

生体関連フリーラジカルの動的イメージングと評価

富田 勉

2018年 2月

筑波大学大学院博士課程

数理物質科学研究科博士論文

博士(工学)

生体関連フリーラジカルの動的イメージングと評価

富田 勉

物性・分子工学専攻

目次

| | |
|-----------------------------------------------------------|---|
| 第1章. 緒言 | 1 |
| 1-1 はじめに・目的 | 1 |
| 1-2 本論文の構成 | 1 |
| 第2章. 背景 | 3 |
| 2-1 はじめに | 3 |
| 2-2 細胞内フリーラジカル発生場所と消去 | 3 |
| 2-2-1 ミトコンドリアは最大のフリーラジカル発生源 | |
| 2-2-2 フリーラジカルの消去経路 | |
| 2-2-3 NOXs は膜に存在する | |
| 2-2-4 NOS は細胞質に存在する | |
| 2-3 フリーラジカル・活性酸素種の検出方法 | 4 |
| 2-3-1 各種検出方法 | |
| 2-3-2 蛍光プローブ | |
| 2-4 生体内ライブイメージング | 5 |
| 第3章. イメージングの先行検討事例 | 6 |
| 3-1 好中球の食菌と食胞内殺菌 <i>in vitro</i> | 6 |
| 3-1-1 方法概略 | |
| 3-1-2 結果概略 | |
| 3-2 好中球性炎症と ROS 産生 (Oxidative burst) <i>in vivo</i> | 7 |
| 3-2-1 方法概略 | |
| 3-2-2 結果概略 | |
| 3-3 がん細胞の運動と細胞内 ROS 濃度 | 8 |
| 3-3-1 方法概略 | |
| 3-3-2 結果概略 | |
| 第4章. インドメタシンに起因する生体内での ROS 発生と消化管組織傷害 ... | 9 |
| 4-1 はじめに | 9 |
| 4-1-1 NSAIDs 起因性消化管粘膜傷害 | |

| | |
|--------------------------------------------|----|
| 4-2 方法 | 10 |
| 4-2-1 材料と試薬 | |
| 4-2-2 小腸粘膜傷害モデル作成とイメージング方法 | |
| 4-2-3 脱落粘膜上皮細胞のフローサイトメトリーによる評価 | |
| 4-2-4 エバンスブルーによる腸管病変部検出 | |
| 4-2-5 統計的解析 | |
| 4-3 結果 | 12 |
| 4-3-1 インドメタシンによるマウス小腸傷害 | |
| 4-3-2 ライブイメージングによる空腸粘膜組織の ROS 検出と死細胞検出 | |
| 4-3-3 フローサイトメトリーによる物理的擦過による脱落細胞の検出 | |
| 4-4 考察・小括 | 15 |
| 4-4-1 細胞死と病変形成 | |
| 4-4-2 ミトコンドリア由来 ROS の関与 | |
| 4-4-3 小括 | |
| 第5章. ホモシステインによる酸化ストレスと骨芽細胞機能 | 17 |
| 5-1 はじめに・ホモシステインとは | 17 |
| 5-1-1 ホモシステインの代謝 | |
| 5-1-2 ホモシステインの毒性 | |
| 5-1-3 ホモシステインによる小胞体ストレス | |
| 5-1-4 ホモシステインと骨質 | |
| 5-3 方法 | 19 |
| 5-3-1 材料と試薬 | |
| 5-3-2 細胞培養 | |
| 5-3-3 アポトーシス検出 | |
| 5-3-4 細胞内 ROS の検出 | |
| 5-3-5 カスパーゼ活性化の測定 | |
| 5-3-6 長期培養におけるリジルオキシダーゼおよびペントシジンの免疫染色 | |
| 5-3-7 遺伝子発現解析 | |
| 5-3-8 ウェスタンブロット | |
| 5-3-9 統計的解析 | |
| 5-4 結果 | 21 |
| 5-4-1 ホモシステインが誘導する MC3T3-E1 細胞のアポトーシス | |
| 5-4-2 アポトーシスおよび ROS 生成に対する Bazedoxifen の作用 | |
| 5-4-2 長期培養での Lox 発現に対する Hcy の作用 | |
| 5-5 考察 | 29 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 5-5-1 骨芽細胞のアポトーシス | |
| 5-5-2 コラーゲン架橋と骨質 | |
| 5-5-3 エストロゲン、SERMs の抗酸化作用 | |
| 5-6 小括 | 31 |
| 第6章. 血管内皮細胞での一酸化窒素 NO の生体内可視化 | 32 |
| 6-1 はじめに | 32 |
| 6-1-1 目的 | |
| 6-1-2 瘀血とは | |
| 6-1-3 生体内での NO イメージングの先行検討例 | |
| 6-1-4 一酸化窒素 NO 検出蛍光プローブ | |
| 6-2 方法 | 35 |
| 6-2-1 材料と試薬 | |
| 6-2-2 マウス皮下血管の血流ライブイメージング | |
| 6-2-3 ラット腸間膜血管での血流動態と NO 産生のライブイメージング | |
| 6-2-4 統計的解析 | |
| 6-3 結果 | 37 |
| 6-3-1 マウス皮下血管での桂枝茯苓丸の血管拡張作用と血流改善作用 | |
| 6-3-2 ラット腸間膜血管での桂枝茯苓丸の NO 産生促進作用 | |
| 6-4 考察・小括 | 38 |
| 第7章. まとめ | 41 |
| 7-1 総括 | |
| 7-2 今後への展望 | |
| 参考文献 | 43 |
| 謝辞 | 50 |

第1章

緒言

1-1 はじめに・目的

生きていることの本質は常に動いていることである。生命を構成する分子は絶えず組み換わり変化しながら平衡が保たれている。その絶え間ない動きは酸化還元反応の連鎖、つまり電子の流れによっている。真核生物の全ては酸素呼吸によって効率よくエネルギーを得ており、高分子中の電子はミトコンドリアの電子伝達系に送られ、最終的に酸素に受け渡されて酸素は水分子に還元される。この過程で電子が漏れ出すと不完全に酸素を還元して、他から電子を奪い取る力が極めて強いフリーラジカルや活性酸素種が生じ自らを傷つけることになる。生命はこれを消去する系を獲得して極めて危険な酸素の利用を可能にした。そればかりではなく、自ら酵素を使って積極的にフリーラジカルを作り出しその反応性の高さを利用するシステムを獲得した。細胞内のシグナル伝達、細胞運動、細胞間のシグナルとしても利用し、生体の全ての動きをフリーラジカルが作り出していると言っても過言ではない。それゆえに制御のバランスを失えば直ちに細胞死、疾病、老化に繋がる。

本研究者は生命現象を動きとして捉え理解することを目指して、長年に渡って顕微鏡を用いた映像撮影に携わってきた。生化学・分子生物学が解明してきた生命の仕組みは、動きの中でこそ確認される。また動きの中にこそまだ説明できない解明すべき課題が見出されると考えている。フリーラジカル、活性酸素種の研究の目覚ましい成果は、生命の動的なシステムを動かす分子の変化の背景にある酸化還元反応の連鎖を明らかにしてきた。本研究者は見て来た生命の動きの背景でその生理的、病理的变化を動かしている酸化還元反応を同時に可視化して見たいと思った。そのことで生命の仕組みの理解に役立ち、社会に貢献できるに違いないと考えた。

そこで、本研究者がこれまで行ってきた安価な装置でも可能なイメージングと蛍光プローブなどの既存の可視化技術を組み合わせ、細胞レベルから生体レベルまでフリーラジカルが作用する各段階で動的に生体反応との関連性を示すことで、生命の仕組み、老化や疾病の機序、治療法、予防法を探るアプローチとすることを目標とし、本研究はその基礎を構築するために、細胞、生体組織の各レベルで、フリーラジカルの画像化と、フリーラジカルが関与する生理的、病理的生体反応のイメージングを併せて行い評価することとした。

1-2 本論文の構成

2章では、本研究の背景として、現在知られている細胞内で生成されるフリーラジカルの主な発生源と、既知の生理的、病理的な役割を概説する。加えて、フリーラジカル、活性酸素種の検出方法と可視化方法について概略を述べる。

3章では、本研究の基になった、これまで本研究者らにより開発してきた生体反応を生きたまま観察する方法に、機能分子の蛍光プローブを適用して動的に可視化、観察した前例を簡略に述べる。

1つは食細胞のファゴゾーム内での活性酸素による殺菌作用 *in vitro*、*in vivo* での可視化。
もう1つは、細胞内活性酸素濃度が細胞の動きに与える影響について、がん細胞の膜運動で解析したものである。

4章では、

本研究の一翼として、外因性に加えた薬剤がミトコンドリア機能を障害することにより起こる活性酸素種の上昇と組織傷害について、ミトコンドリアの電子伝達系に影響を与えることが *in vitro* で知られるようになった非ステロイド系抗炎症薬；**nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs** の一つインドメタシンを取り上げ、動物モデルを用いて *in vivo* で消化管組織傷害とミトコンドリア由来活性酸素種の間接的な関係を述べる。

5章では、

内因性の酸化ストレス起因物質の中で最も重要なものの一つとされ、動脈硬化などの血管病や各種生活習慣病との関係が注目されているホモシステインについて、背景となる代謝経路と酸化ストレスとしての作用の概略を述べたのち、新たに高ホモシステイン血症との関連が明らかになった骨粗鬆症性の骨折リスクについて、*in vitro* で骨芽細胞株を用いて活性酸素種の発生源、細胞生存・機能に対する作用を述べる。これに対してエストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節薬；**selective estrogen receptor modulators, SERMs** の作用を併せて検討した。

第6章では、

血管内皮細胞の一酸化窒素 (NO) 産生を実験動物の生きた血管で *in vivo* で可視化し評価する方法について、血流改善作用が知られている漢方薬桂枝茯苓丸 (けいしぶくりょうがん) の作用に関連して述べる。前章で述べたホモシステインの主な作用点は血管内皮機能の障害にあると言われており、各種疾患と密接に関係する血管内皮機能の評価、解析系の構築を目指した。

第7章では、

本研究のまとめと今後の展開について述べる。あらゆる生命現象の背景にある酸化還元反応の連鎖の生理的、病理的な役割を理解する上で、生命現象を時間軸で動的に捉えることの意義を述べる。

第2章

背景

2-1 はじめに

この章では、細胞内で生成されるフリーラジカルの発生源と、既知の生理的、病理的な役割を概説する。加えて、フリーラジカル、活性酸素種の検出方法と可視化方法について概略を述べる。

2-2 細胞内フリーラジカルの発生場所と消去

スーパーオキシドアニオン superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$ は生体内で最初に発生するのフリーラジカルとして、その後の連鎖反応の起点になることから大変重要である。その細胞内の主な発生源は、ミトコンドリアと細胞膜の NAD(P)H oxidases, NOXs である。

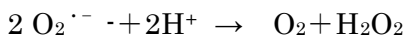
NOXs は生体膜に複合体を作り酵素活性を発揮する。細胞質には nitric oxide synthase, NOS があり、活性窒素種、一酸化窒素; nitric oxide, NO を生成するが、状況により $O_2^{\cdot-}$ を生成する。その他キサンチンオキシダーゼなどがある。小胞体も発生源となる[1]。

2-2-1 ミトコンドリアは最大のフリーラジカル発生源

細胞内の最大のフリーラジカル発生場所はミトコンドリア電子伝達系である[2]。クエン酸回路から NADH として回収した電子は電子伝達系 complex I : NADH dehydrogenase に受け渡され、内膜と外膜の間隙にある CoQ を経由して complex III : ubiquinol-cytochrome-c reductase に渡され、最後はチトクローム c ; cytochrome c から complex IV: cytochrome b oxidase により、 $1/2O_2$ に 2 個の電子が渡されて H_2O となる。この過程で電子が漏れ出し、フリーラジカルの発生源となるのは complex I と complex III である[3]。漏れ出した 1 電子が O_2 を還元するとスーパーオキシドアニオン superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$ が生成される[4, 5]。

2-2-2 フリーラジカルの消去経路

$O_2^{\cdot-}$ は不対電子を持ち、他から電子を奪い取って安定しようとするため反応性が高く危険なフリーラジカルである。これを消去するためにミトコンドリアにはミトコンドリア特異的に $O_2^{\cdot-}$ を消去するマンガンスーパーオキシドジスムターゼ; manganese superoxide dismutase, MnSOD が存在し、直ちに過酸化水素 hydrogen peroxide (H_2O_2) に不均化される。



SOD は $O_2^{\cdot-}$ を酸素 (O_2) と過酸化水素 (H_2O_2) に不均化する酵素で、活性中心にマンガンイオン (Mn SOD)、または銅イオンと亜鉛イオン (Cu/Zn SOD) のような金属イオンを持つ。細胞質に存在する SOD は Cu/Zn SOD である。 $O_2^{\cdot-}$ や H_2O_2 はミトコンドリア外膜を透過して細胞質に拡散する。 H_2O_2 はカタラーゼ catalase やグルタチオンペルオキシダーゼ glutathione peroxidase, GPx により H_2O に無毒化される。 H_2O_2 は比較的安定で細胞内に留まってレドックスシグナリングと呼ばれるジスルフィド結合を介したシグナル伝達のメディエーターとしても働く[6, 7]。しかし何かの要因で消去系を上回って $O_2^{\cdot-}$ の生成が高まり H_2O_2 が上昇すると、いわゆる酸化ストレスとなって種々の活性酸素種 reactive oxygen species, ROS が生成される。 H_2O_2 は金属イオンの存在下でヒ

ドロキシラジカル hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$ を生じる[8]。

$\cdot\text{OH}$ は極めて反応性が高く傷害性が強い。生体分子をラジカル反応の連鎖に巻き込み、最終的に生体膜の脂質を過酸化し DNA を損傷して細胞を傷害する。

2-2-3 NOXs は生体膜に存在する

NADPH oxidase, NOX は NADPH から電子の供与を受けて、 O_2 に付与し $\text{O}_2^{\cdot-}$ を生成する。ミトコンドリアに並び 2 大発生源となっている。NOX は複合体を形成して生体膜に存在して働き、7 つのアイソフォームが知られており状況により発現調節されている。酵素的に積極的にフリーラジカルを生成し、その反応性の高さを細胞内シグナル伝達などの生理的に重要な反応の進行に利用している。[9]。またアクチンの脱重合に働いて細胞膜の運動に関わり、エンドソームの形成や遊走運動などを制御していることがわかっている [10][11]。NOX2 は貪食細胞の食胞に於いて $\text{O}_2^{\cdot-}$ を生成し、Myeloperoxidase, MPO により次亜塩素酸 HOCl を生成して細菌などの異物を消毒殺菌する生体防御で重要な役割を担う [12]。しかし貪食細胞の過剰な活性化は炎症性疾患の原因にもなっている。フリーラジカルの過剰産生は各種病態に関与する。

2-2-4 NOS は細胞質に存在する

Nitric oxide synthase, NOS は NADPH から電子の供与を受けアルギニンと O_2 からフリーラジカルである一酸化窒素; nitric oxide, $\text{NO}\cdot$ を生成する。発現する細胞により 3 つのアイソフォームが知られている。血管内皮細胞に発現する eNOS、神経細胞に発現する nNOS、もう一つは免疫細胞で炎症部位で発現誘導される iNOS である。eNOS, iNOS は恒常的に発現しており恒常性の調整に働いている。 $\text{NO}\cdot$ はさらに $\text{O}_2^{\cdot-}$ と反応して傷害性の高いパーオキシナイトライト; Peroxynitrite anion, ONOO^- を生じる。免疫細胞では異物除去に働く一方で組織を障害して炎症の増悪にも働く。 $\text{NO}\cdot$ は細胞間のシグナル伝達物質として働き、神経細胞ではシナプス間隙で生成される。また血管内皮細胞で生成される $\text{NO}\cdot$ は、隣接する血管平滑筋に働き血管を弛緩させる。血小板の凝集抑制にも働き血流の恒常性を保つ重要な役割をになっており、この機構の機能不全は糖尿病などの発症に関連していると考えられている [13]。NOS は補酵素 BH4 とともに二量体を形成して $\text{NO}\cdot$ を産生するが、酸化ストレスが存在するとアンカップリングな状態となり $\text{O}_2^{\cdot-}$ を生成するようになる [14]。 $\text{NO}\cdot$ 供給不足となる上、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ と ONOO^- を生じ細胞を傷害する。

血管内皮細胞の $\text{NO}\cdot$ 産生が担う血管内皮機能の低下は、動脈硬化、慢性腎臓病、糖尿病などの生活習慣病をはじめ、アルツハイマー病などの神経変性疾患、癌化など、様々な疾患や老化に関与すると考えられている [15]

2-3 フリーラジカル・活性酸素種の検出方法

2-3-1 各種検出方法

フリーラジカルおよび活性酸素種は反応性が高く、消失が速く捕えるのが難しい。

ESR スピントラッピング法：

ラジカルをスピントラップ剤で補足し、安定な別の化合物に取り込ませた状態で寿命を伸ばして、電子スピン共鳴法; electron spin resonance, ESR で測定するもので、スペクトル波形によりラジカル種を特定できるという特徴を持つが、イメージングには適用できない。

8-OHdG :

遺伝子 DNA のグアニン塩基の 8 位の炭素が酸化されたもので、活性酸素による DNA 損傷が起こったことの証拠。修復の過程を経て尿中に排泄されバイオマーカーとして有用。in vitro の細胞系にも使用可能だが、抗体染色のためライブイメージングに適さない。

4-HNE :

ラジカルによって脂質が過酸化された痕跡を残骸を特異抗体で検出できる。反応の現場を見ることができない。抗体染色のためライブイメージングに適さない。

化学発光法 :

ルミノールなどの発光試薬を反応させる。高感度の測定が可能だが、イメージングにはフォトンカウンティングカメラや、高感度冷却 CCD が必要。

2-3-2 蛍光プローブ

様々な蛍光プローブが開発され、市販されているので、それを利用する。

多くはフリーラジカルにより酸化を受けると無蛍光だった試薬が蛍光物質に変わる、蛍光物質が切り出されることを原理としている。不可逆的な反応で一旦蛍光物質に変化したものは再度検出できる形に戻らないものがほとんどで、例えばカルシウムイオン濃度の検出指示薬のように、その場の濃度のモニタリングに用いることはできない。試薬により自己発光などの問題もあり、事前の検討が必要になる場合もある。

本研究で使用した蛍光プローブについては後述する。

2-4 生体内ライブイメージング

最近では、in vivo イメージングというと 2 光子顕微鏡などの最新装置を用いた蛍光イメージングが主流になっており、目覚ましく進歩している。しかし、装置が高価でまだ誰もが利用できるものではない。蛍光のみのイメージングの欠点としては、無蛍光のものは見えないということである。筆者は、その以前より透過光により無染色の材料を用いて主に明視野顕微鏡で、生体内のライブイメージングを行ってきた。透過光で観察が可能な部位は限られるが、安価な装置を用いても細胞単位で映像を得ることができる。この伝統的な手法に分子可視化を可能にする蛍光プローブを適用することで、全体の動きの中での分子の挙動を見ることができる。逆に言えば、分子の挙動によって、他の部位にどのような変化が起こるか、注目する対象を蛍光染色により限定しなくても、全体を見渡し影響の及ぶところを見つけることができるということになる。さらに言えば、通常装置で撮影可能な材料は 2 光子顕微鏡のような高価な装置でもすぐに撮影可能だということになる。事実、通常の蛍光顕微鏡で明視野画像と蛍光画像を撮影するのと同じ方法で作成した撮影素材は、そのまま共焦点レーザー顕微鏡で観察することができる。

第3章

イメージングの先行検討事例

この章では、これまでに行ったイメージングの前例を紹介し、本研究の基になる技術の概略を述べる。

3-1 好中球の食菌と食胞内殺菌 *in vitro*

これまでに NOX が関与する好中球の食胞内で生成する ROS について、検出試薬として Aminophenyl Fluorescein (APF)[16]を用いて *in vitro*, *in vivo* で動画による画像化を行い結果を得ている。APF はそれ自体ほとんど自家蛍光がなく $O_2^{\cdot-}$ や NO^{\cdot} とは反応せず、 $\cdot OH$, $ONOO^{\cdot}$, $\cdot OCl$ の強い反応性を持つ ROS と反応して蛍光を発するようになる。

3-1-1 方法概略

ROS の蛍光プローブとして APF を使用。

ラット腹腔に 5%カゼインを注射して好中球を誘導し 16 時間後に回収した。

シャーレで黄色ブドウ球菌と 10%FBS 含 RPMI1640 培地 (Sigma Aldrich) 中で共培養した。

培地中に APF 10 μM を添加した。

共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Zeiss, Germany) で、40 倍対物レンズでタイムラプス撮影した。

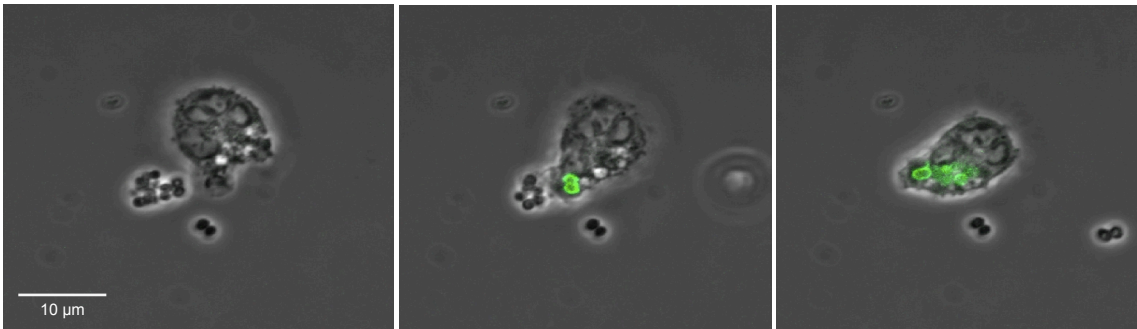


Fig. 1 好中球の食菌に伴い産生される ROS による蛍光

ラット腹腔から調整した好中球と黄色ブドウ球菌を共に培養し APF (10 μM) を培地に含ませた。

3-1-2 結果概要

培地中に含まれる APF はほとんど蛍光を発しなかったが、好中球の食胞内に取り込まれた瞬間に、黄色ブドウ球菌の菌体に接して強い蛍光が観察された。MPO により $O_2^{\cdot-}$ から $\cdot OCl$ が発生する瞬間を可視化できた (Fig. 1)。

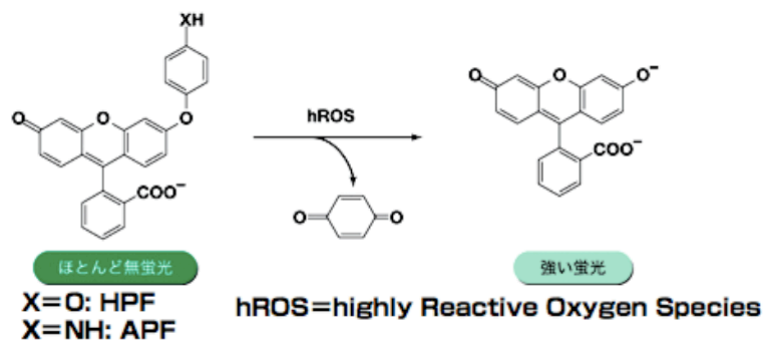


Fig.2
APFとHPFの構造と蛍光検出原理

| ROS | HPF | APF | DCFH |
|-----------------|-----|------|------|
| $\cdot OH$ | 730 | 1200 | 7400 |
| $ONOO^-$ | 120 | 560 | 6600 |
| $\cdot OCl$ | 6 | 3600 | 86 |
| 1O_2 | 5 | 9 | 26 |
| $O_2^{\cdot -}$ | 8 | 6 | 67 |
| H_2O_2 | 2 | <1 | 190 |
| NO | 6 | <1 | 150 |
| ROO^{\cdot} | 17 | 2 | 710 |
| Autoxidation | <1 | <1 | 2000 |

Table 1
各種活性酸素種に対する検出感度

五稜化学のホームページより
<http://goryochemical.com/products/rosfluor/hpf-apf.html>

APFは強いラジカルにより蛍光を発するようになる。ここでの使用目的は食胞内で産生される $\cdot OCl$ だったので、APFを選択した。

3-2 好中球性炎症とROS産生 (Oxidative burst) in vivo

3-2-1 方法概略

ラットをウレタン皮下注射で麻酔し、腸間膜を体外に引き出し、顕微鏡下に広げた。観察局所にCINC-1 (ラットIL-8様ケモカイン) を100 ng (10 $\mu g/mL$ \times 10 μL) 滴下した。好中球の血管外遊走を確認して、APFを滴下した (25 μM \times 20 μL)。通常の蛍光顕微鏡装置 (B2 フィルター、対物10倍) でタイムラプス撮影した。

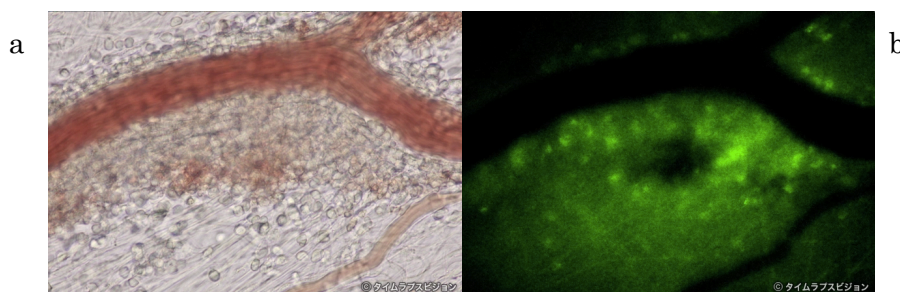


Fig. 3 ラット腸間膜での好中球 Oxidative burst
CINC-1を滴下し、血管外に遊走した好中球にAPFを作用させた。a, 明視野画像。b, 蛍光画像

3-2-2 結果概略

血管外に遊走した好中球から激しく ROS が放出される Oxidative burst が観察され、組織傷害により血管から微小出血が起こった。

蛍光プローブを *in vivo* 適用するにあたり、DCFH も試してみたが、自己酸化による蛍光の増大が激しく、特に *in vivo* の検出には適さなかった。そのため、以降の本研究の検討については APF を使用した。

3-3 がん細胞の運動と細胞内 ROS 濃度

細胞膜の運動に対する ROS の作用について、正常細胞より細胞内 ROS 濃度が高まっているがん細胞において先行研究を行なった。

3-3-1 方法概略

ラット正常胃粘膜細胞株 RGM-1 細胞と、これを親株にがん様変異を起こさせた RGK-1 細胞[17] の、細胞膜先端の動きをタイムラプス撮影によって記録し比較した。APF の蛍光強度から細胞内 ROS 濃度を比較した。

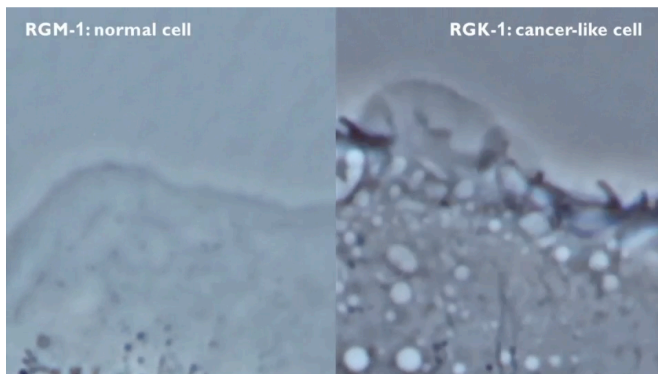


Fig. 4 細胞周囲の膜運動

左：RGM-1, 正常ラット胃粘膜細胞

右：RGK-1, がん様変異細胞

がん様細胞では細胞膜先端の ruffling 運動が非常に激しいことが示された。ミトコンドリアの MnSOD を強制的に発現増強したがん細胞株を用いて検討したところ、細胞内 ROS 濃度が高いほど、膜運動が激しいことがわかった。NOX 阻害剤では抑制されなかったことから、ミトコンドリア由来の ROS であっても細胞内濃度が高まると細胞運動に関与することがわかった[18]。

一連の映像をまとめたコンテンツ "CancerDance" はアメリカ細胞生物学会 American Society for Cell Biology (ASCB) 主催の科学映像コンテストで 2011 年の 1st prize を獲得した。

以上のような検討例を参考に次章からの本研究課題に取り組んだ。

第4章

インドメタシンに起因する生体内での ROS 発生と消化管組織傷害

4-1 はじめに

この章では、生体内の組織におけるミトコンドリアに由来する ROS 生成と組織傷害、病変形成について、インドメタシンによる小腸粘膜傷害を例に *in vivo* ライブイメージングを用いた方法で論じる。

インドメタシンをはじめとする NSAIDs はミトコンドリアの電子伝達系に影響を与え、ROS の生成を増加させることが *in vitro* の実験で明らかになってきた。そこでインドメタシンについて、動物モデルを用いて *in vivo* で消化管組織傷害と ROS の関係を検討した結果を述べる。

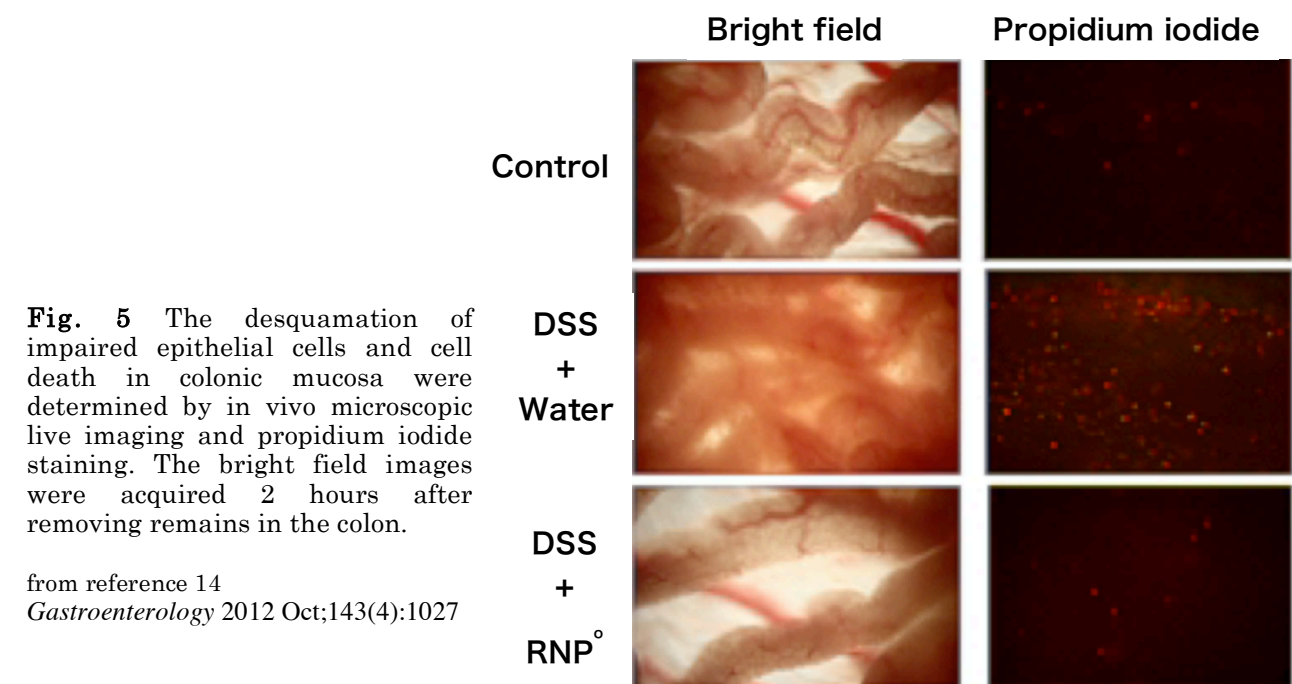
4-1-1 NSAIDs 起因性消化管粘膜傷害

アスピリンやインドメタシンなどの非ステロイド性抗炎症薬; **nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs** は、関節炎、炎症、および心臓血管保護のために最も一般的に処方されている薬物である[19]。しかし、長期にわたる投与は潰瘍やびらんなどの消化器合併症を引き起こすことが知られてる[19]。NSAIDs 起因性粘膜傷害の病態生理は、胃粘膜では NSAIDs によるシクロオキシゲナーゼ; **Cyclooxygenase, COX** 阻害によるプロスタグランジン **E2; prostaglandin E2, PGE2** の産生抑制のために、粘膜におけるムチン産生などの防御因子が減弱し、攻撃因子である胃酸によって粘膜上皮細胞が傷害されるためと説明されてきた[20]。実際、ヒスタミン- H_2 受容体アンタゴニストまたはプロトンポンプ阻害剤による酸分泌の阻害が病変の形成を有意に阻害することが示されている[21,22,23]。近年のカプセル内視鏡検査およびダブルバルーン内視鏡検査による臨床研究により、胃ばかりではなく小腸でも潰瘍及びびらん形成を含む NSAID 誘発性粘膜損傷が、以前に予想されたよりも頻繁に起こることが明らかにされた[24, 25]。小腸には酸分泌はなく、保護因子と攻撃因子のバランス理論は適用できず新たな説明が必要とされている。小腸での出血は止血術が難しく致命的であると報告されている[26]ため、小腸における粘膜傷害をも説明する病態生理の解明が望まれる。NSAIDs はミトコンドリアの電子伝達系 **Complex I** を障害して ROS を発生させる[27]。さらに *in vitro* の培養胃粘膜細胞において、NSAIDs は細胞内 ROS 生成を上昇させ直接粘膜上皮細胞を傷害する。この傷害を胃粘膜保護剤として臨床で処方されているレバミピドが抑制するが、レバミピドはミトコンドリアに局在するマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (**MnSOD**) の発現を上昇させることがわかり[28]、ROS の消去により粘膜細胞の保護に働くことが考えられた。そのため、一つの説として NSAIDs がミトコンドリアからの ROS 産生を上昇させ、粘膜細胞機能を障害することが考えられている。そこで *in vitro* で確認された NSAIDs による ROS 生成と細胞障害が、より高次の構造である生体内の組織においてどのように消化管粘膜傷害の病態に関連するのかを *in vivo* で知ることを目的に、NSAIDs の一つであるインドメタシンを投与することによりマウス小腸傷害モデルを作成して、粘膜上皮の ROS 生成と細胞傷害、組織傷害との関係をライブイメージングにより検討した。

4-1-2 粘膜傷害の先行検討例

動物を生かしたまま 2 点以上の時間ポイントで経過を観察し比較することにより、ある 1 点の時間ポイントの比較では違いが無いように見える場合でも、その後の時間経過による変化に違いが見出される場合があり、状態を知る上で重要な手がかりとなる。先行事例として **Dextran sodium sulfate (DSS)** の投与により誘発されるマウス大腸炎モデルで、大腸粘膜の傷害を顕微鏡ライブイメージングで検討した事例では、顕微鏡下で観察を開始した直後は下痢を発症したマウスの大腸粘膜でも明らかな傷害像が認められなかったが、その後の時間経過により下痢発症マウスでは粘膜上皮細胞が多数剥離して大腸内腔に脱落した。これを **Propidium Iodide** で染色して検出することで、正常マウスとの違いを評価することができた[29] (Fig. 5)。

そのため今回のインドメタシン起因性の小腸粘膜傷害モデルにおいても、この方法を参考にして同様に時間経過による違いを評価した。



4-2 方法

4-2-1 材料と試薬

インドメタシン Indomethacin は和光純薬（大阪、日本）より、Aminophenyl fluorescein, APF は積水メディカル（東京、日本）より購入した。Propidium iodide, PI は Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) から、Guava ViaCount reagent は EMD Millipore (Burlington, MA, USA)よりそれぞれ購入した。レバミピド Rebamipide は大塚製薬（東京、日本）より提供いただいた。ウレタン Urethane は Sigma-Aldrich より購入した。

4-2-2 小腸粘膜傷害モデル作成とイメージング方法

雌性 7 週齢 ICR マウスを日本エスエルシー（浜松、日本）から購入し、23℃±2℃、湿度 50% ±10%、12 時間の明暗サイクルの条件下で予備飼育した。インドメタシン及び rebamipide を 0.5%

カルボキシメチルセルロース (CMC) に懸濁した。マウスに indomethacin を 20 mg/kg の用量でゾンデを使って経口投与した。レバミピド投与群では、indomethacin 投与の 10 分前に rebamipide 30mg/kg を経口投与した。コントロール群は 0.5%CMC を投与した。処置を受けたマウスは、自由摂食、飲水の条件で飼育を続け、12 時間後に蒸留水に溶解したウレタンを 1.75 g/kg の割合で背部皮下に注射して麻酔を施した。腹部を剃毛後、電気メスを用いて 1.5 cm ほど正中線に沿って腹膜に切開を加え、小腸を体外に引き出した。腸管の観察部位に長軸に沿って約 2 cm の長さで電気メスで切開し、粘膜面を直視できるようにした。残存する腸管内容物を粘膜を傷つけないように物理的に除去し、生理食塩水を滴下して粘膜表面を静かに水彩画用筆 NR2 (サクラクレパス、大阪、日本) でなぞり洗った。残存した生理食塩水をろ紙で吸引した後に生理食塩水で 5 μ M に調整した APF を 20 μ L 滴下した。滴下から 15 分後に粘膜面を正立型蛍光顕微鏡 Optiphot (ニコン、東京、日本) で B2 フィルターセットを用いて APF の蛍光画像を撮影し、同じ視野で明視野画像を撮影した。その後マウスを生かしたまま 34°C に保ったプレートの上で 90 分間静置し、その間に細胞死した粘膜上皮細胞を検出する目的で生理食塩水で 5 μ g/mL に調整した propidium iodide (PI) を 10 μ L 粘膜面に滴下して、G フィルターセットを用いて PI の蛍光画像を撮影した。実験は 3 度繰り返し行い再現性を確認した。取得した画像からランダムに選んだ 6 視野で蛍光強度を ImageJ 1.45s software (NIH, USA) を用いて計測した。

4-2-3 脱落粘膜上皮細胞のフローサイトメトリーによる評価

粘膜上皮細胞の脱落のしやすさを以下の方法で確認した。ライブイメージングと同様の処置により小腸粘膜を露出し、洗浄する。水彩画用筆 NR2 を用いて粘膜面の一定領域 (長軸方向 1 cm \times 幅 0.5 cm) を 10 回なぞり、筆に付着した脱落細胞を 1 mL の生理食塩水に再浮遊させ、この操作を 3 回繰り返して脱落細胞を回収した。これを Guava ViaCount Reagent で染色し、Guava EasyCyte Mine system (Guava Technologies, Hayward, CA, USA) を用いてフローサイトメトリーを行い、細胞数を計測した。

4-2-4 エバンスブルーによる腸管病変部検出

Indomethacin を投与したマウスの消化管粘膜傷害部位の検出を従来から動物モデルにおいて汎用されているエバンスブルーの血管外への漏出による評価法 [30, 31] で確認した。概略を記せば次のように行った。生理食塩水に 1% で溶解したエバンスブルー Evans blue (東京化成工業、東京、日本) を 0.05 mL を Indomethacin 投与 12 時間後のマウスに尾静脈注射した。15 分後にマウスをペントバルビタールの過剰投与により致死させ、腸管を摘出した。胃から盲腸までの腸管を長軸方向に腸間膜結合部位の反対側で切開し、生理食塩水で内容物を洗浄して粘膜面を露出させた。エバンスブルーの漏出により青色に染色された領域を粘膜傷害部位として肉眼的に確認した。

4-2-5 統計的解析

結果は、平均 \pm 平均標準誤差 (SEM) で表わした。グループ間の相違についての統計的評価は、一元配置分散分析を行った後、Turkey 法を用いて検定を行った。すべての統計的検定において、P 値 < 0.05 を統計的に有意であると判定した。

4-3 結果

4-3-1 インドメタシンによるマウス小腸傷害

インドメタシン経口投与後 12 時間のマウスでは、小腸下部の回腸に穿孔を含む重度の潰瘍が形成され、肉眼的にも腸管の外側から漿膜を通して病変部位を確認できる場合もあった。典型例を Fig. 6a に示す。静脈内に投与したエバンスブルーは潰瘍形成部分で粘膜面に漏出し、潰瘍は視覚化することができた。病変は腸管内容物が貯留していた小腸下部に集中しており、内容物の貯留が無い小腸上部の空腸では検出されなかった。

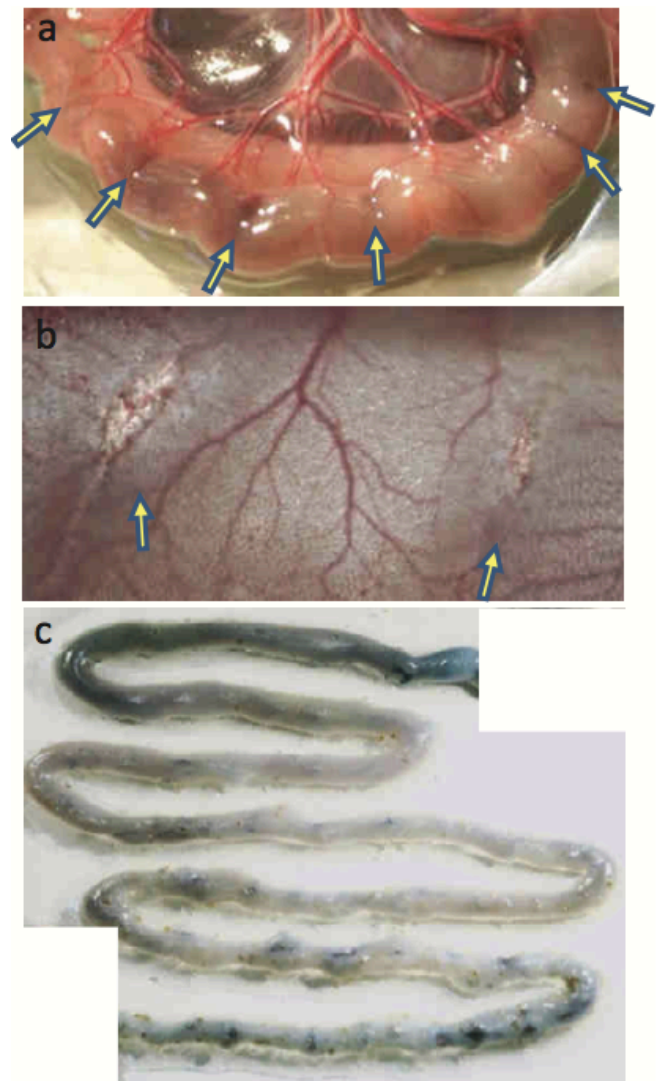


Fig. 6 The images of the small intestines 12 hours after indomethacin administration.

(a) The ulcers associated with intestinal contents developed in the lower small intestine. The arrows indicate the perforations confirmed from the outside of intestinal tract. (b) The perforations in the mucosa observed from inside of intestinal cavity by using microscope. (c) Image of the small intestine with evans blue staining. The mouse was administrated 0.01 mL of 1% Evans blue 15 min before sacrifice. longitudinal incision was performed to show the mucosal surface of small intestine. The typical leakages of dye were observed in the lower part of small intestine.

4-3-2 ライブイメージングによる空腸粘膜組織の ROS 検出と死細胞検出

上記の結果を考慮して、エバンスブルーの漏出のない、従来法では傷害が確認できない小腸上部空腸で粘膜の状態を知るために顕微鏡ライブイメージング観察を行った。空腸粘膜を明視野顕微鏡で拡大してライブイメージング観察しても目立った損傷は認められなかったが (Fig. 7 a, b, c)、粘膜面に APF を滴下して蛍光を観察したところ、インドメタシン投与マウスでは粘膜上皮細胞内に

強い蛍光が認められ ROS 濃度が高いことがわかった。これに対し溶媒投与のコントロールではほとんど蛍光が認められず、レバミピドを事前投与したマウスでは蛍光が弱かった (Fig. 7 b, e, h)。そのまま 90 分間放置し、PI 染色をしたところ、インドメタシン投与マウスでは剥離して腸内腔に脱落し集積した粘膜上皮細胞の死細胞が多数染色された (Fig. 7 c, f, i)。一方コントロールでは絨毛の先端に PI 染色陽性の死細胞がわずかに検出されるのみだった。またレバミピド事前投与マウスではインドメタシン単独よりも PI 陽性細胞が少なかった。蛍光強度を視野毎に計測し集計したところ、ROS の生成量を表す APF の蛍光強度はインドメタシン投与でコントロールに比べ有意に高く、レバミピドの事前投与はこの上昇を有意に抑制した (Fig. 8 a)。死細胞数を反映する PI 画像の蛍光強度の比較でもインドメタシン投与群で有意に高く、レバミピド投与で有意に抑制された (Fig. 8 b)。

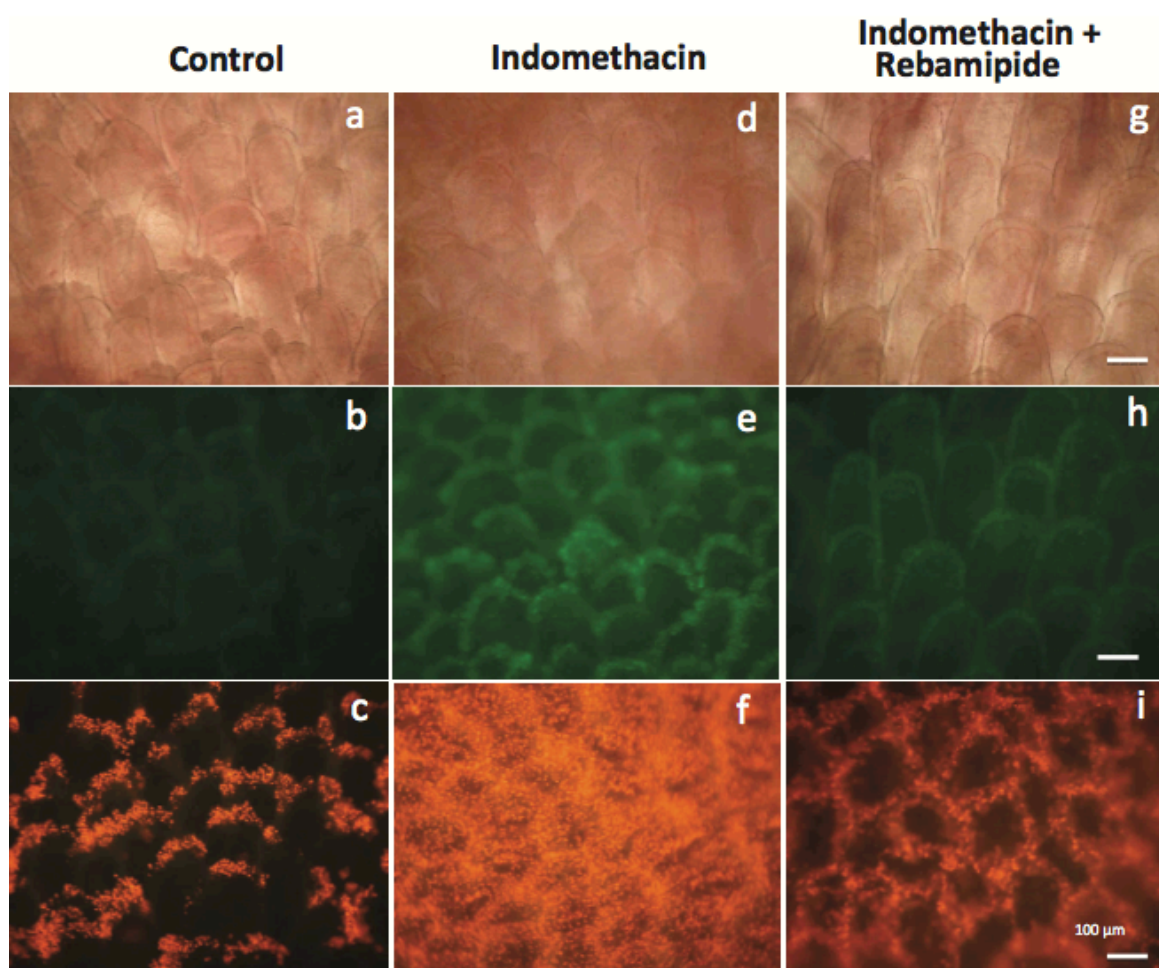


Fig. 7 Representative images of live imaging of mouse small intestine (jejunum).

(a), (d), (g): Bright-field images 12 hours after po administration of indomethacin or vehicle. (b), (e), (h): Fluorescence images after application of APF on the mucosal surface for 15 min. The epithelial cells producing ROS were observed. (c), (f), (i): PI fluorescence images taken 90 min after the initial mucosal clean up. The dead cells were shown as fluorescent dots. Scale bar: 100 μm; magnification of each image is same.

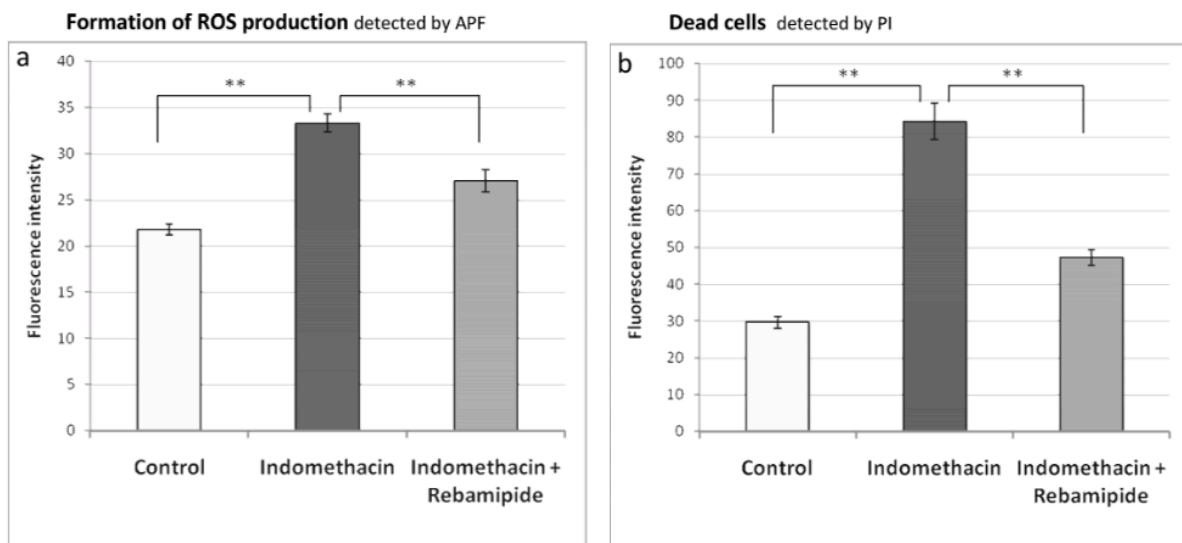


Fig. 8 The amount of ROS generation and the number of epithelial dead cells in the areas of the small intestinal mucosa (jejunum) that macroscopically appeared to be uninjured. (A) The amount of ROS generation measured from the APF fluorescence images. (B) The number of dead cells calculated from PI fluorescence images. The images were taken with the same settings shown in Fig. 3. n=6, mean \pm S.E. ** p<0.05, ANOVA followed by the Tukey method.

4-3-3 フローサイトメトリーによる物理的擦過による脱落細胞の検出

水彩画用筆による物理的な擦過刺激により剥離脱落する上皮細胞数をフローサイトメトリーで検出した結果、ライブイメージングで PI 染色により時間経過により確認された死細胞数と同様、インドメタシン投与マウスで有意に脱落細胞数が多い結果となり (Fig. 9)、粘膜が物理的的刺激に対して脆弱になっていることが示された。

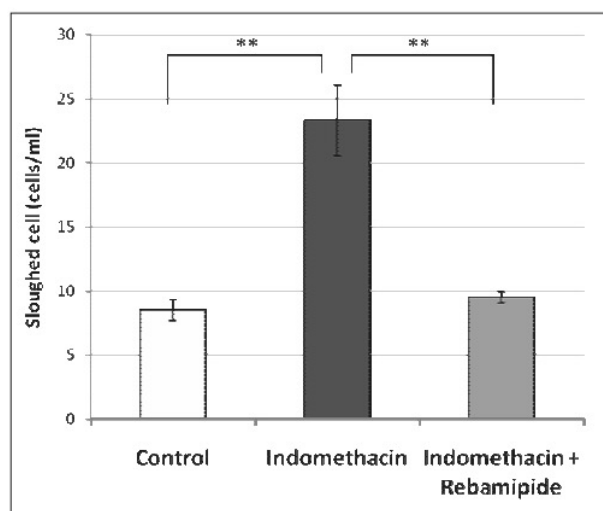


Fig. 9 Comparison of the number of detaching cells by the mucosal brushing. The detaching cells were obtained by wiping the small intestinal mucosa with a painting brush. Numbers of the detaching cells were counted by flow cytometry after staining with the Guava ViaCount Reagent. n=4, mean \pm S.E. ** p<0.01, ANOVA followed by the Tukey method.

4-4 考察・小括

4-4-1 細胞死と病変形成

この研究では、インドメタシン処置が病変の形成に先立って高濃度の ROS を誘導することによって腸粘膜上皮細胞の死を引き起こすことを生体内で初めて示した。

腸の粘膜上皮細胞は、陰窩に近い領域（絨毛の基部に位置する）で幹細胞が増殖し生まれる。分化成熟するにしたがって細胞は絨毛の上部へ移動し、老化して最後は頂上部分で死亡し脱落して糞便となる。この細胞移動と生理的な細胞死の典型が今回コントロールマウスの絨毛の先端に PI 染色陽性細胞として観察された。これに対しインドメタシン投与マウスでは、絨毛先端部分に限らず非常に多数の PI 陽性死細胞が観察された。擦過による刺激でも死細胞の明らかな増加が観察され、肉眼的には病変がないと思われる領域でも上皮細胞内 ROS 濃度が高まった状態の粘膜では、物理的刺激に対して損傷を受けやすくなっていることが示された。小腸下部の食物残渣が貯留した部分では肉眼的にも確認できる病変を生じていたことから、潰瘍およびびらんのような病変の形成には、粘膜の脆弱化と食品の移動に起因するような物理的な力が関与していると考えられた。

4-4-2 ミトコンドリア由来 ROS の関与

ROS は消化管粘膜傷害に関与することが知られている。Kwiecien らは ストレスによる胃粘膜損傷のモデルである水浸漬拘束ストレス（WRS）ラットにおいて、胃粘膜組織の過酸化が胃病変形成に関与することを報告している[32]。彼らのモデルでは、組織の ROS 消去系、SOD およびグルタチオン GSH の産生がストレスによって減少していた。細胞内 ROS 生成の 2 つの既知の主要な供給源は、ミトコンドリア呼吸鎖および細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼ（NOX）である。炎症性サイトカイン・ケモカインは、NOX の活性化を介して ROS を生成し、プロスタグランジン産生を誘導する[33]。一方、ミトコンドリア機能障害による細胞質への ROS 漏出は、アポトーシスなどの細胞事象を引き起こす。

ミトコンドリアからの ROS は、NSAIDs 起因性消化管傷害において重要な役割を果たすことが知られている[34, 35]。ミトコンドリア呼吸鎖の complex I および complex III が ROS の主な発生源であり、漏れ出した電子により O_2 が 1 電子還元されて $O_2^{\cdot-}$ が生成される[36]。ミトコンドリア呼吸鎖は、ROS による有害な影響を受ける重要な標的でもある。ミトコンドリアが ROS により損傷を受けると、シトクロム c および他のアポトーシスを誘導するタンパクが細胞質に放出され、カスパーゼを活性化してアポトーシスが引き起こされる[37]。NSAIDs はミトコンドリアの電子伝達系 Complex I を障害して ROS を生成する[38]。これによりミトコンドリア内膜間隙から細胞質へシトクロム c が放出され、カスパーゼ 9 およびカスパーゼ 3 の活性化および細胞脂質過酸化を引き起こし、アポトーシスに至る[39, 40, 41, 42]。またミトコンドリアの脱共役（アンカップリング uncoupling）による酸化的リン酸化阻害は細胞内 ATP の濃度を低下させ、 Ca^{2+} をミトコンドリアから漏出させ、細胞浸透圧の不均衡およびタイトジャンクションによる細胞間接合の喪失をもたらす、粘膜の透過性および粘膜損傷を増加させる[43]。

インドメタシン処置マウスの腸では、ROS を検出する蛍光プローブである APF の適用により絨毛表層の粘膜上皮細胞内で強い蛍光が観察された。これに対しコントロールマウスの絨毛ではほとんど蛍光は観察されなかった。さらに、インドメタシン処理前にレバミピドを経口投与したマウスの腸の絨毛は蛍光が弱く、この群ではインドメタシン処置マウスよりも死細胞が少なかった。我々は以前に *in vitro* の培養胃粘膜上皮細胞においてレバミピド処理が MnSOD [28] の発現をアップレギュレートすることを報告した。MnSOD はミトコンドリアに局在しミトコンドリア特異的に $O_2^{\cdot-}$ を除去する酵素で、組織損傷に関与する ROS を減少させることが報告されており、MnSOD を過剰発現する細胞は酸化ストレスに耐性であることも報告されている[2, 44, 45, 46, 47]。

以上より、今回のマウスモデルで観察された APF 蛍光は、インドメタシン投与により損傷されたミトコンドリアからの ROS 生成増加を示している可能性が高い。NSAIDs 起因性消化管粘膜傷害の予防的治療として、レバミピドのようなミトコンドリア ROS を消去することによる治療が考慮されるべきである。

4-4-3 小括

ミトコンドリア機能障害に起因する ROS 産生により粘膜細胞が物理的な刺激に対して脆弱になり傷害を受けやすい状態になっていることが、*in vivo* で初めて確認された。こうした病変形成の前段階の状態は、加えた刺激による変化を動物を生かしたまま継時的にライブイメージングを行うことによって初めて確認することができた。

第5章

ホモシステインによる酸化ストレスと骨芽細胞機能

5-1 はじめに・ホモシステインとは

血中ホモシステイン濃度が高値になると、動脈硬化をはじめとする血管病や血栓症のリスクファクターになることが以前から知られていたが[48, 49, 50, 51]、それにとどまらず慢性腎臓病[52]、糖尿病[53]、アルツハイマー病などの神経変性疾患[54]などとの関連が明らかになっている。ホモシステインは酸化ストレスを引き起こす内因性の酸化剤の中で最も重要なものの一つ[55]と考えられており、血管内皮機能を低下させることが原因と言われるが、その作用メカニズムはまだよくわかっていない。

近年、ホモシステインは骨粗鬆症性の骨折リスクを上昇させるリスクファクターでもあることが知られるようになった。この章では *in vitro* で培養骨芽細胞を用いて、ホモシステインの作用により酸化ストレスを受けた細胞に引き起こされる細胞内 ROS の上昇、アポトーシス、細胞機能障害について検討した結果を述べる。

5-1-1 ホモシステインの代謝

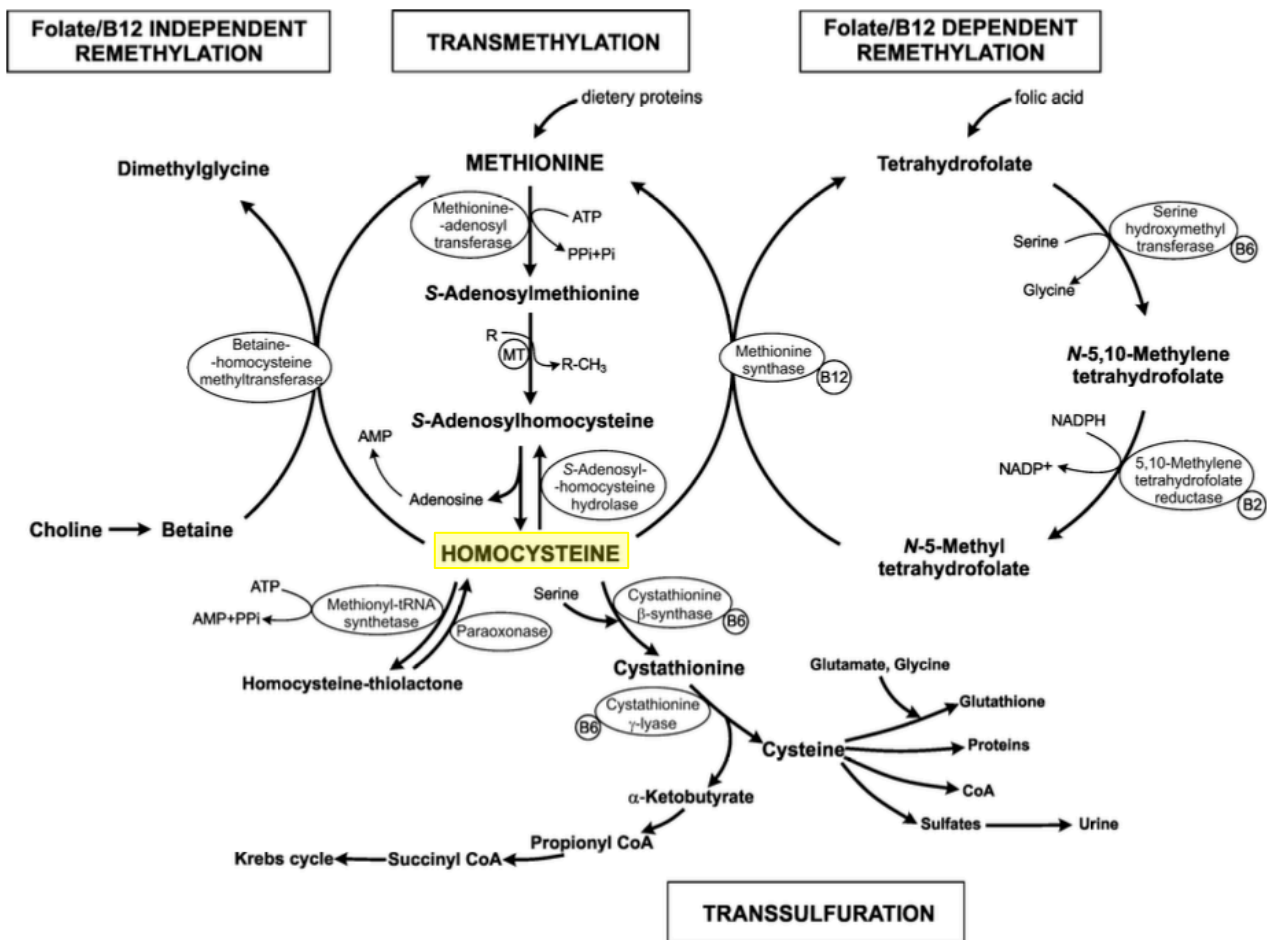
ホモシステイン ; Homocysteine, Hcy は、含硫チオール基をもつ非必須アミノ酸で、タンパク質を構成しないアミノ酸である。必須アミノ酸であるメチオニンの脱メチル化の代謝過程で中間代謝物として生成される[56]。システインに代謝される過程で Vitamin B6, VB6 を必要とする。Hcy は再メチル化によってメチオニンに戻るが、その過程の一端を葉酸回路が担い、葉酸、Vitamin B12, VB12 を要求する[48]。したがって、VB6、VB12、葉酸の不足は Hcy の濃度を上昇させる。また葉酸回路中のメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) の遺伝子多型が血中ホモシステイン濃度の上昇に関係している[57,58]。メチオニンの脱メチル化の過程で生成する S-Adenosyl-methionine (SAM) は、DNA メチル化のメチル基供給源として翻訳制御に重要である。システインはグルタチオンの原料となり、チオール基による活性酸素消去[59]、酸化還元シグナルの制御に関係する。

5-1-2 ホモシステインの毒性

Hcy の作用点は酸化ストレスにより血管内皮細胞からの NO の産生を低下させ血管内皮機能を抑制することにあると考えられている。そのメカニズムとして、チオール基同士の結合によるジスルフィド結合が生じる時の自己酸化による[60]とする説明がされて来たが、同じチオール基をもつシステインは Hcy よりも高濃度であるにもかかわらず血管病のリスクファクターではないことから、現在は否定的[61, 62]で新たなメカニズムが探られている。

5-1-3 ホモシステインによる小胞体ストレス

ホモシステインの作用は、血管内皮細胞で詳しく調べられており、Hcy の誘導するアポトーシスが小胞体ストレス Endoplasmic reticulum stress, ER stress に起因することが近年明らかになってきた[63]。ER でのタンパク質フォールディングにはジスルフィド結合が関与するが[64]、Hcy がどのように ER ストレスを惹起するか、メカニズムはまだわかっていない。



The schematic overview of homocysteine metabolism and its relationship with folic acid and vitamins. ATP: adenosine triphosphate; AMP: adenosine monophosphate; PPI: pyrophosphate; Pi: orthophosphate; B2/B6/B12: vitamins B2/B6/B12; CoA: coenzyme A; R: acceptor; R-CH₃: methylated product; MT: methyltransferases.

Fig. 10 ホモシステインの代謝 *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1733 (文献[56]) より

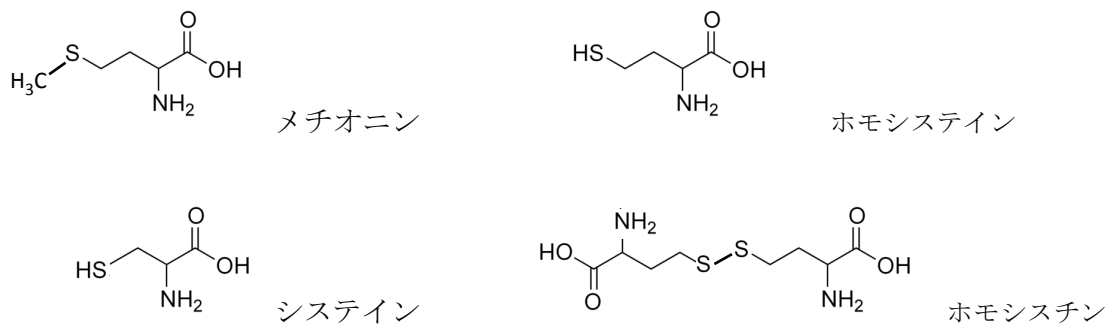


Fig. 11 ホモシステイン関連アミノ酸の構造

5-1-4 ホモシステインと骨質

血中ホモシステイン高値は、Vitamin B6, B12 や葉酸の不足[65, 66]によって閉経後や加齢に伴って起こりやすくなるとされている。高ホモシステイン血症が、血管病のリスクファクターであることは前述の通りだが、最近では骨粗鬆症による骨折の独立したリスクファクターであることが報告され、改めて注目されている[67, 68]。これは骨の量とは関連せず、骨の質の劣化によるものと考えられている[69]。ホモシステイン homocysteine (Hcy) が骨芽細胞のアポトーシスを引き起こすこと[70]、また Hcy がコラーゲン分子を酵素的に架橋するリジルオキシダーゼ Lysyl oxidase (LOX) の発現を抑制することがマウス骨芽細胞株 MC3T3 E1 細胞において報告されており[71]、骨芽細胞の生存と機能を抑制することで骨の脆弱化を引き起こしている可能性が指摘されている。過去の研究ではホモシステインのチオール基がジスルフィド結合を形成する際に自己酸化により酸化ストレスを誘導する酸化剤として働くと説明されてきたが[60, 72]、作用メカニズムはよくわかっていない。

そこで、*in vitro* の培養系でマウス骨芽細胞株 MC3T3 E1 細胞を用いて、Hcy により誘導されるアポトーシスと LOX 発現に対する ROS 産生の影響を調べた。さらに骨粗鬆症の治療に用いられてる選択的エストロゲン受容体調節薬; selective estrogen receptor modulators (SERMs) の一つバゼドキシフェン bazedoxifene の作用を検討した。試験は Hcy を作用させてから 18 時間以内のアポトーシス誘導と、ROS 産生、およびカスパーゼの発現を蛍光プローブを用いて検討した短期培養と、比較的低濃度の Hcy を 14 日間作用させた長期培養で LOX 発現と酸化ストレス存在下で生成が増加すると言われる最終糖化産物; AGE であるペントシジンの集積を免疫染色、ウエスタンブロットティング及び RT-PCR により検討した。

5-2 方法

5-2-1 材料と試薬

MC3T3-E1 細胞は BRC: Riken Bio Resource Center (筑波、日本) より購入した。α MEM 培地 (フェノールレッド不含)、ウシ胎仔血清 (FBS) およびペニシリンストレプトマイシンは Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から購入した。ホモシステインおよびアスコルビン酸は、和光純薬工業 (大阪、日本) から購入した。Aminophenyl Fluorescein (APF) は、五稜化学 (札幌、日本) から購入した。細胞免疫染色に用いた抗ペントシジンマウスモノクローナル抗体 (KH012) および抗 LOX ウサギポリクローナル抗体 (NB110-59729) は、Trans Genic (熊本、日本) および NOVUS (Littleton, CO, USA) から購入した。抗 MnSOD 抗体 (ab13533) は Abcam (Cambridge, UK) から購入した。ヨウ化プロピジウム: Propidium Iodide (PI) および 17β エストラジオール (E2) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。CaspasTag, caspase in situ assay kits は、Merck Millipore (Billerica, MA, USA) から購入した。バゼドキシフェン:bazedoxifene acetate (BZA) は、Pfizer (New York, NY, USA) によって親切に提供された。バゼドキシフェンおよび 17β エストラジオールは DMSO に溶解し、Hcy は蒸留水に溶解した。ウエスタンブロットに用いた LOX に対する rabbit monoclonal 抗体 (ab174316) は Abcam から、ベータアクチンに対する rabbit monoclonal 抗体 (#4970S) は Cell Signaling (Danvers, MA, USA) から購入した。ヤギ抗 rabbit IgG HRP 標識抗体 (#7074S) は Cell Signaling より購入した。

5-2-2 細胞培養

マウス胎仔頭蓋冠由来の骨芽細胞株、MC3T3-E1 細胞を 3.5 cm 径ディッシュに 4×10^4 /dish で播

種し、5% FBS、1% penicillin-streptomycin 添加フェノールレッド不含の α MEM 培地で、5% CO₂、37°Cで培養した。アポトーシス、ROS 生成、及びカスパーゼ活性化については、サブコンフルエントになった細胞にホモシステインを作用させ 18 時間以内の培養で検討した。

LOX の発現とペントシジンの集積を試験するために、MC3T3-E1 細胞を 5% FBS、1% penicillin-streptomycin 添加フェノールレッド不含の α MEM 培地で、5% CO₂、37°Cで 14 日間培養した。コラーゲン生成を促すために培地にはアスコルビン酸 50 μ g/mL を添加し、 α MEM 培地に初めから含まれているアスコルビン酸と合わせて最終濃度 100 μ g/mL になるようにした。bazedoxifene、17 β estradiol を加える、または加えない培地で 1 週間に 2 回培地を交換して培養した。

5-2-3 アポトーシス検出

MC3T3-E1 細胞を Hcy と bazedoxifene または 17 β estradiol を添加して、または添加せず、最終濃度が 10 μ g/mL になるように PI を添加して 18 時間培養した。PI は生細胞の細胞膜は透過せず、死んだ細胞で膜を透過して核を染めるため、死細胞を検出できる。死細胞の数を評価するため、核が PI 染色陽性の細胞を共焦点レーザー顕微鏡、LSM700 (Carl Zeiss, jena, Germany)で撮影した 20 視野の画像よりカウントした。実験は繰り返し 3 回行った。細胞死がアポトーシスによるものかどうか判断するために、一部の培養ではタイムラプス撮影により細胞死の過程で起こる形態的変化を動画記録した。

5-2-4 細胞内 ROS の検出

MC3T3-E1 細胞を Hcy と bazedoxifene または 17 β estradiol を添加して、または添加せず培養して 5 時間後に、ROS 検出蛍光プローブである APF を 10 μ M の濃度になるように加えた。さらに 3 時間培養を続けた後、共焦点レーザー顕微鏡で励起波長 488 nm、発光波長 515 で蛍光画像を撮影した。取得した画像は、ImageJ 1.45s software (NIH, USA)を用いて、細胞面積に対する閾値以上の蛍光陽性領域の面積の比を算出し、Hcy、bazedoxifene、および 17 β estradiol を加えないコントロールを 1 として相対化して表した。

5-2-5 カスパーゼ活性化の測定

Hcy が誘導するアポトーシスの経路を知るためにカスパーゼ 3, 8, 9 の活性化状態を CaspaTag in situ assay kits を用いて検出した。MC3T3-E1 細胞を 3 mM の Hcy を添加して、または添加せずに 13 時間培養した後、製品製造者のプロトコルに従い CaspaTags 蛍光試薬を添加してさらに 1 時間培養を続け、その後リン酸緩衝 4% パラフォルムアルデヒドで細胞を固定し、キットに内包された Hoechst で核染色した。そして共焦点レーザー顕微鏡で CaspaTag の蛍光画像を撮影し、ImageJ software で細胞面積に対する蛍光陽性領域面積の比率を求め、カスパーゼ活性化の指標とした。表示は Hcy を加えず培養したコントロールを 1 として相対化して表した。

5-2-6 長期培養におけるリジルオキシダーゼおよびペントシジンの免疫染色

MC3T3-E1 細胞を 100 μ M のアスコルビン酸存在下で Hcy 300 μ M、bazedoxifene および 17 β estradiol を添加、または添加せずに 14 日間培養した。14 日目に細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで固定し、抗 LOX 抗体、または抗ペントシジン抗体を一次抗体として用い、定法に従い、biotin 標識二次抗体と ABC キット (Vector laboratory, Burlingame, Canada)で増幅してストレプトアビジン Alexa488 (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) で蛍光標識し、DAPI により核染色し封入した。共焦点レーザー顕微鏡で蛍光画像を撮影し、ImageJ software により蛍光強度を測定した。核染色画像から細胞数を計測し蛍光強度を除いて標準化した。

5-2-7 遺伝子発現解析

Lox 遺伝子発現の解析のために、定量的リアルタイム PCR を行った。14 日間培養した MC3T3-E1 細胞から total RNA を抽出した。一本鎖 cDNA の合成に 2 μ g の total RNA を使用した。SYBR green chemistry (TAKARA BIO、滋賀、日本) を用いて、最適化プロトコール[73]に従って Lox、およびハウスキーピング遺伝子、hydroxymethylbilane synthase (Hbms) の mRNA レベルを決定した。リアルタイム PCR は、Takara TP760 および TP810 (TAKARA BIO) を用いて 25 μ L の反応容量で 1 μ L の cDNA を用いて行った。二本鎖 DNA 特異的色素 SYBR Green I は、Lox では AmpliTaq Gold™360 Master Mix (TAKARA BIO) の PCR バッファーに加えて、PCR 産物の定量的検出を可能にした。PCR 条件は、Lox については 95°C で 30 秒間、95°C で 5 秒間の変性を 55 サイクル、60°C で 1 分間アニーリングと伸長を行った。プライマー配列およびフラグメントサイズを以下に示す。

Lox: 5'-ACGACTGTCCCAACC TAAG-3'
and 5'-GCCAGACATTCCATGGATTGAA-3' (250 bp)
Hbms: 5' -GAGTCTAGATGGCTCAGATAGCATGC-3'
and 5' -CCTACAGACCAGTTAGCGCACATC-30 (222 bp).

Hbms はハウスキーピング遺伝子として逆転写の効率の違いを補正するのに用いた。[65].

5-2-8 ウェスタンブロット

LOX のタンパク発現量を調べるためにウェスタンブロット分析を行った。MC3T3-E1 細胞を 10cm 皿に播種し、上述のように培養した。細胞がコンフルエントになった後、各薬剤を添加し 14 日間処理した。細胞を氷冷 PBS で洗浄したのち、ホスファターゼ阻害剤カクテル (Sigma P0044) およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma P8340) を含有する細胞溶解緩衝液 (Sigma C2978) 中で氷上でこそぎ落とした。細胞溶解物を回収し、4°C、15,000rpm で 15 分間遠心分離した。細胞溶解物を 10%SDS-PAGE を用いて電気泳動し、PVDF 膜に移した。ブロットを 5%ウシ血清アルブミン (BSA) を含有する TBST で室温で 1 時間グロッキングした。次に、ブロットを 1 : 1000 で希釈した Lox 抗体を用いて穏やかに振盪しながら 4°C で一晩インキュベートした。これらのブロットを TBST でよく洗浄し、室温で 1 時間、TBST 中のビオチン結合ウサギ抗マウス IgG の 1 : 1000 希釈液とともにさらにインキュベートした。次いでブロットを 3 回洗浄し、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher) を用いて増強化学発光法 (enhanced chemi-luminescence technique) により視覚化した。

5-2-9 統計的解析

結果は、平均±平均標準誤差 (SEM) で表わした。グループ間の相違についての統計的評価は、一元配置分散分析を行った後、Fisher の制限付き最小有意差法を用いて検定を行った。すべての統計的検定において、P 値 < 0.05 を統計的に有意であると判定した。

5-4 結果

5-4-1 ホモシステインが誘導する MC3T3-E1 細胞のアポトーシス

マウス骨芽細胞 MC3T3 E1 細胞を Hcy を高濃度で添加して培養すると、添加 12 時間を経過した頃から、Fig.12 に示すように apoptotic body と呼ばれる小胞に分断される過程を伴い、PI 染色で核の凝集が確認され、アポトーシスに特有の形態変化[66]による細胞死が観察された。

各種濃度の Hcy を作用させ 18 時間後の段階で PI 染色陽性の死細胞の数を測定したところ、Hcy の濃度依存的にアポトーシスが誘導され Hcy 10 mM で顕著にアポトーシスが誘導された。しかし 1 mM 以下の濃度の Hcy ではアポトーシスは誘導されなかった (Fig. 13 a, b)。

アポトーシスに先立ち Hcy 添加 8 時間後に ROS の蛍光プローブである APF の蛍光強度で ROS の生成を測定したところ Hcy は濃度依存的に MC3T3-E1 細胞の ROS 生成が上昇していた (Fig. 13 c, d)。注目すべきことに、300 μ M の Hcy は有意に ROS 生成が上昇したにもかかわらず、アポトーシスは誘導されなかった。細胞内の ROS 生成源を示す APF の蛍光の局在は、MnSOD の免疫染色で示されるミトコンドリアの位置に一致していた (Fig.14 a, b)。

ミトコンドリア由来の ROS は Capase-9 を活性化してアポトーシスを引き起こすことが知られているため、3mM の Hcy 添加によって誘導されるアポトーシスの過程で活性化される Caspase の経路を CaspaTag 蛍光試薬を用いて確認した。Fig. 15 に示すように、Caspase-9, Caspase-8, Caspase-3 のいずれも Hcy 3mM の添加により有意に上昇していた。

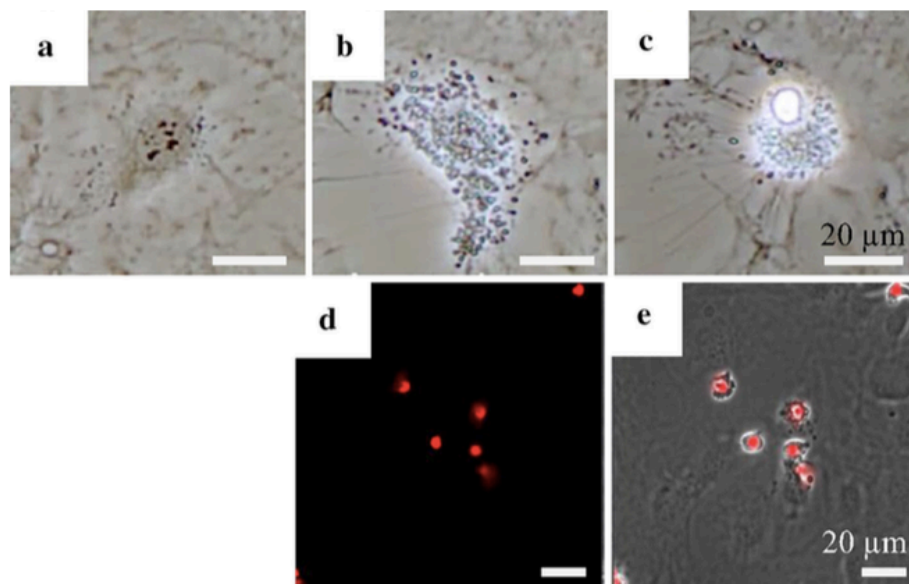


Fig. 12 Detection of homocysteine (Hcy)-induced apoptosis by timelapse recording.

A living cell is shown after 10 mM Hcy treatment for 16 h (a). Apoptotic bodies were appeared on cytoplasmic membrane after 10 min from a (b), and cell death with nuclear and cytoplasmic condensation was observed after 20 min from b (c). The apoptotic cells with nuclei condensation were stained by propidium iodide (d), and the image was merged with phase contrast (e)

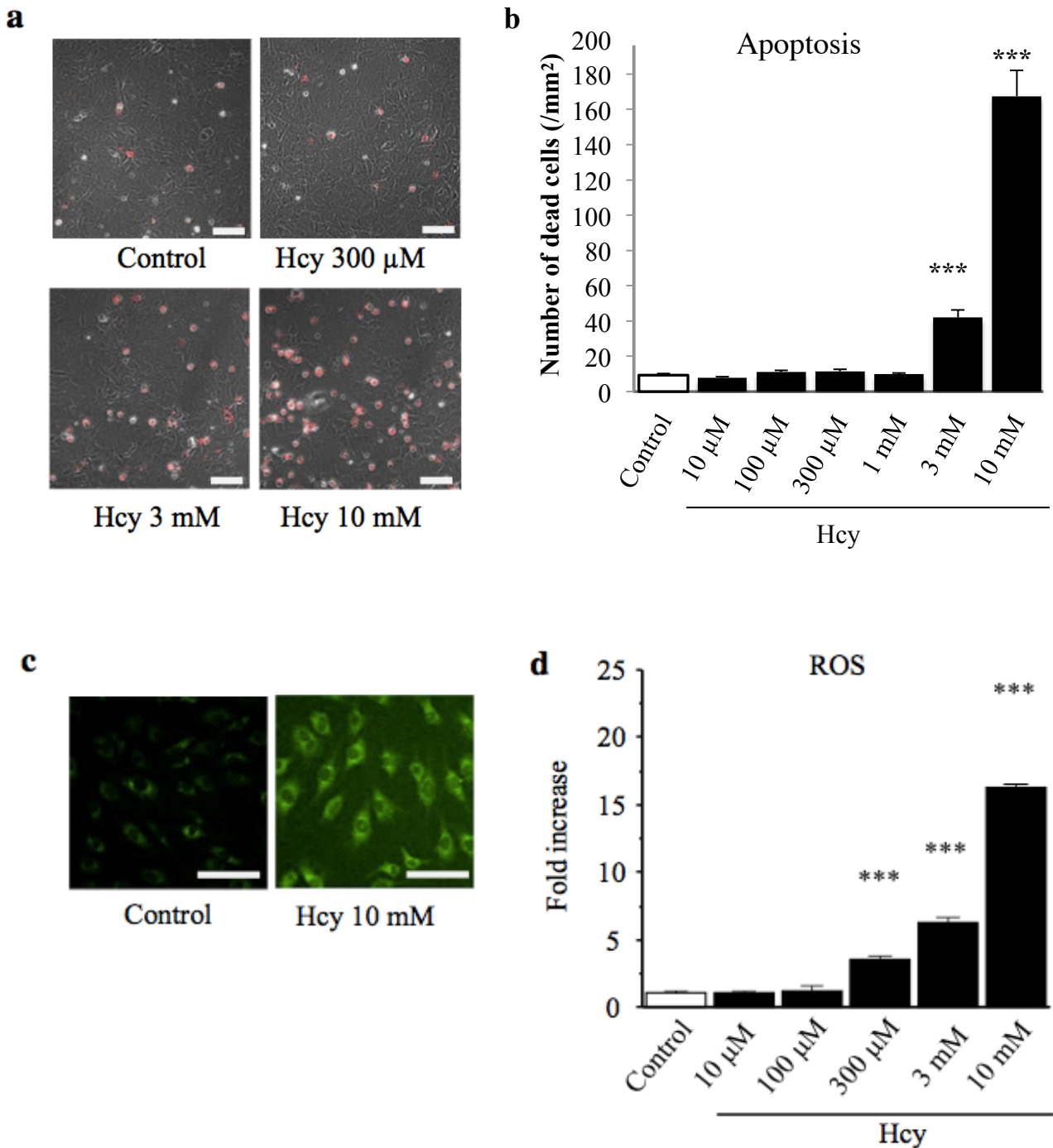


Fig. 13 Effects of homocysteine (Hcy) on apoptosis and reactive oxygen species production in MC3T3-E1 cells.

a, b Hcy or vehicle was added for 18 h after the cells reached subconfluence. Apoptosis was evaluated by propidium iodide staining. Representative pictures of three different experiments are shown (a). The scale bar is 100 μ m. The average value of fluorescently stained cells was evaluated (b). Results are expressed as the mean \pm SEM fold increase over control values (n = 20). ***P < 0.001 versus control. **c, d** Hcy or vehicle was added for 5 h after the cells reached subconfluence. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was evaluated by aminophenyl fluorescein. Effects of homocysteine (Hcy) on apoptosis and reactive oxygen staining. Representative pictures of three different experiments are shown (c). The scale bar is 100 μ m. The average value of intracellular fluorescently stained area was used to evaluate the generation of ROS (d). Results are expressed as the mean \pm SEM fold increase over control values (n = 6). ***P < 0.001 versus control.

Fig. 14 Images of mitochondria in osteoblastic MC3T3-E1 cells

(a) The image of 3 mM of Hcy induced ROS generation detected by APF. (b) The image of a immunostaining of mitochondria by using anti MnSOD antibody.

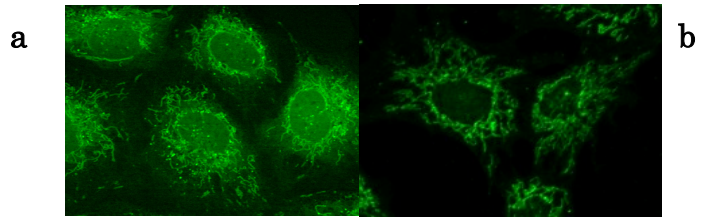
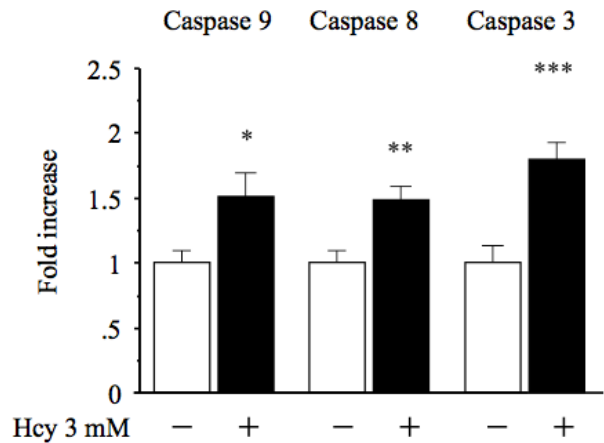


Fig. 15 Effects of homocysteine (Hcy) on caspase activations in MC3T3-E1 cells.

Vehicle or 3 mM Hcy was added for 13 h after the cells reached subconfluence. The activities of caspases-9, 8, and 3 were evaluated by using CaspaTag in situ assay kits. Results are expressed as the mean \pm SEM fold increase over control values (n = 10). *P < 0.05; **P < 0.01 versus without Hcy.



5-4-2 アポトーシスおよび ROS 生成に対する Bazedoxifen の作用

Hcy 3 mM により MC3T3-E1 細胞に誘導されるアポトーシスに対して bazedoxifen および 17 β estradiol を共存させて培養した場合には、アポトーシスの誘導を抑制することが示された(Fig. 16)。また 3 mM の Hcy で誘導される ROS 生成の上昇を bazedoxifen および 17 β estradiol は有意に抑制した (Fig. 17)。

この ROS 生成抑制作用は、アポトーシスを誘導しない濃度の Hcy 300 μ M による ROS の上昇も有意に抑制した (Fig. 18)。

5-4-2 長期培養での Lox 発現に対する Hcy の作用

次に ROS の生成を増加させるがアポトーシスを誘導しない Hcy 300 μ M を添加して 14 日間の長期間培養を行い、コラーゲンの酵素的架橋を担う LOX の発現と、非酵素的架橋反応を引き起こす糖化産物 AGE の一つであるペントシジンの発現を免疫染色により検討した。その結果、300 μ M の Hcy の添加で Lox のタンパクレベルの発現が低下し、bazedoxife を共存させて培養することで、Lox の発現が回復した(Fig.18 a,b)。ペントシジンの集積は Hcy の添加で増加し、bazedoxifene の共存で低下した(Fig. 19)。Hcy による Lox の発現低下は、ウエスタンブロッティングによる検討によっても確かめられ(Fig. 18 c)、定量的リアルタイム PCR によって mRNA レベルでも発現が抑制されていることが確認された(Fig 18 d)。いずれも bazedoxifen および 17 β estradiol の共存で発現低下が回復した。

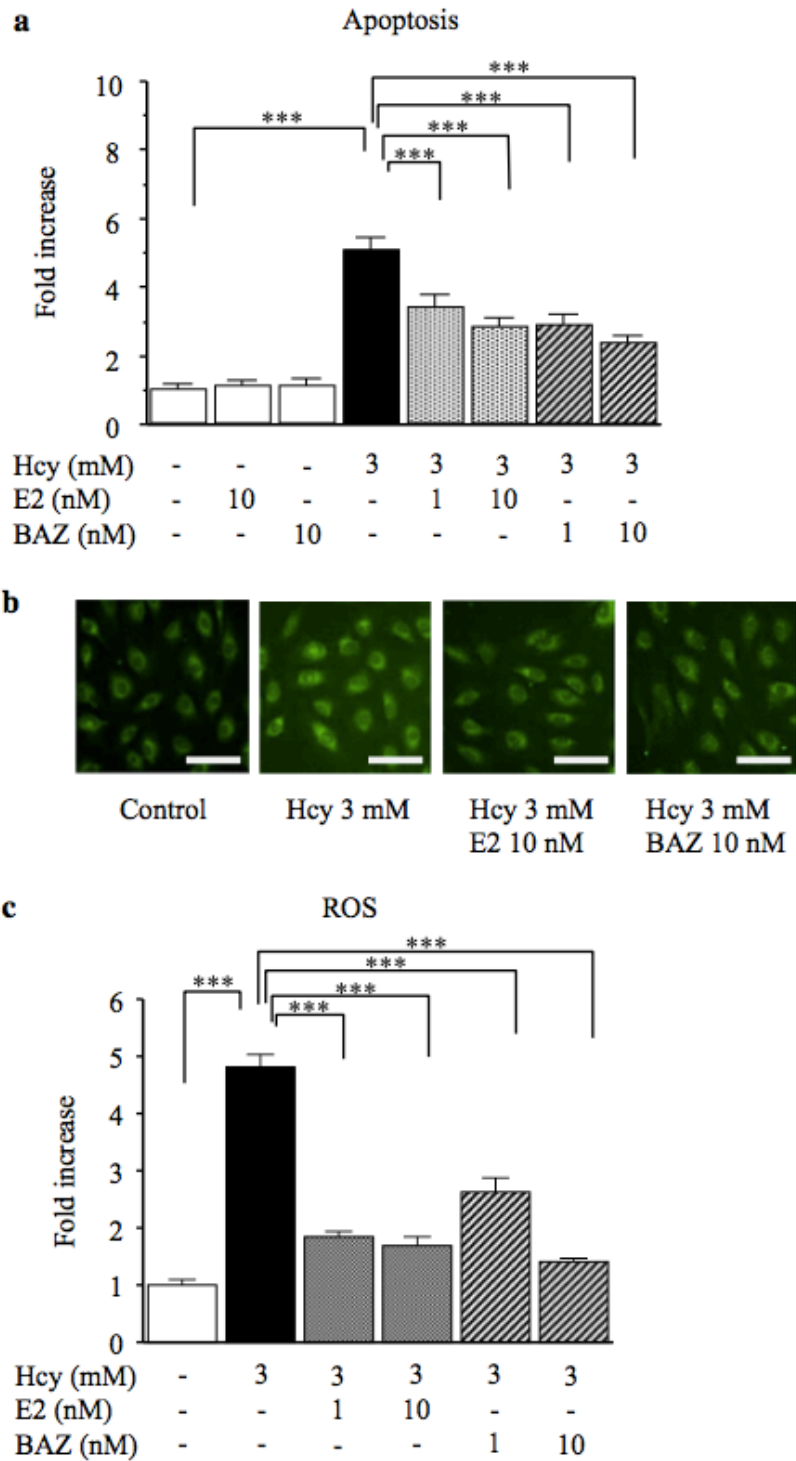


Fig. 16 Effects of bazedoxifene (BAZ) on homocysteine (Hcy)- induced apoptosis and reactive oxygen species production in MC3T3-E1 cells.

a Hcy or vehicle with BAZ or 17 β estradiol (E2) was added for 18 h after the cells reached subconfluence. Apoptosis was evaluated by propidium iodide staining analysis. The average value of fluorescently stained cells was evaluated. Results are expressed as the mean \pm SEM fold increase over control values (n = 12). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. **b, c** Hcy or vehicle with BAZ or E2 was added for 5 h after the cells reached confluence. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was evaluated by aminophenyl fluorescein staining. Representative pictures of three different experiments are shown (b). The scale bar is 100 μ m. The average value of intracellular fluorescently stained area was used to evaluate the generation of ROS (c). Results are expressed as the mean \pm SEM fold increase over control values (n = 6). ***P < 0.001

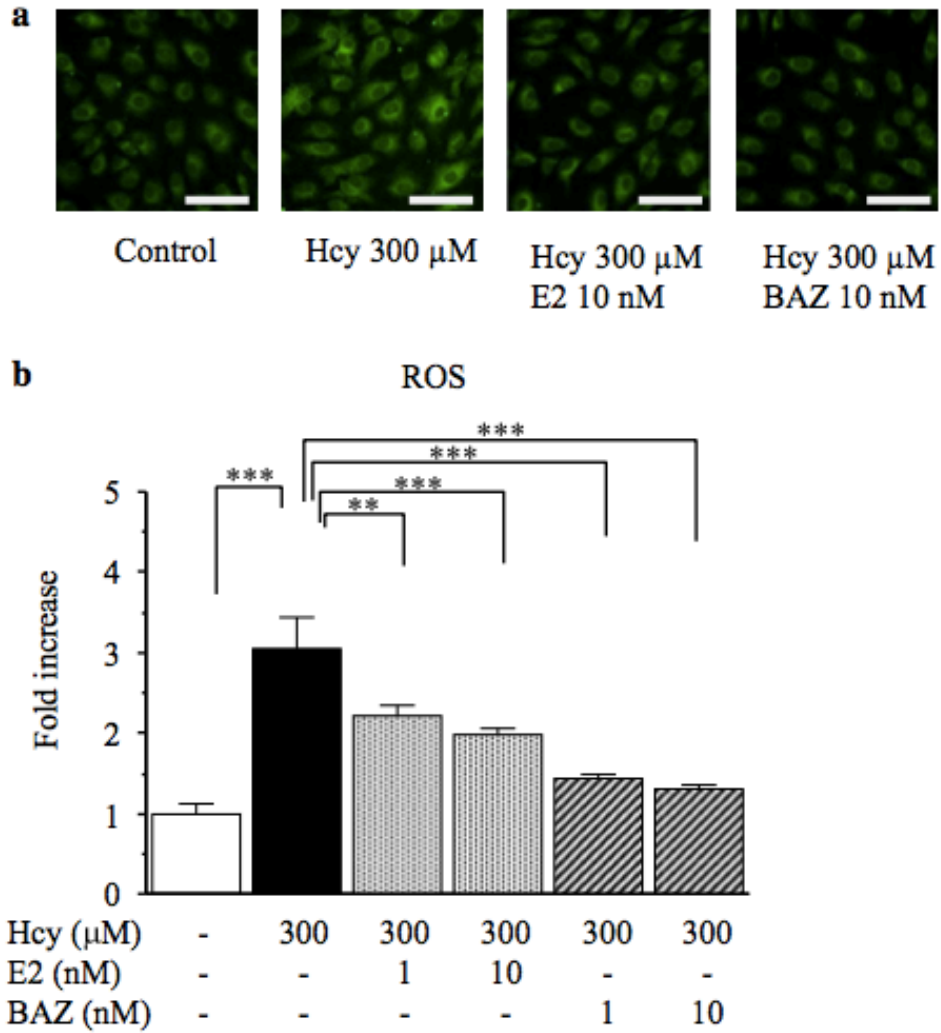


Fig. 17 Effects of bazedoxifene (BZA) on homocysteine (Hcy)-induced reactive oxygen species (ROS) production in MC3T3-E1 cells.

Vehicle, Hcy, or Hcy with 17 β estradiol (E2) or BZA was added for 5 h after the cells reached subconfluence. Intracellular ROS production was evaluated by aminophenyl fluorescein (APF) staining. Representative pictures of three different experiments are shown (a). The scale bar is 100 μ m. The average value of intracellular fluorescently stained area was used to evaluate the generation of ROS (b). Results are expressed as the mean \pm SEM fold increase over control values (n = 6). **P < 0.01; ***P < 0.001

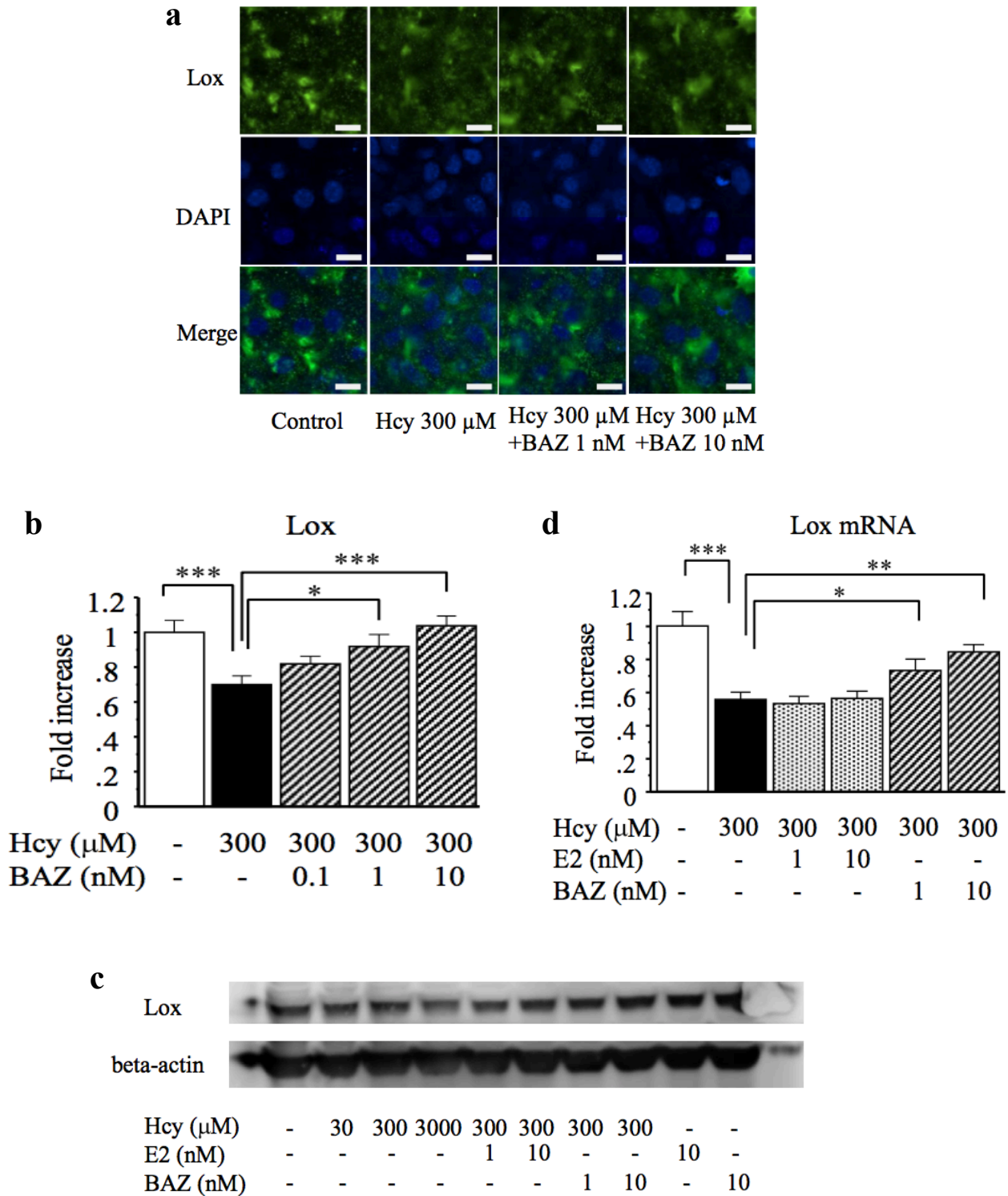


Fig. 18 Effects of bazedoxifene (BZA) on homocysteine (Hcy)-induced suppression of lysyl oxidase (Lox) expression in MC3T3-E1 cells.

Vehicle, Hcy, or Hcy with 17 β estradiol (E2) or BZA was added for 14 days after the cells reached confluence. **a, b** Immunostaining analysis using anti-Lox antibody. **a** Representative pictures of three different experiments are shown. The scale bar is 20 μ m. **b** The average fluorescence intensities were measured and compared under various conditions. The detected fluorescence intensities were normalized by cell number. Results are expressed as the mean \pm SEM fold increase over control values (n = 8). *P < 0.05; ***P < 0.001. **c** Western blot analysis. **a** Real-time PCR. Results are expressed as the mean \pm SEM fold increase over control values (n = 6). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

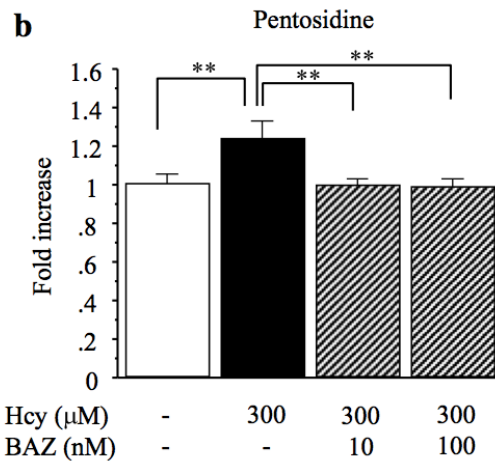
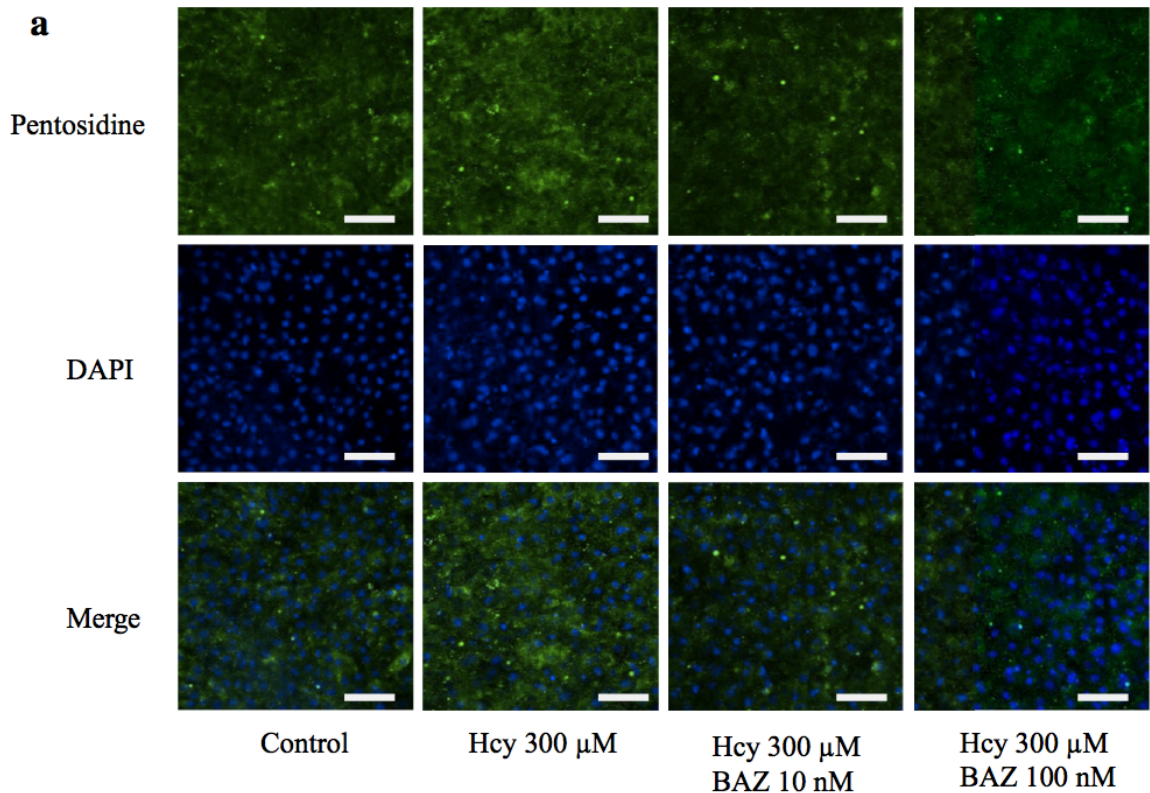


Fig. 19 Effects of homocysteine (Hcy) and bazedoxifene (BZA) on accumulation of pentosidine.

Vehicle, Hcy, or Hcy with BZA was added for 14 days after the cells reached confluence. Immunostaining analysis using anti-pentosidine antibody was used to evaluate pentosidine accumulation. Representative pictures of three different experiments are shown (a). The scale bar is 100 μ m. The average fluorescence intensities were measured and compared under various conditions (b). The detected fluorescence intensities were normalized by cell number. Results are expressed as the mean \pm SEM fold increase over control values (n = 8). **P < 0.01

5-5 考察

5-5-1 骨芽細胞のアポトーシス

これまで報告された研究は、Hcy が骨芽細胞のアポトーシスを誘導することを示したが、そのメカニズムについて多くは分かっていない。Park ら[76]は以前に、ヒト骨肉腫細胞株である U2OS、およびヒト正常骨芽細胞株である HNOst を用いて Hcy が用量依存的にアポトーシスを誘導することを示した。彼らの研究では、2.5mM 以上の濃度で Hcy のアポトーシス誘導が観察されており、これは今回の知見と一致していた。さらに Park らは高濃度の Hcy が caspase-3 を活性化してアポトーシスを導く過程に部分的に小胞体ストレス (endoplasmic reticulum (ER) stress) が関与することを示した。Hcy は骨芽細胞系を含む様々な培養細胞株で酸化ストレスを増加させることが知られている。今回の研究でも MC3T3-E1 細胞で Hcy が濃度依存的にアポトーシスを引き起こすことを確認した。さらに高濃度の Hcy は caspase-3 と同時に caspase-9 を活性化した。caspase-9 はミトコンドリア障害に由来する ROS によりチトクローム c の細胞質への漏出により先行して活性化されるカパーゼであり、Hcy により誘導されるアポトーシスの過程にミトコンドリア傷害が関与することを示している。これを裏付けるように今回 ROS の検出に用いた APF の蛍光画像では、ミトコンドリアの部位に一致して強い蛍光が確認された (Fig. 14)。しかし、今回同時に caspase-8 も活性化されていることが示された。caspase-8 は Fas 受容体や TNF α 受容体など、death receptor の下流で活性化され、アポトーシスを導くシグナルとして知られている[77]。

5-5-2 コラーゲン架橋と骨質

エビデンスの蓄積にしたがい、血中 Hcy レベルの上昇は骨密度とは無関係に骨粗鬆症性骨折のリスクの増加と関連していることが示されており、骨芽細胞のアポトーシスおよび骨形成の減少に加えて Hcy が骨質に影響を及ぼす可能性があることを示唆している[67, 68]。Saito ら[78]は以前に、食餌誘発性の高ホモシステイン血症が酵素依存性のコラーゲン架橋を減少させ、最終糖化産物 AGE の一つであるペントシジンによる非酵素的コラーゲン架橋の産生および蓄積を増強すること示した。このことは Hcy が骨芽細胞機能に負の影響を与え、非酵素的架橋を増加させたことを示唆している。興味深いことに、低濃度の 300 μ M の Hcy は MC3T3-E1 細胞の ROS 産生は増強したが、アポトーシスを誘導しなかった。そして 300 μ M の Hcy はコラーゲンの酵素架橋を担う Lox タンパクの発現を抑制した。さらに非酵素的架橋を作るペントシジンの細胞間マトリックスへの蓄積を抑制した。これらの結果を総合すると、Hcy は ER ストレスにより骨芽細胞の機能を抑制し、同時に酸化ストレスにより非酵素的 AGE 架橋を増加させたことが示唆された。これらは高ホモシステイン血症が骨質の劣化に関与するという臨床的証拠を支持する。

SERM である raloxifene が抗酸化作用を有し、H₂O₂ の添加により培養骨芽細胞に誘導されるアポトーシスを抑制することが報告されている[79]。しかしながら bazedoxifene に関してはこれまで in vitro の骨芽細胞のアポトーシスに対する作用は報告されていない。今回の研究で、活性型エストロゲン 17 β estradiol と bazedoxifene は MC3T3-E1 細胞で Hcy により誘導される ROS 産生とアポトーシスを有意に抑制した。加えて bazedoxifene は Hcy により抑制された Lox の発現とペントシジンの集積の増加を回復させることを示した。したがって、この報告は bazedoxifene が Hcy が引き起こす酸化ストレスの骨芽細胞の生存と機能に対する有害な影響に対する有益な効果を示す最初のエビデンスを示すものである。

raloxifene や bazedoxifene などの SERMs は閉経後骨粗鬆症患者の治療に世界中でしばしば処方される。これまでの研究では raloxifene は糖尿病でない患者に対してより、糖尿病患者に対しての方が、どちらかというより高い効果が得られることが示されている[80]。非酵素的 AGE 架橋の増加は糖尿病に関連した骨の脆弱性の中心的な病態と思われる[81, 82]。AGE の蓄積はその生成過

程に酸化環境の存在が必要であるため、酸化ストレスによって増強されることが知られている[37]。さらに、酸化ストレスは糖尿病において増加することが知られているため、**reloxifene** の抗酸化活性は、特に糖尿病患者における椎骨骨折の発生率の減少に対する有効性を説明するものと思われる。今回の研究で我々は、**bazedoxifene** は、コラーゲン架橋および骨芽細胞の生存を改善することによって、抗酸化活性および骨質の改善を示し、特に、糖尿病に関連する骨の脆弱性に対して、**bazedoxifene** による治療が有益であり得ることを示した。この件を明確にするためにはさらに大規模な臨床試験が必要となる。

本研究は、**Hcy** がペントシジンの細胞外蓄積を増加させることを示す最初の報告である。これらの知見は、高ホモシステイン血症が骨芽細胞の機能を損ない、骨の質を低下させ、骨密度に依存しない骨粗しょう症のリスクを高めることを示唆している。さらに、本研究は、**bazedoxifene** が **MC3T3-E1** 細胞のアポトーシスならびにコラーゲン架橋に及ぼす **Hcy** の有害な影響を改善し、**bazedoxifene** が **Hcy** 誘導性の骨芽細胞機能および骨質の障害に有益な効果を有することを示唆した。したがって、高ホモシステイン血症および酸化ストレスを有する患者における **bazedoxifene** による治療は、骨密度の増加とは独立して有益であり得る。

5-5-3 エストロゲン、SERMs の抗酸化作用

ところで、エストロゲンや **raloxifene**, **bazedoxifene** の抗酸化作用の作用点はよくわかっていない。酸化ストレスには多くの酸化剤抗酸化剤が関与している。主な **ROS** の発生源としてはミトコンドリア電子伝達系と細胞膜では **NOXs** が挙げられる。これを消去するものとしてスーパーオキシドジスムターゼ **super oxide dismutase (SOD)**、グルタチオン(**GSH**)などがある。

前章で述べたレバミピドのようにミトコンドリアでの $O_2^{\cdot-}$ 消去に働く **MnSOD** の発現を増強して抗酸化作用を発揮する可能性を確認するために、**MC3T3-E1** 細胞に **17 β estradiol** または **bazedoxifene** を作用させたが、**MnSOD** の発現に変化はなく **Hcy** を単独で作用させた場合のみ、代償的に上昇していた（データは示さず）。そのため、**bazedoxifene** の抗酸化作用のメカニズムについてさらなる調査が必要であった。

培養血管内皮細胞での研究を改めて調べると、以前から血管内皮細胞においては **ER** ストレスの下流で **caspase-8** が活性化されて、**cytochrome c** の放出、**caspase-9** の活性化が起こりアポトーシスが誘導されることが報告されていた[83]。そして、**Hcy** によってデスレセプターである **Fas** が発現し **caspase-8** が活性化されるとの報告もされていた[84, 85]。そして **ER** ストレスに応答してシャペロンタンパクの **GRP78** や、アポトーシス誘導タンパク **CHOP** が発現し、**NOX4** や **NOX2** が発現し **ROS** が上昇することが報告されてきた[86]。そして最近、**Hcy** でも **ER** ストレスにより **GRP78**、**CHOP** が発現上昇し、**NOX4** がミトコンドリア膜で発現してミトコンドリア由来の **ROS** が上昇してアポトーシスが導かれることが報告された[87]。

これらの血管内皮細胞での結果は、今回の我々の骨芽細胞での **caspase-8** と **caspase-9** が同時に活性化された結果を支持する。また、**ROS** の発生源がミトコンドリアに一致していて、**estrogen** 及び **bazedoxifene** がこれを低下させたが、作用点は **MnSOD** による消去ではなかったことを説明する。かつて骨細胞株である **MLO-Y4** 細胞では **Nox1**, **Nox2** の発現が上昇し **ROS** が上昇していた[88]ことも **ER** ストレスに由来するものと思われた。そして、膵 β 細胞を高血糖で刺激することで起こる **ER** ストレスによる細胞死をエストロゲンが抑制することが報告されている[89]。最近ではエストロゲンはストレス応答転写因子である **Nrf-2** の発現を上昇させることが報告されている[90]。**MC3T3-E1** 細胞の **Hcy** によるアポトーシスが **ER** ストレスによるかどうか、またエストロゲン、**bazedoxifene** の作用点の確認は今後の課題である。

5-6 小括

内因性の酸化ストレス起因物質として注目されているホモシステインについて、骨芽細胞の細胞死を誘発し、コラーゲン架橋を形成する酵素の発現量を低下させる作用を主に *in vitro* 蛍光イメージングによって明らかにした。またホモシステインが酸化ストレスで形成が促進される AGE 架橋を増加させることを *in vitro* で初めて示した。ROS を生じるホモシステインの細胞内の作用点、またエストロゲン、SERMs の作用点の解明は今後の課題である。

第6章

血管内皮細胞での一酸化窒素 NO の生体内可視化

6-1 はじめに

この章では、血管内皮細胞の NO 産生を実験動物の生きた血管で *in vivo* で可視化し評価する方法について述べる。NO は細胞間のシグナル伝達を担う重要なフリーラジカルであり、血管内皮細胞では eNOS の働きで産生され、血管機能を維持し血液循環の恒常性を維持する上で重要な働きをしている。第5章で前述したホモシステインは、酸化ストレスとして血管内皮細胞に作用して eNOS の働きを阻害し NO 産生を減弱させることが、動脈硬化や塞栓症その他の疾病を引き起こす一因と考えられている。

血管内皮細胞から産生される NO は血管平滑筋を弛緩させて血管拡張に働くほか、血管内腔では、血小板の凝集や赤血球の凝集を抑制する。そのため NO の産生低下は血管の収縮のみならず、血球の凝集や分岐での血行異常などの流体力学的な動態と関連する。血管機能は大動脈の大血管から小血管のレベルではドップラー超音波検査や核磁気共鳴画像法 **magnetic resonance imaging (MRI)** 検査など検査機器の進歩により詳細に調べられるようになったが、細小血管、毛細血管レベルでは技術的に困難を伴う。そこで小動物の生体内細小血管で、血流改善効果が確認されている桂枝茯苓丸の作用を、NO 産生を指標にして血管内皮でイメージングによって評価することを試みた。これまで生きて血流が通って機能している血管で NO 産生を視覚化し、薬剤の作用を評価した前例は本研究者が探した限り見当たらない。

6-1-1 目的

血管内皮機能と各種疾病との関連に注目し、これまで *in vitro* で培養細胞を用いた研究は多く行われてきたが、*in vivo* での検討はほとんど行われていない。そこで本研究では、*in vivo* の血管で血管内皮細胞の NO 産生を可視化し評価する方法を確立することを目的とし、血流改善作用が知られている漢方薬である桂枝茯苓丸の作用に関連して検討した。

6-1-2 瘀血とは

漢方では血液循環が障害され、血流が停滞した状態を瘀血という。血は血の流れを意味し瘀は滞るの意味である。近代医学の立場からは明らかにされていないが、1. 全身性に血流が滞る。2. 動静脈系のみならず毛細血管血流も含む概念。3. 赤血球自体の変形能や凝集。4. 動脈硬化性病態、うっ血、凝固亢進、月経異常。などの状態を含んでいると考えられている。漢方では瘀血に対して桂枝茯苓丸などの駆瘀血剤が処方され、歴史的経験的処方によって臨床的な血流改善効果が確認されているが、その作用メカニズムはよくわかっていない。

上記の瘀血状態の所見には血管内皮機能が深く関与しているものと思われる。瘀血状態では、血管径が保たれているにもかかわらず赤血球が通わず、血漿成分のみとなる場合があるという。ラット腸間膜の血流を観察している時に、似たような状態が観察された(**Fig. 20**)。赤血球同士が寄り集まり、ゆるく凝集しながら流れている状態で、凝集した血球と血管内壁との間に結晶成分の間隙が形

成されていた。また分岐部分では細くなった末梢側の血管へ血球が流れず、血漿のみが流れていた。瘀血モデルとも考えられるこの状態のラットに桂枝茯苓丸を経口投与したところ、60 分後には血流が改善した。

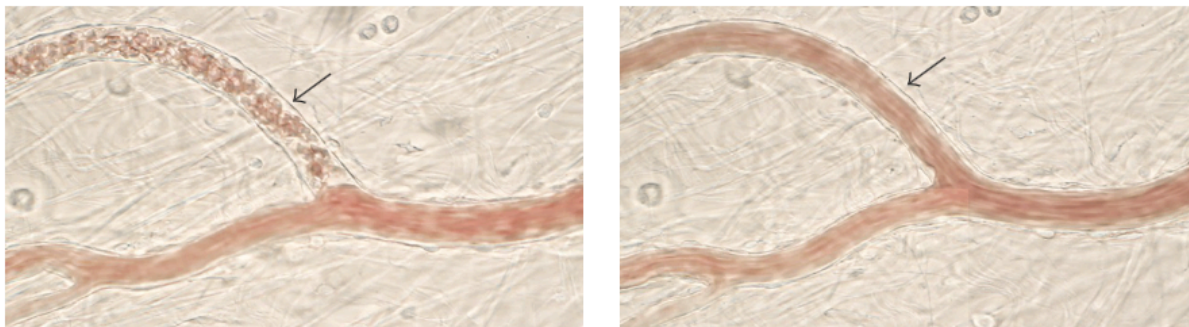


Fig. 20 Live imaging of rat mesenteric arterioles before (a) and 60 min after (b) the administration of Keishibukuryogan. Representative images are shown. Prior to Keishibukuryogan administration, erythrocyte congestion and cell-free plasma layer (plasma pocket) as indicators of Oketsu status (shown by arrows) were observed. At 60 min after administration, these Oketsu symptoms were resolved.

6-1-3 生体内での NO イメージングの先行検討例

NO は血管内皮では endothelial nitric oxide synthase (eNOS)により、アルギニンを基質として O_2 の存在下で NADPH から電子供与を受け生成される。これまでに本研究者はラット腸間膜の細動脈で、NO の蛍光プローブである Diaminofluorescein-2 (DAF-2)を血管内皮細胞に取り込ませることで、生きている細動脈の血管内皮細胞で恒常的に産生される NO を可視化することに成功している (Fig.21)。



Fig. 21 The fluorescence image of NO generation in the blood vessels by DAF-2 in rat mesenterium.

6-1-4 一酸化窒素 NO 検出蛍光プローブ

NO の検出に用いた DAF-2 DA はアセチル基を 2 つ持ち、脂溶性に富んで細胞膜を透過しやすい。細胞内に取り込まれた DAF2-DA は細胞内のエステラーゼによってアセチル基が切り離され水溶性の DAF-2 となって細胞内に留まる。DAF-2 は無蛍光だが、細胞内で産生された NO と特異的に反応し、蛍光を発する DAF-2 T となる(Fig. 22)。これは励起光波長 495nm, 蛍光波長 515nm で検出される蛍光を発し、その強度により NO 産生を検出できる[91]。通常は *in vitro* の培養液に加え培養細胞に取り込ませるが、*in vivo* 生体内の血管にこの指示薬を適用するためには、血管の外側から適用しても血管内皮細胞に到達させることが困難であった。そのため血管内腔に DAF-2 DA を灌流し血管内皮細胞に直接接触れさせて取り込ませる必要があった。今回はこの手法を改良して、薬剤投与の前後で血流改善作用と NO 産生に及ぼす作用を定量的に評価する方法を構築した。

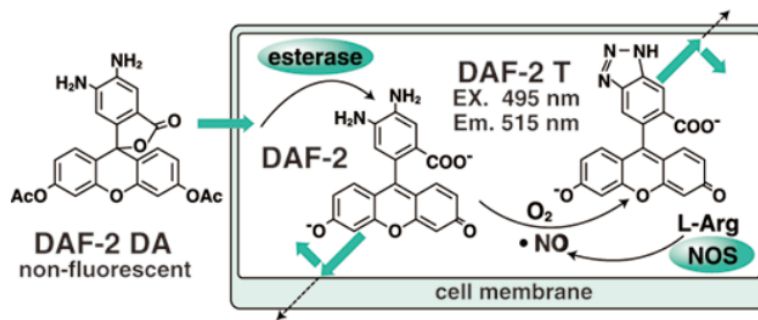


Fig. 22 DAF-2 の構造と検出原理

manufacturer's instruction (五稜化学) より

先に示した DAF-2 の NO 検出の原理からわかるように、蛍光で示されるのはその時点までに産生された NO の蓄積量であり、リアルタイムにその時点での産生量を反映するわけではない。さらに常に血流にさらされる血管内皮細胞では DAF-2 T 及び DAF-2 が細胞外に拡散しクリアランスされるため蛍光の減衰が想像以上に早く、蛍光強度の差分としても NO 産生の変化を検出することが困難であった。そこで今回の桂枝茯苓丸の NO 産生に対する作用の検討ではこれを逆に利用して、まず DAF-2 DA を血管内皮細胞に取り込ませて薬剤投与前の DAF-2 蛍光画像を取得したのち、一旦蛍光の衰退を待って薬剤の投与を行い、もう一度同様に DAF-2 DA を取り込ませて薬剤投与後の蛍光画像を取得し、薬剤投与前後を比較するという方法を開発した。

ラット腸間膜の血管は血管内を観察するのに適しているが、血管周囲の組織が貧弱で血管の収縮弛緩に対する作用を検討するにはあまり適していない。そこでまず、マウス皮下の血管観察系を用いて血管作動と血流動態に対する桂枝茯苓丸の作用を確認し、ついでラット腸間膜の血管で、NO 産生に対する作用を検討した。

6-2 方法

6-2-1 材料と試薬

C57B/6 マウスと Wistar ラットは日本エスエルシー（浜松、日本）から購入した。N^G-Monomethyl-L-arginine acetate (L-NMMA)は同仁化学研究所（鹿児島、日本）から、diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2 DA)は五稜化学（札幌、日本）から、urethane は Sigma-Aldrich Japan（東京、日本）からそれぞれ購入した。共焦点レーザー顕微鏡による撮影は LSM 700, Carl Zeiss (Oberkochen, Germany)を用いた。桂枝茯苓丸エキス顆粒はツムラ（東京、日本）の厚意により提供された。桂枝茯苓丸エキス顆粒（1日用量 7.5 g）には、それぞれ 3 g のケイヒ、ブクリョウ、シャクヤク、ボタンピ、トウニンからの混合抽出物が含まれている。In vivo イメージング実験は、倫理委員会の承認のもと「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議 2006 年 6 月 1 日制定）に準規して行われた。

6-2-2 マウス皮下血管の血流ライブイメージング

8 週齢雌性 C57B/6 マウスを実験に用いた (n = 3)。ウレタン urethane を皮下投与 (1.5 g/kg i.s.) して麻酔し、正中線より腹部皮膚を切開し、血管を傷つけないように皮下組織を剥離して皮膚をガラス板の上に広げた。塩化ビニリデン薄膜で表面を覆い、乾燥を防いだ。桂枝茯苓丸は 100 mg/mL の濃度で湯に懸濁し、室温に冷ましたのちに、経食道的に胃内に留置したチューブにより、麻酔下でイメージング中のマウスに 300 mg/kg の用量で投与した。桂枝茯苓丸投与前と投与後 30 分ごとに 180 分後まで、皮下組織血管の血流動態のリアルタイム動画撮影を行った。記録した画像から、血管内径と血流速度を ImgeJ ver. 1.45s image analysis software (NIH, USA)を用いて計測した。細動脈（血管内径 10 μm ~ 20 μm）及び、毛細血管 (< 10 μm) において、桂枝茯苓丸投与後、0, 30, 60, 90, 120, 180 分後の変化を解析した。血管内径は 3 点において 3 回計測し、3 匹のマウスで再現性を確認した。血流速度は、赤血球の移動距離と移動に要した時間（1 フレーム 1/30 秒 × 移動に要したフレーム数）から算出した。1 ポイント 4 回繰り返し測定してその平均をその時間、そのポイントでの測定値とした。また、イメージング個体とは異なるマウスを用いて、同様にウレタン麻酔下で桂枝茯苓丸投与による心拍数の変化を測定した。

6-2-3 ラット腸間膜血管での血流動態と NO 産生のライブイメージング

実験には 9 週齢の雌性 Wistar ラットを用いた（各実験群 n = 3）。前夜より絶食させたラットにウレタンの皮下投与 (1.5 g/kg i.s.) で麻酔を施し、腹部を剃毛後、電気メスを用いて腹膜を約 2 cm の長さで無血的に切開した。回腸を 7~8 cm の長さで体外に引き出し、腸間膜をガラスプレート上に広げ、塩化ビニリデン薄膜で覆い乾燥を防いだ。顕微鏡で観察する腸間膜上の血管網の上流の腸間膜動脈にカテーテルを挿入し、観察部位の血管内に DAF-2 DA 液を灌流する経路を確保した。Fig. 25 a, c に示すように腸間膜の血管網に流入する血管の上流部、中間部、末梢部に観察部位をそれぞれのラットで決めた。桂枝茯苓丸の NO 産生に対する作用を検討するために、次の 3 つの実験群に分けて実験を行なった。DAF-2 DA を処置するのみのコントロール群、DAF-2 DA 処置と桂枝茯苓丸の投与を行う桂枝茯苓丸群、そして DAF-2 DA と L-NMMA を処置する L-NMMA 群である。桂枝茯苓丸群では、あらかじめ経食道的に胃内に留置したカテーテルを経由して 100 mg/mL の濃度に調整した桂枝茯苓丸を 300 mg/kg の用量で投与した。L-NMMA 群では、L-NMMA を静脈内投与するためにあらかじめ鼠径静脈にカニューレションして投与経路を確保した。

NO 測定は Fig.23 に示すように、次のように行った。まず血流動態を明視野照明で動画撮影した後、確保した経路より観察血管の内腔に 50 μ M に調整した DAF-2 DA 溶液を 3 分間灌流し、血管内皮細胞に DAF-2 を取り込ませた。灌流終了後直ちに共焦点レーザー顕微鏡で 488nm のアルゴンレーザー光で励起光し、492nm のロングパスフィルターを用いて 1 回目の蛍光画像を取得した。その後血管内皮細胞内の蛍光が消失するまで 30 分間放置したのち、あらかじめ胃内に留置したチューブより桂枝茯苓丸の懸濁液を投与し、30 分後に DAF-2 DA の 2 回目の灌流を 1 回目と同じ手順で 3 分間行い、直ちに 2 回目の蛍光画像を取得した。最後に血流の明視野動画を撮影した。

対照として、1 回目の DAF-2 DA 灌流後何も投与せず 60 分後に 2 回目の DAF-2 DA 灌流を行なったコントロール群と、桂枝茯苓丸の代わりにアルギニンの誘導体であり eNOS のアンタゴニストとして作用して活性を阻害する L-NMMA を投与する群の 3 群で比較した。L-NMMA の投与は 2 回目の DAF-2 DA 灌流の 5 分前に血管内に 25mg/kg を全身投与し、さらに DAF-2DA の灌流溶液に 2.5mg/mL の濃度で加えて 3 分間の灌流中作用させた。各群 3 匹のラットから 6 ~ 9 視野で取得した蛍光画像から、注目する血管領域内の平均蛍光強度を ImageJ software を用いて計測した。これにより、1 回目と 2 回目の DAF-2 の蛍光強度を比較して、桂枝茯苓丸投与の前後の NO 産生量を解析した。

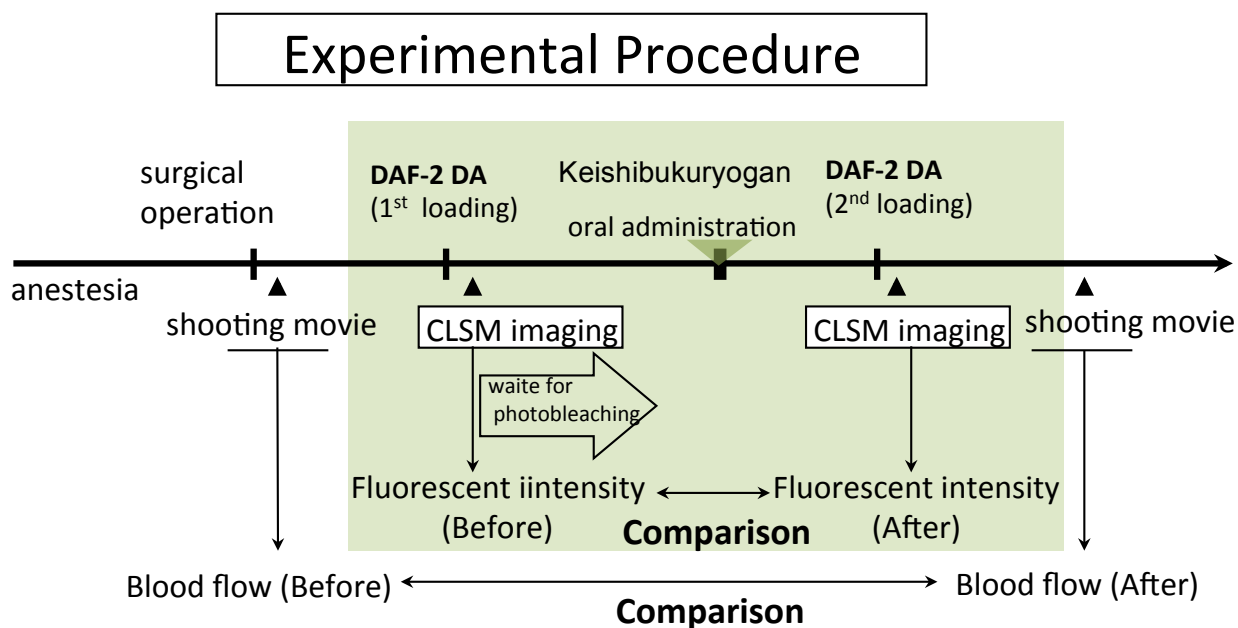


Fig. 23 Experimental procedure

6-2-4 統計的解析

統計学的解析は Prism 6 for Mac OS X (Graphpad Software Inc., La Jolla, Ca, USA)を用い、一元配置分散分析後 Holm-Sidak 法により多重検定を行なった。

6-3 結果

6-3-1 マウス皮下血管での桂枝茯苓丸の血管拡張作用と血流改善作用

NO 測定に先立って、桂枝茯苓丸の血管拡張作用と血流改善作用について、ラット腸間膜の血管よりも血管径と血流速度の変化を計測しやすいマウス皮下組織を用いてライブイメージング画像により確認した。その結果桂枝茯苓丸の経口投与後、約 60 分をピークに細動脈における血管径の拡大と血流量増加が確認された。一方毛細血管では、血管径の変化はなかったが、投与後 60 分をピークに血流速度の増加が観察された (Fig. 24)。

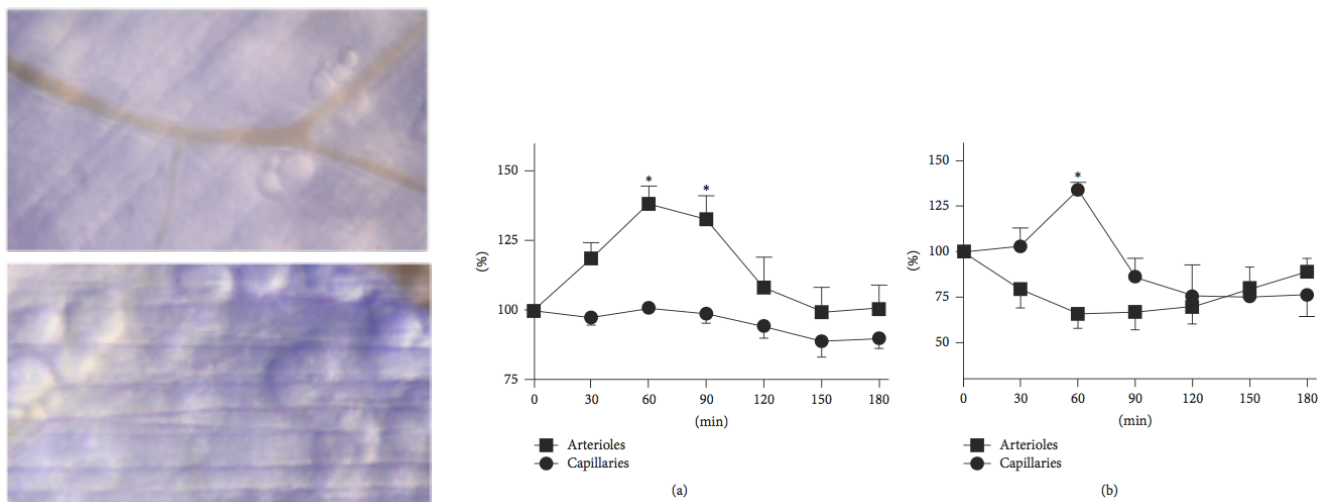


Fig. 24 Changes in vasodiameter (a) and blood flow velocity (b) of mice subcutaneous arterioles (■) and capillaries (●) before and after administration of Keishibukuryogan. Both (a) and (b) are expressed as a percentage, with preadministration expressed as 100 % * $P < 0.05$.

6-3-2 ラット腸間膜血管での桂枝茯苓丸の NO 産生促進作用

結果を Fig. 25 に示す。1 回目の DAF-2 蛍光画像においても細動脈で蛍光が認められ、恒常的に血管内皮細胞から産生されている NO が可視化された。腸間膜の血管網に流入する上流域に近い細動脈でより強い蛍光が観察され、桂枝茯苓丸投与後には、それぞれ領域で血管内皮の蛍光強度が増加した。一方、コントロール群では 1 回目と 2 回目の蛍光強度にほとんど違いがなく、L-NMMA 投与群では投与前に比べ投与後の 2 回目の蛍光が低下していた。1 回目の蛍光強度を 100 として相対化した時の 2 回目の蛍光強度は、コントロール群で 101.0 ± 2.4 %、桂枝茯苓丸群では 157.7 ± 10.9 %と有意に上昇 ($p < 0.01$)、L-NMMA 群では 74.2 ± 3.6 %と有意に低下 ($p < 0.05$)していた (Fig. 26)。

6-4 考察・小括

マウス皮下血管では桂枝茯苓丸投与による血管拡張と血流量の増加が確認された。観察血管の血圧をモニターすることはできなかったが、投与マウスの心拍数に大きな変化がみられなかったことから（データは示さない）、桂枝茯苓丸でみられた血管の拡張と血流改善作用は、血管の弛緩によるものと考えられた。

ラット腸間膜で DAF-2 DA は細動脈から毛細血管、静脈へと満遍なく灌流されたが、DAF-2 の蛍光が観察されたのは、動脈の血管内皮細胞で顕著だった。静脈ではなく動脈で常に NO が産生され、血流の維持に働いていることを示しているものと思われた。腸間膜血管網の流入部分に近い比較的大い動脈で恒常的に強い蛍光を発していたが、この部分は一層の平滑筋細胞が一層取り巻いた抵抗血管にあたる部位であり、シェアストレスの物理的刺激が NO 産生を促進することが *in vitro* の研究で分かっており [92]、これを反映した観察結果と考えられた。

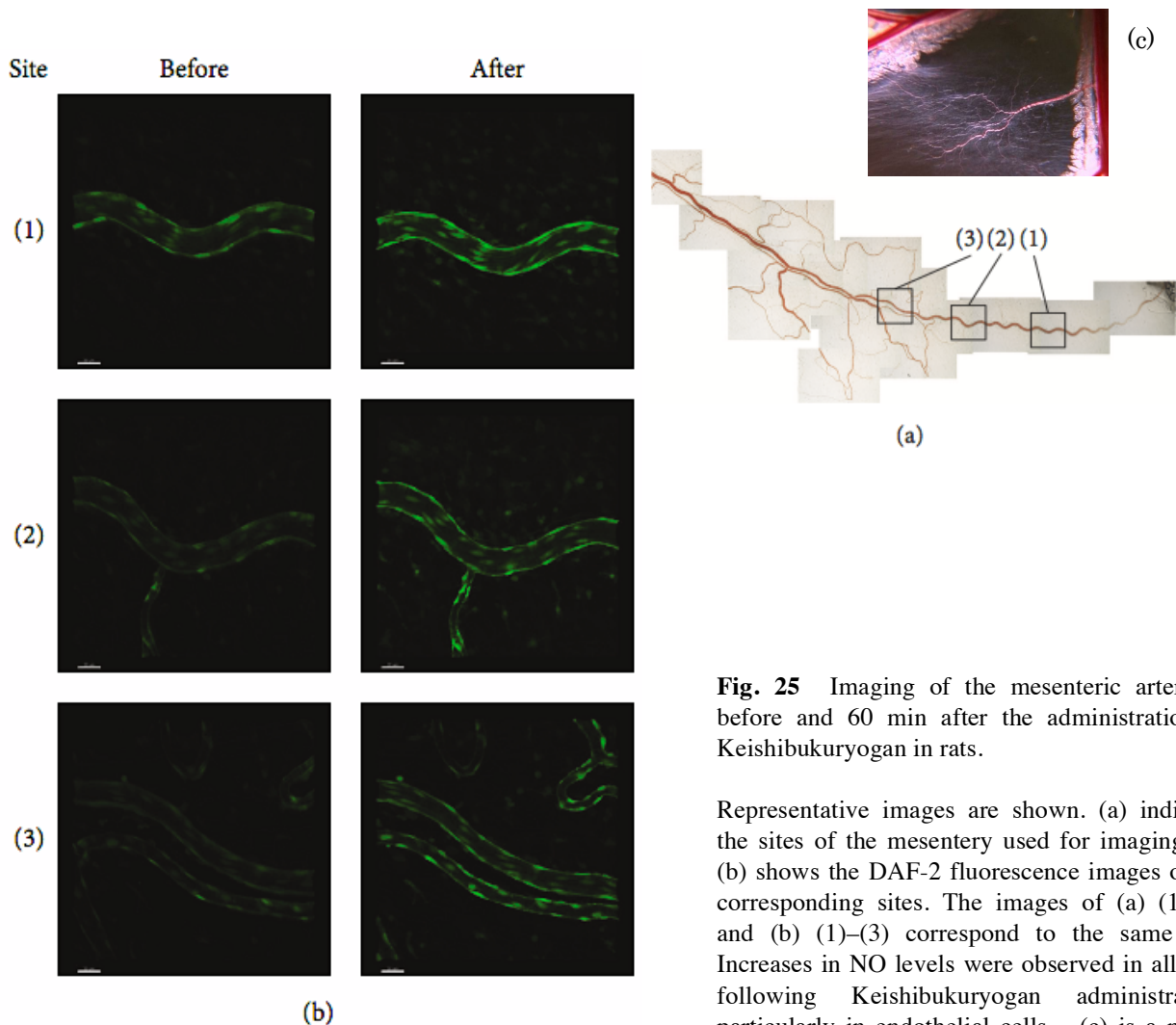


Fig. 25 Imaging of the mesenteric arterioles before and 60 min after the administration of Keishibukuryogan in rats.

Representative images are shown. (a) indicates the sites of the mesenterium used for imaging and (b) shows the DAF-2 fluorescence images of the corresponding sites. The images of (a) (1)–(3) and (b) (1)–(3) correspond to the same site. Increases in NO levels were observed in all sites following Keishibukuryogan administration, particularly in endothelial cells. (c) is a macro image of a rat mesenterium.

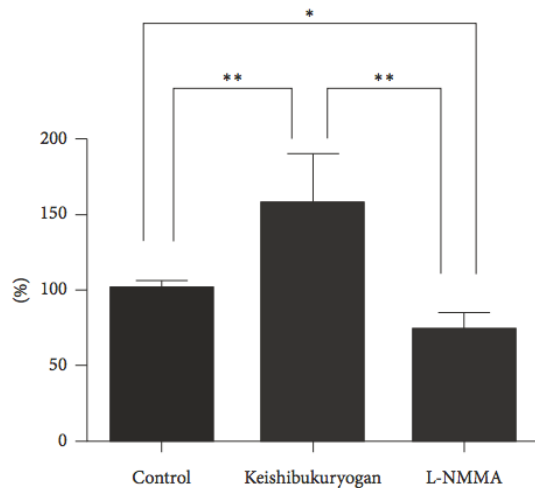


Fig. 26 Changes in NO levels following the administration of Keishibukuryogan.

DAF-2 Fluorescence intensity was significantly decreased in the L-NMMA group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

血管内皮領域の DAF-2 の蛍光が L-NMMA 群で 1 回目に比べ 2 回目の蛍光強度が有意に低下したことは、DAF-2 の蛍光がアルギニンを基質にした eNOS による NO 産生を反映していることを示している。桂枝茯苓丸群で蛍光強度が有意に上昇していたことから、桂枝茯苓丸の投与が血管内皮細胞の NO 産生を促進することが示された。

NO は、血管内皮細胞由来の血管弛緩因子であり、血液循環の調節において極めて重要な生理活性物質とみなされている[93]。瘀血には NO が密接に関与すると予想されるが、特に生体内でこの関係を調べた研究はほとんどない[94, 95, 96]。Hirayama A らはこれまで、駆瘀血剤の一つである冠元顆粒が NO 代謝物を増加させ、ヒトで NO-スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) バランスを変化させることを報告している[97]。Ng らの一連の研究では、細動脈分岐下流の血管内腔で血球の流れと血管壁との間に形成される非対称な無細胞層 (cell-free layer) の幅が、局所の NO-スーパーオキシドバランスの不均一な分布と密接に関係することが明らかになった[98,99]。これらの報告は、瘀血と NO 及び ROS の密接な関係を示唆している。ところで、桂枝茯苓丸は漢方薬の代表的な駆瘀血剤である。主要な抗瘀血効果と NO との関係が *in vitro* で報告されており、皮膚の血管内皮細胞の炎症性サイトカインに対する反応を桂枝茯苓丸が阻害することが示されている[100]。酸化ストレスとの関連では、2,2-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) によって誘導される赤血球膜の脂質過酸化に対する抑制作用と、ニトロプルシドナトリウムによる神経細胞死の抑制作用が報告されている[101,102]。さらに、桂枝茯苓丸の成分については、ケイヒに含まれるケイヒアルデヒド; cinnamic aldehyde、シャクヤクに含まれるペオニフロリン; paeoniflorin、トウニンに含まれるアミグダリン; amygdalin は末梢血を増加させることが知られており[103, 104,105]、ケイヒアルデヒドとペオニフロリンは NO に関連した経路による抗炎症作用を示すことが報告されている[104, 106, 107, 108,109]。これらの結果から、桂枝茯苓丸の抗瘀血作用は NO と ROS に密接に関連していることが強く示唆された。しかし、これらの報告のほとんどは *in vitro* での研究報告であり、*in vivo* での報告はほとんどない[110]。

今回のラット腸間膜細動脈のイメージング研究は、桂枝茯苓丸投与による瘀血状態の改善を DAF-2 蛍光の増加によって示すことに成功した。DAF-2 は高い NO 特異性[82]を有し、L-NMMA の処置が蛍光強度を減少させたことから、桂枝茯苓丸の抗瘀血作用が NO 産生に関連したメカニズムによるものである可能性を明らかにした。NO 産生の増加は桂枝茯苓丸投与後 30 分で、主に血管内皮

細胞において亢進していたことから、eNOS が桂枝茯苓丸の作用の標的となる酵素であることが示唆された。この知見はアジュバント誘発関節炎モデル[101]の大動脈における eNOS および iNOS の両方に対する桂枝茯苓丸の効果を示した以前の *in vivo* 研究と一致する。一方、桂枝茯苓丸の血管拡張作用は投与後 120 分で持続したが、血流量の増加は 60 分までしか維持されず、血管径の増加にもかかわらず減少した。これは、桂枝茯苓丸が赤血球自体に対する素早い薬理効果を有することを示しているのかも知れない。この点を明確にするためにさらなる研究が必要である。

以上のことから、桂枝茯苓丸の投与により、細動脈の血管内皮での NO 産生が増加し、瘀血状態の改善がもたらされたことが、生体内の生きた血管で蛍光ライブイメージングにより初めて確認された。

血管内皮機能の低下は動脈硬化、脳心血管病、塞栓症、慢性腎臓病、糖尿病、アルツハイマー病のような神経変性疾患など、様々な疾患の基盤にあるため、血管内皮細胞の NO 産生機能を実験動物の生きた血管で評価できることの意義は大きい。

第7章

まとめ

第4章では

外因性に投与された薬剤が引き起こす酸化ストレスについて、消化管粘膜傷害の副作用が問題となっている NSAIDs のインドメタシンを取り上げ、*in vitro* で提唱されている新しい傷害メカニズムを、マウスの生体内で確認することができた。小腸粘膜上皮細胞は、病変が形成される前から ROS 濃度が高くなって、脱落しやすくなり粘膜バリアを脆弱なものにしていた。これは *in vivo* ライブイメージングによって明らかにすることができた。

第5章では

内因性の酸化ストレス起因物質として注目されているホモシステインについて、骨芽細胞への作用を *in vitro* で検討した。骨の質を脆弱化し骨折しやすくすることに繋がる、酸化ストレスによる細胞死、コラーゲン架橋を形成する酵素の発現量を低下させる作用が明らかになった。また酸化ストレスで形成が促進される AGE 架橋を増加させることを *in vitro* で初めて示した。*in vitro* の蛍光イメージングによって ROS を生じるホモシステインの細胞内の作用点、またエストロゲン、SERM の作用点を考察するために今後に関わるデータが得られた。

第6章では

漢方で言う瘀血状態を治療対象としている桂枝茯苓丸が血管内皮細胞からの NO 産生を増加させて血流を改善することをライブイメージングによって初めて示すことができた。瘀血の状態は、まさに酸化ストレスによって血管内皮機能が低下した状態であると考えられる。血管内皮機能の低下は、動脈硬化、血栓症、糖尿病、アルツハイマー病など、様々な疾患の根底にあると考えられ、5章で取り上げたホモシステインの作用点であると考えられている。血管内皮細胞の NO 産生を *in vivo* で評価できるイメージング系を構築できたことの意義は大きい。

7-1 総括

生物材料を生かしたまま、*in vitro*, *in vivo* でライブイメージする技術と、機能分子を可視化する蛍光プローブの組み合わせにより、生体関連フリーラジカルの動的な定量的解析が可能になった。

少なくとも2点以上の時間経過のポイントでイメージングすることで、生きている時間経過の中で起こる変化の違いに状態の違いが反映され、一点だけの観察では把握できなかった状態の違いが検出できるようになった。変化の動的な把握は、状態を知るためのより多くの情報を得ることができ有用である。

イメージングポイントをさらに増やせば、それはタイムラプス映像として、「動き」として現象を把握することに他ならない。

7-2 今後への展望

各種疾病の成因を知り医薬品などの効果を検証する上でも、*in vitro* で得られた知見が、体の組織の内でのどのように働いているのかを検証することは重要である。定量性を持った評価系の構築が必要とされている。分子の可視化技術と、生体内組織の可視化技術の組み合わせが可能性を広げていくことになる。今後さらに定量性を増すことで各種疾病との関連に新たな知見がもたらされるものとする。生きたままを見る技術を洗練するとともに、最新の光学・撮像機器、最新の可視化プローブ、遺伝子改変技術と組み合わせてイメージングで評価できる系を構築したい。

時間軸の中で動的に現象を把握し、それを評価して背景にあるメカニズムを理解することができる時代になってきている。これまでは、ある時点で変化の時間を止めて細胞をすりつぶし、特定の物質に限って物質量を定量化し平均値の違いで現象を把握するしかなかった。平均値がどのような要素によって構成されているのかといった詳細な情報は捨てられてしまい同時には得られなかった。例えばシャーレ全体の平均からは、たくさんの細胞が同じように物質を作っているのか、特定の細胞がたくさんの物質を作っているのか、と言った情報は得られない。その不均一性も同時に把握できれば全体の平均値の違いを作り出した要素を知ることができる。そして、生きた反応として平均値の違いが作り出されるに至った時間過程の中の変化の情報も捨てずに評価することができれば、違いを生んだメカニズムを類推することができるはずである。

イメージングは多くの変量を捨てずに同時に記録でき、直感的に把握できる。解析で取り出すことができればより多くの情報を与えてくれる。物質の不均一な分布は形を与え、生きている状態では常に分子が変化し物質の分布パターンが変化している。物質の分布、つまり「形」の時間的な変化は、「動き」に他ならない。物質変化の結果として現れる「動き」の変化で状態を把握できるようになるはずである。

人間の感覚は動きに大変敏感で、少しの動きの違いにも違和感を感じたりする。動きを直感的に客観的に把握し解釈する解析法の開発も可能な時代になりつつある。

生命現象を動きとして記録し、把握することに今後もこだわって行きたい。

生きて動いている中に私たちの健康や病気がある。それぞれがそれぞれの時間を経て、平均値ではない人がそこにいる。平均値で理解してきた知見の上に、平均値ではない個々の現象を説明しなければならない。時間的な変化の中で状態を把握する、動きで状態を把握するのが次の時代を拓くのではないか。

参考文献

- [1] Marija Vlaski-Lafarge and Zoran Ivanovic. Reliability of ROS and RNS detection in hematopoietic stem cells – potential issues with probes and target cell population. *Journal of Cell Science* 2015; 128: 3849-3860
- [2] Indo HP, Davidson M, Yen H-C et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* 2007; 7: 106-118
- [3] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Pelicci PG et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 2005; 122(2): 221-33
- [4] Toren Finkel. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 2011; 194 (1):7–15
- [5] Gerald W Dorn II. Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO Mol Med.* 2015; 7: 865–877
- [6] Sue Goo Rhee. H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science* 2006; 312 (5782): 1882-1883
- [7] Elizabeth A. Veal, Alison M. Day, and Brian A. Morgan. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell* 2007; 26: 1-14
- [8] Michael Schieber and Navdeep S. Chandel. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol.* 2014; 24(10): R453–R462
- [9] Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 47: 1239–1253
- [10] Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci. STKE* 2006; 2006 (349), re8.
- [11] Toehhawng L1, Deng S, Pervaiz S, Yap CT. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. *Mitochondrion* 2013; 13 (3): 246-253
- [12] Ricardo Murphy, Thomas E. DeCoursey. Charge compensation during the phagocyte respiratory burst. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1757: 996–1011
- [13] J Su, P A. Lucchesi, R A Gonzalez-Villalobos et al. Role of Advanced Glycation End Products with Oxidative Stress in Resistance Artery Dysfunction in Type 2 Diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(8): 1432–1438
- [14] Wai Keung Christopher Lai Ming Yin Kan. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Ann Nutr Metab* 2015; 67: 1–12
- [15] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408(6809): 239-47
- [16] Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem.* 2003; 278(5): 3170-5
- [17] Shimokawa O, Matsui H, Nagano Y, Kaneko T et al. Neoplastic transformation and induction of H⁺,K⁺ -adenosine triphosphatase by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the gastric epithelial RGM-1 cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2008; 44(1-2): 26-30

- [18] Masato Tamura, Hirofumi Matsui, Tsutomu Tomita, Hisato Sadakata, Hiroko P. Indo, Hideyuki J. Majima, Tsuyoshi Kaneko and Ichinosuke Hyodo. Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2014; 54 (1): 12–17
- [19] Arora G, Singh G, Triadafilopoulos G. Proton pump inhibitors for gastroduodenal damage related to nonsteroidal anti-inflammatory drugs or aspirin: twelve important questions for clinical practice. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009; 7: 725-735
- [20] Graham DY, Agrawal NM, Roth SH. Prevention of NSAID- induced gastric ulcer with misoprostol: multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 1988; 332(8623): 1277-1280.
- [21] Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93
- [22] Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 2008; 135: 41-60
- [23] Higuchi K, Yoda Y, Amagase K, et al. Prevention of NSAID- induced small intestinal mucosal injury: prophylactic potential of lansoprazole. *J Clin Biochem Nutr.* 2009; 45: 125-130
- [24] Tajima A. Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) - induced small intestinal injury. *Pharm Anal Acta.* 2014; 5: 282
- [25] Higuchi K, Umegaki E, Watanabe T, et al. Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury. *J Gastroenterol.* 2009; 44: 879-888
- [26] Lanas A, Garcia-Rodríguez LA, Polo-Tomas M, et al. Time trends and impact of upper and lower gastrointestinal bleeding and perforation in clinical practice. *Am J Gastroenterol.* 2009; 104: 1633-1641
- [27] Pallab M, Samik B, Uday B et al. Indomethacin, a Non-steroidal Anti-inflammatory Drug, Develops Gastropathy by Inducing Reactive Oxygen Species-mediated Mitochondrial Pathology and Associated Apoptosis in Gastric Mucosa. *J Biol Chem.* 2009; 284(5) :3058 –3068
- [28] Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, et al. Rebamipide attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) induced lipid peroxidation by the manganese superoxide dismutase (MnSOD) overexpression in gastrointestinal epithelial cells. *J Physiol Pharmacol.* 2012; 63: 137-142
- [29] Long Binh Vong, Tsutomu Tomita, Toru Yoshitomi, Hirofumi Matsui and Yukio Nagasaki. An Orally Administered Redox Nanoparticle That Accumulates in the Colonic Mucosa and Reduces Colitis in Mice. *Gastroenterology* 2012 Oct;143(4):1027-36.e3
- [30] Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T, et al. Identification of dihalogenated proteins in rat intestinal mucosa injured by indomethacin. *J Clin Biochem Nutr.* 2011; 48: 178-182
- [31] Amagase K, Yoshida Y, Hara D, Murakami T, Takeuchi K. Prophylactic effect of egualen sodium, a stable azulene derivative, on gastrointestinal damage induced by ischemia/reperfusion, double antiplatelet therapy and loxoprofen in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2013; 64: 65-75
- [32] Kwiecien S, Konturek PC, Sliwowski T, et al. Interaction between selective cyclooxygenase inhibitors and capsaicin- sensitive afferent sensory nerves in pathogenesis of stress- induced gastric lesions. Role of oxidative stress. *J Physiol Pharmacol.* 2012; 63: 143-151
- [33] Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol.* 2013; 64: 409-421
- [34] Somasundaram S, Sigthorsson G, Simpson RJ, et al. Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000; 14: 639-650

- [35] Matsui H, Shimokawa O, Kaneko T, Nagano Y, Rai K, Hyodo I. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine. *J Clin Biochem Nutr.* 2011; 48: 107-111
- [36] Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787-790
- [37] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 913-922
- [38] Pallab M, Samik B, Uday B et al. Indomethacin, a Non-steroidal Anti-inflammatory Drug, Develops Gastropathy by Inducing Reactive Oxygen Species-mediated Mitochondrial Pathology and Associated Apoptosis in Gastric Mucosa. *J Biol Chem* 2009; 284(5) :3058 –3068
- [39] Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 755-767
- [40] Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al. Role of gastric acid secretion in progression of acute gastric erosions induced by ischemia-reperfusion into gastric ulcers. *Eur J Pharmacol.* 2000; 398: 147-158
- [41] Tsutsumi S, Tomisato W, Takano T, Rokutan K, Tsuchiya T, Mizushima T. Gastric irritant-induced apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1589: 168-180
- [42] Nagano Y, Matsui H, Muramatsu M, et al. Rebamipide significantly inhibits indomethacin-induced mitochondrial damage, lipid peroxidation, and apoptosis in gastric epithelial RGM-1 cells. *Dig Dis Sci.* 2005; 50 (Suppl. 1): S76-S83
- [43] Somasundaram S, Hayllar H, Rafi S, Wrigglesworth JM, Macpherson AJ, Bjarnason I. The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis. *Scand J Gastroenterol.* 1995; 30: 289-299
- [44] Indo HP, Inanami O, Koumura T, et al. Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Radic Res.* 2012; 46: 1029-1043
- [45] Majima HJ, Matsui H, Ozawa T, et al. Mitochondria as source of free radicals. *Free Radic Biol.* 2011; 29: 12-22
- [46] Majima HJ, Oberley TD, Furukawa K, et al. Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *J Biol Chem.* 1998; 273: 8217-8224
- [47] Majima HJ, Matsui H, Suenaga S, Matsui H, Yen HC, Ozawa T. Mitochondria as possible pharmaceutical targets for the effects of vitamin E and its homologues in oxidative stress-related diseases. *Curr Pharm Des.* 2011; 17: 2190- 2195
- [48] McCully, K. S., Vascular pathology of homocysteinemia - Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis, *Amer. J. Purhol.* 1969; 56: 111-128
- [49] McCully, K. S. Homocysteine and vascular disease. *Nature medicine* 1996; 2(4): 386-389
- [50] Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M, Helfand M. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83:1203–1212
- [51] The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288:2015–2022
- [52] van Guldener, C. and Stehouwer, C. D. Homocysteine metabolism in renal disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41: 1412–1417

- [53] de Luis, D. A., Fernandez, N., Arranz, M. L., Aller, R., Izaola, O. and Romero, E. Total homocysteine levels relation with chronic complications of diabetes, body composition, and other cardiovascular risk factors in a population of patients with diabetes mellitus type 2. *J. Diabetes Complications*. 2005; 19: 42–46
- [54] Clarke, R., Smith, A. D., Jobst, K. A., Refsum, H., Sutton, L. and Ueland, P. M. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch. Neurol*. 1998; 55: 1449–1455
- [55] Filip C, Zamosteanu N and Albu E. Homocysteine in Red Blood Cells Metabolism –Pharmacological Approaches. *Blood Cell*, INTECH; <http://dx.doi.org/10.5772/47795>
- [56] Henrieta Skovierova, Eva Vidomanova, Silvia Mahmood, Janka Sopkova, AnnaDrgova, Tatiana Cervenova, ErikaHalasova, and JanLehotsky. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int. J. Mol. Sci*. 2016;17:1733
- [57] Morita H, Taguch J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Yazaki Y et al. Genetic Polymorphism of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) as a Risk Factor for Coronary Artery Disease. *Circulation* 1997; 95:2032-2036
- [58] Villadsen, M. M., Bunger, M. H., Carstens, M., Stenkjaer, L. and Langdahl, B. L. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. *Osteoporos. Int*. 2005; 16: 411–416
- [59] Ralf Dringen, Brigitte Pfeiffer, and Bernd Hamprecht. Synthesis of the Antioxidant Glutathione in Neurons: Supply by Astrocytes of CysGly as Precursor for Neuronal Glutathione. *The Journal of Neuroscience* 1999; 19(1):562–569
- [60] Starkebaum, G. and Harlan, J. M. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest*. 1986; 77, 1370–1376
- [61] Muniz, P., Saez, P., Iradi, A., Vina, J., Oliva, M. R. and Saez, G. T. Differences between cysteine and homocysteine in the induction of deoxyribose degradation and DNA damage. *Free Radical Biol. Med*. 2001; 30: 354–362
- [62] Sengupta, S., Wehbe, C., Majors, A. K., Ketterer, M. E., DiBello, P. M. and Jacobsen, D. W. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine–cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 46896–46904
- [63] P. Andrew Outinen, Sudesh K. Sood, Sabine I. Pfeifer, Sushmita Pamidi, Thomas J. Podor, Jun Li, Jeffrey I. Weitz, and Richard C. Austin. Homocysteine-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Growth Arrest Leads to Specific Changes in Gene Expression in Human Vascular Endothelial Cells. *Blood* 1999; 94(3): 959-967
- [64] William J. Wedemeyer, Ervin Welker, Mahesh Narayan, and Harold A. Scheraga. Disulfide Bonds and Protein Folding. *Biochemistry* 2000; 39 (15): 4207–4216
- [65] (4) Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270:2693–2698
- [66] Chen, Z. Karaplis, A.C. Ackerman, S.L. Pogribny, I.P. Melnyk, S. Lussier-Cacan, S. Chen, M.F. Pai, A. John, S.W. Smith, R.S. et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet*. 2001; 10: 433–443
- [67] McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med*. 2004; 350:2042–2049
- [68] van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de JR, Lindemans J et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med*. 2004; 350:2033–2041

- [69] Herrmann M, Tami A, Wildemann B, Wolny M, Wagner A, Schorr H et al. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone* 2009; 44:467–475
- [70] Kim DJ, Koh JM, Lee O, Kim NJ, Lee YS, Kim YS et al. Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone* 2006; 39:582–590
- [71] Thaler R, Spitzer S, Rumpler M, Fratzl-Zelman N, Klaushofer K, Paschalis EP et al. Differential effects of homocysteine and beta aminopropionitrile on preosteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 2010; 46:703–709
- [72] Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sciences* 1997; 61(13):1205-1215
- [73] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25:402–408
- [74] Stephens AS, Stephens SR, Morrison NA. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *BMC Res Notes*. 2011;4:410
- [75] M. R. Bennett, G. I. Evan, S. M. Schwartz. Apoptosis of Rat Vascular Smooth Muscle Cells Is Regulated by p53-Dependent and -Independent Pathways. *Circulation Research* 1995; 77: 266-273
- [76] Park SJ, Kim KJ, Kim WU, Oh IH, Cho CS. Involvement of endoplasmic reticulum stress in homocysteine-induced apoptosis of osteoblastic cells. *J Bone Miner Metab*. 2012; 30:474–484
- [77] M.P. Boldin, T.M. Goncharov, Y.V. Goltsev, D. Wallach. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803-815
- [78] Saito M, Marumo K, Soshi S, Kida Y, Ushiku C, Shinohara A. Raloxifene ameliorates detrimental enzymatic and nonenzymatic collagen cross-links and bone strength in rabbits with hyperhomocysteinemia. *Osteoporos Int* 2010; 21: 655–666
- [79] Mann V, Huber C, Kogianni G, Collins F, Noble B. The antioxidant effect of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the inhibition of osteocyte apoptosis in vitro. *Bone* 2007; 40: 674–684
- [80] Johnell O, Kanis JA, Black DM, Balogh A, Poor G, Sarkar S et al. Associations between baseline risk factors and vertebral fracture risk in the multiple outcomes of raloxifene evaluation (MORE) Study. *J Bone Miner Res*. 2004; 19:764–772
- [81] Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2010; 21:195–214
- [82] Yamaguchi T, Sugimoto T Bone metabolism and fracture risk in type 2 diabetes mellitus. *Endocr J*. 2011; 58:613–624
- [83] Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y, Ohnishi J, Inohara N, Kuida K, Sakamaki K, Yonehara S, Momoi T. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Experimental Cell Research* 2003; 283: 156–166
- [84] Suhara T1, Mano T, Oliveira BE, Walsh K. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res*. 2001; 89: 13–19
- [85] Skurk C, Walsh K. Death receptor induced apoptosis: a new mechanism of homocysteine-mediated endothelial cell cytotoxicity. *Hypertension* 2004; 43: 1168-1170
- [86] Francisco R.M. Laurindo, Thais L.S. Araujo, and Thalita B. Abrahao. Nox NADPH Oxidases and the Endoplasmic Reticulum. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(17):2755-75

- [87] Zhang Z, Wei C, Zhou Y, Yan T, Wang Z, Li W, Zhao L. Homocysteine Induces Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells via Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 5736506
- [88] Takeno A, Kanazawa I, Tanaka K, Notsu M, Yokomoto M, Yamaguchi T et al. Activation of AMP-activated protein kinase protects against homocysteine-induced apoptosis of osteocytic MLO-Y4 cells by regulating the expressions of NADPH oxidase 1 (Nox1) and Nox2. *Bone* 2015; 77:135–141
- [89] Kooptiwut S, Mahawong P, Hanchang W, Semprasert N, Kaewin S, Limjindaporn T, Yenchitsomanus PT. Estrogen reduces endoplasmic reticulum stress to protect against glucotoxicity induced-pancreatic β -cell death. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 139: 25-32
- [90] Yudai Torihata, Kiyotaka Asanuma, Katsunori Iijima, Tooru Shimosegawa et al. Estrogen-Dependent Nrf2 Expression Protects Against Reflux-Induced Esophagitis. *Dig Dis Sci*. 2017 Dec 27. doi: 10.1007/s10620-017-4885-3. [Epub ahead of print]
- [91] H Kojima, N Nakatsubo, T Nagano et al. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins *Anal. Chem.*, 1998; 70(13): 2446–2453
- [92] Pittner J, Wolgast M, Casellas D, Persson AE. Increased shear stress-released NO and decreased endothelial calcium in rat isolated perfused juxtamedullary nephrons. *Kidney Int*. 2005; 67(1):227-36
- [93] R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, and S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327 (6122) : 524–526
- [94] Y. Sasaki, M. Suzuki, T. Matsumoto et al., Vasorelaxant activity of sappan lignum constituents and extracts on rat aorta and mesenteric artery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2010; 33 (9):1555–1560
- [95] Y. Sasaki, H. Goto, C. Tohda et al., Effects of curcuma drugs on Vasomotion in isolated rat aorta. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2003; 26 (8): 1135–1143
- [96] H. Kusayanagi, S. Ishikawa, Y. Tajika, T. Moue, M. Sunagawa, and T. Hisamitsu. Influence of electroacupuncture stimulation on nitric monoxide production in vascular endothelial cells in rats. *In Vivo* 2015; 29 (6): 679–685
- [97] A. Hirayama, T. Okamoto, S. Kimura et al., Kangen-karyu raises Surface body temperature through oxidative stress modification. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2016; 58 (3): 167–173
- [98] Y. C. Ng, B. Namgung, and S. Kim. Two-dimensional transient model for prediction of arteriolar NO/O₂ modulation by spatiotemporal variations in cell-free layer width. *Microvascular Research* 2015; 97: 88–97
- [99] Y. C. Ng, B. Namgung, H. L. Leo, and S. Kim. Erythrocyte aggregation may promote uneven spatial distribution of NO/O₂ in the downstream vessel of arteriolar bifurcations. *Journal of Biomechanics* 2016; 49 (11): 2241–2248
- [100] T. Shimizu, Y. Yoshihisa, M. Furuichi, M. Ur Rehman, C. Ueda, and T. Makino. The traditional japanese formula Keishibu-kuryogan inhibits the production of inflammatory cytokines by dermal endothelial cells. *Mediators of Inflammation*. 2010 (2010): 804298
- [101] N. Sekiya, H. Goto, Y. Shimada, and K. Terasawa. Inhibitory effects of Keishi-bukuryo-gan on free radical induced lysis of rat red blood cells. *Phytotherapy Research* 2002; 16 (4): 373– 376
- [102] Y. Shimada, K. Yokoyama, H. Goto et al., Protective effect of Keishi-bukuryo-gan and its constituent medicinal plants against nitric oxide donor-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *Phytomedicine* 2004; 11 (5): 404– 410
- [103] H. Goto, Y. Shimada, Y. Akechi, K. Kohta, M. Hattori, and K. Terasawa. Endothelium-dependent vasodilator effect of extract prepared from the roots of *Paeonia lactiflora* on isolated rat aorta. *Planta Medica* 1996; 62 (5): 436–439

- [104] Y.-L.Xue,H.-X.Shi,F.Murad,and K.Bian, Vasodilatory effects of cinnamaldehyde and its mechanism of action in the rat aorta. *Vascular Health and Risk Management* 2011; 7 (1): 273–280
- [105] L. Liu, J.-A. Duan, Y. Tang et al., Taoren-Honghua herb pair and its main components promoting blood circulation through influencing on hemorheology, plasma coagulation and platelet aggregation. *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 139 (2): 381–387
- [106] R. C. Veras, K. G. Rodrigues, M. D. C. Alustau et al., Participation of nitric oxide pathway in the relaxation response induced by E-cinnamaldehyde oxime in superior mesenteric artery isolated from rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2013; 62 (1): 58–66
- [107] F. Song, H. Li, J. Y. Sun, and S. Wang. Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 150 (1): 125–130
- [108] Z. Chen, X. Ma, Y. Zhu et al., Paeoniflorin ameliorates ANIT-induced cholestasis by activating Nrf2 through an PI3K/Akt-dependent pathway in rats. *Phytotherapy Research* 2015; 29 (11): 1768–1775
- [109] J. Zhai and Y. Guo, “Paeoniflorin attenuates cardiac dysfunction in endotoxemic mice via the inhibition of nuclear factor- κ B. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 80:200–206
- [110] K. Nozaki, H. Goto, T. Nakagawa et al., Effects of keishibukuryogan on vascular function in adjuvant-induced arthritis rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2007; 30 (6): 1042–1047

本論文を構成する文献

- 第4章. Tomita T, Sadakata H, Tamura M and Matsui H. Indomethacin-induced generation of reactive oxygen species leads to epithelial cell injury before the formation of intestinal lesions in mice. *J Physiol Pharmacol*. 2014 Jun;65(3):435-40.
- 第5章. Ippei Kanazawa, Tsutomu Tomita, Shun Miyazaki, Eiji Ozawa, Luis A. Yamamoto and Toshitsugu Sugimoto. Bazedoxifene Ameliorates Homocysteine-Induced Apoptosis and Accumulation of Advanced Glycation End Products by Reducing Oxidative Stress in MC3T3-E1 Cells. *Calcif Tissue Int*. 2017 Mar;100(3):286-297.
- 第6章. Tsutomu Tomita, Aki Hirayama, Hirofumi Matsui and Kazumasa Aoyagi. Effect of Keishibukuryogan, a Japanese Traditional Kampo Prescription, on Improvement of Microcirculation and Oketsu and Induction of Endothelial Nitric Oxide: A Live Imaging Study. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017;2017:3620130

謝辞

本研究を進めるにあたり

大学研究室に暖かく迎え入れてくださり、長きに渡って落第学生に席を与えてくださり最後までご親切にご指導くださいました筑波大学 長崎幸夫 教授に、まずもって心より深く感謝申し上げます。ご迷惑をおかけするばかりでしたが、学会での講演の機会を与えていただくなど、これまでにない経験をさせていただきました。最後まで気長にお付き合いいただき大変お世話になりました。本当にありがとうございました。

小中高と同じ学校に通った友であり、50を前に会社を立ち上げた私に大学院への進学を勧めてくれた筑波大学 松井裕史 先生に改めて感謝申し上げます。公私に渡りお付き合いいただき、本研究を進めるにあたっても懇切なご指導をいただきました。彼と撮影した RGK 細胞のダンスが意欲を支えてくれました。

本研究のご指導を賜りました筑波技術大学 平山暁 教授にはいつも映像に興味を持っていただき、今回も深い考察をいただきました。感謝申し上げます。また島根大学金沢一平先生には、研究としてまとめるため整理をご指導いただき、大変勉強になりました。感謝申し上げます。

本稿を終えるにあたり、

ともに実験し撮影し本研究の全てを支えてくれ、映像について語り合いダメ社長を支えてくれた、株式会社タイムラプスビジョンのみんなに、この場を借りて心より感謝いたします。

最後に、寝食を支え見守ってくれた家族と一緒に祝いたいと思います。

2018年1月

富田 勉