

糖尿病網膜症の進展抑制に向けた抗酸化酵素の発現  
制御に関する研究

安田 浩之



## 目次

緒論.....	1
第1章 培養ラット網膜血管内皮細胞層への小胞体ストレス負荷 による EC-SOD 透過性亢進	
第1節 緒言.....	6
第2節 実験方法.....	8
第3節 結果.....	14
第4節 考察.....	26
第2章 小胞体ストレス負荷時の培養ヒト網膜血管内皮細胞層透過性 亢進に関わるシグナル伝達経路	
第1節 緒言.....	29
第2節 実験方法.....	31
第3節 結果.....	34
第4節 考察.....	45
第3章 Exendin-4 によるエピジェネティクスを介した EC-SOD 発現 制御	
第1節 緒言.....	48
第2節 実験方法.....	51
第3節 結果.....	56
第4節 考察.....	63
総括.....	65
謝辞.....	68
引用文献.....	69
略語表.....	86



## 緒論

糖尿病はインスリンの生合成・分泌能力の低下や作用不足により高い血糖値が維持される疾患であり、平成 24 年国民健康・栄養調査結果では国内で「糖尿病が強く疑われる人」が 950 万人、「糖尿病の可能性が否定できない人」が 1,100 万人、合わせて 2,050 万人であると推定されている[1]。その総数は平成 19 年以来減少に転じたものの、「糖尿病が強く疑われている人」は増加傾向であり、今後も増加の一途をたどることが懸念される。糖尿病時の慢性高血糖状態により口渇、多飲、多尿、体重減少など典型的な症状が現れるが、自覚症状としては軽度であり見逃されやすい。それゆえ、高血糖とそれに伴う代謝異常が持続することになり、徐々に合併症が進行する。糖尿病患者で認められる主要な合併症は、糖尿病網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害である。特に、糖尿病網膜症は不可逆的な病態の進行により失明に至る危険性のある疾患であり、国内において緑内障に次ぐ中途失明原因の第 2 位を占める。国内の糖尿病網膜症の患者を対象とした疫学研究において[2, 3]、眼科治療技術などの向上により糖尿病網膜症の重症化は抑えられているものの、その有病率に変化は無かったことから、国内における糖尿病患者数の増加に伴い糖尿病網膜症患者数もさらに増加すると推察される。これらのことから、糖尿病網膜症のさらなる詳細な病態解明ならびに新たな予防手段や治療法の開発が望まれている。

糖尿病網膜症はその重症度によって、単純網膜症、増殖前網膜症、増殖網膜症に分類される。このように分類される網膜症はそれぞれ血管透過性亢進、血管閉塞、血管新生の 3 つの主要病態に対応する。この糖尿病網膜症病態の進展は以下のような過程をたどると考えられている。高血糖状態の持続によるポリオール代謝異常[4]や最終糖化生成物（advanced glycation end-products: AGEs）

の蓄積[5]が起きる。AGEs の蓄積は網膜微小血管を傷害し、血管が狭窄するため、周辺の細胞では低酸素状態となり細胞内のエネルギー産生が低下する[6]。細胞内の小胞体では ATP を利用しタンパク質の高次構造を形成するため、このエネルギー産生低下により小胞体に異常なタンパク質が過度に蓄積することとなり、小胞体ストレスが誘導される[7]。また、グルコースの過剰によってミトコンドリア電子伝達系では活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が産生され、ポリオール経路活性化による NADPH/NADP<sup>+</sup>比の低下、AGEs の受容体への結合によって生じるシグナリングの過程においても同様に ROS が産生されることが知られている[8]。さらに、ROS の過剰産生は小胞体ストレスにより小胞体内腔から放出されるカルシウムのミトコンドリアマトリックスへの取り込みによっても惹起される[9]。このような機序により生じる小胞体ストレスや酸化ストレスが網膜微小血管系において血管透過性亢進、血管閉塞、血管新生を引き起こし、病態の悪化による網膜剥離、硝子体出血を経て最終的に失明に至らしめると考えられている[10, 11]。

酸化ストレスとは細胞内外に多量に発生した superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ )、hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの ROS を十分に除去できないことにより組織や細胞が受けるストレスである[12-14]。ROS の多くは不対電子を持つフリーラジカルであり、DNA 切断、タンパク質変性、脂質過酸化など生体成分の酸化修飾により、生理機能に影響を及ぼすことが知られている[15, 16]。 $O_2^{\cdot-}$  は酸素分子が一電子還元されたものであり、生体内ではミトコンドリア電子伝達系の内膜複合体 (I、III)、NAD(P)H oxidase (NOX)、xanthine oxidase、cytochrome P450 などの反応過程で産生される[12, 17]。通常、 $O_2^{\cdot-}$  は superoxide dismutase (SOD) により  $H_2O_2$  と  $O_2$  に不均化され、さらに  $H_2O_2$  は catalase、glutathione peroxidase などにより速やかに  $H_2O$  と  $O_2$  に変換され

ることで生体は ROS の蓄積を抑制している[18, 19]。しかし、過剰の  $O_2^{\cdot-}$  は血管内皮細胞で産生される血管拡張因子の一酸化窒素 (NO) と反応して peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) を生成し[20]、その強力な酸化作用により細胞障害を誘発する。また、 $H_2O_2$  は遷移金属の存在下で反応性の高い  $\cdot OH$  に変換され細胞障害を引き起こす。ROS が過剰になる原因の一つとして、SOD や catalase などの ROS 除去系の破綻が考えられるが、この破綻により生じる酸化ストレスは糖尿病網膜症だけでなく悪性新生物、心血管系疾患などの種々の疾患の発症・増悪への関与が指摘されている。

生体内レドックス恒常性を維持するために、抗酸化酵素は ROS 除去機構の中で中心的な役割を担っている。SOD は主要な抗酸化酵素であり、哺乳類では 3 種の SOD アイソザイム、copper and zinc containing-SOD (Cu,Zn-SOD; SOD1)、manganese containing-SOD (Mn-SOD; SOD2)、extracellular-SOD (EC-SOD; SOD3) が同定されている。Table 1 にそれぞれの SOD の特徴を示す。Cu,Zn-SOD は細胞質に、Mn-SOD はミトコンドリアに局在する細胞内型酵素であるが、EC-SOD は細胞外に局在する分泌型の糖タンパク質として血管系の細胞外マトリックスに広く分布している[21-23]。EC-SOD のアミノ酸配列の C 末端側には塩基性アミノ酸であるアルギニン残基 (R) およびリジン残基 (K) が連結しているヘパリン結合ドメイン (-<sup>210</sup>RKKRRR<sup>215</sup>-) が存在する。このヘパリン結合ドメインが細胞膜表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンやコンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどのグリコサミノグリカン類に結合することにより、EC-SOD は細胞外に局在すると考えられている。この局在により EC-SOD は血管内皮細胞に対してゾーンディフェンスラインを形成し、内皮細胞膜周辺において血管壁に接着した白血球由来の  $O_2^{\cdot-}$  などを効率よく消去することが可能となる。

**Table 1. Properties of human SOD isozymes**

	<b>Cu, Zn-SOD (SOD1)</b>	<b>Mn-SOD (SOD2)</b>	<b>EC-SOD (SOD3)</b>
<b>Molecular mass</b>	32,000	85,000	135,000
<b>Subunit</b>	a2	a4	a4
<b>Metal (atom/subunit)</b>	1Cu, 1Zn	1Mn	1Cu, 1Zn
<b>Rate constant (M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</b>	~2×10 <sup>9</sup>	1.25×10 <sup>9</sup>	1.25×10 <sup>9</sup>
<b>Location</b>	cytoplasm	mitochondria	extracell
<b>Carbohydrate</b>	-	-	+
<b>Affinity for heparin</b>	-	-	+

EC-SOD の生理学的な役割に関しては、EC-SOD の遺伝子改変動物を用いた研究からその重要性が明らかにされている。EC-SOD ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して高酸素分圧下での生存率が低下すること[24]、大動脈縮窄症における左心室肥大、線維化が亢進すること[25]などが報告されている。一方、EC-SOD のトランスジェニックマウスや EC-SOD を投与したマウスにおいて、冠状動脈虚血後の梗塞部位の縮小[26]や、関節炎誘発モデルにおける関節腔中の腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) を含む炎症性サイトカインの減少が報告されており[27]、EC-SOD と特に循環器疾患や炎症性疾患などの病態との関連性に着目した研究が精力的に進められてきた。また、EC-SOD の発現は platelet-derived growth factor (PDGF)、fibroblast growth factor (FGF)、epidermal growth factor (EGF) などの血管新生に関与する細胞増殖因子や TNF $\alpha$  などのサイトカインにより低下することが知られており、その分子機構として mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一つである p38 MAPK の関与が報告されている[28-30]。最近、EC-SOD の発現調節には p38 MAPK 以外に



も、Sp1/Sp3 などの転写因子やエピジェネティクス（DNA メチル化機構、ヒストン修飾機構）の関与も報告されており [31-34]、EC-SOD の発現調節の詳細については未だ十分に解明されていないのが現状である。

血漿中 EC-SOD レベルは各種疾患において変動することが知られており [35-38]、当研究室においても、糖尿病患者ではヘパリン結合ドメインのリジン残基 (211KK212) がグリケーションを受けることにより細胞表面への結合性が低下し、EC-SOD の血漿中レベルが上昇することを報告している [39, 40]。さらに、増殖糖尿病網膜症患者において硝子体中の EC-SOD 並びに vascular endothelial growth factor (VEGF) 濃度が対照である黄斑円孔患者に比べ高値を示すこと、EC-SOD の投与により VEGF 誘導性の網膜微小血管新生が抑制されることを明らかにしているが、硝子体中 EC-SOD 濃度が高値を示す詳細な機序はまだ解明されていない [41]。そこで本研究では、EC-SOD が硝子体中へ漏出する機序について血管透過性の亢進という観点から、ラット由来網膜血管内皮細胞、ヒト網膜血管内皮細胞を用いて解析した。また、糖尿病治療薬である glucagon like peptide-1 (GLP-1) 受容体作動薬は心保護作用や神経保護作用などを有するとの報告もあり [42-44]、この GLP-1 受容体作動薬の新規作用として酸化ストレスから細胞を保護する作用を EC-SOD 発現調節の観点から検討した。以下、本研究で得られた結果を示す。

# 第 1 章 培養ラット網膜血管内皮細胞層への小胞体ストレス負荷による EC-SOD 透過性亢進

## 第 1 節 緒言

糖尿病網膜症は糖尿病三大合併症の一つであり、その病態は網膜微小血管障害を基盤として進行する。この網膜微小血管障害では、過剰に産生される ROS による酸化ストレスが原因の一つに挙げられている[10]。また、糖尿病網膜症の進展には小胞体ストレスの関与も示唆されている[45-47]。小胞体ストレスは酸化ストレス[48-50]、虚血[51]、低酸素[52]、ウイルス感染[53]、飢餓[54]などにより、折りたたみ不全による変性タンパク質が小胞体に蓄積することで誘導される。この細胞応答は unfolded protein response (UPR) とも呼ばれ、小胞体に局在するタンパク質である PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、activating transcription factor 6 (ATF6)、inositol requiring enzyme 1 (IRE1) などがストレスに対する応答の中心的な役割を担っている[55, 56]。これらはストレスセンサーとして機能し、定常状態では小胞体シャペロンである BiP/GRP78 が結合して不活性型を維持しているが、小胞体ストレス応答が惹起されると変性タンパク質の小胞体における過剰蓄積を回避するために、BiP/GRP78 が外れ、これらの下流シグナルが誘導されることでタンパク質の翻訳抑制、小胞体シャペロンの発現亢進、アポトーシス関連因子である C/EBP homologous protein (CHOP) などの発現亢進が誘導される。小胞体ストレスは VEGF や TNF $\alpha$  などのサイトカインの発現を亢進させるという報告があり[57, 58]、これらが血管透過性亢進や血管新生など病態の悪化に繋がると考えら

れている[59, 60]。

網膜血管は内皮細胞、周皮細胞、基底膜から構成されており、隣り合う内皮細胞同士はタイトジャンクションを介し結合して、透過性を非選択的に抑制している。タイトジャンクションを構成するタンパク質として **claudin** や **occludin** などが挙げられるが、これらタイトジャンクション構成タンパク質が細胞間で結びつくことにより網膜血管は血液網膜関門 (**BRB**) を形成し、バリア機能を果たしている[61, 62]。**BRB** は眼血管床と網膜組織間の液体や分子の移動を制御し、分子量の大きいものや有害な物質の網膜への移行を防いでいる。**BRB** には内側 **BRB** (**iBRB**) と外側 **BRB** (**oBRB**) の2つが存在しており、**iBRB** は網膜毛細血管内皮細胞間のタイトジャンクションから成り、**oBRB** は網膜色素上皮細胞がその主体となっている。**iBRB** の破綻は糖尿病病態時の比較的早期の現象であり、血管透過性を亢進させることで結果的に血管性浮腫を誘発する[63, 64]。

最近、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中の **EC-SOD** 濃度ならびに **VEGF** 濃度が対照疾患である黄斑円孔患者に比べ高値を示すこと、**EC-SOD** の投与により **VEGF** 誘導性の網膜微小血管新生が抑制されることが報告されたが[41]、硝子体中 **EC-SOD** 濃度が高値を示す詳細な機序は十分には解明されていない。そこで本研究では、糖尿病網膜症病態進行時に増大すると考えられる小胞体ストレスをラット網膜血管内皮細胞に負荷することで、**EC-SOD** が硝子体中に漏出する可能性とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 第2節 実験方法

### 第1項 試薬

ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) は日水製薬株式会社、penicillin、streptomycin は明治製菓株式会社、ウシ胎児血清 (fetal calf serum: FCS)、TRIzol 試薬、M-MLV 逆転写酵素、Taq DNA polymerase は Invitrogen 社、Ex-Taq polymerase、endothelial cell growth factor (ECGF) はタカラバイオ株式会社、RNase 阻害剤は東洋紡績株式会社、tunicamycin (Tm)、FITC-dextran は Sigma Aldrich 社、thapsigargin (Tg)、anti-claudin-5 rabbit polyclonal antibody、anti-GADD 153 (CHOP) rabbit polyclonal antibody は Santa Cruz 社、VEGF は PeproTech 社から購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

### 第2項 細胞培養

条件的不死化ラット網膜血管内皮細胞は、東北大学薬学部 寺崎哲也教授および富山大学薬学部 細谷健一教授より供与を受けた。この内皮細胞を温度感受性 SV40 ラージ T 抗原が活性化される温度である 33°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で、10%非動化 FCS、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、15 µg/mL ECGF を含む DMEM 中で培養した。

### 第3項 内皮細胞層透過性

トランスウェルプレート (1.0 µm pore size、0.3 cm<sup>2</sup> membrane surface area、Millicell hanging cell culture inserts、Japan Millipore Co、Tokyo、Japan) の各トランスウェルの内側にラット網膜血管内皮細胞 (1×10<sup>4</sup> cells/well) を播

種し、上記の培地を用いてコンフルエントになるまで培養した。その後、トランスウェルの内側と外側の培地を小胞体ストレス誘導剤もしくは VEGF を添加した培地に交換し、さらに 24 時間培養した。内皮細胞層の電気抵抗値 (transendothelial electrical resistance: TEER) を Millicell ERS-2 volt-ohm meter を用いて測定した。内皮細胞が播種されていないウェルの膜抵抗値をブランクとし、内皮細胞層の電気抵抗値を測定した結果を以下のように解析した。

TEER ( $\Delta\Omega\text{cm}^2$ ) = (サンプルウェルの電気抵抗値 - ブランクウェルの電気抵抗値) × トランスウェルの膜面積

TEER を測定した後、トランスウェルの内側と外側の培地を新鮮な培地に交換し、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FITC-dextran (70 kDa)、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FITC-albumin または 50  $\text{ng}/\text{mL}$  EC-SOD をトランスウェルの内側に添加して 33°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 4 時間インキュベートした後、内側と外側の培地を別々に回収した。FITC-dextran、FITC-albumin 濃度は 485 nm の励起波長、538 nm の蛍光波長により蛍光強度を測定した。EC-SOD の濃度測定は ELISA 法 (後述) により測定した。トランスウェルの外側に漏れ出た FITC-dextran (FITC-albumin、EC-SOD も同様) の解析を以下のように行った。

透過性 (%) = (トランスウェルの外側の FITC-dextran 量) / (トランスウェルの内側の FITC-dextran 量 + トランスウェルの外側の FITC-dextran 量) × 100

#### 第 4 項 RT-PCR

ラット網膜血管内皮細胞を 60 mm dish に播種し、上記の培地で培養した。小胞体ストレス誘導剤または VEGF で 24 時間処理した後、PBS で洗浄し、TRIzol 試薬を用いて RNA 抽出を行った。抽出した総 RNA 4  $\mu\text{g}$  を用いて、200 units

M-MLV 逆転写酵素、5 units RNase インヒビター、0.01 M dithiothreitol (DTT)、0.6 µg ランダムプライマー、0.5 mM dNTP を含む 20 µL の反応液中で、37°C、1 時間インキュベートして cDNA を合成した。

EC-SOD 遺伝子の増幅は上記の cDNA 1 µL を用いて、0.2 mM dNTP、10 pmol センスプライマー、10 pmol アンチセンスプライマー、5% dimethylsulfoxide (DMSO)、2.5% glycerol、0.63 units Ex-Taq polymerase を含む 25 µL の反応液中、94°C で 2 分間インキュベートした後、Table 2 に示す条件で PCR 反応を行った。EC-SOD 以外の遺伝子の増幅は上記の cDNA 1 µL を用いて、0.2 mM dNTP、10 pmol センスプライマー、10 pmol アンチセンスプライマー、0.63 units Taq polymerase を含む 25 µL の反応液中、94°C で 2 分間インキュベートした後、Table 2 に示す条件で PCR 反応を行った。

PCR 産物は、ethidium bromide を加えた 2% (w/v) アガロースゲルで電気泳動した後、イメージスキャナー (FLA-5000、Fuji Film、Tokyo、Japan) で撮影し、Multi Gauge V3.0 (Fuji Film) を用いて解析を行った。

**Table 2.**  
Nucleotide sequences of specific primers and PCR conditions for amplification

genes	sequence	cycle	annealing (°C)
EC-SOD	forward 5'- TCA CCA GAG GAA AAA CGT TC -3'	30	60
	reverse 5'- AAG CCC TCC AGA TTG AAG GA -3'		
VEGF	forward 5'- AGA AAG CCC ATG AAG TGG TG -3'	22	47
	reverse 5'- ACT CCA GGG CTT CAT CAT TG -3'		
TNF-α	forward 5'- AAA GCA TGA TCC GAG ATG TG -3'	35	47
	reverse 5'- ATC TGC TGG TAC CAC CAG TT -3'		
Claudin-5	forward 5'- CTG TCT ATG CTC GTC ATC G -3'	30	47
	reverse 5'- CAT TCC CGA TCT AAT GAC GC -3'		
Occludin	forward 5'- TGT CTG CAG GCA CAC AAG AC -3'	28	47
	reverse 5'- CCT GTC GTG TAG TCG GTT TC -3'		
Bip/GRP78	forward 5'- TTT CTG CCA TGG TTC TCA CT -3'	20	51
	reverse 5'- CCC AGA TGA GTA TCT CCA TT -3'		
GAPDH	forward 5'- ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC -3'	18	58
	reverse 5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3'		

## 第5項 Western blotting

ラット網膜血管内皮細胞を 60 mm dish に播種し、上記の培地で培養した。小胞体ストレス誘導剤で処理した後、PBS で洗浄し、細胞抽出液 (1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM NaF、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、20 mM  $\beta$ -glycerophosphate、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin、1 mM DTT、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1% Triton X-100 を含む 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) を 300  $\mu\text{L}$  添加し細胞を回収した後、氷上で 30 分間インキュベートして可溶化した。その後、17000 $\times g$  で 5 分間遠心し、得られた上清を細胞抽出液とした。調製した細胞抽出液の総タンパク質濃度は Bradford 法にて測定した。細胞抽出液 (タンパク質量として 20  $\mu\text{g}$ ) に、SDS sample buffer (2% sodium dodecylsulphate (SDS)、10% glycerol、50 mM DTT、0.01% bromophenol blue を含む 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) を加えた後、5 分間熱処理し、電気泳動用のサンプルとした。

このサンプルを 12% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離した後、PVDF メンブラン上に転写した。メンブランを 1% bovine serum albumin (BSA) を含む PBS でブロッキングした後、各種一次抗体 (1:1000) を加え 4°C で一晩インキュベートした。0.1% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄した後、biotin 標識した二次抗体 (1:1000) を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。メンブランを 0.1% Tween 20 を含んだ PBS で 3 回洗浄し、ABC 試薬 (1:5000) を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。最後に発光試薬である SuperSignal West Pico を添加し、LAS-3000 UV mini (Fuji Film、Tokyo、Japan) を用いて観察した。

## 第6項 ELISA

EC-SOD の内皮細胞層透過性を検討するためトランスウェルから回収した培

地中の EC-SOD を ELISA 法により測定した[30]。イムノプレートへの抗体のコーティングは、200 µg/mL NaN<sub>3</sub> を含む 50 mM sodium carbonate buffer, pH 9.5 に溶解した 50 µg/mL rabbit anti-human EC-SOD polyclonal antibody (80 µL) を well に添加し、4°C 条件下で一晩インキュベートすることで行った。その後、blocking buffer (150 mM NaCl, 10 mg/mL BSA, 500 µg/mL Tween 20, 200 µg/mL NaN<sub>3</sub> を含む 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) を添加し、] 使用時まで 4°C で保存した。Blocking buffer にて希釈したサンプルまたはスタンダード (70 µL) をイムノプレートに添加し、4°C 条件下で一晩インキュベートした。インキュベート後、washing buffer (150 mM NaCl, 500 µg/mL Tween 20, 200 µg/mL NaN<sub>3</sub> を含む 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) を用いて洗浄した後、blocking buffer にて希釈した mouse anti-human EC-SOD monoclonal antibody (80 µL) を添加し、室温で 2 時間インキュベートした後 washing buffer で洗浄した。次に、blocking buffer にて 1000 倍希釈した alkaline phosphatase labeled rabbit anti-mouse IgG antibody を 80 µL を添加し、室温で 3 時間インキュベートした。Washing buffer で洗浄した後、100 µg/mL MgCl<sub>2</sub>, 200 µg/mL NaN<sub>3</sub>, 2 mg/mL *p*-nitrophenyl phosphate を含む diethanolamine buffer, pH 9.8 (150 µL) を添加し、30 分間反応させた。5N NaOH (50 µL) を添加し反応を停止させ、micro plate reader を用いて 415 nm の吸光度を測定した。

## 第 7 項 動物実験

日本 SLC (Hamamatsu, Japan) から入手したオス成熟 ddY マウス (8-11 週齢) は日中夜間 (明暗各 12 時間) を制御している部屋で飼育した。マウスを 3% isoflurane で麻酔した後、麻酔装置 (Soft Lander, Sin-ei Industry Co. Ltd.,



Saitama, Japan) を用いて、1.5% isoflurane を含む 70% N<sub>2</sub>O、30% O<sub>2</sub> 混合気体下の状態を維持し、マウスの体温を 37.0~37.5°C に維持した。上述の麻酔状態で PBS に溶解した 50 µg/mL Tm を左目の硝子体中に 2 µL 投与した。12 時間後、80 mg/kg の pentobarbital sodium を腹腔内投与し安楽死させた後、すばやく眼球を摘出した。眼球から網膜を丁寧にはがし、ドライアイスで急速冷凍した後、その網膜組織から総 RNA を抽出した。また、透過性実験においては、同条件下で飼育されたマウスの左目に PBS に溶解した 500 µg/mL Tm を 2 µL 投与した。Tm または PBS (vehicle) を投与した 24 時間または 72 時間後、PBS に溶解した 100 µg/mL Hoechst 33342 (616 Da, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および 20 mg/mL FITC-dextran (2000 kDa, Sigma-Aldrich) を含む溶液 1 mL を投与した。その後、網膜を分離し、平らにした後、CCD カメラ (DP30VW, Olympus, Tokyo, Japan) を附属させた落射蛍光顕微鏡 (BX50, Olympus) と共焦点顕微鏡 (FluoView FV10, Olympus) を用いて撮影した。

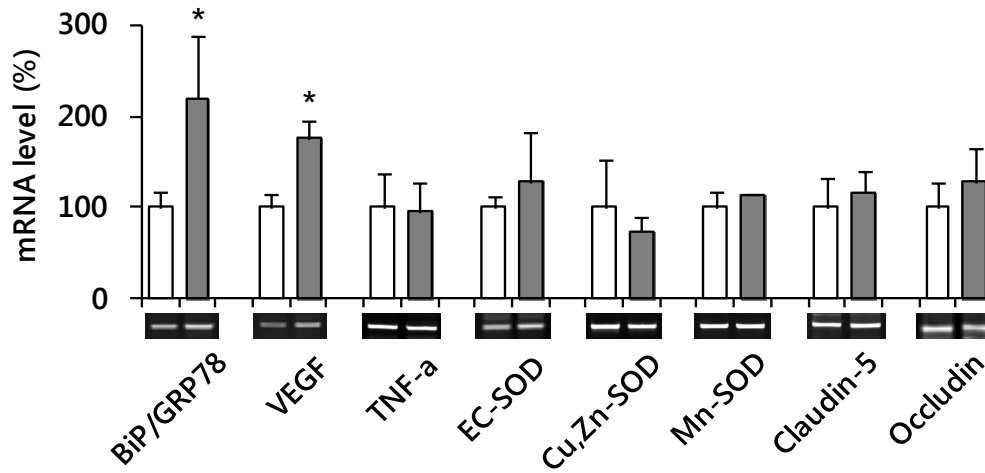
#### 第 8 項 統計学的解析

データ解析は、ANOVA 後 Bonferroni 検定にて行い、 $p < 0.05$  である場合に統計学的に有意であると判断した。

### 第3節 結果

#### 第1項 マウス網膜における小胞体ストレスの影響

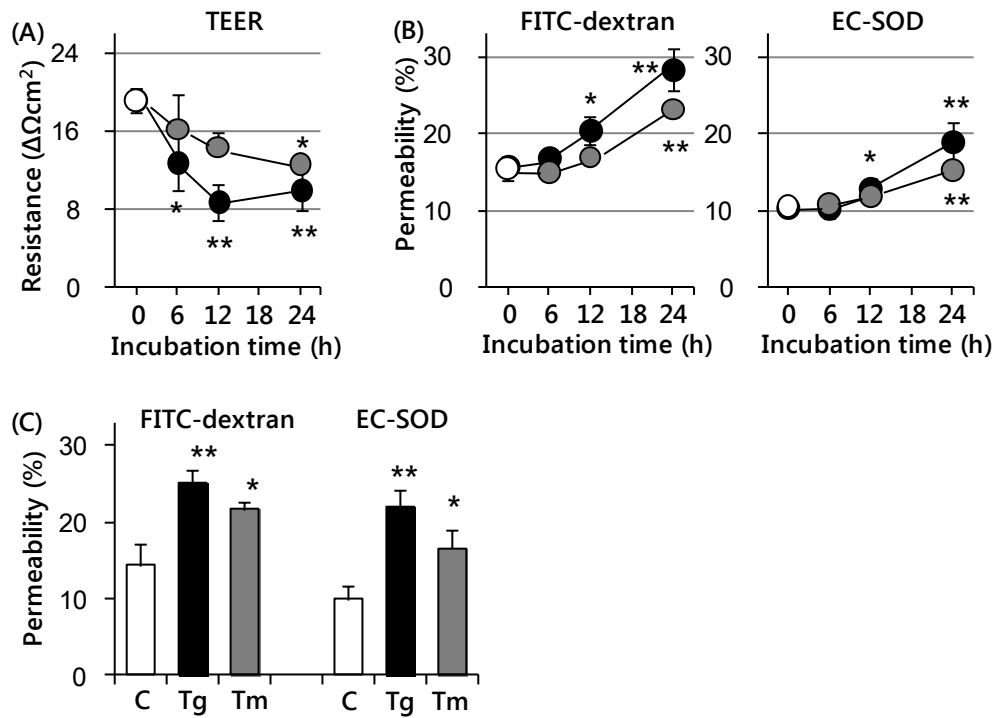
糖尿病網膜症の進行に伴い小胞体ストレスが誘導されることが知られている [65]。また、小胞体ストレスが誘導されると VEGF や TNF $\alpha$  などのサイトカインの発現が亢進するという報告があることから [57, 58]、マウス網膜において小胞体ストレス負荷によるそれらサイトカインの発現の変動について検討した。マウス硝子体中に Tm を 0.1  $\mu\text{g}/\text{eye}$  で投与し、12 時間後に採取した網膜における各遺伝子の発現を RT-PCR 法により評価した結果、Fig. 1 に示すように、小胞体ストレスマーカーである BiP/GRP78 の mRNA レベルが亢進したことから、この条件下で網膜に小胞体ストレスが誘導されることが確認できた。また、糖尿病網膜症の発症・進展に関与する VEGF の発現も亢進したが、TNF $\alpha$  に有意な変化はなかった。さらに、各 SOD アイソザイム、タイトジャンクション構成タンパク質の発現について測定した結果、EC-SOD、Cu,Zn-SOD、Mn-SOD、claudin-5、occludin の発現には有意な変化は認められなかった (Fig. 1)。



**Fig. 1 Effect of intravitreal injection of Tm on retinal mRNA levels of various protein.** Mouse retina 12 h after the intravitreal injection of Tm (0.1  $\mu\text{g}$ ) was obtained by the method described in Materials and Methods, followed by RT-PCR analysis (grey columns). Open columns show values for the sham operation. Each mRNA level was normalized relative to the GAPDH mRNA level in each sample. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=4). \* $p < 0.05$  vs sham operation.

## 第2項 小胞体ストレスのラット網膜血管内皮細胞層透過性に与える影響

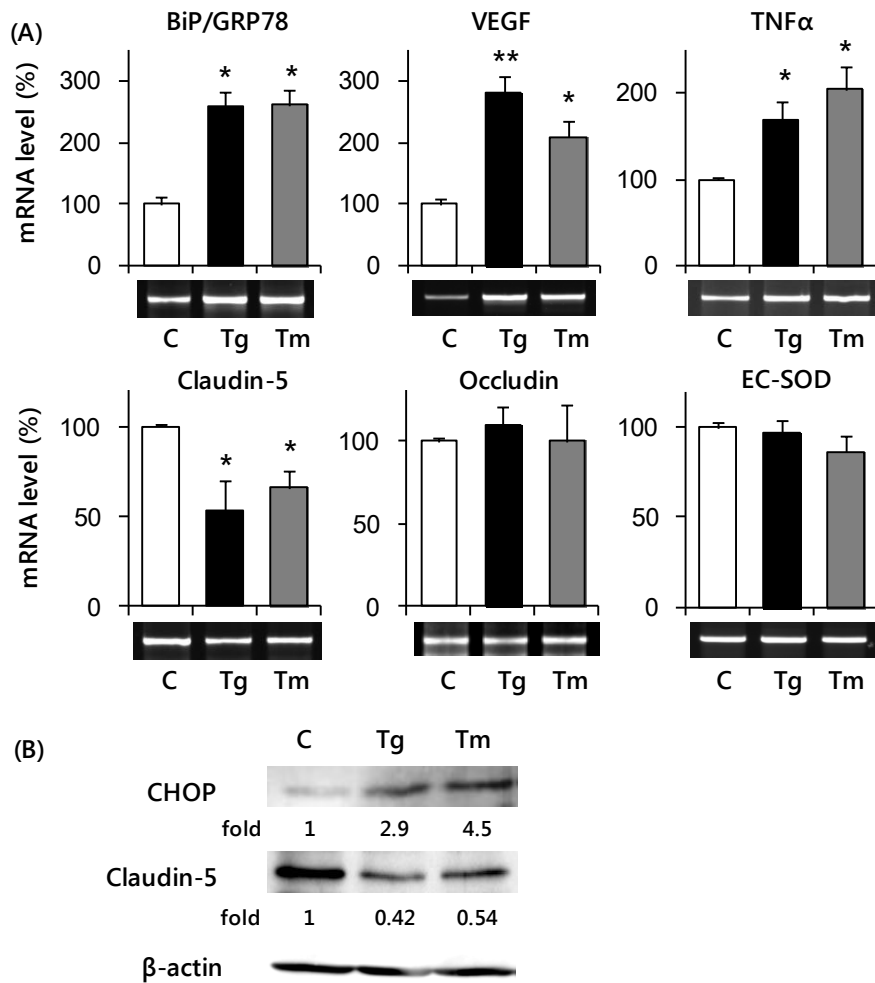
次に、培養ラット網膜血管内皮細胞を用いて小胞体ストレス誘導の網膜血管透過性に及ぼす影響を評価した。ラット網膜血管内皮細胞をトランスウェルの上部に播種した後、3日間培養しコンフルエントとした。その後、TEERを測定し、抵抗値の増加が安定した後(5日目)、Tm、Tg添加の影響を検討した。Tmは生合成されたタンパクの成熟過程に関わる糖鎖修飾を阻害する作用、Tgは小胞体膜上のCa<sup>2+</sup>-ATPaseを阻害し小胞体へのCa<sup>2+</sup>の取り込みを阻害する作用により小胞体ストレスを誘導する[66]。Tm、Tg処理によりTEERは時間依存的に低下した(Fig. 2A)。また、小胞体ストレス誘導時の血管内皮細胞層透過性についてFITC-dextranとEC-SODを指標に評価した結果、Tg、Tm処理によりこれらの透過性は時間依存的に亢進し(Fig. 2B)、24時間後にはその透過量がコントロール群に比べて有意に増加していた(Fig. 2C)。



**Fig. 2 Effect of endoplasmic reticulum (ER) stress on permeability of rat retinal endothelial cells.** Rat retinal endothelial cells were treated with 0.1  $\mu$ M Tg (closed circle) or 2  $\mu$ g/mL Tm (grey circle) for the indicated hours, followed by the analysis of TEER of endothelial monolayer (A) and permeability of FITC-dextran and EC-SOD (B). Open circle shows the pre-treatment level. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs pre-treatment. (C) Rat retinal endothelial cells were treated with 0.1  $\mu$ M Tg or 2  $\mu$ g/mL Tm for 24 h, followed by the analysis of permeability of FITC-dextran and EC-SOD. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle-treatment.

### 第3項 小胞体ストレス負荷によるタイトジャンクション構成タンパク質と EC-SOD 発現変動

小胞体ストレスが網膜血管内皮細胞層透過性を亢進させるメカニズムを明らかにするため、網膜血管内皮細胞層透過性を制御しているタイトジャンクション構成タンパク質の発現変動について評価した。主要なタイトジャンクション構成タンパク質として claudin や occludin が挙げられるが、その内、claudin には 27 種類のアイズォイムが存在し、網膜内皮細胞においては claudin-5 の発現が確認されている [67, 68]。ラット網膜血管内皮細胞を Tg、Tm で 24 時間処理した結果、小胞体ストレスマーカーである BiP/GRP78 mRNA の発現が亢進した (Fig. 3A)。また、別の小胞体ストレスマーカーである CHOP のタンパクレベルでの発現も Tg、Tm 処理により亢進した (Fig. 3B)。さらに、小胞体ストレス誘導剤の添加により VEGF や TNF $\alpha$  mRNA レベルは増大したが、claudin-5 の発現は mRNA レベル、タンパクレベルともに有意に低下した (Fig. 3)。一方、occludin や EC-SOD mRNA レベルに変化はなく (Fig. 3A)、Cu,Zn-SOD、Mn-SOD mRNA についても変化は認められなかった (データ省略)。

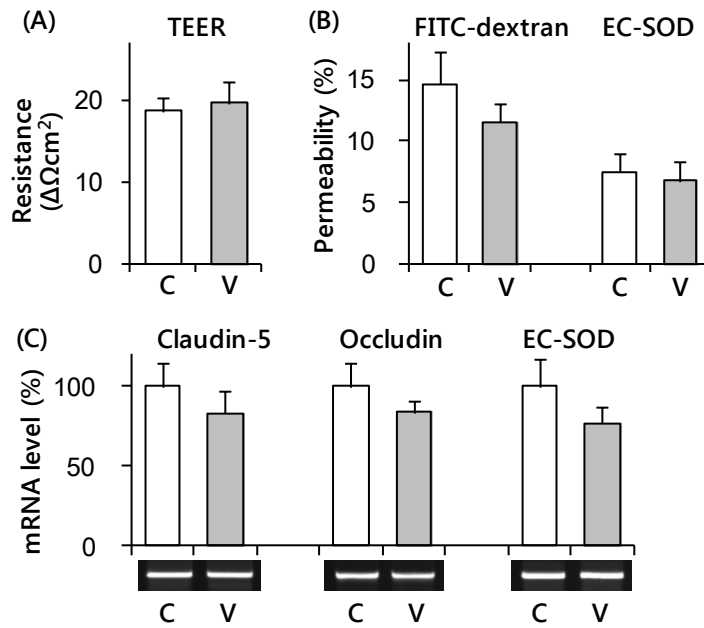


**Fig. 3 Effect of ER stress on expression of pro-inflammatory proteins, tight junction proteins and EC-SOD.** (A) Rat retinal endothelial cells were treated with 0.1  $\mu$ M Tg or 2  $\mu$ g/mL Tm for 24 h, followed by RT-PCR analysis. The mRNA levels were normalized with the GAPDH mRNA level in each sample. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle. (B) Rat retinal endothelial cells were treated with 0.1  $\mu$ M Tg or 2  $\mu$ g/mL Tm for 24 h, followed by Western blotting. The protein levels were normalized with the  $\beta$ -actin level in each sample. Values are fold change compared with that of vehicle.

#### 第 4 項 ラット網膜血管内皮細胞層に与える VEGF の効果

第 1 項ならびに第 3 項に示したように、マウス網膜やラット網膜血管内皮細胞を小胞体ストレス誘導剤で処理した場合、VEGF mRNA 発現が亢進した (Fig. 1、Fig. 3A)。これらの結果から、小胞体ストレスが VEGF の発現亢進を介して網膜血管内皮細胞層透過性を増加させている可能性について検討した。ラット網膜血管内皮細胞を VEGF で 24 時間処理した後、内皮細胞層の透過性や各種遺伝子発現の変化を評価したが、TEER、FITC-dextran や EC-SOD の透過性、claudin-5、occludin、EC-SOD の mRNA レベルに有意な変化は認められなかった (Fig. 4)。



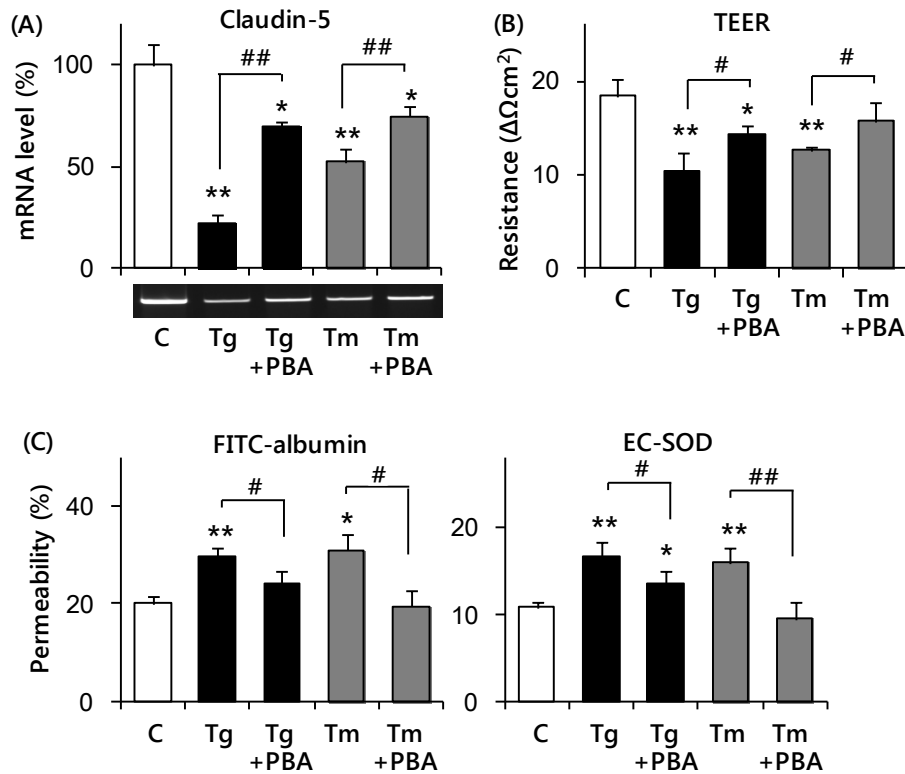


**Fig. 4 Effect of VEGF on function of rat retinal endothelial cell.** Rat retinal endothelial cells were treated with 10 ng/mL rat VEGF (V) or vehicle (C) for 24 h, followed by the analysis of TEER of endothelial monolayer (A), permeability of FITC-dextran and EC-SOD (B) and RT-PCR analyses of claudin-5, occludin and EC-SOD (C). The mRNA levels were normalized with the GAPDH mRNA level in each sample. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=3).

## 第5項 小胞体ストレス負荷時の網膜血管内皮細胞層透過性亢進に対する

### ケミカルシャペロン添加への影響

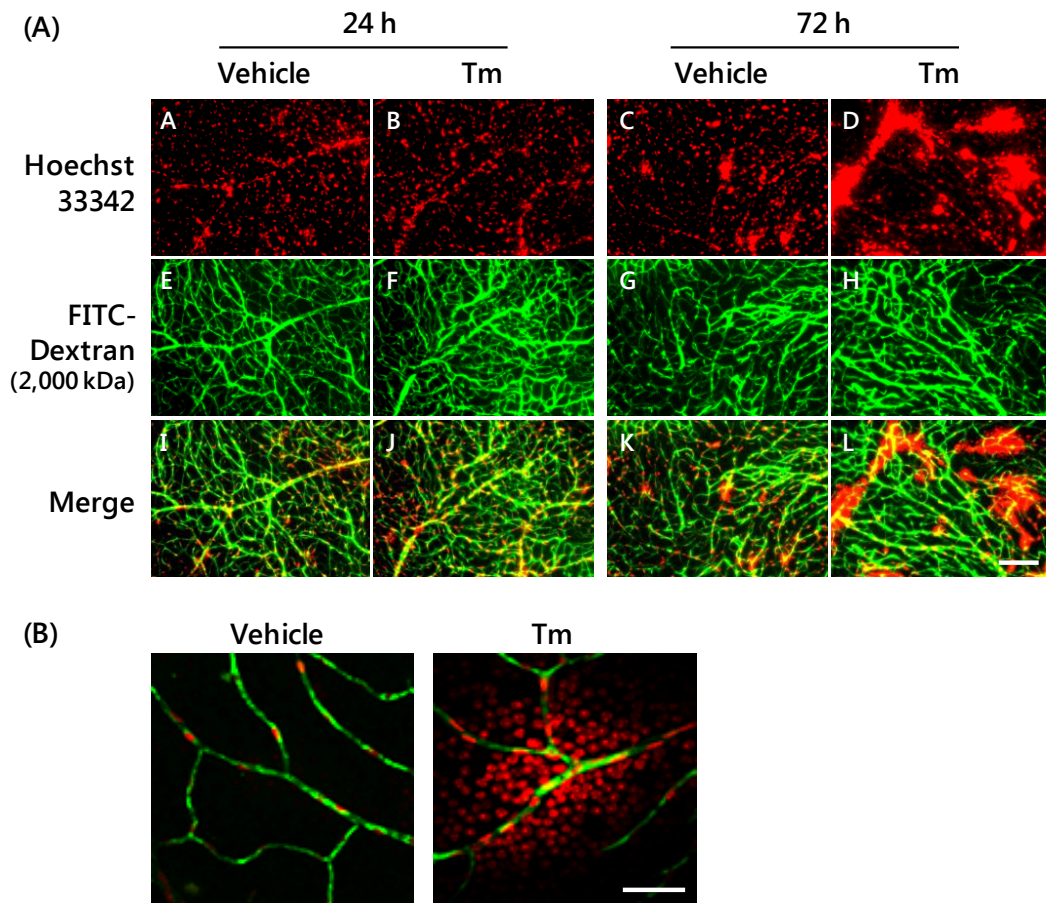
ケミカルシャペロンである 4-phenylbutyric acid (PBA) は小胞体におけるタンパク質の折りたたみ異常を改善し、タンパク質の高次構造を安定化させる働きがあることから、小胞体ストレス抑制剤として知られている[46, 69, 70]。そこで、PBA が小胞体ストレス負荷時の網膜血管内皮細胞層透過性亢進を抑制することができるかどうかを検討した。5 mM PBA 存在下で Tg、Tm 処理を行い、透過性や各種遺伝子の発現を測定したところ、Tg、Tm 処理による claudin-5 の発現低下が有意に抑制された (Fig. 5A)。また、Tg、Tm 処理における TEER の低下と FITC-albumin や EC-SOD の透過性亢進も PBA 前処理により抑制された (Fig. 5B および C)。



**Fig. 5 Effect of pre-treatment with PBA on ER stress-induced endothelial permeability.** (A) Rat retinal endothelial cells were pre-treated with or without 5 mM PBA for 1 h and then treated with 0.1 μM Tg or 2 μg/mL Tm for 24 h. Claudin-5 mRNA was determined by RT-PCR. The mRNA levels were normalized with the GAPDH mRNA level in each sample. Data are shown as mean ± SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle, ## $p$ <0.01 vs Tg or Tm only-treated cell. The cells in transwell inserts were pre-treated with or without 5 mM PBA for 1 h and then treated with 0.1 μM Tg or 2 μg/mL Tm for 24 h, followed by analyses of TEER (B) and permeability of FITC-albumin and EC-SOD (C). Data are shown as mean ± SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle, # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs Tg or Tm only-treated cell.

## 第 6 項 マウス網膜血管透過性に対する小胞体ストレスの影響

前項までの網膜血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験により、小胞体ストレスが網膜血管透過性を亢進させることが明らかとなった。そこで、生体においても同様の現象が認められるかどうか、マウスを用いた *in vivo* 試験により検証した。マウス網膜血管透過性の評価には FITC-dextran (2000 kDa) と Hoechst 33342 (616 Da) をトレーサーとして使用した。Tm を硝子体内に投与したマウスにおける FITC-dextran の血管内からの漏出は僅かであったが、Hoechst 33342 の血管外漏出は Tm 投与 72 時間後において顕著に増加し (Fig. 6A)、血管外に漏出した Hoechst 33342 は血管腔近傍の網膜細胞の核を染色した (Fig. 6B)。



**Fig. 6 Effect of intravitreal injection of Tm on the permeability of mouse retinal blood vessels *in vivo*.** (A) Hoechst 33342 stain (A-D) and FITC-dextran (2000 kDa) (E-H) were detected at 24 h or 72 h after the intravitreal injection of Tm (1  $\mu\text{g}/\text{eye}$ ) or vehicle by the methods described in Materials and Methods. Merged views (I-L) of the signals of Hoechst 33342 and FITC-dextran are presented. The scale bar represents 200  $\mu\text{m}$ . (B) Confocal fluorescence micrographs show higher-magnification versions of part of the vehicle or the Tm-treated mouse retinal blood vessels at 72 h after the intravitreal injection. The scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ .

#### 第4節 考察

増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 EC-SOD 濃度ならびに VEGF 濃度が対照疾患である黄斑円孔患者に比べ高値を示すこと、EC-SOD の投与により VEGF 誘導性の網膜微小血管新生が抑制されることが報告されているが[41]、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、その分子機構の解明に取り組んだ。EC-SOD の発現がサイトカインや VEGF により調節されていることや [71-73]、血管系障害で重要となる低酸素環境下において EC-SOD の発現が減少することなどから[29, 74]、この病態下で網膜における EC-SOD 発現が変化している可能性が考えられる。一方で、EC-SOD は細胞外に分泌され、内膜を含む血管壁に広く分布する抗酸化酵素であり [75]、血管壁周辺に多く存在することで  $O_2^{\cdot-}$  から血管を防御し、抗炎症作用、抗動脈硬化作用を発揮する[76]。それゆえ、増殖糖尿病網膜症の病態下で網膜血管内皮細胞層の透過性が亢進し、血管内腔から硝子体中に EC-SOD が漏出している可能性も考えられる。そこで、網膜組織や網膜血管内皮細胞における EC-SOD 発現変動と EC-SOD の網膜血管からの漏出という 2 つの観点から、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 EC-SOD 濃度が上昇する機序を検証した。

小胞体ストレスは VEGF 産生を亢進させることで糖尿病網膜症の血管障害を誘導することが知られている [45, 46, 77]。本研究でも、小胞体ストレス誘導剤である Tm をマウス硝子体内に投与した *in vivo* 実験で、網膜において VEGF の発現が亢進することが明らかになった。また、網膜血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験においても同様な結果が得られた。しかし、小胞体ストレス誘導剤は EC-SOD 発現に影響を与えず、VEGF 添加もその発現に影響を与えなかった。これらの結果から、小胞体ストレスは本細胞での EC-SOD の発現には影響を与

えないことが明らかとなった。

糖尿病の進行に伴い、網膜血管透過性が亢進するため、黄斑浮腫が生じ網膜症に至る[78, 79]。2型糖尿病マウスにおける研究においても、網膜での albumin の血管漏出の亢進やタイトジャンクション構成タンパク質の発現減少が確認されている[80]。網膜血管内皮細胞は隣り合う細胞間でタイトジャンクション結合し、BRBを形成している。それゆえ、網膜におけるタイトジャンクション機能の破綻や、それに続く血管透過性の亢進は糖尿病網膜症の病態の進行と密接に関連している。Claudin と occludin はともにタイトジャンクションを構成する主要な分子であるが、claudinの方がoccludinに比べ、バリア機能の維持に重要であることが報告されている[81-83]。本実験では、小胞体ストレス誘導剤により claudin-5 の発現が有意に低下することが明らかになった (Fig. 3)。また、小胞体ストレスにより網膜血管内皮細胞層透過性が亢進し、EC-SOD の透過も増加した (Fig. 2)。さらに、小胞体ストレス阻害剤である PBA が claudin-5 の発現低下や EC-SOD の血管透過性亢進を抑制することも確認した (Fig. 5)。以上の結果から、小胞体ストレスの誘導により claudin-5 の発現が低下したために、タイトジャンクションの破綻が生じ、網膜血管内皮細胞層透過性が亢進するのではないかと考えられた。*in vivo* 実験においても小胞体ストレス誘導性の網膜血管内皮細胞層透過性亢進が認められたことから、生体においても *in vitro* 実験により示された機序により網膜血管系の破綻は起きることが示唆された。

以上の結果から、糖尿病網膜症の病態の進展に関与する小胞体ストレスは EC-SOD の発現に影響を与えるのではなく、網膜血管内皮細胞層のタイトジャンクション構成タンパクである claudin-5 の発現を低下させ、EC-SOD の網膜血管内皮細胞層透過性を亢進させることが明らかとなった。本章の結果から、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中の EC-SOD レベルが高値を示す理由として、

網膜血管内皮細胞層の透過性が亢進することにより、EC-SOD の血管腔からの漏出が亢進したためと考えられた。EC-SOD が抗酸化作用を発揮するためには血管内皮細胞表面に存在していることが重要であるため、今回のような網膜血管系の破綻は EC-SOD の機能を低下させると考えられ、酸化ストレスの増加などによるさらなる網膜血管障害の進展につながる可能性が示唆された。



## 第 2 章 小胞体ストレス負荷時の培養ヒト網膜血管内皮細胞層透過性亢進に関わるシグナル伝達経路

### 第 1 節 緒言

糖尿病網膜症早期における BRB の破綻は、網膜血管のタイトジャンクション構成タンパク質の発現変動を伴う血管透過性の亢進により生じ、その後の病態進展にも関与することが報告されている[84]。血管内皮細胞層透過性を制御しているタイトジャンクションは claudin、occludin、JAM のような膜貫通型タンパク質と、その裏打ちタンパク質である zonula occludens (ZO) の複合体によって構成されている。前章では、糖尿病網膜症病態の悪化に伴い増加する小胞体ストレス下でタイトジャンクションタンパク質の発現が低下することにより網膜血管内皮細胞層透過性が亢進することを示したが、そのシグナル伝達を含む発生機序については未だ不明な部分が多い。そこで、本章ではその分子機構の解明に取り組んだ。

インターロイキンなどの炎症に関わる因子や VEGF はタイトジャンクションの構造や機能を変化させることで内皮細胞層透過性亢進を誘導する[85, 86]。この現象には炎症反応において中心的な役割を担っている転写因子である nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) の関与が示唆されている[87, 88]。NF- $\kappa$ B は定常状態において inhibitory protein kappa B (I $\kappa$ B) と結合し、細胞質に局在しており不活性化されている。しかし、細胞外からの刺激により I $\kappa$ B の分解が促進され、I $\kappa$ B との複合体から解離した NF- $\kappa$ B は核内に移行し、遺伝子の転写調節領域に存在する結合部位に結合する。NF- $\kappa$ B は多くの遺伝子の転写を誘導

するが、炎症時の遺伝子の発現制御因子として NF- $\kappa$ B とともに MAPK も重要である[89]。また、MAPK による NF- $\kappa$ B のリン酸化は、その DNA 結合能を増強させることから、NF- $\kappa$ B 経路と MAPK 経路のクロストークも報告されている[90]。最近、NF- $\kappa$ B や MAPK が糖尿病網膜症時に認められる BRB の破綻に寄与していることが示唆された[62, 91]。慢性炎症性疾患の治療薬として用いられているグルココルチコイドはグルココルチコイド受容体 (GR) に結合し、NF- $\kappa$ B の抑制や I $\kappa$ B を誘導することで抗炎症作用を示す[92, 93]。糖尿病網膜症は血管系炎症性疾患と位置付けられるため、NF- $\kappa$ B 抑制作用を有するグルココルチコイドが糖尿病網膜症にも適応可能であると考えられることから、その機序についてより詳細な理解が必要である。

小胞体ストレスの亢進が細胞内ホメオスタシスの破綻に繋がること、その過程に NF- $\kappa$ B や MAPK 経路の活性化が関与していることが報告されている[90]。しかし、小胞体ストレス負荷がタイトジャンクション構成タンパク質の発現を低下させる機序については不明な点が多い。そこで本研究では、糖尿病網膜症の病態進展に伴い誘導される網膜血管内皮細胞層透過性亢進のメカニズムを解明するため、小胞体ストレス負荷時に生じるタイトジャンクション構成タンパク質の発現変動の分子機構を MAPK や NF- $\kappa$ B シグナルに着目し検討した。

## 第2節 実験方法

### 第1項 試薬

CS-C 培地は DS Pharma Biomedical 社、KOD Fx は東洋紡績株式会社、大腸菌由来リポ多糖 (*E. coli* lipopolysaccharide; LPS)、pyrrolidinedithiocarbamate (PDC) は Sigma Aldrich 社、human tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) は和光純薬工業株式会社、RU486 は東京化学工業株式会社、anti-claudin-5 rabbit polyclonal antibody、anti-GADD 153 (CHOP) rabbit polyclonal antibody、anti-histone H1 antibody は Santa Cruz 社、anti-actin mouse monoclonal antibody は Millipore 社、biotin-conjugated goat anti-rabbit or -mouse IgG (H+L) は Zymed Laboratories から購入した。その他の試薬は、第1章、第2節、第1項に示す試薬を用いた。

### 第2項 細胞培養

ヒト網膜血管内皮細胞 (HREC) は DS Pharma Biomedical 社から購入した。HREC は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycin を含む CS-C 培地で培養した。

### 第3項 内皮細胞層透過性

トランスウェルプレート (1.0  $\mu$ m pore size、0.3 cm<sup>2</sup> membrane surface area、Millicell hanging cell culture inserts、Japan Millipore 社) のトランスウェルの内側に HREC (1 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well) を播種し、上記の培地を用いて培養した。内皮細胞層透過性の評価は第1章、第2節、第3項に示す方法にて行った。

#### 第4項 RT-PCR

HREC を 60 mm dish に播種し、CS-C 培地で培養した。小胞体ストレス誘導剤で 24 時間処理した後、第 1 章、第 2 節、第 4 項に示す方法にて cDNA を作製した。Claudin-5 遺伝子の増幅は上記の cDNA 1  $\mu$ L を用いて、0.4 mM dNTP、12 pmol センスプライマー、12 pmol アンチセンスプライマー、0.4 units KOD Fx を含む 20  $\mu$ L の反応液中、94°C で 2 分間インキュベートした後、Table 3 に示す条件で PCR 反応を行った。その他の遺伝子の増幅は上記の cDNA 1  $\mu$ L を用いて、0.2 mM dNTP、10 pmol センスプライマー、10 pmol アンチセンスプライマー、0.63 units Taq polymerase を含む 25  $\mu$ L の反応液中、94°C で 2 分間インキュベートした後、Table 3 に示す条件で PCR 反応を行った。

**Table 3.**  
Nucleotide sequences of specific primers and PCR conditions for amplification

genes	sequence	cycle	annealing (°C)
Bip/GRP78	forward 5'- TTT CTG CCA TGG TTC TCA CT -3'	21	51
	reverse 5'- CCC AGA TGA GTA TCT CCA TT -3'		
Claudin-5	forward 5'- TGC AGC GTT GGA AAT TCT GG -3'	27	60
	reverse 5'- GGT AAC AAA GAG TGC CAC AA -3'		
Occludin	forward 5'- TGT CTG CAG GCA CAC AAG AC -3'	32	60
	reverse 5'- CCT GTC GTG TAG TCG GTT TC -3'		
ZO-1	forward 5'- GCG AGG CAT CGT TCC TAA G -3'	30	60
	reverse 5'- AAT GTC TGG CTC CTC CCT TGC T -3'		
GAPDH	forward 5'- ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC -3'	18	58
	reverse 5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3'		

#### 第5項 核画分の調製

HREC を 90 mm dish に播種し、CS-C 培地で培養した。小胞体ストレス誘導

剤で処理した後、PBS で洗浄し、buffer A (10 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM DTT、10 mM NaF、1 mM PMSF、10 µg/mL leupeptin を含む 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.8) を 1.5 mL 添加し細胞を回収した。その後、800×g で 30 秒遠心分離し上清を除去した。ペレットに buffer B (0.5% Nonidet P-40 を含む buffer A) を 400 µL 添加し、懸濁した。5 分間氷上に静置し、9000×g で 1 分間遠心分離後上清を除去し、buffer C (0.4 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM DTT、10 mM NaF、1 mM PMSF、10 µg/mL leupeptin を含む 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.8) を 40 µL 添加し、ペレットを懸濁した。30 分間氷上に静置後、17000×g で 10 分間遠心分離し、回収した上清を核画分とした。

#### 第 6 項 Western blotting

HREC を 90 mm dish に播種し、CS-C 培地で培養した。小胞体ストレス誘導剤で処理した後、第 1 章、第 2 節、第 5 項に示す方法にて調製した細胞抽出液または、前項に示す方法にて調製した核画分を用いて、タンパク発現を検討した。

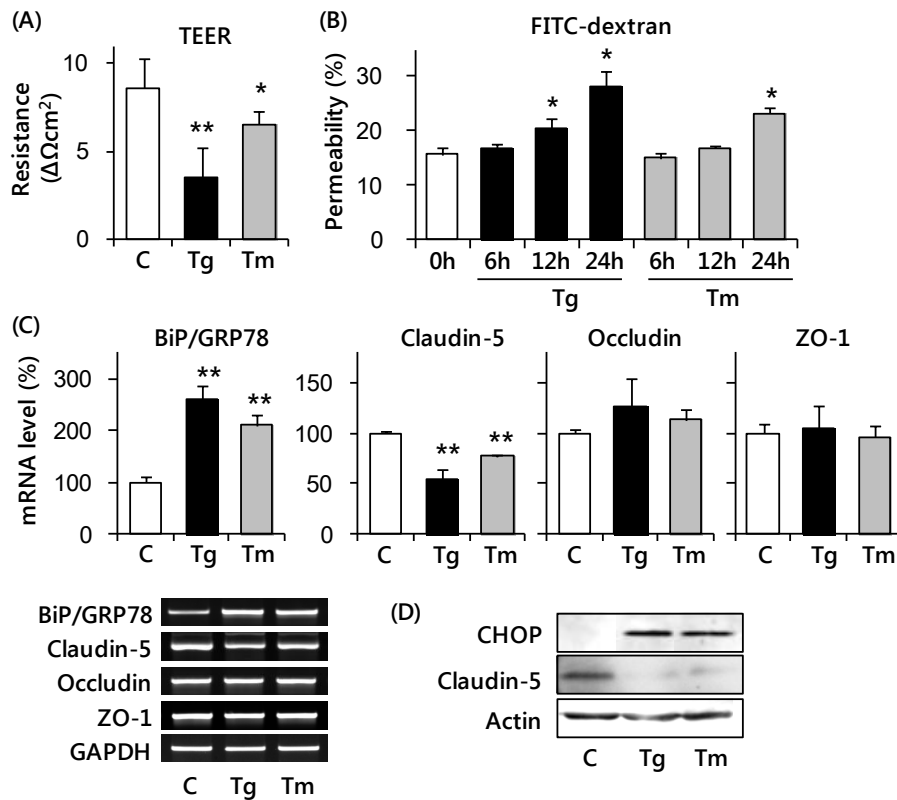
#### 第 7 項 統計学的解析

データ解析は、ANOVA 後 Bonferroni 検定にて行い、 $p < 0.05$  である場合に統計学的に有意であると判断した。

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 小胞体ストレス負荷による内皮細胞層透過性の変化とタイトジャンクション構成タンパク質の発現変動

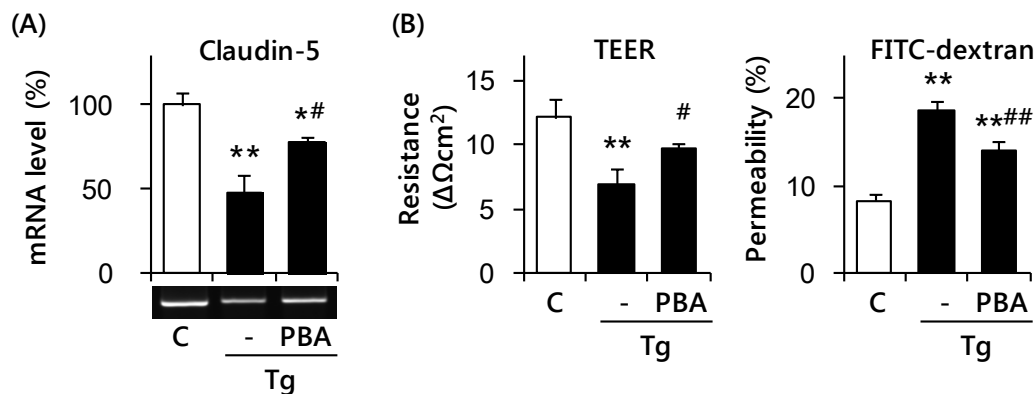
第 1 章では、ラット網膜血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験から、小胞体ストレス誘導時にタイトジャンクション構成タンパク質である claudin-5 の発現が低下し、内皮細胞層透過性が亢進する知見を得た。本章では、このシグナル伝達機構についてヒト網膜血管内皮細胞 (HREC) を用いて検討した。初めに、小胞体ストレス負荷時に透過性が亢進するという第 1 章と同様な結果が HREC においても得られるか検討した。トランスウェルに HREC を播種し、タイトジャンクションが形成されるまで培養した。その後、TEER を測定し、抵抗値が安定したところで 0.1  $\mu\text{M}$  Tg あるいは 2  $\mu\text{g/mL}$  Tm を添加した。その結果、24 時間後に TEER はコントロールに比べ有意に低下し (Fig. 7A)、FITC-dextran の内皮細胞層透過性は有意に亢進した (Fig. 7B)。また、HREC をディッシュに播種し、Tg あるいは Tm で 24 時間処理したところ、小胞体ストレスマーカーである BiP/GRP78 と CHOP の発現亢進も確認できた (Fig. 7C および D)。第 1 章より、小胞体ストレスによる内皮細胞層透過性亢進にはタイトジャンクション構成タンパク質の発現低下が関与していたことから、claudin-5、occludin、ZO-1 の発現について検討した。Claudin-5 の発現は小胞体ストレス誘導剤の添加により有意に低下したが (Fig. 7C および D)、occludin および ZO-1 の発現に有意な変化は認められなかった (Fig. 7C)。



**Fig. 7 Effect of ER stress on the cellular permeability and expression of ER stress markers and TJ proteins in HRECs.** (A) HRECs were treated with 0.1  $\mu\text{M}$  Tg, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tm or vehicle for 24 h, followed by the analysis of TEER of endothelial monolayer. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=5). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle. (B) The cells were treated with 0.1  $\mu\text{M}$  Tg or 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tm for the indicated times, followed by analysis of the permeability of FITC-dextran. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=4). \* $p$ <0.05 vs pre-treatment. (C) The cells were treated with 0.1  $\mu\text{M}$  Tg or 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tm for 24 h, followed by RT-PCR analysis. All RT-PCR data were normalized using GAPDH levels. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=4). \*\* $p$ <0.01 vs vehicle. (D) The cells were treated with 0.1  $\mu\text{M}$  Tg or 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tm for 24 h, followed by Western blotting analysis for CHOP and claudin-5.

## 第2項 小胞体ストレス阻害剤の影響

PBAのようなケミカルシャペロンはタンパク質構造を安定化し、折りたたみ異常を改善するため、小胞体ストレス阻害剤として用いられる[46, 69, 70]。そこで、小胞体ストレスによる claudin-5 の発現低下や透過性の亢進が PBA によって改善されるかどうか HREC を用いて検討した。その結果、Tg 処理による claudin-5 発現低下は PBA 存在下で有意に抑制された (Fig. 8A)。また、Tg 処理による TEER 低下および FITC-dextran の透過性亢進についても PBA により有意に抑制された (Fig. 8B および C)。PBA は異なる小胞体ストレス誘導剤である Tm による claudin-5 発現低下も抑制した (データ省略)。

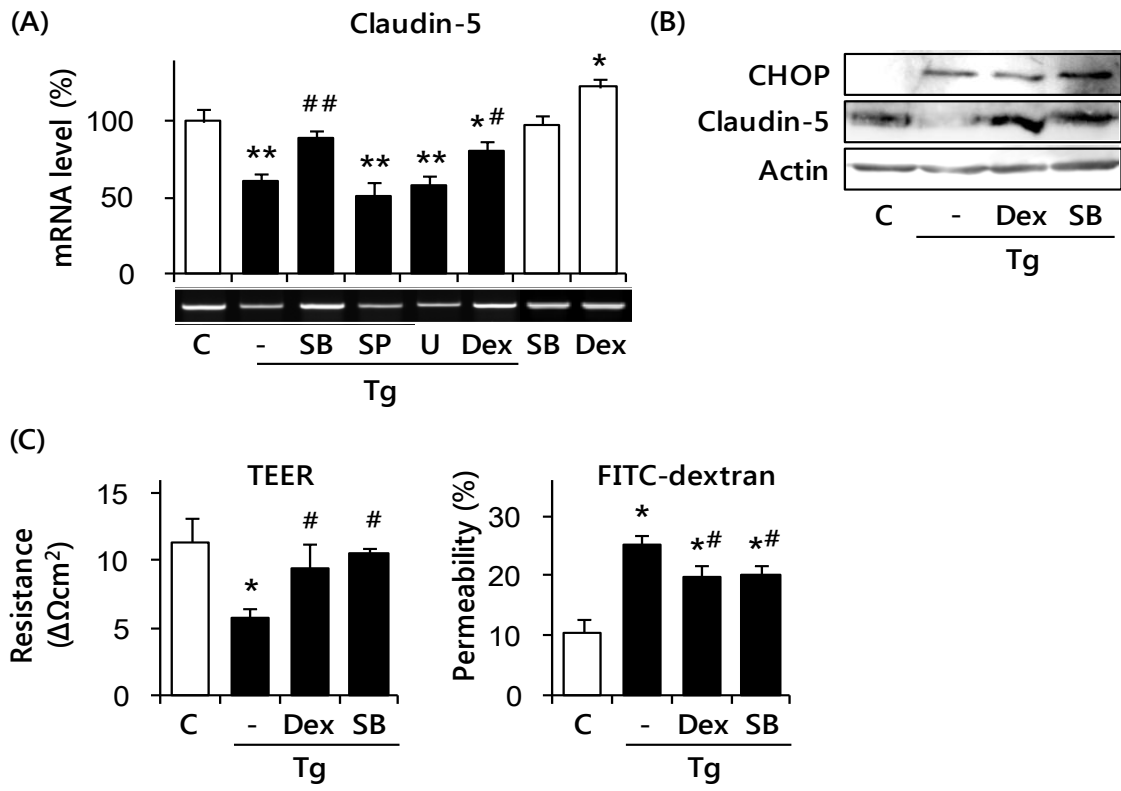


**Fig. 8 Effect of pre-treatment with PBA on ER stress-induced endothelial permeability.** HRECs were pre-treated with or without 5 mM PBA for 1 h and then treated with 0.1  $\mu\text{M}$  Tg for 24 h. After that, claudin-5 mRNA level (A), TEER and permeability of FITC-dextran (B) were determined. The claudin-5 mRNA levels were normalized with the GAPDH level in each sample. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle, # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs Tg only treated cell.



### 第3項 Tg誘導性 claudin-5発現低下に対する MAPK阻害剤と dexamethasone の影響

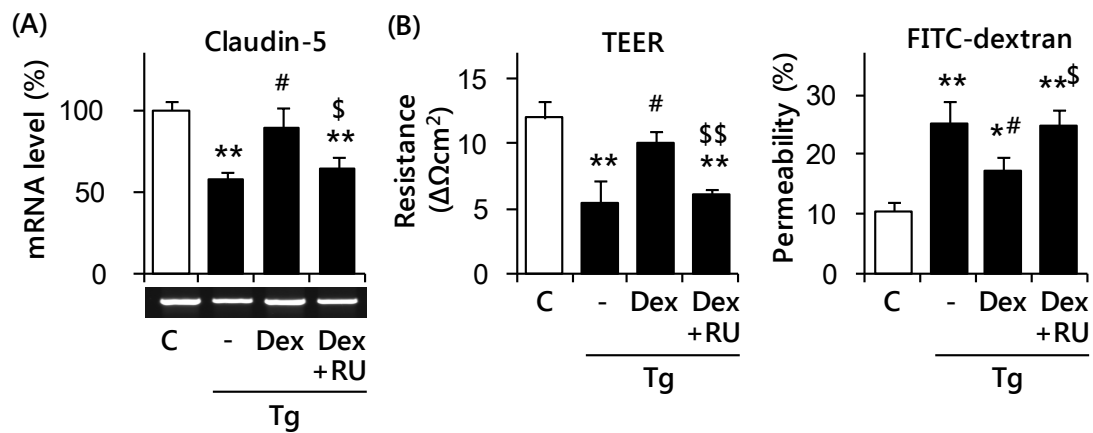
小胞体ストレスにより誘導される BRB の破綻には MAPK や NF- $\kappa$ B の関与が示唆されている [73, 74]。そこで、Tg 処理による claudin-5 発現低下に対する MAPK および NF- $\kappa$ B の阻害剤の影響を検討した。MAPK には extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 MAPK があり、多くの哺乳類細胞においてこれらの発現が認められている。p38 MAPK 阻害剤 SB203580 により Tg 誘導性 claudin-5 発現低下は有意に抑制されたが、JNK 阻害剤 SP600125 および MEK/ERK 阻害剤 U0126 はほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 9A)。合成グルココルチコイドである dexamethasone は NF- $\kappa$ B シグナル経路を阻害することから [92, 93]、次に、NF- $\kappa$ B 経路の関与を検討するために dexamethasone を NF- $\kappa$ B 阻害剤として使用した。Tg 誘導性 claudin-5 発現低下は dexamethasone 前処理により有意に抑制された (Fig. 9A)。タンパク質レベルにおいても、Tg 誘導性 claudin-5 発現低下は dexamethasone および SB203580 により抑制されたが、CHOP の発現には変化が認められなかった (Fig. 9B)。さらに、dexamethasone および SB203580 は Tg 処理による TEER の低下、FITC-dextran の透過性亢進を有意に抑制した (Fig. 9C)。



**Fig. 9 Effect of MAPK inhibitors and dexamethasone on the expression of claudin-5 and endothelial permeability.** (A) HRECs were pre-treated with or without 10  $\mu$ M SB (SB203580), 20  $\mu$ M SP (SP600125), 20  $\mu$ M U (U0126) or 0.5  $\mu$ M Dex (dexamethasone) for 30 min, and then treated with (closed columns) or without (open columns) 0.1  $\mu$ M Tg for 24 h. Claudin-5 mRNA was determined by RT-PCR and normalized with the GAPDH mRNA level in each sample. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=4). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle, # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs Tg only treated cell. (B) The cells were pre-treated with or without Dex or SB for 30 min, and then treated with 0.1  $\mu$ M Tg for 24 h. CHOP and claudin-5 protein levels were determined by Western blotting. (C) The cells in transwell plates were pre-treated with or without Dex or SB for 30 min, and then treated with 0.1  $\mu$ M Tg for 24 h, followed by analyses of TEER and permeability of FITC-dextran. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=4). \* $p$ <0.05 vs vehicle, # $p$ <0.05 vs Tg only treated cell.

#### 第4項 グルココルチコイド受容体の関与

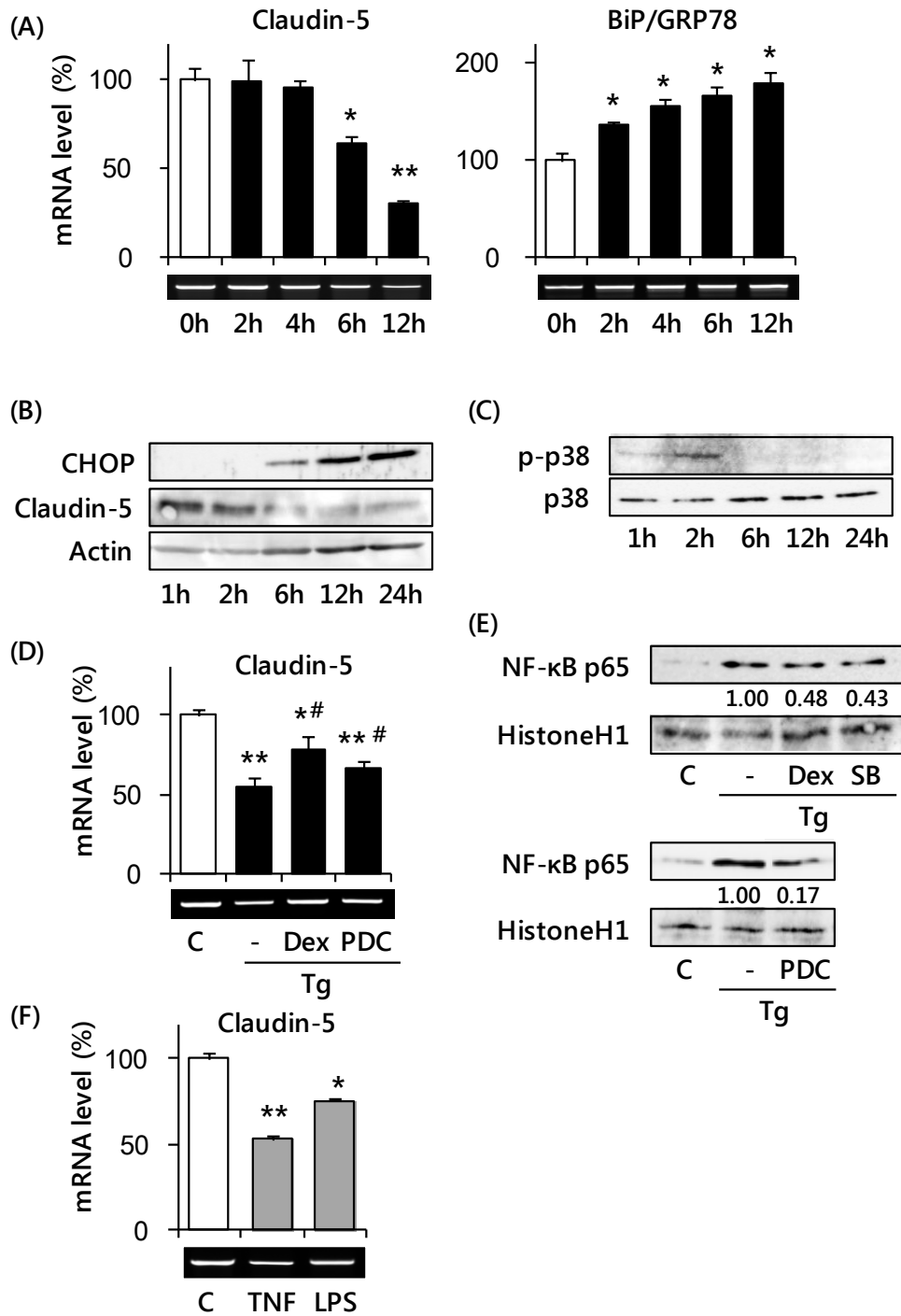
Dexamethasone の作用は GR に結合することで発揮される。*Claudin-5* 遺伝子の 5'調節領域にグルココルチコイド応答エレメント (GRE) が存在していることが報告されているため[92, 94]、Tg 誘導性網膜血管内皮細胞層透過性亢進における GR の関与を GR アンタゴニストである RU486 を用いて検討した。その結果、Tg 処理による claudin-5 発現低下に対する dexamethasone による阻害効果は RU486 の存在下で有意に抑制された (Fig. 10A)。また、Tg 処理による TEER 低下と FITC-dextran の透過性亢進に対する dexamethasone による阻害効果も同様に、RU486 の存在下で抑制された (Fig. 10B)。



**Fig. 10 Involvement of dexamethasone-GR complex in regulation of claudin-5 and endothelial permeability.** HRECs were pre-treated with or without 1  $\mu\text{M}$  RU (RU486) for 10 min, followed by the treatment with 0.5  $\mu\text{M}$  Dex (dexamethasone) for 30 min. After that, the cells were treated with 0.1  $\mu\text{M}$  Tg for 24 h, and claudin-5 mRNA level (A), TEER and permeability of FITC-dextran (B) were determined. The claudin-5 mRNA level was normalized with the GAPDH level in each sample. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle, # $p$ <0.05 vs Tg only treated cell, \$  $p$ <0.05, \$\$  $p$ <0.01 vs Tg-treated cell after the pre-treatment with Dex.

## 第5項 Claudin-5 発現調節における p38 MAPK 経路と NF- $\kappa$ B 経路の関与

前項で示したように、小胞体ストレス誘導における claudin-5 の発現低下には p38 MAPK と NF- $\kappa$ B シグナルが関与することが明らかになったため、次に、実際に p38 MAPK と NF- $\kappa$ B の活性化が小胞体ストレス負荷により起きているか検討した。Claudin-5 の発現低下は mRNA レベルおよびタンパクレベルにおいて Tg 処理 6 時間後から認められた。一方、BiP/GRP78、CHOP の発現は 2 時間から認められ、その発現は時間依存的に増加した (Fig. 11A および B)。次に、Tg が p38 MAPK 経路の活性化に及ぼす影響を p38 MAPK のリン酸化を指標に評価した。p38 MAPK のリン酸化は Tg 処理 2 時間後に最大となり、6 時間後では消失した (Fig. 11C)。さらに、Tg の NF- $\kappa$ B シグナルへの関与を NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤である PDC を用いて検討した。PDC はリン酸化 I $\kappa$ B のユビキチン化に関与するユビキチンリガーゼの活性化を阻害する NF- $\kappa$ B 特異的阻害剤である。PDC により Tg 誘導性 claudin-5 mRNA 発現低下は有意に抑制されたが、その効果は dexamethasone ほどではなかった (Fig. 11D)。次に、Tg が NF- $\kappa$ B 経路の活性化に及ぼす影響を NF- $\kappa$ B の核移行を指標に検討した。NF- $\kappa$ B の核移行は Tg 処理 6 時間後に認められ、dexamethasone あるいは SB 存在下で部分的に抑制され、PDC により顕著に阻害された (Fig. 11E)。NF- $\kappa$ B 経路の活性化が claudin-5 の発現低下に重要であると考えられたことから、NF- $\kappa$ B 活性化因子として知られている TNF $\alpha$  および LPS を用いて [95, 96]、claudin-5 の発現に対する影響を検討した。その結果、ヒト組み換え TNF $\alpha$  および LPS 処理により claudin-5 発現が抑制された (Fig. 11F)。



**Fig.11 Contributions of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathway to regulation of claudin-5.** (A) HRECs were treated with 0.1  $\mu$ M Tg for the indicated hours. Claudin-5 and BiP/GRP78 mRNA levels were determined and normalized using GAPDH levels. Data are shown as means  $\pm$  SD (n = 4). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs pre-treatment level. (B) The cells were treated with 0.1  $\mu$ M Tg for the indicated times, followed by Western blotting for CHOP and claudin-5. (C) The cells were treated with 0.1  $\mu$ M Tg for the indicated times, followed by Western blotting for phosphorylated and total p38 MAPK. (D) The cells were pre-treated with or without 0.5  $\mu$ M Dex or 10  $\mu$ M PDC for 30 min, and then treated with 0.1  $\mu$ M Tg for 24 h. Claudin-5 mRNA levels were determined and normalized using GAPDH levels. Data are shown as means  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle, # $p$ <0.05 vs Tg only treated cell. (E) The cells were pre-treated with or without Dex, SB or PDC for 30 min, and then treated with 0.1  $\mu$ M Tg for 6 h. NF- $\kappa$ B and histone H1 in the nuclear fraction were determined by Western blotting. Values are fold change compared with that of Tg only treated cell. (F) The cells were treated with 20 ng/mL TNF $\alpha$  or 1  $\mu$ g/mL LPS for 24 h. Claudin-5 mRNA levels were determined and normalized using GAPDH levels. Data are shown as means  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle.



#### 第4節 考察

慢性的な高血糖状態の持続が糖尿病網膜症の発症の原因となることはよく知られている[45, 46, 97, 98]。高血糖状態は小胞体ストレスを誘導することから、糖尿病網膜症の病態進展に小胞体ストレス関連因子が関与していることが報告されている[65]。そこで本研究では、小胞体ストレス負荷時の HREC における透過性亢進メカニズムについて、タイトジャンクション構成タンパク質の発現変動に着目し、そのシグナル伝達機構について検討した。

タイトジャンクション構成タンパク質である claudin と occludin は 4 回膜貫通型タンパク質であり、隣接する細胞同士がこれらの分子を介して結合しタイトジャンクションを形成している。また、ZO-1 などの細胞質に存在するタイトジャンクション裏打ちタンパク質によって claudin や occludin は細胞骨格と連結している。Occludin は最初に同定されたタイトジャンクション構成タンパク質であるが、遺伝子ノックダウンの実験などから、その後に発見された claudin の方がタイトジャンクションの形成に重要であることが明らかとなった[81-83]。現在、claudin には 24 種類のアイズォイムが同定されており、claudin-5 は内皮細胞、特に BRB を構成する網膜血管内皮細胞や血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を構成する脳血管内皮細胞に多く発現していることが確認されている。Claudin-5 やその他のタイトジャンクション構成タンパク質の発現の変化が BBB に影響を与えることも報告されている[99]。今回のヒトの網膜血管内皮細胞を用いた検討においても、小胞体ストレスの負荷により網膜血管内皮細胞層透過性が亢進すること、occludin や ZO-1 の発現に影響を与えることなく claudin-5 の発現のみ有意に低下することが判明し (Fig. 7)、この結果は第 1 章のラット網膜血管内皮細胞を用いた結果と一致した。

転写因子は遺伝子の転写調節領域に結合することでその遺伝子発現を制御することが知られており、NF- $\kappa$ B は小胞体と核の間のシグナル伝達経路において重要な転写因子である。小胞体ストレス負荷により NF- $\kappa$ B 経路が活性化することが報告されており [90]、NF- $\kappa$ B は網膜症においても症状の悪化につながる因子として考えられている [100]。HREC において、小胞体ストレス誘導剤である Tg 処理により、NF- $\kappa$ B の核移行が認められたが、NF- $\kappa$ B 阻害剤である dexamethasone や PDC 存在下で核移行は抑制された (Fig. 9 および 11)。このとき Tg 処理による claudin-5 の発現低下もこれら阻害剤の存在下で抑制されたことから、Tg 処理による claudin-5 の発現低下は NF- $\kappa$ B 経路を介して引き起こされることが示唆された。タイトジャンクション構成タンパク質は炎症性サイトカインによって発現が変化し、透過性が亢進するという報告がある [101, 102]。本章での検討においても、NF- $\kappa$ B 活性化因子である TNF $\alpha$  や LPS が claudin-5 mRNA 発現を低下させる結果が得られ (Fig. 11)、小胞体ストレスによる claudin-5 の発現低下に NF- $\kappa$ B が関与することが強く支持された。

NF- $\kappa$ B 経路は MAPK 経路とクロストークしていることが知られている。本章での検討において、p38 MAPK 阻害剤 SB203580 の存在下で Tg 処理による claudin-5 の発現低下は抑制され、また、Tg による一過性の p38 MAPK リン酸化の亢進も認められた (Fig. 9 および 11)。これらの結果から、Tg 処理による claudin-5 の発現低下には p38 MAPK 経路も関与していることが示された。p38 MAPK のリン酸化は I $\kappa$ B キナーゼを活性化、それに続く NF- $\kappa$ B の核移行を誘導することが報告されている [103]。本章での実験の結果、SB203580 が Tg による NF- $\kappa$ B 核移行を部分的に抑制したことから (Fig. 11)、p38 MAPK は NF- $\kappa$ B を介した claudin-5 の発現が低下に関与している可能性が考えられた。

Dexamethasone は GR に結合した後、その複合体が核に移行し GRE に結合

することで遺伝子の発現を調節している。一方で、dexamethasone は NF- $\kappa$ B シグナルを抑制することも知られている。本研究においても、dexamethasone は PDC と同様に Tg による NF- $\kappa$ B の核移行を抑制したことから (Fig. 11)、透過性亢進に対する dexamethasone の抑制に NF- $\kappa$ B 阻害作用が関与していると考えられた。しかし、Tg による claudin-5 の発現低下に対する抑制作用は PDC に比べ dexamethasone の方が強く、さらに、dexamethasone の単独処理の場合、claudin-5 の発現が亢進した (Fig. 9 および 11)。また、*Claudin-5* 遺伝子の 5'調節領域に GRE が存在しており、dexamethasone 処理によりその転写が亢進することが明らかにされている [92, 94]。今回の検討においても、dexamethasone の抑制効果は GR アンタゴニストである RU486 で完全に阻害されたことから (Fig. 10)、dexamethasone は GR への結合を介した機序により、その保護作用を発揮していると考えられた。これらの結果から、dexamethasone は直接的に内皮細胞の claudin-5 の発現を亢進させることで Tg により低下したタイトジャンクション機能を回復させている可能性も考えられた。

以上の結果から、小胞体ストレスにより p38 MAPK と NF- $\kappa$ B シグナルが活性化されることでタイトジャンクションタンパク質 claudin-5 の発現が低下し、網膜内皮細胞層透過性が亢進すると考えられた。また、dexamethasone は HREC において NF- $\kappa$ B シグナルを介して、あるいは GR との複合体を形成し直接的に claudin-5 の発現を制御することが明らかとなった。本章において、小胞体ストレス誘導における糖尿病網膜症の分子メカニズムの一部を解明するとともに、グルココルチコイドによる糖尿病網膜症の保護作用についての知見を得ることができた。

## 第 3 章 Exendin-4 によるエピジェネティクスを介した EC-SOD 発現制御

### 第 1 節 緒言

EC-SOD は主に細胞外に局在する分泌型抗酸化酵素であり[19-21]、細胞外に放出された ROS を効率よく消去することにより、特に血管系においては酸化ストレスから血管を防御する働きをしている。このようなことから、EC-SOD 発現の維持・亢進が糖尿病や動脈硬化症などの血管系疾患の進展抑制に対して重要であると考えられているにもかかわらず[15, 104, 105]、その発現メカニズムに関しては不明な点が多い。しかし、最近、EC-SOD の発現を調節する主要な転写因子として Sp1/Sp3 が同定された[32-34]。また、EC-SOD 発現がエピジェネティクスにより制御されていることが報告された[31-34]。エピジェネティクスとは塩基配列によらない遺伝情報の発現制御機構のことであり、大きく DNA メチル化とヒストン修飾に分けることができる[106]。DNA メチル化は DNA 上のシトシン、グアニンの順で並んだ配列 (CpG 配列) のシトシンの 5 位の炭素で起きるメチル化修飾のことを指し、主にゲノム DNA と転写因子のような DNA 結合タンパク質との結合を阻害もしくは促進する[107]。ヒト遺伝子の約 70%には、そのプロモーター領域にこの CpG 配列が多数存在する CpG アイランドが存在し、その多くがメチル化されていない状態にある[108]。一般的に、CpG 配列がメチル化されることで遺伝子の発現は抑制されるが、一部、DNA メチル化が発生や分化、がん化に関与する遺伝子においてその遺伝子の発現を亢進することも知られている[108-110]。DNA メチル化修飾は DNA メチル化転移

酵素（DNMTs）の触媒作用によって、メチル基供与体である S-adenosylmethionine（SAM）から DNA へメチル基が転移する反応である。この DNMTs には哺乳類において DNMT1、DNMT3A、DNMT3B の 3 種類のアイソザイムが同定されている[111, 112]。一方、ヒストン修飾はヌクレオソームのコア領域からはみ出た N 末端側のヒストンテールと呼ばれる領域のリジン、アルギニン、セリン残基におけるアセチル化、メチル化、リン酸化などの修飾を指し、クロマチン構造の変化を伴った遺伝子発現の誘導や抑制に関与する[113, 114]。

糖尿病治療薬として 2010 年より日本で上市されたエキセナチド (exendin-4) はアメリカオオトカゲの唾液腺から抽出されたホルモンであり、glucagon like peptide-1 (GLP-1) 受容体に結合し、膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌の促進や  $\alpha$  細胞からのグルカゴン分泌の抑制などの効果を示す[115-117]。生体内において GLP-1 は小腸下部より分泌されるが、dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) によって速やかに分解される。Exendin-4 は GLP-1 が DPP-4 により切断を受ける部位のアミノ酸が置換されている GLP-1 アナログであることから DPP-4 に対し抵抗性を示し、GLP-1 受容体作動薬として用いられている。また、GLP-1 受容体は膵臓だけでなく、心臓、腎臓、脳や血管においても発現していることが確認されたことから[118]、exendin-4 の膵外作用が期待され、exendin-4 の適応拡大につながる報告も少なくない。最近、exendin-4 がエピジェネティクスに影響を与え、遺伝子の発現を変化させるということが報告されており[119]、exendin-4 には DNA メチル化やヒストンアセチル化に影響を及ぼす可能性が考えられる。

ヒト肺がん由来の A549 細胞はヒト肺由来の正常細胞である MRC5 細胞に比べ、EC-SOD 発現が低く、脱メチル化剤である 5-azacytidine の添加によってそ

の発現が亢進するという結果から、A549細胞における EC-SOD 発現に関して、主に DNA メチル化によるエピジェネティックな発現調節機構が明らかにされた[34]。上述のように exendin-4 にはエピジェネティクスに影響を与える可能性があることから、exendin-4 が EC-SOD の発現にも影響を及ぼすと考えられる。そこで、exendin-4 の新規膜外作用としての抗酸化酵素 EC-SOD 発現に対する効果を、モデル細胞として A549 細胞を用いて DNA メチル化制御という観点から検討したので、以下に得られた知見を示す。

## 第2節 実験方法

### 第1項 試薬

Exendin-4 は AnaSpec、exendin-(9-39) は GenScript、5-azacytidine は和光純薬工業株式会社、Thunderbird™ SYBR qPCR Mix は東洋紡績株式会社、EC-SOD QuantiTect® Primer、Puregene Core kit は Qiagen、McrBC は New England BioLabs、EZ DNA Methylation-Gold kit は Zymo Research、pGEM-T Easy Vector System は Promega、EpiQuik™ Nuclear Extraction kit I、EpiQuik™ DNMT Activity/Inhibition Assay Ultra kit (Colorimetric) は Epigentek Group から購入した。その他の試薬は、第1章および第2章、第2節、第1項に示す試薬を用いた。

### 第2項 細胞培養

ヒト肺基底上皮腺癌細胞である A549 細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin を含む DMEM 培地で培養した。

### 第3項 Real-time RT-PCR

A549 細胞を 60 mm dish に播種し、上記の条件で培養した。Exendin-4、exendin-(9-39)、5-azacytidine で 24 時間処理した後、第1章、第2節、第4項に示す方法にて cDNA を作製した。EC-SOD 遺伝子は上記の cDNA 1 µg を用いて、ヒト EC-SOD プライマー (QuantiTect® Primer Assay Hs\_SOD3\_2\_SG) を含む反応液 (20 µL, Thunderbird™ SYBR qPCR Mix を使用) を調製し、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (Takara Bio Inc., Ootus, Japan) で増幅した。その他の遺伝子の増幅は 6 pmol の各遺伝子に特異的なセ

ンスプライマー、アンチセンスプライマーを使用し、上記の方法と同様に行った。Table 4 に各遺伝子のプライマーの塩基配列を示す。PCR は Thunderbird™ SYBR qPCR Mix のプロトコール (95°C 15 秒、60°C 1 分の 2 ステップ) で行った。

**Table 4.**  
Nucleotide sequences of specific primers and PCR conditions for amplification

genes	sequence
Cu,Zn-SOD	forward 5'- GCG ACG AAG GCC GTG TGC GTG -3'
	reverse 5'- TGT GCG GCC AAT GAT GCA ATG -3'
Mn-SOD	forward 5'- CGA CCT GCC CTA CGA CTA CGG -3'
	reverse 5'- CAA GCC AAC CCC AAC CTG AGC -3'
DNMT 1	forward 5'- ACC GCT TCT ACT TCC TCG AGG CCT A -3'
	reverse 5'- GTT GCA GTC CTC TGT GAA CAC TGT GG -3'
DNMT 3A	forward 5'- CAC ACA GAA GCA TAT CCA GGA GTG -3'
	reverse 5'- AGT GGA CTG GGA AAC CAA ATA CCC -3'
DNMT 3B	forward 5'- AAT GTG AAT CCA GCC AGG AAA GGC -3'
	reverse 5'- ACT GGA TTA CAC TCC AGG AAC CGT -3'
18S rRNA	forward 5'- CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA -3'
	reverse 5'- GCT GGA ATT ACC GCG GCT -3'

#### 第 4 項 McrBC-PCR

A549 細胞を 60 mm dish に播種し、DMEM 培地で培養した。Exendin-4、5-azacytidine で 24 時間処理した後、PBS で洗浄し、Puregene Core kit を用いてゲノム DNA を調製した。このゲノム DNA 5 µg を制限酵素 EcoRI (25 units) により、37°C、2 時間消化した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を行い、エタノール沈澱により DNA を精製した。その後、さらに、精製した DNA (500 µg) を DNA メチル化部位特異的制限酵素 McrBC (10 units) により、



37°C、1時間消化した。サンプルを65°Cで20分インキュベートし、酵素を失活させた後、精製水を加え、DNA濃度を5 ng/μLに調製した。この調製したサンプルを2 μLを用いて Table 5 に示すプライマーで real-time PCR を行った。Real-time PCR は本章、第2節、第3項に示す方法にて行った。

**Table 5.**  
Nucleotide sequences of specific primers and PCR conditions for amplification

primer	sequence
Pair 1 (-1208/-764)	forward 5'- GCT GGT AAC TAA GTC ACC CA -3'
	reverse 5'- TGT TGT CTG GGA GAA CTA GG -3'
Pair 2 (-278/+51)	forward 5'- CTG AAG GTC ACT GGC TAC AA -3'
	reverse 5'- TAG CAC CCA CCT TTC CAG C -3'

#### 第5項 Methylation-specific PCR (MSP) 法

本章、第2節、第4項に示す方法にてゲノム DNA を調製し、EZ DNA Methylation-Gold kit を使用し、このゲノム DNA (500 ng) のバイサルファイト処理を行った。MethPrimer software で Table 6 に示すバイサルファイト処理 DNA のプライマーをデザインし、PCR を行った。PCR はバイサルファイト処理 DNA 1 μL を用いて、0.2 mM dNTP、10 pmol センスプライマー、10 pmol アンチセンスプライマー、0.63 units Ex-Taq polymerase を含む 25 μL の反応液中、アニーリング温度 60°C で 35 サイクルの条件で行った。PCR 産物は、ethidium bromide を加えた 2% (w/v) アガロースゲルで電気泳動した後、イメージスキャナー (FLA-5000、Fuji Film) で撮影し、Multi Gauge V3.0 (Fuji Film) を用いて解析を行った。

Table 6.

Primer sequences used in MSP of *EC-SOD* promoter (MSP1-methylated (M) and-unmethylated (U)) and coding regions (MSP2-M and -U)).

primer	sequence
MSP 1-M	forward 5'- TGG AGG CGA AGT AAT TTT ATA ATT-3'
	reverse 5'- CCT AAA ACC TAA ACT ATT AAC GCG A-3'
MSP 1-U	forward 5'- GGA GGT GAA GTA ATT TTA TAA TTT GG-3'
	reverse 5'- CCT AAA ACC TAA ACT ATT AAC ACA AA-3'
MSP 2-M	forward 5'- TCG AGA TAT GTA CGT TAA GGT TAC G-3'
	reverse 5'- ACT AAA ACT ATT CGA CTC GAT CGA A-3'
MSP 2-U	forward 5'- TGA GAT ATG TAT GTT AAG GTT ATG G-3'
	reverse 5'- ACT AAA ACT ATT CAA CTC AAT CAA A-3'

#### 第 6 項 バイサルファイトシーケンス

本章、第 2 節、第 5 項で作製したバイサルファイト処理 DNA 500 ng を用いて、Table 7 に示すプライマーにて PCR を行った。プライマーは MethPrimer software でデザインした。増幅した PCR 産物を pGEM-T Easy Vector System にサブクローニングした後、CEQ8000 (Beckman Coulter, Tokyo, Japan) にて塩基配列を決定した。少なくとも 10 個のプラスミドクローンを用いてメチル化の有無を判断した。

Table 7.

Primer sequences used in bisulfite sequencing of *EC-SOD* promoter regions.

primer	sequence
Bisulfite-sequence primer	forward 5'- TTT TTT GTT GTG TGT TGA AGG TTA T-3'
	reverse 5'- AAC TCC TCC AAA AAA ACT TTC TCT C-3'

#### 第 7 項 DNMT 活性測定

A549 細胞を 60 mm dish に播種し、DMEM 培地で培養した。Exendin-4、5-azacytidine で 24 時間処理した後、PBS で洗浄し、EpiQuik™ Nuclear

Extraction kit I を用いて核抽出を行った。タンパク質濃度は Bradford 法にて測定した。調製した核抽出液（タンパク量 10  $\mu\text{g}$ ）の DNMT 活性を EpiQuik™ DNMT Activity/Inhibition Assay Ultra kit (Colorimetric) を用いて測定した。

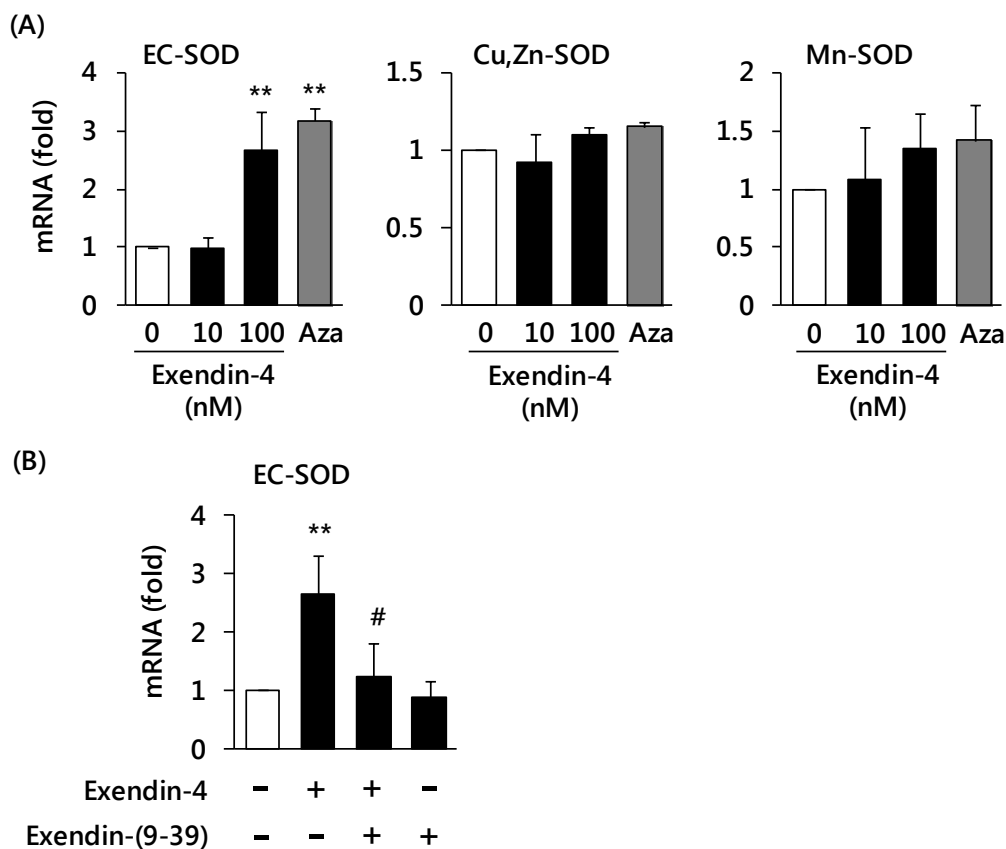
#### 第 8 項 統計学的解析

データ解析は、Mann-Whitney  $U$  test にて行い、 $p < 0.05$  である場合に統計学的に有意であると判断した。

### 第3節 結果

#### 第1項 A549細胞におけるEC-SOD発現に対するexendin-4の影響

Exendin-4は糖尿病治療薬として、膵β細胞からのインスリン分泌の促進やα細胞からのグルカゴン分泌の抑制などの効果を示すことが知られているが[115-117]、EC-SODなどの抗酸化酵素の発現に対する影響については明らかではない。そこで、exendin-4のSODs発現に対する影響についてA549細胞を用いて検討した。A549細胞をディッシュに播種し、exendin-4にて24時間処理したところ、Cu,Zn-SOD、Mn-SODの発現には有意な変化が認められなかったが、EC-SODの発現は有意に亢進した(Fig. 12A)。また、exendin-4のEC-SOD発現亢進がGLP-1受容体を介する反応かどうかGLP-1受容体アンタゴニストであるexendin-(9-39)を用いて検討した。その結果、exendin-(9-39)存在下、exendin-4のEC-SOD発現亢進は有意に抑制された(Fig. 12B)。また、A549細胞におけるEC-SOD発現は主にDNAメチル化により抑制されているため、脱メチル化剤5-azacytidineを用いてその影響を検討した結果、5-azacytidine処理により、SODアイソザイムの内、EC-SODの発現のみが有意に亢進した(Fig. 12A)。

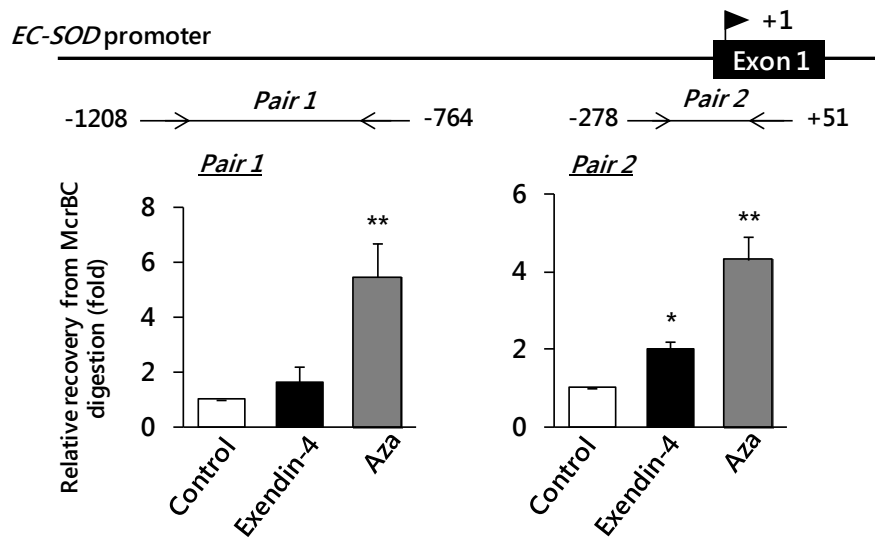


**Fig. 12 Effects of exendin-4 on EC-SOD expression in A549 cells.** (A) A549 cells were treated with the indicated concentrations of exendin-4 or 1  $\mu$ M 5-azacytidine (Aza) for 24 h, followed by the measurement of SODs mRNA levels. (B) A549 cells were pretreated with (+) or without (-) 200 nM exendin-(9-39) for 1 h, and then treated with (+) or without (-) 100 nM exendin-4 for 24 h. Real-time RT-PCR data were normalized using 18S rRNA levels. Data are shown as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*\* $p$ <0.01 vs vehicle, #  $p$ <0.05 vs exendin-4-treated cells.

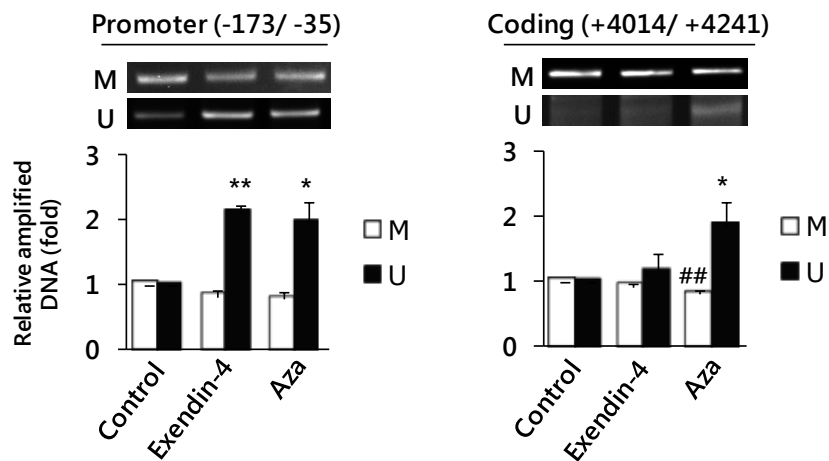
## 第 2 項 *EC-SOD* プロモーター領域での exendin-4 の DNA 脱メチル化作用

A549 細胞における *EC-SOD* の発現は、そのプロモーター領域における高度な DNA メチル化により抑制されていることが知られている [34]。また、Fig. 12A の 5-azacytidine 処理における結果から、exendin-4 による *EC-SOD* 発現亢進には DNA 脱メチル化反応が関与すると考え、*EC-SOD* プロモーター領域における DNA メチル化状態を評価した。まず初めに、McrBC-PCR 法を用いて解析した。DNA メチル化部位特異的制限酵素 McrBC は CpG 配列のメチル化部位を認識して切断するため、メチル化されている DNA を含む領域は PCR によって増幅されない。この反応を利用し解析した結果、exendin-4 の 24 時間処理により、*EC-SOD* プロモーターの Pair 2 の領域において PCR 産物が増加したことから、Pair 2 の領域における脱メチル化の亢進が確認できた (Fig. 13A)。また、5-azacytidine を用いた場合、Pair 1、Pair 2 の領域で脱メチル化が亢進した (Fig. 13A)。次に、バイサルファイト処理を行い、DNA メチル化状態を評価した。バイサルファイト処理を行うことでシトシンはウラシルに変換され、PCR によりチミンとなるが、シトシンがメチル化しているときは、ウラシルへの変換は起こらない。この反応を利用し解析したところ、exendin-4 の 24 時間処理により、非メチル化特異的プライマーによる *EC-SOD* プロモーター領域の PCR 産物が増加したことから、*EC-SOD* プロモーターにおける脱メチル化の亢進が確認できた (Fig. 13B)。さらに、脱メチル化部位をより詳細に特定するために、バイサルファイト処理 DNA を用いて、*EC-SOD* プロモーター領域のシーケンスを行った。その結果、-149、-93 の CpG 部位の脱メチル化が亢進することが明らかとなった (Fig. 13C)。5-azacytidine においても同様な結果を得た (Fig. 13C)。

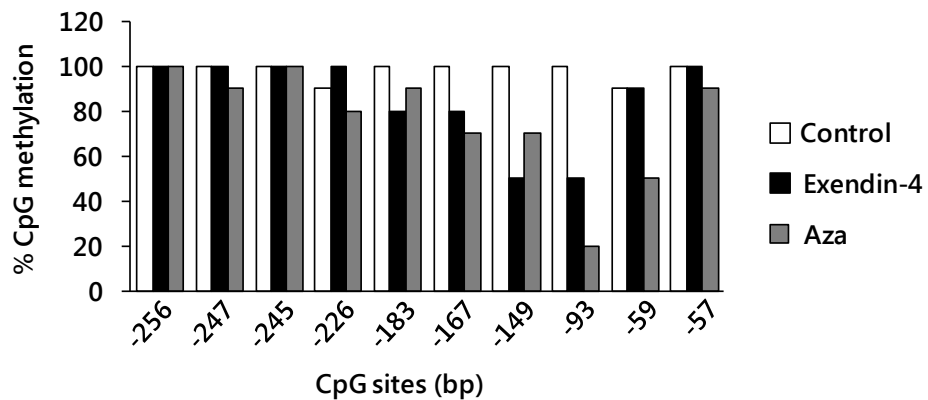
(A)



(B)



(C)

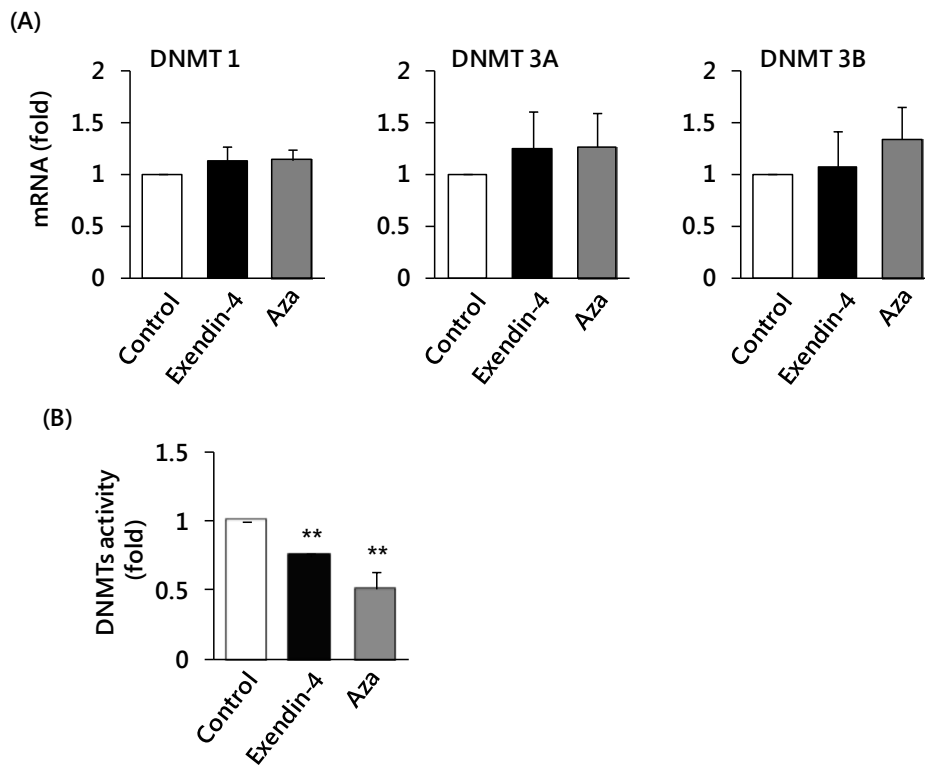


**Fig. 13 Involvement of DNA demethylation in exendin-4-inducible EC-SOD expression in A549 cells.** A549 cells were treated with 100 nM exendin-4 or 1  $\mu$ M Aza for 24 h. (A) After these treatments, genomic DNA from A549 cells was purified, and followed by McrBC digestion-real-time PCR. Data are shown as the mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs vehicle. (B) The genomic DNA of A549 cells was purified and treated with bisulfite, followed by methylation-specific PCR (MSP) amplification with methylation (M) and non-methylation (U) site primers. Data are shown as the mean  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs control (U). ## $p$ <0.01 vs control (M). (C) Amplified sequences were subjected to a DNA sequence analysis. At least 10 individual clones were sequenced for both cell types.



### 第3項 Exendin-4のDNMTに対する影響

DNAメチル化はDNMTにより触媒される反応である[111, 112]。そこで、exendin-4の脱メチル化作用がDNMTへの作用であるかどうか検討した。DNMTには3種のアイソザイムが存在するが、exendin-4はそれらのmRNA発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 14A)。次に、exendin-4のDNMT活性に及ぼす影響を検討した結果、exendin-4にて24時間処理した細胞ではDNMT活性は有意に低下していた (Fig. 14B)。対照として用いた5-azacytidineによる処理によってもDNMT活性の低下が認められた (Fig. 14B)。



**Fig. 14 Effects of exendin-4 on DNMTs in A549 cells.** A549 cells were treated with 100 nM exendin-4 or 1  $\mu$ M Aza for 24 h. mRNA expression levels of DNMTs (A) and DNMT activity (B) were then assayed. (A) Real-time RT-PCR data were normalized using 18S rRNA levels. (B) The activity of DNMT in nuclear extracts was determined by the method described in the “Materials and methods.” Data are shown as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*\* $p$ <0.01 vs vehicle.

#### 第4節 考察

Exendin-4はGLP-1受容体アゴニストであり、糖尿病治療薬として臨床現場で用いられている。膵β細胞において、exendin-4はGLP-1受容体への結合を介してインスリン分泌や膵β細胞の増殖を促進する[115-117]。GLP-1受容体は、膵臓以外に心臓、腎臓、脳や血管においても発現しており[118]、GLP-1やexendin-4の膵外作用として心保護作用や神経保護作用などが報告されている[42-44]。それゆえ、exendin-4の血管系に対する直接的な作用にも興味をもたれている。近年、exendin-4はDNAメチル化などに影響を及ぼすことが報告されている[119]。また、EC-SODの発現がエピジェネティクスの制御を受けることも報告されており[31-34]、特に、A549細胞では*EC-SOD*プロモーター領域が高度にメチル化されているため、遺伝子発現に関わる転写因子Sp1/3などが転写活性化領域に結合できず、その発現が抑制されている[34]。そこで本研究では、exendin-4の新規作用としてEC-SOD発現への影響についてA549細胞を用いてエピジェネティクスの観点から検討を行った。

DNAメチル化修飾はDNMTsによってSAMから二重鎖DNAへメチル基が転移することで起きる。DNMTsには維持メチル化を誘導するDNMT1と初期胚発生や生殖細胞形成などに関与する*de novo*メチル化を誘導するDNMT3A、DNMT3Bが存在する[107, 111, 112]。今回の検討ではexendin-4はDNMTs mRNAの発現に影響を与えなかったが、DNMTs活性を有意に低下させた (Fig. 14)。この結果は、Fig. 13の結果である*EC-SOD*プロモーター領域におけるDNA脱メチル化の亢進につながることを示している。以上の結果から、exendin-4はGLP-1受容体を介し、DNMTs活性を阻害することで*EC-SOD*プロモーター領域のメチル化を解除しEC-SODの発現を誘導すると推察された。

以前の報告から、exendin-4やGLP-1にはhistone deacetylase (HDAC) や

histone acetyltransferase (HAT) の発現や活性を変化させ、ヒストンアセチル化、または脱アセチル化を制御することが報告されている[119, 120]。そこで、今回A549細胞におけるEC-SODの発現に及ぼすHDAC阻害剤トリコスタチンA (TSA) の影響を検討したが、EC-SOD発現はTSA添加によりほとんど変化しなかった(データ省略)。したがって、A549細胞におけるexendin-4のEC-SOD発現制御はDNAメチル化に依存していると考えられる。

本章の結果から、exendin-4はGLP-1受容体を介するDNA脱メチル化作用によりEC-SODの発現を誘導することが明らかとなった。EC-SODは血管壁に広く分布しているため、この結果から、exendin-4によるEC-SOD発現の亢進は酸化ストレス誘導性血管障害に対する抑制効果としても期待できると考える。

## 総括

糖尿病網膜症は不可逆的な病態の進行により失明に至る危険性をもつ疾患であり、患者の **activities of daily living (ADL)** を大きく損なう重篤な糖尿病合併症の一つである。現在、糖尿病網膜症の重症化は診断、治療技術の向上により減少傾向にあるものの、糖尿病患者数は増加しており、さらなる網膜症の病態解明・治療薬の開発が望まれている。**ROS** の異常産生、**ROS** の除去システムの破綻により生じる酸化ストレスは糖尿病網膜症の発症原因の一つであると考えられている。**ROS** であるスーパーオキシドを不均化する **SODs** の中で、**EC-SOD** は細胞外に分泌された後、血管壁に広く局在することから、糖尿病網膜症のような酸化ストレスが誘因となる血管系疾患において防御システムとして病態の進展抑制に重要な役割を担っていると推察される。本研究では糖尿病網膜症の病態と治療薬の新規薬効の解明を目指し、本病態時での **EC-SOD** ならびに **BRB** を形成するタイトジャンクション構成タンパク質の発現変動とその調節機構を明らかにした。以下に本研究で得られた知見をまとめる。

(1) 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中において **EC-SOD** レベルが高値を示す理由を明らかにするために、ラット網膜血管内皮細胞を用いて糖尿病網膜症の病態進展に関与する小胞体ストレスが血管透過性に及ぼす影響について検討した。その結果、小胞体ストレスは網膜血管内皮細胞層のタイトジャンクション構成タンパク質である **claudin-5** の発現を低下させ、**EC-SOD** の網膜血管内皮細胞層透過性を亢進させることが明らかになった。したがって、糖尿病網膜症において **EC-SOD** は網膜血管から硝子体に漏出し、それが血管系の恒常性維持機構の破綻につながると考えられた。

(2) 小胞体ストレス誘導性のタイトジャンクション破綻の分子機構を明らかにするために、HREC を用いて小胞体ストレス負荷時の細胞内シグナル経路を中心に検討した。その結果、小胞体ストレスにより p38 MAPK と NF- $\kappa$ B シグナルが活性化されること、これらのシグナルの活性化によりタイトジャンクション構成タンパク質 claudin-5 の発現が低下し、網膜血管内皮細胞層透過性が亢進することが明らかとなった。さらに、dexamethasone は claudin-5 の発現を亢進させ、小胞体ストレスによる透過性亢進を抑制する作用があることが明らかになった。

(3) 糖尿病治療薬である exendin-4 が EC-SOD 発現に与える影響についてエピジェネティクスの観点から明らかにするために、A549 細胞を用いて、特に DNA メチル化を中心に検討した。その結果、exendin-4 は GLP-1 受容体を介し、DNMT 活性を阻害することで DNA 脱メチル化を促進させ EC-SOD の発現を亢進することが明らかになった。

第 1 章、第 2 章では小胞体ストレス誘導時における網膜血管内皮細胞層透過性亢進のメカニズムを明らかにした。小胞体ストレスは酸化ストレスなど様々な原因により誘導され糖尿病病態を進展させることが知られている。小胞体ストレスが p38 MAPK と NF- $\kappa$ B シグナルを活性化することにより claudin-5 発現の低下をもたらすことが判明した。また、糖尿病によって増加する AGEs がその受容体に結合することで NF- $\kappa$ B シグナルを活性化することも報告されていることから、小胞体ストレスだけでなく、他の因子によっても claudin-5 の発現が低下することも考えられる。それゆえ、NF- $\kappa$ B 阻害作用に加え、直接的な

claudin-5 誘導作用を有する dexamethasone のような医薬品は糖尿病網膜症の治療に有用であると考えられる。第 3 章では A549 細胞を用いて糖尿病治療薬である exendin-4 の抗酸化酵素 EC-SOD 発現誘導という新規作用を明らかにした。GLP-1 受容体の発現は様々な培養細胞や臓器で確認されており、膵臓以外の組織においても GLP-1 受容体アゴニストとしての効果が期待されている。糖尿病網膜症において血管内腔から EC-SOD が漏出しやすくなることを考慮すると、exendin-4 の DNA 脱メチル化を介した EC-SOD 発現亢進作用は、糖尿病網膜症の進展抑制にもつながる重要な知見であると考えられる。

以上、本研究では糖尿病網膜症の病態解明と糖尿病治療薬である exendin-4 の網膜症への適用拡大や糖尿病網膜症治療薬としての exendin-4 誘導体の開発といった創薬の可能性に対し、有益な情報を提供することができた。

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室 足立哲夫教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇篤なる御指導ならびに御助言を賜りました岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室 原宏和准教授、神谷哲朗助教に深謝いたします。また、御協力を賜りました臨床薬剤学研究室の諸氏に感謝の意を表します。



引用文献

- [1] Outline of Results from 2012 National Health and Nutrition Survey: Ministry of Health, Labour and Welfare [http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/0000099296.pdf]
- [2] Katsuki S, Hirota Y. Recent trends in incidence of cerebral hemorrhage and infarction in Japan. A report based on death rates, autopsy case and prospective study on cerebrovascular disease. *Jpn. Heart J.*, **7**: 26-34, 1966.
- [3] Miyazaki M, Kubo M, Kiyohara Y, Okubo K, Nakamura H, Fujisawa K, Hata Y, Tokunaga S, Iida M, Nose Y, Ishibashi T. Comparison of diagnostic methods for diabetes mellitus based on prevalence of retinopathy in a Japanese population.: the Hisayama Study. *Diabetologia*, **47**: 1411-1415, 2004.
- [4] Yabe-Nishimura C. Aldose reductase in glucose toxicity: A potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol. Rev.*, **50**: 21-33, 1998.
- [5] Singh R, Barden A, Mori T, and Beilin L. Advanced glycation end-products: review. *Diabetologia*, **44**: 129-146, 2001.
- [6] Nyengaard JR, Ido Y, Kilo C, Williamson JR. Interactions between hyperglycemia and hypoxia: implications for diabetic retinopathy. *Diabetes*, **53**: 2931-2938, 2004.
- [7] Kapoor A, Sanyal AJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Clin. Liver Dis.*, **13**: 581-590, 2009.

- [8] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, **54**: 1615-1625, 2005.
- [9] Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, Brenner C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*, **27**: 285-299, 2007.
- [10] Kowluru RA, Abbas SN. Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**: 5327-5334, 2003.
- [11] Kowluru RA. Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta. Diabetologica*, **38**: 179-185, 2001.
- [12] Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.*, **102**: 5-12, 1994.
- [13] Carriere A, Carmona M, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Penicaud L, Casteilla L. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J. Biol. Chem.*, **279**: 40462-40469, 2004.
- [14] Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.*, **17**: 3-8, 1997.
- [15] Vachier I, Chanez P, Le Doucen C, Damon M, Descomps B, Godard P. Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and

- unstable asthmatic patients. *Eur. Respir. J.*, **7**: 1585-1592, 1994.
- [16] Wright E Jr, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int. J. Clin. Pract.*, **60**: 308-314, 2006.
- [17] Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, **49**: 835-842, 2010
- [18] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, **114**: 1752-1761, 2004.
- [19] Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism*, **55**: 928-934, 2006.
- [20] Huang PL. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol. Metab.*, **20**: 295-302, 2009.
- [21] Keele BB Jr, McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem.*, **245**: 6176-6181, 1970.
- [22] Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7634-7638, 1982.
- [23] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049-6055,

- 1969.
- [24] Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 6264-6268, 1995.
- [25] Lu Z, Xu X, Hu X, Zhu G, Zhang P, van Deel ED, French JP, Fassett JT, Oury TD, Bache RJ, Chen Y. Extracellular superoxide dismutase deficiency exacerbates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. *Hypertension*, **51**: 19-25, 2008:
- [26] Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Guo Y, French BA. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation*, **103**: 1893-1898, 2001
- [27] Iyama S, Okamoto T, Sato T, Yamauchi N, Sato Y, Sasaki K, Takahashi M, Tanaka M, Adachi T, Kogawa K, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y. Treatment of murine collagen-induced arthritis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Arthritis Rheum.*, **44**: 2160-2167, 2001.
- [28] Adachi T, Toishi T, Takashima E, Hara H. Infliximab neutralizes the suppressive effect of TNF- $\alpha$  on expression of extracellular-superoxide dismutase in vitro. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**: 2095-2098, 2006.
- [29] Kamiya T, Hara H, Yamada H, Imai H, Inagaki N, Adachi T. Cobalt chloride decreases EC-SOD expression through intracellular ROS generation and p38-MAPK pathways in COS7 cells. *Free Radic. Res.*, **42**: 949-956, 2008.
- [30] Adachi T, Hara H, Yamada H, Yamazaki N, Yamamoto M, Sugiyama

- T, Futenma A, Katagiri Y. Heparin-stimulated expression of extracellular-superoxide dismutase in human fibroblasts. *Atherosclerosis*, **159**: 307-312, 2001.
- [31] Kamiya T, Machiura M, Makino J, Hara H, Hozumi I, Adachi T. Epigenetic regulation of extracellular-superoxide dismutase in human monocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, **61**: 197-205, 2013.
- [32] Zelko IN, Folz RJ. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate trichostatin A-induced and basal expression of extracellular superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.*, **37**: 1256-1271. 2004.
- [33] Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. Transcription factors sp1 and sp3 regulate expression of human extracellular superoxide dismutase in lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **39**: 243-251, 2008.
- [34] Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. CpG methylation attenuates Sp1 and Sp3 binding to the human extracellular superoxide dismutase promoter and regulates its cell-specific expression. *Free Radic. Biol. Med.*, **48**: 895-904, 2010.
- [35] Adachi T, Nakamura M, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K. Quantitative and qualitative changes of extracellular-superoxide dismutase in patients with various disease. *Clin. Chim. Acta.*, **229**: 123-131, 1994.
- [36] Adachi T, Yamazaki N, Tasaki H, Toyokawa T, Yamashita K, Hirano K. Changes in the heparin affinity of extracellular-superoxide dismutase in patients with coronary artery atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**: 1090-1093, 1998.

- [37] Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*, **101**: 2264-2270, 2000.
- [38] Wang XL, Adachi T, Sim AS, Wilcken DE. Plasma extracellular superoxide dismutase levels in an Australian population with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**: 1915-1921, 1998.
- [39] Adachi T, Ohta H, Hayashi K, Hirano K, Marklund SL. The site of nonenzymic glycation of human extracellular-superoxide dismutase in vitro. *Free Radic. Biol. Med.*, **13**: 205-210, 1992.
- [40] Adachi T, Ohta H, Hirano K, Hayashi K, Marklund SL. Non-enzymic glycation of human extracellular superoxide dismutase. *Biochem. J.*, **279**: 263-267, 1991.
- [41] Izuta H, Chikaraishi Y, Adachi T, Shimazawa M, Sugiyama T, Ikeda T, Hara H. Extracellular SOD and VEGF are increased in vitreous bodies from proliferative diabetic retinopathy patients. *Mol. Vis.*, **15**: 2663-2672, 2009.
- [42] Okerson T, Chilton RJ. The cardiovascular effects of GLP-1 receptor agonists. *Cardiovasc. Ther.*, **30**: e146-e155, 2012.
- [43] Li Y, Tweedie D, Mattson MP, Holloway HW, Greig NH. Enhancing the GLP-1 receptor signaling pathway leads to proliferation and neuroprotection in human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.*, **113**:

- 1621-1631, 2010.
- [44] Abu-Hamdah R, Rabiee A, Meneilly GS, Shannon RP, Andersen DK, Elahi D. Clinical review: The extrapancreatic effects of glucagon-like peptide-1 and related peptides. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**: 1843-1852, 2009.
- [45] Oshitari T, Hata N, Yamamoto S. Endoplasmic reticulum stress and diabetic retinopathy. *Vasc. Health Risk Manag.*, **4**: 115-122, 2008.
- [46] Li J, Wang JJ, Yu Q, Wang M, Zhang SX. Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *FEBS Lett.*, **583**: 1521-1527, 2009.
- [47] Li J, Wang JJ, Zhang SX. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress mitigates retinal endothelial inflammation via activation of X-box binding protein 1. *J. Biol. Chem.*, **286**: 4912-4921, 2011.
- [48] Cominacini L, Mozzini C, Garbin U, Pasini A, Stranieri C, Solani E, Vallerio P, Tinelli IA, Fratta Pasini A. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, **88**: 233-242, 2015.
- [49] Pan C, Giraldo GS, Prentice H, Wu JY. Taurine protection of PC12 cells against endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress. *J. Biomed. Sci.*, **17**: S17, 2010.
- [50] Pereira C, Ferreira C, Carvalho C, Oliveira C. Contribution of plasma membrane and endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases to the synaptosomal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase during oxidative stress. *Brain Res.*,

713: 269-277, 1996.

- [51] Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JJ, Ushio Y, Mori M. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ.*, **11**: 403-415, 2004.
- [52] Kong B, Cheng T, Wu W, Regel I, Raulefs S, Friess H, Erkan M, Esposito I, Kleeff J, Michalski CW. Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*, **6**: 32154-32160, 2015.
- [53] Liao Y, Fung TS, Huang M, Fang SG, Zhong Y, Liu DX. Upregulation of CHOP/GADD153 during coronavirus infectious bronchitis virus infection modulates apoptosis by restricting activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Virol.*, **87**: 8124-8134, 2013.
- [54] Nadanaka S, Yoshida H, Mori K. Reduction of disulfide bridges in the lumenal domain of ATF6 in response to glucose starvation. *Cell Struct. Funct.*, **31**: 127-134, 2006.
- [55] Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword?. *Antioxid. Redox Signal*, **9**: 2277-2293, 2007.
- [56] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, **140**: 900-917, 2010.
- [57] Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the



- membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol. Cell Biol.*, **26**: 3071-3084, 2006.
- [58] Pereira ER, Frudd K, Awad W, Hendershot LM. Endoplasmic reticulum (ER) stress and hypoxia response pathways interact to potentiate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) transcriptional activity on targets like vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Biol. Chem.*, **289**: 3352-3364, 2014.
- [59] 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. *J. Pathol.*, **212**: 429-439, 2007.
- [60] Jiang Y, Thakran S, Bheemreddy R, Ye EA, He H, Walker RJ, Steinle JJ. Pioglitazone normalizes insulin signaling in the diabetic rat retina through reduction in tumor necrosis factor  $\alpha$  and suppressor of cytokine signaling 3. *J. Biol. Chem.*, **289**: 26395-26405, 2014.
- [61] Metea MR, Newman EA. Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina. *Exp. Physiol.*, **92**: 635-640, 2007.
- [62] Leal EC, Martins J, Voabil P, Liberal J, Chiavaroli C, Bauer J, Cunha-Vaz J, Ambrósio AF. Calcium dobesilate inhibits the alterations in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes. *Diabetes*, **59**: 2637-2645, 2010.
- [63] Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Blood-retinal barrier in hypoxic

- ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog. Retin. Eye Res.*, **27**: 622-647, 2008.
- [64] Kuwabara T, Cogan DG. Retinal vascular patterns **IV**. Mural cells of the retinal capillaries. *Arch. Ophthalmol.*, **69**: 492-502, 1963.
- [65] Yang H, Liu R, Cui Z, Chen ZQ, Yan S, Pei H, Li B. Functional characterization of 58-kilodalton inhibitor of protein kinase in protecting against diabetic retinopathy via the endoplasmic reticulum stress pathway. *Mol. Vis.*, **17**: 78-84, 2011.
- [66] Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci.*, **26**: 504-510, 2001.
- [67] Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**: 1337-1345, 1999.
- [68] Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IM, Gaillard PJ, Van Noorden CJ, Schlingemann RO, Klaassen I. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Exp. Eye Res.*, **96**: 181-190, 2012.
- [69] Özczn U, Yilmaz E, Özczn L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Görqün CZ, Hotamisliqil GS. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, **313**: 1137-1140, 2006.
- [70] Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol. Pharmacol.*, **74**: 1610-1619, 2008.
- [71] Marklund SL. Regulation by cytokines of extracellular superoxide

- dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **267**: 6696-6701, 1992.
- [72] Strålin P, Marklund SL. Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **151**: 433-441, 2000.
- [73] Strålin P, Marklund SL. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **281**: H1621-H1629, 2001.
- [74] Kamiya T, Hara H, Inagaki N, Adachi T. The effect of hypoxia mimetic cobalt chloride on the expression of EC-SOD in 3T3-L1 adipocytes. *Redox Rep.*, **15**: 131-137, 2010.
- [75] Strålin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **15**: 2032-2036, 1995.
- [76] Heistad DD. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **26**: 689-695, 2006.
- [77] Li B, Wang HS, Li GG, Zhao MJ, Zhao MH. The role of endoplasmic reticulum stress in the early stage of diabetic retinopathy. *Acta Diabetol.*, **48**: 101-111, 2009.
- [78] Sander B, Larsen M, Engler C, Strøm C, Moldow B, Larsen N, Lund-Andersen H. Diabetic macular oedema: a comparison of vitreous fluorometry, angiography, and retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.*, **86**: 316-320, 2002.

- [79] Sander B, Thornit DN, Colmorn L, Strøm C, Girach A, Hubbard LD, Lund-Andersen H, Larsen M. Progression of diabetic macular edema: correlation with blood-retinal barrier permeability, retinal thickness, and retinal vessel diameter. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**: 3983-3987, 2007.
- [80] Li J, Wang JJ, Chen D, Mott R, Yu Q, Ma J, Zhang SX. Systemic administration of HMG CoA reductase inhibitor protects the blood-retinal barrier and ameliorates retinal inflammation in type 2 diabetes. *Exp. Eye Res.*, **89**: 71-78, 2009.
- [81] 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. *Am. J. Pathol.*, **170**: 1389-1397, 2007.
- [82] Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/ neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.*, **57**: 173-185, 2005.
- [83] Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke J-D, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occudin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell*, **11**: 4131-4142, 2000.
- [84] Klaassen I, Hughes JM, Vogels IM, Schalkwijk CG, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Exp. Eye Res.*, **89**: 4-15, 2009.
- [85] Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated

- disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**: 1977-1982, 2009.
- [86] Jin S, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Horiuchi H, Cheng Y, Wang Y, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Interleukin-34 restores blood-brain barrier integrity by upregulating tight junction proteins in endothelial cells. *PLoS One*, **9**: e115981, 2014.
- [87] Harama D, Koyama K, Mukai M, Shimokawa N, Miyata M, Nakamura Y, Ohnuma Y, Ogawa H, Matsuoka S, Paton AW, Paton JC, Kitamura M, Nakao A. A subcytotoxic dose of subtilase cytotoxin prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory responses, depending on its capacity to induce the unfolded protein response. *J. Immunol.*, **183**: 1368-1374, 2009.
- [88] Park SH, Choi HJ, Yang H, Do KH, Kim J, Lee DW, Moon Y. Endoplasmic reticulum stress-activated C/EBP homologous protein enhances nuclear factor-kappaB signals via repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.*, **285**: 35330-35339, 2010.
- [89] Chandrakesan P, Ahmed I, Anwar T, Wang Y, Sarkar S, Singh P, Peleg S, Umar S. Novel changes in NF- $\kappa$ B activity during progression and regression phases of hyperplasia: role of MEK, ERK, and p38. *J. Biol. Chem.*, **285**: 33485-33498, 2010.
- [90] Hung JH, Su IJ, Lei HY, Wang HC, Lin WC, Chang WT, Huang W, Chang WC, Chang YS, Chen CC, Lai MD. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through

- activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **279**: 46384-46392, 2004.
- [91] El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am. J. Pathol.*, **168**: 235-244, 2006.
- [92] De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- $\kappa$ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.*, **24**: 488-522, 2003.
- [93] Clark AR, Martins JR, Tchen CR. Role of dual specificity phosphatases in biological responses to glucocorticoids. *J. Biol. Chem.*, **283**: 25765-25769, 2008.
- [94] Burek M, Förster CY. Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **298**: 19–24, 2009.
- [95] Avelaira CA, Lin CM, Abcouwer SF, Ambrosio AF, Antonetti DA. TNF- $\alpha$  signals through PKC $\zeta$ /NF- $\kappa$ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes*, **59**: 2872-2882, 2010.
- [96] Xing J, Birukova AA. ANP attenuates inflammatory signaling and Rho pathway of lung endothelial permeability induced by LPS and TNF $\alpha$ . *Microvasc. Res.*, **79**: 56-62, 2010.
- [97] Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr.*

- Rev.*, **29**: 317-333, 2008.
- [98] Werstuck GH, Khan MI, Femia G, Kim AJ, Tedesco V, Trigatti B, Shi Y. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum dysfunction is associated with accelerated atherosclerosis in a hyperglycemic mouse model. *Diabetes*, **55**: 93-101, 2006.
- [99] Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.*, **32**: 200-219, 2008.
- [100] Kern TS. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp. Diabetes Res.*, ID95103, 2007.
- [101] Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.*, **286**: 31263-31271, 2011.
- [102] Al-Sadi R, Ye D, Said HM, Ma TY. IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF-kappaB pathway. *Am. J. Pathol.*, **177**: 2310-2322, 2010.
- [103] de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, **279**: 17070-17078, 2004.
- [104] Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox Signal*, **8**: 691-728, 2006.

- [105] Sibenaller ZA, Welsh JL, Du C, Witmer JR, Schrock HE, Du J, Buettner GR, Goswami PC, Cieslak JA III, Cullen JJ. Extracellular superoxide dismutase suppresses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in pancreatic cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, **69**: 357-366, 2014.
- [106] Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, **625**: 131-142, 2009
- [107] Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, **447**: 425-432, 2007.
- [108] Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.*, **583**: 1713-1720, 2009.
- [109] Chatterjee R, Vinson C. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1819**: 763-770, 2012.
- [110] Pellacani D, Kestoras D, Droop AP, Frame FM, Berry PA, Lawrence MG, Stower MJ, Simms MS, Mann VM, Collins AT, Risbridger GP, Maitland NJ. DNA hypermethylation in prostate cancer is a consequence of aberrant epithelial differentiation and hyperproliferation. *Cell Death Differ.*, **21**: 761-773, 2014.
- [111] Chen T, Li E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferase. *Curr. Top Dev. Biol.*, **60**: 55-89, 2004.
- [112] Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat. Rev. Genet.*, **10**: 805-811, 2009.
- [113] Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*, **128**: 669-681, 2007.



- [114] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, **358**: 1148-1159, 2008.
- [115] Bhavsar S, Mudaliar S, Cherrington A. Evolution of exenatide as a diabetes therapeutic. *Curr. Diabetes Rev.*, **9**: 161-193, 2013.
- [116] Buse JB, Henry RR, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. Exenatide-113 Clinical Study Group. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **27**: 2628-2635, 2004.
- [117] Thorens B, Porret A, Bühler L, Deng SP, Morel P, Widmann C. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes*, **42**: 1678-1682, 1993.
- [118] Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefler J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*, **117**: 2340-2350, 2008.
- [119] Pinney SE, Jaeckle Santos LJ, Han Y, Stoffers DA, Simmons RA. Exendin-4 increases histone acetylase activity and reverses epigenetic modifications that silence Pdx1 in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetologia*, **54**: 2606-2614, 2011.
- [120] Kim SJ, Nian C, McIntosh CH. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 modulate beta-cell chromatin structure. *J. Biol. Chem.*, **284**: 12896-12904, 2009.

略語表

ADL	activities of daily living
AGEs	advanced glycation end-products
ATF6	activating transcription factor 6
ATP	adenosine triphosphate
BBB	blood-brain barrier
BRB	blood-retina barrier
BSA	bovine serum albumin
CHOP	C/EBP homologous protein
Cu,Zn-SOD	copper and zinc containing-SOD
Dex	dexamethasone
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNMTs	DNA methyltransferases
DPP-4	dipeptidyl peptidase 4
DTT	dithiothreitol
ECGF	endothelial cell growth factor
EC-SOD	extracellular-SOD
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factors

GLP-1	glucagon like peptide-1
GR	glucocorticoid receptor
GRE	glucocorticoid responsive element
HAT	histone acetyltransferase
HDAC	histone deacetylase
HREC	human retina endothelial cell
I $\kappa$ B	inhibitory protein kappa B
IRE1	inositol requiring enzyme 1
JAM	junctional adhesion molecule
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mn-SOD	manganese containing-SOD
MSP	methylation-specific PCR
NaF	sodium fluoride
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	sodium orthovanadate
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NO	nitric oxide
NOX	NAD(P)H oxidase
PBA	4-phenylbutyric acid
PBS	phosphate buffered saline
PDC	pyrrolidinedithiocarbamate
PDGF	platelet-derived growth factor
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase

PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
ROS	reactive oxygen species
SAM	S-adenosylmethionine
SDS	sodium dodecylsulphate
SOD	superoxide dismutase
TEER	transendothelial electrical resistance
Tg	thapsigargin
Tm	tunicamycin
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TSA	trichostatin A
UPR	unfolded protein response
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZO	zonula occludens