

カルベジロール投与による交感神経活動と酸化ストレスの相互作用  
を介するアルコール性肝障害の改善：慢性飲酒ラットモデルを用い  
た検討

氏名 白鳥彩子

所属 山口大学大学院医学系研究科

システム統御医学系専攻

法医・生体侵襲解析医学分野

---

平成25年12月

## 目次

1. 要旨	2
2. 研究の背景	2-3
3. 目的	3-4
4. 方法	4-8
(1) 対象	4-5
(2) 方法	5-8
(3) 解析	8
5. 結果	8-12
6. 考察	13-15
7. 結語	15
8. 謝辞	15
9. 参考文献	15-19

## 1. 要旨

本研究は、アルコール性脂肪肝を発症する慢性飲酒ラットモデルを用いて、交感神経遮断薬であるカルベジロール投与による交感神経活動の亢進、肝内酸化ストレス、インスリンシグナル伝達障害およびアルコール性肝障害の変化を解析し、その関連性を検討することを目的として行った。方法として、7週齢のWistar系雄ラットを用いてアルコール液体食投与群、コントロール液体食投与群、各々のカルベジロール追加投与群の計4群での7週間慢性飼育を行った後、交感神経活動、肝内酸化ストレス、肝内インスリン抵抗性、アルコール性肝障害について、それぞれ生化学検査、ELISA法、蛍光免疫二重染色、病理組織染色法、ウェスタンブロッティング法、リアルタイムRT-PCR法等を用いて評価した。その結果、アルコール投与によって肝細胞の脂肪変性および肝内triglyceride量の増加、血中alanine aminotransferase値の上昇、血中ノルアドレナリン代謝物である3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol量や肝内ノルアドレナリン量の増加、肝内8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)発現量の増加、superoxide dismutase 1発現量の低下傾向、insulin receptor substrate 1発現量の低下を認めた。また、蛍光免疫二重染色にて肝星細胞の8-OHdGの発現量が有意に増加した。さらに、これらの変化は、カルベジロールの追加投与によってコントロールラットのレベルに是正された。以上の結果から、アルコール性脂肪肝の発生機序に、アルコールによる交感神経活動亢進と肝内酸化ストレスの相互作用およびインスリン抵抗性が関与する可能性が示唆され、活性化肝星細胞が酸化ストレスの標的細胞である可能性が示唆された。

## 2. 研究の背景

アルコール摂取は肝臓内で酸化ストレスを引き起こす<sup>1)</sup>。肝臓はアルコール代謝の中心を担う臓器であり、その代謝過程で活性酸素(reactive oxygen species, ROS)が産生されるが、通常は抗酸化系の働きで消去される。しかし、慢性的なアルコール摂取によってROSの処理能力を超えると酸化ストレスが惹起され、DNAや脂質、蛋白質などを傷害し、肝障害を引き起こす原因となる<sup>2)</sup>。アルコール代謝過程に伴う酸化ストレスに加え、鉄過剰蓄積や腸内細菌由来エンドトキシン(lipopolysaccharide, LPS)などの様々な反応系やメディエーターの関与が明らかにされているが<sup>3,4)</sup>、アルコール性肝障害における酸化ストレス発生のメカニズムの解明は未だ十分でない。

一方、アルコール摂取は交感神経活動を亢進させ、血漿中のカテコラミン値<sup>5)</sup>やその代謝物質<sup>6)</sup>、副腎中のカテコラミン合成酵素の遺伝子発現量<sup>7)</sup>などの増加を引き起こすこと



が報告されている。また、Montfort らによる、LPS を接種した慢性飲酒マウスモデルへのアドレナリン前投与が肝障害を増悪させるとの報告<sup>8)</sup>、Ajakaiye らによる、慢性飲酒ラットモデルの肝臓クッパー細胞中アドレナリン作動性  $\alpha_{2A}$  受容体の増加が肝障害メディエーターの一つである炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の分泌に関与するとの報告<sup>9)</sup>、さらに、我々の既報 (Liu ら) による、慢性飲酒ラットモデルへの非選択的  $\beta$  遮断薬カルベジロールの投与が肝星細胞を介した肝脂肪合成や肝線維化を抑制するとの報告<sup>10)</sup> にみられるように、アルコールによる交感神経活動の亢進と肝障害発生との関連性も近年明らかにされてきた。

カルベジロールは交感神経アドレナリン作動性  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  および  $\beta_2$  受容体遮断薬であるが、心疾患領域の研究によって抗酸化作用、抗炎症作用、抗線維化作用など、伝統的な  $\beta$  遮断薬と比較してより多くの効果をもつことが報告されている<sup>11,14)</sup>。また、肝疾患においてもその効果が研究されており、Hamdy らは、四塩化炭素中毒ラットの肝線維化抑制にカルベジロールによる酸化ストレス抑制が関与することを報告している<sup>15)</sup>。さらに、Bakris らは 2 型糖尿病患者や高血圧患者において、Liang らは 2 型糖尿病マウスモデルにおいて、カルベジロールによるインスリン抵抗性の抑制効果を報告している<sup>16,17)</sup>。インスリンのシグナル経路では insulin receptor substrate 1 (IRS-1) が重要な役割を担う<sup>18)</sup>。アルコール摂取はインスリン抵抗性を誘引することが知られており<sup>19)</sup>、de la Monte らはアルコール性肝障害ラットモデルにおいて、IRS-1 遺伝子変異が肝細胞内のインスリンシグナル経路を障害することを報告している<sup>20)</sup>。しかしながら、アルコール性肝障害における酸化ストレス発生、肝内 IRS-1 のシグナル伝達障害に対するカルベジロールの効果を検討した研究は認められていない。

### 3. 目的

本研究の目的は、慢性飲酒ラットモデルを用いて、カルベジロール投与による交感神経活動の亢進、肝内酸化ストレス、インスリンシグナル伝達障害、アルコール性肝障害の変化を評価し、その関連性を解明することである。特にアルコール性肝障害で重要な役割を示すとされる肝星細胞<sup>10)</sup> に注目し、これらの病態における肝星細胞の果たす役割を解明する。カルベジロール投与による交感神経活動の亢進および肝内酸化ストレスの関連性を明らかにすることは、アルコール性肝障害だけでなく様々な酸化ストレス関連疾患の病態の解明にとって意義あるものと考えられる。

なお、酸化傷害のマーカーとして DNA 酸化傷害による生成物である



8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), 抗酸化系のマーカーとしてスーパーオキシアイド除去を担う酵素である superoxide dismutase (SOD) を用い, インスリン抵抗性のマーカーとして IRS-1, 活性化肝星細胞のマーカーとして  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) を用いた.

## 4. 方法

### (1) 対象

7週齢の Wistar 系雄ラット (Charles River Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いて, 先行研究の方法<sup>21, 22)</sup> に準じて慢性飲酒ラットモデルを作成した. 標準固形飼料と Lieber コントロール液体食 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて 5 日間飼育後, 3%エタノール含有の Lieber アルコール液体食 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) を単独で 4 日間, 4%エタノール含有の Lieber アルコール液体食を単独で 3 日間飼育することで液体飼料とアルコールに慣らした後, 5%エタノール含有の Lieber アルコール液体食を 7 週間自由摂取させた群 (Ethanol 群,  $n = 16$ ), 同アルコール液体食摂取 7 週目から 7 日間カルベジロールを同時に投与した群 (Ethanol + carvedilol 群,  $n = 13$ ), 対照として Lieber コントロール液体食を摂取させた群 (Control 群,  $n = 15$ ) および同コントロール液体食摂取 7 週目から 7 日間カルベジロールを同時に投与した群 (Control + carvedilol 群,  $n = 8$ ) の計 4 群による pair-feeding を行った. ここで, pair-feeding とは摂取カロリーおよび体重の差によって生じる病態の影響を排除するために, 等カロリーに調節しながら飼育をする方法である. また, カルベジロールは先行研究に準じて投与した<sup>10)</sup>. 即ち, 同粉末 (DAIICHI SANKYO Co., Ltd., Tokyo, Japan) をポリエチレングリコールと蒸留水の混合溶液に溶解し, 浸透圧ポンプ (model 2ML1; Alzet®, Cupertino, CA, USA) に詰めた後, 1~2%イソフルランと酸素の混合ガス吸入麻酔下にて腹腔内に留置し, 10mg/kg BW/日にて腹腔内投与を行った.

飼育終了時, 1~2%イソフルランと酸素の混合ガス吸入麻酔下にて血液を採取し, 開胸腹して生理食塩水の灌流固定によって全身脱血した後, 肝臓を摘出し, 重さを測定した. 肝臓は実験使用までの間, 液体窒素処理後に凍結保存, あるいは 4%パラホルマリン液による固定処理後に 4°C で保存した.

なお, 本研究は, 「動物使用計画書」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. 動物の飼育・実験は, 山口大学研究推進機構総合科学実験センター生命科学実験施設にて行い, 日照時間は 8:00-20:00 が点灯, 20:00-8:00 が消灯, 室温は  $22 \pm 2\%$ , 湿

度は  $45 \pm 5\%$  であった。

## (2) 方法

### 病理組織染色法による肝障害の評価

固定処理後の肝臓をパラフィン包埋し、 $3\mu\text{m}$  の組織切片を作成した後に Hematoxylin Eosin (HE) 染色を行った。また、固定処理後の肝臓を凍結包埋し、 $5\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した後に Oil red O 脂肪染色を行った。それぞれの標本を光学顕微鏡で観察し、肝障害および肝脂肪化を評価した。

### 生化学的検査による肝障害および肝脂肪化の評価

ヘパリン処理した血液を  $4^{\circ}\text{C} \cdot 10$  分間  $\cdot 3,000g$  で遠心し、血漿成分を得た。自動測定器 DRI-CHEM4000i (FDC4000; Fuji medical systems, Tokyo, Japan) にて、肝逸脱酵素の一つで肝障害のマーカーである alanine aminotransferase (ALT, U/L) 値の血中濃度を測定し、肝障害を評価した。

また、肝組織から抽出した蛋白質画分 (抽出法は後述) を用いて、同測定機で肝内 triglyceride (TG, mg/g total liver protein) 値を測定し、肝内の中性脂肪の蓄積を評価した。なお、肝 TG 値の解析結果は Control 群の平均値による補正值 (百分率) で示した。

### 高速液体クロマトグラフィー法・ELISA 法による交感神経活動の評価

血液の遠心後に得た血漿を用いて、高速液体クロマトグラフィー法 (GC-14B and HSS-2A, C-R6A; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) にてノルアドレナリン代謝物の一つ 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG, ng/mg) の血中濃度を測定し、全身の交感神経活動を評価した。なお、解析結果は Control 群の平均値による補正值 (百分率) で示した。

また、肝組織から抽出した蛋白質 (抽出法は後述) を用いて、肝内ノルアドレナリン (noradrenaline, ng/ml.) 量を測定し、肝臓内の交感神経活動を評価した。ノルアドレナリン酵素結合免疫吸着測定キット (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Nordhorn, Germany) を使用した ELISA 法で得た反応生成物について、マイクロプレートリーダー (Viento® Nano with Gen5 software; DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan) で  $450\text{ nm}$  波長域の吸光度を測定した。なお、解析結果は Control 群の平均値による補正值 (百分率) で示した。



## 肝組織の蛋白質抽出法

肝組織の蛋白質は、TM-PEK 膜タンパク質抽出キット (Novagen®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて抽出した。肝組織をプロテアーゼ阻害剤 Cocktail Set III および Extraction buffer 1 中に加えてホモジナイズし、その溶液を 4°C・5 分間・1,000 g で遠心した後に上清を回収した。この上清を使用して肝 TG 値測定や後述のウェスタンブロットティング法を行った。また、遠心後に得られた沈殿物にプロテアーゼ阻害剤 Cocktail Set III および Extraction buffer 2B を加えた溶液を 4°C・15 分間・16,000 g で遠心した後に上清を回収した。この上清を使用して肝ノルアドレナリン量測定を行った。なお、蛋白濃度は プロテインアッセイ (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いて Bradford 法にて行った。

## ウェスタンブロットティング法による肝内 SOD-1 蛋白発現量の評価

肝組織の蛋白質画分を用いてウェスタンブロットティングを行った。まず、検体をサンプルバッファーで調整し、95°C・5 分間の加熱処理をした後に SDS ポリアクリルアミドゲル (ミニプロティアン TGX ゲル 4-20%; Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) に添加し、電気泳動を行った。泳動後のゲルをメタノールで活性化した PVDF 膜に転写した後に、転写後の PVDF 膜を使用し、5%スキムミルク溶液にてブロッキング後に一次抗体に 4°C・一晩反応させ、二次抗体に室温中で 1 時間反応させた。一次抗体は SOD-1 (1:100; 抗ラビットポリクローナル抗体, sc-11407, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA),  $\beta$ -actin (1:5,000; 抗マウスモノクローナル抗体, A2228, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を反応させ、二次抗体はそれぞれ、HRP 標識抗マウス抗体 (1:10,000; NA931; GE Healthcare UK Ltd., Bucks, UK), HRP 標識抗ラビット抗体 (1:10,000; NA934; GE Healthcare UK Ltd., Bucks, UK) を反応させた。抗体反応後、発光検出し、Quantity One ソフトウェア (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) にて定量解析した。なお、解析結果は Control 群の平均値による補正值 (百分率) で示した。

## リアルタイム RT-PCR 法による肝内 SOD-1 mRNA および IRS-1 mRNA 発現量の評価

肝組織から RNeasy ミニキット (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いて全 RNA を抽出した後に、High Capacity RNA-to-cDNA キット (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いて全 RNA から cDNA を合成した。cDNA 生成物に TaqMan® assay (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を反応させ、リアルタイム RT-PCR 法にて肝組織中の SOD-1 mRNA (ID:



Rn00566938\_m1) および IRS-1 mRNA (ID: Rn02132493\_s1) の発現量を測定し、定量解析した。内因性コントロールとして GAPDH (ID: Rn99999916\_s1) を使用した。なお、解析結果は Control 群の平均値による補正值 (百分率) で示した。

#### ELISA 法による肝 DNA 中 8-OHdG の定量評価

肝組織から DNA エキストラクター®TIS キット (Wako, Osaka, Japan) を用いて DNA を抽出し、加水分解処理 (Wako, Osaka, Japan) を行った後、高感度 8-OHdG Check キット (Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan) を用いて ELISA 法を行った。ELISA 法で得られた反応生成物について、マルチラベルカウンター (Wallac Victor 2, model 1420 ARVOsx, Turku, Finland) で 450 nm 波長域の吸光度を測定し、WorkOut ソフトウェア (PerkinElmer Co., Ltd., Kanagawa, Japan) にて肝 DNA 中の 8-OHdG (ng/mg DNA) を定量解析した。なお、解析結果は Control 群の平均値による補正值 (百分率) で示した。

#### 蛍光免疫組織染色法による肝内 8-OHdG および SOD-1 発現量, 肝星細胞における 8-OHdG 発現量の評価

固定処理後の肝臓を凍結包埋し、10 $\mu$ m の凍結切片を作成した後、8-OHdG および SOD-1, 8-OHdG および  $\alpha$ -SMA をそれぞれ蛍光免疫二重染色した。一次抗体に 4°C・72 時間反応させ、二次抗体に室温中で 1 時間反応させ、核染色 (TO-PRO®-3 iodide; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) を行った後、標本を作成した。一次抗体は 8-OHdG (1:500; 抗ヤギポリクローナル抗体, GTX10802, GeneTex, Inc., San Antonio, TX, USA), SOD-1 (1:500; 抗ラビットポリクローナル抗体, sc-11407, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA),  $\alpha$ -SMA (1:500; 抗ラビットポリクローナル抗体, E2464, Spring Bioscience, Fremont, CA, USA) を反応させ、二次抗体はそれぞれ, FITC 標識抗ラビット抗体 (1:1,000; AP182F, Chemicon, Temecula, CA, USA), Cy3 標識抗ヤギ抗体 (1:1,000; AP106C, Chemicon, Temecula, CA, USA) を反応させた。標本は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、各々の抗体に対する 63 倍対物レンズの観察像における非実質細胞の陽性細胞数 (核の数) を数え、その観察像の非実質細胞全体数に占める陽性率を算出した。この解析を観察写真 30 枚において行い、肝内 8-OHdG および SOD-1 の発現量、また肝星細胞における 8-OHdG の発現量を評価した。なお、解析結果は Control 群の平均値による補正值 (百分率) で示し

た.

### (3) 解析

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) を用いて一元配置分散分析法 (one-way analysis of variance) を行い, 多重比較検定 (Bonferroni/Dunn 法) を行った. 統計学的有意差は  $p < 0.05$  とした.

## 5. 結果

### 慢性飲酒ラットモデルの評価

本研究の検討に使用した慢性飲酒ラットモデルについて, 総エネルギー摂取量および飼育前後の体重に 4 群間で有意な差を認めなかった. また, エタノールを投与した 2 群の総エタノール摂取量は, Ethanol 群で  $164 \pm 12\text{g}$ , Ethanol + carvedilol 群で  $164 \pm 10\text{g}$  と 2 群間に有意な差を認めなかった. これより, ラットモデルの作成は適切であったといえる.

### 慢性アルコール投与による交感神経活動の亢進とカルベジロールの抑制作用

血中 MHPG 値および肝 noradrenaline 値は, 他の 3 群と比較して Ethanol 群で有意に増加した (図 1A および 1B). なお, Control 群と Control + carvedilol 群との間に差を認めなかった (図 1A および 1B).

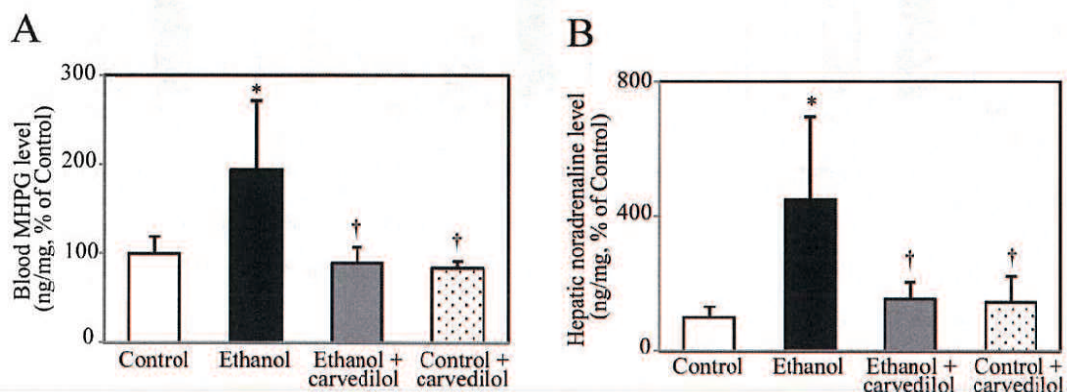


図 1 交感神経活動の変化. A: 血中 MHPG 値 (ng/mg, % of Control). B: 肝内 noradrenaline 値 (ng/mg, % of Control), 平均値±標準偏差,  $n=4$ . \* $p < 0.05$  vs. Control, † $p < 0.05$  vs. Ethanol.



## アルコール性肝障害の発生とカルベジロールの改善作用

HE 染色による病理組織像では, Ethanol 群において中心静脈を中心に肝細胞の空胞変性がみられ, 明らかな炎症細胞浸潤はみられなかった. また, Oil red O 脂肪染色による病理組織像では中心静脈を中心に脂肪滴沈着を強く認めた (図 2A および 2B). 肝重量および血中 ALT 値, 肝内 TG 値は, 他の 3 群と比較して Ethanol 群で有意に増加した (図 2C-2E). なお, いずれも Control 群と Control + carvedilol 群との間に差を認めなかった (図 2A-2E).

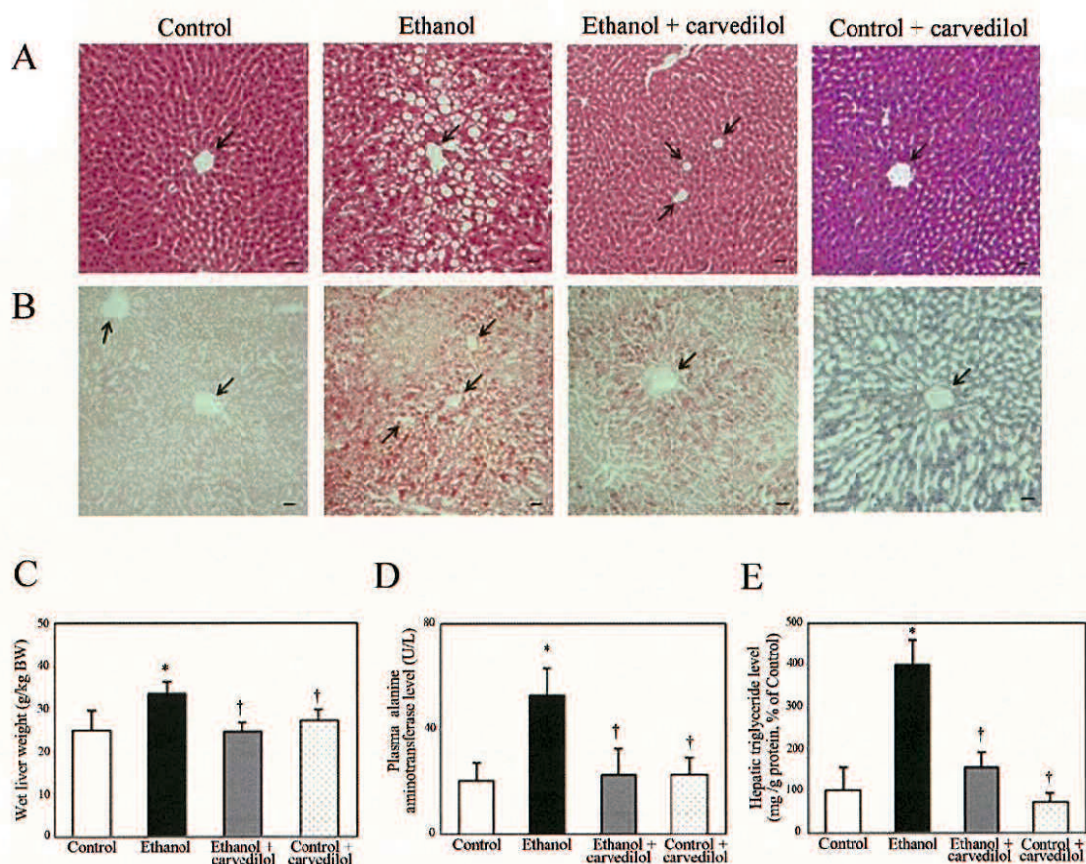


図 2 アルコール性脂肪肝および肝機能の変化. A: 肝組織の HE 染色典型像. B: 肝組織の Oil red-O 染色典型像. (A, B ともに黒矢印は中心静脈を示す, バーは 50 $\mu$ m) C: 肝重量 (g/kg BW, n=7), D: 血中 ALT 値 (U/L, n=4), E: 肝内 TG 値 (mg/g protein, % of Control, n=4). 平均値 $\pm$ 標準偏差, \*p < 0.05 vs. Control, †p < 0.05 vs. Ethanol.

ここまでの検討で, 交感神経活動 (図 1A および 1B), 肝障害 (図 2A および 2B)・肝重量 (図 2C)・血中 ALT 値 (図 2D)・肝内 TG 値 (図 2E) の解析結果を示したが, Control 群と Control + carvedilol 群との間に差を認めない, 即ち, Control 群ラットに対



してカルベジロールの有害な影響はみられなかったため、酸化ストレスおよびインスリン抵抗性の種々の検討については、Control群、Ethanol群、Ethanol + carvedilol群の3群で評価することとした。

### 慢性アルコール投与による肝内酸化ストレスとカルベジロールの抑制作用

肝内酸化ストレスの評価をするために、8-OHdG および SOD-1 の蛍光免疫二重染色を行った。Ethanol 群では Control 群と比較し、8-OHdG 陽性細胞は有意に増加し (図 3A および 3C,  $375 \pm 75$  vs.  $100 \pm 17$ , % of Control), SOD-1 陽性細胞は有意に減少した (図 3B および 3D,  $48 \pm 15$  vs.  $100 \pm 35$ , % of Control). しかし, Ethanol + carvedilol 群では Ethanol 群と比較し、8-OHdG 陽性細胞は有意に減少し (図 3C,  $245 \pm 80$  vs.  $375 \pm 75$ , % of Control), SOD-1 陽性細胞は有意に増加した (図 3D,  $152 \pm 21$  vs.  $48 \pm 15$  %, of Control). なお, 各抗体の陽性細胞は肝細胞 (実質細胞) にはほとんど認めず, 多くは肝細胞間に分布する非実質細胞に認められた (図 3A).

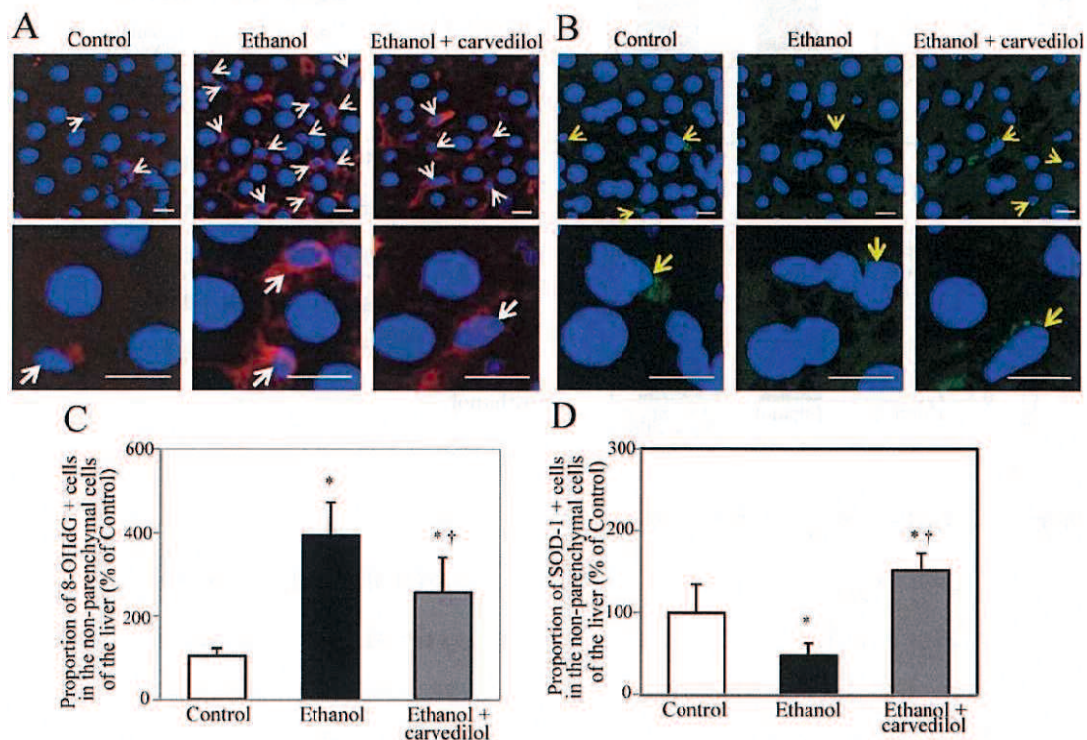


図 3 蛍光免疫染色法による肝内酸化ストレスの変化. A: 肝組織における抗 8-OHdG 抗体陽性典型像 (白矢印, バーは 10 $\mu$ m). B: 肝組織における抗 SOD-1 抗体陽性典型像 (黄矢印, バーは 10 $\mu$ m). 各典型像の下部に拡大像を示す. C: 非実質細胞数における 8-OHdG 陽性細胞率 (% of Control). D: 非実質細胞数における SOD-1 陽性細胞率 (% of Control). 平均値 $\pm$ 標準偏差, n=5, \*p < 0.05 vs. Control, †p < 0.05 vs. Ethanol.

また, ELISA 法による肝 DNA 中 8-OHdG 量, リアルタイム RT-PCR 法による肝内 SOD-1 mRNA 発現量およびウェスタンブロッティング法による肝内 SOD-1 蛋白発現量の解析では, 蛍光免疫染色の結果と同様の傾向を認めた. 即ち, Ethanol 群では Control 群と比較し, 肝内 8-OHdG 量は有意に増加し (図 4A,  $151 \pm 43$  vs.  $100 \pm 21$ , % of Control), 肝内 SOD-1 mRNA 発現量および SOD-1 蛋白発現量は減少傾向を認めたが, Ethanol + carvedilol 群では Ethanol 群と比較し, 肝内 8-OHdG 量は有意に減少し (図 4A,  $88 \pm 29$  vs.  $151 \pm 43$ , % of Control), 肝内 SOD-1 mRNA 発現量の有意な増加を認め (図 4B,  $119 \pm 17$  vs.  $72 \pm 18$ , % of Control), 肝内 SOD-1 蛋白発現量は増加傾向を認めた (図 4C).

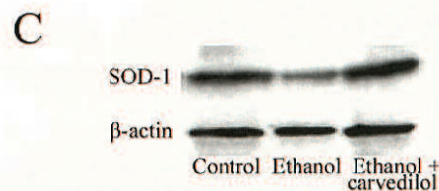
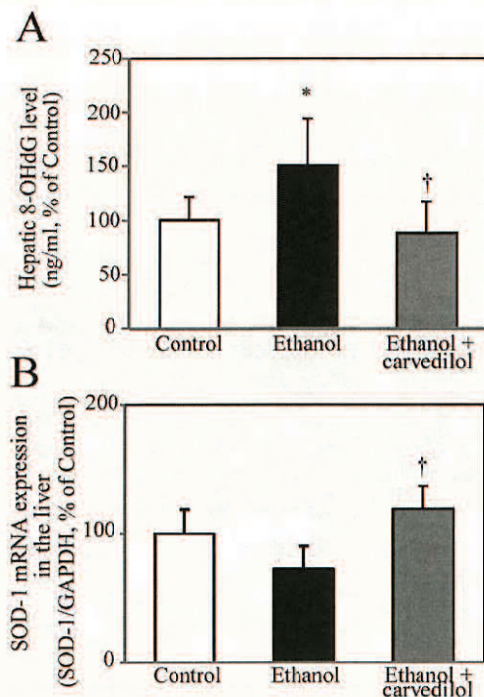


図 4 肝内酸化ストレスの変化. A: 肝 DNA 中 8-OHdG 量 (ng/ml, % of Control, n=6). B: 肝内 SOD-1 mRNA 発現量 (SOD-1/GAPDH, % of Control, n=4). C: 肝内 SOD-1 蛋白発現の典型バンド像. 平均値±標準偏差, \*p < 0.05 vs. Control, †p < 0.05 vs. Ethanol.

### 慢性アルコール投与による肝星細胞の酸化傷害

肝星細胞における酸化ストレスを評価するために, 8-OHdG および  $\alpha$ -SMA の蛍光免疫二重染色を行った. Ethanol 群では Control 群と比較し,  $\alpha$ -SMA 陽性細胞は有意に増加し (図 5A および 5B), 8-OHdG および  $\alpha$ -SMA の二重陽性細胞は有意に増加したが (図 5A および 5C, 8-OHdG/ $\alpha$ -SMA), Ethanol + carvedilol 群では Ethanol 群と比較し, それぞれ有意に減少した (図 5A~5C).

### 慢性アルコール投与による肝内インスリン抵抗性とカルベジロールの抑制作用

肝臓内のインスリン抵抗性を評価するために, IRS-1 mRNA の発現量を測定した.



Ethanol 群では Control 群と比較し、肝内 IRS-1 mRNA 発現量は有意に低下したが、Ethanol + carvedilol 群では Ethanol 群と比較し、肝内 IRS-1 mRNA 発現量は有意に増加した (図 6)。

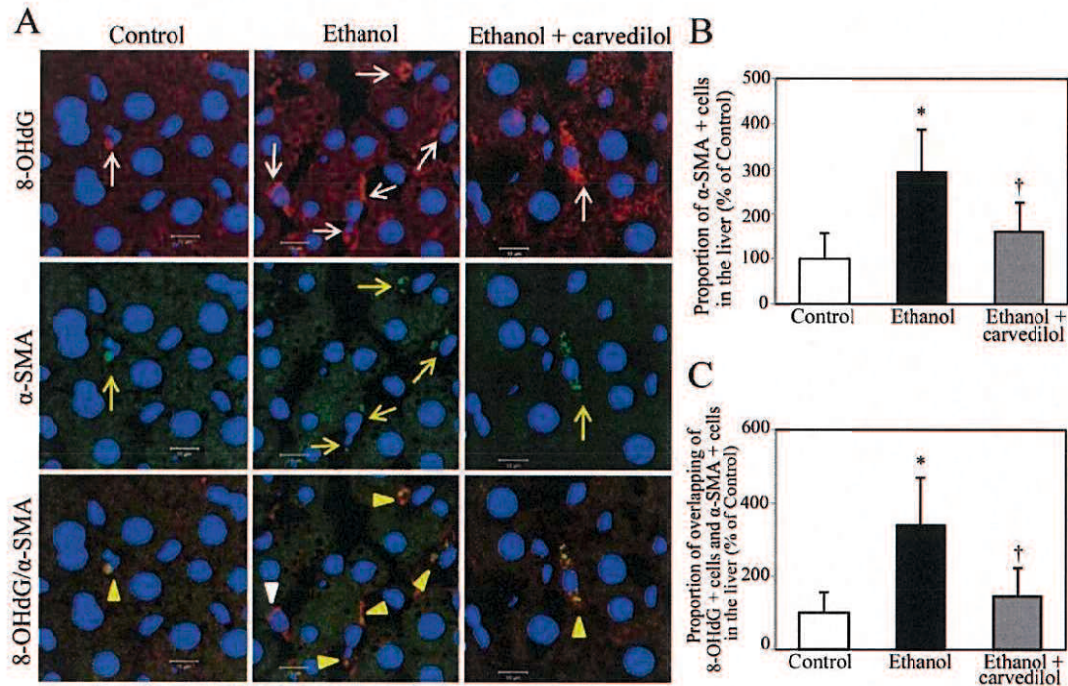


図 5 蛍光免疫染色法による活性化肝星細胞の酸化障害の変化。A: 肝組織における抗 8-OHdG 抗体典型陽性像 (白矢印, 白三角), 抗  $\alpha$ -SMA 抗体典型陽性像 (黄矢印), 両抗体の典型二重陽性像 (黄三角)。バーは 10 $\mu$ m。B: 肝臓細胞数における  $\alpha$ -SMA 陽性細胞率 (% of Control)。C: 肝臓細胞数における 8-OHdG および  $\alpha$ -SMA 二重陽性細胞率 (% of Control)。平均値 $\pm$ 標準偏差, n=5, \*p < 0.05 vs. Control, †p < 0.05 vs. Ethanol.

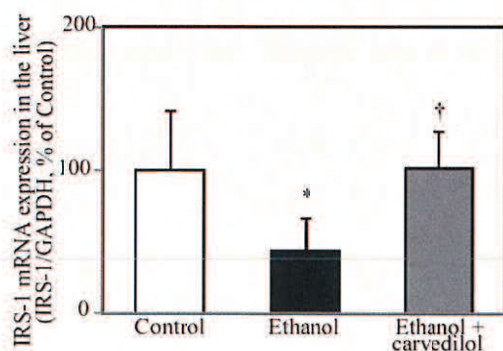


図 6 肝内インスリン抵抗性の変化。IRS-1 mRNA 発現量 (IRS-1/GAPDH, % of Control, n=5)。平均値 $\pm$ 標準偏差, \*p < 0.05 vs. Control, †p < 0.05 vs. Ethanol.



## 6. 考察

本研究の慢性飲酒ラットモデルは、軽度肝機能低下を伴い、組織学的に明らかな炎症細胞浸潤のない肝脂肪化を呈したことから、アルコール性肝障害の初期像であるアルコール性脂肪肝を生じたと考えられる。また、アルコール性肝障害の発生に伴って、交感神経活動の亢進、過剰な酸化傷害による肝内酸化ストレスの発生、肝内インスリン抵抗性がみられたが、これらの変化はすべて、カルベジロールの追加投与によって改善、あるいは抑制された。

アルコール摂取による酸化ストレスは、遺伝子転写やそれに続く細胞内標的の活性化に影響を及ぼし、肝障害発生の一機序とされている。活性酸素 (ROS)、あるいはフリーラジカルは、酸素由来の対電子をもつ独立した種で、スーパーオキシドラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) や過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) などがある。フリーラジカルは化学的に不安定で反応性が非常に高いため、DNA 損傷による変異、酵素の不活性化、蛋白変性、脂質過酸化、生体膜の破壊、アルデヒド付加物の生成等を起こし、最終的に細胞死をまねく<sup>23-25)</sup>。DNA の酸化的損傷は様々な疾患に関与し、酸化損傷塩基は酸化ストレスに起因する疾患のバイオマーカーとなると考えられている<sup>26)</sup>。8-OHdG は活性酸素によるグアニシンの酸化損傷塩基の一つで、現在最も多用される酸化損傷マーカーであるが、アルコール摂取によってマウス肝内の 8-OHdG 量<sup>27)</sup> やアルコール依存症患者の血中 8-OHdG 量が上昇することが報告されている<sup>28)</sup>。一方、生体には ROS に対抗するため抗酸化酵素や抗酸化物質による抗酸化システムがある。SOD は  $O_2^{\cdot-}$  を特異的に除去する酵素で、細胞内分布の違いにより 3 種類のアイソザイムが存在しており、SOD-1 (Cu, Zn-SOD) は主に細胞質やミトコンドリアの内外膜間に分布している<sup>29-31)</sup>。アルコール摂取における SOD 活性については一定の見解が得られておらず、その原因としてモデル動物や食餌、アルコール投与量・期間等の違いが指摘されている<sup>30, 32)</sup>。酸化ストレスは、ROS による酸化的損傷 (酸化系) と活性酸素の除去や酸化的損傷の修復を行う抗酸化力 (抗酸化系) が不均衡化した状態を反映していると考えられるため、本研究では蛍光免疫二重染色による 8-OHdG および SOD-1 の発現量の比較解析を中心に、両者の肝内発現量の検討を行った。その結果、アルコール投与によって 8-OHdG 発現量は著明に増加し、SOD-1 発現量は低下傾向を示したことから、酸化系の亢進が優位となった酸化・抗酸化系のバランスの不均衡化によって酸化ストレス発生が誘引されたと考えられる (図 3 および図 4 参照)。

酸化ストレスは交感神経系の病態にも関与し<sup>33)</sup>、高血圧などの交感神経活動の亢進をきたす疾患に関与していることが報告されている<sup>34)</sup>。ROS を主に生成する酵素系として



NADPH オキシダーゼ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, Nox) が知られるが、 $O_2^{\cdot-}$ は Nox の活性化によって生成され、それによる酸化ストレスが血管拡張作用をもつ一酸化窒素 (NO) の不活性化を介し、神経効果器接合部でのノルアドレナリン分泌量を増加させること、さらに抗酸化剤である N-アセチルシステイン投与で血中ノルアドレナリン分泌が抑制されることが報告されている<sup>35)</sup>。本研究では、カルベジロール投与によって肝障害が改善されるとともに、肝内酸化ストレスおよび交感神経活動亢進が抑制されたことから、アルコール性脂肪肝の発生に酸化ストレスと交感神経活動の相互作用が関与していると考えられる (図 3 および図 4 参照)。

アルコール摂取による肝臓内のインスリンシグナル伝達障害は、脂質過酸化や DNA 損傷、蛋白のカルボニル化など、肝内の酸化ストレス増加と関連している<sup>36, 37)</sup>。一方、カルベジロールは交感神経活動亢進の抑制を介して血糖やインスリン感受性を調節し、インスリン抵抗性を改善させるとの報告がある<sup>16, 17, 38)</sup>。IRS-1 は、インスリンおよびインスリン成長因子受容体の活性化を介するインスリンシグナル伝達経路において重要な役割を担う<sup>19, 39)</sup>。本研究では、アルコール投与で低下した肝内 IRS-1 遺伝子発現がカルベジロール投与によって増加し、肝内インスリン抵抗性の改善が示されたことから、アルコール性脂肪肝におけるインスリン抵抗性に交感神経活動と酸化ストレスの相互作用が関与していると考えられる (図 6 参照)。

肝臓の非実質細胞の一つである肝星細胞は、アルコール性肝障害において線維化を主に担う細胞とされるが、アルコール性脂肪肝などの初期病態への関与も重要であり<sup>10)</sup>、酸化ストレスの発生も報告されている<sup>40)</sup>。本研究では、アルコール性脂肪肝において酸化ストレスの発生を担う細胞を調べるために蛍光免疫染色法を行った結果、8-OHdG 陽性細胞は肝細胞 (実質細胞) にはほぼ認めず、多くは非実質細胞にみられ (図 3A 参照)、8-OHdG と  $\alpha$ -SMA の二重染色によって、主に肝星細胞で 8-OHdG 産生を認めることが明らかとなった (図 5 参照)。これらの結果から、アルコール性肝障害、少なくともアルコール性脂肪肝などの初期病態に関与する酸化ストレスは、肝細胞ではなく非実質細胞、特に活性化肝星細胞で発生している可能性が示唆された。肝星細胞には交感神経繊維が分布し<sup>41)</sup>、アドレナリン作動性  $\alpha$  および  $\beta$  受容体が発現している<sup>42, 43)</sup> ことから、ノルアドレナリンが肝臓で作用する際の標的細胞となりうると思われる。ヒト肝星細胞のアドレナリン作動性  $\alpha$  および  $\beta$  受容体へのノルアドレナリン刺激が、炎症性サイトカイン分泌に関する細胞内シグナル伝達を活性化するとの報告もある<sup>43)</sup>。本研究の結果は、アルコールによる肝内酸化ストレスと交感神経活動の相互作用によって肝星細胞が活性化し、肝障害を引き起こす

様々な反応系に影響を及ぼすことで、アルコール性肝障害に関与している可能性を示唆するが、今後肝星細胞の単離・培養による *in vitro* 実験によって更なる検証を行う必要がある。

## 7. 結語

本研究の慢性飲酒ラットモデルにおいて、アルコール性脂肪肝の発生・進展機序には、アルコールによる交感神経活動の亢進と肝内酸化ストレスの相互作用およびインスリン抵抗性が関与すること、肝星細胞における酸化傷害の発生が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、カルベジロールは交感神経活動亢進の抑制に加え、酸化ストレス抑制やインスリン抵抗性の改善などの作用によってアルコール性肝障害の治療薬となりうることが示唆された。

## 8. 謝辞

本研究は、著者が山口大学大学院医学系研究科医学博士課程特例コース在学中に遂行いたしました。本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導ご鞭撻を頂きました同大学院法医・生体侵襲解析医学分野藤宮龍也教授および劉金耀講師に深く感謝と敬意の意を申し上げます。

在学中ならびに研究過程におきまして、多大なるご指導、ご激励ならびにご支援を頂きました法医・生体侵襲解析医学分野高瀬泉准教授をはじめ、教室員の皆様や関係学部生の皆様、近隣研究室の皆様に深く感謝申し上げます。また、学会活動を通して、ご助言およびご意見を頂きました多くの先生方に深く感謝申し上げます。

本研究および関連研究の遂行におきまして、一部で平成 24 年度および 25 年度山口大学学長長裁量経費〔戦略的研究推進経費〕若手研究者支援経費のご支援を賜ると同時に、多くの関係者の皆様に多大なるご助言を頂きました。深く感謝申し上げます。

最後になりましたが、大学院在学中の 4 年間に於いてあたたかく見守り支えてくださった家族や友人らに心から感謝いたします。

## 9. 参考文献

- 1) Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 2009; 83: 519-48.
- 2) Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol Res* 2012; 42: 741-9.



- 3) Comporti M, Signorini C, Leoncini S *et al.* Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr* 2010; 5: 101-9.
- 4) Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 277-84.
- 5) Bravo IR, Acevedo CG, Gallardo V. Acute effects of ethanol on liver blood circulation in the anesthetized dog. *Alcohol Clin Exp Res* 1980; 4: 248-53.
- 6) Liu J, Fujimiya T. Abrupt termination of an ethanol regimen provokes ventricular arrhythmia and enhances susceptibility to the arrhythmogenic effects of epinephrine in Rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2010; 34: S45-53.
- 7) Patterson-Buckendahl P, Kubovcaková L, Krizanová O, Pohorecký LA, Kvetnanský R. Ethanol consumption increases rat adrenomedullary gene expression. *Alcohol* 2005; 37: 157-66.
- 8) Montfort CV, Beier JI, Guo L, Kaiser JP, Arteel GE. Contribution of the sympathetic hormone epinephrine to the sensitizing effect of ethanol on LPS-induced liver damage in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1227-34.
- 9) Ajakaiye MA, Jacob A, Wu R *et al.* Upregulation of kupffer cell  $\alpha_2A$ -adrenoceptors and downregulation of MKP-1 mediate hepatic injury in chronic alcohol exposure. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 409: 406-11.
- 10) Liu J, Takase I, Hakucho A, Okamura N, Fujimiya T. Carvedilol attenuates the progression of alcohol fatty liver disease in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2012; 36: 1587-99.
- 11) Feuerstein GZ, Ruffolo, Jr RR. Carvedilol, a novel vasodilating beta-blocker with the potential for cardiovascular organ protection. *Eur Heart J* 1996; 17: B 24-9.
- 12) Nakamura K, Kusano K, Nakamura Y *et al.* Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. *Circulation* 2002; 105: 2867-71.
- 13) Li YC, Ge LS, Yang PL *et al.* Carvedilol treatment ameliorates acute coxsackievirus B3-induced myocarditis associated with oxidative stress reduction. *Eur j Pharmacol* 2010; 640: 112-6.
- 14) Arozal W, Watanabe K, Veeraveedu PT *et al.* Protective effect of carvedilol on daunorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 2010; 274: 18-26.
- 15) Hamdy N, El-Demerdash E. New therapeutic aspect for carvedilol: Antifibrotic

effects of carvedilol in chronic carbon tetrachloride-induced liver damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 261: 292-9.

16) Bakris GL, Fonseca V, Katholi RE *et al.* Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 292: 2227-36.

17) Liang Y, Cincotta AH. Increased responsiveness to the hyperglycemic, hyperglucagonemic and hyperinsulinemic effects of circulating norepinephrine in ob/ob mice. *Int J Obes* 2001; 25: 698-704.

18) Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med.* 2004; 10: 65-71.

19) Yao XH, Chen L, Nyomba BL. Adult rats prenatally exposed to ethanol have increased gluconeogenesis and impaired insulin response of hepatic gluconeogenic genes. *J Appl Physiol* 2006; 100: 642-8.

20) de la Monte SM, Yeon JE, Tong M *et al.* Insulin resistance in experimental alcohol-induced liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 23: e477-86.

21) Lieber CS, DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol* 1989; 24: 197-211.

22) Shirafuji S, Liu J, Okamura N, Hamada K, Fujimiya T. QT interval dispersion and cardiac sympathovagal balance shift in rats with acute ethanol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 2010; 34: 223-30.

23) Carreras MC, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C1569-80.

24) McCord J. Iron, free radicals and oxidative injury. *Semin Hematol* 1998; 35: 5-12.

25) Nakazawa J, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.

26) Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine [8-OHdG]: A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C* 2009; 27: 120-39.

27) Kim YD, Eom SY, Ogawa M *et al.* Ethanol-induced oxidative DNA damage and CYP2E1 expression in liver tissue of *Aldh2* knockout mice. *J Occup Health* 2007; 49: 363-9.



- 28) Chen CH, Pan CH, Chen CC, Huang MC. Increased oxidative DNA damage in patients with alcohol dependence and its correlation with alcohol withdrawal severity. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35: 338-44.
- 29) Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-62.
- 30) Curry-McCoy TV, Osna NA, Nanji AA, Donohue Jr TM. Chronic ethanol consumption results in atypical liver injury in copper/zinc superoxide dismutase deficient mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2010; 34: 251-61.
- 31) Fridovich I. Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot -}$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272: 18515-7.
- 32) Koch OR, Pani G, Borrello S *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 191-8.
- 33) Campese VM, Ye S, Zhong H, Yanamadala V, Ye Z, Chiu J. Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: 695-703.
- 34) Kishi T, Sunagawa K. Combination therapy of atorvastatin and amlodipine inhibits sympathetic nervous system activation and improves cognitive function in hypertensive rats. *Circ J* 2012; 76: 1934-41.
- 35) Macarthur H, Westfall TC, Wilken GH. Oxidative stress attenuates NO-induced modulation of sympathetic neurotransmission in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H183-9.
- 36) Ramirez T, Longato L, Dostalek M *et al.* Insulin resistance, ceramide accumulation and endoplasmic reticulum stress in experimental chronic alcohol-induced steatohepatitis. *Alcohol Alcohol* 2013; 48: 39-52.
- 37) Zhong W, Zhao Y, Tang Y *et al.* Chronic alcohol exposure stimulates adipose tissue lipolysis in mice: role of reverse triglyceride transport in the pathogenesis of alcoholic steatosis. *Am J Pathol* 2012; 180: 998-1007.
- 38) Haenni A, Lithell H. Treatment with a beta-blocker with beta 2-agonism improves glucose and lipid metabolism in essential hypertension. *Metabolism* 1994; 43: 455-61.
- 39) Giovannone B, Scaldaferrri ML, Federici M *et al.* Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res*

*Rev.* 2000; 16: 434-41.

40) Vera M, Nieto N. Hepatic stellate cells and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 674-84.

41) MsCuskey RS. Anatomy of efferent hepatic nerves. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 280A: 821-6.

42) Oben JA, Roskams T, Yang S *et al.* Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004; 53: 438-45.

43) Sancho-Bru P, Bataller R, Colmenero J *et al.* Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G877-84.