

綜 説

肝疾患とキマーゼ

里村 克章¹ 清水 秀治¹ 古明地弘和¹ 勝田 悌実¹ 大本 安一²¹ 日本医科大学内科学第一教室² 大塚製薬(株)薬効開拓研究所

Relationship Between Chymase and Fibrosis in Chronic Liver Diseases

Katsuaki Satomura¹, Shuji Shimizu¹, Hirokazu Komeichi¹, Yasumi Katsuta¹ and Yasukazu Omoto²¹First Department of Internal Medicine, Nippon Medical School²Research Institute of Pharmacological & Therapeutical Development, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

Abstract

Chymase, a protease of human mast cells, promotes myocardial and renal interstitial fibrosis by converting angiotensin I to angiotensin II. We established a method for measuring chymase in liver tissue and examined the relationship between chymase and fibrosis in livers of patients with chronic hepatitis or autoimmune disease. We found that chymase levels were higher in livers from patients with chronic hepatitis and more severe fibrosis and were higher in livers from patients with autoimmune disease than in livers from patients with acute hepatitis.

When sections of livers from patients with chronic hepatitis or autoimmune disease were immunostained for chymase, immunoreactive mast cells were detected in portal areas and sinusoidal walls, coinciding with the zone of fibrosis. Thus, chymase appears to be involved in hepatic fibrosis in chronic liver diseases.

(日本医科大学医学会雑誌 2005; 1: 168-174)

Key words: chymase, mast cell, hepatic fibrosis, chronic hepatitis, liver with autoimmune disease

はじめに

ヒト循環血中でのアンジオテンシン I (A I) からアンジオテンシン II (A II) への変換は、その大部分がアンジオテンシン変換酵素 (ACE) に依存している。ところが、ACE によらない A II 産生経路があり、それにセリンプロテアーゼが関与することが証明されている¹。セリンプロテアーゼの一つであるキマーゼは、主に肥満細胞の分泌顆粒に存在して非 ACE 経路の A II 産

生に働いている^{2,3}。近年、肥満細胞と線維芽細胞との関連が注目され、キマーゼを分泌する肥満細胞が線維芽細胞のもとに間質結合組織内で分化し、心筋、腎などにおける線維化に関与していることが明らかになった^{4,7}。一方、A II の働きの一つに各種臓器における細胞増殖、細胞外基質産生を促進する作用があることが明らかにされている^{8,9}。そこでわれわれは、肥満細胞の特異的な酵素であるキマーゼの測定方法を確立し¹⁰キマーゼが肝線維形成に関与しているかどうかを調べるため、血清ならびに肝組織中の活性測定を試みた。

Correspondence to Katsuaki Satomura, First Department Internal Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

E-mail: satomura@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

キマーゼ遺伝子発現

キマーゼ cDNA を増幅するため reverse transcription-polymerase reaction (RT-PCR) 法で発現ベクターの制限酵素サイトを付着した。そこで得られた PCR 産物をクローニングベクターに挿入してサブクローニングし、遺伝子の塩基配列を確認した。キマーゼ遺伝子を制限酵素により切断後、発現ベクターに挿入し、更に、大腸菌に形質転換させ、菌体を培養してキマーゼ蛋白の発現を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で確認した。同様に chinese hamster ovary (CHO) 細胞にも発現ベクターを組み込んで発現させた。

CHO 細胞の培養上清からのプロキマーゼの精製と活性化キマーゼ活性の測定

CHO 細胞を RPMI-1640/10% fetal calf serum (FCS) で 5~6 日培養して、その上清を回収した。約 1,000 mL の培養上清にオープンカラムの Heparin-Agarose, Superose 12HR-high-performance liquid chromatography (HPLC), SP-5PW-HPLC, Heparin-HP-HPLC を加えて処理し、キマーゼを精製した。

精製されたプロキマーゼの酵素活性の有無を調べるために、まずプロキマーゼにジペプチジルペプチダーゼ (DPP1) を加え、37 °C で 24 時間反応させた後、1 mM N-ethylmaleimide (NEM) を加えて活性化キマーゼを作成した¹¹。活性化されたキマーゼに AI を加え、37 °C で 20 分間反応させ、氷沈したエタノールを加えた後に遠心分離し、上清を濃縮乾固し、水に溶解した後、HPLC を用いて分析した。

精製キマーゼには酵素活性 (アンジオテンシン変換酵素) 作用がみられた。AI にキマーゼを加えると AII に変換したが、AI にキマーゼとアンジオテンシン変換酵素阻害剤のキモスタチンを加えると AII に変換しなかった (Fig. 1)。

キマーゼ抗体の作成

精製した 2 種のプロキマーゼ (CHO 細胞由来, *E. coli* 由来) を用いて、ウサギ 1 羽あたり 100 µg の抗原をフロイントの完全アジュバントと混合して、2 週間毎に 7 回皮内に多点免疫した。最終免疫から 1 週後に採血し、抗ヒトプロキマーゼ血清 (ポリクローナル抗体) を得て、それぞれの抗体を OCT 10801~10803

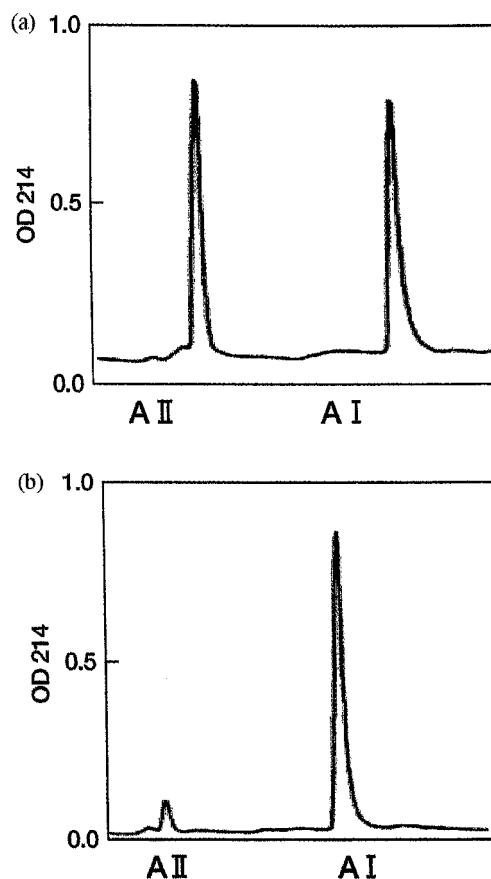


Fig. 1 Enzymatic activity of activated chymase. (a) Angiotensin I (A I) was converted to angiotensin II (A II) when chymase was added. (b) However, conversion of A I to A II was inhibited when an angiotensin-converting enzyme inhibitor (chymostatin) was added with chymase¹⁰.

(免疫抗原: 大腸菌由来プロキマーゼ) と OCT 10811~10813 (免疫抗原: CHO 細胞由来プロキマーゼ) と名づけた。また、マウスにも同様に 20 µg で 3 回免疫後、定法に従い、P3U1 ミエローマ細胞と免疫下マウスの脾細胞をポリエチレングリコール (PEG) で細胞融合し、精製プロキマーゼ固相化プレートを用いて、陽性クローンを選択し、限界希釈法でクローニングした。

クローニングを繰り返し、シングルクローニングにてプロキマーゼに対する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を樹立した。これらのモノクローナル抗体を ANOC 10801~10804 (免疫抗原: CHO 由来プロキマーゼ) と ANOC 10851~10852 (免疫抗原: 大腸菌由来プロキマーゼ) と名付けた。モノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞をプリスタン処置した Balb/c マウスの腹腔に接種し、2 週間後に腹水を採取し、腹

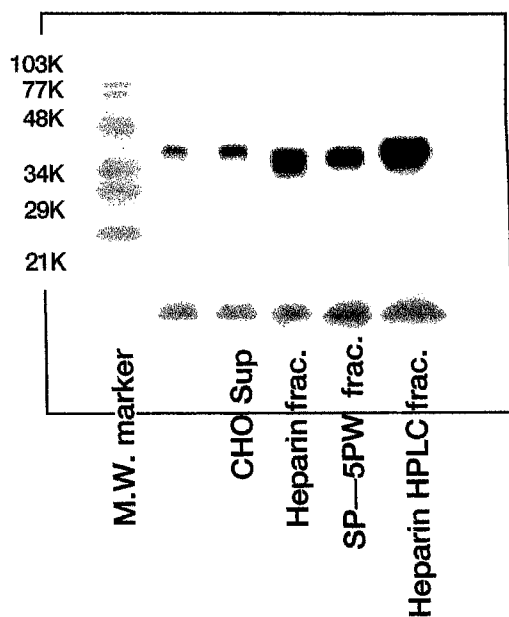


Fig. 2 Purity of prochymase at each stage of purification according to Coomassie brilliant blue R250 (CBB) staining. Prochymase was assayed with Western analysis using a monoclonal antibody (ANOC10803) produced for this study. M.W. molecular weight; HPLC, high-performance liquid chromatography¹⁰.

水から定法によりプロテイン A を用いて精製した。

作成された抗体 (ポリクロナール抗体とモノクロナール抗体) は大腸菌および動物細胞由来の精製キマーゼに Western Blot レベルでよく反応した (Fig. 2)。しかし、酵素活性の中和能は検出できなかった。

キマーゼの enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) の確立

6 種類のモノクロナール抗体を 96 ウェルプレートに固相化し、プロキマーゼ標準品に対して反応性の高い ANOC 10803 を選択した。同様にモノクロナール抗体 (ANOC 10803) を固相化したプレートを用いて、6 種類のポリクロナール抗体の中から反応性が高く、非特異反応が低い OCT 10813 を選択した。このモノクロナール抗体 (ANOC 10803) とポリクロナール抗体 (OCT 10813) を用いて、標準品のキマーゼを感度良く検出する測定法を確立した。すなわち、まずモノクロナール抗体 (ANOC 10803) 固相化 96 ウェルプレートに調整 Buffer を 100 μ L 加え、更に標準品あるいは検体を 100 μ L 加えて 24 時間室温で反応させ

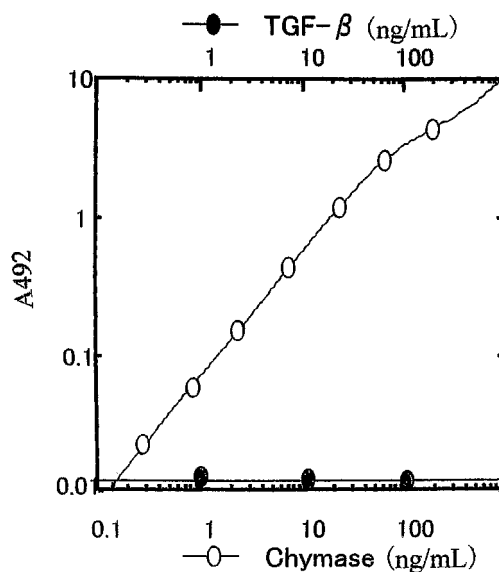


Fig. 3 Logarithmic standard curve for human chymase. A492 of prochymase (the reference standard) of known chymase content was measured, and a standard curve for prochymase was prepared. — — indicates the A492 of transforming growth factor (TGF) β , and — — indicates the A492 of prochymase. Absorbance for prochymase showed linearity between 0.2 and 100 ng/mL¹⁰.

た。次にプレートを洗浄し、ポリクロナール抗体 (OCT 10813) 5,000 倍希釈溶液を 100 μ L 加えて室温で 2 時間反応させた。更にプレートを洗浄して、HRP 標識抗ウサギ IgG 溶液を 100 μ L 加え、室温で 2 時間反応させた。最後に洗浄し、酵素基質 (オルトフェニレンジアミン) 溶液を 100 μ L 加え、室温で 10 分反応させた後、反応停止液 100 μ L を加えた。発色はマイクロプレートリーダーを用いて OD 492 を測定し、標準品 (プロキマーゼ) の発色から検体中のヒトキマーゼ量を推測した。

濃度がすでにわかっているプロキマーゼ (標準品) の OD 492 を測定し、プロキマーゼの標準曲線を作成したところ、測定レンジは 0.2 ng/mL から 100 ng/mL であった (Fig. 3)。

肝組織からのキマーゼの抽出方法

肝組織の一部を 0.5 mL の phosphate buffered saline (PBC)/phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) の入ったエッペンドルフチューブに入れ、抽出まで -80 に保存した。解凍して氷冷下で超音波処理し

Table 1 Stage of fibrosis and chymase level in liver biopsy specimens from 49 patients with chronic hepatitis¹²

Stage	Chymase (ng/mg)	P value
F1 (n = 13)	6.5 ± 7.3	
F2 (n = 18)	5.1 ± 6.2	
F3 (n = 15)	28.2 ± 37.3	
F4 (n = 3)	43.4 ± 66.1	
F1 + F2 (n = 31)	5.7 ± 6.6	
F3 + F4 (n = 18)	30.8 ± 41.2	

F1, mild fibrosis; F2, moderate fibrosis; F3, severe fibrosis; F4, cirrhosis. The international classification was used [13] Chymase levels are expressed as mean ± S.D. *, P < 0.05; **, P < 0.01.: t-test

Table 2 Chymase levels in liver tissue from patients with AIH, PBC, or AH¹⁴

	Cases	Chymase (ng/mg)	P value
AIH	10	11.56 ± 10.64 ^a	
PBC	12	11.67 ± 9.96	
AH	10	2.72 ± 2.23	

^aResults are expressed as mean ± S.D. *, P < 0.05.: t-test
AIH: Autoimmune hepatitis.
PBC: Primary biliary cirrhosis.
AH: Acute hepatitis.

4 , 12 Krpm の条件で 10 分間遠心分離し, 上清 (Sup-1) を採取した。組織の沈殿を更に 0.5 mL の NaCl を加え超音波処理し, 同様に遠心分離し, 上清 (Sup-2) を採取した。上清 (Sup 1, 2) の蛋白量を Bio Rad 製のプロテインアッセイで求めた。キマーゼ濃度は今回確立したキマーゼ ELISA 法によって測定した。

F2 の 2 群に分けて比較すると, F3 + F4 は 30.8 ± 41.2 ng/mL で F1 + F2 の 5.7 ± 6.6 ng/mL に比し有意に多かった (P < 0.01) (Table 1)。この結果は, 慢性肝炎において線維化の程度が強い例が弱い例に比べて肝組織中キマーゼ量が多いことを示し, キマーゼが慢性肝炎の線維化に關与している可能性を示唆した。

慢性肝炎における肝組織中キマーゼ量と線維化の程度について

慢性肝炎患者 49 例 (男性 34 例, 女性 15 例で平均年齢は 48.1 ± 12.4 歳, HBs 抗原陽性 9 例, HCVRNA 陽性 40 例) に肝生検を施行し, 肝組織の一部を凍結した後に肝組織中キマーゼ量を ELISA により測定した¹²。肝組織の光顕的観察は, ヘマトキシリン エオジン (HE) 染色, Masson 染色, 鍍銀染色で行い, 線維化の程度は Desmet ら¹³ の分類に従い, F0 から F4 に分類した。

慢性肝炎 49 例の肝組織中キマーゼ量の平均は 14.9 ± 27.9 ng/mL で, F1 (13 例) は 6.5 ± 7.3 ng/mL, F2 (18 例) は 5.1 ± 6.2 ng/mL, F3 (15 例) は 28.2 ± 37.3 ng/mL, F4 (3 例) は 43.4 ± 66.1 ng/mL であり各群間に有意差は無かった。しかし, F3 + F4 と F1 +

自己免疫性肝疾患における肝組織中キマーゼ量について

自己免疫性肝疾患である自己免疫性肝炎 (AIH) と原発性胆汁性肝硬変 (PBC) はいずれも線維化により肝硬変に進展する。そこで, AIH 10 例 (男性 1 例, 女性 9 例, 平均年齢 60.6 ± 12.6 歳) と PBC 12 例 (男性 2 例, 女性 10 例, 平均年齢 60.0 ± 12.6 歳) を疾患群として肝組織中キマーゼ量を測定した¹⁴。また, 急性肝炎 10 例 (男性 5 例, 女性 5 例, A 型 2 例, B 型 4 例, NANB 型 2 例, 薬剤 2 例, 平均年齢 48.2 ± 10.3) を対照群とした。

肝組織中キマーゼ量は AIH で 11.56 ± 10.64 ng/mL, PBC で 11.67 ± 9.96 ng/mL であり, 共に急性肝炎 (2.27 ± 2.23 ng/mL) に比し有意に多かった (P < 0.05) (Table 2)。

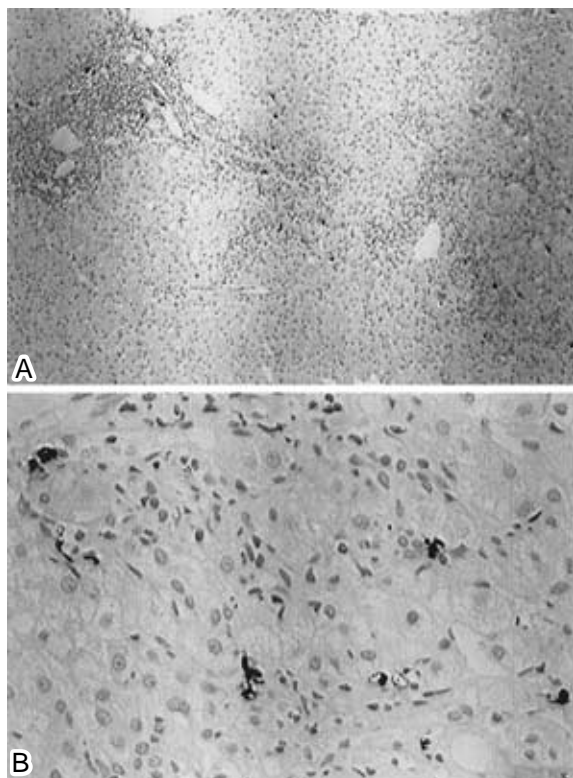


Fig. 4 Microscopic findings in a biopsy specimen from the liver of a patient with chronic hepatitis. A: Mast cells immunoreactive for chymase are seen in the portal area and in lobules. Chymase staining, $\times 40$. B: Chymase-immunoreactive mast cells are seen in lobules surrounding the portal areas. Chymase staining, $\times 40^{12}$.

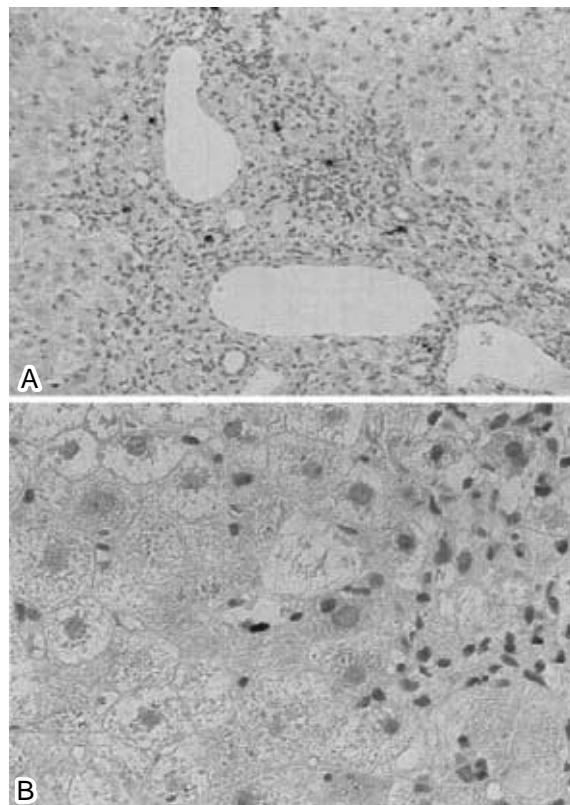


Fig. 5 Microscopic findings in a liver biopsy specimen from a patient with autoimmune hepatitis. A: Mast cells immunoreactive for chymase are seen in the portal area. Chymase staining, $\times 40$. B: Mast cells immunoreactive for chymase are also seen in a fibrotic intralobular sinusoidal wall. Chymase staining, $\times 100^{12}$.

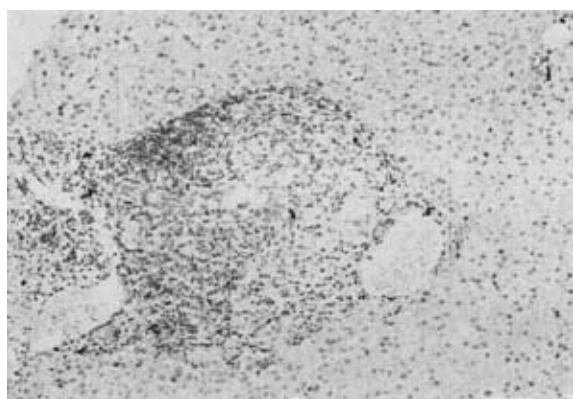


Fig. 6 Microscopic findings in a liver biopsy specimen showing primary biliary cirrhosis. Mast cells immunoreactive for chymase are seen in the portal area. Chymase staining, $\times 40^{14}$.

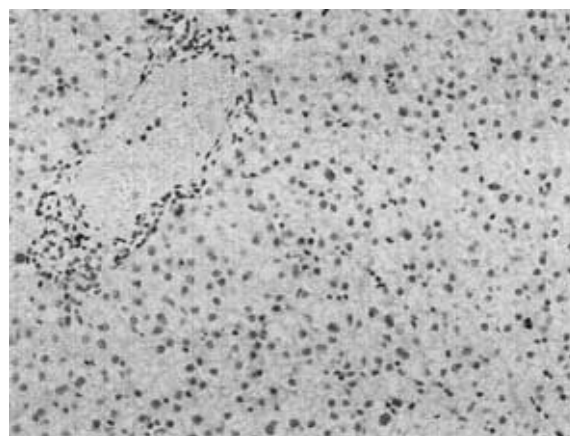


Fig. 7 Microscopic findings in a liver biopsy specimen from a patient with acute hepatitis. Few mast cells immunoreactive for chymase can be seen in the portal area or lobules. Chymase staining, $\times 40^{14}$.

血清中キマーゼ活性の測定

同一健康人の血清, EDTA 添加血漿, ヘパリン添加血漿を用意し, 一定量のプロキマーゼを添加して回収の効率について検討した. その結果, ヘパリン血漿で添加したキマーゼ濃度が回収されなかった. そこで, 一定のキマーゼを添加した血漿にさらに濃度を変えたヘパリンを加えて回収したところ, 普段採血に使われているヘパリン濃度ではキマーゼ測定に影響を及ぼすことがわかり, ヘパリンの影響を除くため塩の添加を試みた. しかし, 慢性肝炎と健康人の血清キマーゼ活性はいずれも感度以下だった.

肥満細胞の免疫組織化学的観察

肝生検で得た肝組織の一部をパラフィン固定して光顕的観察を行い, 残った切片を脱パラフィン後に 10 M クエン酸バッファー (PH 6.0) で 90 , 40 分間温浴処理し不活化した. 内在性ペルオキシダーゼを 0.3% H₂O₂ 加メタノール溶液中で 20 分間処理し不活化した. ANOC 10803 を DAKO 社製抗体希釈液で 100 倍に希釈して, 室温で 1 時間反応させた.

PBS で洗浄後, EmVision 社製ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体と室温 30 分間反応させた. 再び PBS で洗浄後, diaminobenzidine (DAB) により発色させ, ヘマトキシリン エオジン (HE) 染色と対比した.

慢性肝炎では黄褐色に染色されたキマーゼ陽性細胞が門脈域と小葉内にみられた. 肝組織中キマーゼ量の多い例では, 門脈域の線維化の部位に一致してキマーゼ陽性細胞が多数存在した (Fig. 4). 小葉内線維化の見られた類洞壁に沿ってキマーゼ陽性細胞が存在した (Fig. 4). キマーゼ陽性細胞は形態的にみて肥満細胞と思われた.

自己免疫性肝炎 (Fig. 5) と原発性胆汁性肝硬変 (Fig. 6) ではキマーゼ陽性細胞が門脈域の線維化の部位に一致して多数存在した. また, 小葉内線維化のみ見られた類洞壁に沿ってもキマーゼ陽性細胞が認められた. 肝組織中キマーゼ量の多い例でキマーゼ陽性細胞が多く見られた急性肝炎例 (Fig. 7) では小葉内および門脈域でキマーゼ陽性細胞はごく少数のみ認められた.

キマーゼと肝線維形成について

キマーゼは肥満細胞が脱顆粒するときに細胞外に放

出され, 細胞外において AI を AII に変換する. AII は血管平滑筋の収縮作用に加えて, 平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖, 肥大, 遊走を惹起し, コラーゲンなどの細胞外マトリックスを増加させ, 線維化を促進させる¹⁵. 肝線維化において肝星細胞は細胞外マトリックス産生に重要な働きをしているが, AII は肝星細胞を活性化し肝線維化を促進する作用がある¹⁶. 最近になって, アンジオテンシン変換酵素阻害剤や AII 受容体拮抗薬が動物実験で肝線維化を抑制するとの報告がある^{16, 22}. キマーゼが AII 産生による肝線維形成に関与しているかどうかは, 今後キマーゼ拮抗薬による肝線維化抑制を実験的に証明する必要があると考えている.

文 献

1. Reilly CF, Tewksbury DA, Schechter NM, Travis J: Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem* 1982; 257: 8619-8622.
2. Urata H, Boehn KD, Phillip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A: Cellular localization and regional distribution of an angiotensinII-forming Chymase in the heart. *J Clin Invest* 1993; 91: 1269-1281.
3. Nurakami M, Matsuda H, Kubota E, Wakino S, Honda M, Hayashi K, Saruta T: Role of angiotensinII generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int (Suppl)* 1997; 52: S132-135.
4. Marone G, de Crescnzo G, Florio G, Granata F, Dente V, Genovese A: Immunological modulation of human cardiac mast cell. *Neurochem Res* 1999; 91: 1195-1202.
5. Shiota N, Jin D, Takai S, Kawamura T, Koyama M, Nakamura N, Miyazaki M: chymase is Activated in the hamster heart following ventricular fibrosis during the chronic Stage of hypertension. *FEBS Lett* 1997; 406: 301-304.
6. Toh T, Toh-Jakatics R, Jim S, Ihara M, Urata H, Takebayashi S: Mast cell rapidly progressive glomerulonephritis. *J AM Soc Nephrol* 1999; 10: 1498-1505.
7. Yamada M, Ueda M, Naruko T, Tanabe S, Young-Sin H, Ikura Y, Ogami M, Takai S, Miyazaki M: mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys. *Kidney Int* 2001; 59: 1374-1381.
8. Algermissen B, Hermes B, Feldmann-Boeddeker I, Bauer F, Henz BM: Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on in vitro mitogenesis of fibroblast and alterations in cutaneous scars. *Exp Dermatol* 1999; 8: 193-198.
9. Kofford MW, Schwarz LB, Schechter NM, Yager DR, Diegelmann RF, Graham MF: Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *J Biol Chem* 1997; 272:

- 7127 7131.
- 10 . Satomura K, Shimizu S, Nagato T, Komeichi H, Osuga M, Katsuta Y, Aramaki T, Omoto Y: Establishment of an assay method for human mast cell chymase. *Hepato Res* 2002; 24: 361 367.
 - 11 . Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A: Identification of a highly specific chymase as the major angiotensinII-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 1990; 265: 22348 22357.
 - 12 . Shimizu S, Satomura K, Aramaki T, Katsuta Y, Takano T, Omoto T: Hepatic chymase level in chronic hepatitis: co-localization of chymase with fibrosis. *Hepato Res* 2003; 27: 57 61.
 - 13 . Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ: Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513 1520.
 - 14 . Satomura K, Yin M, Shimizu S, Kato Y, Nagato T, Komeichi H, Ohsuga M, Katsuta Y, Aramaki T, Omoto Y: Increased chymase in livers with autoimmune disease: Co-localization with fibrosis. *J Nippon Med Sch* 2003; 70: 490 495.
 - 15 . Tani K, Ogushi F, Kido H, Kawano T, Kunori Y, Kamimura T, Cui P, Sone S: Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 585 589.
 - 16 . Baaller R, Sancho-Brau P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, Colmenero J, Nicolas JM, Jimenez W, Weich N, Gutierrez-Ramos J-C, Arroyo V, Rodes J: Activated hepatic stellate cells express the rennin-angiotensin system and synthesize angiotensinII. *Gastroenterology* 2003; 125: 117 125.
 - 17 . Parits G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW: Up-regulation of components of the rennin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1667 1676.
 - 18 . Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Keleman LI, Horn MJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE: Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001; 121: 148 155.
 - 19 . Ramalho LN, Ramalho FS, Zucoloto S, Castro-e-Silva Junior O, Correa FM, Elias Junior J, Magalhaes JF: Effect of losartan, an angiotensinII antagonist, on secondary biliary cirrhosis. *Hepato-gastroenterology* 2002; 49: 1499 1502.
 - 20 . Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF: The regulatory role of AT I receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCL4. *World Gastroentero* 2000; 6: 824 828.
 - 21 . Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Hukui H: Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745 750.
 - 22 . Tuncer I, Ozbek H, Ugras S, Bayram I: Anti-fibrogenetic effects of captopril and candesartan cilexetil on the hepatic fibrosis development in rat. *Exp Toxic Pathol* 2003; 55: 159 166.

(受付 : 2005年 6 月 28 日)

(受理 : 2005年 8 月 8 日)
