

絶食ラットの腸管粘膜萎縮に対する  
内因性一酸化窒素の役割に関する研究

伊 東 順 太

# 目次

## 総論の部

緒言	3
第1章 絶食初期の腸上皮細胞のアポトーシスに対する iNOS の役割 選択的 iNOS 阻害剤 aminoguanidine を用いた検討	6
第1節 絶食による体重の変化と AG の影響	7
第2節 絶食による腸管粘膜の病理学的変化と AG の影響	8
第3節 絶食による腸の iNOS の発現と AG の影響	16
第4節 絶食による腸の IFN- $\gamma$ mRNA の発現と 8-OHdG の産生	19
第5節 絶食による腸の nNOS mRNA の発現と AG の影響	22
第6節 小括および考察	23
第2章 食餌の有無による腸上皮細胞のアポトーシスに対する iNOS と nNOS の役割—絶食後再摂食ラットを用いた検討	29
第1節 再摂食による体重の変化と AG の影響	31
第2節 再摂食による腸管粘膜の病理学的変化と AG の影響	31

第3節	再摂食による亜硝酸塩の産生とAGの影響	37
第4節	再摂食による腸のiNOSの発現とAGの影響	38
第5節	再摂食による腸のnNOSの発現とAGの影響	40
第6節	再摂食による腸の8-OHdGの産生とIFN- $\gamma$ mRNAの発現	42
第7節	考察および小括	44
結論		49
謝辞		51
実験の部		52
参考文献		63

## 総論の部

### 緒言

絶食は臨床現場において、消化管手術の術前術後や中心静脈栄養の施行時にしばしみられ、治療の一環として行われている。特に中心静脈栄養（TPN）は経口摂取が困難あるいは不可能な患者に対する低栄養リスクの軽減に有益な役割を果たしており、病態や治療法に応じた投与内容の開発および組成改良などの工夫が加えられてきたが、TPN が普及、拡大するのに伴い問題点も明らかになってきた。TPN はその栄養法の特徴から数週間、数ヶ月という長期間に渡り、経口摂取が欠如するため絶食状態となり、消化管を長期間使用しないために腸管粘膜が機能的かつ構造的な変化をきたす。この変化が腸管粘膜萎縮である。この腸管粘膜萎縮は腸管粘膜の表面積が縮小され栄養素を効率よく取り込めなくなると同時に、腸管のバリア機能の低下により、腸内細菌やエンドトキシンが腸管腔から血管内へ侵入するバクテリアルトランスロケーションによって引き続き起こる敗血症を合併するリスクが高まると指摘されている。このように絶食による腸管粘膜萎縮は臨床上大きな問題となっている。すなわち、絶食による腸管粘膜萎縮がどのようなメカニズムによって起こるのかを明らかにすることは、患者の栄養管理だけではなく、合併症の予防や治療にも役立てられると考えられる。

絶食による腸管粘膜萎縮は、長期間絶食において観察されるが、短期間

の絶食においても観察され、陰窩での細胞増殖の減少と腸上皮細胞のアポトーシスの増加によって起こることが報告されている [10, 25, 77]。また、絶食によって誘導された腸上皮細胞のアポトーシスは、食餌摂取により減弱することから [6, 27, 29]、腸上皮細胞のアポトーシスは食餌の有無によって制御されていると考えられる。このように腸管粘膜の形態維持には、陰窩での細胞の増殖だけでなく、腸絨毛での腸上皮細胞のアポトーシスによる細胞死が重要な役割を担っているが、しかしながら、絶食初期から観察されるアポトーシスの誘導メカニズムの詳細は、明らかにされていない。

一方、アポトーシスを調節する多くの生理活性物質の中で、一酸化窒素 (NO) は腸のアポトーシスの誘導に寄与する可能性がある。NO はガス状のラジカルであり、生体内では L-Arginine を基質として NO 合成酵素 (NOS) によって生成される。NOS には神経型 NOS (nNOS)、誘導型 NOS (iNOS) および血管内皮型 NOS (eNOS) の 3 種のアイソザイムが存在し、これらの NOS から産生された NO を内因性 NO という。内因性 NO は腸管において様々な作用をもち、中でも nNOS はラット小腸における NOS の大部分を占めており、nNOS 由来 NO は神経伝達物質として機能し、腸の運動や腸の微小血管の血流など腸管における生理的機能の維持を担っている。一方、iNOS 由来の NO は感染や炎症に伴って多量に生成され、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) などの炎症性サイトカインや活性酸素種 (ROS) を誘導し、病態をさらに悪化させる働きをもつ [48]。最近、腸虚血再灌流障害モデルラットやリポポリサッカライド (LPS) 投与敗血症モデルラットの腸上皮細胞のアポト

ーシスが、iNOS 阻害剤により抑制されることが報告され、iNOS 由来 NO と腸上皮細胞のアポトーシスとの強い関連性が推測される [15, 31]。これらのことから絶食による腸管粘膜萎縮にはアポトーシスに加え、NOS の関与も推察されるが、絶食初期からみられる腸上皮細胞のアポトーシスに対する iNOS の関与については明らかにされていない。

以上のことから、本論文では、絶食ラットを用いて、絶食初期からみられる腸上皮細胞のアポトーシスの誘導メカニズムを iNOS の観点から明らかにするとともに、腸管粘膜の形態維持に対する内因性 NO の役割について解析した。以下、検討結果を論述する。

## 第1章 絶食初期の腸上皮細胞のアポトーシスに対する iNOS の役割

### 選択的 iNOS 阻害剤 aminoguanidine を用いた検討一

腸管粘膜は陰窩の幹細胞を由来とする腸上皮細胞で構成されており、生体の中で細胞回転が活発な組織の一つである。幹細胞は陰窩底部より分裂を繰り返し上部へ移行し、やがて細胞は分化を停止し、腸上皮細胞となる。腸上皮細胞は2~5日間かけて腸絨毛先端まで移動し、アポトーシスによって脱落する [10, 25]。腸管粘膜はこのような陰窩での細胞増殖と絨毛でのアポトーシスによる細胞死のバランスによって生理的に成り立っており、栄養素、電解質および水の吸収組織としてだけでなく、各抗原、微生物および毒素などの有害な物質に対するバリア機能をもつ免疫組織としても重要な組織である。しかしながら、腸管粘膜がもつこれらの生理機能は、腸上皮細胞のアポトーシスの増加ならびに廃用性の萎縮を伴って損なわれる。その原因の一つが絶食である。

絶食は、腸管腔内の食餌の欠如によって引き起こされる生理的な刺激であり、腸管粘膜においては腸上皮細胞のアポトーシスを含む機能的かつ構造的な変化をおこす [9, 16, 29]。これを腸管粘膜萎縮という。たとえば、TPN による長期の絶食は、腸管粘膜萎縮によって腸の生理機能を損なうだけでなく、腸粘膜透過性の亢進やタイトジャンクションの崩壊によって腸のバリア機能も低下し、バクテリアルトランスロケーションが引き起こされる可能性が高まる [72, 74]。このような腸粘膜透過性の亢進やタイトジャンクションの

崩壊は、炎症性サイトカインによるアポトーシスの誘導が考えられる [4, 61]。

一方、アポトーシスを調節する多くの生理活性物質の中で、特に腸のバリア機能の低下および腸上皮細胞のアポトーシスの誘導に、一酸化窒素 (NO) が寄与する可能性が示唆された [5, 50, 71, 75]。Hsu らは、TPN 製剤経口投与モデルラットを用いた研究において iNOS 阻害剤の投与により腸のバリア機能を改善し、バクテリアルトランスロケーションを抑制したことを報告した [31]。このことから腸上皮細胞のアポトーシスの誘導に iNOS 由来の NO が関与することが考えられる。これまでに絶食、特に絶食初期における腸上皮細胞のアポトーシスに関してカスパーゼの活性およびサイトカインの関係について報告されてきたが [2, 10, 21, 37]、NO および NOS の関与については未だ明らかにされていない。

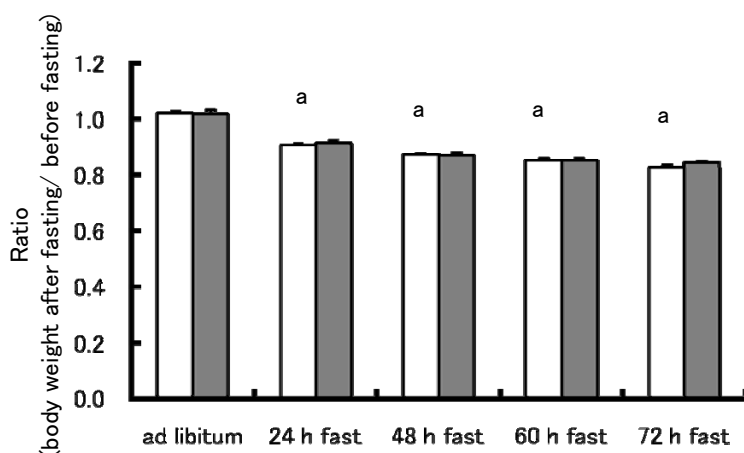
そこで、本章は、絶食初期からみられる腸上皮細胞のアポトーシスに対する iNOS の関与について明らかにすることを目的とし、ラット腸管粘膜のアポトーシスの調節における iNOS の役割について検討するため、選択的 iNOS 阻害剤の aminoguanidine を用いて検討した。

## 第 1 節 絶食による体重の変化と AG の影響

本節では、絶食による体重変化と AG の影響について検討した。SA 群、AG 群ともに体重変化は絶食後/絶食前 (%) で評価し、変化率として表し



た。計測結果を Fig. 1 に示す。体重は絶食時間に沿って徐々に減少した。また、この減少は SA 群と AG 群の両群ともに観察され、*ad libitum* ラットと比較して、SA 群の 72h fast ラットでは約 19 %減少し ( $P < 0.05$ )、AG 群の 72h fast ラットでは約 18 %減少した ( $P < 0.05$ )。さらに、SA 群および AG 群の群間における各絶食時間の体重変化率に有意差はみられなかった。このことから AG は体重の増減に影響していないものと考えられ、本研究における AG の投与量が適正であったことが示唆された。

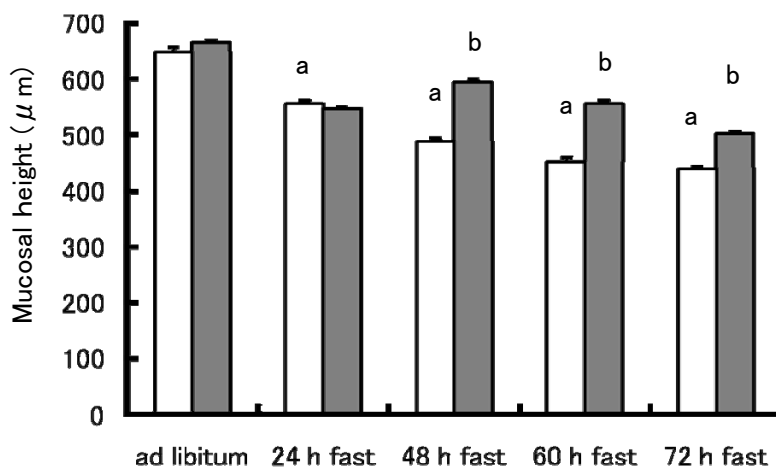


**Fig. 1 Effects of fasting and AG treatment on body weight change.** Values are means  $\pm$  SE.  $aP < 0.05$  compared with the *ad libitum*-fed rats in SA-treated group. Seven rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

## 第2節 絶食による腸管粘膜の病理学的変化と AG の影響

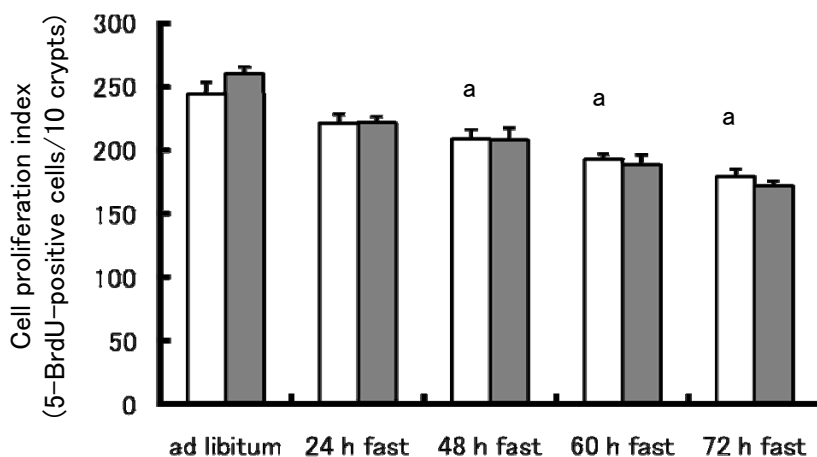
本節では、絶食による腸管粘膜の変化と AG の影響を病理学的に評価し、

腸管粘膜萎縮に対する iNOS の関与について検討した。まず、ラットの空腸組織をヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色し、顕微鏡下でマイクロスケールを用いて計測し、空腸粘膜の粘膜高を評価した。測定結果を Fig. 2 に示す。SA 群において、腸管粘膜は絶食時間の延長に伴い有意に萎縮した ( $P < 0.05$ )。しかしながら 48、60 および 72h fast ラットにおいて、SA 群と比べ、AG 群では腸管粘膜萎縮の有意な軽減がみられた ( $P < 0.05$ )。



**Fig. 2 Effects of fasting and AG treatment on jejunal mucosal height.** Values are means  $\pm$  SE. a $P < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. b $P < 0.05$  compared with the respective SA-treated group by the fasting period. Seven rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

次に、絶食による腸管粘膜萎縮に対して、細胞増殖能の低下と腸上皮細胞のアポトーシスの増加がどのくらい寄与しているのかを評価するために、それぞれに対する絶食の影響と AG の影響について評価した。細胞増殖能は 5-BrdU 免疫組織化学染色法を用いた。評価結果を Fig. 3 に示す。細胞増殖能は絶食時間の延長に伴って有意に減少したが ( $P < 0.05$ )、AG の投与による影響はみられなかった。

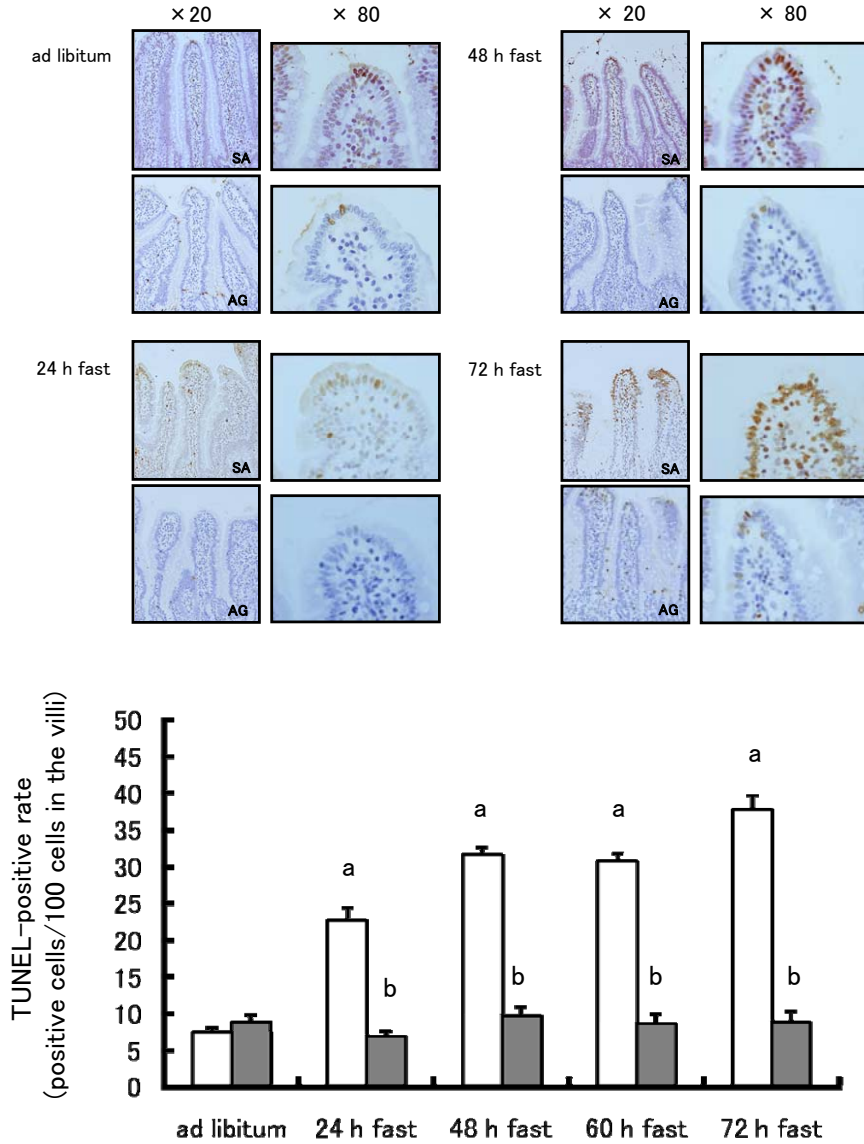


**Fig. 3 Effects of fasting and AG treatment on cell proliferation index in the jejunum.** Values are means  $\pm$  SE.  $aP < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. Seven rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

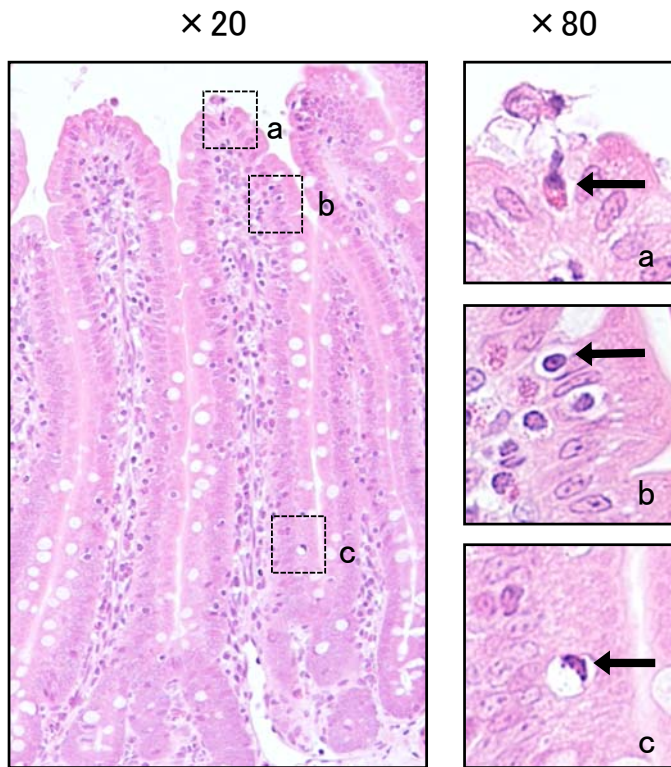
さらに、腸上皮細胞のアポトーシスを評価するため TUNEL 染色法と組織形態学的測定法を用いて計測した。TUNEL 法とは、組織内の細胞核中の DNA 切断端をラベリングする *in situ* end labeling 法によるアポトーシス検出法である。また、TUNEL 法の評価は 1 つの絨毛中の腸上皮細胞に対する

TUNEL 陽性細胞数の割合で評価し、1 匹あたり最低 50 本の絨毛を計測した。TUNEL 染色法による計測の結果を Fig. 4 に示す。腸上皮細胞の TUNEL 陽性細胞割合は絶食時間の延長に伴って有意に増加 ( $P < 0.05$ )、AG の投与によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

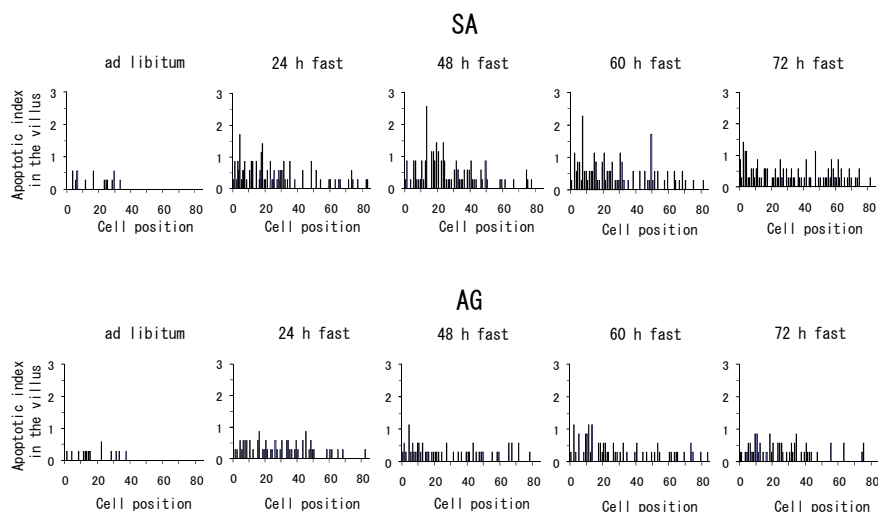
アポトーシスの評価法として組織形態学的評価法も用いた。組織形態学的評価法はアポトーシス特有の細胞変化（アポトーシス小体の形成、クロマチンの凝縮や核の断片化）を光学顕微鏡下で観察し、アポトーシス細胞を検出する方法である (Fig. 5)。計測の結果を Fig. 6 および Table 1 に示す。腸上皮細胞のアポトーシスは絶食時間の延長に伴って有意に増加し ( $P < 0.05$ )、AG の投与によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。また、AI 分布曲線の結果から、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスは主に根元部で発生したことがわかった。



**Fig. 4** Effects of fasting and AG treatment on TUNEL staining and TUNEL-positive rate in the jejunal villus. Values are means  $\pm$  SE.  $aP < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group.  $bP < 0.05$  compared with the respective SA-treated group by fasting period. Seven rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG treated rats.



**Fig. 5 The representative apoptotic changes.** The representative apoptotic changes by conventional light microscopy of HE-stained specimens (48-h fasted rat with SA treatment) are shown in Fig. 5. The boxed areas (a, b, c) in a low-power view of jejunal villi on the left ( $\times 20$ ) are seen at higher power on the right ( $\times 80$ ). Apoptotic cells in the villus are indicated by an arrow showing an intensely eosinophilic cytoplasm and nuclear fragmentation (a), condensed chromatin (b and c).



**Fig. 6 Effect of fasting and AG treatment on apoptotic index in the jejunal villus.** Fig. 6 shows the AI in the villus of ad libitum and the indicated fasting periods (24 h, 48 h, 60 h, and 72 h) for SA treatment (top row) and AG treatment (bottom row). AI is defined as the total number of apoptotic cells at each cell position expressed as a percentage of the total number of cells counted at that cell position. Cell position 1 is defined as the cell at the crypt-villus junction. Seven rats were tested

	ad libitum	24 h fast	48 h fast	60 h fast	72 h fast
SA					
Cells per villus column, n	84 ± 1	72 ± 1 <sup>a</sup>	70 ± 2 <sup>a</sup>	70 ± 2 <sup>a</sup>	68 ± 1 <sup>a</sup>
Apoptotic cells per villus column, n	0.04 ± 0.01	0.24 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>a</sup>
Apoptotic index, %	0.05 ± 0.01	0.34 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>a</sup>
AG					
Cells per villus column, n	85 ± 1	75 ± 1	76 ± 3	75 ± 1	75 ± 2
Apoptotic cells per villus column, n	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.17 ± 0.03 <sup>b</sup>
Apoptotic index, %	0.05 ± 0.01	0.22 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.23 ± 0.04 <sup>b</sup>

**Table 1 Enterocyte apoptosis of the jejunal villus by conventional light microscopy of HE-stained specimens.** Values are means ± SE; n = 7 per group. aP < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. bP < 0.05 compared with the respective SA-treated group at each fasting period. AI in the villus is defined as the total number of apoptotic cells expressed as a percentage of the total number of cells counted in 50 well-oriented villus columns. AI: apoptotic index

本実験では、アポトーシスの評価に TUNEL 染色法と組織形態学的評価法の 2 つの方法を用いた。TUNEL 染色法は、組織切片上のアポトーシス細胞の分布を容易に観察できる方法である [10]。しかしながら、TUNEL 染色法は注意深く制御された技術であるにもかかわらず、非特異的な染色を避けられないため [38]、最も古典的な方法を用いてアポトーシスを評価することとした。そこで、用いたもう一つ方法は、組織形態学的評価法で、この方法はアポトーシス特有の細胞変化を検出する方法である [30, 51]。

この 2 つの評価法から得られた結果は、ともに絶食で誘導されたアポトーシスが AG によって抑制される共通の結果を得た (Fig. 4, Table 1)。しかしながら、アポトーシス細胞の分布が異なった。TUNEL 染色の陽性細胞は、絨毛の上部に主に局在し (Fig. 4)、組織形態学的評価では、絨毛の根元部に主に局在した (Fig. 6)。この結果の違いは Merritt らによって示唆された [43]。つまり、絨毛先端におけるアポトーシスは特に、遺伝子制御による細胞自殺であり、一方それとは異なり、陰窩部や絨毛の根元部におけるアポトーシスは放射線照射や TPN などの損害によるアポトーシスであると示唆した [14, 43, 52]。従って、本節の結果で観察されたような差は、方法論による差であり、絨毛における腸上皮細胞のアポトーシスを評価していることには変わらないと考えられる。

これらの結果から、iNOS は絶食による腸管粘膜萎縮に関与し、細胞増殖には影響せず、腸上皮細胞のアポトーシスを誘導していることが示唆された。



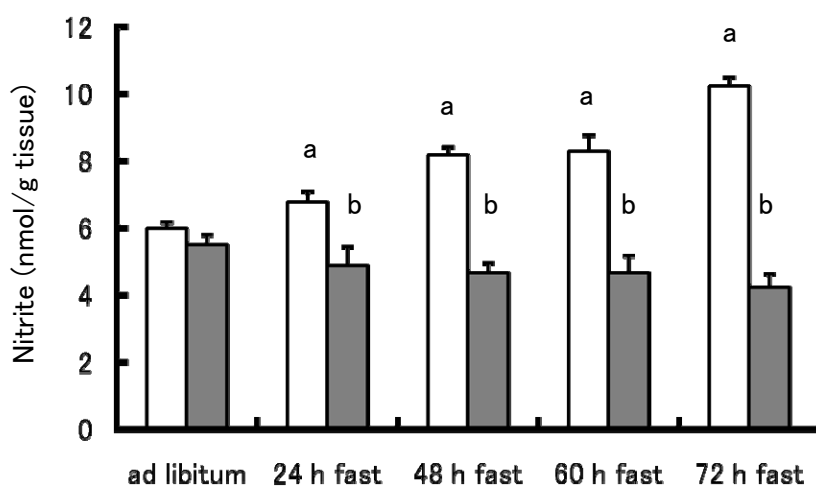
### 第3節 絶食による腸の iNOS の発現と AG の影響

本節では、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスの誘導メカニズムに対する iNOS の関与について明らかにするために、絶食によって空腸に iNOS が発現するかを遺伝子発現およびタンパク質発現で評価した。さらに iNOS の活性を評価するために iNOS 由来 NO の産生について検討した。

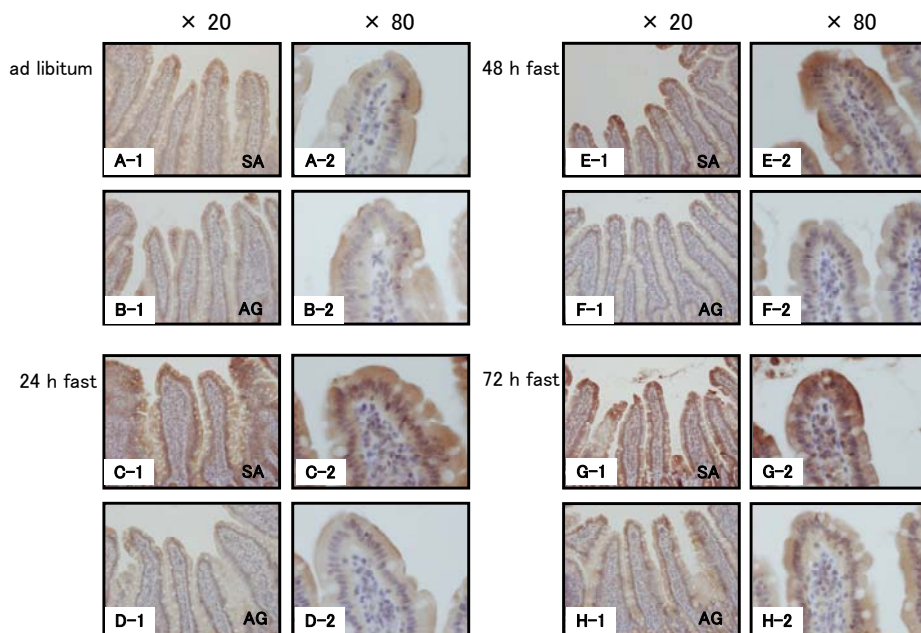
内因性 NO の安定酸化物である亜硝酸塩を HPLC にて測定し、空腸における iNOS 由来 NO の産生の指標として評価した。測定結果を Fig. 7 に示す。亜硝酸塩は絶食時間の延長に伴い増加し、AG によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。この結果は、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスの増加を AG が抑制したことと同じ挙動を示している (Fig. 4, Table 1)。よって、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスおよび空腸の亜硝酸塩の増加が選択的な iNOS 阻害剤である AG によって抑制されたことから、iNOS 由来 NO が絶食ラットの腸上皮細胞のアポトーシスの重要なメディエーターの役割をするかもしれないことが示唆された。

次に、絶食による iNOS 発現の変化をタンパク質レベルでの発現と遺伝子レベルでの発現で評価した。iNOS タンパク質は発現量の変化と発現部位の局在を明らかにするために iNOS 免疫組織化学染色法を用いて評価した。免疫染色標本を Fig. 8 に示す。*ad libitum* ラットでは、陰窩において無視できるほどの iNOS の発現が観察され、また、絨毛先端部では、腸上皮細胞の細胞質にわずかな iNOS タンパク質の発現が認められた (Fig. 8, A-1 and A-2)。

*ad libitum* ラットにおけるこれらの結果は、AG の投与により減少した (Fig. 8, B-1 and B-2)。しかしながら、24h fast ラットでは強い iNOS タンパク質の発現が絨毛の粘膜上皮の単層に沿って観察された (Fig. 8, C-1 and C-2)。また、この iNOS 免疫染色の陽性細胞は、AG の投与によってほとんど完全に抑制された (Fig. 8, D-1 and D-2)。同様の結果は 48h および 72h fast ラットにおいても観察された。さらに、絨毛に沿って発現した iNOS タンパク質の分布は、組織形態学的評価法で観察されたアポトーシスの分布と組織学的に一致していることが示唆された (Fig. 6)。

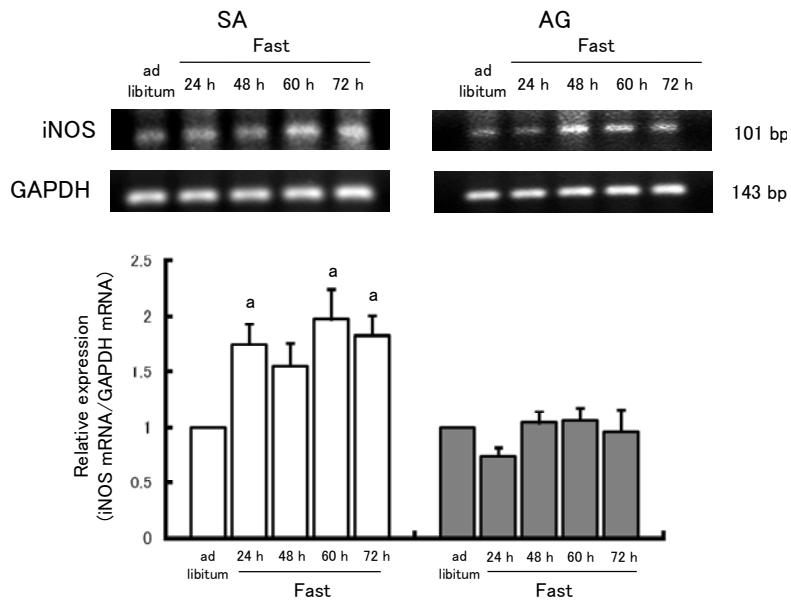


**Fig. 7** Effects of fasting and AG treatment on nitrite concentration in the jejunum. Values are means  $\pm$  SE. a $P$  < 0.05 compared with the *ad libitum*-fed rats in SA-treated group. b $P$  < 0.05 compared with the respective SA-treated group by the fasting period. Seven rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.



**Fig. 8** Light micrographs of the jejunum immunohistochemically stained for iNOS. Magnification: left side  $\times 20$ , right side  $\times 80$ .

次に、RT-PCR法を用いて絶食によるiNOSの転写レベルでの発現の変化を測定し、腸上皮細胞のアポトーシスとiNOSとの因果関係を評価した。測定結果をFig. 9に示す。iNOS mRNAの発現は絶食によって有意に増加したが ( $P < 0.05$ )、AGによって抑えられた。以上の結果からiNOSは絶食による発現の誘導に伴いNOを産生し、腸上皮細胞のアポトーシスを引き起こしている可能性が示唆された。



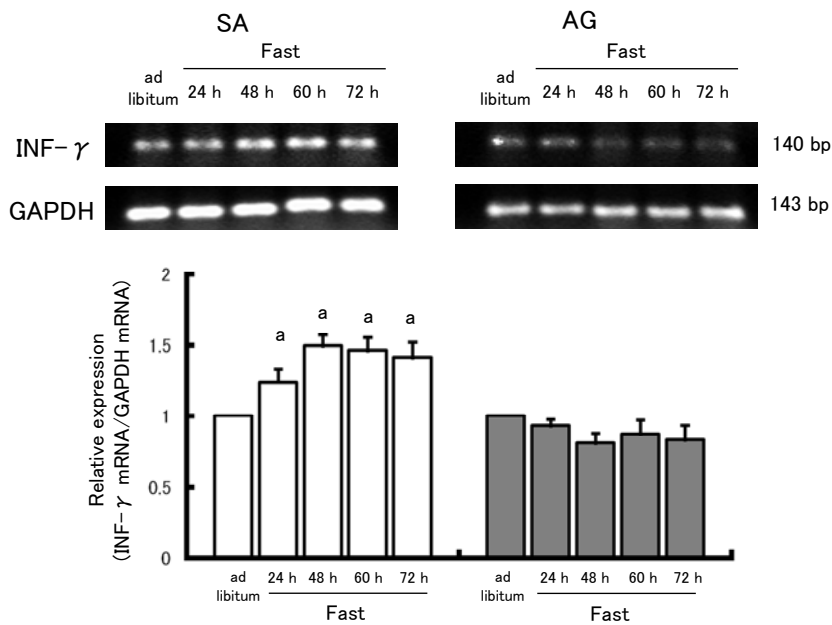
**Fig. 9** Effects of fasting and AG treatment on iNOS expression and transcription in the jejunum. Values are means  $\pm$  SE.  $aP < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. Seven rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats

#### 第4節 絶食による腸の IFN- $\gamma$ mRNA の発現と 8-OHdG の産生

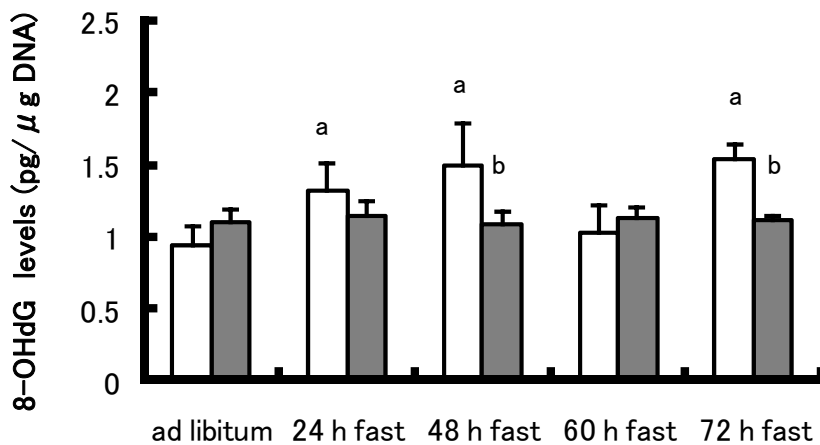
腸上皮細胞の側底にある腸上皮内リンパ球 (IEL) は、腸上皮細胞と解剖学的に隣接しており、この 2 つの細胞の間には機能的なダイアログがあると推測される。さらに最近、TPN マウスにおいて IEL から派生した炎症性サイトカインの IFN- $\gamma$  が腸上皮細胞のアポトーシスを誘導していることが報告された [72, 73, 77]。このことから IFN- $\gamma$  が絶食によるアポトーシスを誘導している可能性が推察された。そこで本節では、絶食による IFN- $\gamma$  の転写レベルでの発現の変化を RT-PCR 法にて評価した。評価結果を Fig. 10 に示す。IFN- $\gamma$

mRNA の発現は絶食によって有意に増加したが ( $P < 0.05$ )、AG によって抑制された。このことから、腸粘膜において、絶食で誘導された iNOS によって IFN- $\gamma$  の転写が誘導される可能性が示唆された。

一方、活性酸素種 (ROS) が腸上皮内リンパ球における IFN- $\gamma$  の主な誘導物質であることに着目し、絶食による空腸の ROS の産生を 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) を測定することにより評価した。8-OHdG は、DNA の構成成分であるデオキシグアノシン (dG) が ROS などのフリーラジカルにより酸化されて分子内に生成する物質である。8-OHdG が生じた場合、DNA 修復酵素が速やかに働いてこれを切り出し、正常な dG に置換される。その結果、放出された 8-OHdG は、代謝されずに排泄される。すなわち、8-OHdG は生体における DNA の酸化による損傷の程度、ひいては ROS や酸化ストレスの指標となる。測定結果を Fig. 11 に示す。空腸の 8-OHdG は SA 群において、*ad libitum* ラットと比較して 24、48 および 72h fast ラットにおいて有意に増加した ( $P < 0.05$ )。さらに、SA 群と AG 群を比較すると、48 h と 72 h fast ラットにおいて、絶食で誘導された 8-OHdG は AG によって有意に抑制され ( $P < 0.05$ )。これらのことから、絶食による腸のアポトーシスの誘導は iNOS 由来 NO によって ROS を介した IFN- $\gamma$  の誘導を通じて起こる可能性が示唆された。



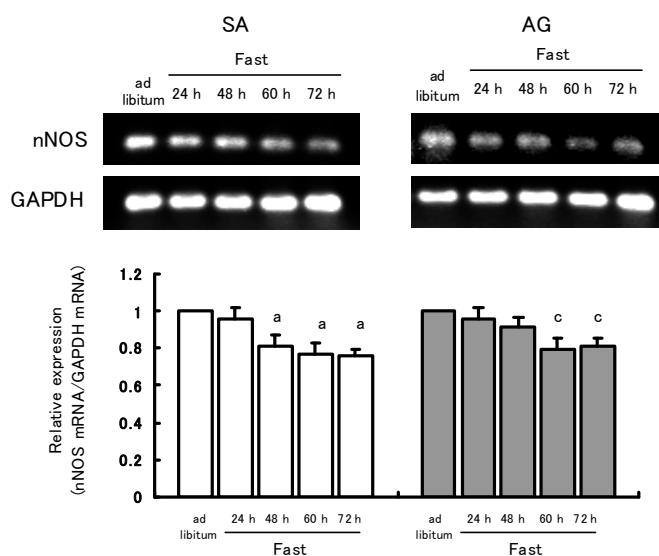
**Fig. 10** Effects of fasting and AG treatment on jejunal expression of IFN- $\gamma$  mRNA. Values are means  $\pm$  SE.  $aP < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. Seven rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.



**Fig. 11** Effects of fasting and AG treatment on DNA oxidative damage in the jejunum.  $aP < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated groups.  $bP < 0.05$  compared with the respective SA-treated group at each fasting period. Seven rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

## 第5節 絶食による腸の nNOS mRNA の発現と AG の影響

ラットの小腸において iNOS 発現の調節に nNOS が重要な役割を果たすことが報告されていることから [54]、絶食による腸の iNOS の発現の調節にも nNOS の関与が推察された。そこで、本節では、iNOS が絶食によって誘導されるメカニズムを検討するために、nNOS mRNA の測定を行った。測定結果を Fig. 12 に示す。空腸の nNOS mRNA は、iNOS mRNA の発現とは対照的に、絶食によって有意に減少した ( $P < 0.05$ )。また、AG は nNOS mRNA の発現に影響しなかった。これらのことから、nNOS は iNOS と少なくとも転写レベルでは相反しており、さらに nNOS が iNOS の発現を制御していることが示唆された。



**Fig. 12** Effects of fasting and AG treatment on jejunal expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA. Values are means  $\pm$  SE.  $aP < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group.  $cP < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in AG-treated group. Seven rats were tested in each group.

## 第6節 小括および考察

第1章では、iNOSが絶食による腸上皮細胞のアポトーシスに関与することを、選択的 iNOS 阻害剤の aminoguanidine を用いて、ラット空腸の病理学的評価および生化学的評価から検討した。

本章では、iNOS 阻害剤として aminoguanidine を用いた。近年、aminoguanidine (AG) よりも特異的で、かつ発展的な iNOS 阻害剤として (1S, 5S, 6R, 7R)-2-aza-7-chloro-3-imino- 5-methylbicyclo [4.1.0] heptane hydrochloride (ONO-1714) や N-(3-(aminomethyl)benzyl) acetamidine (1400W) などが用いられ始めているが [57, 76]、本論文では使用しなかった。なぜなら、腸管における研究実績が乏しいからである。一方、AG は、投与経路や投与量、および投与タイミングに関して文献が蓄積されており、特に腸管における AG の iNOS 抑制実験から得られた知見が根拠として利用可能であると考えたため、本研究では AG を用いた [63, 64, 65]。

本章の結果から、ラットの空腸粘膜は絶食の早期から腸上皮細胞のアポトーシスを伴い萎縮し、それと同時に iNOS mRNA および iNOS タンパク質の発現が空腸で観察された。このことから、iNOS が絶食による腸上皮細胞のアポトーシスの増加と関連があることを明らかにした。また、絶食による空腸粘膜の萎縮の進行が iNOS 阻害剤によって有意に軽減されたことは、細胞増殖の改善によるものではなく、iNOS 阻害剤が腸上皮細胞のアポトーシスの増加を抑制したことによって生じたことが明らかとなった。さらに、iNOS 由来



のNO、ROSの産生およびIFN- $\gamma$  mRNAの発現は絶食によって増加したが、iNOS阻害剤によってそれらは抑制された。このことから、iNOS由来NOがROSを介した腸上皮内リンパ球のIFN- $\gamma$ の発現を通じて、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスを誘導していることが明らかとなった (Fig. 13)。

NOはアポトーシスに対して2つの機能性を示す生理活性物質であり、生成されるNOの濃度によって、指向性を変えることが知られている [8, 39]。低濃度のNOは抗アポトーシス効果が期待され、nNOSやeNOSによって恒常的に産生されるNOやNO供与体からゆっくり放出されるNOに由来する。また、高濃度で急激に産生されるNOはアポトーシスを誘導させ、炎症などで惹起されたiNOSに由来する [7]。一方、腸上皮細胞のアポトーシスには個別の2つの細胞内経路があり、ともにカスパーゼファミリーによるシステインプロテアーゼの連続的活性化を介する経路であり、最終的なイベントとしてはDNAの断片化が生じることが報告されている [19, 45, 68]。一つは内因性の細胞内経路であり、障害を受けたミトコンドリアからのシトクロムCの放出によって生じる経路で虚血再灌流などの種々のストレスに応じて生じるアポトーシスである [21, 70]。これをタイプ2アポトーシス経路という。もう一つは、外因性の細胞内経路であり、腸上皮細胞の細胞膜上のデスレセプターと呼ばれる受容体と炎症性サイトカインなどのリガンドを介した経路で、これをタイプ1アポトーシス経路という。最近、Fujiseらは、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスの細胞内経路が、タイプ1アポトーシス経路によって制御されていることを報告した [21]。しかしながら、絶食に誘導された腸上皮細胞のタイプ

1 アポトーシス経路に対する NO の役割についてあまり述べられていない。そこで、NO と IFN- $\gamma$  の関係に着目し、ROS が IFN- $\gamma$  の誘導物質であることから、ROS を媒介とした腸上皮内リンパ球 (IEL) からの IFN- $\gamma$  が、腸上皮細胞に対してタイプ 1 アポトーシス経路を通過して腸のアポトーシスを誘導する可能性を推察し、腸における 8-OHdG レベルを測定することにより、ROS の生産を評価し、絶食に誘導されたアポトーシスにおける ROS の寄与を検討した。腸の ROS は絶食により増加し、その増加は AG によって抑制された (Fig. 11)。このことから ROS は iNOS 由来 NO によって誘導され、IFN- $\gamma$  を誘導するメカニズムが示唆された (Fig. 13)。さらに、Fas を媒介して生じる腸上皮細胞のアポトーシスがデスレセプターを介したアポトーシス経路を通過することから [42, 73]、腸上皮内リンパ球由来の IFN- $\gamma$  が Fas/FasL の誘導を介してタイプ 1 の細胞内経路を誘導し、腸上皮細胞のアポトーシスを引き起こすことが示唆された [73]。以上のことから、腸上皮細胞と IEL の間には密接な相互作用が存在することが示唆された。したがって、この 2 つの細胞間において、腸上皮細胞の iNOS 由来の NO が、ROS を媒介とした経路を通過して IEL における IFN- $\gamma$  産生を促し、アポトーシスを引き起こす。それと同時に産生された IFN- $\gamma$  は、腸上皮細胞の iNOS の発現と iNOS 由来 NO の産生をさらに誘導する細胞相互のフィードバックループを形成すると考えられた (Fig. 13) [1, 6, 53]。

選択的 iNOS 阻害剤である AG の構造解析によると、一般的には iNOS の活性中心に競合することによって iNOS 活性を抑制する。このことから、AG

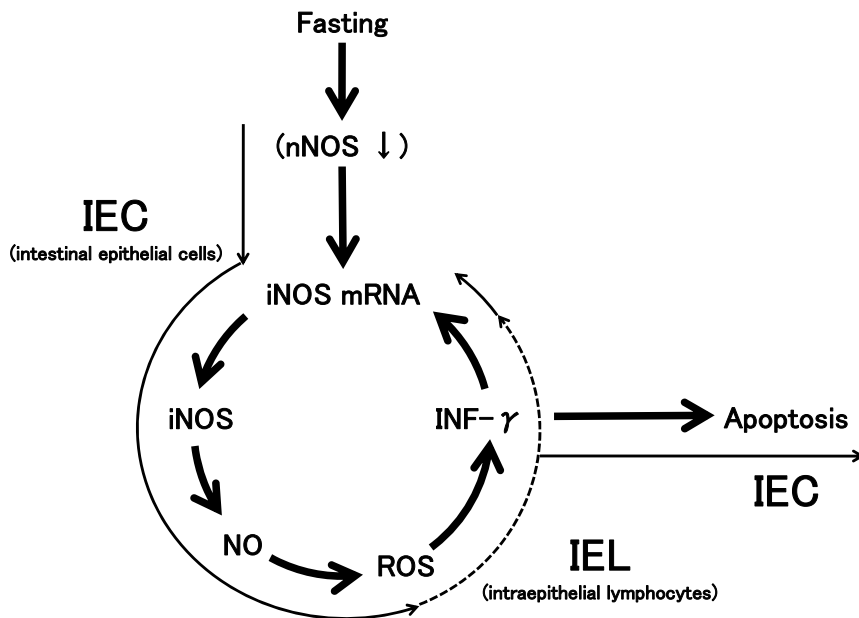
による抑制は、転写レベルよりむしろ転写後に作用すると考えられる [13]。しかしながら、本章の結果では、絶食により誘導された iNOS mRNA および iNOS タンパク質が AG によって抑制された。これも腸上皮細胞と IEL 間の相互作用が考えられ、腸上皮細胞における NO および IEL における IFN- $\gamma$  が互いに影響しあっている可能性が示唆された。したがって、本章の結果は AG による iNOS 活性の抑制により NO が減少し、その結果 IFN- $\gamma$  の産生が抑えられ、さらにフィードバックループによって腸の iNOS 転写の減少が引き続きおこったと考えられる。

これまで絶食と iNOS との間の因果関係に関しては、ほとんど言及されてこなかった。そこで、絶食によってどのようにして iNOS が誘導されたのかについて考察する。本章の結果では、nNOS mRNA の発現が iNOS mRNA の発現とは相反し、絶食によって減少した。また、nNOS mRNA の発現は iNOS 阻害剤の影響を受けなかった。Qu らは最近、ラット小腸における iNOS の発現の調節に対する nNOS の関与を報告した [54]。Qu らは、nNOS が転写活性因子の NF- $\kappa$ B の抑制を通じて、腸上皮細胞における iNOS の遺伝子発現を抑えていること、また、nNOS の活性の低下によって、NF- $\kappa$ B が活性化し、その後の iNOS の発現が増加することを報告した。さらに、Grongnet らは、子豚の空腸における nNOS の発現が絶食によって減少することを報告した [24]。つまり、nNOS は絶食による腸上皮細胞のアポトーシスパスウェイの上流で NF- $\kappa$ B を介して iNOS を制御している可能性が示唆された。

以上のことから本章では、iNOS が絶食による腸上皮細胞のアポトーシス

の誘導に対して中心的な役割を示すことを初めて明らかにした [33]。すなわち、iNOS 由来の NO が ROS を介した腸上皮内リンパ球の IFN- $\gamma$  の発現を通じて、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。また、nNOS が絶食による iNOS の発現に関与していることが示唆された。

しかしながら、NOS 以外にラット小腸の腸上皮細胞のアポトーシスの調節に関係すると報告されているものが、レプチン [69] および視床下部腹内側部における中枢神経系の制御 [20, 59] や、腸管腔内の栄養素 [35] および食餌による機械的刺激 [37] などがあげられる。また、本章の結果より nNOS が絶食による iNOS の発現に関与していることが示唆されたことから、絶食による腸の iNOS 発現の原因となるメカニズムを明らかにするためには、nNOS の役割を明らかにするとともに、iNOS との関連性をさらに研究する必要があると考えられる。そこで次章において、この 2 つの NOS の関連性を明らかにするとともに、腸管粘膜の形態維持に対する iNOS の役割を解析するため、さらなる検討を行った。



**Fig. 13 Schematic summary diagram of fasting-induced intestinal apoptosis.** This schematic summary diagram depicts a possible role of nNOS in the regulation of iNOS activity upstream in the process of fasting-induced apoptosis. iNOS-derived NO may play a central role downstream in this process, inducing IFN- $\gamma$ , and leading to intestinal epithelial cell (IEC) apoptosis. Note a close interaction between iNOS-released NO in IEC and intraepithelial lymphocyte (IEL)-derived IFN- $\gamma$  through a ROS-mediated mechanism in the intestinal mucosa.

## 第2章 食餌の有無による腸上皮細胞のアポトーシスに対する iNOS と

### nNOS の役割 — 絶食後再摂食ラットを用いた検討

長期間絶食による腸管粘膜萎縮の進行は、バクテリアルトランスロケーションによる敗血症合併のリスクが増大するだけでなく、その後の経口摂食による腸管粘膜の復帰障害により下痢などの症状をきたし、患者の予後に悪影響を及ぼす。そのため、早い時期での腸管粘膜と腸管機能の回復は、臨床に大きな意味を成している。絶食によって増加した腸上皮細胞のアポトーシスは、再摂食によって減少し、これに伴い、萎縮した腸も段階的に回復することが報告されている [6, 27, 29, 41, 78]。Nelson らは、絶食後に固形食を再摂食させた場合、腸管粘膜萎縮は回復したが、絶食後に成分栄養剤を摂取させた場合は、萎縮が回復されなかったことから、絶食による腸管粘膜萎縮は栄養素の吸収では制御されていないことを報告した [46]。また、Kakimoto らは、72h 絶食モデルラットに対し、未消化態の固形食（発泡スチロール）を摂食させると、絶食により増加した腸上皮細胞のアポトーシスが減少したことから、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスには、固形物による機械的刺激が強く関係すると報告した [37]。これらのことから絶食後再摂食による腸管粘膜萎縮からの回復は、腸管にける栄養素の吸収によるものではなく、食餌による機械的刺激によって生じたことが示唆された。

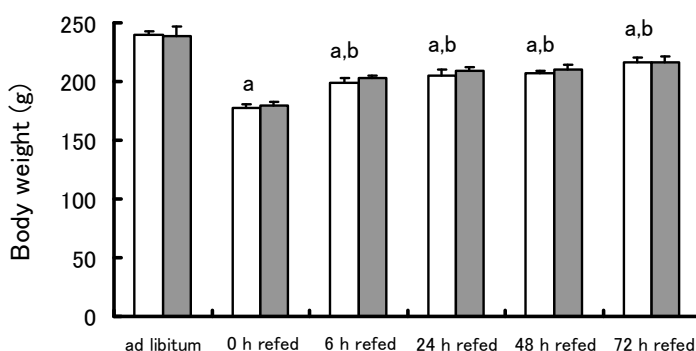
一方、腸管粘膜上皮は、陰窩の幹細胞を由来とする上皮細胞の継続的な細胞増殖と、絨毛先端部でのアポトーシスによって生理的に平衡を保ってい

る [3, 20]。しかしながら、TPN 中の長期絶食下では、陰窩の細胞増殖能が低下し、腸上皮細胞のアポトーシスは増加する。このアポトーシスの増加は絨毛先端部での生理的なアポトーシスとは異なり、絨毛の根元部で主に観察され、病的なアポトーシスであると考えられる [14, 52, 56]。そして、前章の結果で、絶食初期の腸上皮細胞のアポトーシスが絨毛の根元部で主に観察されたことから、絶食初期の腸のアポトーシスの誘導メカニズムを明らかにすることは、病的なアポトーシスの誘導メカニズムが明らかになる可能性があると考えられる。前章では、iNOS 由来の NO が ROS を介した腸上皮内リンパ球の IFN- $\gamma$  の発現を通じて、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスを誘導していることを明らかにし、さらに nNOS が絶食による iNOS の発現に関与していることを示唆した [33]。したがって、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスに対して iNOS と nNOS に相互関係があることが示唆されたことから、腸管粘膜の形態維持に内因性 NO が関与していることが推察された。しかしながら、絶食後再摂食ラットの腸管粘膜萎縮の回復過程における NOS の動態については明らかにされていない。

そこで本章では、食餌の有無による腸上皮細胞のアポトーシスに対する iNOS と nNOS の役割を明らかにするとともに、腸管粘膜の形態維持に対する iNOS の役割を検討するため、絶食後再摂食ラットに選択的 iNOS 阻害剤の aminoguanidine を投与して、再摂食による腸管粘膜の回復過程における iNOS と nNOS の動態を空腸の病理学的評価および生化学的評価から解析した。

## 第 1 節 再摂食による体重の変化と AG の影響

本節では、絶食後再摂食による体重の変化と AG による影響を検討した。Fig. 14 に計測結果を示す。SA 群および AG 群ともに 0h refed ラット（72h 絶食ラット）の体重は、*ad libitum* ラットと比較して、約 25%の減少を示した（ $P < 0.05$ ）。さらに、再摂食によって体重は徐々に増加した（ $P < 0.05$ ）。この増加は SA 群と AG 群ともに観察された。また、SA 群と AG 群間における各再摂食時間に体重変化に有意差はなかった。このことから、絶食後再摂食による体重の増加に AG が影響を及ぼさなかったことが示唆された。



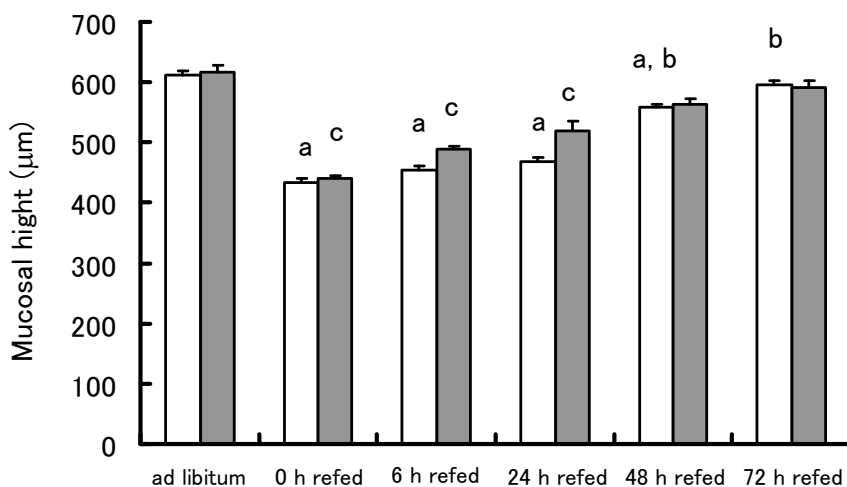
**Fig. 14 Body weight at scheduled time periods after refeeding in SA- and AG-treated rats.** Values are means  $\pm$  SE. a $P < 0.05$  compared with the *ad libitum*-fed rats in SA-treated group. b $P < 0.05$  compared with the 0 h refed rats in SA-treated group. Six rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

## 第 2 節 再摂食による腸管粘膜の病理学的変化と AG の影響

本節では、絶食後再摂食による腸管粘膜の変化と AG の影響を病理学的

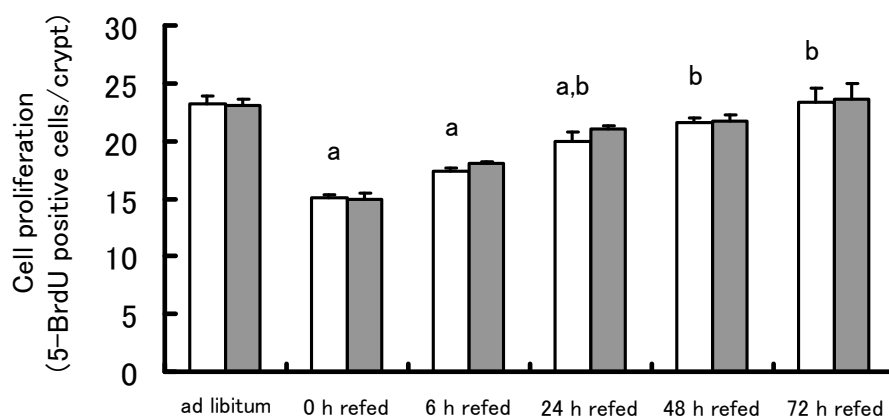


に評価し、腸管粘膜萎縮からの回復過程における iNOS の関与について検討した。ラットの空腸組織を HE 染色し、顕微鏡下でマイクロスケールを用いて計測し、空腸粘膜の粘膜高を評価した。結果を Fig. 15 に示す。ad libitum ラットと比較して、0h refed ラットの空腸粘膜は有意に萎縮した ( $P < 0.05$ )。さらに、絶食後に続く再摂食に伴って、空腸粘膜は徐々に回復した ( $P < 0.05$ )。この腸管粘膜の回復は SA 群と AG 群ともに観察されたが、腸管粘膜は絶食によって萎縮したが、再摂食開始と共に徐々に伸長した。この伸長は SA および AG 群の両方で観察されたが、AG 投与による腸粘膜高の有意な伸長が再摂食 6h と 24h ラットにみられた ( $P < 0.05$ )。このことから、AG は再摂食における腸粘膜の回復を有意に促進することが示唆された。



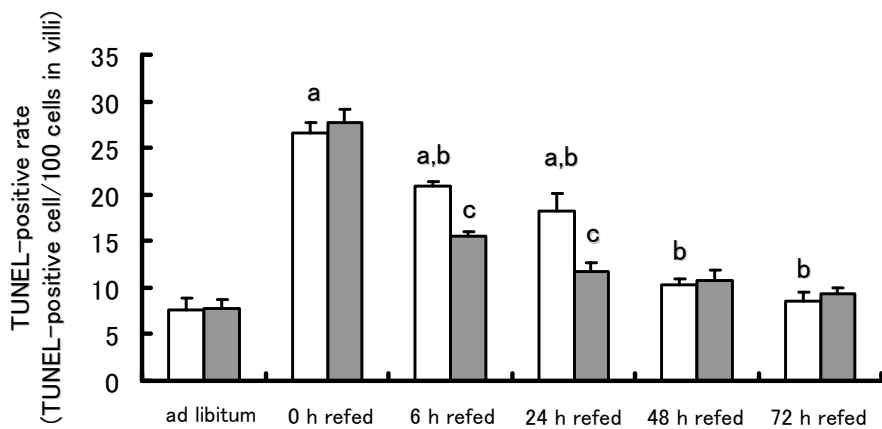
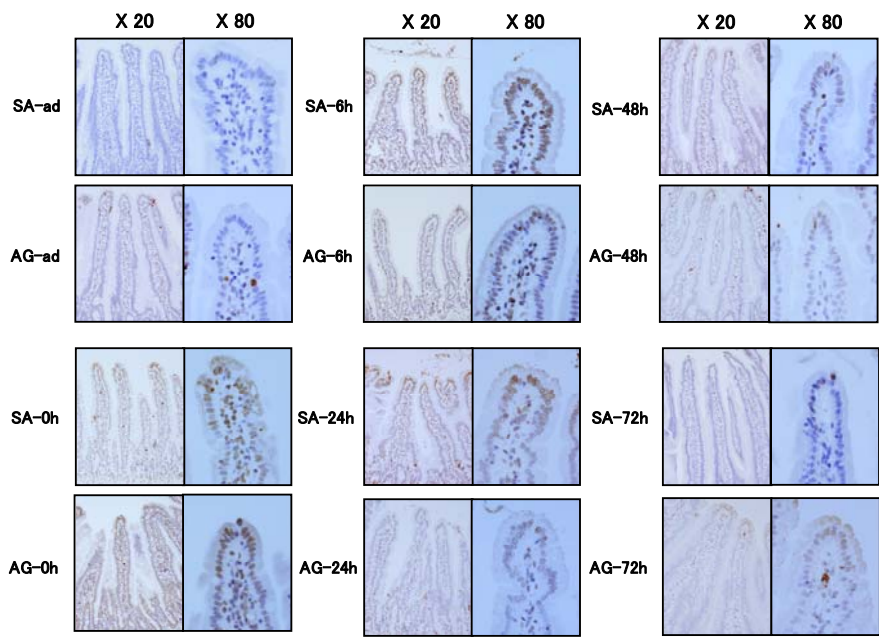
**Fig. 15 Effects of refeeding and AG treatment on jejunal mucosal height.** Values are means  $\pm$  SE. a $P < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. b $P < 0.05$  compared with the 0 h refed rats in SA-treated group. c $P < 0.05$  compared with each of the other groups at each refeeding period. Six rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

次に、絶食後再摂食による腸管粘膜萎縮からの回復過程に、陰窩の細胞増殖および腸上皮細胞のアポトーシスが、どのように寄与するか評価するために、5-BrdU 免疫染色による細胞増殖能の評価と、TUNEL 分析法および組織形態学的評価による空腸のアポトーシスを評価した。細胞増殖能の結果を Fig. 16 に示す。細胞増殖能は絶食によって有意に低下した ( $P < 0.05$ )。さらに再摂食時間に伴って細胞増殖能は徐々に増加したが ( $P < 0.05$ )、各再摂食時間における、SA 群と AG 群の間に差は認められなかった。

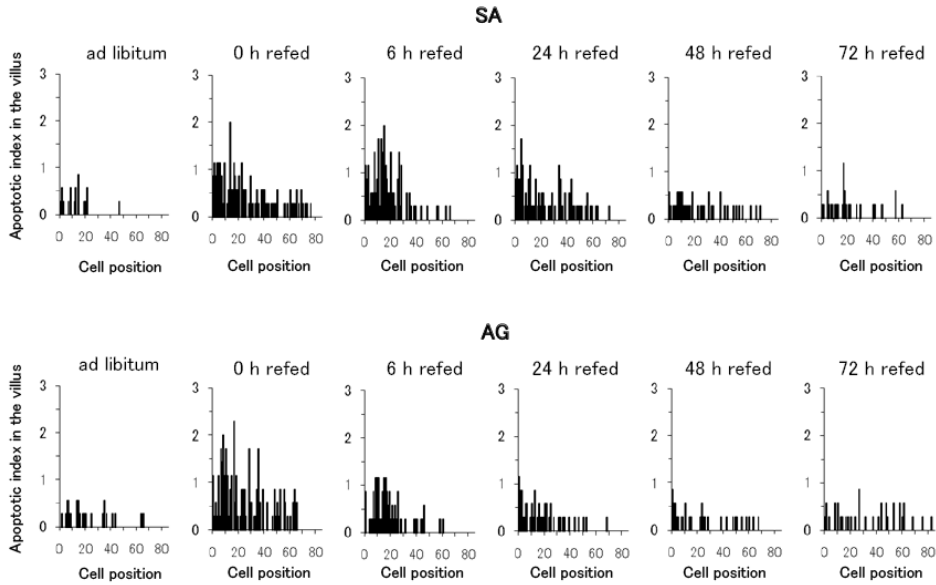


**Fig. 16** Effects of refeeding and AG treatment on cell proliferation in the jejunum. Values are means  $\pm$  SE. aP  $< 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. bP  $< 0.05$  compared with the 0 h refed rats in SA-treatment group. Six rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

TUNEL 染色法による計測の結果を Fig. 17 に、組織形態学的評価の結果を Fig. 18 および Table 2 にそれぞれ示す。腸上皮細胞のアポトーシスは絶食によって有意に増加し ( $P < 0.05$ )、再摂食によって減少した ( $P < 0.05$ )。この減少は SA および AG 群の両方で観察されたが、AG 投与による腸アポトーシスの有意な抑制が再摂食の初期段階である再摂食 6h 群と 24h 群にみられた ( $P < 0.05$ ) (Fig. 17, Table 2)。また、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスは絨毛全体にわたって増加したが、主に根元部で発生したことが、組織形態学的評価による測定結果から得られた AI 分布曲線によってわかった。一方、絶食後再摂食によるアポトーシスの減少は、絨毛の根元部から始まることがわかった。この減少は SA および AG 群の両方で観察されたが、両群を比較して、再摂食の初期段階である再摂食 6h 群と 24h 群において AG 投与によって腸のアポトーシスのさらなる抑制がみられた ( $P < 0.05$ ) (Table 2)。



**Fig. 16** Effects of refeeding and AG treatment on TUNEL staining and TUNEL-positive rate in the jejunum. Values are means  $\pm$  SE. <sup>a</sup>P < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. <sup>b</sup>P < 0.05 compared with the 0 h refeed rats in SA-treatment group. <sup>c</sup>P < 0.05 compared with each group at the refeeding period. Six rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.



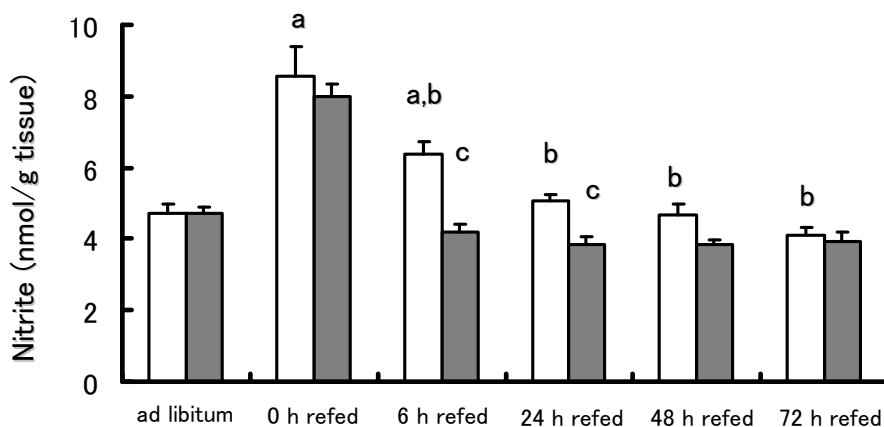
**Fig. 17 Effects of refeeding and AG treatment on apoptotic index in the jejunal villus.** Apoptotic index (AI) is defined as the total number of apoptotic cells at each cell position expressed as a percentage of the total number of cells counted at that cell position. *Cell position 1* is defined as the cell at the crypt-villus junction. Six rats were tested in each group.

	Ad Libitum	0 h Refed	6 h Refed	24 h Refed	48 h Refed	72 h Refed
<b>SA</b>						
Cells per villus column, n	88 ± 2	65 ± 1 *	70 ± 1 *	71 ± 2 *	77 ± 1 *, #	81 ± 2 #
Apoptotic cells per villus column, n	0.05 ± 0.01	0.34 ± 0.03 *	0.30 ± 0.05 *	0.25 ± 0.05 *	0.12 ± 0.04 #	0.10 ± 0.03 #
Apoptotic index (%)	0.06 ± 0.01	0.51 ± 0.04 *	0.42 ± 0.07 *	0.37 ± 0.07 *	0.16 ± 0.05 #	0.12 ± 0.03 #
<b>AG</b>						
Cells per villus column, n	88 ± 2	69 ± 1	74 ± 1 †	81 ± 1 †	79 ± 2	84 ± 1
Apoptotic cells per villus column, n	0.06 ± 0.01	0.38 ± 0.04	0.20 ± 0.05 †	0.13 ± 0.02 †	0.10 ± 0.05	0.10 ± 0.01
Apoptotic index (%)	0.07 ± 0.01	0.55 ± 0.05	0.28 ± 0.07 †	0.16 ± 0.03 †	0.13 ± 0.06	0.11 ± 0.02

**Table 2 Enterocyte apoptosis of the jejunal villus by conventional light microscopy of hematoxylin and eosin-stained specimens.** Values are means ± SE; n = 6 per group. \*P < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. #P < 0.05 compared with the 0 h refeed rats in SA-treated group. †P < 0.05 compared with the SA-treated rats at corresponding refeeding period.

### 第3節 再摂食による亜硝酸塩の産生とAGの影響

本節では、iNOSの活性を評価するためにiNOS由来NOの産生について検討した。内因性NOの安定酸化物である亜硝酸塩をHPLCにて測定し、空腸におけるiNOS由来NOの産生の指標として評価した。測定結果をFig. 18に示す。空腸の亜硝酸塩濃度は絶食によって有意に増加し ( $P < 0.05$ )、再摂食開始に伴い徐々に減少した ( $P < 0.05$ )。この減少はSAおよびAG群の両方で観察されたが、AG投与による亜硝酸塩の有意な抑制が再摂食6hと24h群にみられた ( $P < 0.05$ )。この結果は、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスの増加をAGが抑制したことと同じ挙動を示している (Fig. 16, Table 2)。

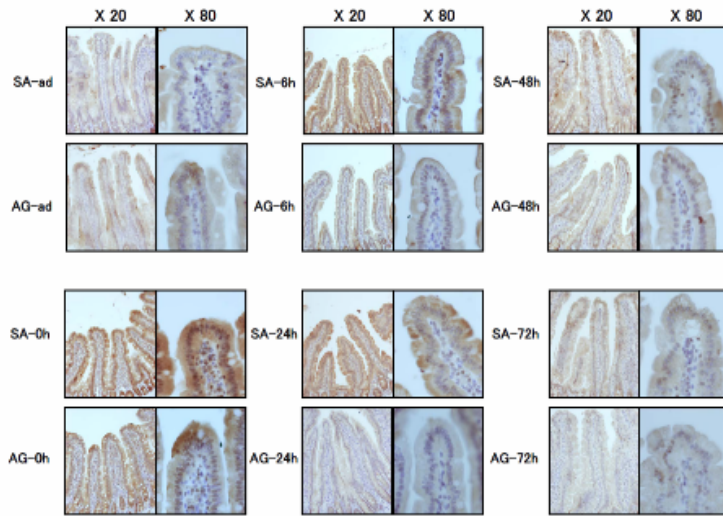


**Fig. 18 Effects of refeeding and AG treatment on nitrite concentration in the jejunum.** Values are means  $\pm$  SE. <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared with the 0-h refed rats in SA-treatment group. <sup>c</sup> $P < 0.05$  compared with the respective SA-treated group by the refeeding period. Six rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

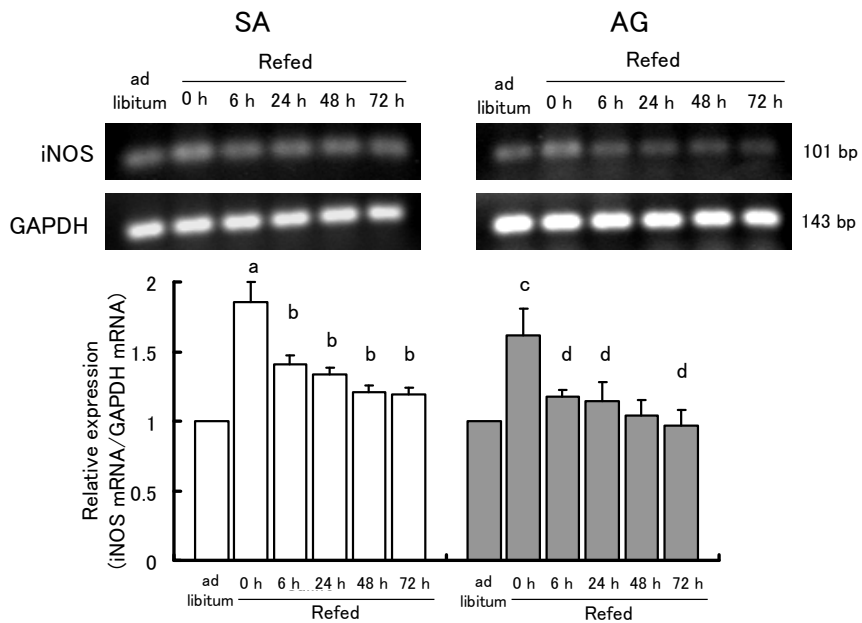
よって、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスおよび空腸の亜硝酸塩の増加を選択的 iNOS 阻害剤である AG が抑制したことから、AG の投与によって iNOS の活性が抑制され、腸上皮細胞のアポトーシスをさらに抑制することにより、腸管粘膜の回復が早められたということが示唆された。

#### 第 4 節 再摂食による腸の iNOS の発現と AG の影響

前章において、絶食による iNOS 発現の誘導に伴い NO が産生され、腸上皮細胞のアポトーシスを引き起こしていることを明らかにした。そこで、本節では、再摂食による腸管粘膜萎縮からの回復過程における iNOS 発現の変化について RT-PCR と iNOS 免疫染色法にて評価した。iNOS 免疫染色による iNOS タンパク質の評価結果を Fig. 19 に示す。*ad libitum* ラットでは、腸上皮細胞の細胞質中においてわずかな iNOS の発現が観察された。0h refed ラットでは、絨毛の粘膜上皮の単層に沿って強い iNOS の発現が観察された。また SA 群において絶食により増加した iNOS タンパク質の発現は、その後の再摂食により、減少した。さらに、SA 群と AG 群を比較すると、再摂食の初期である再摂食 6h と 24h において AG 投与による腸の iNOS の抑制が観察された。また、iNOS mRNA の測定結果を Fig. 20 に示す。iNOS mRNA の発現は絶食によって誘導され ( $P < 0.05$ )、再摂食によって抑制された ( $P < 0.05$ )。この減少は SA および AG 群の両方で観察された。



**Fig. 19** Light micrographs of the jejunum immunohistochemically stained for iNOS.



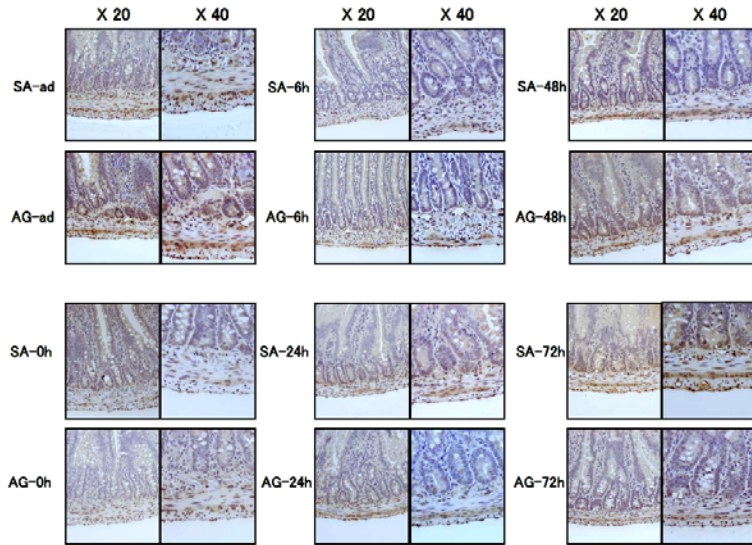
**Fig. 20** Effects of refeeding and AG treatment on iNOS transcription in the jejunum. Values are means  $\pm$  SE. aP < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. bP < 0.05 compared with the 0-h refeed rats in SA-treated group. cP < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in AG-treated group. dP < 0.05 compared with the 0-h refeed rats in AG-treated group. Six rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.



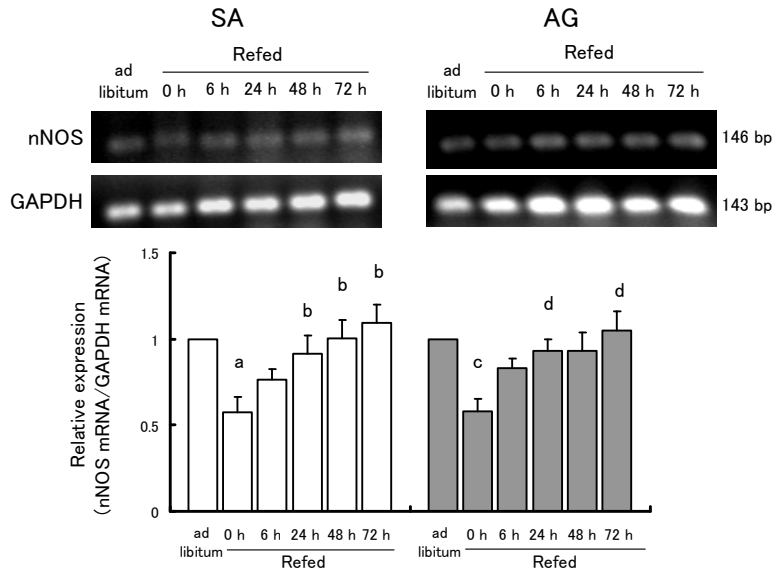
## 第 5 節 再摂食による腸の nNOS の発現と AG の影響

前章で絶食による腸の nNOS 発現の減弱が iNOS の発現増加の要因であることを示唆した。このことから本節では、再摂食が及ぼす nNOS 発現の変化を RT-PCR と nNOS 免疫染色法にて評価した。nNOS 免疫染色法は nNOS タンパク質の発現と nNOS の局在を観察するために用いた。nNOS 免疫染色による nNOS タンパク質の評価結果を Fig. 21 に示す。nNOS タンパク質は *ad libitum* ラットの空腸腸筋層間神経叢で観察された。しかしながら、0h refed ラットは、*ad libitum* ラットと比較すると、腸筋層間神経叢における nNOS 発現が減衰した。さらに nNOS タンパク質の発現は、再摂食時間に沿って段階的に増加した。この増加は SA および AG の両群において観察され、AG による影響はみられなかった。

また、nNOS mRNA の測定結果を Fig. 22 に示す。nNOS mRNA の発現は絶食によって減少し ( $P < 0.05$ )、再摂食によって増加した ( $P < 0.05$ )。この増加は SA 群および AG 群の両群において観察され、nNOS の発現には AG による影響はみられなかった。



**Fig. 21** Light micrographs of the jejunum immunohistochemically stained for nNOS.



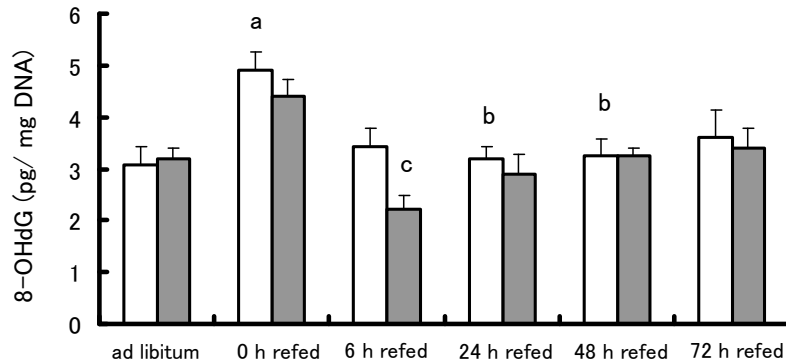
**Fig. 22** Effects of refeeding and AG treatment on nNOS expression and transcription in the jejunum. Values are means  $\pm$  SE. aP < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. bP < 0.05 compared with the 0 h refeed rats in SA-treated group. cP < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in AG-treated group. dP < 0.05 compared with the 0 h refeed rats in AG-treated group. Six rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

## 第 6 節 再摂食による腸の 8-OHdG の産生と IFN- $\gamma$ mRNA の発現

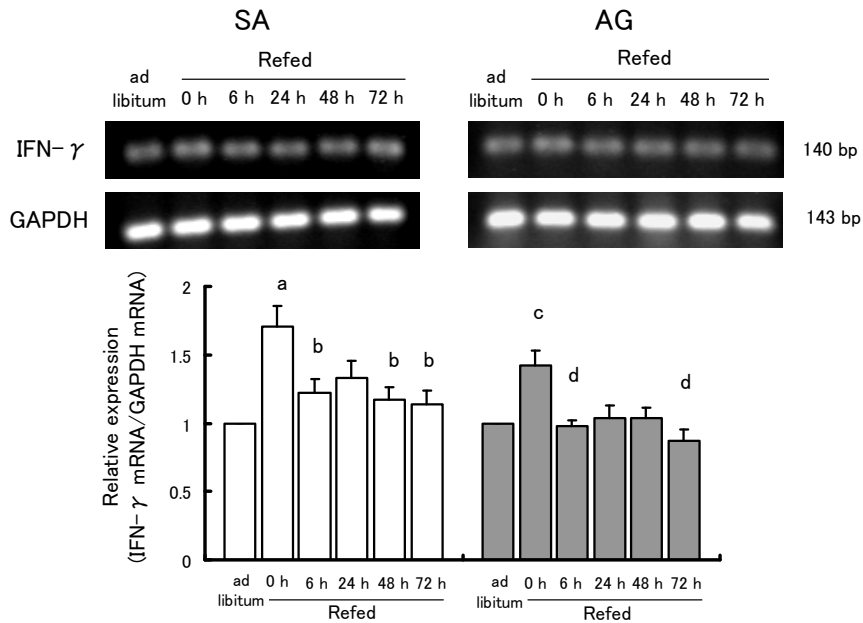
前章にて iNOS 由来の NO が ROS を介した腸上皮内リンパ球の IFN- $\gamma$  の発現を通じて、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスを誘導していることを明らかにした。そこで本節も、8-OHdG と IFN- $\gamma$  mRNA に対する再摂食の効果を評価した。

絶食後再摂食による空腸の ROS の産生を 8-OHdG を測定することにより評価した。測定結果を Fig. 23 に示す。空腸の 8-OHdG は SA 群において、*ad libitum* ラットと比較して 0h refed ラットにおいて有意に増加した ( $P < 0.05$ )。さらに、SA 群と AG 群を比較すると、再摂食 6h ラットにおける 8-OHdG が AG によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。この ROS の減少は、再摂食初期からの AG による iNOS 抑制による結果生じたものと示唆された。

一方、IFN- $\gamma$  mRNA の測定結果を Fig. 24 に示す。IFN- $\gamma$  は絶食によって有意に増加し ( $P < 0.05$ )、再摂食することによって減少した ( $P < 0.05$ )。この減少は SA および AG 群の両群で観察された。



**Fig. 23** Effects of refeeding and AG treatment on jejunal DNA oxidative damage. aP < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. bP < 0.05 compared with the 0 h refeed rats in SA-treated group. cP < 0.05 compared with each group at the refeeding period. Six rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.



**Fig. 24** Effects of refeeding and AG treatment on jejunal transcription of IFN- $\gamma$ . Values are means  $\pm$  SE. aP < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in SA-treated group. bP < 0.05 compared with the 0 h refeed rats in SA-treated group. cP < 0.05 compared with the ad libitum-fed rats in AG-treated group. dP < 0.05 compared with the 0 h refeed rats in AG-treated group. Six rats were tested in each group. Open bars, SA-treated rats; solid bars, AG-treated rats.

## 第7節 考察および小括

第2章では、食餌の有無による腸上皮細胞のアポトーシスに対する iNOS と nNOS の役割を明らかにするとともに、腸管粘膜の形態維持に対する iNOS の役割を検討するため、絶食後再摂食ラットに選択的 iNOS 阻害剤の aminoguanidine を投与して、再摂食による腸管粘膜の回復過程における iNOS と nNOS の動態を空腸の病理学的評価および生化学的評価から解析した。

絶食によって生じた腸上皮細胞のアポトーシスは再摂食によって抑制され、空腸粘膜の萎縮は改善した。また、絶食によって増加した iNOS の発現が再摂食によって抑制されたことに伴い、iNOS 由来の NO、ROS の産生および IFN- $\gamma$  mRNA の誘導もそれぞれ抑制された。加えて、再摂食の初期において、iNOS 阻害剤は再摂食による空腸の粘膜萎縮の回復を早めた。この阻害剤の効果は、細胞増殖の回復ではなく、アポトーシスの減弱によるものであり、再摂食による iNOS 発現の抑制のみならず、iNOS 阻害剤の相加的な iNOS 活性の抑制が、アポトーシスの減弱を促進したことが明らかになった。つまり、絶食が腸における iNOS を活性化することによって腸上皮細胞のアポトーシスを誘導し、逆に再摂食は、腸における iNOS 活性を抑制することによってアポトーシスを抑制すると考えられる。以上のことから、iNOS は腸管粘膜の形態の調節において重要な役割を果たすことが示唆された。

次に、絶食後再摂食による腸管粘膜萎縮の回復過程における iNOS と nNOS との関係について検討する。本章の結果では、nNOS タンパク質の発現は空腸の腸筋層間神経叢で観察され、絶食によって減弱し、再摂食によって段階的に増加した。また、iNOS タンパク質の発現は空腸の腸粘膜上皮で観察され、絶食によって増加し、再摂食することによって減少した。これらのことから、食餌の有無による腸の nNOS と iNOS の発現は相反していることが明らかとなり、腸の nNOS は iNOS の活性を生理的に制御している可能性が推察された。絶食に誘導された腸上皮細胞のアポトーシスに対する nNOS の役割は、これまであまり検討されていなかったが、本章において nNOS の発現は iNOS 阻害剤に影響されず、絶食により減少し、その後の再摂食によって徐々に回復することが明らかとなった。一方 Qu らは、nNOS の抑制が腸において転写活性因子 NF- $\kappa$ B の増加を引き起こし、その後、iNOS の発現が増加したことから、nNOS による恒常的な NF- $\kappa$ B の阻害が、iNOS 発現を抑制していることを報告した [54]。通常、NF- $\kappa$ B は細胞質に存在する複合体であり、I $\kappa$ B と結合していることによって不活性化されている。しかしながら、I $\kappa$ B キナーゼが I $\kappa$ B をリン酸化し、I $\kappa$ B が破壊されることによって、NF- $\kappa$ B は活性化し、核内へトランスロケーションし、DNA に結合し転写活性を促進している [26]。また、NF- $\kappa$ B には、リン酸化による活性化機構だけではなく、NF- $\kappa$ B タンパク質内のシステイン残基に対する S-ニトロソ化による核内トランスロケーションの制御機構があり、I $\kappa$ B タンパク質におけるシステイン残基の S-ニトロソ化は I $\kappa$ B のリン酸化を抑制しており、さらに、NF- $\kappa$ B の p50 サブユ

ニット内のシステイン残基の S-ニトロソ化は、DNA との結合を抑制する。したがって、腸における NF- $\kappa$ B タンパク質は、恒常的に産生される nNOS 由来の NO によるシステイン残基の S-ニトロソ化を介して、常に制御されている可能性が示唆される。以上のことから、絶食による iNOS の発現には、nNOS 由来 NO の産生低下による NF- $\kappa$ B 活性化が関与しているものと考えられる。

一方、本章の結果では、nNOS は筋層間神経叢のニューロンで発現し、iNOS は絨毛の腸上皮細胞で発現した (Figs. 19 & 21)。このことから、nNOS 由来の NO が NF- $\kappa$ B を介した iNOS 誘導に関与しているのであれば、不安定な NO を直接送るためには解剖学的に距離がある問題点が持ち上がる。この問題点は、腸における固有の神経系 (ENS) の観点から考察する。筋層間神経叢の nNOS 陽性のニューロンは、内因性の求心性ニューロン (IPAN) を形成しており、粘膜のセンサーからの感覚性ニューロンの刺激により活性化する [17, 18]。IPAN は、腸管の蠕動運動によって活性化され [40]、筋層間神経叢から抑制性および興奮性運動神経路を通じて神経線維を伸ばし、NO とアセチルコリンをそれぞれ神経伝達物質として主に輪状筋に刺激を伝播する役割を担っている [49]。腸粘膜と腸粘膜下組織における nNOS 陽性のニューロンはこれまで識別はされていないものの、筋層間神経叢から始まる nNOS 陽性の神経線維の神経終末が、粘膜および粘膜下組織で見つかったことから [12]、筋層間神経叢から神経線維を伸ばし、粘膜および粘膜下組織に直接 nNOS 由来 NO を放出しているものと考えられ、nNOS が複雑な腸の神経系 (ENS) を介して腸管粘膜の形態維持に関与してい

る可能性が示唆された [11, 22, 67]。すなわち、腸の nNOS は腸管腔からの機械的刺激の欠如による蠕動運動の消失に伴い減衰し、その結果 iNOS が誘導された可能性が示唆された。

さらに、再摂食による腸管粘膜萎縮からの回復はアポトーシスの抑制だけではなく、細胞増殖能の増加も起因している。本章の結果では、絶食によって減少した細胞増殖能は再摂食時間に伴って徐々に増加したが、iNOS 阻害剤による影響は認められなかった。したがって、細胞増殖の回復における iNOS-independent なメカニズムについて考察する。Niinikoski らは、新生子豚 TPN モデルにおいて、上腸間膜動脈における血流低下が細胞増殖および腸管粘膜の萎縮に関与すると報告した [47]。さらに、Qu らは、ラットの腸の血流のコントロールに nNOS が重要な機能を持っていることを報告した [55]。このような末梢血管運動は、腸粘膜にある知覚神経末端の刺激によって導かれると考えられており、この運動を形成するニューロンは、筋層間神経叢を介した粘膜下神経叢から伝播される NO が血管作動性ポリペプチド (VIP) と共に、粘膜下組織の細動脈血管拡張を引き起こしているものと推察される [11, 22]。これらのことから、陰窩の細胞増殖能の調節に対して nNOS 由来の NO が腸粘膜の血流の維持という重要な役割を担っている可能性が示唆された。つまり、腸筋層間神経叢の nNOS は、NF- $\kappa$ B および腸運動による iNOS の調節に加えて、腸粘膜の血流の調整も担っていると考えられる。

以上の結果から、本章では、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスは、腸



筋層間神経叢の nNOS の減衰を介して、腸粘膜上皮の iNOS が活性化されることで誘導され、再摂食によって nNOS が活性化され、iNOS を抑制することによって減弱されることが明らかとなった [34]。したがって、腸における iNOS および nNOS は食餌の有無によって制御され、腸管粘膜の形態維持に対して腸上皮細胞のアポトーシスの制御という重要な役割を担っていることが示唆された。

## 結論

本論文では、絶食ラットを用いて、絶食初期からみられる腸上皮細胞のアポトーシスの誘導メカニズムを iNOS の観点から明らかにするとともに、腸管粘膜の形態維持に対する内因性 NO の役割について解析し、以下の結論を得た。

第 1 章では、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスに iNOS が関与するのかを、選択的 iNOS 阻害剤の aminoguanidine を用いて、ラット空腸の病理学的評価および生化学的評価から検討した結果、iNOS が絶食による腸上皮細胞のアポトーシスの誘導に対して中心的な役割を示すことを初めて明らかにした。すなわち、iNOS 由来の NO は ROS を介した腸上皮内リンパ球の IFN- $\gamma$  の発現を通じて、絶食による腸上皮細胞のアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。また、nNOS が絶食による iNOS の発現に関与していることが示唆された

第 2 章では、食餌の有無による腸上皮細胞のアポトーシスに対する iNOS と nNOS の役割を明らかにするとともに、腸管粘膜の形態維持に対する iNOS の役割を検討するため、絶食後再摂食ラットに選択的 iNOS 阻害剤の aminoguanidine を投与して、再摂食による腸管粘膜の回復過程における iNOS と nNOS の動態を空腸の病理学的評価および生化学的評価から解析

した結果、絶食は iNOS を活性化することで腸のアポトーシスを誘導し、再摂食は iNOS を抑制することによって腸のアポトーシスを改善することが明らかとなった。さらに、腸筋層間神経叢の nNOS の減衰を介して、腸粘膜上皮の iNOS が活性化されることで誘導され、再摂食によって nNOS が活性化され、iNOS を抑制することによって減弱されることが示唆された。

本研究から、絶食による腸管粘膜萎縮は、iNOS 由来の NO が ROS を介して腸上皮リンパ球からの IFN- $\gamma$  を誘発することにより、腸上皮細胞のアポトーシスが誘導されているものと示唆された。また、絶食は nNOS の減少によって iNOS を活性化することで腸のアポトーシスを誘導し、一方、再摂食は nNOS を活性化することで iNOS を抑制し、腸のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。そして nNOS は、空腸内の食餌による機械的刺激により、蠕動運動と腸粘膜上皮の iNOS の発現を制御する可能性が示唆された。

以上のことから、腸の内因性 NO は食餌の有無によって調整され、腸上皮細胞のアポトーシスの制御という重要な役割を担っていることが明らかとなった。本論文の知見は、これまでわからなかった絶食による腸管粘膜萎縮のメカニズムの一端を明らかにしたことにより、今後の腸管の病態生理の究明に有用な情報が提供できたものと思われる。

## 謝辞

本研究に際し、素晴らしい研究テーマを与えていただくとともに終始ご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部 病態解析学講座教授 小林順先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に多大なるご尽力をいただきました城西大学薬学部 病態解析学講座准教授 内田博之先生、同病態解析学講座助教 大竹一男先生に深謝の意を表します。

本論文に対し、ご示唆並びにご助言を賜りました城西大学薬学部 食毒性学講座教授 加園恵三先生、生体防御学講座教授 日比野康英先生に深謝の意を表します。

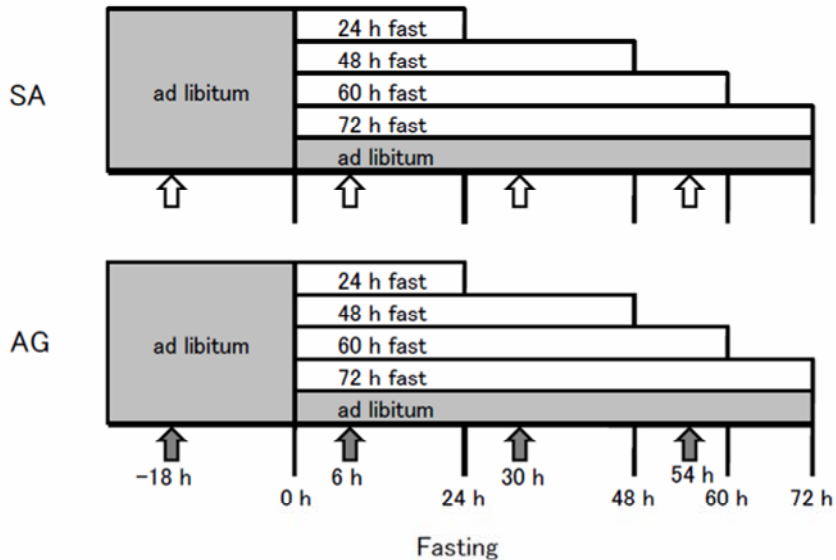
最後に、本研究にご協力いただきました城西大学薬学部 医療栄養学科 病態解析学講座諸氏に感謝いたします。

## 実験の部

### 研究デザイン

#### 第1章

本章では体重 200~220g 9 週齢の Wistar 雄性ラット (SLC, 静岡) を用いた。ラットは通常固形食と逆浸透水を自由に摂食摂水させ、糞食を避けるために網底ケージで個別飼育した。1 週間後 (10 週齢目)、ラットを無作為に生理食塩水投与群 (SA) と aminoguanidine 投与群 (AG) の 2 つの群に分け、さらにそれぞれの群を絶食時間で細分類した。絶食時間は 24、48、60、72 時間とし、対照群として摂食群 (*ad libitum*) を設けた。研究デザインを Fig. 25 に示す。aminoguanidine は絶食前 18 時間、絶食後 6、30、54 時間にそれぞれ 20 mg/kg で皮下に投与した [64]。また、絶食期間中は自由飲水とした。絶食後、ラットをネンブタール麻酔下で開腹し、小腸を氷上にすばやく摘出した。小腸の管腔内を 20 ml のリン緩衝溶液 (PBS) で洗浄後、口側の 10 cm を十二指腸として取り除いた後、残りを 2 等分し、口側を空腸として用いた。各実験に用いるため、3~5 cm ずつに切り出した [21]。切り出した組織のうちの一つは、病理標本を作製するため 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬した。また、残りの組織は液体窒素で凍らせた後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。なお、全ての実験は、城西大学動物実験規定に基づいて行われた。

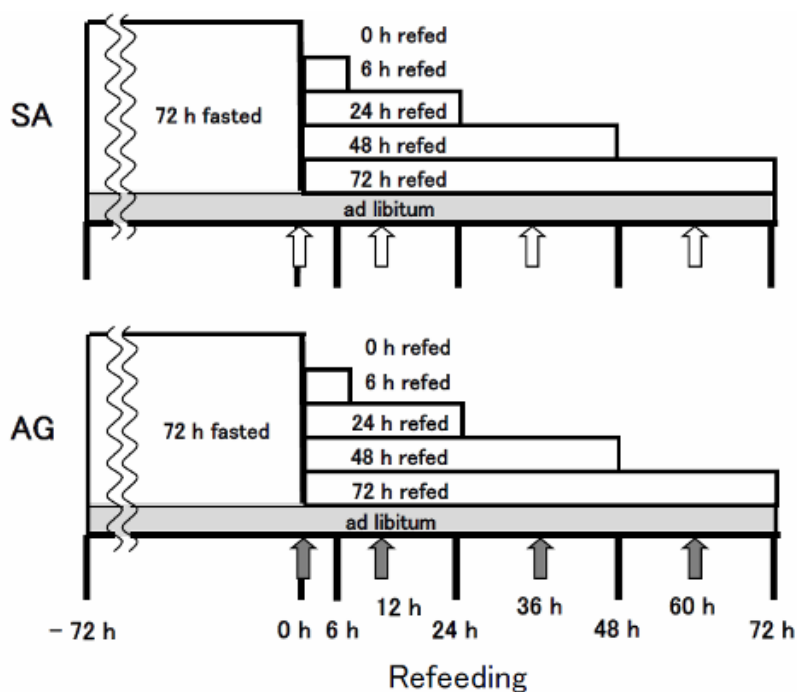


**Fig. 25 Experimental design.** The large block arrows represent treatment with SA (open block arrow) and AG (closed block arrow). At the appointed time after fasting, intestinal tissues were collected. Seven rats were tested in each group.

## 第 2 章

本章では体重 200~220g 9 週齢の Wistar 雄性ラット (SLC, 静岡) を用いた。ラットは通常固形食と逆浸透水を自由に摂食摂水させ、糞食を避けるために網底ケージで個別飼育した。1 週間後 (10 週齢目)、ラットを 72 時間の絶食後、無作為に生理食塩水投与群 (SA) と aminoguanidine 投与群 (AG) の 2 つの群に分け、さらにそれぞれの群を再摂食時間で細分類した。再摂食時間は 6、24、48、72 時間とし、対照群として摂食群 (*ad libitum*) を設けた。研究デザインを Fig. 26 に示す。aminoguanidine は再摂食後 0、12、36、60 時間にそれぞれ 20 mg/kg で皮下に投与した [64]。また、絶食期間中

は自由飲水とした。再摂食後、ラットをネブタール麻酔下で開腹し、小腸を氷上にすばやく摘出した。小腸の管腔内を20 mlのリン緩衝溶液（PBS）で洗浄後、口側の10 cmを十二指腸として取り除いた後、残りを2等分し、口側を空腸として用いた。各実験に用いるため、3~5 cm ずつに切り出した [21]。切り出した組織のうちの一つは、病理標本を作製するため 10%中性緩衝ホルマリンに浸漬した。また、残りの組織は液体窒素で凍らせた後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。なお、全ての実験は、城西大学動物実験規定に基づいて行われた。



**Fig. 26 Experimental Design.** The large block arrows represent the treatment with SA (open block arrow) and AG (closed block arrow). At the appointed time after refeeding, intestinal tissues were collected. Six rats were tested in each group.

### 空腸粘膜高の計測

10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した空腸組織をパラフィン包埋後、組織切片を作成した。作成した組織切片は脱パラフィン処理後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色し、顕微鏡下で1匹あたり最低30箇所（腸絨毛および腸陰窩）を計測した。計測には顕微鏡（OLYMPUS BX41）、デジタルカメラシステム（Pixera Penguin 150CL, USA）およびマイクロスケールを用いた。

### 組織形態学的評価法と *terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUDP-biotin nick-end labeling (TUNEL)* 染色法による腸上皮細胞のアポトーシスの評価

空腸の腸上皮細胞のアポトーシスを検出するために、組織形態学的評価法および TUNEL 染色法の2つの方法を用いた。

組織形態学的評価法はアポトーシス特有の細胞変化（アポトーシス小体の形成、クロマチンの凝縮や核の断片化）を光学顕微鏡下で観察し、アポトーシス細胞を検出する方法であり、ラット1匹あたり50 column 評価した。column とは、絨毛の縦断面に沿った絨毛根元から絨毛先端までを指す。結果は、1 column あたりの腸上皮細胞の全個数に対する1 column あたりのアポトーシス細胞の個数の割合をアポトーシスインデックス（AI）として表した。さらに、この評価法では、絨毛中のアポトーシス細胞の全個数だけでなくアポトーシス細胞の位置（cell position）も記録した。cell position は絨毛と陰



窩の境目を cell position 0 として、絨毛先端部へ向かって数え、絨毛におけるアポトーシス細胞の出現分布を評価するために、AI 分布曲線を作成した。

TUNEL 染色法による腸上皮細胞の断片化 DNA の評価は Apoptosis in situ Detection KIT (Wako, Japan) を用いた [23]。試料を脱パラフィン後、抗原賦活化のため 20 µg/ml proteinase K を 100 µl 滴下し、37 °C で 20 分間インキュベートした。このタンパク質分解酵素の活性を抑えるために子牛血清含有溶液を試料に滴下し、5 分間インキュベートした後、PBS に 10 分間浸漬し、洗浄した。次に terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 溶液 100 µl を試料に滴下し、37 °C で 25 分間インキュベートした後、内因性ペルオキシダーゼを不活性化させるために、3% 過酸化水素溶液に室温で 20 分間浸漬した。PBS で洗浄後、試料に horseradish-peroxidase (POD) 結合 TdT 抗体溶液を 100 µl 滴下し、37 °C で 10 分間インキュベートした後、試料を 10 分間 PBS 溶液に浸漬し、洗浄した。そして、試料に 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液を 100 µl 滴下し、室温で 2 分間発色させた。最後に、試料にヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察した。TUNEL 法の評価は 1 つの絨毛中の腸上皮細胞に対する TUNEL 陽性細胞数の割合で評価し、1 匹あたり最低 50 本の絨毛を計測した。

### ***5-bromo-2'-deoxyuridine (5-BrdU) による細胞増殖能の評価***

陰窩における細胞増殖能は5-BrdU免疫組織化学染色法を用いて測定した。この方法はセルサイクルにおけるS期に特異的に取り込まれた5-BrdUを検出することにより細胞増殖能を計測する方法である [66]。5-BrdU免疫組織化学染色には、anti-5-BrdUモノクローナル抗体およびVECTASTAIN Elite ABC KIT (Vector Laboratories, USA)を用いた。予め、解剖の60分前にラットの腹腔内に100 mg/kgの5-BrdUを投与する。組織切片を脱パラフィン後、3%過酸化水素-メタノール溶液に20分間浸漬した。次に、試料をPBSで洗浄後、DNAの変性のために2N塩酸に20分間浸漬した。試料をPBSで洗浄後、pH調整のために0.1Mホウ酸緩衝溶液(pH 8.5)に5分間浸漬した。次に、試料に20 µg/mlのproteinase Kを300 µl滴下し、37 °Cで25分間インキュベートした。このタンパク質分解酵素の活性を抑えるために子牛血清含有溶液を試料に滴下し、5分間インキュベートした後、PBSに10分間浸漬し、洗浄した。試料にmouse anti-5-BrdUモノクローナル抗体溶液(1:50; Chemicon International, CA)を300 µl滴下し、37 °Cで1時間インキュベートした。PBSで洗浄後、試料にビオチン標識goat anti-mouse IgG抗体溶液(1:200; Vector Laboratories, USA)を300 µl滴下した。続いて、試料をPBSで洗浄した後、avidin-biotin-peroxidase複合体溶液を試料に300 µl滴下し、室温で1時間インキュベートした。反応後、0.05% DAB-過酸化水素溶液を試料に滴下し、室温で発色させた。最後に、試料をヘマトキシリンで対比染色し、顕微鏡下で評価した。評価は、各標本

から最低 10 個の陰窩を抽出し、5-BrdU 陽性細胞を計測した。

### **免疫組織化学染色法による iNOS および nNOS タンパク質の評価**

iNOS および nNOS の免疫組織化学染色は anti-iNOS ポリクローナル抗体、anti-nNOS モノクローナル抗体および VECTASTAIN Elite ABC KIT (Vector Laboratories, USA) を用いた [44]。試料を脱パラフィン後、抗原賦活のために 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、95 °C で 20 分間煮沸した [61]。PBS で洗浄後、試料は内因性ペルオキシダーゼの不活性化のために 6% 過酸化水素溶液に 1 時間浸漬した。再び PBS で洗浄後、非特異的染色を避けるために 20% ヤギ血清含有 PBS 溶液を滴下し、室温で 10 分間ブロッキングした。次に、試料に rabbit anti-iNOS ポリクローナル抗体 (1:100; BD Transduction Laboratories, USA) または mouse anti-nNOS モノクローナル抗体 (1:100; BD Transduction Laboratories, USA) をそれぞれ 300  $\mu$ l 滴下し、4°Cで一晩インキュベートした。続いて、二次抗体としてビオチン標識 goat anti-rabbit IgG (1:200; VECTASTAIN, USA) またはビオチン標識 goat anti-mouse IgG (1:200; VECTASTAIN, USA) を 37 °C で 1 時間、それぞれ反応させた。さらに、試料は VECTASTAIN Elite ABC KIT の avidin-biotin-peroxidase 複合体で処理した後、0.05% DAB-過酸化水素溶液を室温で発色させた。最後に、試料はヘマトキシリンで対比染色し、光学顕微鏡とデジタルカメラシステムを用いて観察した。

### **HPLC を用いた空腸組織中の亜硝酸塩濃度の測定**

空腸組織における亜硝酸塩濃度を HPLC system (ENO-20; EiCom, 日本) を用いて測定した。この HPLC は、亜硝酸塩と硝酸塩をイオンクロマトグラフで分離後、グリース法を用いて試料を発色させ、540 nm の波長で測定する装置である。一方、硝酸塩は亜硝酸塩に還元後、発色し、540 nm で測定する。各臓器サンプルはメタノールで抽出後、10,000 G で 5 分間遠心し、タンパク質を除去した (jejunum : methanol = 1 : 2 weight/volume, 4 °C) [36]。

### **reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) による空腸組織中の iNOS, nNOS および IFN- $\gamma$ mRNA の発現量の評価**

はじめに、-80 °C で保存した空腸組織から TaKaRa RNAiso Reagent (TaKaRa Bio, 日本) を用いて Total RNA を抽出した。抽出はメーカーの指示書に基づいて行った。Total RNA 量は 260nm における吸光度を用いて算出した。次に、RT-PCR は、RNA PCR kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa Bio, 日本) の指示書に基づいて、Total RNA を 1 mg 用いた。逆転写反応は 42 °C で 30 分、99 °C で 5 分、5 °C で 5 分を 1 サイクル行った。PCR 反応は 94 °C で 30 秒、60 °C で 30 秒、72 °C で 1 分を 30 サイクル行った。PCR には RoboCycler 96 gradient temperature cycler (Stratagene, CA) を使用した。以下に、使用したプライマーとベースペアサイズおよび Primer ID を示す。

iNOS mRNA: iNOS forward primer ; 5'-ctcactgtggctgtggcaccta-3'

iNOS reverse primer ; 5'-gggtcttcgggcttcaggta-3'

(101 bp, RA008296)

IFN- $\gamma$  mRNA: IFN- $\gamma$  forward primer ; 5'-aggccatcagcaacaacataagtg-3'

IFN- $\gamma$  reverse primer ; 5'-gacagctttgtgctggatctgtg-3'

(140 bp, RA021293)

nNOS mRNA: nNOS forward primer ; 5'-tcaaagccatccagcgcata-3'

nNOS reverse primer ; 5'-gcggttggtcacttcatacttc-3'

(146 bp, RA022317)

本研究では、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を内部標準とし、GAPDH 発現量との比で発現量を表した。以下に GAPDH のプライマーについて示す。

GAPDH mRNA: GAPDH forward primer ; 5'-ggcacagtcaaggctgagaatg-3'

GAPDH reverse primer ; 5'-atggtggtgaagacgccagta-3'

(143 bp, RA015380)

プライマーは全て TaKaRa Bio が合成したものをを使用した。各 PCR 産物の一部を、2%アガロースゲルを用いて電気泳動した。アガロースゲルは TBE バッファー (89 mM Tris, 89 mM ホウ酸, 2 mM EDTA, pH 8.3) で作成した。そして、PCR 産物を可視化するためエチジウムブロマイドで反応させた。PCR 産物の発光強度は Gene Genius Bioimaging System (SYNGENE, UK) を用いて測定し、iNOS、nNOS および IFN- $\gamma$  の発現量を GAPDH の発現量と

の発現比からそれぞれ算出した。

### **空腸組織中の 8-hydroxydeoxyguanosine の測定**

本論文では空腸における活性酸素種 (ROS) の生成を、DNA 中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) 濃度測定によって評価した [32]。8-OHdG は、酸化による DNA 損傷の生成物であることから、ROS の指標として広く用いられている [62]。空腸の DNA は、カオトロピック試薬および酸化防止剤としてヨウ化ナトリウム (NaI) を使用した DNA Extractor TIS Kit (Wako, 日本) を用いて精製した。ラットの空腸から抽出された DNA 200  $\mu\text{g}$  を 135  $\mu\text{l}$  の水に溶かし、さらに 200 mM 酢酸ナトリウム 15  $\mu\text{l}$  と 6 unit の nuclease P1 (Wako, 日本) を添加し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。その後、1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 15  $\mu\text{l}$  と、2 unit の alkaline phosphatase (Wako, 日本) を加え、37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。加水分解後のサンプルを VIVASPIN 500 MWCO 10,000 (Sartorius Stedim, Germany) を用いて限外濾過を行った。濾過条件は 4  $^{\circ}\text{C}$  で 14,000 rpm、20 分間とした。濾過後のサンプルの 50  $\mu\text{l}$  を 8-OHdG の測定に用いた。8-OHdG の測定には、ELISA kit (Japan Institute for the Control of Aging, 静岡) を用いた。このキットは、特異性の高いモノクローナル抗体を用いており、非常に低レベルの 8-OHdG を測定することができるキットである [58]。8-OHdG は 450 nm の波長で測定し、結果は、検量線に基づいて算出し、DNA 1  $\mu\text{g}$  当たりの 8-OHdG 量とした。

## 統計分析

統計分析は Dr SPSS II for Windows.を用いて算出し、値はすべて平均値 ±SE として表現した。One-way ANOVA は、絶食または再摂食の時間経過による影響に、統計的な違いがあるのかを分析するために使用した。Two-way ANOVA は、各時間群における AG 投与による影響に、統計的な違いがあるかを分析するために使用した。統計的有意差は  $P < 0.05$  とした。

## 参考論文

1. **Abdeen S, Mathew TC, Khan I, Dashti H, and Asfar S.** Fasting-induced intestinal damage is mediated by oxidative and inflammatory responses. *Br J Surg* 96: 552-559, 2009.
2. **Adams SD, Delano BA, Helmer KS, and Mercer DW.** Fasting exacerbates and feeding diminishes LPS-induced liver injury in the rat. *Dig Dis Sci* 54: 767-773, 2009.
3. **Aldewachi HS, Wright NA, Appleton DR, and Watson AJ.** The effect of starvation and refeeding on cell population kinetics in the rat small bowel mucosa. *J Anat* 119: 105-121, 1975.
4. **Bojarski C, Bendfeldt K, Gitter AH, Mankertz J, Fromm M, Wagner S, Riecken EO, and Schulzke JD.** Apoptosis and intestinal barrier function. *Ann NY Acad Sci* 915: 270-274, 2000.
5. **Boscá L, and Hortelano S.** Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal* 11: 239-244, 1999.
6. **Boza JJ, Moënnos D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsché R, Donnet A, Schiffrin EJ, Perruisseau G, and Ballèvre O.** Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr* 129: 1340-1346, 1999.
7. **Brookes PS, Salinas EP, Darley-Usmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-Usmar VM, and Anderson PG.** Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome *c* release. *J Biol Chem* 275: 20474-20479, 2000.
8. **Brüne B, Knethen AV, and Sandau KB.** Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* 6: 969-975, 1999.
9. **Carey HV, Hayden UL, and Tucker KE.** Fasting alters basal and stimulated ion transport in piglet jejunum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 267; R156-R163, 1994.



10. **Chappell VL, Thompson MD, Jeschke MG, Chung DH, Thompson JC, and Wolf SE.** Effects of incremental starvation on gut mucosa. *Dig Dis Sci* 48: 765-769, 2003.
11. **Chino Y, Fujimura M, Kitahama K, and Fujimiya M.** Colocalization of NO and VIP in neurons of the submucous plexus in the rat intestine. *Peptides* 23: 2245–2250, 2002.
12. **Costa M, Brookes SJH, and Hennig GW.** Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47: 15-19, 2000.
13. **Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, Wu C, Ghosh DK, Getzoff ED, Stuehr DJ, and Tainer JA.** The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 278: 425-431, 1997.
14. **Dahly EM, Guo Z, and Ney DM.** Alterations in enterocyte proliferation and apoptosis accompany TPN-induced mucosal hypoplasia and IGF-I-induced hyperplasia in rats. *J Nutr* 132: 2010-2014, 2002.
15. **Dickinson E, Tuncer R, Nadler E, Boyle P, Alber S, Watkins S, and Ford H.** NOX, a novel nitric oxide scavenger, reduces bacterial translocation in rats after endotoxin challenge. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277: G1281-G1287, 1999.
16. **Dunel-Erb S, Chevalier C, Laurent P, Bach A, Decrock F, and Maho Y Le.** Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 933-947, 2001.
17. **Ekblad E, Alm P, and Sundler F.** NOS-containing neurons in the gut and coeliac ganglia. *Neuropharmacology* 33: 1323-1331, 1994.
18. **Ekblad E, Mulder H, Uddman R, and Sundler F.** Distribution, origin and projections of nitric oxide synthase-containing neurons in gut and pancreas. *Neuroscience* 63: 233-248, 1994.
19. **Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, and Varfolomeev E.** The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci* 20: 342-344, 1995.
20. **Fujimoto K, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Tsunada S, and Ootani A.** Homeostasis in the small intestinal mucosa balanced between cell

proliferation and apoptosis is regulated partly by the central nervous system. *J Gastroenterol* 37 [Suppl 14]:139-144, 2002.

21. **Fujise T, Iwakiri R, Wu B, Amemori S, Kakimoto T, Yokoyama F, Sakata Y, Tsunada S, and Fujimoto K.** Apoptotic pathway in the rat small intestinal mucosa is different between fasting and ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G110-G116, 2006.
22. **Furness JB, Jones C, Nurgali K, and Clerc N.** Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 72: 143-164, 2004.
23. **Gavrieli Y, Sherman Y, and Ben-Sasson SA.** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992.
24. **Grongnet JF, and David JC.** Reciprocal variations of nNOS and HSP90 are associated with fasting in gastrointestinal tract of the piglet. *Dig Dis Sci* 48: 365-372, 2003.
25. **Hall PA, Coates PJ, Ansari B, and Hopwood D.** Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 107: 3569-3577, 1994.
26. **Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, and Stamler J.** Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Bio* 6: 150-166, 2005.
27. **Hodin RA, Graham JR, Meng S, and Upton MP.** Temporal pattern of rat small intestinal gene expression with refeeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 266: G83-G89, 1994.
28. **Hoffman RA.** Intraepithelial lymphocytes coinduce nitric oxide synthase in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G886-G894, 2000.
29. **Holt PR, Wu S, and Yeh KY.** Ileal hyperplastic response to starvation in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 251: G124-G131, 1986.
30. **Hotchkiss RS, Schmiege RE Jr, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Karl IE, and Buchman TG.** Rapid onset of intestinal epithelial

and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and shock. *Crit Care Med* 28: 3207-3217, 2000.

31. **Hsu CM, Liu CH, and Chen LW.** Nitric oxide synthase inhibitor ameliorates oral total parenteral nutrition-induced barrier dysfunction. *Shock* 13: 135-139, 2000.
32. **Inoue S, and Kawanishi S.** Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett* 371: 86-88, 1995.
33. **Ito J, Uchida H, Yokote T, Ohtake K, and Kobayashi J.** Fasting-induced intestinal apoptosis is mediated by inducible nitric oxide synthase and interferon- $\gamma$  in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298: G916-G926, 2010.
34. **Ito J, Uchida H, Ohtake K, and Kobayashi J.** Refeeding reverses fasting-induced intestinal apoptosis via neuronal NOS-mediated inhibition of inducible NOS in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* Submitted.
35. **Iwakiri R, Gotoh Y, Noda T, Sugihara H, Fujimoto K, Fuseler J, and Aw TY.** Programmed cell death in rat intestine: effect of feeding and fasting. *Scand J Gastroenterol* 36: 39-47, 2001.
36. **Janero DR, Bryan NS, Saijo F, Dhawan V, Schwalb DJ, Warren MC, and Feelisch M.** Differential nitrosylation of blood and tissue constituents during glyceryl trinitrate biotransformation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16958-16963, 2004.
37. **Kakimoto T, Fujise T, Shiraishi R, Kuroki T, Park JM, Ootani A, Sakata Y, Tsunada S, Iwakiri R, and Fujimoto K.** Indigestible material attenuated changes in apoptosis in the fasted rat jejunal mucosa. *Exp Biol Med* 233: 310-316, 2008.
38. **Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, and Harmon BV.** Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 46: 1-27, 1995.
39. **Kim YM, Bombeck CA, and Billiar TR.** Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 84: 253-256, 1999.

40. **Kunze WAA, and Furness JB.** The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 61: 117-142, 1999.
41. **Mainous M, Xu DZ, Lu Q, Berg RD, and Deitch EA.** Oral-TPN-induced bacterial translocation and impaired immune defenses are reversed by refeeding. *Surgery* 110: 277-283, 1991.
42. **Martin CA, and Panja A.** Cytokine regulation of human intestinal primary epithelial cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G92-G104, 2002.
43. **Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP, and Hall PA.** The role of *p53* in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and *p53*-deficient mice. *Cancer Res* 54: 614-617, 1994.
44. **Morin MJ, Karr SM, Faris RA, and Gruppuso PA.** Developmental variability in expression and regulation of inducible nitric oxide synthase in rat intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G552-G559, 2001.
45. **Nagata S.** Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365, 1997.
46. **Nelson DW, Murali SG, Liu X, Koopmann MC, Holst JJ, and Ney DM.** Insulin-like growth factor I and glucagon-like peptide-2 responses to fasting followed by controlled or ad libitum refeeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1175-R1184, 2008.
47. **Niinikoski H, Stoll B, Guan X, Kansagra K, Lambert BD, Stephens J, Hartmann B, Holst JJ, and Burrin DG.** Onset of small intestinal atrophy is associated with reduced intestinal blood flow in TPN-fed neonatal piglets. *J Nutr* 134: 1467-1474, 2004.
48. **Ohtake K, Koga M, Uchida H, Sonoda K, Ito J, Uchida M, Natsume H, and Kobayashi J.** Oral nitrite ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute experimental colitis in mice. *Nitric Oxide* 23: 65-73, 2010.
49. **Olsson C, and Holmgren S.** The control of gut motility. *Comp Biochem Phys A* 128: 481-503, 2001.
50. **Piacenza L, Peluffo G, and Radi R.** L-Arginine-dependent suppression

- of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: Contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7301-7306, 2001.
- 51. Potten CS.** What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer* 74: 1743- 1748, 1996.
- 52. Potten CS, and Booth C.** The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: a brief review. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 118: 473-478, 1997.
- 53. Pyo CW, Lee SH, and Choi SY.** Oxidative stress induces PKR-dependent apoptosis via IFN- $\gamma$  activation signaling in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Com* 377: 1001-1006, 2008.
- 54. Qu XW, Wang H, De Plaen IG, Rozenfeld RA, and Hsueh W.** Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B. *FASEB J* 15: 439-446, 2001.
- 55. Qu XW, Thaete LG, Rozenfeld RA, Zhu Y, De Plaen IG, Caplan MS, and Hsueh W.** Tetrahydrobiopterin prevents platelet-activating factor-induced intestinal hypoperfusion and necrosis: Role of neuronal nitric oxide synthase. *Crit Care Med* 33: 1050-1056, 2005.
- 56. Ramachandran A, Madesh M, and Balasubramanian KA.** Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroen Hepatol* 15: 109-120, 2000.
- 57. Rudkowski JC, Barreiro E, Harfouche R, Goldberg P, Kishta O, D'Orleans-Juste P, Labonte J, Lesur O, and Hussain SNA.** Roles of iNOS and nNOS in sepsis-induced pulmonary apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L793-L800, 2004.
- 58. Saito S, Yamaguchi H, Hasui Y, Kurashige J, Ochi H, and Yoshida K.** Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) by using ELISA. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 107: 39-44, 2000.
- 59. Sakata H, Ootani A, Fujise T, Sakata Y, Wu B, Tsunada S, Iwakiri R, Fujimoto K, and Shiraishi T.** Decreased apoptosis and increased ornithine decarboxylase activity in the intestinal mucosa of rats with bilateral

- ventromedial hypothalamus lesions. *J Gastroenterol* 40: 137-142, 2005.
- 60. Schulzke JD, Bojarski C, Zeissig S, Heller F, Gitter AH, and Fromm M.** Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 1072: 288-299, 2006.
- 61. Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, and Taylor CR.** Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 41: 1599-1604, 1993.
- 62. Shigenaga M.K, Gimeno C.J, and Ames B.N.** Urinary 8-hydroxy-20-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9697-9701, 1989.
- 63. Sorrells DL, Friend C, Koltuksuz U, Courcoulas A, Boyle P, Garrett M, Watkins S, Rowe MI, and Ford HR.** Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge in vivo. *Arch Surg* 131: 1155-1163, 1996.
- 64. Takeuchi K, Hatazawa R, Tanigami M, Tanaka A, Ohno R, and Yokota A.** Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats. *Life Sciences* 80: 329-336, 2007.
- 65. Tanaka A, Kunikata T, Mizoguchi H, Kato S, and Takeuchi K.** Dual action of nitric oxide in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal ulceration in rats. *J Physiol Pharmacol* 50: 405-17, 1999.
- 66. Tang Y, Swartz-Basile DA, Swietlicki EA, Yi L, Rubin DC, and Levin MS.** Bax is required for resection-induced changes in apoptosis, proliferation, and members of the extrinsic cell death pathways. *Gastroenterology* 126: 220-230, 2004.
- 67. Toda N, and Herman A.** Gastrointestinal function regulation by nitrergic efferent nerves. *Pharmacol Rev* 57: 315-338, 2005.
- 68. Tsujimoto Y, and Shimizu S.** Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Lett* 466: 6-10, 2000.
- 69. Utsumi H, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Sakata H, Shimoda R, Amemori**

- S, Tsunada S, Ootani A, and Fujimoto K.** Intracerebroventricular administration of leptin-induced apoptosis in the rat small intestinal mucosa. *Exp Biol Med* 228: 1239-1244, 2003.
- 70. Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, Utsumi H, Kojima M, Fujise T, Ootani A, and Fujimoto K.** iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion. *Free Radical Bio Med* 33: 649-658, 2002.
- 71. Xie K, and Huang S.** Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. *Free Radic Biol Med* 34: 969-986, 2003.
- 72. Yang H, Finaly R, and Teitelbaum DH.** Alteration in epithelial permeability and ion transport in a mouse model of total parenteral nutrition. *Crit Care Med* 31: 118, 2003.
- 73. Yang H, Fan Y, and Teitelbaum DH.** Intraepithelial lymphocyte-derived interferon- $\gamma$  evokes enterocyte apoptosis with parenteral nutrition in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G629-G637, 2003.
- 74. Yang H, Feng Y, Sun X, and Teitelbaum DH.** Enteral versus parenteral nutrition: Effect on intestinal barrier function. *Ann NY Acad Sci* 1165: 338-346, 2009.
- 75. Yuan B, Ohyama K, Bessho T, and Toyoda H.** Contribution of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 to apoptosis induction in smooth chorion trophoblast cells of human fetal membrane tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 822-827, 2006.
- 76. Yuba T, Nagata K, Yamada T, Osugi S, Kuwahara H, Iwasaki Y, Handa O, Naito Y, Fushiki S, Yoshikawa T, and Marunaka Y.** A novel potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ONO-1714, reduces hyperoxic lung injury in mice. *Respir Med* 101: 793-799, 2007.
- 77. Wildhaber BE, Yang H, Spencer AU, Drongowski RA, and Teitelbaum DH.** Lack of enteral nutrition—effects on the intestinal immune system. *J Surg Res* 123: 8-16, 2005.
- 78. Ziegler TR, Almahfouz A, Pedrini MT, and Smith RJ.** A comparison of rat small intestinal insulin and insulin-like growth factor I receptors during fasting and refeeding. *Endocrinology* 136: 5148-5154, 1995.