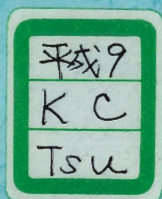


アルコール性肝障害の線維化に関する分子生物学的研究

研究課題番号
07670624

平成7年～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究C）
研究成果報告書

平成11年3月



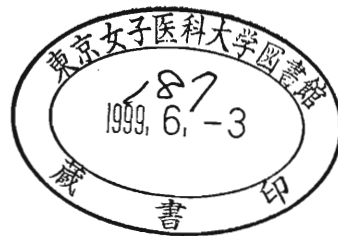
研究代表者 土谷まり子

(東京女子医科大学医学部 助手)

アルコール性肝障害の線維化に関する分子生物学的研究

研究課題番号
07670624

平成7年～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究 C）
研究成果報告書



平成11年3月

研究代表者 土谷まり子

(東京女子医科大学医学部 助手)

はしがき

肝の線維化は、多くの慢性肝障害に引き続きおこる現象であるが、その様相は様々である。我々は、アルコール性肝障害の線維化に至る過程で、類洞の毛細血管化などの循環動態の特異な変化に着目したのを端緒に、繊維化の過程での微小循環構築の remodeling のメカニズムを解明することを企図した。最終的には慢性肝障害の線維化の進展を阻止することが目標であるが、まずいくつかの慢性肝障害の実験モデルについて、肝の循環動態に関わる因子、ことに最近注目されてきたサイトカインについて、臨床的な現象と重ね合わせて、主に *in vivo* の検討を行った。

平成11年2月

研究組織

研究代表者：土谷まり子 (東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者：栗原 毅 (東京女子医科大学医学部助教授)
研究分担者：土谷 健 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費

平成7年度	700千円
平成8年度	700千円
平成9年度	700千円
計	2.100千円

研究発表

(1) 学会誌

1. Carbon monoxide (CO) / heme oxygenase (HO) system in hyperdynamic circulation of cirrhotic rats.

M Tsuchiya, K Tsuchiya, T Seki, M Naruse, H Nihei, I Yokoyama
J Am Soc Nephrol 発表予定

2. Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development.

T Mochizuki, Y Saijo, K Tsuchiya, Y Shirayoshi, S Takai, C Taya, H Yonekawa, K Yamada, H Nihei, N Nakatsuji, PA Overbeek, H Hamada, T Yokoyama
Nature 395: 177-181, 1998

2. Tubuloglomerular feedback と NO

土谷 健、村上和世、中内みゆき、大貫隆子、二瓶 宏
腎と透析 45(6):769-773, 1998

3. DOCA-salt 高血圧モデルなどにおける腎内 nitric oxide synthase (NOS) の発現について

土谷 健、村上和世、荒井純子、佐中 孜、二瓶 宏、成瀬光栄、成瀬清子 腎とフリーラジカル 1998年 東京医学社 pp37-41

4. ラット腎 nitric oxide synthase(NOS)の発現動態と renin-angiotensin 系との関連における免疫組織学的研究

村上和世、土谷 健、成瀬光栄
東女医大誌 68(5):230-239, 1998

5. ラット脂肪肝における血液レオロジー学的検討

栗原 毅、土谷まり子、秋本真寿美、橋本 洋、石黒久貴、新見晶子、前田 淳、
重本六男、山下克子、横山 泉、菊池右二

日本消化器病学会雑誌 94:328-335, 1997

6. Effect of eicosapentaenoic acid on blood rheology in rats with fatty liver

T Kurihara, M Akimoto, M Tsuchiya, H Hashimoto, H Ishiguro, A Niimi, A
Maeda, M Shigemoto, K Yamashita, I Yokoyama, S Kashima, Y Kikuchi

Current Therapeutic Research 58: 525-532, 1997

7. Nitric oxide synthase I immunoreactivity in the macula densa of the
kidney is angiotensin II dependent

K Murakami, K Tsuchiya, M Naruse, K Naruse, H Demura, J Arai, H Nihei

Kidney Int 52 Suppl 63: S208-S210, 1997

8. Roles of heme oxygenase/carbon monoxide system in genetically
hypertensive rats

T Seki, M Naruse, K Naruse, T Yoshimoto, A Tanabe, K Tsuchiya, S Hirose,
T Imaki, H Nihei, H Demura

Biochem Biophys Res Comm 241: 574-578, 1997

(2) 口頭発表

1. A role for heme oxygenase in hyperdynamic circulation of cirrhotic rat

M Tsuchiya, M Seki, M Naruse, K Tsuchiya, I Yokoyama

Hepatology 28:460A, 1998

49th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver
Diseases

Chicago, USA November 6-10, 1998

2. The regulation of heme oxygenase in experimental erythropoietin (EPO) treatment model

K Tsuchiya, E Kikawada, T Seki, M Naruse, M Ando, H Nihei

Nephrology Dialysis Transplantation 13: A65, 1998

XXXV Congress of European Renal Association

Rhimini, Italy June 6-9, 1998

3. The expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in volume-loading glomerular injury

K Murakami, K Tsuchiya, T Seki, M Naruse, H Nihei

J Am Soc Nephrol 9: 356A, 1998

31th annual meeting of Am Soc Nephrol

Philadelphia, USA October 25-28, 1998

4. Carbon monoxide (CO) /heme oxygenase (HO) system in hyperdynamic circulation of cirrhotic rats

T Mimuro, K Tsuchiya, M Seki, M Naruse, H Nihei

J Am Soc Nephrol 9: 343A, 1998

31th annual meeting of Am Soc Nephrol

Philadelphia, USA October 25-28, 1998

5. 実験的肝障害における一酸化窒素(NO)/一酸化炭素(CO)系の動態と腎機能への関わり

三室知子、土谷 健、大貫隆子、木川田衛利弥、二瓶 宏

日腎会誌 40(3):109, 1998

第 41 回日本腎臓学会総会

東京 1998 年 5 月 11-12 日

5. 慢性アルコール投与ラットの微小循環構築の変化

土谷まり子、栗原 毅、秋本真寿美、橋本 洋、石黒久貴、新見晶子、前田 淳、
重本六男、山下克子、横山 泉

日本消化器病学会雑誌 93:251 1996

第 38 回日本消化器病学会大会

東京 1996 年 9 月 21-23 日

1. 慢性肝障害時の微少循環とサイトカイン

背景

慢性肝障害時には様々な生理活性物質が生体ならびに肝自体の病態生理の成立に関与している。ことに最近、血管構成細胞由来の物質の同定とその生理作用が次々に明らかにされつつある。肝硬変における門脈圧亢進を中心とした循環動態の変化やアルコール性肝障害時の微少循環障害、エンドトキシンへの暴露などの臨床的特徴とこうした物質の関与が検討されている。

Nitric oxide (NO)は血管内皮由来弛緩因子の本体であることが明らかにされたが、広く情報伝達物質として重要な生理作用を有するのみではなく、サイトカインネットワークへの関与など組織障害の促進因子としての側面も指摘され、複雑な活性をもつことがわかってきた。一方 Carbon oxide (CO)も NO と類似した構造、性質を有するため、やはり情報伝達物質としての作用が注目された。従来 CO は Heme から biliverdin へ、代謝酵素である Heme oxygenase (HO) により代謝される過程で生成されることから、単なる分解産物とされていたが、cGMP の産生を促進する作用が指摘され、CO 及びその代謝酵素 HO の生理的意義がより積極的に検討されるにいたっている。

目的

慢性肝障害モデルのひとつであるアルコール負荷ラットにおいて、それぞれ NO 及び CO の合成酵素である Nitric oxide synthase (NOS)及び Heme oxygenase (HO)の各 isoform の肝内発現の変化を、mRNA レベルで検討した。またエンドキシンである Lipopolysaccharide を外因性に投与して、正常およびアルコール負荷肝での mRNA の発現におよぼす影響を検討した。

方法

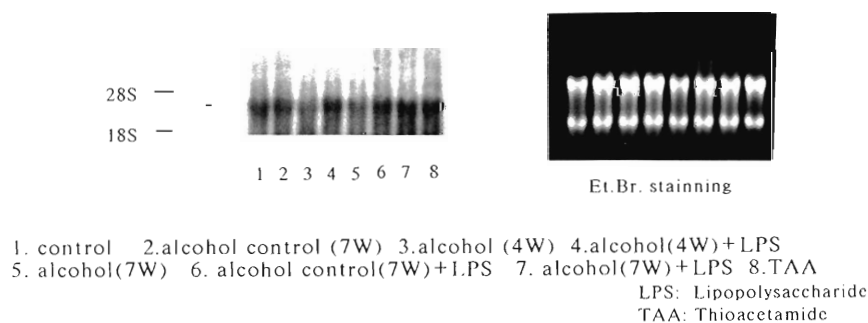
Wistar rat (140-160g)を lieber 食および control 食にて4～6週飼育して用いた。

コントロール食、アルコール食摂取ラットの肝臓を脱血灌流後、mRNA を抽出し、各モデルでの一酸化窒素合成酵素 (NOS)およびヘム合成酵素 (HO)

の発現レベルの変化を Northern analysis, RT-PCR 法により検討した。
 また同モデルで Lipopolysaccharide (LPS, E.Coli serotype 026:B26) を
 1mg/kg.BW 尾静脈より注入し、6 時間後の発現レベルを同様に検討した。
 Northern blot の probe は、既知の sequence により primer を作製し、rat cDNA
 を PCR で amplification して用いた。
 Northern blot: 65 °C hybridization, 0.5x SSC 63 °C wash
 RT-PCR: 5 µg total RNA から oligo-dT primer により、reverstranscription
 反応をおこない、PCR にて amplification した。

結果

eNOS



RT-PCR

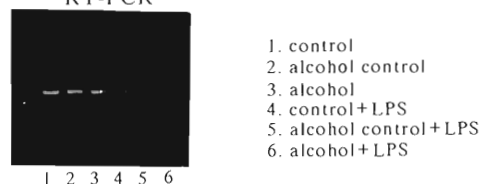


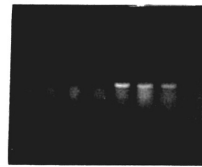
図1 eNOS は正常群とも定常的な発現が認められ、アルコール自体による誘導や、LPS 負荷でも大きな変化は認められなかった。

iNOS



1. control 2.alcohol control 3.alcohol
4. control+LPS 5. alcohol control+LPS 6. alcohol+LPS

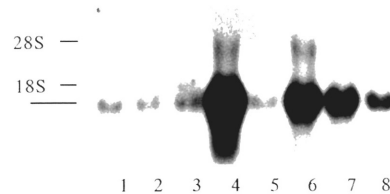
RT-PCR



1 2 3 4 5 6

図 2 iNOS は定常状態では RT-PCR 解析でも発現は低いですが、LPS 負荷では明らかに誘導がみられ、コントロール、アルコールとも同程度にみられる。

HO-1



1. control 2.alcohol control (7W) 3.alcohol(4W) 4. alcohol(4W)+LPS
5. alcohol(7W) 6. alcohol control(7W)+LPS 7. alcohol(7W)+LPS 8. TAA

LPS: Lipopolysaccharide
TAA: Thioacetamide

RT-PCR



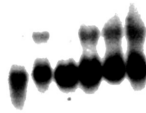
1 2 3 4 5 6

1. control
2. alcohol control
3. alcohol
4. control+LPS
5. alcohol control+LPS
6. alcohol+LPS

図 3 HO-1 は両群とも常時発現が確認され、LPS 負荷で著明な誘導が認められる。

HO - II

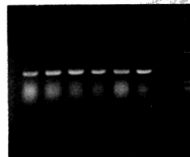
28S —
18S —



1 2 3 4 5 6

1. control 2.alcohol control 3.alcohol
4. control+LPS 5. alcohol control+LPS 6. alcohol+LPS

RT-PCR



1 2 3 4 5 6

図 4 HO-II は常時強い発現が認められた。

要約

eNOS の発現は定常的であり、Northern analysis、PCR 解析においてもコントロール、アルコール負荷で差はなく、LPS 投与下でも発現の亢進は観察されなかった。

iNOS は RT-PCR 解析でもコントロール、アルコールとも発現は低い、投与下ではコントロール、アルコール負荷ともに誘導された。

constitutive な発現が期待される HO-II はコントロール、アルコールとも定常的に認められ、HO-I は Northern 解析においても RT-PCR 法においても発現が確認された。さらに HO-I は LPS 負荷によりコントロールおよびアルコール負荷モデルでも誘導された。

HO-I は thioacetamide 投与の肝硬変モデルラットではアルコール比較して、発現が亢進していた。

Abstract

Various physiological active substances, such as nitric oxide (NO), carbon oxide (CO) are implicated in the pathophysiology of chronic liver injury. However, these substances have several aspects as vasoactive substances, cytokine-modulator, etc. It is speculated that these substances and their synthesis enzyme are complicatedly involved in the pathophysiology of chronic liver disease. In this study, we investigated the expression of NOS and HO in the model of alcoholic liver injury.

Alcoholic model was induced by the administration of lieber diet for 4-7weeks. The diagnosis was confirmed by the histological examination. The mRNA expression of NOS isoforms (endothelial type: eNOS, inducible type: iNOS) and HO isoforms (HO-I, HO-II) were examined by the Northern analysis and reverse-transcription PCR (RT-PCR) methods. mRNA of eNOS and HO-II were constitutively expressed in alcoholic model and there was no significant change under LPS administration. iNOS and HO-I were remarkably induced by LPS injection in alcoholic model as well as control. mRNA of HO-I was detected in both alcoholic and control model without LPS in almost same intensity, but HO-I expression in cirrhotic model (thioacetamide, 200 mg/kg BW, 3times/week for 8weeks) seemed to be increased.

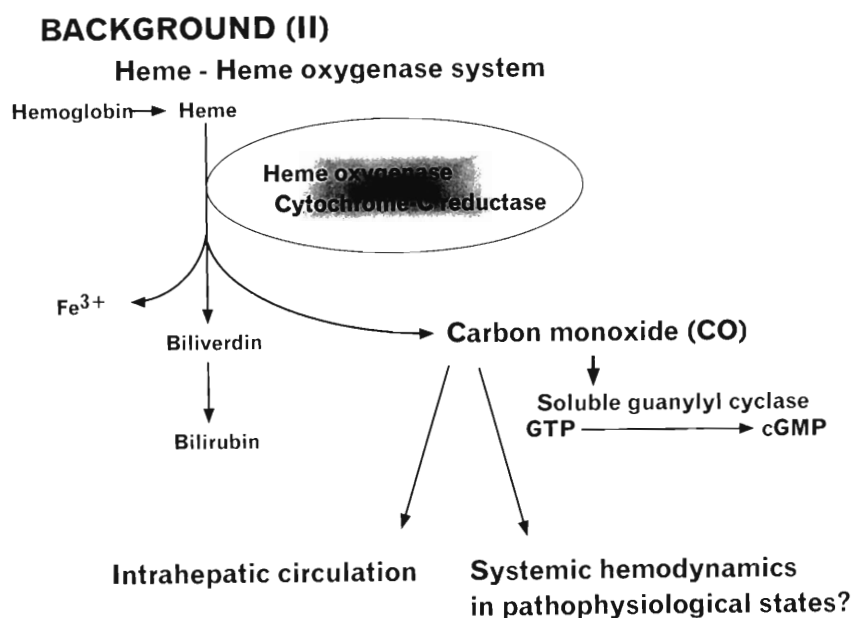
In the process of chronic liver injury, biological substances and their synthase show different dynamics dependent of the primary disease.

2. 肝硬変時の hyperdynamic circulation における Heme oxygenase の役割

背景

慢性門脈圧亢進症に見られる hyperdynamic circulation は全身血圧の低下と腎機能不全によって特徴付けられる。Nitric oxide (NO)はこのような病態に関与する血管作動物質としてよく知られているが、他のガス状生理活性物質である Carbon monoxide (CO)についてもこのような作用、ことに肝内の循環動態の調節に働く生理活性物質としての作用が検討されている。

Heme oxygenase (HO)は代謝酵素で、hemoglobin (Hb)由来の heme の代謝に関わり、CO を発生する。CO は cGMP を介する情報伝達系により、血管のトーンやイオンチャンネルの調整などに関与し、このような作用によって循環動態に深く関わる。CO は NO と同様に血管拡張作用をもつ生理活性物質として、門脈圧亢進症の病態に関与する分子と考えられる。



目的

実験的肝硬変ラットの hyperdynamic state における、CO ならびにその代謝酵素である HO の役割を検討する。

方法

1) 実験動物

雄性 Sprague-Dawley ラット(200-220g)に、Thioacetamide 200mg /kg BW を、週 3 回腹腔内投与し、8 週間続ける。

2) 腎クリアランス、血圧の測定

Inactin (10mg/100g BW i.p.)麻酔下にて、大腿動脈の圧をモニターし、血液のサンプリングをおこなった。大腿静脈にカニューレーションし、2.5% Inulin を加えた 0.9%生理食塩水にて、1ml/hr/100g BW の速度で灌流し、膀胱よりカテーテルにて採尿した。

heme oxygenase inhibitor である zinc protoporphyrin IX (ZnPPN, 30 μ M/kg dissolved in 50 mM Na₂CO₃)を腹腔内投与し、投与前後で採尿、採血し、比較した。また同様のプロトコールにて、mRNA を抽出し、投与前と投与 3 時間後で発現を比較した。

Inulin clearance, urinary volume, urinary Na excretion は時間採尿により計算した。平均動脈血圧は transducer (P231D, Gould-Statham,UK)により、モニターされ、血漿の Inulin や Na 濃度は Anthrone method および flame photometry により測定された。

3) RNA analysis

Northern analysis により、HO-I, HO-II, eNOS の mRNA を解析した。HO-II については、さらに RNAase protection assay をおこなった。antisense cRNA probe を α -³²P UTP でラベルし、10 μ g total RNA と hybridize し(45 °C 12hr)、ribonuclease A および T1 にて digest した後、protected fragment を 5% polyacrylamide urea gel (7M urea) で泳動し、

autoradiography を行った。band の intensity は densitometry で測定し、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の intensity により補正した。

結果

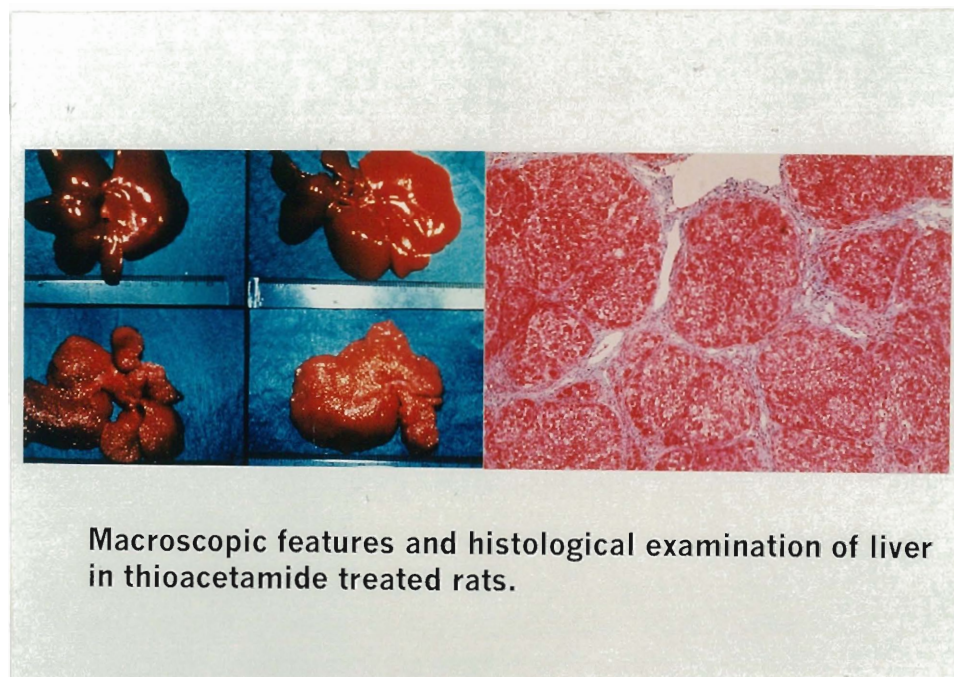


図1 thioacetamide による肝硬変ラットの肝の肉眼及び組織所見
左上段は control ラットの、下段は thioacetamide による肝硬変ラットの肝臓の肉眼所見。右は、thioacetamide による肝硬変ラットの肝組織像（マッソン染色）。

**Comparison of renal parameters, PNOx and UcGMP
between control and Thio-treated animals**

	Control	Thioacetamide
MAP (mmHg)	118.3 ± 2.2	88.2 ± 5.5 *
UV (μl/min/g)	6.2 ± 3.9	4.3 ± 2.8 *
Cinulin (ml/min/g)	1.2 ± 0.1	0.84 ± 0.2 *
UNaV (μEq/min/g)	5.2 ± 0.5	1.6 ± 0.9 *
Plasma NOx (μM)	10.2 ± 1.8	22.2 ± 5.8*
Urinary cGMP (pM/hr)	13.2 ± 5.9	21.3 ± 6.8 #

*p<0.01 #p<0.05

図2 control および thioacetamide 投与ラットにおける血圧、イヌリンクリアランス、尿量、Na 排泄量、血漿 NOx, および尿中 cGMP などの parameter の比較

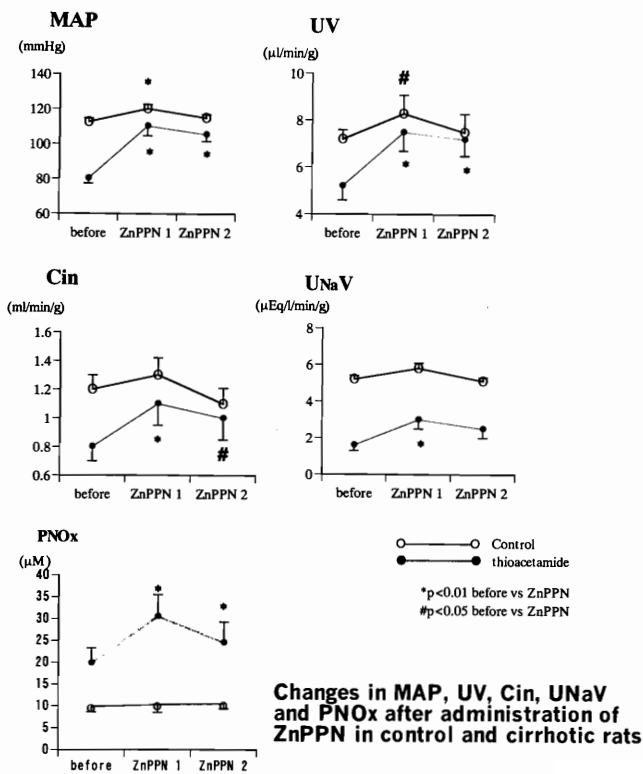
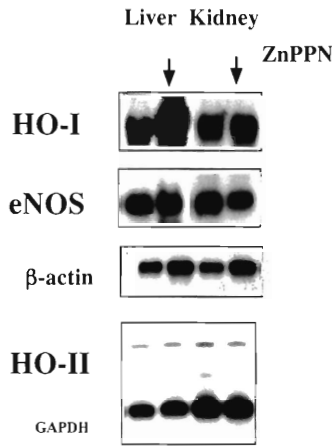


図3 control および thioacetamide 投与ラットにおける、ZnPPN 投与後の腎 parameter の変化



Representative blotting of HO-I, HO-II and eNOS mRNA before and after ZnPPN administration in cirrhotic rats.

HO-I and eNOS were determined in Northern analysis and standardized by β-actin and HO-II was in protection assay standardized by GAPDH.

図 4 ZnPPN 投与後の thioacetamide 投与ラットにおける HO-I, HO-II, eNOS の mRNA の変化

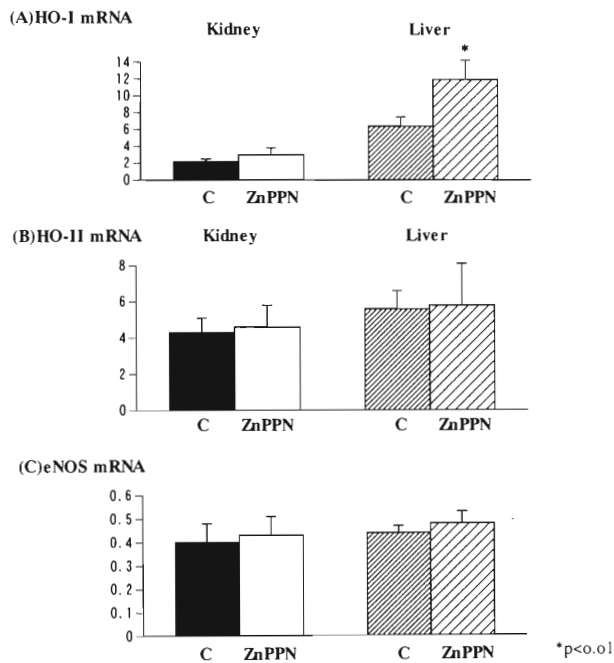


図 5 ZnPPN 投与後の thioacetamide 投与ラットにおける HO-I, HO-II, eNOS の mRNA の定量的変化

Effects of ZnPPN on HO-I, HO-II and eNOS mRNA expression in cirrhotic rats.

要約

thioacetamide による肝硬変ラットの systemic hyperdynamic state における heme oxygenase (HO)の役割について検討した。

- 1) 肝硬変ラットでは、血圧の低下、イヌリンクリアランスの低下、尿量、Na排泄量の低下が観察され、血漿 NO_x, および尿中 cGMP については、増加がみられた。
- 2) heme oxygenase inhibitor である zinc protoporphyrin IX (ZnPPN)の投与により、血圧や腎クリアランスの値は回復がみられた。
- 3) 肝硬変ラットにおいて、HO-I の mRNA は、ZnPPN の投与により発現の増強がみられたが、HO-II, eNOS の mRNA については差が認められなかった。
- 4) ZnPPN 投与のより、肝硬変ラットでは、有意に血漿 NO_x の増加がみられた。

結語

HO は肝硬変の病態形成に、重要な役割を演じているとかがえられる。heme oxygenase inhibitor の投与により、尿中 NO 代謝産物は増加することから、HO と NO system の強い相互作用が示唆され、肝硬変の病態においても両者の役割は重要である。

abstract

Hyperdynamic circulation observed in portal hypertension is characterized by generalized vasodilation that results in systemic hypotension and renal dysfunction. It is well known that nitric oxide (NO), has been involved in the pathogenesis of hyperdynamic circulation. On the other hand, another gaseous monoxide, carbon monoxide (CO), has been reported to act as a physiological substance, especially in heme oxygenase (HO), a catalyzing enzyme of heme to produce CO, in modulation of systemic circulation in experimental cirrhotic animals. Liver cirrhosis was induced by administration of thioacetamide (200mg/kg BW) for 3 times per week 8 weeks in Wistar rats (n=8). The expression of HO isoform and endothelial NO synthase (eNOS) mRNA were estimated by Northern and

protection assay. Mean arterial pressure (MAP) and renal function were determined by clearance study and serum NO₂/NO₃ (NO_x) was measured by Griess method.

Typical feature of cirrhosis were histologically observed in treated animals. MAP was markedly decreased in cirrhotic rats (118.2 ± 2.1 vs. 88.2 ± 5.5 mmHg, $p < 0.01$), and basal inulin clearance (Cin), urine volume (UV) and natriuresis were significantly lower. This group also showed serum NO_x elevation and urinary cGMP increase. Intraperitoneal injection of zinc protophyrin IX (ZnPPN), a specific HO inhibitor ($30 \mu\text{M}/\text{kg BW}$), demonstrated a greater MAP increase in cirrhotic rats than in control rats ($+BP \pm 6$ vs. $+12 \pm 4$ mmHg, $p < 0.01$), and significantly improved Cin ($+22.5 \pm 3.9$ %) and UV ($+38.3 \pm 5.9$ %) and natriuresis ($+48.4 \pm 9.3$ %) in cirrhotic rats. The expression of HO-I mRNA was increased 82 ± 9 %, but not that of HO-II in liver in cirrhotic animals. In contrast to our previous data investigating cultured normal endothelial cells of the rat aorta, eNOS mRNA in liver and kidney in this study were not affected by ZnPPN treatment. However, serum NO_x was elevated by ZnPPN administration from 20.0 ± 2.9 to $34.3 \pm 5.9 \mu\text{M}/\text{l}$. In conclusion, 1) HO may be implicated in the pathophysiological mechanism of cirrhotic state; 2) the changes of HO-II and eNOS mRNA expression were not observed during in vivo study: 3) there may be an interrelationship between NO and HO (CO) systems.

おわりに

Thioacetamide による肝硬変モデルラットは、腹水を伴う門脈圧亢進症のよいモデルであり、その循環動態も肝硬変を特徴づける hyperdynamic state を呈していたことが証明された。ガス状生理活性物質である NO と CO は循環動態の調節について、その作用の特異性ととも、相互の関連も強く示唆されていたが、このように *in vivo* で検討しその関連性を指摘し得たのは初めてである。

今後、いくつかのモデルでの比較と、循環動態に影響を及ぼす生理活性物質の検討を重ねることにより、より臨床的に近いかたちでの肝の循環動態、微小循環の変化、組織構築の変化に至る道筋が導かれるかもしれない。まだ端緒にすぎたばかりであるが、細胞レベル、個体レベル両者の生理学的、分子生物学的検討が相互に feedback されて、病態の解明が進むことが期待される。