が多いが、タイト結合構成タンパクであるoccludinの発現の低下、vesiculo-vacuolar organellesの形成、カベオラの増加、窓構造の形成などの関与が報告されている。これらのことは、VEGFがタイト結合を介したパラセルラー経路による血管透過性を亢進させるだけでなく、トランスセルラー経路によっても血管透過性を亢進させていることを示している。今後、BRBを構成する血管内皮細胞に対するVEGFの作用を明らかにする必要がある。

糖尿病合併症の原因の一つと考えられているAGEは、生体のタンパク質に糖が付加されることにより、タンパク質の構造が変化しその機能が障害されることが考えられている。例えば、水晶体蛋白がAGE化されると、混濁が生じ白内障となることや、腎基底膜にAGEが蓄積し、血漿蛋白の漏出が増加することなどが挙げられる。近年、AGEの作用は、細胞表面に存在するAGE受容体を介して、さまざまな反応が起こることが明らかになった。AGEの受容体としては、RAGE (receptor for AGE)、マクロファージスカベ

ンジャー受容体, ガレクチン-3 などいくつかの分子が存在するとされている. それらの受容体のうち, RAGEは血管内皮細胞・平滑筋細胞・周皮細胞などの血管壁細胞や腎メサンギウム細胞, 赤血球, マクロファージ, 脳グリア細胞に発現が認められており, 糖尿病性細小血管症の発症, 進展に関与しうる因子として注目されている. しかし, そのシグナル伝達に関しては不明な点が多い. ヒト網膜色素上皮細胞を用いたAGEによるシグナル伝達について検討した報告では, extracellular regulated キナーゼ

( ERK ), c-jun, NH2-terminal キナーゼ ( JNK ), p38 MAP キナーゼ ( p38 K ) とホスファチジルイノシトール3キナーゼ ( PI3K ) のリン酸化を調べたところ, ERK と JNK で増加したと報告している. また, ERK と PI3K の阻害薬を用いて, AGEによる VEGF の発現に関しても検討しており, ERK の阻害薬にて VEGF 発現が低下したとしている. 今後, このようなシグナル伝達阻害薬を用いて, AGE-2 による GDNF の発現変化についても検討を要する. また, 網膜における AGE の局在について, 抗 CML 抗体を用いてヒト網膜症眼を検討したところ, 血管壁および血管周囲のグリア細胞に沈着がみられたとしているが, 今後, AGE1 ~ 5, CEL の抗体を用いて網膜での沈着を解析する必要もあろう.

MAPキナーゼは, 血管内皮細胞のタイト結合の機能を調節するが, その標的分子については未だ不明である. 今回我々は, MAPキナーゼが claudin-1 の制御を介して血管内皮細胞のバリア機能を上昇させることを明らかにした. その理由としては, 第一に RLE:rtTA:CL1細胞において, MAPキナーゼの阻害剤である PD98059 の前処置が, Dox で誘導される TER の上昇とマンニトール, イヌリンの透過性の減少を抑制したこと, 第二に PD98059 の前処置が, Dox 処置した RLE:rtTA:CL1細胞における Triton-X100 非可溶性 claudin-1 の量を

著明に減少させたこと, 第三に Dox によって誘導される RLE:rtTA:CL1T203A細胞のバリア機能や Triton-X100 非可溶性 claudin-1 の量が, RLE:rtTA:CL1細胞のそれと比較して有意に小さいこと, が挙げられる. また, 両細胞株で違うレベルにあったバリア機能や Triton-X100 非可溶性 claudin-1 の量が, PD98059 前処置により同じレベルに減少したことは, MAPキナーゼが claudin-1 の Thr<sup>203</sup> だけではなく別の部位を標的としてバリア機能を上昇させる可能性を示唆している. 実際, claudin-1 の第2細胞外ドメイン内の Thr<sup>153</sup> にも MAPキナーゼのコンセンサスリン酸化候補部位があり, この部位の生理学的意義を明らかにするためには今後更なる研究が必要である.

本研究の結果から, AGE は, 臍帯静脈や大動脈といったバリア機能の低い内皮細胞に対して血管透過性を亢進させると報告されているが, バリア機能の高い脳毛細血管内皮細胞の透過性に対して, 影響を及ぼさないことが明らかになった. 一方, グリア細胞は AGE-2 に感受性が高く, GDNF の発現を低下させるとともに, VEGF の発現を亢進させた. 以上から, BBB や BRB という血管内皮細胞とグリア細胞からなる生体機能ユニットにおける AGE2 の標的細胞はグリア細胞であり, 高血糖で生じた AGE2 がアストロサイトに作用し, 血管透過性を制御する GDNF と VEGF の分泌が変化することが示唆された. また, cAMP が protein kinase A 依存性に claudin-5 をリン酸化し, タイト結合バリア機能を亢進させることから, 糖尿病によって亢進した網膜毛細血管の透過性を, PKA を活性化することにより低下させられる可能性が示唆された.

BBB や BRB において, アストロサイトがパラクライン的に血管透過性を調整していると考えられる. そこで, アストロサイトなどのグリア細胞を標的に, 血管透過性を亢進させる VEGF 分泌を抑える一方で, 血管透過性を下げ GDNF 分泌の誘導ができれば, 血管透過性亢



進による網膜浮腫など糖尿病網膜症の予防や治療において有効の可能性があると考えられた。このことは、グリア細胞を標的とした、従来とはまったく異なる新しい概念の治療法を提案している。

#### E. 結論

糖尿病網膜症の初期変化である血管透過性の亢進は、血管内皮細胞のタイト結合の機能が低下するために起こる。本研究の結果から、高血糖により生じる AGE は、BRB を構成するグリア細胞に選択的に働き、血管透過性を高める VEGF 産生を促進した。一方、血管内皮細胞に対しては、PKA の活性化を介して血管透過性を低下させることが示唆された。これらの研究成果は、糖尿病網膜症の初期変化である血管透過性の亢進という症状に対して、血管内皮細胞のタイト結合機能を正常状態にまで高めるといふ根治療法の開発には、グリア細胞の形質を調節する方法と、血管内皮細胞のタイト結合機能を直接制御する方法が提案された。今後、AGE による、あるいは cAMP によるシグナル伝達経路を明らかにすることができれば、糖尿病網膜症による後天性失明を激減させることと期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

著書

澤田典均, 小島隆. 血液臓器関門と疾患. 森道夫編著, 病気と細胞内小器官, 文光堂. 182-194, 2002.

澤田典均. 組織修復と HGF. 森道夫編著, 病気と分子細胞生物学, メディカルサイエンスインターナショナル. 148-158, 2002.

森道夫, 澤田典均. 細胞間接着装置, 臨牀電子顕微鏡学会編 病気の形態学, 学際企画, 52-55, 2002.

雑誌

Suzuki K, Kokai Y, Sawada N, Takakuwa R, Kuwahara K, Isogai E, Isogai H, Mori M.

SS1 Helicobacter pylori disrupts the paracellular barrier of the gastric mucosa and leads to neutrophilic gastritis in mice.

Virchows Archiv, 440: 318-324, 2002.

Takakuwa Y, Kokai Y, Sasaki K, Chiba H, Tobioka H, Mori M, Sawada N.

Bile canalicular barrier function and expression of tight junctional molecules in rat hepatocytes during common bile duct ligation.

Cell Tissue Res, 307: 181-189, 2002.

Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, Sawada N.

Polarised distribution of carcinoembryonic antigen is associated with a tight junction in human colorectal adenocarcinomas. J Pathol, 198: 207-212, 2002.

Kojima T, Spray DC, Kokai Y, Chiba H, Mochizuki Y, Sawada N.

Cx32 formation and/or cx32-mediated intercellular communication induce expression and function of tight junctions in hepatocytic cell line.

Exp Cell Res, 276: 40-51, 2002.

Osanai M, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Kimura H, Satoh M, Sawada N.

Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)-4  $\alpha$  induces expression of endothelial Fas ligand (FasL) to prevent cancer cell transmigration: A novel defense mechanism of endothelium against cancer metastasis.

Jpn J Cancer Res, 93:532-541, 2002.

Kamimura Y, Chiba H, Utsumi H, Gotoh T, Tobioka H, Sawada N.

Barrier function of microvessels and roles of glial cell line-derived neurotrophic factor in the rat testis. *Med Electron Microsc*, Sep;35(3): 139-45, 2002.

Miyahara T, Simoura T, Osahune N, Uchida Y, Sakuma T, Nemoto N, Kozakai A, Takamura T, Yamazaki R, Higuchi S, Chiba H, Iba K, Sawada N. A Highly Potent 26,27-Hexafluoro-1  $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 on Calcification in SV40-Transformed Human Fetal Osteoblastic Cells. *Calcif Tissue Int*, Jun;70(6): 488-95, 2002.

Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M, Sawada N. Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4  $\alpha$  triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*, in press.

Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*, 36 in press.

## 2. 学会発表

千葉英樹, 藤部正人, 相馬有, 後藤朋子, 伊藤泰成, 菊地慶介, 長澤邦彦, 小島隆, 澤田典均. コンディショナルシステムを用いた核内受容体と生体バリアの機能解析. 第 91 回日本病理学会総会, 2002.

相馬有, 千葉英樹, 石崎努, 藤部正人, 小島隆, 澤田典均. cAMP による血液脳関門の制御におけるコネクシン 40 の関与.

第 91 回日本病理学会総会, 2002.

千葉英樹, 後藤朋子, 伊藤泰成, 菊地慶介, 小山内誠, 小島隆, 澤田典均. 遺伝子改変マウス F9 細胞株を用いた Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4  $\alpha$  とレチノイド受容体の機能解析.

第 82 回北海道医学大会, 2002.

藤部正人, 千葉英樹, 相馬有, 小島隆, 澤田典均. ラット肺血管内皮細胞株を用いた生体バリアの再構成と制御機構の解析. 第 82 回北海道医学大会, 2002.

相馬有, 千葉英樹, 藤部正人, 宮嶋秀彰, 郷久晴朗, 石崎努, 小島隆, 澤田典均. cAMP/プロテインキナーゼ A は claudin-5 を標的分子として血液脳関門を制御する. 第 82 回北海道医学大会, 2002.

千葉英樹, 小山内誠, 小島隆, 澤田典均. 遺伝子改変マウス F9 細胞株を用いた Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4  $\alpha$  とレチノイド受容体の機能解析. 第 61 回日本癌学会総会, 2002.

藤部正人, 千葉英樹, 相馬有, 小島隆, 澤田典均. ラット肺血管内皮細胞株における生体バリアの再構成と MAP キナーゼによる制御. 第 61 回日本癌学会総会, 2002.

相馬有, 千葉英樹, 藤部正人, 小島隆, 澤田典均. cAMP はコネクシン 40 を標的分子として血液脳関門を制御する. 第 61 回日本癌学会総会, 2002.

Ishizaki T, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Soma T, Miyajima H, Wada I, Sawada N.

Cyclic AMP Induces Expression and Threonine-Phosphorylation of Tight Junction Protein Claudin-5 in Blood-Brain Barrier Endothelial Cells.  
第 42 回米国細胞生物学会, 2002.

Chiba H, Goto T, Itoh T, Kikuchi K, Osanai M, Kojima T, Sawada N.  
Functions of Hepatocyte Nuclear Factor-4  $\alpha$  in Epithelial Differentiation and Proliferation of F9 Embryonal Carcinoma Cells.  
第 42 回米国細胞生物学会, 2002.

Fujibe M, Chiba H, Soma T, Kojima T, Sawada N.  
Regulation of Thr203 of Claudin-1 by Mitogen-Activated Protein Kinase modulates Tight Junction Function.  
第 42 回米国細胞生物学会, 2002.

小島隆, 山本敏誠, 村田雅樹, 千葉英樹, 澤田典均.  
肝細胞の毛細胆管シール機能の維持におけるギャップ結合の役割.  
第 9 回肝細胞研究会, 2002.

小島隆, 山本敏誠, 村田雅樹, 千葉英樹, 小海康夫, 澤田典均.  
胆汁うっ滞と血液胆汁関門.  
日本臨床電子顕微鏡学会第 34 回学術講演会, 2002.

山本敏誠, 小島隆, 小海康夫, 千葉英樹, 澤田典均.  
IL-1 $\beta$  は肝細胞のギャップおよびタイト結合の発現を相反的に調節している.  
第 61 回日本癌学会, 2002.

小島隆, 山本敏誠, 小海康夫, 千葉英樹, 澤田典均.

TGF-beta/Smads シグナルによる肝細胞のギャップおよびタイト結合の変化.  
第 61 回日本癌学会, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む.)  
なし

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
澤田典均 小島 隆	血液臓器関門と疾患	森道夫	病気と細胞内小器官	文光堂	東京	2002	182-194
澤田典均	組織修復とHGF	森道夫	病気と分子細胞生物学	メディカルサイエンスインターナショナル	東京	2002	148-158
森 道夫 澤田典均	細胞間接着装置	臨牀電子顕微鏡学会	病気の形態学	学際企画	東京	2002	52-55

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki K, Kokai Y, Sawada N, Takakuwa R, Kuwahara K, Isogai E, Isogai H, Mori M.	SS1 Helicobacter pylori disrupts the paracellular barrier of the gastric mucosa and leads to neutrophilic gastritis in mice.	Virchows Archiv	440	318-324	2002
Takakuwa Y, Kokai Y, Sasaki K, Chiba H, Tobioka H, Mori M, Sawada N.	Bile canalicular barrier function and expression of tight junctional molecules in rat hepatocytes during common bile duct ligation.	Cell Tissue Res	307	181-189	2002
Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, Sawada N.	Polarised distribution of carcinoembryonic antigen is associated with a tight junction in human colorectal adenocarcinomas.	J Pathol	198	207-212	2002
Kojima T, Spray DC, Kokai Y, Chiba H, Mochizuki Y, Sawada N.	Cx32 formation and/or cx32-mediated intercellular communication induce expression and function of tight junctions in hepatocytic cell line.	Exp Cell Res	276	40-51	2002
Osanai M, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Kimura H, Satoh M, Sawada N.	Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)-4 $\alpha$ induces expression of endothelial Fas ligand (FasL) to prevent cancer cell transmigration: A novel defense mechanism of endothelium against cancer metastasis.	Jpn J Cancer Res	93	532-541	2002
Kamimura Y, Chiba H, Utsumi H, Gotoh T, Tobioka H, Sawada N.	Barrier function of microvessels and roles of glial cell line-derived neurotrophic factor in the rat testis.	Med Electron Microsc	Sep; 35(3)	139-45	2002
Miyahara T, Simoura T, Osahune N, Uchida Y, Sakuma T, Nemoto N, Kozakai A, Takamura T, Yamazaki R, Higuchi S, Chiba H, Iba K, Sawada N.	A Highly Potent 26,27-Hexafluoro-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 on Calcification in SV40-Transformed Human Fetal Osteoblastic Cells.	Calcif Tissue Int	Jun; 70(6)	488-95	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M, Sawada N.	Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 $\alpha$ triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells.	Exp Cell Res		in press	
Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H.	Tight junctions and human diseases.	Med Electron Microsc	36	in press	

20020659

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。