

平成 21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19390352

研究課題名 (和文) 肝硬変症における肝内微小循環障害の分子機序解明と肝機能改善のための新規治療の開発

研究課題名 (英文) Defective eNOS signaling is mediated by Rho-kinase activation in rats with secondary biliary cirrhosis

研究代表者

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)

九州大学・医学研

研究者番号：80165662

研究成果の概要：

(1) 硬変肝のeNOSシグナル改善による肝内微小循環障害の改善

肝硬変症においては、ETやAT-IIの発現が亢進し、さらに類洞内皮細胞からのNO分泌が低下しているため、肝星細胞の収縮が強まり、類洞血管抵抗が増大し、肝内微小循環が障害され、門脈圧亢進症をきたしている。肝硬変症における類洞内皮細胞のNO分泌障害は、AktによるeNOSのリン酸化障害であることがわかっているが、その機序は不明であった。そこで、類洞内皮細胞におけるAkt-eNOSリン酸化の障害にRho kinaseが関与しているのではないかと仮説をたて、検討した。肝硬変ラットにRho kinase阻害剤であるfasdil (1 or 2 mg/dl)を点滴静注すると門脈圧が約20%、肝内血管抵抗が約30%低下することがわかった。また、Rho kinase阻害剤を用いることで、肝内eNOSリン酸化およびeNOSとAktの結合が増加することも判明し、さらにRho kinaseとAktが直接結合することにより、Rho kinaseがAktとeNOSの結合を阻害し、eNOS酵素活性を傷害していることを証明した。

(2) 肝再生におけるNitric oxideおよびVEGFの役割

肝再生に関して肝細胞再生および血管新生が重要である事が報告されている。そこで、肝再生時における血管新生因子 VEGF および類洞血流維持に関与する NO を検討した。(1)SDラット 70%肝切モデルを使用。肝切後 (POD1, 3, 7)に、肝組織血流・肝重量増加率・類洞面積割合・肝組織中 VEGF, NO_x について検討。(2)L-NAME (NO 合成阻害剤)を腹腔内投与、肝再生について同様な検討を行った。(1)70%肝切後、肝組織血流は一過性上昇後減少するが POD3 に再度増加、肝重量増加率は経時的に増加。肝組織中 VEGF・NO_x は POD3 でピークを示した。(2)L-NAME 投与群で肝重量増加率が非投与群に比し POD3, 7 で有意に低く、肝組織中 NO_x は抑制されており、肝組織血流は有意に減少、さらに、類洞面積の縮小も認められた。また、肝組織中 VEGF も有意に低下していた。肝再生において、NO は VEGF の induction を介して類洞血管新生ならびに血流維持に働くと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：肝硬変

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝硬、NO、eNOS、Rho-kinase VEGF

1. 研究の背景

肝硬変における門脈圧亢進症の一因として、肝の線維化、類洞内皮細胞からのNO分泌低下が示されていた。肝線維化にはRho-kinaseが関与する事が示されていたが、動脈における内皮細胞ではRho-kinaseが内皮細胞からのNO分泌低下を惹起することが示されていた。Rho-kinaseは肝において、線維化のみならず類洞内皮細胞からのNO分泌低下を惹起している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

Rho-kinaseがAkt-eNOSシグナルを阻害することにより肝類洞内皮細胞からのNO分泌低下に関与しているかを検討する。

3. 研究の方法

胆管結紮肝硬変ラットを用い、肝Rho-kinaseの活性化が、肝類洞内皮細胞からのNO分泌低下に関与しているかを検討した。

肝線維化への影響を考慮し、Rho-kinase阻害薬(ファスジル:1 or 2mg/kg/h)を急性投与し、以下の項目を検討した。

(1) 血圧、門脈圧、肝組織血流量

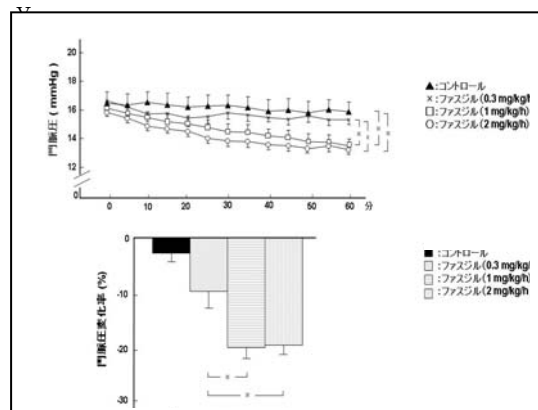
(2) Western blotにてファスジル投与後の肝におけるRho-kinase活性、eNOS活性、Akt活性

(3) 免疫沈降にてファスジル投与後の肝におけるAktとeNOSの結合、AktとRho-kinaseの結合

4. 研究成果

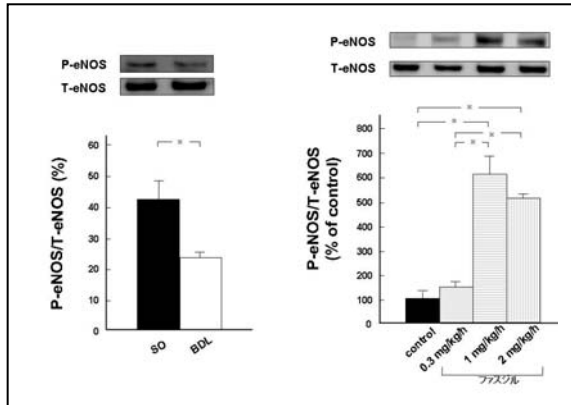
(1) ファスジル(1mg/kg/h)投与にて血圧、肝組織血流量は有意に低下することなく門脈圧は約20%低下した。

(2) 硬変肝ではRho-kinase活性が増加していた。ファスジル投与にて肝Rho-kinase活性は低下し、肝eNOS、Akt活性は増加した。



(3) ファスジル投与にてeNOSとAktの結合は増加し、Rho-kinaseとAktの結合は減少した。以上より、硬変肝ではRho-kinaseがAktと

eNOS の結合を阻害することにより eNOS の活性が低下し NO が低下している可能性が示唆された。



(2) 肝再生におけるNitric oxideおよびVEGFの役割

1. 研究の背景

肝再生には肝細胞の再生のみならず血管新生が必要であり、特に VEGF による類洞の血管新生が重要であることが報告されている。さらに、Nitric oxide (NO) が類洞血流維持に参与している。

2. 研究の目的

肝再生における NO および VEGF の役割を明らかにする。

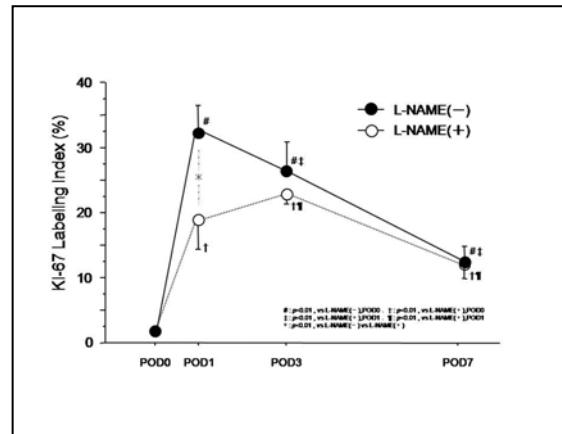
3. 研究の方法

(1) 雄性 SD ラット 70%肝切除モデルを使用。肝切除後(POD1,3,7)に、肝重量増加率、Ki-67 labeling index(L.I.)による肝細胞増殖、Laser doppler 法による肝組織血流測定、RECA-1 による類洞面積、肝組織中 VEGF・eNOS 蛋白発現、NO_x 産生について検討した。(2)L-NAME(NO 合成阻害剤)を腹腔内投与(100mg/kg/day)し、肝再生への影響について検討した。

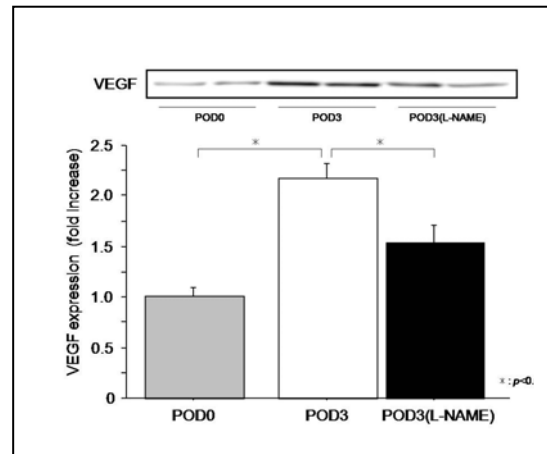
4. 研究成果

(1)70%肝切除、肝細胞の Ki-67 L.I.は POD1 でピークとなり、以後漸減するが、類洞面積比は POD3 より増加を始めた。肝切除後の肝組織血流は POD1 で減少するが、POD3 より上昇した。肝組織中 VEGF 発現は POD3 でピーク、POD7 で

basal level まで減少した。eNOS 発現、NO_x はともにも POD3 より有意に増加した。



(2)NO 合成阻害を行い肝再生の検討をしたところ、L-NAME 投与群(L 群)では L-NAME 非投与群(N 群)に比し肝重量増加率が POD3,7 で有意に低く、Ki-67 L.I.も POD1 で有意に低下した。L 群では肝組織中 NO_x は抑制されており、POD3 における肝組織中 VEGF 発現は N 群に比べ有意に低下していた。また、POD3 以降の肝組織血流および類洞面積比の増加を有意に抑制した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)
Hepatology, 2008 Mar;47(3):966-77.

〔学会発表〕(計 6 件)

(1)Digestive Disease Week in Washington

D.C.

Topic Forum of the American Association

for the Study of Liver Disease

- (2) 第 107 回 日本外科学会
一般演題ポスター (i POS 賞受賞)
- (3) 第 106 回 日本外科学会
一般演題ポスター
- (4) 第 14 回日本門脈圧亢進症学会
パネルディスカッション
- (5) 第 13 回日本門脈圧亢進症学会
パネルディスカッション
- (6) 第 43 回日本肝臓学会総会

6. 研究組織

(1) 研究代表者
前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：80165662

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号：