

東京大学博士（獣医学）学位論文

腸炎時の消化管運動機能障害における IL-1 $\beta$ の役割

大濱剛

2006年12月

指導教員 尾崎博

# 目次

<b>第1章 緒言</b>	<b>- 4 -</b>
1-1 消化管	- 4 -
1-2 消化管平滑筋収縮機構	- 4 -
1-3 消化管の炎症と腸炎モデル	- 11 -
1-4 腸炎時の運動機能障害のメカニズムに関するこれまでの報告	- 13 -
1-5 腸炎と IL-1	- 14 -
1-6 研究目的	- 15 -
<b>第2章 実験材料および実験方法</b>	<b>- 18 -</b>
2-1 実験材料	- 18 -
2-2 組織培養法	- 18 -
2-3 消化管平滑筋細胞単離培養法	- 18 -
2-4 腸炎モデル動物の作成	- 19 -
2-5 組織学的検討	- 19 -
2-5-1 HE 染色	- 19 -
2-5-2 免疫組織化学染色	- 20 -
2-6 張力測定法	- 22 -
2-6-1 標本および栄養液	- 22 -
2-6-2 張力測定	- 22 -
2-7 MLC/CPI-17/MYPT1 リン酸化量測定法	- 23 -
2-7-1 標本作成およびタンパク質抽出	- 23 -
2-7-2 リン酸化 MLC の検出	- 23 -
2-7-3 リン酸化 CPI-17/MYPT1 の検出	- 24 -
2-8 スキンドファイバー実験法	- 25 -

2-8-1	$\alpha$ -TOXIN 脱膜化標本および溶液	- 25 -
2-8-2	$\alpha$ -TOXIN 脱膜化標本の張力測定	- 25 -
2-8-3	$\beta$ -ESCIN 脱膜化標本の収縮力測定および溶液	- 25 -
2-9	タンパク質発現量測定法	- 26 -
2-9-1	タンパク質抽出	- 26 -
2-9-2	WESTERN BLOTTING 法	- 27 -
2-10	RT-PCR 法	- 27 -
2-10-1	MRNA の抽出	- 27 -
2-10-2	半定量的 RT-PCR	- 28 -
2-11	統計処理	- 29 -

### 第 3 章 実験結果 - 32 -

3-1	IL-1 $\beta$ の平滑筋収縮に対する作用	- 32 -
3-1-1	消化管平滑筋収縮機構	- 32 -
3-1-2	回腸炎の平滑筋層における炎症性サイトカイン産生	- 43 -
3-1-3	消化管平滑筋組織に対する IL-1 $\beta$ の短期作用	- 45 -
3-1-4	回腸平滑筋組織培養法における IL-1 $\beta$ の長期作用	- 49 -
3-1-5	TNBS 誘発回腸炎における CPI-17 発現と運動機能障害	- 60 -
3-1-6	IL-1 $\beta$ は TNF- $\alpha$ を介して CPI-17 発現量を抑制する	- 65 -
3-1-7	慢性腸炎モデルにおける CPI-17 発現抑制と運動機能障害	- 75 -
3-2	IL-1 $\beta$ の平滑筋増殖に対する作用	- 79 -
3-2-1	<i>IN VIVO</i> の腸炎モデルにおける平滑筋細胞の増殖	- 79 -
3-2-2	回腸平滑筋細胞に対する IL-1 $\beta$ の増殖促進作用	- 81 -
3-2-3	回腸平滑筋組織に対する IL-1 $\beta$ の増殖抑制作用	- 83 -

**第4章 考察** **- 91 -**

---

- 4-1 腸炎時の平滑筋収縮力の変化 - 94 -
- 4-2 腸炎時の運動機能障害に対する PGs と NO の関与 - 95 -
- 4-3 腸炎時の消化管収縮力低下のメカニズム - 98 -
- 4-4 収縮メカニズムの現在の理解 - 105 -
- 4-5 MLCP 活性制御機構の不全による運動機能障害 - 109 -
- 4-6 腸炎治療の現状と問題点 - 110 -
- 4-7 組織培養法の有用性 - 115 -
- 4-8 腸炎における種差、部位差 - 116 -
- 4-9 腸炎時の消化管運動機能障害における IL-1 $\beta$ の役割 - 118 -

**第5章 引用文献** **- 120 -**

---

### 第1章 緒言

#### 1-1 消化管

消化管とは口から始まり肛門に終わる管のことであり、食物の運搬、消化、吸収という生命の営みを支える最も根源的な機能を果たす器官である。その構造上、消化管粘膜層は体の外側（外界）と常に接しており、消化管の内側は体内ではなく体外であるといえることができる。この消化管内部には様々な細菌が、ヒトでは400種類以上、総数で約100兆個もの細菌がバランスを保ち常在している。特に小腸から大腸にかけてのこれら腸内細菌叢は、植物が群生する様子、あるいは花畑になぞらえて腸内フローラと呼ばれる。フローラとは古代ローマの「花と豊穡と春の女神」のことである（図1）。消化管はこれら腸内細菌や食物、また様々な異物などの刺激にさらされながら、我々の活動を維持するためのエネルギー摂取という仕事を生命の誕生から死まで休まず続けているのである。

消化管組織は粘膜層と平滑筋層の2層に分けることができる。消化・吸収は粘膜層が、食物運搬は平滑筋層が各々その役割を担っている。消化管の運動はその役割上、他の平滑筋組織に比べ遥かに複雑である。これを制御するため消化管平滑筋層にはその他の末梢神経をすべて合わせたよりも多くの神経細胞が存在し、『第二の脳』と呼ばれるほど精密な制御を受けている(a)。中枢神経系が発達していない原始的な生物でも消化管を保有すること、脳死状態でも消化管は働き消化吸収が行われることから、消化管の独立性と重要性が分かる。

#### 1-2 消化管平滑筋収縮機構

消化管は食物が内部に入ると周期的に環状の収縮を次々と下部へ伝え、食物を肛門へと移動させる蠕動運動を行う。今世紀の初めベイリスとスターリングはこの蠕動運動が平滑筋層の神経ネットワークによって制御されているという

ことを明らかとした。しかしながら、神経系を切断してもなお消化管平滑筋はリズムカルに収縮運動を行う。消化管平滑筋の膜電位は slow wave と呼ばれる周期的な変動を示し、これが自動能と呼ばれるリズムカルな収縮運動につながる。消化管平滑筋層内にはカハールの介在細胞 (ICC) と呼ばれる間質細胞がネットワークを形成しており、この ICC を遺伝的に、もしくは薬剤を用いて欠損させたマウスでは slow wave が消失することから、ICC がこの律動性を制御していると考えられている (91, 157, 286, 306)。最近では一部の ICC は神経細胞と平滑筋細胞の間に介在して、コリン作動性などの神経伝達による収縮を調節する役割も果たすと言われている (ICC の収縮制御に関しては以下の総説を参照のこと (78))。

消化管の収縮を引き起こすアゴニストには、acetylcholine、5-HT、motilin、substance P、PGF<sub>2α</sub>などがあげられる。この中で acetylcholine がもっとも腸管運動の調節に重要であると考えられている。Acetylcholine は副交感神経末端から分泌され、平滑筋細胞の主に M<sub>3</sub> 受容体に結合することで細胞の収縮を引き起こす (104, 241, 312)。ミオシン軽鎖 (MLC) の Ser19 残基の可逆的なリン酸化の調節は、平滑筋細胞の収縮を制御する最も基本的な機構である。消化管平滑筋細胞では acetylcholine 刺激により、ムスカリン受容体から直接的、または筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup>放出や K<sub>ATP</sub> channel の抑制による脱分極依存的に、nonselective cation channel や voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> channel を通した細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入が引き起こされる (71, 72, 98, 212, 213)。ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇により形成される Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン (CaM) 複合体によって活性化され、MLC のリン酸化レベルの上昇を起こす (88, 110)。その結果、ミオシンの ATPase 活性が上昇して、平滑筋の収縮が起こると考えられている。一方、リン酸化された MLC は、ミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) によって脱リン酸化される (図 2)。

MLCP は 38 kDa の触媒サブユニットである PP1cδ、130 kDa の調節サブユニットである MYPT1 (MBS : myosin binding subunit)、および現在のところ機能の不明な 20 kDa の非触媒サブユニットである M20 の3つのサブユニットで構成され

る (5, 101, 255, 256)。PP1cにはPP1c $\alpha_1$ 、PP1c $\alpha_2$ 、PP1c $\gamma_1$ 、PP1c $\gamma_2$ 、PP1c $\delta$ の5つの isoform が存在するが、平滑筋ではPP1c $\delta$ が主要な構成要素であると考えられている (5)。PP1c $\delta$ は直接 MLC に結合せず、MYPT1 を介して基質である MLC と結合しその脱リン酸化を触媒していると考えられている (95, 168, 209)。MYPT1 の N 末端側には PP1c との結合部位とその活性化に関与する部位が存在する (70, 279)。MYPT1 には Thr696 や Ser853 などいくつかのリン酸化サイトが存在する (以下 MYPT1 のリン酸化サイトはすべてヒトの配列に準じて表記する) (表1)。MYPT1 は調節サブユニットとして MLCP の活性を制御するが、これにはこれらリン酸化部位のリン酸化が関与する。これまで Thr696 のリン酸化が MLCP の活性抑制に重要であると考えられてきたが (56, 96)、最近 Thr853 の重要性も示唆され始めた (185, 199, 290, 320)。またアゴニスト刺激後の MLCP 活性の抑制機構には、MYPT1 の他に CPI-17 が重要な役割を果たしている。MYPT1 は主に Rho/ROCKs 系により、CPI-17 は Rho/ROCKs 系 と PKC により活性化される (120, 134, 141, 188)。

Rho は低分子量 G タンパク質の一種であるが、低分子量 G タンパク質とは分子量が 20,000 から 40,000 程度の単量体の GDP/GTP 結合能と GTPase 活性を持った一群のタンパク質を指し、Rho のほかに Ras、Rab、Arf、Sar、Ran などのファミリーに分類される (273)。Rho ファミリーには RhoA、Rac1、Cdc42 など少なくとも 14 のメンバーが存在し、それらは 50%以上の相同性を保持している。このうちミオシンリン酸化収縮機構に関与するのは RhoA である (77)。RhoA は GDP が結合すると不活性型の RhoA-GDP、GTP が結合すると活性型の RhoA-GTP に変化するが、GDP を解離し新たに GTP を結合する交換反応は GEF (GDP-GTP exchange factor) によって触媒される。一方で GTP 結合型から GDP 結合型への変換は GAP (GTPase activating protein) によって促進される。また GDP 結合型 Rho には GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) が結合し、GDP の解離を抑制することにより不活性状態を維持するとともに、GDP 結合型 Rho は細胞膜から遊離する (107)。G タンパク質共役受容体 (GPCR) にアゴニストが結合すると、G $\alpha_{12}$  や G $\alpha_{13}$  によって RhoA が活性化される (135)。活性化された RhoA

はエフェクタータンパク質である ROCKs (Rho-associated kinase) に結合し、これらを活性化する (99)。

ROCK には高い相同性を示す ROCK1 と ROCK2 の 2 種類のアイソフォームが存在し、ROCK1 は脳を除く多くの組織、特に、心臓、肺、骨格筋、腎臓などに強く発現しているのに対して、ROCK2 は脳に強く発現している (190)。活性化した Rho は、ROCK のコイルドコイルドメインの C 末端側にある Rho 結合ドメインに結合することで ROCK の構造変化を起こし、C 末端領域による抑制を解除して ROCK の活性化を引き起こすと考えられている (6, 60)。活性化された ROCK は、MYPT1 の主に Thr696 をリン酸化することによって MLCP の活性を抑制するだけでなく (56, 115, 120)、MLC の Ser19 や Thr18 を直接リン酸化することで MLC のリン酸化レベルを制御する可能性が示唆されている (7, 140)。

アゴニストが受容体に結合することによる 3 量体 G タンパクの活性化は、ジアシルグリセロール (DG) およびイノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) の産生につながるホスファチジルイノシトール (PIP<sub>2</sub>) カスケードの活性化を起こす (18, 217)。IP<sub>3</sub> が筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup>の放出を生じさせ Ca<sup>2+</sup>/CaM 複合体を介した MLCK の活性化を引き起こすのに対して、DG は PKC の活性化を引き起こす。平滑筋において PKC を活性化させるホルボールエステルは強力な収縮作用を示すことが知られていたが (258, 259)、その後の研究により PKC 活性化に伴う収縮は MLCP の阻害に起因することが明らかにされた (162)。Eto らはこの PKC による MLCP 活性抑制を担う因子として CPI-17 (PKC potentiated inhibitory protein of PP1) を明らかとした (52, 53)。PKC は CPI-17 の Thr38 リン酸化を引き起こし、このリン酸化 CPI-17 が MLCP の PP1c $\delta$  と直接結合し活性を阻害する (51, 127, 141)。CPI-17 の発現は平滑筋、血小板、小脳のプルキンエ細胞などに見られ、心筋や骨格筋、多くの非筋組織での発現は少ないことが知られている (50, 53, 308)。

このように平滑筋の収縮機構は Ca<sup>2+</sup>/CaM/MLCK 系による MLCK の活性制御と CPI-17/MYPT1 系による MLCP 活性制御のバランスによる複雑な制御を受けている。





図1 「春—プリマヴェーラ」 ボッティチェリ

右から3番目が花と豊穰と春の女神フローラ。時間軸は右から左へと流れ、青緑色の風の神ゼフィロス（右端）がニンフのクロリス（右から2番目）に求愛したことでクロリスが女神フローラになる様子が描かれているとされている。中央はヴィーナス、その左がヴィーナスの侍従である三美神、左端がメルクリウスとされる。15世紀に描かれた絵画の中でも難解とされ、その解釈には諸説ある。

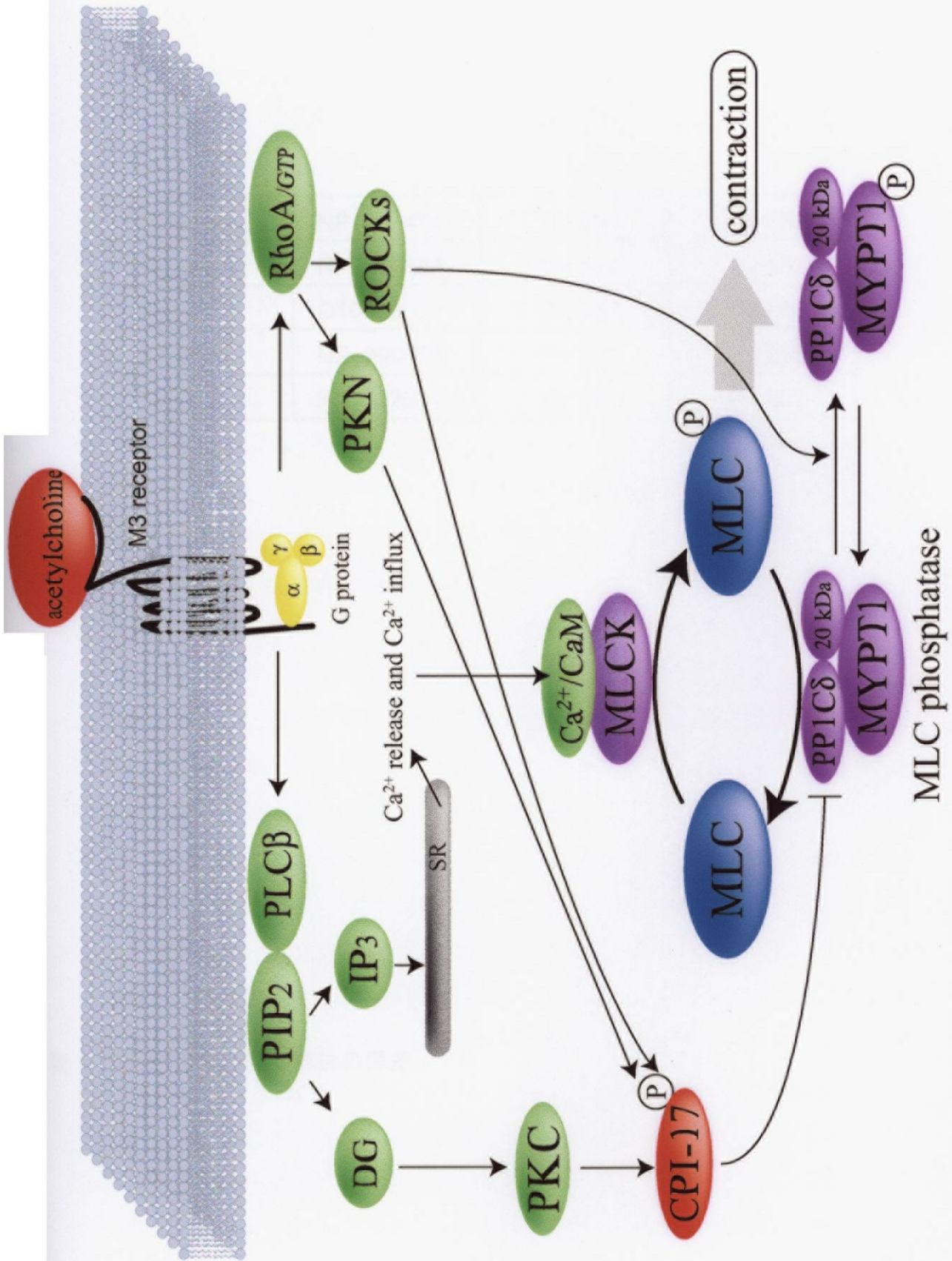


图2 消化管平滑肌收缩结构

Human	NP_002471	Thr 696	Thr 853
Mouse	NP_082168	Thr 694	Thr 852
Rat	Q10728	Thr 697	Thr 855
Chicken	NP_990454	Thr 695	Thr 850
Dog	XP_532634	Thr 695	Thr 852

表1 MYPT1 リン酸化部位の種差

### 1-3 消化管の炎症と腸炎モデル

腹痛や下痢などの症状を伴う軽度の胃炎・腸炎は誰もが経験する身近なものである。一方で深刻な腸炎疾患として、医療の世界では原因不明の慢性炎症であるクローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患（IBD: Inflammatory Bowel Disease）がある。欧米では有病率が 100-200 人に 1 人という一般的な疾患であるが、日本においてはまれな疾患として近年まであまりなじみのないものであった。しかし生活習慣の欧米化に伴い、現在本邦のクローン病患者数は 20 年前の約 3 千人から約 2 万 5 千人に、潰瘍性大腸炎患者数は約 1 万人から約 8 万人へと急激に増加し大きな問題となっている (b)。いずれの疾患も炎症部における活性化 T 細胞、単球・マクロファージなどの集積が確認され、消化管における免疫異常がその病態において重要な役割を果たしている (223, 224)。しかしながらしばしばその免疫反応には違いが観察され、一般的にクローン病は全腸性・全層性に起こりうるのに対して、潰瘍性大腸炎の炎症は大腸に局限し、また粘膜層の炎症が強度で平滑筋層の炎症は弱いことが知られている。またクローン病において認められる上皮細胞やマクロファージでの IL-12、IL-18 発現増強が、潰瘍性大腸炎では認められない (111, 171, 222)。潰瘍性大腸炎では局所の自己免疫反応が関与し、結腸上皮細胞が抗原提示細胞として機能することや細胞傷害性 T 細胞による上皮細胞の傷害の関与が報告されている (75, 194, 326)。

ヒトが経口摂取により生命を維持するのに必要な小腸の長さは、小児では 30cm、成人では 50cm 以上とされている。これよりも短い場合消化吸収が十分ではなく、栄養障害、発育障害を引き起こす原因となる。小腸移植はこのような腸管不全症状を持つ短腸症候群（中腸軸捻転、小腸閉鎖症、壊死性腸炎、腹壁破裂、上腸間膜動静脈血栓症、クローン病、デスモイド腫瘍、腸癒着症など）や機能的不可逆性小腸不全（特発性慢性偽小腸閉塞症、ヒルシュスプルング病など）の患者に適応される (c)。しかし腸管にはリンパ組織が多く存在するため拒絶反応が引き起こされやすく、また腸内細菌による感染症も起こりやすい。さらに移植自体によりグラフトに炎症が引き起こされ、筋層の肥厚や運動機能

障害による腸閉塞を誘発することも問題となる (102, 245, 291)。また小腸移植に限らず開腹を行うような手術の際に問題になるのが、腹腔内の操作 (manipulation) のみによっても平滑筋層において炎症が引き起こされるという事実である (108, 109)。この manipulation による運動機能障害、すなわち術後イレウスはあらゆる開腹手術において問題となるため臨床的に非常に重要である。

他方畜産の世界では、消化器症状を呈するウイルス性および細菌性疾患に加え、多頭飼育に伴うストレスや感染症により発生する消化器障害が問題となっている。ウシのヨーネ病は症状が慢性的に推移することから特に問題となるが、近年その発生頭数が増加しており、1997年以前は年間200頭前後だった国内発生頭数が1997年以降700頭前後と急増し、2004年にはついに1000頭を超えた(d)。3-6年といった長い潜伏期ののちに慢性の下痢による消瘦、乳量の低下といった症状を起こし、日本のみならず世界的にも畜産業に与える打撃は大きい。

以上のような背景から腸炎疾患、特に慢性腸炎のメカニズムを解明することは非常に重要な課題である。これまで腸炎研究では消化管における免疫異常、特に粘膜免疫に着目した研究が精力的に行われてきた。一方でこれら慢性腸炎疾患ではしばしば消化管運動機能障害が観察され (35, 261, 263, 302)、腸内容の滞留などにより腸内フローラの乱れをきたすことで、病態の悪化を引き起こす原因となっている (図3)。近年消化管平滑筋層にも常在型マクロファージや常在型樹状細胞など固有の免疫系の存在が明らかとなってきた (58, 167)。また腸炎時には粘膜層のみならず平滑筋層においてもサイトカインの発現上昇が確認されている (229)。さらに炎症性腸疾患の患者でも粘膜層のみならず平滑筋層においてT細胞の分裂像が確認されている (55)。したがって腸炎においては粘膜層の炎症のみならず平滑筋層の炎症も重要であると考えられるが、平滑筋層の炎症による消化管運動機能障害に関する研究は遅れており、統一された見解はいまだ得られていない。

消化管の炎症研究ではこれまで様々な病態モデルが開発され用いられてきた (表2) (13, 22, 65, 66, 73, 79, 85, 133, 138, 139, 155, 156, 160, 164, 169, 179, 180, 208, 216, 230, 234, 242, 266, 270, 282, 307, 315, 317, 322)。本研究では、この中で

急性腸炎モデルとして主に 2, 4, 6-trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS) 誘発回腸炎モデルを、慢性腸炎モデルとして結腸炎自然発症モデルである IL-10 KO マウスを使用した。TNBS 誘発回腸炎モデルでは、ハプテンである TNBS を“バリアブレーター”となる 50%エタノール溶液に溶解させ、腸管管腔に処置することにより炎症を引き起こす (179)。粘膜層の傷害や炎症性細胞の浸潤は TNBS 処置後 2 時間あまりから観察され、2-3 日目をピークとして炎症の度合いが減弱し、その後平滑筋層の肥厚など慢性腸炎の症状が数週間持続する (323)。IL-10 KO マウスは Muller らのグループによって 1993 年に作成された (138)。生後 12-20 週齢前後から結腸炎を自然発症し、IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ を含む各種炎症性サイトカインの発現や筋層の肥厚などの症状を示す (17, 114)。また、生存率の測定には DSS (dextran sulfate sodium) 誘発結腸炎モデルを使用した (208)。このモデルでは DSS 溶液を自由飲水させることにより結腸に局限した炎症を惹起し、結腸の短縮、粘膜の異形成やリンパ球の浸潤が観察される。

### 1-4 腸炎時の運動機能障害のメカニズムに関するこれまでの報告

前述のようにヒトや動物モデルの腸炎では、しばしば消化管の運動機能障害が認められる。運動機能障害のメカニズムに関する報告は多くはないが、これまでに組織学的な不全や受容体、イオンチャネル系などの機能学的な不全が報告されている。組織学的には平滑筋細胞の増殖および肥大 (20, 181) や平滑筋層における神経細胞数の減少 (146, 239) が一因と考えられる。内在性神経がダメージを受けることは平滑筋細胞に対する制御機構の破綻による平滑筋細胞の増殖につながる (150) ことから、この 2 つの現象は密接に関連しているようにみえる。さらにはクローン病患者において ICC の減少や形態変化が確認されている (225, 227)。機能学的には平滑筋細胞の静止膜電位の上昇 (31, 151) が報告されているが、ICC は平滑筋細胞の過分極を制御することが示唆されており、炎症時の ICC の傷害・減少が平滑筋細胞の脱分極に関与している可能性が考えられる。

Jadcherla らはイヌの腸炎モデルを用いた検討で、正常時の carbachol 収縮や自発性収縮は  $M_3$  受容体によって制御されているのに対して、炎症時には収縮力の減弱がみられるとともに、 $M_2$  依存的な収縮の割合が増加すると報告している (104)。また L-type  $Ca^{2+}$  channel の不全による  $Ca^{2+}$  current の低下 (122, 148) や  $K_{ATP}$  channel の活性化 (2, 105) などのイオンチャネル系の不全も炎症時の運動機能障害に関与する (腸炎による受容体・イオンチャネル系の不全については以下の総説を参照のこと (159))。

### 1-5 腸炎と IL-1

サイトカインは免疫系の調節において中心的な役割を果たしている。消化管など局所における免疫反応は、炎症を促進すると考えられている炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  など) と、炎症を抑制すると考えられているこれらのサイトカインに対する内因性のアンタゴニスト (IL-1Ra, sTNFR など) や抗炎症性サイトカイン (IL-4, IL-10, IL-13 など) のバランスによって決定される。IL-1 $\beta$  は単球・マクロファージ、好中球、上皮細胞や平滑筋細胞など、様々な細胞から産生され、そのアンタゴニストである IL-1Ra は IL-1 $\beta$  と同じ細胞から産生され IL-1 $\beta$  の作用に拮抗的に働く (45)。炎症性腸疾患の患者では、炎症の度合いと末梢血中のリンパ球の IL-1 $\beta$  産生レベルが相関していることが知られている (191)。腸炎時には IL-1 と IL-1Ra のバランスが崩れ、IL-1 優位な状況が生まれる (8, 27)。また、急性および慢性の腸炎では、粘膜層だけでなく筋層でもしばしば IL-1 $\beta$  の発現の上昇が認められる (116, 118, 229, 303)。このことから炎症性腸疾患においては、粘膜層の上皮細胞やマクロファージからだけでなく、筋層のマクロファージもしくは平滑筋細胞自身からも IL-1 $\beta$  が産生され、収縮能に影響している可能性が考えられる。このような観点から、平滑筋収縮に対する IL-1 $\beta$  の急性作用についての研究がなされている。数時間といった短期的な作用では、IL-1 $\beta$  は acetylcholine や norepinephrine の放出を抑制することが知られている (92, 158)。この IL-1 $\beta$  による acetylcholine 放出抑制は LIF (Leukemia Inhibitory

Factor) を介する (298)。これらの現象は平滑筋収縮を減弱させると考えられるが、一方で IL-1 $\beta$  は substance P の放出を増強する (94) との報告もあり、さらに IL-1 $\beta$  と IL-6 を空腸平滑筋組織に作用させると PGE<sub>2</sub> 産生を介して norepinephrine 放出の抑制を引き起こす (231, 232) ことから、その作用は複雑である。しかし Aube らはラット消化管平滑筋組織に対して IL-1 $\beta$  を数時間処置すると、acetylcholine 刺激による収縮力が減弱することを報告しており、総合的には消化管運動を抑制する方向に作用すると考えられる (10)。また IL-1 $\beta$  および IL-6 を *in vivo* で投与することで急性腸炎を引き起こしたモデルでも carbachol 収縮の減弱が観察されている (195)。しかしながらこれらの報告はすべて短期的な作用を検討したもので、実際の慢性腸疾患では平滑筋が長期間にわたって IL-1 $\beta$  に暴露されると考えられる。すなわち平滑筋に対する IL-1 $\beta$  の、より長期的な作用を検討する必要があるが、そのような検討はこれまでなされていない。

前述のように機能学的な運動機能障害の一方で、平滑筋細胞の増殖や肥大による平滑筋層の肥厚など組織学的な変化も運動機能障害の一因となる。IL-1 $\beta$  は様々な細胞に対して増殖作用を示すことが知られており (44)、消化管平滑筋細胞においても単離平滑筋細胞 (62, 83)、株化細胞 (211) で IL-1 $\beta$  の増殖促進作用が報告されている。したがって腸炎時の消化管平滑筋層の肥厚に対して、IL-1 $\beta$  は病態を促進する方向に作用すると考えられるが、その詳細についての検討はなされていない。

## 1-6 研究目的

消化管平滑筋層が炎症性サイトカインに長期間暴露されることで平滑筋細胞自身に機能異常をきたすとの仮説の上、特に炎症性サイトカインの代表である IL-1 $\beta$  を中心とした『消化管運動機能障害の分子機構』を解明することを目的とした。本研究は、消化管平滑筋細胞の収縮機能ならびに増殖・肥大に対する作用の2部構成となっている。



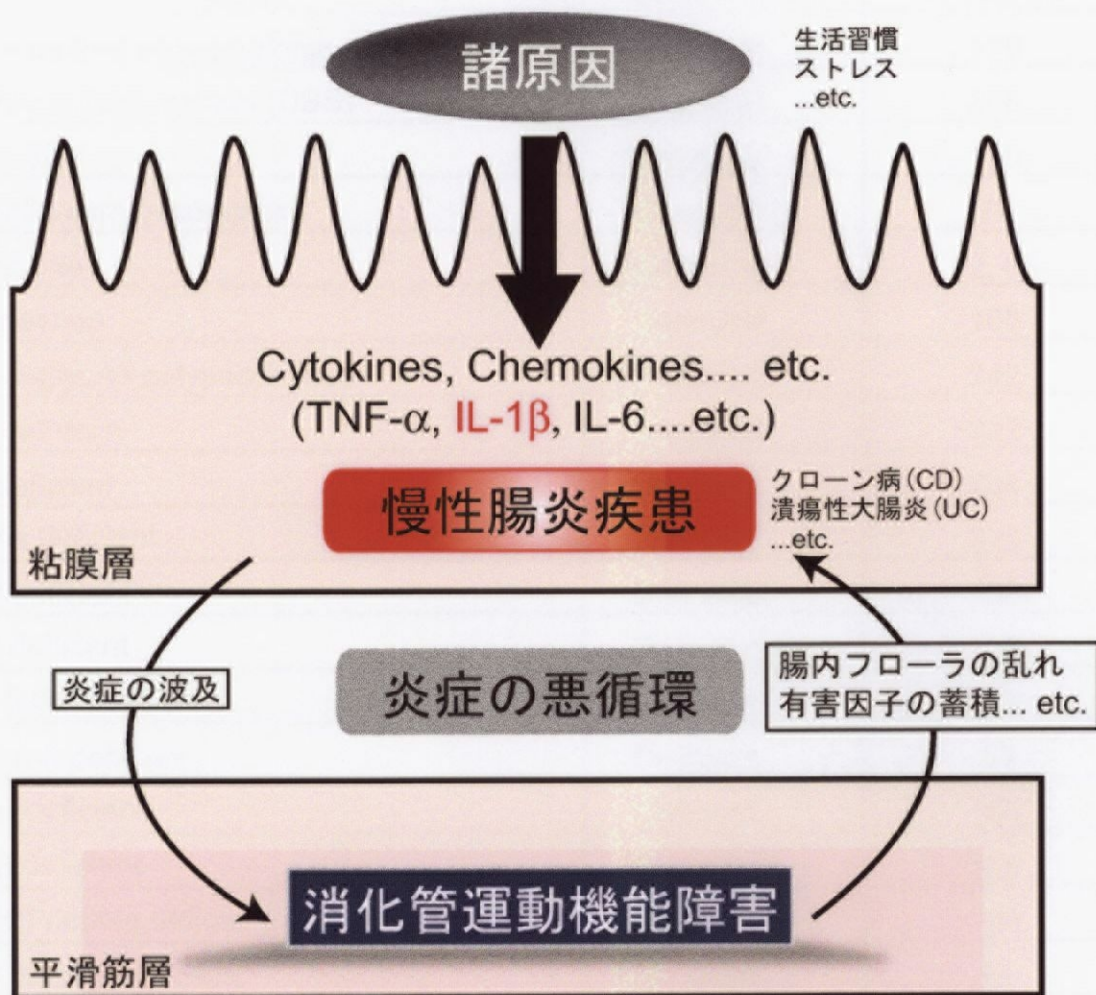


図3 慢性の腸炎では消化管の運動機能障害が腸内フローラの乱れなどをきたすことで、炎症の悪循環を引き起こす原因となっている。

Model	Classification	Reference
2, 4, 6-trinitrobenzensulfonic acid (TNBS)	Chemical	179
Dextran sulfate sodium (DSS)	Chemical	208
Acetic acid	Chemical	155
Formalin-immun complex	Chemical	79
Oxazolone	Chemical	22, 65
Carageenan	Chemical	160
Peptidoglycan-polysaccharide	Chemical	242
Indomethacin	Chemical	322
IL-2 deficient	Deficient	234
IL-2R $\alpha$ deficient	Deficient	315
IL-10 deficient	Deficient	138
G $\alpha$ i2 deficient	Deficient	230
TGF- $\beta$ deficient	Deficient	139
Keratin-8 deficient	Deficient	13
TCR $\alpha$ deficient	Deficient	169
TCR $\beta$ deficient	Deficient	169
TCR $\beta$ / $\gamma$ double deficient	Deficient	169
MHC class II deficient	Deficient	66
CRFB4 deficient	Deficient	266
mdr1a deficient	Deficient	216
TNF $\Delta$ ARE deficient	Deficient	133
IL-7 transgenic	Transgenic	307
Stat4 transgenic	Transgenic	317
N-cadherin dominant negative	Transgenic	73
HALB27 transgenic	Transgenic	282
CD4 <sup>+</sup> /CD45RB <sup>high</sup> transfer	Transfer	180
Bone Marrow Tg $\epsilon$ 26 transfer	Transfer	85
SAMP1/Yit mouse	Spontaneous	164
Cotton-top tamarin	Spontaneous	156
C3H/HeJBir mouse	Spontaneous	270

表2 腸炎モデル

## 第2章 実験材料および実験方法

### 2-1 実験材料

オスの Wistar ラット (200-250 g)、C57BL/6J マウス (20-30 g)、Balb/c マウス (20-30 g) は Charles River Japan より購入した。IL-1 $\alpha$ / $\beta$  knock out (以下 KO) マウス (20-30 g) および TNF- $\alpha$  KO マウス (20-30 g) は、それぞれ東京大学医科学研究所 (岩倉洋一郎教授) と動物衛生研究所 (百溪英一チーム長) より提供を受け、当研究室において繁殖させた。IL-10 KO マウスは味の素株式会社より提供していただいた。

### 2-2 組織培養法

東京大学動物実験実施マニュアルに従いマウスおよびラットを麻酔したのち、頸動脈を切断して放血致死させた。70%エタノールで腹部を消毒したのちに開腹し、回盲部から上部約 10 cm の回腸部を無菌的に摘出した。滅菌した Hanks 溶液中で摘出した回腸から脂肪組織および結合組織を除去し、筋層方向に切断したのち、粘膜層から筋層を剥離した。剥離した筋層を無血清 Medium 199 (M 199) を培養液として、各薬物存在下で 37 °C に保った 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1-7 日間培養した。培養液は毎日交換した。なお、必要な器具は全て滅菌して用いた。

### 2-3 消化管平滑筋細胞単離培養法

消化管平滑筋細胞単離培養法は基本的に papain および collagenase を用いた Shi らの方法 (250) に従った。組織培養法の項 (2-2) と同様にラットから回腸部を無菌的に摘出し、滅菌した Hanks 溶液中で平滑筋層を剥離した。剥離した筋層を約 5 mm x 5 mm の大きさに細断し、Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> free Hanks に移したのち、37 °C で 15 分間インキュベートした。遠心し上清を取り除いたのち、2 mg/ml (45.4

U/ml) papain、2 mM DTT を含む  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  free Hanks 溶液で約 10 分間 37 °C でインキュベートした。さらに遠心して上清を取り除いたのち、2 mg/ml (608 U/ml) collagenase type II、0.1 mg soybean trypsin inhibitor を含む  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  free Hanks 溶液で 30-40 分間 31 °C でインキュベートした。遠心し  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  free Hanks 溶液による洗浄と、遠心による上清の除去を繰り返したのち、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  free Hanks 溶液で 40 分間 37 °C でインキュベートした。Sigma Screen 40 で組織液をろ過し、ろ液を遠心したのち 10 % FBS 含有 DMEM を培地として懸濁し、60 mm dish に移して 1 日培養した。翌日培地を交換し、その後は 3 日おきに培地交換を行った。

### 2-4 腸炎モデル動物の作成

TNBS 誘発回腸炎モデルの作製では、東京大学動物実験実施マニュアルに従いマウスおよびラットを全身麻酔し、腹部を剃毛した。70%エタノールで腹部を消毒したのち正中線に沿って開腹し、盲腸および回腸部を体表面に露出させた。盲腸から 1 cm および 5 cm 遠位の回腸をクリップし、クリップ間の回腸腔に TNBS (Trinitrobenzenesulphonic acid : 溶媒は 50%エタノール含有生理食塩水) を 100 mg/kg で注入した。モデルの対照として同容量溶媒のみを注射した動物を上記の方法で作成した。

DSS 誘発結腸炎モデルの作製では、4%の DSS を蒸留水 (以下 DW) に溶解し、自由飲水で 5 日間投与した。その後、DW を 7 日間与えることでその間の生存率を測定した。

### 2-5 組織学的検討

#### 2-5-1 HE 染色

摘出後および培養後の回腸標本を 10% 中性ホルマリン緩衝液 (formalin neutral buffer solution) で 24 時間、20 °C で浸漬し固定した。その後、組織を水道水で 1

時間流水洗浄し、70%、80%、90%、100%の各濃度のエタノールに順次処置して脱水し、100% トルエンで処理してエタノールを除去した。さらに100%トルエンをパラフィンに置換して、パラフィン包埋した。パラフィン包埋した組織をミクロトームで4  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切した。薄切標本は、100%、90%、80%、70%の各濃度のエタノールで順次処置して脱パラフィンし、hematoxylin 溶液で染色した。流水洗浄ののち、薄切標本を eosin 溶液で染色し、70%、80%、90%、100%の各濃度のエタノールで順次処置して脱水後、キシレンで処置してエタノールを除去した。その後ダイアテックスを滴下し、カバーガラスで封入したのち、光学顕微鏡を用いて観察した。

## 2-5-2 免疫組織化学染色

### 2-5-2-1 組織固定

免疫染色に用いる抗体によって4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde、PFA) 固定液か、ザンボニ固定液 (15% 飽和ピクリン酸水溶液、2% paraformaldehyde、0.15 M phosphate buffer) を用いて標本を固定した。

各種動物から組織培養の項 (2-2) と同様に回腸を摘出し、そのまま薄切標本にする場合は腸管を約5 mm の長さに切断し、筒状のまま固定液に浸漬して固定した。組織培養後薄切標本にする場合は、培養組織をシート状のまま固定液に浸漬して固定した。ホールマウント標本の場合は、腸管を約2 cm の長さに切断したのち、腸間膜に沿って切開し粘膜を除去した筋層を1.2倍ほど伸展させてシリコンゴムに針で4隅を固定し、固定液に浸漬して固定した。4% PFA 固定液による固定は、薄切標本の場合24時間、20  $^{\circ}\text{C}$  で行い、ホールマウント標本の場合10分間、20  $^{\circ}\text{C}$  で行った。ザンボニ固定液による固定は、薄切標本の場合24時間、20  $^{\circ}\text{C}$  で行い、ホールマウント標本の場合20分間、20  $^{\circ}\text{C}$  で行った。その後PBSで固定液を洗浄し、4  $^{\circ}\text{C}$  のPBSで保存した。

### 2-5-2-2 酵素抗体法（ABC法）によるPCNA免疫染色

4% PFA 固定液で固定しパラフィン包埋して作製した薄切標本を、キシレンおよびエタノールで脱パラフィンしたのち、PBS で洗浄後標本に存在する内在性ペルオキシダーゼ活性を阻害するために、1%の過酸化水素水を含むメタノールで10分間処理した。その後再びPBS洗浄を行ったのち、プレパラートをDW中に入れ、電子レンジで約8分間熱した。室温に戻したのちに5% スキムミルク含有PBSで30分間、37℃で処置することにより抗体の非特異的な結合を防いだ。1次抗体には anti PCNA mouse IgG を5% スキムミルク含有PBSで希釈(1:50)して1晩、4℃で処置した。翌日PBSで洗浄後 biotin conjugated anti mouse IgG をスキムミルク含有PBSで希釈(1:200)して30分間、37℃で処置した。さらにPBSで洗浄後 Strept AB complex を30分間、37℃で処置した。再びPBSで洗浄後0.3% 過酸化水素および0.02% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) を含む Tris buffer を処置して、褐色の発色を確認後 Tris buffer により発色を停止させた。その後、薄切標本を Methylgreen (pH 4.0 : 0.5% (w/v)) で30分間、20℃で処置し核染色を行った。

### 2-5-2-3 酵素抗体法（ABC法）によるBrdU免疫染色

組織培養2日目にBrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) を20 μMで処置した。培養3日目に培養液を3回程度交換することで余分なBrdUを除去したのち、標本を組織固定の項(2-5-2-1)のように4% PFA 固定液で固定しパラフィン包埋し薄切標本を作製した。その後、酵素抗体法（ABC法）によるPCNA免疫染色の項(2-5-2-2)と同様の処理を行って染色を行った。ただし、1次抗体として anti bromodeoxyuridine mouse IgG (1:50) を、2次抗体として biotin conjugated anti-mouse IgG (1:200) を用いた。

#### 2-5-2-4 蛍光抗体法

固定したホルマウント標本（COX-2 はザンボニ固定液、iNOS は 4% PFA 固定液で固定）を PBS で洗浄後、0.3% Triton X100 含有 PBS を 1 時間、20 °C で処置した。その後 1 次抗体として anti COX-2 rabbit IgG (1:50)、anti iNOS rabbit IgG (1:1000) または anti rat resident macrophage (ED2) mouse IgG (1:500) を 5% スキムミルク含有 PBS で希釈して 1 晩、4 °C で処置した。翌日 PBS で洗浄したのち、COX-2 および iNOS 抗体に対しては Texas Red conjugated anti rabbit IgG (1:500)、ED2 抗体に対しては Alexa 488 conjugated anti mouse IgG (1:500) を 2 次抗体として 1 時間、20 °C で処置した。標本を PBS で洗浄後スライドガラスの上に載せカバーガラスで封入後、直ちに共焦点レーザー顕微鏡（Carl Zeiss Co., Ltd. LSM510）を用いて観察した。

### 2-6 張力測定法

#### 2-6-1 標本および栄養液

特に断りのない場合は回腸筋層を縦走筋方向に切断した標本を用いて実験を行った。正常栄養液の組成を以下に示す (mM) ; NaCl 136.9、KCl 5.4、CaCl<sub>2</sub> 1.5、MgCl<sub>2</sub> 1.0、NaHCO<sub>3</sub> 23.8、glucose 5.5、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.01。等張性高濃度 K<sup>+</sup>液 (72.7 mM) は、NaCl を同じ濃度の KCl と置換することにより作成した。これらの栄養液は 37 °C に保ち、95 % O<sub>2</sub> と 5 % CO<sub>2</sub> の混合ガスを通気して pH を 7.4 に保った。

#### 2-6-2 張力測定

正常栄養液を満たした容量 10 ml または 20 ml のマグヌス管中で、長さ 5 mm、幅 3 mm の標本の一方をホルダーで固定し、もう一方をひずみ圧トランスデューサーに接続して、標本を固定した。その後、標本にラットの場合は 10 mN、マ

ウスの場合は 5 mN の静止張力を負荷して、発生する収縮張力を等尺性に測定し記録した。実験は高濃度  $K^+$  (72.7 mM) を繰り返し投与し、収縮が一定になったのちに開始した。張力測定終了後、組織の重量を測定した。得られた絶対張力は  $mN/mm^2$  (cross section area) で表した。

## 2-7 MLC/CPI-17/MYPT1 リン酸化量測定法

### 2-7-1 標本作成およびタンパク質抽出

張力測定法に示したように標本を作成しホルダーに固定したのちに、正常栄養液中に入れ、10 mN 静止張力のもとで、高濃度  $K^+$  (72.7 mM) を繰り返し投与し、収縮が一定になったのちに、高濃度  $K^+$  (72.7 mM) またはカルバコール (1  $\mu$ M または 10  $\mu$ M) を 30 秒間処置した。処置後、標本を直ちに 10 mM dithiothreitol (DTT)、10 mM sodium thioglycolate および 10 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) の入ったドライアイス・アセトンで凍結し、低温室で徐々に解凍した。培養後の回腸筋層標本を液体窒素で急速に凍結した。次に液体窒素で冷却したテフロンチューブに凍結した標本をタングステンボールとともに入れ、振盪組織破砕機によって 10 秒×3 回振盪し粉碎した。その後水飽和エーテルで数回洗浄し、直ちにタンパク抽出溶液を 200  $\mu$ l 加えて、タンパク質を変性・可溶化した。抽出溶液には以下の組成のものを用いた (MLC: 10 mM DTT, 8 M Urea, 20 mM Tris, 23 mM glycine (pH 8.6)。CPI-17, MYPT1 : 60 mM b-glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 0.2% SDS, 100 mM NaF, 1 mM  $Na_3VO_4$ , 2 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl (pH8.0))。

### 2-7-2 リン酸化 MLC の検出

8-12  $\mu$ g のタンパク質をグリセロールポリアクリルアミドゲルで泳動し、分離したのち、PVDF 膜へ電気泳動的に転写した。その後、室温 (22-25  $^{\circ}$ C) で PVDF 膜を、5% スキムミルクを加えた 0.05% tween 含有リン酸緩衝液



(phosphate-buffered saline; PBS) で1時間ブロッキング処置してから、1次抗体として polyclonal rabbit anti-bovine tracheal MLC antibody (1:1000) を4℃で1晩処置した。翌日 PBS-Tween で洗浄後、2次抗体としてラットの場合は alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG (1:1000)、マウスの場合は HRP conjugated anti-rabbit IgG (1:1000) を室温 (22-25℃) で1時間、処置した。その後ラットのサンプルは alkaline phosphatase 染色によって、マウスのサンプルは ECL+を用いてバンドを検出した。結果は MLC のバンド濃度を 100 として、リン酸化 MLC のバンド発現量をその比率として表した。

### 2-7-3 リン酸化 CPI-17/MYPT1 の検出

各標本共 20 µg のタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲルで泳動し分離したのち、PVDF 膜へ電気泳動的に転写した。その後、室温 (22-25℃) で PVDF 膜を 5 % スキムミルクを加えた 0.05% Tween 含有リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) で1時間ブロッキング処置してから、anti p-CPI-17 (Thr38) goat IgG (1:250) または anti p-MYPT1 (Thr696) goat IgG (1:1000) で1晩、4℃で処置した。その後 PBS-Tween で洗浄し、2次抗体をリン酸化 CPI-17 に対しては biotin conjugated anti goat IgG (1:1000) を、リン酸化 MYPT1 に対しては alkaline phosphatase conjugated anti goat IgG (1:1000) を1時間、室温 (22-25℃) で処置した。リン酸化 CPI-17 に関しては2次抗体ののち、さらに Streptavidin HRP (1:1000) を1時間、室温 (22-25℃) で処置してから ECL+でバンドを検出した。リン酸化 MYPT1 はそのまま alkaline phosphatase 染色でバンドを検出した。結果は、照準となるタンパク質のバンド濃度を 100% として、各種ターゲットのタンパク質バンド濃度をその相対値で表した。

## 2-8 スキンドファイバー実験法

### 2-8-1 $\alpha$ -toxin 脱膜化標本および溶液

定法に従って、筋層標本に 80  $\mu\text{g/ml}$  の *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin を 30 分間処置し脱膜化標本を作成した (126, 200)。 $\text{Ca}^{2+}$ -free の relaxing solution は以下の組成のものを用いた (7.1 mM  $\text{Mg}^{2+}$ -dimethanesulphonate ( $\text{MgMs}_2$ )、108.0 mM KMs、5.9 mM ATP、2.0 mM creatine phosphate、20.0 mM PIPES、2.0 mM EGTA、10 u/ml creatin phosphokinase (CP)、carbonyl cyanide 1  $\mu\text{M}$  p-trifluoromethoxy-phenylhydrazine (FCCP)、1  $\mu\text{g/ml}$  E-64 (pH 6.8))。  $\text{Ca}^{2+}$ 溶液は Fabiato らの方法 (54) に従い relaxing solution に適当な量の  $\text{CaMs}_2$  を加えることで作成した。

### 2-8-2 $\alpha$ -toxin 脱膜化標本の張力測定

標本に 1 mN の静止張力を負荷して、発生する収縮張力をひずみ圧トランスデューサーで等尺性に測定し記録した。実験は pCa 5 の  $\text{Ca}^{2+}$ 溶液を繰り返し投与し、収縮が一定になったのちに開始した。pCa 6 の  $\text{Ca}^{2+}$ 溶液で収縮を引き起こし、収縮力を測定したのちに  $\text{Ca}^{2+}$ -free 溶液で弛緩させた。その後 carbachol (10  $\mu\text{M}$ ) と GTP (100  $\mu\text{M}$ ) を同時に、GTP $\gamma$ S (100  $\mu\text{M}$ ) もしくは 12-deoxyphorbol 13-isobutyrate (DPB; 10  $\mu\text{M}$ ) を単独で 5 分間処置し、再び pCa 6 の  $\text{Ca}^{2+}$ 溶液で収縮を引き起こした。各々の相対張力を pCa 4.5 による収縮力を 100%として算出した。pCa 4.5 による絶対張力は、張力測定終了後組織の表面積を測定し、 $\text{mN/mm}^2$  (surface area) を単位として表した。

### 2-8-3 $\beta$ -escin 脱膜化標本の収縮力測定および溶液

ラット回腸平滑筋組織を 0.5 mm  $\times$  0.5 mm の大きさに切断し、縦走筋方向にひずみ圧トランスデューサーに結び付け、収縮力が安定するまで高濃度  $\text{K}^+$ 溶液で収縮させた。その後 pCa 6.3 の  $\text{Ca}^{2+}$ 溶液を処置することで一過性の収縮を引き起こし、弛緩したのちに 20  $\mu\text{M}$  の  $\beta$ -escin を処置した。 $\beta$ -escin によって細胞が脱

膜化されることで引き起こされる収縮がプラトーに達したのち、Ca<sup>2+</sup>-free 溶液を処置した。Ca<sup>2+</sup>-free 溶液を数回交換したのち、pCa 6.3 の Ca<sup>2+</sup>溶液で収縮を引き起こした。10 分後、対照として normal rabbit IgG (Santa Cruz) と normal goat IgG (Santa Cruz) を、CPI-17 活性を抑制するために抗 Thr38 リン酸化 CPI-17 抗体 (goat IgG; Santa Cruz) を、MYPT1 活性を抑制するために抗 Thr696 リン酸化 MYPT1 抗体 (goat IgG; Santa Cruz) と抗 Thr853 リン酸化 MYPT1 抗体 (rabbit IgG; UpState) を 20 分間処置した。抗体処置の際は 5 分おきに溶液を混合した。抗体の濃度は各々 1:200 とした。その後 carbachol (1 μM) と GTP (100 μM) を処置することで Ca<sup>2+</sup>感受性の増大を測定した。最後に pCa 4.5 の Ca<sup>2+</sup>溶液で収縮を引き起こした。相対張力は pCa 6.3 による収縮力を 100%として算出した。Ca<sup>2+</sup>-free 溶液は以下のものを用いた (74.1 mM potassium methanesulfonate、7.31 mM magnesium methanesulfonate、5.1 mM ATP、1 mM EGTA、10 mM creatine phosphate、30 mM PIPES)。β-escin 処置以降の pCa 6.3 溶液、pCa4.5 溶液および pCa 6.3 刺激直前の Ca<sup>2+</sup>-free 溶液には calmodulin (1 μM) を加えた。

## 2-9 タンパク質発現量測定法

### 2-9-1 タンパク質抽出

組織標本は液体窒素で急速に凍結したのち、液体窒素で冷却したテフロンチューブにタングステンボールとともに入れ、振盪組織破砕機によって 10 秒×3 回振盪し粉碎した。その後直ちにタンパク抽出溶液を適量加えて、タンパク質を変性・可溶化した。こうして得たホモジネートを 4 °C、15,000 g で 15 分間遠心したのち、上清を採取した。タンパク質抽出液は以下の組成のものを用いた。  
α-actin、MLC : 8 M Urea、50 mM Tris-HCl、500 mM KCl、1 mM EGTA。RhoA、ROCK1、ROCK2 : 20 mM Tris-HCl、50 mM KCl、1 mM EGTA。MLCK、PP1 : 50 mM Tris-HCl、500 mM KCl、1 mM EGTA。CPI-17、MYPT1、calponin、COX-2、iNOS : 60 mM b-glycerophosphate、0.5% Nonidet P-40、0.2% SDS、100 mM NaF、

1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、2 mM EGTA、50 mM Tris-HCl (pH8.0)。以上の抽出液に酸化防止剤として1 mM DTT を、プロテアーゼ阻害剤として1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM benzamidine、10 µg/ml leupeptin、10 µg/ml aprotinin を混合したもの、もしくは市販のプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Complete) を加えた。タンパク質濃度はウシ血清アルブミンをスタンダードとして Bradford 法もしくは Lawry 法を用いて測定した。

### 2-9-2 Western Blotting 法

各標本共、タンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲルで泳動し分離したのち、PVDF 膜へ電気泳動的に転写した。その後、室温 (22-25 °C) で PVDF 膜を 5 % スキムミルクを加えた 0.05% tween 含有リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) で1時間ブロッキング処置してから、各々1次抗体を表3の希釈濃度で1晩、4 °C で処置した。その後 PBS-tween で洗浄し、2次抗体を表3の希釈濃度で1時間、室温 (22-25 °C) で処置した。2次抗体として alkaline phosphatase conjugated の抗体を使用したものは alkaline phosphatase 染色で、biotin conjugated の抗体を使用したもののうち MLC は ABC 法で、その他のものはさらに Streptavidin HRP (1:1000) を1時間、室温 (22-25 °C) で処置してから ECL+でバンドを検出した。HRP conjugated の抗体を使用したものはそのまま ECL+でバンドを検出した。結果は、照準となるタンパク質のバンド濃度を 100%として、各種ターゲットのタンパク質バンド濃度をその相対値で表した。

### 2-10 RT-PCR 法

#### 2-10-1 mRNA の抽出

摘出した標本もしくは組織培養した標本に Trizol Reagent を 1 ml 加えた。Polytron PT2000 で細胞を破碎後 10 分間静置し、0.2 ml のクロロホルムを加えて良く攪拌し 2-3 分間静置した。これを 15,000 rpm、4 °C、15 分間遠心し、上清を

別のチューブに移し替え、イソプロピルアルコールを 0.7 ml 加えて攪拌し 10 分間静置した。その後 15,000 rpm、4 °C、15 分間遠心して mRNA を沈殿させた。上清を除去したのち 80%エタノールを加え、チューブの壁に付着した mRNA を剥がし遠心したのち、80%エタノールを除去した。得られた mRNA は DEPC 処理水に溶解し、RNA サンプルとした。サンプルの一部の 260 nm および 280 nm の吸光度を分光光度計で測定し、この比を RNA サンプルへのタンパク質混入の指標とした。また RNA サンプルおよび DEPC 処理水の 260 nm の吸光度を測定することで RNA サンプルの RNA 濃度を求め、1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  もしくは 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  になるように希釈して調整した。

### 2-10-2 半定量的 RT-PCR

前項で調整した RNA 1  $\mu\text{g}$  を鋳型に逆転写酵素 (AMV reverse transcriptase XL) と random primer を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応は PCR thermal cycler を用いて 30 °C で 10 分間、55 °C で 45 分間、99 °C で 5 分間行った。これにより cDNA サンプルを得た。

次に上記で得られた cDNA サンプルについて各種ターゲットに対するプライマー (表 4) と Taq DNA polymerase を用いて PCR を行った。PCR 反応は最初に 95 °C で 10 分間プレヒートを行ったのち、94 °C で 40 秒間 (熱変性)、各々のプライマーに適した温度 (表 4) で 60 秒間、72 °C で 90 秒間 (伸長) を 1 サイクルとして行った。サイクル数については表 4 を参照のこと。

得られた PCR 産物は 20  $\mu\text{l}$  あたり 5  $\mu\text{l}$  の loading buffer を加えたのち、0.002%のエチジウムブロマイドを加えた 2%アガロースゲルに泳動し、UV-transilluminator によってバンドを確認した。結果は、GAPDH のバンド濃度を 100%として、各種ターゲットの mRNA バンド濃度をその相対値で表した。

## 2-11 統計処理

実験成績は、平均±標準誤差で示した。また、2群間での有意差検定には Student's *t*-test を用いて行い、2群を越える群間での有意差検定は one-way ANOVA を用いたあとで、Dunnnett's test、もしくは Tukey test を行い、危険率 (*p*) が5%未満の場合を有意差ありとした。

	1次抗体		2次抗体	
	抗体名	希釈濃度	抗体名	希釈濃度
$\alpha$ -actin	anti $\alpha$ -actin (Dako)	1:2000	anti mouse IgG (AP)	1:1000
Calponin	anti calponin (Sigma)	1:1000	anti mouse IgG (AP)	1:1000
MLC	anti MLC (Dr. J Stull)	1:1000	anti rabbit IgG (BI)	1:1000
MLCK	anti MLCK (Sigma)	1:1000	anti mouse IgG (AP)	1:1000
PP1	anti PP1 (SC)	1:1000	anti mouse IgG (AP)	1:1000
Rho A	anti RhoA (SC)	1:1000	anti mouse IgG (AP)	1:1000
ROCK I	anti ROCK I (SC)	1:1000	anti goat IgG (AP)	1:1000
ROCK II	anti ROCK II (SC)	1:1000	anti goat IgG (AP)	1:1000
CPI-17	anti CPI-17 (SC)	1:500	anti goat IgG (BI)	1:1000
MYPT1	anti MYPT1 (SC)	1:1000	anti goat IgG (AP)	1:1000
COX-2	anti COX-2 (CA)	1:2000	anti rabbit IgG (BI)	1:1000
iNOS	anti iNOS (BD)	1:1000	anti mouse IgG (BI)	1:1000

表3 Western Blottingにおいて使用した抗体とその希釈濃度

1次抗体 SC: Santa Cruz、CA: Cayman

2次抗体 AP: alkaline phosphatase conjugated、BI: biotin conjugated

HRP: Hourse Radish Peroxidase conjugated

	Sense	Antisense	Cycles
mouse IL-1 $\alpha$	ctacagttctgccattgacc	ttgagcgctcacgaacagtt	30
mouse IL-1 $\beta$	agctctccacctcaatggac	tggggaaggcattagaaaca	30
mouse TNF- $\alpha$	acggcatggatctcaaagac	aacacccattcccttcacag	30
mouse GAPDH	tgttctacccccaatgtgt	ccctgttctgttagccgtat	30
rat COX-2	ctgtatcccgccctgctggg	acttgcgctgatgggtggctgtctt	36
rat iNOS	ctacctacctggggaacacctggg	ggaggagctgatggagtagtagcgg	36
rat GAPDH	taccagccgggggaccac	cgagctgacagagtagta	36
rat CPI-17	gacgtggagaagtggatcgacggg	gcccggctgcttgg	36

表4 RT-PCR で用いたプライマーの配列