

平成 22 年度 修士論文

肺線維芽細胞に対するエラスチンの分化誘導効果

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

石原 千明

目次

| | |
|--|-----------|
| 1 緒言 | 1 |
| 1-1 再生医療と組織工学 | 1 |
| 1-2 肺組織 | 2 |
| 1-2-1 気道と気管支 | |
| 1-2-2 肺胞実質系 | |
| 1-3 肺を構成する細胞と物質 | 4 |
| 1-3-1 肺胞に存在する細胞 | |
| 1-3-2 細胞外マトリックス | |
| 1-3-3 マトリックスメタロプロテアーゼ | |
| 1-4 肺疾患 | 10 |
| 1-4-1 慢性肺疾患と治療法 | |
| 1-4-2 肺疾患と細胞 | |
| 1-5 本研究の目的 | 12 |
| | |
| 2 方法 | 13 |
| 2-1 培養機材の作成 | 13 |
| 2-1-1 肺エラスチンの抽出 | |
| 2-1-2 肺エラスチンの分子量測定 | |
| 2-1-3 ECM 溶液と ECM コーティングシャーレの作製 | |
| 2-2 細胞外マトリックスと動的刺激が細胞に与える影響 | 14 |
| 2-2-1 細胞の培養と継代 | |
| 2-2-2 ECM 添加培地による細胞培養 | |
| 2-2-3 ECM コーティング上での細胞培養 | |
| 2-2-4 細胞数のカウント | |
| 2-2-5 色素結合法を用いたコラーゲンの定量 | |
| 2-2-6 色素結合法を用いたエラスチンの定量 | |
| 2-2-7 免疫蛍光染色を用いた細胞表面の ECM 蓄積の観察 | |
| 2-2-8 BCA 法によるタンパク質の定量 | |
| 2-2-9 ゼラチンザイモグラフィを用いた細胞の MMP 活性 | |
| 2-3 統計分析 | 15 |

| | | |
|------------|----------------------------------|-----------|
| 3 | 結果 | 16 |
| 3-1 | 肺エラスチンの抽出 | 16 |
| 3-1-1 | 不溶性肺エラスチン | |
| 3-1-2 | 水溶性肺エラスチン | |
| 3-1-3 | 肺エラスチンの分子量測定 | |
| 3-1-4 | 線維芽細胞の肺エラスチンへの接着・伸展観察 | |
| 3-2 | 細胞外マトリックスによる細胞応答 | 18 |
| 3-2-1 | 培地中の ECM 産生量 | |
| 3-2-2 | 細胞が産生する MMP の活性 | |
| 3-2-3 | 細胞表面の ECM 蓄積 | |
| 4 | 考察 | 27 |
| 4-1 | 肺エラスチンの構造 | 27 |
| 4-2 | 肺エラスチンが細胞の ECM 産生に与える影響 | 29 |
| 4-3 | エラスチンの構造の違いにおける細胞への影響 | 31 |
| 4-4 | 添加とコーティングでの細胞応答の差 | 32 |
| 4-5 | VGVAPG ペプチドと細胞活性 | 34 |
| 4-6 | Collagen 添加とその他の条件における MMP 活性の違い | 34 |
| 4-7 | ECM 産生、線維化と MMP の関連性 | 36 |
| 4-8 | 動的刺激が細胞に与える影響 | 37 |
| 5 | 結論 | 39 |
| 6 | 参考文献 | 40 |
| 7 | 謝辞 | 43 |
| 8 | 付録 | 44 |

1. 緒言

1-1 再生医療と組織工学

完全に人体になじまない人工臓器を用いた再建外科医療や、臓器の慢性不足と免疫拒絶抑制剤による副作用などに問題のある移植医療を補うために開発されたのが再生医療である。再生医療は細胞の増殖・分化ポテンシャルを活用し、生体本来の自然治癒力を最大限に発揮させ、欠損した生体組織を再生させる。

再生医療には二種類のアプローチがある。ひとつは細胞移植である。細胞にはさまざまな種類が存在するが、再生医療では主に未分化細胞である幹細胞が用いられている。この細胞は分化する事によりあらゆる組織を形成する可能性を有する多能性細胞であり、このような細胞を組織の欠損部に移植することで移植した部位特有の再生が試みられている。

もうひとつは組織工学である。組織工学は細胞移植では修復できない組織の大きな損傷の場合に用いられる。組織工学は大きく3つの要素に分けられる(図 1-1)。生体組織再生のため“細胞”、細胞の増殖・分化や形態形成を促進させる“足場材料”、細胞の機能を向上させる“サイトカイン”に分けられる。

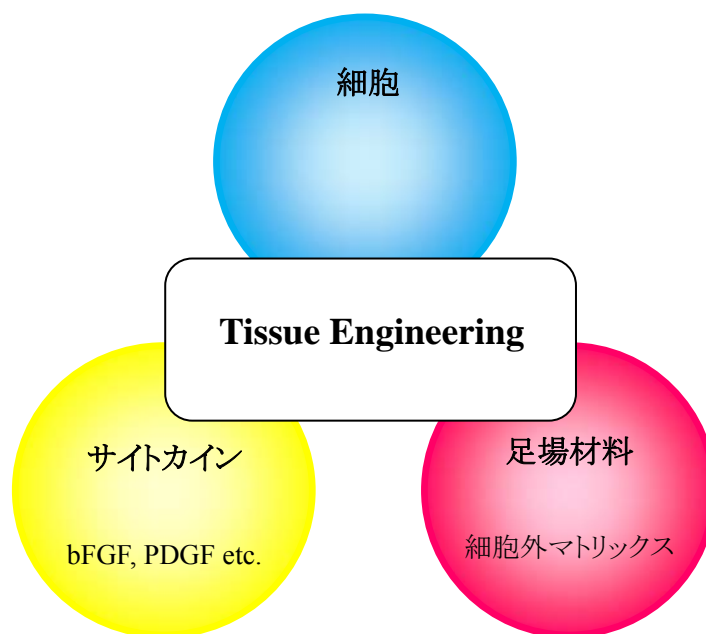


図 1-1 組織工学の3要素

これら3つを巧みに組み合わせ利用することによって自己組織誘導が可能となるという考え方から組織工学は成立している。足場材料は移植先に対して毒性が無く生体適合性がある事が重要であるが、現在ではそれだけではなく同様な機能や力

学的な適合性を有する事が必要とされている。その為に目的とする組織の機能・構造を把握することが重要となる。現在でも生体組織の機能・構造には不明瞭な部分が多く残されており、これらを解明していくことが重要な課題であると考えられる。

1-2 肺組織

ヒトが生きるためには体内に酸素を取り込み、二酸化炭素を排出しなければならない。この働き(呼吸)を行う器官が肺である。呼吸は肋間筋や横隔膜が動くことで空気を取り入れ、自身の弾性によって縮むことで空気を吐き出す。この時、空気の流通路となるものが気道と気管支であり、ガス交換を行うものが肺泡実質系である。

1-2-1 気道と気管支

肺の気道系は気管から気管支、細気管支、終末細気管支へと分岐していく(図1-2)。気管から肺泡へと枝分かれするごとに構成細胞・物質が変化していく。

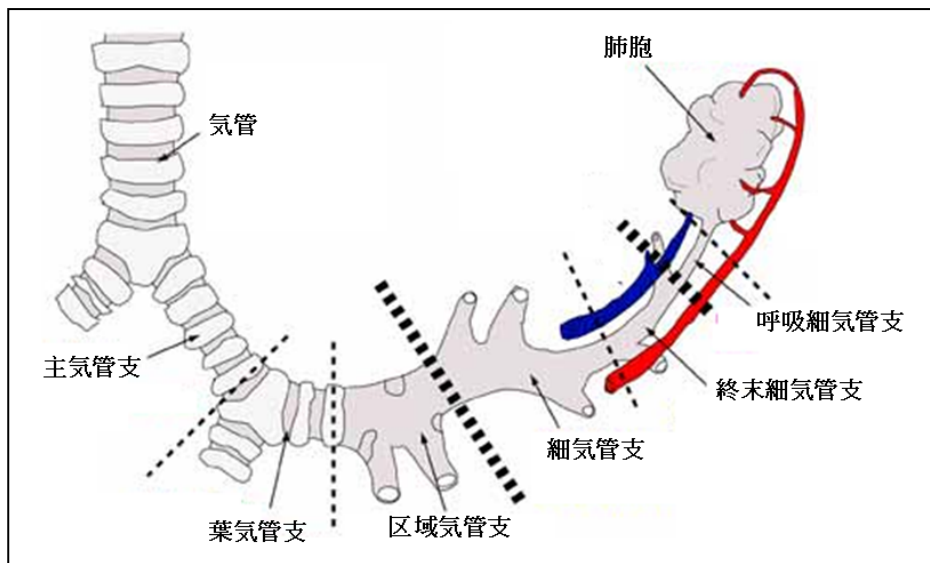


図 1-2 気管から肺泡までの部位⁽¹⁾

気管壁は平滑筋が気道の腹側面を横走し、C の字形をした軟骨部の末端付近に付着して形成されている(図 1-3)。この気道の構造は壁の支持組織としての気管支軟骨が減少するに従い、それを補うように平滑筋の割合が増加する。また、気道の内腔面は線毛細胞と杯細胞で覆われている。この線毛細胞によって気道内の分泌物や異物が口腔に移送排除されている。

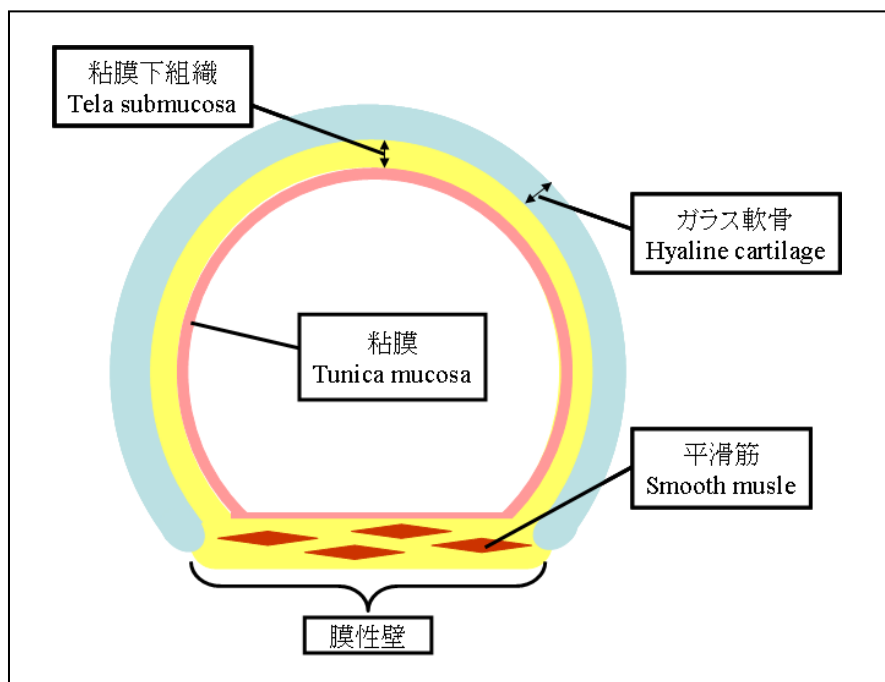


図 1-3 気管の横断面図

1-2-2 肺胞実質系

ガス交換という肺の主要な機能は肺胞実質系で行われる。肺胞実質系は肺胞管、肺胞嚢、肺胞から成り立つ(図 1-4)。

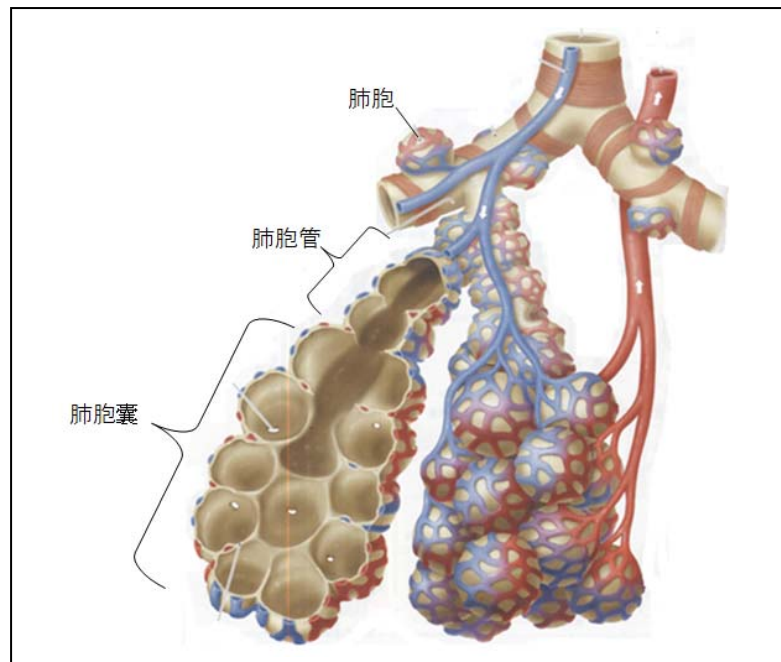


図 1-4 肺胞実質系の構造⁽²⁾

肺胞は上皮細胞が毛細血管・線維芽細胞・細胞外マトリックス (ECM) を挟むようにして存在する⁽³⁾。(図 1-5)

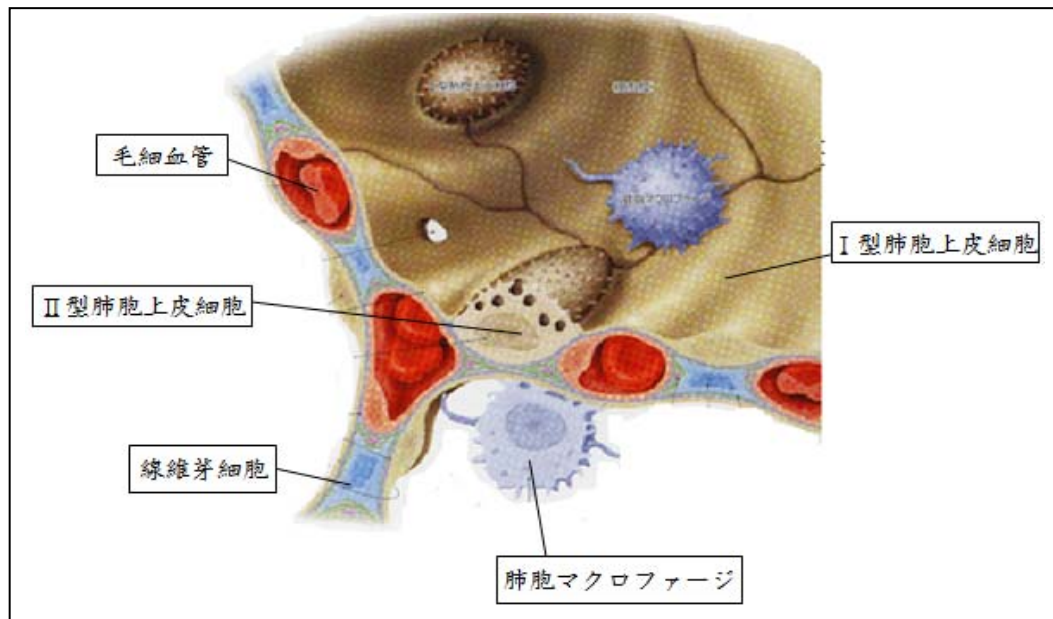


図 1-5 肺胞の構造⁽²⁾

1-3 肺に存在する細胞と物質

肺組織には約 40 種以上の細胞が存在し、臓器の構造や呼吸機能の維持を行っている。

1-3-1 気道に存在する細胞

線毛細胞

約 3～6 μm の長さの線毛を持ち、気道内の分泌物や異物を口腔に移送除去する⁽³⁾。

杯細胞

気管支に存在し、気管粘液を分泌することで湿度を保つ働きを持つ。

クララ細胞

細気管支から終末細気管支にかけて現れる細胞。サーファクタント(界面活性剤)の産生、除去や吸入された異物の有害作用の阻止を行うと考えられている。

1-3-2 肺胞に存在する細胞

I 型肺胞上皮細胞

肺胞表面の約 95%を覆い、薄層をなして肺胞腔と血管のガス交換が効率よくなされるような形状を示す。I 型肺胞上皮細胞、基底膜、血管内皮細胞によって酸素と二酸化酸素が通過する血液空気関門が構成される。

II 型肺胞上皮細胞

肺胞表面には肺胞の形態を保持するために表面活性物質が存在する。この表

面活性物質を産生する役割を持つ立方状の大型細胞である。

肺胞マクロファージ

肺胞内や気道内の細菌、異物などを貪食し排除する。また、活性酵素を産生する。肺胞内には若い小型のマクロファージが多く存在している。

線維芽細胞

肺胞の間質層に存在し、肺胞壁を構成する ECM やマトリックスメタプロテアーゼ(MMP)などを産生する。肺においては主に線維芽細胞が ECM 産生を行う。

1-3-2 細胞外マトリックス(ECM : Extracellular Matrix)

ヒトの体は主に4種類の組織(上皮組織、筋組織、神経組織、結合組織)に分類される。この中の結合組織は構造の保持を担うとされている。この結合組織は細胞外マトリックス(ECM: Extracellular Matrix)から構成される。この ECM にはコラーゲンやエラスチンなどがある。

コラーゲン

コラーゲンは、真皮、人体、腱、骨、軟骨などを構成するタンパク質の一つであり、生体を構成するタンパク質の中で最も多い。30 種以上のコラーゲンがあり、様々な結合組織に力学的な強度を与えるだけでなく、細胞の足場となりその増殖や機能の維持に役立っている。

コラーゲンのペプチド鎖を構成するアミノ酸はグリシンが全体の約 1/3 を占め、-Gly-X-Y-の繰り返し構造を持つペプチドからできている。また、分子量 100 kDa 程度の、1 本のペプチド鎖はトロポコラーゲンと呼ばれ、多くの型のコラーゲンは、トロポコラーゲンが3本集まり、直径 15 Å、長さ 3000 Å の細長い棒状構造となり⁽⁴⁾、三重らせん構造を形成している。

コラーゲンは臓器の構造を維持する骨組みのような成分であり、肺には I ~ VI 型コラーゲンが存在する。I, III, V, VI 型コラーゲンは主に肺胞の間質に存在し、線維芽細胞によって産生される⁽⁵⁾。IV, V 型は肺胞の基底膜に存在する。これらの型の異なるコラーゲンは構成ポリペプチド鎖の遺伝子情報が異なり、さらに組織中での局在も異なることから、それぞれの型のコラーゲンが特異的な生物学的機能を有すると考えられる。

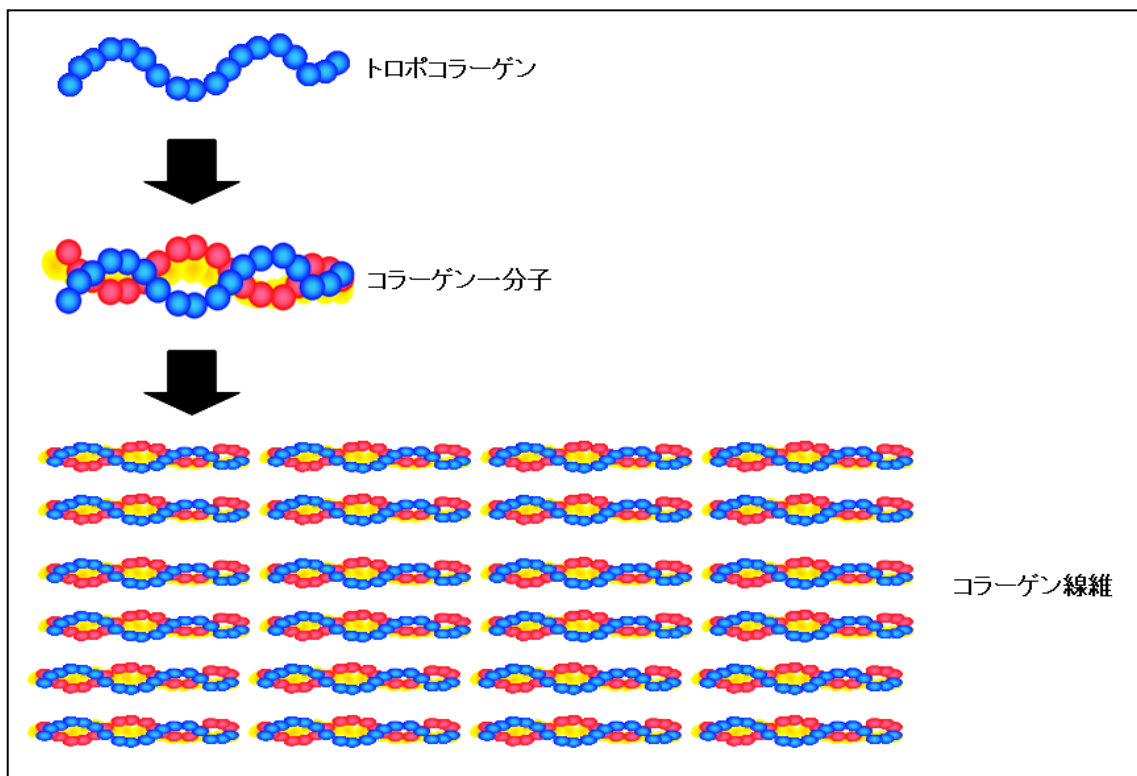


図 1-6 コラーゲンの構造

エラスチン

エラスチンは弾性繊維の主要構成タンパク質である。弾性繊維の最も重要な機能である弾性はエラスチンの特性に基づいている。エラスチンの定義としては組織から酸、アルカリ、アルコール等で処理後に残る、不溶性タンパク質とされている。組織の伸縮性、弾性を生み出す繊維状タンパク質で、大動脈、靭帯、肺、皮膚、結合組織に発現している。

エラスチンは分子量が 67 kDa の前駆体であるトロポエラスチンが銅依存性のリシロキシダーゼによって架橋されて形成される。コラーゲンのように明確なタイプ分けはされていないが、トロポエラスチンにはスプライシング変異が 11 つある。exon22,23,24,26A,32 で選択的スプライシングを受けやすい。例えば、ヒトの exon26A は胎児の大動脈細胞で確認されるが、皮膚の線維芽細胞では存在しない。exon26A が欠落したトロポエラスチンはプロテアーゼに対する抵抗が強いが exon32 が欠落したトロポエラスチンは弱い。このようにスプライシング変異は器官によって変化し、弾性線維の特徴に影響している⁽⁶⁾⁽⁷⁾。

エラスチンは、約 75%以上が非極性・非電荷のアミノ酸からなり、エラスチン凝集体の収縮・弛緩により、立体構造が容易に復元する。エラスチンの特異的なアミノ酸配列として VGVAPG (Val バリン-Gly グリシン-Val バリン-Ala アラニン-Pro プロリン-Gly グリシン) 構造を有していることが知られている。生体内において以下の

ような架橋構造を形成することで、その弾性・不溶性・熱安定性を有している。

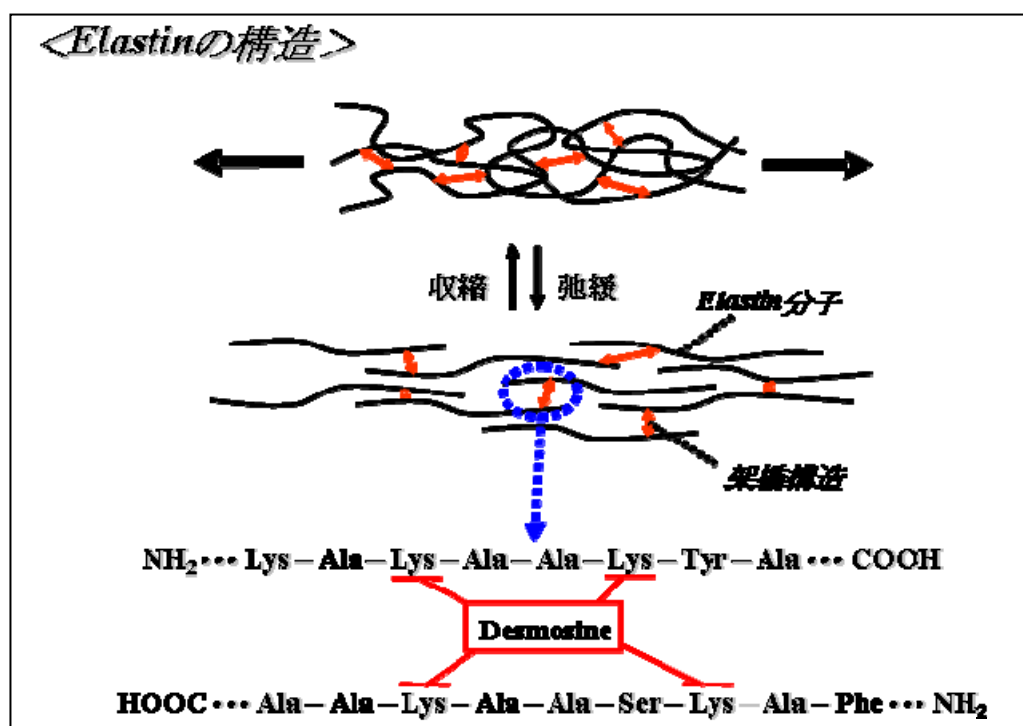


図 1-7 エラスチンの構造

ヒトの肺は胎生 26 週目から毛細血管が密接し始め、弾性線維が現れる。この 26 週目から呼吸が行えるようになる。β-アミノプロピオニトリルによるエラスチン架橋阻害により肺胞形成が破壊されるという報告がある⁽⁸⁾。このようにエラスチンは肺胞形成に重要である。呼吸は肋間筋や横隔膜が動くことで肺が受動的に膨らむことで空気を取り入れ、肺自身の弾性によって縮むことで空気を吐き出す。肺は呼吸によって構造が大きく変化するため、呼吸作用にはエラスチンが必要であるといわれている。しかし、肺組織は血管の動脈壁に比べエラスチンの再形成が遅い。これは肺組織に存在する線維芽細胞と血管に存在する平滑筋細胞のエラスチン合成能力が異なるためと考えられている。

プロテオグリカン

プロテオグリカンはコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンと呼ばれる硫酸化多糖がコアタンパク質に共有結合してできる糖タンパクの一種である⁽⁹⁾。現在までに 20 数種類の異なった遺伝子産物であるコアタンパクを持つプロテオグリカンが見出されており、それぞれ異なった分子構造と機能を持っている。グリコサミノグリカンはプロテオグリカン分子の性質に重要な機能を与えている。グリコサミノグリカンの化学構造はウロン酸(またはガラクトース)とヘキソサミン(6 個の炭素分子をもつ単糖類のアルキル基が一部アミノ基で

置換されたアミノ糖のこと)からなる基本の二糖構造が 40~100 回繰り返してできていて、これが硫酸化を受ける。

プロテオグリカンの分子機能はおもにそのグリコサミノグリカン成分に由来した性質と、コアタンパクに由来するものがある。グリコサミノグリカンはその顕著な硫酸化のため強い親水性を示し溶液中で伸展した構造をとる。この性質は特に多数のグリコサミノグリカンがコアタンパクに結合した形のプロテオグリカンが形成された時に強調され、溶液中で巨大な分子容積を占め、分子中に多くの水分子を保持する。もう一つのグリコサミノグリカンの際立った性質は、成長因子や重要な機能タンパクとの相互作用である(FGF や TGF- β に結合し細胞増殖などに影響する)⁽⁹⁾。コアタンパクの持つ性質としては、これも他分子との相互作用を介しての機能で、主にプロテオグリカンが ECM を構成する際に重要な役割持つ。

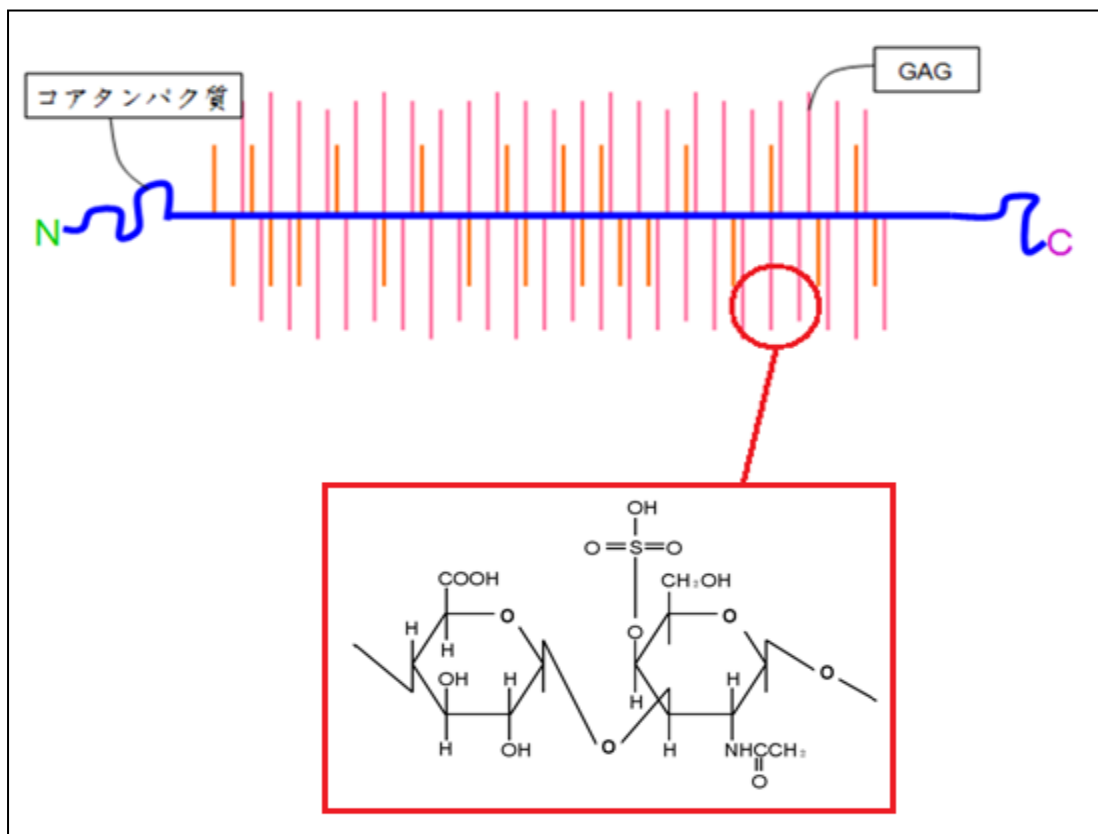


図 1-8 プロテオグリカン(例:アグリカン)の構造

グリコサミノグリカン

糖タンパクであるプロテオグリカンを構成する糖類である。ヘキスロン酸または β D-ガラクトースと N-アセチルヘキソサミンとの二糖繰り返し構造から成る。カルボキシル基、硫酸基を多く持つので、組織内の水分保持を行う。また、コラーゲンなどに結合して、超高分子複合体の ECM を形成し細胞増殖や細胞機能を制御する働きが

ある⁽¹⁰⁾。軟骨、皮膚などの結合組織に多く存在する。

1-3-3 マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP : Matrix Metalloproteinase)

結合組織性細胞、上皮細胞などから産生される ECM の分解に関与する一群の酵素。生理的条件下で組織形成、修復に関与する一方、関節炎や糸球体腎炎など組織破壊を伴う疾患の原因となるともいわれている。酵素活性部位に亜鉛イオンと結合部位を持つ。活性にカルシウムイオンを必要とし、pH 7.5~8.0 の時に働く。分泌型 MMP と膜結合型 MMP が存在する。ともにマトリックスプロテアーゼ阻害因子(TIMP : Tissue Inhibitor Metalloproteinase)によって阻害される⁽¹¹⁾。

分泌型 MMP

産生細胞から離れて広範囲で働くことのできる MMP である。潜在型として産生され、プロペプチドドメインが切断されることで活性型となり ECM 分解を行う。自分自身あるいは他のプロテアーゼによって活性化されたり、細胞上にある MMP によって活性化されたりする⁽¹²⁾。

コラゲナーゼ群

MMP-1(間質コラゲナーゼ)

分子量 52,56kDa(潜在型)、41,45kDa(活性型)の MMP である。I、II、III、VII、X 型コラーゲンやゼラチン、プロテオグリカンを分解する。線維芽細胞、上皮細胞、マクロファージによって産生される。

MMP-8(好中球コラゲナーゼ)

分子量 75kDa(潜在型)、65kDa(活性型)の MMP である。I~III 型コラーゲンとゼラチンを分解する。MMP-1 と異なり好中球のみが産生する。

ゼラチナーゼ群

MMP-2(ゼラチナーゼ A)

分子量 72kDa(潜在型)、67kDa(活性型)の MMP である。ゼラチンやIV、V、VII、11 型コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカンなどを分解する。線維芽細胞や骨芽細胞、軟骨細胞など様々な細胞が産生する。

MMP-9(ゼラチナーゼ B)

分子量 92kDa(潜在型)、84,67kDa(活性型)の MMP である。ゼラチンやIV、V、12、13 型コラーゲン、エラスチンなどを分解する。好中球やマクロファージなど結合組織性細胞以外の細胞が産生する。

ストロメライシン群

MMP-3(ストロメライシン 1)

分子量 57,59kDa(潜在型)、47,45,28kDa(活性型)の MMP である。プロテオグリカン、ゼラチンやIII、IV、IX 型コラーゲンなどを分解するだけでなく、プロ MMP-1 やプロ MMP-9 を活性化する働きを持つ。線維芽細胞や軟骨細胞によって産生され

る。

膜貫通型 MMP

産生細胞の表面に局在するため、細胞の微少環境を改変するのに適している。ECM 分解だけでなく分泌型 MMP の活性化を行うことができる。

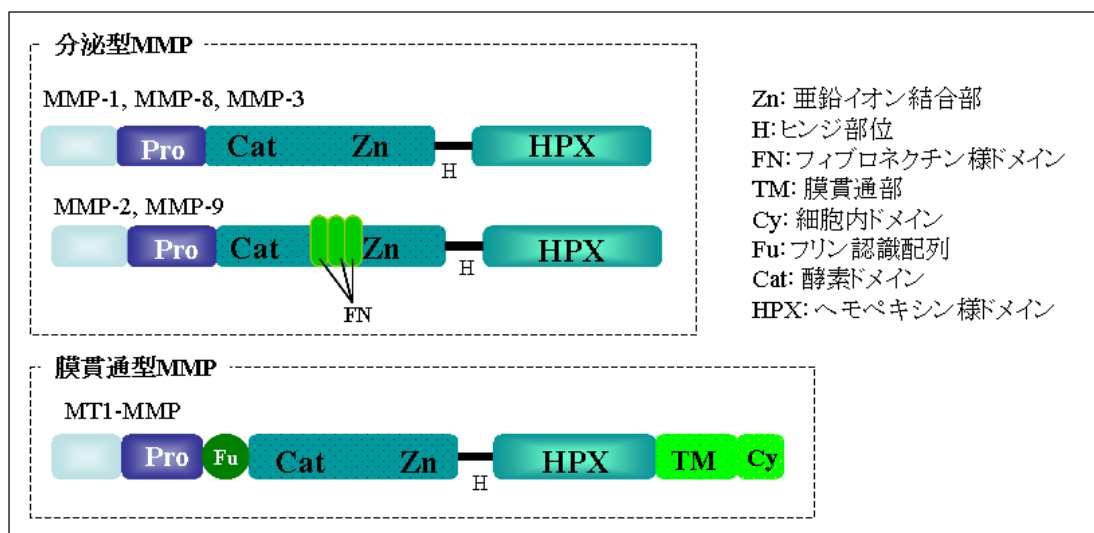


図 1-9 マトリックスメタロプロテアーゼの構造

1-4 肺疾患

1-4-1 慢性肺疾患と治療法

呼吸器の代表疾患は感染症であったが、抗生物質の発見や薬の開発によって 20 世紀後半には治療法が打ち立てられた。現在、感染症の代わりに炎症性疾患が代表的な病態となり、呼吸器疾患患者の 8 割を占めるといわれている。炎症性肺疾患の例として患者数 22 万人、年々死亡者が増加している COPD や炎症組織が線維化した肺線維症がある。

肺気腫

肺気腫は組織（特に弾性線維）の損失による肺胞の拡大、破壊的変化を伴う疾患であり⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾肺移植対象疾患である。長年の喫煙のためマクロファージが過剰反応・過剰防衛し肺胞壁を攻撃、このため肺胞が破壊され肺弾性収縮圧が低下し換気が上手くいなくなる⁽³⁾。慢性気管支炎を併発することもあるため合わせて chronic obstructive pulmonary disease (COPD) と呼ばれ、世界で約 300 万人、日本では 14,416 人が死亡している(2005 年)。現在の治療法としては薬物療法、在宅酸素療法、気腫肺減量手術（肺気腫病

変の重度な部位を一部切除し、比較的軽度な部位の負担を減らす方法) があるが根本的な治療ではなく肺移植までの橋渡しである。

間質性肺炎

肺の間質とは肺胞上皮基底膜で区切られた肺胞壁の間隙でありその中にコラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン等の ECM と毛細血管、線維芽細胞を含みガス交換の場として重要な領域である。間質性肺炎とは肺の間質に異常が生じる疾患の総称である。どの間質性肺炎も線維化の過程をとり、線維化によってガス交換の場を破壊し呼吸不全を引き起こす⁽⁵⁾。

1-4-2 肺疾患と細胞

感染、ショック、酸素中毒など多くの原因によって肺胞傷害が起こる。傷害は肺胞上皮の壊死を引き起こし、肺胞は炎症性滲出物で満たされる。このとき基底膜や ECM が無傷で存在するならば、再生によって治癒が起こり、マクロファージなどが肺胞内滲出物进行处理する。しかし、基底膜や ECM が破壊されると肺胞壁から間葉系細胞が増殖、線維芽細胞や筋線維芽細胞に分化する。線維芽細胞や筋線維芽細胞は肺胞腔に遊走し、コラーゲンやプロテオグリカンを中心とする ECM を分泌し肺胞壁が肥厚する。また、大規模な肺胞傷害により肺胞壁の弾性線維が破壊され、肺が収縮できなくなり呼吸が行えなくなる場合もある。

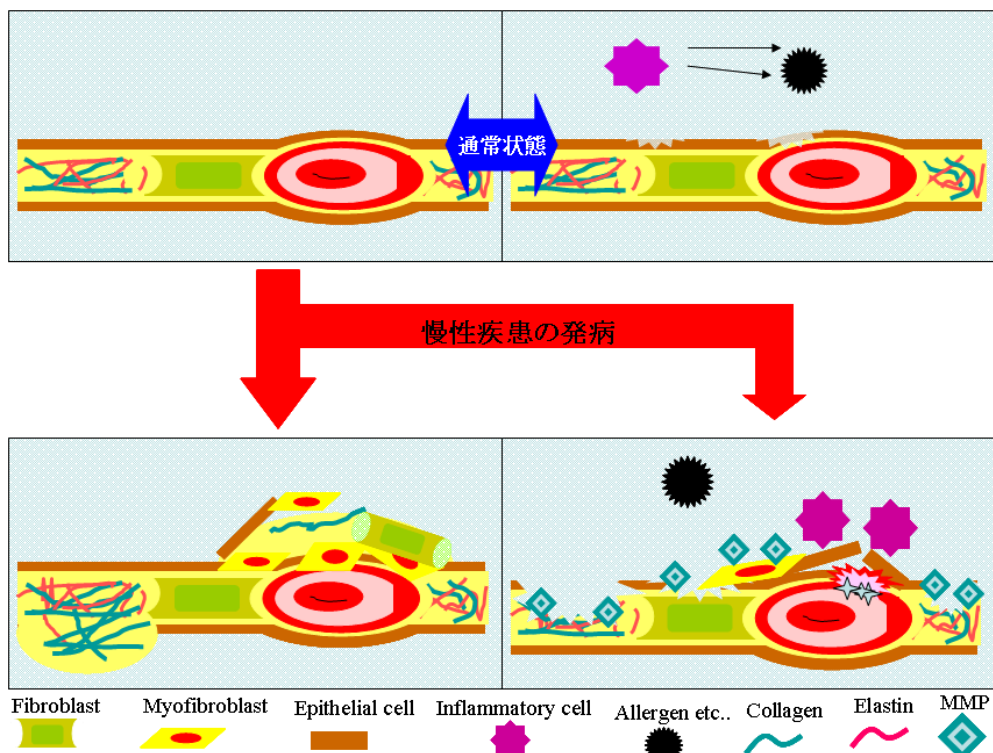


図1-10 慢性肺疾患のメカニズム⁽¹⁵⁾

1-5 本研究の目的

組織再生のため、材料には生体組織に毒性がなく組織の機能を補助する材料が望ましい。呼吸を担う肺組織(肺胞)は伸縮という動きを受けながら、細胞の ECM 産生と ECM 分解のバランスを保つことで、その構造と機能を維持する。肺胞再生においては、肺のスポンジ構造、収縮力の模倣した材料と ECM と力学的刺激による肺線維芽細胞の形質変換、ECM の分泌バランスのコントロールが重要である。

本研究は肺組織の再生誘導を目指した技術開発の基礎検討として、肺の細 ECM が線維芽細胞に与える影響を検証することを目的とし、以下の実験を行った。

- (1) 培地中の ECM 産生量の定量、細胞表面の ECM 蓄積の観察による ECM 産生評価
- (2) Gelatin Zymography を用いた培地中の MMP 活性の測定による ECM 分解評価

2.方法

2-1 培養機材の作成

2-1-1 肺エラスチンの抽出

三重県松坂食肉流通センターから頂いたブタ肺組織を肺胞部と気管支に切り分け、肺胞部を細かくミンチにした後、エタノールで脱水を行い乾燥させた。精製した不溶性エラスチンをシュウ酸処理し上澄み液を透析チューブに入れ、外液の pH が 5~6 程度になるまで透析を行った。チューブから取り出した液を遠心し、上澄み液を凍結乾燥させ水溶性エラスチンを得た。

2-1-2 肺エラスチンの分子量測定

分子量マーカーを用いて液体クロマトグラフィーを行い、検量線を作成した。各サンプルを展開溶媒 PBS、流速 1ml/min で 2000SW カラム(東ソー)で分離し、検量線との比較から数平均分子量、重量平均分子量、多分散度の調査を行った。

2-1-3 ECM 添加培地と ECM コーティングシャーレの作製

ECM 添加培地

肺エラスチン(LE6, LE15)、I 型コラーゲン(Col I)、コンドロイチン硫酸(GAG)、VGVAPG 1mg を 10 ml の DMEM に溶解し、0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌を行った。

ECM コーティングシャーレの作製

コロナ放電を用いて前処理を行った後、コラーゲン(0.1 mg/ml)またはエラスチン水溶液(0.1 mg/ml)を 1.5 ml 添加し 5 時間静置した。その後溶液を吸引し、コーティングシャーレとして実験に用いた。

エラスチン水溶液の調製

肺エラスチン(LE)4mg を 40 ml の滅菌水に溶解し、0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌を行った。

コラーゲン溶液の調製

I 型コラーゲン(本研究室で抽出)1mg を 1 ml の希塩酸(pH3.0)に溶解した。これをさらに滅菌水で 10 倍希釈を行い濃度 0.1 mg/ml に調整して 0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌を行った。

2-2 細胞外マトリックスが線維芽細胞に与える影響

2-2-1 細胞の培養と継代

ヒト肺線維芽細胞を 37°C/5%CO₂ インキュベーター(池本理化工業社)内で培養した。培地はペニシリンストレプトマイシン(Sigma 社)を添加した DMEM(Sigma 社)を用い、3 日に 1 度培地交換を行った。sub-confluent(70%~80%)状態に増殖した時点で再びトリプシン処理にて線維芽細胞を剥離させ、細胞懸濁液を調製し継代培養を行った。

2-2-2 ECM 添加培地による細胞培養

ECM 添加培地を培養用シャーレに入れ 37°C/5%CO₂ プレインキュベーターさせた後、細胞を播種した。ECM 添加培地を用いて 3 日に 1 度培地交換を行った。

2-2-3 ECM コーティング上での細胞培養

コーティングシャーレ上にヒト肺線維芽細胞を播種し、37°C/5%CO₂ インキュベーター(池本理化工業社)内で培養した。

2-2-4 細胞数のカウント

トリプシン処理にて線維芽細胞を剥離させ、細胞懸濁液を調製した。血球計算版にカバーガラスをのせ、その隙間に培養フラスコに播種する直前の細胞懸濁液 7 μ l を注入して、顕微鏡で細胞数を測定した。

2-2-5 色素結合法を用いたコラーゲンの定量

染色液(Direct Red 80/ピクリン酸,1:1)1 ml に対してサンプルを最大 100 μ l 加え、ローテーターで 30 分間攪拌した。12,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄み液を除去した後、0.5M 水酸化ナトリウムを 1 ml 加えて沈殿物を溶解した。96 穴プレートに 200 μ l ずつ移してからマイクロプレートリーダー(BIO-RAD 社)を用いて吸光度を測定した(波長:550 nm)。

2-2-6 色素結合法を用いたエラスチンの定量

4°Cに冷やしておいた 5%トリクロロ酢酸に対してサンプルを最大 100 μ l を加え静置した後、12,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄み液を除去した。これに染色液(TPPS/クエン酸ナトリウム/リン酸,3:6:1)1 ml を加え、ローテーターで 90 分間攪拌した。12,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄み液を除去した後、1-プロパノールを 1 ml 加えて沈殿物を溶解した。96 穴プレートに 200 μ l ずつ移してからマイクロプレートリーダー(BIO-RAD 社)を用いて吸光度を測定した(波長:550 nm)。

2-2-7 免疫蛍光染色を用いた細胞表面の ECM 蓄積の観察

PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。1%BSA/PBS で 20 分間置換後、1%BSA/PBS 溶液を除去し、一次抗体を加え 4°C、飽和湿度で overnight させた。一次抗体を除去し、PBS で洗浄し二次抗体を加え室温、暗室で放置した。二次抗体を除去し、PBS で洗浄した後共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2-2-8 BCA 法によるタンパク質の定量

Gelatin Zymography を行う際にサンプルのタンパク質濃度をそろえるため、BCA 法によるタンパク質の定量を行った。

培地の色を抜くため、回収培地 100 μ l に対し 1mg の活性炭を加え、溶液を遠心分離にかけた。その上澄みを回収し、サンプルとした。A 溶液と B 溶液を 50:1 で混合したもの 100 μ l に対して、サンプル及びスタンダード(BSA)を 10 μ l ずつ加えた。37°C/30 分静置し、OD₅₆₂ 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。

2-2-9 Gelatin Zymography を用いた細胞の MMP 活性

ゼラチンを含む 10%アクリルアミドゲルに、サンプルとサンプルバッファーを 1:1 で混合したものを 15mA・定電圧で電気泳動を行った。この時のサンプルに含まれるタンパク質量を 4 μ g となるようにサンプル量を決定した。電気泳動終了後、酵素反応溶液でゲルを洗浄することで SDS を Triton-100X で置換した。37°C、pH7.5~8.0 条件下で 48h、MMP を活性化させた。48h の MMP 活性化の後、ゲルを 0.125%クマシーブリリアントブルーR で染色した。

2-3 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 を有意とした。

3.結果

3-1 肺エラスチンの抽出

3-1-1 不溶性肺エラスチン

処理を行った肺組織総量 6,863.38g (気管支:2,272.95g 肺胞:4,590.43g)

最終的に得られたエラスチンの重さ① 95.94g

肺胞に含まれる水の含有率② 84.38%

処理を行った肺組織に含まれる水の重さ③ 3873.4g

②③より肺胞に含まれる組織の総量④ 717.03g

①④より肺胞に含まれると考えられるエラスチンの含有率 13.38%

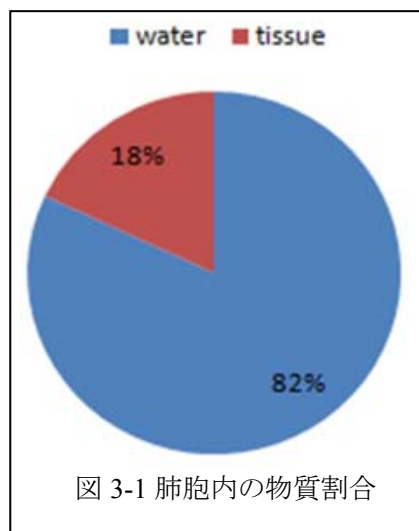


図 3-1 肺胞内の物質割合

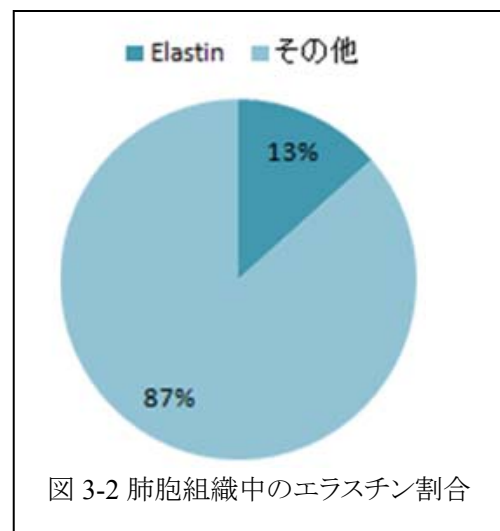


図 3-2 肺胞組織中のエラスチン割合

3-1-2 水溶性肺エラスチン

得られた不溶性肺エラスチンのシュウ酸処理を行った。シュウ酸処理の過程で最初に得られたエラスチンからNo.1とし今回はNo.1～16まで得られた(表 3-1)。得られた水溶性エラスチンの総量は約 1.51g であった。

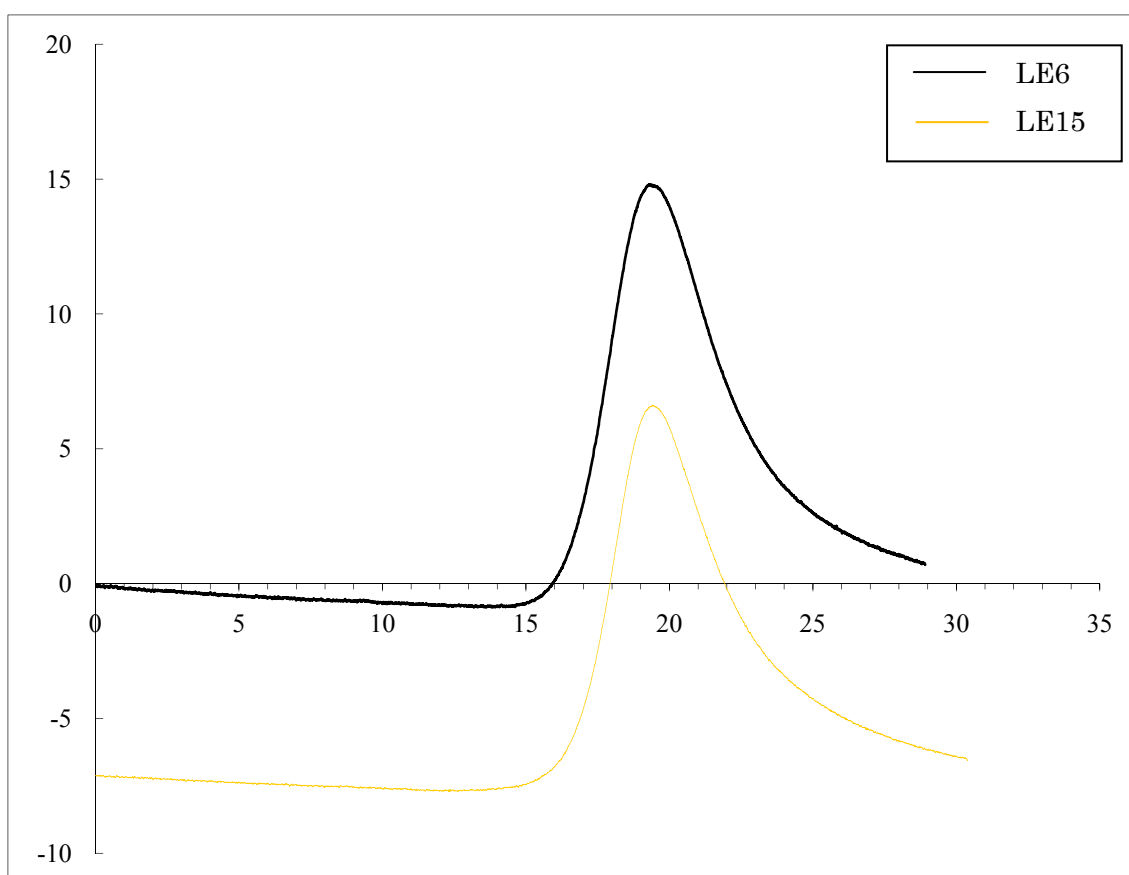
| No. | 重量 (mg) | No. | 重量 (mg) | No. | 重量 (mg) |
|-----|---------|-----|---------|-----|---------|
| 1 | 190 | 7 | — | 13 | — |
| 2 | 70 | 8 | 13 | 14 | 140 |
| 3 | 70 | 9 | 20.5 | 15 | 440 |
| 4 | 20 | 10 | 78.8 | 16 | — |
| 5 | 100 | 11 | 150 | | |
| 6 | 110 | 12 | 110 | | |

表 3-1 得られた水溶性エラスチンの重量

今回得られた肺エラスチンのうち No.6,15 の凝集温度を測定した。No.6 (LE6) の凝集温度は 41.3℃、No.15 (LE15) の凝集温度は 21.3℃であった。凝集はエラスチン内の疎水性ドメインが相互作用を持つため生じる現象である。このため、LE15 の方が疎水性ドメインを多く持つことが分かった。

3-1-3 肺エラスチンの分子量測定

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって LE6、LE15 の分子量分布を調べた。HPLC の結果より、LE6 は LE15 よりも分子量が 1kDa ほど小さいことが分かった (図 3-3)。



| 試料名 | ピーク分子量 | 数平均分子量[Mn] | 重量平均分子量[Mw] | [Mw]/[Mn] |
|----------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------|
| BSA (時間補正用) | 59,000 (文献値 66000) | 6,8524 | 403,229 | 5.8 |
| LE6 | 11,849 | 10,065 (1.0E+4) | 17,460 (1.7E+4) | 1.73 |
| LE15 | 12,900 | 11,858 (1.2E+4) | 18,594 (1.9E+4) | 1.57 |

図 3-3 LE の HPLC

3-1-4 線維芽細胞の肺エラスチンへの接着・伸展観察

LE コーティングシャーレに肺線維芽細胞を播種し、その様子を観察した。図 3-4 のように LE6、LE15 ではほぼすべての細胞の接着が確認されたが、LE6 では約 60% の細胞が伸展細胞(偽足を形成し、細胞質を広げる細胞⁽²⁶⁾)になった。LE15 では約 3.4%となり LE6 よりも少なかった。7 日目では LE6,LE15 上のすべての細胞が伸展細胞になった。

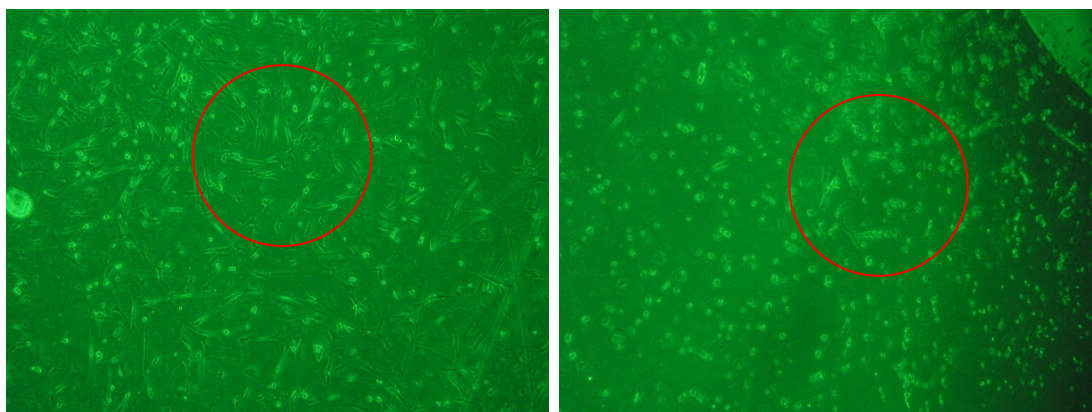


図 3-4 LE コーティングシャーレへの細胞播種から 2 日目の肺線維芽細胞の様子
(左:LE6 コーティングシャーレ 右:LE15 コーティングシャーレ)

3-2 細胞外マトリックスによる細胞応答

3-2-1 培地中の ECM 産生量

ECM 添加実験

肺線維芽細胞を 24 穴に 4.5×10^3 cells 播種した後、サブコンフルエントになるまで培養した。サブコンフルエントになったら ECM 添加培地 (Col I, LE, GAG; 各 0.1mg/ml)、VGVAPG 添加培地 (0.1mg/ml) に培地交換し、14 日間培養した。回収培地の Elastin Assay, Collagen Assay を行った。

回収培地には ECM が添加してあるため、細胞を培養せずに ECM を添加した培地を Blank として以下のような式で細胞一つあたりが培地中に産生するエラスチン、コラーゲン量を求めた。

$$\text{細胞一つあたりが産生する ECM 量} = \frac{\text{回収培地中に存在する ECM 量} - \text{Blank 中に存在する ECM 量}}{14 \text{ 日後の細胞数}}$$

Control (添加なし) と比較して培地中のエラスチン量は LE15、Col I、GAG 添加において減少した (図 3-5)。コラーゲン量は Col I 添加によって増加した (図 3-6)。

有意差(vs control,*:p<0.05 **:p<0.01、vs VGVAPG,*:p<0.05 **:p<0.01)

エラスチン産生量とコラーゲン産生量のバランスが重要であるため、エラスチンとコラーゲンの産生量の比を図 3-7 で示した。Control と比較して、LE6 添加によってエラスチンの産生比が増加し、LE15、Col I、GAG 添加によってエラスチンの産生比が減少した(図 3-7)。VGVAPG 添加と比較して、培地中のエラスチン量が LE6、LE15 添加によって減少し(図 3-5)、培地中のコラーゲン量が減少した(図 3-6)。このことから、LE6 にはエラスチンの産生に何らかの影響を与えることが分かった。

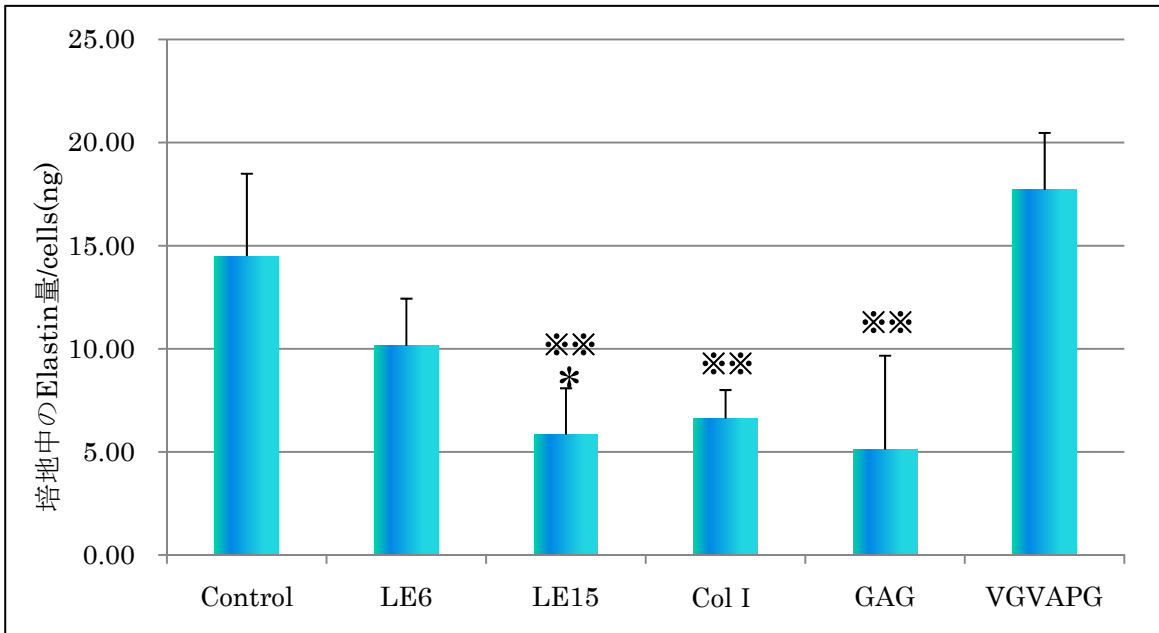


図 3-5 細胞一つあたりの培地中に産生するエラスチン量(n=3)

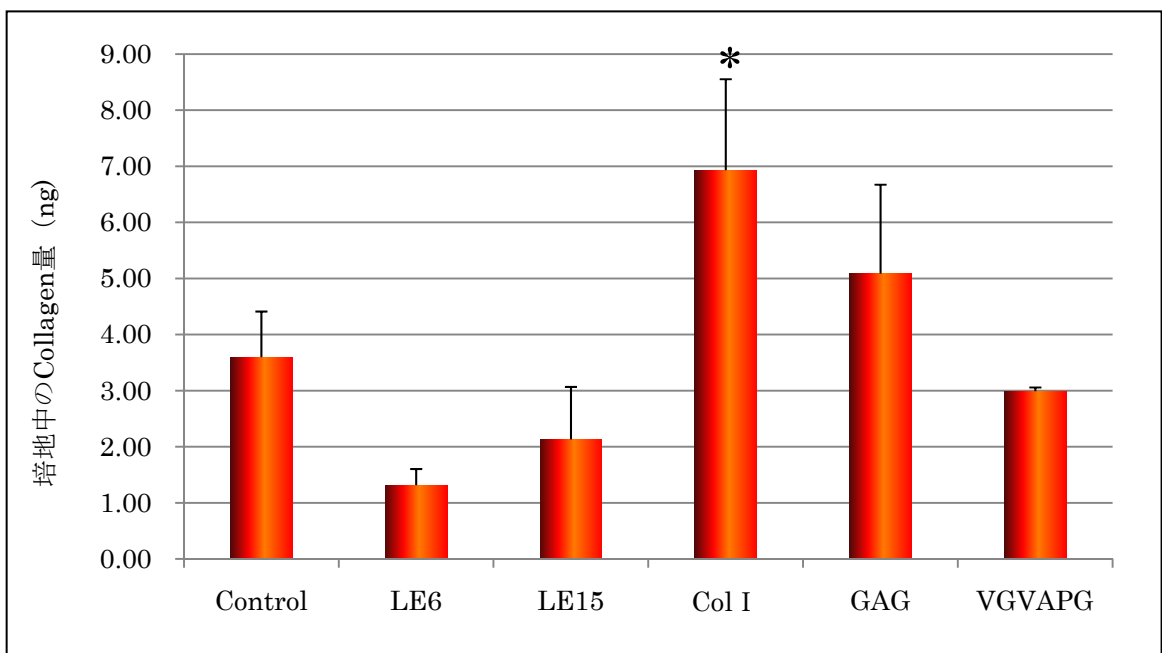


図 3-6 細胞一つあたりの培地中に産生するコラーゲン量(n=3)

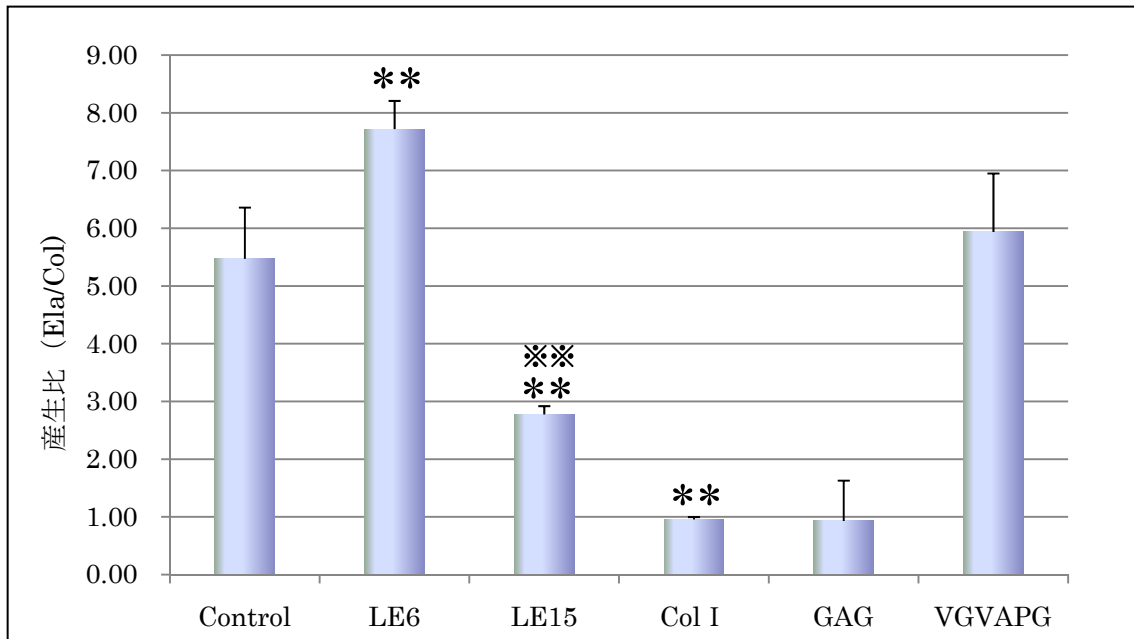


図 3-7 細胞一つあたりが培地中に産生する ECM 量の比

ECM Coat 実験

ECM をコーティングしたシャーレに肺線維芽細胞を 2.4×10^4 cells 播種し、14 日間培養した。3 日ごとに培地交換を行った。

Non Coat と比較して LE15 Coat において培地中のエラスチン、コラーゲン量が増加した(図 3-8、図 3-9)。しかし、ECM 産生比においては LE Coat でエラスチンの産生比が Non Coat に比べ減少した(図 3-10)。有意差(vs Non Coat, *:p<0.05)

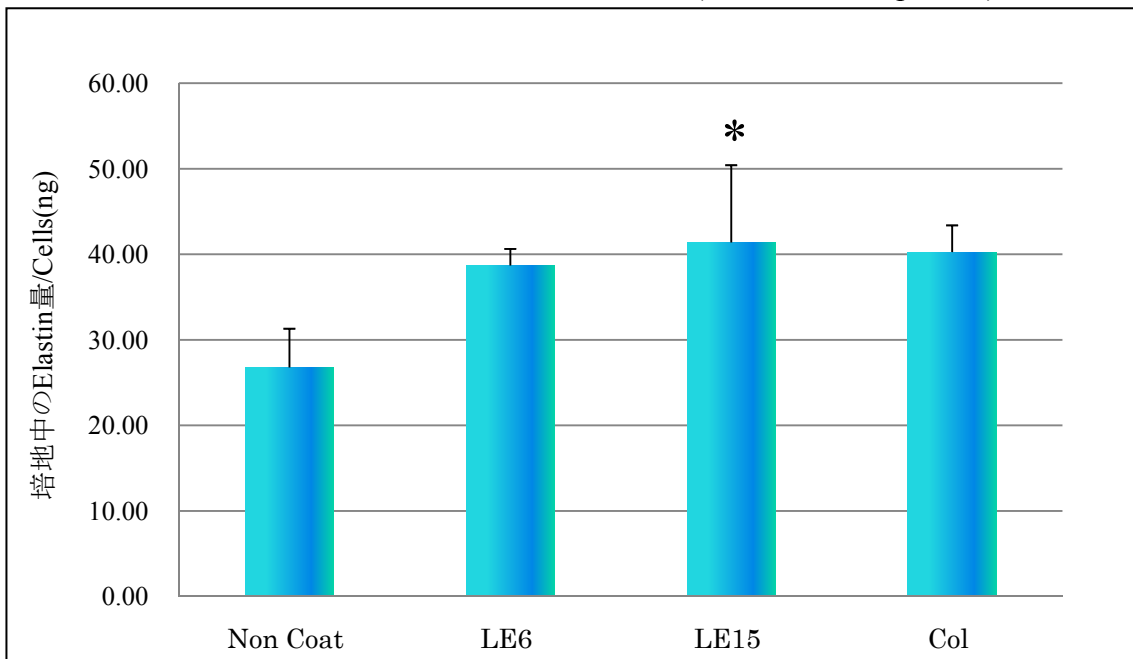


図 3-8 細胞一つあたりの培地中に産生するエラスチン量(n=3)

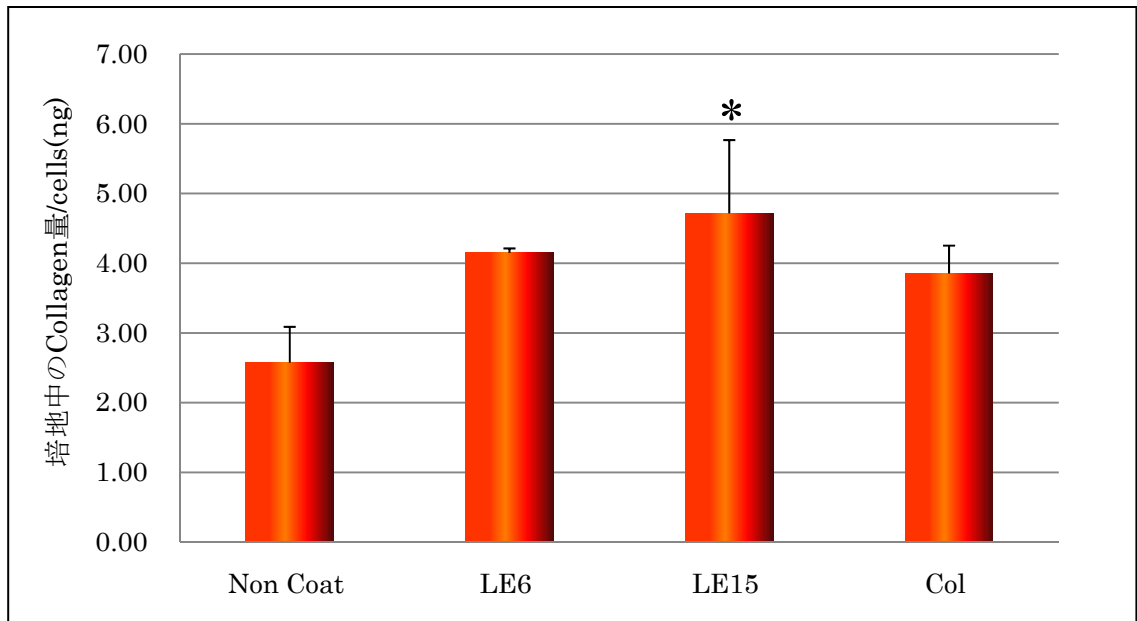


図 3-9 細胞一つあたりの培地中に産生するコラーゲン量(n=3)

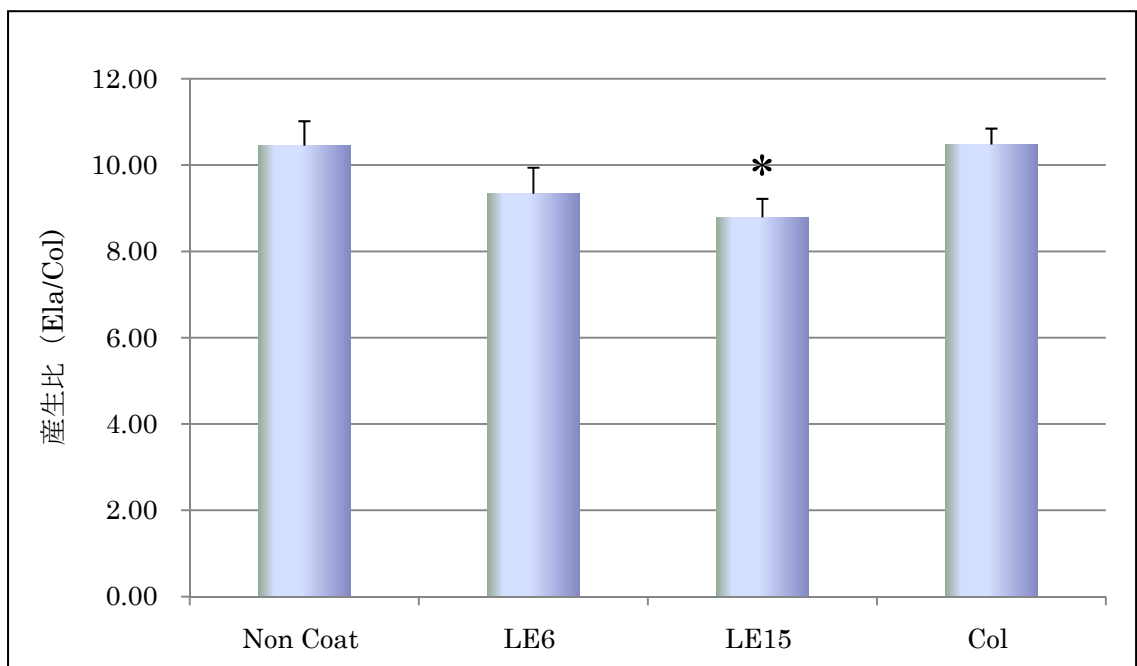


図 3-10 細胞一つあたりが培地中に産生する ECM 量の比

3-2-2 細胞が産生する MMP の活性

14 日間細胞を培養した後、回収した培地に含まれる MMP の活性を Gelatin Zymography を用いて測定した。MMP 活性を Image J によって画像解析を行い数値化した。ゲルの違いで MMP の活性に差が出ないように MMP マーカーを基準に MMP 活性を規格化した。

ECM 添加実験

Control、LE 添加で MMP 活性に差は見られなかった(図 3-11)。Col 添加によって MMP-2 以外の MMP 活性が見られた(図 3-11A)。VGVAPG 添加によって MMP-2、proMMP-2 の活性が上がった。Col と VGVAPG には線維芽細胞の MMP 活性に影響を与えることが分かった。

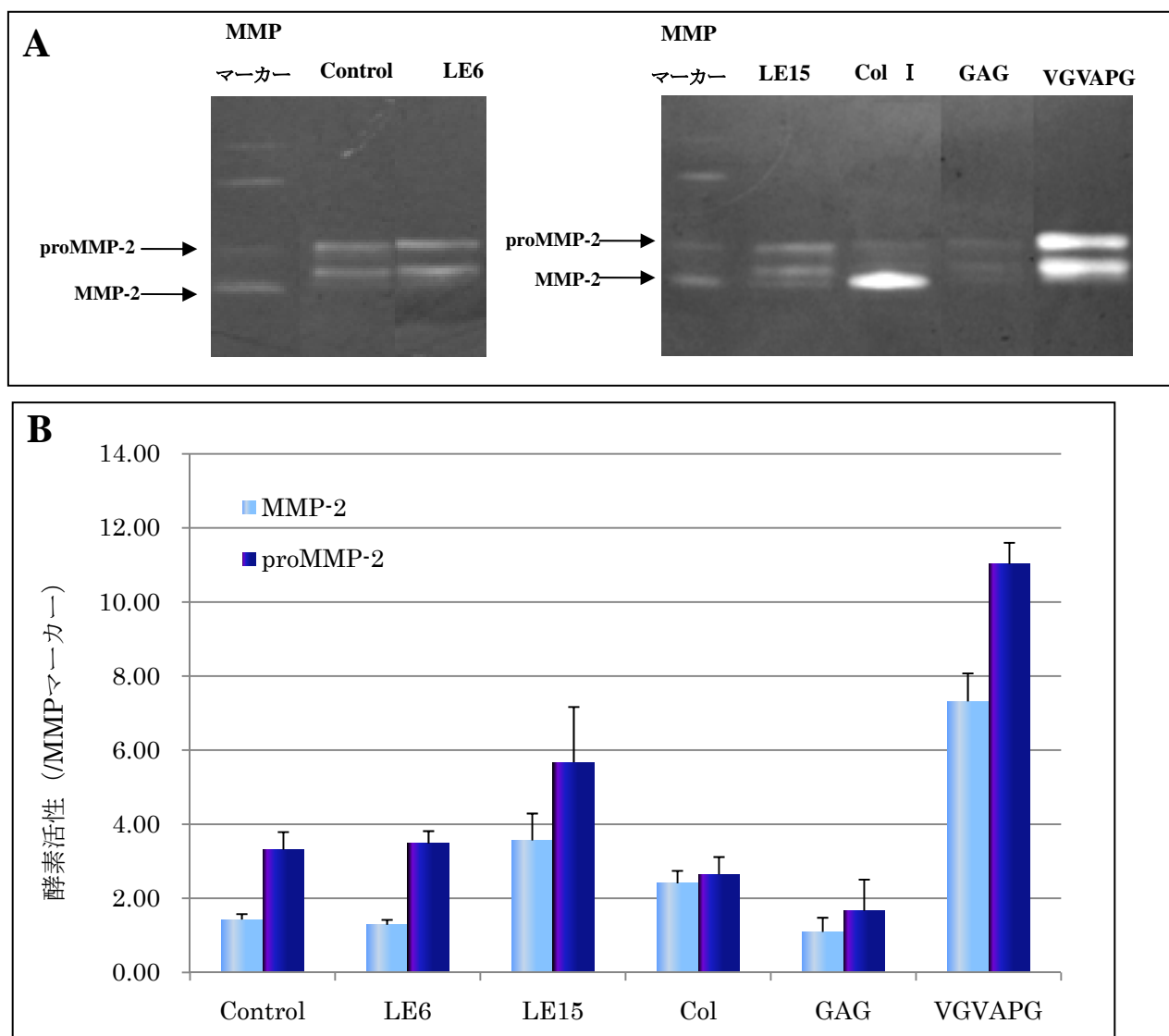


図 3-11 ECM 添加培地中の MMP 活性 (n=3~2)

MMP は proMMP (潜在型) のプロペプチドドメインが切断されることによって MMP (活性型) になり、ECM を分解する。proMMP-2 に対して MMP-2 がどれくらい活性化しているかが重要である。そのため、MMP-2 活性と proMMP-2 活性の比を図 3-12 で示した。LE15, Col, GAG, VGVAPG 添加は Control と比較して MMP-2 の活性化が見られた。

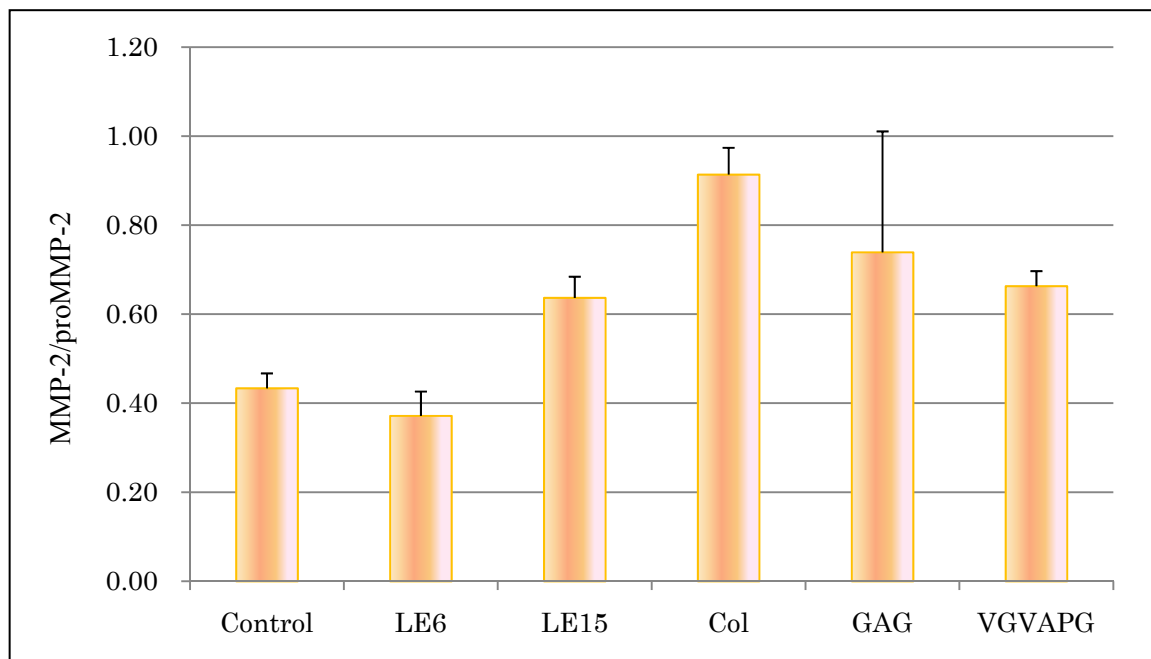
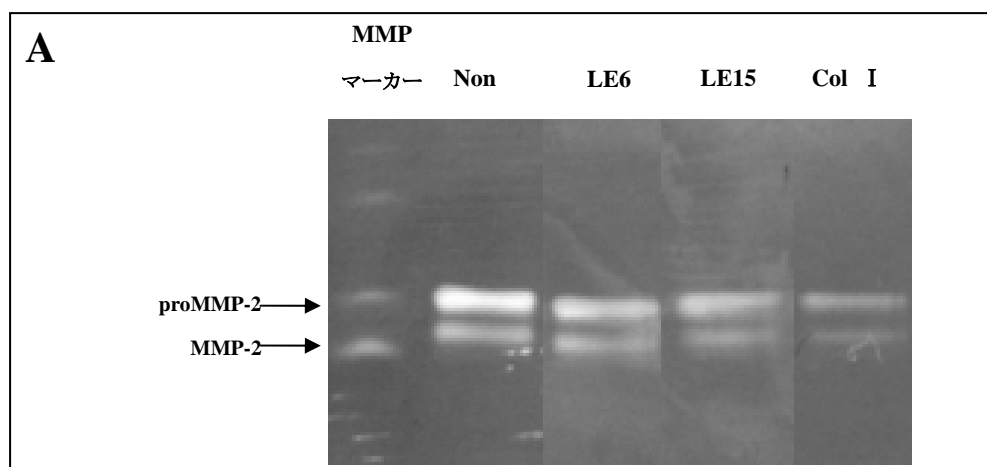


図 3-12 proMMP-2 活性に対する MMP-2 活性

ECM Coat 実験

ECM 添加時と比較して各条件での MMP-2 活性と proMMP-2 活性の比の差はなかった(図 3-14)。Col I Coat の MMP 活性が ECM 添加と異なった。このことから、ECM Coat は MMP 活性に大きな影響を与えないことが分かった。



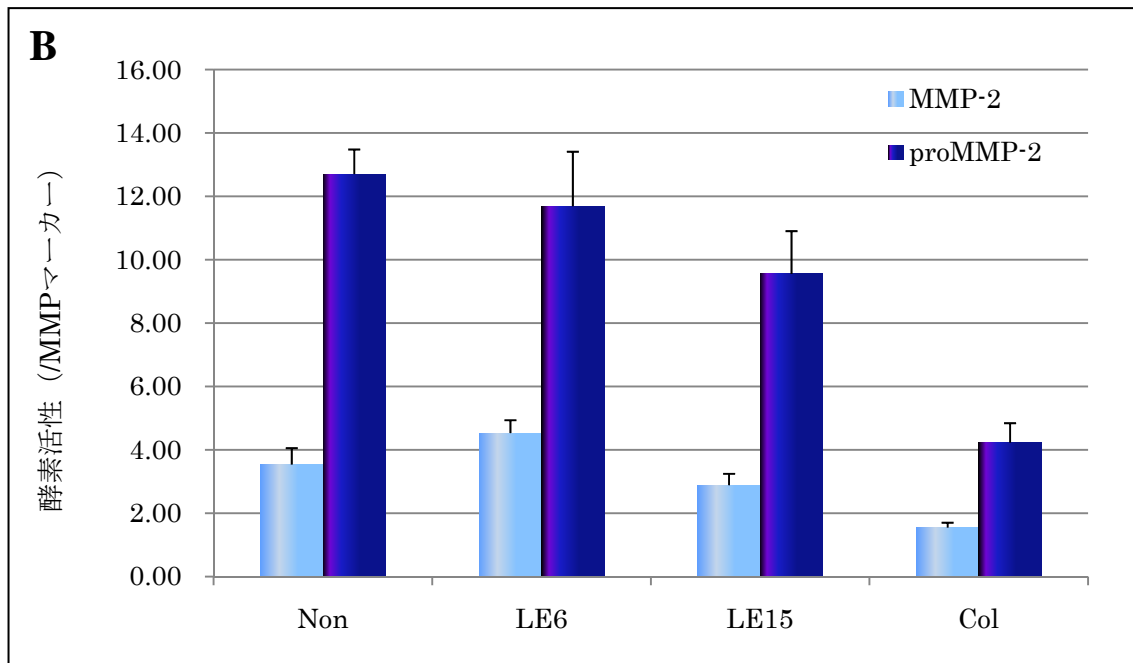


図 3-13 ECM Coat 培地中の MMP 活性 (n=3~2)

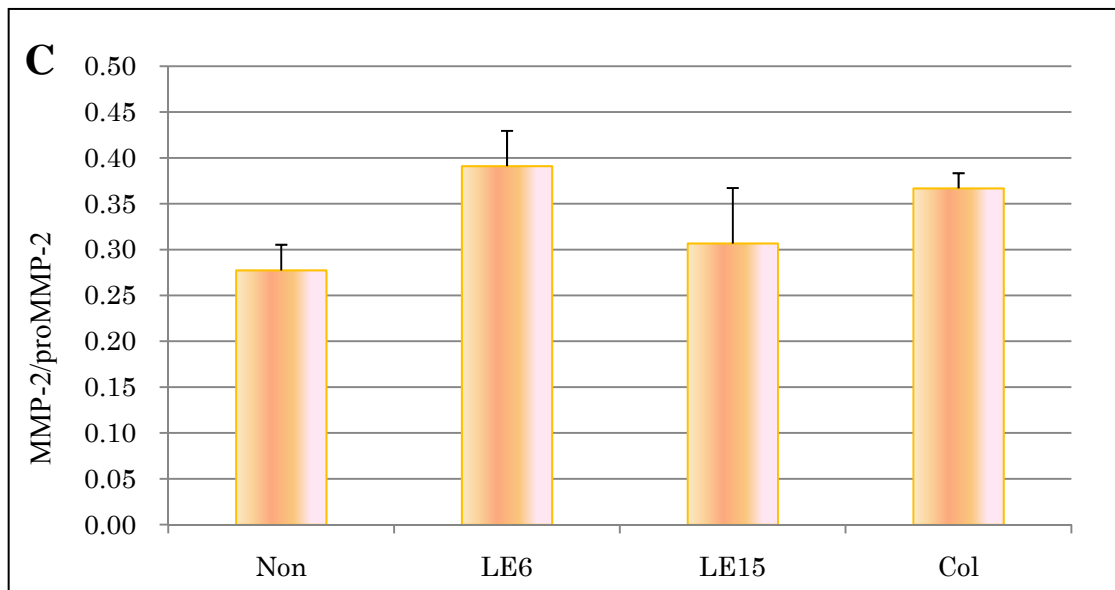


図 3-14 proMMP-2 活性に対する MMP-2 活性

3-2-3 細胞表面の ECM 蓄積

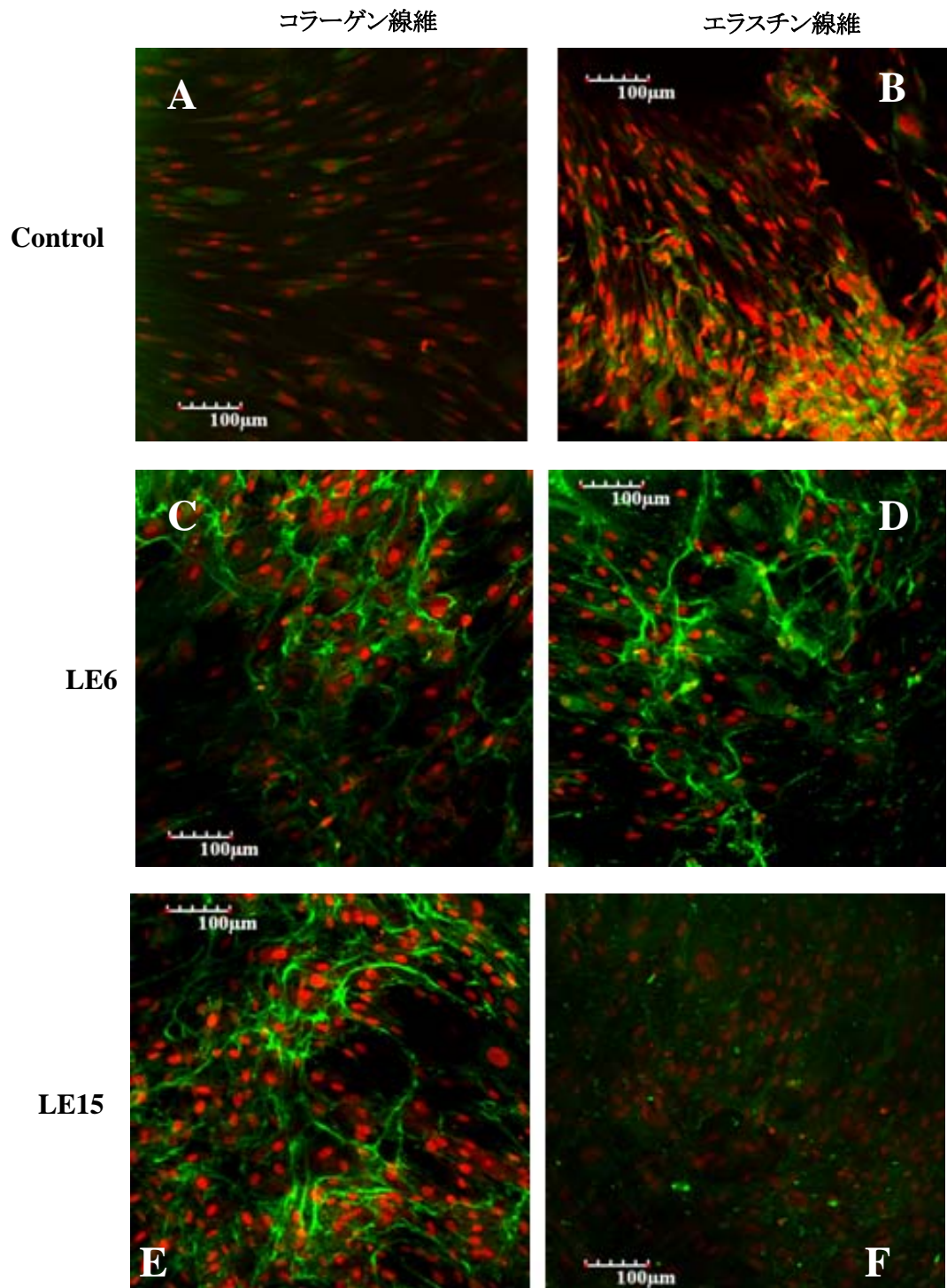
ECM 添加実験

A,B は Control (ECM 添加なし) の細胞、C,D は LE6 を添加した細胞、E,F は LE15 を添加した細胞、G,H は Col I を添加した細胞、I,J は GAG を添加した細胞、K,L は VGVAPG を添加した細胞の表面を免疫蛍光染色した写真である(倍率:200 倍)

Bar=100 μ m)。

何も添加していない Control と VGVAPG 添加ではコラーゲン線維、エラスチン線維共に観察されなかった。LE、GAG 添加、特に LE6 添加によって細胞表面にエラスチンが観察された。

LE6 添加によってエラスチンとコラーゲンの蓄積が促進されることが分かった。



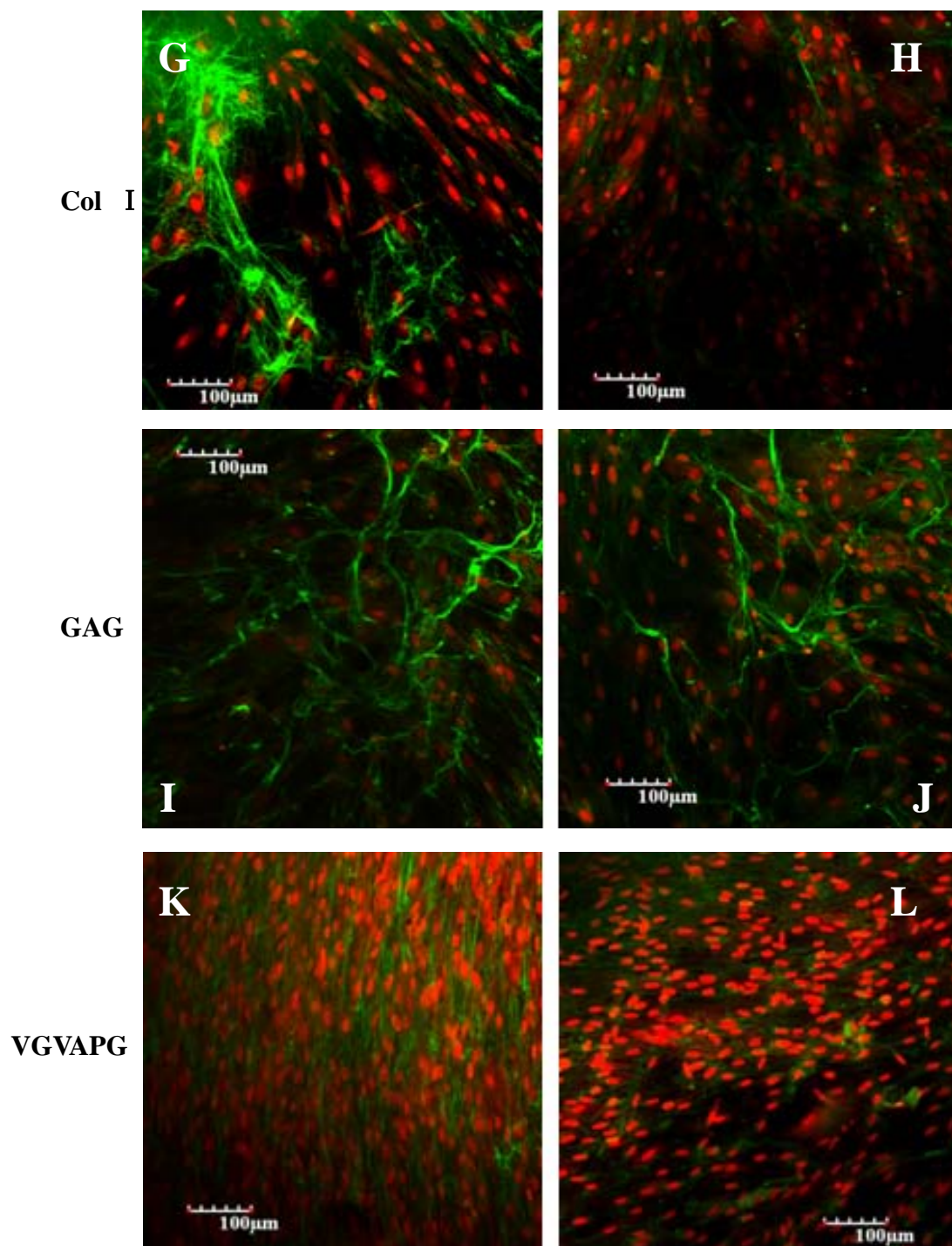


図 3-15 ECM 添加の細胞表面の ECM の観察

A,C,E,G,I,K (緑色：コラーゲン 赤色：細胞核)

B,D,F,H,J,L (緑色：トロポエラスチン 赤色：細胞核)

4 考察

4-1 肺エラスチンの構造

高速液体クロマトグラフィーにより LE6 の数平均分子量は 10kDa、LE15 の数平均分子量は 11.9kDa であることが分かった(図 3-3)。本研究室で抽出した血管エラスチンの数平均分子量は A が 25.2kDa、E が 10.1kDa である⁽²⁰⁾(表 4-1)。このことから、LE6 は血管の E、LE15 は C~D に近い性質を持つと考えられる。しかし、凝集温度を測定すると LE6 は 41.3°C、LE15 の凝集温度は 21.3°C であった。これは血管エラスチンの E と A に相当する。凝集はエラスチン内の疎水性ドメインが相互作用を持つため生じる現象である。このため、LE15 は LE6 とほぼ大きさの変わらない分子の中に GVGVP や GGVP のような疎水性ドメインを多く持つと考えられる。

| | 数平均分子量 (kDa) (クロマトグラフィー) | 凝集温度 |
|-----------|-----------------------------|-----------|
| Elastin A | 25.2 | ~22.5°C |
| Elastin B | 21.4 | 22.5~25°C |
| Elastin C | 18.7 | 25~30°C |
| Elastin D | 10.3 | 30~35°C |
| Elastin E | 10.1 | 35°C~ |

表 4-1 分画された血管エラスチンの数平均分子量

ヒトエラスチンのアミノ酸配列の特徴として、赤字で示された KAAK、KAAAK 配列と、青字で示された VGVAPG 配列がある(図 4-1)。EBP はエラスチンの VGVAPG 配列に結合する⁽²⁰⁾。また、KAAK、KAAAK 配列は架橋領域である。この架橋領域のなかでもエラスチン同士の分子間架橋を形成する部位が 492-496 番目で接着領域に近接するものであることが報告されている⁽²¹⁾。

| |
|--|
| MAGLTAAPRPGVLLLLLSI LHPSRPGGVP GAI PGGVPPG 40 |
| VFPYFAGLGA LGGGALPGG KPLKPVPPGGL AGAGLGAGLG 80 |
| AFPAYTFP GALVPPGGVADAA AAY KAAK AGA GLGGVPGYGG 120 |
| LGVSAGAVVP QPGAGVKPGK VPGVGLPGVY PGGVLPGARF 160 |
| PGVGVLPGYPTGAGVKPKAP GVGGAFAFAGIP GVGPFGGPQP 200 |
| GVPLGYPIKA PKLPGGYGLP YTTGKLPYGY GPGGVAGAAG 240 |
| KAGYPTGTGV GPQAAAAAAAA KAAAK FGAGA AGVLPGVGGA 280 |
| GVPGVPGAIP GIGGIAGVGT PAAAAAAAAA KAAK YGAAA 320 |
| GLVPPGGPFG PGVVGVPGAG VPGVGVPGAG IPVVVPGAGIP 360 |
| GAAVPGVVSPEAAA KAAAKA AKYGARPGVG VGGIPTYGVG 400 |
| AGGFPGFVG VGGIPGVAGV PSVGGVPGVG GVPGVGISPE 440 |
| AQAAAAAAAA KAA KYGAAGAGVL GGLVPGPQAA VPGVPGTGGV 480 |
| PGVGTAAAAA KAAAK AAQFGLVPG VGVAP GVGVAPGVG 520 |
| APGVGLAPGV GVAPGVGVAP VGVAPG IGP GGVAATAAKSA 560 |
| AKVAAKAQLR AAAGLGAGIP GLGVGVGVPG LGVAGVPG 600 |
| GVGAGVPGFAGADEGVRRLSP ELREGDFSSSQHLFPSTP 640 |
| SSPRVPGALA AAKAAK YGAAVPGVLGGLGA LGGVGIPGGV 680 |
| VGAGPAAAAA AAKAAK AAQFGLVGAAGLG GLGVGGLGVP 720 |
| GVGGGLGIP PAAAA KAAK YG AAGLGGVLGG AGQFP LGGVA 760 |
| ARPFGLSPI FPGGACLGKACGRKRK 786 |

赤字: 架橋領域 青字: 接着領域

図 4-1 ヒトエラスチンのアミノ酸配列

今回使用したエラスチンはブタから抽出したものである。しかし、ブタエラスチンのアミノ酸配列にも数は少ないが KAAK、KAAAK 配列、VGVAPG 配列がある(図 4-2)。エラスチンの架橋はこの KAAK、KAAAK 配列の K(Lysine)がリシルオキシダーゼによってアリン残基と縮合を起こし、デスマシンやイソデスマシンのような四官能性の架橋を形成する。

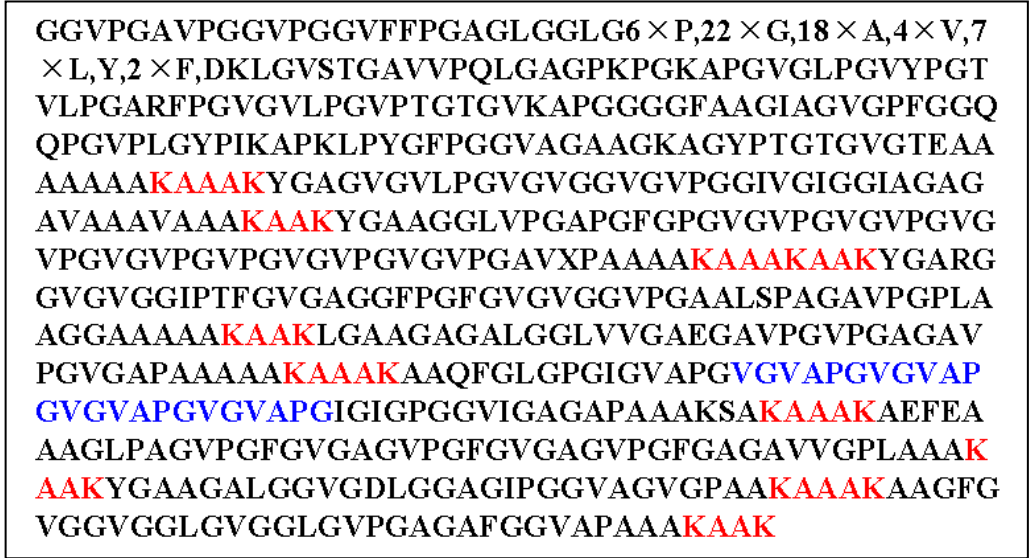


図 4-2 ブタエラスチンのアミノ酸配列

肺泡は一分間に 16～18 回(成人)伸縮し、直径 250～300μm の肺泡が肺腔内の陰圧によって風船のように膨らむ。これに対して血管は一分間に 60～100 回(成人)伸縮し、何層にも重なった板状の弾性線維が平滑筋細胞とともに血圧を調整する。血管に比べ肺は器官の構造変化が大きいため弾性線維には弾性よりも伸長率が求められる(図 4-3)。この器官の構造の違いと分子量と凝集温度の関係から、肺のエラスチンは血管のエラスチンよりも架橋部位が少ないと考えられる。

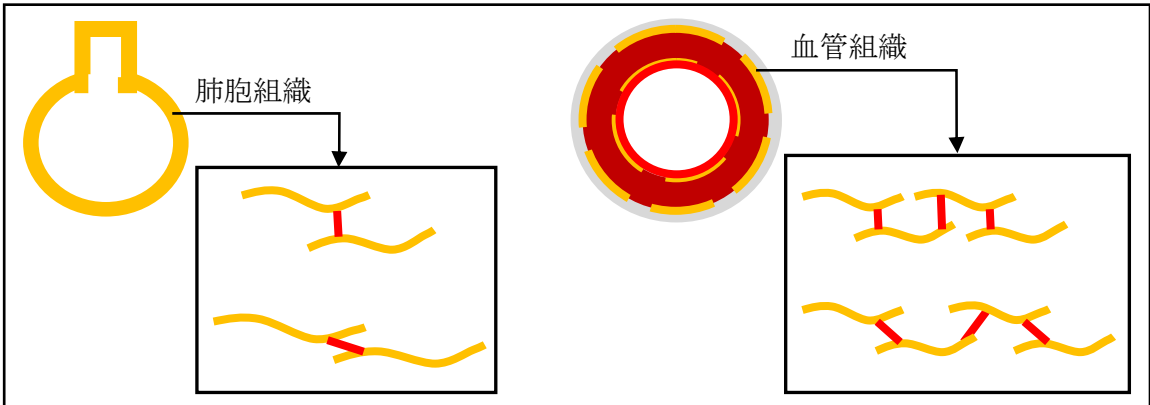


図 4-3 肺泡と血管の弾性組織

肺エラスチンは抽出した不溶性のエラスチンにシュウ酸処理を行い得られたものである。最初に得られたものを No.1 とした。シュウ酸処理を行うことで、架橋領域の

少ない部分から切断され水溶性エラスチンと得られる。このことから、LE6はLE15と比較して架橋に使われていないKを多く含んでいる配列と考えられる。

4-2 肺エラスチンが肺線維芽細胞の ECM 産生に与える影響

エラスチンの産生に関わるタンパク質にエラスチンバインディングプロテイン (Elastin Binding Protein: EBP)がある。このEBPは61kDaのNeu-1、55kDaのPPCAと三量体を形成し、分子内シャペロンあるいはレセプターとして機能する。EBPが分子内シャペロンとして機能するのは、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンが細胞外に分泌されるまでに分解されるのを防ぐためである。通常の場合、トロポエラスチンと結合したEBPのレクチン結合部位が細胞膜表面近くにあるマクロフィブリルのガラクトースに結合。EBPはトロポエラスチンを放出し、細胞に戻る。放出されたトロポエラスチンはマイクロフィブリルに結合し、エラスチンが産生される⁽⁷⁾(図4-4)。この後EBPの40~50%は細胞表面から細胞内へ入り、EBPが再利用される⁽¹⁶⁾。しかし、EBPはラクトースやグリコサミノグリカンのような糖鎖によって阻害されるという報告がある⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾。

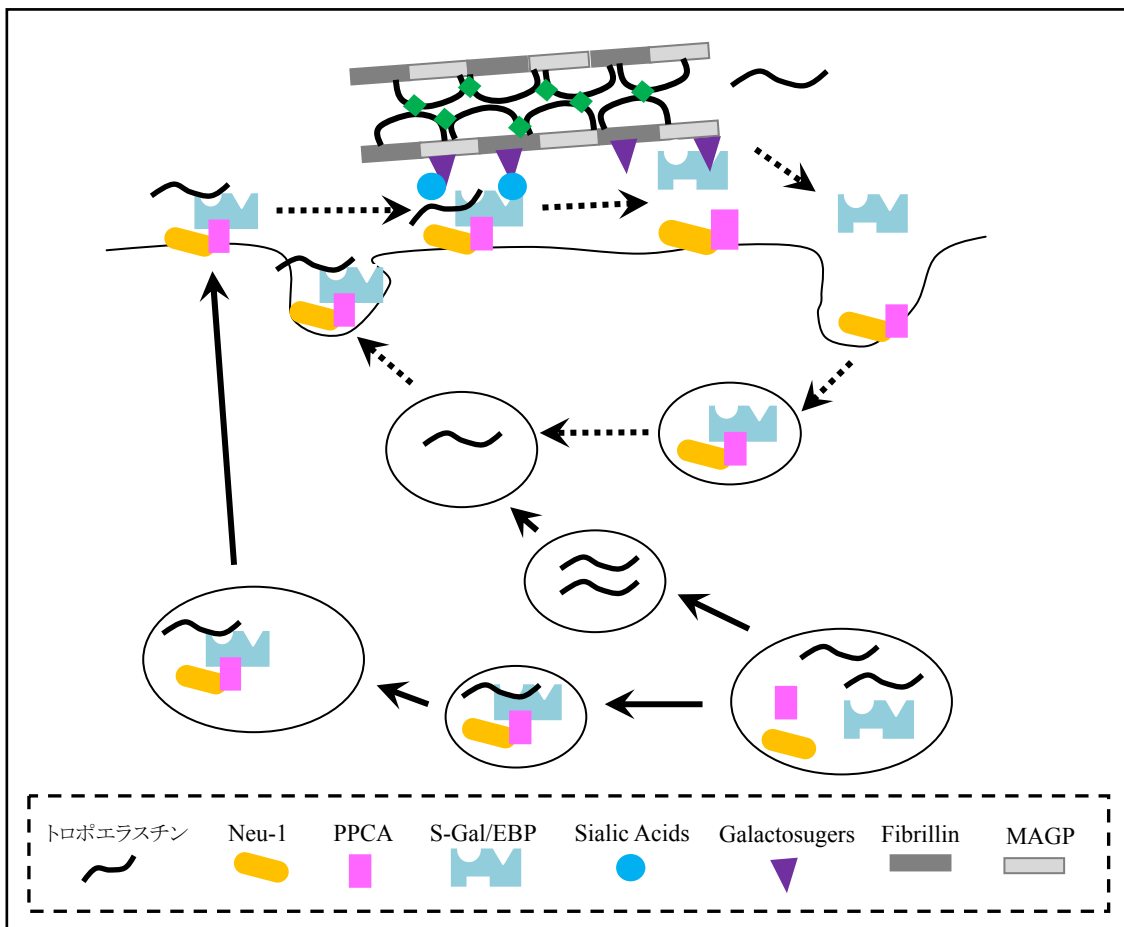


図 4-4 分子内シャペロンとしての EBP の働きと動き⁽¹⁸⁾

グリコサミノグリカンであるコンドロイチン硫酸やヘパリンは TN-C や FGF と高い親和性を持つ。これはグリコサミノグリカンの硫酸基の負電荷と TN-C、FGF の K と R (Arginine) の正電荷によって高い親和性を持つためである。つまり、グリコサミノグリカンはタンパク質の K と R とイオン結合することができる。エラスチンの C 末端の RKRK は細胞表面のコンドロイチン硫酸、ヘパリンと結合することができ、細胞接着に関与していると考えられている。この細胞接着時の必要条件として末端に K と R を多く持つこと、塩基残基集団の前に疎水性アミノ酸をもつことが挙げられている⁽¹⁹⁾。ブタのエラスチンには RKRK 配列が見られない。しかし、タンパク質は立体構造を形成する。エラスチンは P (Proline) や G (Glycine) を多く含むため、ターン構造を形成しやすい。LE6 がターン構造をとり、離れていた K や R 同士が近づき、塩基性が上がったと考えられる。

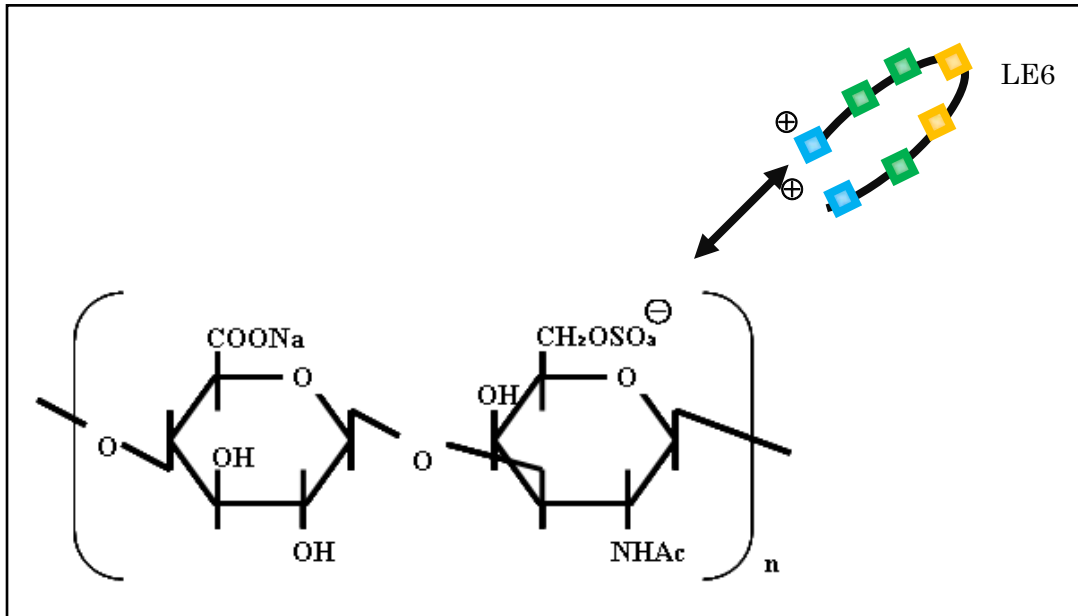


図 4-5 GAG (コンドロイチン硫酸) と LE6 の相互作用

グリコサミノグリカン産生量はエラスチンやコラーゲンと比較すると微量だが、線維芽細胞によって産生される。ECM 添加なし時やコラーゲン、GAG 添加時において、培地中に存在するあるいは産生されたグリコサミノグリカンが、細胞表面の EBP と結合し、分子内シャペロンとして働く EBP の再利用が妨害されたと考えられる(図 4-6)。それに対して LE6 添加時では LE6 に含まれる R や K がグリコサミノグリカンの硫酸基と結合し、結合した LE6 が立体障害となりグリコサミノグリカンの EBP への結合を阻害したことによって分子内シャペロンとして働く EBP が再利用されやすくなり(図 4-4)エラスチンの産生比が増加した(図 3-7)と考えられる。

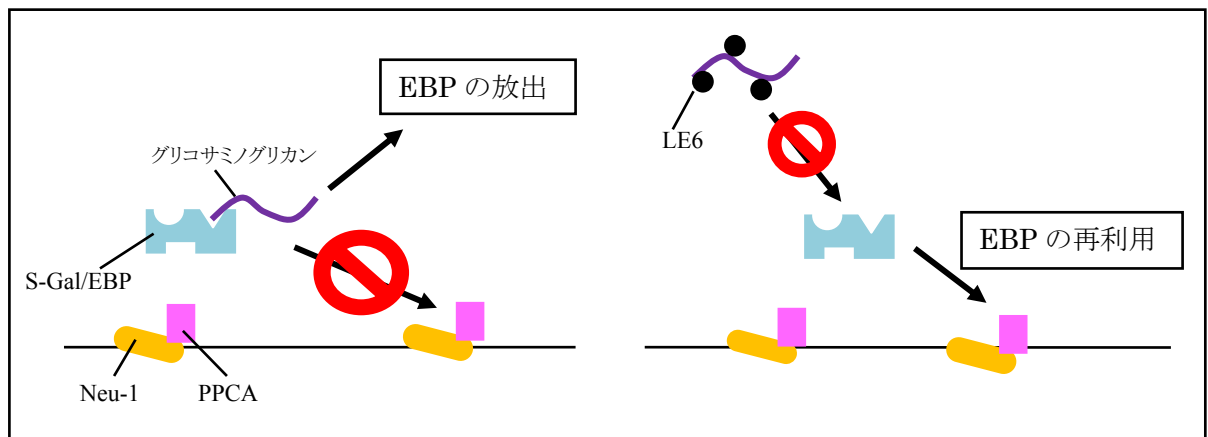


図 4-6 EBP に対するグリコサミノグリカンと LE6 の作用

4-3 エラスチンの構造の違いにおける細胞への影響

エラスチンが細胞に認識される配列として VGVAPG が最も知られている^{(22)~(24)}。そのため、この VGVAPG 配列が肺エラスチンのどちらかに多く含まれていたため二つのエラスチンで細胞応答に差が生じたと考えた。しかし、ペプチド添加実験の結果より(図 3-7、図 3-11、図 3-15)、LE-15、LE-6 の細胞応答は VGVAPG 添加時とは異なることが分かった。

現在、細胞が認識するエラスチン配列として XGXXPG (VGVAPG、PGAIPG、LG TIPG⁽²³⁾)、GRKRK⁽²⁵⁾が確認されている。しかし、XGXXPG、GRKRK はプロテアーゼ放出、細胞接着を引き起こすが ECM 産生を上方制御するとは報告されていない。XGXXPG、GRKRK 以外のアミノ酸配列が細胞の ECM 産生に何らかの影響を与えたと考えられる。

高速液体クロマトグラフィーによる肺エラスチンの分子量測定より、LE6 よりも LE15 の分子量が大きいことが分かった。コアセルベーションはエラスチン分子の疎水性ドメインの相互作用によって生じる。このコアセルベーションは GVGVP、GGVP、GVGVAPG のようなオリゴペプチドの繰り返し配列の疎水性ドメイン間の相互作用によって生じる⁽⁷⁾。それ故、LE 中に細胞へ影響を与える配列が存在したとしても、LE15 は自身の疎水性ドメインの相互作用のため凝集を起こして細胞へ結合しにくくなると考えられる。

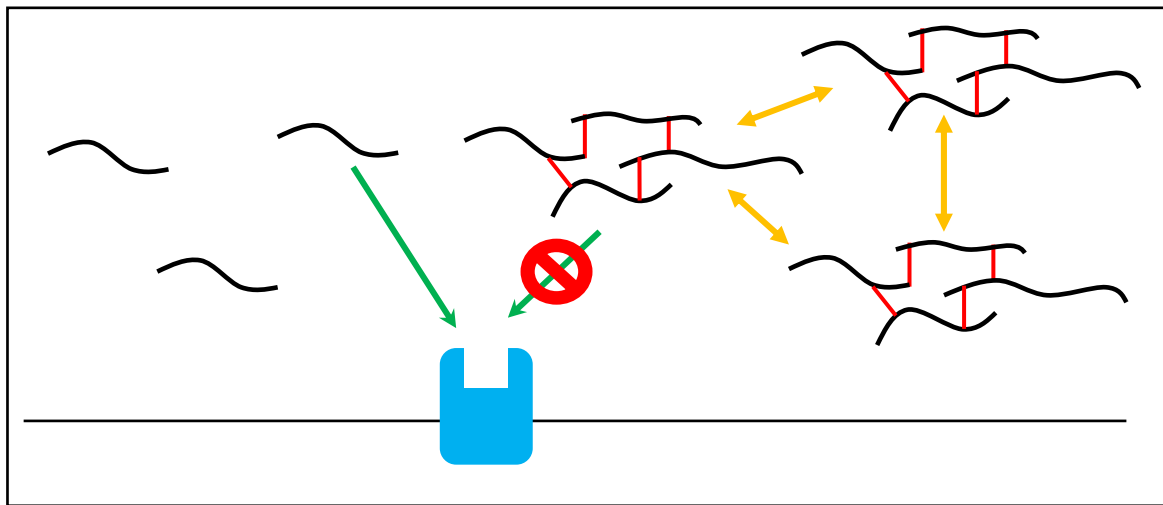


図 4-7 細胞表面に存在するレセプターと LE の結合

4-4 添加とコーティングでの細胞応答の差について

今回実験で用いたコーティングシャーレはコロナ放電によって表面処理を行ったシャーレである。コロナ放電処理を施すことによってシャーレ表面は一時的に親水性が増す。コロナ放電処理により起こると考えられる反応機構は、疎水表面であった浮遊培養用シャーレ(ポリスチレン製)にコロナ放電を行うことで表面にラジカル($\text{COO}\cdot$ 、 $\text{CO}\cdot$)が発生する。そこに空気中の酸素や水分などが速やかに反応することで、カルボキシル基(COOH)やヒドロキシル基(OH)といった極性を有し親水性に優れた官能基が導入され、そこにエラスチンなどのタンパクが水素結合や親水性相互作用により結合し、タンパク表面を形成していると考えられる⁽²⁶⁾。

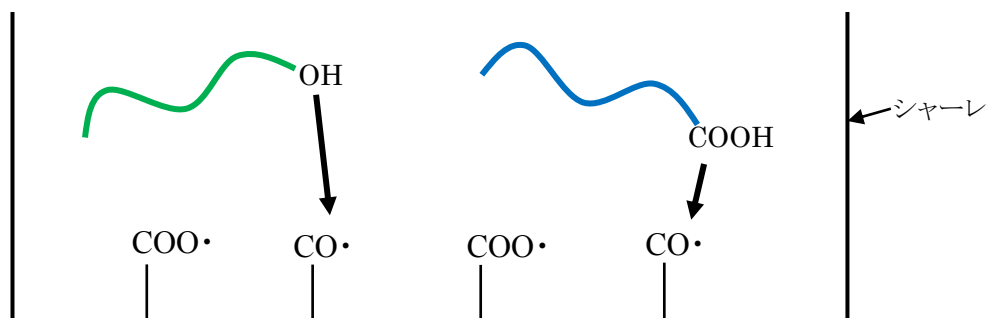


図 4-8 コロナ放電によるシャーレ上の反応の模式図

コーティングシャーレに細胞を播種すると、コーティングされた ECM 上に細胞が接着する。そのため、細胞は接着した面からしか、ECM による刺激を受けないと考えられる。添加実験では培地中に ECM 分子が存在するため、コーティングよりも細胞と ECM 分子の接触が多いと考えられる(図 4-9)。また、LE15 は添加と異なり、シャーレ上に LE15 分子が固定されているため、凝集せず細胞に作用しやすくなったと考えられる。よって、添加実験で見られた細胞応答とコーティング実験で見られた細胞応答に差が生じたと考えられる(図 3-5～図 3-14)。

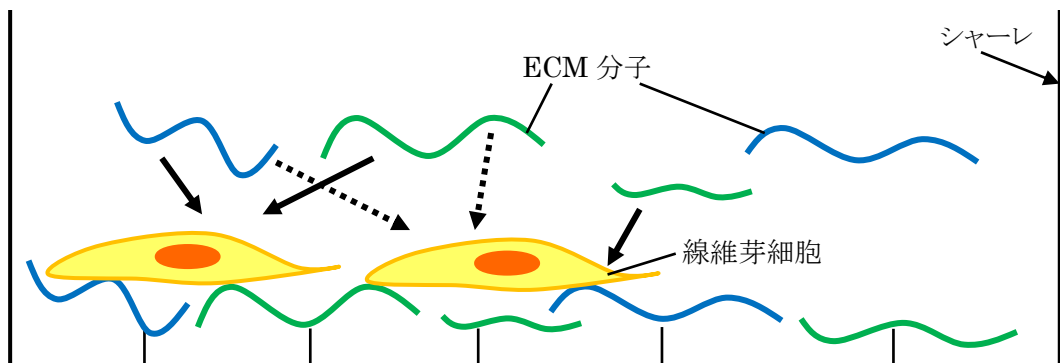


図 4-9 ECM 分子と細胞の接触

肺線維芽細胞は肺胞の間質に存在する細胞である。そのため、接着結合という細胞接着で ECM 内に存在する⁽²⁷⁾。コーティングシャーレとは異なり細胞全体が ECM と接着するため(図 4-10)、シャーレ上より ECM による影響を受けやすいと考えられる。三次元構造の材料がより細胞応答を活性化させることができる。

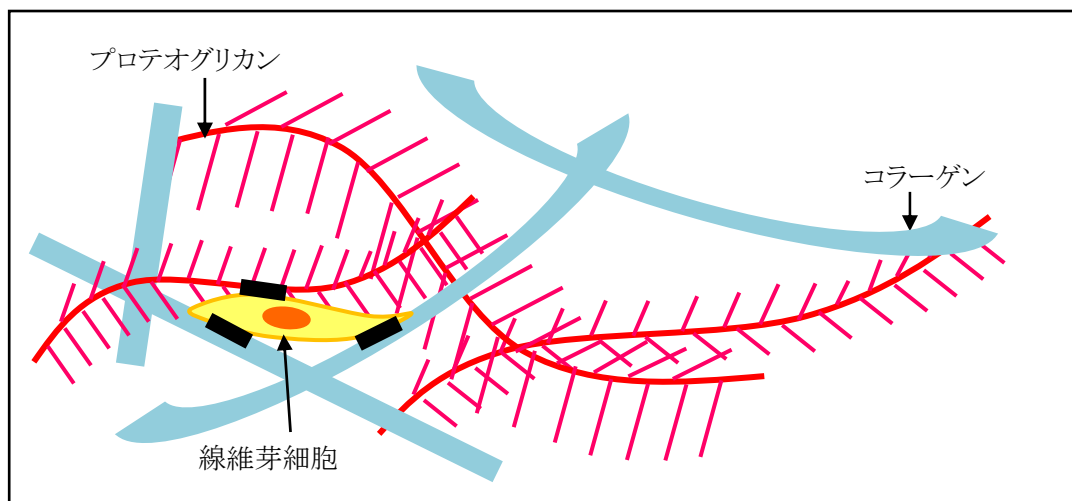


図 4-10 生体内の線維芽細胞の ECM 分子との接着の模式図

4-5 VGVAPG ペプチドと細胞活性

エラスチンを認識するレセプターとして EBP、galectin-3、integrin $\alpha\beta 3$ が知られている⁽²²⁾。このうち EBP と galectin-3 はエラスチンペプチドの XGXXPG 配列(例: VGVAPG)を認識する。VGVAPG を認識した細胞は増殖、プロテアーゼ放出、走化性を導く⁽²³⁾⁽²⁴⁾。integrin は RGD 配列を認識し、RGD 配列を持たないエラスチンは通常 integrin に認識されることはない。しかし、integrin $\alpha\beta 3$ はエラスチンの C 末端部位を認識するといわれている。

肺線維芽細胞は EBP を持つため、添加された VGVAPG を認識し MMP-2 活性が上昇したと考えられる(図 3-11)。MMP-2 が活性化したため、細胞によって分泌されたトロポエラスチンが線維化せず(図 3-15)、培地中に分泌されたため培地中のエラスチン産生量と産生比が増加したと考えられる(図 3-7)。

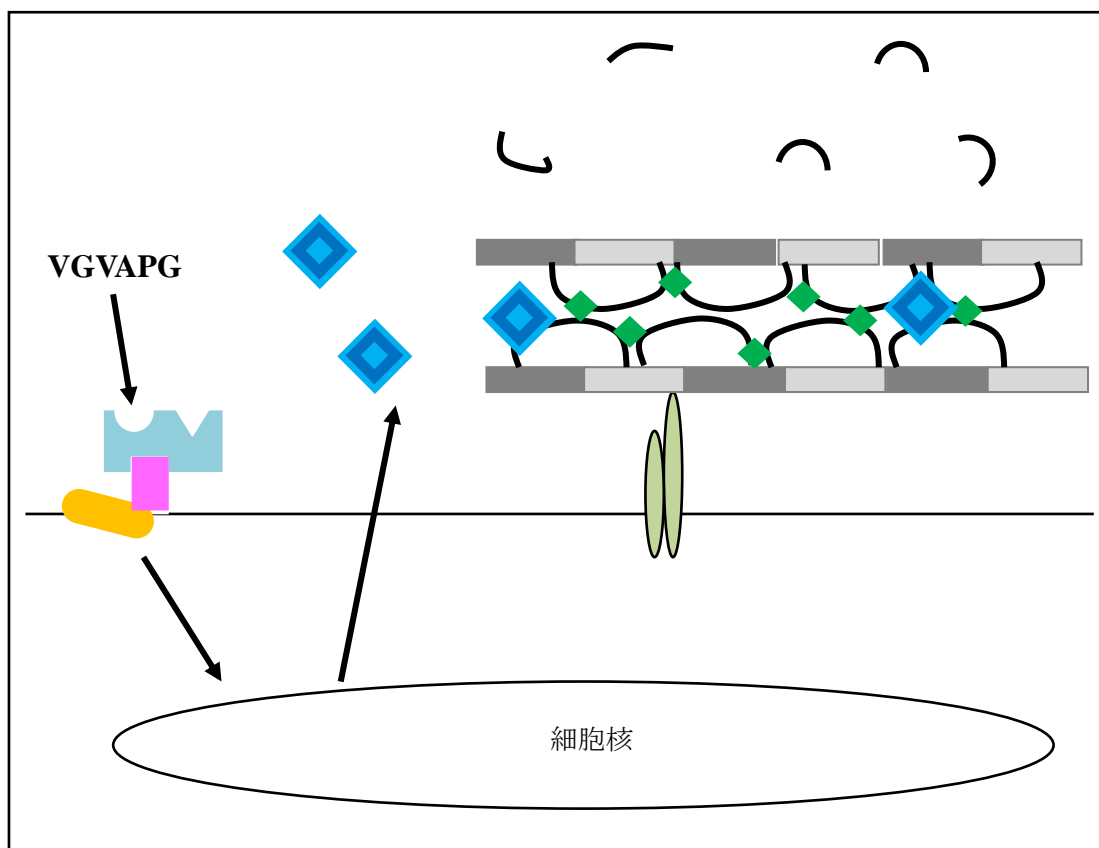


図 4-11 VGVAPG ペプチドによる MMP 産生

4-6 Collagen 添加とその他の条件における MMP 活性の違い

健康な肺では一日に約 10% の ECM 分子が代謝回転を受けているといわれている⁽²⁸⁾。この代謝回転には三つの要素が重要であると考えられおり、(1) ECM 産生と

蓄積、(2)MMP による ECM 分解、(3)TIMP による MMP 阻害である⁽²⁹⁾(図 4-12)。MMP は ECM を分解するため、疾患の発病に大きく影響すると考えられている。しかし、肺線維症などの肺の間質層の肥厚が見られる疾患においては MMP 活性の減少が見られる。

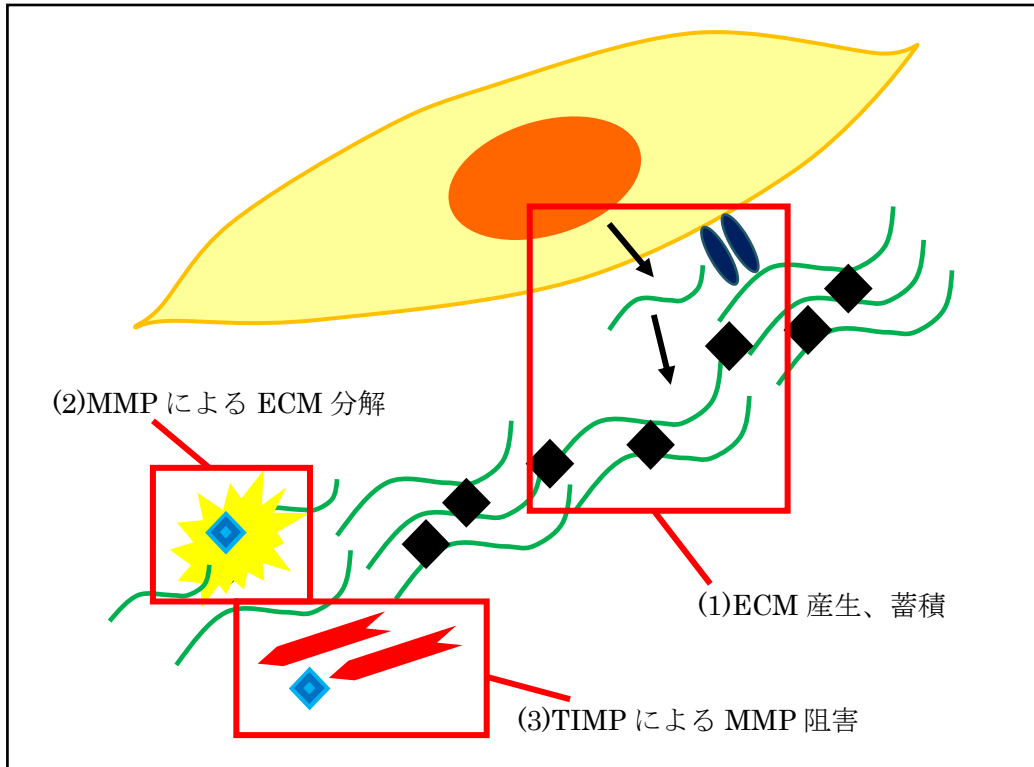


図 4-12 ECM の代謝回転の模式図

通常、線維芽細胞は分泌型の MMP-1,-2,-3 と膜貫通型の MMP-14 (MT1-MMP) のみを産生する。ECM 添加によって MMP-2 と proMMP-2 の活性が見られたが、Collagen 添加時のみ MMP-2 の下に MMP-2,-9 以外の MMP の活性が見られた(図 3-11A)。分泌型の MMP-1,-3 の酵素活性は 52,56kDa (潜在型)、41,45kDa (活性型) と 57,59kDa (潜在型)、47,45,28kDa (活性型) で見られるため、67kDa 付近に MMP 活性が見られることはない。ここで考えられる可能性として、MMP-8 と MMP-9 がある。MMP-8 は分子量 75kDa (潜在型)、65kDa (活性型) で I ~ III 型コラーゲンとゼラチンを分解する MMP である。MMP-9 は分子量 92kDa (潜在型)、84⁽¹⁰⁾,67kDa⁽³⁰⁾ (活性型) の MMP でゼラチンや IV、V、12、13 型コラーゲン、エラスチンなどを分解する MMP である。MMP-9 は IL-1 β 刺激や IV 型コラーゲン上で培養することにより、発現、活性化することが報告されている⁽³¹⁾⁽³²⁾。また、前立腺癌細胞に I 型コラーゲンを添加することにより proMMP-9 発現が上昇するという報告がある⁽³³⁾。今回の添加実験において、培地中の I 型コラーゲンが $\alpha 2$ インテグリンに認識されることで線維芽細胞の MMP-9 の活性が刺激され、図 3-11A のように MMP-2 の下にバンドが

確認された可能性が示唆される。もう一つの可能性として、MMP-8 がある。線維細胞 (Fibrocyte) が MMP-8 を産生するという報告がある⁽³⁴⁾。培地中の I 型コラーゲンがインテグリンを認識することで線維芽細胞が形質変換し、MMP-8 を産生したという可能性が考えられる。

コラーゲン添加によってインテグリンが肺線維芽細胞の MMP 活性に影響したと考えられる。

4-7 ECM 産生、蓄積と MMP の関連性

ECM が細胞外で蓄積するためには細胞内で ECM の前駆体がつくられ、細胞外に放出され細胞外で架橋されなければならない。ECM 添加によって細胞表面での ECM 蓄積 (図 3-13) が促進された可能性として二つ考えられる。

一つは添加した ECM 自身が細胞表面に蓄積した場合である。エラスチンとコラーゲンはともに前駆体として細胞外に産生され、リシロキシダーゼによって架橋され線維を形成する。エラスチンが線維を形成するためにはトロポエラスチンだけでなくリシロキシダーゼ、フィブリリン、フィブリンが必要である⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾ (図 4-13)。exon26A が欠落したトロポエラスチンは、全長のトロポエラスチンよりもフィブリンやフィブリリンの組み換えタンパク質に結合しやすいという報告がある⁽⁶⁾。そのため、添加した LE が細胞表面に存在するフィブリンやフィブリリンに結合することで細胞表面での ECM 蓄積が促進されたと考えられる。

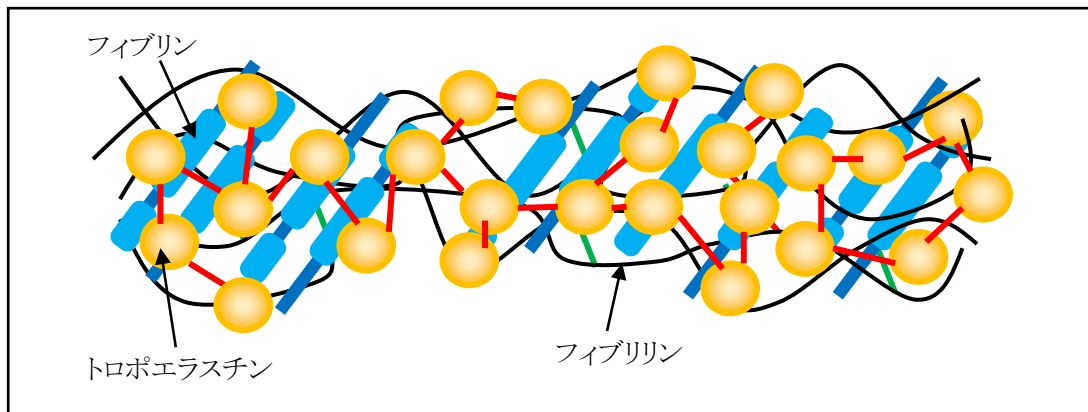


図 4-13 弾性線維

もうひとつは MMP 活性と ECM 産生バランスのコントロールによる ECM 蓄積の促進の可能性である。

現在、デヒドロエピアンドロステロン (性ステロイドホルモン) 処理によってリシロキシダーゼの mRNA が増加し MMP-2 の mRNA と活性が減少するという報告⁽³⁷⁾ や MMP-2 はフィブリリン-2 を分解するという報告がある⁽³⁸⁾。このことから MMP-2 は既存のエラスチン線維を分解するだけでなく、エラスチンの細胞上への蓄積を阻害してしまう可能性が考えられる。

MMP は細胞によって産生される TIMP やヒドロキサム酸のような阻害剤によって活性が阻害される。MMP 活性の阻害は MMP の酵素活性部位に亜鉛イオンに阻害剤がキレートを形成することで起こる。トロポエラスチンをベースとしたペプチドが MMP-2 と MMP-9 の分解からトロポエラスチンを保護するという報告がある⁽⁴¹⁾。ヒドロキサム酸は図 4-14 のような構造をしており、トロポエラスチンからつくられた阻害剤も末端がヒドロキサム酸のような構造となり MMP-2 とキレートを形成する。

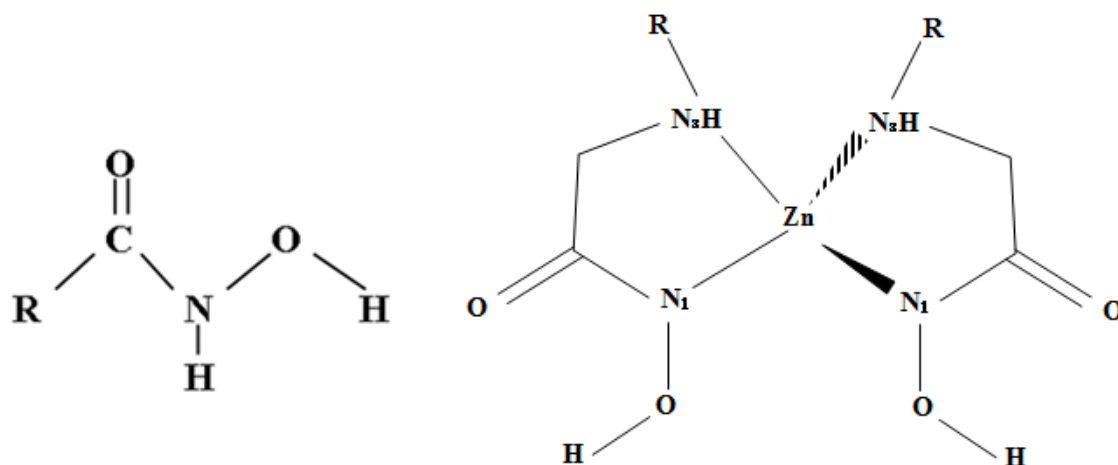


図 4-14 ヒドロキサム酸とキレート形成の例⁽⁴²⁾

LE6 を添加することによって培地中のエラスチンの産生比が上昇と細胞表面の蓄積が観察された(図 3-7、図 3-15C,D)。これは LE6 が MMP-2 の一部とキレートを形成することによって、弾性線維を形成するリシルオキシダーゼやフィブリリンの産生が MMP-2 によって阻害されず、さらに EBP によってトロポエラスチンの放出が上方制御されたため細胞表面でのエラスチンの蓄積が促進されたと考えられる。このことから、LE6 は ECM の蓄積を活性化すると考えられる。

4-8 動的刺激が細胞に与える影響

肺は日常的に伸展している臓器である。ヒトの肺は胎生 5~16 週目で肺芽が分枝し、終末細気管支まで形成される。やがて肺は終末のう期と呼ばれる 26 週目から毛細血管が密接し始め、弾性線維が現れる。この 26 週目から呼吸が行えるようになる。しかし、肺胞の 95% は出生後に発達する。このことから肺の発達には呼吸運動が必要とされており、伸展や圧縮などの機械的刺激は線維芽細胞の分化、ECM 産生、増殖に関わる。48h の伸展は I 型コラーゲンの mRNA 発現を減少させるという報告がされている⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾。これにはインテグリン関わっているとされている。今回、LE15 Coat において ECM の産生が増加した(図 3-8、図 3-9)。エラスチンはインテグリンに認識される RGD 配列を持たないため、何らかの配列が ECM 産生に影響し

たとえられる。

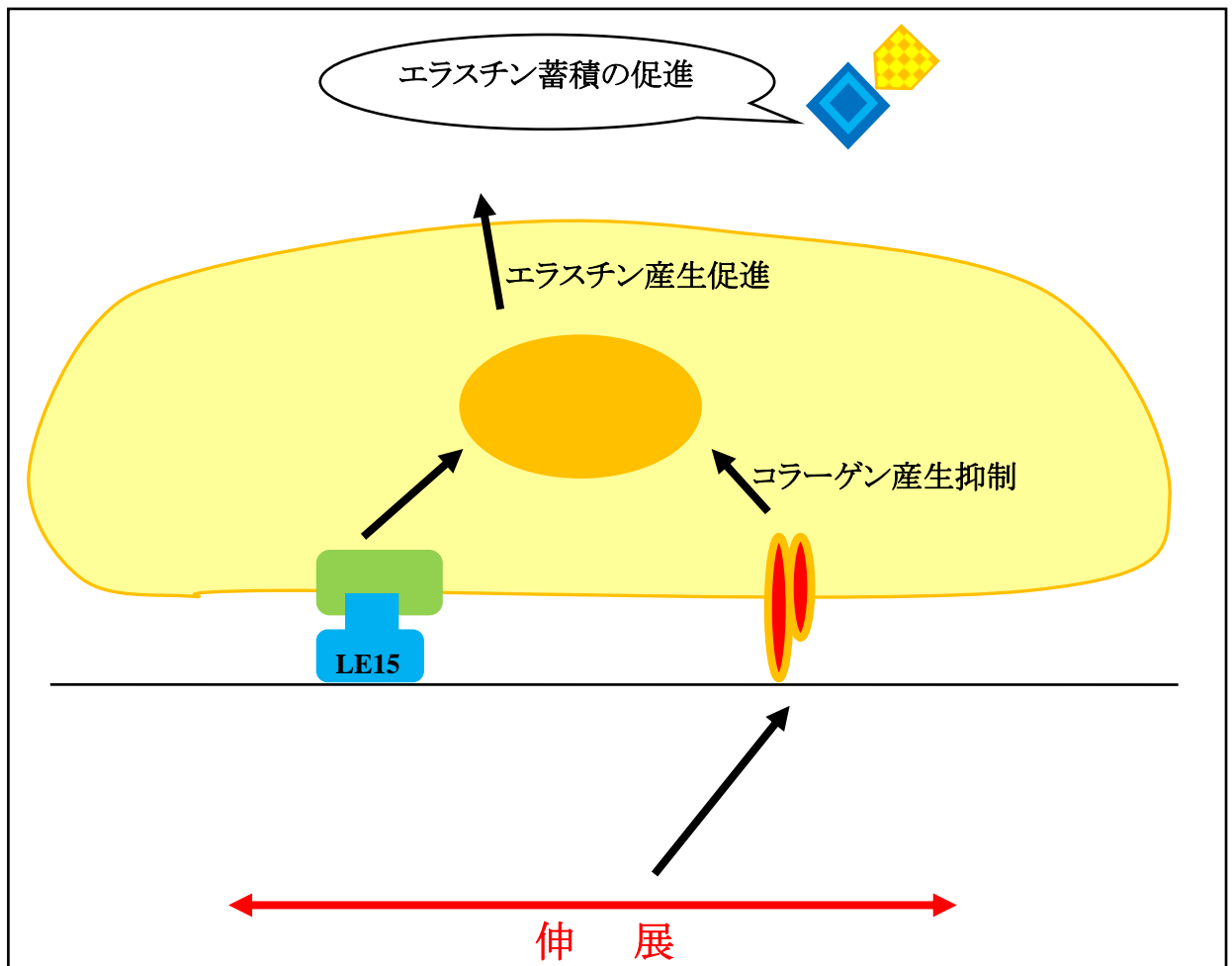


図 4-15 LE と動的刺激の効果

このことから、LE15 Coat 上の細胞に動的刺激を加えることで、LE15 によるエラスチン産生増加とインテグリンを介した動的刺激によるコラーゲン産生抑制を導き、エラスチンの産生比が増加すると予想される(図 4-15)。

また、LE6 添加によりエラスチン産生・蓄積が促進された(図 3-7、図 3-15)。動的刺激と LE6 を細胞に与えることでもエラスチン産生増加とインテグリンを介したコラーゲン産生抑制を導き、エラスチンの産生比が増加すると予想される。

以上より、LE15 は肺再生材料として、LE6 は炎症を抑え、肺組織再生を誘導する薬として利用できると期待される。

5. 結論

本研究において以下のことが分かった。

•肺エラスチンについて

LE15 は数平均分子量が 11.9kDa で疎水性ドメインを多く持ち、LE6 は数平均分子量が 10.0kDa で親水性ドメインを多く持つことが分かった。

•ECM 添加

LE6 添加は MMP 活性を変化させず、エラスチン産生と細胞表面の ECM 蓄積を促進させた。

I 型コラーゲン添加は他条件とは異なる MMP 活性を誘導し、コラーゲン産生、細胞表面のコラーゲン蓄積を促進させた。

•ECM Coat

ECM Coat では細胞応答の差が見られなかった。

以上のことから、LE6 添加は肺胞再生のための肺線維芽細胞の ECM 産生・蓄積、MMP 活性を制御することができることが分かった。

今後は、動的刺激を与えることで肺線維芽細胞のエラスチンの産生・蓄積を促進させていくと共に、形質変換を起こした細胞においても LE と動的刺激が有効であるか検証していく。

6.参考文献

- 1) <http://www.lab.toho-u.ac.jp/med/physi1/respi/respi4,5/respi4,5.html>
- 2) 牛木 辰夫、他:カラー図解 人体の正常構造と機能 I 呼吸器/日本医事新報社(2002)
- 3) 日野原 重明、他:看護のための最新医学講座〈第二巻〉呼吸器疾患/中山書店(2001)
- 4) 赤池 敏弘:生体機能材料学/コロナ社(2005)
- 5) 貫和 敏博編:臨床医のための実験医学シリーズ 11 呼吸器系の分子医学/羊土社(1993)
- 6) Sato F, *et al* The characteristics of elastic fiber assembled with recombinant tropoelastin isoform. *Clinical Biochemistry*, 2006; 39:746-753
- 7) Vrhovski, B, *et al* Biochemistry of tropoelastin. *Eur. J. Biochem.* 1998;258:1-18
- 8) Foster JA, *et al.* The regulation of lung elastin synthesis. *Am J Physiol.*1990;259:L13-23
- 9)Jing Xu, *et al.* Mechanical strain induces constitutive and regulated secretion of glycosaminoglycans and proteoglycans in fetal lung cells. *Journal of Cell Science* 1996;109:1605-1613
- 10) 上出利光、他:生体機能分子データブック 中外医学社(2001)
- 11) 鈴木紘一編:プロテアーゼと生体機能 分子から病態まで 現代化学 増刊 22/東京化学同人(1993)
- 12) 杉田憲治:血管新生とマトリックスメタロプロテアーゼ 第 120 回日本医学会シンポジウム記録集 血管新生の基礎と臨床(2001) p43-49
- 13) Mervyn JM, *et al.* Changes in elastin, elastin binding protein and versican in alveoli in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research* 2008;9:41
- 14) Cristiano FA, *et al.* Cell –based tissue engineering for lung regeneration. *Am J Physiol* 2007;292: L510–L518,
- 15) 鈴木 利光、他訳:カラー ルービン病理学 臨床医学への基盤/西村書店(2007)
- 16) Murphy, B.A *et al* The Hyperthermia-enhanced Association between Tropoelastin and Its 67-kDa Chaperone Results in Better Deposition of Elastic Fibers. *J Biol Chem* 2010;285:40282–40293
- 17) Mervyn JM, *et al.* Matrix proteoglycans and remodelling of interstitial lung tissue in lymphangiomyomatosis. *J Pathol* 2004;203:653-660
- 18) Aleksandar H, *et al.* Lysosomal Sialidase (Neuraminidase-1) Is Targeted to the Cell Surface in a Multiprotein Complex That Facilitates Elastic Fiber Assembly. *J.*

Biol. Chem 2006;281:3698-3710

- 19) Broekelmann, T.J, *et al.* Tropoelastin Interacts with Cell-surface Glycosaminoglycans via Its COOH-terminal Domain. *J Biol Chem* 2005;280:40939-47
- 20) Laurent D, *et al.* The Elastin Receptor Complex Transduces Signals through the Catalytic Activity of Its Neu-1 Subunit. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2007;282:12484–12491,
- 21) Mithieux SM, *et al.* A model two-component system for studying the architecture of elastin assembly in vitro. *J Struct Biol* 2005; 149: 282-289
- 22) Pocza, P, *et al.* Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int J Cancer* 2008; 122: 1972-80
- 23) Duca, L, *et al.* Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:235-44
- 24) Ntayi, C, *et al.* Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol* 2004;122:256-265
- 25) Bax, D. V, *et al.* Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRR motif and integrin $\alpha\beta3$. *J Biol Chem* 2009;284: 28616-23
- 26) 河戸仁志: エラスチンを用いた靭帯組織再生誘導に関する基礎的研究 平成19年度 修士論文 2007
- 27) 林正男: 細胞接着分子の世界 羊土社(1995)
- 28) Leufgen H, *et al.* Collagenase expression and activity is modulated by the interaction of collagen types, hypoxia, and nutrition in human lung cells. *J Cell Physiol.* 2005;204:146-54.
- 29) Eickelberg O, *et al.* Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol.* 1999;276:L814-24.
- 30) Y. Okada, *et al.* Matrix Metalloproteinase9 (92-kDa Gelatinase/Type IV Collagenase) from HT 1080 Human Fibrosarcoma Cells. *J. Biol. Chem* 1992;267: 21712-21719
- 31) Xie, Z, *et al.* Osteopontin inhibits interleukin-1beta-stimulated increases in matrix metalloproteinase activity in adult rat cardiac fibroblasts: role of protein kinase C-zeta. *J Biol Chem* 2003;278:48546-52
- 32) Leufgen, H, *et al.* Collagenase expression and activity is modulated by the interaction of collagen types, hypoxia, and nutrition in human lung cells. *J Cell Physiol* 2005;204: 146-54

- 33) Dong, Z, *et al.* Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. *Int J Cancer* 2001;93:507-15
- 34) Garcia-de-Alba, C, *et al.* Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes: possible role in migration and homing. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1144-52
- 35) Wagenseil, J. E, *et al.* New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2007;81:229-40
- 36) 中邨智之:器官形成における弾性線維の役割とその制御 細胞工学 2007 26 巻 1127-1130
- 37) H. Henmi, *et al.* Lysyl Oxidase and MMP-2 Expression in Dehydroepiandrosterone-Induced Polycystic Ovary in Rats. *Biol Reprod* 2001;64:157-62
- 38) E. Tsuruga, *et al.* Fibrillin-2 Degradation by Matrix Metalloproteinase-2 in Periodontium. *J DENT RES* 2007 86: 352-357
- 39) Blaauboer, M. E, *et al.* Cyclic mechanical stretch reduces myofibroblast differentiation of primary lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;404: 23-7
- 40) Xu, J, *et al.* Differential regulation of extracellular matrix molecules by mechanical strain of fetal lung cells. *Am J Physiol.* 1999;276: L728-35
- 41) Jensen SA, *et al.* Rational design of tropoelastin peptide-based inhibitors of metalloproteinases. *Arch Biochem Biophys.* 2003;409:335-40.
- 42) Brown, D. A, *et al.* A DFT study of model complexes of zinc hydrolases and their inhibition by hydroxamic acids. *Inorg Chem* 2004;43: 297-302

7. 謝辞

本研究、修士論文の作成を進めていくの中で、ご指導・ご鞭撻いただきました三重大学工学部 堀内孝教授、宮本啓一准教授に深く感謝申し上げます。堀内教授には研究に対して的確なアドバイスをいただき、宮本准教授にはアドバイスとともに動的培養装置を作製、高速液体クロマトグラフィーをしていただきました。お二人のおかげで研究を進め、よりよい修士論文を作成できただけでなく、研究にすにあたり研究者としてどうあるべきかを学ぶことができたと感じております。三年間本当にありがとうございました。

また、修士論文を発表するにあたり、副査を担当して頂いた分子生物研究室の湊元幹太先生には深く感謝しております。

本研究を進めるにあたり、水谷直紀先輩には様々な場面でお世話になり本当に感謝しています。そして、同じエラスチンをテーマとする前田裕子さん、羽多野由季子さん、石田尚志君、電気泳動を伝授してくれ、アドバイスをくれた熊澤雄基君、中村雅広君、研究生活を共に過ごした生体材料化学研究室のM2の伊藤寛之君、篠原紀子さん、永田裕子さん、山崎慎也君、生活において様々な形でサポートしていただいた村上節子さん、高速遠心分離機を貸してくださった分子生物研究室の方々、免疫蛍光染色で助けてくださった電子顕微鏡教室の小川さん、他皆様方に深く感謝いたします。

8.付録

8-1 培地、試薬の調整

[試薬・器具・機器]

- DMEM (SIGMA)
- Penicillin-Streptomycin Solution(P-S)(P-0781/SIGMA)
- Fetal bovine serum(FBS)(EQUITCH-BIO)
- Trypsin-EDTA solution (10x)(T-4174/SIGMA)
- 各種アシストチューブ(アシスト)
- 各種シリンジ(テルモ)
- 孔径 0.22 μm フィルター(Millex-GV)(SLGV025LS/MILLIPORE)
- Stericup フィルターユニット(SCGVU05RE/MILLIPORE)

[培地の調整]

- ① 凍結保存している P-S を恒温槽にいれ解凍した。
- ② 500ml の DMEM 培地に対し 5ml の P-S をシリンジで吸引し、0.22 μm フィルター滅菌を行い、DMEM 培地に添加した。
- ③ 培地の容器に開封及び添加した日付を書き、冷蔵庫で保存した。

[各溶液の調製]

●P-S

5 ml アシストチューブに 5 ml ずつ分注し、冷凍庫にて -20°C で保存した。

●FBS(牛胎児血清)の不活性化、分注、保存

[操作]

- 37°C の温水で解凍した後、数回振り、 $55\sim 56^{\circ}\text{C}$ の温水で、時折振り混ぜながら 30 分間加温した(不活性化)。
- Stericup フィルターユニットでフィルター滅菌を行い、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、滅菌状態で行った。
- 分注後の溶液は冷凍庫(-20°C)で保存した。

●Trypsin-EDTA solution (10x)

[操作]

- 37°C の温水で解凍した後、5 ml アシストチューブに 4 ml ずつ分注し、冷凍庫(-20°C)で保存した。

滅菌水の作成

- ① 脱イオン水を密閉できるガラスビン(赤蓋の 1 L メディウムビン)に入れる。
- ② 蓋をきっちり締めた後、滅菌テープで封印し $121^{\circ}\text{C}/40$ 分にて高圧蒸気滅菌を行う。

8-2. 細胞培養

[試薬・器具・機器]

- Phosphate Buffered Saline(PBS)(D-8537/SIGMA)
- セルバンカー(日本全薬工業)
- バンバンカー(日本ジェネティクス)
- 75cm² 培養フラスコ(MS-21250/住友ベークライト)
- φ35 シャーレ、各種プレート(住友ベークライト)
- DMEM (SIGMA)
- 各種遠沈管(Orange Scientific,アズワン)
- エルマ血球計算盤 (Erma)
- CO₂ インキュベーター(池本理化工業)
- 遠心機(2010/KUBOTA)
- ボルテックス(S-100/TAITEC)
- 恒温槽(BT-15/Yamato)

[継代培養 —ヒト肺線維芽細胞—]

I 細胞の洗浄

- ① 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌する。
- ② 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引する。
- ③ PBS 溶液 5 ml/25 cm² フラスコ又は 10 ml/75 cm² フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄する。
- ④ 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、洗浄液を吸引する。

II 培養細胞の剥離方法

- ① 冷凍保存してあるトリプシン 1.0 ml に PBS 溶液 9.0 ml を加え、10 倍希釈する。(以下トリプシン溶液)
- ② トリプシン溶液 5ml/25 cm² フラスコ又は 10ml/75 cm² フラスコを加え、1 分間放置する。
- ③ 顕微鏡で細胞がはがれたことを確認後、FBS 1 ml/25 cm² フラスコ又は 2 ml/75 cm² フラスコを加える。
- ④ 細胞をピペッティングで培養フラスコから剥離させる。
- ⑤ 滅菌済み 10 ml のピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15 ml 遠心管に入れる。

- ⑥ 100G(800 rpm)1 分間原則 4°C)5 分間遠心分離する。
- ⑦ 培養フラスコに DMEM 培地を入れ、37°Cの 5%CO₂インキュベート内にて放置しておく。
- ⑧ ⑥で遠心分離した上澄みをピペットで吸引する。
- ⑨ DMEM 培地を 1 ml 又は 3 ml 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う。
- 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播種し、37°Cの CO₂ インキュベート内にて培養する。

※細胞懸濁液濃度は血球計算版にカバーガラスをのせ、その隙間に培養フラスコに播種する直前の細胞懸濁液 7 μ l を注入して、顕微鏡で細胞数を測定し算出した。1 mm²の面積の細胞を数えて、液の厚みを 0.1 mm としたときの細胞懸濁液濃度は細胞測定数 $\times 10^4$ cells/ml とした。ヒト肺線維芽細胞の最適播種密度は 2,500cells/cm²である。

[培地交換と培地・懸濁液量]

培地交換

[操作]

- ① あらかじめ交換する培養培地を 37°Cの温水で温めたものを使用した。
- ② 滅菌済みパスツールで細胞培養培地を吸引した。
- ③ 細胞培養に使用する各容器に対してそれぞれ適量の培養培地を加えた。

[細胞の凍結]

細胞の凍結はセルバンカーの凍結液を用いた。

[操作]

- ① 継代培養の手順に従い、II 培養細胞の剥離方法の⑧まで行った。
- ② 上澄み液を除去し、凍結液 1 ml を加えてピペッティングすることで凍結用細胞懸濁液を作成した。
- ③ 2 ml アシストチューブに細胞懸濁液を加え、-80°Cの冷凍庫内で凍結した。

※冷凍庫の温度変化は細胞へ大きく影響を与えるため、発泡スチロールの入れ物などに入れ、凍結後の温度変化を防いだ。

〔細胞の解凍〕

〔操作〕

- ① 75cm²フラスコに DMEM を 14 ml 入れ、37°C、5%CO₂ インキュベーター内でプレインキュベートした。
- ② -80°C で凍結してあったヒト肺線維芽細胞の 2 ml アシストチューブを、37°C の温水で解凍した。僅かに氷が残る程度に加温を抑えた。
- ③ 解凍した細胞懸濁液を、あらかじめ用意しておいた 15 ml 遠沈管中の 9 ml の DMEM に加えた。
- ④ ボルテックス後、800 rpm で 5 分間遠心分離を行った。
- ⑤ 上澄み液をとり、1 ml の DMEM を加えてピペッティング後、75cm²フラスコに加えた

8-3 肺エラスチンの調整

8-3-1 肺組織からの不溶性エラスチン抽出

< 試薬・器具・機器 >

- ・5L ポリプロピレン手付きビーカー (NIKKO)
- ・圧力鍋(Pearl Plus)
- ・電気バケツ(National)
- ・電気衣類乾燥機(TOSHIBA)
- ・塩化ナトリウム(Wako)
- ・アジ化ナトリウム(Wako)
- ・99.5%エタノール(Wako)
- ・ラテックス製手袋(Ansell)
- ・フリーザーバック(Ziploc)
- ・洗濯用メッシュ(ダイソー)
- ・ざる(ダイソー)
- ・ガーゼ

< 方法 >

① 肺組織をパックのまま、水道水の入った水槽につけて解凍する。
水道水で洗浄し、肺と気道系を切り分ける。

・肺胞

血塊や余分な組織をできる限り切り取り、水道水で洗浄。

ミキサーで細かく切り刻み、肉片をザルにのせ水道水で洗浄する。

・気道系

膜性壁(柔らかいところ)とガラス軟骨(硬いところ)に切り分ける。

血塊や脂質・余分な組織をできる限り切り取り、水道水で洗浄。

* 気道の総量を量り、肺組織の総量から気道の重さを引き出した値を肺胞の重さとする。

② 肺胞をメッシュに入れ、一晩水道水で流し洗いをする。

③ 5L ポリプロピレン手付きビーカーを用意し、5L ポリプロピレン手付きビーカーに肺胞二つに分け入れる。それぞれに 10%食塩水(2.5L)を入れる。

冷蔵庫に一日静置。

④ 肺胞を濯ぎ、ザルにあげ水道水で洗浄。5L 手付きビーカーに 10%食塩水(2.5L)を入れ、そこに処理した肺胞を浸す。冷蔵庫で一日静置

⑤ 冷蔵庫からビーカーを取り出し、水を切る。

別の 5L 手付きビーカーに 10%食塩水(2.5L)を用意し、そこに移し替える。

再び冷蔵庫内で一日静置。

- ⑥ 冷蔵庫からビーカーを取り出し、水を切る。脱イオン水で洗浄。脱イオン水を肺胞と共に圧力鍋に入れ、加圧加熱を開始し、沸騰後 0.5h 煮込む。圧を抜き、圧力鍋からガーゼを乗せたざるに取り出したら、水を替え、もう一度圧力鍋に入れ、加圧加熱を開始し、沸騰後 0.5h 煮込む。
- ⑦ エラスチンの水をよく切ったらメッシュの袋ごと 5L 手付きビーカーに入れた脱イオン水で洗浄する。更に水を切り、電気バケツに移し入れ、脱イオン水を加え洗浄する。(洗浄はバケツの底が見えるようになるまで続けるのが望ましい。洗浄と洗浄の間にはエラスチンの水をよく絞っておく。)秤量。
- ⑧ 50%、70%、90%のエタノール水溶液をそれぞれ 5L 手付きビーカーに作成。メッシュの袋から出して水をよく切ったエラスチンを 5 L 手付きビーカーに移し、50%エタノール水溶液(2.5L)を入れ冷蔵庫内で 30 分静置。
50%エタノール水溶液をよく切った後、70%エタノール水溶液(2.5L)に浸け冷蔵庫内で 90 分静置。
70%エタノール水溶液をよく切った後、90%エタノール水溶液(2.5L)に浸け冷蔵庫内で一日静置。
エタノールを切る時はざるにガーゼをのせ、その上に肺を出しガーゼをしぼって溶液を切る。
- ⑨ 冷蔵庫からエタノールに浸けておいたエラスチンを取り出し、ザルにあげエタノールをよく絞り、メッシュに移して重さを量る。エラスチンを電気衣類乾燥機で乾燥させる。乾燥終了後、重さを量る。

8-3-2 水溶性エラスチンの調整

< 試薬・器具・機器 >

- ・耐圧ビン
- ・シュウ酸(Wako)
- ・5L ポリプロピレン手付きビーカー (NIKKO)
- ・ラテックス製手袋(Ansell)
- ・セルロースチューブ(三光純薬)
- ・スターラー(ADVANTEC)
- ・ミキサー(小泉成器)
- ・ふるい
- ・遠心分離機(HITACHI)

< 方法 >

- ① 乾燥した不溶性エラスチンをミキサーにかけ、粒径 1mm 程度になるまで粗く砕く。

- ② 粗く砕いた不溶性エラスチンを茶葉粉碎機で更に砕き、ふるいにかけて粒径が 600 μm 以下になるまで繰り返す。
- ③ 耐圧ビンに不溶性エラスチン粉末 40g と 0.25M のシュウ酸水溶液 80ml を加え、冷蔵庫で一晩保存し、エラスチンを膨潤させる。
- ④ セルロースチューブを切り、水道水で流し洗いする。
- ⑤ 一晩シュウ酸に浸け込んだエラスチンを耐圧ビンごと 100 $^{\circ}\text{C}$ の浴槽で 1h 加熱する(100 $^{\circ}\text{C}$ に達してから 1h とする)。このとき、熱をビン全体に行き渡らせる為に 10 分おきにビンを振って攪拌する。定期的に火力と湯温の確認をする。
- ⑥ 氷水にビンを沈め、0.5~1h 程度、エラスチンが十分に冷却されるまで置いておく。内部まで完全に冷却させる為、10 分おきにビンを振って攪拌させる。
- ⑦ 50ml 遠沈管(2 つに分ける)に移し、遠心分離(3000rpm \cdot 6min)にかける。
- ⑧ 上澄み液を透析用セルロースチューブに入れ、手付きビーカー内に溜めた水道水に浸けて流し洗いをする。このとき、水道水はビーカー内の水がちゃんと入れ替わるように多めに流す。
- ⑨ 遠沈管に残った沈殿は耐圧ビンに戻し、同濃度のシュウ酸を加えて再度 100 $^{\circ}\text{C}$ で 1h 加熱する。
- ⑩ ⑥~⑨の工程を遠沈管の沈殿がなくなるまで繰り返す。このとき、上澄み液を入れた透析チューブに加熱回数に従って番号を付けて分類しておく。
- ⑪ 上澄み液を入れた透析チューブは水道水で 2~3 日流し洗いする。
- ⑫ 脱イオン水で透析を行う。透析用の脱イオン水(外液)は毎朝と夜の 2 回交換する。このとき、外液の pH 測定を行う。
- ⑬ 透析中、チューブの下に沈殿が溜まり出したら、内液を(3000rpm \cdot 6min)にかけて濾過し、沈殿を取り除き、チューブも交換する。
- ⑭ 外液の pH が 5~6 程度で安定したら内液の pH を測定し、それも 5~6 程度なら内液を 50ml 遠沈管に入れて遠心分離(3000rpm \cdot 6min)にかける。
- ⑮ 上澄み液を膜フィルター・ガラスフィルターで吸引濾過する。このとき、上澄み液が室温で凝集を起こさないように濾過前に氷水で冷却しておく。
- ⑯ ろ液を耐圧ビンに入れ 2~3 日凍結乾燥する。
- ⑰ 凍結乾燥して出てきた水溶性エラスチンはスターラーチップを入れた容器に入れて重さを量り、その後スターラーにかけ粉末化させる。

8-4 ECM コーティングシャーレの作製と評価

8-4-1 ECM コーティングシャーレの作製

生体細胞は、接着するための足場を必要とする接着細胞と、接着なしに浮遊したまま培養可能な浮遊細胞に分類される。接着細胞は細胞外マトリックス(ECM)に接着することではじめて接着・分化・増殖といった機能を果たすため、接着細胞のECM 上での詳しい解析を行う必要がある。そこで、細胞接着もタンパクの吸着もできない浮遊細胞培養用のシャーレ表面をコロナ放電処理した後に、ECM をコーティングすることでECM のみの表面を持つシャーレを作製した。

【コロナ放電処理の原理】

シリコン、ポリプロピレン、ポリエチレン等は、その表面層に極性基を持たない為に、接着性、コーティング性、親水性が悪い等の問題があり、その表面を改質する必要がある。コロナ放電表面処理装置は、高周波高電圧を利用し、大気中にコロナ放電を発生させ、それによって生成される官能基と共に、その電子を物質表面に照射することにより物質の表面改質を行うもので、高周波高電圧の気中で、電解内にて起きる、原子、分子、電子、イオン間での衝突により、電子エネルギーの励起、光子の放出が起こる。このコロナ放電のエネルギーを物質の表面で作用させたとき、その表面がエネルギーを受け、表面エネルギーが高くなり活性化された状態(ラジカル生成)になる。そこに空気中の酸素や水分などが反応し、極性をもったさまざまな官能基が表面の濡れ性が向上する。

<浮遊培養用シャーレ>



図 8-1 コロナ放電処理前後のシャーレ表面の様子

[使用機器・器具]

- ・浮遊培養用 φ35 シャーレ (MS-80240/住友ベークライト)
- ・各種シリンジ (テルモ)
- ・Corona Fit (CFG-500/信光電気計装株式会社)
- ・0.22 μm フィルター (SVGSB1010/ステリベックス)
- ・50 ml 遠沈管 (MS-56500/SUMILON)

[使用試薬]

- ・Lung Elastin-6, -15
- ・滅菌水
- ・I 型コラーゲン
- ・5 mol/L HCl aq (081-05435/WAKO、500 ml)

[準備]

1. エラスチン溶液の調整

- ①分画水溶性エラスチンを 50 mg 秤量し、50 ml の滅菌水に溶解させた。
- ②エラスチン水溶液をシリンジで吸引し、0.22 μm フィルター滅菌を行い、滅菌水で 10 倍希釈を行い最終濃度 0.1 mg/ml にし、冷蔵庫で保存した。

2. コラーゲン溶液の調整

- ①滅菌水を塩酸により pH 3 に調整した後、0.22 μm フィルターを用いて滅菌し、50 ml 遠沈管に入れた。(4°C 保存)
- ②1mg/ml の I 型コラーゲン溶液を①で作成した希塩酸で 10 倍に希釈することで最終濃度 0.1 mg/ml のコラーゲン溶液を作成した。

[操作]

- ①浮遊培養用 φ35 シャーレの表面を 1 分間コロナ放電した。
- ②作成しておいたエラスチン水溶液、コラーゲン水溶液をそれぞれ 1.5 ml/φ35 シャーレに添加し、4°C で 5 時間静置した。
- ③コーティング溶液を吸引後、培地を 2 ml 添加し、37 °C/5%CO₂ 条件で 15 分間以上プレインキュベートした。
- ④細胞懸濁液を播種し、37 °C/5%CO₂ 条件で培養した。

8-5 色素結合を用いた細胞外マトリックス産生量の測定

8-5-1 Collagen Assay

[使用装置・器具・試薬]

- ・1.5 ml アシストチューブ
- ・50 ml 遠沈管
- ・96 穴プレート
- ・ローテーター
- ・遠心分離機
- ・マイクロプレートリーダー
- ・サンプル(培地を測定する場合、FBS 含有量は 5 %以内のものとする)
- ・Collagen Type I (Lot.001-1/ECM Lab)
- ・酢酸
- ・Direct Red 80 (Cat.No.501-68041/Wako)
- ・ピクリン酸 (Cat.No.239801-10G/SIGMA)
- ・水酸化ナトリウム

[操作]

- ①Direct Red 80 水溶液 (1 mg/ml) とピクリン酸の飽和水を 1:1 で混合し、染色液を作製した。
- ② 1.5 ml アシストチューブにサンプルあるいは 0.5M 酢酸に溶解した I 型コラーゲン(スタンダード:5-100 μ g)を最大 100 μ l 入れ、染色液を 1 ml 加えた。
- ③アシストチューブを数回上下させて混合し、ローテーターを用いて 30 分間攪拌した。
- ④12000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。
- ⑤上澄み液を除去し、1 ml の 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え、ボルテックスした。
(※上澄み液はピペットや細く丸めたキムワイプなどを用いて完全に取り除くこと。このとき、アシストチューブの側面や底に付着している沈殿物に絶対に触れてはならない。また、側面などに黄色く付着しているピクリン酸も完全に取り除く。)
- ⑥96 穴プレートに 200 μ l ずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した(波長:550 nm)。
- ⑦測定値を水の値で補正し、検量線から得られた近似曲線式に代入し、コラーゲン量を測定した。

8-5-3 Elastin Assay

[使用装置・器具・試薬]

- ・1.5 ml アシストチューブ
- ・50 ml 遠沈管
- ・96 穴プレート
- ・ローテーター
- ・遠心分離機
- ・マイクロプレートリーダー
- ・サンプル(培地を測定する場合、FBS 含有量は 5 %以内のものとする)
- ・Elastin PES-(A) (Lot.009-FEI1819/ECM Lab)
- ・TPPS(5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphinetetrasulfonic acid, disulfuric acid,tetrahydrate) (Cat.No.345-03901/Wako)
- ・クエン酸ナトリウム
- ・リン酸
- ・硫酸アンモニウム
- ・トリクロロ酢酸
- ・1-プロパノール

[操作]

- ① TPPS(1.0mg/ml)、0.1M クエン酸ナトリウム、0.1M リン酸を 3:6:1 で混合し、染色液を作製した。
- ② 1.5 ml アシストチューブにサンプルあるいは水溶性エラスチン (スタンダード: 5-100 μ g)を最大 100 μ l 入れ、4°Cに冷やしておいた 5%トリクロロ酢酸を 1 ml 加えた。
- ③ ボルテックスし、4°Cで 10 分静置した後、12000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。
- ④ 上澄みを除去し 1ml の染色液と 100 μ l の飽和硫酸アンモニウム溶液を加えた。
(※上澄み液はピペットや細く丸めたキムワイプなどを用いて完全に除去すること。このとき、アシストチューブの側面や底に付着している沈殿物に絶対に触れてはならない。)
- ⑤ ボルテックスし、ローテーターを用いて 90 分間攪拌した。
- ⑥ 12000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。
- ⑦ 上澄み液を除去し、1 ml の 1-プロパノールを加え、ボルテックスした。
(※上澄み液はピペットや細く丸めたキムワイプなどを用いて完全に除去すること。このとき、アシストチューブの側面や底に付着している沈殿物に絶対に触れてはならない。)

⑦96 穴プレートに 200 μ l ずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した(波長:550 nm)。

⑧測定値を水の値で補正し、検量線から得られた近似曲線式に代入し、エラスチン量を測定した。

8-6 細胞表面のコラーゲン、トロポエラスチンの定性評価(免疫化学染色)

[測定原理]

免疫化学染色は、特定のタンパク質を検出する方法で、各々の細胞の特異的なタンパク質を標識し、それを確認することにより細胞の同定を行う。

特定タンパクに一次抗体を認識させ、さらにその一次抗体を抗原として認識する蛍光物質を標識した二次抗体を用いる。二次抗体には特定の動物種の免疫グロブリンを認識する抗体を利用する。同じ動物種の由来の一次抗体であれば二次抗体が認識可能である。

それぞれの蛍光物質に対応する波長の励起光当て、蛍光を検出する。

(図 8-5)

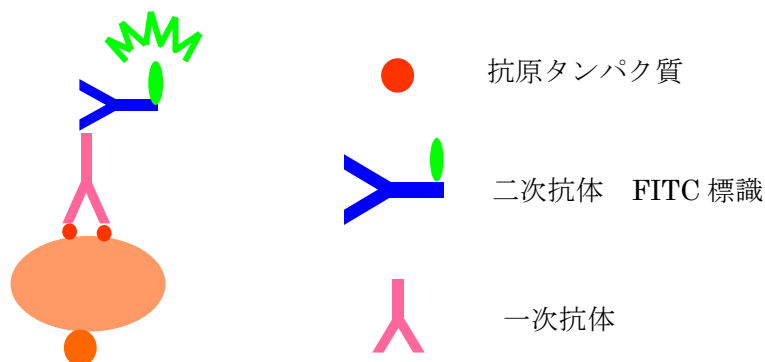


図 8-5 抗原抗体反応を用いた免疫化学染色

•FITC (fluorescein isothiocyanate)

緑色系の蛍光色素で、この色素は安定で、抗体活性を阻害せず、抗体への標識が容易で安定、蛍光効率が低い、最大吸収波長と最大発光波長がかなり離れているなどの標識用蛍光色素の要件をかなり満たしている。

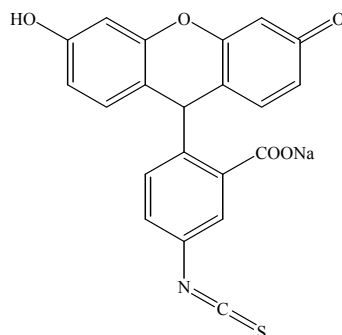


図 8-6 FITC

[使用装置・器具・試薬]

- 共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV1000 倒立顕微鏡 IX81)
- 35 φ シャーレ
- Polyclonal Antiserum to Human Tropoelastin (PR398/EPC)
- rabbit anti-Human collagen type I polyclonal antibody (AB745/CHEMICON)
- GOAT ANTI-MOUSE IgG (H+L) FLUORESCCEIN CONJUGATED SECONDARY ANTIBODY (AP308F/Lot. No. 24110620/WAKO)
- propidium iodide (PI) (P4170-25MG/SIGMA)
- acetone (WAKO)
- methanol (WAKO)
- Paraformaldehyde
- 1N NaOH
- リン酸二水素ナトリウム二水和物
- リン酸二ナトリウム十二水和物
-

[操作]

I. ブロッキング溶液の調整

- ① ウシ血清アルブミン 300 mg を調整し、PBS 30 ml に溶解させ 1%BSA/PBS を作製した (2 本作製)。
- ② ① で作製した 1%BSA/PBS に tritonX-100 を加え、1%BSA、0.02%tritonX-100/PBS を作製した。

II. 固定溶液の調整

• acetone/methanol

acetone、methanol を 15 ml ずつ加え、acetone/methanol (1:1) の固定液を作製し、 -20°C で保管した。

• 4%パラホルムアルデヒド

- ① 0.2M リン酸二ナトリウムに 0.2M リン酸二水素ナトリウムを加え、pH メーターで pH を測定しながら pH7.4 にし、リン酸バッファーを作製した。
- ② Paraformaldehyde 12g を $60\sim 65^{\circ}\text{C}$ に温めた水に浸しながら、150ml の脱イオン水に溶かした。
- ③ 大体が溶けたら NaOH を少量加え、白濁が取れるまでゆっくり加えた。
- ④ 全てが溶け、十分に溶けたらフィルター滅菌を行った。

- ⑤ ④に 0.2M リン酸バッファーを加え 300ml にし、4°C、遮光で保管した。

※作業はすべてドラフト内で行った。

III. 固定

• aceton/methanol の場合

- ① 細胞を 35 φ シャーレ上で confluence になるまで培養し、培地を取り除き PBS で洗浄した。
- ② -20°C の aceton/methanol (1:1) にて室温で 5 分間固定した後、固定液を除き 10 分間風乾した。
- ③ この状態で測定まで -4°C に保存した。(保存は 2 週間以内)

• 4% パラホルムアルデヒドの場合

- ① 細胞を 35 φ シャーレ上で confluence になるまで培養し、培地を取り除き PBS で洗浄した。
- ② 4°C で保管した 4% パラホルムアルデヒドにて室温で 15 分間固定した後、固定液を除き PBS で洗浄した。

IV. 一次抗体

- ① 1% BSA/PBS で 20 分間置換した。
- ② 細胞に 200 μl (希釈: 1% BSA、0.02% tritonX-100/PBS) の一次抗体を加え、4°C、飽和湿度で overnight させた。
- ③ 一次抗体を吸引除去し、1% BSA/PBS で 3 回洗浄した。

V. 二次抗体

- ① 二次抗体と PI を 200 μl (希釈: 1% BSA、0.02% tritonX-100/PBS) 加え、90 分間、暗所室温で放置した。
- ② 二次抗体を取り除き 1% BSA/PBS で 3 回洗浄した。
- ③ 35 φ シャーレの壁面を破壊し、ガラスシャーレに乗せた。
- ④ 共焦点レーザー顕微鏡で観察し撮影した。

表 8-3 各抗体の調整

| | 抗体名 | 希釈率 |
|------|---|-------|
| 一次抗体 | Polyclonal Antiserum to Human Tropoelastin | 1:200 |
| | rabbit anti-Human collagen type I polyclonal antibody | 1:200 |
| 核染色 | propidium iodide(PI)(10 mg/ml) | 1:200 |
| 二次抗体 | Goat anti-Mouse IgG FITC | 1:200 |

8-7 共焦点レーザー顕微鏡

〔共焦点レーザー走査顕微鏡の原理〕

普通の顕微鏡を使っていると、焦点外のぼけの重なりによるコントラストの低下がしばしば観察の障害になる。高倍率になるとなおさらである。これを解決するのが共焦点レーザー走査顕微鏡である。最大の特徴は、ぼけを排除できること、高倍率でも鮮明な画像が得られ、立体観察も容易である。切片像を無浸襲で得られるので、組織や細胞を生きたまま詳細に見ることも可能である。

原理はシンプルで、その中核になるのは点光源とピンホールの2つである。これらが巧妙に配置されている。

レーザーから出力されたビームは、光ファイバーを通して共焦点顕微鏡に導かれ、点光源として用いられる。その光をレンズによって平行光に変換し、ダイクロイックミラーによって落射照明にされ、対物レンズの試料側の焦点に収束する。対物レンズの焦点に収束した照明光は、試料の蛍光色素を励起する。そこから発した蛍光を、対物レンズが集めて結像させる。この結合位置にあわせてピンホールを置くと、ピンホールに結像した光が通過し、検出器によって電気信号に変換されたものを観察する。

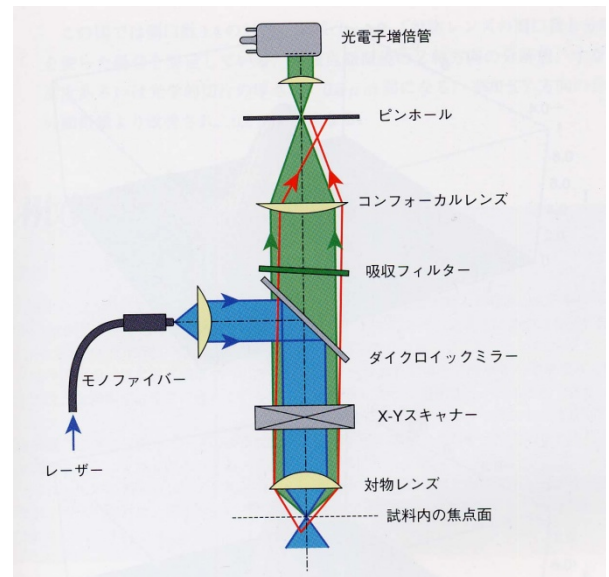
〔使用装置〕

- ・ 共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (OLYMPUS)
- ・ 倒立型顕微鏡 IX81 分光タイプ (OLYMPUS)

〔方法〕

I システムの立ち上げ

- ① パソコンを ON にした。
- ② レーザーを ON にした。
- ③ モニター上にパスワード入力画面が表示された後、水銀ランプを ON にした。
- ④ ユーザー名・パスワードを入力し WindowsXP へログオン。



User ID: Administrator

Password: fluoview

⑤



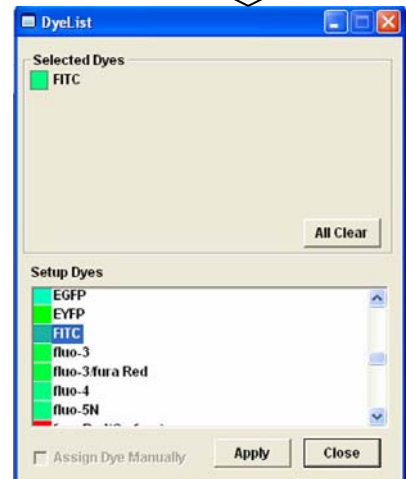
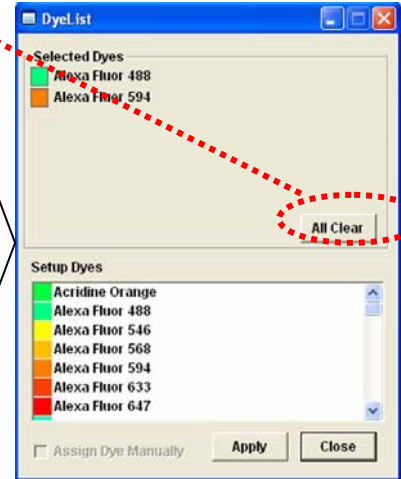
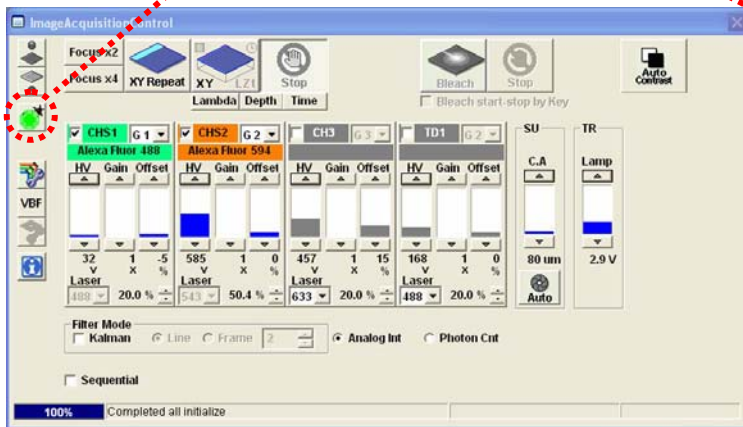
をダブルクリックしユーザー名・パスワードを入力、
FV10-ASW ソフトウェアを起動した。

User ID: Administrator

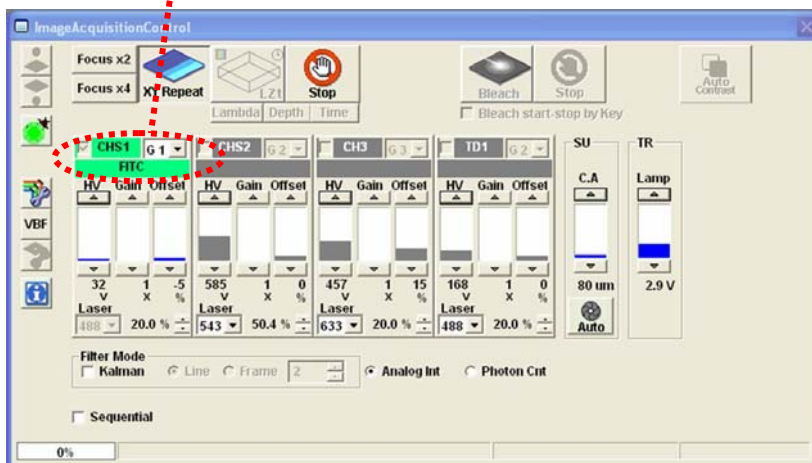
Password: Administrator

II 蛍光試薬選択

- ① DyeList ボタンをクリックし、All Clear ボタンをクリックしリセットした。



- ② DyeList パネルから観察する蛍光試薬 (FITC,PI)を選びダブルクリックした。
- ③ Apply ボタンをクリックして閉じる。
- ④ CHS1 の蛍光試薬が変更したことを確認した。



II 顕微鏡で目視観察

- ① ハンドスイッチで対物レンズを選択した。
(10,20 倍レンズ:ドライ 40,60 倍レンズ:オイルを用いた。)
- ② パソコン上のアイコンをクリックし、ハロゲンランプ、蛍光レーザーの ON、OFF をした。




- ③ 顕微鏡手前のフォーカススイッチ等によりピント調節した。

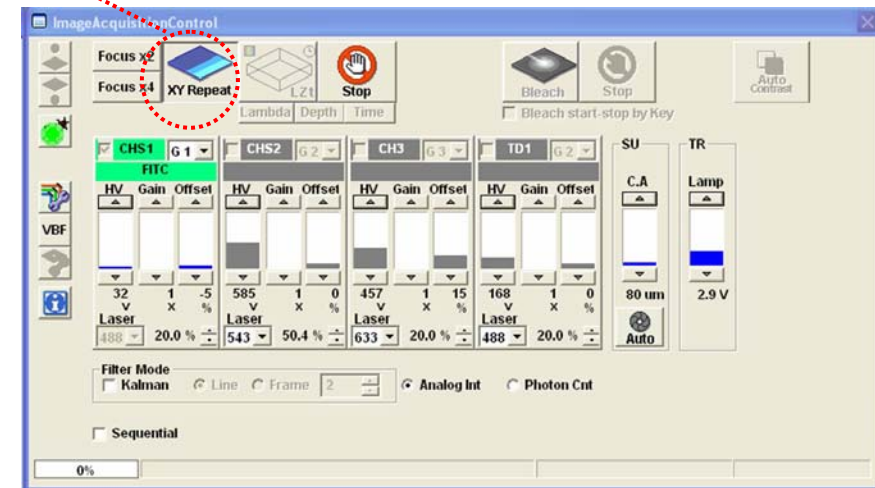
III 画像の取得(試し撮り)

- ① HV の値を FITC:700,PI550、スキャン速度 2.0us/Pixel、画素数 512by にセットした。Reser を FITC:10%,PI:30% SU80 μ m にセットした。

The screenshot shows two software windows. The 'AcquisitionSetting' window on the left contains various parameters for image acquisition, including Mode, Size, Area, Laser, LambdaScan, Microscope, and TimeScan. The 'AcquisitionControl' window on the right shows real-time control for channels CHS1, CHS2, CHS3, and TD1, including HV, Gain, Offset, and Laser settings. Red dotted lines connect the text in step 1 to the corresponding settings in the software windows.

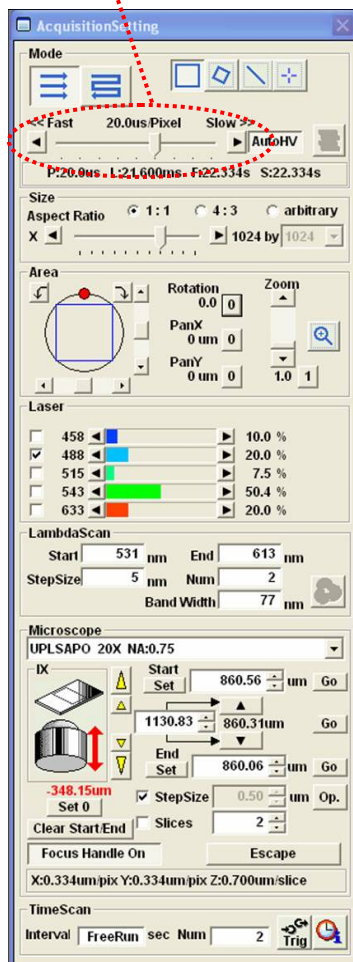
微分干渉像 TD1 の値は HV100 前後にする。
(微分干渉像が不必要の場合はチェックをはずす。)


- ②  をクリックし、画面を見ながらピントを合わせ微調整した。

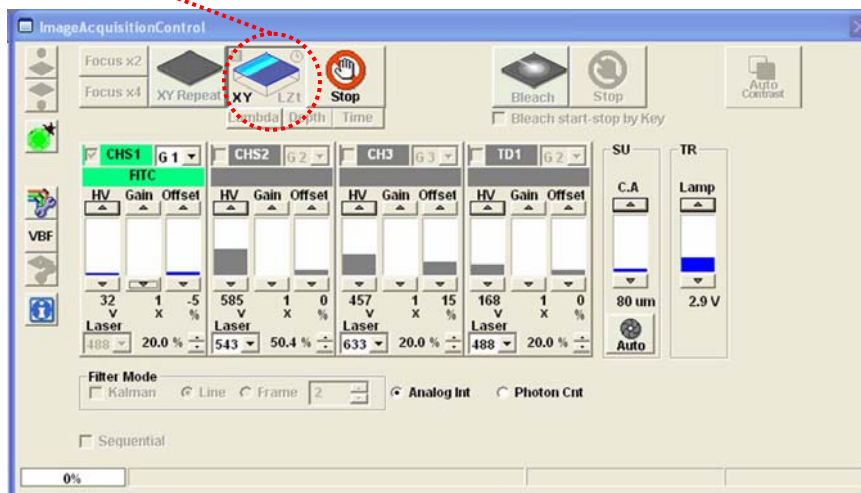


IV 画像の取得(本番)

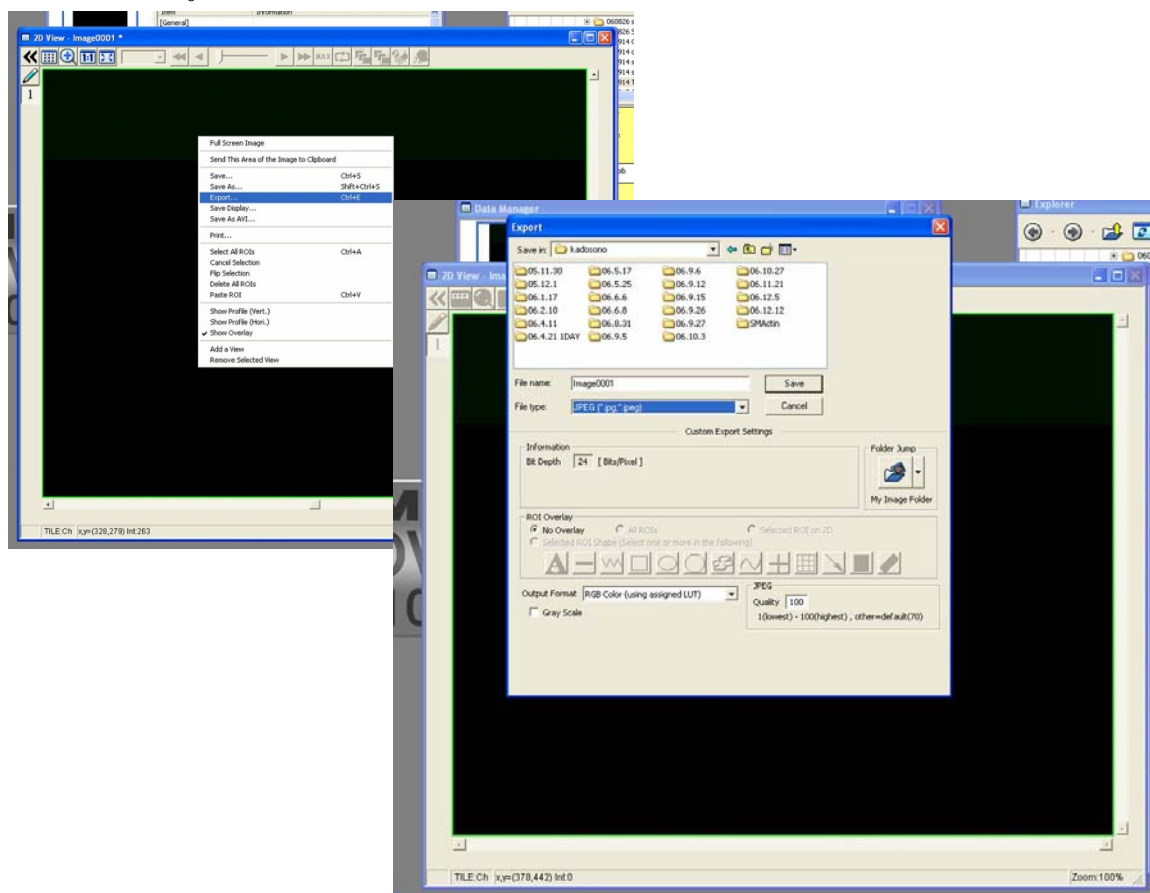
- ① 20.0us/Pixel に設定を変更した。



- ②  をクリックし、画像を取得した。



- ③ 取得した画像の上で、右クリックし Export を選択、名前をつけて保存する。



V システムの終了

- ① FV10-ASW ソフトウェアを終了した。
- ② WindowsXP を終了した (Start/ShutDown→「ShutDown」を選択)。
- ③ レーザーを OFF にした。
- ④ 水銀ランプを OFF にした。

補足

The image shows two software windows from the FV10-ASW system. The top window is 'AcquisitionSetting' and the bottom window is 'ImageAcquisitionControl'. Red dotted lines with arrows point from text annotations to specific controls in the software.

AcquisitionSetting window:

- Mode:** Includes buttons for acquisition mode and speed settings (Fast, 20.0us/Pixel, Slow) and an AutoHV button.
- Size:** Aspect Ratio (1:1, 4:3, arbitrary) and X-axis resolution (1024 by 1024).
- Area:** Includes a diagram of a field of view with a red circle and a blue square, and controls for Rotation (0.0), PanX (0 um), PanY (0 um), and Zoom (1.0).
- Laser:** A list of laser lines with checkboxes and intensity sliders: 458 (10.0%), 488 (20.0%), 515 (7.5%), 543 (50.4%), 633 (20.0%).
- LambdaScan:** Start (531 nm), End (613 nm), StepSize (5 nm), Num (2).

ImageAcquisitionControl window:

- Microscope:** UPLSAPO 20X NA.
- IX:** Includes a diagram of the microscope and a vertical scale set to -348.15um.
- Focus Handle On:** X:0.334um/pix Y:0.
- TimeScan:** Interval: FreeRun.
- Control Buttons:** Focus x2, Focus x4, XY Repeat, XY, LZt, Stop, Bleach, Stop, Auto Contrast.
- Channels:** A table of channel settings for CHS1, CHS2, CHS3, and TD1.
- Filter Mode:** Kalman, Line, Frame (set to 2), Analog Int, Photon Cnt.
- Sequential:** A checkbox that is currently unchecked.

| Channel | Group | HV (V) | Gain (x) | Offset (%) | Laser | Intensity (%) |
|---------|-------|--------|----------|------------|-------|---------------|
| CHS1 | G 1 | 680 | 1 | 0 | 488 | 20.0 |
| CHS2 | G 2 | 585 | 1 | 0 | 543 | 50.4 |
| CHS3 | G 3 | 457 | 1 | 15 | 633 | 20.0 |
| TD1 | G 2 | 118 | 1 | 0 | 488 | 20.0 |

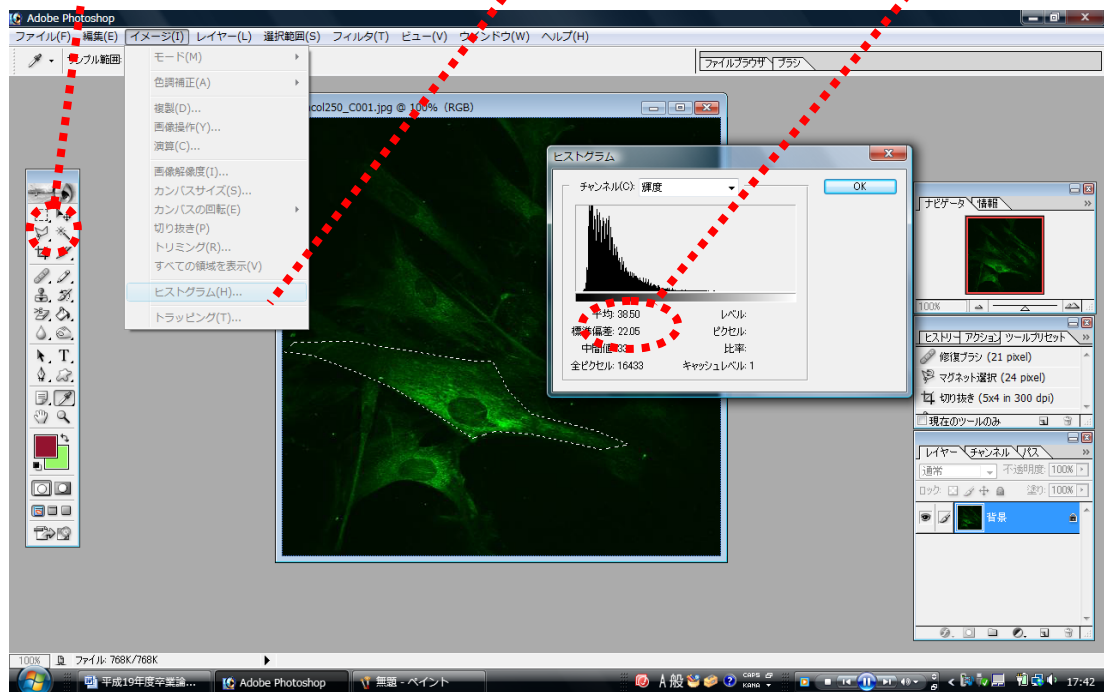
- 向き・角度の調整
試料を動かさずに撮影可能
- デジタルズーム
対物レンズを換えずに高倍率で観察可能

通常、Offset を 0 にしておく。
HV だけ値を変える。

単染色ではチェックを入れない。

8-8 蛍光強度の測定

- ① 共焦点レーザー顕微鏡で撮影した蛍光写真を adobe photoshop 7.0 で開く。
- ② 多角形選択ツールを用いて細胞を取り囲み、細胞部分を選択する。
- ③ 細胞を選択した状態のまま、[イメージ]-[ヒストグラム]で選択部分の輝度を測定した。



8-9 タンパク質の定量(BCA 法)

[使用器具・試薬]

- Spectrophotometer (SmartSpec™Plus, BIO-RAD)
- ビシニコニン酸、酒石酸ナトリウム、 Na_2CO_3 、 NaOH 、 NaHCO_3 、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)

| | | |
|--------------------------|-------|--|
| ビシニコニン酸 | 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_2CO_3 | 2g | |
| NaOH | 0.4g | |
| NaHCO_3 | 0.95g | |
| DW | 適量 | |

• B 溶液 (室温保存)

| | |
|---|-------|
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 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 (μl) | DW (μl) | 試験管1本当たり のBSA量 (μl) |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 10 | 0 |
| 2 | 8 | 2 |
| 4 | 6 | 4 |
| 6 | 4 | 6 |
| 8 | 2 | 8 |
| 10 | 0 | 10 |

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 μl 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 μ ずつ加える。

- ⑤ ボルテックスで攪拌する。
- ⑥ 37°C、30分で静置する。
- ⑦ OD₅₆₂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。

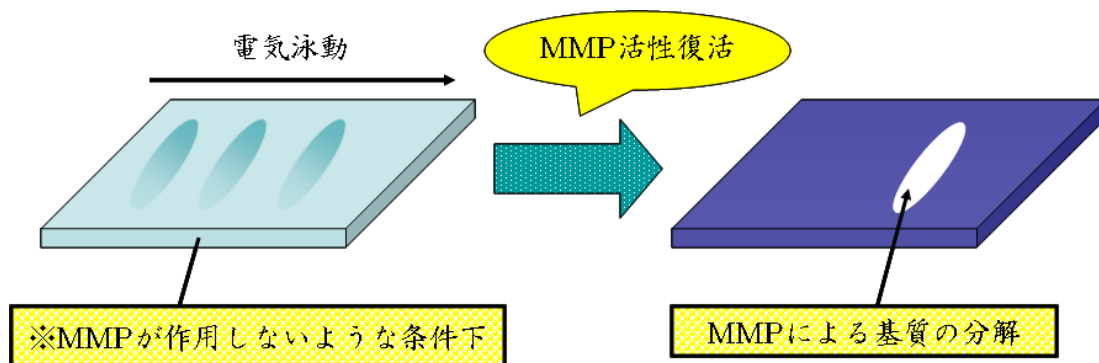
* Spectrophotometer (SmartSpec™Plus, BIO-RAD) 操作方法

1. 電源を入れる
2. λ 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 μ 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

8-10 Gelatin Zymography を用いた MMP 活性の測定

[測定原理]

MMP は 37°C、pH7.5～8.0 の条件下でゼラチンやコラーゲンなどの基質を分解する酵素である。不活性条件下で基質(ゼラチン)を含むゲルにサンプルを電気泳動によって分画する。電気泳動後にゲルを活性化条件下におくことで、MMP がゲル中のゼラチンを分解する。このゲルを染色すると、MMP 活性が見られる部位は白抜きのバンドが見られる。



[使用装置・器具・試薬]

- ・ゲル板(前面ガラス板、ミミ付ガラス板)、
- ・シリコンガセット、
- ・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
- ・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)
- ・CBB-R250(クマシーブリアントブルー)
- ・TritonX-100

[操作]

I. 各溶液の調整

- ・アクリルアミド/bis アクリルアミド溶液

アクリルアミド 58g と bis アクリルアミド 2.0g を脱イオン水で溶解し、200ml にする。

- ・separating buffer

Tris54.5g、SDS1.2g 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。

- ・staging buffer

Tris6.0g、SDS0.4g 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。

•10×ゼラチン基質溶液

ブタの皮膚のゼラチン 800mg をガラス容器内で 100ml の脱イオン水に溶解する。均一に染まったバックグラウンドを得るため、ゲルへの取り込みの前に完全にタンパク質を溶解する。溶液が沸騰するまで電子レンジで加熱する(吹きこぼれないようにする)。タンパク質が溶液に溶解するように回す。

•スクロース溶液

スクロース 50g と NaN_3 0.02g を ~50ml の脱イオン水に溶解する。トルエン 30 μ l を加え、脱イオン水で 100ml にする。

•10%(w/v)過硫酸アンモニウム

過硫酸アンモニウム 0.5g に 5ml の脱イオン水を加え溶解する。

•泳動バッファー

Tris3.0g、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、SDS1.0g を加え、溶解させる。

•染色溶液

クマシーブリリアントブルーR-250(0.125%) 2.5g を混合物(メタノール 1.25l、酢酸 0.5l、脱イオン水 0.75l)で溶解する。

•脱色溶液

メタノール 1.5l、脱イオン水 3.5l、ギ酸 50ml を混合する。

•Sample loading buffer

SDS(2%) 0.2g とブロモフェノールブルー(0.1%) 0.01g を stacking gel buffer 5ml に溶解し、グリセロール 5ml を加える。

•APMA

4-アミノフェニル水銀アセテート(20mM) 7mg に NaOH (80mM)1ml を加え溶解する。

•酵素復元バッファー

Developing buffer に Triton X-100 を 25ml 加える。

•Developing buffer

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(50mM) 6.055g、NaCl(200mM) 11.69g、ZnCl 0.7mg、 $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5mM) 0.74g、 NaN_3 (0.02%) 0.2g を ~900ml の脱イオン水で溶解し、HCl で pH7.5 に合わせる。脱イオン水で 1000ml にする。

II. 電気泳動

- ① 以下の表に従って separating gel、stacking gel を作製する。ただし、TEMED はこの時点では加えない。separating gel をアスピレーターで

脱気する。

| 溶液 | 単位 | Separating gel | | | | Stacking gel |
|-----------------------|----|----------------|------|------|------|--------------|
| | | 6.0 | 7.5 | 10.0 | 12.0 | |
| アクリルアミド/bis アクリルアミド溶液 | ml | 2.4 | 3 | 3.96 | 4.83 | 0.426 |
| Separating gel | ml | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| Stacking gel | ml | | | | | 0.855 |
| 10× ゼラチン基質溶液 | ml | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 0 |
| スクロース溶液 | ml | 2.58 | 2.58 | 2.58 | 2.58 | 0.855 |
| 脱イオン水 | ml | 2.82 | 2.22 | 1.26 | 0.39 | 1.284 |
| 10%(w/v)過硫酸アンモニウム | μl | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 |
| TEMED | μl | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 4.5 | 9 |
| 合計 | ml | 12 | 12 | 12 | 12 | 3.471 |

- ② ゲル板を組み立てる。
- ③ separating gel に TEMED を加え、素早く混ぜゲル板に注ぐ。上から脱イオン水を薄く注ぐ。固まるまで 1 時間 30 分ほど静置。この間に separating gel をアスピレーターで脱気する。
- ④ n-ブタノールの上澄みを捨て、静かに水ですすぐ。stacking gel に TEMED を加え、素早く混ぜ直ちに注ぐ。空気が入らないように注意しながらコームを差し込む。1 時間 30 分静置。
- ⑤ サンプルに 20mM の APMA 1μl を加え、1~4h 37°C でインキュベートする(サンプルのタンパク濃度を合わせる)。サンプルと同じ量の sample loading buffer を加える。
- ⑥ ゲルを泳動槽にセットし、陽極バッファー、陰極バッファーを注ぐ。
- ⑦ サンプル、分子量マーカー、MMP マーカーをセットする。
- ⑧ 20mA でブロモフェノールブルーが底に着くまで泳動する。
- ⑨ ゲルを板からはずし、酵素還元バッファーで洗浄する。室温、30min×1、20min×3 回で洗浄。
- ⑩ Developing buffer へ移し、37°C で 30min インキュベート。
- ⑪ の Developing buffer を捨て、新しく Developing buffer を注ぎ 37°C でインキュベート。24~48h。Developing Buffer に含まれる Tris は温度によって pH が大きく変わるので、37°C でインキュベートしてから 30min 後に Buffer の pH を測る(37°C で pH7.5~8.0 にする)。
- ⑫ Developing buffer を静かに捨て、染色溶液を加える。室温、20~30 分。
- ⑬ 完全に脱色させる。室温、2h 以上。