

“すきま”の細胞生物学

—細胞間接着装置タイト結合とヒト疾患—

澤田典均, 小島 隆, 飛岡弘敏,
小海康夫, 千葉英樹

札幌医科大学医学部病理学第二講座

“Barrierology” : Tight Junctions and Human Diseases

Norimasa SAWADA, Takashi KOJIMA, Hirotoshi TOBIOKA,
Yasuo KOKAI, Hideki CHIBA

Second Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine

ABSTRACT

Tight junctions are intercellular junctions adjacent to the lateral end of the apical membrane. They have two functions: the barrier (or gate) function and the fence function. The barrier function of tight junctions regulates the passage of ions, water, and various macromolecules, even of cancer cells, through paracellular spaces. The barrier function is thus relevant to edema, jaundice, diarrhea and blood-borne metastasis. The blood-brain barrier exclusively depends on this function of tight junctions of endothelial cells. On the other hand, the fence function maintains cell polarity. In other words, tight junctions work as a fence to prevent intermixing of molecules in the apical membrane with those in the lateral membranes. This function is deeply involved in cancer cell biology, in terms of loss of cell polarity. We have been trying to expand our understanding of molecular regulation of tight junctions to human diseases. In this review, we introduce three projects currently ongoing; studies on tight junctions of hepatocytes deeply related to jaundice, tight junctions of endothelial cells crucial for the blood-brain barrier, and the formation and regulation of tight junctions during establishment of cell polarity.

(Accepted February 25, 2003)

Key words: Tight junction, Barrier function, Gap junction, Transcriptional factor, Hepatocyte, Endothelial cell, F9 cell, Blood-brain barrier

1 タイト結合の構造と機能

タイト結合とは、細胞間接着装置のひとつで、側壁基底 (baso-lateral) 細胞膜のもっとも細胞頂部 (apical) に存在している¹⁾。透過型電子顕微鏡では、隣接する細胞の細胞膜が融合しているように見えることから、密着結合 (occludens junction) とも呼ばれている。そのため物質は、この部分を通過できない (図1)。形態学的にタイト結合が細胞と細胞の隙間 (paracellular pathway) の物質の通過を制御していることがわかる。フリーズフラクチャーレプリカ法で観察すると、タイト結合は、膜内粒子の連続した配列からなるストランドの集合であり (図2A)、ストランドの数は、タイト結合の機能と関係が深い。1998年、この膜内粒子の正体が claudin であることがあきらかになった。

タイト結合は、二つの機能を担っている (図2B)。一つは、細胞膜を区域化し、それを維持することである。この機能は、フェンス機能 (fence function) と呼ばれている。この機能により、細胞膜は大きく細胞頂部 (apical) 細胞膜と側壁基底 (baso-lateral) 細胞膜が分けられており、それぞれの細胞膜に固有の蛋白や脂質の成分は交じり合わない。言い換えれば、細胞の極性を維持する機能である。形態学的に、がん細胞が細胞極性を失い脱分化するのは、タイト結合の形成が低下するためと考えられている²⁾。

もう一つの機能は、細胞と細胞の間 (paracellular pathway) を物質が自由に通過出来ないように、細胞間をシールする機能で、バリア機能 (barrier function) と呼ばれている。たとえば、消化管腔の内外を隔絶する、循環系から胆汁排泄路を隔絶する、血管の内外を分けているのが、上

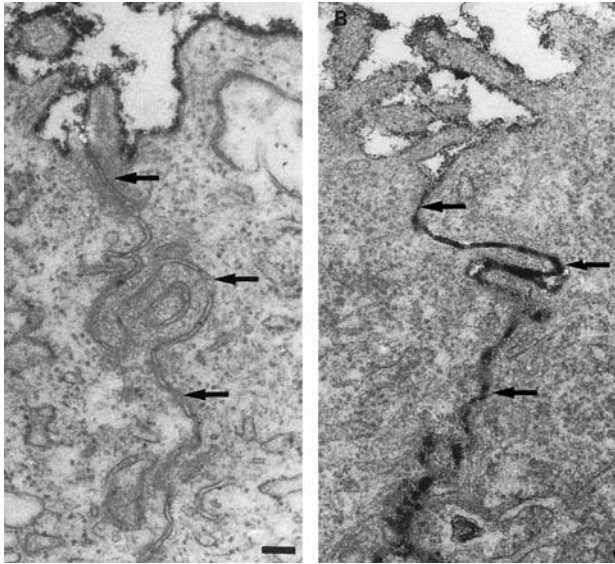


図1 MDCK細胞におけるタイト結合。

A：通常培養，B：ATP枯渇状態，bar：100 nm。
矢印は，細胞間隙（paracellular space）を示す。
細胞内ATPが減少すると，タイト結合機能が低下し，コロイドランタン（黒色の物質）が細胞間隙に侵入する。

皮細胞や内皮細胞間に存在するタイト結合である。したがって下痢症，黄疸，浮腫などは，それぞれ消化管上皮，肝細胞，血管内皮のタイト結合機能の異常といえることができる。2002年には，体の表面を覆う扁平上皮にもタイト結合が存在し，体外への水分の漏出を防いでいることが示され，外界から生体を隔離する重要な装置であることが明らかになった。血液脳関門（blood-brain-barrier: BBB）の本体は，血管内皮細胞に存在するよく発達したタイト結合であり，細胞間隙の物質の通過を厳しく制限して脳内のホメオスタシスの維持に深く関与している。バリア機能は，アクチン細胞骨格³⁾とATP（図1）に依存しており，フィルター上に培養した細胞層の電気抵抗（trans-epithelial electrical resistance）やトレーサの透過性を調べることで，簡便に測定できる。

1999年には，家族性低マグネシウム血症がタイト結合蛋白 claudin-16の変異によることが明らかになり，タイト結合が，分子ふるいのような単純な装置ではなく，選択的に物質の通過を制御していることが明らかになってきた。

2 タイト結合構成蛋白

タイト結合蛋白は，大きく膜貫通蛋白と細胞質蛋白に分けられる（詳しくは総説1参照のこと）。膜蛋白は，さらに3種類に分けられる。ひとつは，1998年に発見された分子量約23kDaの claudin family であり，ストランドを形成できるのは，claudinのみである。Claudinは，膜貫通ドメインを4個もち，二つの細胞外ループを有する。Claudinは，

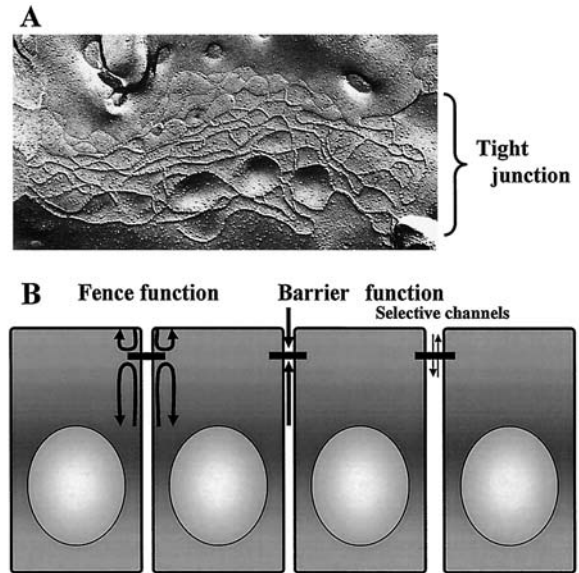


図2 タイト結合の形態と機能。

A：freeze-fracture replica 法によって，小粒子の集合からなるひも状構造物（strand）として観察できる。
B：fence 機能：細胞膜の蛋白や脂質はタイト結合によって自由な拡散が制限されている。
Barrier 機能：細胞間隙の物質の通過を制限し，一部選択的透過も行っている。

少なくとも20種以上の遺伝子ファミリーを形成しており，各々単独でストランドを形成することができる。1個の細胞に複数種の claudin が発現しており，細胞や臓器の特異性に関与していると考えられている。たとえば，claudin-11は，オリゴデンドロサイトやセルトリ細胞にある特殊なタイト結合を形成している。Claudin-14は内耳の外有毛細胞に，claudin-16/paracellin-1は腎のHenle上行脚に発現し，それらの遺伝子の変異は，それぞれ遺伝性難聴，遺伝性低マグネシウム血症を引き起こす。また claudin-2, -4, -14は，タイト結合に組み込まれたチャンネルを形成していると考えられている。ほかの2種の膜貫通蛋白は，occludinとJAM（junctional adhesion molecule）であり，occludinは1993年に発見された分子量約65kDaの蛋白で，タイト結合にもっとも普遍的に存在する蛋白である。JAMはイムノグロブリンスーパーファミリーに属し，3種の遺伝子ファミリーからなる。細胞質蛋白は，PDZドメインを含むものと含まないものの2つに大きく分けられる。前者には，ZO-1, -2, -3, par-3, -6, MAGI-1, -2, -3などがあり，とくにZO-1は膜タンパクを固定する足場蛋白と考えられている。後者には，cingulin, heteromeric G proteins, aPKC, rab-3b, -13, PTENなどが含まれる。このような種々の蛋白の集合体がタイト結合であるが，いかにして形成されるかは，いまだ十分に解明されていない。

この小論では，以下にわれわれが研究を行っているテーマ，「肝細胞のタイト結合」，「血管内皮細胞のタイト結合」および「タイト結合形成の分子機構」について紹介する。

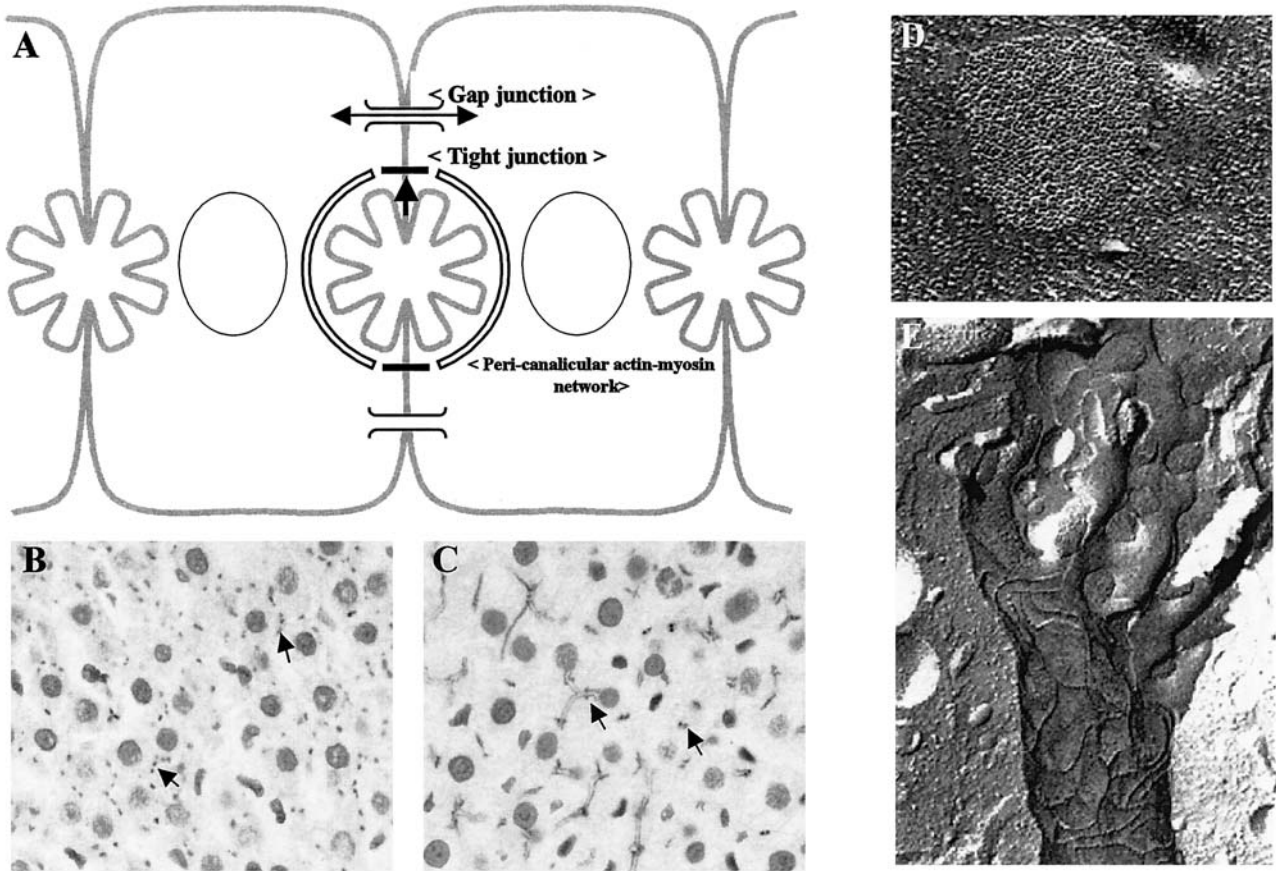


図3 正常肝細胞のギャップ結合とタイト結合。

- A : 正常肝細胞の細胞間接着装置。
- B, C : 正常肝組織のパラフィン切片を用いたCx32 (B, 矢印) 及び claudin-1 (C, 矢印) の免疫染色像。
- D, E : 正常肝組織の凍結断面法によるギャップ結合プラーク (D) 及びタイト結合ストランド (E) のレプリカ像。

3 肝細胞のタイト結合の発現とギャップ結合の深い関係

肝炎、肝障害、肝癌など様々な肝疾患では、肝細胞の細胞間接着装置 (図3A) に著しい変化が認められる⁴⁻⁷。とくに感染症や消化管手術後に続発し患者の予後を左右する黄疸の発生の原因に、肝細胞の細胞間接着装置の機能低下が関与している^{6,7}。細胞間接着装置の一つは細胞間コミュニケーションを行うギャップ結合で、そのコミュニケーション阻害剤の実験より胆汁分泌及び毛細胆管運動に密接に関与していると考えられている (図3B, 3D)。もう一つは、肝細胞の毛細胆管をシールしているタイト結合である (図3C, 3E)。タイト結合が生体にとって有毒な胆汁が胆道から大循環に漏出し黄疸が発症するのを防いでいることから、この仕組みを血液胆汁関門 (blood-biliary barrier) と呼ぶことを提唱している⁹。しかしタイト結合を構成する蛋白が長い間不明であったため、現在未だ黄疸の発生に関与する詳細なメカニズムは明らかではない。ここでは、我々がこれまで行ってきた初代培養肝細胞及び肝細胞株を用いた肝細胞のギャップ及びタイト結合の発現調節機構について述べる。

3・1 初代培養肝細胞におけるギャップおよびタイト結合蛋白

肝細胞には、ギャップ結合蛋白としてCx32 およびCx26、タイト結合関連の膜蛋白としてoccludin および claudin-1, -2, -3 が各々膜上に発現している⁹。それらのタイト結合の膜蛋白は、他の細胞と同様タイト結合関連蛋白 (ZO-1, ZO-2, ZO-3 など) を介してサイトスケルトンであるアクチンと連結している⁹。我々は、分化誘導剤である2% dimethylsulfoxide (DMSO) および生理的濃度のグルカゴン ($10^{-7}M$) を処置し、ギャップおよびタイト結合を再構成している初代培養ラット肝細胞を用いて⁸⁻¹⁰、ギャップおよびタイト結合蛋白の相互発現を詳細に検索した¹¹。この初代培養ラット肝細胞では、ギャップ結合蛋白 (Cx32 および Cx26)、タイト結合の膜蛋白 (occludin および claudin-1) およびタイト結合関連蛋白 (ZO-1, ZO-2) が各々細胞接着部に高発現し、超微構造上よく発達したタイト結合構造物内にもギャップ結合構造物もみられた。二重免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で詳細に観察した結果、Cx32は、lateral 膜の basal 側では粗大な dot 状に観察され、apical 側では line 状に認められた。さらに apical 側の

Cx32は、タイト結合蛋白 (occludin, claudin-1, ZO-1, ZO-2) と分布が一致していた。免疫沈降法で検索したところ、このCx32はタイト結合蛋白と結合している可能性が示された。

3・2 培養肝細胞におけるギャップ結合蛋白 (Cx32) によるタイト結合の誘導

上述した初代培養ラット肝細胞を用いた結果より、ギャップ結合蛋白であるCx32がタイト結合蛋白と非常に密接な関係にあると考えられ、そこでその仮説を証明するため、Cx32を欠き細胞間コミュニケーションを消失している2種類のマウス肝細胞株 (CHST8: C3Hマウスの肝細胞をSV40で不死化した細胞, Cx32 KOH: Cx32ノックアウトマウスの肝細胞を継代中に不死化した細胞) に、ヒトCx32を遺伝子導入して、タイト結合蛋白の発現の変化を検索した^{12, 13)}。CHST8にCx32遺伝子導入したCx32高発現細胞では、occludin, claudin-1, -2の発現の増加し、タイト結合ストランドの増加およびタイト結合内にギャップ結合構造物がみられた。Cx32 KOHにCx32遺伝子導入したCx32高発現細胞では、occludin, claudin-1, ZO-1の発現の増加、タイト結合のフェンスおよびバリア機能の亢進がみられた。さらにcircumferential actin形成の増強も認められた。この遺伝子導入細胞のoccludinおよびclaudin-1の発現は、ギャップ結合を介したコミュニケーション能を阻害する薬剤、18 β -glycyrrhetic acidで抑制がみられた。しかし、ほかのギャップ結合蛋白であるCx26やCx43の遺伝子を導入しても、タイト結合蛋白の発現に影響がなかった。以上の結果は、ギャップ結合蛋白であるCx32の発現およびそのコミュニケーション能が肝細胞のタイト結合を誘導する可能性を示している。

3・3 増殖因子及び炎症性サイトカインによる肝細胞のギャップ結合及びタイト結合の変化

肝内胆汁うっ滞或いは肝炎により生産される増殖因子及びサイトカインは、肝細胞のギャップ結合及びタイト結合に対して様々な影響を与えていると考えられているが、シグナル伝達経路も含めて詳細な調節機構については全く不明である。そこでわれわれは、初代培養ラット肝細胞¹⁴⁾に増殖因子 (EGF, TGF- β) 及び炎症性サイトカイン (IL-1 β) を処置しギャップ結合及びタイト結合蛋白の変化について調べた。すると、Cx32, claudin-1, claudin-2の発現は、それぞれ微妙に異なることが明らかとなり、それらの発現調節は、複雑なシグナル伝達経路を介していることが分かった (Kojima T, et al. unpublished observation)。

肝臓においては、claudin-1が小葉の全肝細胞に発現がみられるのに対して、claudin-2は小葉中心の肝細胞に強く発現がみられる。この小葉内分布の違いは、ラットだけでなくマウスにもみられ (Kojima T, et al. unpublished observation)、ヒトでもみられる可能性が高い。そこで我々は、

この肝細胞のclaudin-2が選択的にイオンを通過させる機能をもつclaudinと仮説を立て、浸透圧により毛細胆管内の胆汁量の調節をし、先に述べたギャップ結合とともに、胆汁を速やかに小葉中心から辺縁に流すのに積極的に働いているのではないかと考えている。

今後、肝細胞のギャップ結合とタイト結合の直接的関係及びclaudin-2の発現調節機構をシグナル伝達機構も含めて解析し、胆汁分泌および黄疸の発生のメカニズムに迫っていきたい。

4 血液組織関門の制御機構と再構築

血管内皮細胞のタイト結合は血液組織関門の本体であり、その破綻は脳浮腫、肺浮腫や不妊、癌細胞の血管外脱出等さまざまな病態を引き起こす。近年多くのタイト結合構成分子が同定され、血管内皮細胞には膜貫通分子claudin-1, claudin-5, occludinや、膜裏打ち分子ZO-1, ZO-2が発現することが明らかになっている。しかし、血液組織関門の形成や制御の分子機構は未だ不明である。ここでは、ブタ大脳皮質毛細血管内皮細胞とラット肺血管内皮細胞株を用いた、我々の研究成果について紹介する。

4・1 血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の制御機構

BBBの制御機構を解明するため、我々はまず、ブタ大脳皮質毛細血管内皮細胞の分離培養法を確立した^{15, 16)}。この細胞は少なくとも6種類のタイト結合蛋白を発現し、かつ比較的高いバリア機能を有することから、BBBの*in vitro*モデルとして有用と考えられた。BBB血管内皮細胞は、生体内でグリア細胞に取り囲まれており、グリア細胞を培養した培地には血管内皮細胞のバリア機能を上昇させる物質が含まれていることが知られていた。我々は、グリア細胞から分泌される神経栄養因子 (GDNF) が神経細胞の生存を維持するだけでなく、BBB血管内皮細胞のバリア機能を亢進させること、BBB血管内皮細胞がGDNF受容体 (GFR- α 1) を発現し、その発現量がBBBの成熟に伴って増加することを明らかにした^{15, 16)}。またGDNFは、血液網膜関門、血液精巣関門の制御にも関わる可能性を示した^{17, 18)}。さらに我々はこの培養系を用いて、血管内皮のバリア機能を上昇させることが知られているcAMPが、claudin-5を主たる標的分子として、そのリン酸化と発現を各々protein kinase A (PKA) 依存性、非依存性に誘導することを明らかにした (Ishizaki T, et al. unpublished observation)。

4・2 肺血管内皮細胞株を用いた血液組織関門の再構築と制御の分子メカニズム

ラット肺血管内皮 (RLE) 細胞株は、occludinやclaudin-1, claudin-5の発現や、タイト結合の超微構造と機能をほとんど欠如している。我々は、本細胞株にreverse tetracycline-controlled trans-activator (rtTA)

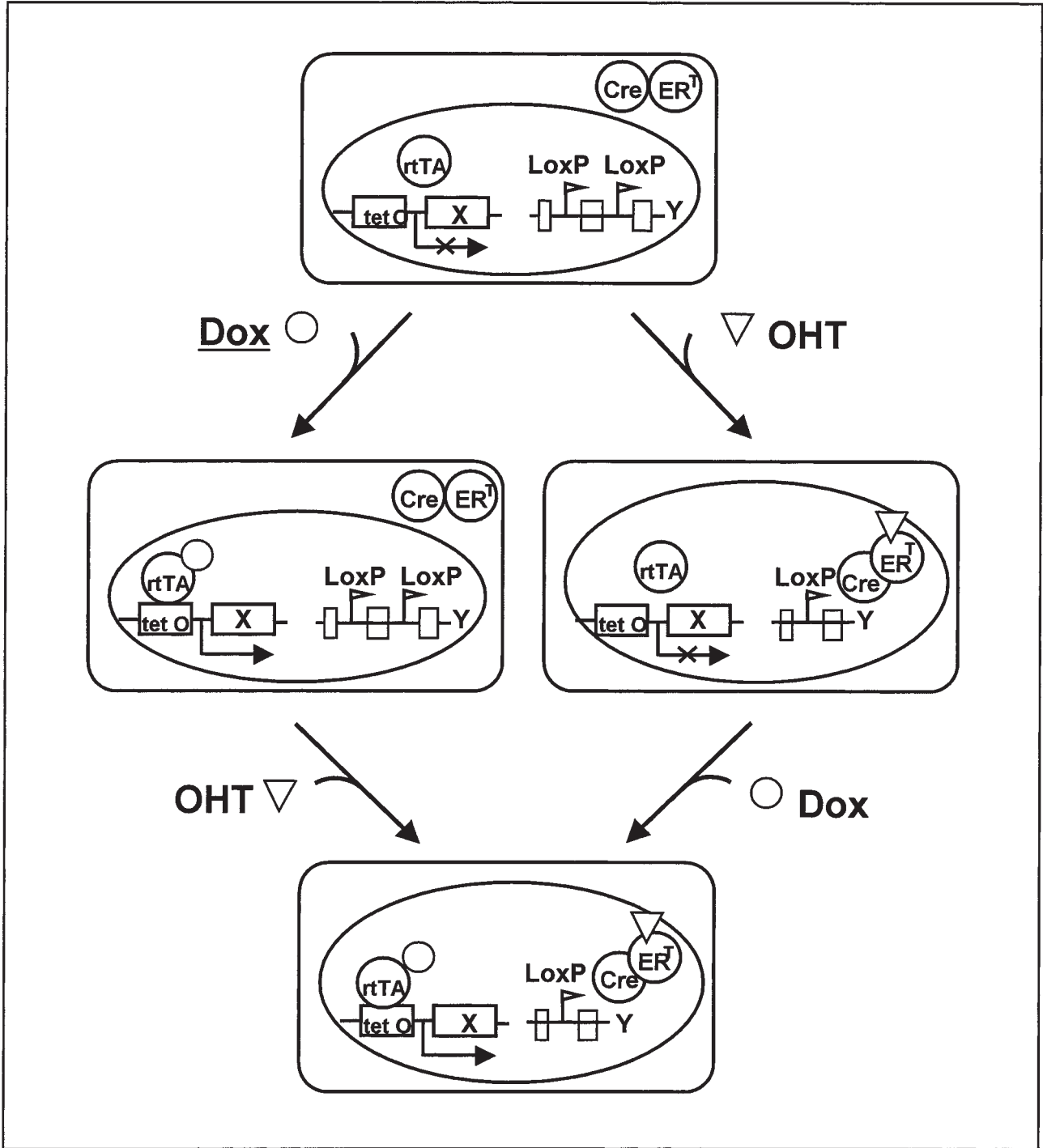


図4 遺伝子改変マウス胚トーマF9細胞を用いたコンディショナルシステム。

本細胞株は、rtTAとCre-ER^Tを恒常発現している。ドキシサイクリン(Dox)の投与によって、tetオペレーター(tetO)の下流の外来遺伝子Xの発現が時間的・量的に制御される。一方、ヒドロキシタモキシフェン(OHT)の投与によって、Cre-ERTが活性化され、loxPに挟まれた遺伝子Yをほぼ100%の確率でコンディショナルノックアウトできる。またloxPに挟まれた薬剤耐性遺伝子も除かれるため、同じ薬剤耐性遺伝子を用いて多数の遺伝子を導入・ノックアウトすることが可能である。

を恒常発現させ、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン(Dox)処置によって外来遺伝子の発現を時間的・量的に調節できるコンディショナルシステムを確立した¹⁹⁾。そこで更に、claudin-1やclaudin-5の発現を誘導できるRLE細胞株を樹立し、これらの分子の発現誘導に

よって機能的なタイト結合が再構成されることを示した(Fujibe M, et al. unpublished observation)。またclaudin-1のC末細胞内ドメインにMAPキナーゼ(MAPK)のリン酸化候補部位を見出し、MAPKがこの部位のリン酸化を誘導することによって、claudin-1のタ

イト結合へのターゲティングと, タイト結合のバリア機能を亢進させることを明らかにした. さらに, claudin-5 の C 末細胞内ドメインに PKA のリン酸化候補部位を見つけ, PKA がこの部位のスレオニンリン酸化を誘導し, 血管内皮細胞のバリア機能を上昇させることを示した (Chiba H, et al. unpublished observation).

今後これらの系を用いて, 血液組織関門の分子解析をさらに進め, その破綻が原因となる病気に対する新たな予防法・治療法を開発する基盤を確立したい.

5 核内受容体による上皮分化と細胞極性形成の分子機構

上皮細胞層が生体内外の異なる環境を分離し, 生体の恒常性を維持するためには, タイト結合が必要不可欠である. しかし, どのようなシグナル分子によってタイト結合が新生され, 上皮分化と細胞極性が獲得されるかについては長い間不明であった.

マウス F9 細胞株は, レチノイン酸 (RA) 存在下で単層培養, 浮遊培養すると, 各々始原内胚葉 (primitive endoderm; PrE), 臓側内胚葉 (visceral endoderm; VE) に相当する細胞に分化する. PrE, VE 細胞は, いずれもタイト結合を有する上皮様細胞で, 胎児成分を直接覆っている. 我々は, F9 細胞に rtTA とリガンド依存性 Cre リコンビナーゼ Cre-ER^{T20, 21} を恒常発現させ, リガンド処置によって多数の遺伝子の導入, ノックアウトや, 遺伝子発現の厳密な制御が可能なコンディショナルシステムを確立した (F9:rtTA:Cre-ER^T L32T2 細胞株²²) (図4). これを用いて, RA が特異的なレチノイド X 受容体 (RXR) /レチノイン酸受容体 (RAR) 二量体を介して, いくつかのタイト結合分子の発現とタイト結合の新生を誘導することを明らかにした. したがって, F9:rtTA:Cre-ER^T L32T2 細胞は, タイト結合の生合成と上皮分化の分子機構を研究する上で極めて有用なシステムである.

Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α は, リガンドが不明なオーファン受容体として肝臓からクローニングされた核内受容体で, RXR や RAR と同じスーパーファミリーに属する. HNF-4 α は, さまざまな栄養物質の輸送や代謝に関わる遺伝子の発現を転写レベルで制御し, 発生初期にはまず PrE 細胞に, 次いで VE 細胞に発現する. また強制発現系やノックアウトマウスを用いた研究では, HNF-4 α が VE 細胞と肝細胞の分化に関与することが強く示唆されている. 成体では, HNF-4 α は, 肝のみならず, 腎, 小腸, 結腸, 胃, 膵など, 輸送・吸収上皮を有する臓器に発現することが知られている. これらの点に加えて, タイト結合は上皮細胞に必須であることを考え合わせ, 我々は「HNF-4 α が, タイト結合の新生と上皮の細胞極性の形成にとって重要な役割を担う」という仮説を立てた. この仮説を証明するため, F9:rtTA:Cre-ER^T L32T2 細胞を用いて, HNF-4 α の発現を Dox で誘導できる F9 細胞株を樹立し, HNF-4 α

が occludin, claudin-6, claudin-7 の発現や, 機能的タイト結合の形成, 上皮細胞の極性形成を誘導することを明らかにした²³). また HNF-4 α が CDK インヒビター p21^{waf1/cip1} 遺伝子の発現を転写レベルで直接誘導し, 細胞増殖を抑制することを示した (Chiba H, et al. unpublished observation). これらの知見をもとに我々は, HNF-4 α が腸管や肝, 膵においても同様な機能を有し, これらの臓器で発生する腺癌や肝細胞癌の分化度, 増殖性を規定する可能性があると考え, 研究を進めている. また現在, F9:rtTA:Cre-ER^T L32T2 細胞における上皮分化の過程を詳細に検討中であり, HNF-4 α 遺伝子コンディショナルノックアウト F9 細胞株の樹立を試みている.

RAR や HNF-4 α 以外の核内受容体にも, 各種上皮の分化に関わるものがある. 例えばエストロゲン受容体とアンドロゲン受容体は各々, 乳腺上皮と前立腺上皮の分化を誘導し, 乳癌や前立腺癌の病態に深く関与することが知られている. 以上の点を踏まえ, 我々は「上皮に発現しうる各種の核内受容体が, “上皮の共通かつ必須の形質であるタイト結合”の構成分子の転写制御を司り, 上皮分化と細胞極性の形成を誘導する」という仮説を立てている. 今後この仮説を検証するため, タイト結合関連遺伝子のプロモーター解析や, 各種の核内受容体のコンディショナルノックアウトマウス²⁴)を用いた解析を進めていきたい.

謝辞

この研究は, 文部科学省, 厚生労働省, 日本学術振興会, 秋山記念生命科学振興財団, 上原記念生命科学財団, 加藤記念バイオサイエンス研究振興財団, 喫煙科学研究財団, 寿原記念財団, 内藤記念科学振興財団および北海道老年医学研究協会からの研究助成によって行われましたので, ここに深謝いたします.

参考文献

1. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 285-293.
2. 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* 2002; 198: 207-212.
3. Takakuwa R, Kokai Y, Kojima T, Akatsuka T, Tobioka H, Sawada N, Mori M. Uncoupling of gate and fence functions of MDCK cells by the actin depolymerizing reagent mycalolide B. *Exp Cell Res* 2000; 257: 238-244.
4. Kojima T, Sawada N, Zhong Y, Oyamada M, Mori M. Sequential changes of intercellular junctions in hepatocytes during the course of acute liver injury and restoration after thioacetamide treatment. *Virchows Arch* 1994; 425: 407-412.
5. Oyamada M, Sakamoto H, Enomoto K, Oyamada Y, Kojima T, Sawada N, Mori M. Expression of multiple connexins is differentially modulated during multistage

- hepatocarcinogenesis. *Prog Cell Res* 1995; 4: 103-106.
6. Kojima T, Sawada N, Duffy H S, Spray DC. Gap and tight junctions in liver: composition, regulation and function. In : Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA, editors. *The Liver: Biology and Pathobiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.29-46.
 7. 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.
 8. Kojima T, Mitaka T, Shibata Y, Mochizuki Y. Induction and regulation of connexin 26 by glucagon in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J Cell Sci* 1995; 108: 2771-2780.
 9. Kojima T, Mitaka T, Paul D, Mori M, Mochizuki Y. Reappearance and long-term maintenance of connexin 32 in proliferated adult rat hepatocytes: use of serum-free L-15 medium supplemented with EGF and DMSO. *J Cell Sci* 1995; 108: 1347-1357.
 10. Kojima T, Yamamoto M, Tobioka H, Mizuguchi T, Mitaka T, Mochizuki Y. Changes in cellular distribution of connexin 32 and 26 during formation of gap junctions in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1996; 223: 314-326.
 11. Kojima T, Kokai Y, Chiba H, Yamamoto M, Mochizuki Y, Sawada N. Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 2001; 263: 193-201.
 12. Kojima T, Sawada N, Chiba H, Kokai Y, Urban M, Yamamoto M, Lee G.-H., Hertzberg EL, Mochizuki Y, Spray DC. Induction of tight junctions in human connexin32 (hCx32) -transfected mouse hepatocytes: connexin32 interacts with occludin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 222-229.
 13. Kojima T, Spray D C, 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* 2002; 276: 40-51.
 14. Kojima T, Yamamoto M, Mochizuki C, Mitaka T, Sawada N, Mochizuki Y. Different changes in expression and function of connexin 26 and connexin 32 during DNA synthesis and redifferentiation in primary rat hepatocytes using a DMSO culture system. *Hepatology* 1997; 26: 585-597.
 15. Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 108-112.
 16. Utsumi H, Chiba H, Kamimura Y, Osanai M, Igarashi Y, Tobioka H, Mori M, Sawada N. Expression of GFR α 1, receptor for GDNF, in rat brain capillary during post-natal development of the BBB. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C361-C368.
 17. Igarashi Y, Chiba H, Utsumi H, Miyajima H, Ishizaki T, Gotoh T, Kuwahara K, Tobioka H, Satoh M, Mori M, Sawada N. Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats. *Cell Struct Funct* 2000; 25: 237-241.
 18. 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* 2002; 35: 139-145.
 19. Osanai M, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Kuwahara K, Kimura H, Satoh M, Sawada N. Hepatocyte nuclear factor (HNF) -4 α 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* 2002; 93: 532-541.
 20. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6991-6995.
 21. Chiba H, Metzger D, Chambon P. F9 embryonal carcinoma cells engineered for tamoxifen-dependent Cre-mediated site-directed mutagenesis and doxycycline-inducible gene expression. *Exp Cell Res* 2000; 260: 334-339.
 22. Kubota H, Chiba H, Takakuwa Y, Osanai M, Tobioka H, Kohama G, Mori M, Sawada N. Retinoid X receptor α and retinoic acid receptor α mediate expression of genes encoding tight junction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. *Exp Cell Res* 2001; 263: 163-172.
 23. Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M, Sawada N. Hepatocyte nuclear factor (HNF) -4 α triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*. In press 2003.
 24. Li M, Chiba H, Warot X, Massaddeq N, Gerard C, Chambon P, Metzger D. RXR α ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alteration. *Development* 2001; 128: 675-688.
-
- 別刷請求先：
〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目
札幌医科大学医学部病理学第二講座 澤田典均
TEL : 011-611-2111 (内線2700)
FAX : 011-613-5665