

肝臓における NO 産生とその調節機構の解析

Developmental changes of NO production in neonatal rat liver

滝沢達也

麻布大学大学院獣医学研究科

Tatsuya Takizawa

Graduate School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract: Hepatocytes have high ability to proliferate and are still undifferentiated in neonates. During development, the rat liver at 3 weeks after birth has been reported as the late maturation stage, increasing the number of the differentiated hepatocytes. Nitric oxide (NO) has been reported as a key mediator to enhance the hepatocyte proliferation in regenerating liver. However it is unclear that whether NO contributes to the hepatocyte proliferation in neonatal rat. We performed a semi-quantitative evaluation of endogenous NO production using a spin trap followed by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy with Fe-*N,N*-diethyldithiocarbamate (Fe-DETC) complex as a NO-trapping reagent in the rat liver during development. The NO production in the liver was increased at 3 weeks after birth and then declined. Administration of the NO synthase (NOS) inhibitor L-NAME suppressed the endogenous NO production and the hepatocyte proliferation in the rat liver at 3 weeks after birth. The phosphorylation level of NOS3 at Ser1177, the activating residue of the enzyme, was increased at 3 weeks after birth and then declined as well as the NO production pattern. These results suggest that NO is mainly synthesized by NOS3 up-regulated by phosphorylation at Ser1177 and enhances the hepatocyte proliferation in the rat liver at 3 weeks after birth. These findings provide a novel insight into the contribution of NO to hepatic growth and the liver maturation during development.

1. 目的

肝臓は代謝の中心的臓器であり、多岐にわたる機能の大半を肝細胞が担っている。成体の肝細胞はほとんど増殖しないが、薬物や部分切除などにより肝細胞が失われると分裂を開始し、再生されることが知られている。また、出生直後の肝細胞は高い増殖能を有するが、この増殖能は成長に伴い減弱し、肝細胞増殖因子 (HGF) や一酸化窒素 (NO) などの関与が示唆されているものの、詳細は不明である。本研究は、スピントラップ・EPR法を用いて、新生子ラット肝臓におけるNO産生量を解析し、NOの産生機序および、その肝細胞増殖への関与を明らかにす

ることを目的とした。

2. 方法

1) 供試動物および妊娠日齢の算定

Crj:Wistarラット (日本チャールズリバー, 東京) を自家繁殖させて得た10~15週齢のF1動物を用いた。ラット新生子を得るために、雌雄ラットを交配させ、出生日を確認し、出生日を生後0日と起算した。また、生後7日に1腹の新生子数を雄5から7匹、雌5から7匹、計12匹に調整した。

2) スピントラップ-EPR (電子常磁性共鳴吸収) 法による肝臓におけるNO産生の解析

スピントラップ剤として DETC (Sodium N, N-Diethyldithio-carbamate Trihydrate) を用いた。生後2週(14日), 3週(21日), 4週(28日) および5週(35日)の13時をサンプリング時とし, サンプリングの30分前のラット背部に DETC 液 (400 mg/kg 体重) および Fe 液 (80 mg/kg 体重) を皮下投与し, 30分後にエーテル麻酔下で肝臓を取り出した。取り出した肝臓は速やかに細切した後, 石英の EPR 試料管へ充填し, ただちに液体窒素で凍結し, EPR 解析に供した。また, NO 由来の EPR スペクトルを数値化するために, 酸化マンガン (MnO) 粉末を同時に EPR により解析し, 両者のシグナルの高さの比を求めることにより NO-Fe-DETC 由来の EPR スペクトルを定量化した。なお, 検出した EPR シグナルが肝臓の NOS 由来であることを確認するために, NOS 阻害剤 L-NAME (N^G -Nitro- L-arginine Metyl Ester Hydrochloride) をサンプリング12時間前に投与 (100 mg/kg 体重) し, NO 産生量を解析した

3) 総 RNA の抽出と Real-Time RT-PCR

上記と同様に肝臓を採取し, 液体窒素により急速凍結し, RNA 抽出まで -80°C で保存した。総 RNA の抽出は ISOGEN (ニッポンジーン, 富山) を用い, 添付のマニュアルに従って実施した。抽出した総 RNA は -80°C にて保存した。Real-Time RT-PCR (Real-Time Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction) 法により eNOS (endothelial nitric oxide synthase), HO (Heme Oxygenase)-1 及び HO-2 の mRNA 発現量を解析した。

4) ウェスタンブロット解析

1次抗体として抗 eNOS 抗体, 抗 p-eNOS Ser¹¹⁷⁶ 抗体を用い, ECL 法により可視化し定量した。

5) 血中総 bilirubin 濃度の定量

Quanti ChromTM Bilirubin Assay Kit (DIBR-180) を用いて血清中の総 bilirubin 濃度を定量し, 血中総 bilirubin 濃度とした。

6) 肝細胞の増殖能の解析

肝細胞の増殖能の指標として肝細胞の核への BrdU (5-Bromo-2'-deoxy-Uridine) 取り込みを免疫組織化学的に検出した。

3. 結果と考察

生後2週齢から5週齢のオスラット新生子の肝臓のNO産生量の変化を, スピントラップ・EPR法を用いて解析した結果, NO産生量は生後3週齢においてピークを示し, 2週齢, 4週齢および5週齢では低値を示した。NOがNOS (NO合成酵素) 由来であることを確認するため, NO産生量がピークを示した3週齢ラットに, 競合的NOS阻害剤であるL-NAME (100 mg/kg i.p.) をサンプリングの12時間前に投与すると, NO産生が認められないことから, NOがNOS由来であることが示された。

続いて, 新生子期の肝臓におけるNOSアイソフォーム発現の解析を行った。新生子期ではeNOSのみ発現が確認されているため, Real-Time RT-PCR法によりeNOS mRNA発現量を解析すると, eNOS発現は2週齢から3週齢にかけて減少していることが明らかとなった。続いて, タンパク質発現をウェスタンブロット法により解析したところ, eNOSタンパク質発現は2週齢から5週齢にかけて減少していることが明らかとなった。eNOSはSer¹¹⁷⁶のリン酸化により活性化するという報告があることから, eNOS Ser¹¹⁷⁶についてウェスタンブロット法を用いて解析をしたところ, p-eNOS Ser¹¹⁷⁶のリン酸化パターンは, 3週齢でピークを示し, 2週, 5週齢で低い値を示すNO産生量の変動パターンと一致した。このことから, 新生子ラット肝臓ではeNOS Ser¹¹⁷⁶のリン酸化によりNO産生が調節されていることが推測された。

血管内皮細胞において, 一酸化炭素 (CO) が eNOS Ser¹¹⁷⁶ のリン酸化を阻害することが報告されている。肝臓においてCOを産生する酵素であるHO-1, HO-2発現を解析したところ, HO-1のmRNAおよびタンパク質発現は2週齢で最も高いことが明らかとなった。このため, 2週齢ではHO-1により産生されるCOが, eNOS Ser¹¹⁷⁶のリン酸化を阻害することが推測された。一方, HO-2 mRNA発現に有意な変化は認められなかった。HOがCOを産生する際に Biliverudin も産生され, その大部分は Bilirubin と

なるため、血中 Bilirubin 濃度を CO 産生の指標として解析すると、生後2週齢から5週齢の間に有意な変化は認められなかった。これは、脾臓に存在する HO が血中 Bilirubin 濃度に影響を与えたためと考えられる。NO の肝細胞増殖に与える影響を確認するために、L-NAME 投与12時間後の肝細胞増殖能を、BrdU の取り込みを指標として評価した。その結果、L-NAME 投与により、BrdU 陽性細胞が有意に減少したため、NO が肝細胞増殖を促進していることが示唆された。

以上のことから新生子ラット肝臓では、eNOS Ser¹¹⁷⁶ のリン酸化により NO 産生が調節され、産生された NO は肝細胞の増殖を促進することが示唆された。

4. 要 約

生後3週齢のラット新生子の肝臓において NO 産生の亢進が認められ、この NO 産生は eNOS Ser¹¹⁷⁶ のリン酸化により調節され、産生された NO は肝細胞の増殖を維持していることが示唆された。