

平成21年 9月

# 西田直史 学位論文審査要旨

主 査 井 藤 久 雄  
副主査 村 脇 義 和  
同 松 浦 達 也

## 主論文

Zinc supplementation with polaprezinc protects mouse hepatocytes against acetaminophen-induced toxicity via induction of heat shock protein 70

(ポラプレジンクによるマウス肝細胞への亜鉛供給は熱ショック蛋白70誘導を介してアセトアミノフェン肝細胞障害を抑制する)

(著者：西田直史、大畑修三、楠本智章、持田晋輔、仲田純也、稲垣喜三、太田好次、松浦達也)

平成21年 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

## Zinc supplementation with polaprezinc protects mouse hepatocytes against acetaminophen-induced toxicity via induction of heat shock protein 70

(ポラプレジンクによるマウス肝細胞への亜鉛供給は熱ショック蛋白70誘導を介してアセトアミノフェン肝細胞障害を抑制する)

アセトアミノフェン (APAP)は世界中で最も多く市販されている解熱鎮痛剤で、通常の服用量では害がないと考えられているが、過剰に摂取すると肝障害を誘発することが知られている。欧米では事故、自殺目的を含めたAPAP大量摂取による肝障害が毎年増加を続けており、APAP肝障害に対する治療薬の開発は極めて重要である。

ストレス応答タンパク質である熱ショック蛋白 (HSP) は細胞・臓器保護効果を有することが知られている。本研究では、抗胃潰瘍薬でありHSP誘導作用を有するポラプレジンク (Zinc L-carnosine: PZ) がAPAP肝細胞障害からマウス初代培養肝細胞を保護するかを検討した。

### 方 法

コラゲナーゼ灌流法により8~11週齢の雄性C57BL/6マウスから肝細胞を単離し、初代肝細胞培養系を確立した。それぞれ100  $\mu$ Mのポラプレジンク (PZ) およびその構成成分である亜鉛 (ZnSO<sub>4</sub>: ZS)、L-カルノシン (LC) を実験に使用した。肝細胞障害は10 mM APAPで誘導した。初代培養肝細胞は単離後4~6時間培養し、コラーゲンコートした培養皿に接着させた。培地交換後、PZ、ZSあるいはLC含有培地で培養した。PZ、ZSあるいはLC含有培地で9時間培養した後、APAP含有培地に交換し、APAP肝細胞障害への影響を検討した。また、HSP阻害剤であるKNK437をPZ処理6時間前に添加し、PZのHSP70誘導への影響およびAPAP肝細胞障害への影響を検討した。

### 結 果

- (1) HSP70発現量への影響: HSP70発現量はPZ処理6時間後から有意に増加し、9時間後に約4倍に増加した。またZS処理9時間後のHSP70発現量は約6.4倍に増加した。一方、LC処理はHSP70発現量に影響を与えなかった。
- (2) 細胞内亜鉛濃度への影響: 細胞内亜鉛濃度はPZおよびZS処理1時間後でピークとなり、

その濃度は9時間後まで維持された。PZおよびZS処理による細胞内亜鉛濃度に差はみられなかった。

- (3) **細胞生存率への影響**：APAP処理後の細胞生存率を経時的に測定した。APAP単独処理12時間後の細胞生存率は55%まで減少した。PZあるいはZSで前処理した肝細胞のAPAP処理12時間後の細胞生存率はそれぞれ89%、83%と有意に改善された。またLCで前処理した肝細胞のAPAP処理12時間後の細胞生存率は62%と有意な改善はみられなかった。
- (4) **過酸化脂質量への影響**：APAP処理後の過酸化脂質量の変化を経時的に測定した。過酸化脂質量はAPAP単独処理3時間後から有意に増加し、12時間後には約2.3倍に増加した。PZあるいはZS前処理はAPAPによる過酸化脂質量の増加を有意に抑制した。またLC前処理は抑制傾向を示したが有意差はみられなかった。
- (5) **細胞内グルタチオン (GSH) 量への影響**：APAP単独処理3時間後の細胞内GSH量は有意に減少した。またPZ前処理はAPAPによる細胞内GSH量の減少を抑制しなかった。
- (6) **HSP阻害剤の効果**：KNK437で前処理した肝細胞のPZ処理9時間後のHSP70発現量は有意に減少していた。KNK437によってPZによるHSP70発現誘導が阻害された肝細胞のAPAP処理12時間後の細胞生存率は約61%に減少した。

## 考 察

PZ前処理がAPAP肝細胞障害からマウス初代培養肝細胞を保護することが示された。とくにその構成成分である亜鉛はPZ処理と同様のHSP70発現誘導および肝細胞障害抑制効果を示した。このことから、PZの肝細胞保護効果は亜鉛の作用によるものであると考えられる。また、KNK437はPZによるHSP70発現誘導を抑制し、さらにPZのAPAP肝細胞障害保護効果を消去した。これらの結果は、HSP70発現増加がAPAP肝細胞障害抑制に重要であることを示唆する。APAP過剰摂取は細胞内GSHを枯渇させることが知られている。本研究において、PZ前処理はAPAPによる細胞内GSH量の減少を抑制しなかった。このことは、PZが細胞内GSH枯渇の下流で、HSP70発現を誘導し、脂質過酸化を抑制して肝細胞障害を抑制することを示唆する。

## 結 論

本研究において、抗胃潰瘍薬であるPZはその構成成分である亜鉛の作用によって、HSP70発現誘導および脂質過酸化抑制を介し、APAP肝細胞障害を抑制することが示された。