
肝再生過程におけるリン代謝動態と
細胞内情報伝達機構との連関
ーリンMRSによる解析

(課題番号 09680840)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 田中 邦雄
(旭川医科大学医学部助教授)

は し が き

^{31}P -MRS (Magnetic Resonance Spectroscopy) 法によれば、生化学的手法のように組織からの試料抽出操作の必要がなく、そのまま連続的にリン酸化合物代謝動態を追跡できる。なかでも、アデノシン三リン酸(ATP)はエネルギーを要求する生体反応に対する直接のエネルギー源であり、加水分解によってアデノシン二リン酸(ADP)と無機リン(P_i)に変化する際にエネルギーを放出する。 ^{31}P -MRS 法を用いた研究では、ATP はエネルギー源であるという観点から、種々の臓器を対象に ATP の増減およびこれに伴う P_i の増減を中心に解析されてきた。

一方、細胞内や臓器組織内ではそれぞれの臓器に特有の機能の発現に関連する各種のリン代謝機構が存在し、これらの制御因子として ATP が重要な役割を果たしていることが生化学的手法により、主として細胞レベルで検討されてきた。本研究では再生という特異的な機能を有する肝臓を対象として、 ^{31}P -MRS 法によりエネルギー供給源として以外の ATP を中心とするリン代謝動態と細胞内情報伝達機構との関連性を明らかにするとともに、臓器機能評価法としての有用性を臓器レベルで明らかにすることを目標とした。

研究組織

- 研究代表者 : 田中 邦雄 (旭川医科大学医学部助教授)
研究分担者 : 葛西 眞一 (旭川医科大学医学部教授)
研究協力者 : 棟方 隆 (旭川医科大学医学部助教授)
研究協力者 : 秋田 信之 (旭川医科大学医学部研究生)
研究協力者 : 日下部 光俊 (旭川医科大学医学部技官)

研究経費

平成 9 年度	2,300 千円
平成 10 年度	700 千円
計	3,000 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. 秋田信之, 田中邦雄, 日下部光俊, 羽根田俊, 小川裕二, 高橋文彦, 菊池健次郎: マグネシウム投与の心筋エネルギー代謝動態および心筋虚血に及ぼす効果—ダール食塩感受性ラットにおける検討—, 電子情報通信学会技術研究報告: MBE97-36, 81-85 (1997)
2. F. Nakazawa, M. Sawa, B. Jiang, K. Onodera, S. Kasai and M. Mito: Functional Assessment of Proliferating Hepatocytes Stimulated by Hepatic Stimulatory Substance in Ascorbic Acid Biosynthetic Enzyme-Deficient Rats, *Hepatology*, 26:437-443 (1997)
3. K. Tanaka, A. Nizukami, N. Kojima and M. Ishikawa: ^{31}P -NMR Studies of Phosphate Metabolism in the Ovulatory Process Induced by Gonadotropins in Perfused Rabbit Ovary, *NMR in Biomed.* (印刷中)

(2) 国際会議報告 (Abstract)

1. K. Tanaka, A. Mizukami, T. Munakata, M. Kusakabe and M. Ishikawa: ^{31}P -NMR Studies of Phosphate Metabolism in the Ovulatory Process Induced by Gonadotropins in Perfused Rabbit Ovary, *Int. Sympo. Ultrafast Magnetic Resonance Imaging in Medicine*, (Kyoto, 1999-01), P-51

研究 成 果

本研究ではラット灌流肝臓を対象として、細胞内情報伝達機構を駆動させるコレラ毒素やホルスコリンなどを投与した後のリン代謝動態を定量的に解析するとともに、関連酵素活性阻害時の代謝動態とを比較検討することにより、肝再生の機能評価への有用性を明らかにすることを目的として 2 年間研究を行った。以下に本研究で得られた成果をまとめる。

実 験 方 法

実験には Wister 系雄性ラットを用い、麻酔下で開腹後、6Fr ポリエチレンチューブを門脈内に挿入し、毎分約 18ml で灌流した状態で肝臓を摘出し、外径 25mm の NMR 試料管に挿入した。灌流液として、37℃に保ったリンを含まない Krebs Bicarbonate 液 (pH7.35, NaCl 120mM, NaHCO₃ 24mM, KCl 4.8mM, MgSO₄ 1.2mM, CaCl₂ 1.3mM, D-glucose 5.5mM; 95%O₂, 5%CO₂)を用いた。実験群として次の 3 群を作成した。無処置群：無処置肝臓を対象に 60 分間スペクトル計測を行った。コレラ毒素単独投与群：コレラ毒素 50, 100, 200 μg を投与後、60 分間スペクトル計測を行った。蛋白質リン酸化酵素活性阻害剤投与群(k-252b 投与群)：プロテインキナーゼの強力な阻害剤である蛋白質リン酸化酵素阻害剤 k-252b 0.1mg を灌流 30 分前にラット陰茎静脈より静注した。灌流開始 10 分後にコレラ毒素 50, 100, 200 μg を投与後、60 分間スペクトル計測を行った。また、各群ともスペクトルの測定と同時に 10 分毎に肝臓から流出する灌流液を採取し、灌流液中のサイクリック AMP (cAMP) 濃度も測定した。さらに、ホルスコリン投与群：非ホルモン剤であるホルスコリン 200 μg 投与後、120 分間スペクトル計測を行った群、また、蛋白質リン酸化酵素活性阻害剤投与群(H-89 投与群)：選択性の高い阻害剤 H-89 200 μg を k-252b と

同様、灌流開始 30 分前に前投与し、灌流開始 10 分後にコレラ毒素 100 μ g を投与後、60 分間スペクトル計測を行った群も作成した。

NMR スペクトルの測定には、GX-270 FT-NMR スペクトロメータ(日本電子, 静磁場 6.3 テスラ, リン共鳴周波数 109.25MHz)を用いた。25mm 用検出プローブを用い、RF パルス幅を 15 μ s, パルス繰り返し時間を 0.5sec とした。また S/N 改善のため、1 スペクトルあたり 1200 回の信号積算(10 分間)を行った。なお、HMPA(Hexamethyl phosphoroamide)を外部基準試料として用いた。各リン酸化合物の量は HMPA による信号面積に対する相対量として表した。ATP の定量は β -ATP によるピークを用いた。なお、各リン酸化合物の変化は、コレラ毒素投与前におけるレベルを 100% としてその後の相対的変化を求めた。灌流液中の cAMP の測定は cAMP enzyme immunoassay キットを用い、全自動比色計で測定した。

実験結果

まず、本研究の基盤となった、家兎灌流卵巣にゴナドロピンホルモン(PMSG および HCG)投与後の ATP の大幅な減少を確認するために、卵巣組織からの抽出液について ATP 濃度を定量した結果を表 1 に示す。この結果、PMSG 100IU を静注 96 時間

Table1 ATP concentration in extracts of ovarian tissues

	n	ATP (μ mol/g, wet weight)
96h after priming with 100 IU of PMSG	5	1.39 \pm 0.13
4h perfusion after 10 IU/min of HCG	5	0.48 \pm 0.05

The concentration of ATP were expressed as the mean \pm S.D.

後の組織中の ATP 濃度は 1.39 \pm 0.13 μ mol/g, wet weight であるのに対して、HCG 10IU/min で灌流液中へ側注後 4 時間目には 0.48 \pm 0.05 μ mol/g, wet weight まで減少し、³¹P-NMR スペクトル計測による結果とほぼ一致することを確認した。

図1に ^{31}P -NMRスペクトルの代表例を示す。上段にコレラ毒素 $100\mu\text{g}$ 投与前、投与後30分および60分におけるスペクトルを、下段に阻害剤k-252bを前投与した群におけるコレラ毒素 $100\mu\text{g}$ 投与前、投与後30分および60分のスペクトルを示す。コレラ毒素単独投与群では、コレラ毒素投与後の時間経過とともにATPおよびPiのピークが徐々に低下することがわかる。一方、k-252b前投与群では、コレラ毒素投与によってATPおよびPiピークが低下するが、その減少程度は上段の単独投与群と比較して抑制されていることがわかる。

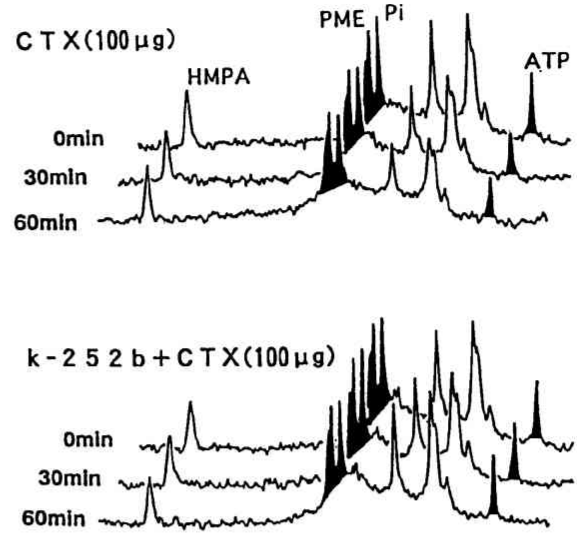


図1 ^{31}P -NMR スペクトル代表例

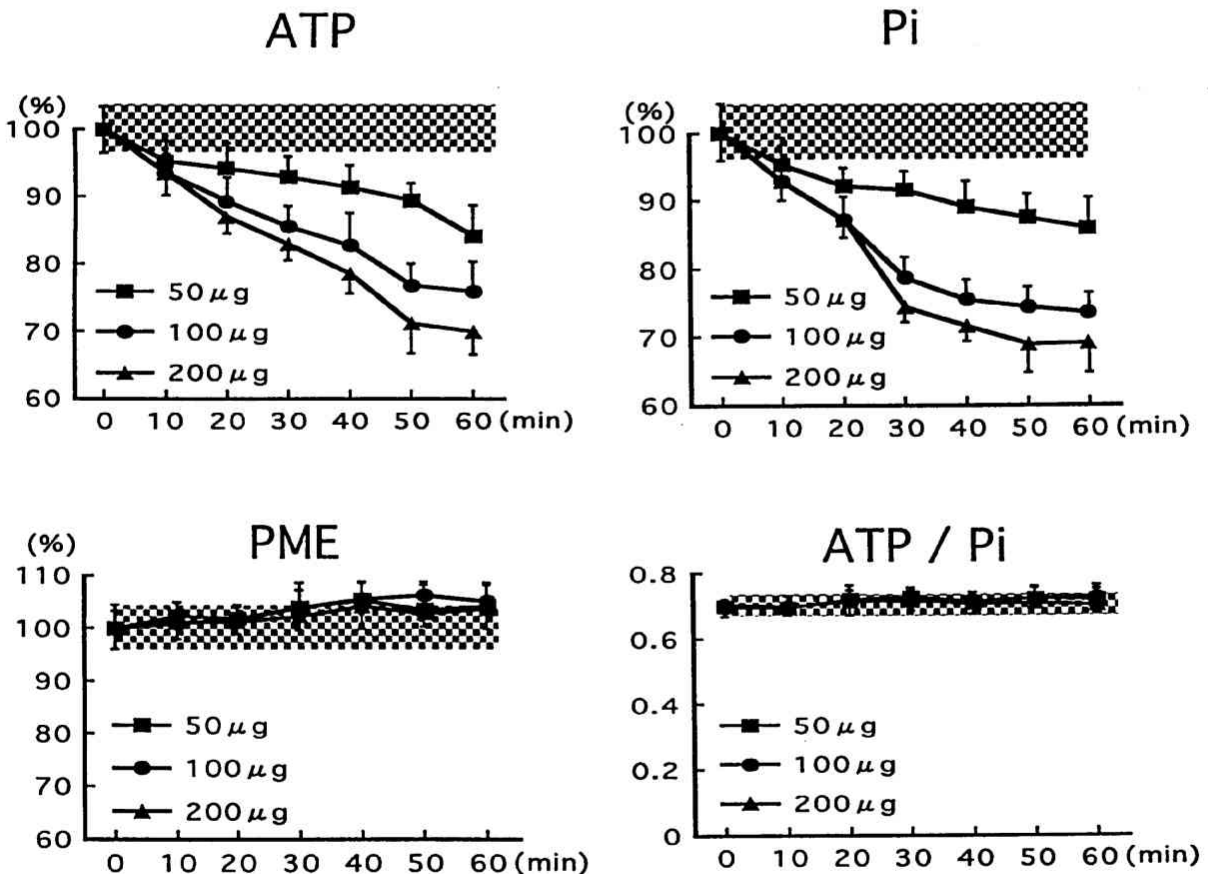


図2 コレラ毒素単独投与後のATP, Pi, PME, 及びATP/Piの経時的変化

図2にコレラ毒素単独投与後のATP, Pi, phosphomonoesters (PME), およびエネルギー状態の指標として ATP/Pi の経時的变化を示す。なお、図中の shaded 部分は無処置群における平均値±標準偏差を示す。この結果、コレラ毒素投与直後から肝内 ATP, Pi とともに徐々に減少し、投与後 60 分まで減少し続けた。コレラ毒素 50 μ g 投与群において、投与後 30 分で ATP は 93%, Pi は 92%まで減少し、60 分で ATP は 84%, Pi は 86%まで有意に減少した。一方、PME は投与後若干増加する傾向を示したが、有意な変化ではなかった。同様に ATP/Pi もほとんど変化を認めず、コレラ毒素投与後も肝内エネルギー状態はほぼ一定に保たれていることがわかる。また、ATP, Pi の減少程度はコレラ毒素投与量に依存する傾向を示し、100 μ g 投与群で 60 分後の ATP, Pi はそれぞれ 76%, 74%、200 μ g 投与群でそれぞれ 70%, 69%まで有意に減少した。PME, ATP/Pi は 3 群間で有意差はなかった。

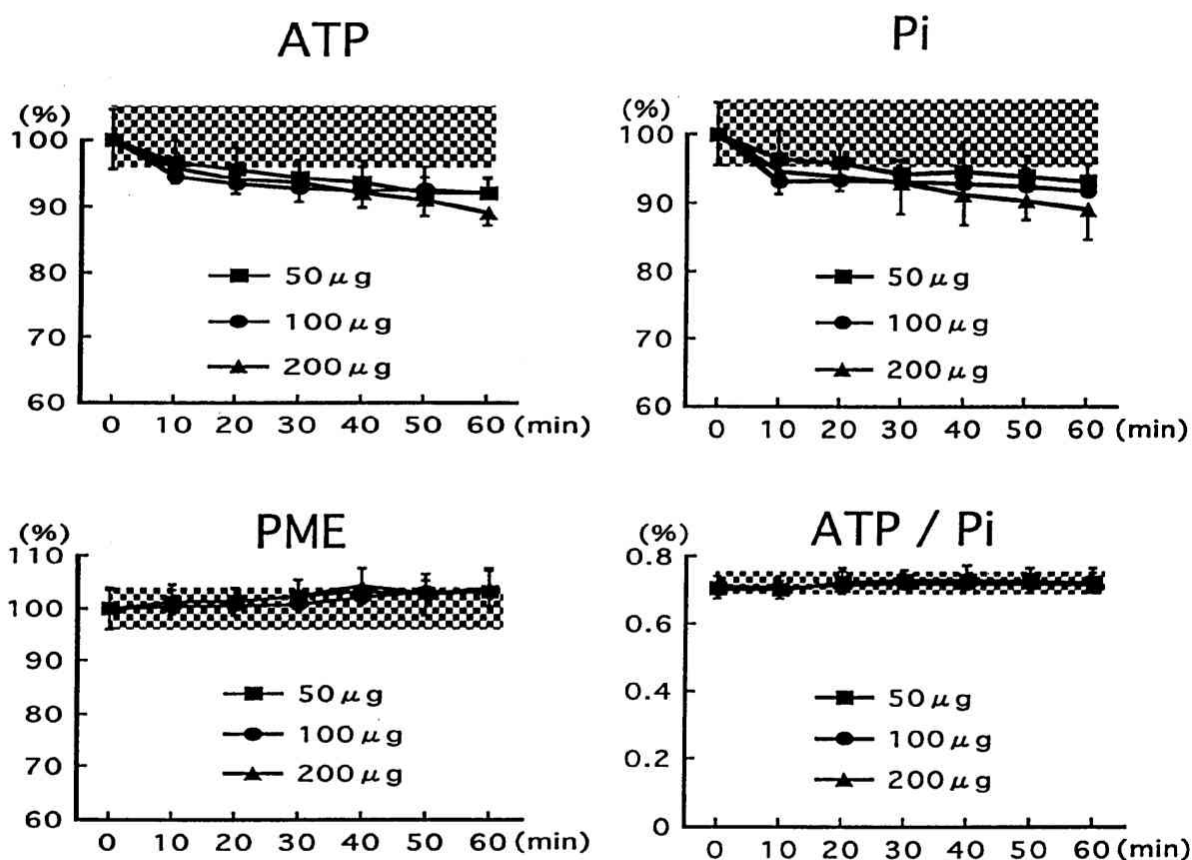


図3 k-252b 前投与群におけるコレラ毒素単独投与後のATP, Pi, PME 及びATP/Pi の経時的变化

図3にk-252b前投与群におけるコレラ毒素投与後のATP, Pi, PME、およびATP/Piの経時的变化を示す。この結果、k-252b前投与群ではコレラ毒素投与後から肝内ATP, Piともに減少しているが、その減少程度は有意に抑制されており、コレラ毒素50 μ g投与群では灌流60分でATPは92%, Piは93%までの減少にとどまった。PME, ATP/Piはコレラ毒素単独投与群と同様、有意な変化を認めなかった。また、コレラ毒素100, 200 μ g投与群も同様にk-252b前投与によりATP, Piの減少は有意に抑制された。

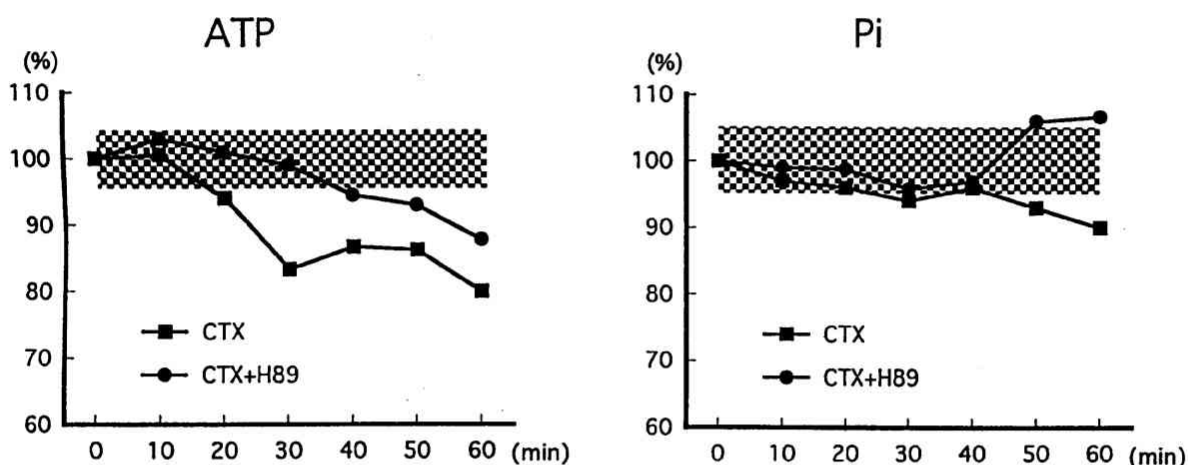


図4 コレラ毒素単独投与群およびH-89前投与群のATP, Piの経時的变化

図4にコレラ毒素100 μ g単独投与群および蛋白質リン酸化酵素活性阻害剤H-89 200 μ g前投与群におけるATPとPiの経時的变化を示す。この結果、阻害剤H-89の前投与によってもATPおよびPiの減少程度を抑制することがわかる。

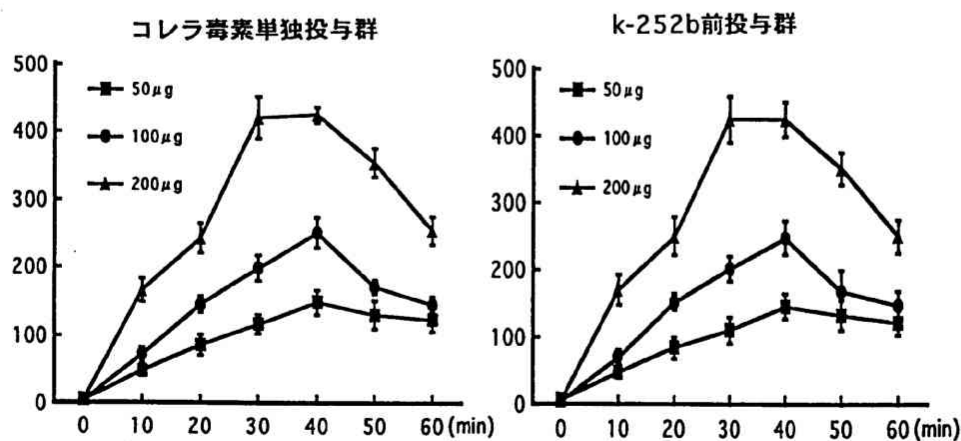


図5 灌流液中cAMP濃度(pmol/ml perfusate)の経時的变化

図5に灌流液中のcAMP濃度の測定結果を示す。コレラ毒素単独投与群ではコレラ毒素投与後から灌流液中のcAMP濃度が急速に上昇し、コレラ毒素投与後約40分で最高値を示した。コレラ毒素50 μ g投与群では、投与前の灌流液中のcAMP濃度が5.9pmol/ml perfusateであったのに対して、投与後40分ではcAMP濃度は149pmol/ml perfusateまで増加し、その後徐々に減少し、60分では124pmol/ml perfusateであった。また、灌流液中のcAMP濃度はコレラ毒素投与量に依存する傾向を示し、100 μ g投与群で40分、60分のcAMP濃度はそれぞれ252, 146pmol/ml perfusate, 200 μ g投与群でそれぞれ426, 255pmol/ml perfusateを示した。一方、k-252b前投与群では、k-252b前投与にも関わらずコレラ毒素単独投与群と同様、コレラ毒素投与量に依存して投与後40分で最高値を示し、その後徐々に減少することがわかった。

図6にホルスコリン200 μ g投与後のATPの経時的変化を示す。この結果、ホルスコリンの投与によってもATPは徐々に低下することがわかる。

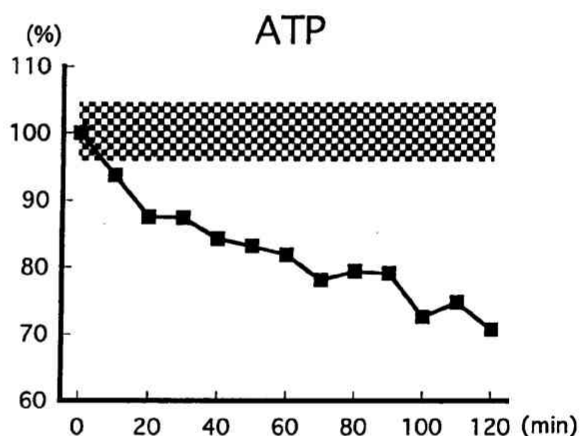


図6 ホルスコリン投与後のATPの経時的変化

図7に部分肝切除後1~4週経過群と肝切除直後の肝重量、フルクトース負荷60分後におけるATPレベルを示す。非切除時の肝重量は約

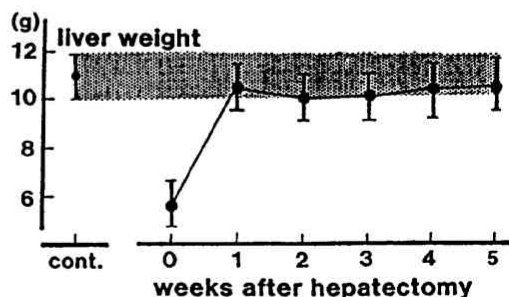
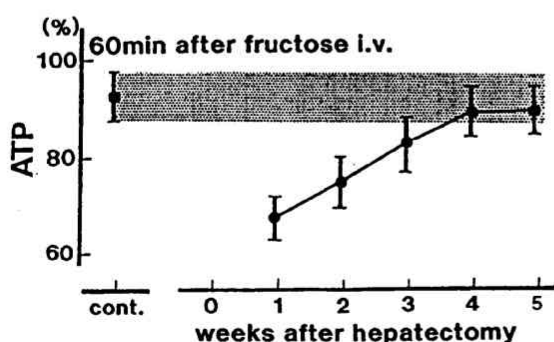


図7 部分肝切除後の肝重量とフルクトース負荷における経時的変化

11g であった。一方、部分肝切除法による残存した肝の重量は 6g であった。肝切 1 週後の肝重量は 10.8g であり、切除前のレベルまで回復した。その後、肝切 2 週以降には肝重量の変化を認めなかった。これに対して、フルクトース負荷 60 分後における ATP レベルは肝切週齢を経るごとに上昇し、肝切除後 4 週でコントロール群と同程度まで回復することがわかった。

考 察

図 8 は肝細胞内情報伝達系を模式的に表したものである。一般に細胞外の情報を細胞内に伝達するホルモンは、細胞膜上のレセプターと結合し、細胞内 2 次メッセンジャーを介して情報伝達を行う。本研究で用いたコレラ毒素はレセプター

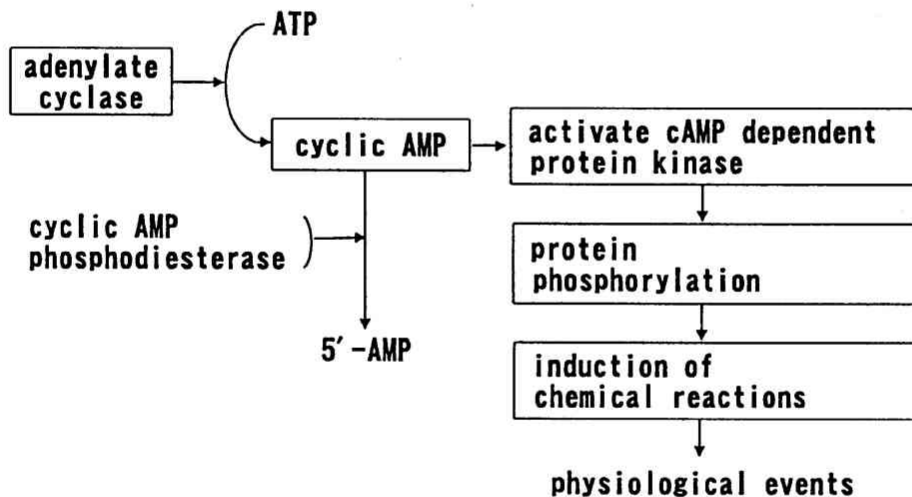


図 8 肝細胞内情報伝達系模式図

を介さず、直接細胞膜 G 蛋白質に作用して細胞内情報伝達機構を直接駆動させる物質として良く知られている。即ち、コレラ毒素投与によりアデニル酸シクラーゼが活性化され、細胞内 2 次メッセンジャーである細胞内 cAMP 濃度を増加させ、cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素 (A キナーゼ) を活性化して種々の反応を引き起

こす。

本研究でコレラ毒素投与後に観察したリン酸化合物代謝動態では、ATP は Pi の増加を伴わずに減少し、かつ Pi も ATP の変化と併行して減少している。このような ATP, Pi の変化は、通常のエネルギー代謝過程において観察されるものと全く異なっている。細胞内 cAMP はアデニル酸シクラーゼの活性化により、ATP を用いて産生される。しかし、コレラ毒素投与により認められた灌流液中の cAMP の上昇は一過性であり、またその濃度も pmol と低濃度での変化であった。従って、コレラ毒素投与後に認められた ATP の大幅な減少は cAMP 産生のためのみ利用されたものとは考えにくい。非ホルモン性であるホルスコリンはアデニル酸シクラーゼを活性化して 2 次メッセンジャーである cAMP を一過性に増加させ、排卵を誘発させることが知られている。本研究でもホルスコリン投与後にコレラ毒素投与と同様 ATP が大幅に減少することを明らかにした。細胞内で一過性に増加した cAMP は cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素を活性化する。その活性阻害剤である k-252b またはより選択性の高い H-89 の前投与により、cAMP は一過性の上昇を示すにも関わらず、コレラ毒素投与後の ATP と Pi の減少程度は有意に抑制された。細胞内情報伝達の 2 次メッセンジャーである cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼ (A キナーゼ) を活性化する。活性化された A キナーゼは種々の蛋白質をリン酸化する。特に ATP の γ 位のリン酸が蛋白質のセリン、スレオニンの水酸基をリン酸化することが知られている。従って、コレラ毒素やホルスコリン投与後の ATP の大幅な低下は蛋白質リン酸化反応に大量に利用されていることを示している。また同時に減少する Pi は ATP の減少を補い、エネルギー状態を保つために ATP の産生に利用されていることを示唆する。蛋白質リン酸化により種々の化学反応が誘発され、臓器に特有の機能が発現するものと考えられる。これらの結果は、肝に特異的な機能である肝再生のメカニズムを細胞内情報伝達機構と関連させ、臓器レベルで探る手法として ^{31}P -MRS 法が有用であることを明らかにした。

ま と め

本研究によって得られた主な成果を以下にまとめる。

1. ラット灌流肝臓を対象にコレラ毒素を投与し、投与後 60 分間にわたってリン NMR スペクトルを計測した。この結果、コレラ毒素投与直後から肝内 ATP と無機リン(Pi)はともに投与量に依存して徐々に減少することを明らかにした。また、phosphomonoesters (PME) レベルおよびエネルギー状態の指標である ATP/Pi 比はほぼ一定に保たれていた。
2. アデニル酸シクラーゼを活性化し、サイクリック AMP (cAMP) を増加させるホルスコリンを投与した結果、コレラ毒素投与と同様 ATP が大幅に低下する結果を得た。
3. 蛋白質リン酸化酵素の活性阻害剤である k-252b を灌流開始 30 分前に静注した後、コレラ毒素を投与した場合、ATP と Pi の減少程度が有意に抑制されることを明らかにした。また、k-252b よりも選択的に cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素の活性を阻害するとされる H-89 を前投与した場合も、ATP と Pi の減少程度が抑制された。
4. 流出灌流液を経時的に採取し、cAMP 濃度を測定した。この結果、コレラ毒素投与後 cAMP 濃度が投与量に依存して一過性に増加した。また、酵素活性阻害剤 k-252b を前投与した場合も cAMP は同様の変化を示すことを明らかにした。
5. 以上の結果は、コレラ毒素やホルスコリン投与後の肝内 ATP の大幅な減少は、cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素活性化に伴い、蛋白質リン酸化に ATP が利用されることを示している。引き続き、70%部分肝切除後の再生肝の機能評価を対象に同様の検討を行っている。