

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2009.03) 9巻1号:51~52.

平成19年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題  
5)慢性炎症性腸疾患の病態に關与するチロシンキナーゼの同定

仙葉慎吾

5) 「慢性炎症性腸疾患の病態に関与するチロシンキナーゼの同定」

研究代表者 仙葉 慎吾

【目的】

慢性炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎とクローン病を代表とする一群の消化管疾患であり、消化管の炎症が緩解・再燃を繰り返しながら慢性に経過する。病因については遺伝的素因や環境因子に加え、免疫要因の関与が重要と考えられているが、その詳細については不明である。

本研究では、チロシンキナーゼを網羅的に検出できるユニークなマルチキナーゼ抗体を用いて、腸管の免疫防御において機能しているチロシンキナーゼの中で、炎症性腸疾患特異的に発現が増加あるいは減少しているものを同定することを目的とする。

【方法】

潰瘍性大腸炎のモデルには、マウスに oxazolone を注腸投与して大腸炎を誘導するモデルを用いた。Balb/c マウスに150 $\mu$ l の1% oxazolone を注腸し、投与後2日後に解剖して結腸を摘出した。結腸遠位部からの上皮組織の調製は以下の手順に従って行った。摘出した結腸遠位部を5mm四方に細断し、PBS で洗浄して血液などの不純物を除いた。これを30 mM EDTA を含む PBS 中で震盪し上皮を解離させた後、上皮を遠心分離によって回収した。上皮中に混入しているリ

ンパ球を除くため、調製した上皮を 35% Percoll を含む PBS に懸濁後、500 g で 20 分間遠心分離後、Percoll 表面上に浮いている上皮細胞を回収した。調製した上皮細胞を 5 倍量の抽出バッファーでホモジナイズし、その遠心上清を抽出液として実験に用いた。大腸炎誘導によって起こる大腸上皮抽出液中のチロシンキナーゼ量の変化を、チロシンキナーゼ群において 1 次構造が保存されている領域をエピトープとして開発したチロシンキナーゼ群特異的なモノクローナル抗体 (YK34) を用いたウェスタンブロットにて解析した。

### [結果]

Balb/c マウスに 1% の oxazolone の注腸することによって、下痢や血便などの大腸炎の症状が認められた。生存率は 60% (n=10) であった。結腸を摘出したところ、結腸の遠位部に炎症が見られ、結腸全体の長さがコントロールに比べ短くなっていることが確認された。

正常および大腸炎発症マウスから大腸上皮を単離し、その抽出液中のチロシンキナーゼの発現量を YK34 を用いたウェスタンブロットで解析した。YK34 は抽出液中の様々な分子量のタンパク質と結合し、これらの結合シグナルのうち、少なくとも 5 つのシグナルの強度が大腸炎の誘導によって上昇していることが明らかとなった。

大腸炎の誘導によって発現量に変化したチロシンキナーゼの等電点を知るために、大腸上皮抽出液を等電点電気泳動と SDS-PAGE からなる 2 次元電気泳動で展開した後、YK34 を用いたウェスタンブロットを行った。図 1 に示すように、大腸炎の誘導によって 4

つの結合シグナル (等電点と分子量 (kDa) の組み合わせが 5.3 と 150、5.8 と 110、5.5 と 80、6.3 と 42) の強度が大きく上昇した。また、等電点が 6.2 で分子量が 50 kDa のシグナルの強度は大腸炎の誘導によって減少した。

### [考察と今後の展望]

本申請では、炎症性腸疾患の病態形成メカニズムを理解するために、チロシンキナーゼに焦点を当てて、その発現量の変化をチロシンキナーゼを網羅的に検出できる抗体 (YK34) を用いて調べた。大腸上皮抽出液中には YK34 と結合するタンパク質が複数種存在したことから、上皮細胞にはいくつかのチロシンキナーゼが存在していることがわかる。このうち、大腸炎の誘導によって少なくとも 4 種のチロシンキナーゼの発現量が上昇し、1 種の発現量が減少していることが明らかとなった。このことは、大腸上皮細胞におけるチロシンキナーゼが腸粘膜機能に関与し、潰瘍性大腸炎の病態とも関連している可能性が示唆される。

本研究で見いだされた大腸炎発症に関与しているチロシンキナーゼの活性を特異的に阻害する薬剤は、潰瘍性大腸炎の極めて有効な治療薬となりうる。このような薬剤の開発のためには、これらのチロシンキナーゼを同定することが不可欠である。今後、これらのチロシンキナーゼを質量分析で同定し、大腸上皮由来の培養細胞を用いてチロシンキナーゼと大腸炎の病態形成の関連を明らかにする予定である。

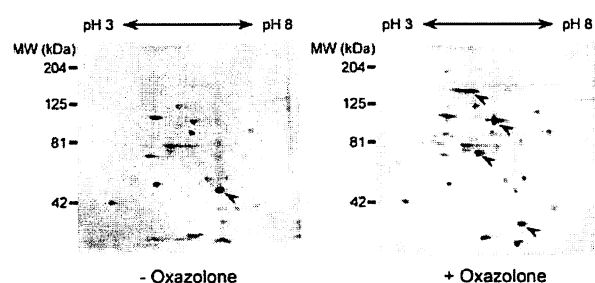


図 1 大腸上皮抽出液の 2 次元電気泳動とウェスタンブロットによる解析。

大腸炎の誘導によって強度が変化したシグナルを矢印で示した。