

平成22年2月

楠本智章 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

Protection by exogenously added coenzyme Q₉ against free radical-induced injuries
in human liver cells

(外来性コエンザイムQ₉によるフリーラジカル誘導ヒト肝細胞障害の防御効果)

(著者：楠本智章、絹川知世、森川仁詞、寺岡麻梨、西田直史、村脇義和、山田一夫、
松浦達也)

平成22年 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 掲載予定

学位論文要旨

Protection by exogenously added coenzyme Q₉ against free radical-induced injuries in human liver cells

(外来性コエンザイムQ₉によるフリーラジカル誘導ヒト肝細胞障害の防御効果)

コエンザイムQ (CoQ) はイソプレノイド側鎖を有するキノン化合物であり、哺乳類ではイソプレノイド側鎖数が9または10の同族体 (CoQ₉, CoQ₁₀) が知られている。ヒトにおける主な同族体はCoQ₁₀であるが、CoQ₉も数パーセントの割合で存在する。CoQはミトコンドリア電子伝達系の構成成分であるが、還元型CoQは強力な内在性抗酸化物質であり、還元型CoQ₁₀ (CoQ₁₀H₂) の抗酸化作用は数多く報告されている。しかしながら、還元型CoQ₉ (CoQ₉H₂) がCoQ₁₀を主な同族体とするヒト細胞において抗酸化作用を発揮するかという研究はこれまでに存在しなかった。

本研究では、ヒト肝癌細胞株を用いて、外来性CoQ₉が水溶性および脂溶性フリーラジカル発生剤によって誘導される細胞障害を保護できるかを検討した。

方法

ヒト肝癌由来HepG2細胞 (以下、コントロール細胞) に対して、単層CoQ₉リポソームを最終濃度10 μMで培地中に添加し、37°C、5% CO₂の条件下で24時間培養したものをCoQ₉過剰細胞として実験に使用した。フリーラジカルによる細胞障害誘導には水溶性フリーラジカル発生剤の2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) および脂溶性フリーラジカル発生剤の2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) を用いた。コントロール細胞およびCoQ₉過剰細胞に、10 mM AAPHまたは500 μM AMVNを添加し、それぞれ4時間、24時間培養することにより細胞障害を誘導した。AAPH添加1、2、4時間後およびAMVN添加6、12、24時間後にそれぞれの細胞を採取し、細胞生存率、細胞内過酸化脂質量およびグルタチオン (GSH) 量、細胞内CoQ量を測定し、フリーラジカル誘導細胞障害への影響を検討した。

結果

- (1) 細胞内へのCoQ₉取り込み効果：添加したCoQ₉リポソームは経時的に細胞内へ取り込まれ、添加24時間後に細胞内CoQ₉およびCoQ₉H₂量はピークとなった。CoQ₉リポソーム添加後の

細胞内CoQ₁₀およびCoQ₁₀H₂量にはほとんど変化はみられなかった。

- (2) **細胞生存率への影響**: AAPHまたはAMVN添加後のコントロール細胞の細胞生存率は経時的に減少し、AAPH添加4時間後、AMVN添加24時間後にはそれぞれ24%、26%となった。しかしながら、CoQ₉過剰細胞のAAPH添加4時間後、AMVN添加24時間後の細胞生存率はそれぞれ47%、66%と有意に改善された。
- (3) **過酸化脂質量への影響**: コントロール細胞では過酸化脂質量はAAPH添加2時間後まで経時的に増加し、4時間後には約2.5倍まで増加した。また、AMVN添加6時間後には約2.8倍まで増加し、その後プラトーとなった。CoQ₉過剰細胞ではAAPHおよびAMVN添加後の過酸化脂質量の増加が有意に抑制された。
- (4) **細胞内GSH量への影響**: コントロール細胞におけるAAPH添加1時間後の細胞内GSH量は80%まで減少し、CoQ₉過剰細胞ではその減少が有意に抑制された。また、AMVN添加12時間後においても同様の結果が得られた。
- (5) **細胞内CoQ量の変化**: CoQ₉H₂はAAPH添加2、4時間後およびAMVN添加6、12、24時間後には有意に減少し、CoQ₉は相補的に増加傾向を示した。しかしながら、CoQ₁₀H₂は有意な減少を示さなかった。

考 察

本研究により、外来性CoQ₉がヒト肝細胞におけるフリーラジカル誘導細胞障害を保護することが示された。AAPHおよびAMVNを用いてそれぞれ細胞外および細胞膜疎水性部分から酸化ストレスを誘導した実験で、CoQ₉過剰細胞ではAAPHおよびAMVN添加後の過酸化脂質量および細胞内GSH量減少の抑制と、経時的なCoQ₉H₂の減少および相補的なCoQ₉の増加が認められたことから、細胞膜内外双方から誘導される酸化ストレスに抵抗性を示すことが明らかになった。CoQ₁₀を主な同族体として有するヒト細胞において酸化ストレス誘導後に内在性CoQ₁₀H₂の減少を認めなかったことから、外来性CoQ₉が細胞内で還元されCoQ₉H₂となり強力な抗酸化作用を発揮した結果、CoQ₁₀H₂の減少が節約されたものと考えられた。

結 論

外来性CoQ₉はその強力な抗酸化作用によって脂質過酸化抑制および細胞内GSH減少の抑制を介し、フリーラジカル誘導ヒト肝細胞障害を防御することが示された。