

# ラット胆管結紮肝線維化モデルにおけるangiotensin-II系抑制薬の 肝線維化阻止効果

鳥取大学医学部基盤病態医学講座分子医動物学分野 (主任 平井 和光教授)  
鳥取大学医学部統合内科医学講座機能病態内科学分野 (主任 村脇 義和教授)

植 木 賢

## Effect of angiotensin-II inhibition on the development of liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats

Masaru UEKI

*Division of Molecular Medical Zoology, Department of Microbiology and Pathology,  
Faculty of Medicine, Tottori University*  
*Division of Medicine and Clinical Science, Department of Multidisciplinary Internal Medicine,  
Faculty of Medicine, Tottori University*

### ABSTRACT

We studied the effect of the renin-angiotensin system inhibitors, perindopril (PE), and candesartan (CA) on the development of liver fibrosis induced by bile duct ligation.

Expression of angiotensin-II type-1 receptor were demonstrated in isolated hepatic stellate cells (HSCs) by RT-PCR. CA (2 mg/kg, P.O.) and PE (2 mg/kg, P.O.) were administrated to rats every day 3 weeks after the bile duct ligation. The hepatic hydroxyproline content and hepatic fibrosis area were significantly suppressed by the administration of CA or PE.

To clarify the mechanism underlying this suppression, we examined the amount of activated HSCs and the expression of fibrogenic cytokines. The number of  $\alpha$  smooth muscle actin positive cells were significantly reduced by the administration of CA or PE. The hepatic expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and connective tissue growth factor mRNAs, and the liver total TGF- $\beta$ 1 content in the groups treated with CA or PE were, not significantly, lower compared with the bile duct ligation group. These findings suggested that angiotensin-II would play a pivotal role in liver fibrosis development through the HSC activation, and the angiotensin-II inhibition could be a novel approach for the possible prevention of hepatic fibrosis. (Accepted on November 9, 2004)

**Key words :** liver fibrosis, bile duct ligation, angiotensin converting enzyme inhibitor, angiotensin-II type1 receptor blocker

## はじめに

近年、強力な血管収縮物質であるangiotensin-IIが心筋由来線維芽細胞、メサンギウム細胞などに作用し、コラーゲンの生成を促進することが示されている<sup>1,2)</sup>。肝でも細胞外マトリックスの主要な産生細胞である肝星細胞にangiotensin-II type 1 receptor (AT-R1) が発現し、angiotensin-II添加により肝星細胞の収縮とともに増殖を促進することが明らかにされている<sup>3)</sup>。この報告後、各種の実験的肝線維化モデルでangiotensin-II系抑制薬が肝線維化の進行を阻止することが相次いで報告された<sup>4-9)</sup>。今回、各種実験的肝線維化モデルのうち、実際にヒトでも認められる胆管結紮 (bile duct ligation: BDL) による胆汁うっ滞性肝線維化モデルを用い、angiotensin converting enzyme (ACE) 阻害薬であるperindopril (PE) とAT-R1拮抗薬であるcandesartan (CA) の肝線維化抑制効果およびその機序について検討した。

## 材料および方法

## 1. 動物

Wistar系雄性ラット、体重230~290 g (日本SLC, 静岡) を用い、室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、12時間おきの明-暗周期で飼育した。食餌は標準的な小丸剤 (日本クレア, 東京) を使用し、水分は自動給水器で与えた。処置時の麻酔にはpentobarbital 50 mg/kgを腹腔内投与した。動物実験はすべて鳥取大学医学部動物実験指針にのっとり、同動物実験委員会の承認を得て行った。

## 2. 肝星細胞の分離・培養

Wistar系雄性ラットの肝臓からcollagenase還流法にて、星細胞を分離した<sup>10)</sup>。具体的には $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ を含まないHanks'balanced salts solution (HBSS) を $37^\circ\text{C}$ に加温し、門脈から10 ml/minで10分間灌流した。続いて0.08% pronase E (Merck, Darmstadt, Germany), 0.05% collagenase (type IV;Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A), 0.01% DNase 1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を含んだGey's balanced salt solutions (GBSS) を30分間灌流した。肝を摘出してメスで細切し、0.05% pronase E, 0.05% collagenase, 0.001% DNase 1を含んだGBSSを加えて $37^\circ\text{C}$ 、20分間振盪した。混合液をナイロンガーゼで濾過し、 $50 \times \text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、5分間

および $500 \times \text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、8分間遠心分離して星細胞の多く含まれる層を採取した。続いて25.6% nycodenz (第一化学薬品, 東京) を含むGBSSを加えて転倒、混和し、その混合液の上にHBSS 1 mlを静置して $1500 \times \text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ で15分間遠心分離した。HBSSとnycodenzの間にある星細胞の層を採取し、10% fetal calf serum (fetal bovine serum; JRH Bioscience Inc. Kansas, U.S.A), 200 U/ml penicillin G sodium (Gibco-BRL), 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin sulfate (Gibco-BRL), 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  amphotericin B (Gibco-BRL) を含むDulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco-BRL) を加えて25  $\text{cm}^2$  プラスチックフラスコディッシュに入れ $37^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス、95%空気相にて培養を行った。培養液は、細胞を播種した24時間後に第1回目の交換を行い、その後は隔日で交換を行った。星細胞はconfluent stage (充満期) で実験に供した。

## 3. in vivoにおける肝線維化モデルの作成と薬物の投与方法

Wistar系雄性ラット (体重230-290 g) を用い4群、胆管結紮群 (BDL群)、胆管結紮+CA投与群 (BDL+CA群)、胆管結紮+PE投与群 (BDL+PE群)、Sham群に分けた。BDL、BDL+CA、BDL+PE群では、pentobarbital麻酔後、総胆管 (CBD) を二重結紮、切離した<sup>11)</sup>。Sham群は開腹のみを行った。手術翌日から連日、ラットの体重1kgあたりCA 2 mgもしくはPE 2 mgを、胃管チューブでそれぞれ経口投与した。術後3週のラット生存率は、BDL群:  $n=7/13$  (54%), BDL+CA群:  $n=6/12$  (50%), BDL+PE群:  $n=9/12$  (75%), Sham群:  $n=5/5$  (100%) であった。3週間後pentobarbital麻酔下に、下大静脈より採血と肝摘出を行った。採取した血清は、 $-80^\circ\text{C}$ で保管した。また、肝は生理食塩水を肝静脈より還流し、重量を測定した。肝組織片をRNA later (Ambion Inc. Tx, U.S.A.) 中に入れ $4^\circ\text{C}$ で24時間静置した後 $-30^\circ\text{C}$ で保管した。さらに、hydroxyproline (Hyp), TGF- $\beta$ 1 蛋白測定のため肝組織片を直ちに凍結し $-80^\circ\text{C}$ で保管するとともに、組織学的検討を行うため肝組織を10%ホルマリン中に浸漬して、その後パラフィン包埋した。

## 肝組織中Hypの定量

肝組織200 mgをホモジナイズ後に6 N塩酸4

mlを加え、密封後105°C, 24時間加水分解した。加水分解物はevaporaterを用いて塩酸を除去後、蒸留水で再溶解して4回乾固を繰り返した。つぎに蒸留水10 mlで溶解し、0.1 gの活性炭を加えて混和、脱色し、濾過した。濾液は1 N水酸化ナトリウムを用いてpH 5とし、再乾固した後、蒸留水10 mlで溶解し、その1 mlに対して2 mlのisopropanolと1 mlの酸化試薬(7%のchloramine T(和光純薬工業, 大阪)水溶液1容と緩衝液4容を混和)を加え5分間放置し酸化した。2 mlのEhrlich試薬(p-dimethylamino-benz-aldehyde 17.6 gを60%過塩素酸40.8 gに溶解させ、使用時にisopropanolで100 mlとした)を加え60°C, 10分間加温し発色させた。30分間室温放置にて冷却後562 nmで比色した。高純度のL-Hyp(和光)を溶解して内部標準液を作り、同様の方法で比色して標準曲線を作成しHyp濃度の定量を行った。Hyp濃度を肝1 g当たりで表わし( $\mu\text{g/g wet liver}$ ), 肝重量を乗じて肝臓当たりの総Hyp量とした<sup>12)</sup>。

#### 肝組織中TGF- $\beta$ 1 蛋白の定量

肝組織中よりTGF- $\beta$ 1 蛋白を酸-エタノール法で活性型として抽出し<sup>13,14)</sup>, ヒト肝組織中TGF- $\beta$ 1に対するモノクローナル抗体を用いたELISAキット(Genzyme Corporation, MA, U.S.A.)にて測定した。具体的には、酸-エタノール溶液(95%エタノール 375 ml, 12N HCl 7.5 ml) 100 mlに対して0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 和光) 7 ml, 0.1% pepstatin 0.4 mlを加えた混合液を2.0 ml作成して肝組織500 mgに加え、24時間4°Cで振盪抽出した。12,000×gで60分間遠心分離を行い、上清1.0 mlを塩酸アンモニウムによりpH約5.0に調整し、pH 5.3の2 M酢酸アンモニウムを12  $\mu$ l添加した。その後エタノール/エーテル(2:1)混合液6 mlを加え混合後、48時間-30°Cで静置した。17,000×g, 10分間の遠心分離後、沈殿物を1 M酢酸1.5 mlに溶解し、0.17 M酢酸にて48時間4°Cで透析した。透析後凍結乾燥し、得られた検体を0.1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液0.5 mlにて溶解しTGF- $\beta$ 1測定に供した。なお、この測定条件下でTGF- $\beta$ 1量0.1 ng/mlから5 ng/mlの範囲で吸光度と濃度とが対数グラフで直線性を示すことを確認した。

#### RNA抽出とSYBR Green I PCR法

分離・精製したラット肝星細胞を25 cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコディッシュに播種し, confluent stageに至った時点で培養細胞のtotal RNAをISOGEN(ニッポンジーン, 富山)を用いてフェノール, クロロホルム法にて抽出した。得られたtotal RNAの一部を鋳型として用い, oligo-dt primerとrandom primerを用いてreverse transcriptaseによりcDNAに変換し, 表1に示したACE, renin, AT-R1のprimerを用いてPCRを行った。そのPCR産物を1%アガロースゲルにて電気泳動し, ACE mRNA, renin mRNA, AT-R1 mRNAの存在を調べた。

In vivo実験では, RNA laterに浸漬した肝組織200 mgからtotal RNAをISOGENにより前述と同様に抽出, cDNAを作成し, Light Cycler(Roche), Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche)を用いてACE mRNA, renin mRNA, TGF- $\beta$ 1 mRNA, CTGF mRNA, collagen-I mRNAの定量を行った。なお, 対照として $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulin ( $\beta$ <sub>2</sub>-MG)を測定し, その比で発現量とした。なお特異的cDNAの増幅に用いたforward, reverse primerは表1に示した。PCRはACE mRNA: pre-incubation 95°C 10 min 1 cycle. Shuttle PCR 95°C 10 sec, 62°C 10 sec, 72°C 7 sec 40 cycle, renin mRNA: pre-incubation 95°C 10 min 1 cycle. Shuttle PCR 95°C 10 sec, 62°C 10 sec, 72°C 7 sec 40 cycle, TGF- $\beta$ 1 mRNA: pre-incubation 95°C 10 min 1 cycle. Shuttle PCR 95°C 10 sec, 62°C 10 sec, 72°C 9 sec 40 cycle, CTGF mRNA: pre-incubation 95°C 10 min 1 cycle. Shuttle PCR 95°C 10 sec, 55°C 10 sec, 72°C 6 sec 40 cycle, collagen-I mRNA: pre-incubation 95°C 10 min 1 cycle. Shuttle PCR 95°C 10 sec, 55°C 10 sec, 72°C 3 sec 40 cycle,  $\beta$ <sub>2</sub>-MG mRNA: pre-incubation 95°C 10 min 1 cycle. Shuttle PCR 95°C 10 sec, 55°C 10 sec, 72°C 5 sec 40 cycleの条件で施行した。

#### 血清Bilirubin, ALP, AST, ALTの測定

血清のBilirubin, ALP, AST, ALTは Autoanalyzer(日立 7170)で測定した。

#### 組織学的検討

摘出した肝臓は直ちに10%ホルマリンで固定し, パラフィン包埋した。切片は4  $\mu$ m で薄切し, hematoxylin-eosin (H-E) 染色およびazan染色と

表1. RT-PCRに用いたprimer

ACE	Forward primer 5' -GAAGCATCACCAAGGAGAAC-3'
	Reverse primer 5' -GGAAGTGGATGATGAAGCTG-3'
renin	Forward primer 5' -CATGAAGGGGGTCTCTGT-3'
	Reverse primer 5' -TGGCTACAGTTCACAACG-3'
angiotensin-II type 1 receptor	Forward primer 5' -CTCCAGCTTCTGAAATACAT-3'
	Reverse primer 5' -TGTCAGGAAATCACTTCACT-3'
TGF- $\beta$ 1	Forward primer 5' -GCAACAACGCAATCTATGAC-3'
	Reverse primer 5' -CCTGTATTCCGTCTCTT-3'
CTGF	Forward primer 5' -TCCCTGCGACCCACACAA-3'
	Reverse primer 5' -TGCAACTGCTTTGGAAGGACTC-3'
collagen-I	Forward primer 5' -TCCGGCTCCTGCTCCTCTTA-3'
	Reverse primer 5' -GTATGCAGCTGACTTCAGGGATGT-3'
$\beta_2$ -microglobulin	Forward primer 5' -CCGATGTATATGCTTGCAGAGTTAA-3'
	Reverse primer 5' -CAGATGATTTCAGAGCTCCATAGA-3'

ともに、 $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) 免疫染色を施した。具体的には脱パラフィン処理を行い、内因性ペルオキシダーゼブロックを15分間施行し正常血清に20分間浸漬した。つぎに一次抗体であるマウスモノクローナル抗ヒト $\alpha$ -SMA (100倍希釈 DAKO A/S, Denmark) (No M0851) に4°Cで24時間浸漬した。さらに、二次抗体に45分間浸漬して、avidin-biotin-peroxidase complexに40分間浸漬後、diaminobenzidineにて可視化しhematoxylinで対比染色をして、エタノールキシレン系列で脱水処理を行い封入した。 $\alpha$ -SMA染色標本では、400倍 $\times$ 10視野を観察して、類洞に存在する $\alpha$ -SMA染色陽性の肝星細胞を活性型星細胞と判定し、その数を定量化した。Azan染色標本は画像をAdobe-Photoshopで取り込み、線維を示す青色部分を抽出し、線維化面積をNIH-image (National institutes of health, U.S.A.)にて定量化した。

#### 統計学的検討

2群間の有意差検定はMann-Whitney検定で行

い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意な差があると判定した (Stat View for Windows; Microsoft, NC, U.S.A.)。

#### 結 果

正常ラットより分離し、2週間培養し活性化した星細胞よりtotal RNAを抽出しACE, renin, AT-R1のmRNAを検討すると、それぞれ174 bp, 174 bp, 179 bpの単一のバンドが認められた (図1)。このうちACE, reninの遺伝子発現量をBDLラット肝で検討すると、術後3週でACE mRNAは著明に亢進していた (図2)。3週後の血液生化学検査では、表2のように、トランスアミナーゼは胆管結紮を行った3群で差がなかったが、CA投与群でBilirubin, ALPが低値を示した。

Azan染色による肝組織像では、BDL群はSham群に比べて著明な線維化を認めたが、BDL+CA群, BDL+PE群はBDL群に比べてその所見はいずれも軽度であった (図3)。肝線維化面積の測定では、BDL群に比べてBDL+CA群、

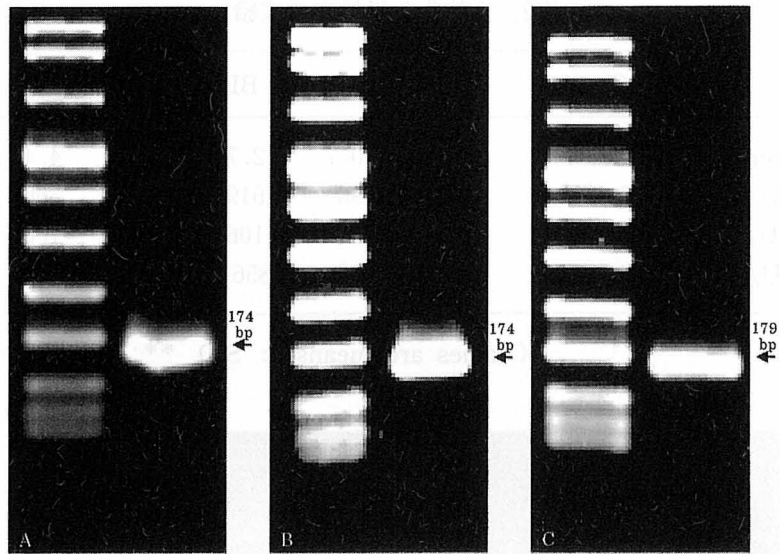


図1. 肝星細胞におけるACE (A), renin (B), AT-R1 (C) mRNAの発現  
肝星細胞のACE, renin, AT-R1の存在を確認するため活性型星細胞よりtotal-RNAを抽出しPCRおよび電気泳動を行った。それぞれ174 bp, 174 bp, 179 bpのバンドが出現し、活性型星細胞にACE, renin, AT-R1の遺伝子発現が確かめられた。

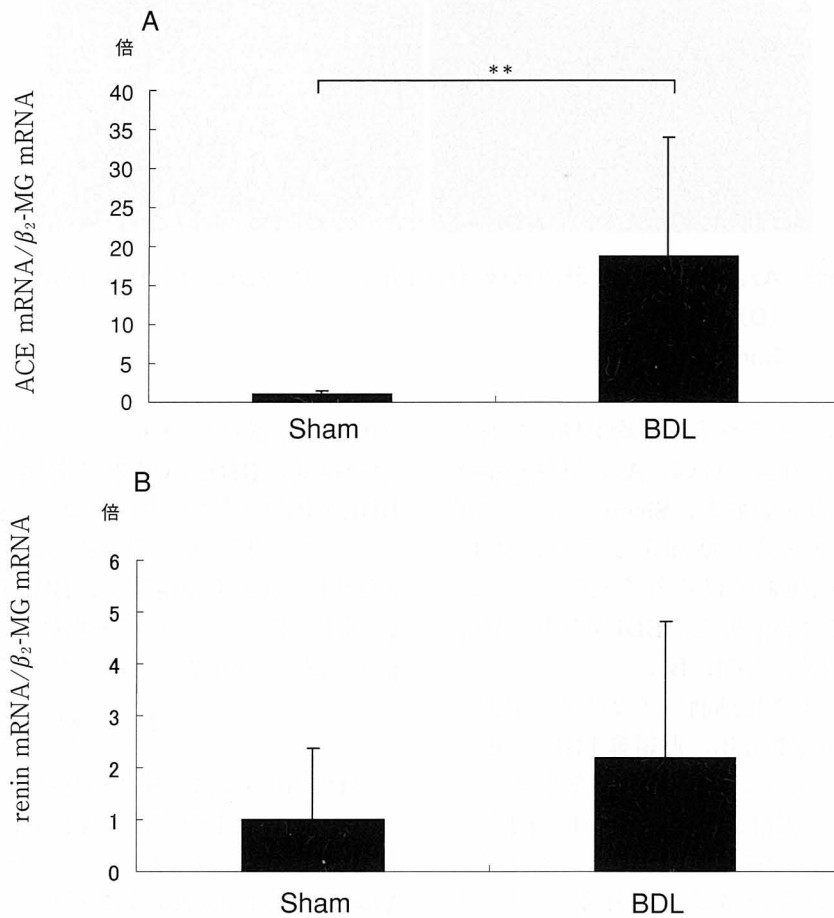


図2. 肝におけるACE (A), renin (B)のmRNA発現量  
肝組織中ACEの遺伝子発現は、術後3週のBDLラット肝においてSham群よりも著明に亢進していた。mRNA発現量は、Sham群の発現量を1とし、その倍数で表した。  
Values are means  $\pm$  S.D. \*\*:  $p < 0.01$

表2. 血液生化学検査の成績

	Sham	BDL	BDL+CA	BDL+PE
T-Bil (mg/dl)	0	6.4 ± 0.7	2.7 ± 2.7**	4.4 ± 3.0
AST (IU/L)	109 ± 10	649 ± 96	619 ± 508	560 ± 266
ALT (IU/L)	45 ± 4	125 ± 24	106 ± 54	108 ± 33
ALP (IU/L)	658 ± 109	1307 ± 262	856 ± 122**	1202 ± 429

(Values are means ± S.D. \*\*: p<0.01 vs BDL)

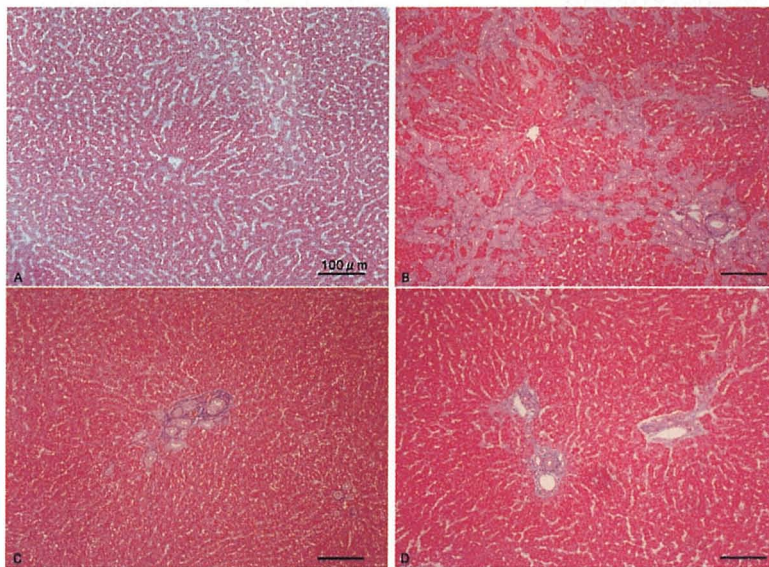


図3. Azan染色による肝組織像 (A) Sham, (B) BDL, (C) BDL+CA, (D) BDL+PE  
Bar = 100 μm

BDL+PE群においてそれぞれ平均36%, 45%の線維化面積減少を認めた(図4. A). 肝Hyp量はBDL群 $10.0 \pm 1.9$  mg/肝と, Sham群 $1.7 \pm 1.9$  mg/肝に比べて約6倍の増加を認めた. BDL+CA群, BDL+PE群ではそれぞれ $5.5 \pm 1.3$  mg/肝,  $6.3 \pm 2.0$  mg/肝と, BDL群に比べHypの有意な減少を認めた(図4. B).

これら薬物の肝線維化抑制のメカニズムを調べるため活性型星細胞数算出, 肝組織TGF- $\beta$ 1蛋白定量, 各種サイトカインのmRNA定量などを行った. 活性型星細胞数は, BDL群に比べBDL+CA群, BDL+PE群で有意に減少していた(図5). 肝組織中TGF- $\beta$ 1蛋白量は, BDL群に比べてBDL+CA群, BDL+PE群においてわずかに減少傾向 (BDL+CA群:  $p = 0.09$ , BDL+PE群:  $p$

$= 0.15$ ) を認めた(図6). またcollagen-I mRNAの発現は, BDL+CA群で著明に減少したが, BDL+PE群ではわずかな減少 ( $p = 0.16$ ) にとどまった(図7. A). TGF- $\beta$ 1 mRNA, CTGF mRNAの遺伝子発現量は, BDL群に比べBDL+CA群においてわずかに平均値の低下 (それぞれ  $p = 0.36$ ,  $p = 0.23$ ) を認めた(図7. B, C).

## 考 察

今回の検討では, 胆管結紮肝線維化モデルラットにおいてACE阻害薬, AT-R1拮抗薬の投与が肝線維化の進行を抑制することが確認された. Yoshijiら<sup>4)</sup>はFischer344雄性ラットにブタ血清を投与して作成した肝線維化モデルで, CAおよびPEが肝線維化を著明に抑制したことを報告して

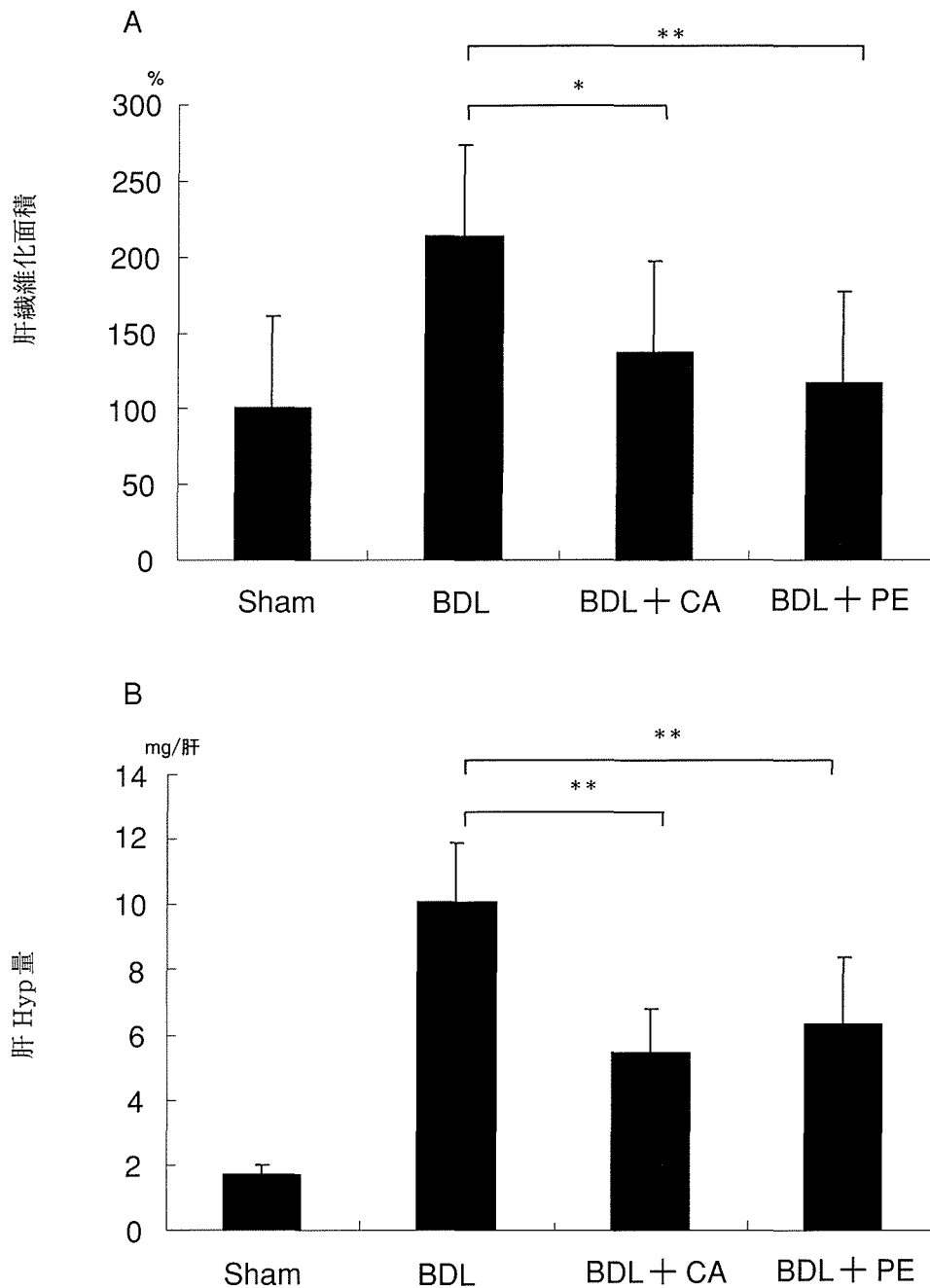


図4. 肝線維化面積(A)と肝Hyp量(B)

A: Azan染色による肝線維化面積は, Sham群を100%として表した. B: 肝Hyp量は, BDL群に比較しBDL+CA群, BDL+PE群で有意に減少した.

Values are means  $\pm$  S.D. \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  vs BDL

いる. この成績は, Jonssonら<sup>7)</sup>の胆管結紮モデルによるcaptopril 4週投与の成績, Ohishiら<sup>6)</sup>の四塩化炭素投与モデルによるlisinopril 12週投与の成績, Kurikawaら<sup>9)</sup>の胆管結紮モデルによるolmesartan 4週投与の成績, Tuncerら<sup>8)</sup>の四塩化炭

素投与モデルによるcandesartan 7週投与の成績と同様であった.

これら薬物の線維化抑制機序を明らかにするため検討した成績では, 活性型星細胞数の減少とともにTGF- $\beta$ 1蛋白量, TGF- $\beta$ 1 mRNA, CTGF

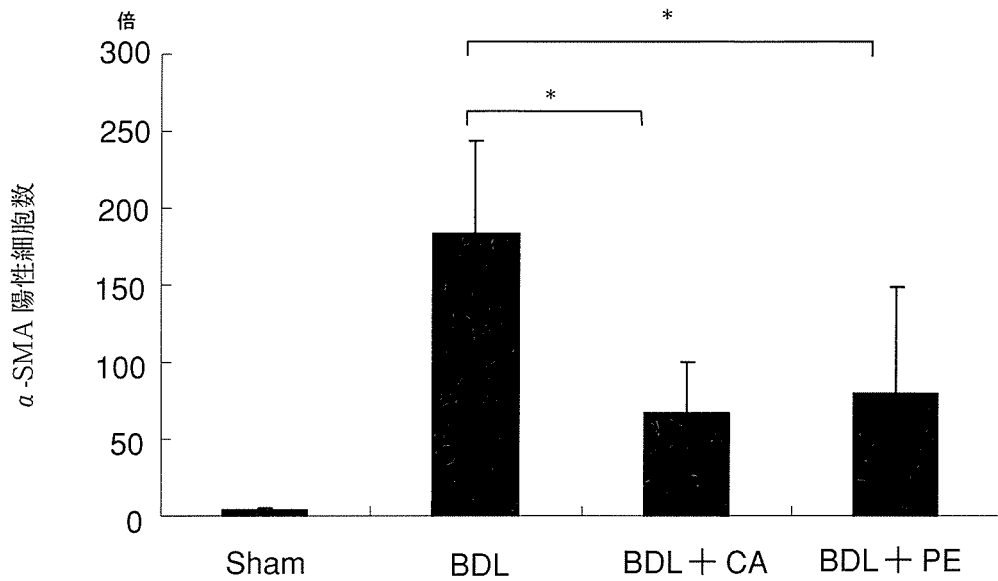


図5.  $\alpha$ -SMA陽性細胞数

$\alpha$ -SMA陽性細胞数は、Sham群を1とし、その倍数で表した。

Values are means  $\pm$  S.D. \* :  $p < 0.05$  vs BDL

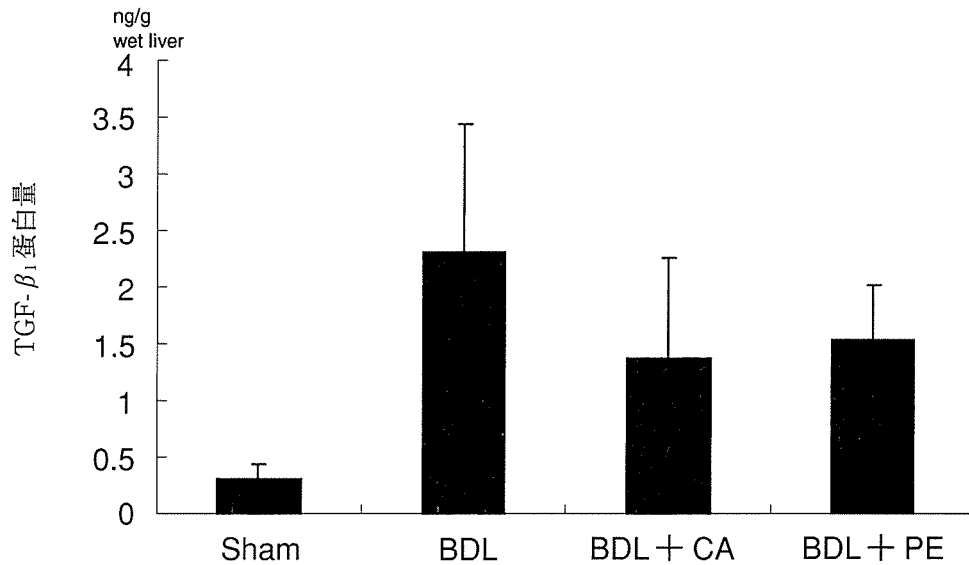


図6. TGF- $\beta$ 1 蛋白量

Values are means  $\pm$  S.D.

mRNA発現量の平均値は低下した。Paizisら<sup>5)</sup>は胆管結紮をしたSprague-Dawley 雄性ラットにAT-R1拮抗薬であるirbesartanを経口投与し、結紮3週間後に肝におけるTGF- $\beta$ 1 mRNA, collagen-I mRNAの減少を報告している。同様の成績はYoshijiら<sup>4)</sup>Kurikawaら<sup>9)</sup>においても認められ

た。肝線維化病態では、TGF- $\beta$ 1および酸化ストレスなどにより肝星細胞は活性化される。活性型星細胞はTGF- $\beta$ 1, CTGFにより細胞外マトリックスの産生を増加する。さらに活性型星細胞は自らもこれらサイトカインを放出し、オートクライン的にも刺激を受けている<sup>15)</sup>。なお、CTGFは、



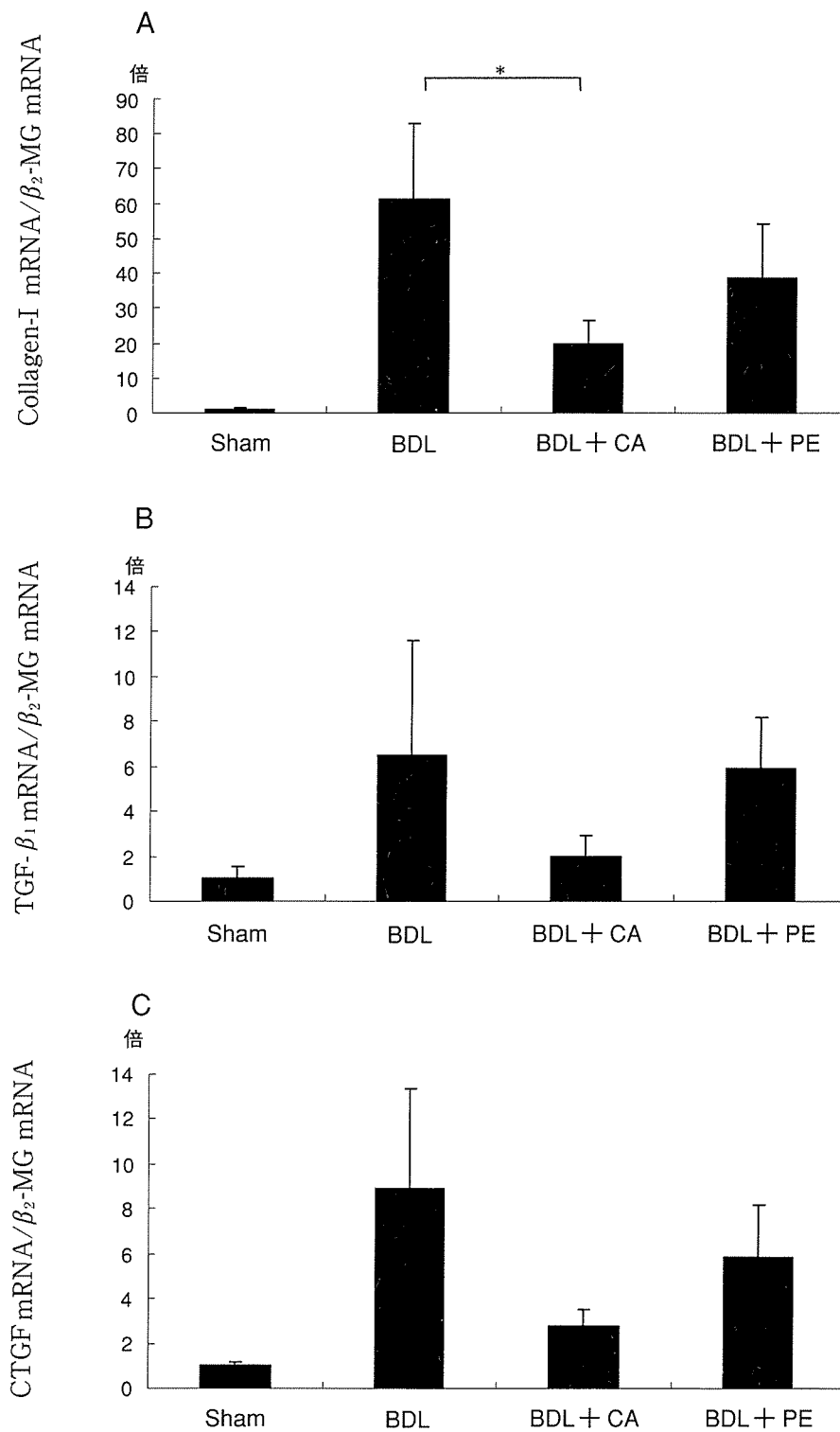


図7. 肝におけるcollagen-I (A), TGF- $\beta$ 1 (B), CTGF (C) のmRNA発現量 mRNA発現量は, Sham群の発現量を1とし, その倍数で表した.

Values are means  $\pm$  S.E. \* : p < 0.05 vs BDL

TGF- $\beta$ 1により誘導発現されるサイトカインである。したがってangiotensin-II系抑制薬は、肝星細胞の活性化を抑制し、これにより線維化促進性サイトカインTGF- $\beta$ 1, CTGFが減少し、肝線維化の進行が抑制されたものと推測された。

近年、組織線維化に関与しているangiotensin-IIは、炎症部位自体で産生されていることが心臓、腎臓などで知られている<sup>16~18)</sup>。肝臓についても、活性化した星細胞がrenin, ACE, angiotensin-IIなどのrenin angiotensin systemコンポーネントを発現することをBatallerら<sup>19)</sup>が報告している。

今回、肝星細胞培養系でRASコンポーネントの発現を調べたところ、ACE, renin, AT-R1ともに遺伝子発現を検出した。さらに3週間後の胆管結紮ラット肝においては、ACEの遺伝子発現は亢進していた。したがって、胆汁うっ滞性肝線維化モデルでも局所のrenin angiotensin systemが作動し、肝線維化に関与しているものと考えられた。

なお今回の実験で、CA, PEの投与によっても血清中AST, ALTに差が認められなかったことより、CA, PEの肝線維化抑制作用は肝細胞障害の軽減によるものではないことが示された。これらの薬剤はともに降圧薬として承認されており、その安全性は確認されていることから今後ヒトへの臨床応用が期待される。

### 結 語

今回の検討で、ACE阻害薬PE, AT-R1拮抗薬CAが胆汁うっ滞肝線維化モデルの活性型星細胞を減少させ、肝線維化を抑制することを示した。この線維化抑制効果は、サイトカインTGF- $\beta$ 1, CTGFの発現低下と関連していることが推察された。

稿を終えるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部基盤病態医学講座分子医動物学教室平井和光教授、鳥取大学医学部統合内科医学講座機能病態内科学教室村脇義和教授、孝田雅彦助教授、また御校閲賜りました病態解析医学講座薬物治療学教室長谷川純一教授、御指導を賜りました生体情報機能学講座病態生化学教室武良哲雄先生、病態解析医学講座統合分子医化学教室小倉嘉夫先生に深甚なる謝意を捧げます。さらに御協力いただきました肝臓研究室の先生方ならびに内科学教室員各位に深く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Wolf, G., Haberstroh, U. and Neilson, E. G. (1992) Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 140, 95-107.
- 2) Brilla, C. G., Maisch, B. and Weber, K. T. (1993) Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. In vivo and in vitro studies on collagen matrix regulation. *Clin Investig* 71, 35-41.
- 3) Bataller, R., Gines, P., Nicolas, J. M., Gorbic, N., Ramallo, E. G., Gasull, X., Bosch, J., Arroyo, V. and Rodes, J. (2000) Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 118, 1149-1156.
- 4) Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Nakatani, T., Tsujinoue, H. and Fukui, H. (2001) Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 34, 745-750.
- 5) Paizis, G., Gilbert, R. E., Cooper, M. E., Murthi, P., Schembri, J. M., Wu, L. L., Rumble, J. R., Kelly, D. J., Tikellis, C., Cox, A., Smallwood, R. A. and Angus, P. W. (2001) Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 35, 376-385.
- 6) Ohishi, T., Saito, H., Tsusaka, K., Toda, K., Inagaki, H., Hamada, Y., Kumagai, N., Atsukawa, K. and Ishii, H. (2001) Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatol Res* 21, 147-158.
- 7) Jonsson, J. R., Clouston, A. D., Ando, Y., Kelemen, L. I., Horn, M. J., Adamson, M. D., Purdie, D. M. and Powell, E. E. (2001) Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic

- fibrosis. *Gastroenterology* 121, 148-155.
- 8) Tuncer, I., Ozbek, H., Ugras, S. and Bayram, I. (2003) Anti-fibrogenic effects of captopril and candesartan cilexetil on the hepatic fibrosis development in rat. *Exp Toxic Pathol* 55, 159-166.
  - 9) Kurikawa, N., Suga, M., Kuroda, S., Yamada, K. and Ishikawa, H. (2003) An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by suppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 139, 1085-1094.
  - 10) Eyken, P. V., Geerts, A., Bleser, P. D., Lazou, J. M., Vrijzen, R., Scot, R., Wisse, E. and Desmet, V. J. (1992) Localization and cellular source of the extracellular matrix protein tenascin in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* 15, 909-916.
  - 11) Kountouras, J., Billing, B. H., Scheuer, P. J. (1984) Prolonged bile duct obstruction : a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 65, 305-311.
  - 12) Murawaki, Y. and Hirayama, C. (1980) Hepatic collagenolytic cathepsin in patients with chronic liver disease. *Clin Chim Acta* 108, 121-128.
  - 13) Shirai, Y., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Tsushima, H., Takaishi, K., Kiso, S. and Mastuzawa, Y. (1994) Plasma transforming growth factor- $\beta$ 1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 73, 2275-2279.
  - 14) Murawaki, Y., Nishimura, Y., Ikuta, Y., Idobe, Y., Kitamura, Y. and Kawasaki, H. (1998) Plasma transforming growth factor- $\beta$ 1 concentrations in patients with chronic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 13, 680-684.
  - 15) Gressner, A. M. (1995) Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 22 (Suppl.), 28-36.
  - 16) DeMello, W. C. and Danser, J. (2000) Angiotensin II and the heart. On the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 35, 1183-1188.
  - 17) Harris R. C. and Cheng, H. F. (1996) The intrarenal renin-angiotensin system; A paracrine system for the local control of renal function separate from the systemic axis. *Exp Nephrol* 4 (Suppl. 1), 2-7.
  - 18) Anderson, S. (1997) Role of local and systemic angiotensin in diabetic renal disease. *Kidney Int Suppl* 63, S107-S110.
  - 19) Bataller, R., Bru, P. S., Gines, P., Lora, J. M., Garawi, A. A., Sole, M., Colmenero, J., Nicolas, J. M., Jimenez, W., Weich, N., Ramos, J. G., Arroyo, V. and Rodes, J. (2003) Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 125, 117-125.