

メトトレキサートによる小腸上皮バリア
機能障害に関する研究

2010 年

濱田 和真

目次

略語一覧表.....	3
第1章 緒論.....	4
第2章 MTXによる小腸バリア機能障害のモデル確立およびその病態に関する 検討.....	9
第1節 序.....	9
第2節 結果.....	10
2-1 <i>In vitro</i> 反転腸管法を用いた小腸上皮透過性の評価	
2-2 小腸粘膜における luminol-enhanced chemiluminescence 法による ROS 産生および MPO 活性の測定による炎症反応の評価	
2-3 小腸粘膜におけるサイトカインおよび TLR4 の発現変化に関する検討	
第3節 考察.....	12
第4節 小括.....	15
第3章 MTXによる小腸バリア機能障害における TJ 分子の変化.....	21
第1節 序.....	21
第2節 結果.....	24
2-1 小腸バリア機能障害における ZO-1 の変化に関する検討	
2-2 小腸バリア機能障害における claudin-2, -4, -15 の変化に関する検討	
2-3 小腸バリア機能障害における occludin の変化に関する検討	
2-4 ZO-1 と claudin-4 もしくは occludin との結合に関する検討	
第3節 考察.....	26
第4節 小括.....	30

第4章 MTXによる小腸バリア機能障害に対する抗潰瘍剤 rebamipide の効果.....	39
第1節 序.....	39
第2節 結果.....	40
2-1 MTXによる小腸バリア機能障害に対する rebamipide の効果	
2-2 MTX処置小腸における ROS 産生、MPO 活性の上昇に対する rebamipide の効果	
2-3 MTX処置小腸における ZO-1 の変化に対する rebamipide の効果	
第3節 考察.....	42
第4節 小括.....	44
第5章 総括.....	50
実験の部.....	52
引用文献.....	64
論文目録.....	73
謝辞.....	74
審査委員.....	75

略語一覽表

AJ;	adherens junction
CINC-2;	cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2
CPE;	<i>Clostridium perfringens enterotoxin</i>
FD-4;	fluorescein isothiocyanate-dextran (average molecular weight; 4,400)
IL-1β;	interleukin-1 beta
IL-8;	interleukin-8
MALT;	mucosa-associated lymphoid tissue
MIP-2;	macrophage inflammatory protein-2
MPO;	myeloperoxidase
MTX;	methotrexate
NAC;	N-acetylcystein
NF-κB;	nuclear factor-kappa B
ROS;	reactive oxygen species
TER;	transepithelial electric resistance
TJ;	tight junction
TLR4;	toll-like receptor 4
TNF-α;	tumor necrosis factor-alpha
XO;	xanthine oxidase
ZO-1;	zonula occludens-1

第1章 緒論

我々は、鼻腔、口腔、気道、消化管、泌尿生殖器の粘膜や皮膚表皮といった多様な場所で体外環境と接している。それを視覚的に認識しやすい部分は皮膚表皮であるが、実際は粘膜が体外環境に接している面積の方が遥かに大きい。また、粘膜は mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)が体外環境に曝され、免疫応答が行われる主要な部位である。腸管では、絨毛および上皮細胞の管腔側膜における微絨毛構造によって 400 m²に及ぶ器官最大の粘膜表面積を創りだしている。ここには食物抗原や食物と共に摂取される外来微生物、100 兆個以上もの腸内細菌叢が存在しており、それらと腸管粘膜は絶えず積極的かつ適切な相互作用を行い体内環境の維持に寄与している。故に腸管は様々な抗原に対する自然・獲得免疫を司る場所として重要な役割を担っていると言える。

消化管管腔に代表される体外環境と MALT との相互作用の仲介において中心的な役割を担っているのが上皮細胞であり、それは粘膜表面を一様に覆い、体の内と外とを区切るバリアの役目を果たしている。上皮細胞が創り出すバリアの性質は皮膚上皮では非常に tight であるのに対して、多くの粘膜上皮ではその性質は leaky である。粘膜のこのような性質は、粘膜が担う多様な機能(液体やイオンの交換など)や器官特異的な機能を支えるために必要な性質である。よって上皮バリアの性質は器官によって、さらには器官の部位ごとの機能に適うように決められている。例えばネフロンでは、ある部位で特定のイオンの輸送を促進させたり、あるいは制限したりと部位ごとで上皮を介したイオンの透過性が異なる[1]。一方、腸管では crypt から villus にかけて透過できる分子の大きさが次第に小さくなるといった、部位によって分子の通過しやすさが違うことが報告されている[2]。

多くの粘膜表面はムチンを含む水和された粘液によって被われている。腸管では杯細胞がムチンを分泌して、細菌などの大きな粒子が直接上皮細胞膜に接触しないようなバリアを形成している[3]。ムチン遺伝子欠損マウスは腸炎を自然発症する[4]。また、粘液の水和レベルも生理的に重要であり、これは嚢胞性線維症で見られる粘液の粘稠化が肺、肝、膵、小腸などの臓器障害をもたらすことからわかる[5-7]。一方、微小分子はその粘液層を比較的容易に通過できるが、粘液の流れは制限され上皮細胞の表面に非攪拌水層を形成しているためイオンや小さな溶質の拡散は緩やかである。小腸においては

栄養が腸子縁膜上へ到達する速度が減少するため、その吸収が遅れる。しかしながら、これは腸子縁膜上に存在する消化酵素によって代謝された僅かな栄養が放出される程度を制限することに役立っている可能性が考えられている。非攪拌水槽の欠損と疾患の関連性は見られないが、セリアック病ではその水層の厚さが増加しており、この疾患の特徴である吸収不良症候群に関与している可能性が考えられている[8]。

粘膜バリア機能において最も重要な役割を担っているのは上皮細胞膜であり、そこに特異的な輸送担体が存在しない限りは多くの水溶性分子を透過させない。細胞間隙経路が閉じられることでこのようなバリア機能が創りだされる。この上皮バリア機能は管腔側に位置する **tight junction (TJ)** とその基底側にある **adherens junction (AJ)** から成る細胞間接着装置複合体によって制御されている[9]。TJ および AJ の形成はその近傍に密集している **actin** と **myosin** に裏打ちされ支えられている。

AJ による結合は細胞同士の距離を保ち、またそこでは細胞間伝達が行われる。AJ の欠損は細胞-細胞、細胞-細胞外マトリックの結合を破綻させ上皮細胞の極性化や分化の阻害、アポトーシス誘発をもたらす[10]。AJ は膜貫通タンパク質 **cadherin** からなり[11, 12]、それは同じ細胞膜上でシスダイマーを形成した後、隣接する細胞膜間でのそのシスダイマー同士がトランスダイマーを形成して細胞同士を接着させる[13, 14]。Cadherin の細胞内 C 末端領域が **β -catenin** と、そして **β -catenin** が **α -catenin** と結合している。 **α -catenin** は **actin** と結合すると同時に **actin** 重合を促進させ **cadherin** を介した AJ の形成に寄与している。一方、AJ による細胞間接着だけでは水、イオン、タンパク質などは細胞間隙を自由に通過させてしてしまうが、AJ の形成は細胞間隙の物質透過性を制御する TJ の形成をもたらす[15]。

TJ は膜貫通タンパク質、膜裏打ちタンパク質、キナーゼ等からなるタンパク質複合体である[16]。TJ はサイズおよびチャージ選択的なバリア機能を持っており、この機能の基本骨格は膜貫通タンパク質である **claudin family** が担っていると考えられている[17]。そして、膜裏打ちタンパク質 **ZOs** が **claudin** の TJ におけるバリア機能を支えている[18]。サイズ選択的なバリア機能は、例えば腸管では細菌と同程度の大きさをもつ分子は通過させないが、ある程度の大きさを持った溶質でも通過するという性質を持つ[19, 20]。一方、チャージ選択的なバリア機能は、培養上皮細胞に **claudin family** を発現させるとイオンの透過性が変化することから証明されており、この効果は陽イオンの透過性が上昇あるいは低下させることもあれば、陰イオンの透過性にほとんど影響を与え

ないことなど分子種によって効果が異なることが明らかとされている。また、細胞外領域の構造や荷電の分布を変えた claudin を発現させると、それに応じて TJ バリアのチャージ選択性が変化することから[21]、claudin 細胞外領域がチャネルのようなものを形成してイオン透過を制御していると考えられている。このように TJ はサイズ、そしてチャージ選択的なバリア機能をもっておりそれぞれの性質は独立して、あるいは協調して様々な生理的、病態の刺激によって制御されている。近年、炎症性腸疾患、感染症、癌など様々な病態と TJ バリアの機能低下が密接に関与していることがわかってきたことから[22-24]、それら病態の解明、治療法開発のターゲットとして TJ 分子が注目されている。さらに、血液脳関門、消化管での透過性が低いため薬効があっても実用化できない化合物が存在するといった現状から、TJ バリアを人為的に操作して薬物送達を改善しようという試みもなされている。また、claudin 遺伝子の欠損あるいは変異が、疾患発症や臓器機能に影響を与えることがノックアウトマウスやヒトで報告されており[25-29]、個体レベルでの TJ バリアの重要性が明らかになりつつある。

Methotrexate (MTX)は、古くから白血病など悪性腫瘍の治療、現在では関節リウマチの治療など臨床で広く使用されている薬剤である。MTX による副作用には、口内炎、脱毛、肝機能障害がよく知られており、重篤なものとしては血液障害、間質性肺炎、感染症が報告されている。また、腸管上皮は MTX に対する障害感受性が骨髄より高いこと[30]、腸粘膜障害は本剤の臨床使用を制限させる代表的な副作用であることが報告されている[31]。がん化学療法剤による腸粘膜障害の病態として Sonis により five-phase model; (1) initiation, (2) upregulation and message generation, (3) signaling and amplification, (4) ulceration, and (5) healing が提唱されている[32]。このモデルは、(1) initiation; 可逆的もしくは不可逆的な DNA 損傷、活性酸素種(ROS)の産生、ROS 依存的あるいは非依存的なシグナルの活性化、(2) upregulation and message generation; 上皮細胞、マクロファージ、血管内皮細胞において NF- κ B などの転写因子が活性化され、様々な遺伝子発現が起こる、(3) signaling and amplification; シグナル、エフェクター分子(サイトカイン等)が産生され粘膜障害が生じる。同時にこれら一連の反応にフィードバックがかかり、粘膜障害がさらに増幅される。(4) ulceration; この期にすべての反応が最大となり上皮が破壊される。また、潰瘍面に付着した細菌由来の細胞壁成分が粘膜を通過し、マクロファージの活性化を介してサイトカインを放出させ、さらに粘膜障害を増強させるだけでは

なく菌血症や敗血症などの全身性疾患のリスクを高める。(5) healing; 最終的に自然治癒にいたるといふものである。MTX による小腸粘膜障害に対する治療あるいは予防は、このモデルを考慮し病態の分子メカニズムに基づいて行われることが必要となるが、このモデルにおいては腸バリア機能障害の分子メカニズムは示されていない。これらの背景から、本研究は TJ 構成分子が MTX による腸バリア機能障害時にどのようなに変化しているのか検討し、その障害の分子メカニズムに新たな知見を加えることを目的とした。

本研究の第 2 章では MTX による小腸バリア機能障害の実験モデル確立およびその病態を Sonis のモデルに基づいて検討した。小腸バリア機能は細胞間隙透過性のマーカー分子である FITC-dextran (average molecular weight 4,400; FD-4)の透過量を *in vitro* 反転腸管法を用いた透過実験により算出することで評価した。また、*in vitro* での小腸粘膜における ROS の産生はルミノールを用いた化学発光測定法により評価した。炎症反応は好中球浸潤のマーカー酵素である myeloperoxidase (MPO)活性の測定およびサイトカイン発現等について real time RT-PCR、Western blot 法により評価した。

第 3 章では MTX 処置ラット小腸における TJ 構成分子 ZO-1、claudin、occludin の変化を Western blot 法、免疫沈降法、免疫染色法によってそれぞれ評価することで、小腸バリア機能障害の機序について検討した。

第 4 章では、ROS 産生および ZO-1 の変化が MTX による小腸バリア機能障害にどのように関与するのかを明らかにする目的で抗酸化作用を有する薬剤 rebamipide の効果を検討した。

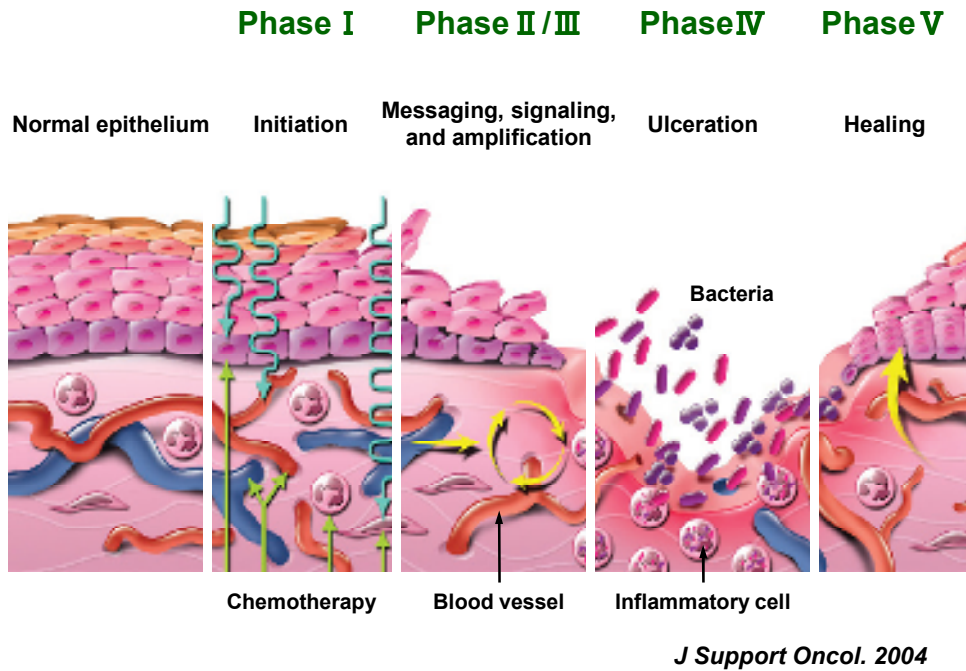


Fig. 1 Sonis five-phase model of mucositis

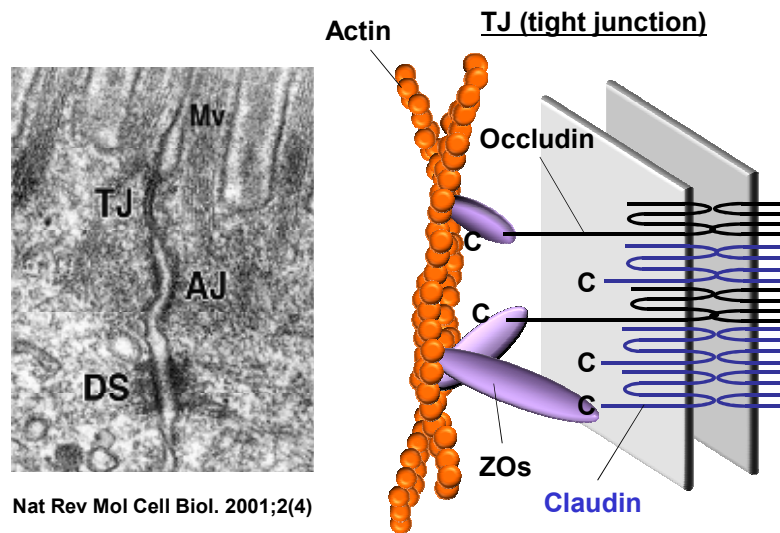


Fig. 2 Proposed molecular model of tight junction in epithelial cells

第2章 MTXによる小腸バリア機能障害のモデル確立およびその病態に関する検討

第1節 序

腸管粘膜障害は MTX の使用時に良く見られる副作用である。これは、MTX の適切な投与量あるいは投与計画を妨げ、治療成績を低下させることから、この障害に対する治療法あるいは予防法の開発が囑望されている。現在、MTX など化学療法剤による粘膜障害の病態は、Sonis が提唱している five-phase model [32]; (1) initiation, (2) upregulation and message generation, (3) signaling and amplification, (4) ulceration, and (5) healing が広く受け入れられており、このモデルに準じて粘膜障害の治療が行われている。しかしながら、このモデルは化学療法剤全般に適用できるというもので、個々の薬剤おける病態メカニズムを示したものではない。MTX による腸管粘膜障害に対して効果的な治療を行うためには、MTX による粘膜障害の分子メカニズムを明らかにする必要がある。一方、腸粘膜障害は腸上皮のバリア機能の低下と良く関係しており、腸バリア機能は最も apical 側に位置する細胞間接着装置 TJ によって制御されている[33-37]。

これらのことから、本研究は MTX による小腸バリア機能障害に新たな知見を加えることを目的として、小腸 TJ 分子の変化について検討することを計画した。そこで本章では、MTX による小腸バリア機能障害モデルを確立した。また、確立したモデルの病態を明らかにする目的で Sonis の five-phase model に準じて、MTX 処置小腸における ROS 産生、炎症応答について検討した。

第2節 結果

2-1 *In vitro* 反転腸管法を用いた小腸上皮透過性の評価

水溶性の高い難吸収性化合物である FD-4 は、細胞間隙透過性の指標として幅広く使用されている[34, 35, 38]。 *In vitro* 反転腸管法を用いて、FD-4 のラット小腸粘膜透過性に対する MTX の日数依存的な効果を検討した。MTX を4日間投与した群では透過実験開始後30分において、また5日間投与群では透過実験開始後20、30分においてFD-4の透過量が対照群に比して有意に上昇した(Fig. 4a)。一方、3日間投与群では対照群と比べてFD-4の透過量に明らかな変化は認められなかった。透過実験開始から10分以降でFD-4の透過量に線形が見られていることから、10分、30分におけるFD-4透過量を用いて、その透過クリアランスを算出した。MTX投与4日間、および5日間投与で対照群に比してFD-4の透過クリアランスが有意に上昇した(control, 0.130 ± 0.010 ; 4 days, 0.242 ± 0.039 ; 5 days, $0.297 \pm 0.016 \mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}$) (Fig. 4b)。MTXの投与期間によって、Sonisのモデルにおける異なる区分の小腸粘膜障害を発症している可能性が考えられるが、小腸バリア機能障害が惹起される最小の投与期間であるMTX4日間投与を本研究のモデルとして用いることとし、以降の研究を進めた。

2-2 小腸粘膜における luminol-enhanced chemiluminescence 法による ROS 産生および MPO 活性の測定による炎症反応の評価

化学療法剤による ROS 産生が腸粘膜障害の発症における initiation factor として提唱されている[32]。そこで、光増感剤ルミノールを用いて小腸粘膜ホモジネートにおける ROS 産生を評価した。MTX 投与群およびコントロール群ともに経時的な化学発光の上昇が見られたが、MTX 投与群ではより強い化学発光が見られた(Fig. 5a)。5分間での化学発光の累積値を比較したところ、MTX 投与群では対照群に比して小腸粘膜での化学発光が有意に上昇した(Fig. 5b)。一方、炎症組織には好中球、マクロファージ、単球などの多核白血球が浸潤することが知られている。そこで好中球のマーカー酵素である

MPO の小腸粘膜での活性を評価したところ、MTX 処置群では対照群と比較して小腸粘膜における MPO 活性は有意に上昇した(Fig. 5c)。

2-3 小腸粘膜におけるサイトカインおよび TLR4 の発現変化に関する検討

化学療法剤による ROS 産生は上皮細胞やマクロファージにおいて、NF- κ B などの転写因子を活性化させることで、サイトカインなど様々な遺伝子発現を誘導し粘膜障害を引き起こすとされている。そこで、MTX 処置ラット小腸におけるサイトカイン発現を real time-RT-PCR 法により評価した。MTX 処置群では対照群に比して Th1 サイトカインである TNF- α 、IL-1 β の発現が有意に上昇した(Fig. 6)。また、前項で MTX 処置群において MPO 活性の上昇が見られたことから、好中球浸潤のトリガーである CXC ケモカイン \searrow macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) および cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-2) の発現変化について検討した。MTX 処置小腸では、対照群と比較して MIP-2 の発現が上昇することが明らかとなった。一方、CINC-2 は MTX 処置群、対照群と比較して明らかな変化はみとめられなかった(Fig. 6)。ROS を介した Th1 サイトカインの発現において toll-like receptor 4 (TLR4) が重要な役割を担っていることが報告されており [39, 40]、本障害においてもその関与が推察された。よって、その発現変化を検討した。MTX 処置小腸粘膜において TLR4 の発現が有意に上昇することが明らかとなった(Fig. 6)。

第3節 考察

本章では MTX による小腸バリア機能障害の機序を検討するための実験モデルを作製した。反転腸管法を用いて FD-4 の透過量から小腸粘膜透過性を評価したところ、MTX を 4 日以上投与することで、小腸バリア機能が障害されることが明らかとなった(Fig. 4)。化学療法剤による粘膜障害の発症時期は、上皮の turnover rate が決定因子のひとつと考えられており[41]、哺乳動物の腸上皮のそれは 24-96 h であることが報告されている[42]。本検討から、MTX によって腸バリア機能が低下する時期も粘膜障害と同様、腸上皮の turnover rate が関与していると考えられる。

これまでに MTX を静脈内投与したラットにおいて小腸で ROS が産生した後、粘膜への好中球浸潤および小腸透過性亢進が見られることを明らかにしている[43, 44]。また、抗酸化物質 N-acetylcystein (NAC)を併用することでそれらが抑制されたことから、MTX による ROS 産生が炎症応答とバリア機能障害の重要な引き金であると報告した[44]。本検討で用いた経口投与モデルにおいても、MTX 処置により小腸での ROS 生成および好中球の浸潤が見られ(Fig. 5)、バリア機能障害と ROS 産生そして炎症応答の関連性が示された。これらのことから MTX の静脈投与、あるいは経口投与により惹起される腸バリア機能障害はいずれも ROS 産生が関与しており、これは Sonis の提唱する粘膜障害モデルの病態と良く一致していることから有用な実験モデルであると考えられる。

MTX による好中球浸潤に寄与する因子を明らかにする目的で、小腸粘膜における好中球浸潤のトリガーである 2 つの CXC ケモカインの発現について検討したところ、MTX 処置によって MIP-2 が有意に上昇することが明らかとなった(Fig. 6)。一方、CINC-2 の発現は MTX 処置群と未処置群で明らかな差は認められなかった。同様に、ROS 産生および好中球の浸潤が腸バリア機能低下に寄与する腸虚血再灌流モデルにおいて、抗酸化物質 allopurinol の投与が腸粘膜での MIP-2 の産生を抑制すること、そして好中球の浸潤が MIP-2 の阻害によって抑制されることが報告されている[45]。また、MIP-2 のレセプターである CXC Receptor 2 遺伝子欠損マウスでは炎症刺激による腸粘膜への好中球浸潤が抑制されること[46]、さらにトランスジェニックマウスのモデルによって腸粘膜への好中球浸潤は CXC ケモカインである IL-8 の発現上昇だけで起こることが明らかに

されている[47]。そして、好中球に対する特異的な阻害剤がインドメタシンによる小腸粘膜障害を緩和させることが報告されている[48]。これらのことから、ROS 産生が引き金となる MTX による腸バリア機能障害には好中球の浸潤が密接に関与しており、そして腸粘膜へ好中球が浸潤する過程には ROS 依存的な MIP-2 の発現上昇が重要な役割を担っていると推察された。MTX による MIP-2 の産生部位としては腸上皮および粘膜下に存在するマクロファージが考えられ、それらは ROS を作用させると IL-8 や MIP-2 を産生することが報告されている[49, 50]。

さらに Sonis のモデルに従い、ROS 依存的な経路で産生され腸バリア機能障害に関与していると考えられている Th1 サイトカインの発現変化について検討したところ、MTX 処置小腸粘膜において TNF- α および IL-1 β の発現が有意に上昇していることが明らかとなった(Fig. 6)。好中球が腸粘膜に集積する過程において、血管内皮上で rolling、adhesion というステップを経る。Rolling に関与している接着分子として P-, E-, L-selectin が知られており、TNF- α や IL-1 β といった Th1 サイトカインによって血管内皮に E-selectin が発現する[51]。これより、MTX による TNF- α 、IL-1 β の発現上昇が好中球の rolling へ寄与していることが考えられた。一方、これまでに TNF- α 、IL-1 β の発現上昇が MTX による腸粘膜障害に重要な役割を担っている可能性が示唆されており[52-54]、これらのサイトカインは MTX 投与後、数時間で発現上昇が見られるという報告もある。炎症性サイトカインのこのような短時間での発現上昇は、ROS や TLR4 のリガンドである LPS による刺激で見られる[40, 55]。また、ROS による Th1 サイトカインの産生には、TLR4 の下流シグナルである、TRAF6-apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)-p38 経路が必要であることが報告されている[39]。TLR4 の変異マウスは wild type と比較して MTX による腸粘膜障害が軽度であり、また MTX を投与したマウスから単離したマクロファージは LPS 刺激による TNF- α の産生がより強く見られる。これらのことは、TLR4 を介した経路が MTX による小腸粘膜障害の重症度を左右する因子であること、また TLR4 の発現が MTX 処置によって上昇している可能性を示唆している。興味深いことに、本検討から MTX 処置小腸において TLR4 の発現が有意に上昇することが明らかとなった(Fig. 7)。

MTX は免疫抑制、抗炎症作用を有する薬剤であるにも関わらず粘膜障害を惹起し、そこには腸管での免疫応答のインバランスが関与していることが本検討および過去の研究から示された[52-54]。このような知見から、腸粘膜障害は、すでに知られているような MTX の薬理作用とは独立したメカニズムで生じていると推察される。MTX によ

る腸粘膜障害は小腸において大腸より起こり易いこと、小腸は大腸に比べて TLR4 の発現が高いこと、上述したように TLR4 を介した炎症応答に ROS が必要であること、そして得られた結果を踏まえて考えると、MTX による小腸バリア機能障害は、MTX によって産生される ROS が TLR4 の下流シグナルを介して MIP-2、TNF- α 、IL-1 β を産生させるという機序で起こっている可能性が推察された。Luminol を用いた化学発光の測定は感度が高い一方で、多種類の ROS を検出するため本モデルにおいてこういった ROS が小腸バリア機能障害に関与しているか明らかではない。しかしながら、MTX による ROS 産生および好中球の浸潤が tungsten の併用により有意に阻害されることから[43]、ROS 産生部位として xanthine oxidase (XO)が関与していると考えられる。XO から産生される ROS としては H₂O₂が major であること[56]、そして H₂O₂は TLR4 の経路を介して本検討で見られるような Th1 サイトカインを産生させることから[39, 55]、MTX による小腸バリア機能障害には H₂O₂の寄与が大きいかもしれない。

第4節 小括

本章では、MTXによる小腸バリア機能障害のモデルを確立する目的でラット小腸におけるFD-4の粘膜透過性を反転腸管法により評価した。また、確立したモデルの病態を理解する目的で、小腸粘膜を用いてROS産生、MPO活性、免疫応答変化について検討した。以下に得られた知見を要約する。

1. MTXを4日間以上投与することでFD-4の小腸透過性が有意に上昇したことから、この投与期間において小腸上皮バリア機能が障害されることが明らかとなった。
2. MTXを4日間投与した小腸粘膜において、ROS産生、MPO活性が有意に上昇したことから、酸化ストレス、好中球浸潤がバリア機能障害に関与している可能性が示唆された。
3. MTXを4日間投与した小腸粘膜においてTNF- α 、IL-1 β 、MIP-2、TLR4の発現が有意に上昇しており、炎症応答が小腸バリア機能障害に関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、本モデルにおいて、MTXは小腸バリア機能障害時に、ROS産生、サイトカン発現を伴うことが示唆された。これはSonisにより提唱されているモデルのphase (3) signaling and amplificationの病態に一致しており、MTXによるROS産生が引き金となり炎症応答および小腸上皮バリア機能障害が発症したと考えられる。

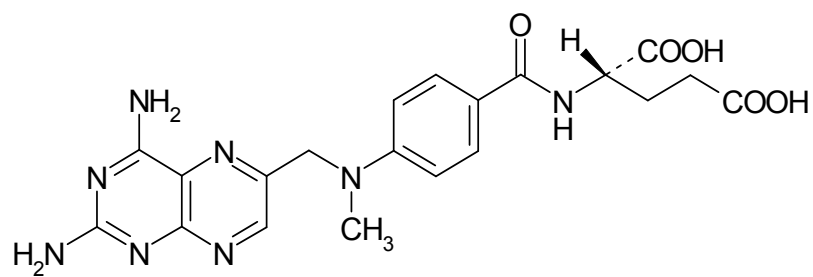


Fig. 3 Chemical structure of methotrexate

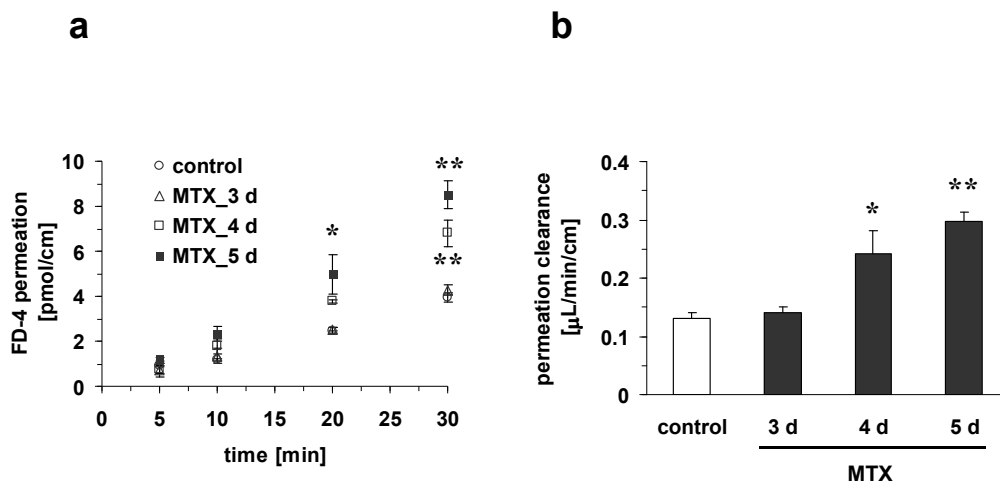


Fig. 4 Effect of MTX treatment on intestinal permeability in rats. **a** Time-course analyses of FD-4 permeation and **b** permeation clearance of FD-4 were performed using *in vitro* everted sac experiments, as described in the “Materials and methods” section. Data represent the means \pm SEM (n = 4). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significantly different from control rats

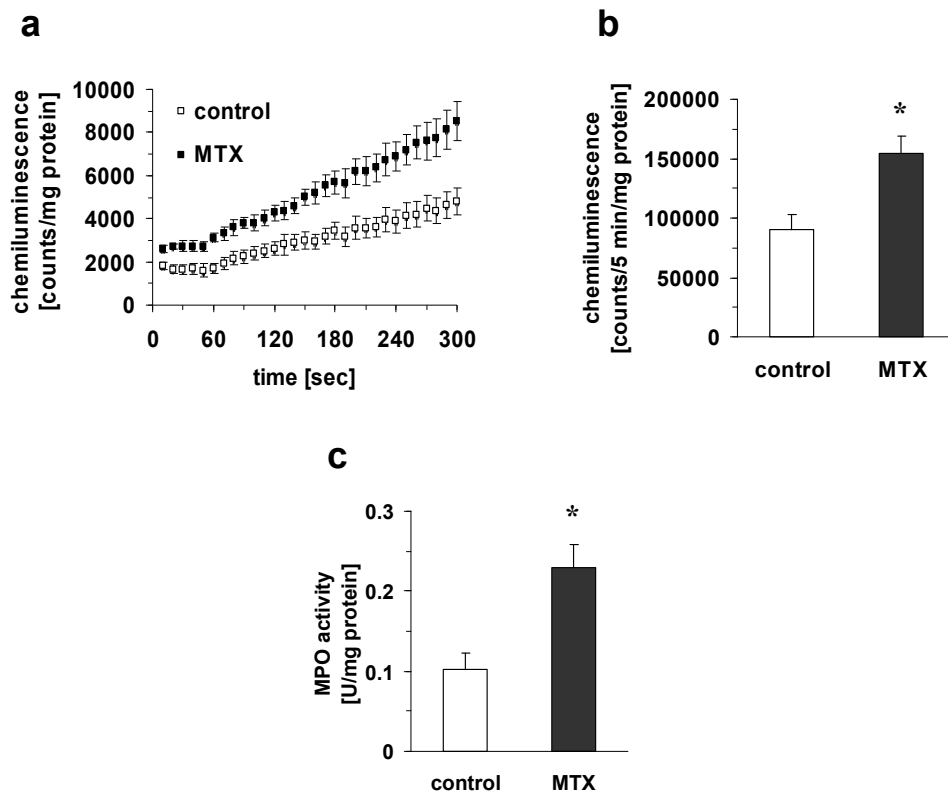


Fig. 5 MTX-induced increase in ROS production (**a**, **b**) and MPO activity (**c**) in the rat intestine. **a**, **b** Luminol-enhanced chemiluminescence and **c** MPO activity were measured in the intestinal mucosa as described in the “Materials and methods” section. Data represent the means \pm SEM (n = 4). * $P < 0.05$, significantly different from control rats

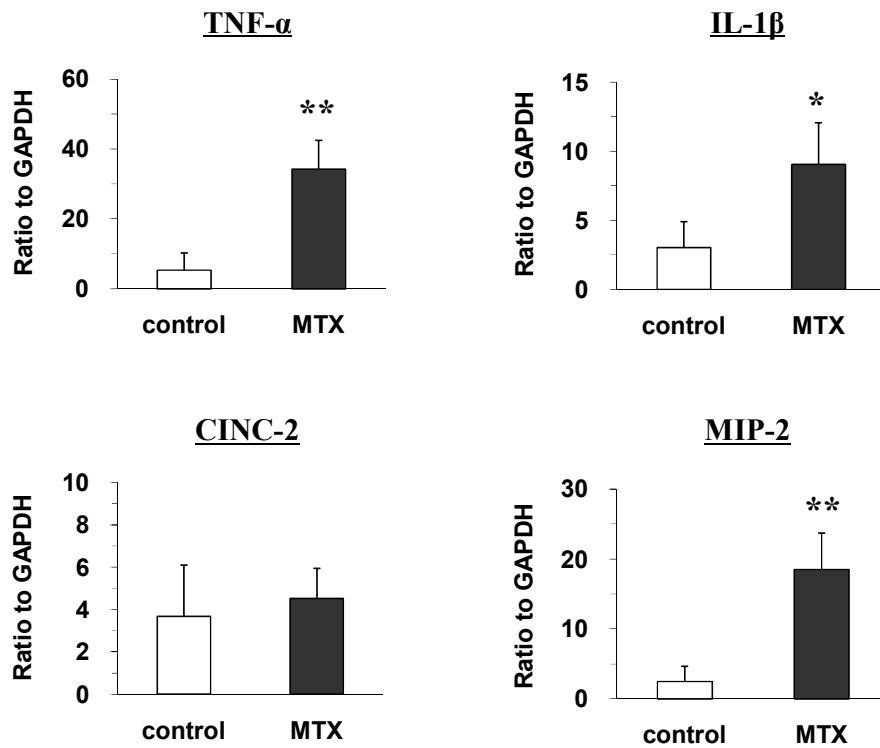


Fig. 6 Effect of MTX on the cytokines production in the rat intestine. Cytokine productions were determined by real time RT-PCR. Data represent the means \pm S.D. (n = 4). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significantly different from control rats

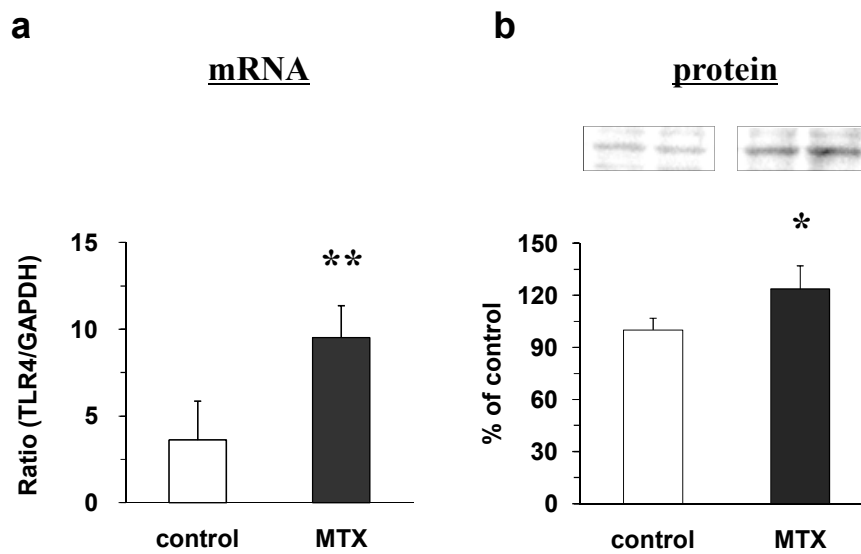


Fig. 7 Effect of MTX on the expression of TLR4 in the rat intestine. The expression levels of intestinal mucosa-derived TLR4 were detected using real time RT-PCR (**a**) and Western blot analysis (**b**). **a** Quantization of TLR4 mRNA-specific signals is shown as the ratio after normalization to GAPDH expression. **b** Tissue extracts were directly immunoblotted for TLR4. Data represent the means \pm S.D. ($n = 4$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significantly different from control rats.

第3章 MTXによる小腸バリア機能障害における TJ 分子の変化

第1節 序

先の検討において MTX による小腸バリア機能障害のモデルを確立した。また、この障害時に ROS 産生、炎症応答が小腸粘膜上皮で生じていることが明らかとなった。小腸上皮バリア機能は TJ によって制御されていることから、TJ を構成する分子の発現あるいは機能変化は TJ バリアの機能低下につながると考えられる。これまでに、腸透過性が亢進する病態や実験モデルにおいて、TJ 分子の変化とバリア機能の関連性について研究がなされているものの、実験モデルや病態によって変動する TJ 分子が異なることから、どの TJ 分子の変化がバリア機能障害に直接つながるのか統一した見解は得られていない。このことは、病態あるいはモデルごとでバリア機能障害時の TJ 分子の変化を明らかにする必要性を示唆している。本章では確立したモデルを用いて、MTX による小腸バリア機能障害において TJ 分子がどのように変化するか検討した。

TJ はタンパク質複合体であり、それを構成する代表的な分子として 4 回膜貫通タンパク質である occludin、claudin family、膜裏打ちタンパク質である ZO-1, -2, -3 などが同定されている[57-61]。Claudin family が TJ の基本構造である TJ ストランドを構成する主要な分子であり、TJ のバリア機能において中心的な役割を担っていることが明らかとされている[17]。一方、claudin が TJ に局在して機能するためには自身の細胞内 C 末端領域を介して、ZO-1 あるいは ZO-2 の PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) ドメインと結合して局在制御されることが必要である[18]。これらのことから、ZO-1 の発現あるいは局在変化は claudin との相互作用に影響することで、TJ のバリア機能低下につながる可能性が考えられる。そこで、はじめに MTX による小腸での ZO-1 の変化について検討した。

Claudin の発現パターンは組織、細胞ごとで異なっており、そのような発現の多様性が器官特異的な TJ バリアの性質を創り出していると考えられている。ここに、腸管における claudin 発現パターンを示す(Fig. 8)。このように、腸管では十二指腸から大腸にかけて、さらには crypt から絨毛先端にかけて発現する claudin 分子種が異なっている。本研究では実験で用いる空腸における発現量が高く、かつ空腸における発現パターンが異なる 3 つの claudin 分子種(claudin-2, -4, -15)に着目してその変化について検討した。一

方、occludin は TJ を構成する膜貫通タンパク質として最初に同定された分子であるが、腸上皮バリアにおける役割は明らかとされていない。そこで occludin が MTX による腸上皮バリア障害時にどのように変化するか検討を試みた。これら一連の TJ 分子の変化に関する検討結果を踏まえ、MTX による TJ バリア障害における ZO-1 の重要性を明らかにする目的で、ZO-1 と claudin-4 および ZO-1 と occludin の相互作用について検討した。

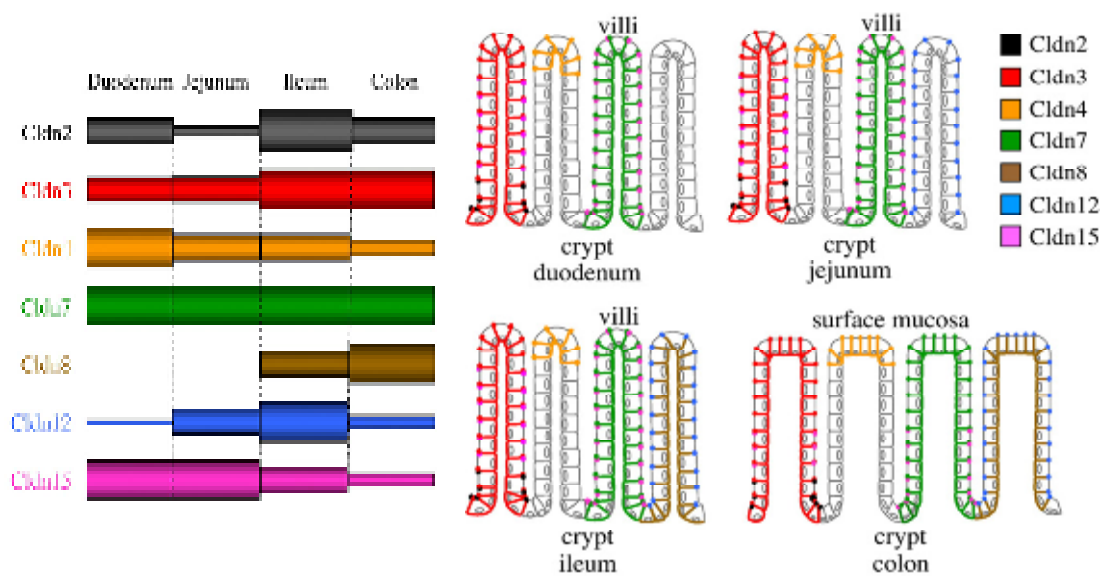


Fig. 8 Differential expression profile of claudin in the intestine. *Biochim Biophys Acta*, 2007
より引用

第2節 結果

2-1 小腸バリア機能障害における ZO-1 の変化に関する検討

MTX 処置ラット小腸での ZO-1 発現変化を RT-PCR 法、Western blot 法により評価した。ZO-1 の mRNA、タンパク質レベルは MTX 処置群と対照群で明らかな違いは認められなかった(Fig. 9a, b)。次に ZO-1 のリン酸化状態の変化が TJ のバリア機能に影響を及ぼす可能性が報告されていることから[62]、ZO-1 のチロシンリン酸化レベルを免疫沈降法により評価した。MTX 処置群では対照群と比較して ZO-1 のチロシンリン酸化が有意に低下することが明らかとなった(Fig. 9c)。このようなタンパク質の翻訳後修飾は自身の細胞内局在に影響を及ぼすことが考えられたため、小腸凍結切片を作製して、ZO-1 の発現を免疫染色法により評価した。対照群では上皮細胞接着部位での ZO-1 の染色が見られ、TJ に局在していることが示された。一方、MTX 処置小腸においては、上皮細胞接着部位での ZO-1 の染色の脆弱が見られた(Fig. 10)。

2-2 小腸バリア機能障害における claudin-2, -4, -15 の変化に関する検討

本章 1 節で述べたように claudin-2,-4,-15 について検討を行った。はじめに、それら claudin 分子種の発現量を Western blot により評価した。MTX 処置群では claudin-2 の発現量が対照群に比較して有意に上昇することが明らかとなった(Fig. 11)。一方、claudin-4 および claudin-15 の発現量は MTX 処置群と対照群で明らかな差は認められなかった(Fig. 11)。次に小腸凍結切片を用いて、それら claudin 分子種の発現について免疫染色法により評価した。MTX 処置小腸では、claudin-2 の発現が上昇した(Fig. 12)。また、claudin-2 の発現上昇は crypt で強く起こっているだけでなく、対照群とは異なり絨毛先端にまで発現することが明らかとなった。さらに、MTX 処置小腸では対照群と比較して、絨毛先端部位における claudin-4 の発現が低下することが明らかとなった(Fig. 13)。Claudin-15 は対照群、MTX 処置群ともに上皮細胞接着部位における染色が見られ、両群間で明らかな差は認められなかった(Fig. 14)。

2-3 小腸バリア機能障害における occludin の変化に関する検討

MTX による小腸バリア機能障害に対しての occludin の関与を検討する目的で、その発現変化を real time-RT PCR 法、Western blot 法により評価した。MTX 処置小腸では occludin の mRNA は有意に低下しているものの、タンパク質レベルでは対照群と比較して明らかな差は認められなかった(Fig. 15)。

2-4 ZO-1 と claudin-4 もしくは occludin との結合に関する検討

Claudin-4 および occludin のそれぞれについて ZO-1 との相互作用について検討した。免疫沈降法による検討から、MTX 処置小腸において ZO-1 と claudin-4 の結合が有意に阻害されることが明らかとなった(Fig. 16)。また、ZO-1 と occludin の結合も阻害されている傾向が見られたものの、その差は有意なものではなかった。

第3節 考察

本章では、MTXによる小腸バリア機能障害の機序に新たな知見を加える目的で TJ 分子の変化について検討した。TNF- α および ROS によって TJ バリアが障害される際、ZO-1 の局在やリン酸化が変化することが報告されている[63, 64]。よって、MTX 処置で見られた ROS 産生や炎症性サイトカンの発現上昇は、このような ZO-1 の変化をもたらす小腸バリア機能低下につながることを考えられる。そこで、小腸における ZO-1 の変化を検討した。MTX 処置小腸では ZO-1 の発現量に明らかな変化は認められなかったものの、そのチロシンリン酸化レベルが低下しており、この変化がバリア機能障害に関与している可能性が示唆された(Fig. 9)。これまでに、TJ バリアが障害あるいは形成される際に ZO-1 のチロシンリン酸化が変化することが報告されているが、そのリン酸化の影響は細胞ごとで異なっており議論の余地がある[65]。例えば、Caco-2 細胞に酸化ストレスを与えて細胞間隙の透過性を亢進させると、ZO-1 の発現量に変化は見られないものの、そのチロシンリン酸化が上昇する[63]。Ras を発現させた MDCK 細胞、そして A431 細胞においては TJ が形成する過程で ZO-1 のチロシンリン酸化が上昇する[65, 66]。一方、*mdr1a*^{-/-}マウスにおける自然発症腸炎時、およびセリアック病患者における腸バリア機能低下時では ZO-1 のチロシンリン酸化が低下する[34, 67]。このように、ZO-1 チロシンリン酸化の変化が TJ のバリア機能の低下および TJ 形成のいずれにも関係していることが示されているため、そのリン酸化の役割について明確な結論は得られていない。しかしながら、MTX による小腸バリア機能障害においては、ZO-1 のチロシンリン酸化レベルが有意に低下しており、これはこれまでのヒトやマウスでの TJ バリア機能低下時の報告と一致していた。近年、Caco-2 細胞において pseudo substrate や knockdown によって PKC η を阻害すると TJ のバリア機能が低下することが報告された。ここでは上述した酸化ストレスによる TJ バリア機能低下の場合とは異なり、PKC η の阻害は TJ における ZO-1 の局在を低下させるものの、そのチロシンリン酸化は変化させなかった[68]。このような知見を踏まえると、ZO-1 のチロシンリン酸化の役割は細胞種での違いではなく、TJ 構成分子と相互作用する kinase の違いで部分的に説明できる可能性が考えられた。

MTX により ZO-1 のチロシンリン酸化の低下が見られ、この変化が ZO-1 の TJ にお

ける発現に影響する可能性が考えられたため、小腸凍結切片を用いて免疫染色法により ZO-1 の発現について検討した。対照群では小腸上皮細胞接着部位での ZO-1 の染色が見られ、TJ に局在していることが示唆された(Fig. 10)。一方、MTX 処置小腸ではその染色が減少しており、TJ における ZO-1 の発現が低下することが明らかとなった(Fig. 10)。この結果から、MTX による ZO-1 の TJ での発現低下は自身のチロシンリン酸化の低下が関与している可能性が考えられた。TJ のバリア機能は、膜貫通タンパク質である claudin の polymerization によって担われている[29, 69, 70]。しかしながら、ZO-1 を欠損させた上皮細胞では claudin が発現していても TJ が全く形成されなく、claudin が TJ の部分において polymerization するためには ZO-1 と直接相互作用することが必要である[18]。これより、MTX による ZO-1 の TJ での発現低下が腸バリア機能低下につながった機序として、claudin との相互作用が阻害されたことが考えられた。

Claudin は 24 種類のアイソフォームが同定されており、消化管における発現パターンが部位ごとで異なっている。本章 1 節で述べたように小腸における claudin-2, -4, -15 について検討を行った。それら claudin 分子種の発現量を Western blot により評価したところ、MTX 処置により claudin-2 の発現が有意に上昇することが明らかとなった(Fig. 11)。一方、claudin-4 および claudin-15 の発現は MTX 処置群と対照群を比較して明らかな変化は見られなかった(Fig. 11)。さらに、3 種類の claudin 分子種の発現について小腸凍結切片を用いて免疫染色法により評価した。MTX 処置小腸では claudin-2 の発現上昇が見られ、Western blot による結果と一致していた(Fig. 12)。また、その発現上昇は crypt において強く見られること、そして対照群とは異なり絨毛全体にわたり発現していることが明らかとなった。潰瘍性大腸炎、クローン病といった腸バリア機能障害を伴う疾患において claudin-2 の発現が上昇すること[36, 71]、また claudin-2 を上皮細胞株に発現させるとカチオンの透過性上昇や transepithelial electric resistance (TER)の低下が見られることから[72, 73]、claudin-2 は TJ バリアにおいて leaky に働いている可能性が提唱されている。これらのことから MTX による claudin-2 の発現上昇は、小腸 TJ バリアの機能低下に関与していると考えられた。一方、消化管において claudin-2 は通常 crypt に発現しているため、どのようにしてバリア機能低下につながるのかについては説明がつかない。MTX 処置小腸において claudin-2 の発現が絨毛の全体で発現していることが示され、このような claudin-2 の発現する部位の変化が、他の claudin 分子種の発現に影響を及ぼして小腸バリア機能の低下につながったのかもしれない。

Claudin-4 を MDCK 細胞や LLC-PK1 細胞といった上皮細胞株に発現させると TER が上昇すること[74, 75]、また、collagenous colitis における腸バリア機能低下時に細胞膜上での claudin-4 の発現が低下していることから[76]、この分子は TJ バリアを tight にする機能を持つと考えられる。そこで MTX 処置による claudin-4 の発現変化について検討した。Western blot による検討では MTX 処置で明らかな変化は見られなかったものの、免疫染色法から絨毛先端部位における claudin-4 の発現が対照群と比較して低下することが明らかとなった(Fig. 13)。Clostridium perfringens enterotoxin (CPE)の C 末端(C-CPE)が claudin-4 を介して TJ のバリア機能を阻害することが報告されている[77]。また、ラット空腸を用いた *in situ* loop assay から C-CPE は血漿中 FD-4 の濃度を上昇させるが、その C-CPE の効果は大腸では見られない[78]。これは、claudin-4 は小腸での上皮バリアを tight にする上で重要な分子であることを示唆する。よって、MTX 処置小腸でみられた claudin-4 の発現低下もまた、小腸バリア機能障害に寄与する重要な知見であると考えられる。一方、claudin-15 は免疫染色法により対照群、MTX 処置群ともに腸上皮細胞接着部位での発現が示され、Western blot による検討と同様に両群間で明らかな差は認められなかった(Fig. 14)。このように、claudin は同一の分子 ZOs によって TJ での局在が制御されているにも関わらず、腸バリア機能障害時では、分子種ごとに発現変化が異なる。これは claudin の分子種によって TJ に局在するための機序が異なること、さらには ZOs 以外の別の分子が claudin の発現に関与している可能性を示唆している。

Occludin は TJ に存在する膜貫通タンパク質として最初に同定された分子である。上皮細胞株あるいはモデル動物を用いた検討では、occludin の変化がバリア機能低下への関与が示されているものの[68, 79, 80]、occludin (-/-)マウスでは腸管バリアの機能変化を伴わないことから[81]、腸管バリア機能における occludin の役割は結論が得られていない。そこで、MTX による小腸バリア機能障害において occludin が関与しているか否かを検討する目的でその発現変化を検討した。MTX 処置小腸では対照群と比較して明らかな occludin の発現変化が見られず(Fig. 15)、本障害への関与は示されなかった。

これまでの結果から、claudin-2 の発現上昇、claudin-4 の絨毛先端での発現低下が MTX による小腸バリア機能障害に関与している可能性が示唆された。一方で、ZO-1 の TJ における発現低下が見られることから、MTX による TJ バリア機能障害において claudin-2 は ZO-1 以外の分子によって発現が制御されて本障害に寄与していることが推察された。そこで、MTX による ZO-1 の変化が TJ バリアの機能低下にどのように関与するのかを

明らかにする目的で、発現低下が見られた claudin-4、および先の検討で mRNA とタンパク発現が一致していなかった occludin のそれぞれについて ZO-1 との相互作用について検討した。免疫沈降法による検討から、MTX 処置小腸では ZO-1 と claudin-4 の結合が阻害されることが明らかとなった(Fig. 16)。また、ZO-1 と occludin の結合も阻害されている傾向が見られたものの、その差は有意なものではなかった(Fig. 16)。これより、MTX 処置によって claudin-4 の小腸絨毛先端部位における発現が低下した機序として、ZO-1 との結合阻害が考えられた。ヒト腸由来 T84 細胞に TNF- α を作用させると、TJ における claudin-4 の発現が低下することが報告されている[82]。同様に、MTX 処置小腸においても TNF- α の発現が有意に上昇していることから、ZO-1 と claudin-4 の結合阻害は MTX による TNF- α の発現上昇が関与しているかもしれない。

第4節 小括

本章では、MTXによる小腸バリア機能障害の機序を明らかにする目的で小腸における TJ 分子 ZO-1、claudin-2, -4, -15 および occludin の変化について検討した。また、ZO-1 の小腸 TJ バリアにおける重要性を明らかにする目的で、ZO-1 と claudin-4 あるいは occludin との相互作用について検討した。以下に得られた知見を要約する。

1. MTX 処置小腸では ZO-1 の発現量に明らかな変化は見られないものの、そのチロシンリン酸化および上皮細胞間接着部位での発現が低下することが明らかとなった。
2. MTX 処置小腸では claudin-2 の発現が上昇し、それは crypt において強く見られると同時に、未処置群とは異なり絨毛全体で発現することが明らかとなった。
3. MTX 処置小腸では絨毛の先端部位において、claudin-4 の発現が低下することが明らかとなった。
4. MTX による小腸バリア機能障害において、claudin-15 および occludin の発現変化は認められず、本障害への関与は見出せなかった。
5. MTX 処置小腸では、ZO-1 と claudin-4 との結合が阻害されていることが明らかとなった。

以上の結果から、MTXによる小腸バリア機能障害には claudin-2 の発現上昇、claudin-4 の発現低下が関与していることが明らかとなった。Claudin-4 の絨毛先端での発現低下の機序として ZO-1 との結合阻害が考えられ、これは ROS が引き金となって産生された TNF- α が関与していることが考えられた。

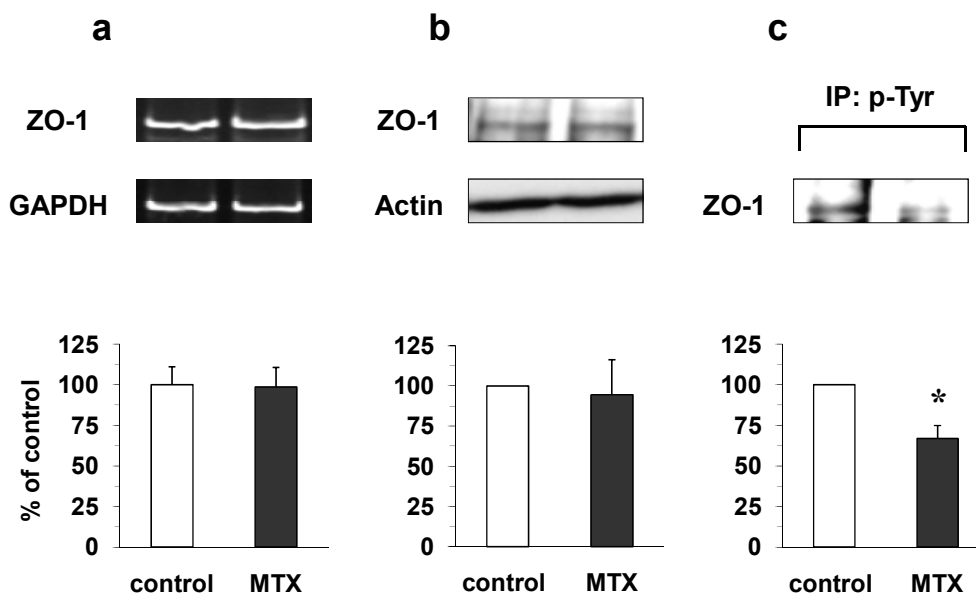


Fig. 9 Effect of MTX on the expression levels and tyrosine phosphorylation of ZO-1 in the rat intestine. The expression levels of intestinal mucosa-derived ZO-1 were detected using RT-PCR (a) and Western blot analysis (b). a Quantization of ZO-1 mRNA-specific signals is shown as the percentage of expression compared with control rats after normalization to GAPDH expression. b Tissue extracts were directly immunoblotted for total ZO-1 and β -actin. c Protein extracts were subjected to immunoprecipitation (under denaturing conditions) of p-Tyr, followed by immunoblotting for ZO-1. Data represent the means \pm S.D. (n = 3). * P < 0.05, significantly different from control rats.

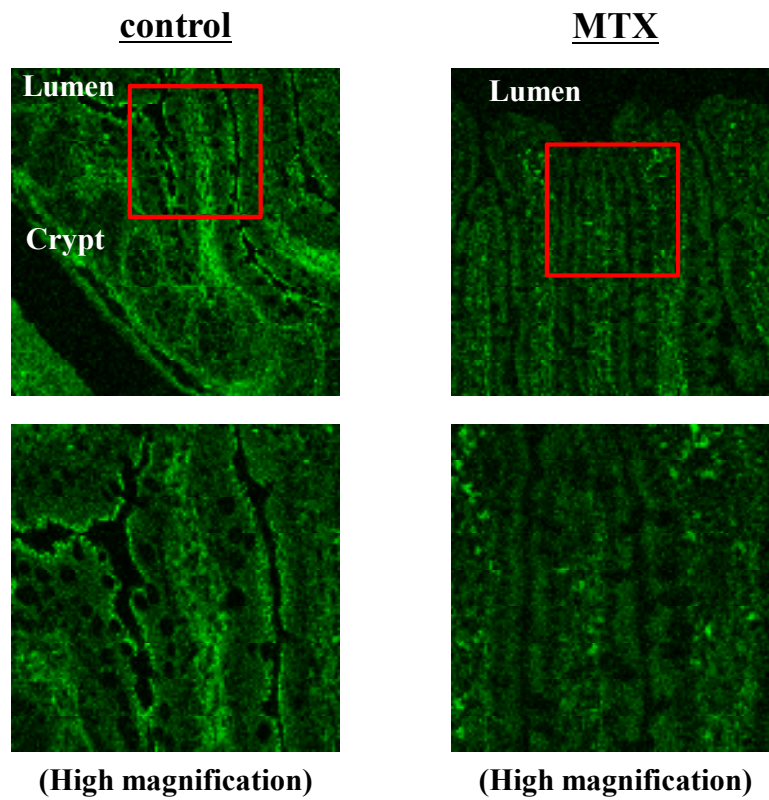


Fig. 10 Immunohistochemical localization of ZO-1 in the rat intestine. ZO-1 localization in villus epithelia of the rat jejunum was evaluated using immunohistochemical analysis. Cryosections (6 μm) of rat intestine were stained with the primary antibody for ZO-1, followed by incubation with a secondary antibody conjugated with FITC.

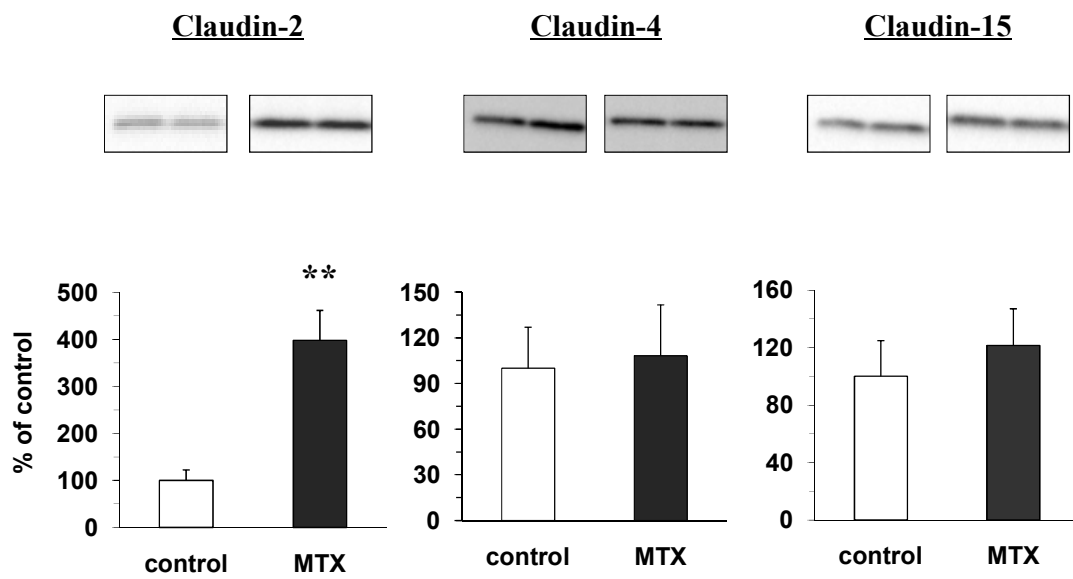


Fig. 11 Effect of MTX on the expression levels of claudin in the rat intestine. The expression levels of intestinal mucosa-derived claudin were determined by Western blot analysis. Data represent the means \pm SEM (n = 4). ** $P < 0.01$, significantly different from control rats.

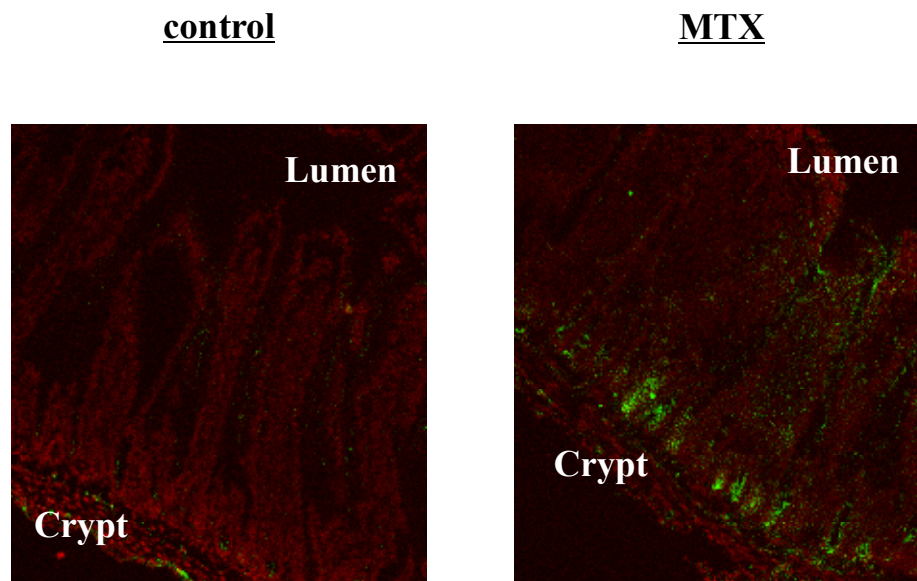


Fig. 12 Immunohistochemical localization of claudin-2 in the rat intestine. Claudin-2 localization in villus epithelia of the rat jejunum was evaluated using immunohistochemical analysis. Cryosections (6 μm) of rat intestine were stained with the primary antibody for claudin-2, followed by incubation with a secondary antibody conjugated with FITC. Claudin-2 and nuclei are shown in green and red, respectively.

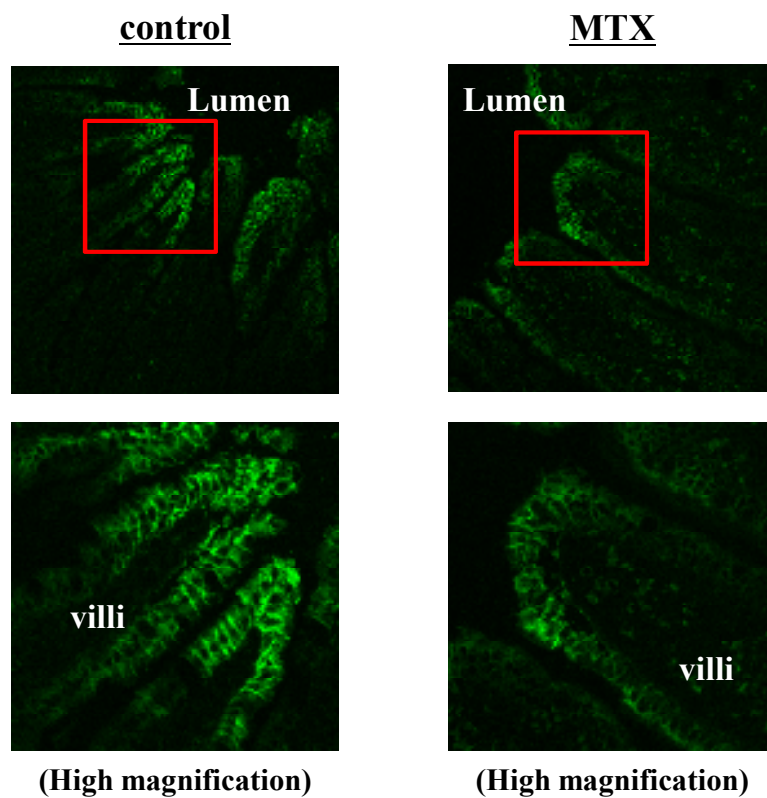


Fig. 13 Immunohistochemical localization of claudin-4 in the rat intestine. Claudin-4 localization in villus epithelia of the rat jejunum was evaluated using immunohistochemical analysis. Cryosections (6 μm) of rat intestine were stained with the primary antibody for claudin-4, followed by incubation with a secondary antibody conjugated with FITC.

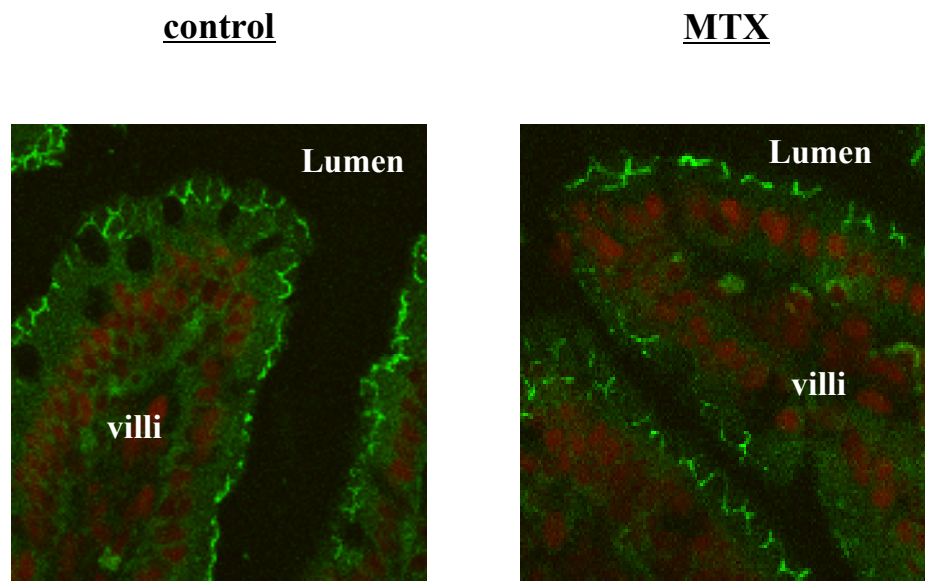


Fig. 14 Immunohistochemical localization of claudin-15 in the rat intestine. Claudin-15 localization in villus epithelia of the rat jejunum was evaluated using immunohistochemical analysis. Cryosections (6 μm) of rat intestine were stained with the primary antibody for claudin-15, followed by incubation with a secondary antibody conjugated with FITC. Claudin-15 and nuclei are shown in green and red, respectively.

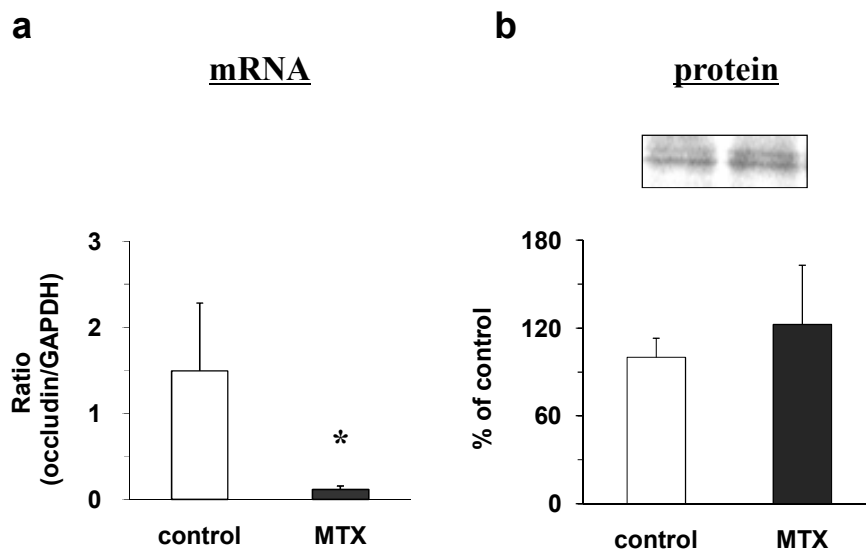


Fig. 15 Effect of MTX on the expression of occludin in the rat intestine. The expression levels of intestinal mucosa-derived occludin were detected using real time RT-PCR and Western blot analysis. **a** Quantization of occludin mRNA-specific signals is shown as the ratio after normalization to GAPDH expression. **b** Tissue extracts were directly immunoblotted for occludin. Data represent the means \pm S.D. (n = 3–4). * $P < 0.05$, significantly different from control rats.

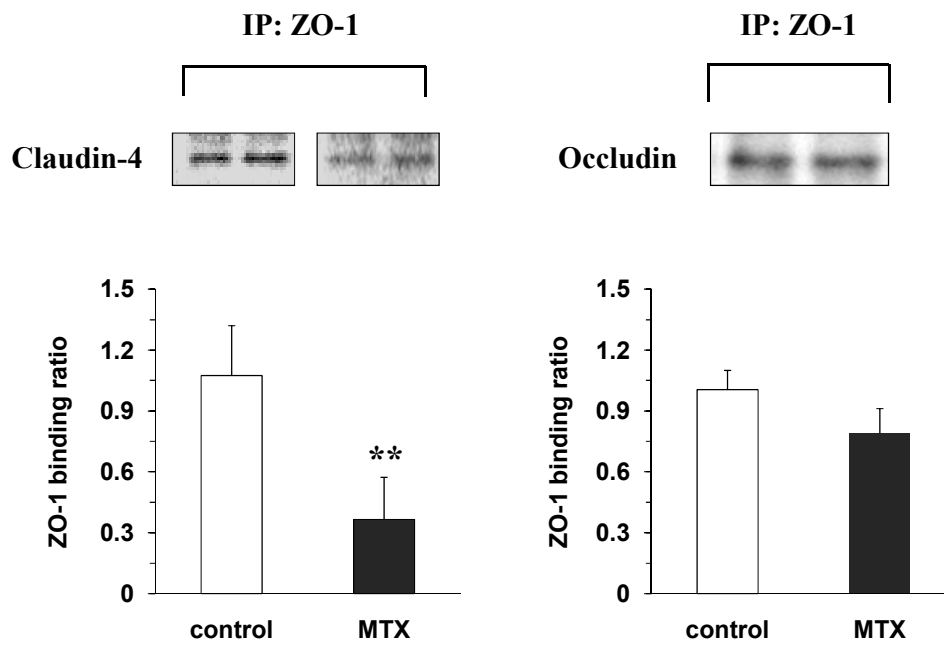


Fig. 16 Effect of MTX on the interaction between ZO-1 and claudin-4 or occludin in the rat intestine. Protein extracts were subjected to immunoprecipitation (under denaturing conditions) of ZO-1, followed by immunoblotting for claudin-4 or occludin. Data represent the means \pm S.D. (n = 3–4). ** $P < 0.01$, significantly different from control rats.

第4章 MTXによる小腸バリア機能障害に対する抗潰瘍剤 rebamipide の効果

第1節 序

これまでの一連の検討および Sonis の five-phase model を考えると、MTXによる小腸バリア機能障害は、ZO-1 の TJ における発現およびチロシンリン酸化の低下に起因した ZO-1 と claudin-4 の結合阻害が関与しており、それは MTX による ROS 産生を介した応答によって生じた可能性が考えられた。本章では、この仮説を検証する目的で抗酸化作用を有する薬剤 rebamipide の MTX による小腸バリア機能障害、ROS 産生、MPO 活性の上昇に加え、本研究から明らかとなった ZO-1 の変化に対する効果について検討した。Rebamipide は胃炎、胃潰瘍に使用される医薬品であり、経口投与後、適応を有する胃だけではなく、小腸にも分布する。

第2節 結果

2-1 MTXによる小腸バリア機能障害に対する rebamipide の効果

In vitro 反転腸管法を用いて MTX によって惹起される FD-4 の小腸透過性亢進に対する rebamipide の効果を検討した。MTX 単独投与群では対照群と比較して小腸での FD-4 透過量が有意に上昇した(Fig. 18a)。一方、rebamipide の併用群は MTX 単独投与群と比較して FD-4 の小腸における透過量が低く、そして rebamipide の効果に投与量依存性が見られた。また、rebamipide 単独投与群では対照群と比較して FD-4 の透過量に明らかな差は認められなかった。第2章 2-1 に準じて FD-4 透過クリアランスを算出したところ、rebamipide 併用群は MTX 単独投与群と比較してクリアランスが有意に低下した (control, 0.104 ± 0.016 ; MTX alone, 0.199 ± 0.011 ; MTX with 150 mg/kg rebamipide, 0.132 ± 0.017 ; rebamipide alone, $0.117 \pm 0.011 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Fig. 18b)。この結果をうけ、以降の検討に用いる rebamipide の投与量は、小腸透過性亢進を有意に抑制した 150 mg/kg/day とした。

2-2 MTX 処置小腸における ROS 産生、MPO 活性の上昇に対する rebamipide の効果

MTX 処置小腸粘膜における ROS 産生、好中球浸潤に対する rebamipide の効果を luminol-enhanced chemiluminescence 法および MPO 活性の測定によりそれぞれ評価した。小腸粘膜ホモジネートを用いて 5 分間化学発光を測定したところ、MTX 単独投与群は対照群に比べてその化学発光が有意に上昇した。一方、rebamipide 併用小腸粘膜における化学発光は MTX 単独投与群と比較して有意に低かった(Fig. 19a, b)。同様に、rebamipide の併用は MTX 単独投与群で見られた小腸粘膜における MPO 活性の上昇を有意に抑制した(Fig. 19c)。

2-3 MTX 処置小腸における ZO-1 の変化に対する rebamipide の効果

MTX 処置小腸における ZO-1 のチロシンリン酸化の低下および TJ での発現変化に対する rebamipide の効果を RT-PCR 法、Western blot 法、免疫沈降法、そして小腸凍結切片を用いた免疫染色法によりそれぞれ評価した。Rebamipide 単独投与群は対照群と比較して小腸における ZO-1 の発現レベルに明らかな差は認められなかった(Fig. 20a, b)。一方、rebamipide の併用は MTX 処置小腸で見られた ZO-1 のチロシンリン酸化の低下を有意に抑制した(Fig. 20c)。また、rebamipide 単独投与群と対照群では ZO-1 のチロシンリン酸化に明らかな差は認められなかった。免疫染色法を用いた検討から、MTX 処置小腸では対照群と比較して ZO-1 の apical 側膜に沿った発現が低下することが示された(Fig. 21)。Rebamipide の併用は、MTX 処置小腸で見られたその ZO-1 の変化を抑制した。

第3節 考察

本章では、MTXによる小腸バリア機能障害におけるROS産生およびZO-1の役割を明らかにする目的で、抗酸化作用を有する薬剤 rebamipide の効果を検討した。*In vitro* 反転腸管法を用いた検討から、rebamipide 併用ラット小腸におけるFD-4の透過量はMTX単独投与群と比較して有意に低いことが示され、rebamipideはMTXによって惹起される小腸バリア機能障害を緩和させることが明らかとなった(Fig. 18)。Rebamipide単独投与群では対照群と比較して小腸バリア機能に明らかな差は認められなかったことから、rebamipideの小腸バリアに対する効果は、そのバリア機能を高めることではなくTJバリアの障害に対する予防効果と考えられる。一方、rebamipide 併用ラット小腸粘膜における化学発光およびMPO活性はMTX単独投与群と比較していずれも有意に低く(Fig. 19)、透過性亢進に対する効果とROS産生および好中球浸潤に対する抑制効果に良い相関が見られた。これまでに、Caco-2細胞やMKN28細胞にH₂O₂を作用させることで惹起される上皮バリア機能障害に対して rebamipide の前処置は抑制効果を示すこと[83, 84]、また、インドメタシンによる小腸粘膜障害に対しても同様に rebamipide が抑制効果を示し、その効果はsuperoxide dismutaseとcatalaseの併用で見られる効果と一致しており[85]、rebamipideの抗酸化作用がTJバリアに対して保護的に働くことが明らかとなっている。よって、rebamipideのMTXによる小腸バリア機能障害に対する緩和効果も同様にMTXによる酸化ストレスの制御に起因していると考えられた。以上のことから、経口投与モデルにおけるMTXによるROS産生は、静脈投与モデルと同様に炎症反応およびバリア機能障害につながる因子であることが示された。臨床ではMTXは経口および静脈のいずれの投与経路においても使用されることから、本検討により得られた結果はMTXによる小腸バリア機能障害の機序を理解する上で重要な知見であると考えられる。

続いて、MTXによる小腸バリア機能障害におけるZO-1の役割を明らかにする目的で、ZO-1の変化に対するrebamipideの効果を検討した。Rebamipide投与群では対照群と比較して小腸におけるZO-1の発現に明らかな差は認められなかった(Fig. 20)。しかしながら、rebamipideの併用はMTX単独処置小腸で見られるZO-1のチロシンリン酸化レベルの低下、およびZO-1のapical側における染色の減少を防ぐことが明らかとなった(Fig.

20, 21)。上述したように rebamipide 単独投与群では対照群と比較して ZO-1 の発現およびそのチロシンリン酸化レベルに明らかな差は認められず、これはバリア機能そのものを高めないという知見に類似している。よって、rebamipide の MTX による小腸バリア機能障害に対する予防効果は ZO-1 の変化を抑制したことに起因すると考えられた。これより MTX による小腸での ZO-1 の変化は TJ バリアの障害に寄与する変化であること、またこのような ZO-1 の変化は ROS 産生を介した応答に依存していることが明らかとなった。本検討と同様に非アルコール性脂肪肝患者や肥満マウスにおいて、腸透過性亢進と ZO-1 の変化に良い相関が見られることから[86, 87]、腸における生理的な TJ バリアにおいて ZO-1 は重要な役割を担っていると考えられる。一方で、TJ はタンパク質複合体であり、その構成分子の中で claudin family が TJ バリアを創り出す直接の分子とされている。しかしながら、MTX による小腸バリア機能障害において複数の claudin 分子種の発現変化が見られ、さらにその変化は分子種によって発現上昇したり発現低下したりと制御機構が異なることがわかり、それぞれの claudin をターゲットとして MTX による TJ バリア機能障害を防ぐことは困難と考えられる。本研究で示されたように、ZO-1 の変化をターゲットとした治療戦略が MTX による小腸バリア機能障害の予防に効果が期待できるため、ROS 産生からはじまる炎症反応、そして ZO-1 の変化につながる分子機序を解明することが、分子メカニズムに基づいた MTX による小腸粘膜障害の予防法開発につながるかもしれない。

第4節 小括

本章では、MTXによる小腸バリア機能障害におけるROS産生およびZO-1の役割を明らかにする目的で、抗酸化作用を有する薬剤rebamipideの効果を検討した。以下に得られた知見を要約する。

1. RebamipideはMTXにより惹起されるFD-4の小腸粘膜透過性の亢進を抑制させたことから、小腸バリア機能障害を緩和させることが明らかとなった。
2. RebamipideはMTX処置小腸で見られるROS産生および炎症反応を抑制することが明らかとなった。
3. RebamipideはMTX処置小腸でみられるZO-1チロシンリン酸化の低下およびapicalに沿ったZO-1の発現低下のいずれも抑制することが明らかとなった。

以上の結果から、MTXによる小腸バリア機能障害において見られるZO-1のチロシンリン酸化およびapical側での発現の低下はその障害に寄与する変化であり、この変化はROSによって刺激された炎症応答が関与していることが明らかとなった。

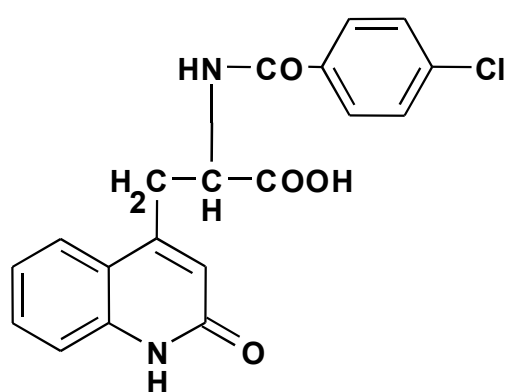


Fig. 17 Chemical structure of rebamipide

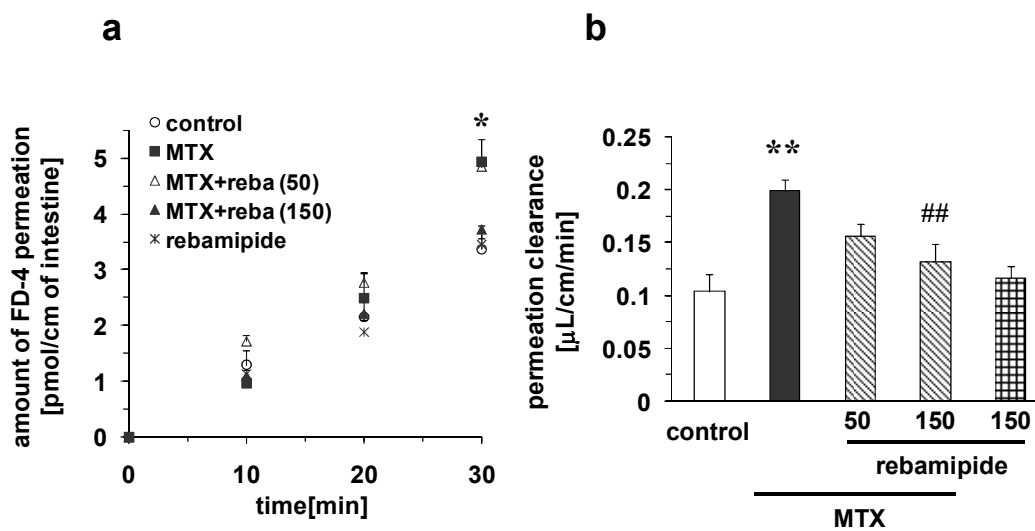


Fig. 18 Effect of rebamipide on the MTX-induced increase of intestinal paracellular permeability in rats. **a** Time course of FD-4 permeation and **b** permeation clearance of FD-4 were determined in *in vitro* everted sac experiments as described in “Materials and methods” section. Data represent the means \pm SEM (n = 5). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significantly different from control rats. ## $P < 0.01$, significantly different from MTX-treated rats.

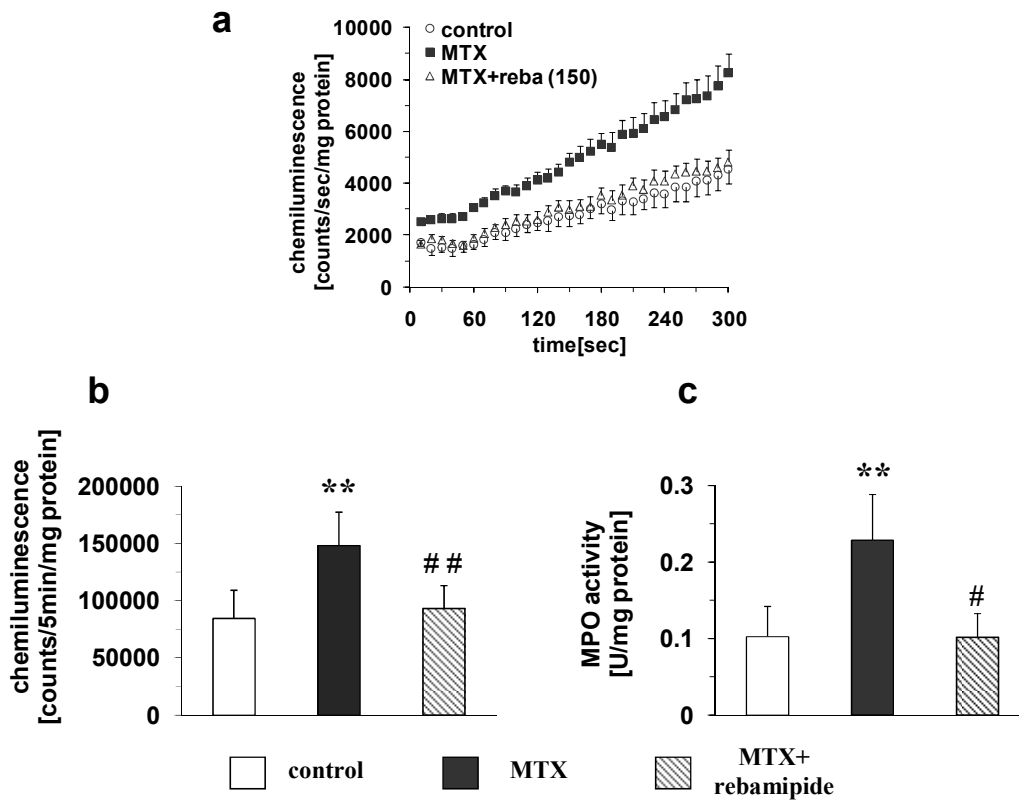


Fig. 19 Effect of rebamipide on the MTX-induced increase in ROS production (**a, b**) and MPO activity (**c**) in the rat intestine. **a, b** Luminol-enhanced chemiluminescence and **c** MPO activity were measured in the intestinal mucosa as described in the “Materials and methods” section. Data represent the means \pm SEM ($n = 3-5$). ** $P < 0.01$, significantly different from control rats. # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$, significantly different from MTX-treated rats.

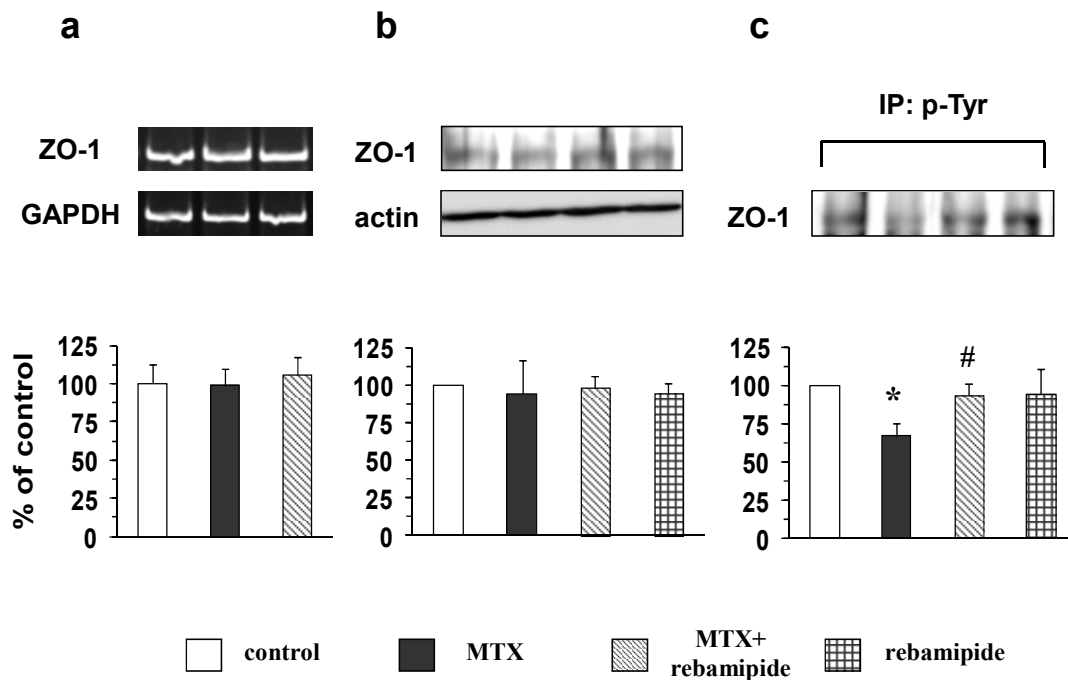


Fig. 20 Effect of MTX and/or rebamipide on the expression levels and tyrosine phosphorylation of ZO-1 in the rat intestine. The expression levels of intestinal mucosa-derived ZO-1 were detected using RT-PCR (**a**) and Western blot analysis (**b**). **a** Quantization of ZO-1 mRNA-specific signals is shown as the percentage of expression compared with control rats after normalization to GAPDH expression. **b** Tissue extracts were directly immunoblotted for total ZO-1 and β -actin. **c** Protein extracts were subjected to immunoprecipitation (under denaturing conditions) of p-Tyr, followed by immunoblotting for ZO-1. Data represent the means \pm S.D. (n = 3). * $P < 0.05$, significantly different from control rats. # $P < 0.05$, significantly different from MTX-treated rats.

control

MTX alone

**MTX with
rebamipide**

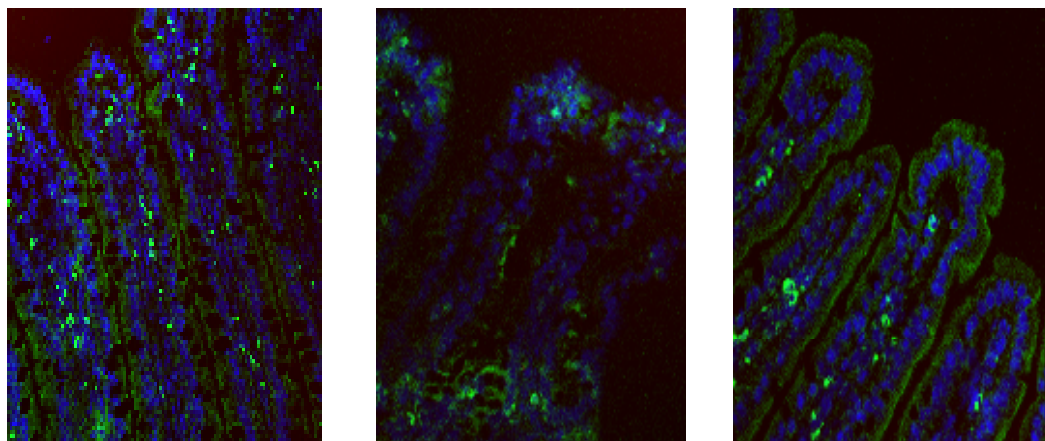


Fig. 21 Immunohistochemical localization of ZO-1 in the rat intestine. ZO-1 localization in villus epithelia of the rat jejunum was evaluated using immunohistochemical analysis. Cryosections (6 μm) of rat intestine were stained with the primary antibody for ZO-1, followed by incubation with a secondary antibody conjugated with FITC. ZO-1 and nuclei are shown in green and blue, respectively.

第5章 総括

MTX による小腸上皮バリア機能障害はその効果的な臨床使用を妨げ、治療成績の低下をもたらす副作用として知られる。この障害の機序を明らかにすることは、分子メカニズムに基づいた治療方法の開発、ひいては MTX の安全な臨床使用の確立につながる事が期待できる。細胞間接着装置である TJ によって小腸上皮バリア機能は制御されていることから、本研究は MTX による小腸バリア機能障害の機序を TJ 分子の変化から明らかにすることを目的とした。以下に得られた知見を総括する。

1. MTX による小腸バリア機能障害のモデル確立およびその病態の検討(第2章)

15 mg/kg MTX を4日以上経口投与することで、小腸バリア機能が障害されることが明らかとなった。この時、小腸粘膜において ROS 産生、MPO 活性、TNF- α 、IL-1 β 、MIP-2、TLR4 の発現が有意に上昇しており本障害への関与が示唆された。

2. MTX による小腸バリア機能障害における TJ 分子の変化(第3章)

MTX による小腸バリア機能障害において、ZO-1 のチロシンリン酸化および細胞間接着部位での発現が低下した。一方、claudin-2 は MTX 処置により発現が上昇し、それは小腸 crypt において強く見られた。Claudin-4 は絨毛先端部位での発現が低下すること、そして ZO-1 との結合が阻害されることが明らかとなった。

3. MTX による小腸バリア機能障害に対する rebamipide の効果(第4章)

MTX による小腸バリア機能障害は rebamipide の処置によって抑制され、その効果は ROS 産生、MPO 活性の上昇、ZO-1 の変化に対する抑制効果と良く相関した。これより、MTX による小腸バリア機能障害において ZO-1 の変化が重要な役割を担っていること、それら ZO-1 の変化は ROS を介した炎症応答が寄与していることが明らかとなった。

以上、MTXによる小腸バリア機能障害にはROSが重要な役割を果たしており、その産生を抑制することは本障害の緩和に寄与することが示唆された。一方、腸上皮バリア機能が障害された時、TJ分子 claudin-2 の発現上昇および claudin-4 の発現低下が明らかとなり、claudin-4 の発現低下にはZO-1との結合阻害が関与していることが示唆された。これらの知見は、MTXによる小腸バリア障害発症機構のさらなる理解、あるいは本障害に対する効果的な治療法開発につながり、MTXの安全な臨床使用を確立する上での有用な基礎資料になるものと考えられる。

実験の部

実験試料

Methotrexate (MTX)は和光純薬工業株式会社(Osaka, Japan)より購入した。Fluorescein isothiocyanate-dextran (average molecular weight, 4,400 Da; FD-4)は Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA)より購入した。Protein A-Sepharose は Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)より購入した。Human myeloperoxidase (MPO)は Alexis Biochemical, Inc. (San Diego, CA, USA.)より購入した。Rebamipide は大塚製薬株式会社(Tokushima, Japan)より恵与されたものを使用した。他の試薬および溶媒は市販の特級品を使用した。

統計解析

実験データは平均値±標準誤差もしくは平均値±標準偏差で示した。有意差検定は2群間においては Student の t-検定、3 群間以上においては一元分散分析(AVOVA)および多重比較法として Bonferroni 法により行った。P<0.05 を被有意水準とした。

第2章に関する実験

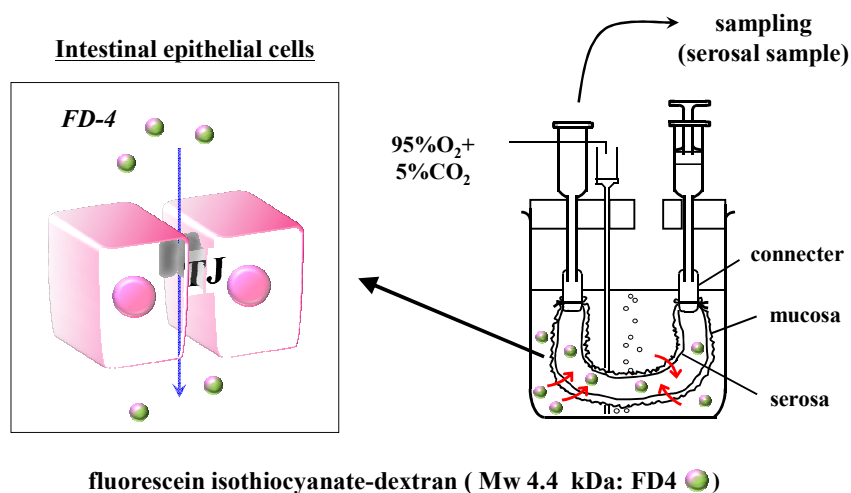
実験動物および薬物投与

すべての動物実験は千葉大学大学院薬学研究院動物実験委員会の承認の下で行われた。実験には Wistar 系雄性ラット(7-8 weeks old; Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan)を用いた。購入したラットは一週間以上専用動物室にて飼育した後、実験に用いた。

ラットを対照群、MTX 処置群に分けた。MTX を生理食塩水に溶かし 15 mg/kg を連日経口投与した。対照群には同量の生理食塩水を経口投与した。MTX の最終投与から 24 時間後、ラットをジエチルエーテル麻酔下、腹部正中線に沿って開腹し胃結節部より 10 cm の部位から腸管 20 cm を摘出して実験を行った。

1. *In vitro* 反転腸管法(Everted sac technique)を用いた FD-4 透過実験

Estimation of intestinal permeation abnormality in everted intestine technique by using FITC-dextran



摘出した腸管の内腔を氷冷した生理食塩水で洗浄後、反転させ両側をそれぞれコネクターに固定した。コネクターの一方をプラスチック製のシリンジに、他方をガラス製のシリンジに接続した。FD-4 を含まない modified Krebs-Ringer-bicarbonate phosphate (mKRBP) buffer (113.3 mM NaCl, 4.83 mM KCl, 1.21 mM KH₂PO₄ , 10.18 mM Na₂HPO₄, 16.96 mM NaHCO₃, 0.645 mM CaCl₂, 1.21 mM MgSO₄, pH 7.4)をプラスチック製シリンジ側より 5 mL 加えた。予め、ビーカーに FD-4 (1 μM)を含む mKRBP buffer を 40 mL 入れ、37 °C に保って混合ガス(95% O₂, 5% CO₂)で通気しておき、その中に腸管を入れた。この時を実験開始時間(t=0)として、以後 2.5 分おきにプランジャー動かして serosal 側の buffer を攪拌し、5, 10, 20, 30 分後に serosal 側(プラスチック製シリンジ内腔)から 0.3 mL ずつ試料として回収した。回収したサンプルは測定に使用するまで氷冷保存した。

Serosal 側における buffer の体積を一定に保つ目的で、試料回収後直ちに FD-4 を含まない buffer を 0.3 mL 加えた。透過実験終了後、吸収部分の長さを測定した。回収した試料について励起波長、蛍光波長それぞれ、495, 515 nm における蛍光強度を測定し FD-4 の透過量を算出した。また、得られた FD-4 透過量から以下の式により透過クリアランスを算出した。

$$CL = \frac{(C_{30} - C_{10}) \cdot V}{\Delta t \cdot C_{out} \cdot L}$$

ここで CL は吸収クリアランス、 C_{10} 、 C_{30} は 10、30 分後における serosal 側の FD-4 濃度、 C_{out} は mucosal 側の FD-4 濃度、 V は serosal 側の buffer の volume (mL)、 $\Delta t = 20$ (min)、 L は吸収部位の長さ(cm)を示す。

2. Luminol-enhanced chemiluminescence 法による小腸粘膜における化学発光の測定

摘出した腸管の内腔を氷冷した生理食塩水で洗浄後、反転させスライドガラスを用いて小腸粘膜を回収した。小腸粘膜に対して 0.1 g/mL となるように 50 mM carbonate buffer (pH 8.7)を加えてホモジナイズした後、Beckmann Microfuge E™で遠心分離(14000 r.p.m., 2 min)して得られた上清を測定試料とした。この試料 50 μ L を 400 μ M luminol を含む反応溶液(5 mM glucose in phosphate-buffered saline (PBS(-)) solution) 1 mL に加えて発光量を 5 分間測定した。化学発光量は background を減じた値を反応液中のタンパク質濃度で補正し、算出した。

3. Myeloperoxidase (MPO)活性の測定

小腸粘膜における MPO 活性は *o*-dianisidine 法を一部改変した系により算出した。小腸粘膜に対して 0.1 g/mL となるように phosphate buffer (0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide, 50 mM, pH 6.0)を加えてホモジネートした。得られたホモジネートを氷上で超音波処理(15 秒間、2 サイクル)して、遠心分離後(20,600 \times g, 15 min, 4°C)の上清を測定用サンプルとした。反応液 490 μ L phosphate buffer (0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide, 0.4 mg/mL *o*-dianisidine dihydrochloride, 0.0005% H₂O₂, 50 mM, pH 6.0)に対して調整した上清 10 μ L を加え 450 nm における吸光度を 6 分間測定して傾きを算出した。また同様の方法により、ヒト MPO を用いて得られた傾きからサンプルにおける MPO 活性をもとめた。そして、上清におけるタンパク質濃度で補正した。

4. サイトカインおよび TLR4 発現の検討

Total RNA の抽出

ラット小腸粘膜の total RNA は RNA-Solv Reagent (Omega Bio-tek, Inc., Doraville, GA, USA)を用いて調整した。BioMasher (Nippi, Inc., Tokyo, Japan)を用いた遠心分離法(15000 r.p.m., 15 sec, 4°C)によりラット小腸粘膜 0.1 g を粉砕し、RNA-Solv Reagent を 1 mL、クロロホルム 200 μ L を加え 15 秒間攪拌後、10 分間氷中静置した。遠心後(12000 r.p.m. 15 min, 4°C)の上清を回収し、等量のイソプロパノールを加え転倒混和後、室温で 10 min 静置し、再度遠心(12000 r.p.m. 15 min, 4°C)して上清を取り除いた。得られた沈殿を 70% ethanol で洗浄後、DEPC 処理水(diethylpyrocarbonate water)で溶解させた。この溶液中の吸光度を測定して total RNA の濃度を算出した。260 nm/280 nm の比が 1.8-2.0 のサンプルを以降の実験に用いた。

RT-PCR

逆転写反応は TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (Takarabio Co., Ltd, Shiga, Japan)を用いて、30°C-10 min, 50°C-30 min, 99°C-5 min, 25°C-5 min 行った。反応系を以下に示す。

25 mM MgCl₂	4 μL
10 \times RT buffer	2 μL
10 mM dNTP mixture	2 μL
RNase inhibitor (40U/μL)	0.5 μL
AMV reverse transcriptase (5 U/μL)	1 μL
Random 9mer (50 pmol/μL)	1 μL
Total RNA (400 ng/μL)	2 μL
RNase Free distilled water	7.5 μL
<hr/>	
total	20.0 μL

Real-time PCR

Real time PCR は Power SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc., Warrington, UK)を用いて行った。増幅反応は ABI PRISM 7000 により、50°C-2 min, 95°C-10 min の後、95°C-15 sec, 60°C- 1 min を 40 cycle 行いサイクル毎に励起波長によって生じる cDNA と SYBR Green のインターカレーション由来の蛍光シグナルを検出した。Sequence Detection System ソフトウェア(PE Applied Biosystems)の解析アルゴリズムにより作成された PCR 増幅曲線の指数関数的増幅領域において任意に Threshold line を設定し、その交点から Threshold Cycle (Ct 値)を各 cDNA サンプルについて算出した。最終的に内部標準物質に対する相対発現量でサンプル間での遺伝子発現変化を比較した。

Real-time PCR master mix	12.5 µL
3.0 µM primer (Forward)	2.5 µL
3.0 µM primer (Reverse)	2.5 µL
Distilled water	5.0 µL
RT product (1:20 dilution)	2.5 µL
total	25.0 µL

Gene	Accession No.		Sequence (5' – 3')
TNF-alpha	NM_012675	Forward	gagggtcaacctgccaagta
		Reverse	gtcgcttcacagagcaatga
IL-1beta	NM_031512	Forward	cacctctcaagcagagcacag
		Reverse	gggttccatgggtaagtcaac
MIP-2	NM_053647	Forward	aacgggcagaatcaaagaga
		Reverse	acatcaggtagcatccaggc
CINC-2	NM_138522	Forward	gtgctaagagacgggaatgc
		Reverse	ttgttcgctgatgcgtagtc
TLR4	NM_019178	Forward	tgctcagacatggcagtttc
		Reverse	atacaattcgacctgctgcc
GAPDH	NM_017008	Forward	gttaccagggctgccttctc
		Reverse	gggtttcccggtgatgacc
ZO-1	XM_001058833	Forward	attcagttcgtcccatgac
		Reverse	gctgtggagactgtgtggaa
occludin	NM_031329	Forward	ctactcctccaacggcaaag
		Reverse	agtcatccaacggacaaggtc

Table. PCR primer list

Western blot 解析

ラット小腸粘膜を lysis buffer (1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM Na_2EDTA , 1 mM EGTA, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 150 mM NaCl, and 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) でホモジネートした。4°C で 30 min 可溶化した後、超音波処理(15 sec、3 ラウンド)を行い、遠心分離(15,600 $\times g$ で 30 min at 4°C)して得られた上清をサンプルとした。サンプルのタンパク定量は BCA 法により行い、各サンプル間のタンパク量が等量になるように調整した後、Laemmli sample buffer (0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 12% β -mercaptoethanol, 20% glycer-

ol, 0.001% BPB)と混合した。サンプルを 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(20 mA 定電流)にて分離し、poly vinylidene difluoride (PVDF)膜に転写した(15 V、1 時間)。PVDF 膜をブロッキング溶液(3% BSA in TTBS buffer)中で 25°C、90 分間振とうし、TTBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH 8.0)を用いて室温洗浄した。一次抗体と 4°C、over night で反応させ、TTBS 溶液で PVDF 膜を洗浄後、HRP 標識二次抗体で 25°C、90 分間反応させた。さらに TTBS 溶液で洗浄した。検出は ECL plus キット(Amersham Bioscience Corp., Piscataway, NJ, USA)付属のプロトコールに従った。化学発光 ECL 基質にて発光させ、発光を冷却型 CCD カメラにより画像を取得し、LAS-1000 plus (Fuji Photo Film Co., Ltd, Tokyo, Japan)を用いて解析した。

抗体条件

- TLR4:** 一次抗体: Mouse monoclonal anti-toll like receptor 4 antibody (IMGENEX, San Diego, CA, USA; 1:2000 dilution in 0.1% BSA TTBS)
二次抗体: Horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:3000 dilution in 0.1% BSA TTBS)
- β -actin:** 一次抗体: Mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA; 1:10000 dilution in 0.1% BSA TTBS)
二次抗体: Horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:5000 dilution in 0.1% BSA TTBS)
- ZO-1:** 一次抗体: Rabbit polyclonal anti-ZO-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:500 dilution in 0.1% BSA TTBS)
二次抗体: Horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:3000 dilution in 0.1% BSA TTBS)
- Claudin-2:** 一次抗体: Rabbit polyclonal anti-claudin-2 antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 1:3000 dilution in 0.1% BSA TTBS)

二次抗体: Horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:3000 dilution in 0.1% BSA TTBS)

Claudin-4: 一次抗体: Mouse monoclonal anti-claudin-4 antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 1:5000 dilution in 0.1% BSA TTBS)

二次抗体: Horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:3000 dilution in 0.1% BSA TTBS)

Claudin-15: 一次抗体: Rabbit polyclonal anti-claudin-15 antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 1:3000 dilution in 0.1% BSA TTBS)

二次抗体: Horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:3000 dilution in 0.1% BSA TTBS)

Occludin: 一次抗体: Goat polyclonal anti-occludin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:3000 dilution in 0.1% BSA TTBS)

二次抗体: Horseradish peroxidase-labeled anti-goat IgG antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA ; 1:5000 dilution in 0.1% BSA TTBS)

第 3 章に関する実験

1. 小腸バリア機能障害における ZO-1 の変化に関する検討

Total RNA の抽出および RT-PCR

実験の部、第 2 章に関する実験に準じて行った。

半定量的 RT-PCR

PCR は KOD plus polymerase (TOYOBO Co., Ltd, Osaka, Japan)を用いて行った。PCR は

94°C-2 min の後、94°C-15 sec、59°C-30 sec、68°C-1 min を 1cycle として、ZO-1 は 26 cycle、GAPDH は 21cycle 行った。Cycle number は目的とする cDNA が指数関数的増幅領域であることを確認した上で決定した。

10 × Buffer for KOD -plus-	0.5 μL
2 mM dNTP mixture	2 μL
25 mM MgSO₄	0.2 μL
1.5 μM primer (Forward)	0.5 μL
1.5 μM primer (Reverse)	0.5 μL
RT product	1 μL
KOD -plus- (1.0U/μL)	0.1 μL
Distilled water	0.2 μL
total	5.0 μL

PCR 増幅産物を 8% polyacrylamide gels 電気泳動(150V 定電圧)によって分離し、SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA)で染色後、LAS-1000 を用いて解析した。

免疫沈降法

ラット小腸粘膜を lysis buffer (1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 5 μg/mL leupeptin, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/mL pepstatin, 5 μg/mL aprotinin, 150 mM NaCl, and 20mM Tris-HCl, pH 7.5)でホモジネートした。4°Cで30 min可溶化した後、超音波処理(15 sec、3ラウンド)を行い、遠心分離(15,600 × g で30 min at 4°C)して得られた上清を lysate とした。Lysate のタンパク定量は BCA 法により行い、各 lysate のタンパク量 5 mg に対して 3 μg の rabbit polyclonal anti-phosphotyrosine (p-Tyr) antibody (Transduction Laboratories, San Diego, CA, USA) を加え、4°C、overnight で反応させた。Protein A-Sepharose beads を 50 μL ずつ lysate にそれぞれ加え、4°C、90 min

反応させた。遠心分離($5,800 \times g$, 1 min, 4°C)により beads を沈殿させ、上清を除去後、lysis buffer (ただし sodium deoxycholate と SDS は含まない) で沈殿した beads を洗浄した。洗浄操作を3回行った後、beads に対して、elution buffer (3% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 8 M urea, 0.001% bromophenol blue, and 10 mM Tris-HCl, pH 6.5) を加え、 95°C 、5 min 加温して、beads に結合した抗原を溶出させた。遠心分離後($15,600 \times g$, 5 min)の上清を回収しサンプルとした。

Western blot 解析

実験の部、第2章に関する実験に準じて行った。

凍結切片の作製および固定

摘出した小腸の下部 2 cm 程度を切り出し、OCT compound に包埋し凍結させた後、6 μm の切片を作製した。凍結切片を2時間程度風乾させ、acetone で10分間室温で固定後、同様に2時間程度風乾させ実験に使用するまで -80°C で保存した。

免疫組織染色法

作製した凍結切片を PBS(-) で再水和(室温 30 分)させ、1次抗体と反応(室温 1 時間)させた後 PBS(-) で洗浄後、2次抗体 Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Inc., CA, USA; 1:100 dilution in 1% BSA PBS(-)) で同様に反応させた。PBS(-) で洗浄後、VECTASHIELD with or without propidium iodide (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) をサンプルにのせ、共焦点レーザー顕微鏡(LSM 510; Zeiss, Jena, Germany) で評価した。

抗体条件

1 次抗体は 1:50 dilution in 1% BSA PBS(-)で使用した。

Rabbit polyclonal anti-ZO-1 antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Rabbit polyclonal anti-claudin-2 antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Mouse monoclonal anti-claudin-4 antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Rabbit polyclonal anti-claudin-15 antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

2. 小腸バリア機能害における claudin-2, -4, -15 の変化に関する検討

Western blot 解析

実験の部、第 2 章に関する実験に準じて行った。

凍結切片の作製、固定および免疫組織染色法

実験の部、第 3 章に関する実験に準じて行った。

3. 小腸バリア機能障害における occludin の変化に関する検討

Total RNA の抽出および RT-PCR

実験の部、第 2 章に関する実験に準じて行った。

Real-time PCR

実験の部、第 2 章に関する実験に準じて行った。

4. ZO-1 と claudin-4 もしくは occludin との結合に関する検討

免疫沈降法、Western blot 解析

実験の部、第 2、3 章に関する実験に準じて行った。ただし、免疫沈降法において lysate に加える ZO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)は、4 μ g とした。

第 4 章に関する実験

実験動物および薬物投与

実験の部、第 2 章に関する実験に準じて行った。Rebamipide は 0.1% carboxyl methyl cellulose-Na に懸濁させ、1 日 2 回、MTX 投与 30 分前および 6 時間後に MTX と同日経口投与した。

1. MTX による小腸バリア機能障害に対する rebamipide の効果

実験の部、第 2 章に関する実験に準じて行った

2. MTX 処置小腸における ROS 産生、MPO 活性上昇に対する rebamipide の効果

実験の部、第 2 章に関する実験に準じて行った

3. MTX 処置小腸における ZO-1 の変化に対する rebamipide の効果

実験の部、第 2、3 章に関する実験に準じて行った

引用文献

- 1 Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y. and Tsukita, S. (2002) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* **13**, 875-886
- 2 Fihn, B. M., Sjoqvist, A. and Jodal, M. (2000) Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport. *Gastroenterology* **119**, 1029-1036
- 3 Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L. and Hansson, G. C. (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15064-15069
- 4 Heazlewood, C. K., Cook, M. C., Eri, R., Price, G. R., Tauro, S. B., Taupin, D., Thornton, D. J., Png, C. W., Crockford, T. L., Cornall, R. J., Adams, R., Kato, M., Nelms, K. A., Hong, N. A., Florin, T. H., Goodnow, C. C. and McGuckin, M. A. (2008) Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* **5**, e54
- 5 Pilewski, J. M. and Frizzell, R. A. (1999) Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* **79**, S215-255
- 6 Bradford, E. M., Sartor, M. A., Gawenis, L. R., Clarke, L. L. and Shull, G. E. (2009) Reduced NHE3-mediated Na⁺ absorption increases survival and decreases the incidence of intestinal obstructions in cystic fibrosis mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**, G886-898
- 7 Wilschanski, M. and Durie, P. R. (2007) Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. *Gut* **56**, 1153-1163
- 8 Strocchi, A., Corazza, G., Furne, J., Fine, C., Di Sario, A., Gasbarrini, G. and Levitt, M. D. (1996) Measurements of the jejunal unstirred layer in normal subjects and patients with celiac disease. *Am J Physiol* **270**, G487-491
- 9 Gumbiner, B. M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357
- 10 Hermiston, M. L. and Gordon, J. I. (1995) In vivo analysis of cadherin function in the

- mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* **129**, 489-506
- 11 Takeichi, M. (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451-1455
- 12 Yagi, T. and Takeichi, M. (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* **14**, 1169-1180
- 13 Tamura, K., Shan, W. S., Hendrickson, W. A., Colman, D. R. and Shapiro, L. (1998) Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* **20**, 1153-1163
- 14 Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A. and Engel, J. (1999) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J* **18**, 1738-1747
- 15 Takai, Y. and Nakanishi, H. (2003) Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* **116**, 17-27
- 16 Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 285-293
- 17 Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M. (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* **68**, 403-429
- 18 Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* **126**, 741-754
- 19 Van Itallie, C. M., Holmes, J., Bridges, A., Gookin, J. L., Coccaro, M. R., Proctor, W., Colegio, O. R. and Anderson, J. M. (2008) The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* **121**, 298-305
- 20 Watson, C. J., Hoare, C. J., Garrod, D. R., Carlson, G. L. and Warhurst, G. (2005) Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *J Cell Sci* **118**, 5221-5230
- 21 Colegio, O. R., Van Itallie, C., Rahner, C. and Anderson, J. M. (2003) Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1346-1354
- 22 Mullin, J. M., Agostino, N., Rendon-Huerta, E. and Thornton, J. J. (2005) Keynote review:

- epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov Today* **10**, 395-408
- 23 Oliveira, S. S. and Morgado-Diaz, J. A. (2007) Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol Life Sci* **64**, 17-28
- 24 Mankertz, J. and Schulzke, J. D. (2007) Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* **23**, 379-383
- 25 Weber, S., Hoffmann, K., Jeck, N., Saar, K., Boeswald, M., Kuwertz-Broeking, E., Meij, II, Knoers, N. V., Cochat, P., Sulakova, T., Bonzel, K. E., Soergel, M., Manz, F., Schaerer, K., Seyberth, H. W., Reis, A. and Konrad, M. (2000) Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet* **8**, 414-422
- 26 Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. and Tsukita, S. (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* **156**, 1099-1111
- 27 Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M. and Tsukita, S. (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* **161**, 653-660
- 28 Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., Lyonnet, S., De Prost, Y., Munnich, A., Hadchouel, M. and Smahi, A. (2004) Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* **127**, 1386-1390
- 29 Tamura, A., Kitano, Y., Hata, M., Katsuno, T., Moriwaki, K., Sasaki, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Noda, T., Furuse, M., Tsukita, S. and Tsukita, S. (2008) Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology* **134**, 523-534
- 30 Kremer, J. M. (2004) Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum* **50**, 1370-1382
- 31 Alarcon, G. S. (2000) Methotrexate use in rheumatoid arthritis. A Clinician's perspective. *Immunopharmacology* **47**, 259-271
- 32 Sonis, S. T. (2004) The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* **4**, 277-284
- 33 Madsen, K. L., Malfair, D., Gray, D., Doyle, J. S., Jewell, L. D. and Fedorak, R. N. (1999) Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* **5**, 262-270

- 34 Resta-Lenert, S., Smitham, J. and Barrett, K. E. (2005) Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed *mdr1a*^{-/-} mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G153-162
- 35 Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbin, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A., Dermody, T. S., Nusrat, A. and Parkos, C. A. (2007) JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* **204**, 3067-3076
- 36 Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* **56**, 61-72
- 37 Yan, Y., Kolachala, V., Dalmaso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V. and Merlin, D. (2009) Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* **4**, e6073
- 38 Tomita, M., Menconi, M. J., Delude, R. L. and Fink, M. P. (2000) Polarized transport of hydrophilic compounds across rat colonic mucosa from serosa to mucosa is temperature dependent. *Gastroenterology* **118**, 535-543
- 39 Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. and Ichijo, H. (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* **6**, 587-592
- 40 Lorne, E., Zmijewski, J. W., Zhao, X., Liu, G., Tsuruta, Y., Park, Y. J., Dupont, H. and Abraham, E. (2008) Role of extracellular superoxide in neutrophil activation: interactions between xanthine oxidase and TLR4 induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C985-993
- 41 Sonis, S. T. (2004) A biological approach to mucositis. *J Support Oncol* **2**, 21-32; discussion 35-26
- 42 Podolsky, D. K. (1993) Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. *Am J Physiol* **264**, G179-186
- 43 Miyazono, Y., Gao, F. and Horie, T. (2004) Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol* **39**, 1119-1127

- 44 Maeda, T., Miyazono, Y., Ito, K., Hamada, K., Sekine, S. and Horie, T. (2009) Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol* (in press)
- 45 Riaz, A. A., Schramm, R., Sato, T., Menger, M. D., Jeppsson, B. and Thorlacius, H. (2003) Oxygen radical-dependent expression of CXC chemokines regulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion in the mouse colon. *Free Radic Biol Med* **35**, 782-789
- 46 Cacalano, G., Lee, J., Kikly, K., Ryan, A. M., Pitts-Meek, S., Hultgren, B., Wood, W. I. and Moore, M. W. (1994) Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* **265**, 682-684
- 47 Kucharzik, T., Hudson, J. T., 3rd, Lugerling, A., Abbas, J. A., Bettini, M., Lake, J. G., Evans, M. E., Ziegler, T. R., Merlin, D., Madara, J. L. and Williams, I. R. (2005) Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut* **54**, 1565-1572
- 48 Watanabe, T., Higuchi, K., Kobata, A., Nishio, H., Tanigawa, T., Shiba, M., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Asahara, T., Nomoto, K., Takeuchi, K. and Arakawa, T. (2008) Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut* **57**, 181-187
- 49 Son, D. O., Satsu, H. and Shimizu, M. (2005) Histidine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett* **579**, 4671-4677
- 50 Shi, M. M., Chong, I., Godleski, J. J. and Paulauskis, J. D. (1999) Regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene expression by oxidative stress in rat alveolar macrophages. *Immunology* **97**, 309-315
- 51 Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314
- 52 Logan, R. M., Stringer, A. M., Bowen, J. M., Gibson, R. J., Sonis, S. T. and Keefe, D. M. (2009) Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemother Pharmacol* **63**, 239-251
- 53 Boukhattala, N., Leblond, J., Claeysens, S., Faure, M., Le Pessot, F., Bole-Feysot, C., Hassan, A., Mettraux, C., Vuichoud, J., Lavoinnie, A., Breuille, D., Dechelotte, P. and

- Coeffier, M. (2009) Methotrexate induces intestinal mucositis and alters gut protein metabolism independently of reduced food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E182-190
- 54 de Koning, B. A., van Dieren, J. M., Lindenbergh-Kortleve, D. J., van der Sluis, M., Matsumoto, T., Yamaguchi, K., Einerhand, A. W., Samsom, J. N., Pieters, R. and Nieuwenhuis, E. E. (2006) Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. *Int Immunol* **18**, 941-949
- 55 Asehnoune, K., Strassheim, D., Mitra, S., Kim, J. Y. and Abraham, E. (2004) Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol* **172**, 2522-2529
- 56 Kelley, E. E., Khoo, N. K., Hundley, N. J., Malik, U. Z., Freeman, B. A. and Tarpey, M. M. (2009) Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med*
- 57 Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**, 1777-1788
- 58 Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* **141**, 1539-1550
- 59 Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S. and Goodenough, D. A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* **103**, 755-766
- 60 Gumbiner, B., Lowenkopf, T. and Apatira, D. (1991) Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3460-3464
- 61 Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J. and Stevenson, B. R. (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* **141**, 199-208
- 62 Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A. and Avila-Flores, A. (2000) MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 315-324
- 63 Basuroy, S., Seth, A., Elias, B., Naren, A. P. and Rao, R. (2006) MAPK interacts with

- occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *Biochem J* **393**, 69-77
- 64 Mazzon, E. and Cuzzocrea, S. (2008) Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G1268-1280
- 65 Chen, Y., Lu, Q., Schneeberger, E. E. and Goodenough, D. A. (2000) Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* **11**, 849-862
- 66 Van Itallie, C. M., Balda, M. S. and Anderson, J. M. (1995) Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation and reorganization of the tight junction protein ZO-1 in A431 cells. *J Cell Sci* **108 (Pt 4)**, 1735-1742
- 67 Ciccocioppo, R., Finamore, A., Ara, C., Di Sabatino, A., Mengheri, E. and Corazza, G. R. (2006) Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *Am J Clin Pathol* **125**, 502-511
- 68 Suzuki, T., Elias, B. C., Seth, A., Shen, L., Turner, J. R., Giorgianni, F., Desiderio, D., Guntaka, R. and Rao, R. (2009) PKC eta regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 61-66
- 69 Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* **143**, 391-401
- 70 Miyamoto, T., Morita, K., Takemoto, D., Takeuchi, K., Kitano, Y., Miyakawa, T., Nakayama, K., Okamura, Y., Sasaki, H., Miyachi, Y., Furuse, M. and Tsukita, S. (2005) Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* **169**, 527-538
- 71 Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Burgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W. and Schulzke, J. D. (2005) Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* **129**, 550-564
- 72 Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. and Tsukita, S. (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* **153**, 263-272

- 73 Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* **115**, 4969-4976
- 74 Van Itallie, C., Rahner, C. and Anderson, J. M. (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* **107**, 1319-1327
- 75 Van Itallie, C. M., Fanning, A. S. and Anderson, J. M. (2003) Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F1078-1084
- 76 Burgel, N., Bojarski, C., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2002) Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* **123**, 433-443
- 77 Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y. and Tsukita, S. (1999) Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* **147**, 195-204
- 78 Kondoh, M., Masuyama, A., Takahashi, A., Asano, N., Mizuguchi, H., Koizumi, N., Fujii, M., Hayakawa, T., Horiguchi, Y. and Watanabe, Y. (2005) A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol Pharmacol* **67**, 749-756
- 79 Utech, M., Ivanov, A. I., Samarina, S. N., Bruewer, M., Turner, J. R., Mrsny, R. J., Parkos, C. A. and Nusrat, A. (2005) Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* **16**, 5040-5052
- 80 Schwarz, B. T., Wang, F., Shen, L., Clayburgh, D. R., Su, L., Wang, Y., Fu, Y. X. and Turner, J. R. (2007) LIGHT signals directly to intestinal epithelia to cause barrier dysfunction via cytoskeletal and endocytic mechanisms. *Gastroenterology* **132**, 2383-2394
- 81 Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* **11**, 4131-4142
- 82 Wang, J., Lopez-Fraga, M., Rynko, A. and Lo, D. D. (2009) TNFR and LTbetaR agonists induce follicle-associated epithelium and M cell specific genes in rat and human intestinal epithelial cells. *Cytokine* **47**, 69-76

- 83 Banan, A., Fitzpatrick, L., Zhang, Y. and Keshavarzian, A. (2001) OPC-compounds prevent oxidant-induced carbonylation and depolymerization of the F-actin cytoskeleton and intestinal barrier hyperpermeability. *Free Radic Biol Med* **30**, 287-298
- 84 Hashimoto, K., Oshima, T., Tomita, T., Kim, Y., Matsumoto, T., Joh, T. and Miwa, H. (2008) Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. *Biochem Biophys Res Commun* **376**, 154-157
- 85 Mizoguchi, H., Ogawa, Y., Kanatsu, K., Tanaka, A., Kato, S. and Takeuchi, K. (2001) Protective effect of rebamipide on indomethacin-induced intestinal damage in rats. *J Gastroenterol Hepatol* **16**, 1112-1119
- 86 Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G. and Delzenne, N. M. (2009) Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* **58**, 1091-1103
- 87 Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., Masciana, R., Forgione, A., Gabrieli, M. L., Perotti, G., Vecchio, F. M., Rapaccini, G., Gasbarrini, G., Day, C. P. and Grieco, A. (2009) Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **49**, 1877-1887

論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Hamada K, Shitara Y, Sekine S, Horie T.

Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, in press.

謝辞

本稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 生物薬剤学研究室 堀江利治教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、終始有益なる御教示と御指導及び本論文の校閲を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 生物薬剤学研究室 設楽悦久准教授に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始御便宜と御協力を惜しまれなかった千葉大学大学院薬学研究院 生物薬剤学研究室 関根秀一助教に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、多くの御助言、御討論頂き、そして共に切磋琢磨し合った中 埜貴文修士ならびに生物薬剤学研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。

本研究において、尊い命を捧げてくれた動物達に哀悼の意を表すとともに、御冥福をお祈り致します。

最後に、貴重な研究生生活の機会を与えてくださり、そして終始温かく見守り、多方面から支えてくれた家族に心から感謝いたします。

2010年2月
濱田 和真

審査委員

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 医学博士 上田 志朗

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 上野 光一

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 戸井田 敏彦