

浸透圧性下剤硫酸マグネシウムおよび大腸刺激性下剤ビスコジルの
瀉下作用における大腸アクアポリン3の役割

**The role of colon aquaporin-3 in laxative effects of an osmotic laxative,
magnesium sulphate, and a stimulant laxative, bisacodyl**

五十嵐 信智

Nobutomo Ikarashi

【目次】

掲載論文目録	1
略号一覧	2
序論	4
第一章	12
第二章	49
第三章	80
第四章	98
総括	115
謝辞	121
引用論文	122

【掲載論文目録】

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

Ikarashi N., Mochiduki T., Takasaki A., Ushiki T., Baba K., Ishii M., Kudo T., Ito K., Toda T., Ochiai W., Sugiyama K., A mechanism by which the osmotic laxative magnesium sulphate increases the intestinal aquaporin 3 expression in HT-29 cells, *Life Sci.*, **88**, 194-200 (2010).

Ikarashi N., Ushiki T., Mochiduki T., Toda T., Kudo T., Baba K., Ishii M., Ito K., Ochiai W., Sugiyama K., Effects of magnesium sulphate administration on aquaporin 3 in rat gastrointestinal tract, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 238-242 (2011).

Ikarashi N., Baba K., Ushiki T., Kon R., Mimura A., Toda T., Ishii M., Ochiai W., Sugiyama K., The laxative effect of bisacodyl is attributable to decreased aquaporin-3 expression in the colon induced by increased PGE₂ secretion from macrophages, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver*, **301**, G887-G895 (2011).

Ikarashi N., Mimura A., Kon R., Iizasa T., Omodaka M., Nagoya C., Ishii M., Toda T., Ochiai W., Sugiyama K., The concomitant use of an osmotic laxative, magnesium sulphate, and a stimulant laxative, bisacodyl, does not enhance the laxative effect, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **45**, 73-78 (2012).

Ikarashi N., Kon R., Iizasa T., Suzuki N., Hiruma R., Suenaga K., Toda T., Ishii M., Hoshino M., Ochiai W., Sugiyama K., Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 957-962 (2012).

【略号一覧】

本論文では、以下の略号を用いた。

AC : adenylyate cyclase

AQPs : aquaporins

AUC : area under the curve

BSA : bovine serum albumin

cAMP : adenosine 3',5'-cyclic monophosphate

COX : cyclooxygenase

CRE : cAMP-response element

CREB : CRE-binding protein

DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole

DNA : deoxyribonucleic acid

ECL : enhanced chemiluminescence system

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HE : hematoxylin-eosin

Ig : immunoglobulin

IL : interleukin

IV : intracellular vesicle

NCCT : sodium-chloride co-transporter

NSAIDs : non-steroidal antiinflammatory drugs

PCR : polymerase chain reaction

PFA : paraformaldehyde

PGE₂ : prostaglandin E₂

PKA : protein kinase A

PM : plasma membrane

PMSF : phenylmethanesulfonyl fluoride

PVDF : polyvinyliden difluoride

QOL : quolity of life

RNA : ribonucleic acid

RT : reverse transcription

S.D. : standard deviation

SDS : sodium dodecyl sulfate

SMIT : sodium myo-inositol transporter

TauT : taurine transporter

TE buffer : Tris/EDTA buffer

TBS : Tris-buffered saline

TNF : tumour necrosis factor

Tris : 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

TRPM : transient receptor potential melastatin

Tween 20 : polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate

VIP : vasoactive intestinal polypeptide

【序論】

便秘症は、便の腸管内の異常な停滞あるいは腸管内通過時間の異常な延長により、便通回数と排便量が減少した状態と定義されている。便秘症は、臨床経過から急性と慢性に分けられ、さらに、慢性便秘は器質性便秘、機能性便秘、全身疾患に伴う便秘および薬剤性便秘に分類される (Table 1)。これらの中で、器質性便秘や全身疾患に伴う便秘に対しては、原因疾患の治療が優先される。また、薬剤性便秘では、まず原因薬物の中止または変更を行う。一方、機能性便秘に対しては、食事や運動などの生活習慣の改善に加えて、薬物療法を行い、便秘の改善を図る。

Table 1 Type of the chronic constipation

Type of chronic constipation	Causes
Organic constipation	Intestinal adhesions
	Tumor
Functional constipation	Psychological stress (Irritable bowel syndrome)
	Lack of exercise
	Aging
Constipation associated with systemic disease	Diabetes mellitus
	Parkinson's disease
	Pregnancy
Drug-induced constipation	Opioid drugs
	Anticholinergic agents

機能性便秘は、弛緩性便秘、痙攣性便秘および直腸性便秘に分類される (Table 2)。弛緩性便秘は、高齢者や女性に多くみられる便秘であり、腹筋力の衰えなどにより、腸管蠕動運動が低下し、大腸全体が弛緩する。これに伴い、内容物が大腸に貯留し、水分が過剰に吸収されるために硬い便が形成され、便秘を生じる。痙攣性便秘は過敏性腸症候群でみられる便秘であり、大腸の運動および緊張の亢進により、過度の痙攣性収縮をきたし、大腸内容物の通過が妨げられるために生じる便秘である。直腸性便秘は、直腸での排便反射が減弱し、便意が弱まることで生じる便秘である。

Table 2 Type of the functional constipation and its therapeutic medications

Type	Therapeutic medications
Atonic constipation	Osmotic laxatives (MgO, MgSO ₄ , Lactulos)
	Stimulant laxatives (bisacodyl, sennoside)
	Cholinergic agonists (bethanechol)
Spastic constipation	Osmotic laxatives (MgO, MgSO ₄ , Lactulos)
	Anticholinergic agents (mepenzolate)
Rectal constipation	Osmotic laxatives (MgO, MgSO ₄ , Lactulos)
	Stimulant laxatives (bisacodyl, sennoside)

機能性便秘に対する薬物療法は、便秘の種類や程度により異なる (Table 2)¹⁾。一般的には、第一選択薬として、作用の緩徐な薬物 (浸透圧性下剤) を用い、少量から漸増していく。効果が不十分な場合は、作用機序の異なる薬物を併用する。また、瀉下剤は習慣性を生じやすいため、瀉下剤を長期間使用せざるを得ない場合には、瀉下剤の種類の変更あるいは作用機序の異なる薬物の併用を行う。特に、大腸刺激性下剤

を長期間、大量に用いた場合には、腸管の痙攣性の収縮が生じるため、逆に内容物が肛門側に輸送されずにとどまり、結果として便秘が増悪することがあり、注意を要する。

便秘症の第一選択に用いられる浸透圧性下剤は、腸管内浸透圧を高めることにより、下痢が生じるものと考えられている²⁾。すなわち、浸透圧性下剤は消化管ではほとんど吸収されず、腸管内の浸透圧を上昇させるため、水を血管側から管腔側へと移動させ、下痢が発生すると考えられている。一方、浸透圧性下剤で効果が認められない場合に追加投与される大腸刺激性下剤は、大腸の prostaglandin E₂ (PGE₂) の産生を促進し、粘膜上皮細胞の血管側に発現している Na⁺,K⁺-ATPase の活性を阻害する。そのため、細胞内 Na⁺濃度が高まり、大腸管腔内からの Na⁺の吸収が阻害される。それに伴い、sodium-chloride co-transporter (NCCT) による Na⁺および Cl⁻の吸収も阻害され、腸管内浸透圧が高まる。その結果、腸管側から血管側への水の吸収が減弱するため、下痢が発生すると考えられている (Figure 1)^{3,4)}。また、大腸刺激性下剤は大腸粘膜上皮細胞からの一酸化窒素の産生を亢進し、腸管平滑筋を弛緩するとともに、PGE₂ の産生を亢進し、腸管平滑筋を収縮する。その結果、腸管の蠕動運動が促進するため、腸内容物が肛門側へと移動し、瀉下作用を示すと考えられている^{3,5)}。しかしながら、これら瀉下剤が大腸において、どのようなメカニズムで水を移動させるかについての詳細は、全くわかっていなかった。しかも、複数の瀉下剤が併用されているにもかかわらず、併用効果に関するエビデンスはほとんどなかった。

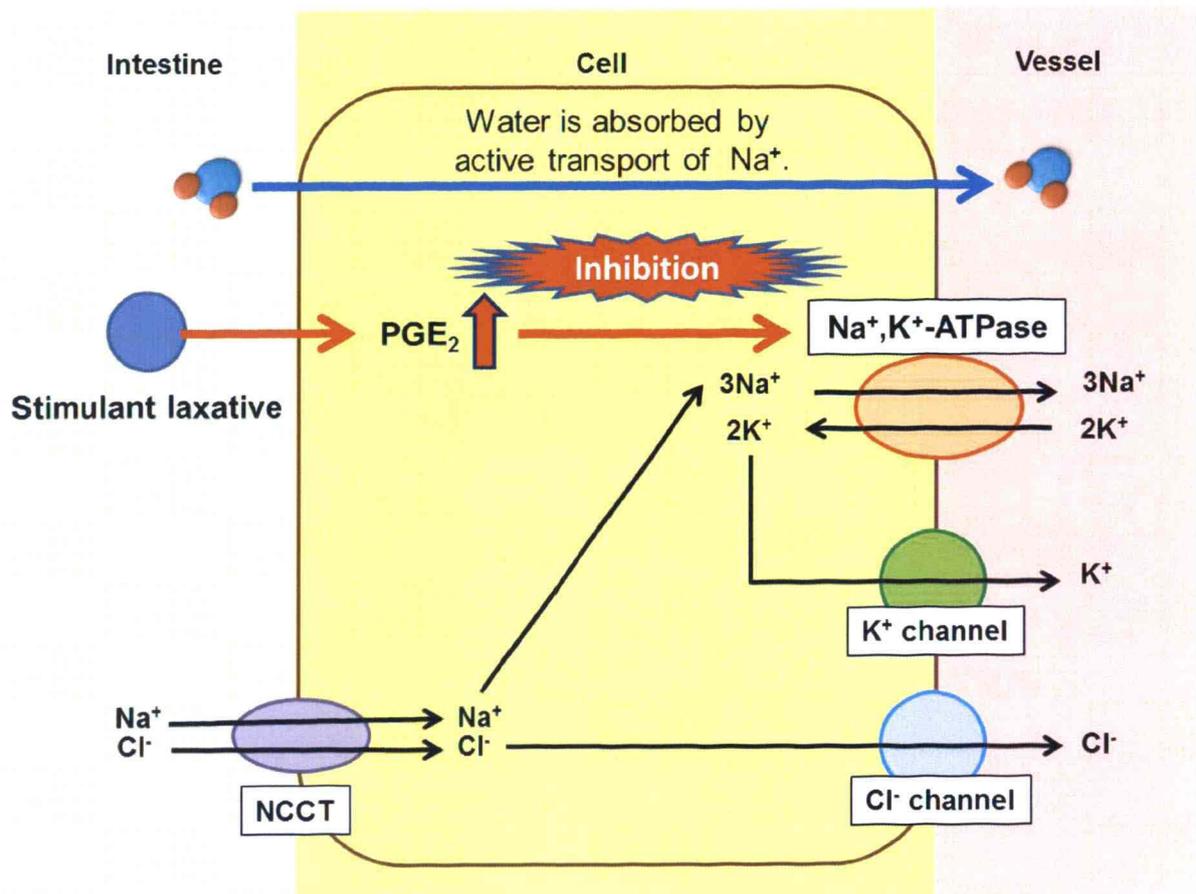


Figure 1 Mechanisms of the laxative effect of stimulant laxatives

一方、大腸での水の輸送については、水チャネルであるアクアポリン (AQP) が重要な役割を担っていると考えられている⁶⁾。従来、細胞膜における水の輸送は、拡散によって行われると考えられていた。ところが、細胞膜は脂質二重構造であるにも関わらず、赤血球のような高い水透過性を有する細胞膜が存在することから、多くの研究者によって水を選択的に透過させる膜タンパク質である水チャネルの存在が考えられていた。1992年、P. Agreらによって、初めて赤血球膜から水チャネルが発見され⁷⁾、その直後に、佐々木らによって発見された別の水チャネル⁸⁾と共に、これらのタンパク質はそれぞれ AQP1 および AQP2 と命名された。その後、研究は進み、AQPs の存在は植物から動物にわたる広い範囲で見出されている⁹⁾。

AQPs は 6 回膜貫通型の膜タンパク質であり、4 量体として機能し、水やグリセロ

ールを選択的に透過させる (Figure 2A)。AQPs はアスパラギン (Asn, N)、プロリン (Pro, P) およびアラニン (Ala, A) からなる NPA ボックスを 2 つ有している。AQPs の水に対する高い選択性は、この NPA ボックスによりもたらされている (Figure 2B) ^{10, 11}。

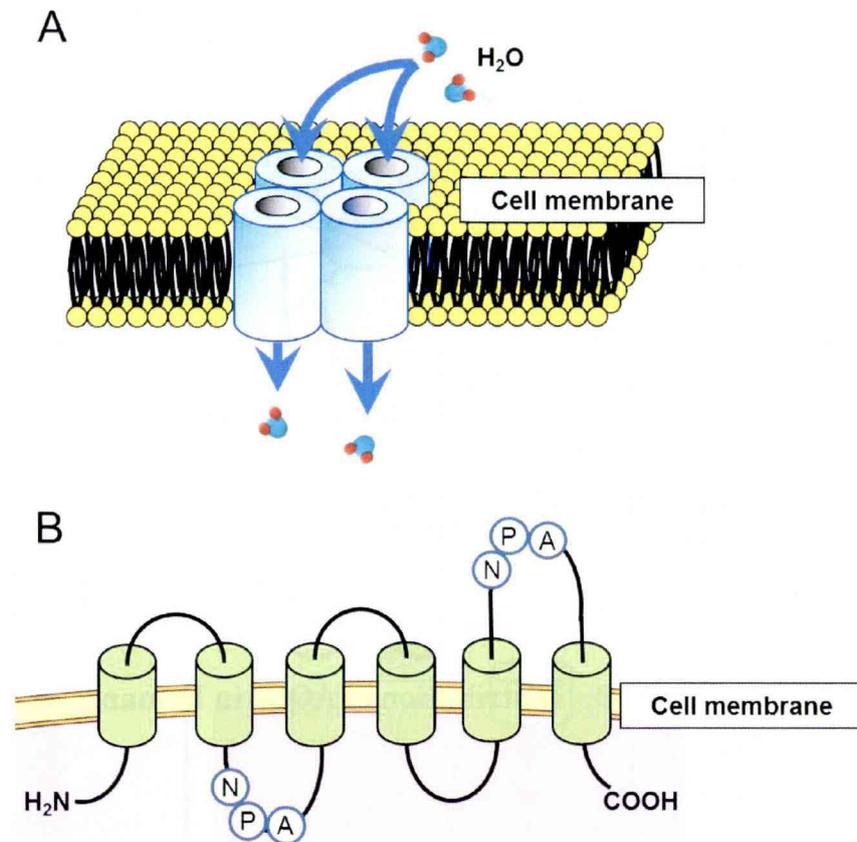


Figure 2 Structure of the AQPs

AQPs は、ヒトにおいては現在、AQP0 から AQP12 までの 13 種類が様々な臓器に発現・分布していることが明らかになっている (Figure 3) ¹²。さらに、最近、AQPs の発現量の異常が種々の疾患の原因となっていることも明らかとなってきた。たとえば、腎臓の AQP2 の発現量の低下や変異が腎性尿崩症の原因となること ^{13, 14}、皮膚の AQP3 の発現量の低下が乾燥肌の原因となること ^{15, 16}、および脳の AQP4 の発現

量の増加が脳浮腫の原因となること¹⁷⁾などが報告されている (Table 3)。したがって、AQP_sの発現や機能を制御することにより、種々の疾患の治療に役立つと考えられる。

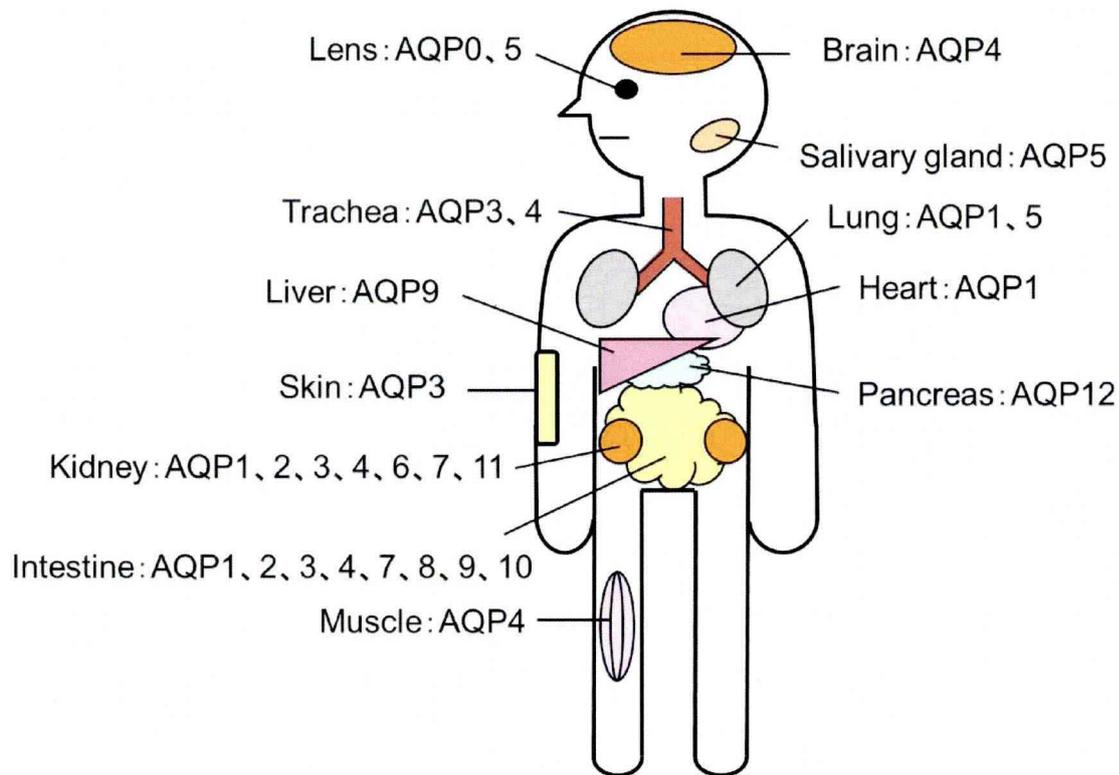


Figure 3 Distribution of AQP_s in human

Table 3 Disease caused by the variation of AQP_s expression

Tissue	Change in expression of AQP _s	Disease
Lens	Decrease in AQP0 expression	Cataract
Kidney	Decrease in AQP2 expression	Nephrogenic diabetes insipidus
Skin	Decrease in AQP3 expression	Dry skin
Brain	Increase in AQP4 expression	Cerebral edema
Salivary gland	Decrease in AQP5 expression	Sjogren's syndrome

腸管には多数の AQPファミリーの発現が認められており、少なくとも AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP7、AQP8、AQP9、AQP10 の8種類の存在が知られている (Figure 3) ¹⁸⁻²¹。大腸においては主に、AQP1、AQP2、AQP3、AQP4 および AQP8 が発現している ^{18, 21, 22}。生理的条件下においては、大腸の管腔内の浸透圧は血管側のそれに比べて低いため、水は腸管側から血管側に輸送され、便の濃縮が行われる ²³。この際、大腸の上皮細胞は tight junction が強固なため、大腸での水の輸送は、大腸粘膜上皮細胞に発現している AQPs を介して行われると考えられている (Figure 4) ^{18, 21, 22}。しかしながら、大腸における AQPs を介した水の輸送については、ほとんど解明されていない。

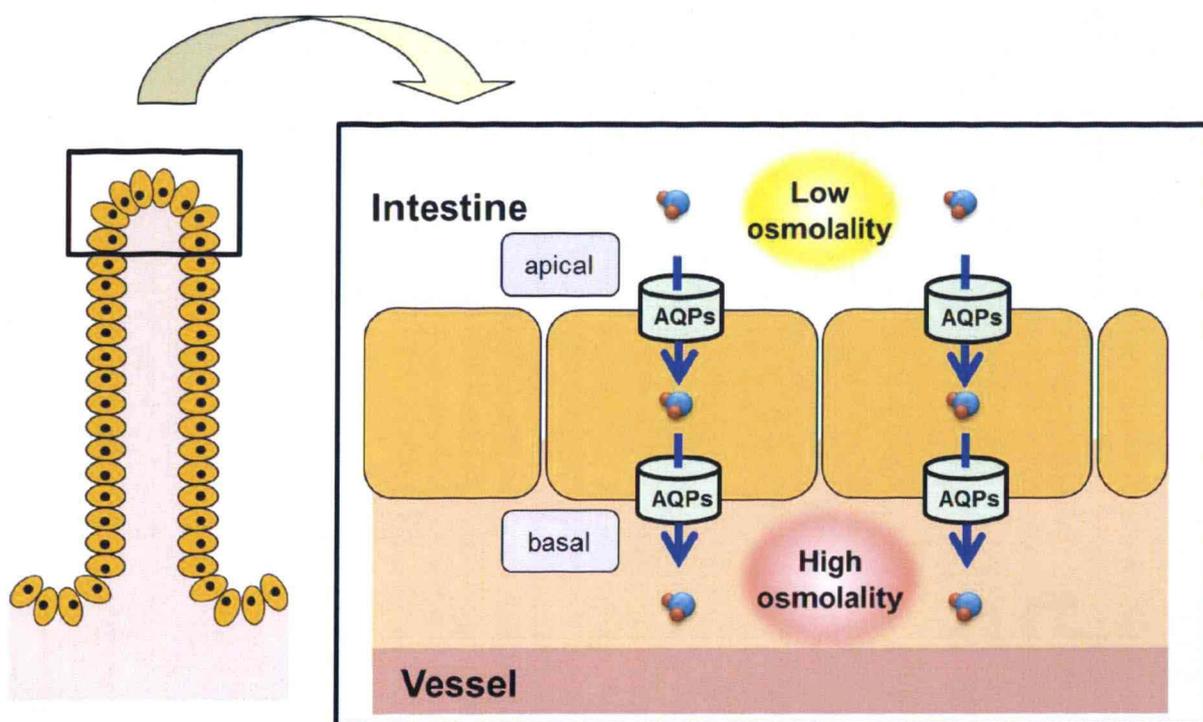


Figure 4 Water transport via AQPs in the colon

そこで本研究では、AQP_sに着目し、浸透圧性下剤および大腸刺激性下剤の瀉下作用におけるAQP_sの役割を明確にするとともに、両薬剤の併用効果を解明することにより、瀉下剤を適正に使用するためのエビデンスを提供することを試みた。本研究では、浸透圧性下剤としてMgSO₄を、大腸刺激性下剤としてピサコジルを用い、以下の検討を行った。

1. ラットにMgSO₄を経口投与した際の糞中水分量と大腸AQP3の発現変化の関係を解析するとともに、AQP3の発現変動メカニズムを検討した（第一章）。
2. ラットにピサコジルを経口投与した際の糞中水分量と大腸AQP3の発現変化の関係を解析するとともに、AQP3の発現変動メカニズムを検討した（第二章）。
3. AQP3活性化阻害剤であるHgCl₂およびCuSO₄を用いて、大腸での水の輸送におけるAQP3の役割について検討した（第三章）。
4. MgSO₄とピサコジルとを併用した場合に、瀉下作用がどのように変化するかについて調べるとともに、そのメカニズムについて検討した（第四章）。

【第一章】

MgSO₄ の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割および

AQP3 発現変動メカニズムの解明

1. 緒言

AQPs はヒトにおいて、様々な組織に発現しており、腸管には少なくとも AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP7、AQP8、AQP9、AQP10 の 8 種類の存在が知られている¹⁸⁻²¹⁾。大腸においては主に、AQP1、AQP2、AQP3、AQP4 および AQP8 が発現している^{18, 21, 22)}。これまで、消化管ホルモンである vasoactive intestinal polypeptide (VIP) が下痢を伴う Verner-Morrison syndrome の原因物質であること²⁴⁾、健常人に VIP を静脈内投与することにより下痢が発症すること²⁵⁾、大腸炎を発症したラットにおいて血清中 VIP 濃度が上昇すること²⁶⁾、および VIP がヒト結腸癌由来細胞である HT-29 細胞の AQP3 の mRNA 発現量およびタンパク質発現量を増加すること²⁷⁾が報告されている。これらのことから、AQP3 は大腸の水の輸送において特に重要であると考えられている。しかしながら、下痢の発生と AQP3 の発現量の関連性が示唆されているにもかかわらず、瀉下剤の作用メカニズムを考える上で、AQP3 の発現量の変動に関しては何ら注目されていなかった。

そこで本章では、機能性便秘の治療に繁用される浸透圧性下剤のうち、MgSO₄ を対象とし、MgSO₄ の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割を検討した。まず、ラットに MgSO₄ を経口投与し、糞中水分量の変動と大腸の浸透圧の変動との関係、あるいは糞中水分量の変動と大腸 AQP3 の発現量の変動との関係を調べた。次に、MgSO₄ による大腸 AQP3 の発現変動メカニズムについて検討した。

2. 方法

2-1. 試薬

MgSO₄·7H₂O、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)、sodium dodecyl sulfate (SDS) および polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween20) は、和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した。Bovine serum albumin (BSA)、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、leupeptin trifluoroacetate salt、phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)、forskolin および 8-bromo cAMP (8-Br cAMP) は、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) から購入した。RNeasy Mini Kit は、Qiagen GmbH (Hilden, Germany) から購入した。High Capacity cDNA synthesis Kit は、Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。iQ SYBR green supermix は、Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) から購入した。Fetal bovine serum (FBS)、Alexa Fluoro 488 anti-rabbit IgG および各種プライマーは、インビトロジェン (東京, 日本) から購入した。RPMI 1640 medium は、MP Biomedicals, Inc. (Aurora, OH, USA) から購入した。Phosphosafe extraction reagent は、Novagen (Madison, WI, USA) から購入した。Rabbit anti-rat AQP1 antibody、rabbit anti-rat AQP2 antibody、rabbit anti-rat AQP3 antibody、rabbit anti-rat AQP4 antibody および rabbit anti-rat AQP8 antibody は、Alomone Labs (Jerusalem, Israel) から購入した。Donkey anti-rabbit IgG-HRP antibody、goat anti-human AQP3 antibody および donkey anti-goat IgG-HRP antibody は、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。Rabbit anti-rat phospho-CREB antibody および rabbit anti-human CREB antibody は、Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY, USA) から購入した。Mouse anti-rabbit GAPDH antibody は、CHEMICON International, Inc. (Billerica, MA, USA) から購入した。Sheep anti-mouse IgG-HRP antibody、enhanced chemiluminescence

system (ECL) plus Western blotting detection reagents および Amersham cAMP Biotrak Enzyme Immunoassay System は、GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) から購入した。4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution は、株式会社同仁化学研究所 (熊本, 日本) から購入した。その他の試薬は、市販されている物の内、最もグレードの高い物を購入した。

2-2. 動物

10 週齢の雄性 Wistar 系ラットは日本エスエルシー株式会社 (静岡, 日本) から購入した。動物は温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ の施設において飼育し、明暗条件は 8 : 00 点灯、20 : 00 消灯の条件下で飼育した。

本動物実験は、実験動物の適正な使用および管理について定められた星薬科大学動物センター管理運営規程に準じて行われた。

2-3. MgSO_4 の投与方法

MgSO_4 投与 18 時間前よりラットを絶食した (飲水は自由)。 MgSO_4 (2 g/kg) 水溶液をラットに経口投与し^{28, 29)}、 MgSO_4 投与直後、2、5 および 8 時間後にエーテル麻酔下で解剖し、大腸を摘出した。Phosphate buffered saline (PBS: 140 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 32 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 ; PH 7.4) を用いて腸管を洗浄した後、液体窒素により瞬時冷凍し -80°C で保存した。

2-4. 糞中水分量の測定

それぞれのラットについて、 MgSO_4 投与 8 時間後まで経時的に糞を採取し、シリ

カゲル入りのデシケータ内で 24 時間乾燥した。糞湿質量および乾燥質量から糞 1 g に含まれる水分量を算出した。

2-5. HT-29 細胞の培養方法

HT-29 細胞は、100 U/mL penicillin G potassium、100 µg/mL streptomycin、0.25 µg/mL amphotericin B および 10%FBS を含んだ RPMI 1640 medium で維持した。細胞は密度 2×10^5 cells/cm² で 6 well-plate、24 well-plate、96 well-plate あるいは 100-mm dish に播種し、36 時間、CO₂ incubator でインキュベートした。36 時間後、細胞に MgSO₄、forskolin、8-Br cAMP、NaCl、MgCl₂、Na₂SO₄ あるいは K₂SO₄ を添加し、12 時間後まで培養した。Control には培地のみを添加した。

培地の浸透圧は Multi-OSMETTE (Precision Systems Inc., Horsham, PA, UK) を用いて測定した。実験には 5–15 代目の細胞を用いた。

2-6. 大腸および HT-29 細胞からの RNA の抽出

凍結した大腸約 15 mg あるいはトリプシン処理により剥離した HT-29 細胞から RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出した。RNA 抽出方法は、RNeasy Mini Kit 付属のプロトコールに従って行った。得られた溶液を Tris/EDTA buffer (TE buffer) を用いて 50 倍希釈し、分光光度計 (U-2800, Hitachi High-Technologies Corporation, 東京, 日本) により 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することで、純度の確認および RNA 濃度 (µg/mL) の算出を行った。

2-7. Real-time RT-PCR

RNA 1 μg から High capacity cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。これを TE buffer にて 20 倍希釈し、cDNA TE buffer 溶液とした。Table 4 に示すプライマーを作成し、real-time PCR を行い、各遺伝子の発現を検出した。すなわち、PCR plates の各 well へ iQ SYBR green supermix 25 μL 、目的遺伝子の Forward primer (5 pmol/ μL) 3 μL 、Reverse primer (5 pmol/ μL) 3 μL 、cDNA TE buffer 溶液 4 μL 、RNase free water 15 μL を加えた。温度条件は denaturation temperature として 95°C で 15 秒、annealing temperature として 56°C で 30 秒、elongation temperature として 72°C で 30 秒とした。増幅過程の蛍光強度を My iQ™ single color real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories) によりモニタリングした。mRNA 発現量は 18S rRNA あるいは GAPDH を用いてノーマライズした。

Table 4 Primer sequences of mRNA

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
rSMIT	AGGAGTCCTTGGGTTGGAAC	ACTGCAACAAGGCCTCCAG
rTauT	GTTCTGGGAGCGCAACGT	ACCGAACACCCTTCCAGATG
rAQP3	CCCCTTGTGATGCCTCTC	CCCTAGCTGGCAGAGTTC
r18S rRNA	GTCTGTGATGCCCTTAGATG	AGCTTATGACCCGCACTTAC
hAQP3	AGACAGCCCCTTCAGGATTT	TCCCTTGCCCTGAATATCTG
hGAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	GGGGTCATTGATGGCAACAATA

SMIT: sodium myo-inositol transporter, TauT: taurine transporter, AQP3: aquaporin-3, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

2-8. 免疫組織化学染色

ラットをエーテルにより麻酔し、心臓内に PBS を灌流した。次いで、4% paraformaldehyde (PFA) 溶液を 50 mL 灌流後、大腸を摘出し、4% PFA 溶液中で固定した(4°C、1時間)。4°Cで一晩、30% sucrose 溶液に浸し、OCT compound (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA) で包埋した。凍結ブロックをクリオスタット (CM1850, ライカマイクロシステムズ株式会社, 東京, 日本) により 10 μm に薄切し、MAS-coated glass slide (松浪硝子工業株式会社, 大阪, 日本) に固定した。固定した切片を PBS で洗浄後、blocking buffer (3% FBS および 0.1% Triton X-100 を含む PBS) で1時間ブロッキングした。次いで、一次抗体 [rabbit anti-rat AQP1 (1/200)、rabbit anti-rat AQP2 (1/200)、rabbit anti-rat AQP3 (1/200)、rabbit anti-rat AQP4 (1/200)、rabbit anti-rat AQP8 (1/200)] で、4°Cで一晩、インキュベートした。PBS で3回洗浄した後、Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG antibody (1/200) と室温で1時間反応させた。PBS で3回洗浄後、DAPI solution (1/500) と室温で30分間反応させた。PBS で洗浄した後、vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で封入し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence Corporation, 東京, 日本) を用いて検出した。

2-9. 大腸の膜画分の調製

ラット大腸からかきとった粘膜あるいはセルスクレーパーにより剥離した HT-29 細胞を dissecting buffer (0.3 M sucrose, 25 mM imidazole, 1 mM EDTA, 8.5 μM leupeptin, 1 μM PMSF; pH 7.2) に懸濁し、氷上で digital homogenizer (Iuchi Co., 大阪, 日本) を用いてホモジナイズ (1,250 rpm、5 stroke) した。ホモジネートを遠心分離 (800 \times g、15分、4°C) し、得られた上清を遠心分離 (200,000 \times g、60分、4°C) した。上清を除去し、沈殿に dissecting buffer を加え、超音波分散機 (UH-50, SMT

Co., Ltd, 東京, 日本) により分散させた。この溶液を、細胞全体の膜を含む crude membrane 画分とした³⁰⁾。AQP3 は plasma membrane および intracellular vesicle に発現している。そこで、両画分を多く含む crude membrane 画分を調製し、AQP3 のタンパク質発現量を測定した。

2-10. Whole cell lysate の調製

100-mm dish で 36 時間培養した HT-29 細胞の培地を、MgSO₄ を種々の濃度で添加した培地に交換し、1 時間培養した。Control には培地のみを添加した。1 時間後、extraction buffer (8.5 μM leupeptin および 1 μM PMSF を含む phosphatase extraction reagent) を細胞に添加し、氷上で 5 分間放置した。セルスクレーパーを用いて細胞を剥離し、回収した後、digital homogenizer を用いてホモジナイズ (1,250 rpm、5 stroke) を行い、遠心分離 (16,000×g、30 分、4℃) した。上清を whole cell lysate とし、cAMP-response element-binding protein (CREB) のリン酸化を評価した^{31, 32)}。

2-11. 電気泳動とウエスタンブロッティング法

タンパク質濃度は、Lowry 法³³⁾を用いて測定した。標準品には BSA を用いた。

電気泳動は、Laemmli 法³⁴⁾に基づいて行った。タンパク質を loading buffer (0.1 M Tris, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol; pH 6.8) で 2 倍希釈し、ポリアクリルアミドゲルにアプライした。電気泳動後、分離されたタンパク質はセミドライブロッティング装置を用いて、PVDF メンブレンに転写した。1%スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った後、rabbit anti-rat AQP3 antibody (1/2,000; colon)、goat anti-human AQP3 antibody (1/1,000; HT-29 cells)、

rabbit anti-rat phospho-CREB antibody (1/500)、rabbit anti-human CREB antibody (1/500) あるいは mouse anti-rabbit GAPDH antibody (1/10,000) と室温で1時間反応させた。メンブレンを TBS-Tween (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20; pH7.6) で洗浄後、donkey anti-goat IgG-HRP antibody、donkey anti-rabbit IgG-HRP antibody あるいは sheep anti-mouse IgG-HRP antibody と室温で1時間反応させた。メンブレンを洗浄後、ECL plus Western blotting detection reagents と反応させ、化学発光検出器 (LAS-3000mini, FUJIFILM, 東京, 日本) で露光し、検出されたバンドを解析した。

2-12. 細胞内 Mg 量の測定

細胞内 Mg 濃度は原子吸光法により測定した³⁵⁾。すなわち、6 well-plate で36時間培養した HT-29 細胞の培地を、MgSO₄ (7.5 mM) を添加した培地に交換し、10分間培養した。Control には培地のみを添加した。その後、10 mM EDTA および 150 mM choline chloride を含む PBS で洗浄した後、150 mM choline chloride を含む PBS で洗浄した。セルスクレーパーを用いて細胞を回収し、5% trichloroacetic acid - 1.75% LaCl₃ 2 mL で溶解し、20分間室温で放置した。遠心分離 (1,000×g、10分) 後の上清を回収し、上清中の Mg 濃度を測定した。

2-13. アデニル酸シクラーゼ活性の測定

アデニル酸シクラーゼ活性の測定は、Aurbach and Chase らと同様の方法³⁶⁾で行った。すなわち、6 well-plate で36時間培養した HT-29 細胞の培地を、MgSO₄ (7.5 mM) あるいは forskolin (50 μM) を添加した培地に交換し、20分間培養した。Control には培地のみを添加した。20分後、セルスクレーパーにより細胞を回収し、超音波

処理を行った後、遠心分離した (2,200×g、10 分、4°C)。上清を除去し、沈殿に Tris buffer (pH 7.5) を 2 mL 加え、懸濁し、digital homogenizer によりホモジナイズした。このホモジネートをアデニル酸シクラーゼ活性測定に用いた。

アデニル酸シクラーゼ活性は ATP から cAMP への変換率から評価した。ホモジネート 0.1 mL に反応液 (0.015% BSA, 1.23 mM ATP, 50 mM Tris) を添加し、37°C で 15 分間インキュベートした。ホスホジエステラーゼ活性を阻害するために 40 mM theophylline を添加し、最終容積を 1.1 mL とした。3 分間煮沸し、反応を止めた後、遠心分離した (2,200×g、10 分、4°C)。上清中の cAMP 濃度を Amersham cAMP Biotrak Enzyme Immunoassay System を用いて測定した。

2-14. プロテインキナーゼ A 活性の測定

6 well-plate で 36 時間培養した HT-29 細胞の培地を、MgSO₄ (7.5 mM) あるいは 8-Br cAMP (1 mM) を添加した培地に交換し、20 分間培養した。Control には培地のみを添加した。20 分後、PBS で洗浄し、lysis buffer (20 mM 3-morpholinopropanesulfonic acid, 50 mM β-glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 5 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 10 μg/mL leupeptin, 10 μg/mL aprotinin) を添加し、10 分間氷冷した。セルスクレーパーにより細胞を回収し、超音波処理を行った後、遠心分離した (16,000×g、15 分、4°C)。上清を回収し、PKA kinase activity assay kit を用いて、プロテインキナーゼ A 活性を測定した。

2-15. 統計学的有意差検定

実験値は平均値±標準偏差として表示した。平均値の多重比較には Dunnett 法を用いた。

3. 結果

3-1. 糞中水分量

ラットに MgSO_4 を経口投与した際の糞中水分量を経時的に測定した (Figure 5)。糞中水分量は MgSO_4 投与により経時的に増加した。特に、 MgSO_4 投与 4 時間後から 8 時間後にかけて、糞中水分量は著しく増加し、投与直後に比べて約 5 倍から 10 倍となり、この間に激しい下痢が見られた。

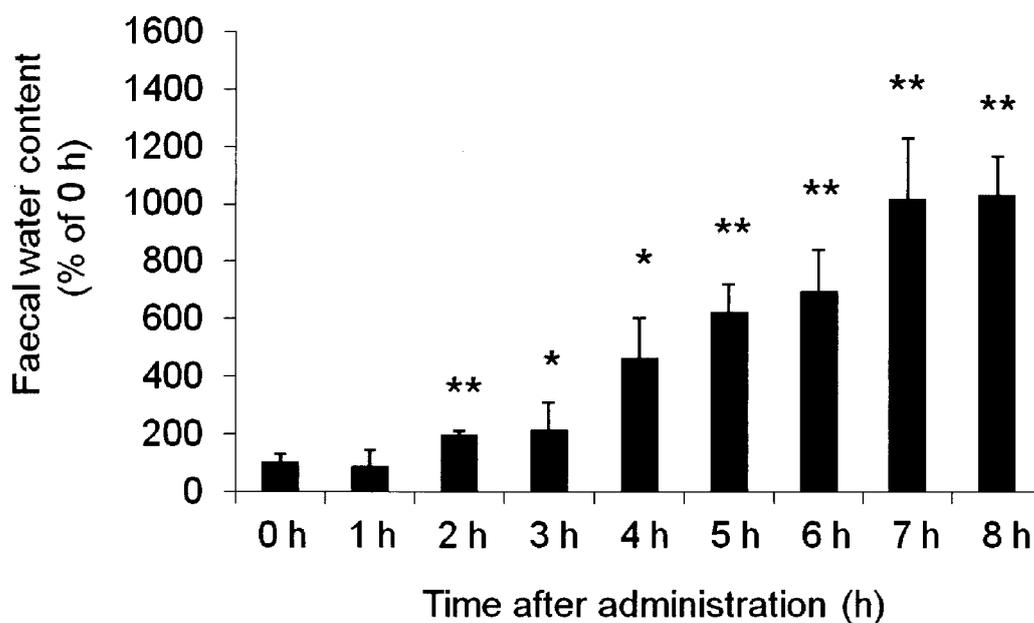


Figure 5 Effect of MgSO₄ on faecal water content

Rat faecal samples were collected at various times for up to 8 h beginning immediately after the administration of MgSO₄, and the faecal water content was measured. The mean faecal water content immediately after the administration of MgSO₄ (0 h) was indicated as 100%. Data represent means ± SDs for 6 rats. Dunnett's test: *p<0.05 and **p<0.01 vs. 0 h.

3-2. 大腸における浸透圧調節関連遺伝子の mRNA 発現量

浸透圧調節関連遺伝子である sodium myo-inositol transporter (SMIT) および taurine transporter (TauT) は、腎臓や脳を中心に多くの組織で発現している。これらの浸透圧調節関連遺伝子は細胞外の浸透圧の増加に伴い、急速に転写が促進され、mRNA 発現量が敏速に増加することが知られている³⁷⁻³⁹⁾。そこで、MgSO₄ 投与後のラット大腸の浸透圧の変化を調べる目的で、大腸の SMIT および TauT の mRNA 発現量を測定した (Figure 6)。

大腸における SMIT の mRNA 発現量は、MgSO₄ 投与 2 時間後において約 2.2 倍有意に増加し、その後、経時的に減少した。しかしながら、MgSO₄ 投与 8 時間後の時点においても、SMIT の mRNA 発現量は投与直後 (0 h) に比べて、依然有意に高い値を維持していた (Figure 6A)。また、TauT の mRNA 発現量についても、SMIT の mRNA 発現量と同様の挙動が見られた (Figure 6B)。

これらのことより、大腸内の浸透圧は、MgSO₄ 投与 2 時間後の時点ではすでに高い状態にあり、投与 8 時間後においても投与前に比べて、依然高い状態を維持していることがわかった。

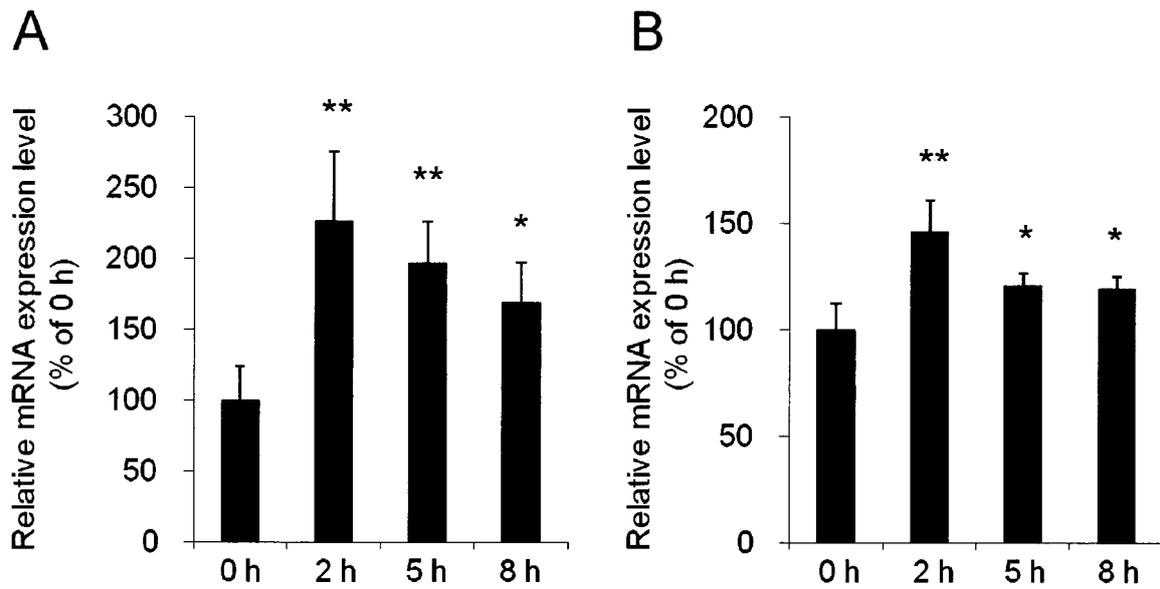


Figure 6 Effect of MgSO₄ on SMIT (A) and TauT (B) mRNA expression levels in the rat colon

Immediately after the administration of MgSO₄ (0 h) and at 2, 5, and 8 h after administration, rat colons were harvested, and mRNA expression levels of SMIT and TauT were analyzed by real-time RT-PCR. Normalization was performed against 18S rRNA, and mean levels of mRNA expression immediately after the administration (0 h) were indicated as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 rats. Dunnett's test: *p<0.05 and **p<0.01 vs. 0 h.

3-3. ラット大腸における AQP_s の発現分布

ラットの大腸には AQP1、AQP2、AQP3、AQP4 および AQP8 が発現していることが知られている^{18, 21, 22)}。免疫組織化学染色により、ラット大腸における AQP_s の発現分布を調べた (Figure 7)。

大腸において AQP3 は粘膜表層部の上皮細胞に最も優位に発現していた。AQP1 はリンパ管や血管周囲に、AQP4 は筋層に発現していた。AQP2 および AQP8 は、大腸において発現が弱かった (Figure 7A)。

一方、これまで、AQP3 は大腸粘膜上皮細胞の basal 側に多く発現していると考えられていた⁴⁰⁾ が、AQP3 は大腸粘膜上皮細胞の apical 側および basal 側の両側に強く発現していることがわかった (Figure 7B)。

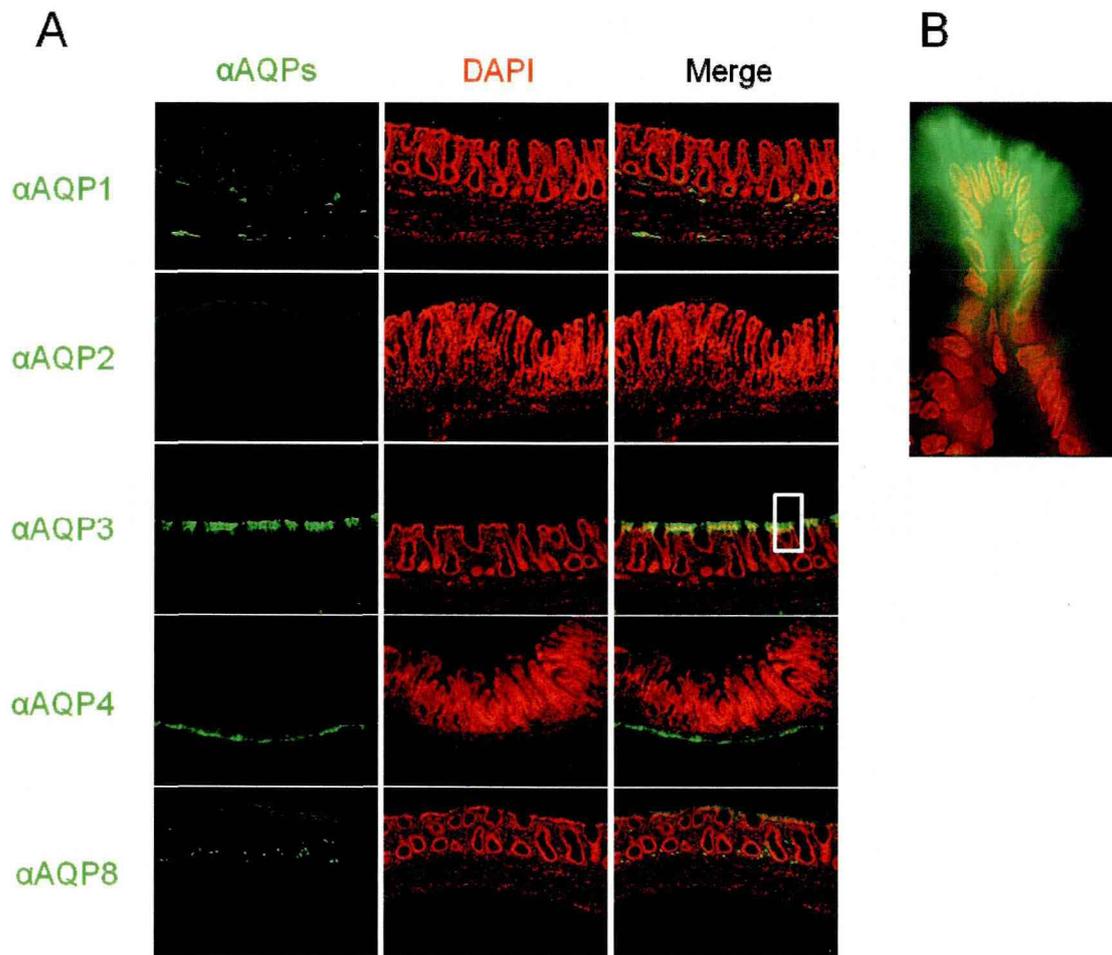


Figure 7 The distribution of AQP3 expression in the colon of rats

A: The colons were removed from the rats. AQPs (green) and nuclei (red) were immunostained.

B: Enlarged view of AQP3 in the mucosal epithelial cells of rats.

3-4. 大腸の AQP3 の mRNA 発現量およびタンパク質発現量

AQP3 は大腸の粘膜上皮細胞に優位に発現しており、大腸の水の輸送において特に重要な役割を担っていると考えられている^{27, 41, 42)}。そこで、MgSO₄ 投与後のラット大腸の AQP3 の mRNA 発現量およびタンパク質発現量を測定した (Figure 8)。

AQP3 の mRNA の発現量は、MgSO₄ 投与 2 時間後において、投与直後 (0 h) に比べて約 4 倍有意に増加し、その後、経時的に減少した。しかしながら、投与 8 時間後においても、投与直後に比べると有意な増加が認められた (Figure 8A)。

AQP3 のタンパク質は 27 kDa および 30~40 kDa 付近に検出された (Figure 8B)。これらはそれぞれ糖鎖の結合していない AQP3 と糖鎖の結合している AQP3 であると考えられている^{43, 44)}。糖鎖の結合の違いにより、安定性や細胞内小器官から細胞膜への輸送に差異は見られるものの、水の透過性には差異は見られないことが知られている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。そこで本研究では、これらのバンドの総和を AQP3 のタンパク質の発現量として解析した (Figure 8B)。大腸粘膜上皮細胞から調製した crude membrane 画分における AQP3 のタンパク質発現量は、MgSO₄ 投与により経時的に増加し、投与 8 時間後では投与直後に比べて、約 8 倍有意に高かった (Figure 8B)。

これらのことより、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現は、MgSO₄ 投与 2 時間後から上昇し始め、投与 8 時間後まで経時的に増加することがわかった。

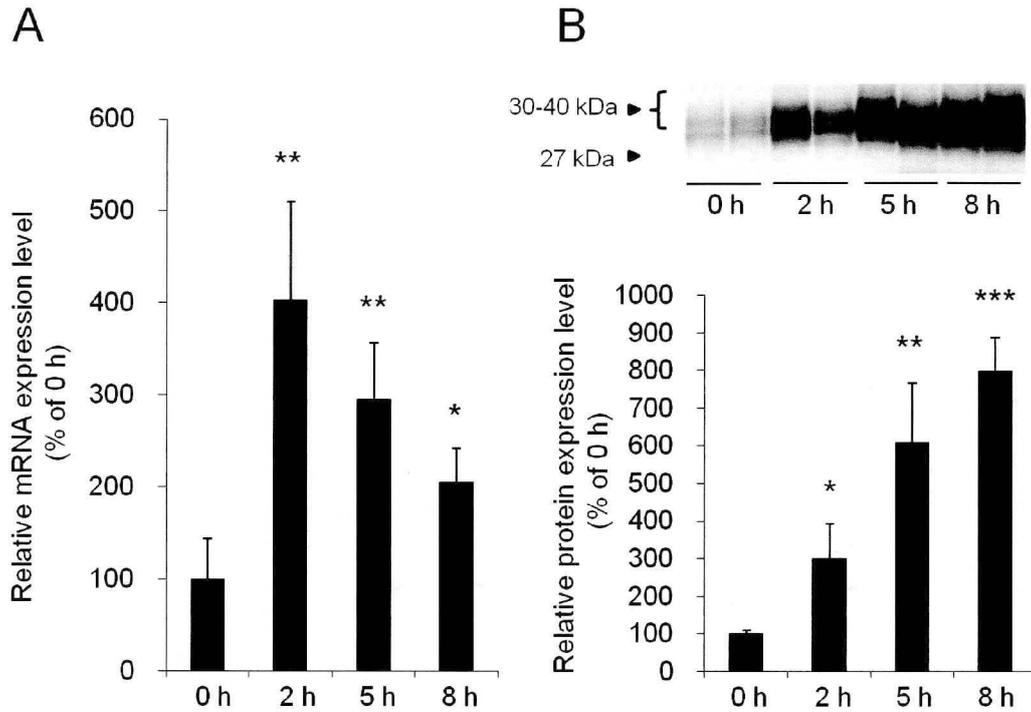


Figure 8 Effect of MgSO₄ on AQP3 mRNA (A) and protein (B) expression level in the rat colon

A: Immediately after the administration of MgSO₄ (0 h) and at 2, 5, and 8 h after administration, rat colons were harvested, and mRNA expression levels of AQP3 were analyzed by real-time RT-PCR. Normalization was performed against 18S rRNA, and mean levels of mRNA expression immediately after administration (0 h) were indicated as 100%.

B: Immediately after the administration of MgSO₄ (0 h) and at 2, 5, and 8 h after administration, rat colons were harvested, crude membrane fractions were prepared, and the protein expression levels of AQP3 were analyzed by Western blotting. Mean levels of AQP3 protein expression immediately after administration (0 h) were indicated as 100%.

Data represent means \pm SDs for 6 rats. Dunnett's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. 0 h.

3-5. HT-29 細胞の AQP3 の発現量に及ぼす MgSO₄ の影響

HT-29 細胞はヒト結腸癌由来の細胞株であり、下痢発生メカニズムや瀉下剤のメカニズムなどの研究に広く用いられている。また、HT-29 細胞には AQP3 が多く発現しており、VIP や natriuretic peptide がプロテインキナーゼ A の活性化を介して、AQP3 の発現量が増加することも報告されている^{27, 41, 48)}。そこで、ラットを用いた *in vivo* 試験で見られた MgSO₄ による AQP3 の発現増加メカニズムを HT-29 細胞を用いる *in vitro* 試験において解明した (Figure 9)。

まず、HT-29 細胞がメカニズム解析に適した実験系であるか否かについて検討した。MgSO₄ (0.75 mM) 添加 6 時間後の AQP3 の mRNA 発現量は、Control と比較してほとんど変化は認められなかった。これに対して、MgSO₄ 7.5 mM および 75 mM 添加では、AQP3 の mRNA 発現量は、Control に比べ有意に増加した (Figure 9A)。

MgSO₄ (7.5 mM) を HT-29 細胞に添加し、12 時間後までの AQP3 の mRNA 発現量を経時的に調べた。その結果、MgSO₄ 添加 1 時間後から AQP3 の mRNA 発現量が有意に増加し、9 時間後にはピーク値を示した。その後、12 時間後には減少したものの、依然 Control の約 2 倍の発現量を維持していた (Figure 9B)。

MgSO₄ (7.5 mM) 添加 6 時間後および 12 時間後の AQP3 タンパク質の発現量をウエスタンブロッティングにより測定した。MgSO₄ (7.5 mM) を添加した HT-29 細胞における AQP3 のタンパク質発現量は、6 時間後および 12 時間後ともに Control と比べ、有意に増加していた。また、この増加率は、MgSO₄ 添加 6 時間後に比べ、12 時間後の方が高かった (Figure 9C)。

以上の結果から、MgSO₄ は HT-29 細胞においても、AQP3 の発現量を増加させることがわかった。さらに、この増加パターンは、*in vivo* 試験の結果と符合するものであった。これらのことから、MgSO₄ によるラット大腸 AQP3 の発現増加メカニズムの解明に、HT-29 細胞が使用可能であることが明らかとなった。

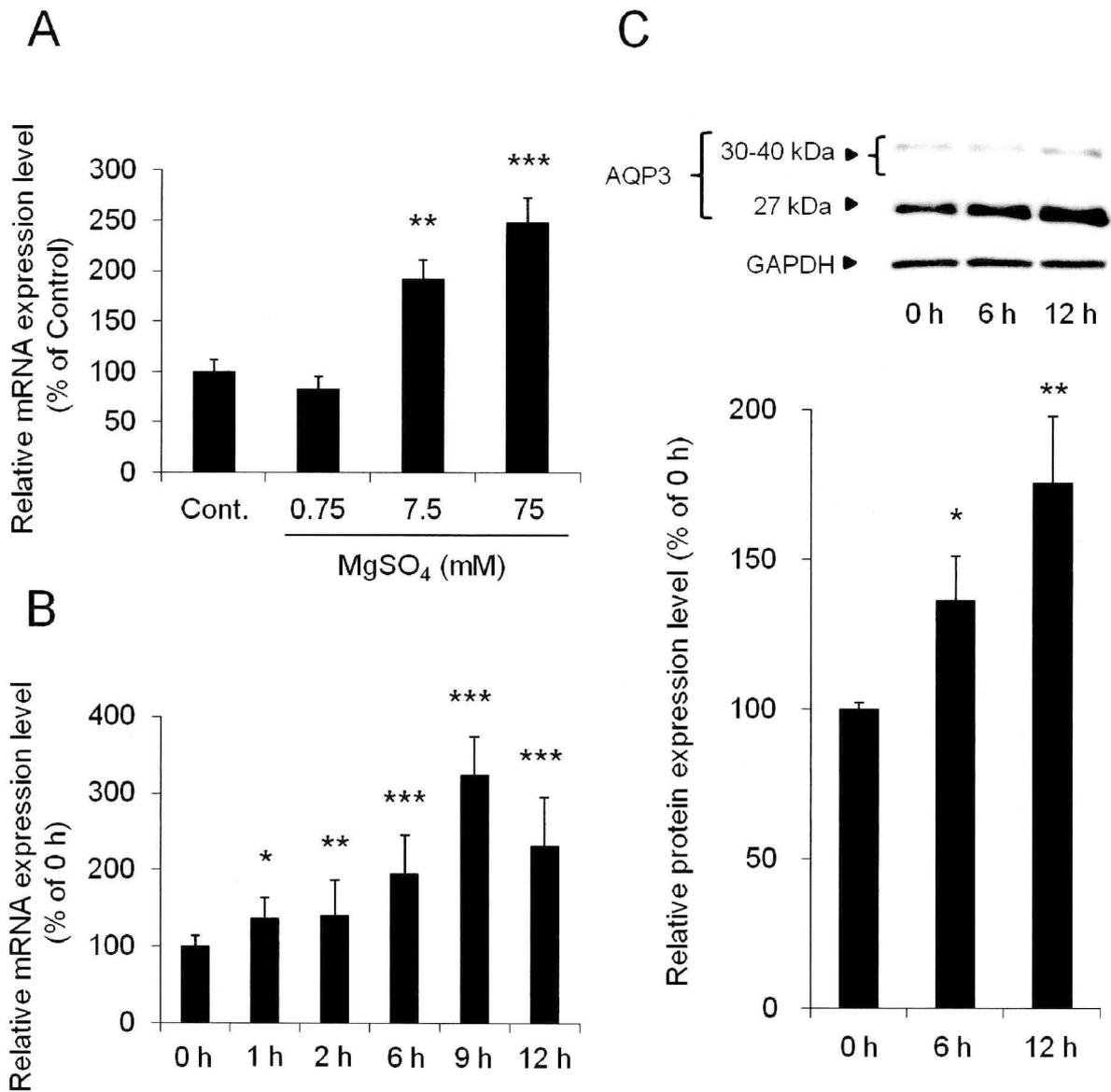


Figure 9 Effect of MgSO₄ on AQP3 expression level in HT-29 cells

A: HT-29 cells were treated with MgSO₄ (0.75, 7.5, and 75 mM) or the original medium (control) and recovered 6 h later. AQP3 mRNA expression level was measured by real-time RT-PCR, corrected for the GAPDH level, and then presented using the mean of the control cells as 100%.

B: HT-29 cells were treated with MgSO₄ (7.5 mM) and recovered 0-12 h later. AQP3 mRNA expression level was measured by real-time RT-PCR, corrected for

the GAPDH level, and then presented using the mean of the 0 h cells as 100%. The AQP3 expression levels of the control did not change up to 12 h after the addition of original medium.

C: HT-29 cells were treated with MgSO_4 (7.5 mM) and recovered 0 h, 6 h and 12 h later. The AQP3 protein expression level was measured by Western blotting, corrected for the GAPDH level, and then presented using the mean of the control cells as 100%.

Data represent means \pm SDs for 6 experiments. Dunnett's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. control or 0 h.

3-6. HT-29 細胞の AQP3 の mRNA 発現量に及ぼす浸透圧の影響

AQP3 の発現量は、浸透圧の上昇により増加することが報告されている^{49, 50)}。そこで、MgSO₄による HT-29 細胞の AQP3 の発現量増加が、浸透圧の上昇に起因したものであるか否かを調べた。具体的には、HT-29 細胞に NaCl を 0.75 mM あるいは 7.5 mM の濃度で添加し、6 時間経過後の AQP3 の mRNA 発現量を MgSO₄ 添加時と比較検討した (Table 5)。

まず、Multi-OSMETTE を用いて、培地の浸透圧の実測値を測定した。その結果、MgSO₄ と NaCl はほぼ等しい浸透圧を示し、7.5 mM 添加時においても、理論値 (NaCl の場合、15 mOsm の上昇) とほぼ等しい上昇を示した (Table 5)。文献上、この程度の浸透圧の上昇のみでは、AQPs の発現増加は認められていない^{51, 52)}が、このことを確かめる目的で、AQP3 の mRNA 発現量を調べた。

0.75 mM の NaCl (282 mOsm) および MgSO₄ (280 mOsm) 添加時の AQP3 の mRNA 発現量は、いずれも Control (279 mOsm) との間に有意な差は認められなかった。同様に、7.5 mM の NaCl 添加時の AQP3 の mRNA 発現量も、Control と比較して有意な差は認められなかった。これに対して、MgSO₄ 7.5 mM 添加時には、浸透圧は 7.5 mM の NaCl と同等であったにもかかわらず、AQP3 の mRNA 発現量は、Control と比べて約 2 倍有意に高い値を示した (Table 5)。

以上の結果から、MgSO₄による AQP3 の発現増加は、浸透圧の上昇に起因したものではないことが明らかとなった。

Table 5 Effect of osmotic pressure on AQP3 mRNA expression level in HT-29 cells

Treatment		AQP3/GAPDH (% of control)	Osmotic pressure (mOsm)
Control		100±12	279±2
MgSO ₄	0.75 mM	88±12	280±1
	7.5 mM	195±18**	287±1
NaCl	0.75 mM	85±10	282±1
	7.5 mM	100±5	295±2

HT-29 cells were treated with 0.75 or 7.5 mM MgSO₄ or NaCl (osmotic pressure: 280 to 295 mOsm) and recovered 6 h later. The control was treated with the original medium and handled in a similar manner. AQP3 mRNA expression level was measured by real-time RT-PCR, corrected for the GAPDH level, and then presented using the mean of the control cells as 100%. The supernatant medium harvested immediately after sample treatment was measured with an osmometer for osmotic pressure. Data represent means ± SDs for 6 experiments. Dunnett's test: **p<0.01 vs. control.

3-7. HT-29 細胞の AQP3 mRNA 発現量に及ぼすマグネシウム塩および硫酸塩の影響

MgSO₄ による AQP3 発現増加作用が、Mg²⁺に起因するものであるか、あるいは SO₄²⁻に起因するものであるかを調べた (Figure 10)。

まず、Mg²⁺が AQP3 の発現増加に起因しているかどうかを調べた。実験には、陰イオンが SO₄²⁻ではなく、Cl⁻からなる MgCl₂を用い、AQP3 の mRNA 発現量を MgSO₄ と比較した。MgSO₄あるいは MgCl₂を 50 mM の濃度で HT-29 細胞に添加し、6 時間経過後の AQP3 の mRNA 発現量を測定した。その結果、陰イオンが SO₄²⁻でも Cl⁻でも、陽イオンが Mg²⁺であれば、AQP3 の mRNA 発現量がほぼ同程度増加することがわかった (Figure 10A)。

次に、SO₄²⁻が AQP3 の発現増加に起因しているかどうかを調べた。実験には、陽イオンが Mg²⁺ではなく、Na⁺あるいは K⁺からなる Na₂SO₄あるいは K₂SO₄を用い、AQP3 の mRNA 発現量を MgSO₄ と比較した。MgSO₄、Na₂SO₄あるいは K₂SO₄を 50 mM の濃度で HT-29 細胞に添加し、6 時間経過後の AQP3 の mRNA 発現量を測定した。その結果、陽イオンが Mg²⁺の時のみ、Control と比較して AQP3 の mRNA 発現量の有意な増加が見られた (Figure 10B)。

以上の結果から、HT-29 細胞における MgSO₄ による AQP3 の発現増加には、陰イオンの SO₄²⁻は関与せず、陽イオンの Mg²⁺のみが重要な役割を担っていることがわかった。

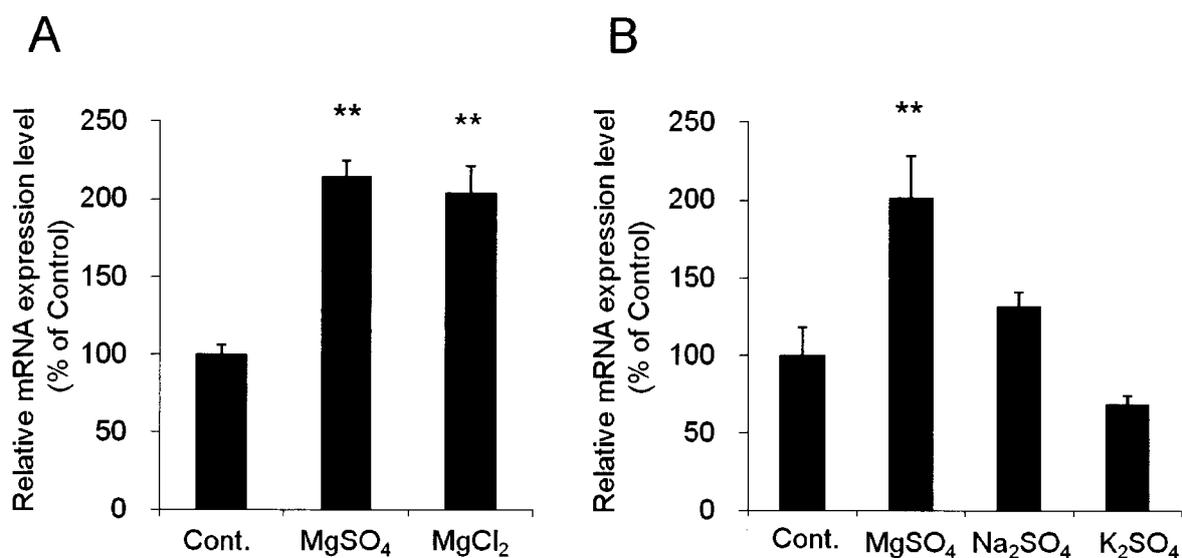


Figure 10 Effect of magnesium salts (A) and sulphates (B) on AQP3 mRNA expression level in HT-29 cells

A: HT-29 cells were treated with 50 mM MgSO₄ or MgCl₂ and recovered 6 h later. The control was treated with the original medium and handled in a similar manner.

B: HT-29 cells were treated with 50 mM MgSO₄, Na₂SO₄, or K₂SO₄ and recovered 6 h later. The control was treated with the original medium and handled in a similar manner.

AQP3 mRNA expression level was measured by real-time RT-PCR, corrected for the GAPDH level, and then presented using the mean of the control cells as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 experiments. Dunnett's test: **p<0.01 vs. control.

3-8. 細胞内 Mg 濃度に及ぼす MgSO₄ の影響

培地の Mg 濃度が上昇すると、細胞内 Mg 濃度が上昇することは知られている³⁵⁾。そこで、HT-29 細胞に MgSO₄ (7.5 mM) を添加した際に、細胞内 Mg 濃度がどの程度上昇するかについて検討した (Figure 11)。

HT-29 細胞に MgSO₄ (7.5 mM) を添加し、10 分後の細胞内 Mg 濃度を測定した。その結果、細胞内 Mg 濃度は MgSO₄ の添加により、Control に比べて約 1.4 倍有意に増加することがわかった (Figure 11)。

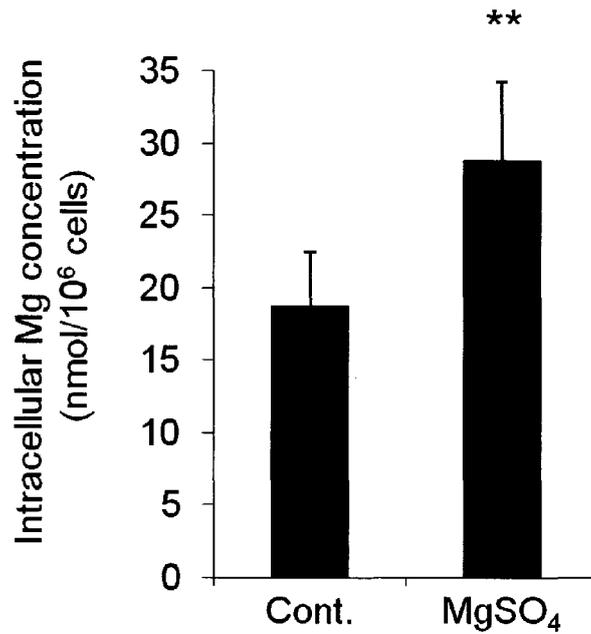


Figure 11 Effect of MgSO₄ on the intracellular Mg concentration in HT-29 cells

HT-29 cells were treated with MgSO₄ (7.5 mM) and recovered 10 min later. The control was treated with the original medium and handled in a similar manner. The intracellular Mg concentration was determined by using atomic absorption spectrometry. Data represent means \pm SDs for 6 experiments. Dunnett's test: **p<0.01 vs. control.

3-9. アデニル酸シクラーゼ活性およびプロテインキナーゼ A 活性に及ぼす MgSO₄ の影響

細胞内に取り込まれた Mg は、アデニル酸シクラーゼを活性化することが報告されている⁵³⁻⁵⁵⁾。さらに、アデニル酸シクラーゼの活性化により産生される cAMP は、プロテインキナーゼ A を活性化することが知られている^{56, 57)}。そこで、MgSO₄ による AQP3 の発現増加に、アデニル酸シクラーゼおよびプロテインキナーゼ A の活性化が関与しているか否かを調べた。検討にあたっては、アデニル酸シクラーゼを活性化する forskolin⁵⁸⁾あるいはプロテインキナーゼ A を活性化する 8-Br cAMP⁴¹⁾を用い、これらの AQP3 発現増加作用と MgSO₄ の作用とを比較検討した (Figure 12)。

まず、HT-29 細胞に forskolin (50 μM) あるいは 8-Br cAMP (1 mM) を添加した際に、AQP3 の発現量が増加するか否かを調べた。その結果、両化合物とも、添加 6 時間後において、Control と比べて、AQP3 の mRNA 発現量が約 2 倍有意に増加することがわかった。また、これらの増加率は、MgSO₄ (7.5 mM) 添加時とほぼ同程度であることが明らかとなった (Figure 12A)。

次に、MgSO₄ を HT-29 細胞に添加し、20 分後におけるアデニル酸シクラーゼ活性を調べた結果、Control と比べて約 1.5 倍有意に上昇することがわかった。この上昇率は、アデニル酸シクラーゼを活性化することが知られている forskolin 添加時とほぼ同程度であった (Figure 12B)。

さらに、プロテインキナーゼ A 活性についても、MgSO₄ を添加することにより、Control と比べて約 1.6 倍有意に上昇することがわかった。また、この上昇率は、プロテインキナーゼ A を活性化することが知られている 8-Br cAMP 添加時とほぼ同程度であることが示された (Figure 12C)。

以上の結果から、MgSO₄ は HT-29 細胞のアデニル酸シクラーゼ活性およびプロテインキナーゼ A 活性を上昇させることがわかった。

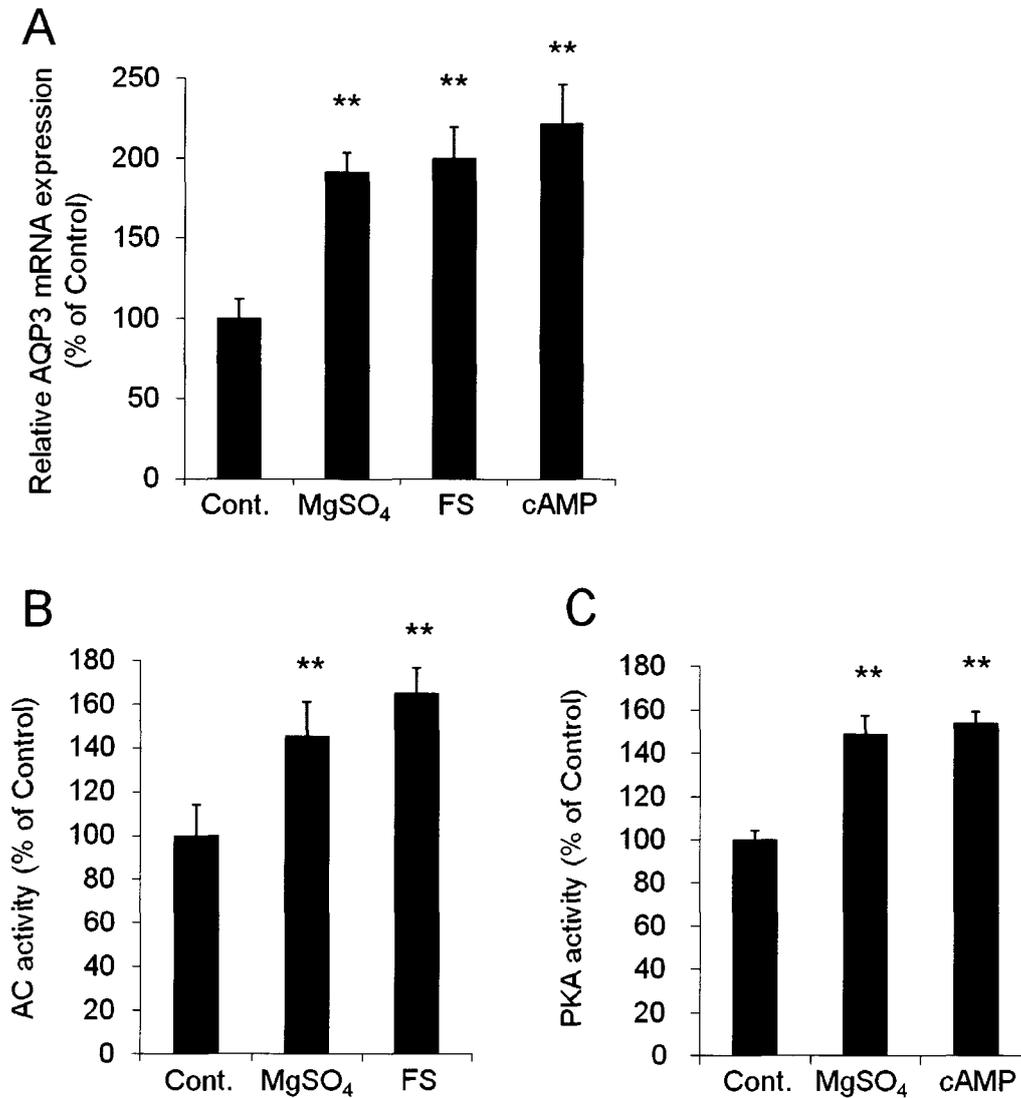


Figure 12 Effect of MgSO₄ on adenylate cyclase activity and protein kinase A activity in HT-29 cells

A: HT-29 cells were treated with MgSO₄ (7.5 mM), forskolin (FS, 50 μM), 8-Br cAMP (cAMP, 1 mM), or the original medium (control) and recovered 6 h later. AQP3 mRNA expression level was measured by real-time RT-PCR, corrected for the GAPDH level, and then presented using the mean of the control cells as 100%.

B: HT-29 cells were treated with MgSO₄ (7.5 mM), forskolin (FS, 50 μM), or the original medium (control) and recovered 20 min later. Adenylate cyclase (AC)

activity was assayed by determining the rate of formation of cAMP from ATP and presented using the mean of the control cells as 100%.

C: HT-29 cells were treated with MgSO₄ (7.5 mM), 8-Br cAMP (cAMP, 1 mM), or the original medium (control) and recovered 20 min later. The control was treated with the original medium and handled in a similar manner. Protein kinase A (PKA) activity was assayed by a commercial kit and presented using the mean of the control cells as 100%.

Data represent means \pm SDs for 6 experiments. Dunnett's test: **p<0.01 vs. control.

3-10. HT-29 細胞の CREB のリン酸化に及ぼす MgSO₄ の影響

プロテインキナーゼ A の活性化により、核内転写因子 cAMP-response element-binding protein (CREB) のリン酸化が亢進し^{59, 60}、AQP_s の発現が増加することが知られている^{61, 62}。そこで、MgSO₄ による AQP3 の発現増加に CREB のリン酸化が関与しているか否かを調べた (Figure 13)。

ウエスタンブロッティングにおいて、リン酸化された CREB (P-CREB) および CREB のタンパク質は、いずれも 43 kDa 付近に検出された。MgSO₄ 添加 1 時間後の P-CREB および CREB のタンパク質発現量の比 (P-CREB/CREB) をとり、CREB のリン酸化の程度を評価した (Figure 13)。P-CREB/CREB は、AQP3 の発現増加が認められなかった 0.75 mM の MgSO₄ 添加では、変化が見られなかった。これに対して、AQP3 の発現増加が認められた 7.5 mM および 75 mM の MgSO₄ では、Control に比べて、CREB のリン酸化の亢進がみられた (Figure 13)。この CREB のリン酸化の亢進は、AQP3 の mRNA の発現増加 (Figure 9A) と符合するものであった。

以上の結果から、MgSO₄ は CREB のリン酸化を亢進することが明らかとなった。

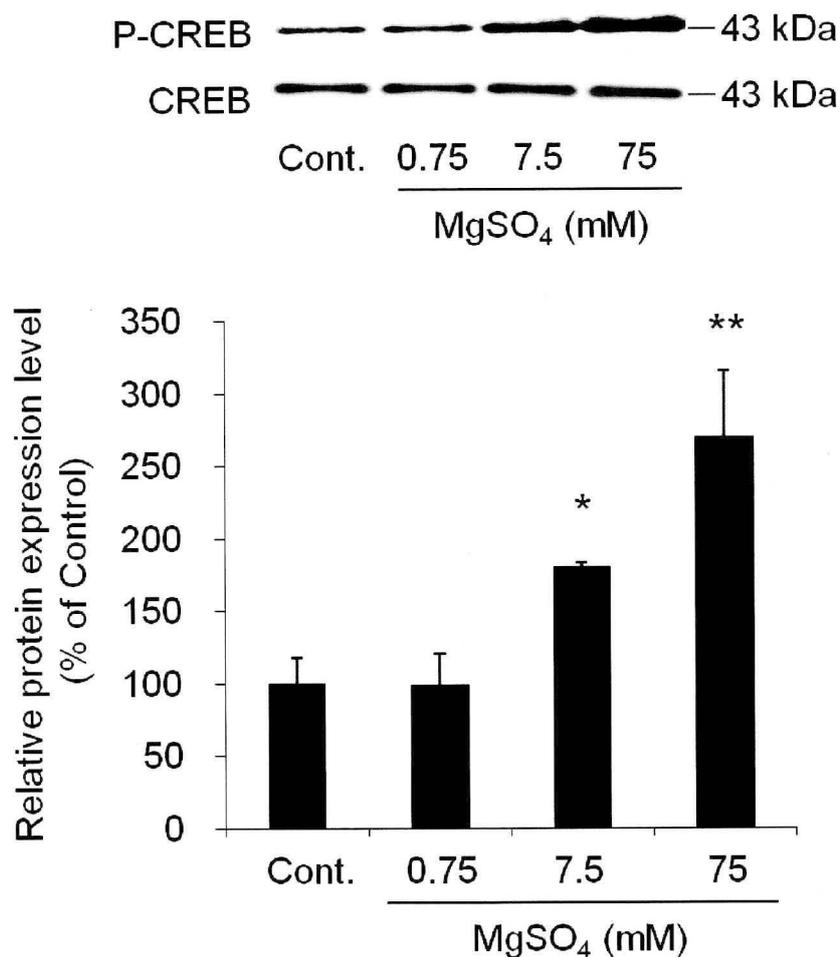


Figure 13 Effect of MgSO₄ on CREB phosphorylation in HT-29 cells

HT-29 cells were treated with MgSO₄ (0.75, 7.5, and 75 mM) and recovered 1 h later. The control was treated with the original medium and handled in a similar manner. P-CREB and CREB protein expression levels were determined by Western blotting. The ratio of P-CREB to CREB protein expression level was calculated and presented using the mean of the control cells as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 experiments. Dunnett's test: *p<0.05 and **: p<0.01 vs. control.

4. 考察

本章では、浸透圧性下剤 MgSO_4 の瀉下作用における大腸 AQP_s の役割について検討した。実験に際して、 MgSO_4 は 2 g/kg の投与量でラットに経口投与したが、この投与量は過去の報告^{28, 29)}を基に設定した。

MgSO_4 は腸管内浸透圧を高めることにより、腸内容物を軟化・増加させ、瀉下作用を発現することが知られている²⁾。そこでまず、 MgSO_4 投与後のラット大腸における浸透圧調節関連遺伝子の mRNA 発現量を測定し、糞中水分量と浸透圧との関係について調べた。浸透圧の変動の指標として、浸透圧調節関連遺伝子 SMIT および TauT の mRNA 発現量を測定した。これらの浸透圧調節関連遺伝子は細胞外の浸透圧の変動に伴い、転写が制御され、敏速に mRNA 発現量に変動することが知られている^{38, 39)}。この変動は、高浸透圧刺激においては、30 分後に mRNA の発現量の増加が見られ、浸透圧の低下に伴い、発現量が減少することが報告されている^{39, 63)}。したがって、これらの mRNA 発現量は、浸透圧の変動の指標として用いることができる^{63, 64)}。SMIT および TauT の mRNA 発現量は、 MgSO_4 投与 2 時間後において最も高い値を示し、その後、経時的に減少した (Figure 6)。これらのことから、大腸内の浸透圧は MgSO_4 投与 2 時間後の時点ではすでに高い状態にあり、下痢に伴い MgSO_4 が排泄されるため、経時的に減少することがわかった。一方、糞中水分量は投与 2 時間後の時点では低く、 MgSO_4 による糞中水分量増加と大腸内浸透圧上昇には相関がみられなかった (Figures 5 and 6)。以上のことから、 MgSO_4 による瀉下作用は、従来から考えられていた腸管内浸透圧の上昇のみでは説明できないことが明らかとなった。

ラットの大腸においては主に、AQP1、AQP2、AQP3、AQP4 および AQP8 が発現していることが知られている^{18, 21, 22)}。大腸における AQP1、AQP2、AQP3、AQP4 および AQP8 のタンパク質を免疫染色した結果、AQP3 は大腸の管腔側に多く発現し、

その発現強度は他の AQP3s に比べて著しく強かった (Figure 7)。また、AQP3 は、大腸粘膜上皮細胞の apical 側および basal 側の両側に発現していることが明らかとなった (Figure 7)。これらのことより、大腸の水の移動には AQP3 が中心的役割を担っている可能性が示唆された。

AQP3 の mRNA 発現量について調べた結果、MgSO₄ 投与 2 時間後に最も高値を示し、その後、徐々に減少することがわかった (Figure 8A)。一方、大腸の AQP3 のタンパク質発現量は MgSO₄ 投与 2 時間後には有意に増加しているものの、その後、経時的かつ著明に増加し、投与 8 時間後では投与直後に比べ、約 8 倍有意に増加することが明らかとなった (Figure 8B)。また、この AQP3 のタンパク質の発現パターンは、糞中水分量の経時変化と符合することがわかった (Figures 5 and 8B)。

これまで、MgSO₄ を含む浸透圧性下剤は、腸管内の浸透圧が上昇することにより下痢が発症するものと考えられていた。しかし、SMIT および TauT mRNA の測定結果から、MgSO₄ 投与 2 時間後の時点ではすでに、腸管内の浸透圧は血管内のそれと比べ、高くなっているものと考えられるが、下痢は発症しなかった。これは、浸透圧勾配から考えると、水の移動は血管側から管腔側方向であったにもかかわらず、AQP3 の発現量が十分でなかったため、水の移動量が少なく、下痢を発症するには至らなかったものと考えられる。それに対して、MgSO₄ 投与 4 時間目以降では、浸透圧は 2 時間後に比べ、いくぶん低下したものの、AQP3 の発現量が著明に増加したため、大量の水が血管内から管腔内に移動し、下痢が発症したものと考えられる。この推論は、AQPs を介した水の移動は、浸透圧の差よりもむしろ、AQPs の発現量に大きく依存するとの報告と一致する^{65, 66)}。以上の結果から、MgSO₄ の瀉下作用が単に浸透圧の変化のみによってもたらされるものではなく、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現増加を伴って、極めて合理的に生じている可能性が示唆された。

次に、HT-29 細胞は、ラットを用いた *in vivo* 試験を反映し得る *in vitro* 実験系であることがわかった (Figure 9) ので、この細胞を用いて、AQP3 発現増加メカニズ

ムを検討した。一般に、AQPs は高浸透圧刺激によって発現が増加することが知られている^{49,50)}。MgSO₄ は水溶液中で Mg²⁺ と SO₄²⁻ に解離し、浸透圧を上昇させる。そこで、まず、MgSO₄ による AQP3 の発現増加が浸透圧の増加によるものであるか否かを調べた。その結果、MgSO₄ 添加による AQP3 の mRNA の発現増加は、浸透圧には起因しないことがわかった (Table 5)。

次に、MgSO₄ による AQP3 発現増加作用が、Mg²⁺ に起因するものであるか、あるいは SO₄²⁻ に起因するものであるかについて、種々のマグネシウム塩および硫酸塩を用いて検討した。Mg²⁺ 濃度の等しい MgSO₄ と MgCl₂ を HT-29 細胞に添加したところ、AQP3 の mRNA 発現量はいずれも Control に比べて有意に増加し、この増加率は両者でほぼ等しかった (Figure 10A)。これに対して、SO₄²⁻ の濃度が等しい MgSO₄、Na₂SO₄ および K₂SO₄ 添加実験においては、MgSO₄ 添加時のみに AQP3 の mRNA の著明な発現増加が見られた (Figure 10B)。これらのことから、HT-29 細胞における MgSO₄ による AQP3 の発現増加には、SO₄²⁻ は関与せず、Mg²⁺ が重要な役割を担っていることが示唆された。なお、MgCl₂ は MgSO₄ と同様に瀉下剤として使用されているのに対して、Na₂SO₄ および K₂SO₄ は瀉下剤として使用されていない。このことより、瀉下剤として用いられている化合物は、AQPs の発現を変動させる可能性を有していることが示唆された。

Mg²⁺ は大腸粘膜上皮細胞の刷子縁膜に存在する Mg 輸送トランスポーター transient receptor potential melastatin (TRPM) 6/TRPM7 複合体により、細胞内に取り込まれる⁶⁷⁾。MgSO₄ 7.5 mM 添加 10 分後にはすでに、細胞内 Mg 濃度が約 1.4 倍有意に増加していた (Figure 11)。また、MgSO₄ 添加 20 分後におけるアデニル酸シクラーゼ活性およびプロテインキナーゼ A 活性は、それぞれ約 1.5 倍および 1.6 倍有意に増加していた (Figures 12B and 12C)。MgSO₄ によるアデニル酸シクラーゼの活性化およびプロテインキナーゼ A の活性化は、それぞれの positive control である forskolin および 8-Br cAMP 添加時とほぼ同等であった (Figures 12B and 12C)。

また、forskolin および 8-Br cAMP 添加時の AQP3 の mRNA 発現量は、MgSO₄ 添加時とほぼ同程度まで増加していた (Figure 12A)。したがって、MgSO₄ による AQP3 の発現増加メカニズムは、forskolin あるいは 8-Br cAMP に類似している可能性が考えられた。

アデニル酸シクラーゼの活性化により、産生される cAMP は、プロテインキナーゼ A を活性化し、転写因子 CREB のリン酸化を亢進する^{59, 60)}。また、AQPs は CREB のリン酸化により転写および発現量が調節されている^{61, 62)}。そこで、CREB のリン酸化に及ぼす MgSO₄ の影響を検討した。その結果、AQP3 の発現量を増加させた 7.5 mM および 75 mM において、CREB のリン酸化が亢進していることがわかった (Figure 13)。

以上の結果から、MgSO₄ は細胞内 Mg 濃度を増加させることにより、アデニル酸シクラーゼおよびプロテインキナーゼ A を活性化し、CREB のリン酸化の亢進を介して、AQP3 の発現量を増加させたものと考えられた (Figure 14)。

MgSO₄ は瀉下剤として、臨床で 1 回 5-15 g を服用する。ヒト大腸の内容積を 2 L と仮定する⁶⁸⁾と大腸内の MgSO₄ 濃度は 20-60 mM となる。本研究において、HT-29 細胞の AQP3 の発現を増加させた MgSO₄ の 7.5 mM という濃度は、MgSO₄ 服用後のヒト腸管内においてあり得る濃度であると考えられる。

本章の結果から、MgSO₄ の瀉下作用が単に浸透圧の変化のみによってもたらされるものではなく、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現増加を伴って、極めて合理的に生じている可能性が示唆された。さらに、MgSO₄ は以下の経路により、ラット大腸における AQP3 の発現を増加したと考えられる。まず、細胞内 Mg 濃度の上昇に伴ってアデニル酸シクラーゼが活性化され、cAMP の生成量が増加する。次に cAMP の上昇に伴ってプロテインキナーゼ A が活性化され、CREB のリン酸化が亢進する。リン酸化された CREB は、DNA の cAMP-response element (CRE) に結合し、AQP3 の mRNA の転写を促進する (Figure 14)。

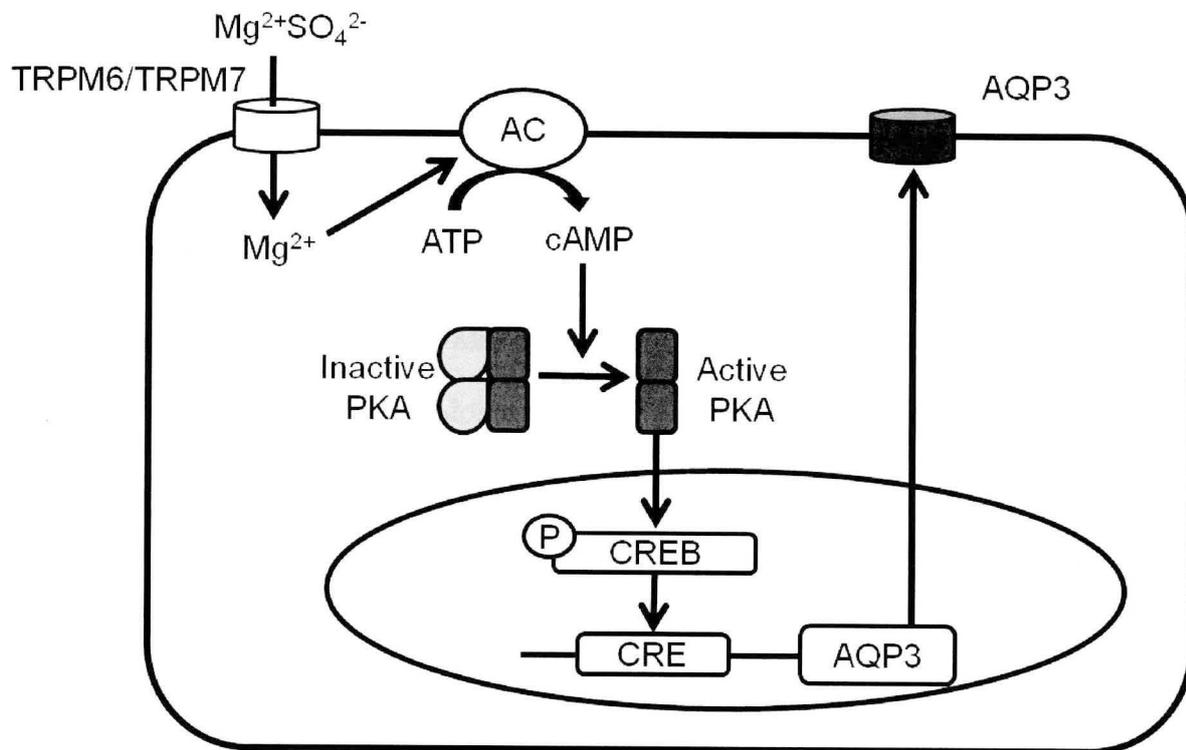


Figure 14 Suggested main mechanisms of the laxative effect of $MgSO_4$

【第二章】

ビサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割および

AQP3 発現変動メカニズムの解明

1. 緒言

ビサコジルは大腸刺激性の瀉下剤に分類され、単独あるいは浸透圧性下剤との併用により、便秘症の改善に広く用いられている。ビサコジルは、大腸の PGE₂ の産生を促進し、Na⁺,K⁺-ATPase の活性を阻害する。その結果、腸管内浸透圧が高まり、腸管側から血管側への水の吸収を減弱させるため、瀉下作用を発現すると考えられている^{3,4)}。しかし、PGE₂ の産生メカニズムや産生細胞については、全く知られていなかった。さらに、大腸における水の移動に関しては、AQP3 が関与しているか否かは全く不明であった。

本章では、ビサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割を調べる目的で、まず、ラットにビサコジルを経口投与し、糞中水分量の変動と大腸 AQP3 の発現変動との関係を調べた。次に、ビサコジルによる大腸 AQP3 の発現変動メカニズムを調べる目的で、ラットを用いる *in vivo* 実験に加え、マクロファージ Raw264.7 細胞および HT-29 細胞を用いる *in vitro* 実験も行った。

2. 方法

2-1. 試薬

Bisacodyl, tumour necrosis factor (TNF) α , indomethacin および DAPI solution は、和光純薬工業株式会社（大阪, 日本）から購入した。BSA および TRI reagent は、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) から購入した。PGE₂ は、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。High capacity cDNA synthesis kit は、Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。iQ SYBR green supermix は、Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) から購入した。Rabbit anti-rat AQP3 antibody は、Alomone Labs (Jerusalem, Israel) から購入した。Rabbit anti-rat COX-2 antibody は、abcam (Cambridge, UK) から購入した。Mouse anti-rat macrophage/dendritic cell monoclonal antibody は、Trans Genic Inc. (神戸, 日本) より購入した。Alexa Fluoro 488 donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluoro 555 donkey anti-mouse IgG および各種プライマーは、インビトロジェン（東京, 日本）から購入した。Donkey anti-rabbit IgG-HRP antibody は、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。ECL plus Western blotting detection reagents は、GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) から購入した。その他の試薬は、市販されている物の内、最もグレードの高い物を購入した。

2-2. 動物

10 週齢の雄性 Wistar 系ラットは日本エスエルシー株式会社（静岡, 日本）から購入した。動物は温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ の施設において飼育し、明暗条件は 8 : 00 点灯、20 : 00 消灯の条件下で飼育した。

本動物実験は、実験動物の適正な使用および管理について定められた星薬科大学動

物センター管理運営規程に準じて行われた。

2-3. ビサコジルの投与方法

ビサコジル投与 18 時間前よりラットを絶食した（飲水は自由）。ビサコジル（20 mg/kg）水溶液をラットに経口投与し、ビサコジル投与直後、1、2、3、5、8 および 12 時間後にエーテル麻酔下で解剖し、大腸を摘出した。また、ビサコジルを経口投与する 15 分前に、インドメタシン（10 mg/kg）あるいは生理食塩液をラットに腹腔内投与し、ビサコジル投与 2 時間後の大腸を摘出した。PBS を用いて大腸を洗浄した後、液体窒素により瞬時冷凍し、 -80°C で保存した。

2-4. 糞中水分量の測定

それぞれのラットについて、ビサコジル投与 8 時間後まで経時的に糞を採取し、シリカゲル入りのデシケータ内で 24 時間乾燥した。糞湿質量および乾燥質量から糞 1 g に含まれる水分量を算出した。

2-5. 免疫組織化学染色

ラットをエーテルにより麻酔し、心臓内に PBS を灌流した。次いで、4% PFA 溶液を 50 mL 灌流後、大腸を摘出し、4% PFA 溶液中で固定した（ 4°C 、1 時間）。 4°C で一晩、30% sucrose 溶液に浸し、OCT compound で包埋した。凍結ブロックをクリオスタットにより $10\ \mu\text{m}$ に薄切し、MAS-coated glass slide に固定した。固定した切片を PBS で洗浄後、blocking buffer で 1 時間ブロッキングした。次いで、一次抗体 [rabbit anti-rat AQP3 (1/200)、rabbit anti-rat COX-2 (1/100)、mouse anti-rat

macrophage/dendritic cell (1/25)] で、一晩、4°Cでインキュベートした。PBSで3回洗浄した後、Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG antibody (1/200) あるいは Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG antibody (1/200) と室温で1時間反応させた。PBSで3回洗浄後、DAPI solution (1/500) と室温で30分間反応させた。PBSで洗浄した後、vectashieldで封入し、蛍光顕微鏡を用いて検出した。

2-6. Raw264.7 細胞の培養方法

Raw264.7 細胞は、100 U/mL penicillin G potassium、100 µg/mL streptomycin、1%の非必須アミノ酸および10%FBSを含んだDMEM培地で維持した。細胞は密度 6×10^4 cells/cm²で24 well-plateに播種し、CO₂ incubatorでインキュベートした。サブコンフルエントになった状態の細胞にピサコジル (10 µg/mL) を添加し、0.5時間あるいは2時間培養した。培養上清を回収し、培養上清中のTNF-α濃度 (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA) およびPGE₂濃度 (Cayman Chemical) をELISAキットを用いて測定した。また、細胞を回収し、TNF-α、interleukin (IL)-1β、IL-6、cyclooxygenase (COX) 1 およびCOX2のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCRにより測定した。なお、実験には3-10代目の細胞を用いた。

2-7. HT-29 細胞の培養方法

HT-29 細胞は、100 U/mL penicillin G potassium、100 µg/mL streptomycin、0.25 µg/mL amphotericin B および10%FBSを含んだRPMI1640培地で維持した。細胞は密度 2×10^6 cells/cm²で100-mm dishに播種し、CO₂ incubatorでインキュベートした。サブコンフルエントになった状態の細胞にピサコジル (10 µg/mL)、TNF-α (10 µg/mL) およびPGE₂ (10 µM) を添加し、0.5時間、2時間あるいは6時間培養した。

セルスクレーパーにより細胞を回収し、AQP3 のタンパク質発現量をウエスタンブロッティングにより測定した。実験には 5-15 代目の細胞を用いた。

2-8. 大腸および細胞からの RNA の抽出

凍結した大腸約 15 mg あるいは回収した Raw264.7 細胞から TRI reagent を用いて RNA を抽出した。得られた溶液を TE buffer を用いて 50 倍希釈し、分光光度計により 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することで、純度の確認および RNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の算出を行った。

2-9. Real-time RT-PCR

RNA 1 μg から High capacity cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。これを TE buffer にて 20 倍希釈し、cDNA TE buffer 溶液とした。Table 6 に示すプライマーを作成し、real-time PCR を行い、各遺伝子の発現を検出した。すなわち、PCR plates の各 well へ iQ SYBR green supermix 25 μL 、目的遺伝子の Forward primer (5 pmol/ μL) 3 μL 、Reverse primer (5 pmol/ μL) 3 μL 、cDNA TE buffer 溶液 4 μL 、RNase free water 15 μL を加えた。温度条件は denaturation temperature として 95°C で 15 秒、annealing temperature として 56°C で 30 秒、elongation temperature として 72°C で 30 秒とした。増幅過程の蛍光強度を My iQ™ single color real-time PCR detection system によりモニタリングした。mRNA 発現量は 18S rRNA あるいは GAPDH を用いてノーマライズした。

Table 6 Primer sequences of mRNA

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
rTNF- α	GAAACACACGAGACGCTGAAGT	CACTGGATCCCGGAATGTCGAT
rIL-1 β	TCAGGCTTCCTTGTGCAAGTGT	ACAGGTCATTCTCCTCACTGTC
rIL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAACTTC	GCCGAGTAGACCTCATAGTGAC
rCOX1	AAGGAGATGGCCGCTGAGTT	AGGAGCCCCCATCTCTATCA
rCOX2	GCTGATGACTGCCCAACTC	GATCCGGGATGAACTCTCTC
r18S rRNA	GTCTGTGATGCCCTTAGATG	AGCTTATGACCCGCACTTAC
mTNF- α	ATGGACACCAAACATTTCTCTGC	CCAGTGGAGAGCCGATTCC
mCOX2	CAGGGCCCTTCCTCCCGTAG	GCCTTGGGGGTCAGGGATGA
mGAPDH	GGCAAATTCAACGGCACAGT	AGATGGTGTGGGCTTCCC

TNF: tumour necrosis factor, IL: interleukin, COX: cyclooxygenase, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

2-10. 大腸の膜画分の調製

ラット大腸からかきとった粘膜を dissecting buffer により、氷上で digital homogenizer を用いてホモジナイズ (1,250 rpm、5 stroke) した。ホモジネートを遠心分離 (800 \times g、15 分、4 $^{\circ}$ C) し、得られた上清 (上清 A) から crude membrane 画分、plasma membrane (PM) 画分および intracellular vesicle (IV) 画分を調製した。上清 A を遠心分離 (200,000 \times g、60 分、4 $^{\circ}$ C) した後、上清を除去し、沈殿に dissecting buffer を加え、超音波分散機により分散させた。この溶液を、細胞全体の膜を含む crude membrane 画分とした。また、上清 A を遠心分離 (17,000 \times g、30 分、4 $^{\circ}$ C) した後の上清 (上清 B) を分取した。沈殿に dissecting buffer を加え、超音波分散機により分散させ、これを plasma membrane を豊富に含む PM 画分とした。さ

らに、上清Bを遠心分離(200,000×g、60分、4°C)し、上清を除去した。沈殿に dissecting buffer を加え、超音波分散機により分散させ、これを intracellular vesicle を豊富に含む IV 画分とした^{31, 32)}。

2-11. HT-29 細胞の膜画分の調製

セルスクレーパーにより剥離した HT-29 細胞を lysis buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 8.5 μM leupeptin, 1 μM PMSF, 0.5% NP-40; pH 7.2) を用いて、氷上で超音波処理した。ホモジネートを遠心分離 (15,000×g、15分、4°C) し、得られた上清を crude membrane 画分とした。

2-12. 電気泳動およびウエスタンブロットティング法

タンパク質濃度は、BCA 法⁶⁹⁾を用いて測定した。標準品には BSA を用いた。

電気泳動は、Laemmli 法³⁴⁾に基づいて行った。タンパク質を loading buffer で 2 倍希釈し、ポリアクリルアミドゲルにアプライした。電気泳動後、分離されたタンパク質はセミドライブロットティング装置を用いて、PVDF メンブレンに転写した。1% スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った後、rabbit anti-rat AQP3 antibody (1/500; rat colon, 1/100; HT-29 cells) と室温で 1 時間反応させた。メンブレンを TBS-Tween で洗浄後、donkey anti-rabbit IgG-HRP antibody (1/5,000) と室温で 1 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、ECL plus Western blotting detection reagents と反応させ、化学発光検出器で露光し、検出されたバンドを解析した。

2-13. 大腸の PGE₂ 含量の測定

ラット大腸の PGE₂ 含量は、prostaglandin E₂ EIA kit (Cayman Chemical) を用いて測定した。PGE₂ 抽出方法は、prostaglandin E₂ EIA kit 付属のプロトコールに従って行った。すなわち、ラット大腸 200 mg をホモジネートバッファー (1 mM EDTA および 10 μM indomethacin を含む PBS; pH7.4) 1 mL を用いて、ホモジナイズした。遠心分離 (8,000 ×g、10 分、4°C) を行い、上清中の PGE₂ 濃度を測定した。

2-14. 統計学的有意差検定

実験値は平均値±標準偏差として表示した。2 群の平均値の有意差検定には、Student's t-テスト、平均値の多重比較には Dannett 法あるいは Tukey 法を用いた。

3. 結果

3-1. 糞中水分量

ラットにピサコジルを経口投与した際の糞中水分量を経時的に測定した (Figure 15)。糞中水分量はピサコジル投与により、経時的に増加した。特に、ピサコジル投与4時間後から8時間後にかけて糞中水分量は著しく増加し、投与直後に比べて約8倍から12倍となり、この間に激しい下痢が見られた。

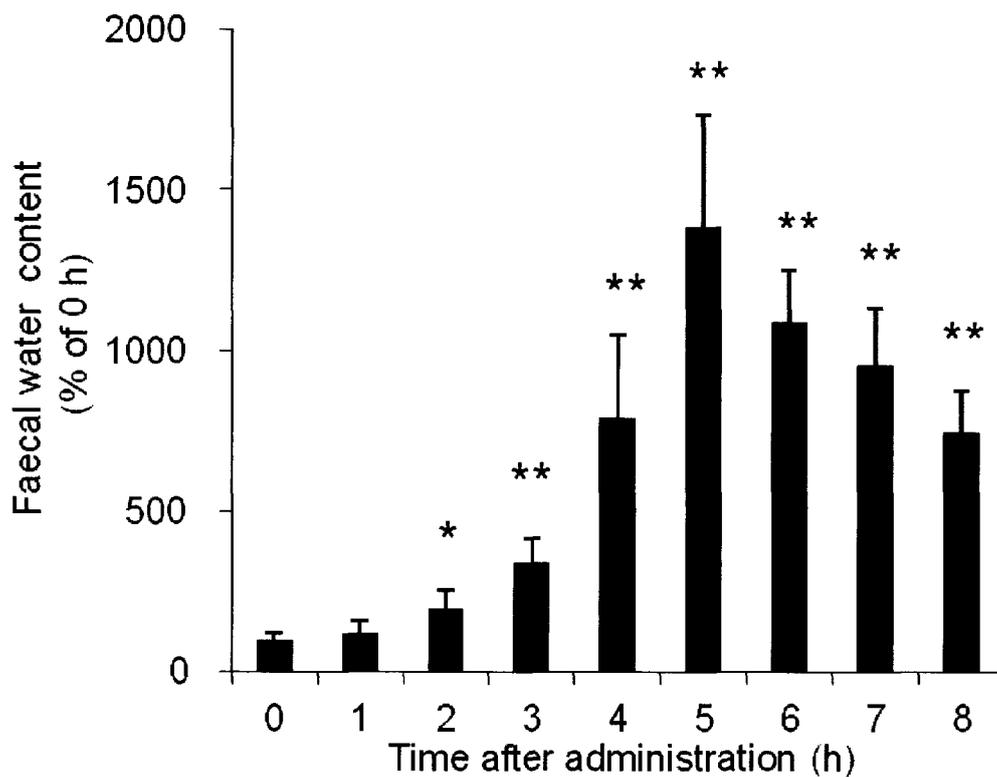


Figure 15 Effect of bisacodyl on faecal water content

Rat faecal samples were collected at various times for up to 8 h beginning immediately after the administration of bisacodyl, and the faecal water content was measured. The mean faecal water content immediately after the administration of bisacodyl (0 h) was indicated as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 rats. Dunnett's test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. 0 h.

3-2. 大腸の AQP3 タンパク質発現量および発現分布

大腸粘膜上皮細胞に最も強く発現している AQP3 について、ビスコジル投与後のタンパク質発現量をウエスタンブロッティングにより経時的に調べた (Figure 16)。

大腸粘膜上皮細胞から調製した crude membrane 画分における AQP3 のタンパク質発現量は、ビスコジル投与 2 時間後から有意に低下し、5 時間後には投与直後 (0 h) に比べ、約 80% 低下した。さらに、AQP3 の発現量は、投与 8 時間後においても投与直後の約 50% であった (Figure 16A)。

大腸粘膜上皮細胞の AQP3 は、種々の刺激により、細胞膜直下の小胞から管腔側膜へと移動し、水チャネルとして機能することが解明されている⁷⁰⁾。Plasma membrane (PM) 画分は、細胞膜を多く含むため、この画分の AQP3 の発現量を調べることで、水の輸送に直接かかわる AQP3 の発現量がわかる。一方、intracellular vesicle (IV) 画分は、小胞体膜を多く含むため、この画分の AQP3 の発現量を調べることで、小胞体膜に発現している AQP3 の発現量がわかる。また、crude membrane 画分の発現量を調べることで、PM 画分および IV 画分に発現している AQP3 の総量がわかる。そこで、ビスコジルを投与したラット大腸の PM 画分および IV 画分における AQP3 のタンパク質発現量を調べた。その結果、大腸 PM 画分 (Figure 16B)、IV 画分 (Figure 16C) および crude membrane 画分 (Figure 16A) における AQP3 のタンパク質発現量は、ともに同様の挙動を示し、しかも、糞中水分量の経時変化 (Figure 15) と逆の変動を示すことがわかった。

さらに、免疫組織化学染色の結果においても、大腸粘膜上皮細胞に発現している AQP3 が経時的に低下することが確認できた (Figure 17A)。加えて、ビスコジルによる大腸 AQP3 の発現低下は、apical 側および basal 側の両部位において見られた (Figure 17B)。

これらのことより、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現はビスコジル投与 2 時間後から急激かつ著明に低下し始め、この低下は投与 8 時間後まで持続することがわかった。

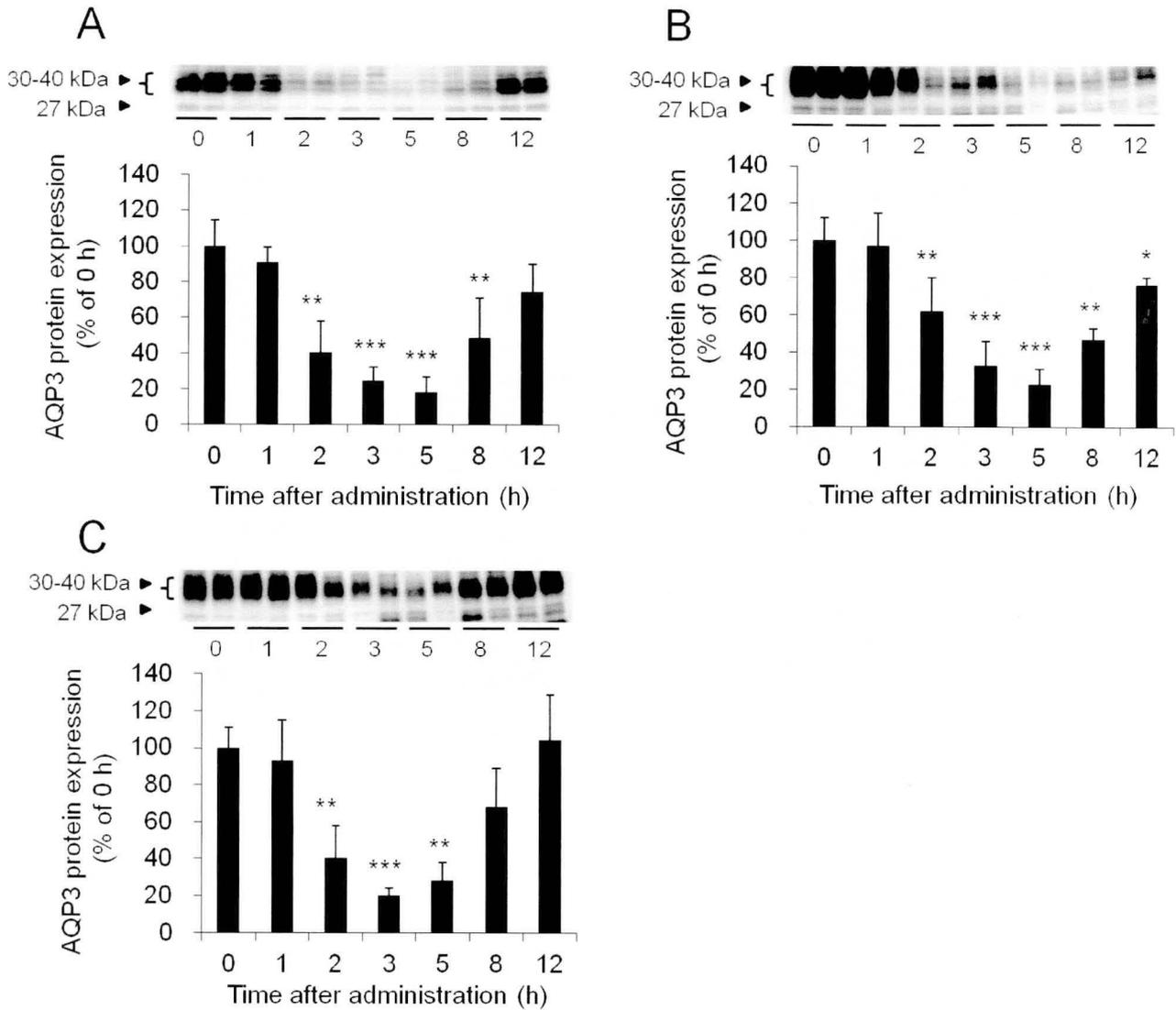


Figure 16 Effect of bisacodyl on AQP3 protein expression level in the rat colon

Rat colons were harvested at various times for up to 12 h, beginning immediately after the administration of bisacodyl. The crude membrane (A), plasma membrane (B), and intracellular vesicle fractions (C) were prepared, and the protein expression levels of AQP3 were analysed by Western blotting. Mean levels of AQP3 protein expression immediately after administration (0 h) were indicated as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 rats. Dunnett's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. 0 h.

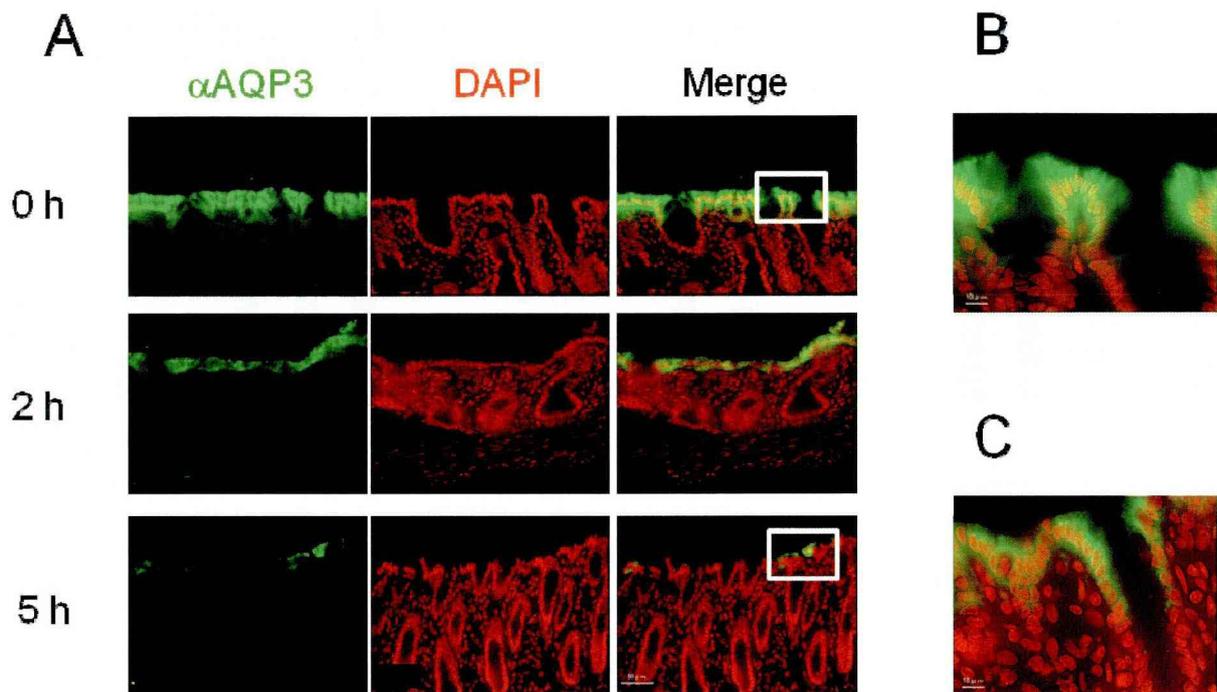


Figure 17 The distribution of AQP3 expression in the colon of rats after bisacodyl administration

A: The colons were removed from the rats from immediately after administration to 5 h after administration. AQP3 (green) and nuclei (red) were immunostained.

B and C: Enlarged view of AQP3 in the mucosal epithelial cells in the colon of rats immediately after administration (B) and 5 h after administration (C).

3-3. 大腸の炎症性サイトカインの mRNA 発現量

AQPs の発現量は、炎症性サイトカインにより低下することが知られている⁷¹⁻⁷³⁾。そこで、ビスコジルの投与により、大腸の炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) の mRNA 発現量が増加しているか否かを調べた (Figure 18)。

ビスコジルを投与したラット大腸の TNF- α の mRNA 発現量は、ビスコジル投与 1 時間後には変化は見られなかったが、投与 2 時間後および 3 時間後には有意に増加した (Figure 18A)。また、IL-1 β および IL-6 の mRNA 発現量も、TNF- α と同様にビスコジル投与 2 時間後から 3 時間後にかけて、いずれも有意に増加した (Figures 18B and 18C)。

以上の結果から、ビスコジルの投与により、大腸の炎症性サイトカインの発現が増加することがわかった。

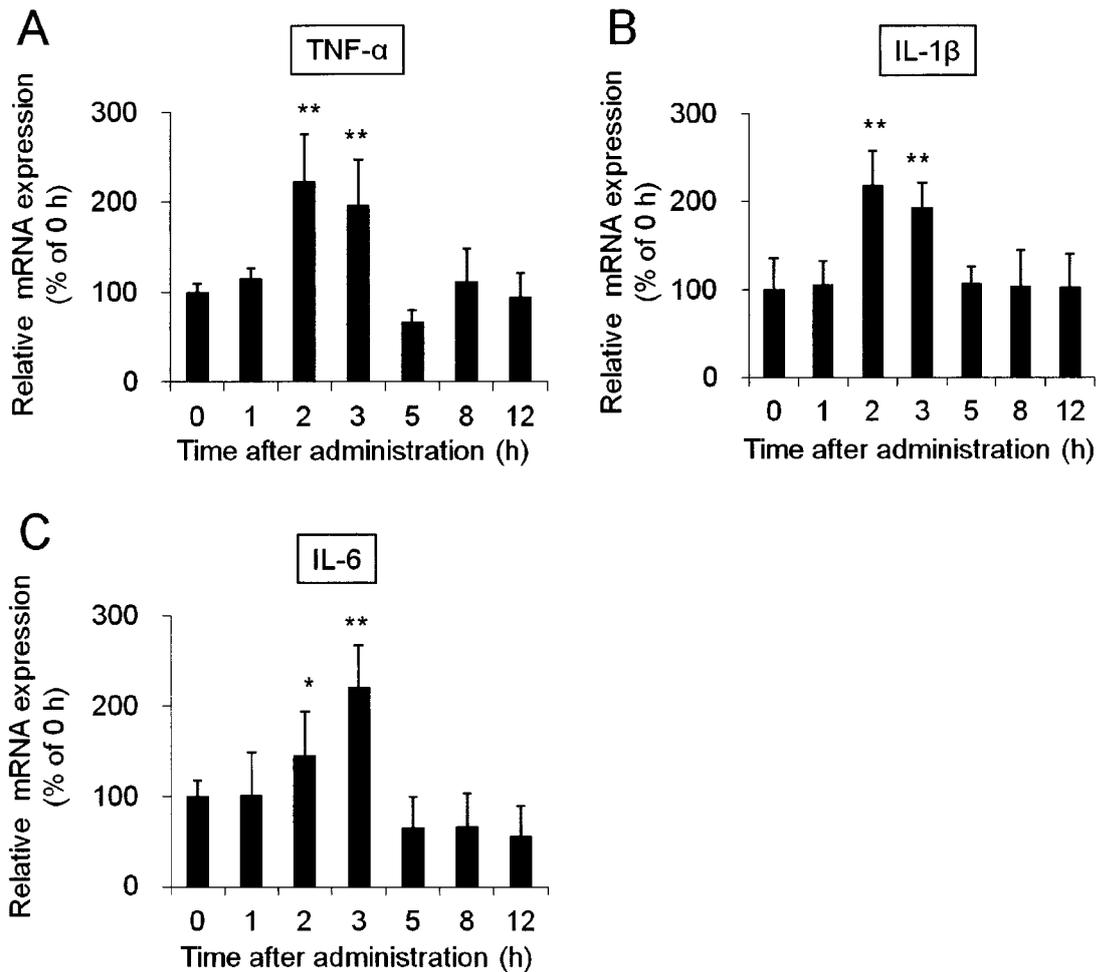


Figure 18 Effect of bisacodyl on mRNA expression levels of inflammatory cytokines in the rat colon

Rat colons were harvested at various times for up to 12 h, beginning immediately after the administration of bisacodyl. The mRNA expression levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), and IL-6 (C) were analysed by real-time RT-PCR. Normalisation was performed against 18S rRNA, and the mean levels of mRNA expression immediately after administration (0 h) were indicated as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 rats. Dunnett's test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. 0 h.

3-4. 大腸の COXs の発現量および発現分布

炎症性サイトカインは、COX2 の発現量を増加させることが知られている⁷⁴⁾。そこで、ビスコジル投与により、大腸の COX2 の発現が増加しているか否かを調べた (Figure 19)。

その結果、COX2 の mRNA 発現量は、炎症性サイトカインの発現パターンと同様に、ビスコジル投与 2 時間後から 3 時間後にかけて有意に増加することがわかった (Figure 19B)。それに対して、COX1 の mRNA 発現量は、いずれの時間においても変化しないことがわかった (Figure 19A)。

ビスコジルはマクロファージを活性化させること^{75, 76)}、およびマクロファージが活性化すると COX2 の発現が増加することが知られている⁷⁷⁾。そこで、COX2 のタンパク質をマクロファージと二重染色することにより、COX2 の発現がマクロファージに由来するものであるか否かを調べた。その結果、COX2 およびマクロファージは、大腸粘膜固有層に局在していることがわかった (Figure 20A のそれぞれ anti-COX2 および anti-macrophage)。しかも、両者が共発現していることがわかった (Figure 20B)。これらのことより、ビスコジル投与 2 時間後において、大腸粘膜固有層に局在しているマクロファージの COX2 が特異的に活性化している可能性が示された。

以上の結果から、ビスコジルは大腸のマクロファージを活性化することにより、マクロファージの COX2 の発現量を増加させている可能性が示された。

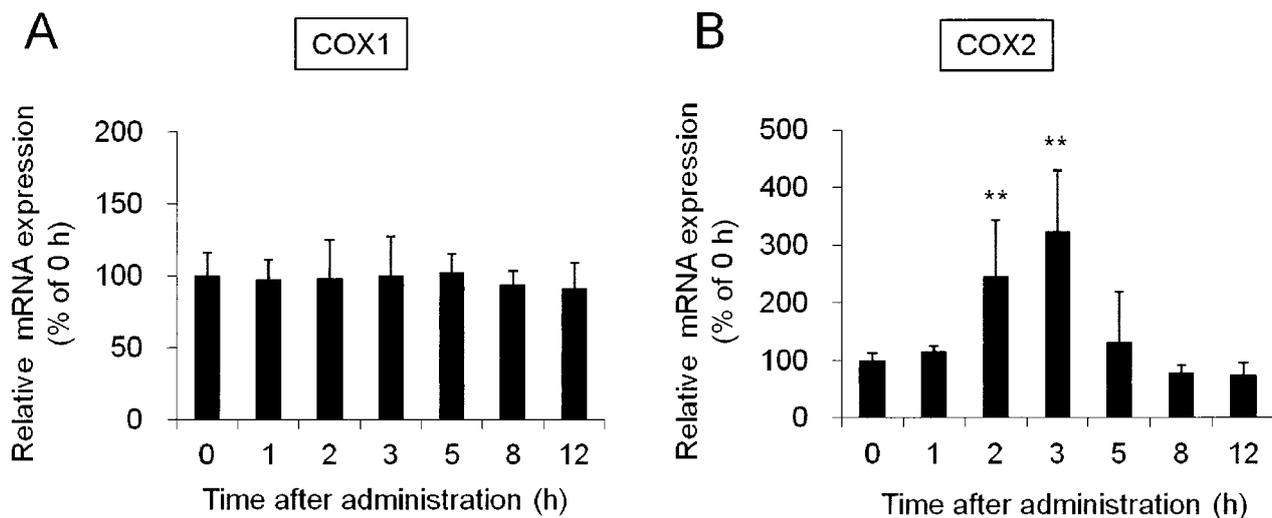
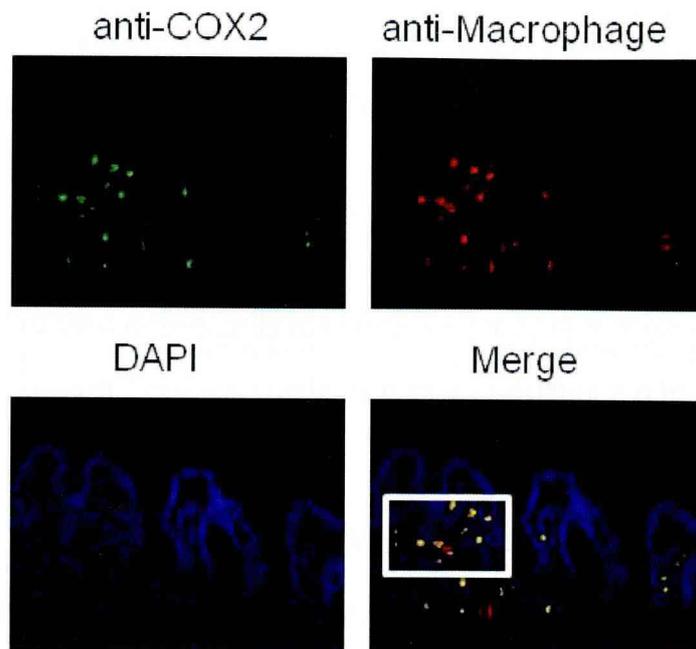


Figure 19 Effect of bisacodyl on mRNA expression levels of inflammatory cytokines and COXs in the rat colon

Rat colons were harvested at various times for up to 12 h, beginning immediately after the administration of bisacodyl. The mRNA expression levels of COX1 (A) and COX2 (B) were analysed by real-time RT-PCR. Normalisation was performed against 18S rRNA, and the mean levels of mRNA expression immediately after administration (0 h) were indicated as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 rats. Dunnett's test: ** $p < 0.01$ vs. 0 h.

A



B

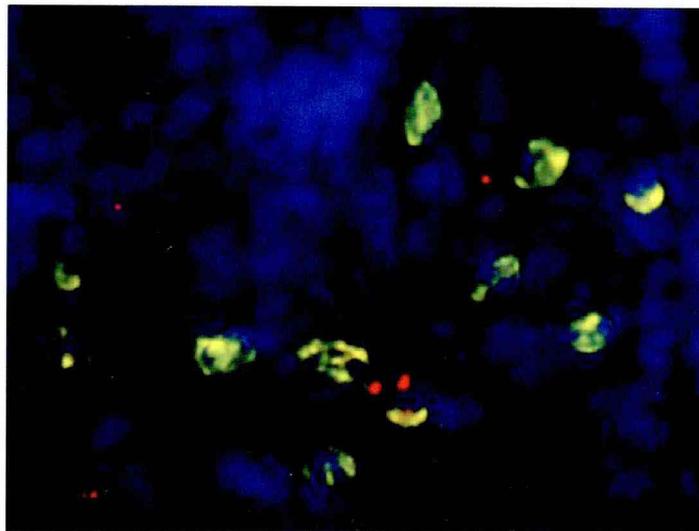


Figure 20 The distribution of COX2 expression in the colon of rats 2 h after the administration of bisacodyl

A: The colons were removed from the rats 2 h after the administration of bisacodyl. COX2 (green), macrophage (red), and nuclei (blue) were immunostained.

B: Enlarged view of COX2 in the rat colon.

3-5. Raw264.7 細胞に対するピサコジルの影響

ラットの大腸において、ピサコジルはマクロファージに直接作用することにより、炎症性サイトカインを分泌し、マクロファージの COX2 の活性化を介して、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現を著明に減少させている可能性が示唆された。そこで、このことをより明確にするために、マウスマクロファージ由来細胞株 Raw264.7 細胞を用いて、種々検討した。

まず、ピサコジルがマクロファージを直接活性化させるか否かを調べた (Figure 21)。ピサコジル添加 0.5 時間後および 2 時間後において、Raw264.7 細胞の TNF- α mRNA 発現量は、添加直後 (0 h) と比べ、それぞれ約 2.2 倍および 6 倍有意に増加していた (Figure 21A)。同様に、培養上清中の TNF- α 濃度も、ピサコジル添加 0.5 時間後において、添加直後に比べて、約 1.8 倍有意に増加し、2 時間後では約 8 倍有意に増加していた (Figure 21C)。

次に、COX2 の活性化について調べた。ピサコジル添加 0.5 時間後および 2 時間後における COX2 の mRNA 発現量は、添加直後と比べて、それぞれ約 1.8 倍および 6 倍有意に増加していた (Figure 21B)。

さらに、COX2 の活性化により合成される PGE₂ について、合成量の変化を調べた。その結果、ピサコジル添加 0.5 時間後および 2 時間後において、培養上清中の PGE₂ 濃度が、添加直後と比べて、それぞれ約 1.6 倍および 2.2 倍有意に増加することがわかった (Figure 21D)。

以上の結果から、ピサコジルは直接マクロファージを活性化し、TNF- α の分泌を亢進すること、マクロファージの COX2 の発現を増加すること、および PGE₂ の分泌を亢進することがわかった。

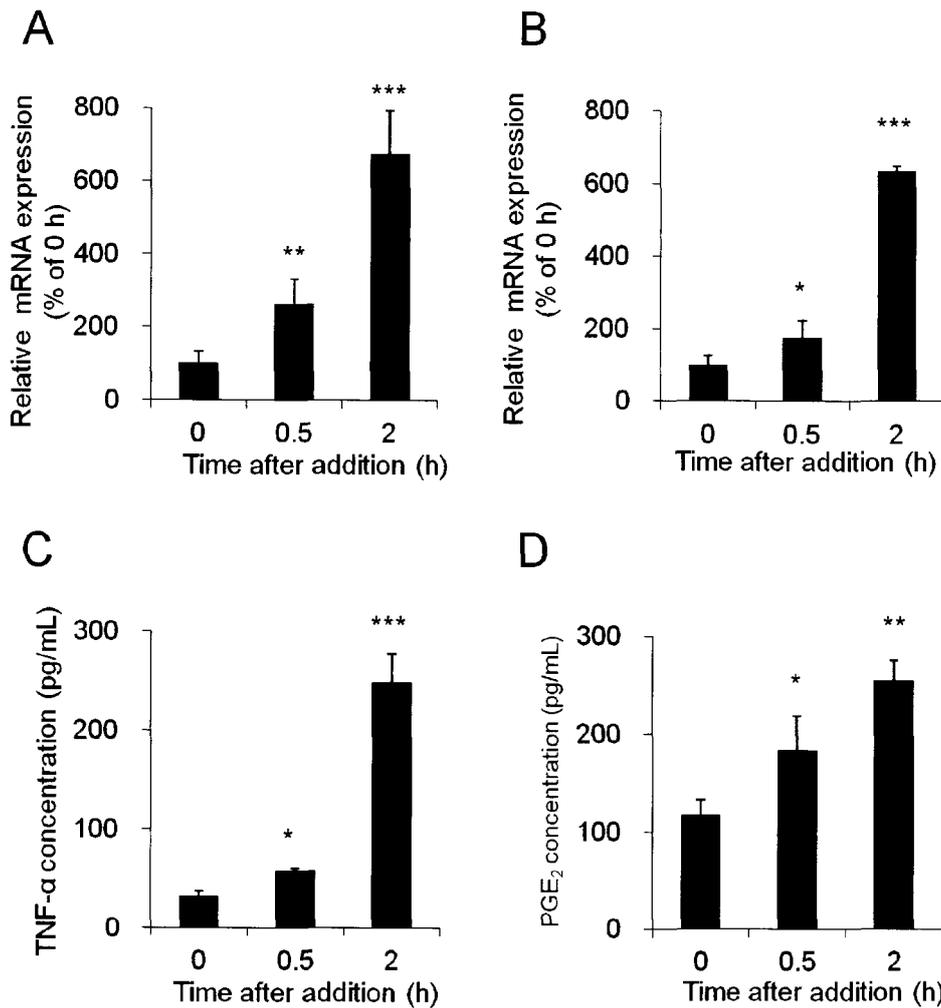


Figure 21 Effect of bisacodyl on Raw264.7 cells

Raw264.7 cells were treated with bisacodyl (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and recovered 0, 0.5, and 2 h later. TNF- α (A) and COX2 (B) mRNA expression levels were measured by real-time RT-PCR, corrected for the GAPDH level, and presented using the mean of the 0 h cells as 100%. Directly after, 0.5 h after, and 2 h after the addition of bisacodyl, the supernatant was collected, and the concentrations of TNF- α (C) and PGE₂ (D) were measured by using EIA. The mRNA expression levels and TNF- α and PGE₂ concentrations in the control did not change up to 2 h after the addition of the original medium. Data represent means \pm SDs for 6 experiments. Dunnett's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. 0 h.

3-6. HT-29 細胞の AQP3 のタンパク質発現量に及ぼすピサコジル、TNF- α あるいは PGE₂ の影響

ピサコジルは、マクロファージに直接作用し、TNF- α および PGE₂ の分泌を亢進させることがわかった。しかし、TNF- α が直接大腸粘膜上皮細胞に作用し AQP3 を減少させている可能性はないのか、あるいはピサコジルが直接大腸粘膜上皮細胞に作用し AQP3 を減少させている可能性はないのか、それとも PGE₂ が直接大腸粘膜上皮細胞に作用し AQP3 を減少させているのかについては不明であった。そこで、HT-29 細胞にピサコジル、TNF- α あるいは PGE₂ を添加し、これらが AQP3 のタンパク質発現量を低下させるか否かを調べた (Figure 22)。

ピサコジル添加 0.5 時間後および 2 時間後においても、HT-29 細胞の AQP3 のタンパク質発現量は、添加直後 (0 h) と比べて有意な変化は認められなかった (Figure 22A)。

TNF- α 添加 0.5 時間後および 2 時間後においても、AQP3 のタンパク質発現量は、添加直後と比べて有意な変化は認められなかった。それに対して、6 時間後においては、TNF- α の添加により、AQP3 のタンパク質発現量は有意に低下していた (Figure 22B)。

一方、HT-29 細胞に PGE₂ を添加した場合には、AQP3 のタンパク質発現量は、添加 0.5 時間後にはすでに、添加直後の約 40% まで有意に低下していた (Figure 22C)。

以上の結果より、PGE₂ が大腸粘膜上皮細胞に直接作用し、AQP3 の発現を低下させている可能性が示された。

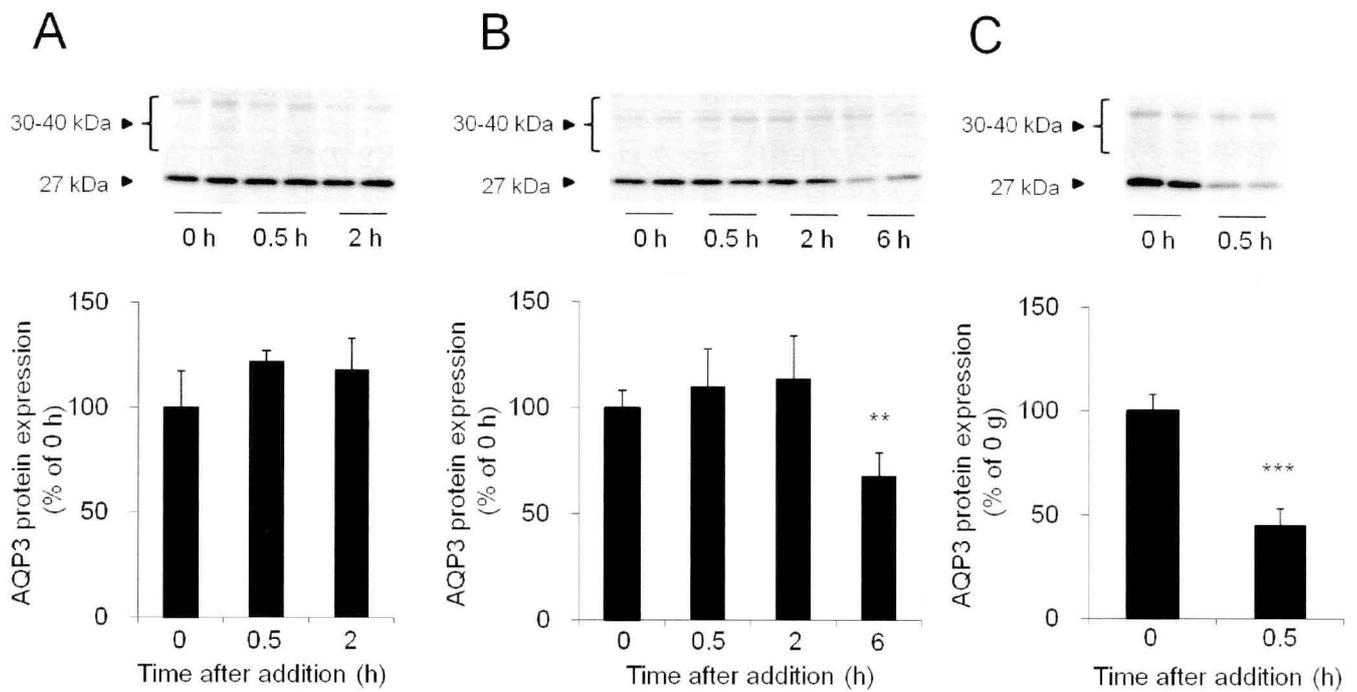


Figure 22 Effect of bisacodyl (A), TNF- α (B) and PGE₂ (C) on the expression of AQP3 in HT-29 cells

HT-29 cells were treated with bisacodyl (10 μ g/mL, A), TNF- α (10 μ g/mL, B), or PGE₂ (10 μ M, C) for 0.5 h, 2 h, or 6 h. The protein expression level of AQP3 was measured by Western blotting and presented using the mean of the 0 h cells as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 experiments. Dunnett's test or Student's t-test: ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. 0 h.

3-7. インドメタシン前処置ラットへのピサコジル投与による糞中水分量、大腸 PGE₂ 含量および AQP3 タンパク質発現量の変化

マクロファージ Raw264.7 細胞および HT-29 細胞を用いた *in vitro* 実験により、ピサコジルがマクロファージに作用し、マクロファージの COX2 の活性を亢進することにより、PGE₂ の分泌を亢進させ、PGE₂ が大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現を低下させている可能性が示された。そこで、COXs 阻害剤インドメタシンを前処置することにより、PGE₂ の分泌を抑制した際に、ピサコジルによる瀉下作用および大腸 AQP3 の発現がどのように変化するかについて、ラットを用いて検討した (Figure 23)。

インドメタシンを前処置した後に、ピサコジルを経口投与したラットの糞中水分量は、ピサコジル投与 2 時間後および 5 時間後のいずれの時期においても、投与直後 (0 h) とほぼ同程度であり、下痢の発生は確認できなかった (Figure 23A)。

一方、ピサコジル投与 2 時間後のラット大腸における PGE₂ 含量は、Control 群に比べて約 1.8 倍有意に高かった。これに対して、インドメタシンを前処理した場合には、大腸 PGE₂ の産生はほとんど認められなかった (Figure 23B)。

また、インドメタシンを前処置した場合には、ピサコジルを投与しても、大腸の AQP3 タンパク質発現量は低下せず、Control 群とほぼ同程度であった (Figure 23C)。

以上の結果から、ピサコジルによる AQP3 の発現低下作用には、PGE₂ が関与していることが確認できた。

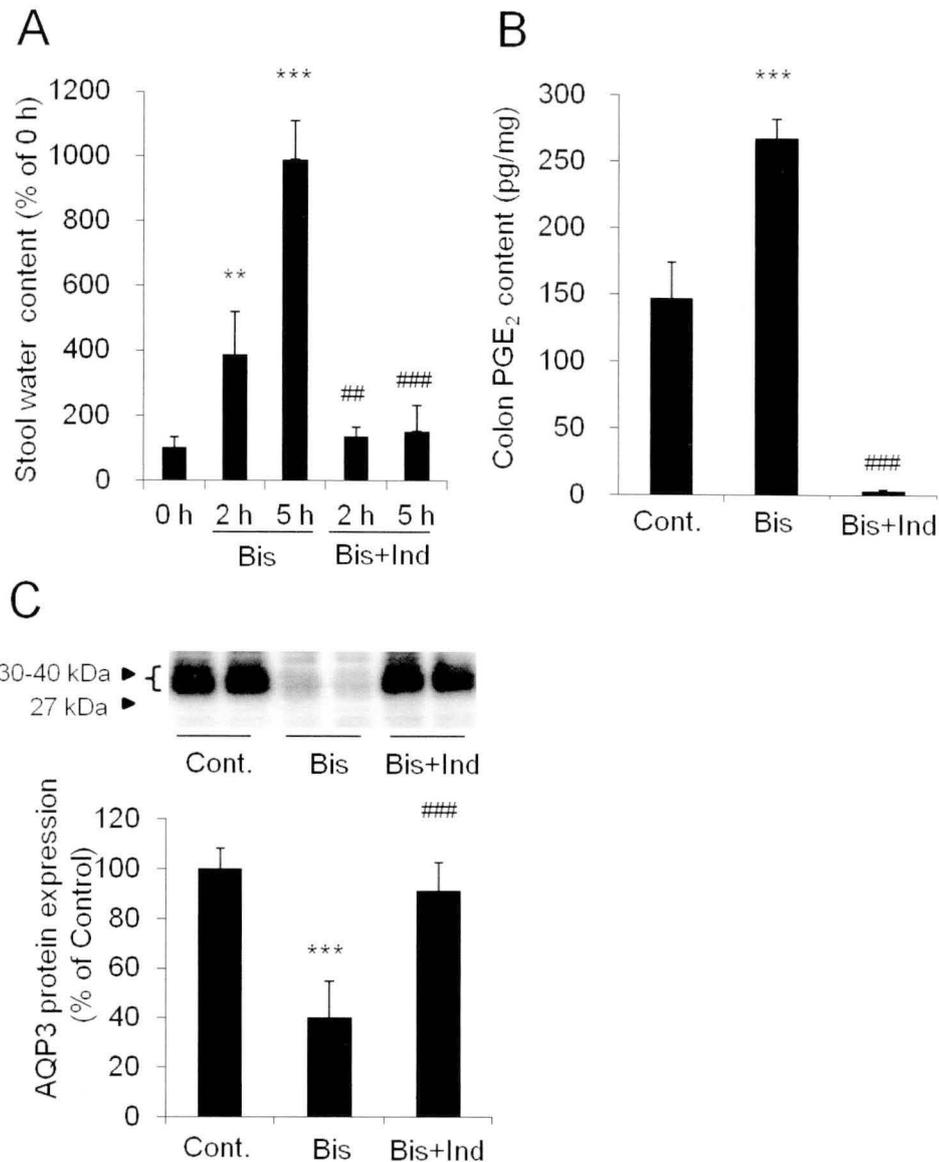


Figure 23 Changes in the faecal water content, PGE₂ concentration, and the protein expression level of AQP3 in the colon caused by bisacodyl administration to rats pretreated with indomethacin

Saline or indomethacin (10 mg/kg) was intraperitoneally administered to rats. Distilled water or bisacodyl (20 mg/kg) was orally administered to rats 15 minutes after the administration of indomethacin. The faecal water content was measured 2 h and 5 h after the administration of bisacodyl (A). The colon was removed 2 h after the administration of bisacodyl, and the PGE₂ content was measured using

the EIA method (B). The protein expression level of AQP3 was measured via Western blotting (C). The faecal water content and protein expression level of AQP3 are shown with the mean value immediately after administration (0 h) as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 rats. Tukey's test: **p<0.01 and ***p<0.001 vs. 0 h or control. ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. rats treated bisacodyl alone at each h.

4. 考察

本章では、ビスコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割について検討した。実験に際して、ビスコジルの投与量は 20 mg/kg の投与量でラットに経口投与したが、この投与量は過去の報告^{3,5)}を基に設定した。

ビスコジルの投与後、ラットの粗膜画分、PM 画分および IV 画分の AQP3 のタンパク質発現量が、いずれもビスコジルの投与 2 時間後より著明に低下した (Figure 16)。また、この発現低下は apical 側および basal 側の両方に認められた (Figure 17)。さらに、この AQP3 の発現低下と糞中水分量の増加には、一定の相関関係が見られた (Figures 15 and 16)。これらのことから、ビスコジル投与により大腸粘膜上皮細胞の AQP3 が低下すると、下痢が発生する可能性が示唆された。

それでは、なぜ、AQP3 の発現量が低下すると下痢が発生するのか。生理的条件下においては、大腸の管腔内の浸透圧は血管側のそれに比べて低いため、水は腸管側から血管側に移動し、糞の濃縮が行われる²³⁾。上述したように、この水の移動は、主に AQP3 を介して行われているものと考えられる。したがって、AQP3 の発現量が減少すると、腸管側から血管側への水の移動が減少するため、腸管内に水が貯留し、下痢が発生すると考えられる。Wang らは、マウスの大腸粘膜上皮細胞に優位に発現している AQP4 をノックアウトしたマウスにおいては、野生型マウスに比べ、生理的条件下においても糞中水分量が増加していることを報告している⁷⁸⁾。この Wang らの報告は、大腸の AQPs が低下すると、糞中水分量が増加する可能性を示しており、本結果を支持するものである。

次に、ビスコジルがどのようなメカニズムで AQP3 の発現量を低下させているかについて調べた。まず、ビスコジルが直接、大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現量を低下させた可能性について、HT-29 細胞を用いて調べた。HT-29 細胞にビスコジ

ルを添加した結果、添加 2 時間後においても、AQP3 のタンパク質発現量に影響を及ぼさなかった (Figure 22A)。したがって、ビスコジルが直接、大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現量を低下させている可能性は低いことが明らかとなった。

次いで、ビスコジルが間接的に、大腸の AQP3 の発現量を低下させた可能性について調べた。ビスコジルは大腸マクロファージを活性化することが知られている^{75, 76)}。マクロファージが活性化すると、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現および分泌が亢進し、COX2 の発現増加を介して PGE₂ が分泌される⁷⁹⁻⁸²⁾。一方、TNF- α ⁷¹⁻⁷³⁾ および PGE₂^{83, 84)} は、AQPs の発現量を低下させることが知られている。そこで、ビスコジルが直接マクロファージを活性化し、TNF- α および PGE₂ を分泌させるか否かをマウスマクロファージ由来細胞株 Raw264.7 細胞を用いて調べた。Raw264.7 細胞にビスコジルを添加した結果、TNF- α の分泌量の増加、COX2 の発現量の増加および PGE₂ の分泌量の増加が認められた (Figure 21)。一方、ラットにビスコジルを投与し、下痢が発生した際の大腸においても、TNF- α などの炎症性サイトカインおよび COX2 の mRNA の発現増加 (Figures 18 and 19)、ならびに PGE₂ の分泌増加が認められた (Figure 23B)。さらに、下痢発生時において、COX2 の発現増加がマクロファージにおいて特異的に見られた (Figure 20)。以上のことから、ビスコジルはマクロファージを活性化し、TNF- α および PGE₂ の産生および分泌を亢進することがわかった。

次に、TNF- α および PGE₂ がパラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現を低下させているかどうかについて調べた。Horie らは、ケラチノサイトに対して TNF- α を添加すると、添加 6 時間後から AQP3 のタンパク質発現量が低下し始めることを報告している⁷¹⁾。そこで、TNF- α を HT-29 細胞に添加し、AQP3 のタンパク質発現量を調べた。その結果、TNF- α を添加しても、添加 2 時間後では AQP3 の発現量に変化は見られず、6 時間後になってはじめて、低下することがわかった (Figure 22B)。これに対して、ラットでは下痢発生時において、大腸における

TNF- α の増加と AQP3 の低下が、ほぼ同時に見られた (Figures 15, 16, and 18A)。したがって、マクロファージから分泌された TNF- α は、オートクライン因子として、マクロファージの COX2 の発現量増加には関わっているものの、パラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の速やかな発現低下を引き起こした可能性は低いと考えられる。一方、HT-29 細胞に PGE₂ を添加すると、AQP3 の発現量が著明に低下した。また、この AQP3 の発現低下は速やかに生じ、PGE₂ 添加後 30 分以内には起きることがわかった (Figure 22C)。以上のことから、マクロファージから分泌された PGE₂ は、パラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現量を低下させたと考えられる。

最後に、COXs 阻害剤インドメタシンをラットに前処置することにより、ビスコジルの瀉下作用が減弱するかどうかについて調べた。その結果、インドメタシンを前投与することにより、ビスコジルの瀉下作用が抑制されるとともに、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 タンパク質発現量の低下が抑制された (Figure 23)。このことより、ビスコジル投与による大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の急速かつ著明な発現低下には、PGE₂ が関与している可能性が確認できた。これまで、腎臓において、PGE₂ が AQP2 の endocytosis を引き起こして発現量を低下させること、および PGE₂ による発現低下が 30 分以内に生じることが明らかにされており、この発現低下は ubiquitin 化が関与していることが示唆されている⁸³⁻⁸⁶⁾。したがって、PGE₂ が大腸粘膜上皮細胞の AQP3 を低下させるメカニズムとして、AQP3 の endocytosis の亢進が考えられる。

これまで、ビスコジルの下痢発生のメカニズムとして、以下の可能性が示唆されている。すなわち、ビスコジルが PGE₂ の産生を亢進し、大腸粘膜上皮細胞の Na⁺,K⁺-ATPase の活性を阻害するため、管腔内の Na⁺ や Cl⁻ の濃度が高まる。その結果、管腔内の浸透圧が上昇し、腸管側から血管側への水の吸収が減弱するため、瀉下作用を発現すると考えられている^{3, 4)}。しかし、ビスコジルによって大腸内浸透圧は上昇していなかった (Figure 24)。したがって、ビスコジルによる瀉下作用は、これ

まで考えられていた腸管内の浸透圧の上昇に伴う水の吸収抑制というメカニズムよりはむしろ、大腸 AQP3 の発現低下に伴って水の吸収が抑制されるというメカニズムの方が妥当であると考える。

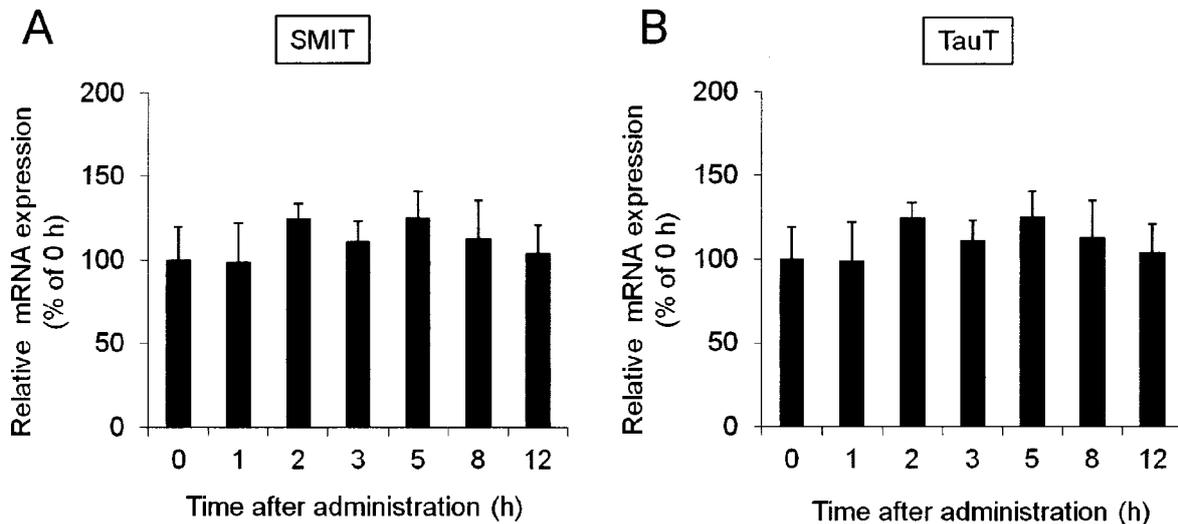


Figure 24 Effect of bisacodyl on SMIT (A) and TauT (B) mRNA expression levels in the rat colon

Rat colons were harvested at various times for up to 12 h, beginning immediately after the administration of bisacodyl. The mRNA expression levels of SMIT (A) and TauT (B) were analysed by real-time RT-PCR. Normalisation was performed against 18S rRNA, and the mean levels of mRNA expression immediately after administration (0 h) were indicated as 100%. Data represent means \pm SDs for 6 rats.

本章の結果より、ビスコジルは大腸の AQP3 の発現量を低下させることにより、腸管側から血管側への水の移動を抑制し、瀉下作用を示している可能性が示唆された。

さらに、ビサコジルは、直接、大腸のマクロファージを活性化させることにより、マクロファージの PGE₂ の産生および分泌を亢進すること、および PGE₂ はパラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現を低下させていることを明らかにした (Figure 25)。

本研究により、ビサコジルが腸管に存在するマクロファージに直接作用し、マクロファージから PGE₂ を分泌させること、このマクロファージから産生される PGE₂ が腸管上皮細胞に作用し、AQP3 を低下させること、および AQP3 の低下により下痢が発生することを明らかにしたことは、ビサコジルの瀉下作用に対して、明確なエビデンスを与えたものであり、本研究の成果は、瀉下剤の適正使用や開発において極めて重要なものになると考える。

加えて、本研究の結果は、大腸の AQP3 の発現量を低下させる物質やマクロファージを活性化する物質が、糞中水分量を増加させ、瀉下作用を示す可能性があることを示唆するものである。マクロファージを活性化する物質は、連用により活性化作用が減弱することが知られている^{87, 88)}。したがって、ビサコジルを連用すると効果が減弱する可能性がある。また、インドメタシンやセレコキシブなどの非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; NSAIDs) は、COXs を阻害することが知られている。したがって、これら NSAIDs とビサコジルを併用すると、効果が減弱する可能性が考えられる。

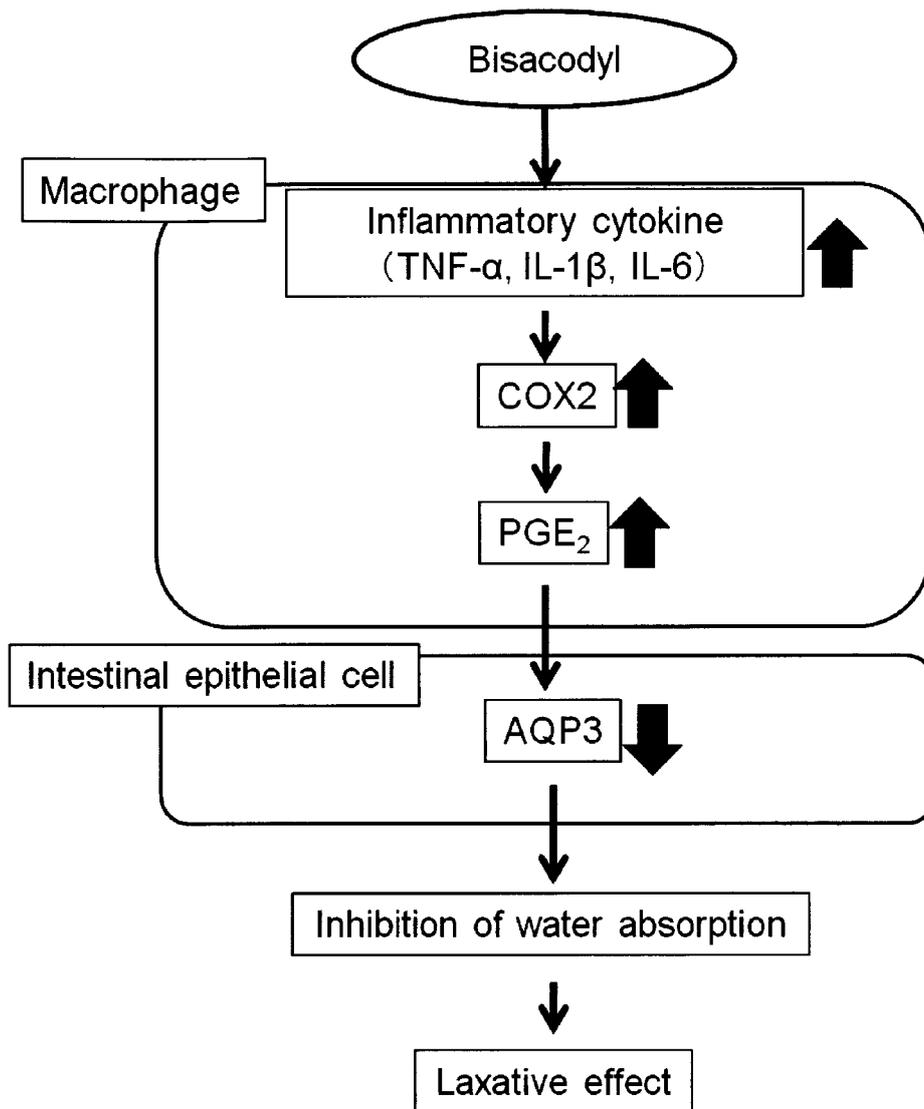


Figure 25 Suggested main mechanisms of the laxative effect of bisacodyl

【第三章】

AQP3 活性化阻害剤の大腸での水の輸送に及ぼす影響

1. 緒言

AQP3 は大腸に最も優位に発現しており、大腸における水の輸送に関して、重要な役割を担っている^{27, 41, 42)}。第一章において、浸透圧性下剤 MgSO_4 の瀉下作用が、単に腸管内の浸透圧の上昇のみでもたらされるものではなく、大腸粘膜上皮細胞における AQP3 の発現量の増加を伴って、極めて合理的に生じている可能性を示した。また、第二章において、大腸刺激性下剤ピサコジルは、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現量を低下させることにより、腸管から血管側への水の吸収を抑制し、瀉下作用を発現している可能性を示した。このように、大腸の AQP3 の発現量の変動により、水の輸送能が変動することが明らかとなったものの、AQP3 の発現量ではなく、AQP3 の機能を変化させた場合、大腸の水の輸送能にどのような影響を及ぼすかについては、全く不明であった。

そこで本章では、AQP3 の機能を阻害した際の大腸における水の輸送能に及ぼす影響を *in vivo* 試験により調べた。具体的には、AQP3 の機能を阻害することが知られている HgCl_2 ⁸⁹⁾ あるいは CuSO_4 ⁹⁰⁾ をラットの大腸内に投与し、糞中水分量がどのように変化するかを調べた。さらに、これらの化合物によって、大腸 AQP3 の機能だけが阻害されたことを確認する目的で、下痢の発生に関連した他の因子（浸透圧や AQP の発現量）についても調べた。

2. 方法

2-1. 試薬

HgCl₂、CuSO₄・5H₂O および DAPI solution は、和光純薬工業株式会社（大阪，日本）から購入した。BSA および TRI reagent は、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) から購入した。High capacity cDNA synthesis kit は、Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。iQ SYBR green supermix は、Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) から購入した。Rabbit anti-rat AQP3 antibody は、Alomone Labs (Jerusalem, Israel) から購入した。Alexa Fluoro 488 donkey anti-rabbit IgG および各種プライマーは、インビトロジェン（東京，日本）から購入した。Donkey anti-rabbit IgG-HRP antibody は、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。ECL plus Western blotting detection reagents は、GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) から購入した。その他の試薬は、市販されている物の内、最もグレードの高い物を購入した。

2-2. 動物

10 週齢の雄性 Wistar 系ラットは日本エスエルシー株式会社（静岡，日本）から購入した。動物は温度 24±1°C、湿度 55±5%の施設において飼育し、明暗条件は 8：00 点灯、20：00 消灯の条件下で飼育した。

本動物実験は、実験動物の適正な使用および管理について定められた星薬科大学動物センター管理運営規程に準じて行われた。

2-3. HgCl₂あるいはCuSO₄の投与方法

エーテル麻酔下で、HgCl₂ (1 mg/kg) あるいはCuSO₄ (1 mg/kg) をラットに直腸内投与した。投与1時間後にエーテル麻酔下で解剖し、大腸を摘出した。生理食塩液を直腸内投与したラットをControlとした。PBSを用いて大腸を洗浄した後、液体窒素により瞬時冷凍し、-80℃で保存した。

2-4. 糞中水分量の測定

それぞれのラットについて、投与1時間後まで糞を採取し、シリカゲル入りのデシケータ内で24時間乾燥した。糞湿質量および乾燥質量から糞1gに含まれる水分量を算出した。

2-5. 大腸からのRNAの抽出

凍結した大腸約15mgからTRI reagentを用いてRNAを抽出した。得られた溶液をTE bufferを用いて50倍希釈し、分光光度計により260nmおよび280nmの吸光度を測定することで、純度の確認およびRNA濃度(μg/mL)の算出を行った。

2-6. Real-time RT-PCR

RNA 1 μg から High capacity cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。これを TE buffer にて 20 倍希釈し、cDNA TE buffer 溶液とした。Table 7 に示すプライマーを作成し、real-time PCR を行い、各遺伝子の発現を検出した。すなわち、PCR plates の各 well へ iQ SYBR green supermix 25 μL、目的遺伝子の Forward primer (5 pmol/μL) 3 μL、Reverse primer (5 pmol/μL) 3 μL、cDNA TE buffer 溶液 4 μL、

RNase free water 15 μ L を加えた。温度条件は denaturation temperature として 95°C で 15 秒、annealing temperature として 56°C で 30 秒、elongation temperature として 72°C で 30 秒とした。増幅過程の蛍光強度を My iQ™ single color real-time PCR detection system によりモニタリングした。mRNA 発現量は 18S rRNA を用いてノーマライズした。

Table 7 Primer sequences of mRNA

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
rSMIT	AGGAGTCCTTGGGTTGGAAC	ACTGCAACAAGGCCTCCAG
rTauT	GTTCTGGGAGCGCAACGT	ACCGAACACCCTTCCAGATG
r18S rRNA	GTCTGTGATGCCCTTAGATG	AGCTTATGACCCGCACTTAC

SMIT: sodium myo-inositol transporter, TauT: taurine transporter

2-7. 大腸の膜画分の調製

ラット大腸からかきとった粘膜を dissecting buffer により、氷上で digital homogenizer を用いてホモジナイズ (1,250 rpm、5 stroke) した。ホモジネートを遠心分離 (800×g、15 分、4°C) し、得られた上清 (上清 A) から crude membrane 画分、PM 画分および IV 画分を調製した。上清 A を遠心分離 (200,000×g、60 分 4°C) した後、上清を除去し、沈殿に dissecting buffer を加え、超音波分散機により分散させた。この溶液を、細胞全体の膜を含む crude membrane 画分とした。また、上清 A を遠心分離 (17,000×g、30 分、4°C) した後の上清 (上清 B) を分取した。沈殿に dissecting buffer を加え、超音波分散機により分散させ、これを plasma membrane を豊富に含む PM 画分とした。さらに、上清 B を遠心分離 (200,000×g、60 分、4°C)

し、上清を除去した。沈殿に dissecting buffer を加え、超音波分散機により分散させ、これを intracellular vesicle を豊富に含む IV 画分とした³⁰⁾。

2-8. 電気泳動およびウエスタンブロットィング法

タンパク質濃度は、BCA 法⁶⁹⁾を用いて測定した。標準品には BSA を用いた。

電気泳動は、Laemmli 法³⁴⁾に基づいて行った。タンパク質を loading buffer で 2 倍希釈し、ポリアクリルアミドゲルにアプライした。電気泳動後、分離されたタンパク質はセミドライブロットィング装置を用いて、PVDF メンブレンに転写した。1% スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った後、rabbit anti-rat AQP3 antibody (1/500) と室温で 1 時間反応させた。メンブレンを TBS-Tween で洗浄後、donkey anti-rabbit IgG-HRP antibody (1/5,000) と室温で 1 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、ECL plus Western blotting detection reagents と反応させ、化学発光検出器で露光し、検出されたバンドを解析した。

2-9. 免疫組織化学染色

ラットをエーテルにより麻酔し、心臓内に PBS を灌流した。次いで、4% PFA 溶液を 50 mL 灌流後、大腸を摘出し、4% PFA 溶液中で固定した (4°C、1 時間)。4°C で一晩、30% sucrose 溶液に浸し、OCT compound で包埋した。凍結ブロックをクリオスタットにより 10 μm に薄切し、MAS-coated glass slide に固定した。固定した切片を PBS で洗浄後、blocking buffer で 1 時間ブロッキングした。次いで、一次抗体 [rabbit anti-rat AQP3 (1/200)] で、一晩、4°C でインキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG antibody (1/200) と室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、DAPI solution (1/500) と室温で 30 分間反

応させた。PBS で洗浄した後、vectashield で封入し、蛍光顕微鏡を用いて検出した。

2-10. Hematoxylin-eosin 染色 (HE 染色)

OCT compound で包埋した大腸切片を凍結した。その後、クリオスタットにより 10 μm にカットし、MAS-coated glass slide に固定した。hematoxylin-eosin 溶液で染色し、顕微鏡下で観察した。

2-11. 統計学的有意差検定

実験値は平均値 \pm 標準偏差として表示した。2 群の平均値の有意差検定には、Student's t-テストを用いた。

3. 結果

3-1. 糞中水分量

HgCl₂あるいはCuSO₄をラットに直腸内投与し、1時間後までの糞を回収し、糞中水分量を算出した (Figure 26)。

HgCl₂投与後の糞中水分量は、Control群に比べて約4倍有意に増加し、激しい下痢が認められた (Figure 26A)。CuSO₄投与後の糞中水分量も、HgCl₂投与群と同様に、約4倍有意に増加し、激しい下痢が認められた (Figure 26B)。

これらのことより、大腸のAQP3の機能を抑制すると、激しい下痢が発生することがわかった。

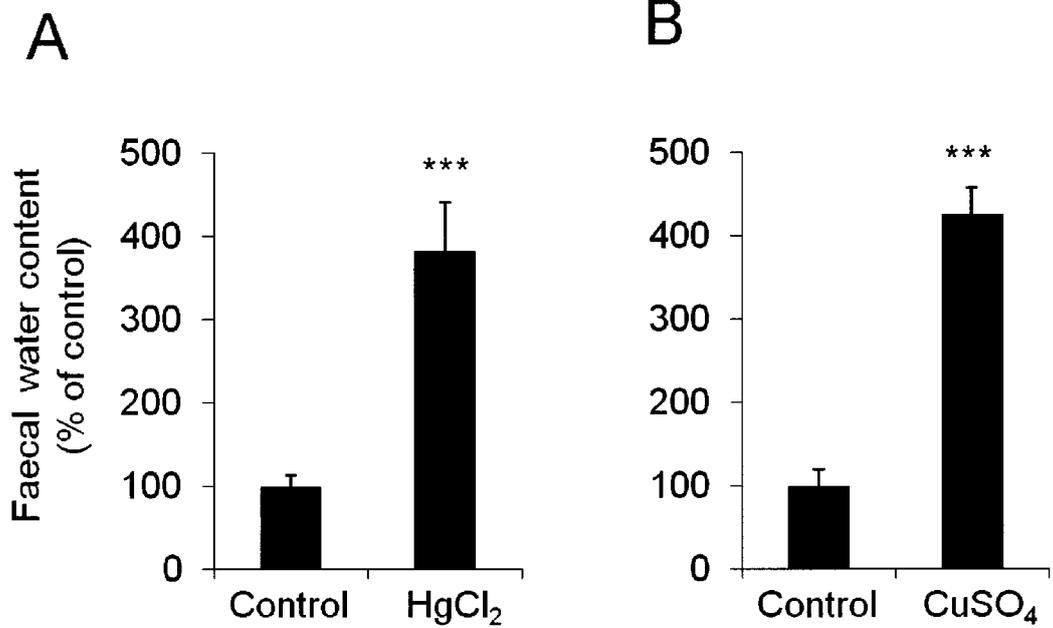


Figure 26 Effect of HgCl₂ and CuSO₄ on faecal water content

The rats were intrarectally administered HgCl₂ (1 mg/kg, A) or CuSO₄ (1 mg/kg, B). Purified water was intrarectally administered to the control group. The faeces were collected 1 h after administration, and the faecal water content was measured. The data are shown using the mean value of faecal water content of the control group was indicated as 100%. The data represent the means \pm SDs for 6 rats. Student's t-test: ***p<0.001 vs. Control.

3-2. 大腸の浸透圧調節関連遺伝子の mRNA 発現量

MgSO₄ 投与時において見られた様に、大腸管腔側の浸透圧が上昇すると、生理的条件下とは逆に、水は血管側から管腔側へと移動し、下痢が発生する。HgCl₂あるいは CuSO₄ 投与による下痢が浸透圧の上昇によるものであるか否かを確認する目的で、投与 1 時間後のラット大腸における SMIT および TauT の mRNA 発現量を測定した (Figure 27)。

HgCl₂ 投与後の大腸における SMIT および TauT の mRNA 発現量は、いずれも Control 群との間に有意な差は認められなかった (Figure 27A)。同様に、CuSO₄ 投与群の SMIT および TauT の mRNA 発現量についても、Control 群との間に差は見られなかった (Figure 27B)。

これらのことより、HgCl₂ あるいは CuSO₄ を大腸内に直接投与しても、大腸内の浸透圧は変化しないことがわかった。

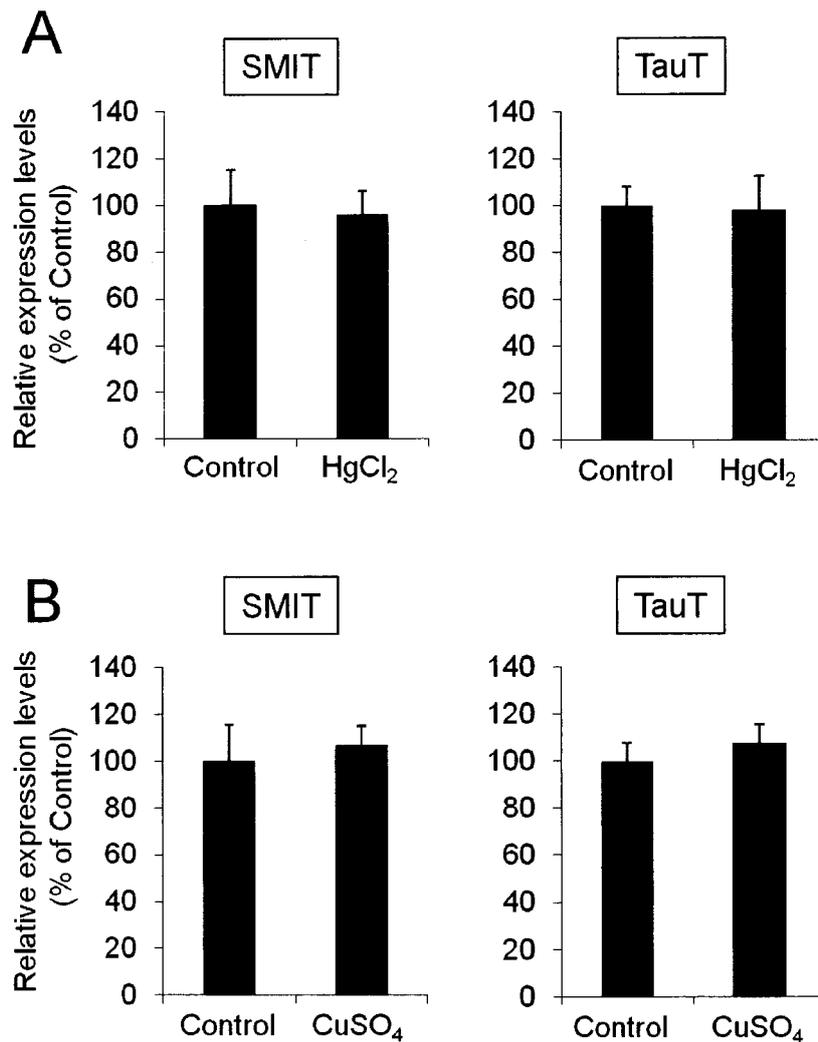


Figure 27 Effect of HgCl₂ and CuSO₄ on SMIT and TauT mRNA expression levels in the rat colon

The rats were intrarectally administered HgCl₂ (1 mg/kg, A) or CuSO₄ (1 mg/kg, B). Purified water was intrarectally administered to the control group. Rat colons were harvested 1 h after treatment. The mRNA expression levels of SMIT and TauT were analysed by real-time RT-PCR. Normalisation was performed against 18S rRNA, and the mean levels of mRNA expression of the control group were indicated as 100%. The data represent the means \pm SDs for 6 rats.

3-3. 大腸 AQP3 のタンパク質発現量

第一章および第二章の結果より、大腸の AQP3 の発現量が変動すると、下痢が発生することがわかった。そこで、HgCl₂あるいは CuSO₄投与による下痢が大腸の AQP3 の発現変動に起因したものであるか否かを確認する目的で、投与 1 時間後のラット大腸における AQP3 のタンパク質発現量を測定した (Figures 28 and 29)。

HgCl₂を投与し、1 時間後における大腸 crude membrane 画分の AQP3 のタンパク質発現量は、Control 群とほぼ同程度であり、両間で差は認められなかった。また、PM 画分および IV 画分においても、Control 群との間に差は見られなかった (Figure 28)。

CuSO₄を投与し、1 時間後における大腸 crude membrane 画分の AQP3 のタンパク質発現量も、Control 群とほぼ同程度であり、両間で差は認められなかった。また、PM 画分および IV 画分においても、Control 群との間に差は見られなかった (Figure 29)。

以上の結果より、HgCl₂あるいは CuSO₄を投与しても、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現量は、変化しないことがわかった。

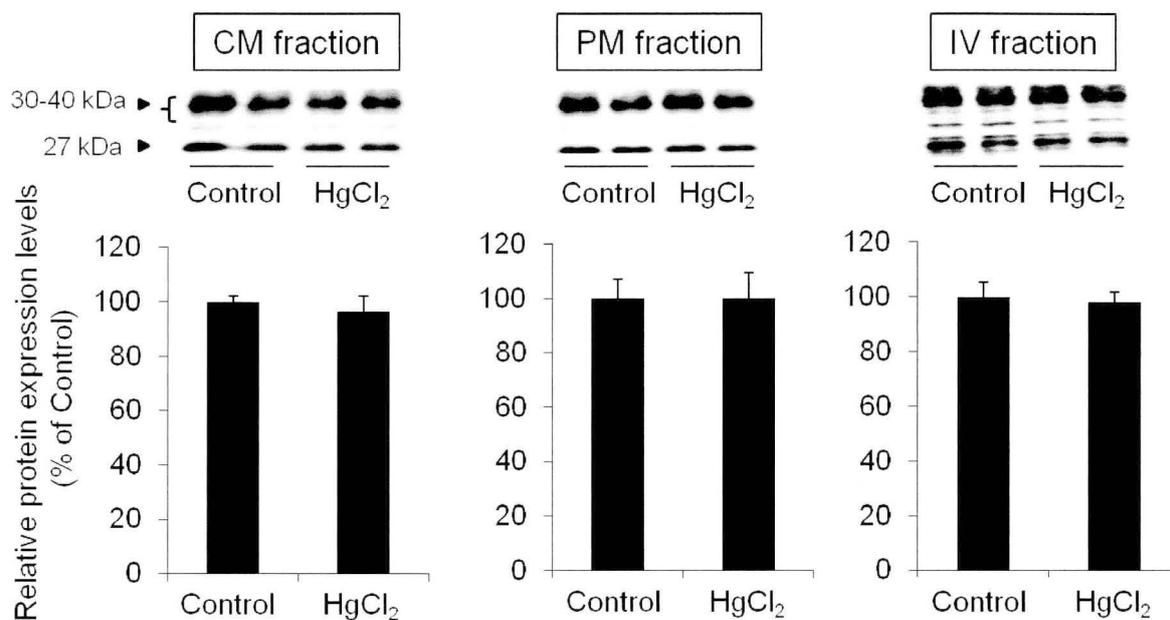


Figure 28 Effect of HgCl₂ on AQP3 protein expression level in the rat colon

The rats were intrarectally administered HgCl₂ (1 mg/kg, A). Purified water was intrarectally administered to the control group. Rat colons were harvested 1 h after treatment. The crude membrane (CM), plasma membrane (PM), and intracellular vesicle (IV) fractions were prepared, and the protein expression levels of AQP3 were analysed by Western blotting. Mean levels of AQP3 protein expression of the control group were indicated as 100%. The data represent the means ± SDs for 6 rats.

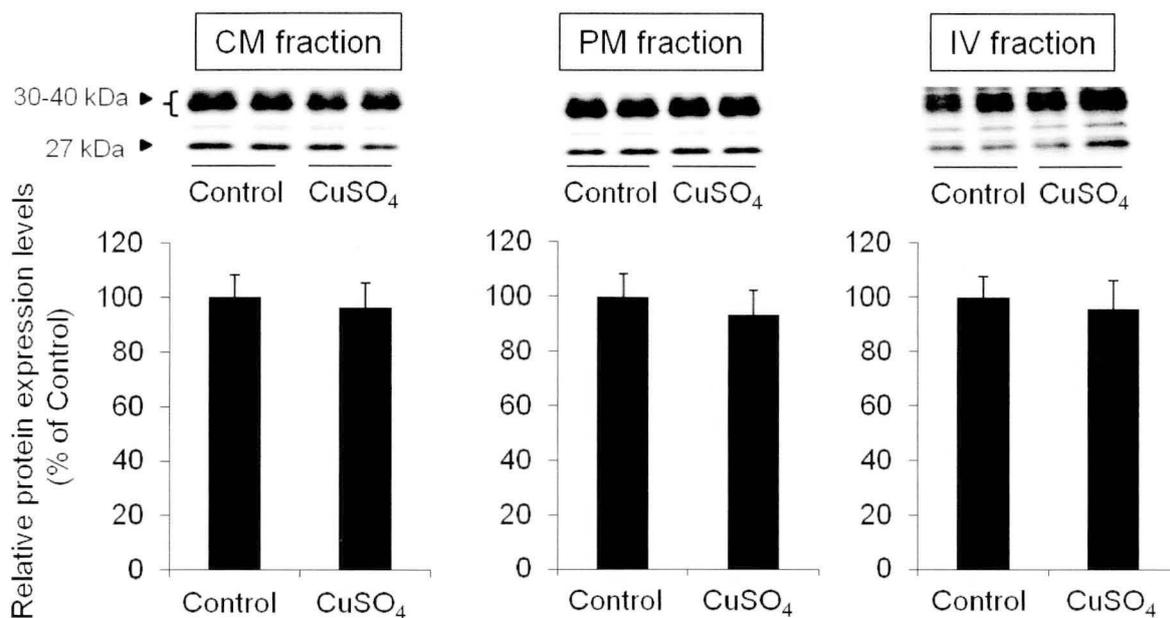


Figure 29 Effect of CuSO₄ on AQP3 protein expression level in the rat colon

The rats were intrarectally administered CuSO₄ (1 mg/kg, B). Purified water was intrarectally administered to the control group. Rat colons were harvested 1 h after treatment. The crude membrane (CM), plasma membrane (PM), and intracellular vesicle (IV) fractions were prepared, and the protein expression levels of AQP3 were analysed by Western blotting. Mean levels of AQP3 protein expression of the control group were indicated as 100%. The data represent the means \pm SDs for 6 rats.

3-4. ラット大腸の AQP3 の発現分布および粘膜障害に及ぼす HgCl₂ および CuSO₄ の影響

すでに、第一章で述べたように、AQP3 は大腸粘膜上皮細胞に局在し、しかも apical 側および basal 側の両側に発現している。この大腸の AQP3 の発現パターンについても、HgCl₂ あるいは CuSO₄ は影響を及ぼさなかった (Figure 30)。

また、大腸組織切片を HE 染色により観察した結果、HgCl₂ あるいは CuSO₄ の投与によって、大腸粘膜障害が起こらないことがわかった (Figure 31)。

これらのことより、HgCl₂ あるいは CuSO₄ は、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現パターンに影響を及ぼさないことがわかった。加えて、大腸粘膜上皮細胞を障害しないことも明らかとなった。

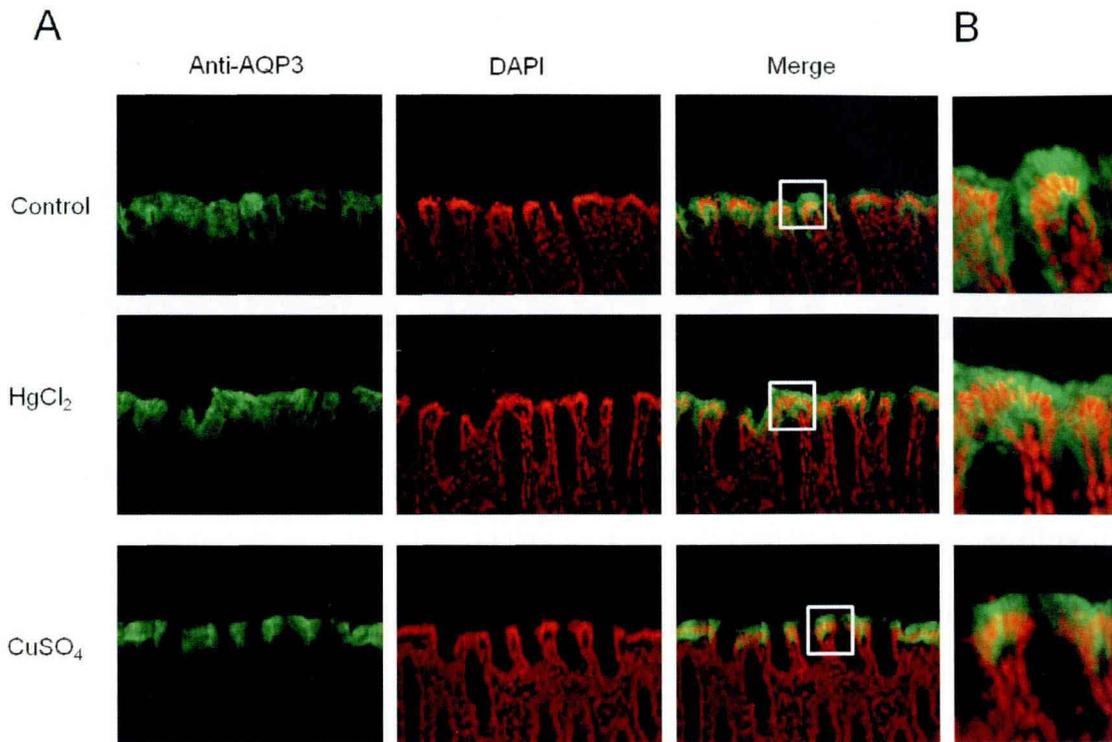


Figure 30 The distribution of AQP3 expression in the colon of rats after the administration of HgCl₂ and CuSO₄

A: The rats were intrarectally administered HgCl₂ (1 mg/kg) or CuSO₄ (1 mg/kg). Purified water was intrarectally administered to the control group. Rat colons were harvested 1 h after treatment. AQP3 (green) and nuclei (red) were immunostained.

B: Enlarged view of AQP3 in the mucosal epithelial cells in the colon of rats.

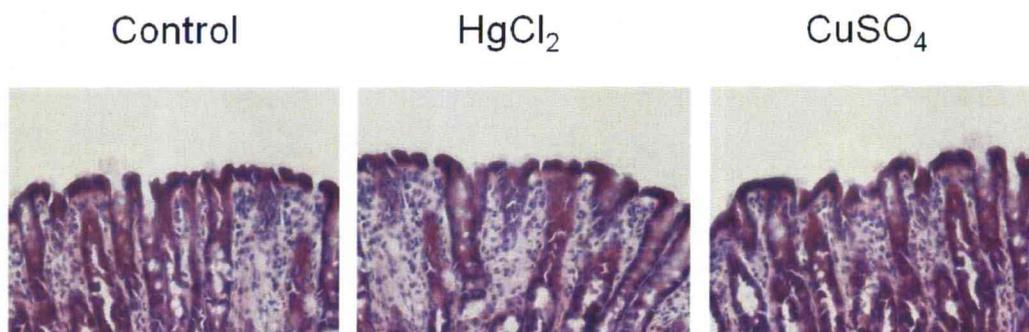


Figure 31 Representative histological sections of colon stained with hematoxylin-eosin

The rats were intrarectally administered HgCl₂ (1 mg/kg) or CuSO₄ (1 mg/kg). Purified water was intrarectally administered to the control group. The colon was removed, and stained using hematoxylin-eosin.

4. 考察

AQPsは6回膜貫通型の膜タンパク質であり、4量体として機能し、水やグリセロールを選択的に透過させる。AQPsはアスパラギン(Asn, N)、プロリン(Pro, P)およびアラニン(Ala, A)からなるNPAボックスを2つ有している。AQPsの水に対する高い選択性は、このNPAボックスにより規制されている(Figure 2)^{10, 11)}。水銀化合物は、NPAボックスの近傍のCys-11に結合することで、AQP3の水の透過を阻害する⁸⁹⁾。一方、銅化合物は、Trp-128、Ser-152およびHis-241の3つのアミノ酸残基に結合することにより、AQP3の水の透過を阻害する⁹⁰⁾。本章では、HgCl₂あるいはCuSO₄をラットに直腸内投与し、大腸AQP3の機能を阻害した際に糞中水分量がどのように変化するかについて検討した。

HgCl₂およびCuSO₄はin vitro試験において、それぞれ0.3 mMおよび1.0 mMの濃度で、AQP3の水の透過性を約50-70%程度阻害することが報告されている⁸⁹⁻⁹¹⁾。本試験では、1.5 mMのHgCl₂溶液および3.0 mMのCuSO₄溶液を調製し、直腸内に直接投与した(1 mg/kg)。ラットにHgCl₂あるいはCuSO₄を直腸内投与した結果、糞中水分量はいずれも、Control群に比べて約4倍有意に増加し、重度の下痢を発生した(Figure 26)。これらの結果より、大腸のAQP3の機能を阻害すると、管腔側から血管側への水の吸収が抑制され、下痢が発症することが確認できた。

AQP3は浸透圧勾配に従って、水を輸送する。したがって、大腸管腔側の浸透圧が上昇すると、生理的条件下とは逆に、水は血管側から管腔側へと移動し、下痢が発生する。そこで、HgCl₂あるいはCuSO₄を直腸内に投与した際の管腔内浸透圧を調べた。浸透圧の変動に敏速に反応する浸透圧関連遺伝子^{37-39, 63, 64)}SMITおよびTauTのmRNAの発現量を調べた結果、HgCl₂あるいはCuSO₄を投与しても、これらのmRNA発現量は変化しなかった(Figure 27)。以上のことから、HgCl₂およびCuSO₄投与による下痢は、直腸内の浸透圧の上昇によるものではないことが確認できた。

第一章および第二章に述べたように、大腸の AQP3 の発現量が変動すると、下痢が発生する。そこで、HgCl₂ および CuSO₄ によって、大腸の AQP3 の発現が変動したか否かを確認した。その結果、大腸の AQP3 の発現量および発現パターンは、HgCl₂ あるいは CuSO₄ の投与により、変化しないことがわかった (Figures 28-30)。これらのことから、HgCl₂ および CuSO₄ 投与による下痢は、AQP3 の発現変動によるものではないことが確認できた。

一方、大腸粘膜が障害を受けると、下痢が発生することが知られている^{92, 93)}。Figure 31 に示したように、HgCl₂ あるいは CuSO₄ を投与しても大腸粘膜の障害は認められなかった。したがって、HgCl₂ あるいは CuSO₄ 投与による下痢は、大腸粘膜の障害に起因したものではないことが確認できた。

本章の結果から、大腸粘膜上皮細胞に局在する AQP3 の機能を阻害すると、下痢が発生することがわかった。また、生理的条件下では、AQP3 を介して、水は管腔側から血管側に輸送され、糞中水分量が調節されていることも確認できた。

これまで、MgSO₄ の瀉下作用においては、大腸 AQP3 の発現増加が重要な役割を担っていること、ビスコジルの瀉下作用においては、大腸 AQP3 の発現低下が重要な役割を担っていることを述べた。しかし、本章の結果は、両化合物の瀉下作用において、AQP3 の機能変化についても調べる必要性があることを示している。本研究においては、両化合物の AQP3 の機能に及ぼす影響については検討しなかったが、以下の理由により、MgSO₄ やビスコジルは AQP3 の機能に対しては、ほとんど抑制的に働いていないか、あるいは機能の阻害が下痢発生において、さほど重要な役割を担っていないものと考えられる。すなわち、1) Mg は AQP3 を阻害しないことが報告されている⁹⁴⁾。2) ビスコジルに関しては、AQP3 の機能を阻害するとの報告はない。しかし、ビスコジル投与により、AQP3 の発現量が 80% 減少するため、このことだけでも、激しい下痢が発生する。したがって、仮にビスコジルによって AQP3 の機能が阻害されても、下痢の発生に対してはそれほど重要な役割を担っていない。

【第四章】

MgSO₄ とピサコジルとの併用効果およびそのメカニズムの解明

1. 緒言

臨床において、重度な便秘症患者には、第一選択薬として浸透圧性下剤（MgSO₄ や MgO）が処方され、効果が認められない場合には大腸刺激性下剤（ピサコジルやセンノシド）など、作用メカニズムが異なる瀉下剤が併用される^{95, 96)}。しかし、瀉下剤の併用により、瀉下作用が増強するかどうかについての明確なエビデンスはない。

一方、第一章において、MgSO₄ の瀉下作用が単に腸管内の浸透圧の上昇のみでもたらされるものではなく、大腸粘膜上皮細胞における AQP3 の発現量の増加を伴って、極めて合理的に生じている可能性を示した。また、第二章において、ピサコジルに関しては、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現量を低下させ、腸管から血管側への水の吸収を抑制することが、瀉下作用のメカニズムであることを明らかにした。このように、MgSO₄ もピサコジルも、大腸の AQP3 の発現を制御することにより、瀉下作用を示すことが明らかとなったが、両薬剤で AQP3 の発現制御の方向が反対であった。

そこで本章では、浸透圧性下剤と大腸刺激性下剤を併用した場合、瀉下作用が増強するか否かをラットを用いて調べた。まず、ラットに MgSO₄ 単独、ピサコジル単独あるいは MgSO₄ とピサコジルを同時に経口投与した場合の瀉下作用を比較検討した。次に、大腸内浸透圧および大腸 AQP3 の発現量と下痢との関係を調べることにより、両薬剤併用時の瀉下作用に関するメカニズムを解明した。

2. 方法

2-1. 試薬

MgSO₄ · 7H₂O および bisacodyl は、和光純薬工業株式会社（大阪，日本）から購入した。BSA および TRI reagent は、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) から購入した。各種プライマーは、インビトロジェン（東京，日本）から購入した。High capacity cDNA synthesis kit は、Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。iQ SYBR green supermix は、Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) から購入した。Rabbit anti-rat AQP3 antibody は、Alomone Labs (Jerusalem, Israel) から購入した。Donkey anti-rabbit IgG-HRP antibody は、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。ECL plus Western blotting detection reagents は、GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) から購入した。その他の試薬は、市販されている物の内、最もグレードの高い物を購入した。

2-2. 動物

10 週齢の雄性 Wistar 系ラットは日本エスエルシー株式会社（静岡，日本）から購入した。動物は温度 24±1°C、湿度 55±5% の施設において飼育し、明暗条件は 8 : 00 点灯、20 : 00 消灯の条件下で飼育した。

本動物実験は、実験動物の適正な使用および管理について定められた星薬科大学動物センター管理運営規程に準じて行われた。

2-3. 瀉下剤の投与方法

ラットを 4 群に分け、Control 群、MgSO₄ 投与群、ピサコジル投与群および併用群

(MgSO₄+ビスコジル)とした。瀉下剤投与 18 時間前よりラットを絶食した（飲水は自由）。MgSO₄ (2 g/kg あるいは 4 g/kg) 単独、ビスコジル (20 mg/kg あるいは 40 mg/kg) 単独あるいは MgSO₄ (2 g/kg) とビスコジル (20 mg/kg) を同時にラットに経口投与した。Control 群には精製水を経口投与した。投与 5 時間後にエーテル麻酔下で解剖し、大腸を摘出した。PBS を用いて大腸を洗浄した後、液体窒素により瞬時冷凍し、-80°C で保存した。

2-4. 糞中水分量の測定

瀉下剤を経口投与したラットについて、投与 10 時間後まで経時的に糞を採取し、シリカゲル入りのデシケータ内で 24 時間乾燥した。糞湿質量および乾燥質量から糞 1 g に含まれる水分量を算出した。

2-5. 大腸からの RNA の抽出

凍結した大腸約 15 mg から TRI reagent を用いて RNA を抽出した。得られた溶液を TE buffer を用いて 50 倍希釈し、分光光度計により、260 nm および 280 nm の吸光度を測定することで、純度の確認および RNA 濃度 (μg/mL) の算出を行った。

2-6. Real-time RT-PCR

RNA 1 μg から High capacity cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。これを TE buffer にて 20 倍希釈し、cDNA TE buffer 溶液とした。Table 8 に示すプライマーを作成し、real-time PCR を行い、各遺伝子の発現を検出した。すなわち、PCR plates の各 well に iQ SYBR green supermix 25 μL、目的遺伝子の Forward primer

(5 pmol/μL) 3 μL、Reverse primer (5 pmol/μL) 3 μL、cDNA TE buffer 溶液 4 μL、RNase free water 15 μL を加えた。温度条件は denaturation temperature として 95°C で 15 秒、annealing temperature として 56°C で 30 秒、elongation temperature として 72°C で 30 秒とした。増幅過程の蛍光強度を My iQ™ single color real-time PCR detection system によりモニタリングした。mRNA 発現量は 18S rRNA を用いてノーマライズした。

Table 8 Primer sequences of mRNA

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
rSMIT	AGGAGTCCTTGGGTTGGAAC	ACTGCAACAAGGCCTCCAG
rTauT	GTTCTGGGAGCGCAACGT	ACCGAACACCCTTCCAGATG
r18S rRNA	GTCTGTGATGCCCTTAGATG	AGCTTATGACCCGCACTTAC

SMIT: sodium myo-inositol transporter, TauT: taurine transporter

2-7. 大腸の膜画分の調製

ラット大腸からかきとった粘膜を dissecting buffer に懸濁し、氷上で digital homogenizer を用いてホモジナイズ (1,250 rpm、5 stroke) した。ホモジネートを遠心分離 (800×g、15 分、4°C) し、得られた上清を遠心分離 (200,000×g、60 分、4°C) した。上清を除去し、沈殿に dissecting buffer を加え、超音波分散機により分散させた。この溶液を、細胞全体の膜を含む crude membrane 画分とした³⁰⁾。

2-8. 電気泳動およびウエスタンブロットティング法

タンパク質濃度は、BCA 法⁶⁹⁾を用いて測定した。標準品には BSA を用いた。

電気泳動は、Laemmli 法³⁴⁾に基づいて行った。タンパク質を loading buffer で 2 倍希釈し、ポリアクリルアミドゲルにアプライした。電気泳動後、分離されたタンパク質はセミドライブロットティング装置を用いて、PVDF メンブレンに転写した。1% スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った後、rabbit anti-rat AQP3 antibody (1/500) と室温で 1 時間反応させた。メンブレンを TBS-Tween で洗浄後、donkey anti-rabbit IgG-HRP antibody (1/5,000) と室温で 1 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、ECL plus Western blotting detection reagents と反応させ、化学発光検出器で露光し、検出されたバンドを解析した。

2-9. 統計学的有意差検定

実験値は平均値±標準偏差として表示した。2 群の平均値の有意差検定には Student's t-テストおよび平均値の多重比較には Dunnett 法を用いた。

3. 結果

3-1. 併用時の糞中水分量の変化

ラットに MgSO_4 単独、ビサコジル単独あるいは MgSO_4 とビサコジルを併用投与した際の糞中水分量を経時的に測定した (Figure 32)。

MgSO_4 (2 g/kg) 単独投与後の糞中水分量は、経時的に増加し、投与 2 時間目以降から、投与直後 (0 h) に比べて有意な上昇が認められた。投与 8 時間後にはピーク値を示し、その値は 0 h の約 9 倍であった (Figure 32A)。また、4 時間後から 8 時間後にかけて、激しい下痢が見られた。

ビサコジル (20 mg/kg) 単独投与後の糞中水分量は、経時的に増加し、投与 2 時間目以降から、投与直後に比べて有意な上昇が認められた。投与 5 時間後にはピーク値を示し、その値は 0 h の約 7 倍であった (Figure 32B)。また、4 時間後から 8 時間後にかけて激しい下痢が見られた。

MgSO_4 (2 g/kg) とビサコジル (20 mg/kg) を併用投与した際の糞中水分量の変動パターンおよび変化率 (area under the curve; AUC) には、両薬剤の相加効果あるいは相乗効果は見られず、ビサコジル単独投与時のそれらとほぼ同様であった (Figures 32D and 32E)。すなわち、併用投与したラットの糞中水分量は、投与 2 時間目以降から、投与直後に比べて有意な上昇が認められ、投与 5 時間後にはピーク値を示し、その値は 0 h の約 7 倍であった。また、4 時間後から 8 時間後にかけて激しい下痢が見られた (Figure 32C)。

以上の結果より、 MgSO_4 とビサコジルを併用した際の糞中水分量の変動パターンおよび変化率は、ビサコジル単独投与の場合のそれらと同様であることがわかった。

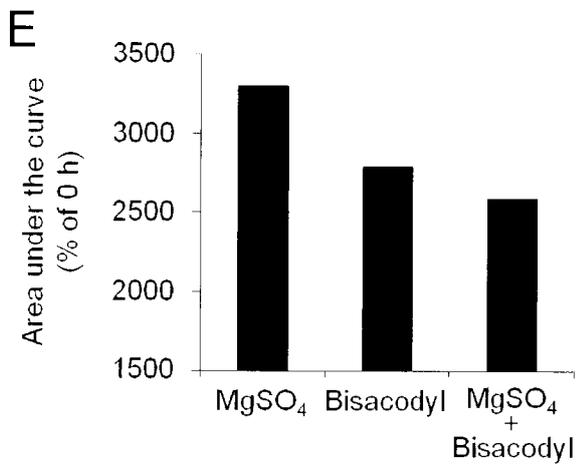
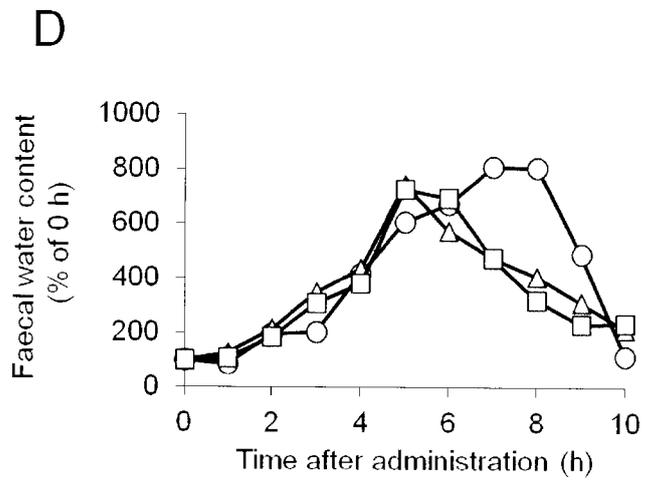
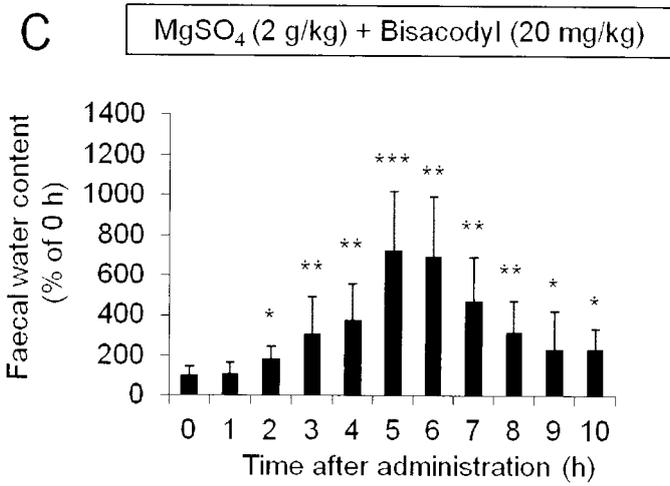
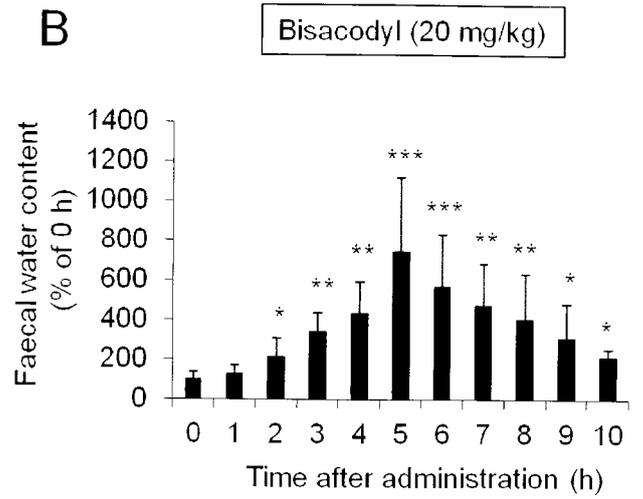
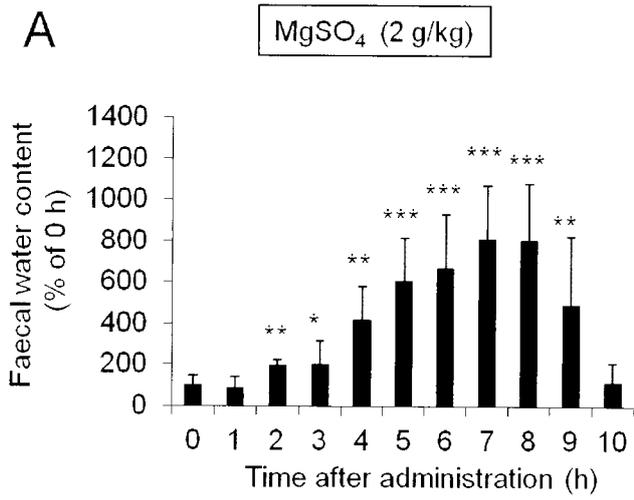


Figure 32 Effect of combination of MgSO₄ and bisacodyl on faecal water content

The rats were orally administered MgSO₄ (2 g/kg) alone (A, ○), bisacodyl (20 mg/kg) alone (B, Δ), or a combination of MgSO₄ (2 g/kg) and bisacodyl (20 mg/kg) (C, □). The faeces were periodically collected from immediately after administration to 10 h after administration, and the faecal water content was measured (D). The area under the curve of stool water content (0 h-10 h) was calculated with the linear trapezoidal rule (E). The data are shown using the mean value of faecal water content immediately after administration of the laxative (0 h) as 100%. The data represent the means ± SDs for 6 rats. Dunnett's test: *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 vs. 0 h.

3-2. MgSO₄あるいはピサコジルの投与量と瀉下作用の関係

MgSO₄ (2 g/kg) あるいはピサコジル (20 mg/kg) の単独投与時の瀉下作用が、投与量の増加に伴い、増強するか否かを確認した。すなわち、それぞれ倍量の 4 g/kg の MgSO₄ あるいは 40 mg/kg のピサコジルを経口投与し、ピーク値の糞中水分量を調べた (Figure 33)。その結果、4 g/kg で MgSO₄ を投与した際の糞中水分量のピーク値 (7 時間後の糞中水分量) は、2 g/kg で MgSO₄ を投与した時に比べて、約 1.7 倍有意に高い値を示すことがわかった。また、40 mg/kg でピサコジルを投与した時の糞中水分量のピーク値 (投与 5 時間後の糞中水分量) も、20 mg/kg で投与した時と比べて、約 1.5 倍有意に高い値を示すことが示された (Figure 33)。なお、両薬剤とも、いずれの投与量においても、下痢が発生した。

これらのことより、2 g/kg の MgSO₄ および 20 mg/kg のピサコジルは、最大瀉下作用を示す投与量ではなく、これらの瀉下作用は、投与量を増量することにより、さらに増強することがわかった。

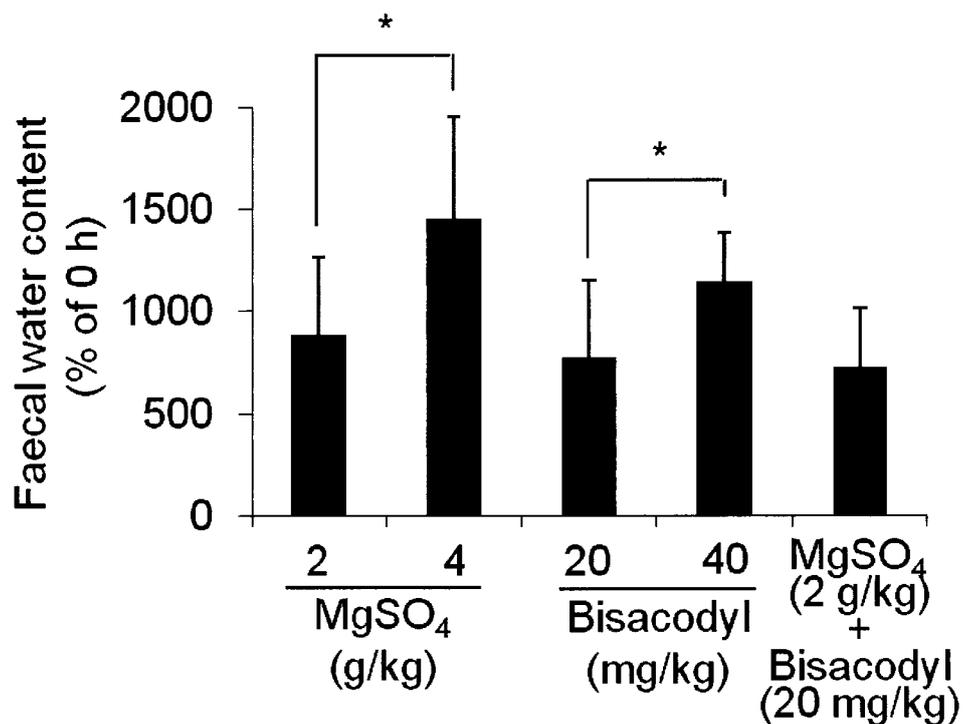


Figure 33 Effect of MgSO₄ and bisacodyl on faecal water content

The rats were orally administered MgSO₄ alone (2 g/kg or 4 g/kg), bisacodyl alone (20 mg/kg or 40 mg/kg), or a combination of MgSO₄ (2 g/kg) and bisacodyl (20 mg/kg), and the peak value of faecal water content was measured. The data are shown using the mean value of faecal water content immediately after administration of the laxative (0 h) as 100%. The data represent the means \pm SDs for 6 rats. Dunnett's test: * $p < 0.05$.

3-3. 大腸の浸透圧調節関連遺伝子の mRNA 発現量

大腸管腔側の浸透圧が上昇すると、生理的条件下とは逆に、水は血管側から管腔側へと移動し、下痢が発生する。そこで、瀉下剤投与後のラット大腸の浸透圧の変化を調べる目的で、大腸の SMIT および TauT の mRNA 発現量を測定した (Figure 34)。

MgSO₄ を単独投与し、5 時間後における大腸の SMIT の mRNA 発現量は、Control 群に比べて、約 2.4 倍有意に高かった。また、大腸の TauT の mRNA 発現量も約 1.5 倍有意に高かった。これに対して、ビスコジルを単独投与し、5 時間後における大腸の SMIT および TauT の mRNA 発現量は、いずれも Control 群とほぼ同程度であった。

一方、MgSO₄ とビスコジルを併用投与し、5 時間後における大腸の SMIT および TauT の mRNA 発現量は、Control 群に比べて、それぞれ約 2.1 倍および約 1.4 倍有意に高かった。

以上の結果から、MgSO₄ とビスコジルを併用投与した際の大腸内浸透圧は、MgSO₄ 単独投与時とほぼ同程度であることがわかった。

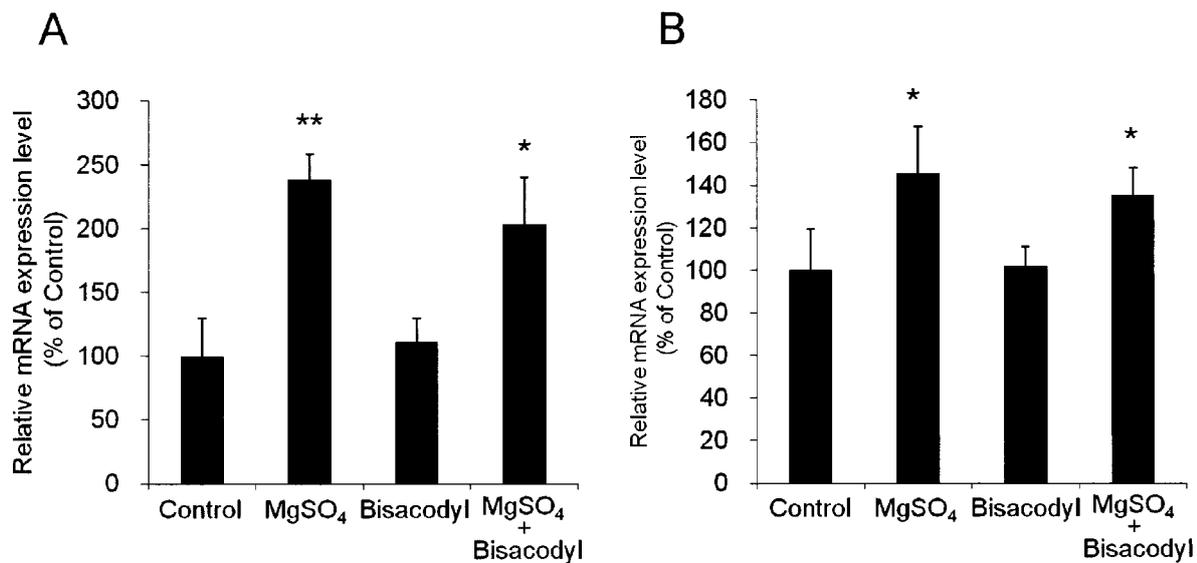


Figure 34 Effect of combination of MgSO₄ and bisacodyl on SMIT (A) and TauT (B) mRNA expression levels in the rat colon

The rats were orally administered MgSO₄ (2 g/kg) alone, bisacodyl (20 mg/kg) alone, or a combination of MgSO₄ (2 g/kg) and bisacodyl (20 mg/kg). Purified water was orally administered to the control group. Rat colons were harvested 5 h after treatment. The mRNA expression levels of SMIT (A) and TauT (B) were analysed by real-time RT-PCR. Normalisation was performed against 18S rRNA, and the mean levels of mRNA expression of the control group were indicated as 100%. The data represent the means \pm SDs for 6 rats. Dunnett's test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group.

3-4. 大腸の AQP3 のタンパク質発現量

MgSO₄ とビサコジルを併用投与した際に、大腸の AQP3 の発現量がどのように変動するかについて調べた (Figure 35)。

MgSO₄ を単独投与し、5 時間後における大腸 crude membrane 画分の AQP3 のタンパク質発現量は、Control 群に比べて、約 6 倍有意に高かった (Figure 35A)。これに対して、ビサコジルを単独投与し、5 時間後における大腸の AQP3 のタンパク質発現量は、Control 群に比べて、約 80% 低下した (Figure 35B)。

一方、MgSO₄ とビサコジルを併用投与し、5 時間後における大腸の AQP3 のタンパク質発現量は、Control 群に比べて、約 70% 低下した (Figure 35C)。

以上の結果から、MgSO₄ とビサコジルを併用投与すると、大腸の AQP3 のタンパク質発現量は低下し、この低下率はビサコジル単独投与時とほぼ同程度であることがわかった。

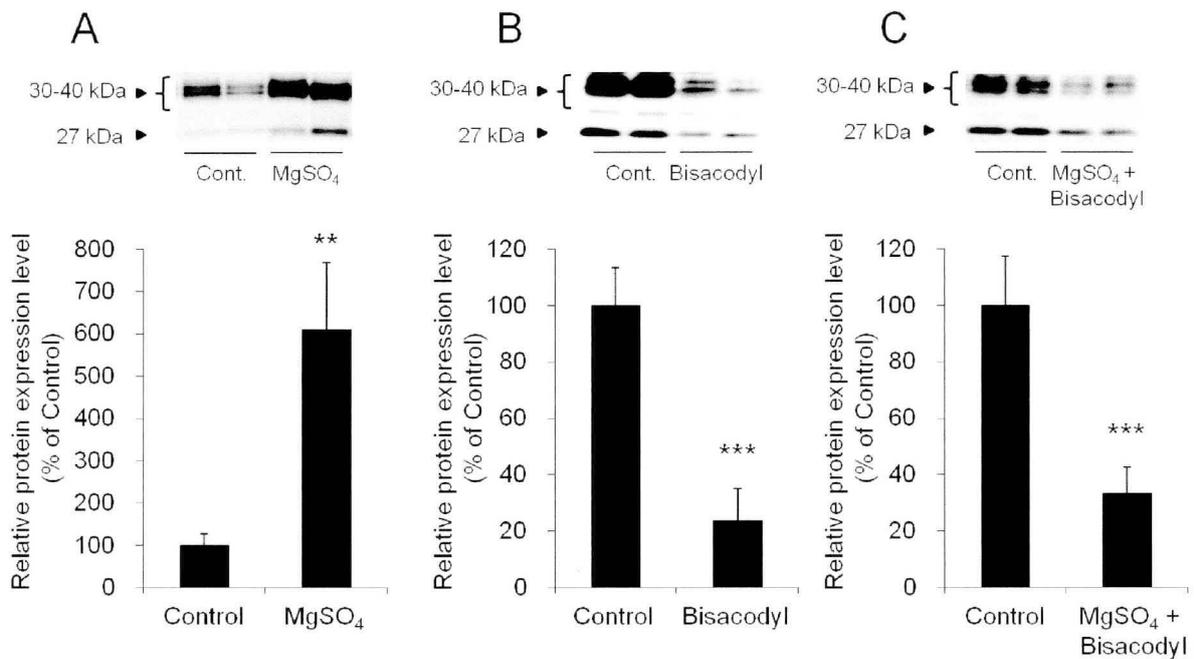


Figure 35 Effect of combination of MgSO₄ and bisacodyl on AQP3 protein expression level in the rat colon

The rats were orally administered MgSO₄ (2 g/kg) alone, bisacodyl (20 mg/kg) alone, or a combination of MgSO₄ (2 g/kg) and bisacodyl (20 mg/kg). Purified water was orally administered to the control group. Rat colons were harvested 5 h after administrations. The crude membrane was prepared, and the protein expression levels of AQP3 were analysed by Western blotting. Mean levels of AQP3 protein expression of the control group were indicated as 100%. The data represent the means \pm SDs for 6 rats. Student's t-test: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

4. 考察

便秘症では一般的に、浸透圧性下剤が第一選択薬として用いられ、効果が不十分である場合には、大腸刺激性下剤などの作用機序が異なる瀉下剤が併用される。しかし、瀉下剤の併用により、瀉下作用が増強するか否かについての明確なエビデンスはない。そこで本章では、作用機序が異なる瀉下剤 (MgSO_4 およびピサコジル) を併用した場合、瀉下作用が単独時に比べて増強するか否かをラットを用いて検討した。

MgSO_4 (2 g/kg) あるいはピサコジル (20 mg/kg) をそれぞれ単独で経口投与した際には、いずれも糞中水分量が投与 2 時間後から有意に増加し、投与 4 時間後から 8 時間後にかけて、激しい下痢が認められた。一方、 MgSO_4 (2 g/kg) とピサコジル (20 mg/kg) を併用投与したラットの糞中水分量の変動パターンおよび変化率 (AUC) は、ピサコジル単独投与時とほぼ同じであった (Figure 32)。

ここで、両薬剤を併用した際に糞中水分量が増加しなかった理由として、2 g/kg および 20 mg/kg の投与量が、それぞれ両薬剤の最大瀉下効果を示す投与量ではないかとの疑問が生じた。そこで、このことを確かめる目的で、両薬剤の投与量を増加した時の瀉下効果を検討した。その結果、両薬剤ともに、投与量を増加させると瀉下効果も増強することがわかった (Figure 33)。このことより、両薬剤を併用した際に瀉下効果が増強しなかった理由が、投与量の問題ではないことが確認できた。

それではなぜ、 MgSO_4 とピサコジルを併用した場合に、瀉下作用が増強しなかったのか。生理的条件下においては、大腸の管腔内の浸透圧は血管側のそれに比べて低い²³⁾ため、水は腸管側から血管側に輸送され、糞の濃縮が行われる²³⁾。大腸の上皮細胞は tight junction が強固なため、大腸での水の輸送は、大腸粘膜上皮細胞に優位に発現している AQP3 を介して行われている。すでに述べたように、 MgSO_4 は腸管内浸透圧を増加させると同時に、大腸 AQP3 の発現量を増加させるため、水が血管側から管腔側に効率よく分泌され、瀉下作用を示す (第一章)。一方、ピサコジルは腸管内

浸透圧を変化させずに、AQP3 の発現量を低下させるため、管腔側から血管側への水の吸収が抑制され、このことにより、腸管内に水が貯留するため、瀉下作用を示す（第二章）。したがって、ビサコジル投与時に比べ、MgSO₄ 投与時の方が瀉下作用が強くなる可能性が考えられる。MgSO₄ とビサコジルを併用した場合、大腸内の浸透圧は上昇していたものの、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現量は、著明に低下していた（Figures 34 and 35）。しかも、この AQP3 の発現低下の程度は、ビサコジル単独投与群とほぼ同程度であった（Figure 35）。水の移動速度は浸透圧差よりもむしろ、AQPs の発現量に依存していることが明らかになっている^{65, 66}。それゆえ、併用投与時に腸管内の浸透圧が上昇しても、AQP3 が低下していたため、血管側から管腔側への水の移動はほとんど起こらず、ビサコジルの場合と同様に、水の吸収阻害のみが起こり、それによって、下痢が発生したものと考える。このように、MgSO₄ とビサコジルを併用しても瀉下作用は増強せず、むしろ MgSO₄ 単独投与時よりも瀉下作用は減弱し、ビサコジルと同程度の瀉下作用を示すことがわかった。

それではなぜ、MgSO₄ とビサコジルを併用すると、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現パターンがビサコジルのそれと同様になるのだろうか。MgSO₄ は大腸粘膜上皮細胞のアデニル酸シクラーゼおよびプロテインキナーゼ A の活性化、CREB のリン酸化の亢進を介して、AQP3 の発現量を増加させる（第一章）。一方、ビサコジルは大腸粘膜固有層のマクロファージの活性化、TNF- α の産生亢進、COX2 の活性化および PGE₂ の産生亢進を介して AQP3 の発現を減少させる（第二章）。この一連のカスケードにおいて、PGE₂ は endocytosis により、AQP3 を減少させると考えられ、この作用は迅速でかつ著明である^{83, 84}。このように、両メカニズムには交差したところはなく、それぞれが独立したメカニズムで瀉下作用を発現している。したがって、MgSO₄ とビサコジルを併用した場合には、MgSO₄ による AQP3 の増加よりもむしろ、ビサコジルによる AQP3 の低下の方が強くあらわれ、結果的に大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現量は、ビサコジル単独のそれとほぼ同一の値を示したものと思われる。

以上をまとめると、MgSO₄とピサコジルを併用した場合、MgSO₄単独時よりもむしろ瀉下作用は減弱し、ピサコジル単独の場合と同程度の瀉下作用がおこることがわかった。さらに、この理由として、MgSO₄とピサコジルを併用した場合の大腸粘膜上皮細胞のAQP3の発現パターンが、ピサコジル単独投与時とほぼ同様になるためであると考えられた。

現在、重度な便秘症患者に対して、エビデンスが希薄にもかかわらず、作用機序が異なる複数の瀉下剤が併用されている。薬物の服用数の増加は、薬物間相互作用の増加につながる。瀉下剤の併用が必ずしも瀉下作用を増強しないことから考えても、今後、瀉下剤に関しても、その治療効果に対するエビデンスを明確にし、適正使用を図ることが必要であると考えられる。

【総括】

近年、不規則な食事や生活、食物繊維や水分の摂取不足、過度のストレス、瀉下剤の乱用、運動不足、高齢化に伴う腸管機能の低下などにより、便秘症が問題となっている。また、緩和医療に用いられるモルヒネなどのオピオイドの副作用による便秘症も、患者の quality of life (QOL) の観点から重要な課題となっている。

一方、臨床において、重度な便秘症患者には、第一選択薬として浸透圧性下剤 (MgSO_4 や MgO) が処方され、効果が認められない場合には大腸刺激性下剤 (ピサコジルやセンノシド) など、作用機序が異なる瀉下剤が併用される。

浸透圧性下剤は消化管ではほとんど吸収されず、腸管内の浸透圧を上昇させることにより、生理的条件下とは逆に、水を血管側から管腔側へと移動させるため、下痢が発生すると考えられている。一方、大腸刺激性下剤は、大腸の PGE_2 の産生を促進し、 Na^+, K^+ -ATPase の活性を阻害することにより、腸管内浸透圧を高め、腸管側から血管側への水の吸収を減弱させるため、瀉下作用を発現すると考えられている。また、大腸刺激性下剤は腸管の蠕動運動を促進することも、瀉下作用のメカニズムの一つと考えられている。しかしながら、これら瀉下剤が大腸において、どのようなメカニズムで水を移動させるかについての詳細は全く不明であった。しかも、複数の瀉下剤が併用されているのにもかかわらず、併用効果に関するエビデンスはほとんどなかった。

一方、大腸の上皮細胞は tight junction が強固なため、大腸での水の輸送は、大腸粘膜上皮細胞に優位に発現している水チャネルである AQP3 を介して行われると考えられている。しかしながら、大腸における AQP3 を介した水の輸送については、ほとんど解明されていなかった。

そこで本研究では、AQP3 に着目し、浸透圧性下剤および大腸刺激性下剤の瀉下作用における AQP3 の役割を明確にするとともに、両薬剤の併用効果を解明することにより、瀉下剤を適正に使用するためのエビデンスを提供することを試みた。本研究で

は、浸透圧性下剤として MgSO_4 を、大腸刺激性下剤としてピサコジルを用い、以下の検討を行った。

1. ラットに MgSO_4 を経口投与した際の糞中水分量と大腸 AQP3 の発現変動の関係を解析するとともに、AQP3 の発現変動メカニズムを検討した。
2. ラットにピサコジルを経口投与した際の糞中水分量と大腸 AQP3 の発現変動の関係を解析するとともに、AQP3 の発現変動メカニズムを検討した。
3. AQP3 活性化阻害剤である HgCl_2 および CuSO_4 を用いて、大腸での水の輸送における AQP3 の役割について検討した。
4. MgSO_4 とピサコジルとを併用した場合に、瀉下作用がどのように変化するかについて調べるとともに、そのメカニズムについて検討した。

1. MgSO_4 の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割および AQP3 発現変動メカニズムの解明

浸透圧性下剤 MgSO_4 の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割について検討した。まず、ラットに MgSO_4 (2 g/kg) を経口投与し、糞中水分量の変動と大腸内浸透圧あるいは AQP3 発現量の変動との関係について検討した。その結果、糞中水分量は MgSO_4 投与により、2 時間目以降有意に増加し、投与 4 時間後から 8 時間後にかけて、重度の下痢が発生することがわかった。それに対して、大腸内浸透圧は 2 時間後にはピークに達し、浸透圧の変動パターンと下痢発生のパターンが異なることが明らかとなった。このことより、 MgSO_4 による瀉下作用は、従来から考えられている腸管内浸透圧の上昇のみでは説明できないことが明らかとなった。一方、大腸 AQP3 のタンパク質発現量は、 MgSO_4 投与により経時的に増加し、この変化と下痢発生の経時変化が符合することがわかった。以上の結果から、 MgSO_4 の瀉下作用が単に浸透圧の変化

のみによってもたらされるものではなく、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現増加を伴って、極めて合理的に生じている可能性が示唆された。

次に、MgSO₄による大腸 AQP3 の発現増加メカニズムをヒト結腸癌由来 HT-29 細胞を用いて調べた。MgSO₄は水溶液中で Mg²⁺と SO₄²⁻に解離し、浸透圧を上昇させる。一方、AQP3 は浸透圧の上昇に伴い、発現量が増加する。そこで、MgSO₄による AQP3 の発現増加が浸透圧の上昇に起因するものであるか否かを検討した。その結果、MgSO₄による AQP3 の発現増加は、浸透圧の上昇に起因したものではないことが明らかとなった。

続いて、MgSO₄による AQP3 の発現増加作用が Mg²⁺あるいは SO₄²⁻に起因するものであるか否かについて、種々のマグネシウム塩および硫酸塩を用いて検討した。その結果、MgSO₄による AQP3 の発現増加には、SO₄²⁻は関与せず、Mg²⁺のみが重要な役割を担っていることが明らかとなった。

細胞内に取り込まれた Mg は、アデニル酸シクラーゼを活性化することが知られている。さらに、アデニル酸シクラーゼの活性化は、cAMP を増加させ、プロテインキナーゼ A の活性化を介して、核内転写因子 cAMP-response element-binding protein (CREB) をリン酸化することが知られている。リン酸化された CREB は、AQPs の転写を促進し、発現量を増加させる。そこで、MgSO₄による AQP3 発現増加メカニズムについて、この経路に焦点を絞り検討した。その結果、MgSO₄は細胞内 Mg 濃度を増加させること、アデニル酸シクラーゼおよびプロテインキナーゼ A を活性化すること、および CREB のリン酸化を亢進することが明らかとなった。

以上の結果から、MgSO₄は細胞内 Mg 濃度を増加させることにより、アデニル酸シクラーゼ活性、プロテインキナーゼ A 活性および CREB のリン酸化を亢進させ、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 を増加させることが明らかとなった。

2. ビサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割および AQP3 発現変動メカニズ

ムの解明

ビサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割を検討した。ラットにビサコジル (20 mg/kg) を経口投与したところ、大腸の AQP3 のタンパク質発現量が投与 2 時間後から著明に低下した。また、AQP3 の発現低下と下痢発生の経時変化が相関していた。以上の結果から、ビサコジルは大腸の AQP3 の発現量を低下させることにより、腸管側から血管側への水の移動を抑制し、瀉下作用を示している可能性が示唆された。

次に、ビサコジルがどのようなメカニズムで AQP3 の発現量を低下させるかについて検討した。まず、ビサコジルが直接、大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現量を低下させた可能性について、HT-29 細胞を用いて調べた。その結果、ビサコジルが直接、AQP3 の発現量を低下させている可能性は低いことが明らかとなった。

続いて、ビサコジルが間接的に、大腸の AQP3 の発現量を低下させた可能性について検討した。ビサコジルは大腸マクロファージを活性化すること、マクロファージが活性化すると炎症性サイトカインの分泌が亢進し、COX2 の発現増加を介して PGE₂ が分泌されること、および TNF- α や PGE₂ は AQP3 の発現量を低下させることが知られている。そこで、ビサコジルが直接マクロファージを活性化し、TNF- α や PGE₂ を分泌させるか否かをマクロファージ Raw264.7 細胞を用いて検討した。その結果、ビサコジルはマクロファージを直接活性化し、TNF- α および PGE₂ の産生および分泌を亢進することがわかった。さらに、PGE₂ が HT-29 細胞の AQP3 の発現を著明かつ速やかに低下させることが明らかとなった。

以上の結果から、ビサコジルは直接、大腸のマクロファージを活性化させることにより PGE₂ の産生および分泌を亢進すること、およびこのマクロファージの産生する PGE₂ が、パラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3

の発現を低下させていることが明らかとなった。

3. AQP3 活性化阻害剤の大腸での水の輸送に及ぼす影響

上述したように、大腸の AQP3 の発現量の変動により、水の輸送能が変動することが明らかとなったものの、AQP3 の発現量ではなく、AQP3 の機能を変化させた場合、大腸の水の輸送能にどのような影響を及ぼすかについては全く不明であった。そこで、AQP3 の機能を阻害した際に大腸における水の輸送能がどのように変化するかについて、AQP3 活性化阻害剤である HgCl₂ および CuSO₄ を用いて検討した。HgCl₂ および CuSO₄ をラットに直腸内投与した結果、投与 1 時間以内に下痢が発生することがわかった。一方、HgCl₂ および CuSO₄ は、大腸内浸透圧および AQP3 の発現量に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

以上の結果から、大腸粘膜上皮細胞に局在する AQP3 の機能を阻害すると、下痢が発生することが明らかとなった。また、生理的条件下では、AQP3 を介して、水は管腔側から血管側に輸送され、糞中水分量が調節されていることも確認できた。

4. MgSO₄ とビサコジルとの併用効果およびそのメカニズムの解明

これまで、複数の瀉下剤を併用した場合、瀉下作用が増強するか否かについての明確なエビデンスはなかった。そこで、MgSO₄ およびビサコジルを併用した場合、瀉下作用が増強するか否かを検討した。その結果、MgSO₄ (2 g/kg) とビサコジル (20 mg/kg) を併用しても、糞中水分量の変動パターンおよび変化率には、両薬剤の相加効果あるいは相乗効果は見られず、ビサコジル単独投与時のそれらとほぼ同様であることが明らかとなった。一方、併用投与した際の大腸内浸透圧は Control 群に比べて高く、MgSO₄ 単独投与時とほぼ同程度であることがわかった。また、併用投与時の大腸の AQP3 のタンパク質発現量は、Control 群に比べ

て有意に低く、この低下率はピサコジル単独投与時とほぼ同程度であることが明らかとなった。

以上のことから、 $MgSO_4$ とピサコジルを併用した際の瀉下作用は、 $MgSO_4$ 単独時よりも減弱し、ピサコジル単独時の場合とほぼ同程度であることが明らかとなった。さらに、 $MgSO_4$ とピサコジルを併用した場合の大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現パターンが、ピサコジル単独投与時とほぼ同様になることがその理由として考えられた。

本研究の結果から、浸透圧性下剤および大腸刺激性下剤の瀉下作用において、大腸の AQP3 の発現量が重要な役割を担っていることが明らかとなった。加えて、大腸 AQP3 の機能を阻害すると、下痢が発生することも明らかとなった。AQP3 はヒトの腸管において最も多く発現している AQP_s である。今後、腸管 AQP3 の発現および機能と水の移動についてさらなる研究を展開することにより、AQP_s をターゲットとした新たな瀉下剤や止瀉剤の開発が可能になるものとする。

さらに、本研究により、瀉下剤の併用が必ずしも瀉下作用を増強しないことが初めて明らかとなった。薬物の服用数の増加は、薬物間相互作用の増加につながるため、安易な併用は避けるべきである。今後、瀉下剤に関しても、その治療効果に対するエビデンスを明確にし、適正使用を図ることが必要であるとする。

【謝 辞】

本研究に際し、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました星薬科大学薬動学教室 杉山 清 教授に深く感謝致しますと共に、謹んで御礼申し上げます。

本研究にあたり、多分の御指導、御助言及び御協力を賜りました同教室 落合 和 講師に深く感謝致しますと共に、心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、多分の御指導と御助言を賜りました武蔵野大学薬学部薬物動態学 研究室 伊藤清美 教授に深く感謝致しますと共に、厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり、種々の御協力、御助言を賜りました星薬科大学薬動学教室 戸田 雄大 氏、武蔵野大学薬学部薬物動態学研究室 工藤敏行 氏に深く感謝致します。

本研究にあたり、多大なる御協力を戴きました星薬科大学薬動学教室 望月俊秀 氏、宇敷 隆 氏、高崎文香 氏、馬場弘太 氏、今 理紗子 氏、三村綾子 氏、飯笹朋彦 氏、面高みどり 氏、名古屋智香 氏、鈴木統子 氏、蛭間玲依子 氏、末永聖美 氏に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、種々の御協力、御助言を賜りました星薬科大学薬動学 教室の皆様に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、多数の動物たちがその生命を捧げてくれたことに対して、畏敬の念を表します。

最後に、ここまで私を支えてくれた妻と娘に心から感謝致します。

【引用論文】

- 1) Locke GR, 3rd, Pemberton JH, Phillips SF. AGA technical review on constipation. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology*, **119**, 1766-1778 (2000).
- 2) Izzo AA, Gagarella TS, Capasso F. The osmotic and intrinsic mechanisms of the pharmacological laxative action of oral high doses of magnesium sulphate. Importance of the release of digestive polypeptides and nitric oxide. *Magnes. Res.*, **9**, 133-138 (1996).
- 3) Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E. Effects of bisacodyl on cAMP and prostaglandin E2 contents, (Na + K) ATPase, adenylyl cyclase, and phosphodiesterase activities of rat intestine. *Dig. Dis. Sci.*, **25**, 602-608 (1980).
- 4) Schreiner J, Nell G, Loeschke K. Effect of diphenolic laxatives on Na⁺-K⁺-activated ATPase and cyclic nucleotide content of rat colon mucosa in vivo. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **313**, 249-255 (1980).
- 5) Gagarella TS, Mascolo N, Izzo AA, Autore G, Capasso F. Nitric oxide as a mediator of bisacodyl and phenolphthalein laxative action: induction of nitric oxide synthase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 1239-1245 (1994).

- 6) Loo DD, Wright EM, Zeuthen T. Water pumps. *J. Physiol.*, **542**, 53-60 (2002).
- 7) Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, **256**, 385-387 (1992).
- 8) Fushimi K, Sasaki S, Yamamoto T, Hayashi M, Furukawa T, Uchida S, Kuwahara M, Ishibashi K, Kawasaki M, Kihara I, et al. Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct. *Am. J. Physiol.*, **267**, F573-582 (1994).
- 9) Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Grubmuller H, Agre P, Engel A. Structure and function of water channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 509-515 (2002).
- 10) Verbavatz JM, Brown D, Sabolic I, Valenti G, Ausiello DA, Van Hoek AN, Ma T, Verkman AS. Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study. *J. Cell Biol.*, **123**, 605-618 (1993).
- 11) Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.*, **118**, 3225-3232 (2005).

- 12) King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 687-698 (2004).
- 13) Loonen AJ, Knoers NV, van Os CH, Deen PM. Aquaporin 2 mutations in nephrogenic diabetes insipidus. *Semin. Nephrol.*, **28**, 252-265 (2008).
- 14) Nejsum LN. The renal plumbing system: aquaporin water channels. *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 1692-1706 (2005).
- 15) Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. *Biol. Cell*, **97**, 479-486 (2005).
- 16) Ma T, Hara M, Sougrat R, Verbavatz JM, Verkman AS. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *J. Biol. Chem.*, **277**, 17147-17153 (2002).
- 17) Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat. Med.*, **6**, 159-163 (2000).
- 18) Gallardo P, Cid LP, Vio CP, Sepulveda FV. Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **281**, G856-863 (2001).

- 19) Hatakeyama S, Yoshida Y, Tani T, Koyama Y, Nihei K, Ohshiro K, Kamiie JI, Yaoita E, Suda T, Hatakeyama K, Yamamoto T. Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**, 814-819 (2001).
- 20) Laforenza U, Gastaldi G, Grazioli M, Cova E, Tritto S, Faelli A, Calamita G, Ventura U. Expression and immunolocalization of aquaporin-7 in rat gastrointestinal tract. *Biol. Cell.*, **97**, 605-613 (2005).
- 21) Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Aoki T, Hagiwara H, Takata K. Aquaporins in the digestive system. *Med. Electron Microsc.*, **37**, 71-80 (2004).
- 22) Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.*, **276**, C621-627 (1999).
- 23) Phillips SF. Diarrhea: a current view of the pathophysiology. *Gastroenterology*, **63**, 495-518 (1972).
- 24) Krejs GJ. VIPoma syndrome. *Am. J. Med.*, **82**, 37-48 (1987).

- 25) Kane MG, O'Dorisio TM, Krejs GJ. Production of secretory diarrhea by intravenous infusion of vasoactive intestinal polypeptide. *N. Engl. J. Med.*, **309**, 1482-1485 (1983).
- 26) Kishimoto S, Kobayashi H, Shimizu S, Haruma K, Tamaru T, Kajiyama G, Miyoshi A. Changes of colonic vasoactive intestinal peptide and cholinergic activity in rats with chemical colitis. *Dig. Dis. Sci.*, **37**, 1729-1737 (1992).
- 27) Itoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. Enhancement of aquaporin-3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell line. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 203-210 (2003).
- 28) Galvez J, Zarzuelo A, Crespo ME, Lorente MD, Ocete MA, Jimenez J. Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med.*, **59**, 333-336 (1993).
- 29) Izzo AA, Gagarella TS, Mascolo N, Capasso F. Nitric oxide as a mediator of the laxative action of magnesium sulphate. *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 228-232 (1994).
- 30) Marples D, Knepper MA, Christensen EI, Nielsen S. Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.*, **269**, C655-664 (1995).

- 31) Hawcroft G, Ko CW, Hull MA. Prostaglandin E2-EP4 receptor signalling promotes tumorigenic behaviour of HT-29 human colorectal cancer cells. *Oncogene*, **26**, 3006-3019 (2007).
- 32) Toscano CD, McGlothlan JL, Guilarte TR. Lead exposure alters cyclic-AMP response element binding protein phosphorylation and binding activity in the developing rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **145**, 219-228 (2003).
- 33) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 34) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 35) Okahira M, Kubota M, Iguchi K, Usui S, Hirano K. Regulation of aquaporin 3 expression by magnesium ion. *Eur. J. Pharmacol.*, **588**, 26-32 (2008).
- 36) Aurbach GD, Chase LR. Cyclic 3',5'-adenylic acid in bone and the mechanism of action of parathyroid hormone. *Fed. Proc.*, **29**, 1179-1182 (1970).
- 37) Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol. Rev.*, **87**, 1441-1474 (2007).

- 38) Handler JS, Kwon HM. Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity. *Am. J. Physiol.*, **265**, C1449-1455 (1993).
- 39) Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Kwon HM, Handler JS. Hypertonicity stimulates transcription of gene for Na(+)-myo-inositol cotransporter in MDCK cells. *Am. J. Physiol.*, **264**, F20-23 (1993).
- 40) Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K. Water channel protein AQP3 is present in epithelia exposed to the environment of possible water loss. *J. Histochem. Cytochem.*, **47**, 1275-1286 (1999).
- 41) Itoh A, Tsujikawa T, Yasuoka T, Nakahara T, Sasaki M, Fujiyama Y. Natriuretic peptides up-regulate aquaporin 3 in a human colonic epithelial cell line. *Int. J. Mol. Med.*, **14**, 621-626 (2004).
- 42) Tsujikawa T, Itoh A, Fukunaga T, Satoh J, Yasuoka T, Fujiyama Y. Alteration of aquaporin mRNA expression after small bowel resection in the rat residual ileum and colon. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 803-808 (2003).
- 43) Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, Zotta E, Bigi F, Berkowski D, Ibarra C. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **32**, 1303-1313 (1999).

- 44) Spector DA, Wade JB, Dillow R, Steplock DA, Weinman EJ. Expression, localization, and regulation of aquaporin-1 to -3 in rat urothelia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **282**, F1034-1042 (2002).
- 45) Baumgarten R, Van De Pol MH, Wetzels JF, Van Os CH, Deen PM. Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **9**, 1553-1559 (1998).
- 46) Hendriks G, Koudijs M, van Balkom BW, Oorschot V, Klumperman J, Deen PM, van der Sluijs P. Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **279**, 2975-2983 (2004).
- 47) Umenishi F, Narikiyo T, Schrier RW. Effect on stability, degradation, expression, and targeting of aquaporin-2 water channel by hyperosmolality in renal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1593-1599 (2005).
- 48) Parnaud G, Corpet DE, Gamet-Payrastre L. Cytostatic effect of polyethylene glycol on human colonic adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer.*, **92**, 63-69 (2001).

- 49) Matsuzaki T, Suzuki T, Takata K. Hypertonicity-induced expression of aquaporin 3 in MDCK cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **281**, C55-63 (2001).
- 50) Sugiyama Y, Ota Y, Hara M, Inoue S. Osmotic stress up-regulates aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1522**, 82-88 (2001).
- 51) Arima H, Yamamoto N, Sobue K, Umenishi F, Tada T, Katsuya H, Asai K. Hyperosmolar mannitol simulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J. Biol. Chem.*, **278**, 44525-44534 (2003).
- 52) Storm R, Klussmann E, Geelhaar A, Rosenthal W, Maric K. Osmolality and solute composition are strong regulators of AQP2 expression in renal principal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **284**, F189-198 (2003).
- 53) Altura BM. Basic biochemistry and physiology of magnesium: a brief review. *Magnes. Trace Elem.*, **10**, 167-171 (1991).
- 54) Mittag TW, Tormay A, Ortega M, Podos SM. Effects of inorganic ions on rabbit ciliary process adenylate cyclase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **28**, 2049-2056 (1987).

- 55) Vernon WB. The role of magnesium in nucleic-acid and protein metabolism. *Magnesium*, **7**, 234-248 (1988).
- 56) Kammer GM. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. *Immunol. Today.*, **9**, 222-229 (1988).
- 57) Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, Nelson MT. Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *J. Physiol.*, **475**, 9-13 (1994).
- 58) Wang S, Amidi F, Beall M, Gui L, Ross MG. Aquaporin 3 expression in human fetal membranes and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in amnion epithelial cell culture. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, **13**, 181-185 (2006).
- 59) Nguyen BT, Dessauer CW. Relaxin stimulates cAMP production in MCF-7 cells upon overexpression of type V adenylyl cyclase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1041**, 296-299 (2005).
- 60) Nishihara H, Hwang M, Kizaka-Kondoh S, Eckmann L, Insel PA. Cyclic AMP promotes cAMP-responsive element-binding protein-dependent induction of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 and suppresses apoptosis of colon cancer cells through ERK1/2 and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.*, **279**, 26176-26183 (2004).

- 61) Umenishi F, Narikiyo T, Vandewalle A, Schrier RW. cAMP regulates vasopressin-induced AQP2 expression via protein kinase A-independent pathway. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1758**, 1100-1105 (2006).
- 62) Yasui M, Zelenin SM, Celsi G, Aperia A. Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements. *Am. J. Physiol.*, **272**, F443-450 (1997).
- 63) Minami Y, Inoue K, Shimada S, Morimura H, Miyai A, Yamauchi A, Matsunaga T, Tohyama M. Rapid and transient up-regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter transcription in the brain of acute hypernatremic rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **40**, 64-70 (1996).
- 64) Warskulat U, Wettstein M, Haussinger D. Osmoregulated taurine transport in H4IIE hepatoma cells and perfused rat liver. *Biochem. J.*, **321** (Pt 3), 683-690 (1997).
- 65) Marr N, Bichet DG, Hoefs S, Savelkoul PJ, Konings IB, De Mattia F, Graat MP, Arthus MF, Lonergan M, Fujiwara TM, Knoers NV, Landau D, Balfe WJ, Oksche A, Rosenthal W, Muller D, Van Os CH, Deen PM. Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 2267-2277 (2002).

- 66) Verkman AS, Weyer P, Brown D, Ausiello DA. Functional water channels are present in clathrin-coated vesicles from bovine kidney but not from brain. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20608-20613 (1989).
- 67) Quamme GA. Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **24**, 230-235 (2008).
- 68) Rogalla P, Lembcke A, Ruckert JC, Hein E, Bollow M, Rogalla NE, Hamm B. Spasmolysis at CT colonography: butyl scopolamine versus glucagon. *Radiology*, **236**, 184-188 (2005).
- 69) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85 (1985).
- 70) Yasui H, Kubota M, Iguchi K, Usui S, Kiho T, Hirano K. Membrane trafficking of aquaporin 3 induced by epinephrine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **373**, 613-617 (2008).
- 71) Horie I, Maeda M, Yokoyama S, Hisatsune A, Katsuki H, Miyata T, Isohama Y. Tumor necrosis factor-alpha decreases aquaporin-3 expression in DJM-1 keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **387**, 564-568 (2009).

- 72) Lehmann GL, Carreras FI, Soria LR, Gradilone SA, Marinelli RA. LPS induces the TNF-alpha-mediated downregulation of rat liver aquaporin-8: role in sepsis-associated cholestasis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **294**, G567-575 (2008).
- 73) Yao C, Purwanti N, Karabasil MR, Azlina A, Javkhlan P, Hasegawa T, Akamatsu T, Hosoi T, Ozawa K, Hosoi K. Potential down-regulation of salivary gland AQP5 by LPS via cross-coupling of NF-kappaB and p-c-Jun/c-Fos. *Am. J. Pathol.*, **177**, 724-734 (2010).
- 74) Ferrer R, Moreno JJ. Role of eicosanoids on intestinal epithelial homeostasis. *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 431-438 (2010).
- 75) Mengs U, Rudolph RL. Light and electron-microscopic changes in the colon of the guinea pig after treatment with anthranoid and non-anthranoid laxatives. *Pharmacology*, **47**, 172-177 (1993).
- 76) Riemann JF, Schmidt H, Zimmermann W. The fine structure of colonic submucosal nerves in patients with chronic laxative abuse. *Scand. J. Gastroenterol.*, **15**, 761-768 (1980).
- 77) Chang ZQ, Lee JS, Hwang MH, Hong JH, Jung HK, Lee SP, Park SC. A novel beta-glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115 induces nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. *J. Vet. Sci.*, **10**, 165-167 (2009).

- 78) Wang KS, Ma T, Filiz F, Verkman AS, Bastidas JA. Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **279**, G463-470 (2000).
- 79) Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.*, **157**, 4634-4640 (1996).
- 80) Hori M, Kita M, Torihashi S, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, Ozaki H, Karaki H. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **280**, G930-938 (2001).
- 81) Kim SS, Oh OJ, Min HY, Park EJ, Kim Y, Park HJ, Nam Han Y, Lee SK. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sci.*, **73**, 337-348 (2003).
- 82) Lee JY, Cho BJ, Park TW, Park BE, Kim SJ, Sim SS, Kim CJ. Dibenzylbutyrolactone lignans from forsythia koreana fruits attenuate lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthetase and cyclooxygenase-2 expressions through activation of nuclear factor-kappab and mitogen-activated protein kinase in RAW264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1847-1853 (2010).

- 83) Nejsum LN, Zelenina M, Aperia A, Frokiaer J, Nielsen S. Bidirectional regulation of AQP2 trafficking and recycling: involvement of AQP2-S256 phosphorylation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **288**, F930-938 (2005).
- 84) Zelenina M, Christensen BM, Palmer J, Nairn AC, Nielsen S, Aperia A. Prostaglandin E(2) interaction with AVP: effects on AQP2 phosphorylation and distribution. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **278**, F388-394 (2000).
- 85) Boone M, Deen PM. Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch.*, **456**, 1005-1024 (2008).
- 86) Lee YJ, Kwon TH. Ubiquitination of aquaporin-2 in the kidney. *Electrolyte Blood Press.*, **7**, 1-4 (2009).
- 87) Beeson PB. Tolerance to Bacterial Pyrogens : I. Factors Influencing Its Development. *J. Exp. Med.*, **86**, 29-38 (1947).
- 88) Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, Ulevitch RJ. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J. Clin. Invest.*, **102**, 1645-1652 (1998).
- 89) Kuwahara M, Gu Y, Ishibashi K, Marumo F, Sasaki S. Mercury-sensitive residues and pore site in AQP3 water channel. *Biochemistry (Mosc)*, **36**, 13973-13978 (1997).

- 90) Zelenina M, Tritto S, Bondar AA, Zelenin S, Aperia A. Copper inhibits the water and glycerol permeability of aquaporin-3. *J. Biol. Chem.*, **279**, 51939-51943 (2004).
- 91) Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, et al. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 6269-6273 (1994).
- 92) Cuzzocrea S, Ianaro A, Wayman NS, Mazzon E, Pisano B, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ2 attenuates the development of colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **138**, 678-688 (2003).
- 93) Xue H, Sawyer MB, Field CJ, Dieleman LA, Baracos VE. Nutritional modulation of antitumor efficacy and diarrhea toxicity related to irinotecan chemotherapy in rats bearing the ward colon tumor. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 7146-7154 (2007).
- 94) Verdoucq L, Grondin A, Maurel C. Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochem. J.*, **415**, 409-416 (2008).

- 95) Bosshard W, Dreher R, Schnegg JF, Bula CJ. The treatment of chronic constipation in elderly people: an update. *Drugs Aging*, **21**, 911-930 (2004).
- 96) Siegel JD, Di Palma JA. Medical treatment of constipation. *Clin. Colon Rectal Surg.*, **18**, 76-80 (2005).