

## 第3章 実験結果

### 3-1 IL-1 $\beta$ の平滑筋収縮に対する作用

#### 3-1-1 消化管平滑筋収縮機構

はじめにアゴニスト刺激による消化管平滑筋収縮におけるミオシン軽鎖フォスファターゼ (MLCP) 活性調節機構を明らかとするため、内因性セリン・スレオニンフォスファターゼ阻害因子である CPI-17 と MLCP の調節サブユニットである MYPT1 の活性化機構を検討した。CPI-17 の活性化は主に Thr38 のリン酸化によって制御されていることが知られているため、まずラット回腸平滑筋組織に carbachol 刺激 (1  $\mu$ M) をし、CPI-17 の Thr38 リン酸化量の変化を経時的に測定した (図 4)。CPI-17 は無刺激時にはほとんどリン酸化バンドが検出されなかったが、carbachol 刺激後速やかにリン酸化され少なくとも 10 分間リン酸化が持続した。そこで次に CPI-17 の Thr38 リン酸化に関与するプロテインキナーゼを明らかにするため、各種キナーゼ阻害剤を 30 分間処置したのち、carbachol で 30 秒間刺激した際のリン酸化量を測定した (図 5)。非特異的プロテインキナーゼ阻害剤である K252a (1  $\mu$ M) を処置すると、CPI-17 のリン酸化バンドはほぼ完全に消失した。ROCKs 阻害剤である Y-27632 (10  $\mu$ M)、ROCKs および PKN 阻害剤である HA-1077 (2  $\mu$ M) (6)、PKC 阻害剤である bisindolylmaleimide I (BIS; 10  $\mu$ M) は各々 CPI-17 リン酸化を抑制したことから CPI-17 の Thr38 リン酸化には ROCKs、PKN、PKC が関与することが示唆された。

MYPT1 は Thr696 リン酸化によって活性化し、MLCP 活性を抑制すると考えられているため、ラット回腸平滑筋組織を carbachol (1  $\mu$ M) で刺激し、MYPT1 の Thr696 リン酸化量の変化を経時的に測定した (図 6)。MYPT1 の Thr696 は無刺激時からリン酸化バンドが検出され、carbachol 刺激後緩やかにリン酸化量が増加し 5 分後以降にわずかではあるが有意な増加が観察された。そこで MYPT1 の Thr696 のリン酸化に関与するプロテインキナーゼを明らかにするため、各種

キナーゼ阻害剤を30分間処置したのち、carbacholで10分間刺激した際のリン酸化量を検討した(図7)。非特異的プロテインキナーゼ阻害剤であるK252a(1  $\mu\text{M}$ )を処置するとMYPT1のThr696リン酸化バンドは無刺激時の約半分まで減少したことから、Thr696のリン酸化は無刺激時からある程度存在することが示唆された。ROCKs阻害剤であるY-27632(10  $\mu\text{M}$ )、ROCKsおよびPKN阻害剤であるHA-1077(2  $\mu\text{M}$ )はK252aと同程度まで抑制したことから、MYPT1のThr696リン酸化にはおもにROCKsが関与することが示唆された。

また、最近MYPT1の活性に重要である可能性が指摘されているThr853のリン酸化についても検討を行った。ラット回腸平滑筋組織をcarbachol(1  $\mu\text{M}$ )で刺激し、MYPT1のThr853リン酸化量の変化を経時的に測定した(図8)。MYPT1のThr853は無刺激時からある程度リン酸化バンドが検出されるが、carbachol刺激後速やかにリン酸化量が増加し、10分間リン酸化が持続することが観察された。

緒言でも記したとおり、PKC活性化による収縮にはCPI-17のリン酸化が関与し、MYPT1リン酸化は関与しないと考えられている。そこでMYPT1のThr696およびThr853リン酸化に対するPKC阻害剤の効果を確認するため、BIS(10  $\mu\text{M}$ )を用いてリン酸化レベルを検討したところ、MYPT1のThr696およびThr853のリン酸化にPKCは関与しないことが明らかとなった(図9)。したがってPKC活性化によるMLCP活性抑制は主にCPI-17によって制御されることが示唆された。そこで回腸平滑筋のcarbachol収縮におけるCPI-17の重要性を検討するために、BIS(10  $\mu\text{M}$ )の収縮力に対する効果を検討した(図10)。Carbachol収縮はPKC阻害剤によって80%程度抑制されたことから、回腸縦走筋のアゴニスト刺激による収縮にはPKC活性化経路、すなわちCPI-17が重要であることが示唆された。そこでさらに収縮機構におけるCPI-17およびMYPT1の重要性を明らかにするため、ラット回腸平滑筋 $\beta$ -escin脱膜化標本作製し $\text{Ca}^{2+}$ 感受性増加に対するCPI-17およびMYPT1のリン酸化抗体の効果を検討した(図11)。 $\beta$ -escin脱膜化標本では細胞内の機能的タンパク質が保持されており、外液の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変化させることにより、細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を操作することができる(128)。

外液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を一定 (pCa 6.3) にし、carbachol (1  $\mu\text{M}$ ) と GTP (100  $\mu\text{M}$ ) の同時処置によって RhoA 依存的な経路による  $\text{Ca}^{2+}$  感受性の変化を観察した。対照となる normal IgG を処置した標本では  $\text{Ca}^{2+}$  感受性の増加にともなって pCa 6.3 によって引き起こされた収縮と比較して収縮力が約 2 倍増加することが観察された。これに対して抗 Thr 38 リン酸化 CPI-17 抗体を処置した標本では  $\text{Ca}^{2+}$  感受性の増加がほぼ 100% 抑制されていたことから、CPI-17 の活性化が carbachol 刺激による収縮に重要であることが示唆された。また抗 Thr 696 リン酸化 MYPT1 抗体および抗 Thr 853 リン酸化 MYPT1 抗体を処置した標本でも  $\text{Ca}^{2+}$  感受性の増加がほぼ 100% 抑制されていたことから MYPT1 のリン酸化も carbachol 刺激による収縮に重要であることが示唆された。

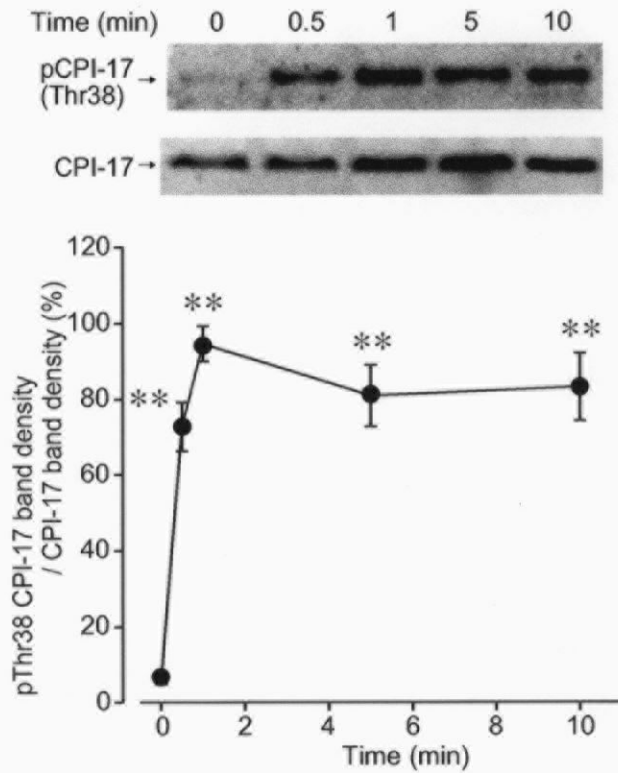


図4 CPI-17のThr38のリン酸化はcarbachol刺激後速やかに起こる。ラット回腸平滑筋組織をcarbachol (1  $\mu$ M) で刺激しCPI-17のThr38リン酸化を経時的に測定した。定量図はCPI-17のバンド濃度を100%とし、リン酸化バンド濃度をその相対値で表した。n=5。\*\*:  $p < 0.01$  (carbachol 非処置との比較)。

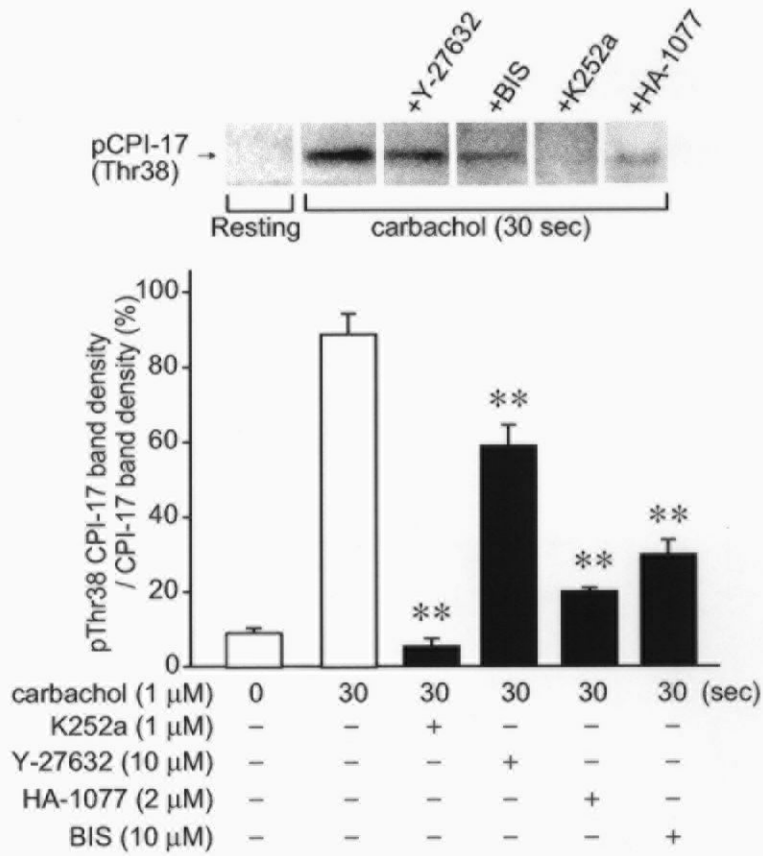


図5 CPI-17のThr38のリン酸化はROCKs, PKC, PKNによって制御される。ラット回腸平滑筋組織をcarbachol (1 μM) で30秒間刺激し、CPI-17のThr38のリン酸化量を測定した。K252a、Y-27632、HA-1077、BISはcarbachol刺激の30分前から処置した。定量図はCPI-17のバンド濃度を100%とし、リン酸化バンド濃度をその相対値で表した。n=4-12。\*\*: p<0.01 (carbachol 30秒間処置との比較)。

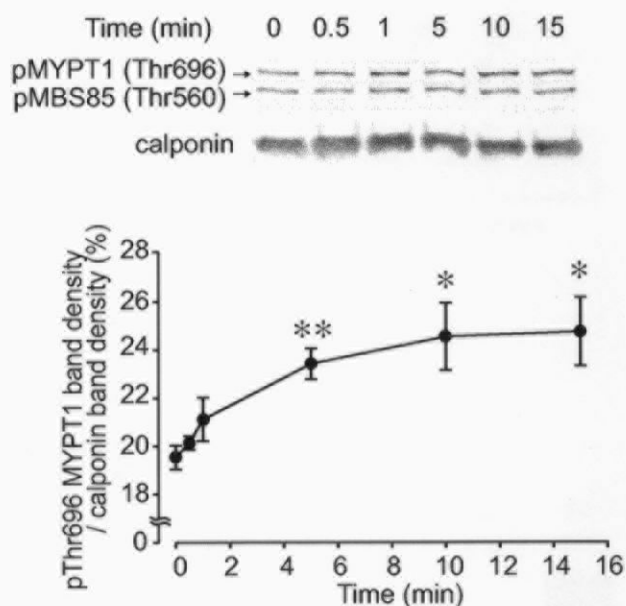


図6 MYPT1のThr696のリン酸化はcarbachol刺激後緩やかに起こる。ラット回腸平滑筋組織をcarbachol (1  $\mu$ M) で刺激しMYPT1のThr696リン酸化を経時的に測定した。定量図はcalponinのバンド濃度を100%とし、MYPT1のThr696リン酸化バンド濃度をその相対値で表した。n=4。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01 (carbachol 非処置との比較)。

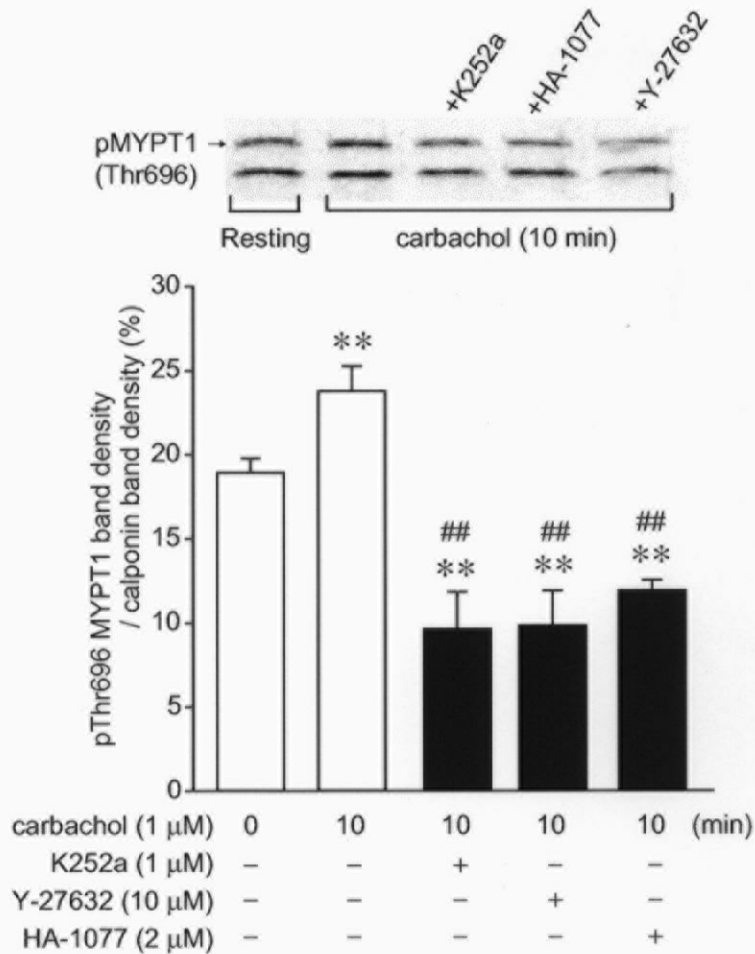


図7 MYPT1のThr696リン酸化はROCKsによって制御される。  
 ラット回腸平滑筋組織をcarbachol (1  $\mu$ M) で10分間刺激し、MYPT1のThr696のリン酸化量を測定した。K252a、Y-27632、HA-1077はcarbachol刺激の30分前から処置した。定量図はcalponinのバンド濃度を100%とし、MYPT1のThr696リン酸化バンドをその相対値で表した。n=4-6。##: p<0.01 (carbachol 10分間刺激との比較)、\*: p<0.01 (無刺激との比較)。

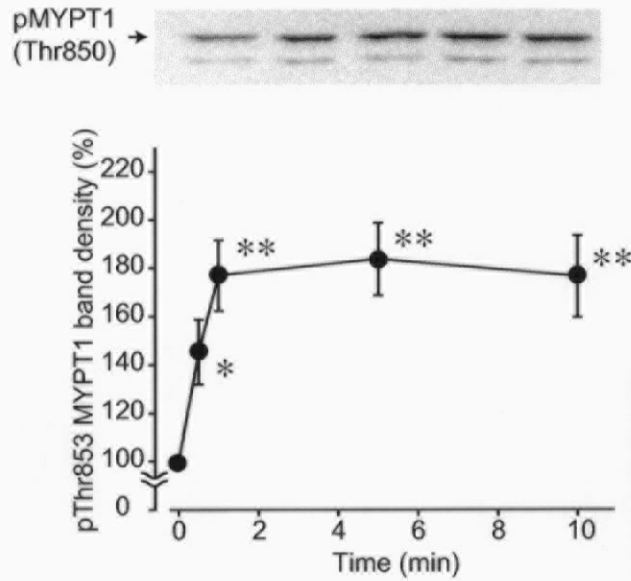


図8 MYPT1のThr853のリン酸化はcarbachol刺激後速やかに起こる。  
 ラット回腸平滑筋組織をcarbachol (1  $\mu$ M) で刺激しMYPT1のThr853リン酸化を経時的に測定した。定量図は無刺激時のMYPT1バンド濃度を100 %とし、リン酸化バンド濃度をその相対値で表した。n=4。\*:  $p < 0.05$ 、\*\*:  $p < 0.01$  (carbachol 非処置との比較)。



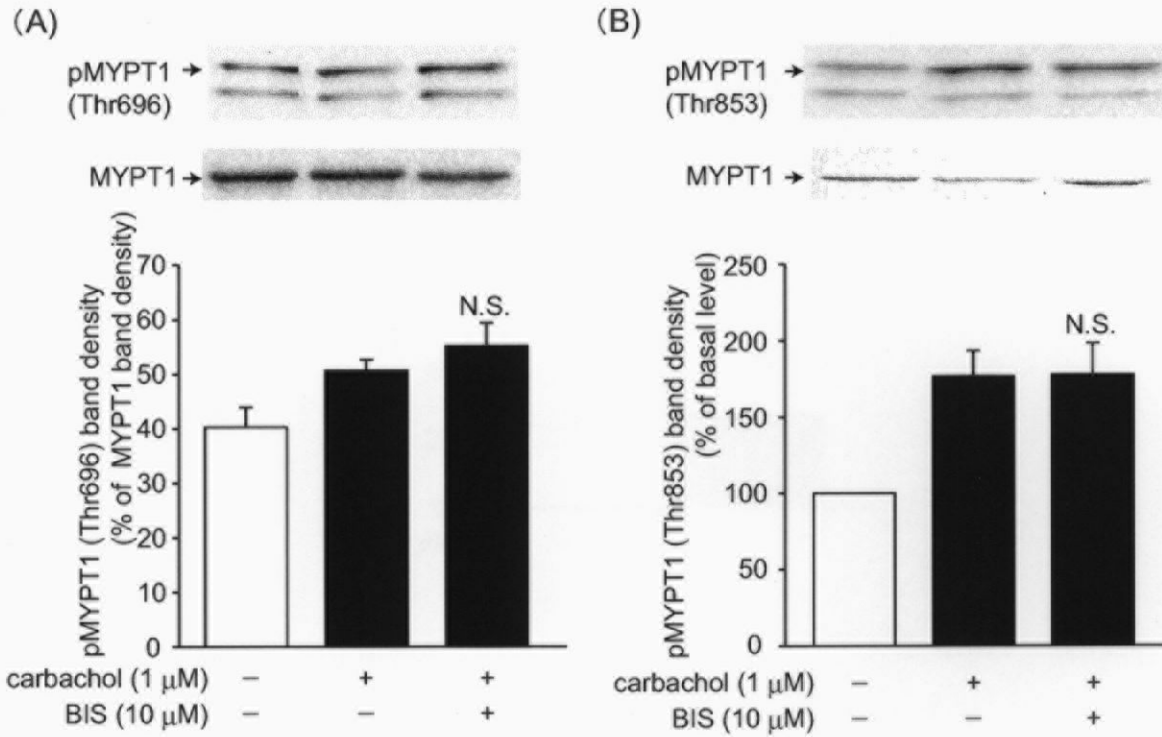


図9 MYPT1のThr696およびThr853リン酸化にはPKCが関与しない。  
 ラット回腸平滑筋組織をcarbachol (1 μM) で10分間刺激し、MYPT1の (A) Thr696  
 および (B) Thr853リン酸化量を測定した。BIS (10 μM) はcarbachol刺激の30分前  
 から処置した。定量図は (A) MYPT1および (B) 無処置のバンド濃度を100%とし、  
 各リン酸化バンド濃度をその相対値で表した。n=4。N.S.: 有意差なし (carbachol  
 10分間刺激との比較)。

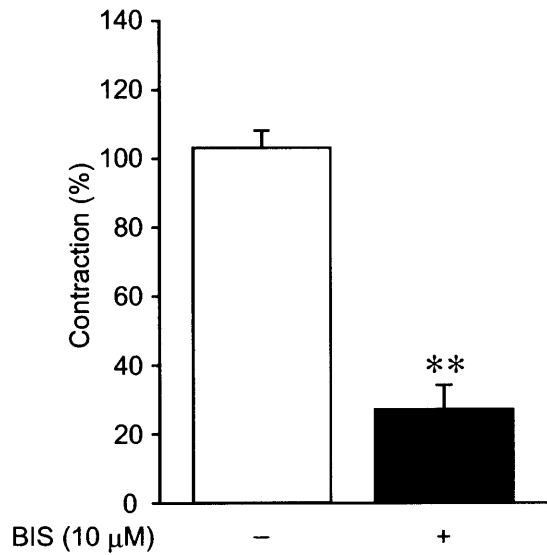


図10 回腸平滑筋のcarbachol収縮にはPKC活性化経路が重要な役割を果たす。ラット回腸平滑筋組織をcarbachol (1 μM) で刺激し収縮力を測定した。その後vehicleもしくはBIS (10 μM) を30分間処置し、再びcarbachol (1 μM) 刺激による収縮力を測定した。定量図ははじめのcarbachol収縮の大きさを100%として、その相対値で表した。n=4。\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

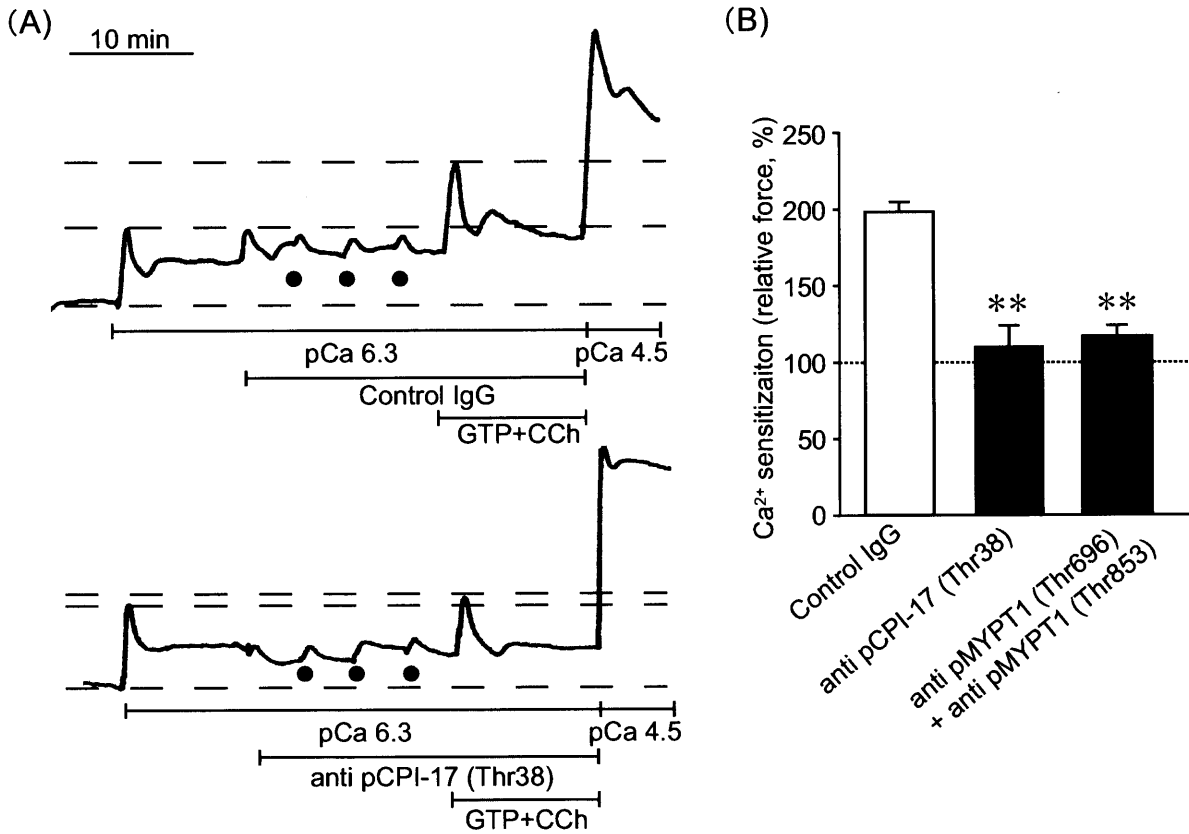


図11 CPI-17およびMYPT1のリン酸化抗体はCa<sup>2+</sup>感受性の増加を抑制する。ラット回腸平滑筋組織をβ-escin (20 μM) により脱膜化した標本を作製し、Ca<sup>2+</sup>濃度固定下のcarbachol (1 μM) とGTP (100 μM) の同時投与によるCa<sup>2+</sup>感受性の増加を測定した。(A) 対照のnormal IgG (上) および抗Thr38リン酸化CPI-17抗体 (下) を処置した際の典型例。丸印は溶液の混合を示す。(B) Ca<sup>2+</sup>刺激 (pCa 6.3) を100%とし、carbacholとGTPの同時投与によるCa<sup>2+</sup>感受性の増加をその相対値で表した。  
\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

#### 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

腸炎時の平滑筋組織における炎症性サイトカインの発現を検討するためラット回腸に TNBS を処置することにより回腸炎を惹起した。回腸を TNBS 処置後 1 日目、2 日目、3 日目に摘出し平滑筋層を剥離してタンパク質を抽出し各種サイトカイン発現量を ELISA で検討した (図 12)。TNF- $\alpha$  は TNBS 処置後 1 日目、2 日目と有意な増加が認められたが、3 日目には対照の vehicle 処置と同レベルに減少した (図 12A)。IL-1 $\beta$  は 1 日目から 3 日目まで産生量の増加が観察された (図 12B)。IL-6 は 2 日目にのみ産生量の増加が認められた (図 12C)。

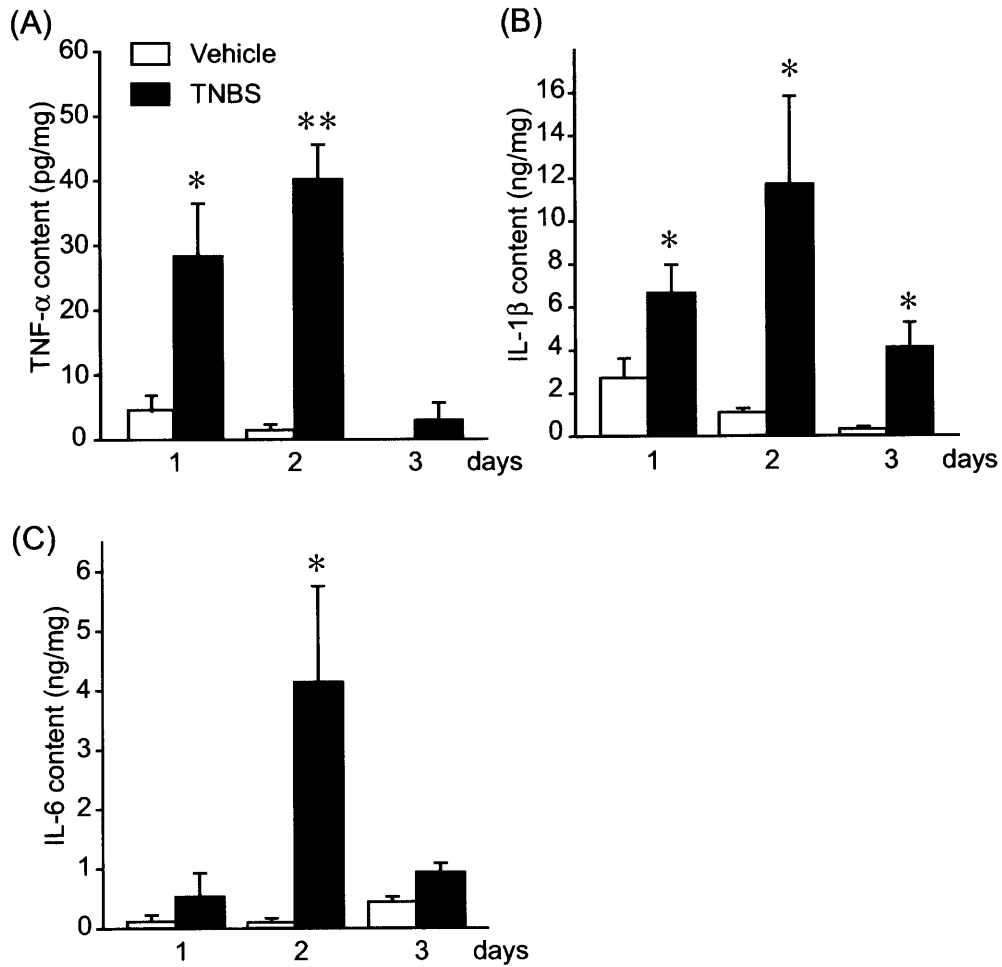


図12 TNBS誘発回腸炎の平滑筋層においても炎症性サイトカインの産生が認められる。ラット回腸にTNBSを処置することで回腸炎を引き起こし、平滑筋層における (A) TNF- $\alpha$ 、(B) IL-1 $\beta$ 、(C) IL-6の産生をELISAを用いて経時的に測定した。n=4-16。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

#### 3-1-3 消化管平滑筋組織に対する IL-1 $\beta$ の短期作用

緒言でも記したとおり、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が知られている。そこで IL-1 $\beta$ のマウス消化管平滑筋組織に対する短期的な作用を検討した。マウス回腸および結腸平滑筋組織に IL-1 $\beta$ をマグヌス管中で4時間処置すると、予想に反して回腸平滑筋の carbachol 収縮は対照と差がなく、さらに結腸平滑筋の carbachol 収縮は増強した (図 13)。次にマウス結腸平滑筋組織に対する IL-1 $\beta$ の短期的な作用を経時的に測定したところ、IL-1 $\beta$ による収縮力の増強は4時間をピークとして6時間目には有意な差はなくなっていた (図 14)。この IL-1 $\beta$ による収縮力の増強は COX-2 (cyclooxygenase-2) 阻害剤である CAY10404 (1  $\mu$ M) で完全に抑制されたことから prostaglandin の産生を介した現象であることが示唆された (図 15)。

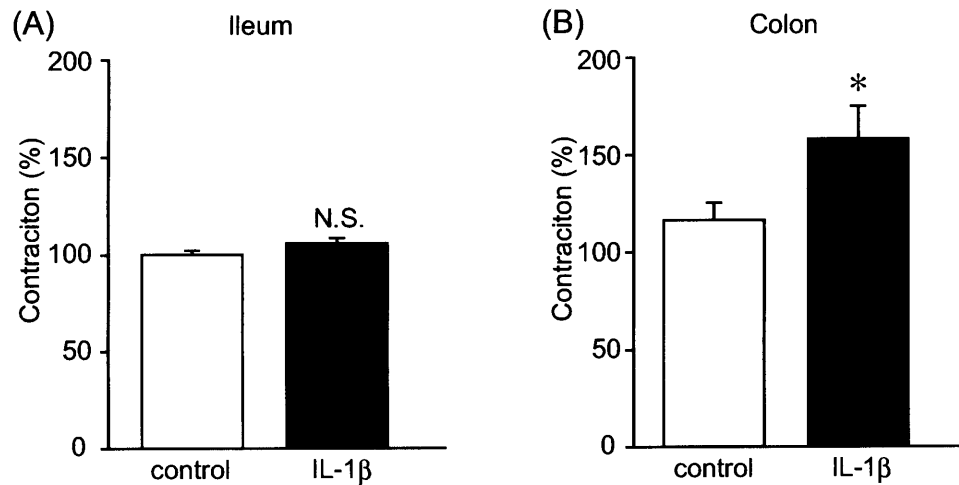


図13 マウス結腸平滑筋組織をIL-1βで4時間処置するとcarbachol収縮の増強が観察される。

マウス回腸 (A)および結腸 (B) 平滑筋組織のcarbachol (1 μM) 収縮を測定後、マグヌス管中でvehicleもしくはIL-1β (10 ng/ml) で4時間処置し、再びcarbachol (1 μM) で刺激し収縮力の変化を測定した。定量図ははじめのcarbachol収縮を100%として、その相対値で表した。n=4-6。\*: p<0.05、N.S.: 有意差なし (対照との比較)。

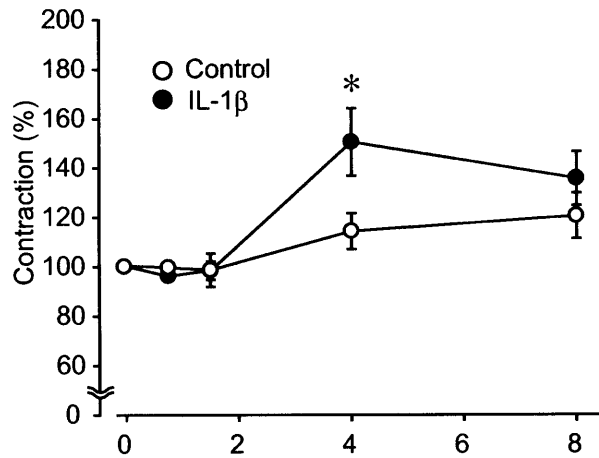


図14 IL-1 $\beta$ によるマウス結腸平滑筋組織carbachol収縮の増強は一過性のものである。マウス結腸平滑筋組織のcarbachol (1  $\mu$ M) 収縮を測定後、マグヌス管中でvehicleもしくはIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) を0-8時間処置し、再びcarbachol (1  $\mu$ M) で刺激し収縮力の変化を測定した。定量図ははじめのcarbachol収縮を100%として、その相対値で表した。n=4-6。\*: p<0.05、N.S.: 有意差なし (対照との比較)。



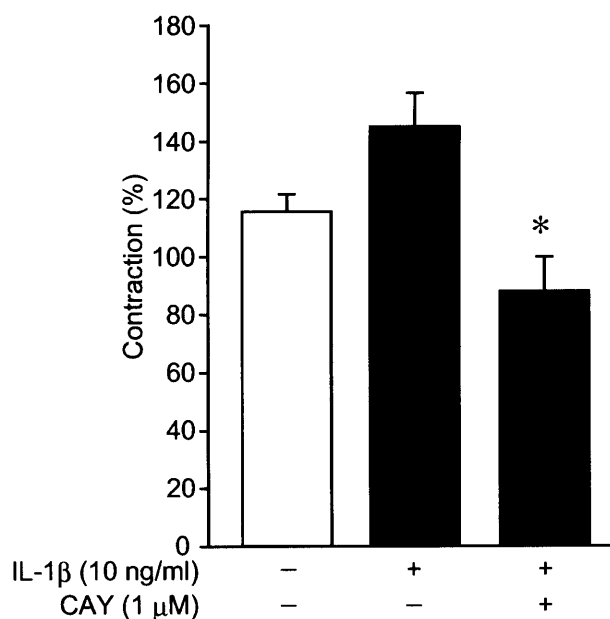


図15 IL-1βによるマウス結腸平滑筋組織carbachol収縮の増強はCOX-2阻害剤で抑制される。

マウス結腸平滑筋組織のcarbachol (1 μM) 収縮を測定後、マグヌス管中でvehicle、IL-1β (10 ng/ml) もしくはIL-1βとCOX-2阻害剤であるCAY10404 (1 μM) を同時に4時間処置し、再びcarbachol (1 μM) で刺激して収縮力の変化を測定した。定量図ははじめのcarbachol収縮を100%として、その相対値で表した。n=4-6。\*: p<0.05、N.S.: 有意差なし (対照との比較)。

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

次に IL-1 $\beta$ の回腸平滑筋組織に対するより長期的な作用を検討した。ラット回腸平滑筋組織を IL-1 $\beta$ 処置・非処置で培養し、高濃度 K<sup>+</sup> (72.7 mM: 図 16A) および carbachol (1  $\mu$ M: 図 16B) 刺激による収縮力の経時的な変化を検討した。対照の IL-1 $\beta$ 非処置の標本では少なくとも 3 日目まで高濃度 K<sup>+</sup>収縮および carbachol 収縮ともに良く保持された。これに対して IL-1 $\beta$ 処置標本では高濃度 K<sup>+</sup>収縮、carbachol 収縮ともに、培養 3 日目において収縮力の低下が認められた。また IL-1 $\beta$ による収縮力の抑制の程度は、高濃度 K<sup>+</sup>収縮よりも carbachol 収縮でより強く現れた。培養 3 日目において様々な濃度の IL-1 $\beta$ の作用を検討したところ、濃度依存的に carbachol 収縮 (1  $\mu$ M) を抑制した (図 16C)。そこで以下の実験では 10 ng/ml の IL-1 $\beta$ を 3 日間処置して実験を行った。

IL-1 $\beta$ は COX-2 や iNOS (inducible NO synthase) の発現を誘導することが知られており、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) および一酸化窒素 (NO) はこれら酵素により誘導される平滑筋弛緩因子であるため、IL-1 $\beta$ の平滑筋収縮抑制作用が PGE<sub>2</sub>または NO の作用によるものであるかを明らかとするため以下の実験を行った (表 5)。マグヌス法において高濃度 K<sup>+</sup> (72.7 mM) を繰り返し投与し収縮力を安定化させたのち、COX 阻害剤である indomethacin (10  $\mu$ M) または NOS 阻害剤である L-NMMA (300  $\mu$ M) で標本を 30 分間処置し、IL-1 $\beta$ による carbachol 収縮抑制作用に対する影響を検討した。L-NMMA 処置では細胞内 L-Arg 濃度が NO 産生に十分であるように、L-Arg (1 mM) を L-NMMA 処置前にバス内に投与した (311)。IL-1 $\beta$ を 3 日間処置することによる高濃度 K<sup>+</sup>収縮および carbachol 収縮の抑制は indomethacin および L-NMMA 処置では回復しなかったことから、プロスタグランジン類および NO は IL-1 $\beta$ の収縮抑制作用には関与しないことが明らかとなった。

緒言に示したとおり平滑筋収縮は主にミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化によって制御されているため、MLC リン酸化レベルに対する IL-1 $\beta$ の作用を検討した (図 17)。静止状態 (carbachol 非処置) ではわずかな MLC のリン酸化が認め

られたが、IL-1 $\beta$ はこれに影響を与えなかった。これに対して、carbachol (1  $\mu$ M) を 30 秒間処置することによって収縮を誘導した標本では、IL-1 $\beta$ 処置によって MLC リン酸化量が減少した。しかしながら、高濃度 K<sup>+</sup> (72.7 mM) を 30 秒間処置することによって収縮を引き起こした標本では、IL-1 $\beta$ 処置で MLC リン酸化レベルが減少傾向にあったものの有意な差は認められなかった。

$\alpha$ -toxin 処置による脱膜化組織では $\beta$ -escin 脱膜化標本同様、細胞内の機能的タンパク質が保持されており、外液の Ca<sup>2+</sup>濃度を変化させることにより、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度を操作することができる (126, 200)。外液の Ca<sup>2+</sup>濃度を一定 (pCa 6) にし、carbachol (10  $\mu$ M) と GTP (100  $\mu$ M) の同時処置、もしくは GTP $\gamma$ S (100  $\mu$ M) の単独処置によって RhoA 依存的な経路による Ca<sup>2+</sup>感受性の変化について検討を行った (図 18A)。Carbachol と GTP、もしくは GTP $\gamma$ S の前処置は Ca<sup>2+</sup>感受性の増大 (pCa 6 の Ca<sup>2+</sup>溶液による収縮力増大) をもたらしたが、IL-1 $\beta$ はこの増大を抑制した。また PKC 活性化作用を持つホルボールエステル (12-deoxyphorbol 13-isobutyrate; DPB) を、同様に一定の Ca<sup>2+</sup>濃度下で処置することにより PKC 依存的な経路による Ca<sup>2+</sup>感受性の変化について検討を行った (図 18B)。DPB の前処置は Ca<sup>2+</sup>感受性の増大をもたらしたが、IL-1 $\beta$ 処置を行った標本ではこの増大に対して抑制傾向ではあったものの有意な差は認められなかった。IL-1 $\beta$ の pCa 4.5 の Ca<sup>2+</sup>溶液による絶対張力に対する影響を検討したところ、IL-1 $\beta$ で 3 日間処置した標本では絶対張力の低下が認められた。以上のことから、IL-1 $\beta$ による収縮力の低下には RhoA に依存した経路の不全が関与していることが示唆された。

そこで次に消化管平滑筋収縮に関与する内在性因子のタンパク質発現量を western blotting で検討した。図 19 に示すように、 $\alpha$ -actin、MLC、MLCK、PP1 のタンパク質発現量は IL-1 $\beta$ を 3 日間処置と非処置で培養した標本の間には差は見られなかった。また RhoA 経路に関与する RhoA、ROCK I、ROCK II、MYPT1 の発現に対しても IL-1 $\beta$ は影響を与えなかった (図 20A-D)。これに対して図 20E に示すとおり、CPI-17 タンパク質は IL-1 $\beta$ 処置によって発現量の低下が認められた。MYPT1 および CPI-17 の活性はそれぞれ Thr696 と Thr38 のリン酸化によ

て制御されているため、これらのリン酸化レベルを検討した。すると図 21A のように MYPT1 の Thr696 リン酸化は carbachol 刺激の有無に関わらず IL-1 $\beta$ 処置によって抑制されていた。一方、CPI-17 の Thr38 リン酸化は carbachol 処置前にはほとんど検出されず、carbachol を 30 秒間処置した際のリン酸化レベルは IL-1 $\beta$ によって抑制されていた (図 21B)。さらに IL-1 $\beta$ の CPI-17 mRNA 発現量に対する影響を RT-PCR 法で検討したところ、対照と IL-1 $\beta$ 処置標本の間には CPI-17 mRNA 発現量の有意な差は存在しなかった (図 22)。

以上のことから、回腸平滑筋組織に IL-1 $\beta$ を長期間処置することによって引き起こされる収縮力の低下には MYPT1 のリン酸化レベルの低下と、CPI-17 タンパク質発現量の低下にともなうリン酸化 CPI-17 量の低下が関与することが明らかとなった。また IL-1 $\beta$ による CPI-17 発現量低下は転写レベルではなく、転写後調節のレベルで制御されていることが示唆された。

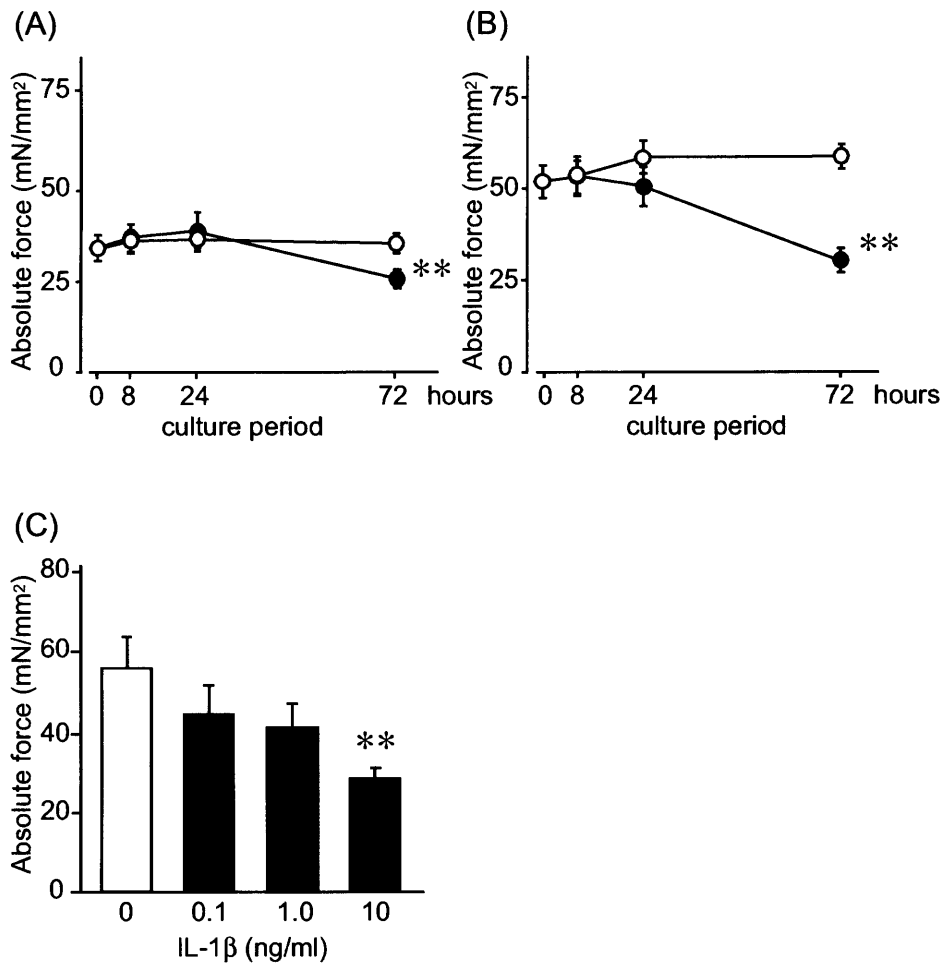


図16. 平滑筋組織をIL-1βで3日間処置すると収縮力が抑制される。  
 IL-1β (10 ng/ml) をラット回腸平滑筋組織に処置し、(A) 高濃度K<sup>+</sup> (72.7 mM) 刺激  
 および (B) carbachol (1 μM) 刺激による収縮力に対する影響を経時的に検討した。  
 (C) 異なった濃度のIL-1βによる3日間培養後の収縮力の変化を検討した。n=8-32。  
 \*\*: p<0.01 (対照との比較)。

(A)

Treatment	Control (mN/mm <sup>2</sup> )	IL-1 $\beta$ (mN/mm <sup>2</sup> )
Control	43.2 $\pm$ 2.4	18.9 $\pm$ 2.4
L-Arg (1 mM)	41.7 $\pm$ 2.4	17.7 $\pm$ 2.4
L-Arg (1 mM) + L-NMMA (300 $\mu$ M)	40.2 $\pm$ 2.1	17.1 $\pm$ 2.7
Control	36.9 $\pm$ 0.3	19.5 $\pm$ 0.3
Indomethacin (10 $\mu$ M)	32.4 $\pm$ 0.3	15.3 $\pm$ 0.3

(B)

Treatment	Control (mN/mm <sup>2</sup> )	IL-1 $\beta$ (mN/mm <sup>2</sup> )
Control	30.0 $\pm$ 2.4	18.6 $\pm$ 2.1
L-Arg (1 mM)	25.8 $\pm$ 1.8	16.2 $\pm$ 1.8
L-Arg (1 mM) + L-NMMA (300 $\mu$ M)	28.8 $\pm$ 2.1	16.2 $\pm$ 2.4
Control	23.1 $\pm$ 1.8	21.0 $\pm$ 3.0
Indomethacin (10 $\mu$ M)	16.2 $\pm$ 1.5	11.1 $\pm$ 1.5

表5 NOS阻害薬およびCOX阻害薬はIL-1 $\beta$ による収縮抑制作用に影響しない。IL-1 $\beta$ 処置・非処置で3日間培養した標本における、NOSの基質であるL-Arg (1 mM) NOS阻害薬であるL-NMMA (300  $\mu$ M)、COX阻害薬であるindomethacin (10  $\mu$ M)のcarbachol (1  $\mu$ M)収縮(A)、高濃度K<sup>+</sup> (72.7 mM)収縮(B)に対する作用を検討したn=6-15。

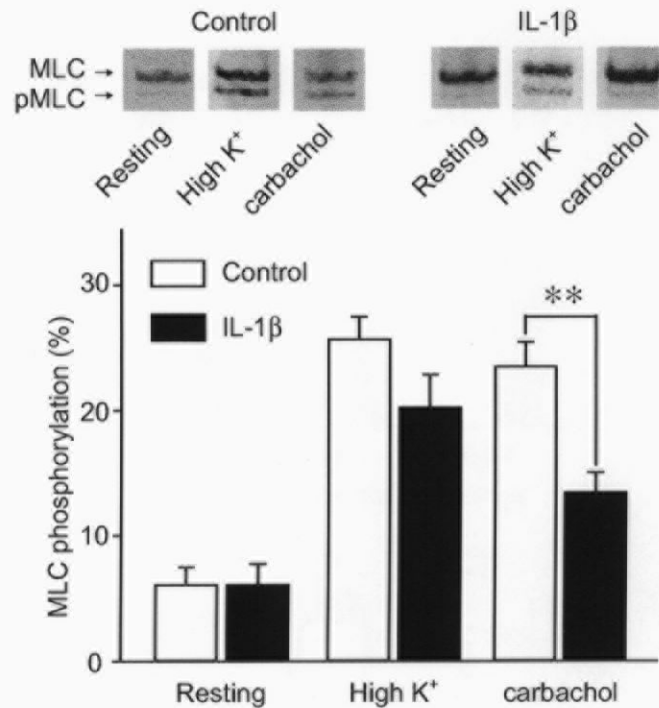


図17 IL-1βはMLCリン酸化を抑制する。

ラット回腸平滑筋組織培養3日目の標本について、高濃度K<sup>+</sup> (72.7 mM) およびcarbachol (1 μM) 刺激によるMLCリン酸化に対するIL-1β (10 ng/ml) の影響を検討した。MLCリン酸化量は全体のMLCバンド濃度を100%として、リン酸化バンド濃度をその相対値で表した。n=9-16。\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

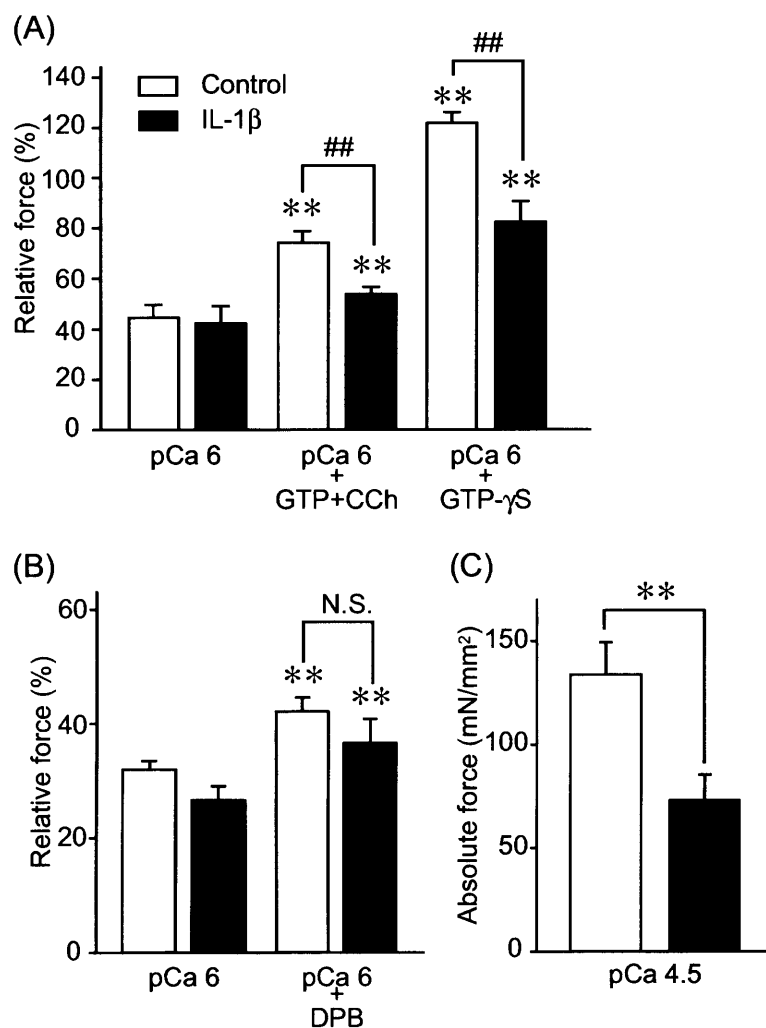


図18 IL-1βはRho活性化によるCa<sup>2+</sup>感受性の増加を抑制する。  
 ラット回腸平滑筋組織培養においてIL-1β (10 ng/ml) を3日間処置した後、α-toxin脱膜化標本を作製した。Ca<sup>2+</sup>濃度固定下 (pCa 6) の (A) carbachol (10 μM) とGTP (100 μM) の同時投与、またはguanosin 5'-O-3-thiotriphosphate (GTP-γS: 1 μM)、(B) 12-deoxy-phorbol 13-isobutyrate (DPB: 1 μM) によるCa<sup>2+</sup>感受性増加を測定した。相対張力はpCa 5のCa<sup>2+</sup>刺激による収縮力を100%として、その相対値で表した。(C) pCa 4.5のCa<sup>2+</sup>刺激による収縮力を絶対張力として表した。n=7-9。\*: p<0.01、N.S.: 有意差なし(対照との比較)。



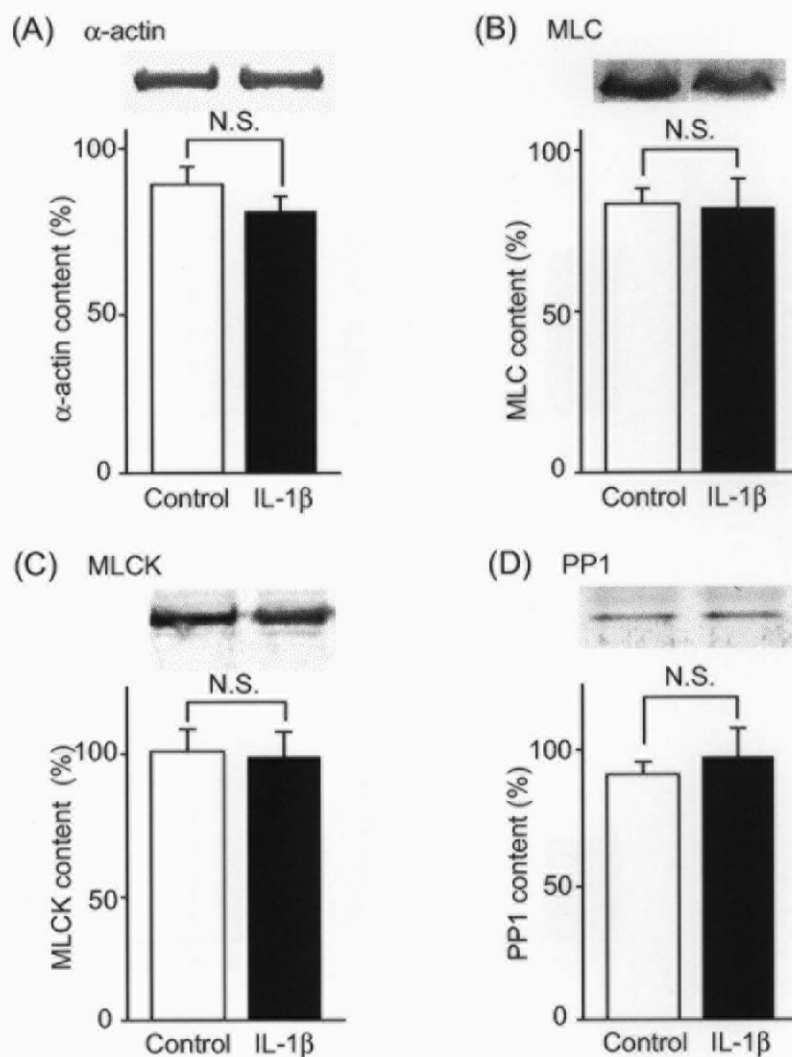


図19 IL-1 $\beta$ は $\alpha$ -actin、MLC、MLCK、PP1のタンパク質発現に影響を与えない。ラット回腸平滑筋組織をIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) 処置・非処置で3日間培養した標本における(A)  $\alpha$ -actin、(B) MLC、(C) MLCK、(D) PP1のタンパク質発現量をwestern blotting法で測定した。定量図は新鮮標本のバンド濃度を100%として、その相対値で表した。n=4-8。N.S.: 有意差なし (対照との比較)。

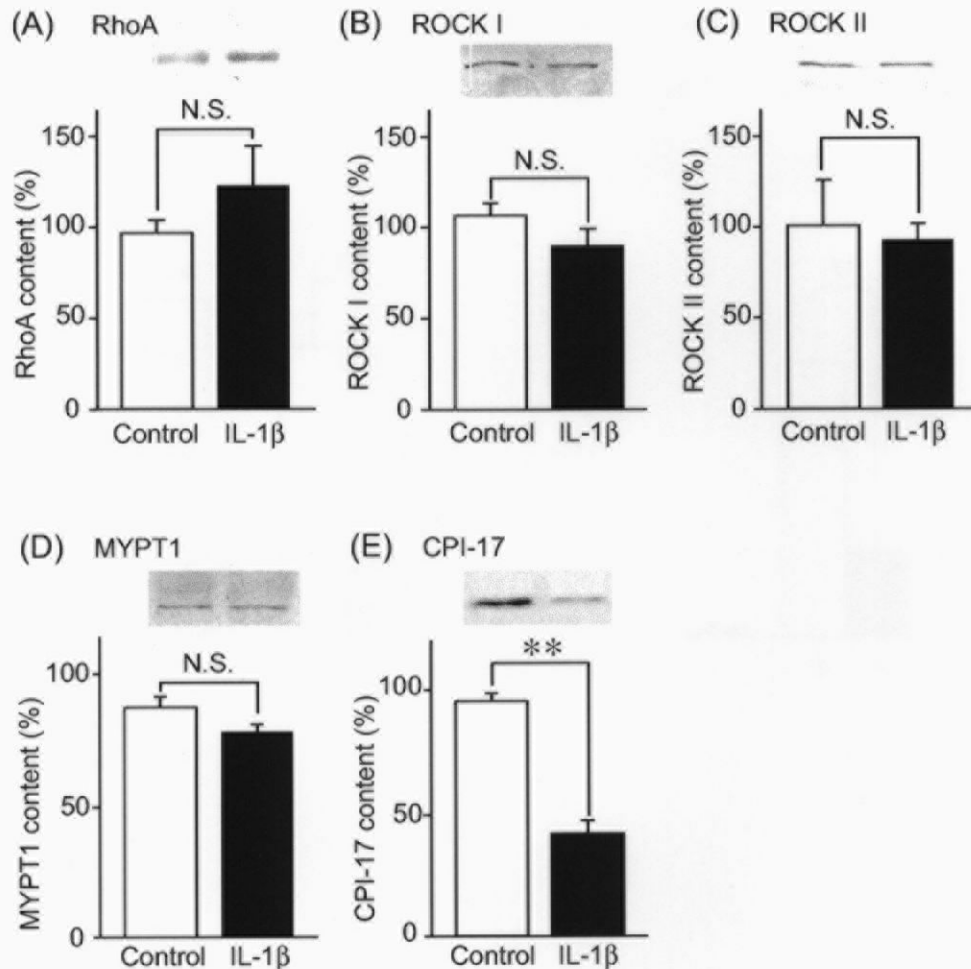


図20 IL-1βはRhoA、ROCK II/II、MYPT-1のタンパク質発現に影響を与えないが CPI-17タンパク質発現量を抑制する。

ラット回腸平滑筋組織をIL-1β (10 ng/ml) 処置・非処置で3日間培養した標本における (A) RhoA、(B) ROCK I、(C) ROCK II、(D) MYPT1、(E) CPI-17のタンパク質発現量を western blotting法で測定した。定量図は新鮮標本のバンド濃度を100%として、その相対値で表した。n=5-8。\*\*: p<0.01、N.S.: 有意差なし (対照との比較)。

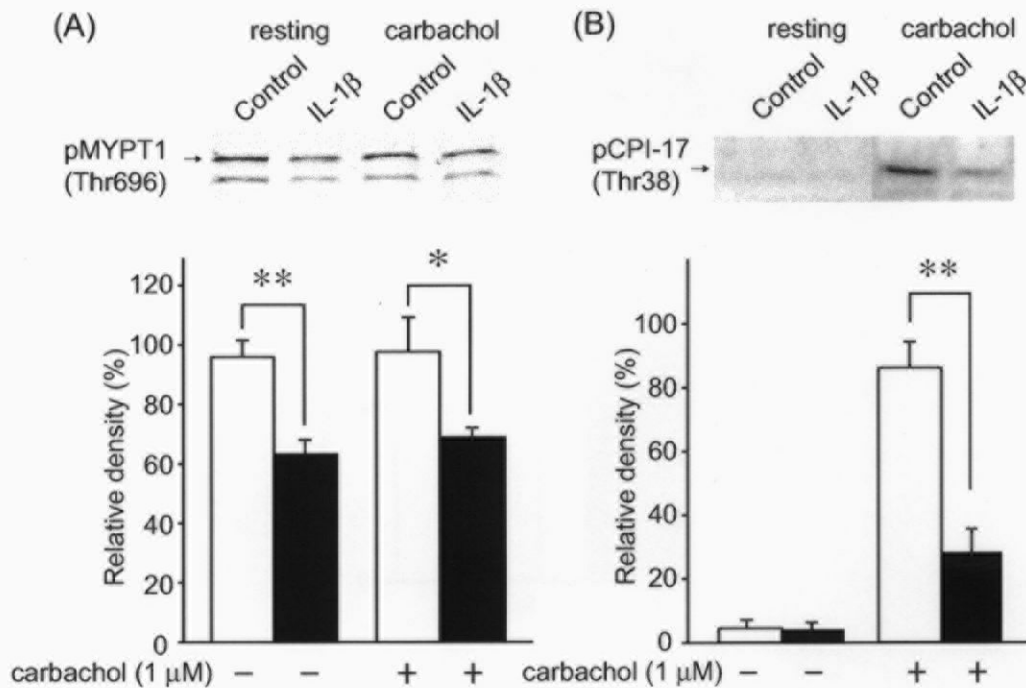


図21 IL-1 $\beta$ はMYPT1およびCPI-17のリン酸化レベルを低下する。  
 ラット回腸平滑筋組織をIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) 処置・非処置で3日間培養した標本における無刺激時とcarbacholで30秒間刺激した際の(A) MYPT1、(B) CPI-17のリン酸化レベルを、western blotting法で測定した。定量図は新鮮標本のバンド濃度を100%として、その相対値で表した。n=4-5。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

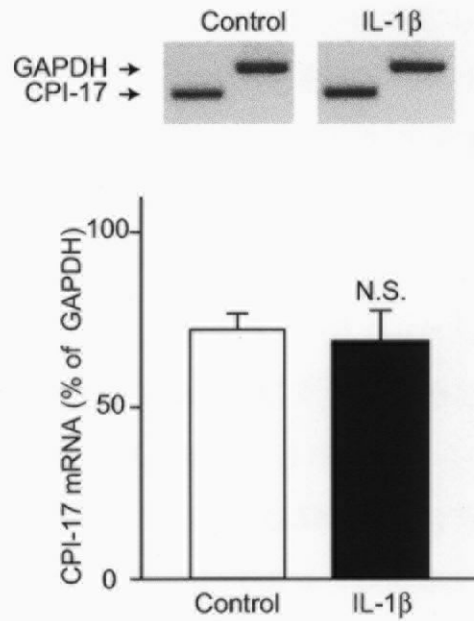


図22 IL-1 $\beta$ はCPI-17のmRNA発現に影響を与えない。  
 ラット回腸平滑筋組織をIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) 処置・非処置で3日間培養した標本におけるCPI-17のmRNA発現量をRT-PCR法を用いて測定した。定量図はGAPDHのバンド濃度を100%として、その相対値で表した。n=8。N.S.: 有意差なし (対照との比較)。