

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860466

研究課題名(和文) 高血圧者の長期飲酒とアルコール性肝障害進展における交感神経系の関連性の検討

研究課題名(英文) The effects of sympathetic nervous system on progression of alcoholic liver disease and chronic drinking in hypertensive individuals

研究代表者

姫宮 彩子(白鳥)(HIMEMIYA-HAKUCHO, Ayako)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90593301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高血圧自然発症ラット(SHR)と正常血圧ラット(WKY)を用いてアルコール性肝障害への高血圧の影響について検討した。その結果、SHRではWKYと比べ、慢性アルコール投与によってより高度の肝機能低下を伴うアルコール性脂肪肝および肝線維形成を生じ、活性化星細胞やTNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、コラーゲン等の炎症・線維形成関連因子、アドレナリン作動性受容体、ニューロペプチドY、チロシンヒドロキシラーゼ等の交感神経関連因子の遺伝子あるいは蛋白発現量の増加を認めた。以上より、高血圧と慢性飲酒は交感神経活性の相乗作用によって、相互に増悪因子として影響している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of hypertension on the progression of alcoholic liver injury using the spontaneously hypertensive rat (SHR) and normotensive Wistar-Kyoto rat (WKY) as control. As a result, chronic ethanol treatment in SHR induced hepatosteatosis with liver injury and sympathetic hyperactivity, as evidenced by increased in the accumulation of fatty droplets within hepatocytes and pericellular hepatic fibrosis with liver injury, increased in gene or protein expressions such as activated hepatic stellate cells, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, collagen, adrenergic receptor, neuropeptide Y and tyrosine hydroxylase. These results suggested that chronic ethanol treatment in SHR could induce the more severe liver injuries. In conclusion, chronic alcohol intake and hypertension could be possible to deteriorate mutually each pathological state via the sympathetic overactivity.

研究分野：法医学(法医病理学、法医中毒学)、アルコール医学

キーワード：アルコール性肝障害 高血圧 交感神経系 高血圧自然発症ラット 肝星細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルコール性肝障害は、飲酒量の増加とともに罹患比率が増加してきた疾患で、全肝疾患に占める割合や死亡率は増加傾向を示し、その病態の解明や治療法、予防・対策の確立が強く求められている。

我々は、慢性飲酒モデルラットの実験にて、アドレナリン受容体遮断薬の投与によってアルコール性肝障害の進展が抑制されることを示し、飲酒によるアルコール性肝障害発症・進展の病態に、交感神経系の異常活性化が関与することを報告してきた。

(2) 慢性飲酒は高血圧発症のリスクの一つとされており、日本では 30 才以上の男性の約 50% が高血圧者とされるが、その高血圧者の約 1/3 は飲酒に起因するといわれている。

飲酒による高血圧発症の機序についてはレニン・アンジオテンシン系の活性化等のいくつかの病態が指摘されているが、慢性飲酒による交感神経系の関与も指摘されている。

(3) 近年、脂肪肝患者を対象とした臨床研究において、アルコール性脂肪肝が高血圧の関連因子になることが報告された。

しかし、その機序については明らかにされておらず、高血圧とアルコール性肝障害の関連性やその機序について検討した研究報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、高血圧自然発症ラット SHR (Spontaneous hypertensive rat) および正常血圧ラット WKY (Wistar Kyoto normotensive rat) を用いて、高血圧がアルコール性肝障害の増悪リスクとなることを明らかにし、その病態における肝星細胞の関わりについて解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験モデル動物の作成・サンプル採取

7 週齢雄の SHR と WKY に各々 5% アルコール液体食 (アルコール群)、又はコントロール液体食 (コントロール群) を投与し、計 4 群で 49 日間飼育した。なお、本研究は、「動物使用計画書」を提出の上、山口大学動物使用委員会の承認を受けて実施した。

飼育終了時に尾静脈より血液を採取し、ヘパリンを添加した。全身脱血後に肝臓を摘出して湿重量を測定し、各検討を開始するまで -80 で凍結保存、あるいは 4% パラホルマリン液・15% スクロース液による固定処理後に 4 で冷蔵保存した。

### (2) 病理組織検査

肝臓のパラフィン組織切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色・Oil red O 染色・Masson's trichrome 染色・Sirius red

染色を行った後、光学顕微鏡にて肝障害および肝脂肪化、肝線維化の程度を観察した。

Oil red O 染色および Sirius red 染色では、蛍光顕微鏡 BZ-9000 および専用画像解析ソフト (BZ-VIEWER and BZ-ANALYZER 2007; Keyence Corporation, Osaka, Japan) を使用し、各切片の 200 倍撮影像 5 視野に対する脂肪沈着部あるいは線維形成部 (赤色の染色部位) の割合を解析した。

### (3) 生化学検査

血液を遠心分離して得た血漿を用いて、alanine aminotransferase (ALT) を測定して肝機能を評価した。

TM-PEK 膜タンパク質抽出キット (Novagen®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) によって肝組織から細胞質タンパク質画分を抽出し、triglyceride (TG) 量を測定して肝組織中の中性脂肪含有量を評価した。それぞれ測定には自動測定器 DRI-CHEM 4000i (FDC4000; Fuji medical systems, Japan) を使用した。

### (4) ウェスタンブロッティング法

M-PEK 膜タンパク質抽出キット (前述) によって肝組織から抽出した細胞質タンパク質画分を用いて、SDS ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行った。ゲルを PVDF 膜に転写した後、ウェスタンブロッティングを行って、交感神経系のマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の蛋白発現量を定量評価した。内因性コントロールとして、 $\alpha$ -actin を使用した。

### (5) リアルタイム RT-PCR 法

RNeasy ミニキット (QIAGEN, Tokyo, Japan) によって肝組織から全 RNA を抽出し、逆転写にて cDNA を合成した後、TaqMan@assay を用いた RT-PCR 法 (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) によってマーカー ( ) の肝組織中 mRNA 遺伝子発現量を定量評価した。内因性コントロールとして GAPDH を使用した。マーカー：活性化肝星細胞  $\alpha$ -SMA、炎症マーカー TNF- $\alpha$ 、肝線維形成の関連因子 - TGF- $\beta$  1、コラーゲン 1 $\alpha$ 1 (Col1 $\alpha$ 1) および 4 $\alpha$ 1 (Col4 $\alpha$ 1)、交感神経系の関連因子 - アドレナリン作動性  $\alpha$ 1A 受容体 ( $\alpha$ 1A-AR)、神経伝達物質ニューロペプチド Y (NPY)

### (6) 蛍光免疫染色法

肝臓の凍結切片を作成し、各マーカー ( ) の抗体について蛍光免疫染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 Pascal/Version 3.2; Carl Zeiss Microimaging Co. Ltd., Zeiss, Germany) で観察した。各切片の 63 倍対物レンズでの撮影像 20 視野に対する染色陽性率の割合を解析した。マーカー：活性化肝星細胞  $\alpha$ -SMA、交感神経系の関連因子 - アドレナリン作動性  $\alpha$ 1A 受容体 ( $\alpha$ 1A-AR)、神経伝達物質 neuropeptide Y (NPY)

#### (7)統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。統計学的処理は専用ソフト Statcel2 (OMS Publishing, Inc., Saitama, Japan)を用いて、分散分析 (ANOVA) を行い、多重比較検定を行った。統計学的有意差は  $p < 0.05$  とした。

#### 4. 研究成果

##### (1)病理組織検討結果

HE 染色では全群で明らかな炎症反応を認めなかった。SHR のアルコール群にて中心静脈周囲の肝細胞での空胞変性が目立って認められた。

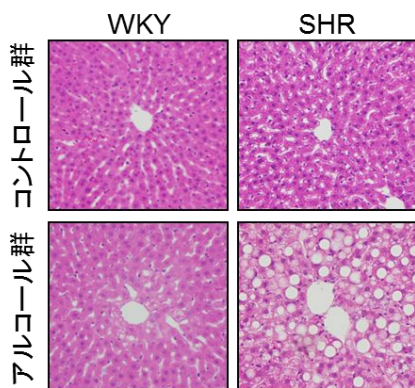


図1 HE染色像(100倍)

Oil red O 染色では、WKY、SHR ともにアルコール群にて中心静脈を中心に脂肪滴沈着が増加し、SHR ではより高度であった。これらの観察結果は脂肪沈着の定量的解析で有意差をもって示された。また、コントロール群間では、WKY に比較して SHR に脂肪滴沈着の有意な増加を認めた。なお、肝重量は SHR、WKY ともにアルコール群で有意に増加し、SHR はより高値を示した。

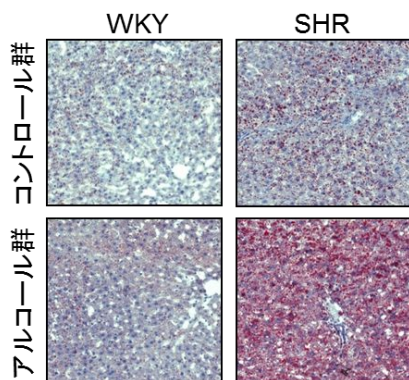


図2 Oil red O 染色像(200倍)

Sirius red 染色および Masson's trichrome 染色では、WKY、SHR ともにアルコール群にて中心静脈周囲や細胞周囲の線維形成を認め、SHR ではより高度の線維形成を認めた。Masson's trichrome 染色では、中心静脈周囲の非実質細胞の増加が目立って認められた。また、線維形成については、Sirius red 染色の定量的解析にて有意差をも

って示された、コントロール群間では WKY に比較して SHR で有意な増加を認めた。

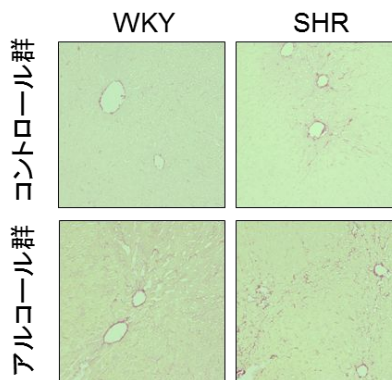


図3 Sirius red染色像(200倍)

##### (2)生化学検査の検討結果

SHR、WKY ともに ALT および肝内 TG 含有量は上昇し、SHR ではより高値を示した。また、各コントロール群間に有意差を認めなかった。

##### (3)ウェスタンブロッティング法の検討結果

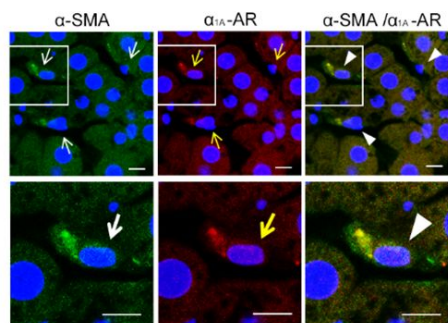
SHR、WKY ともにアルコール群にて肝内 TH 蛋白発現量は増加する傾向を示し、特に SHR ではより高値を示した。

##### (4)リアルタイム RT-PCR 法の検討結果

SHR、WKY ともにアルコール群にて肝内  $\alpha$ -SMA、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、Col1a1、Col4a1、 $\alpha$ <sub>1A</sub>-AR、NPY の mRNA 遺伝子発現量は増加し、特に SHR ではより高値を示した。

##### (5)蛍光免疫染色法の検討結果

SHR、WKY ともにアルコール群にて肝切片での  $\alpha$ -SMA 抗体、 $\alpha$ <sub>1A</sub>-AR 抗体、NPY 抗体の染色陽性率は増加し、特に SHR ではより高値を示した。抗- $\alpha$ -SMA 抗体と抗- $\alpha$ <sub>1A</sub>-AR 抗体の二重陽性率についても同様の傾向を示した。これらの結果は、 $\alpha$ -SMA、 $\alpha$ <sub>1A</sub>-AR、NPY の肝内 mRNA 遺伝子発現の検討結果と同様の傾向を示した。



(1/10 μm)

図4-1 SHRアルコール群における  $\alpha$ -SMA と  $\alpha$ <sub>1A</sub>-AR の蛍光免疫二重染色像

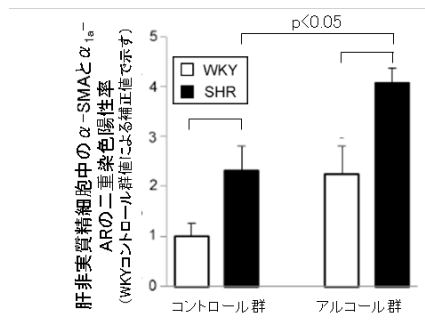


図4-2 α-SMAとα<sub>1a</sub>-ARの蛍光免疫二重染色の陽性率

#### (6)結果のまとめ

本実験動物では慢性アルコール投与によって、アルコール性脂肪肝を示すことが確認された。特に SHR では、肝機能障害および肝内の脂肪含有量増加、肝線維化に関連する遺伝子発現量の増加がより高度となり、アルコール性肝障害のより進展した病像を示した。

アルコールの慢性投与によって、SHR、WKYともに交感神経 α<sub>1a</sub> 受容体や NPY、活性化肝星細胞の mRNA 遺伝子発現や同免疫染色陽性率、TH 蛋白発現量が増加する傾向を示し、この傾向は SHR ではより強く認められた。

これより、SHR では WKY と比較して、慢性アルコール投与による肝内交感神経系の異常活性化および肝星細胞活性化がより亢進した状態を示したと考えられ、肝星細胞に発現する α<sub>1a</sub> 受容体への交感神経刺激が肝障害の進展に寄与している可能性が示唆された。

#### (7)結論

本研究の検討結果は、SHR への慢性アルコール投与が交感神経系の異常活性化の増悪をきたし、アドレナリン作動性 α<sub>1a</sub> 受容体刺激を亢進させることで、活性化肝星細胞の肝障害への寄与をより促進させている可能性を示唆するものと考えられる。

以上から、高血圧がアルコール性肝障害の増悪リスクとなる一方で、高血圧者のアルコール性肝障害の進展機序には交感神経の異常活性化が関与することが明らかとなり、高血圧と慢性飲酒は、交感神経活性化の相乗効果によって互いにその病態の増悪因子として影響しあっている可能性が示唆された。

#### <引用文献>

Hakucho A, Jinyao Liu, Tatsuya Fujimiya, Carvedilol improves ethanol-induced liver injury via modifying the interaction between oxidative stress and sympathetic hyperactivity in rats, *Hepatol Res.*, 44(5), 2014, 560 - 570

Liu J, Takase I, Hakucho A 他, Carvedilol Attenuates the Progression of Alcohol Fatty Liver Disease in Rats, *Alcohol Clin Exp Res.*, 9, 2012, 1587 - 1599

MacMahon S, Alcohol consumption and hypertension, *Hypertension*, 9, 1987, 111-121

Nakamura K, Okamura T, Hayakawa T 他, NIPPON DATE 90, The Proportion of Individuals with Alcohol-Induced Hypertension among Total Hypertensives in a General Japanese Population: *Hypertens Res.*, 30, 2007, 663-665

Oben JA, Roskams T, Yang S 他, Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters, *Gut.*, 53, 2004, 438-445

Ohira T, Tanigawa T, Tabata M 他, Effects of habitual alcohol intake on ambulatory blood pressure, heart rate, and its variability among Japanese men, *Hypertension*, 53, 2009, 13-19

Toshikuni N, Fukumura A, Hayashi N 他, Comparison of the relationships of alcoholic and nonalcoholic fatty liver with lifestyle-related diseases, *Alcohol and Biomedical Research*, 31, 2012, 83-86

#### 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2件)

白鳥彩子、劉金耀、藤宮龍也、慢性飲酒による交感神経活性化が及ぼす心臓性突然死およびアルコール性脂肪肝への影響、月刊細胞、査読無、47(15)、2015、32 - 36、DOI なし

白鳥彩子、劉金耀、劉旭、藤宮龍也、高血圧症がアルコール性肝障害に及ぼす影響 SHR ラット慢性飲酒モデルによる基礎的検討、アルコールと医学生物学、査読有、33、2015、95 - 98、DOI なし

〔学会発表〕(計2件)

白鳥彩子、他、高血圧自然発症ラットにおけるアルコール性脂肪肝の進展と交感神経活性との関連、第100回日本法医学会全国集会、2016年6月17日、東京(きゅりあん)

白鳥彩子、基礎研究からみた高血圧者の飲酒とアルコール性肝障害、第49回日本アルコール・薬物医学会、2014年10月4日、横浜市(パシフィコ横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姫宮 彩子(白鳥) (HIMEMIYA-HAKUCHO ,  
Ayako)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90593301

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

劉 金耀 (LIU, Jinyao)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60379956

藤宮 龍也 (FUJIMIYA, Tatsuya)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50219044