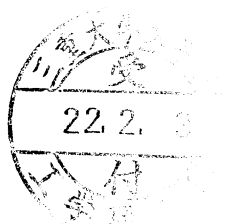


平成 21 年度 修士論文

腹膜機能維持に関する基礎的研究

－形質変換と細胞遊走性－



三重大学大学院工学研究科 博士前期課程

分子素材工学専攻

佐野 晃史

# 目次

<b>1. 緒言</b>	<b>・ ・ ・ ・ ・ 1</b>
<b>1-1. 腎不全と腹膜透析</b>	<b>・ ・ ・ ・ ・ 1</b>
1-1-1. 腹膜と腹膜中皮細胞	
1-1-2. 腹膜透析 (CAPD)と合併症	
<b>1-2. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) と Mesenchymal to epithelial transition (MET)</b>	<b>・ ・ ・ ・ ・ 3</b>
1-2-1. 腹膜透析と EMT	
1-2-2. EMT とは	
1-2-3. EMT 誘導因子	
1-2-4. MET とは	
1-2.5. Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7)とは	
<b>1-3. 細胞遊走</b>	<b>・ ・ ・ ・ ・ 9</b>
1-3-1. EMT 誘導細胞の浸潤・遊走	
1-3-2. 化学走化性因子	
1-3-3. 癌・発生における浸潤・遊走	
<b>1-4. 3次元細胞遊走モデル</b>	<b>・ ・ ・ ・ ・ 12</b>
1-4-1. 既存の3次元細胞遊走モデル	
1-4-2. 生体内における濃度勾配	
<b>2. 目的</b>	<b>・ ・ ・ ・ ・ 14</b>
<b>3. 方法</b>	<b>・ ・ ・ ・ ・ 15</b>
<b>3-1. 実験系の作成</b>	<b>・ ・ ・ ・ ・ 15</b>
3-1-1. ヒト大網由来腹膜中皮細胞(HPMCs)の培養	
3-1-2. HPMC への TGF- $\beta$ 1 の曝露	
<b>3-2. TGF-<math>\beta</math>1 曝露による細胞の形態変化の静止画撮影</b>	<b>・ ・ ・ ・ ・ 16</b>

<b>3-3. TGF-<math>\beta</math>1 曝露による Snail, E-cadherin, <math>\alpha</math>5-integrin, MMP-2 mRNA の経時的測定</b>	<b>16</b>
3-3-1. AGPC 法による mRNA の抽出と定量	
3-3-2. mRNA の逆転写による cDNA の作成と PCR による Snail, E-cadherin, $\alpha$ 5-integrin 及び MMP-2 cDNA の増幅	
3-3-3. 電気泳動とバンドの定量	
<b>3-4. TGF-<math>\beta</math>1 曝露による<math>\alpha</math>-SMA, RhoA タンパクの経時的測定</b>	<b>18</b>
3-4-1. 実験条件下での細胞の準備	
3-4-2. タンパク質の抽出と BCA 法による定量	
3-4-3. SDS-PAGE によるタンパク質の分離	
3-4-4. 膜への転写 (Western Blotting)	
3-4-5. 抗体反応とバンドの定量	
<b>3-5. 化学走化性因子を用いた EMT 細胞の 3 次元細胞遊走評価</b>	<b>20</b>
3-5-1. FN, BSA, 及び AGE-BSA を用いた 3 次元細胞遊走モデルの作成	
3-5-2. RGDS 阻害剤による FN 存在下での実験条件	
3-5-3. collagen gel 中の拡散係数測定法	
3-5-4. Fick の拡散方程式による濃度勾配予測	
3-5-5. 遊走細胞数の計測	
3-5-6. 実験条件下での細胞増殖試験	
3-5-7. 実験条件下での MTT 試験	
<b>3-6. BMP-7 曝露による MET 誘導</b>	<b>24</b>
3-6-1. BMP-7 曝露濃度の違いによる形態への影響	
<b>3-7. 統計処理</b>	<b>24</b>
<b>4. 結果</b>	<b>25</b>
<b>4-1. TGF-<math>\beta</math>1 曝露による HPMC の形態変化の観察</b>	<b>25</b>
<b>4-2. TGF-<math>\beta</math>1 曝露による Snail, E-cadherin, <math>\alpha</math>5-integrin, MMP-2 mRNA の経時的変化</b>	<b>25</b>
4-2-1. Snail mRNA	

4-2-2. E-cadherin mRNA	
4-2-3. $\alpha_5$ -integrin mRNA	
4-2-4. MMP-2 mRNA	
<b>4-3. TGF-<math>\beta</math>1 曝露による<math>\alpha</math>-SMA, RhoA タンパクの経時的変化</b>	<b>29</b>
4-3-1. $\alpha$ -SMA	
4-3-2. RhoA	
<b>4-4. collagen gel 中の拡散係数測定</b>	<b>30</b>
<b>4-5. Fick の拡散方程式による理論的濃度勾配</b>	<b>31</b>
<b>4-6. 走化性因子を用いた 3 次元細胞遊走試験</b>	<b>33</b>
4-6-1. EMT (-) vs EMT (+)	
4-6-2. FN 存在下での EMT (-) vs EMT (+)	
4-6-3. EMT 誘導下での Alb vs AGE-BSA vs FN	
4-6-4. FN 存在下での RGDS (-) vs RGDS (+)	
4-6-5. 細胞増殖試験	
4-6-6. MTT 試験	
<b>4-7. BMP-7 を用いた MET 誘導</b>	<b>36</b>
4-7-1. BMP-7 曝露濃度の違いによる形態への影響	
4-7-2. EMT 誘導細胞への BMP-7 曝露による $\alpha$ -SMA 発現量変化	
<b>5. 考察</b>	<b>39</b>
5-1. 腹膜透析による TGF- $\beta$ 1 産生機序	39
5-2. TGF- $\beta$ 1 による Snail mRNA 発現に伴う E-cadherin mRNA の減少メカニズムとその役割	40
5-3. EMT 誘導 HPMC における $\alpha_5$ -integrin mRNA、MMP-2 mRNA、 $\alpha$ -SMA タンパク、RhoA タンパクの遊走における役割	42
5-4. HPMC の 3 次元遊走に関与する遊走因子と遊走促進メカニズム	43

5-5. BMP-7 による腹膜機能維持メカニズム	・ ・ ・ ・ ・ 46
5-6. 総括	・ ・ ・ ・ ・ 48
6. 結論	・ ・ ・ ・ ・ 49
7. 今後の展望	・ ・ ・ ・ ・ 51
8. 参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 52
9. 謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 58
10. APPENDIX	・ ・ ・ ・ ・ 59

# 1. 緒言

## 1-1. 腎不全と腹膜透析

### 1-1-1. 腹膜と腹膜中皮細胞

腹膜とは胃や肝臓といった腹部の臓器の全体ないし一部及び腹壁を覆っている薄い漿膜組織である。この腹膜はたくさんの微絨毛を持つ一層の中皮細胞と、膠原繊維、弾性繊維、ヒアルロン酸などの細胞外マトリクスなどが存在する基底膜下の間質から構成された生体複合膜である。間質組織中に線維芽細胞、脂肪細胞、肥満細胞、マクロファージなどの細胞や毛細血管が散在する構造をとる (Fig.1-1)。

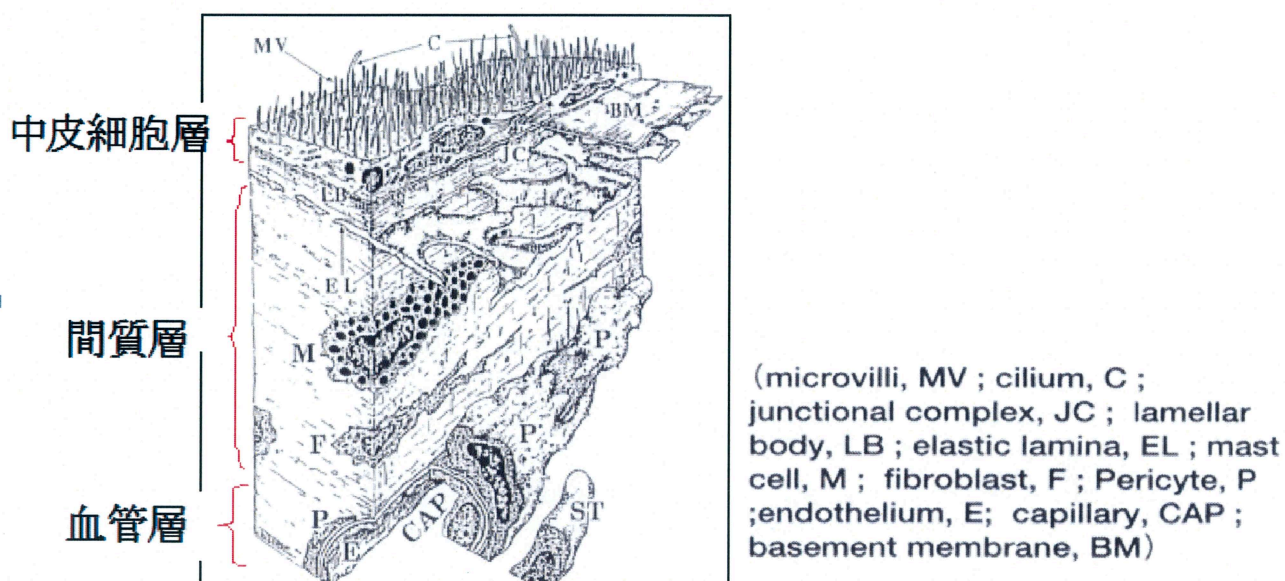


Fig.1-1 正常な腹膜の形態学的模式図

腹膜の厚さは 50~150 $\mu\text{m}$  で、壁側腹膜と臓側腹膜に囲まれた空間を腹腔と称す。

腹膜の機能

①腹部臓器が自由に動けるように滑面を提供する

②臓器・器官の癒着防止

腹膜中皮細胞は長さ 2~3 $\mu\text{m}$ 、直径 0.08 $\mu\text{m}$  の微絨毛の厚い外套に覆われていて、微絨毛は細胞表面一面に一様に広がっている(Fig.1-2)。微絨毛はリン脂質を分泌し、臓器間の癒着を防ぐ働きをしている。中皮細胞同士は斜めに重なり合い、固く組み合うように接着している。

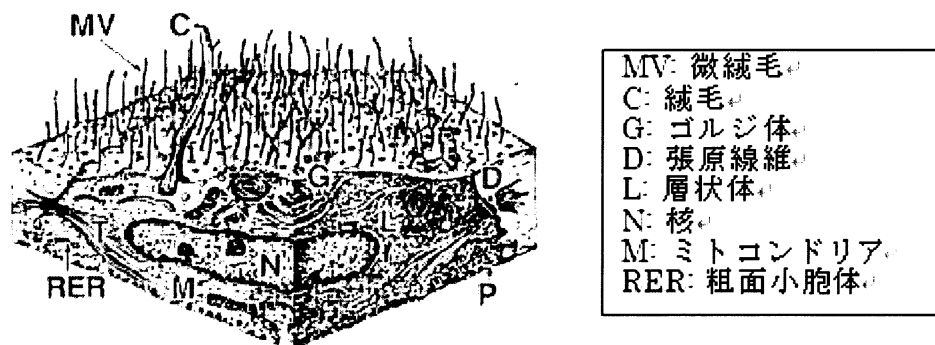


Fig.1-2 正常中皮細胞の形態学的模式図

### 1-1-2.腹膜透析(CAPD)と合併症

現在日本において食の欧米化が進み、脂質を摂取する機会が増え、メタボリックシンドロームの増加が社会的問題となっている。それに伴い 1998 年以降、透析原疾患としてそれ以前まででは慢性糸球体腎炎が 1 位であったが、糖尿病性腎症が 1 位となっている(Table.1-1)。それらの疾患によって腎臓の働きが 30%以下になることを腎不全と言い、10%以下になると末期腎不全となり透析療法が必要となる。本邦では透析患者数は毎年 1 万人ずつ増加している一方で全世界でも 2010 年には 210 万人に達する勢いである(Fig.1-3)。

透析療法には大きく分類して血液透析と腹膜透析の 2 種類が存在している。腹膜透析(Peritoneal Dialysis : PD)では、Fig.1-4 に示すように、患者自身の腹腔内に高濃度 D-glucose を主成分とした透析液を注入し、腹膜を介して拡散と限外濾過によって水・老廃物(尿として排出されるべき物質)の除去、電解質、pH の調整を行う療法である。血液透析では週に 3 回、1 回 4~5 時間の通院治療が必要であるが、腹膜透析は自己管理が中心の在宅療法であるため、月に 1~2 回の診察だけで良い。そのため、就学や就労がしやすい事、残存腎機能の維持がしやすい事、必要な器材や薬液が血液透析に比べ僅かで済み生産コストの面でも、医療廃棄物処理の面でも、さらには設備投資が全く必要無い点など、経済効果が大きい事など利点も多い。医学的にも、連続的な水・老廃物除去による循環器系への負担軽減から、特に高齢者への適応がさらに広がるかと期待される。しかしその一方で透析液中の主成分である D-グルコースやグルコース分解産物(Glucose degradation products)の影響による溶質透過性亢進や除水不全、さらには腹膜線維症や腹膜硬化症といった合併症が問題となっている<sup>[1]</sup>。その為、未来型の腹膜透析の発展には長期透析時における腹膜機能劣化のメカニズムを解明し、合併症を低減することが不可欠である。

Table.1-1 透析原疾患

原疾患	患者数	%	順位
糖尿病性腎症	14,968	42.9	1
慢性糸球体腎炎	8,914	25.6	2
不明	3,454	9.9	3
腎硬化症	3,262	9.4	4
その他	903	2.6	5
多発性嚢胞腎	827	2.4	6
急速進行性糸球体腎炎	421	1.2	7
慢性腎盂腎炎	295	0.8	8
悪性高血圧	269	0.8	9
SLE腎炎	268	0.8	10
移植後再導入	224	0.6	11
アミロイド腎	168	0.5	12
腎・尿路腫瘍	158	0.5	13
その他分類不能の腎炎	149	0.4	14
骨髄腫	137	0.4	15
閉塞性尿路障害	128	0.4	16
痛風腎	113	0.3	17
腎・尿路結石	75	0.2	18
腎形成不全	51	0.1	19
妊娠腎/妊娠中毒症	44	0.1	20
腎・尿路結核	19	0.1	21
先天性代謝異常による腎不全	30	0.1	22

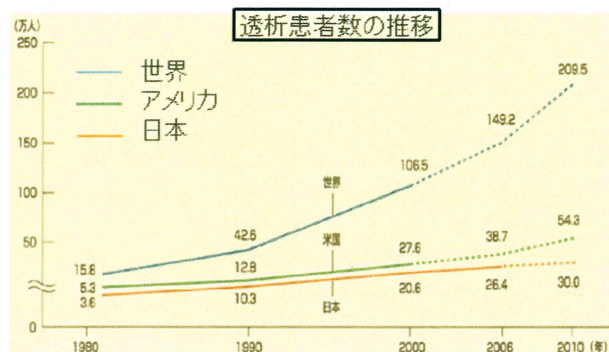
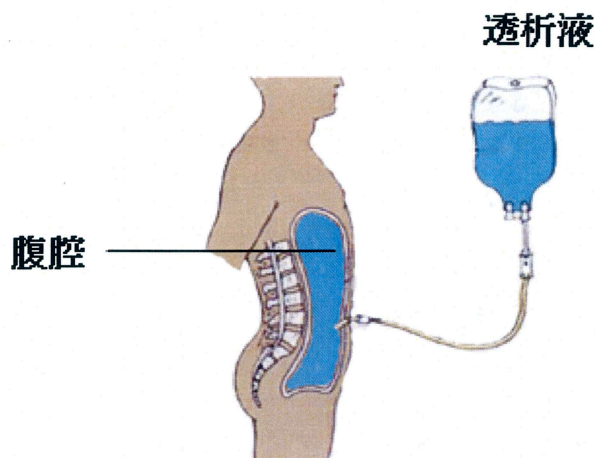


Fig.1-3 透析患者数の推移

Fig.1-4 腹膜透析<sup>[2]</sup>

## 1-2. EMT(Epithelial to mesenchymal transition)

### 1-2-1. 腹膜透析と EMT

腹膜線維症は間質内に存在する細胞が、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを過産生する事により間質が肥厚化し、線維化することで、さらなる腹膜機能の低下をもたらす組織編成である<sup>[3]</sup>。今まではこのような腹膜組織の機能・構造変化は、主に間質内の線維芽細胞に起因しているものと考えられてきたが、上皮細胞マーカータンパク質サイトケラチン陽性細胞が間質内で観察されたことから、上皮細胞の関与も議論され始めている<sup>[4]</sup> (Fig.1-5 茶色：サイトケラチン陽性細胞)。

腹膜の肥厚化・組織化に関与する細胞の起源として以下の三つの説が提案されている。

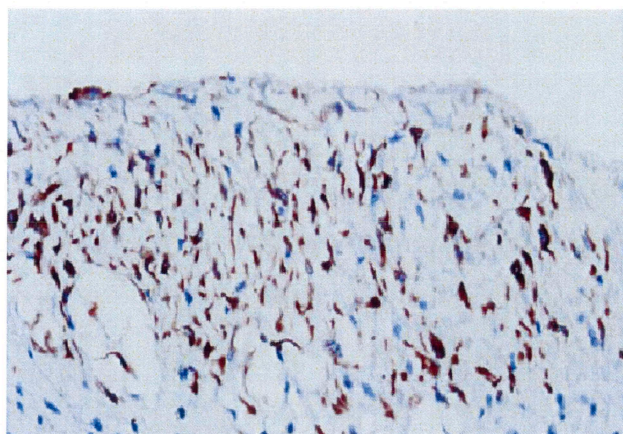


Fig.1-5 間質内での上皮細胞の観察<sup>[4]</sup>

#### 仮説 (1) 白血球由来<sup>[5]</sup>

血液中を循環している白血球が炎症部位へ遊走し、サイトカイン產生することにより腹膜間質のマトリクス產生細胞に働くとする説。

#### 仮説 (2) 腹膜線維芽細胞<sup>[5]</sup>

組織傷害が生じた際に、傷害部位へと遊走し増殖する事で癒痕形成を促進し、組織修復を行う線維芽細胞によって引き起こされるとする説。この細胞は器官形成後に未分化のまま残った間葉系細胞であると考えられている。

#### 仮説 (3) 腹膜中皮細胞<sup>[3][4]</sup>

透析液の高浸透圧や酸性、加熱滅菌時に生じる GDPs (glucose degradation products) の影響で、HPMC は剥離し遊走する。このとき HPMC は EMT (上皮間葉系転換) を引き起こして、細胞間接着を失うことで上皮細胞の極性を失い、間質層へと遊走する。

### 1-2-2. EMT とは

EMT(Epithelial to mesenchymal transition)とは、癌転移や発生時に見られる、上皮細胞が間葉系細胞へと形質変化することである。これは上皮細胞の極性が失われ、間葉系細胞(線維芽様細胞)の特性が現れるということである<sup>[3][6]</sup>。つまり EMT が起こる際に、上皮細胞が発現していた mRNA やタンパク質は維持されるものと減少するものがあり、間葉系細胞が持つ特有の mRNA やタンパク質が発現される。このことは腹膜上皮に存在する腹膜中皮細胞にも同様な機構が起こる。例えば、細胞接着分子として知られている E-cadherin は EMT を起こすことにより、減少することが報告されている<sup>[7]</sup>。その他に、

Occludins、ZO-1、Desmoplakin、サイトケラチン等が減少する<sup>[8]</sup>。これに対し、細胞接着分子を減少させる転写因子である Snail、細胞骨格形成する  $\alpha$ -SMA、間質の主成分である Collagen I/III、また、細胞接着・遊走に関与すると考えられている Fibronectin 等が EMT により増加する事が報告されている<sup>[3][9][10]</sup>。これらの分子マーカーを測定することにより、EMT が起きているのかどうかを検証することができる。Table.1-2 に、中皮細胞と線維芽(様)細胞の分子マーカー表を示す<sup>[5]</sup>。

Table.1-2 中皮細胞と線維芽(様)細胞の分子マーカー<sup>[5]</sup>

分子マーカー	中皮細胞	線維芽様細胞	線維芽細胞
E-cadherin	+	-	-
Snail	+/-	++	++
Cytokeratins	++	+	-
Fibronectin	+	++	++
Collagen I	+	++	++
$\alpha$ -SMA	-	++	++
$\alpha_5$ -integrin	-	+	+

この EMT を起こした細胞の特徴としては、遊走能や浸潤能を得ることが挙げられる。この現象は、癌転移、初期胚発生時における原腸陥入、神経堤細胞の運動、また、心臓や腎臓、口蓋形成などの器官形成過程において重要である<sup>[11][12]</sup>。

### 1-2-3. EMT 誘導因子

EMT を誘導する物質として様々なサイトカインやタンパク質の存在が知られている。サイトカインとは、細胞の分化、増殖、活性を制御する細胞から分泌されるタンパク性増殖因子である。細胞表面の受容体に働くことで、シグナル伝達を引き起こす。具体的には次の様な物質が報告されている。

- ・ TGF- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1)  
透析液の中の D-グルコースの影響により中皮細胞がオートクリンで産生し、その影響により EMT を誘導することが知られている<sup>[3][13]</sup>。
- ・ AGEs(advanced glycation end products)  
タンパク質に糖が結合した物質。AGE が糖尿病の腎臓における尿細管間質線維症の発達の役割を担っている事が報告されており、EMT に大きく関与していると考えられる<sup>[14][15]</sup>。

- EGF(epidermal growth factor)  
細胞増殖、遊走、細胞外マトリックス産生などの機能を持つ。血小板から分泌される。血管新生時に EGF が発現し、EMT を誘導することが知られている<sup>[10]</sup>。
- FGF(fibroblast growth factor)  
上皮細胞やマクロファージなどから産生され、線維芽細胞など、特定の細胞を成長、増殖、または分化させる因子<sup>[16][17]</sup>。また、創傷時における線維芽細胞増殖や血管新生時においても発現する。
- HGF(hepatocyte growth factor)  
肝細胞増殖因子。肝細胞に限らず多種の上皮系細胞の増殖、遊走、形態形成、などの活動を制御することが知られている<sup>[18]</sup>。また、胎児期の器官形成や成体の組織や臓器の再生と修復、癌などに関わっていることが知られている。
- IL-1(interleukin-1)  
リンパ球の分化・増殖を促進する因子として同定されている。炎症が起こると単球やマクロファージなどから産生され、血管内皮への付着、および血管内膜への侵入を促進すると知られている<sup>[18]</sup>。
- TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )  
E-cadherin を抑制し、ビメンチン発現を促進して MMP9 活動を活性化させることで EMT を誘導する<sup>[19]</sup>。

組織においてはこれら様々な因子が相互作用をして EMT を進行させることが報告されている。この中でも TGF- $\beta$ 1 は顕著に EMT を誘導し、間質線維症を誘引する主要なサイトカインとして報告されている<sup>[20]</sup>。

#### 1-2-4. MET とは

1-2 で記載したように、TGF- $\beta$ 1 などの影響によって上皮系の細胞が間葉系の細胞へと脱分化してしまう現象の事を EMT と言う。これに対して、間葉系の細胞が上皮系の細胞へと分化する、Mesenchymal to epithelial transition (MET) という現象がある。MET は、組織形成の過程において誘導されたり、癌細胞が転移後にその場に定着するために誘導されたりするため、EMT 同様に必要な時には誘導をし、生体に害を与える際には防がなければならない現象である。これを利用して腹膜透析時の線維化の進行を遅らそうとしている研究が幾つか報告されている<sup>[21][22]</sup>。詳細なメカニズムに関しては未知な部分が多いが、現在報告されている MET 誘導因子は 2 つ存在している。まず 1 つ目は Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7)、2 つ目は Hepatocyte growth factor (HGF)

である。それらが EMT を引き起こした細胞に作用し、細胞間接着を再度結合させ、Rho-GTPase の活性化、細胞骨格リモデリングなどを行う事で、上皮系の細胞へと分化させる(Fig. 1-6)。この現象を理解し、利用することによって、現在問題視されている長期腹膜透析時における腹膜硬化症を予防、あるいは治療することができるようになると考えられる。

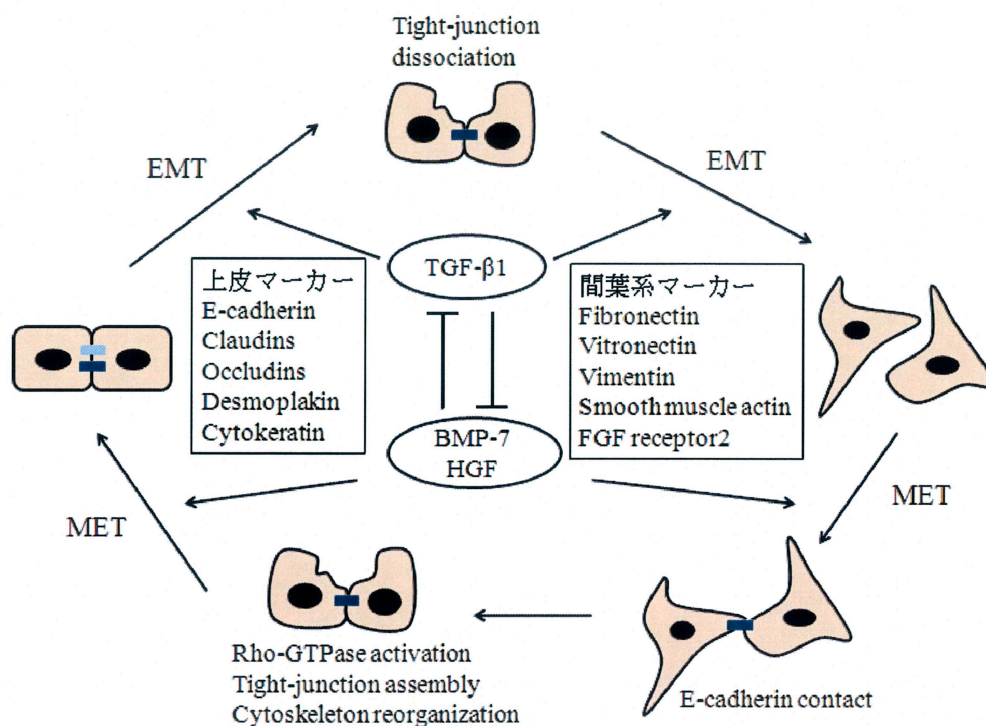


Fig.1-6 EMT と MET の概要<sup>[21]</sup>

### 1-2-5. Bone Morphogenetic Protein-7(BMP-7)とは

Bone Morphogenetic Protein(BMP)は、1960 年代に Urist らが脱灰骨基質を筋肉内、あるいは皮下移植をすることによって異所性の骨誘導現象が起こることから発見された分子量約 30kDa のタンパク質である<sup>[23]</sup>。その後 Urist らはこの現象を担っているタンパク質を BMP と名付け、以来研究が盛んに行われ、腹側中胚葉の誘導活性や、様々な細胞運動、細胞の分化や器官形成における役割が明らかとなってきた TGF-βスーパーファミリーに属するタンパク質である。BMP2 と BMP7 は相同性が高く、これらは TGF-βのアミノ酸配列、3 次構造の相同性が高い事から、TGF-βファミリーに分類されている(Fig.1-7)<sup>[24]</sup>。オレンジの領域であるα1、α2 は TGF-βに特有の領域であり、赤いα4 は、BMP-7 に特有の領域である。TGF-βが体中の至る所に存在し、それらの組織にレセプターが存在していることから想像できるように、BMP においても骨のみならず、脳、腎、心臓、皮膚、その他の組織にも発現していることが知られている<sup>[25][26]</sup>。骨以外の組織における役割については不明な点

が多いが、上述した様に、近年 MET 誘導にも大きく関与している可能性が報告されているため、EMT に関する研究をしている者にとって非常に興味深いサイトカインの一つであると言える。

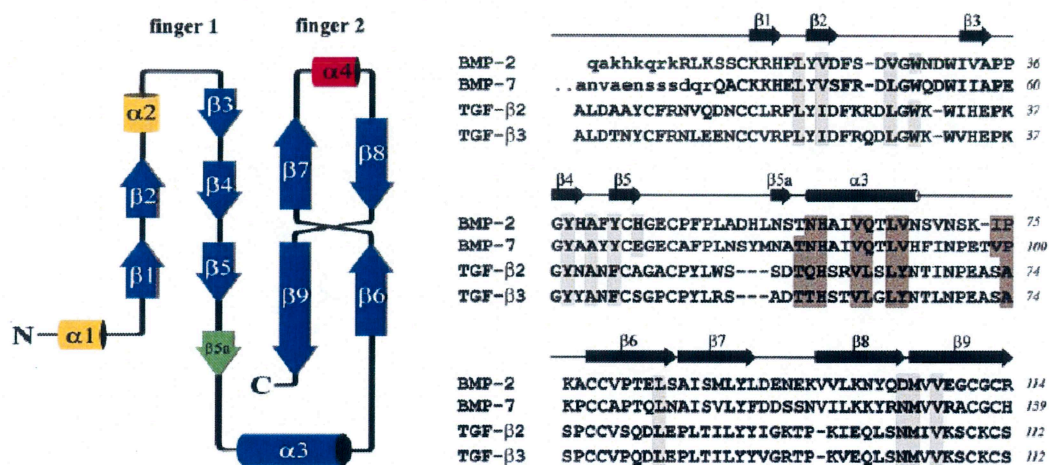
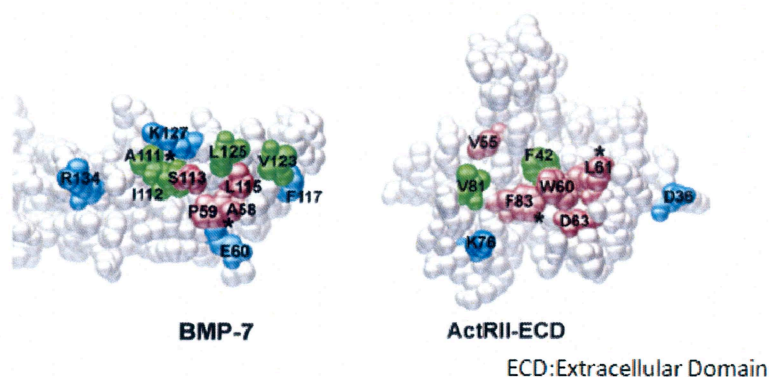


Fig.1-7 BMP の topology diagram<sup>[24]</sup>

BMP にはいくつかのレセプターが存在している(Tabel.1-3)。レセプターには type I、type II の二種類のセリン/スレオニンキナーゼ型受容体があり、type II レセプターに BMP が結合して複合体を形成し、それが type I レセプターに結合することによってシグナル伝達を開始されると言われている<sup>[27][28]</sup>。Type II レセプターと BMP-7 の結合様式は、Fig.1-8 に示す通りである<sup>[29]</sup>。BMP は一般的に骨形成に関与するタンパク質として知られているが、一方で尿細管細胞において BMP-7 が特異的 Smad である Smad1/5/8 を活性化して Smad4 と結合し、核内移行して E-cadherin の発現を上昇させると共に、抑制型 Smad である Smad6、Smad7 を活性化することによって特異的 Smad のリン酸化を抑制し、TGF-βからの Smad2/3 の経路も抑制するという経路も報告されている<sup>[27]</sup>。これらの事からも、BMP-7 が MET に大きく関与している事が容易に想像できる。

Table.1-3 BMP のレセプター

type	name
I	ALK-2(ActR-IA)
	ALK-3(BMPR-IA)
	ALK-6(BMPR-IB)
II	BMPR-II
	ActR-II



BMP-7	S88, L115, L125	A111, I112, S113, K127	P59	A58, L115
Act-RII	W60	L61	D63	F83

Fig.1-8 BMP-7 と type II レセプターの結合部位<sup>[29]</sup>

### 1-3. 細胞遊走

#### 1-3-1. EMT 誘導細胞の浸潤・遊走

細胞遊走には、EMT による細胞遊走、癌細胞の浸潤、白血球の炎症部位への遊走、組織形成における遊走など様々な遊走がある。

EMT を引き起こした上皮系細胞は、正常な上皮系細胞で見られる細胞間結合装置が減少し、細胞の極性を失う。形態保持を補うために、Rho などの影響によって細胞骨格である  $\alpha$ -SMA を再構成し、前後の動きを獲得することで遊走能を得る。そして、マトリックス分解酵素(MMP)を産生することで、基底膜や間質を構成している Collagen type I 等を分解しながら間質へと浸潤していく (Fig.1-9)。

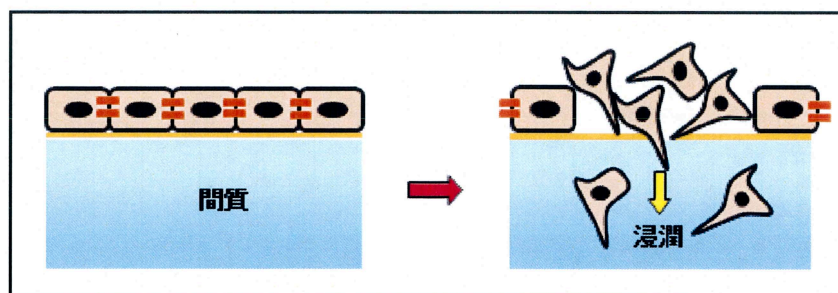


Fig.1-9 EMT を引き起こした細胞遊走

### 1-3-2. 化学走化性因子

化学走化性因子とは、癌細胞の浸潤、線維芽細胞の遊走<sup>[30]</sup>、白血球の遊走<sup>[31]</sup>など、様々な状況で機能する物質である。この化学走化性因子を細胞がレセプターを介して認識し、遊走のシグナルを伝達して遊走する。また、化学走化性因子の濃度勾配に沿って遊走することも知られている<sup>[19]</sup>。Table.1-4 に、化学走化性因子と考えられる因子を記した。

Table.1-4 化学走化性因子

走化性因子	Receptor	発現細胞	機能
FN <sup>[30][31]</sup> (fibronectin)	$\alpha_5\beta_1$ Integrin $\alpha_v\beta_1$ Integrin	線維芽細胞	細胞遊走、接着に関与している細胞外マトリクス
IL8 <sup>[32]</sup>	IL8R- $\alpha$	マクロファージ 内皮細胞 線維芽細胞	炎症部で大量に産生され、血管から炎症組織へ好中球やT細胞を遊走させる
EGF <sup>[10]</sup>	EGFR	上皮細胞 血小板	細胞増殖、遊走、細胞外マトリクス産生などの働きを持つ
HA <sup>[33]</sup> (hyaluronan)	CD44	血管平滑筋細胞 腫瘍細胞	細胞の遊走活性を刺激して浸潤の増強に働く
TGF- $\beta$ 1 <sup>[3][9]</sup>	TGFR	上皮細胞 癌細胞 内皮細胞	上皮マーカーの発現抑制と間葉系マーカーの発現の上昇を誘導し、浸潤性や運動性を亢進させる

癌細胞の浸潤（転移）のメカニズムは、下の図に示したように起こる (Fig.1-10)。癌化した細胞が EMT を起こすことにより、マトリックス分解酵素を産生し、基底膜や間質の Collagen type I を分解し、浸潤していく。そして、血管へと浸潤し、血流に乗って他の組織へと進み、そこで接着増殖を起こすことで癌転が増殖する。



The diagram illustrates the development of the heart through four stages:

- Stage 1 (Top Left):** Shows the early heart tube with labels: 洞房口 (Auricular opening), 心内横膈 (Septum transversum), and 一室中隔 (Septum secundum).
- Stage 2 (Top Right):** Shows the formation of the atria and ventricles. Labels include: 一室中隔 (Septum secundum) and 一室孔 (Foramen secundum).
- Stage 3 (Bottom Left):** Shows the further differentiation of the heart chambers. Labels include: 肺静脉 (Pulmonary vein), 二室孔 (Foramen secundum), 原始右房 (Primitive right atrium), 原始左房 (Primitive left atrium), 室间隔 (Septum interventriculare), 心房 (Atrium), 心室中隔 (Septum interatriale), and 卵圆孔 (Fornix).
- Stage 4 (Bottom Right):** Shows the mature fetal heart. Labels include: 二室中隔 (Septum secundum), 上室瓣膜口 (Superior vena cava orifice), 下室瓣膜口 (Inferior vena cava orifice), 室间隔缺损口 (Defect in septum interventriculare), 肺动脉 (Pulmonary artery), 三尖瓣 (Tricuspid valve), 室间隔 (Septum interventriculare), 卵圆孔 (Fornix), 室间隔缺损口 (Defect in septum interventriculare), 肺静脉 (Pulmonary vein), 心室中隔 (Septum interatriale), 室间隔 (Septum interventriculare), and 卵圆孔 (Fornix).

Fig.1-11 心臓弁形成の流れ

### 1-4.3 次元細胞遊走モデル

#### 1-4-1. 既存の3次元細胞遊走モデル

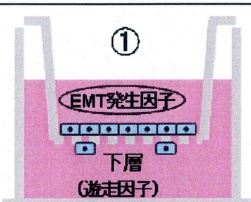
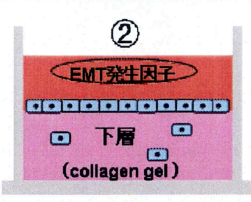
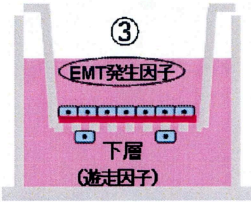
現在、癌転移、組織形成における遊走など、様々な研究で3次元細胞遊走モデルが用いられている<sup>[10]</sup>。染色により下層へ浸潤した細胞数をカウントする方法や、共焦点顕微鏡を用いて下層へ遊走する様子を可視化する方法などがあり、それらにはそれぞれ異なる利点、欠点が存在する(Table.1-5)。

モデル①：Transwell を用いた方法。下層に遊走因子を含ませた培地を入れ、膜上に細胞を播種し、EMT 発生因子により EMT を引き起こし、膜裏へと浸潤した細胞を染色し、観察する<sup>[35][36]</sup>。

モデル②：Collagen gel 上へ直接細胞を播種する方法。膜上には EMT 発生因子が含まれており、EMT を引き起こさせる。ゲル中へと浸潤した細胞を染色し、共焦点顕微鏡にて可視化する<sup>[10][37]</sup>。

モデル③：モデル①の膜上に細胞外マトリクス成分をコートしたモデル。その他の方法はモデル①と同様<sup>[31]</sup>。

Table.1-5 既存の3次元細胞遊走モデル

モデル	利点	欠点
 <p>①</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・遊走した細胞を観察できる</li> <li>・膜上と膜下で、膜の厚さ分だけが濃度勾配が形成される</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・下層に遊走因子の濃度勾配が存在しない</li> <li>・下層の細胞は観察できない</li> </ul>
 <p>②</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ゲル内に浸潤した細胞を可視化できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・下層に遊走因子の濃度勾配が存在しない</li> <li>・基底膜を考慮していない</li> </ul>
 <p>③</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・生体内に近い基底膜を作成できる</li> <li>・遊走した細胞を観察できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・下層に遊走因子の濃度勾配が存在しない</li> </ul>

### 1-4-3. 生体内における濃度勾配

生体内には様々な濃度勾配が存在しており、Fibronectin に関しても濃度勾配が形成されていると考えられる。例えば糖尿病による腹膜線維症において、体内の高血糖下においてグルコースやフルクトースによりグリケーションが促進し、血管に AGE(advanced glycation end products)が蓄積し、この AGE のレセプター(RAGE)を持つマクロファージ、好中球などが AGE を認識し、Fibronectin を産生する。この Fibronectin に引き寄せられるように EMT を起こした HPMC が間質へと浸潤すると考えられる(Fig.1-12)。さらに、EMT を起こした HPMC である線維芽様細胞が浸潤した後に Fibronectin を産生することが報告されている<sup>[33][12]</sup>。これにより HPMC の間質への浸潤がさらに促進されることが考えられる。

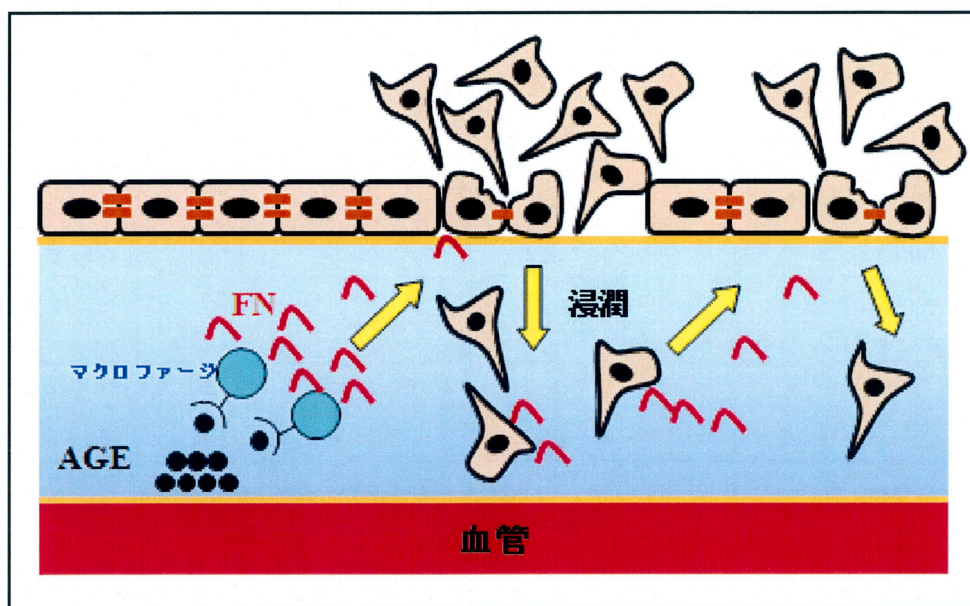


Fig.1-12 HPMC の間質への浸潤の流れ

## 2. 目的

HPMC が引き起こす EMT は腹膜線維症・硬化症に関係していると考えられているが、その詳しいメカニズムはまだ解明されていない。腹膜線維症の透析患者の腹膜組織特有に見られる cytokeratin(+), $\alpha$ -SMA(+)の細胞群の由来を解明すると共に、EMT-HPMC を正常な HPMC に可逆変化させられるかどうかそのメカニズムを探索し、腹膜線維症・硬化症の治療・予防に貢献することを本研究の目的とする。

そこで「炎症などにより間質に生じた化学走化性因子の濃度勾配を EMT-HPMC が特異的に認識して遊走する」という仮説を立て、既存の 3 次元細胞遊走モデルよりもより定量性を向上させた濃度勾配を持つ 3D 遊走モデルを試作して、本仮説を証明することを目的とした。

### 3. 方法

本研究で使用した試薬・機器に関する詳細なデータに関しては、10.APPENDIX に示した。

#### 実験の概要

本研究の目的を達成するために、次のような流れで実験を行った。

1. 初代培養・細胞培養
2. EMT 誘導の観察(画像撮影、RT-PCR、Western Blotting)
3. ゲル中における遊走因子の拡散係数測定
4. 3次元細胞遊走試験における遊走能測定
5. MET 誘導時における形態変化及び $\alpha$ -SMA 発現量変化

#### 3-1. 初代培養・細胞培養

ヒト腹腔内体網から採取した腹膜中皮細胞を培養して、以後の実験を行った。ヒト体網からの腹膜中皮細胞の採取（初代培養）及び継代培養は生体材料化学研究室の共通プロトコル（APPENDIX A-1. 細胞培養プロトコル 参照）に従った。ここではその概略を記す。

##### 3-1-1. ヒト大網由来腹膜中皮細胞（HPMC）の培養

本研究で使用した HPMC は、予め本学医学部倫理委員会によって患者組織の採取につき承認(No.369)を得て、informed consent を得た患者から頂いた体網組織に由来する。腹腔内手術から得られたヒト体網塊を親指大の切片に切り分けた後、10%trypsin/PBS 溶液により HPMC を単離・採取し、各種 supplement 及び 10%FBS を添加した M199 を用いて培養フラスコ内で培養した。本研究では継代数が2~3代目の細胞から細胞密度が $5 \times 10^5$  個/ml の細胞懸濁液を作成し、6 穴プレート及び $\phi 35$  シャーレ、24 穴プレートに播種した後、confluent または subconfluent まで培養したものを使用した。培地は3日に1回交換した。

##### 3-1-2. HPMC への TGF- $\beta 1$ の曝露

6 穴プレート及び $\phi 35$  シャーレに subconfluent まで培養した HPMC の培地を、0.1%FBS/M199(SIGMA)と交換し 24h growth arrest を行った。その後 10ng/ml TGF- $\beta 1$ /M199 と交換し、12、24、48h 培養した。用いた TGF- $\beta 1$  は、PEPRO TECH EC から購入した。

### 3-2. TGF- $\beta$ 1 曝露による細胞の形態変化の静止画撮影

#### 静止画撮影

TGF- $\beta$ 1 曝露後、各時間（0、24、48、72、96h）における HPMC の形態を位相差顕微鏡 CK2 にて観察し、デジタルカメラ CAMEDIA C-3040 ZOOM にてその画像を撮影し、パーソナルコンピュータに取り込んだ。

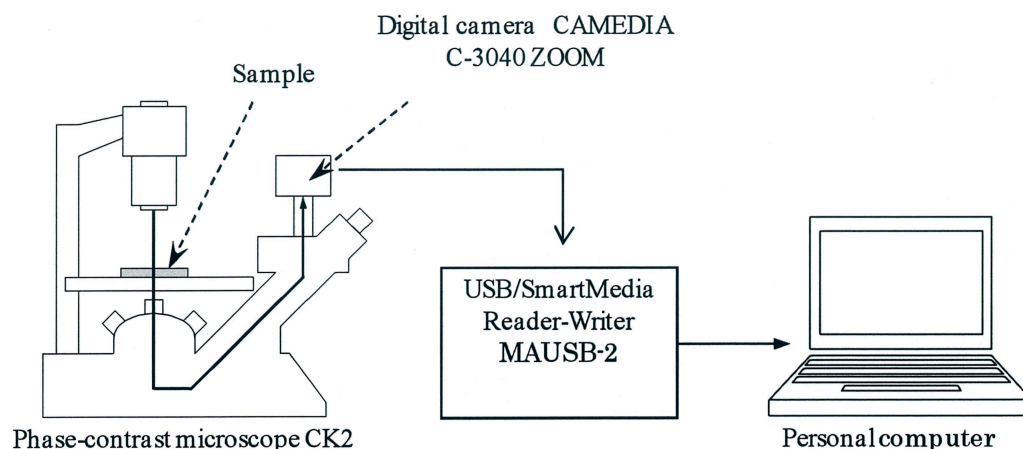


Fig.3-1 画像取り込みダイアグラム

### 3-3. TGF- $\beta$ 1 曝露による Snail 及び E-cadherin、 $\alpha$ <sub>5</sub>-integrin、MMP-2

#### mRNA の経時的測定

作成した HPMC の TGF- $\beta$ 1 曝露モデルより、mRNA の抽出し、Snail 及び E-cadherin、 $\alpha$ <sub>5</sub>-integrin、MMP-2 mRNA 発現量の経時的測定を行った。AGPC 法、RNA の定量法、RT-PCR 法、電気泳動法は生体材料化学研究室の共通プロトコル（APPENDIX A-3. AGPC 法プロトコル、A-3. RNA の定量プロトコル、A-4. RT-PCR プロトコル 参照）に従った。ここでは、簡単にその概要を記す。

#### 3-3-1. Acid Guanidium-Phenol-Chloroform 法（AGPC 法）による mRNA の抽出と定量

作成した HPMC の TGF- $\beta$ 1 刺激モデルに RNA-Bee™ ISOLATION OF RNA(Tel-Test,Inc.)を 1ml/well 加え細胞を掻き取った。chloroform - isoamylalcohol 24:1(SIGMA)を 200 $\mu$ l 加え 15 分間静置した（室温）。12000G/4℃/15 分にて遠心分離、最上層より 350 $\mu$ l 採取し、isopropanol を 500 $\mu$ l 加え-80℃にて一晩保存した。解凍後 12000G/4℃/10 分にて遠心分離、上澄みを除去し、

75%EtOH/DEPC 処理水溶液を 500 $\mu$ l 加えた。10000G/4 $^{\circ}$ C/5 分にて遠心分離、再び上澄みを除去し、減圧乾燥後 DEPC 処理水を 10 $\mu$ l 加え、55 $^{\circ}$ C/5 分加温後 4 $^{\circ}$ C に冷却した。Smart Spec<sup>TM</sup> 3000 Spectrophotometer(BIO RAD)を用いて各サンプルの mRNA を定量した。

### 3-3-2. mRNA の逆転写による cDNA 作成と Polymerase Chain Reaction (PCR) による Snail 及び E-cadherin、 $\alpha_5$ -integrin cDNA の増幅

mRNA の定量結果を基に、全サンプルの mRNA 濃度を統一した。これらの mRNA を Super Script<sup>TM</sup> RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase(Invitrogen)及び Random Primers(Invitrogen)を用いて cDNA に逆転写した (RT product の作成)。得られた RT product 2 $\mu$ l と、各種 Primer (Table.3-1) 及び AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> DNA polymerase(Applied Biosystems)を含む PCR Master Mix を 48 $\mu$ l 混合し、サンプル内の cDNA を PCR により増幅させた (PCR product の作成)。等量の cDNA が用いられているかを確認し、PCR product を半定量化するため、内部標準として house keeping gene である GAPDH を用いた。

Table.3-1 Primer List

Primer	Sequence		Cycles	Size (bp)
GAPDH <sup>[38]</sup>	sense	5'-GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT-3'	29	322
	antisense	5'-CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC-3'		
Snail <sup>[39]</sup>	sense	5'-TCA GAC GAG GAC AGT GGG AAA G-3'	38	487
	antisense	5'-GCT TGT GGA GCA GGG ACA TTC-3'		
E-cadherin <sup>[39]</sup>	sense	5'-TCC CAT CAG CTG CCC AGA AA-3'	36	500
	antisense	5'-TGA CTC CTG TGT TCC TGT TA-3'		
$\alpha_5$ -integrin <sup>[40]</sup>	sense	5'-GGC ATC AGA GGT GGC TGG AGG CTT-3'	39	453
	antisense	5'-GGC AGC TAT GGC GTC CCA CTG TGG-3'		
MMP-2 <sup>[41]</sup>	sense	5'-ACA GCC TGG CAT GGG GCA AGT -3'	29	292
	antisense	5'-TTC TCC TCC ATC CAG TGG AG-3'		

### 3-3-3. 電気泳動とバンドの定量

PCR による増幅後、3% wt/vol Agarose gel と、0.3 $\mu$ g/ml の ethidium bromide を含む 600ml の 1x Tris-acetate-EDTA buffer 泳動液を用い、80V/80mA/70 分の条件で PCR product 10 $\mu$ l の電気泳動を行った。泳動後、イメージアナライザー (TOYOBO) にて jpeg 型式でゲルの画像を撮影し、画像解析ソフト Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™ (Media Cybernetics®) を用いてバンドの輝度を定量化した。結果は GAPDH の値に対する Snail 及び E-cadherin、 $\alpha_5$ -integrin の値の比として示した。

## 3-4. TGF- $\beta$ 1 曝露による $\alpha$ -SMA, RhoA タンパクの経時的測定

タンパク質を抽出し、 $\alpha$ -SMA 発現量の経時的測定を行った。タンパク質の抽出法及び BCA 法によるタンパク質の定量、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング、抗体反応とバンドの定量は体材料化学研究室の共通プロトコル (APPENDIX. A-10 Western Blotting 法 参照) に従った。ここでは、簡単にその概要を記す。

### 3-4-1. 実験条件下での細胞の準備

$\phi$ 35 シャーレに P2~P4 の HPMC をコンフルエントに培養し、0.1%FBS/M199 培地で 24h growth arrest を行った後、実験条件に従って 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 を曝露した。

TGF- $\beta$ 1 曝露時間

$\alpha$ -SMA : 0h、24h、48h、72h、96h

RhoA : 12h、24h、48h

### 3-4-2. タンパク質の抽出と BCA 法による定量

上記の実験条件の細胞に、細胞溶解液を 300 $\mu$ l 加え、さらに protease inhibitor(SIGMA)及び phosphatase inhibitor(SIGMA)をそれぞれ 1 $\mu$ l ずつ加えた。室温で 15 分ほど軽く浸盪した後、セルスクレーパーで細胞を掻き取った。冷却遠心機で 15000rpm/30 分遠心し、上澄み液を取った。抽出したタンパク質溶液は -20 度で冷凍保存した。A 溶液と B 溶液を 50:1 で混合したもの 100 $\mu$ l に対して、サンプル及びスタンダード(BSA)を 10 $\mu$ l ずつ加えた。37°C/30 分静置し、OD<sub>562</sub> を測定した。スタンダードのタンパク質濃度を横軸、吸光度を縦軸にとり、検量線を作成した。その検量線を元にサンプルの総タンパク質濃度を測定した。

### 3-4-3. SDS-PAGE によるタンパク質の分離

ゲル板に running gel (10% or 15% アクリルアミドゲル(Wako)) と stacking gel (4.5% アクリルアミドゲル) 溶液を加え、コームを取り付けて 1h 静置してゲル化させた。コームを取り外し、ウェルを作成した。泳動バッファーを満たした電気泳動槽にゲル板を固定した。抽出したタンパク質溶液とサンプルバッファーを 1:1 で混合し、熱湯 100℃/3 分でボイルした。各ウェル内にサンプルをタンパク量 6 $\mu$ g として計算した量をローディングした。15mA・定電圧で BPB 線が適度な位置に来るまで電気泳動した。

### 3-4-4. 膜への転写(Western Blotting)

電気泳動終了前に running gel と同じ大きさに切ったブロッキング用膜 (ATTO) をメタノールに 20 秒浸し、さらに B 溶液に 15 分浸漬させた。また running gel と同じ大きさに切ったブロッキング濾紙を A 溶液に 2 枚、B 溶液に 1 枚、C 溶液に 3 枚浸した。電気泳動終了後、running gel を B 溶液に浸した。ブロッキング装置に、準備していた A 溶液に浸していたブロッキング濾紙 2 枚を乗せ、さらに B 溶液に浸していた濾紙 1 枚、PVDF 膜、running gel、C 溶液に浸していた濾紙 3 枚の順番に上に重ねてセットした。膜面積 $\times$ 2mA の電流で 40 分ブロッキングした。ブロッキング後にブロッキング溶液で 10 分間ブロッキングを行い、PBST で 10 分毎に 3 回洗浄した。その後、一次抗体溶液を添加して 4℃で over night 行った。

### 3-4-5. 抗体反応とバンドの定量

PBST で 10 分毎に 3 回洗浄した。洗浄後二次抗体を PVDF 膜に添加して室温下で 10 分間静置した。再び PBST で 10 分毎に 3 回洗浄した。ECL1 液と 2 液をそれぞれ 1:1 で混ぜ、PVDF 膜上に添加し、3 分間静置した。LAS4000 mini EPUV でバンドをスキャンし画像を保存した。保存した画像を Image J で定量を行った。具体的な方法は APPENDIX. A-10 Western Blotting に従った。

### 3-5. 化学走化性因子を用いた EMT 細胞の 3 次元細胞遊走評価

具体的な方法は APPENDIX. A-6 3 次元細胞遊走モデルの作製に従った。ここでは簡単な方法を示す。

#### 3-5-1. FN, BSA, AGE を用いた 3 次元細胞遊走評価モデルの作成

24 穴プレートに 10 $\mu$ g/ml FN(あるいは 1.5 $\mu$ g/ml BSA or AGE)を含んだ 1.5mg/ml collagen gel を 200 $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C/30 分インキュベートしてゲル化させた (control として 1.5mg/ml collagen gel を用いた)。さらにそのゲルの上に、0.5mg/ml collagen gel を 200 $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C/30 分インキュベートしてゲル化させることにより、FN の拡散層を作成した。FN は 48h、72h インキュベートして濃度勾配を作成した。またゲル上に膜孔 12 $\mu$ m のインサートを乗せ、EMT 誘導なしでは 0.1%FBS/M199 で、また EMT 誘導条件として 10ng/ml TGF- $\beta$ 1/0.1%FBS/M199 を 300 $\mu$ l 加えた (Fig.3-2a)。

予め $\phi$ 35 シャーレに subconfluent まで培養し、EMT 誘導条件の時のみ HPMC に 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 を 48h 曝露した。それを継代操作し、細胞数が 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 個/穴となるように作成しておいた 24 穴プレートのインサート上部へ播種後、72h 培養した (Fig.3-2b、Fig.3-2c)。

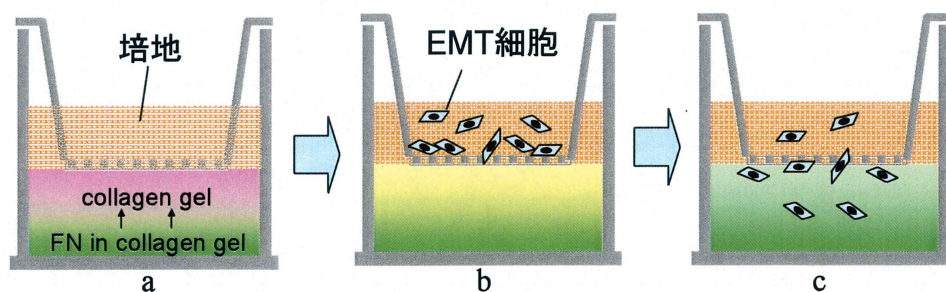


Fig.3-2 3 次元細胞遊走評価モデル

#### 3-5-2. RGDS 阻害剤による FN 存在下での実験条件

FN のゲル内の濃度及び拡散時間等は 3-5-1 に記した。RGDS による阻害実験では、まず予め $\phi$ 35 シャーレに subconfluent までに培養した細胞に 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 を 48h 曝露した。それを継代操作する際に、5 $\mu$ g/ml の RGDS を曝露し、30min インキュベートを行った。その後継代培養するとき、細胞数が 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 個/穴となるように作成しておいた 24 穴プレートのインサート上部へ播種後、72h 培養した。

### 3-5-3. collagen gel 中の拡散係数測定法

具体的な方法は APPENDIX. A-6 Collagen gel 中の拡散係数測定法に従った。  
ここでは簡単な方法を示す。

まず、内径 1mm のシリコンチューブを 3cm ずつ切断する。また、それぞれの濃度の collagen gel を 50ml 遠沈管に作成する(Table3-2)。

Table3-2 collagen gel 作成(1.8ml 作成時)

(ml)	ゲル濃度(mg/ml)			
	2.0	1.5	1.0	0.5
Cellmatrix I-A(μl)	1200	900	600	300
濃縮培地 199(μl)	150	112.5	75	37.5
緩衝溶液(μl)	150	112.5	75	37.5
M199 培地(μl)	300	675	1050	1425

作成した collagen gel を、シリコンチューブ内に作成し、両端をガラスキャピラリーで密閉し、2h、37℃でインキュベートしてゲル化させる。また、PBS 中に 4kDa,10kDa,70kDa の Dextran を溶解させた溶液をそれぞれ暗室にて作成し、1.5ml アシストチューブに分注しておく。アシストチューブの蓋を開き、パラフィルムで覆い、小さく穴を開け、先ほどゲル化させたシリコンチューブを挿入し、遮光しながら 96h、37℃で Dextran を拡散させる。その後、暗室でシリコンチューブを取り出し、PBS でしっかりと洗浄を行い、カッターで 2mm 間隔に切断し、1% collagenase 溶液に断片をそれぞれ入れ、軽く振り、遮光し、37℃で 30 分インキュベートする。その後蛍光強度測定を行い、拡散距離(cm)と蛍光強度のグラフを作成し、そこから蛍光強度比等の値を式に代入することで、拡散係数  $D$  を逆算することで求めた(Fig3-3)。

また、分子量と拡散係数の両対数プロットを行い、近似直線を作成するにあたり、傾きは水中の傾きと等しくし、切片を最小二乗法にて求めて作成した。

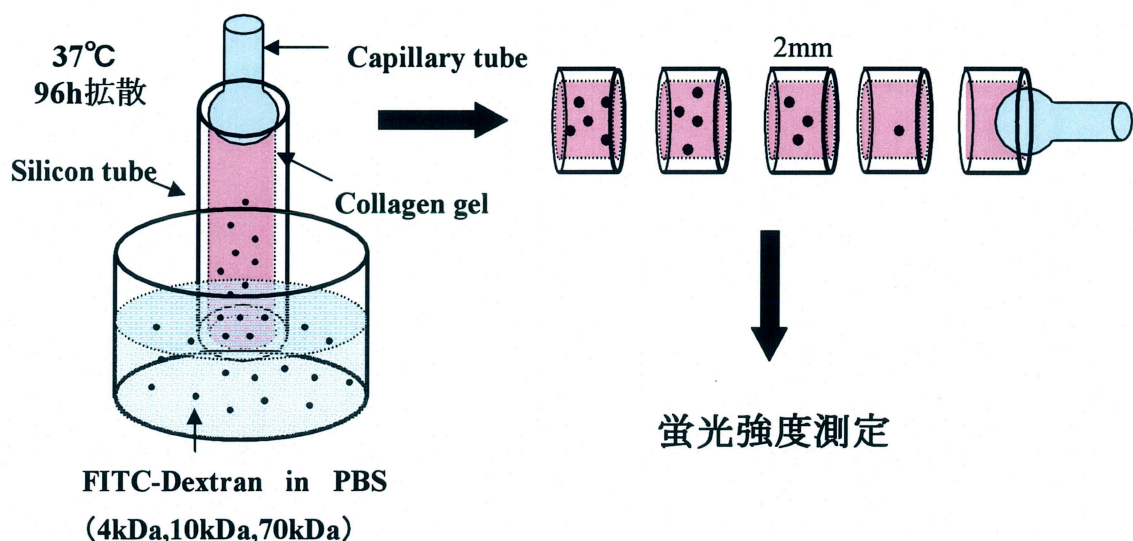


Fig3-3 Collagen gel 中での拡散係数測定法

### 3-5-4. Fick の拡散方程式による濃度勾配予測

Fick の拡散方程式(式①)を初期条件、境界条件を設定することにより、濃度勾配予測の方程式を得た。詳しい途中式に関しては、APPENDIX.A-9 Fick の拡散方程式による濃度勾配予測 にて記した。

Fick の拡散方程式を解くことにより、右の式が得られた。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \longrightarrow \quad C_{(x,t)} = C_0 \operatorname{erfc} \left( \frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) \propto f(R)$$

ここに、濃度、距離(cm)、拡散係数(cm<sup>2</sup>/s)、時間(s)を代入することで、濃度勾配をグラフ化した。error function の値に関しては、APPENDIX.A-9 に記した。

またこの式は、Amylopectin gel 中での BSA の拡散を研究した文献から、濃度と IR スペクトルのピークの高さが比例するということが報告されている [35]。

### 3-5-5. 遊走細胞数の計測

以上の実験条件で行った三次元遊走細胞の測定方法について以下に記す。

まず三次元遊走実験に用いた培地を取り出し、そこに PBS をいれ、PBS を取り除いた培地と混ぜ、上澄みとした。その後インサートを取り除き、インサートは風乾し、ディフクイック染色(APPENDIX 参照)により細胞数を測定した。また上澄みは遠心分離して溶液を取り除き、M199 の 50μl 程度細胞懸濁液を作成した。血球計算盤にて細胞数をカウントし、細胞数を計算した。

ゲルに collagenase S-1 を 30 $\mu$ l 加え、37°C/30 分インキュベートしてゲルを分解した。その溶液を遠心分離して上澄み液を取り除き、M199 を加えて 50 $\mu$ l 程度の細胞懸濁液を作成した。血球計算版にて細胞数をカウントし、細胞数を計算した。

### 3-5-6. 実験条件下での細胞増殖試験

具体的な方法は APPENDIX. A-8 細胞増殖試験 に従った。ここでは簡単な方法を示す。

$\phi$ 35 シャーレに HPMC を  $5 \times 10^4$  個播種した。10%FBS/M199 で 24h インキュベートし、細胞を接着させた。その後 0.1%FBS/M199 で 24h growth arrest 行い、各シャーレ毎に以下に示す条件で培養を行った。

- 10%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 + 10 $\mu$ g/ml FN

培養 24h ごとに 96h まで各シャーレの同一箇所を写真撮影し、細胞数をカウントした。

### 3-5-7. 実験条件下での MTT 試験

具体的な方法は APPENDIX. A-11 MTT 試験に従った。ここでは簡単な方法を示す。

96 穴プレートに HPMC を  $5 \times 10^3$  個/well 播種し、10%FBS/M199 でコンフルエントになるまで培養した。その後、以下の条件で培養を行った。

- 10%FBS/M199 + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 + RGDS

その後 MTT1 液を添加し、37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4h 培養し、MTT2 液を添加して 10 分間振動させ、37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で overnight 静置する。その後 Microplate Reader を用いて測定波長 550nm で吸光度を測定する。

### 3-6. BMP-7 曝露による MET 誘導

#### 3-6-1. BMP-7 曝露濃度の違いによる形態への影響

φ35 シャーレに細胞をコンフルエントで培養し、0.1%FBS/M199 で growth arrest を 24h 行った。その後 10ng/ml の TGF-β1 を 48h 曝露した。線維芽様に形態変化し、EMT が誘導されたことを確認した後、1ng/ml、10ng/ml の濃度の BMP-7 をそれぞれ曝露して形態変化を 72h 観察した。比較対象として、正常 HPMC を 0.1%FBS/M199 で growth arrest 行った後、1ng/ml、10ng/ml の BMP-7 をそれぞれ曝露した細胞も準備した。その後、タンパク抽出を行い、それぞれのα-SMA 発現量を Western Blotting によって観察した。

<Western Blotting 条件>

- 正常 HPMC
- 正常 HPMC + 1ng/ml BMP-7
- 正常 HPMC + 10ng/ml BMP-7
- EMT-HPMC(48h)
- EMT-HPMC(48h) + 1ng/ml BMP-7
- EMT-HPMC(48h) + 10ng/ml BMP-7

### 3-7.統計分析

統計的な有意性は StatView®-J 5.0(SAS 社)を使用した。Control に対する有意差を出す際には、t 検定(対応あり)で試験を行い、control 以外のデータの比較の際には、t 検定(対応なし)で試験を行うことで確率値(P 値)の算出を行い、P 値<0.05 を有意と認識した。

## 4. 結果

### 4-1. TGF- $\beta$ 1 曝露による細胞の形態変化の観察

Subconfluent に培養した HPMC に 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 曝露したときの、細胞形態の経時変化を、デジタルカメラにより撮影した画像を示す (Fig.4-1)。TGF- $\beta$ 1 曝露直後 (0h) では細胞間接着がしっかりしており、敷石状の形態であった。TGF- $\beta$ 1 の曝露時間の経過にしたがって、細胞間が離れ形態が紡錘状に細長く変化した。

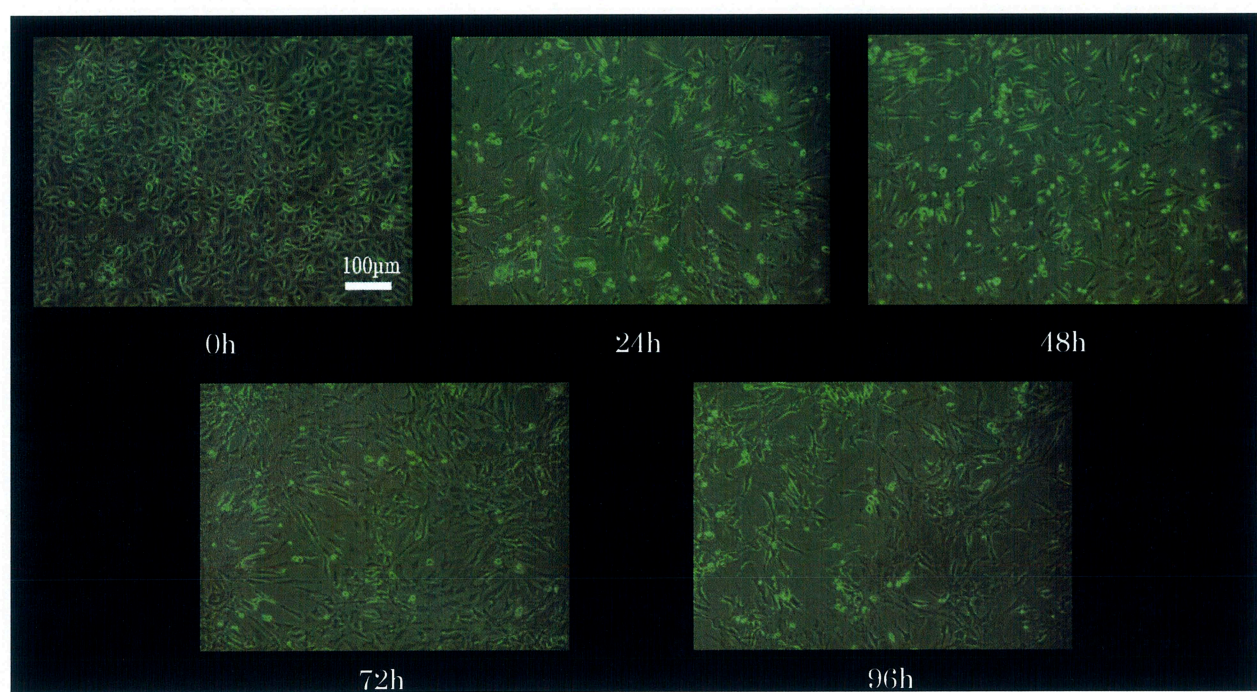


Fig.4-1 TGF- $\beta$ 1 曝露による HPMC の経時的形態変化( $\times 40$ )

### 4-2. TGF- $\beta$ 1 曝露による Snail, E-cadherin, $\alpha_5$ -integrin, MMP-2 mRNA の経時的変化

以下に示す Snail 及び E-cadherin、 $\alpha_5$ -integrin、MMP-2 mRNA 発現結果に用いた値は、RT-PCR 法によって測定したそれぞれの発現量を、内部標準である GAPDH mRNA の発現量で除し、control が 1 となるように補正を行った。

#### 4-2-1. Snail mRNA

Fig.4-2 に TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) 曝露に対する Snail mRNA 発現の経時的変化を示す。TGF- $\beta$ 1 曝露後から Snail mRNA 発現は増加した。また曝露 24 時間後で最大となり、control の約 1.8 倍の発現を示した。48h ではやや減少したが、control よりも高い発現レベルを維持していた (n=6)。

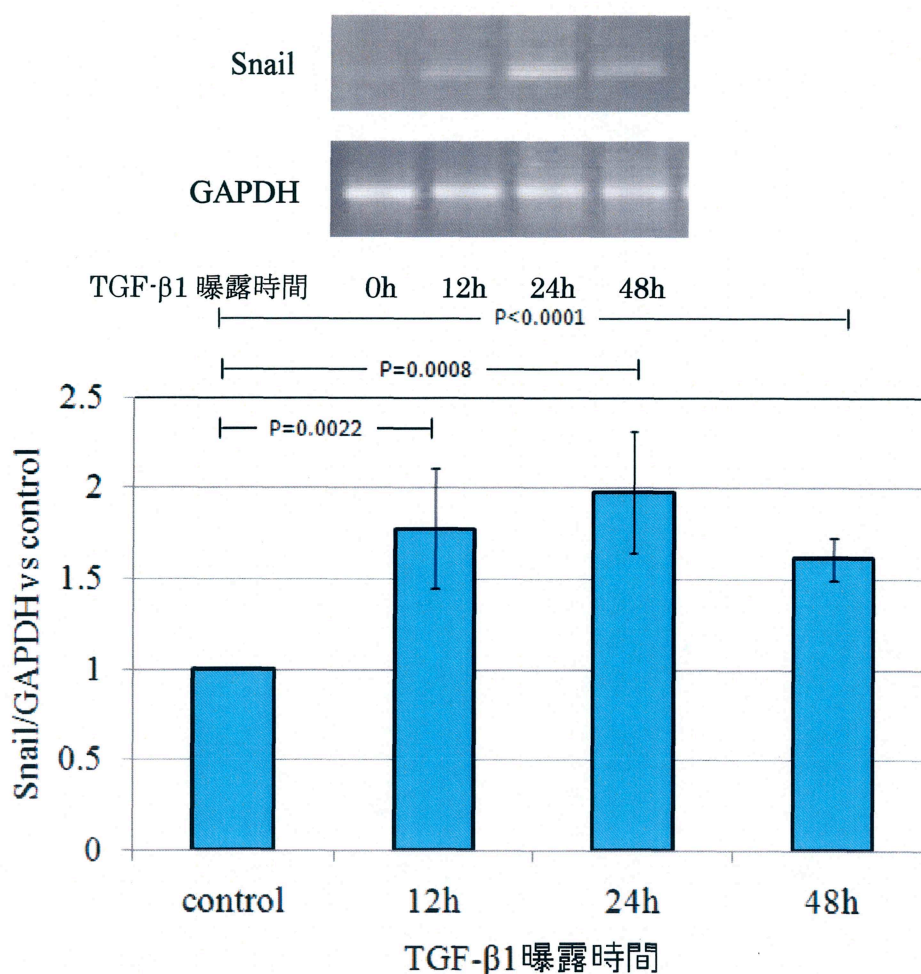


Fig.4-2 TGF- $\beta$ 1 曝露による Snail mRNA の経時変化

#### 4-2-2. E-cadherin mRNA

Fig.4-3 に TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) 曝露に対する E-cadherin mRNA 発現の経時的変化を示す。E-cadherin mRNA は曝露時間依存的に減少した。また曝露後 48 時間後では control の約 0.7 倍の発現の減少を示した (n=6)。

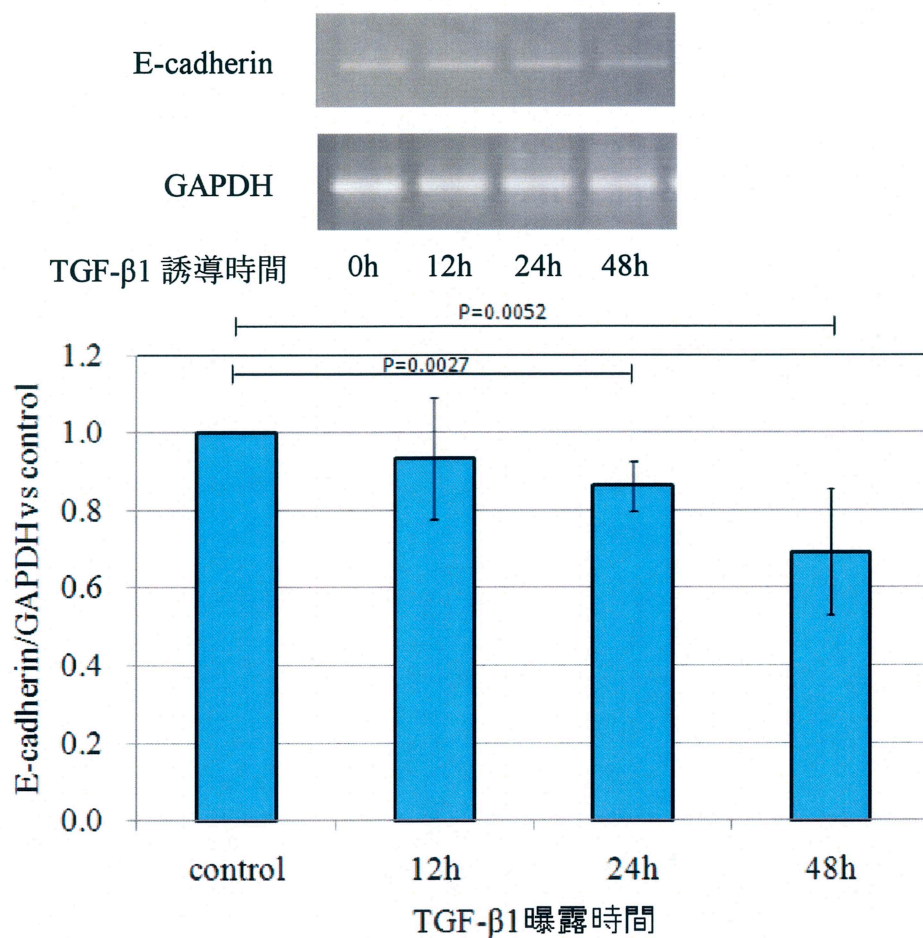
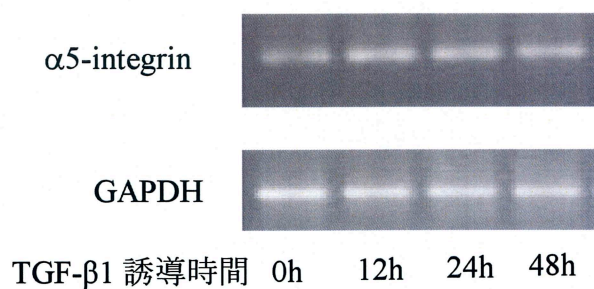


Fig.4-3 TGF- $\beta$ 1 曝露による E-cadherin mRNA の経時変化

#### 4-2-3. TGF- $\beta$ 1 曝露による $\alpha_5$ -integrin mRNA の経時的測定

Fig.4-4 に TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) 曝露に対する $\alpha_5$ -integrin mRNA 発現の経時的変化を示す。TGF- $\beta$ 1 曝露に対して $\alpha_5$ -integrin mRNA は 12h の時点から強い発現を示し、48h でもその強い発現を維持していた (n=6)。



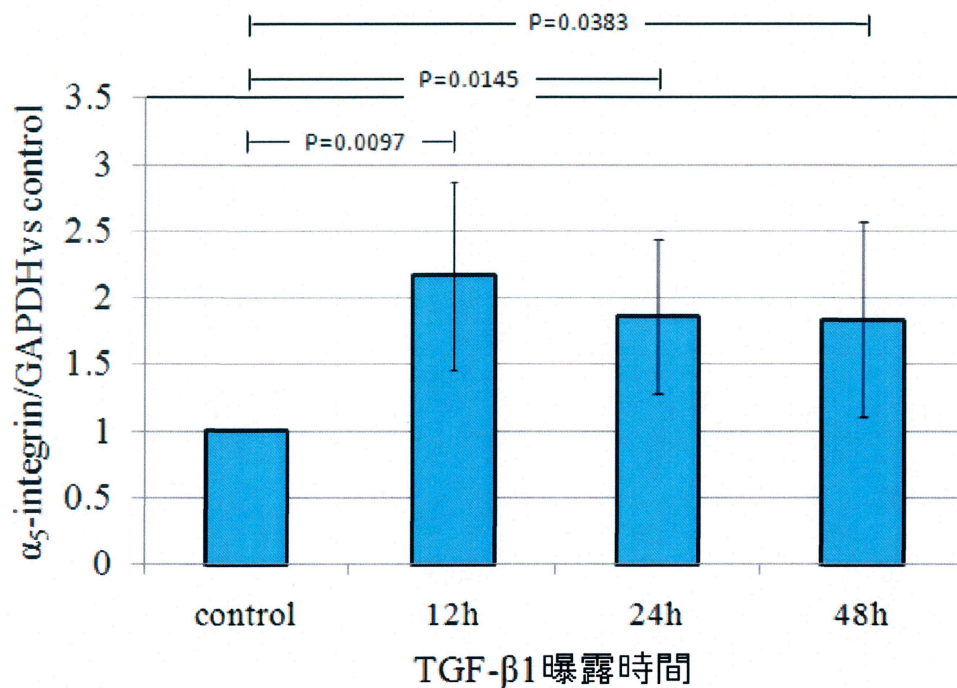
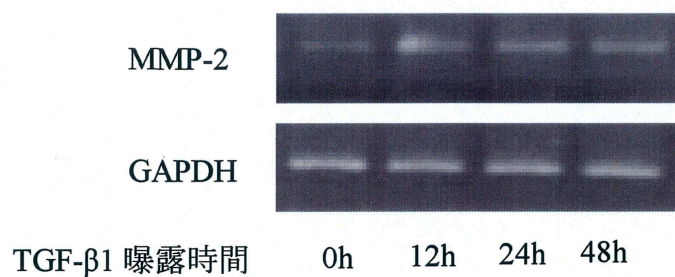


Fig.4-4 TGF-β1 曝露によるα<sub>5</sub>-integrin mRNA の経時変化

#### 4-2-4. TGF-β1 曝露による MMP-2 mRNA の経時的測定

Fig.4-5 に TGF-β1 (10ng/ml) 曝露に対する MMP-2 mRNA 発現の経時的変化を示す。TGF-β1 曝露に対して MMP-2 mRNA は 12h の時点から強い発現を示し、48h でもその強い発現を維持していた (n=6)。



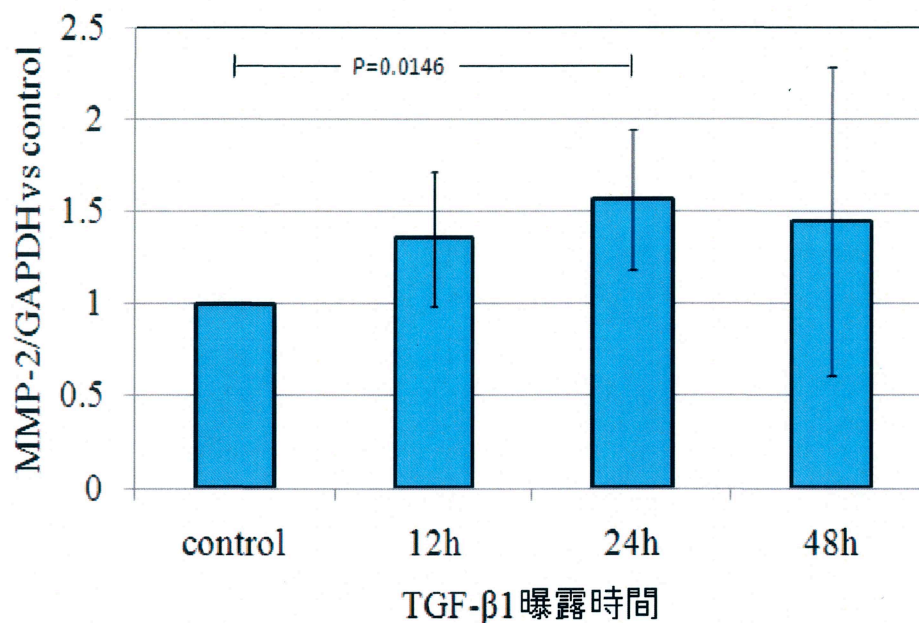


Fig.4-5 TGF-β1 曝露による MMP-2 mRNA の経時変化

### 4.3. TGF-β1 曝露によるα-SMA, RhoA タンパクの経時的変化

#### 4-3-1. α-SMA

Fig.4-6 に TGF-β1 (10ng/ml) 曝露に対するα-SMA 発現の経時的変化を示す。TGF-β1 曝露時間が長くなるほどα-SMA の発現が強発現した(n=4)。

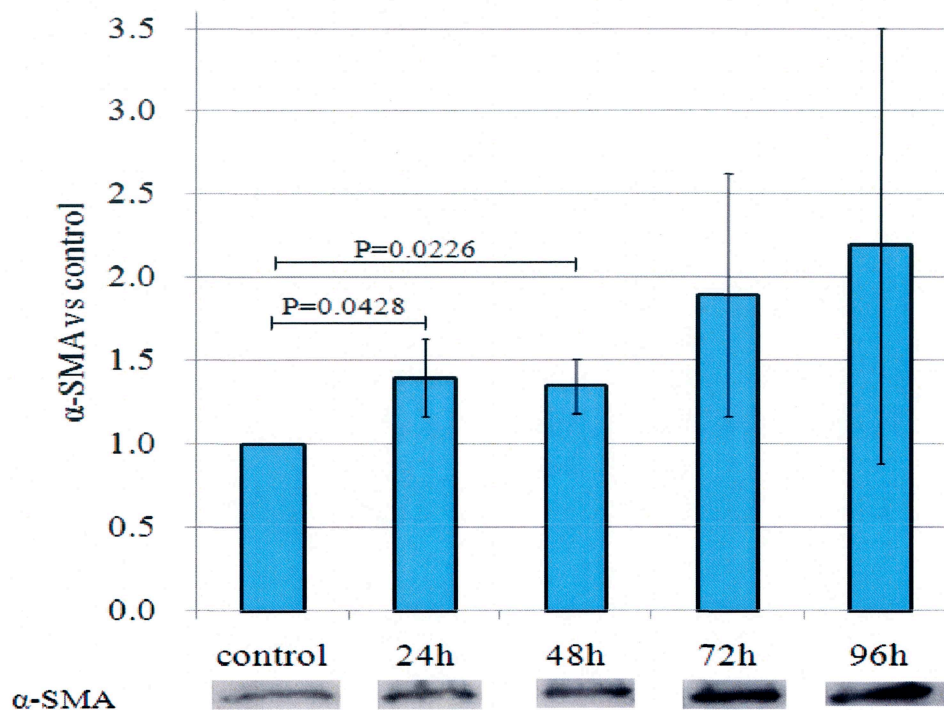


Fig.4-6 EMT 曝露によるα-SMA 発現量の経時的変化

#### 4-3-2. RhoA

Fig.4-7 に TGF- $\beta$ 1(10ng/ml)曝露に対する RhoA 発現の経時的変化を示す。TGF- $\beta$ 1 曝露時間に関係なく、RhoA 発現量は一定の傾向を示した(n=5)。

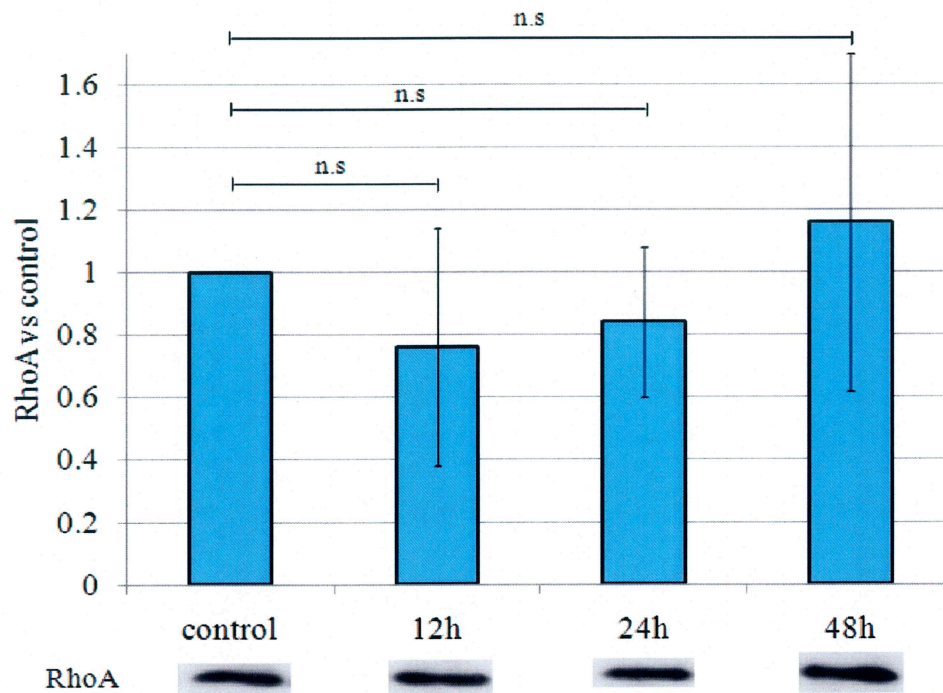


Fig.4-7 TGF- $\beta$ 1 曝露による RhoA 発現量の経時的変化

#### 4-4. collagen gel 中の拡散係数測定

シリコンチューブ内に 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 1.5mg/ml の collagen gel を作製し、そのゲル内に 4kDa, 10kDa, 70kDa の FITC-Dextran を 96h, 37°C で拡散させて蛍光強度を測定した結果の一例を示す(Fig4-8)。また、このグラフから得られた蛍光強度比や、距離(cm)、濃度( $\mu$ g/ml)を、Fick の拡散方程式から得られた式に代入し、拡散係数を逆算した。それらの拡散係数値と、分子量の両対数プロットしたグラフを示す(Fig4-9)。

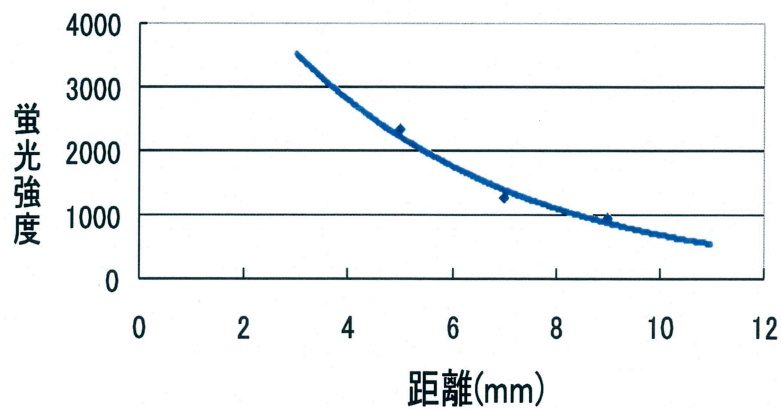


Fig4-8 70kDa FITC-Dextran in 1mg/ml collagen gel の蛍光強度測定結果

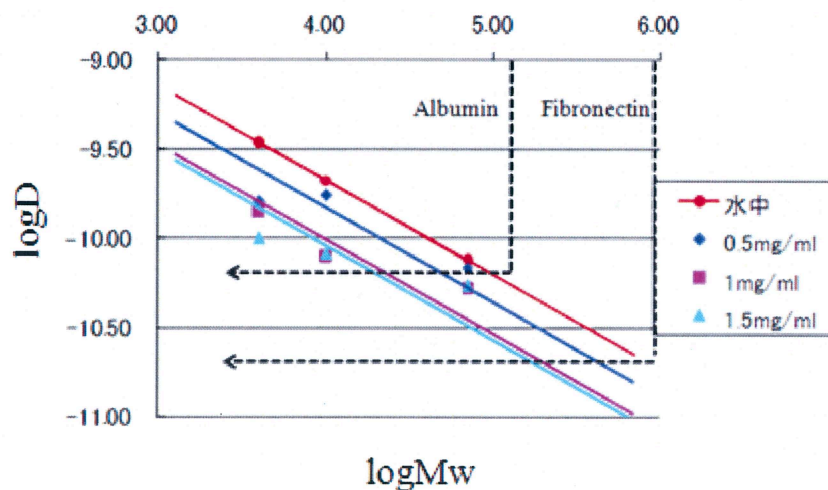


Fig.4-9 分子量と拡散係数の両対数プロット(左列から 4kDa,10kDa,70kDa)

これらから 0.5mg/ml Collagen gel 中での Fibronectin、Albumin の拡散係数は  
 Fibronectin の拡散係数  $D=1.9 \times 10^{-11} (\text{m}^2/\text{s})$   
 Albumin の拡散係数  $D=4.32 \times 10^{-11} (\text{m}^2/\text{s})$  であった。

#### 4-5. Fick の拡散方程式による理論的濃度勾配

3-5 でも述べたように、Fick の拡散方程式を初期条件、境界条件を設定し解くことにより、余誤差関数(error function)を含む式を得ることができた(式 1)。

$$C_{(x,t)} = C_0 \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) \dots\dots (1)$$

この式 1 を用いて、Fibronectin、Albumin の濃度勾配を、横軸に距離(cm)、縦軸に  $C/C_0$  をとり、グラフ化を行った。その結果を示す(Fig4-10)。このグラフは、何時間拡散させたら、距離  $x$  にどの程度の遊走因子が到達するかを理論的に示したものである。まず、Fibronectin の濃度勾配のグラフ化を行い、そのグラフの形状をそのまま一致させた状態から Albumin の時間を逆算し、Albumin の濃度勾配のグラフ化を行った。これにより、Fibronectin と Albumin で実験を行う際、同様の濃度勾配が作成された系で実験を行うことができる。この結果、Fibronectin ではある程度高濃度が細胞付近へ到達していて、濃度勾配も形成されている、72h を選択した。また Albumin に関しては、72h と対応した 24h を選択した。

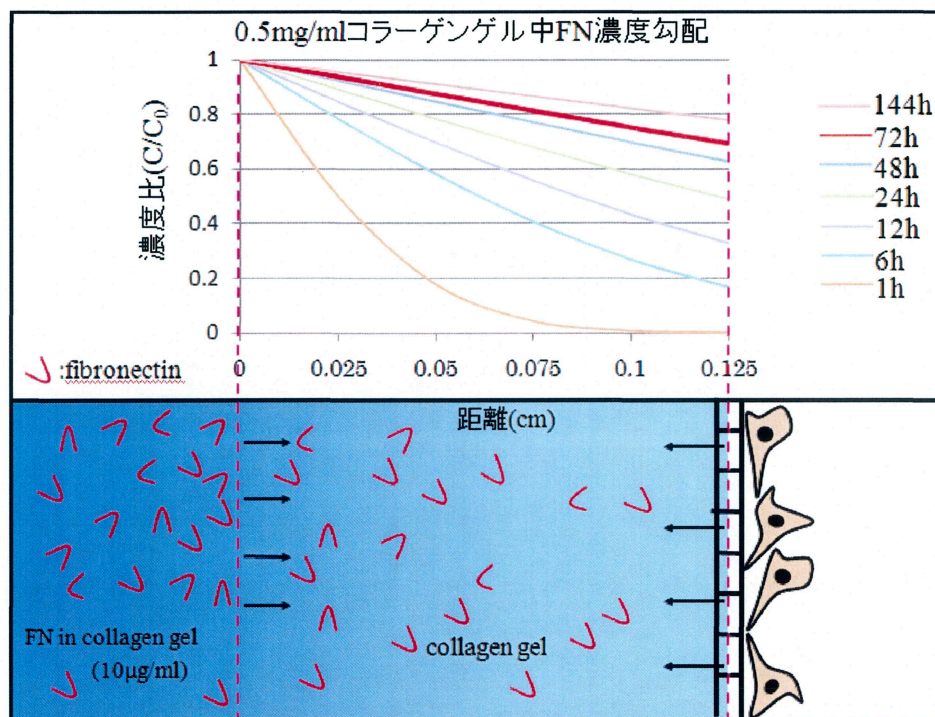


Fig.4-10 Fibronectin の濃度勾配のグラフ化

## 4-6. 走化性因子を用いた 3 次元細胞遊走試験

### 4-6-1. EMT(-) vs EMT(+)

10ng/ml の TGF- $\beta$ 1 を曝露し、EMT を誘導した細胞と、誘導しない正常 HPMC を用いて遊走因子を含まない条件下で 3 次元細胞遊走試験を行った (n=3)。その結果、有意差は得られなかったものの、EMT 誘導 HPMC の方が高い遊走能を示唆する結果となった(Fig.4-11)。

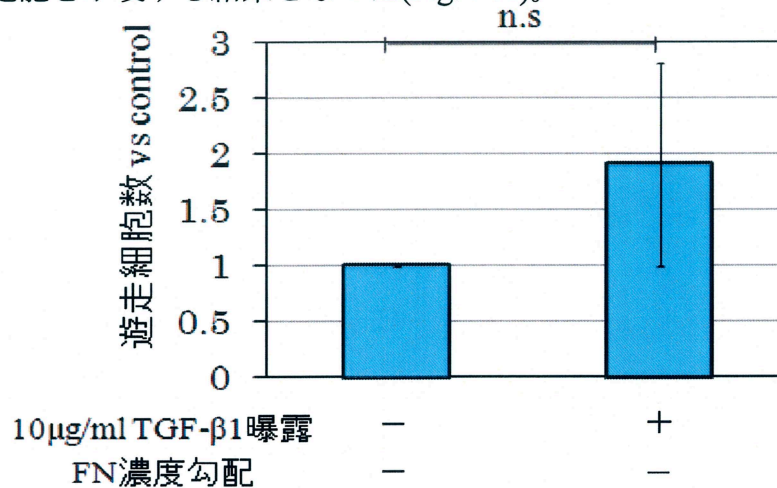


Fig.4-11 3 次元細胞遊走実験 EMT(-) vs EMT(+)

### 4-6-2. FN 存在下での EMT(-) vs EMT(+)

4-6-1 の実験条件に 10μg/ml の FN を 72h 拡散させ、濃度勾配を形成させ、3 次元細胞遊走試験を行った (n=4)。その結果、有意な差は得られなかったものの、EMT 誘導有り、FN 濃度勾配有りの条件下において遊走能の上昇が観察された(Fig.4-12)。

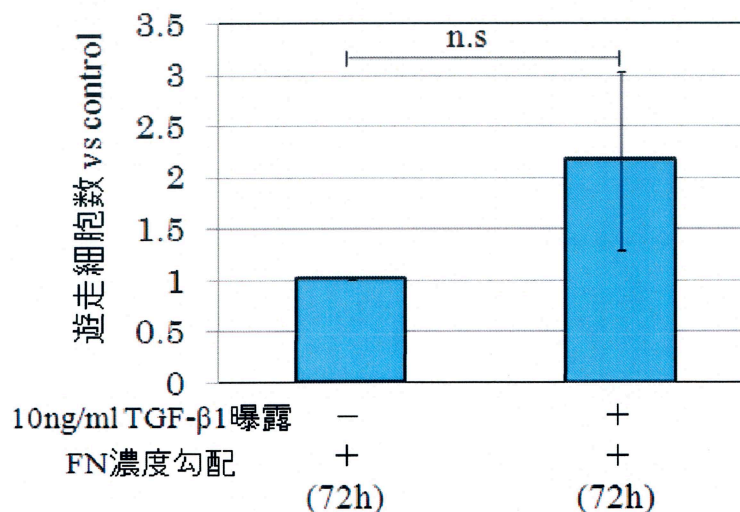


Fig.4-12 FN 存在下の 3 次元細胞遊走実験 EMT(-) vs EMT(+)

#### 4-6-3. EMT 誘導下での Alb vs AGE-BSA vs FN

HPMC にとって FN が特異的な遊走因子であるかどうかを検証するために、血液中に存在する Albumin、また透析患者において蓄積が報告されている最終糖化産物(AGE)を用いて比較を行った(n=5)。その結果、FN の濃度勾配を形成させた系においてのみ、有意な遊走能の上昇が観察された(Fig.4-13)。Alb に関して若干の遊走能の上昇が観察されているが、有意差は得られず、この 3 つの中では FN のみ HPMC が特異的に認識している可能性が示唆された。

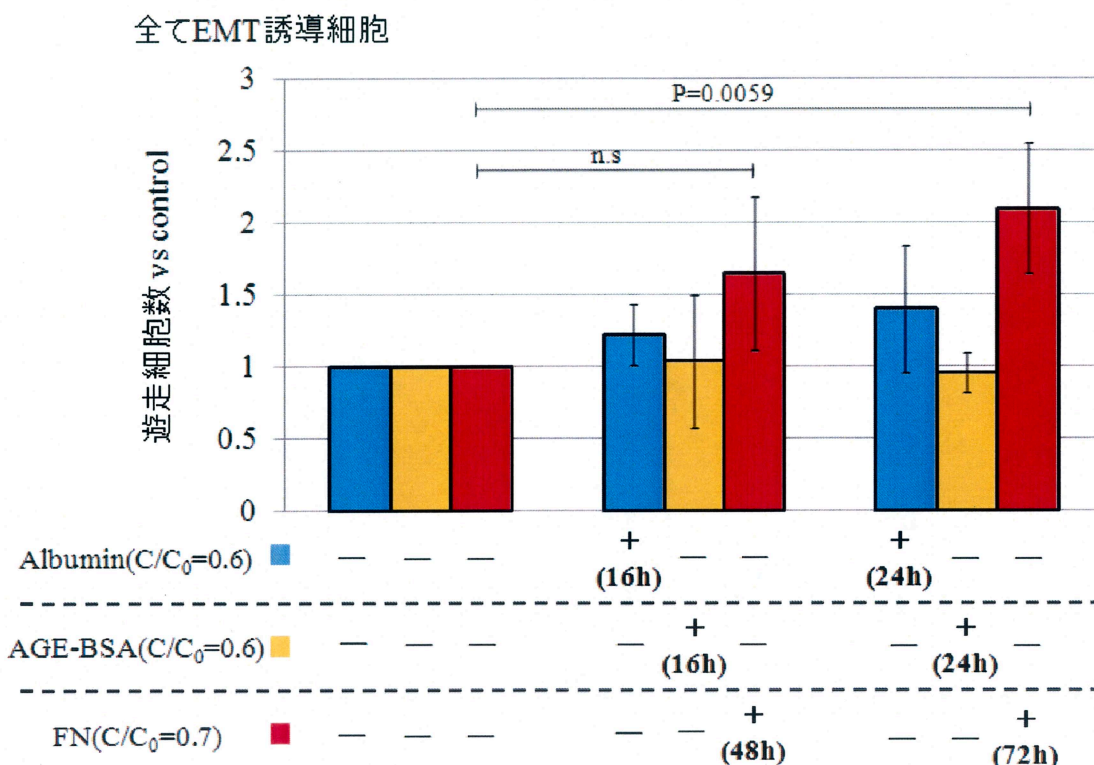


Fig.4-13 3 次元細胞遊走実験 Albumin vs AGE-BSA vs FN

#### 4-6-4. FN 存在下での RGDS(-) vs RGDS(+)

FN が遊走因子であるかを検証するために、FN のレセプターである  $\alpha_5$ -integrin の阻害剤として 5 $\mu$ g/ml の RGDS ペプチドを HPMC に 30 分曝露し、3 次元細胞遊走試験を行った(n=3)。FN の濃度勾配を形成させ、RGDS ペプチドを曝露した系において、有意に遊走能が抑制された。

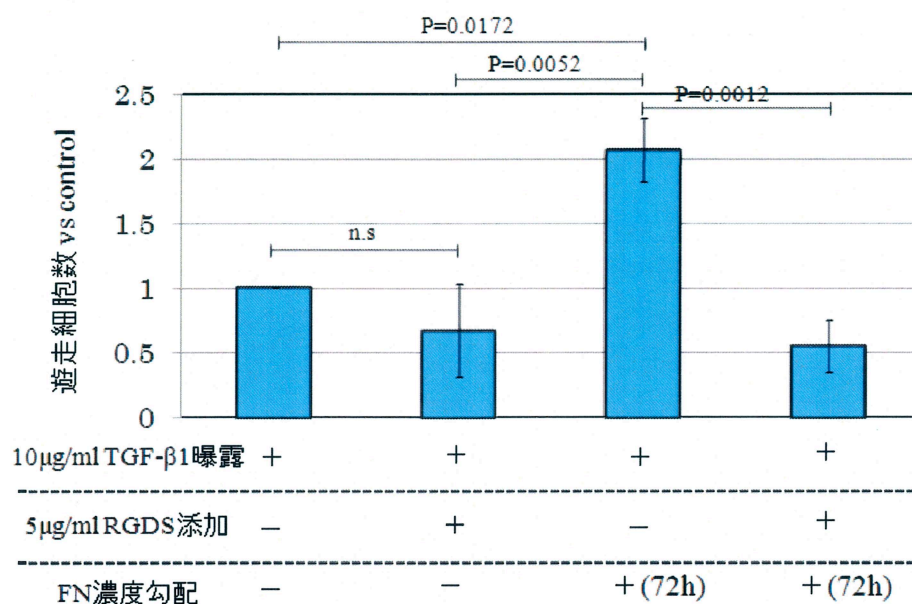


Fig.4-14 FN 存在下の 3 次元細胞遊走実験 RGDS(-) vs RGDS(+)

#### 4-6-5. 細胞増殖試験

Fig.4-15 に各条件下において細胞増殖への影響を測定した結果を示す。条件は以下の 4 種類で行った (n=3)。

- 10%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1 + 10μg/ml FN

通常の細胞培養条件下である 10%FBS/M199 では細胞は増殖し続けた。一方 growth arrest や EMT を起こさせる条件化では細胞は増殖しなかった。

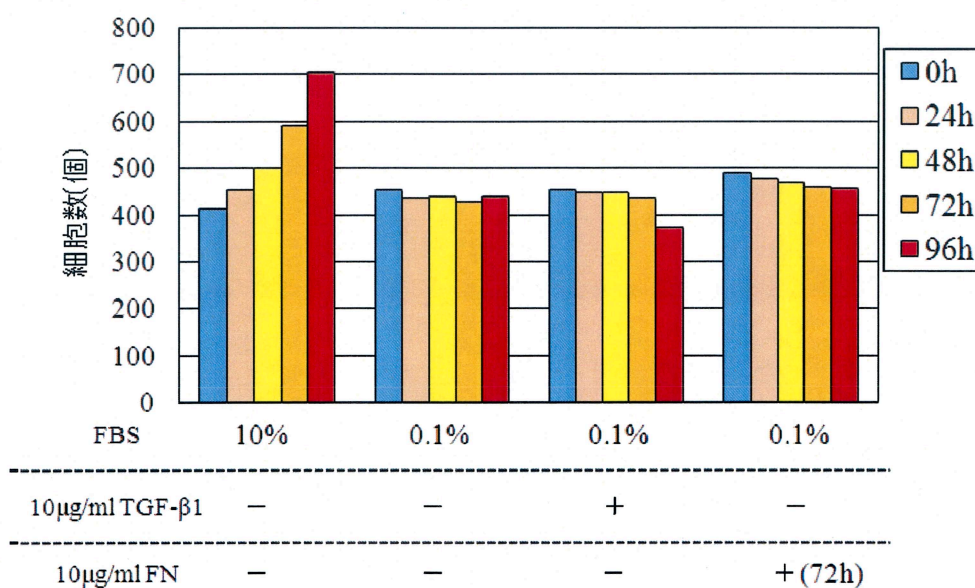


Fig.4-15 細胞増殖試験の経時的観察

#### 4-6-6. MTT 試験

RGDS ペプチドによって細胞活性に影響がないかどうかを MTT 試験によって検証した。実験条件は以下の通りである(n=6)。

- 10ng/ml TGF- $\beta$ 1
- 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 + 5 $\mu$ g/ml RGDS ペプチド

その結果、RGDS ペプチドを曝露しても細胞活性には全く影響を与えなかった(Fig.4-16)。このことから、RGDS ペプチド曝露時の遊走能の減少は、RGDS ペプチドが細胞活性に影響を与えたからではなく、 $\alpha_5$ -integrin に結合して FN 認識能力を抑制したため遊走能が減少したという可能性が示唆された。

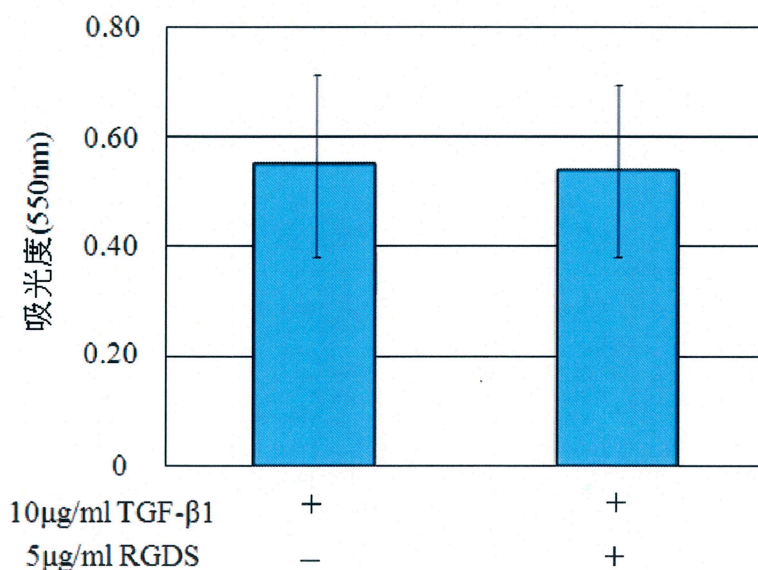


Fig.4-16 RGDS ペプチド添加時における MTT 試験

#### 4-7. BMP-7 曝露による MET 誘導

##### 4-7-1. BMP-7 曝露濃度の違いによる形態への影響

10ng/ml TGF- $\beta$ 1 によって 48h EMT 誘導を行った EMT-HPMC に対して、1ng/ml、10ng/ml の BMP-7 を 72h 曝露し、形態に影響を与えるかどうかを写真撮影によって観察した(Fig.4-17-(b))。比較対象として、正常 HPMC に対しても同等の BMP-7 を曝露し、撮影を行った(Fig.4-17-(a))。EMT 誘導を行った細胞に BMP-7 を曝露することによって、はっきりと敷石状の細胞への形態変化は観察されなかった。しかし、正常 HPMC への BMP-7 曝露は、より敷石状へと形態が変化していた。

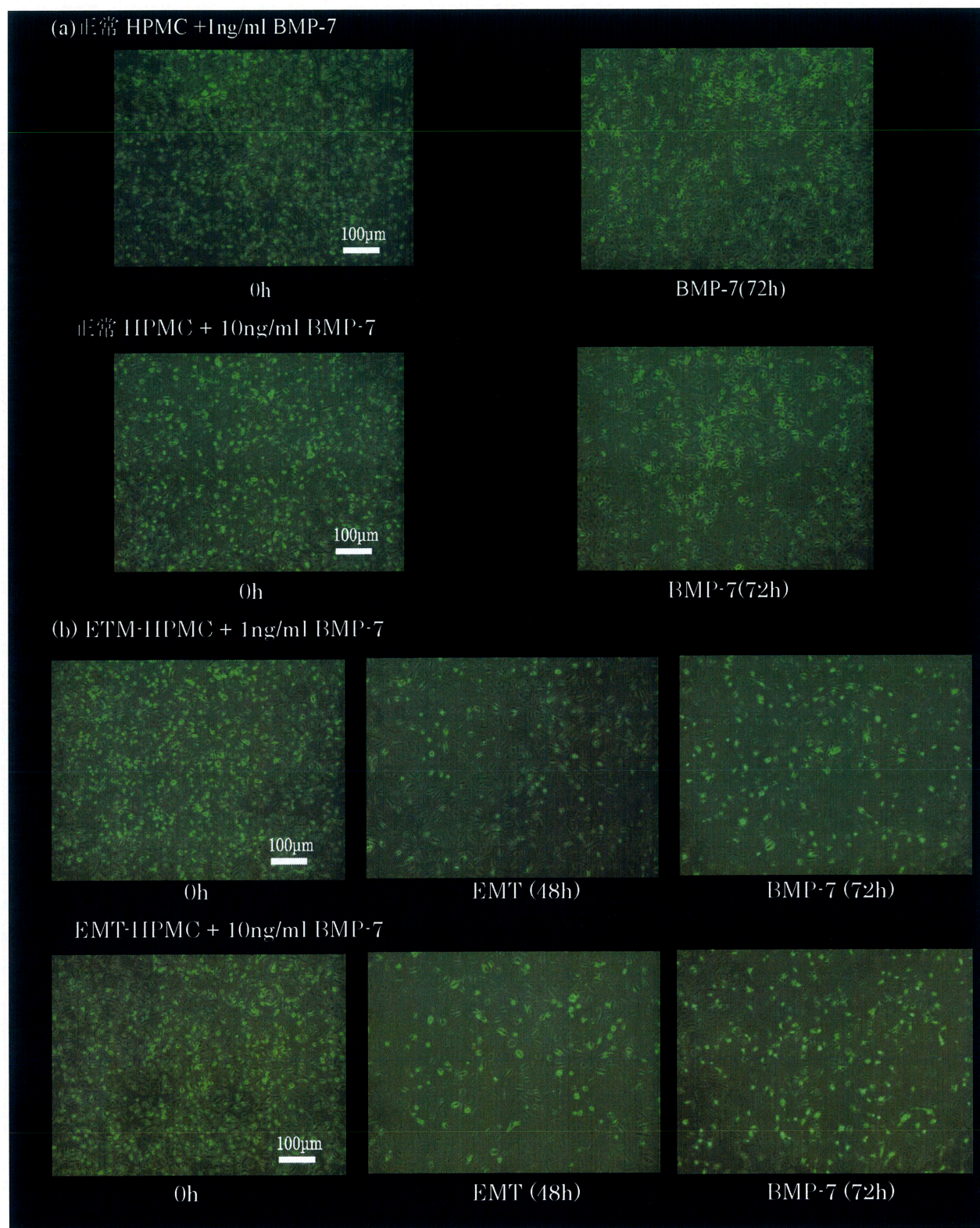


Fig.4-17 BMP-7 曝露における形態変化(×40)

#### 4-7-2. EMT 誘導細胞への BMP-7 曝露による $\alpha$ -SMA 発現量変化

4-7-1 で形態変化を観察した細胞からタンパク抽出を行い、 $\alpha$ -SMA の発現量変化を Western Blotting によって観察した(control, EMT(48h) ; n=8, BMP-7 曝露; n=4)。実験条件は以下の通りである。

- 正常 HPMC
- 10ng/ml TGF- $\beta$ 1(48h)
- 10ng/ml TGF- $\beta$ 1(48h) + 1ng/ml BMP-7(72h)
- 10ng/ml TGF- $\beta$ 1(48h) + 10ng/ml BMP-7(72h)

EMT 誘導 HPMC に BMP-7 を曝露することによって $\alpha$ -SMA 発現量は control とほぼ同等の発現量へと減少した(Fig.4-18)。

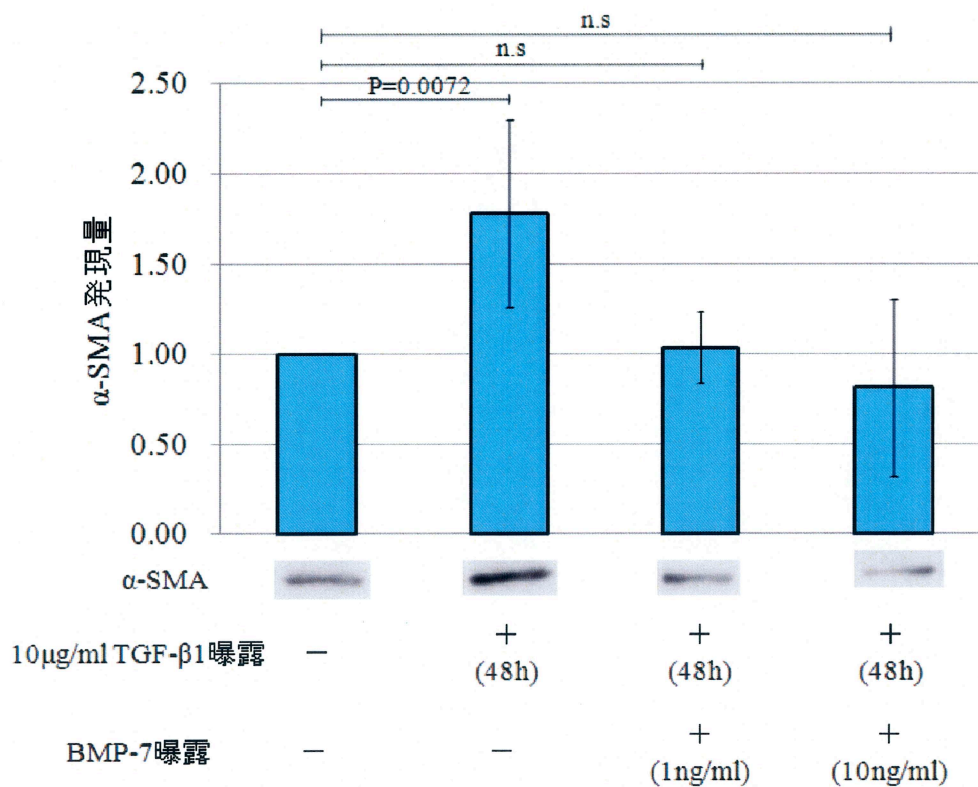


Fig.4-18 BMP-7 曝露時の $\alpha$ -SMA 発現量変化

## 5. 考察

### 5-1. 腹膜透析における TGF- $\beta$ 1 の産生機序

高濃度 glucose が細胞に作用すると、ROS(Reactive Oxygen Species)が産生されることが知られている<sup>[42]</sup>。この ROS によって PKC (protein kinase C)活性化を誘導する役割を担っている NADPH オキシダーゼ過活性が生じ、PKC の活性化が起こる<sup>[43]</sup>。活性化 PKC により脱リン酸化した転写因子 c-Fos と c-Jun の複合体 (AP-1 : activated protein-1) は、TGF- $\beta$ 1 遺伝子上のプロモーター領域の AP-1 結合部位に結合し、TGF- $\beta$ 1 mRNA が発現する。それにより TGF- $\beta$ 1 の産生が促進される (Fig.5-1)<sup>[44]</sup>。このような経路によって、HPMC では TGF- $\beta$ 1 がオートクリンに産生され、TGF- $\beta$ 1 が HPMC 自身に作用する事で EMT が進行していくと考えられる<sup>[6]</sup>。

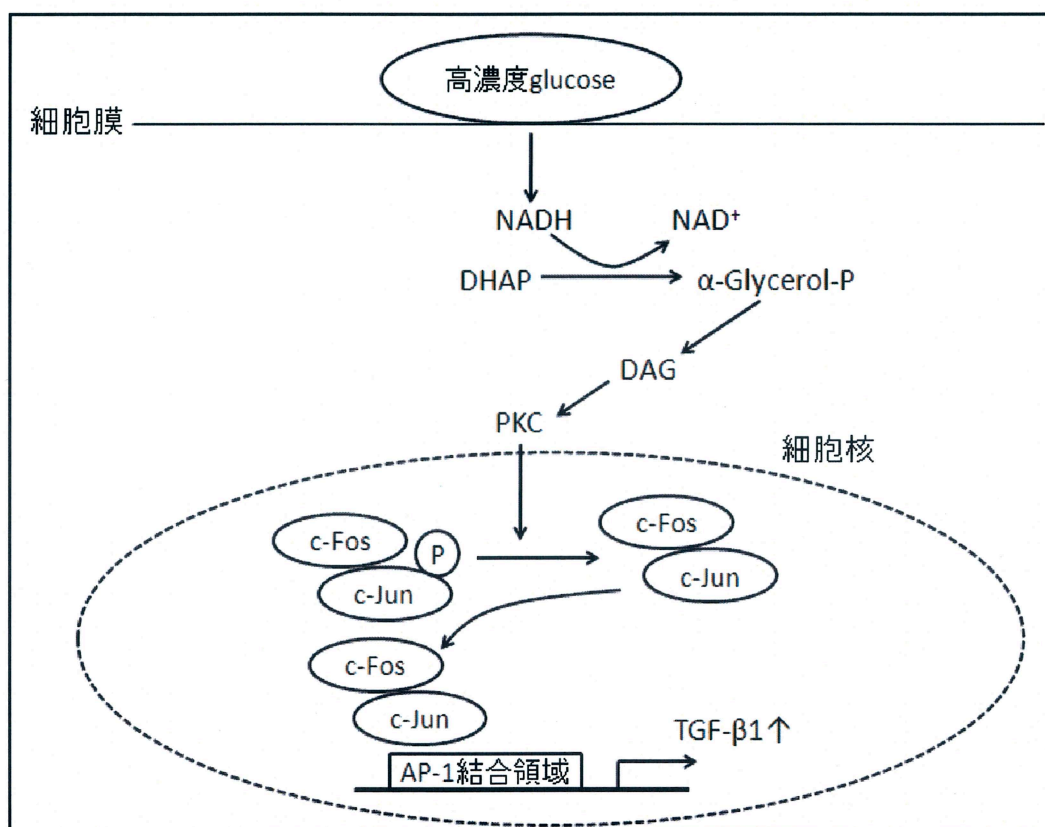


Fig.5-1 TGF- $\beta$ 1 の産生経路<sup>[40]</sup>

## 5-2. TGF- $\beta$ 1 による Snail mRNA 発現に伴う E-cadherin mRNA の減

### 少メカニズムとその役割

細胞間接着分子である E-cadherin は、Fig.5-2 のように裏打ちタンパクの  $\beta$ -catenin や  $\alpha$ -catenin によって支えられながら存在している。これらは細胞質においてアクチン細胞骨格タンパクと連結しており、接着構造を安定化させて細胞全体の形態維持を担ったり、細胞と細胞の間隙を充填したりすることで外界からの分子、細菌、ウイルスなどの侵入を防ぐといったバリアー機能を有している<sup>[45]</sup>。本研究において TGF- $\beta$ 1 を HPMC に作用させることで Snail mRNA は曝露 12 時間後に有意な発現の増加を示し(Fig.4-2)、E-cadherin mRNA は 24h で有意な減少を示した(Fig.4-3)。これら二つの mRNA 発現時間のずれは以下のシグナル伝達経路を経由することで生じると考えられている。

TGF- $\beta$ 1 が HPMC 細胞の膜上に存在する TGF- $\beta$ 1 レセプター (セリン/スレオニンキナーゼレセプター) に結合すると、レセプターの細胞内ドメインにあるセリン/スレオニン残基がリン酸化する。続いて TGF- $\beta$ 1 が結合したレセプターがエンドサイトーシスし、SH2/SH3 ドメインを有する PI3K (ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ) がリン酸化部位に結合する。PI3K は細胞膜上の PIP2 (ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸) を PIP3 (ホスファチジル 3,4,5-トリリン酸) へとリン酸化する。続いて SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) は PIP3 及び TGF レセプターと結合する。Smad2/3 は SARA を介して TGF レセプターと結合しリン酸化される<sup>[46][47]</sup>。リン酸化した Smad2/3 は Co-Smad である Smad4 と複合体を作ることによって核内へと移行し、Snail mRNA のプロモーター領域に作用する事で Snail mRNA を発現させる<sup>[10]</sup>。またもう一つの経路として MAPK カスケードがある。それは Ras、Raf、MEK、ERK という経路のリン酸化を通して活性化し、Snail mRNA を発現させる<sup>[46]</sup>。これらの経路によって発現した転写因子である Snail は E-cadherin mRNA のプロモーター領域に直接作用する事で、E-cadherin mRNA の発現を抑制すると言われている(Fig.5-3)<sup>[48]</sup>。このようなメカニズムで細胞間接着が剥がれるため、Snail mRNA 発現が強発現した後に E-cadherin mRNA の発現が最大となるといった時間のずれが生じると考えられる。

Adherence Junction を構成する E-cadherin は細胞間接着を維持する事で、細胞の形態を維持している(Fig.5-2)。しかし、詳細は次項で記載するが、上記のような過程で TGF- $\beta$ 1 などによって E-cadherin が減少すると、細胞間接着が失われることで形態変化を起こし、その後 FAK の活性化が生じることで接着斑を活発に形成し、さらにその FAK が  $\alpha$ -SMA の発現を促進することで、平滑筋細胞や線維

芽細胞のような間葉系細胞同様に遊走能を持つと考えられている<sup>[49]</sup>。このため、細胞間接着の指標（EMT の指標）としては $\alpha$ -SMA 以外にも、Tight Junction の構成成分である ZO-1 や Occludins などが用いられている<sup>[17][50]</sup>。ZO-1 や Occludins は glucose 添加によってリン酸化され、down-regulate し、溶質透過性の亢進に關与する主要なタンパク質である<sup>[51]</sup>。Adherence Junction や Tight Junction はそれぞれが細胞内で細胞骨格タンパク質アクチンと結合していることから、EMT と溶質透過性亢進の間には関連性があると思われる。

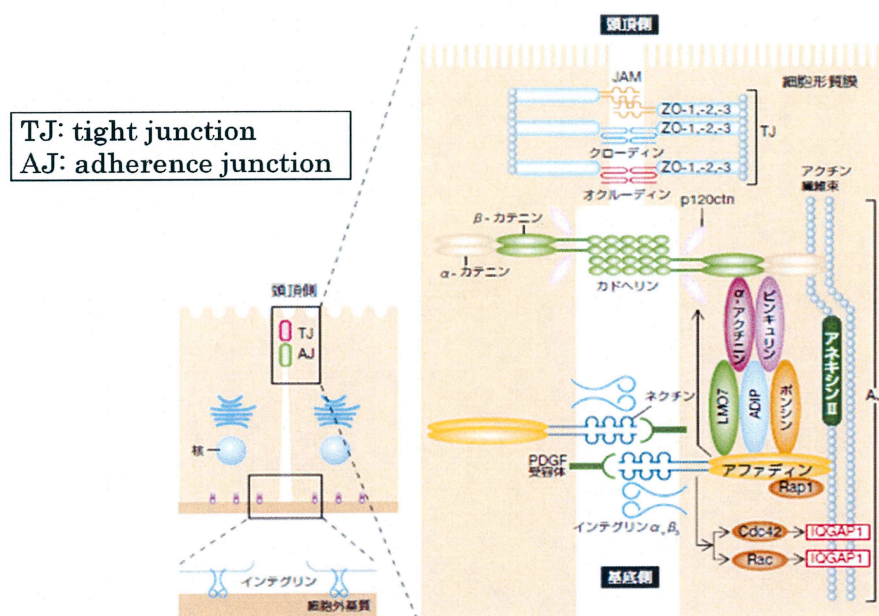


Fig.5-2 細胞間接着の模式図<sup>[52]</sup>

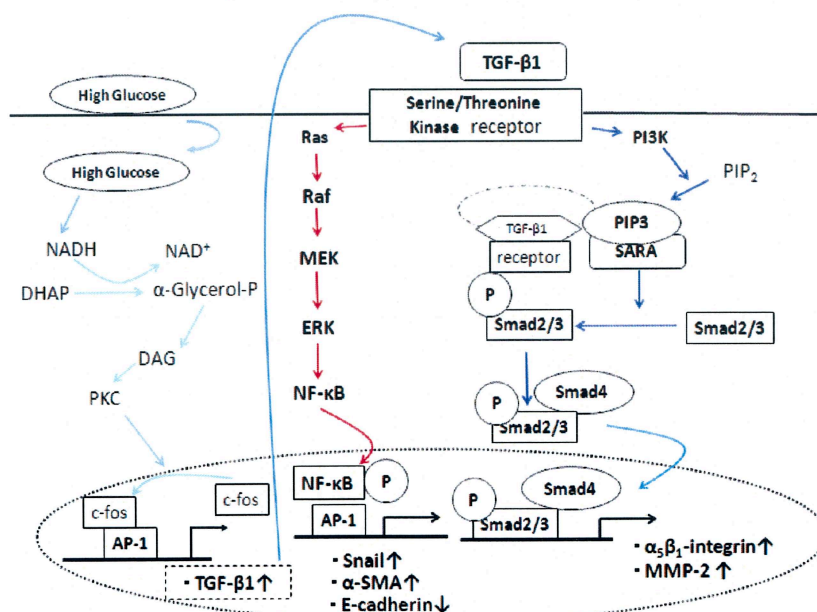


Fig.5-3 TGF- $\beta$ 1 による Snail mRNA 発現メカニズム

### 5-3. EMT 誘導 HPMC における $\alpha_5$ -integrin mRNA、MMP-2 mRNA、

#### $\alpha$ -SMA タンパク、RhoA タンパクの遊走における役割

細胞遊走に大きく関わっていると考えられている因子は様々存在し、その中でも FN との相互作用により遊走に関するシグナルを細胞に伝達する  $\alpha_5$ -integrin<sup>[53][54][55]</sup>、コラーゲンなどの細胞外マトリクスを分解する役割を持つ MMP-2<sup>[56]</sup>、遊走時のストレスファイバーであり、EMT の指標でもある  $\alpha$ -SMA<sup>[20]</sup>、またそのストレスファイバー形成に大きく関与している低分子量 G タンパク質である RhoA<sup>[7]</sup>に着目した。Liu らは 4 つのステップを経て遊走が起こることを提唱している<sup>[49]</sup>。それらは以下の通りである。(1)細胞間接着の減少 (2) $\alpha$ -SMA や細胞骨格の構築 (3)MMPs による基底膜の分解 (4)遊走の促進。Fig.4-2,4-3 に示したように、10ng/ml の TGF- $\beta$ 1 曝露から 12h 後に Snail mRNA が強発現し、24h 後に E-cadherin の減少が観察された。また、 $\alpha$ -SMA 発現は、TGF- $\beta$ 1 曝露時間が長時間になればなるほど強発現となった。このことから TGF- $\beta$ 1 によって HPMC は EMT 誘導が起こり、細胞骨格の構築が起こり遊走能を獲得している状態だと考えられる。また、MMP-2 mRNA の発現は 24h 後に最大を示したことから、生体内環境におい、基底膜や間質を加水分解して遊走していく事が考えられる。RhoA の発現に関しては、今回の測定は不活性型 RhoA(GDP-RhoA)と活性型 RhoA(GTP-RhoA)のトータル量を測定したものであり、トータル量は TGF- $\beta$ 1 によって変化しないという結果が得られた。しかし、GTP-RhoA の割合が増加している可能性が考えられるため、今後 GTP-RhoA の検出を行っていく必要があるといえる。内部標準として  $\beta$ -actin を用いて規格化していない理由としては、 $\phi$ 35 シャーレから得たタンパクに含まれる  $\beta$ -actin 量がほぼ一律であるという結果が別の実験において得られており、単位タンパク量当たりの発現量という形でデータを記載した。

TGF- $\beta$ 1 によって E-cadherin の減少が引き起こされ、それと共に接着斑の形成に大きく関与している Focal Adhesion Kinase (FAK)、アクチン制御を行うモータータンパク質である Myosin light chain (MLC)のリン酸化を経て $\alpha$ -SMA を発現する。EMT を引き起こされた HPMC が  $\alpha_5$ -integrin を強発現していることから、FN を認識した EMT-HPMC が TGF- $\beta$ 1 の経路と共に $\alpha$ -SMA 発現や RhoA/ROCK を活性化し、遊走能を高める事が考えられる。

#### 5-4. HPMC の 3 次元遊走に關与する遊走因子と遊走促進メカニズム

遊走能を獲得した EMT-HPMC が、基底膜や間質を MMPs で加水分解しながら方向性を持って遊走していくためには遊走因子の存在が必要不可欠と考えた。市販の 3 次元遊走モデルは、ラミニンやコラーゲン IV を混合して基底膜を模倣したマトリゲルを膜孔 8 $\mu$ m のストレートポアに封入しただけのものであり、定量的な細胞遊走判定には不十分である。そこで、間質を模倣して遊走因子の濃度勾配を形成させた新規 3 次元細胞遊走モデルを作成した。

本研究において遊走因子の選択は非常に重要である。EMT-HPMC が  $\alpha_5$ -integrin を強発現していること、そして炎症などが生じると必ず存在しうること、かつ、線維芽細胞や筋線維芽細胞から産生されるなどの理由から、細胞遊走や接着に重要な役割を担っていると考えられている FN が、EMT-HPMC の遊走因子の一つの候補と考えた。また、腹膜線維症の患者組織中に存在している最終糖化産物のモデルである糖化アルブミン(AGE-BSA)、及びそのネガティブコントロールとしてアルブミンの 3 種類を用いて 3 次元遊走試験を行った (Fig.5-4)。

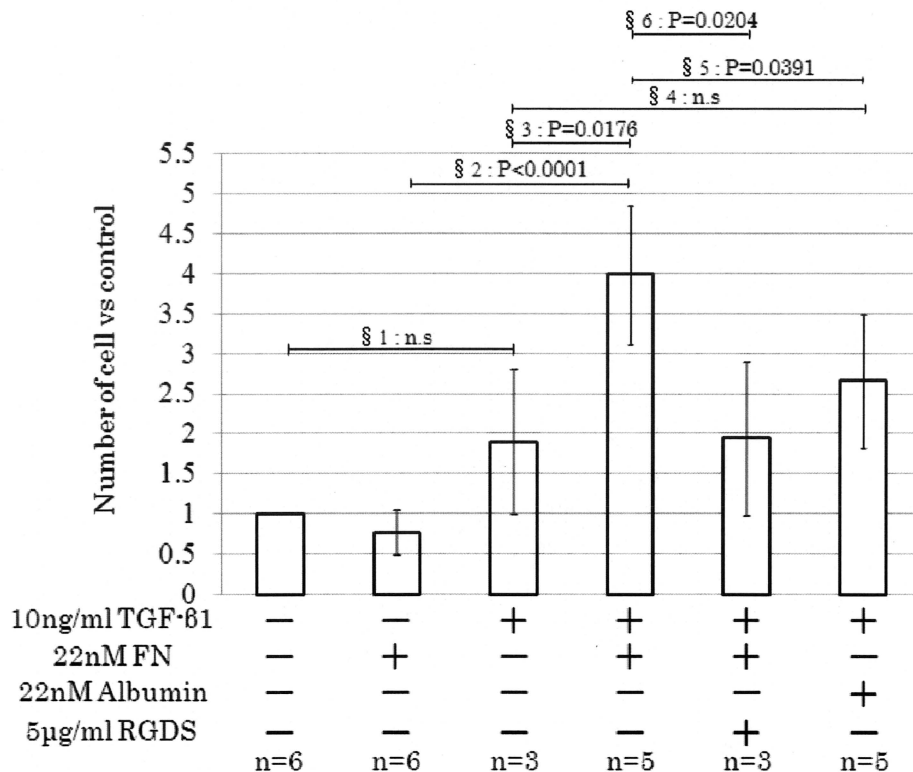


Fig.5-4 3 次元細胞遊走実験結果のまとめ

その結果 22nM の FN の濃度勾配( $C/C_0=0.7$ )を形成させた系で EMT-HPMC の遊走能が FN を含まない系に比べて約 2.1 倍にも高められた (§ 3)。また、5 $\mu$ g/ml の RGDS ペプチドを $\alpha_5$ -integrin の阻害剤として用いた結果、遊走能をコントロールと同等にまで抑制できた (§ 6)。これらのことから FN が EMT-HPMC の遊走因子の一つであることが明らかとなった。

今回の 3 次元細胞遊走試験の結果から考えられる事は、

- ①EMT を誘導すると遊走能が高まる (§ 1, § 2)
- ②EMT 誘導しない場合、FN 濃度勾配が存在しても遊走能を獲得しない
- ③EMT 誘導と FN 濃度勾配が存在する場合、遊走能が極めて高くなる (§ 3)

ここで問題となるのが、遊走能の上昇には FN(遊走因子)が必要なのか、濃度勾配が必要なのかという点である。結論から言えば、どちらも必要であるが、FN の様な遊走因子をまず認識する事が必要不可欠と考えている。その理由として、アルブミンや糖化アルブミンの濃度勾配に対して有意な遊走能の増加は見られなかったことが挙げられる。EMT-HPMC が一旦 FN を $\alpha_5$ -integrin を介して認識した細胞は、より FN の濃度の高い方向へと遊走していくことは、従来から研究されている白血球がケモカインを認識して濃度勾配に沿ってより高濃度の方へと遊走するメカニズムと同様であろう [57]。また、EMT 誘導を行っていない正常 HPMC に対して FN 濃度勾配を形成させた系では、EMT 誘導を行った系に比べて遊走能の上昇が認められなかった (§ 2)。この理由としては、Fig.5-5 の様なシグナル伝達が発生している可能性が考えられる。

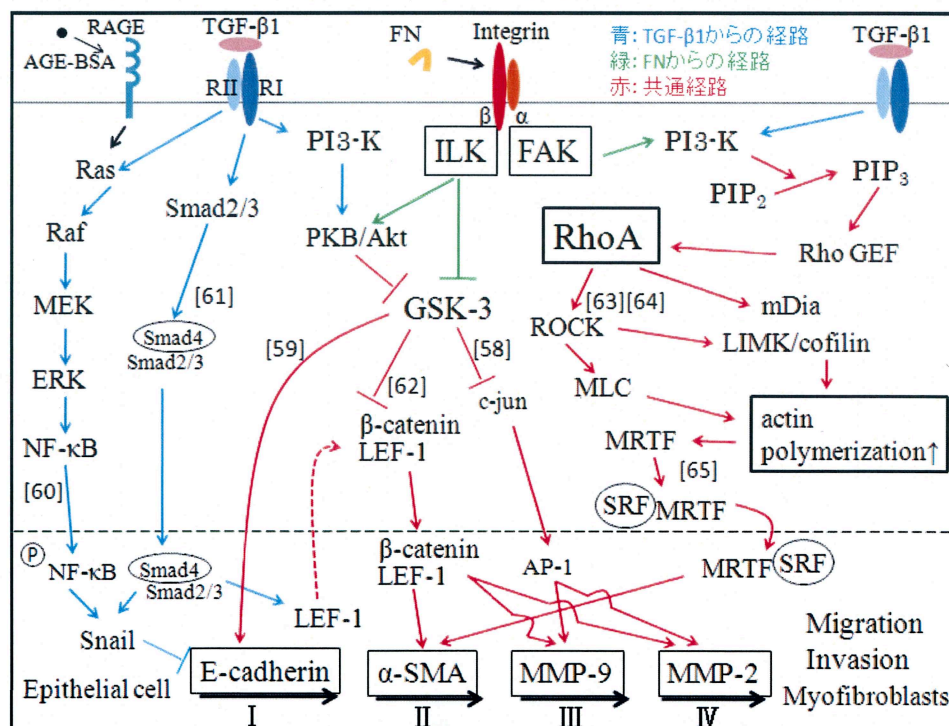


Fig.5-5 HPMC の遊走メカニズム [49][58][59][60][61][62][63][64]

EMT 誘導が無い状況でも、 $\alpha 5$ -integrin を介した FN のシグナル伝達はある程度起こっている。FN の結合により、RhoA/ROCK 経路を活性化し、MMP-2 や MMP-9 の発現を上昇させるが、PKB/Akt の経路により細胞間接着分子 E-cadherin の局在化が促進される<sup>[59]</sup>(Fig.5-5 : 緑)。このため、HPMC(-,+,;-) が遊走できないが、ここに TGF- $\beta$ 1 が作用することにより E-cadherin の減少、及び RhoA/ROCK 経路の相乗的な活性化(Fig.5-5 : 水色)によって、HPMC(-,-;-) と比べて遊走能が約 4 倍にまで高められたと考えられる (§ 2)。

一方、糖化アルブミンが遊走能の強化を引き起こさなかった理由は、Fig.5-5 からも、糖化アルブミンが $\alpha$ -SMA、MMP-9、MMP-2 の発現、特にその上流である RhoA の活性化に関与していないからではないかと考えられる。RhoA 活性化メカニズムとして、TGF- $\beta$ 1 によって RhoA の活性化が引き起こされること<sup>[7][65]</sup>や、FN によって RhoA の活性化が引き起こされること<sup>[66]</sup>は、文献で報告されている。RhoA は、TGF- $\beta$ R、Integrin を介して Rho-GEF の活性化が生じることによって GDP-RhoA が GTP-RhoA とリン酸化される事が報告されており<sup>[67]</sup>(Fig.5-6)、特に $\alpha 5$ -integrin を介した RhoA の活性化は、アクトミオシンの形成、細胞の収縮に大きく寄与しているという報告もされている<sup>[68]</sup>。これらの事からも、RhoA の活性化が遊走時において必要不可欠であることは明らかであり、アルブミンや糖化アルブミンではその活性化が生じず、遊走能の促進が見られなかったと考えられる。残念ながら、本実験では活性型 RhoA を計測するに至らず、結論を出すことが出来なかったため、これは今後の課題の一つである。

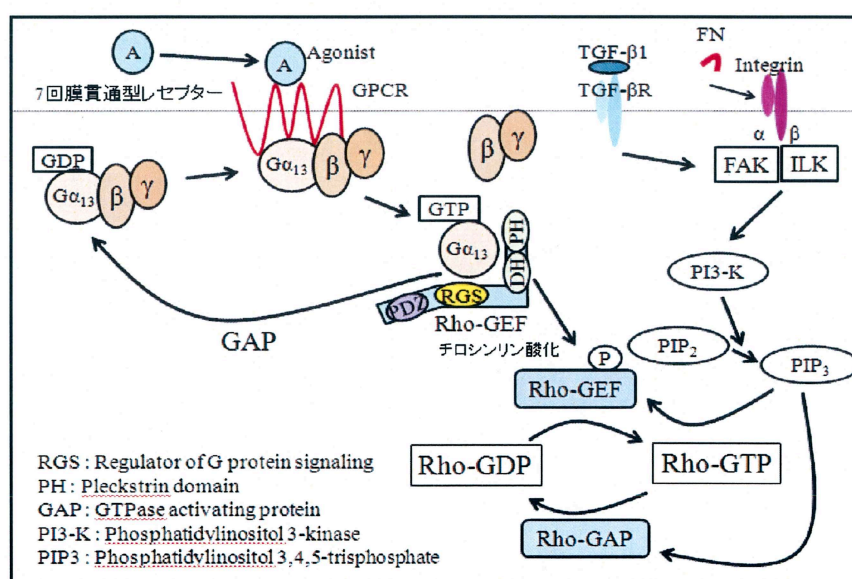


Fig.5-6 Rho の活性化メカニズム

ここまでの結果をまとめると、HPMCの間質への遊走メカニズムは次の様になる。

- (1) TGF- $\beta$ 1 が HPMC にオートクリンで作用して細胞間接着が消失
- (2)  $\alpha$ -SMA の発現(EMT の誘導)
- (3) RhoA の活性化(遊走能の強化)
- (4) MMPs による基底膜、間質の分解
- (5) FN を認識した EMT-HPMC がより高濃度の FN へと遊走

この様にして間質へと遊走した細胞が、コラーゲンなどの細胞外マトリクスを過産生し、腹膜肥厚を形成するのであろう。従って、腹膜肥厚を防ぐためには、いかにして EMT を防ぐか、あるいは EMT-HPMC を正常な HPMC に可逆的に形質変換できるかが重要である。

## 5-5. BMP-7 による腹膜機能維持メカニズム

EMT が可逆的であるかという点について、幾つかの文献で HGF や BMP-7 を EMT 細胞に作用させると MET という現象が起こり、正常な中皮細胞へと可逆的に形質変換する事が報告されている<sup>[23][69]</sup>。今回我々は EMT 誘導 HPMC に対して BMP-7 曝露時の形態変化、及び $\alpha$ -SMA 発現量変化を検討した。その結果、形態においては正常 HPMC に近づくことは観察されなかったが、 $\alpha$ -SMA 発現量は BMP-7 を曝露した系において control と同等にまで抑制されることが認められた(Fig.4-17,18)。BMP-7 による MET 誘導のシグナル伝達経路としては、BMP-7 がレセプターを介して特異的 Smad1/5/8 をリン酸化して、Smad4 と複合体を形成し、E-cadherin の発現を高めると共に、抑制型 Smad と呼ばれている Smad7 を活性化することによって TGF- $\beta$ 1 からのシグナルを阻害している可能性が考えられる(Fig.5-7)<sup>[70]</sup>。これらの事から、BMP-7 が MET を誘導している可能性が高い。形態変化が観察されなかった事に関しては、今回は RT-PCR や免疫蛍光染色によって E-cadherin の様な細胞間接着を BMP-7 曝露時に観察していないため、今後行っていく必要があると考えられる。また、早期の EMT に対して BMP-7 が効果を発揮するという報告もあるため、TGF- $\beta$ 1 の曝露時間、あるいは濃度を変化させた実験系や、TGF- $\beta$ 1 と BMP-7 を同時に曝露させた系での実験を行う必要もあると考えている。HPMC において $\alpha$ -SMA が継代数を重ねていくことで、より顕著に発現量が増加しているといったデータが得られている(データは載せていない)。この事と BMP-7 曝露時に $\alpha$ -SMA 発現が抑制された結果を合わせて考えると、BMP-7 曝露を行う事で正常な状態、あるいはそれに近い状態で HPMC を長

期維持することができる可能性が示唆された。しかし、BMP-7 による MET 誘導の詳細なメカニズムは現段階では解明されていないため、今後行っていく必要がある。また、BMP-7 と同様、あるいはそれ以上の効果を発揮する物質が他にも存在する可能性があるため、メカニズム解明と並行に検討していく必要性があると考えている。

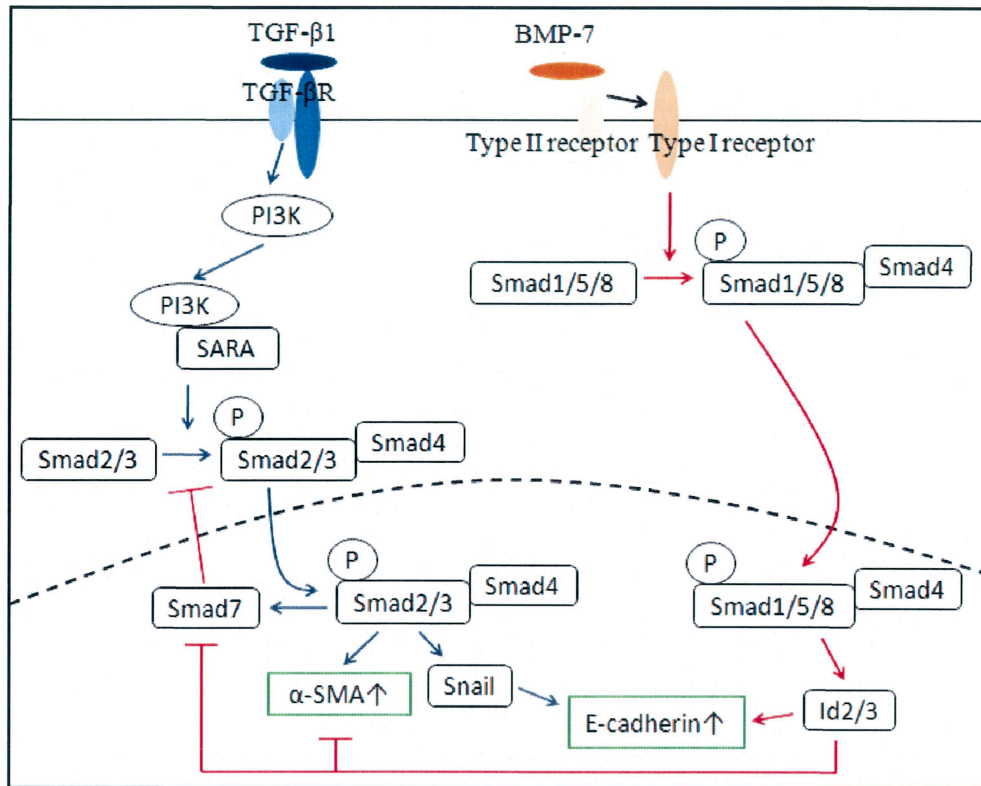


Fig.5-7 BMP-7 による MET 誘導シグナル伝達経路<sup>[70]</sup>

## 5-6. 総括

本研究において達成できた事は以下の通りである。

- ①TGF- $\beta$ 1 による HPMC の EMT 誘導
- ②生体内模倣した遊走因子の濃度勾配を形成した 3 次元細胞遊走モデルの確立
- ③EMT-HPMC の間質への遊走メカニズム
- ④BMP-7 による $\alpha$ -SMA 発現の抑制

本研究で用いた 3 次元細胞遊走モデルによって TGF- $\beta$ 1 が EMT を誘導し、MMP-2 を発現してコラーゲンを溶解しながら FN の濃度勾配を認識して間質へと遊走することが示された。本 3 次元細胞遊走モデルは様々な分野への応用が可能なモデルであると考えられる。また BMP-7 によって正常 HPMC の長期維持ができる可能性が示唆されたため、これは透析患者のみならず、継代数を重ねることで形質変化をし始めてしまう HPMC を用いて研究を行っている研究者に多大な貢献をもたらす結果であると言える。

## 6. 結論

本研究より以下のことが導き出せた。

### ①TGF- $\beta$ 1 曝露による HPMC の形態変化の観察及び mRNA 測定からの EMT 誘導の確認

10ng/ml TGF- $\beta$ 1 を曝露された HPMC は

- ・ 敷石状の形態から扁平で細長い形態に変化した
- ・ E-cadherin の転写因子である Snail mRNA 発現が増加し、曝露後 24h で最大の発現を示した
- ・ 細胞間接着タンパク質 E-cadherin mRNA が時間依存的に減少した
- ・ EMT の指標とされている $\alpha$ -SMA の強発現が観察された

形態変化を伴う EMT 発生の主な 3 種類の指標を確認することができたので、本モデルを EMT 発生モデルとして 3 次元細胞遊走実験に使用した。

またこの条件時のその他の mRNA は

- ・ FN レセプターである $\alpha_5$ -integrin mRNA は TGF- $\beta$ 1 曝露 12h から発現を増し、48 時間後でも維持した
- ・ コラーゲン分解酵素 MMP-2 mRNA は $\alpha_5$ -integrin と同じように 12h から強発現し始め、48h においても発現が維持された

これらから、EMT 誘導された HPMC は $\alpha_5$ -integrin を強発現して、FN 認識能力が高められている可能性が示唆された。また、コラーゲン分解酵素である MMP-2 によって間質層中のコラーゲンを分解することが可能であることが観察できた。

### ②EMT 誘導中皮細胞が化学層化性因子の濃度勾配を認識して遊走することを in vitro 実験系で実証

- ・ 3 次元遊走モデルを用い、化学走化性因子として BSA を用いると、下層へ遊走した細胞数は control と比較して 1.2 倍ほどであった
- ・ 一方、化学走化性因子として FN を用いると、下層へ遊走した細胞数は control と比較して 2.1 倍ほど増加し、RGDS ペプチドを添加した場合、遊走能が抑制されることが分かった
- ・ 細胞増殖試験から本実験で使用した EMT 発生モデル及び 3 次元遊走モデルで細胞数は変化しなかった

EMT 誘導された HPMC は、周囲に存在する化学走化性因子を特異的に認識して遊走している可能性が示唆された。

#### ③従来の 3 次元遊走評価法をより改良した新規 3 次元細胞遊走装置を試作

今回作成した新規 3 次元細胞遊走装置は、化学層化性因子の濃度勾配を考慮したものである。本実験の結果から、EMT 誘導 HPMC は化学層化性因子特に FN を特異的に認識し、その FN の濃度勾配に従って遊走する事を定量化できた。

この事から今回作成した新規 3 次元細胞遊走モデルは既存のモデルと比較すると、より生体環境に近い条件を作り出し、定量性に特化しているため、様々な細胞遊走メカニズムの解明を助ける有用なツールとなりうる事が言える。

#### ④BMP-7 曝露における形態変化、及び $\alpha$ -SMA 発現の変化

今回の実験において形態変化を観察することは出来なかった。しかしながら、BMP-7 を曝露することによって EMT の指標とされている $\alpha$ -SMA 発現量は control と同等にまで抑制できた。この事からも、BMP-7 が EMT を引き起こした HPMC を元に戻そうとするシグナルが働いていることが考えられ、シグナル伝達経路を解明することによって EMT を阻止し、正常状態を維持することが可能となることが考えられる。

TGF- $\beta$ 1 によって EMT を誘導された HPMC は遊走能を獲得し、 $\alpha_5$ -integrin、MMP-2 を発現する事によって基底膜、間質を破壊し、FN を特異的に認識した後により高濃度の FN へと向かって遊走し、そこでコラーゲンを過産生する事が腹膜硬化症を引き起こす原因の一つとなることが示された。そして、BMP-7 によって長期腹膜機能維持が可能となる可能性が示唆された。

## 7. 今後の展望

- ・細胞遊走に関与が考えられるシグナル伝達物質の変化の測定

今回は RhoA(不活性型+活性型)の全体量を観察したが、EMT 誘導時における遊走能の上昇を考慮すると、活性型 RhoA(GTP-RhoA)の発現が強化される可能性が十分に考えられるため、Western blotting によって観察する。

- ・様々な化学走化性因子 (IL-8、変性 collagen など) を用いて 3 次元遊走実験

HPMC が FN の濃度勾配を特異的に認識していることから、他の遊走因子の存在が考えられるため、様々な化学走化性因子と考えられる物質を用いて検証し、EMT 誘導 HPMC の遊走を促進する化学走化性因子を発見する。

- ・EMT の治療として着目している MET の誘導、及び誘導時の遊走能測定

腹膜劣化を防ぐためには EMT を誘導させない事が理想であるが、EMT 誘導された細胞を元に戻すことも同等に重要であると考えられる。そのために MET を如何にして誘導させるか、MET 誘導された細胞はどのような性質を持っているか、遊走能を失うか、そしてどのようなシグナル伝達経路であるか、詳細に検討を行っていく必要がある。

## 8. 参考文献

- 1 平原 一郎, 他. 中皮細胞の epithelial-to-mesenchymal transition(EMT)による腹膜肥厚の促進. 腹膜透析 2007 東京医学社
- 2 Gary A.T, et al. カラーで学ぶ解剖生理学. 医学図書院 MYW, 1998
- 3 Selgas R, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell-its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: ii2-ii7
- 4 Jimenez-Hefferman J.A, et al. Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 2004; 444: 247-256
- 5 Luiz S. Aroeira et al. Epithelial to Mesenchymal Transition and Peritoneal Membrane Failure in Peritoneal Dialysis Patients:Pathologic Significance and Potential Therapeutic Interventions. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2004-2013
- 6 山口 陽平 著. Snail mRNA と Epithelial to mesenchymal Transition(EMT). 平成 18 年度三重大学工学部分子素材工学科卒業論文 2006
- 7 Zeisberg M and Kalluri R:The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med*,2004;82:175-181
- 8 Zeisberg M, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9: 964-968
- 9 Maszi A, et al. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F911-F924
- 10 Tian Y.C, et al. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Exp Cell Res* 2007; 313: 2367-2377
- 11 LaGamba D, et al. Microarray Analysis of Gene Expression During Epithelial-Mesenchymal transformation. *Dev Dyn* 2005; 234: 132-142
- 12 Dokic D, et al. VCAM-1 inhibits TGFbeta stimulated epithelial-mesenchymal transformation by modulating Rho activity and stabilizing intercellular adhesion in epicardial mesothelial cells. *Dev Biol* 2006; 299: 489-504
- 13 石垣 達也 著. 三次元細胞遊走モデルを用いた腹膜中皮細胞の epithelial to mesenchymal transition(EMT)による浸潤メカニズムの解明. 平成 19 年度三重大学大学院工学研究科博士前期過程分子素材工学専攻修士論文 2007

- 14 Oldfield M.D, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 2001; 108: 1853-1863
- 15 An S. De Vriese, et al. Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:2549-2555
- 16 田宮信雄、村松正実、八木達彦、吉田浩、遠藤斗志也 ヴォート生化学(上) 第3版/東京化学同人(2005)
- 17 Yanez-Mo M, et al. Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 403-413
- 18 An Hang Yang, et al. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 2003;63:1530-1539
- 19 Mei-Jen, et al. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 2008
- 20 門脇孝:細胞増殖因子の最前線 基礎から臨床への up-to-date な分子医学/羊土社(1993)
- 21 Jean Paul Thiery, et al. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2006; 7: 131-142
- 22 Min-A Yu, et al. HGF and BMP-7 Ameliorate High Glucose-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Peritoneal Mesothelium. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 567-581
- 23 Urist M.R. Bone: formation by autoinduction. *Sci* 1965; 150: 893-899
- 24 Clemens Scheufler, et al. Crystal Structure of Human Bone Morphogenetic Protein-2 at 2.7 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 1999; 287: 103-115
- 25 Lyons K.M. et al. Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic. *Genes Dev* 1989; 3: 1657-1668
- 26 Lyons K.M. et al. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* 1990; 109: 833-844
- 27 Nadia A. Wahab, et al. A Critical Look at Growth Factors and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Adult Kidney. *Exp Nephrol* 2006; 104:e129-e134
- 28 Kelly J.Gordon, et al. Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad 1-dependent mechanism that involves matrix

- metalloproteinase-2. *Carcinogenesis* 2009; 30:238-248
- 29 George P. et al. Structure of the ternary signaling complex of a TGF- $\beta$  1 superfamily member. *PNSA*; 103:7643-7648
  - 30 鶴尾隆:最新医学からのアプローチ⑧癌転移の分子機構/メジカルビュー社 (1993)
  - 31 White L.R, et al. The characterization of alpha5-integrin expression on tubular epithelium during renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F567-F576
  - 32 Schnyder B, et al. Role of interleukin-8 phosphorylated kinases in stimulating neutrophil migration through fibrin gels. *Lab Invest* 1999; 79: 1403-1413
  - 33 Sugahara kazuki, et al. Hyaluronan Oligosaccharides and Tumor Progression. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 2004;16:187-197
  - 34 Zhiyong Zhao et al. Rho-associated kinases play a role in endocardial cell differentiation and migration. *D.Biol* 2004;275:183-191
  - 35 Greiling D, et al. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci* 1997; 110: 861-870
  - 36 Takahashi M, et al. Effects of endogenous endothelial interleukin-8 on neutrophil migration across an endothelial monolayer. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 670-675
  - 37 平野俊夫:疾患とのかかわりを探る サイトカインの最前線/羊土社(2000)
  - 38 Reiko Inagi, et al. Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Letters* 1999; 463:260-264
  - 39 Jing-Xin Ding, et al. The reinforcement of invasion in epithelial ovarian cancer cells by 17 $\beta$ -Estradiol is associated with up-regulation of Snail. *Gynecol Onc* 2006; 103:623-630
  - 40 Shouwei Han, et al. Control of COX-2 Gene Expression through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  in Human Cervical Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4627-4635
  - 41 Ichiro H, et al. Methylglyoxal induces peritoneal thickening by mesenchymal-like mesothelial cells in rats. *Nephrol Dial Transdl* 2008; 24:437-447
  - 42 松永 和也 著. 培養細胞を用いた細胞内活性酸素種(ROS)産生とアスコルビン酸グルコシドによる ROS 消去能評価. 平成 19 年度三重大学大学院工学研究科博士前期過程分子素材工学専攻修士論文 2008

- 43 Leung J.C, et al. Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1336-1349
- 44 Ha H, et al. High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2001; 59: 463-47
- 45 林 正一 著. 新細胞接着分子の世界/羊土社(2001)
- 46 Medici D, et al. Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 1871-1879
- 47 Itoh F, et al. The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-beta/Smad signaling. *Genes Cells* 2002; 7: 321-331
- 48 Tsuyoshi Saito, et al. E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanism of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* 2004; 23:8629-8638
- 49 Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis : Pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1-12.
- 50 飯田 喜俊, 二瓶 宏, 秋澤 忠男, 椿原 美治 編. ©EBM 血液浄化療法. 株式会社 金芳堂 2000
- 51 坂野 真利 著. 活性酸素種による細胞間結合タンパクの非局在化に関する研究. 平成 18 年度三重大学大学院工学研究科博士前期過程分子素材工学専攻修士論文 2007
- 52 文部科学省 HP ターゲットタンパク研究プログラム : [http://www.tanpaku.org/tp\\_fundamental\\_biology/07.php](http://www.tanpaku.org/tp_fundamental_biology/07.php)
- 53 Gilcrease MZ. Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Letters* 2007; 247:1-25.
- 54 Sanka K, et al. Influence of actin cytoskeletal integrity on matrix metalloproteinase-2 activation in cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophth Vis Sci* 2007; 48:2105-2114.
- 55 Hood JD, et al. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Rev* 2002; 2:91-100.
- 56 Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:624-632.
- 57 Niggli V, et al. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1619-1638.

- 58 ARMELLE A, et al. Cell-Extracellular Matrix Interactions Stimulate the AP-1 Transcription Factor in an Integrin-Linked Kinase- and Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Manner. *Mol Cell Biol* 1999; 19:7420-7427.
- 59 John J, et al. GSK3 and PKB/Akt are associated with integrin-mediated regulation of PTHrP, IL-6 and IL-8 expression in FG pancreatic cancer cells. *Int. J. Cancer* 2005; 114:522-530.
- 60 Raffael Strippoli, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF- $\kappa$ B/Snail1 pathway. *Disease Models Mechanism* 2008; 1:264-274.
- 61 Damian Medici, et al. Cooperation between Snail and LEF-1 Transcription Factors Is Essential for TGF- $\beta$ 1-induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol Biol Cell* 2006; 17:1871-1879.
- 62 Neil A. Bhowmick, et al. Transforming Growth Factor- $\beta$  1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. *Mol Biol Cell* 2001; 12:27-36.
- 63 XN Meng, et al. Characterisation of Fibronectin-mediated FAK signaling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2009; 101:327-334
- 64 Lingzhi Fan, et al. Cell Contact-dependent Regulation of Epithelial-Myofibroblast Transition via the Rho-Rho Kinase-Phospho-Myosin Pathway. *Mol Biol Cell* 2007; 18:1083-1097
- 65 David a, et al. Hic-5 contributes to Epithelial-Mesenchymal Transformation through a RhoA/ROCK-dependent pathway. *J Cell Physiol* 2007; 211:736-747
- 66 XN Meng, et al. Characterisation of Fibronectin-mediated FAK signaling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *Brit J Cancer* 2009; 101: 327-334
- 67 Suzuki, N. et al. Activation of leukemia-associated RhoGEF by Galpha 13 with significant conformational rearrangements in the interface. *J Biol Chem* 2009; 284:5000-5009
- 68 Stephan Huveneers, et al. Adhesion signaling-crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 2009; 122:1059-1069
- 69 Regina Vargha, et al. Ex vivo reversal of in vivo transdifferentiation in mesothelial cells grown from peritoneal dialysate effluents. *Nephrol Dial Transpl* 2006; 21:2943-2947

- 70 Nadia A. Wahab, et al. A Critical Look at Growth Factors and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Adult Kidney. *Exp Nephrol* 2006; 104:e129-e134

## 9. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究及び研究生活全般において、適切かつ懇切なご指導を賜り、公私において非常にお世話になりました三重大学工学部分子素材工学科生体材料化学研究室の堀内 孝教授、宮本 啓一准教授、事務員の村上 節子様、また、副査をしていただいた湊元 幹太先生に、深く感謝致します。

本研究を行う上で必要な大綱組織を提供していただいた患者様、そしてそこに関わる三重大学医学部の諸先生方に深く感謝致します。

そして、3年間苦楽を共にして研究に励んだ、大原 健太郎君、小西 綾子さん、園田 雄久君、田辺 潤哉君、千葉 武史君、水谷 直紀君、水本 健君に深く感謝を致します。また、1年間でしたが、研究熱心な姿にとっても刺激を受け、精神的にも支えて頂いた太田 憲志君の事も一生忘れません。

また、時には厳しい事も言ってしまったかもしれませんが、最後まで優しく接して下さった、石田 尚志君、石原 千明さん、伊藤 寛之君、篠原 紀子さん、永田 裕子さん、羽多野 由季子さん、前田 裕子さん、山崎 慎也君、大友 佳子さん、加藤 真司君、熊澤 雄基君、佐々木 剛君、塩崎 大介君、野口 寛之君、原 吉彦君、堀井 貴司君、山本 光則君に感謝致します。

最後に、実験や研究室生活、公私共に多大なサポートをして頂き、最後まで力を貸して頂いた 高橋 国宏君、東 洋君に深く感謝致します。

## **10. Appendix**

**A-1. 細胞培養プロトコル**

**A-2. 動画撮影**

**A-3. AGPC 法**

**A-4. RNA 定量プロトコル**

**A-5. RT-PCR 法**

**A-6. Collagen gel 中の拡散係数測定法**

**A-7. 3次元細胞浸潤モデルの作成**

**A-8. 細胞増殖試験**

**A-9. Fick の拡散方程式による濃度勾配予測**

**A-10. Western Blotting 法**

**A-11. MTT 試験**

**B-1. 滅菌について**

**B-2. Primer 表**

**B-3. RT/PCR プログラム**

**B-4. 本研究で使用了した試薬について**

## A-1. 細胞培養プロトコル

### A-1-1. 培地調整

#### <使用機器・器具・試薬>

- ・ 50ml シリンジ(TERUMO<sup>®</sup>)
- ・ 30ml アシストチューブ(アシスト/Cat.No.60.543.001S)
- ・ 注射針
- ・ PH メーター
- ・ Millex-GV(MILLIPORE/Cat.No.SLGV025LS/孔径 0.22 $\mu$ m)
- ・ Strivex GS(MILLIPORE/Cat.No.SVGSB1010/膜孔径 0.22 $\mu$ m)
- ・ STERICUP<sup>TM</sup> フィルター(MILLIPORE/Cat.No.SCGVU05RE)
- ・ 15ml 遠沈管
- ・ 0.5ml アシストチューブ(アシスト/Cat.No.72.699 S)
- ・ Medium 199(SIGMA/Cat.No.M2154)
- ・ Penicillin streptomycin(SIGMA/Cat.No.P-0781)
- ・ Insulin Transferin Selenate(SIGMA/Cat.No.I-1844)
- ・ L-Glutamine(SIGMA/Cat.No.G-7513)
- ・ Hydrocortisone(SIGMA/Cat.No.H-0888)
- ・ 1N NaOH aq
- ・ 1N HCL aq(080-08065/Wako)
- ・ Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)
- ・ Diethylpyrocarbonate

#### <各溶液調整>

##### ○ 培地調整

- ・ ITS (Insulin Transferin Selenate)  
ITS (パウダー状) の瓶に DEPC 処理水 50 ml を入れ攪拌し、1.5ml アシストチューブに 500 $\mu$ l ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。
- ・ L-G (L-Glutamine)  
15 ml 遠沈管に 5 ml ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。
- ・ P-S (Penicillin-Streptomycin Solution)  
5 ml アシストチューブに 5 ml ずつ分注し、冷凍庫にて -20℃で保存した。
- ・ HC (Hydrocortisone)  
HC 4 mg を 2 ml の無水 ethanol で溶解し、DEPC 処理水 2 ml を加えて濾過した。0.5 ml アシストチューブに 200  $\mu$ l ずつ分注し、室温で保存した。

[操作]

- ① L-G、P-S 各 5 ml を一本のチューブにまとめ、L-G,HC をそれぞれ 50  $\mu$ l ずつ加えた。
- ② 上記のサプリメントを、10 ml シリンジ (TERUMO®) を用いて Millex-GV を通してフィルター滅菌し、Medium-199 に添加した。

\*pH を調整する場合

- ③ 培地の pH を調整した。また、pH は 7.2 に調整した。

※体内の pH は 7.4 である。

※pH を 7.2 にするのは、フィルター滅菌後に pH の値がおよそ 0.2 大きくなるためである。1N-HCl aq や 1N-NaOH aq を使用して pH を調整した。

○ Fetal bovine serum (牛胎児血清) の不活性化、分注、保存

[操作]

- ① 凍結の状態で送られてきた FBS は 37°C で溶かした。溶かし終わったら数回振り、55~56°C で、時折振り混ぜながら 30 分間温めた (不活性化)。
- ② 50 ml のシリンジ (TERUMO®) で吸い取り、Strivex GS、もしくは、Stericup フィルターユニットにてフィルター滅菌し、30 ml アシストチューブに 25 ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。
- ③ 冷凍庫 (−20°C) で保存した。

○ Trypsin-EDTA solution (10x)

[操作]

- ① 納品後、冷凍保存 (−20°C 以下) した。
- ② 37°C で解凍し、5 ml アシストチューブに 4 ml ずつ分注し、−20°C にて保存した。

○ 滅菌水の作製

[操作]

- ① Milli-Q 水又は蒸留水 (用途に応じて) 滅菌瓶に小分けし、高圧蒸気滅菌 (121°C、20 分) した。
- ② 滅菌後、栓をしたまま棚に保管した。

○ DEPC 処理水の作製

[操作]

- ① メディウムビン を Milli-Q 水で 2 回洗浄し、Milli-Q 水をメディウムビンに入れた。
- ② Milli-Q 水の体積に対して 0.1% の DEPC (Diethylpyrocarbonate) を加え (500 ml のミリ Q 水に対してならば DEPC を 500 $\mu$ l)、蓋をきっちり締めてよく振り混ぜた。

※ DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行うこと。

③ そのまま 37℃のインキュベーター内に入れ、2 時間加温した。加温の際には 30 分に 1 回振り混ぜること。

※ 振り混ぜることによってビンの蓋や首の部分、液体内に DEPC が均一に広がり、全体の RNase を失活させる。

④ ビンの蓋を十分緩めて、121℃/40 分(1 本あたり 500ml ならば)オートクレーブにかけた。

※ オートクレーブをすることにより DEPC を除去する。オートクレーブ後にも DEPC の臭いが残っている場合は、もう一度オートクレーブにかける。

※ DEPC は発癌性であるため、むやみに蒸気を吸うことのないように気を付けること。また、オートクレーブに溜まった水は気化して抜けた DEPC が溶け込んでいるので、その排水は責任を持って処理すること（大量の水と共に排水口へ流す）。

## A-1-2.初代培養

### <使用機器・器具・試薬>

- ・ CO<sub>2</sub> インキュベーター（池本理科工業/10-0212）
- ・ 攪拌遠心機(LABINCO/2790001)
- ・ ウォーターバス
- ・ Vortex
- ・ 手術器具一式（滅菌済）
- ・ 25cm<sup>2</sup> 培養フラスコ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-21050)
- ・ 15ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56150)
- ・ 50ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56500)
- ・ 遠沈管立て
- ・ 10ml ピペット(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-66100)
- ・ ピペッター
- ・ タイマー
- ・ Medium-199(SIGMA/M2154)
- ・ PBS(SIGMA/D8537)
- ・ TRYPSIN-EDTA SOLUTION(10x)(SIGMA/T4174)
- ・ Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)

### <組織の入手>

本研究で用いた HPMC は、予め本学医学部倫理委員会にて患者組織の採取につき承認を得て、かつ informed consent を得た患者より頂いた大網組織である。

#### <組織の切断>

##### [操作]

- ① オートクレーブ滅菌処理した金属トレイに、滅菌済み（新品）の PBS を 1 本（500ml）入れた。
- ② すぐさま組織を浸し、切断箇所を滅菌糸で固く縛り、縛った箇所の間を滅菌済みハサミにて切断した。
- ③ 同様の操作を繰り返し、数個の親指大の切片に切り分けた。

#### <細胞剥離>

##### [操作]

- ① 25cm<sup>2</sup>培養フラスコに 10%FBS/M-199 を 5ml 加えてプレインキュベートした。
- ② 50ml 遠心管に、分注した 5.0%トリプトシン/2.0%EDTA 溶液 2ml と M-199 培地溶液 18ml を加え、0.5%トリプトシン/2.0%EDTA 溶液/M-199 培地溶液（以下トリプトシン溶液）を作成した。
- ③ 用意したトリプトシン溶液 20ml に、親指大の大きさにした大網組織を入れて、37℃20 分間ローテーターにより攪拌しながら、インキュベートした。
- ④ 攪拌した大網を遠心管から取り出し、次の遠心管に入れ、□の操作を行う。また、大網を取り出した遠心管は 50G（遠心半径 10cm 750rpm 原則 4℃）5 分間遠心分離を行った。
- ⑤ 上澄みを抜き取り cell pellet を作った。50%FCS/M-199 を 2ml 加え、ボルテックスをかけて、再び 50G（遠心半径 10cm 750rpm 原則 4℃）5 分間遠心分離を行った。
- ⑥ 再び上澄みを抜き取り、10%FBS/M-199 を 1ml 加えて 10 回のピペッティングにより細胞懸濁液を作成した。この懸濁液を①で調整した 25 cm<sup>2</sup>培養フラスコに播種し、37 度の 5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内にて培養した。
- ⑦ ③～⑥の操作を繰り返した。

### A-1-3. 継代培養

#### <使用機器・器具・試薬>

- ・ CO<sub>2</sub> インキュベーター（池本理科工業/10-0212）
- ・ ウォーターバス
- ・ Vortex
- ・ 25cm<sup>2</sup>培養フラスコ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-21050)
- ・ 75 cm<sup>2</sup>培養フラスコ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-21250)
- ・ 6 穴プレート(友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-80060)

- ・  $\phi 35\text{mm}$  シャーレ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-80240)
- ・ 15ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56150)
- ・ 50ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56500)
- ・ 遠沈管立て
- ・ 10ml ピペット(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-66100)
- ・ ピペッター
- ・ パスツールピペット
- ・ チップ各種
- ・ セルスクレーパー(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-93170)
- ・ カウンター
- ・ 血球計算盤
- ・ Medium-199(SIGMA/M2154)
- ・ PBS(SIGMA/M8537)
- ・ TRYPsin-EDTA SOLUTION(10x)(SIGMA/T4174)
- ・ Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)

#### <細胞の洗浄>

##### [操作]

- ① 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌した。
- ② 滅菌済み 10ml ピペットを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引した。
- ③ PBS 溶液 5ml/25cm<sup>2</sup> フラスコ又は 10ml/75 cm<sup>2</sup> フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄した。
- ④ 滅菌済み 10ml ピペットを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、洗浄液を吸引した。

#### <継代作業>

##### [操作]

- ① 冷凍保存してあるトリプシン 1ml に培地 9ml を加え、10 倍希釈した。(以下トリプシン溶液)
- ② トリプシン溶液 5ml/25 cm<sup>2</sup> フラスコ又は 10ml/75 cm<sup>2</sup> フラスコを加え、37℃ の CO<sub>2</sub> インキュベート内にて 10 分間放置した。
- ③ 顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認後、FBS 1ml/25 cm<sup>2</sup> フラスコ又は 2ml/75 cm<sup>2</sup> フラスコを加えた。
- ④ 滅菌済みセルスクレーパーを培養フラスコ内に挿入し、細胞を剥離した。
- ⑤ 滅菌済み 10ml ピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml 遠

心管に入れた。

- ⑥ 50G (750rpm5 分間原則 4℃) 遠心分離した。
- ⑦ 培養フラスコに 10%FBS/M-199 を入れ、37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベート内にて放置した。
- ⑧ ⑥で遠心分離した上澄みをピペットで吸引した。
- ⑨ 10%FBS/M-199 を 1ml 又は 3ml を遠心管に沈殿している細胞に加え、細胞懸濁液を作成し、10 回ピペッティングを行った。
- ⑩ 細胞懸濁液を取り、⑦で用意しておいた培養フラスコに 200μl/25cm<sup>2</sup> フラスコ、1ml/75cm<sup>2</sup> フラスコ播種し、37℃の CO<sub>2</sub> インキュベート内にて培養した。

## A-2. 動画撮影

### <使用機器・器具・試薬>

- ・ オリンパス倒立高級培養顕微鏡(OLYMPUS/IX50/IX70)
- ・ オリンパス倒立落射蛍光観察装置(OLYMPUS/IX-FLA)
- ・ オリンパス CO<sub>2</sub> 培養装置(OLYMPUS/IX-FLA)
- ・ パーソナルコンピュータ
- ・ 写真撮影ソフト X-cap
- ・ 動画作成ソフト Virtual Dub

### <準備>

- ① ステージと培養装置をアルコールで消毒した。
- ② 培養装置の水を捨て、内側をミリ Q 水、あるいは脱イオン水で洗浄した。
- ③ ミリ Q 水を線の部分まで入れた。
- ④ ステージの保温装置のスイッチを入れた。
- ⑤ ポンプのねじを 30 度ほど開き、さらに他の 2 つのねじも根元から開いた。
- ⑥ CO<sub>2</sub> 調節装置を左側 200、右側 10 にセットした。
- ⑦ 細胞を培養し、シャーレをセットし、細胞の形態変化を撮影した。

### <写真撮影>

- ① 顕微鏡とつながっているパーソナルコンピュータの電源を入れた。
- ② X-cap for windows を起動させた。
- ③ メニューバーの「PIXCI」から「Open/Close」を選択し、さらに「Multiple Devices」を選択した。

- ④ 顕微鏡から送られてくる画像をモニターに映し、焦点をセットして、撮影場所、坐像の明るさ調整を行った。
- ⑤ ツールバーの「Capture」、「Sequence capture」、「video to image file」を順に選択した。
- ⑥ 「file」、「Browse」の順に選択し、ファイル名をつけ、取り込み方式を「JPEG」に設定した。
- ⑦ 「Capture」、「Image to Save」で撮影枚数を決定し、「Time Interval」で撮影間隔を設定した。また、「Snap Video at Time Interval」、「Linear Sequence Event Free」がチェックされていることを確認した。
- ⑧ 「Record」で撮影を開始した。

#### <Virtual Dub による動画作成>

- ①. Virtual Dub を起動する
- ②. メニューバーの「ファイル」から「ビデオファイルを開く」を選択し、画像番号の一番始めのファイルを選択し「開く」ボタンをクリックした。
- ③. メニューバーの「映像」から「フィルター」を選択し、「追加」をクリックし、「resize」を選択後、「OK」をクリックし新しい幅・新しい高さの値を入力し画面のサイズを 640×480 に指定し「OK」をクリックした。  
再び、追加をクリックし「HSV adjust」を選択し「OK」をクリックした。  
「プレビューの表示」をクリックし「値」を変化させ、最適な明るさに調整し「OK」をクリックした。「OK」をクリックし、フィルター調整を終了した。
- ④. 「映像」から「フレームレート」を選択し、「ソースレート調整」の「変更する」をチェックし、適当な値を入力した。
- ⑤. 「映像」から「圧縮」を選択し、「Cinepak Codec by Radius」を選択し、「OK」をクリックした。
- ⑥. 「ファイル」から「名前を付けて保存」を選択し、適当な名前を入力し作成し「OK」をクリックした。（動画の作成が開始される）

### A-3. AGPC 法

#### <原理>

RNA を構成するリボースは、DNA のデオキシリボースに比べて 2 位の炭素に水酸基が一つ多くあるため、酸性下でフェノール処理すると DNA は疎水性に勝るフェノール層に分配されるが、RNA はリボースの水酸基があるため水相に分配される。AGPC 法は、この性質を利用して RNA を抽出する方法である(fig.A-5-1)。一般的に、チオシアン酸グアニジンで細胞膜の可溶化をするとともに、RNase を失活させる。pH を酸性に保ち、フェノール処理を行うことにより DNA はフェノール層、RNA は水層、その間の中間層には変性した蛋白と、3 層に分けることができる。RNA の入った水層を

取り出し、アルコールで塩析することで純粋な RNA を得て、乾燥後に RNase を失活させた DEPC 水に溶解することで精製する。

本実験では市販の RNA-BEE™ ISOLATION OF RNA と呼ばれる試薬により RNA 抽出を行っているが、基本的には原理は同じである。

#### <RNA・DNA を扱う上での注意点>

細胞は細胞の種類、状態に応じて特定の DNA を選択的に活性化して機能を発言している。この仲立ちをするのが mRNA であり、細胞の状態をフレキシブルに変化させるには古い mRNA がいつまでも残っていて問題である。そこで、細胞や組織液中には RNA を分解する酵素(RNase)が豊富に含まれている。実際に我々が RNA の分析を行うにあたって、この RNase による RNA の分解が障害となってくる。RNase は我々の汗・唾液・皮膚など様々な部分に存在していて、熱による失活も難しいため、実験において RNase の混入をいかに防ぐかがポイントとなる。そのため、以下の点に気をつけること。

- ・ 各チューブ・チップは素手で触れたものは使用しないこと。
- ・ 使用するガラス器具は乾熱滅菌(RNase free)を行うこと。
- ・ 実験中は必ずゴム手袋（利き腕でない方のみで良い）、マスク、帽子、白衣を着用し、唾液を飛ばさないように会話を極力控えること。
- ・ ゴム手袋を着用した手ではサンプル使用以外に使用しないこと。
- ・ サンプルに触れるものを素手で扱わないこと。

また、AGPC 法に特有な注意点として以下の点に気をつけること。

- ・ 高速遠心機は予冷運転を行っておくこと。
- ・ 操作は全体的に素早く正確に行うこと。

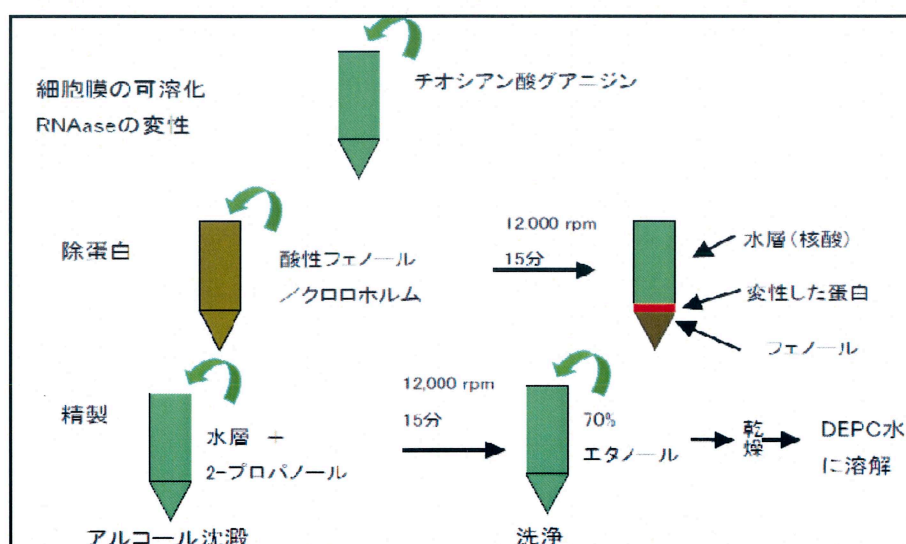


Fig.A-3-1 RNA 抽出の流れ

#### <使用機器・器具・試薬>

- ・ 日立微量高速遠心機(日立/CR15B 型)
- ・ DNA mini(HETO LAB EQUIPMENT/ID 872146)
- ・ MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- ・ Vortex
- ・ ウォーターバス
- ・ 1.5ml アシストチューブ(アシスト/72.690S)
- ・ チューブ立て
- ・ マイクロピペッター各種
- ・ チップ各種
- ・ タイマー
- ・ Crash ice 用発泡スチロール
- ・ Crash ice
- ・ PARAFILM®(Pechiney Plastic Packaging, Inc./PM-996)
- ・ 注射針(TERUMO®/NN-2432R)
- ・ RNA-BEE™ ISOLATION OF RNA(Tel-Test, Inc./CS-104B)
- ・ Chloroform-isoamylalcohol 24:1(SIGMA/C-0549)
- ・ Isopropanol(SIGMA/I-9516)
- ・ PBS(SIGMA/D-8537)
- ・ 75%EtOH/DEPC 処理水溶液(無水 EtOH を DEPC 処理水で希釈)  
→無水 EtOH(Wako/321-00025)
- ・ DEPC 処理水→Diethylpyrocarbonate(CALBIOCHEM®/298711)

#### <AGPC 法(前半)>

##### [操作]

- ① 細胞に刺激を与え、6 穴プレートから培地を吸引して PBS を 1ml/well 加えて細胞を洗浄した。  
※後の作業を考慮し、3 穴毎に行うのが良い。
- ② 洗浄後 PBS を吸引して、素早く RNA-BEE™ を 1ml/well 加えた。
- ③ 2 連にしたピペットチップの先端で細胞を剥がすように搔いた後、10 回程度ピペッティングを行い、懸濁液を 1.5ml アシストチューブに移し入れた。  
※②と③の操作は 5 分間で行うこと。  
※チップは well 毎に交換すること。
- ④ チューブに入った各サンプルに chloroform-isoamylalcohol 24:1 を 200μl ずつ加え、しっかりと蓋を閉めた後 15 回程度上下に振り混ぜた。
- ⑤ 室温にて 15 分間静置した。

- ⑥ 12000G/4°C/15 分遠心分離を行った。
- ⑦ 3 層に分離するため、最上層(透明な水層)を液面近傍よりそれぞれ 350 $\mu$ l ずつ採取して、別の 1.5ml アシストチューブに移し入れた。
- ⑧ 移し入れた各サンプルに isopropanol を 500 $\mu$ l ずつ加えて、Vortex にて攪拌し、その後すぐに-80°Cの冷凍庫で一晩保存した。

<AGPC 法(後半)>

#### 【全て氷上操作】

- ① サンプルを解凍し、12000G/4°C/10 分遠心分離を行った。  
※この時チューブの継ぎ手を外側に向けて遠心分離を行うこと。
- ② チューブを傾け、ある程度の上澄み液を慎重に取り除いた。  
※沈殿は肉眼で確認できないので、チューブの継ぎ手側に沈殿が存在していると想定し、上澄み液を取り除くこと。
- ③ 各サンプルに 75%EtOH/DEPC 処理水溶液を 500 $\mu$ l ずつ加えて Vortex で攪拌した後、10000G/4°C/5 分遠心分離を行った。
- ④ チューブを傾け、より慎重に上澄み液をぎりぎりまで取り除いた。
- ⑤ チューブの口に PARAFILM®を張り、注射針で 10 個程度の穴を開けた。  
※PARAFILM®は絶対に素手では触らないこと。
- ⑥ DNA mini にサンプルをセットし、減圧乾燥を行った。  
※サンプル残量により乾燥時間が異なるので、乾燥しすぎないように様子を見ながら慎重に行うこと。(1 セット 3~5 分)
- ⑦ 各サンプルに DEPC 処理水を 10 $\mu$ l ずつ加えて、Vortex による攪拌、続いて MINI CENTRIFUGE による軽い遠心を 2 回繰り返した。  
※減圧乾燥の際に RNA が壁に付着する可能性があるため、念入りに行うこと。
- ⑧ ウォーターバスにて 55°C/5 分加温後、4°C冷蔵庫にて冷却した。
- ⑨ 得られたサンプルは RNA の定量後、RT-PCR 法に使用した。

## A-4. RNA 定量プロトコル

<原理>

分光光度計を用いて吸光度 OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub> を測定し、その値をもとにして全サンプルの RNA 濃度を一律に揃える。ここでの OD<sub>260</sub> は RNA を示しており、一方で OD<sub>280</sub> はそれ以外のタンパク質等の物質を示しており、その吸光度比(OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>)はサンプルの RNA 純度を示している。一般的に、この値は 1.5 以上が望ましいとされている。RT-PCR 法は mRNA を鋳型にして DNA 合成・増幅を行い、得られた DNA の定量を行うため、鋳型である mRNA 量を揃えることにより PCR の反応生成物に定量性を持

たせることができる。

<注意点>

OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> は、比がいくら大きくても吸光度が低いと RNA 濃度は低くなってしまうため、理想的なサンプル濃度である 0.2~0.5μg/ml にするためには、少なくとも OD<sub>260</sub> = 0.085 以上は必要となる。また、逆にサンプル濃度が高すぎる場合には、希釈して用いることが必要である。

<使用機器・器具・試薬>

- Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer(BIO RAD/170-2501)
- Cuvette(BIO RAD/170-2505)
- MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- Vortex
- 0.5ml アシストチューブ(アシスト/72.699S)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- 0.1N HCl aq
- DEPC 処理水
- キムワイプ®S-200(株式会社クレシア/62011)

<RNA の定量>

- ① AGPC 法により得られた各サンプル 10μl より 1μl ずつ採取し、サンプル数分用意した 0.5ml アシストチューブの底部にそれぞれ入れた。
  - ② DEPC 処理水を 59μl ずつ①のチューブに入れ、Vortex で攪拌後、MINICENTRIFUGE で軽く遠心を行った。
  - ③ 0.1N HCl aq に浸しておいた Cuvette を脱イオン水でよく洗い水気を切った。
  - ④ マイクロピペッターを用いて Cuvette に DEPC 処理水を 60μl 入れ、Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer にセットし、零点補正(Read Blank)を行った。
  - ⑤ マイクロピペッターを用いて DEPC 処理水を抜き取り、1 つ目のサンプルを 60μl 入れ、セットして、3 回吸光度測定(Read Sample)を行った。
- ※測定し終えたサンプルは、測定のやり直しができるように、再びマイクロピペッターを用いて元のチューブに戻しておくこと。
- ⑥ Cuvette を脱イオン水でしっかり洗浄し、水気を取った。
  - ⑦ ④~⑥をサンプル数分繰り返した。
  - ⑧ 測定結果が異常であったサンプルを再測定した。
  - ⑨ 得られたデータのデータ処理を次のように行った。

### <データ処理>

得られたデータより、次の2つの計算を行った。

i)各サンプルの濃度

ii)全サンプルの濃度を最低サンプル濃度に合わせるために必要なサンプルと DEPC 処理水の量

サンプル濃度( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )=(OD260) $\times$ (換算濃度) $\times$ (希釈倍率)

RNA 最低量( $\mu\text{g}$ )=最低のサンプル濃度( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) $\times$ サンプル残量( $\mu\text{l}$ )

必要サンプル量( $\mu\text{l}$ )=RNA の最低量( $\mu\text{g}$ ) / 希釈対象のサンプル濃度

必要 DEPC 処理水量( $\mu\text{l}$ )=サンプル残量( $\mu\text{l}$ ) - 必要サンプル量( $\mu\text{l}$ )

※換算係数は RNA 測定の場合 0.04( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

※希釈倍率は 60 倍

※サンプル残量は AGPC 法にて得られたサンプル 10 $\mu\text{l}$  から RNA の定量に用いた 1 $\mu\text{l}$  を差し引いた 9 $\mu\text{l}$ 。

## A-5. RT-PCR

### <原理>

PCR は微量な DNA の存在を非常に鋭敏に検出できる方法であるので、これを用いてわずかな mRNA の発現を検出したいが、DNA 合成酵素は RNA を鋳型として DNA を合成する活性を持たないため、そのままでは RNA の検出を行えない。そこで、逆転写酵素を用いて RNA を鋳型とした DNA の合成反応(逆転写反応)をあらかじめ行い、その DNA をあらためて鋳型として PCR を行う方法が RT-PCR である(Fig.A-5-1)。

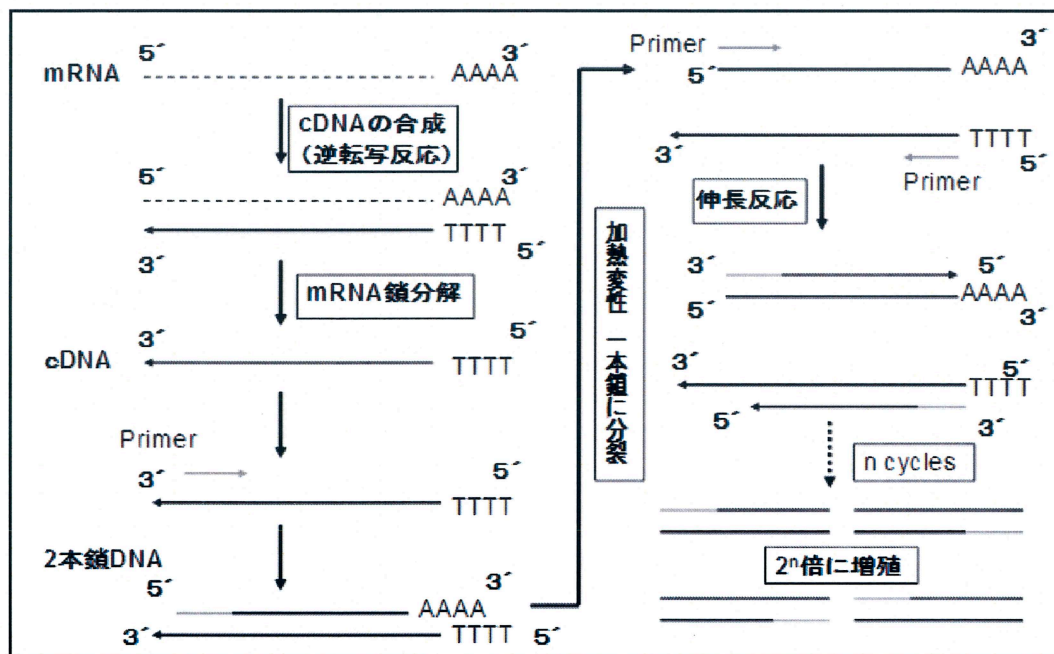


Fig.A-5-1 RT-PCR 法

## A-5-1. Reverse Transcription

### <原理>

細胞から発現した mRNA に Primer(Random Hexamer)を結合させて、逆転写酵素を用いて mRNA に相補的な一本鎖 DNA(cDNA)を逆転写反応により合成する。この時点では DNA と RNA が繋がった 2 本鎖の状態であり、安定性が高いため、PCR の熱変性(denature)時に十分に一本鎖にならないことがあるため、DNA 鎖と対をなしている mRNA 鎖を、RNA 分解酵素(RNase)を用いて分解する。これにより、完全長 cDNA を合成できる。

### <注意点>

- ・ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM に RT program 01/02 を予め入力しておくこと。
- ・ Reaction Tube with Cap は必ず専用の滅菌缶に入れて、滅菌しておくこと。その際素手では触れないこと。
- ・ Reaction Tube with Cap にラベルする際、分かりやすく、消えない箇所に記入すること。

### <使用機器・器具・試薬>

- ・ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM(ASTEC/PC-708)
- ・ MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- ・ Vortex
- ・ Reaction Tube with Cap(MicroAmp/N801-0540)
- ・ チューブ立て
- ・ マイクロピペッター各種
- ・ チップ各種
- ・ Crash ice 用発泡スチロール
- ・ Crash ice
- ・ Random Primers(Invitrogen/48190-011)
- ・ dATP(Amersham Biosciences/27-2050-01)
- ・ dTTP(Amersham Biosciences/272080)
- ・ dGTP(Amersham Biosciences/272070)
- ・ dCTP(Amersham Biosciences/272060)
- ・ 10x PCR buffer(PERKIN ELMER/E12387)
- ・ Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor(Promega/N2511)
- ・ Super Script™ RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase(Invitrogen/18053-017)
- ・ DTT(Invitrogen/Y00147)

- ・ DEPC 処理水

#### <RT Master Mix>

##### 【全て氷上操作】

Table.A-5-1 に従い、各試薬を混合して RT Master Mix を作製する。微量を扱うので、サンプル数丁度の量では不足する恐れがあるため、サンプル数が多い場合は 1~2 サンプル多めに作製すること。その後、Table.A-5-2 に従って RNase inhibitor と Super Script™ を加える。

Table.A-5-1 RT Master Mix (単位:μl)

Sample 数	1	6(+1)	9(+2)	12(+2)	18(+3)	24(+4)
Random Primers(100mM)	1	7	11	14	21	28
dATP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dTTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dCTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dGTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
10x PCR buffer	2	14	22	28	42	56
DTT	2	14	22	28	42	56
合計	9	63	99	126	189	252

Table.A-5-2 RNase inhibitor と Super Script™ の必要量(単位:μl)

Sample 数	1	6(+1)	9(+2)	12(+2)	18(+3)	24(+4)
RNase inhibitor	1	7	11	14	21	28
Super Script™	1	7	11	14	21	28
合計	2	14	22	28	42	56

#### <Reverse Transcription>

##### 【全て氷上操作】

- ① 各サンプルを扱う前に RT Master Mix を作製した。
- ② RNA の定量結果に基づいて、AGPC 法により得たサンプル原液を Reaction Tube with Cap 内に希釈し、9μl とした。
- ③ 希釈後の各サンプル 9μl に、RT Master Mix を 9μl ずつ加えて、Vortex で攪拌し、

MINI CENTRIFUGE によって軽く遠心を行った。

- ④ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM にサンプルをセットし、RT program 01 を実行した。
- ⑤ 各サンプルに RNase inhibitor と Super Script™ を 1μl ずつ加えた。  
※予めサンプルに RNase inhibitor と Super Script™ を加えても良いが、その場合混合液の量を 4 サンプル分程多めに作製しておくこと。
- ⑥ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM にサンプルをセットし、RT program 02 を実行した。
- ⑦ 作製した RT product は -20℃ の冷凍庫で保存した（数ヶ月保存可）。

## A-5-2. Polymerase Chain Reaction

### <原理>

PCR の原理は 3 段階から成る DNA 合成反応を繰り返して行うことにある。まず、鋳型となる 2 本鎖 DNA を加熱して変性し、一本鎖にする(denature)。次に、増幅したい特定部位の DNA 鎖の両端に相補的な 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを反応系に過剰に加えた状態で温度を下げると、プライマーが DNA 鎖の相補的な部位と 2 本鎖を形成する(annealing)。この状態で DNA 合成基質のデオキシヌクレオシド三リン酸と DNA ポリメラーゼを作用させると、ポリメラーゼはプライマー部位から DNA 相補鎖を合成していく(伸長反応、extension)。初めの 2 サイクルでは長さが不定な部分 2 本鎖 DNA が合成されるが、3 サイクル目からはプライマー対に挟まれた部位の長さの揃った 2 本鎖が生成され、その数が指数関数的に増加していく。1 回の合成反応で生成した DNA は次の反応の鋳型となるため、連鎖反動的に DNA が合成され、20~30 サイクルの反応の後には、莫大な数の DNA 分子が得られることとなる。

### <注意点>

注意すべきことは、RNase の混入を防ぐことである。PCR 法に特有の注意点として以下の点に気を付けること。

- ・ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM に各プライマーに対応した PCR program を予め入力しておくこと。
- ・ サイクル数を上下させる場合は、4 サイクル刻みで増減させ、2 サイクル刻みで微調整すること。
- ・ RT product 内に白い沈殿がある場合は、cDNA が壊れてしまっている可能性が高い。そのサンプルで PCR を行っても結果が得られない場合が多いので注意すること。
- ・ RT 法と同様、Reaction Tube with Cap の扱いに気を付けること。

<使用機器・器具・試薬>

- ・ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM(ASTEC/PC-708)
- ・ MINI CENTRIFUGE(COSTER/MVSS-06618)
- ・ Vortex
- ・ Reaction Tube with Cap(MicroAmp/N801-0540)
- ・ チューブ立て
- ・ マイクロピペッター各種
- ・ チップ各種
- ・ Crash ice 用発泡スチロール
- ・ Crash ice
- ・ dATP(Amersham Biosciences/27-2050-01)
- ・ dTTP(Amersham Biosciences/272080)
- ・ dGTP(Amersham Biosciences/272070)
- ・ dCTP(Amersham Biosciences/272060)
- ・ Primer(sense/antisense)各種
- ・ AmpliTaq Gold<sup>TM</sup>(Applied Biosystems/N808-0242)
- ・ 10x PCR buffer(PERKIN ELMER/E12387)
- ・ DEPC 処理水

<PCR Master Mix>

【全て氷上操作】

Table.A-5-3 に従い、各試薬を混合して PCR Master Mix を作製する。プライマーは目的に応じて変更する。RT Master Mix と同様に、サンプル数が多い場合は 1,2 サンプル分余分に PCR Master Mix を作製すること。また、AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> は各サンプルを加える直前に加えること。

Table.A-5-3 PCR Master Mix(単位:μl)

Sample 数	1	6(+1)	9(+2)	12(+2)	18(+3)	24(+4)
dATP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dTTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dCTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dGTP(2.5mM)	1	7	11	14	21	28
Primer(sense)(20μM)	1.25	8.75	11.25	17.5	26.25	35
Primer(antisense)(20μM)	1.25	8.75	11.25	17.5	26.25	35
10x PCR buffer	5	35	55	70	105	140
DEPC 処理水	36.25	253.75	398.75	507.5	761.25	1015
AmpliTaq Gold™	0.25	1.75	2.75	3.5	5.25	7
合計	48	336	528	672	1008	1344

## &lt;Polymerase Chain Reaction&gt;

## 【全て氷上操作】

- ① 各サンプルを扱う直前に PCR Master Mix(AmpliTaq Gold™ 抜き)を作製した。
- ② RT 法により作製した各 RT product から 2μl ずつ採取し、予め用意しておいた Reaction Tube with Cap に移し入れた。
- ③ PCR Master Mix に AmpliTaq Gold™ を加え、Vortex により攪拌し、MINI CENTRIFUGE による軽い遠心を行った。
- ④ □で用意したチューブに PCR Master Mix を 48μl ずつ加えて、Vortex により攪拌し、MINI CENTRIFUGE にて 1 分間遠心を行った。
- GeneAmp® PCR system 2400(サーマルサイクラー)を使用する場合、PCR 中にサンプルが蒸発して組成が変化するのを防ぐために、この時点でサンプルの液面に MINERAL OIL(SIGMA/M5904)を 50μl ずつ壁側にゆっくりと流し込むこと。
- ⑤ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM にサンプルをセットし、各プライマーに合った PCR program を実行した。
- ⑥ 作製した PCR product は-20℃の冷凍庫にて保存した（数ヵ月保存可）。

### A-5-3. 電気泳動

#### <原理>

核酸検出の手段として、電気泳動は一般的な方法である。DNA 分子はリン酸基を持つため、水溶液中で負に荷電している。よって、DNA を電場に置くと、陽極に向かって動く。そして、ゲル内を移動する DNA 分子は、分子量の小さいものほど早く移動するので、分子量の違いにより DNA を分離することができる。電気泳動によってゲル上に分離された DNA を、エチジウムブロマイドで染色することで、エチジウムブロマイドが 2 本鎖 DNA と結合し、紫外線照射装置をゲルに当てると DNA が橙色の蛍光を発色し、DNA の存在を確認できる(fig.A-5-2)。

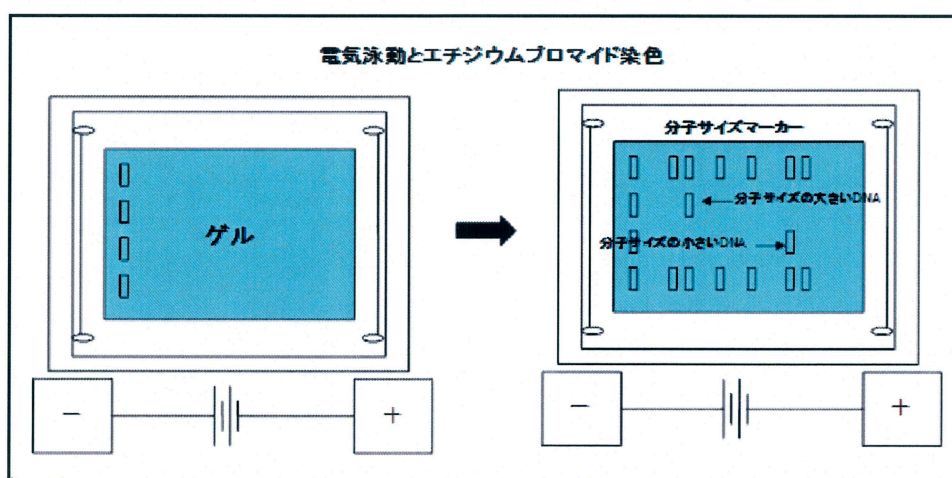


Fig.A-5-2 アガロース電気泳動法の原理

#### <注意点>

AGPC 法、RT 法、PCR 法に比べてそれほど神経質にならなくても良いが、ゴム手袋と白衣は必ず着用すること。RNase の混入を防ぐ意味もあるが、ここでは Ethidium Bromide から身を守るという意味の方が大きい。

#### ⚠Ethidium Bromide

Ethidium Bromide は核酸のバンド検出に用いられる蛍光試薬であり、2 本鎖 DNA の間に挿入(インターカレーション)されるという性質上、DNA の正常な複製や転写を妨げ、突然変異誘起させるという効果から、強力な発癌作用と毒性が生まれる。取り扱いには必ずゴム手袋をはめ、粉末の計量にはマスクを着用すること。また、Ethidium Bromide を含んだ泳動用 buffer などの廃液やアガロースゲル、廃チップや廃ビンには必ず他のものと区別して集め、適切な処置を施してから廃棄すること。もしくは業者に委託して廃棄してもらうこと。

※電気泳動に特有の注意点として、以下の点に気をつけること。

※使用する三角フラスコとメスシリンダーは口にアルミホイルで蓋をし、180℃、8時間以上(Over Night)乾熱滅菌を行うこと。

#### <使用機器・器具・試薬>

- ・ Wide Mini-Sub Cell® GT System(BIO RAD/170-4485)
- ・ POWER PAC 300(BIO RAD/282 BR 11443)
- ・ LIBROR(株式会社 島津製作所/AEL-200)
- ・ 電子レンジ
- ・ ゲル作製用三角フラスコ(100ml)
- ・ メスシリンダー(100ml)
- ・ マイクロピペッター各種
- ・ チップ各種
- ・ アルミホイル
- ・ サランラップ
- ・ PARAFILM®(Pechiney Plastic Packaging, Inc./PM-996)
- ・ NuSieve® GTG® Agarose(BMA/50080)
- ・ Ultra Pure Agarose(Invitrogen/15510-019)
- ・ 50x TAE buffer(INTERGEN/S4300)
- ・ 10x TAE buffer(Invitrogen/15558-042)
- ・ Ethidium Bromide(SIGMA/E-1510)
- ・ Blue Juice™(Invitrogen/10816-015)
- ・ 123 bp DNA Ladder(Invitrogen/15613-011)
- ・ DEPC 処理水

#### <Agarose Gel(3% wt/vol)の作製>

- ① Wide Mini-Sub Cell® GT System の Gel caster にゲルトレイをセットし、水準器を用いてゲルトレイが地面に対し水平になるように調整した。
- ② NuSieve® GTG® Agarose と Ultra Pure Agarose を秤量し、乾熱滅菌済みのゲル作製用三角フラスコに入れた(Table.A-5-3)。

※秤量には薬包紙ではなく、乾熱滅菌した三角フラスコの口を包んでいた、アルミホイルを用いること。また、アルミホイルの内側は素手で触らないこと。

※秤量にはスパチュラを用いないこと。

- ③ 50x TAE buffer を乾熱滅菌済みのメスシリンダーに入れ、DEPC 処理水を所定量加え、50 倍に希釈し、1x TAE buffer(from 50x)を作製した(Table.A-5-3)。

Table.A-5-4 Agarose Gel(3% wt/vol)作製に必要な各薬の量

NuSieve® GTG® Agarose(g)	1.2	50x TAE buffer(ml)	1.2
Ultra Pure Agarose(g)	0.6	DEPC 処理水(ml)	58.8
合計(g)	1.8	合計(ml)	60

- ④ ②の三角フラスコに③で調整した 1x TAE buffer(from 50x)を加え、ゲルの塊が出来ないように振り混ぜた後、buffer の蒸発を防ぐためサランラップでフラスコの口を閉じ、電子レンジを用いて加熱して agarose を溶解させた。

※細かい気泡が出なくなり、完全に透明になるまで加熱すること。

※急騰防止のため、様子を見ながら行うこと(目安:1 分毎に止めること)。

※加熱し過ぎて buffer が多量に蒸発した場合、ゲルの濃度が変わってしまうため 1x TAE buffer(from 50x)を適量加えること。

- ⑤ 完全に溶解させたアガロース溶液に Ethidium Bromide を 6 $\mu$ l 加えてよく振り混ぜた時、ゲルトレイに気泡が出来ないようにゆっくりと流し入れ、気泡が付着しないようにコームをセットした。

- ⑥ 10 分程度静置しゲルを固めた後、10x TAE buffer を DEPC 処理水で 10 倍に希釈して作製した 1x TAE buffer(from 10x)にてゲル表面を浸し、冷蔵庫に 10 分程度入れて完全に固めた。

#### <電気泳動>

- ① 水準器を用いて、地面に対して水平になるように調整した Wide Mini-Sub Cell® GT System の泳動槽に、1x TAE buffer(from 10x)を 600ml、Ethidium Bromide を 20 $\mu$ l 加えた。

- ② 完全に固まったゲルからコームを慎重に抜き取り、サンプル側が陰極となるように、ゲルトレイごと泳動槽に移し入れた。

※ゲル本体及び穴が崩れた場合は作り直すこと。

- ③ PARAFILM®を 20cm 程度切り出し、その上に Blue Juice™を 3 $\mu$ l ずつ滴下した。

※Blue Juice™はすぐに乾燥してしまうため、1 度に全サンプル分を滴下しない方がよい。

- ④ 123bp DNA Ladder(3 $\mu$ l)は、Blue Juice™(3 $\mu$ l)及び 1x TAE buffer(from 50x)(3 $\mu$ l)と混合し、ピペティング後にゲルの所定の穴に静かに流し込んだ。

- ⑤ 各 PCR product から 10 $\mu$ l ずつサンプルを採取し、Blue Juice™(3 $\mu$ l)に加えた後ピペティングを行い、ゲルの所定の穴に静かに流し込んだ。

- ⑥ Positive Control を 10 $\mu$ l 採取し、所定の位置の Blue Juice™(3 $\mu$ l)に加えた後ピペティングを行い、ゲルの所定の穴に静かに流し込んだ。

※混合後の溶液(13 $\mu$ l)は残さず吸い取り、流し込んだ。

⑦ 電流がゲル内をまっすぐに流れるようにゲルトレイの位置を調整した。

⑧ 電極を取り付け POWER PAC 300 に接続した後、80V 80mA 70 分の条件で泳動を開始した。

#### A-5-4. PCR 反応生成物の確認と定量化

##### <原理>

核酸は280nm付近の波長に吸収ピークがある。この核酸のUV光を吸収する性質は、対象となる2本鎖DNAの内部にEthidium Bromide分子をインターカレートすることで、PCR反応生成物の確認に応用することができる。すなわち、核酸(ここでは2本鎖DNA)に吸収された280nmのUV光がEthidium Bromide分子にエネルギー転移されると励起されて590nmの蛍光を放射する。Ethidium Bromide本来の吸収は300nmなので、この300nmの波長をあまり含まず、280nm付近の波長を豊富に含むUV光でEthidium Bromide染色を行ったゲルを照らすと、遊離したEthidium Bromide分子は励起されず、インターカレートした分子のみがDNAからのエネルギー転移により励起されて蛍光を発する。つまり、ゲル中で2本鎖DNAが存在する部分のみが光ということになる。この蛍光強度はインターカレートしたEthidium Bromide分子の個数に比例し、また、インターカレーションは2本鎖DNAの量(長さ×本数)に比例して起こるため、蛍光強度を測定することでゲル中のDNA量を推定することが可能になる。但し、測定する2本鎖DNAが全て十分量のEthidium Bromideと結合し、飽和していなければ、その定量は意味を成さないので注意しなくてはならない。

##### <内部標準>

内部標準とは、それぞれ検出したサンプル量を補正するために必要となる基準のことである。定量的PCR一般において一義的に明らかにされることは、反応系に加えたサンプルに含まれる目的DNAの相対量であり、絶対量ではない。その絶対量を知るためには、予め絶対量の分かっているDNAで標準サンプルを調整してPCRを行い、目的DNAと標準サンプルとの相対量を比較する必要がある。この標準となるものを内部標準という。本研究で用いたGAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)はhouse keeping geneの一種であり、組織によって発現量に差がないため、内部標準として用いることが出来る。また、GAPDH以外にも $\alpha$ -actinや $\beta$ -actinなども内部標準としてよく用いられる。

##### <注意点>

ここでもEthidium Bromide汚染の危険性があるため、その扱いには十分注意すること。また、PCR反応生成物の確認と定量化に特有の注意点として、以下の点に気を付

けること。

- ・ ゲルは崩れやすいため、無理な力を加えないこと。
- ・ ゲルをイメージアナライザーに付属のプレートに移す際は、隙間に気泡を入れないこと。
- ・ フロッピーディスクに画像データ(jpeg 形式)を記録する際は、自動的にファイル名が連番の番号のみとなるため、大量に撮影する場合には、どの画像がどの結果なのか確認できるようにしておくこと。

#### <使用機器・器具・試薬>

- ・ イメージアナライザー一式(TOYOBO/FAS-□)
- ・ Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™(Media Cybernetics® / 50N31000-11851)
- ・ パーソナルコンピュータ
- ・ フロッピーディスク(Windows®フォーマットのもの)
- ・ サランラップ

#### <PCR 反応生成物の確認>

- ① 電気泳動終了後、ゲルをイメージアナライザーに付属のプレートに移してセットした後、モニターに映ったゲルの位置、被写体の大きさを調整し、カメラのフォーカスを合わせた。
- ② UV トランスイルミネーターより UV 光を照射し、バンドの確認を行った。
- ③ 鮮明なバンドの確認が出来た場合、露光時間を変えて数パターンの写真を撮影し、付属のドライブよりフロッピーディスクに画像データ(jpeg 形式)を記録した。
- ④ Positive Control を含め、バンドが確認できなかった場合は、作製したゲルや電気泳動操作に問題があったと考え、もう一度やり直した。
- ⑤ 記録した画像データをパソコンに移し、画像解析ソフト Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™を用いてバンドの解析を行った。

#### <データの扱い・処理>

画像解析ソフト Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™を用いて以下の2点を解析する。なお、解析操作はソフトに付属の取扱説明書に従って行う。

- i) サイズマーカーと比較し、PCR 反応生成物の Size(bp)を解析する。
- ii) 各泳動レーン内の目的のバンドを選定し、バンドの輝度(max.OD)を測定する。得られた各データ値は内部標準のデータ値で除し、control を 1 として補正する。

## A-6. Collagen gel 中の拡散係数測定法

### <原理>

一般的な拡散係数は、水中における拡散係数が知られている。しかし、今回行った 3 次元細胞遊走実験では、コラーゲンゲル内を拡散させるため、コラーゲンゲル中での拡散係数が必要となってくる。そこで、シリコンチューブ内にコラーゲンゲルを形成させ、時間、距離を設定し、FITC-Dextran をコラーゲンゲル内に拡散させることで、拡散係数を求める方法を用いた。これにより作製されたグラフから、Fibronectin、Albumin などの、他の物質の拡散係数を逆算した。

### <実験器具・機器・試薬>

- ・ シリコンチューブ(アズワン株式会社/Cat.No.986903)
- ・ ガラスキャピラリー
- ・ 50ml 遠沈管(BIOLOGIX/Cat.No.BI10-9152)
- ・ 1.5ml アシストチューブ(アシスト/Cat.No.72-690S)
- ・ 1ml シリンジ
- ・ 18G 注射針(テルモ/NN-1838R)
- ・ インキュベーター
- ・ カッターナイフ
- ・ 定規
- ・ Cellmatrix Type I-A (新田ゼラチン/637-00653)
- ・ FITC-Dextran (4kDa 10kDa 70kDa)
- ・ Medium-199(Sigma/Cat.No.M2154)
- ・ 10 倍濃縮培地(M199 倍地) (新田ゼラチン/02-069-010)
- ・ NaHCO<sub>3</sub> (Wako/038-10531)
- ・ HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (Wako/340-01371)
- ・ 1NHCl (080-08065/Wako)

### <ガラスキャピラリーの作製>

- ① ガラスキャピラリーを 1.5cm ほどの大きさに切断した。
- ② バーナーで先端を炙り、先が丸くなってきたらバーナーから離れた。

※ガラスキャピラリーはすぐに熱くなるため、素手で触らないように、熱した後はピンセット等を用いて扱うこと。

<操作>

全て氷上操作

- ① 0.5mg/ml,1mg/ml,1.5mg/ml のコラーゲンゲルを作成した。(table.A-5-5)

Table.A-6-1 Collagen gel 作成(1.8ml 作成時)

(ml)	ゲル濃度 (mg/ml)			
	2.0	1.5	1.0	0.5
Cellmatrix I -A(μl)	1200	900	600	300
濃縮培地 199(μl)	150	112.5	75	37.5
緩衝溶液(μl)	150	112.5	75	37.5
M199 培地(μl)	300	675	1050	1425

- ② 1000rpm,2min 遠心分離を行い脱気した。
- ③ シリンジに注射針をつけ、針の先端にシリコンチューブを差し込み、コラーゲンゲルを吸引した。
- ④ 針に付けていない側の穴をガラスキャピラリーで塞ぎ、その後針からシリコンチューブを取り、別の穴を塞いだ。シリコンチューブを遠沈管に入れ 1000rpm,2min 遠心分離して脱気した。
- ⑤ 37℃,1h インキュベータに入れ、ゲル化させた。
- ⑥ デキストラン/PBS 溶液をそれぞれ作成した。(暗室)
- 70kDa :3000μg/ml → 2ml(3 本分)
- 10kDa :3000μg/ml → 2ml(本分)
- 4kDa :140μg/ml → 10ml(デキストラン微量のため)
- ⑦ 1.5ml アシストチューブに 500μl ずつ溶液をいれ、シリコンチューブの一端を浸した。
- ⑧ 96h デキストランを拡散させた。

<4 日後>

- ① Collagenase/PBS 溶液を作成(PBS45ml に対し、Collagenase20μl 入れる)し、1.5ml アシストチューブに 1ml ずつ入れておいた。また、ブランク用に PBS1ml を 1.5ml アシストチューブに 1ml 入れておいた。
- ② シリコンチューブを取り出し、PBS で洗浄、キムワイプで軽く拭いた。
- ③ シリコンチューブを 2mm ずつ等間隔に 5 つの断片に切断した。
- ※一番端の断片は、誤差が大きいため捨て、残りの 4 つを用いること。
- ④ 切断部分をアシストチューブに入れ、ボルテックスして 37℃で 30 分インキュベートした。

#### <蛍光強度測定>

- ① 蛍光顕微鏡のスイッチを左から順に入れた。
- ② 測定入力メニュー [4]を押して[入力]を押した。
- ③ [1]を押して[入力]を押した。
- ④ 再び[1]を押して[入力]を押した。
- ⑤ ブランクを測定するために、キュベットに PBS を入れ[蛍光]を押した。
- ⑥ 5 回以上脱イオン水で洗浄し、中の水を綿棒で拭いた。
- ⑦ 濃度の低いものから順に試料をピペッティングした後入れ、[蛍光]を押した。
- ⑧ 値をノートにメモした。
- ⑨ 測定終了後、電源を右から順に切った。

### A-7.3 次元細胞浸潤モデルの作成

#### A-7-1. Type I Collagen gel 溶液の作成

##### <使用機器・器具・試薬>

- ・ Millex-GV (MILLIPORE/Cat.No.SLGV025LS/孔径 0.22  $\mu\text{m}$ )
- ・ Strivex GS (MILLIPORE/Cat. No.SVGSB1010/孔径 0.22  $\mu\text{m}$ )
- ・ 15ml 遠心管 (住友ベークライト/MS-56150)
- ・ 50ml 遠心管 (住友ベークライト/MS-56500)
- ・ Cellmatrix Type I -A (新田ゼラチン/637-00653)
- ・ HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (Wako/340-01371)
- ・  $\text{NaHCO}_3$  (Wako/038-10531)
- ・ 1N $\text{NaOH}$ (196-05635/Wako)
- ・ 1N $\text{HCl}$  (080-08065/Wako)
- ・ 10 倍濃縮培地(M199 倍地) (新田ゼラチン/02-069-010)

##### <準備>

試薬 A.3.0mg/ml pH3.0 Cellmatrix Type I -A

試薬 B.10 倍濃縮培地

試薬 C.再構成用緩衝溶液

0.05N  $\text{NaOH}$  溶液 100ml に対して  $\text{NaHCO}_3$  2.2g、HEPES4.77g を溶解させ、0.22 $\mu\text{m}$  フィルターで濾過滅菌を行った。

※大量に貯蔵しておく、と、 $\text{NaHCO}_3$  から  $\text{CO}_2$  が抜けていくため、5ml ずつ分注

して密封保存しておく。

#### <操作>

しっかりと低温状態を保つため、全て氷上操作で行う。またゲル濃度によって各溶液の混合量が異なるため Table.A-6-1 に従うこと。

- ① A、B、C 液を 8:1:1 となるように 50ml 遠心管内で混合した。この際 A 液と B 液を混合した後にあわ立てないようによく攪拌し、さらに C 液を加えよく混ぜた。

※色を見ながら pH7.4 になるように、緩衝溶液の量で調節する。あるいは 1N HCl や NaOH で調節を行う。5 $\mu$ l 前後を加えながら微調整するとよい。

※あらかじめ pH7.3、7.4、7.5 の標識標本を水:10 倍濃縮培地:緩衝溶液が 8:1:1 となるようにして作っておくこと。

- ② M199 培地を加え、ゆっくりと振り混ぜた。

## A-7-2. Fibronectin in Type I Collagen gel または BSA in type I

### Collagen gel 溶液の作成

#### <使用機器・器具・試薬>

- ・ Millex-GV (MILLIPORE/Cat.No.SLGV025LS/孔径 0.22  $\mu$ m)
- ・ Strivex GS (MILLIPORE/Cat. No.SVGSB1010/孔径 0.22  $\mu$ m)
- ・ 15ml 遠心管 (住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56150)
- ・ 50ml 遠心管 (住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56500)
- ・ Cellmatrix Type I -A (新田ゼラチン/637-00653)
- ・ HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (Wako/340-01371)
- ・ NaHCO<sub>3</sub> (Wako/191-01305)
- ・ 1N NaOH (196-05635/Wako)
- ・ 1N HCl (080-08065/Wako)
- ・ 10 倍濃縮培地(M199 培地) (新田ゼラチン/02-069-010)
- ・ BSA (Wako/019-07494)
- ・ Fibronectin (三光純薬/341635)

※原液濃度 1g/ml  $\Rightarrow$  M199 培地で 50 $\mu$ g/ml に希釈して分注後、冷凍庫にて -20 $^{\circ}$ C で保存。解凍する際にはゲル化してしまうため振り混ぜないこと。

# <準備>

試薬 A.3.0mg/ml pH3.0 Cellmatrix Type I -A

試薬 B.10 倍濃縮培地

試薬 C.再構成用緩衝溶液

0.05N NaOH 溶液 100ml に対して NaHCO<sub>3</sub> 2.2g、HEPES4.77g を溶解させ、0.22μm フィルターで濾過滅菌を行った。

※大量に貯蔵しておく、NaHCO<sub>3</sub> から CO<sub>2</sub> が抜けていくため、5ml ずつ分注して密封保存しておく。

# <操作>

しっかりと低温状態を保つため、全て氷上操作で行う。またゲル濃度によって各溶液の混合量が異なるため Table.A-7-1 に従うこと。

- ① A、B、C 液を 8:1:1 となるように遠心管内で混合する。この際 A 液と B 液を混合した後にあわ立てないようによく攪拌し、さらに C 液を加えよく混ぜた。

※色を見ながら pH7.4 になるように、緩衝溶液の量で調節する。あるいは 1N HCl や NaOH で調節を行う。5μl 前後を加えながら微調整するとよい。

※あらかじめ pH7.3、7.4、7.5 の標識標本を水:10 倍濃縮培地:緩衝溶液が 8:1:1 となるようにして作っておくこと。

- ② FN または BSA 及び M199 培地を加え、攪拌した。

それぞれのゲル濃度の溶液を 1.8ml 作るとすると、それぞれの溶液の割合は以下の表のようになる。

TableA-7-1 FN 及び BSA in Type I collagen gel 作成

(μl)	ゲル濃度 (mg/ml)			
	2.0	1.5	1.0	0.5
Cellmatrix I -A	1200	900	600	300
濃縮培地 M199	150	112.5	75	37.5
緩衝溶液	150	112.5	75	37.5
M199 培地	300	315	690	1065
FN または BSA (μl)		360	360	360

※FN または BSA 有りの場合（ゲル作成時は FN 濃度 10μg/ml ⇒ 拡散後は 5μg/ml、BSA 濃度 7.5μg/ml ⇒ 1.5μg/ml）

### A-7-3. HPMC への TGF- $\beta$ 1 曝露による EMT の誘導

#### <使用機器・器具・試薬>

- ・ 6 穴プレート（住友ベークライト/NS80060）
- ・ TGF- $\beta$ 1（SIGMA/T7039-2-UG）
- ・ M199（SIGMA/F9423）
- ・ FBS（SIGMA/F9423）

#### <操作>

- ① 6 穴プレートに HPMC を播種し、subconfluent になるまで培養した。
- ② 0.1%FBS/M199 で 24 時間 growth arrest した。
- ③ 6 穴プレートの培地を吸引し、3 穴分に 10ng/ml TGF- $\beta$ 1/0.1%FBS/M199 を 2ml/well ずつ加え、48h 培養した。

### A-7-4. トランスウェルを用いた HPMC の間質への遊走モデルの作成

#### <使用機器・器具・試薬>

- ・ ミリセル PCF（膜孔 12 $\mu$ m）（MILLIPORE/PIXP 012 50）
- ・ 24 穴プレート（住友ベークライト/MS-80240）
- ・ APPENDIXA-5-1 で作成した混合用液
- ・ APPENDIXA-5-2 で作成した混合用液
- ・ M199（SIGMA/M2154）
- ・ FBS（SIGMA/F9423）
- ・ PBS（SIGMA/D8537）
- ・ TRYPSIN-EDTA SOLUTION（10x）（SIGMA/T4174）
- ・ 血球計算盤

#### <操作>

- ① あらかじめ膜を 300 $\mu$ l の M199 で浸しておいた。
- ② APPENDIXA-6-1 または APPENDIXA-7-2 で作成した 1.5mg/ml コラーゲンゲル 200 $\mu$ l を 24 穴プレート lower に加え、均一になるように整えた。  
※ピペットを押し切ると空気が入るため、ゲルに空気が入らないように注意する事。
- ③ 37℃で 30 分間インキュベートした。
- ④ ②で作成したゲル上に APPENDIXA-6-1 で作成した 0.5mg/ml コラーゲンゲル 200 $\mu$ l を積層し、均一になるように整えた。

- ⑤ ①の膜から培地を抜き取り、コラーゲンゲル上へ乗せた。  
※膜とゲルの間に空気が入らないように、ゆっくりと乗せる。
- ⑥ 0.1%FBS/M199 300μl を膜に加え、37℃でFNの拡散の場合は48hまたは72h、BSAの拡散の場合は16hまたは24h インキュベートした。
- ⑦ 膜から 0.1%FBS/M199 を抜き取り、10ng/ml TGF-β1/0.1%FBS/M199 を 300μl 加え、プレインキュベートした。また upper と lower 液面が同一になるように、lower のゲル上部に M199 を 100μl ほど加えて調節した。
- ⑧ APPENDIXA-7-3 で培養した 6 穴プレートから培地を吸引し、PBS を加え洗浄した。
- ⑨ 10%trypsin/PBS を 1ml 加え、細胞がはがれているか顕微鏡で確認した。
- ⑩ セルスクレイパーで細胞をはがし、3 穴分をまとめて 15ml 遠心管に移した。
- ⑪ 750rpm/5 分遠心分離を行った。
- ⑫ 上澄み液を吸い取り、1ml の 0.1%FBS/M199 を加え、細胞懸濁液を作成した。
- ⑬ 血球計算盤で細胞数をカウントし、1 穴当り細胞数が 5 万個となるように upper に播種後、軽くピペティングを行った。
- ⑭ 72h 培養した。

## A-7-5. 遊走細胞数の計測

### <使用機器・器具>

- ・ 攪拌遠心機 (LABINCO/2790001)
- ・ 血球計算盤
- ・ オリンパス倒立型顕微鏡 (OLYMPUS/CK2)
- ・ Collagenase S-1 (Wako/038-10531)
- ・ M199 (SIGMA/M2154)
- ・ PBS (SIGMA/D8537)
- ・ TRYPSIN-EDTA SOLUTION (10x) (SIGMA/T4174)
- ・ ディフ・クイック (シスメックス/16920)

### <操作>

#### I upper 側

- ① APPENDIXA-7-4 で培養したトランスウェルの upper から培地を吸い取り、15ml 遠心管に移した。
- ② 750rpm/5 分遠心分離を行った。
- ③ 上澄み液を吸い取り、70μl 程度の M199 を加え、細胞懸濁液を作成した。

※上澄み液の吸い取ったあとに残った液量によって、細胞懸濁液量が多少異なってしまうため、この際にピペットなどで全容液量を確認しておくこと。

- ④ 血球計算盤にて細胞数を計測した。

## II 膜上、膜下

- ① 膜上、膜下に 10%trypsin/PBS 溶液に浸し、10 分間インキュベートをした。
- ② プレートを手軽にゆすり、数回膜へピペッティングを行い、膜上、膜下の液をそれぞれ 15ml 遠心管に移した。
- ③ 750rpm/5 分遠心分離を行った。
- ④ 上澄み液を吸い取り、70 $\mu$ l 程度の M199 を加え、細胞懸濁液を作成した。  
※上澄み液の吸い取ったあとに残った液量によって、細胞懸濁液量が多少異なってしまうため、この際にピペットなどで全容液量を確認しておくこと。
- ⑤ 血球計算盤にて細胞数を測定した。

## III 膜内

- ① ディフクイック固定液に 5 回/秒浸した。
- ② ディフクイック染色液 I に 5 回/秒浸した。
- ③ ディフクイック染色液 II に 5 回/秒浸した。
- ④ CAMEDIA (200 倍) で染色された細胞数を数えた (10 視野)。  
※染色液に浸す時間及び回数は染色の度合いを見て、調節すること。

## IV gel

- ① lower 内 collagen gel をピペットチップでゆっくりとかき回し、細かい断片にわけた。
- ② Collagenase S-1 を 40 $\mu$ l (最終濃度が 0.02%となるように、すなわちゲル 1ml に対して 100 $\mu$ l) を加え、溶液が全体に浸透するように再びピペットチップでかき混ぜた。
- ③ 37°C で 30 分インキュベートした。
- ④ lower からピペットを用いて液を吸い、15ml 遠心管に移した。
- ⑤ 750rpm/5 分遠心分離を行った。
- ⑥ 上澄みを吸い取り、M199 1ml を加えて、軽く vortex をかけた。
- ⑦ 750rpm/5 分遠心分離を行った。  
※⑥、⑦の操作を 2、3 回繰り返し、細胞をしっかりと洗浄すること。
- ⑧ 上澄み液を吸い取り、M199 70 $\mu$ l 程度加え、細胞懸濁液を作成した。  
※上澄み液の吸い取ったあとに残った液量によって、細胞懸濁液量が多少異なってしまうため、この際にピペットなどで全容液量を確認しておくこと。

- ⑨ 血球計算盤にて細胞数を測定した。

## A-8. 細胞増殖試験

### <使用機器・器具・試薬>

- ・ 6 穴プレート（住友ベークライト/NS80060）
- ・ M199 培地（SIGMA/M2154）
- ・ FBS（SIGMA / F9423）
- ・ TGF- $\beta$ 1（SIGMA/T7039-2-UG）
- ・ FN（三光純薬/341635）
- ・ デジタルカメラ CAMEDIA C-3040 ZOOM
- ・ 位相差顕微鏡 CK2（OLYMPUS/CK2）

### <操作>

- ① 6 穴プレートに 10%FBS/M199 を 2ml ずつ加え、プレインキュベートした。
- ② 75cm<sup>2</sup> に confluent に培養した HPMC を継代作業し、細胞懸濁液を作成した。
- ③ 血球計算盤にて細胞数をカウントし、 $5 \times 10^4$  個/1 穴となるように 6 穴プレートに播種した。
- ④ 播種後 24h 培養し、細胞を接着させた。
- ⑤ 培地を吸引後、0.1%FBS/M199 を 2ml 加え 24h 培養し、Growth arrest を行った。
- ⑥ 培地を吸引し、以下の 4 種類の条件の培地をそれぞれ 2ml 加えた。
  - ・ 10%FBS/M199
  - ・ 0.1%FBS/M199
  - ・ 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1
  - ・ 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 + 10 $\mu$ g/ml FN
- ⑦ 位相差顕微鏡で確認しながら注射針を用いて、それぞれの条件のプレート底面に 3 箇所ずつ印（傷）をつけた。
- ⑧ 培養 0、24、48、72、96h ごとに印を付けた同一部位を、デジタルカメラにて撮影を行った。
- ⑨ 撮影した画像データから細胞数をカウントした。

## A-9. Fick の拡散方程式による濃度勾配予測

Fick の拡散方程式(1)を初期条件、境界条件を設定することで方程式を解く。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \dots\dots (1)$$

初期条件では、時間 0 である距離において、濃度は 0 であると設定した。  
つまり、

$$C_{(x,0)} = 0 \dots\dots (2)$$

また、境界条件では、次の二つを設定した。

(i)ある時間において、距離 0 の点では濃度は初期濃度のままである。

$$C_{(0,t)} = C_0 \dots\dots (3)$$

(ii)ある時間において、距離 $\infty$ の位置では、濃度は 0 である。

$$C_{(\infty,t)} = 0 \dots\dots (4)$$

これらの条件を用い、以下で方程式を解く。

(1)をラプラス変換することで、

$$\text{左辺} = SX - C_{(x,0)} \qquad \text{右辺} = D \frac{d^2 X}{dx^2}$$

初期条件(2)より、

$$SX = D \frac{d^2 X}{dx^2} \quad \text{よって、} \quad \frac{d^2 X}{dx^2} - \frac{S}{D} X = 0$$

この常微分方程式を解くと、

$$X_{(x,t)} = C_1 \exp\left(\sqrt{\frac{S}{D}}\right)x + C_2 \exp\left(-\sqrt{\frac{S}{D}}\right)x$$

ここで、 $C_1$ 、 $C_2$ は積分定数であるため、それらを境界条件(3),(4)を用いて求める。

$$X_{(0,S)} = C_1 + C_2 = C_{(0,S)} = C_0$$

$$X_{(\infty,t)} = C_1 \exp\left(\sqrt{\frac{S}{D}}\right) \times \infty + 0 = 0$$

これらより、

$$C_1 = 0 \qquad C_2 = C_0$$

よって、

$$X_{(x,t)} = C \exp\left(-\sqrt{\frac{S}{D}}\right) x \cdots \cdots (5)$$

(5)を(x,t)領域に逆変換する(MATHEMATICS OF DIFFUSION table2.2 参照)。

解は、

$$C_{(x,t)} = C_0 \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad \operatorname{erfc} = \text{error function}$$

となる。

この式に、時間(s)、距離(cm)、濃度、拡散係数(cm<sup>2</sup>/s)を代入することにより、何時間後にどれぐらいの濃度勾配が形成されているかをグラフ化することができる。

**error function** の表を以下に記した。

TableA-9-1 error function 表

x	erfc(x)	x	erfc(x)	x	erfc(x)	x	erfc(x)
0	1	0.55	0.436677	1.1	0.119795	2.1	0.002979
0.05	0.943628	0.6	0.396144	1.2	0.089686	2.2	0.001863
0.1	0.887537	0.65	0.357971	1.3	0.065992	2.3	0.001143
0.15	0.832004	0.7	0.322199	1.4	0.047715	2.4	0.000689
0.2	0.777297	0.75	0.288845	1.5	0.033895	2.5	0.000407
0.25	0.723674	0.8	0.257899	1.6	0.023652	2.6	0.000236
0.3	0.671373	0.85	0.229332	1.7	0.01621	2.7	0.000134
0.35	0.620618	0.9	0.203092	1.8	0.010909	2.8	7.5E-05
0.4	0.571608	0.95	0.179109	1.9	0.00721	2.9	4.11E-05
0.45	0.524518	1	0.157299	2	0.004678	3	2.21E-05
0.5	0.4795						

(MATHEMATICS OF DIFFUSION table2.1 参照)

## A-10. Western Blotting

### ◎目的

目的のタンパク質を電気泳動による分離と抗原抗体反応の組み合わせで高感度に検出し、定量する方法

### ◎操作の流れ

1. 細胞からタンパク質の抽出  
↓
2. タンパク質の定量(BCA 法)  
↓
3. SDS-PAGE    \* 電気泳動で分子量ごとに分離させる  
↓
4. ウェスタンブロッティング    \* ゲル中のタンパクを膜に転写させる  
↓
5. 一次抗体    \* 目的のタンパク質を特異的に認識させる  
↓
6. 二次抗体  
↓
7. バンドの定量

### ◎測定の方法

#### ・BCA 法

蛋白はアルカリ溶液中で2価の銅イオンに作用し、1価の銅を生成させます。この1価の銅イオンが2分子の BCA (Bicinchoninic Acid) 分子と錯体を形成し紫紅色を発します。その際の吸光度を測定することでタンパク質濃度を求める

#### ・SDS-PAGE

SDS は水溶性タンパク質 1g 当たり約 1.4g 結合して SDS-タンパク質複合体を形成します。タンパク質分子自身が持つ電荷は SDS との結合によってほとんど打ち消されている。また、還元剤である 2-メルカプトエタノールによってタンパク質の S-S 結合 (ジスルフィド結合) が切断され、SDS が結合したタンパク質の形状はほぼ直鎖状になっているため、タンパク質分子の本来の形状は移動速度に影響を及ぼさない。これらのことから、ゲル内でのタンパク質の移動のしやすさは分子の大きさとそれに比例した負電荷の量にのみ左右され、分子量に従って分離することができる。

### A-10-1. 細胞からのタンパク抽出

〔使用器具・試薬〕

・タンパク抽出液、PBS(冷やした物)、phosphatase inhibitor、proteinase inhibitor、セルスクレーパー、遠心分離機

〔操作〕

- ① 培地を吸引し、冷やした PBS で洗浄する。
- ② タンパク抽出液を 300 $\mu$ l 加えて、そこに phosphatase inhibitor、proteinase inhibitor をそれぞれ 1 $\mu$ l 加えて、10 分間振盪する。
- ③ セルスクレーパーで細胞をしっかりと剥がし、1.5ml のアシストチューブに溶液を移す。
- ④ 4℃の遠心分離機で 15000rpm、30min 遠心分離する。
- ⑤ 上澄み溶液だけをできる限り取り出し、500ml のアシストチューブに移し替える。
- ⑥ -80℃の冷凍庫に保存する。(保存前に BCA 法を行っても良い)

※

保存の際には、用いた細胞、実験条件、実験日などをシールに記載し、はっておくと良い

### A-10-2. タンパク質の定量(BCA 法)

〔使用器具・試薬〕

・Spectrophotometer (SmartSpec<sup>TM</sup>Plus, BIO-RAD)  
・ビシンコニン酸、酒石酸ナトリウム、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaOH、NaHCO<sub>3</sub>、硫酸銅(Ⅱ)5 水和物

〔操作〕

- ① A 溶液、B 溶液をそれぞれ作製する。

#### ・A 溶液 (数ヶ月室温保存)

ビシンコニン酸	1g	} 100ml にメスアップ後 NaOH を加え、 pH11.25 にする。
酒石酸ナトリウム	0.16g	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2g	
NaOH	0.4g	
NaHCO <sub>3</sub>	0.95g	
DW	適量	

#### ・B 溶液 (室温保存)

CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	4g
DW	100ml

② スタンダード(1mg/ml BSA)を作製し、下表のように加える。

1mg/ml BSA ( $\mu$ l)	DW ( $\mu$ l)	試験管1本当り のBSA量 ( $\mu$ l)
<b>0</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
<b>2</b>	<b>8</b>	<b>2</b>
<b>4</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
<b>8</b>	<b>2</b>	<b>8</b>
<b>10</b>	<b>0</b>	<b>10</b>

③ A 溶液と B 溶液を 50:1 で混合する。

④ サンプルとスタンダードをそれぞれ 10 $\mu$ l ずつアシストチューブにとり(各サンプル 2 本ずつ)、(3)で作製した溶液を 100 $\mu$  ずつ加える。

⑤ ボルテックスで攪拌する。

⑥ 37℃、30 分で静置する。

⑦ OD<sub>562</sub>を測定する。

⑧ タンパク質濃度を横軸、吸光度を縦軸にとり、検量線を作り、総タンパク質量を測定する。

**\* Spectrophotometer (SmartSpec™Plus, BIO-RAD) 操作方法**

1. 電源を入れる

2.  $\lambda$ を押す

3. enter を押す (波長の読み取り 1)

4. 波長を 562nm に設定する

5. enter を押す (バックグラウンド読み取りをひきますか No)

6. select → enter を押す (繰り返して読むサンプルはありますか YES)

7. enter を押す (試料の反復番号 3)

8.セルに Blank(A 液+B 液)を 100 $\mu$ l 入れ、Read Blank を押す

9. →を押す

10. 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄し、脱イオン水を取り除く

11. セルに試料を入れ、Read Sample を3回押す

12. 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄し、脱イオン水を取り除く

13. 10～11 を繰り返す

### A-10-3. SDS-PAGE による蛋白質の分離

#### [使用器具・試薬]

- ・ゲル板(前面ガラス板、ミミ付ガラス板)、シリコンガスケット、プラスチック製クリップ、コーム、電気泳動槽(AE-6410 型, ATTO)、電源装置(クロスパワー500, ATTO)
- ・Tris(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、HCl、アクリルアミド(Wako)、Bis (N,N'-メチレンビスアクリルアミド)(Wako)、APS(過硫酸アンモニウム)、グリシン、BPB(ブロムフェノールブルー)、2-メルカプトエタノール、グリセロール、TEMED(N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン)、分子量マーカー(HMW SDS Marker Kit, Amersham)、MagicMark XP ウェスタンプロテインスタンダード(Invitrogen)

#### [操作]

##### 1) 電気泳動用試薬の調製

##### ・1.5M Tris-HCl (pH8.8), 0.4% SDS

Tris 54.5g、SDS 1.2g を脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 17ml)を加えて pH8.8 に合わせ、脱イオン水で 300ml にメスアップする。

##### ・0.5M Tris-HCl (pH6.8), 0.4% SDS

Tris 6.0g、SDS 0.4g を脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 9ml)を加えて pH6.8 に合わせ、脱イオン水で 100ml にメスアップする。

##### ・30%アクリルアミド溶液

アクリルアミド 58g、Bis 2.0g を脱イオン水に溶かし、脱イオン水で 200ml にメスアップする。

##### ・0.4% SDS

SDS 0.2g に脱イオン水 50ml を加えて溶解する。

##### ・10%APS

APS 0.1g に脱イオン水 1ml を加えて溶解する。

##### ・泳動バッファー

Tris 3.0g、グリシン 14.4g を脱イオン水に溶かし、脱イオン水で 1000ml にメスアップする。その後、SDS 1.0g を加え、溶解させる。

##### ・サンプルバッファー

0.5M Tris-HCl (pH6.8) 2ml、0.4% SDS 4ml、2-メルカプトエタノール 1.2ml、グリセロール 2ml、脱イオン水 0.8ml、0.1%BPB 数滴を混ぜる。

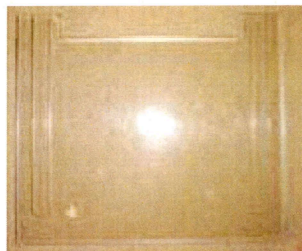


## 2) ゲル板の組み立て

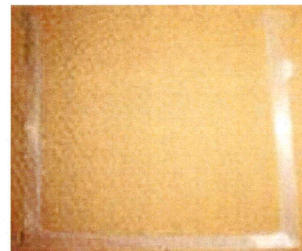
① 前面ガラス板とミミ付ガラス板、シリコンガasketをエタノールで拭く。



前面ガラス板



ミミ付ガラス板



シリコンガasket



コーム



クリップ

② ミミ付ガラス板にシリコンガasketをセットし、前面ガラス板をのせて、クリップでとめる。



③ コーム(comb)を差し込み、コームの下底から 5mm のところに目印を入れる。

### 3) running gel、stacking gel の作製

REAGENT	アクリルアミド濃度(%)				
	Runnning gel				Stacking gel
	5%	7.5%	10%	12.5%	4.5%
分画分子量範囲	30~200kDa	40~200kDa	20~130kDa	14~80kDa	—
30% アクリルアミド溶液	2.0ml	3.0ml	4.0ml	5.0ml	0.9ml
1.5M Tris- HCl(pH8.8), 0.4%SDS	3.0ml	3.0ml	3.0ml	3.0ml	—
0.5M Tris- HCl(pH6.8), 0.4%SDS	—	—	—	—	1.5ml
APS	120 $\mu$ l	120 $\mu$ l	120 $\mu$ l	120 $\mu$ l	60 $\mu$ l
TEMED	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l	6 $\mu$ l
脱イオン水	7.0ml	6.0ml	5.0ml	4.0ml	3.6ml
Total Volume	12.0ml	12.0ml	12.0ml	12.0ml	6.0ml

- \* 目的とするタンパク質の分子量に対応して、ゲル濃度を決定する。
- \* 表はゲル 1 枚分の量を示している。
- \* アクリルアミドのモノマーは神経毒であるので、試薬を扱う時は手袋、マスクを着用する。

- ① running gel 溶液、stacking gel 溶液を上表に従って作成する。(但し、TEMED はこの時点では加えない)
- ② running gel 溶液をアスピレーターで脱気する。(1~2 時間程度)
- ③ 脱気後、TEMED 12 $\mu$ l を加え、軽く混ぜる。
  - \* 微量なのでピペット操作は要注意。
- ④ 素早く、2)で準備したゲル板の目印のところまで running gel 溶液を入れる。
  - \* フラスコから直接注ぎ込む。
- ⑤ ピペットで脱イオン水をゲル液面上に重層する。
- ⑥ ゲル化するまで静置する。(1 時間程度)
  - \* アクリルアミドは 20℃以下では重合しにくいので、室温に注意。(特に冬期は注意)
  - \* ゲルと水の界面ができていればゲル化しているので、水を捨ててキムワイプで軽く拭く。
- ⑦ ゲル化させている間に stacking gel 溶液をアスピレーターで脱気する。
- ⑧ 脱気後、TEMED 6 $\mu$ l を加え、軽く混ぜる。

\* 微量なのでピペット操作は要注意。

⑨ 素早く、ミミ付ガラス板の切り欠きの少し下まで **stacking gel** 溶液を入れる。

⑩ コームを気泡が入らないように差し込み、1 時間静置してゲル化させる。

\* コームを両手で持ち、水平に差し込む。

#### 4) 各ウェルにローディングする試料溶液の調製

① 各ウェルに加えるタンパク量に相当する試料の体積を **BCA 法** により測定した濃度から算出する。

② ①で算出してタンパク量とサンプルバッファーを 1:1 で混合する。

③ ボルテックスで攪拌する。

④ 100℃の熱湯で 3 分間ボイルする。

⑤ ボルテックスで攪拌する。

#### 5) 電気泳動

① 電気泳動槽に底から(陽極側)泳動バッファーを入れる。

② ゲル化したらコームをそっと抜き取る。

③ クリップとシリコンガasketを外し、ゲル板を締め付け具に固定し、電気泳動槽に入れる。

④ ゲルの上部(陰極側)が十分に浸るぐらい電解槽液を入れる。

⑤ シリンジを用いて、ウェルを電解槽液で洗浄する。

⑥ サンプルをピペットでウェル内にゆっくり注入する。

\* ガラスにマジックでサンプル番号を書くと見やすい。

\* 分子量マーカ―はサンプルバッファーを加えずに、分子量マーカ―5 $\mu$ l 注入。

**Magic marker** は、最終的に発現物質の分子量を確認しなければならない時に 3 $\mu$ l 流す。

⑦ 電極端末を接続し電源を入れ、ゲル 1 枚のときは 15mA の定電流で、ゲル 2 枚のときは 30mA の定電流で泳動する。

\* **BPB** 線がゲル下端から 5mm の位置にくるまで泳動する。

#### A-10-4. ゲル(膜)の染色 (CBB 染色)

〔使用試薬〕

メタノール、酢酸、CBB-R250(クマシーブリリアントブルー)

〔操作〕

##### 1) 試薬の調製

・染色液 → 室温で保存&再使用

CBB-R250 2.5g、メタノール 500ml、酢酸 50ml、脱イオン水 450ml

・脱色液 → 室温で保存

メタノール 50ml、酢酸 70ml、脱イオン水 880ml

##### 2) 操作

1. 電気泳動の終わったゲルを染色液に入れる。
2. 室温で 15 分間振盪する。
3. 膜を染色する場合は、数十秒振盪する程度でよい。
4. 染色液をビンに戻し、脱色液を少量入れる。
5. 容器を軽く揺すり、染色液をすすぎ、脱色液を捨てる。
6. 脱色液をたっぷり入れて、キムワイプを 2,3 枚脱色液に浸けこむ。
7. 脱色の際にキムワイプを適宜交換することで、脱色を早くすることが出来る。
8. 室温で数時間～一晩振盪する。
9. 膜の場合は乾燥させることでバンドが確認できるため、冷風などで膜を乾燥させる。

### A-10-5. ゲルから膜への転写(Western blotting)

#### [使用器具・試薬]

- PVDF 膜(ポリフッ化ビニリデンメンブレン)、ブロッティング濾紙、ブロッティング装置
- Tris(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)、メタノール、6-アミノカプロン酸

#### [操作]

##### 1) 試薬の調製

##### •A 溶液(0.3%M Tris 5%メタノール溶液)

Tris 3.6342g を脱イオン水 50ml に溶かし、5ml のメタノールを加えて、最後に脱イオン水を加えて計 100ml とする。

##### •B 溶液(トランスファーバッファー )

まず、10xトランスファーバッファー(Tris:15.15g グリシン:72.05g SDS:0.5g を 500ml の脱イオン水に溶かす)を作成する。

その後、10xトランスファーバッファー:50ml + メタノール:100ml + 脱イオン水:350ml を混ぜる。

##### •C 溶液(25mM Tris 40mM 6-アミノカプロン酸 5%メタノール溶液)

Tris 0.3029g、40mM 6-アミノカプロン酸 0.5247g を脱イオン水 50ml に溶かし、5ml のメタノールを加えて、最後に脱イオン水を加えて計 100ml とする。

##### 2) Western blotting

- ① 電気泳動終了前に、PVDF 膜を running gel と同じ大きさに切り、メタノールに 30 秒ほど浸し、次に B 溶液に浸し 30 分ほど振盪させる。
- ② さらに、電気泳動終了前に、ブロッティング濾紙 6 枚を running gel と同じ大きさに切り、A 溶液に 2 枚、B 溶液に 1 枚、C 溶液に 3 枚浸す。
- ③ 電気泳動終了後、ガラス板の隙間にスパチュラを差し込み、この原理でガラス板をはがす
- ④ stacking gel を取り除き、running gel 部分のみにして、脱イオン水で軽く洗浄した後、B 溶液に 10 分間浸す。
- ⑤ 準備してあったブロッティング濾紙で、まず A 溶液に浸した濾紙 2 枚をブロッティング装置にのせる。さらに、B 溶液に浸した濾紙 1 枚、PVDF 膜、ゲル、C 溶液に浸した濾紙 3 枚の順に上へ重ねる。
- ⑥ グローブをはめ、手のひらで全体を押しつぶすように気泡を抜き、膜とゲルを密着させる。
- ⑦ 一番上の濾紙に C 溶液をかけ、陰極板をセットし、リード線をつなぐ。
- ⑧ ゲルの面積  $1\text{cm}^2$  あたり 2mA の定電流で約 40 分間ブロッティングする。
- ⑨ 膜を脱イオン水で軽く洗浄し、乾燥させる(overnight)。

## A-10-6. 抗体処理

### 〔使用試薬〕

・PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal(東洋紡)、PBS、TritonX-100、PBS 粉末、Immunoreaction Enhancer Solution1(東洋紡)

$\beta$ -actin の場合: Rabbit polyclonal to beta Actin、HRP-Goat anti-Rabbit IgG(H+L)

$\alpha$ -SMA の場合: Rabbit polyclonal to alpha smooth muscle actin、HRP-Goat anti-Rabbit IgG(H+L)

### 6-(1). 一次抗体

#### 〔操作〕

#### 1) 試薬の調製

・PBS

PBS 粉末を脱イオン水に溶解して全量を 1000ml にする。

・0.1%PBST

PBS 1ℓ に Triton1.0ml を加える。

・一次抗体

Immunoreaction Enhancer Solution1(東洋紡)1ml に一次抗体 1 $\mu$ l を加え 1000 倍希釈する。  
( $\alpha$ -SMA の場合は、Solution1 を 1ml に対して一次抗体 2 $\mu$ l を加える。)

#### 2) 操作

① PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal をサランラップに 3ml 置き(膜の大きさで量を調節)、タンパク面を溶液に浸してサランラップを包み、常温で 20 分ブロッキングする。

② PBST で 5 分洗浄を 3 回繰り返す。(室温)

③ サランラップにパラフィルムを乗せ、その上に一次抗体溶液を乗せ、タンパク面を溶液に浸してサランラップを包み、4℃で overnight。

※一次抗体を良く結合させたい場合は overnight。時間を短縮したい場合は、常温で 1 時間静置して、次の作業を開始する。(overnight を推奨)

### 6-(2). 二次抗体

#### 〔操作〕

#### 1) 試薬の調製

・二次抗体

Immunoreaction Enhancer Solution2(東洋紡)2ml に HRP 標識二次抗体(HRP-Goat anti-Rabbit IgG(H+L))を 1 $\mu$ l 加え、2000 倍希釈する。

•ECL

1 液と 2 液を必要量とる。測定直前に混ぜる。

\* アルミで遮光、氷上

\* 1 液と 2 液は等量混ぜ、 $0.125\text{ml}/\text{cm}^2$ を目安に ECL の量を決める。

2) 操作

① PBST で 5 分毎に3回洗浄。(バックグラウンドに影響するため、しっかりと洗浄すること)

② サランラップにパラフィルムをセットし、その上に二次抗体溶液を乗せてタンパク面を重ねるようにして PVDF 膜をのせ、室温下で 15 分静置させる。

\* 抗体溶液が移動しないように水平にセットする。

③ ①の操作を行う。

**A-10-7. バンドの定量**

[使用器具・試薬]

•ルミノイメージアナライザー(LAS-4000 mini EPUV,FUJIFILM)

•ECL (Enhanced ChemiLuminescence)

[操作]

① 洗浄した膜をラップ上にのせる。

② ECL の 1 液、2 液を混ぜ、膜上に添加する。

\* 3 分間静置させる。

③ 新しいラップ上に膜を移し、ラップで包み込む。

\*しわがつかないように包む

④光にさらさないように箱に入れて、ルミノイメージアナライザーの場所へ行く。

[ルミノイメージアナライザーの操作方法]

※予約表と使用表に名前などを記載すること(ルミノイメージアナライザーの横のファイルに紙が入っている)

① 装置の電源と、コンピュータの電源を付ける。

② ルミノイメージアナライザーのアイコンを選択し、装置が $-25^{\circ}\text{C}$ に設定されるまで待機。

③ 膜をセットする。

※分子量マーカーが真っ直ぐ縦になるように膜をセットすると定量化の際便利

④ Method/Tray position を選択し、Chemiluminescence、EPI にチェックが入っていることを確認する。

⑤ Tray position を、選択したポジションの番号にチェックを入れ、OK を押す。

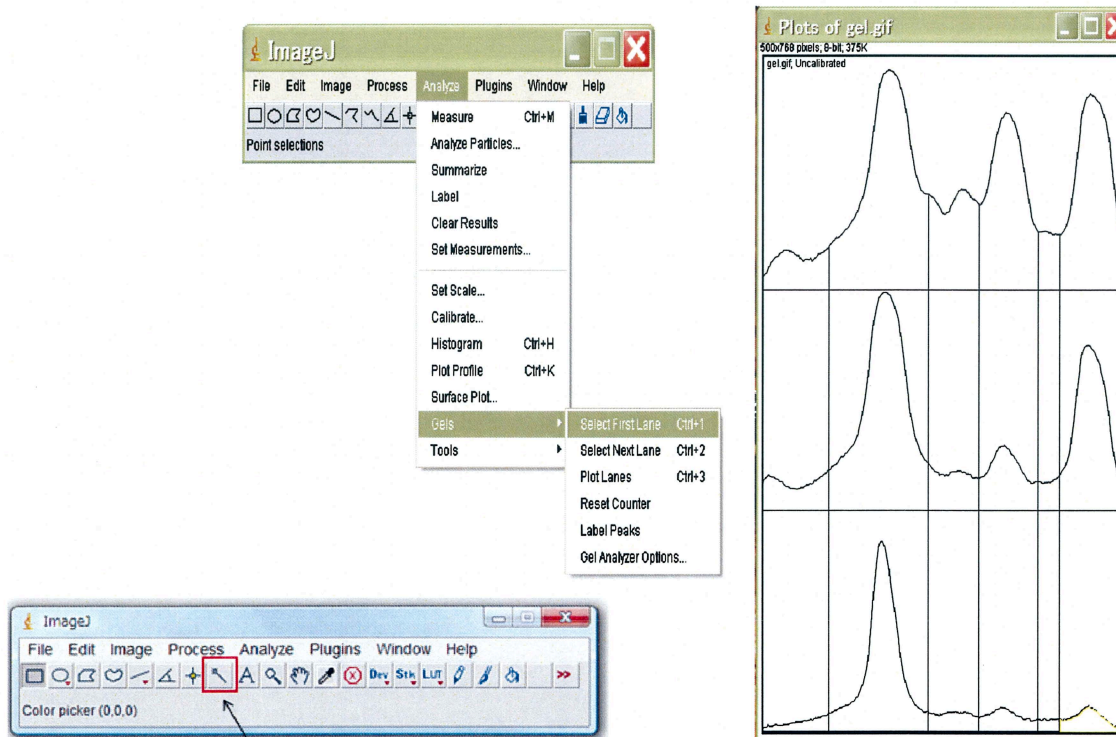
⑥ Focusing を選択し、明るさや焦点を合わせる。

- ⑦ Exposure Type を Precision あるいは Increment を選択。  
 Precision: 光を指定時間照射し、1 枚だけ写真を撮影する  
 Increment: 指定時間毎に写真を撮影し、画像を積み重ねていく
- ⑧ 時間を指定し、Start を押す。
- ⑨ 画像を保存する際、1 枚目から最後の画像までを保存するように指定し、Next を押し、保存先を指定した後に 8bit Tiff file に保存方法を変更して保存する。
- ⑩ USB に画像を入れて持ち帰る。

### \* Image J による定量方法

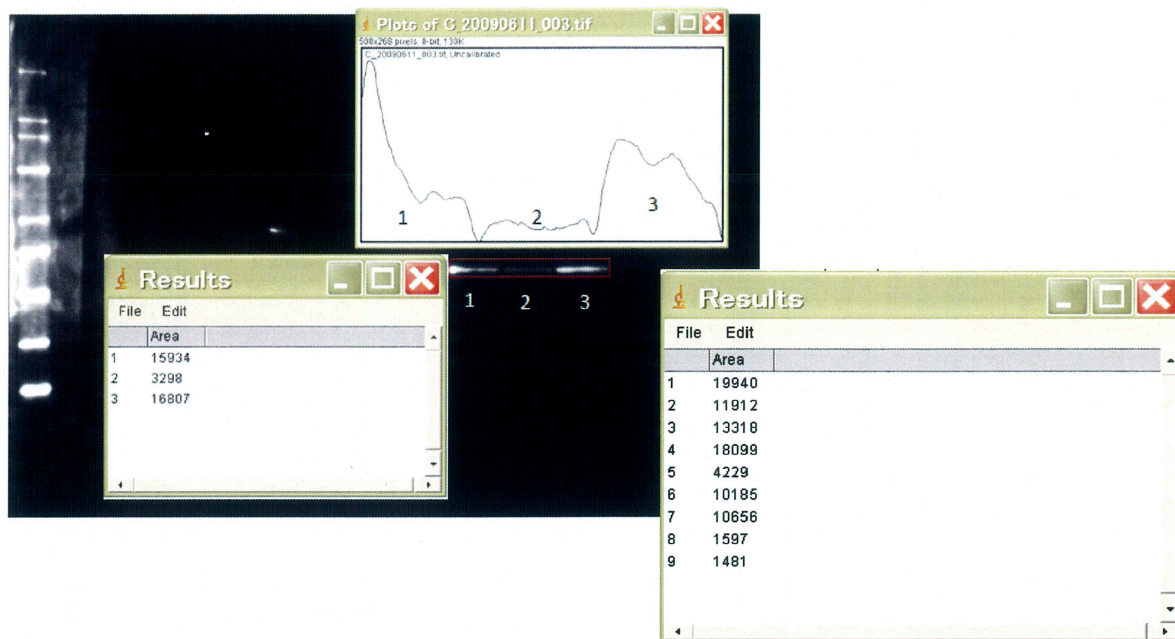
<使用方法>

- ① 四角くレーンを選択する(できるだけ小さく囲う)
- ② Analyze ⇒ Gels ⇒ Select First Lane を選択
- ③ Analyze ⇒ Gels ⇒ Select Second Lane を選択し、次のレーンを選択
- ④ 測定したいレーンを②を繰り返す
- ⑤ Analyze ⇒ Plot Lane を選択
- ⑥ グラフ化されて表示される
- ⑦ 調べたい部分の面積をクリックすることで面積が表示される
- ⑧ コントロールを 1 として比でグラフ化を行う



このボタンを押して、知りたい面積部分をクリック

## 結果例



## A-11. MTT 試験

### [原理]

MTT[3-(4,5-dimethylthiazo-2,5-diphenyltetrazoliumbromide); $C_{18}H_{16}N_5SBr$ (分子量 414.3)]等のテトラゾリウム塩はミトコンドリアの酸化的リン酸化反応である TCA 回路の脱水素酵素(コハク酸脱水素酵素)の基質である。ミトコンドリアは、真核細胞の細胞質中に見られる小器官であり、酸化的リン酸化反応によるエネルギー産出の場として重要な役割を担っている。活発に活動・増殖する細胞はエネルギー産出量が多くなる。細胞が活発であれば、細胞がより多く分裂するために酵素活性が高くなり、MTT を多く分解する。MTT は分解されると青紫色のホルマゼンに変化するので、吸光度を測定すれば生存細胞数や細胞への毒性傷害効果を定量することができる。本実験においては、播種細胞数をほぼ一定の条件にし、常に異なる培地で細胞培養を行ったので、MTT 法によって得られた値は細胞活性を示すものとする。

### [使用装置・器具・試薬]

- ・  $CO_2$  インキュベーター (池本理化工業株式会社)
- ・ 浸透機 (MICROTUBE MIXER) (TAITEC)
- ・ Microplate Reader Model 550 (BIO-RAD)
- ・ 96 穴プレート (Cat. No. MS-8096F/SUMILON)
- ・ オートクレーブ滅菌済みクリーンベンチ内器具
- ・ 各種ピペットおよびチップ

- ・ パスツール
- ・ 吸引ポンプ
- ・ エルマ血球計算盤 (Erma)
- ・ Cell Proliferation Kit I (MTT) (Cat. No. 1 465 007/Roche)
  - 1 液 (MTT labeling reagent)
  - 2 液 (Solubilization buffer)

[操作]

- 1) 96 穴プレートへの播種 ※周りの 36 穴は利用しないこととする
  - ① 10%FBS/M199 を 37°C/5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 100μl プレインキュベートした。
  - ② HPMC を 5×10<sup>3</sup> 個/well 播種する。
  - ③ 37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養する。
- 2) 試験
  - ① 実験条件に合わせて TGF-β1, RGDS を細胞に曝露する。
  - ② 実験条件が整い次第、MTT 1 液(MTT labeling reagent)を 10 μl/well 添加する。
  - ③ 37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間培養する。
  - ④ MTT 2(Solubilization buffer)液を 100 μl/well 添加し、10 分間振動させる。
  - ⑤ 37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で overnight 静置する。
  - ⑥ Microplate Reader を用いて、測定波長 550 nm の吸光度を測定する。

## B-1. 滅菌について

### <高圧蒸気滅菌>

高圧蒸気滅菌(オートクレーブ)は、滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶、ケースなどに入れ、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて行う。滅菌後は 50 度のオーブンに入れ、乾燥・保管する。

液体の高圧蒸気滅菌は専用の耐圧ビンに入れて行う。但し、液体は全体が均一な温度(121℃)になるまで時間が掛かるため、通常の器具滅菌の場合よりも 1L あたり 20 分程余分に行う。

### <乾熱滅菌>

乾熱滅菌も滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶に入れて行う。ピペットの場合は吸入口に専用の綿を詰め、滅菌缶に入れて滅菌する。その他のガラス器具などは口にアルミホイルで蓋をし、そのまま滅菌する。乾熱滅菌の温度と時間は以下の通り (Table.B-2-1)。

一般的な滅菌	RNase free にするための滅菌
160~170℃/2~4h もしくは 180~200℃/0.5~1h	180℃/8h 以上(Over Night) もしくは 250℃/0.5h 以上

Table.B-2-1 乾熱滅菌

- ※ 乾熱滅菌は冷めるまでが滅菌なので、必ず冷めるまで待つこと。
- ※ 高圧蒸気滅菌と乾熱滅菌のいずれの場合も、必ず滅菌対象の材質・耐熱温度を確認すること。機器の損傷の恐れもある。

### <ガス滅菌>

高温耐性のない器具を滅菌する際に使用する。滅菌対象物とガスのバイアル瓶を専用の袋に入れて、密封後のガスのバイアル瓶を折り、ガスを充満させる。このガスは人体にも有害であるため、作業は必ずドラフト内で行い、開始後 2 週間程度ドラフト内に放置する。

### <UV 殺菌>

クリーンベンチは使用後に必ず UV 滅菌灯を点灯し、ベンチ内を殺菌した。その際、ベンチ内のプラスチック製品は全てアルミホイルで巻くこと。

<主要器具の滅菌方法>

○クリーンベンチ内器具一式

- ・ ピンセット×1
- ・ 50ml、100ml ビーカー×各 1
- ・ シャーレ×2

① ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスした。

② 滅菌缶に器具を詰め、滅菌テープで封印し 121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

○手術器具一式

- ・ ピンセット(拘つき) ×1、(拘無し)×3~4
- ・ ハサミ(直、先丸)×各 1
- ・ 鉗子×1
- ・ 滅菌糸(20cm 程度のもの)×20

専用の金属トレイに器具を詰め、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

○チップ、Reaction Tube with Cap(PCR 専用チューブ)

専用のケース、金属缶に詰め、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。詰める作業は必ず手袋を着用して行った。

○10ml ピペット、パスツールピペット

①20 倍希釈の無リン洗剤に約 24 時間浸漬後、約 24 時間水洗いした(浸漬液は 2 ヶ月毎に交換した)。

②水気を取り、10ml ピペットは吸入口に綿栓をし、滅菌缶につめた。パスツールピペットは綿栓をせずに 3 本毎にアルミホイルで巻いて滅菌缶につめた。

③180℃で 4 時間乾熱滅菌した。

○ゲル作製用三角フラスコ、メスシリンダー

①ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスした。

②乾燥後、口に 7cm 四方程度のアルミホイルで蓋をした。

③そのまま 180 度/Over Night にて乾熱滅菌を行った。

## B-2. Primer 表

本研究にて使用した Primer の詳細を以下に示す。

Primer	Sequence		Cycles	Size(bp)
GAPDH	sense	5'-CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC-3'	29	322
	antisense	5'-GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT-3'		
Snail	sense	5'-TCA GAC GAG GAC AGT GGG AAA G-3'	38	487
	antisense	5'-TAG GAC CAG AGG TTG TFT TTF C-3'		
E-cadherin	sense	5'-TCC CAT CAG CTG CCC AGA AAA-3'	36	500
	antisense	5'-TGA CTC CTC TGT TCC TGT TA-3'		

※Primer の作製は Invitrogen 株式会社に外注した。

## B-3. RT/PCR プログラム

本研究に使用した RT 及び PCR program の詳細を以下に示す。

<RT program>

Program	Step	Temp/Time
RT program 01	1	95.0°C/5 min
	Hold	4.0°C/∞
RT program 02	1	20.0°C/20 min
	2	42.0°C/40 min
	3	95.0°C/5 min
	Hold	4.0°C/∞

<PCR program>

Primer	Cycles	Step	Pre-PCR	PCR-cycles	Post-PCR
GAPDH	29	denature	94.0°C/5 min	94.0°C/30 sec	94.0°C/40 sec
		annealing	60.0°C/1 min	60.0°C/1 min	60.0°C/10 min
		extension	72.0°C/1 min	72.0°C/1.5 min	—
		Hold	—	—	4.0°C/∞
Snail	38	denature	95.0°C/3 min	94.0°C/1 min	—
		annealing	—	55.0°C/ 1 min	—
		extension	—	72.0°C/1 min	72.0°C/10 min
		Hold	—	—	4.0°C/∞
E-cadherin	36	denature	95.0°C/3 min	94.0°C/1 min	—
		annealing	—	55.0°C/1min	—
		extension	—	72.0°C/1 min	72.0/ 10 min
		Hold	—	—	4.0°C/∞

※ 出展は Primer と同様(B-4.Primer List 参照)。

## B-4. 本研究で使用した試薬について

### <FBS の不活化・分注・保存>

- ① -20℃にて凍結保存されている FBS(500ml)を 37℃のウォーターバスに浸け、振り混ぜながら溶かした。
- ② 完全に溶かし終えたら、数回振り混ぜた。
- ③ 55~56℃のウォーターバスで 30 分加熱した。
- ④ STERICUP™にてフィルター滅菌し、30ml アシストチューブに 20~25ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。
- ⑤ -20℃の冷凍庫にて保存した。

※分注後初めて解凍、使用する場合は、必ず Vortex にかけること。

### <ITS>

ITS(粉末状)の瓶に DEPC 処理水 50ml を入れ、攪拌、溶解させたものを分注した。

### <HC>

HC の粉末 2mg を量り取り、無水 EtOH と DEPC 処理水をそれぞれ 1ml ずつ加えて溶解させたものを MILLEX®GP にて濾過、分注した。

#### <DEPC 処理水の作製>

- ① Milli-Q 水を密閉できるガラス瓶(青蓋の 500ml メディウムビン)に入れた。
- ② 500ml の Milli-Q 水に対し DEPC を 500 $\mu$ l(0.1%)加えて、蓋をきっちり閉めてよく振り混ぜた。

※DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行うこと。

- ③ そのまま 37℃のオープン内に入れ、2 時間加温した。30 分に一度振り混ぜた。

※ 振り混ぜることによって瓶の蓋や首の部分、液体内に DEPC が均一に広がり、全体の RNase を失活させる。

- ④ 瓶の蓋を十分緩めて、121℃/40 分(1 分あたり 500ml の場合)高圧蒸気滅菌にかけた。

※高圧蒸気滅菌をすることにより DEPC を除去する。滅菌後にも DEPC の臭いが残っている場合は、もう一度高圧蒸気滅菌を行う。

※DEPC は発癌性であるため、むやみに蒸気を吸わないように気を付けること。また、滅菌装置内に溜まった水は、気化して抜けた DEPC が溶け込んでいるため、その排水は責任をもって処理すること(大量の水と共に排水口へ)。

#### <Random Primers、各 Primer について>

これらの Stock Solution(S.S)は粉末状の試薬に DEPC 処理水を適宜加えて作成した。詳細は添付の取扱説明書に従った。

#### <滅菌水の作製>

- ① 脱イオン水を密閉できるガラス瓶(赤蓋の 1L メディウムビン)に入れた。
- ② 蓋をきっちり閉めた後、滅菌テープで封印し、121℃/40 分にて高圧蒸気滅菌を行った。