

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	浅 間 俊 之
学 位 論 文 題 目 <b>Polaprezinc prevents ongoing thioacetamide-induced liver fibrosis in rats</b> (polaprezincはthioacetamide投与による肝硬変ラットモデルにおいて、 進行中の肝線維化を抑制する)			
共 著 者 名 河野透、千里直之、海老澤良昭、岡山大志、今井浩二、 唐崎秀則、古川博之、米田政志			
Life Sciences		DOI:10.1016/j.lfs.2011.10.022	
研 究 目 的			
<p>慢性肝炎は、肝障害が継続することで線維化が促進し肝硬変に至る。この線維化を抑制することが临床上重要となる。肝硬変患者では、線維化の程度と相関して亜鉛欠乏が生じやすく、亜鉛が肝線維化のプロセスに重要な働きをしていると考えられている。亜鉛はcollagenaseの必須金属補酵素であるだけでなく、抗酸化作用をもつ重要な微量元素の一つである。polaprezinc (N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc) は、亜鉛とL-carnosineの錯体構造をもち、胃潰瘍の治療に用いられているが、近年、肝硬変患者の亜鉛補給に臨床応用されており、後ろ向き試験で線維化抑制効果が報告されている。本研究では、thioacetamide (以下TAA) 投与で作成した肝硬変ラットモデルにおいて、polaprezincによる慢性肝炎から始まる肝線維化抑制効果について検討した。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p>肝線維症モデルには生後5週の雄性Wistarラットを用い、既報に従いTAA 300mg/L含有飲料水を20週間投与する肝線維化モデルを作成した。慢性肝炎化が始まるTAA投与10週後から polaprezinc 50mg/kg/day:zinc 11.3mg(以下 polaprezinc50mg 投与群)、200mg/kg/day:zinc 45.2mg(以下polaprezinc200mg投与群)を各々粉末餌として併用投与し、TAA投与20週で犠牲死させた。比較対照のため、硫酸亜鉛 112mg/kg/day:zinc 45.2mg、亜鉛-L-アスパラギン酸錯体(zinc 45.2mg) (以下アスパラギン酸錯体投与群)、L-carnosine 115mg/kg/dayのみを、それぞれ同時投与したモデルも作成した。また、TAAを投与せずpolaprezinc 500mg/kg/dayを投与したモデルも作成した。</p>			

※用紙の大きさは、A4判とし、23×17cmの枠内におさめ、ワープロ等で印字すること。

※用紙は、各自で作成すること。

ラット各群からは血液及び肝組織を採取した。血液は血清学的検査をおこない、肝組織は亜鉛含有量を測定した。病理組織学的にはシリウスレッド染色と肝星状細胞(HSC)染色を行いその程度を確認、シリウスレッド染色部位の割合を測定、ならびにHSC活性化の指標として $\alpha$ -smooth muscle actin(SMA)染色部位の割合を測定し、肝線維化の程度を組織学的に評価した。

さらに肝線維化の指標としてhydroxyproline(HP)含有量、TGF- $\beta$ 1蛋白量、matrix metalloproteinase(MMP)活性、tissue inhibitor of MMP-1(TIMP-1)を測定した。さらに酸化ストレスの指標として、lipid peroxide (LPO)、superoxide dismutase (SOD)活性、還元型グルタチオン (GSH) を測定した。

## 成 績

- ・ 正常ラットの体重増加と比較すると、すべてのTAA投与群で体重増加の抑制がみられたが、polaprezinc200mg投与群とアスパラギン酸錯体投与群では体重減少が抑制された。
- ・ 肝亜鉛濃度は、TAA投与10週で正常ラットよりやや低下し、TAA投与20週でさらに低下した。polaprezinc200mg投与群とアスパラギン酸錯体投与群では、TAAを10週間投与された群とほぼ同等の値を示した。
- ・ 組織学的な肝線維化のマーカーは、全てTAA投与期間と相関して高値を示したが、これらはpolaprezinc200mg併用投与によって有意に抑制された。
- ・ 肝HP、MMP2、TIMP-1は、TAA投与10週後に高値となり、TAA投与20週ではさらに高い値を示した。しかし、polaprezinc200mg併用投与によって、これらはTAA投与10週とほぼ同等の値にとどまっていた。また、TGF- $\beta$ 1蛋白量は、polaprezinc200mg投与群で最も低かった。
- ・ TAA投与とともに、LPOは増加し、GSHやSOD活性は低下した。polaprezinc200mg投与群においてはコントロール群と同等であり、アスパラギン酸錯体投与群ではGSHのみがTAA投与20週群よりもやや高い値を示していた。polaprezinc50mg投与群や硫酸亜鉛投与群、L-carnosine併用投与群はTAA投与20週モデルと差がなかった。

## 考 案

polaprezincは約22.4%の亜鉛と77.6%のL-carnosineから成る錯体である。錯体構造は亜鉛吸収率を高めると報告されているが、polaprezincとアスパラギン酸錯体の亜鉛吸収率は同等であった。しかし、polaprezincは、アスパラギン酸錯体よりもより強い抗線維化効果をもたらすことが明らかとなった。またTAAとL-carnosineの併用投与では抗線維化効果が認められなかったことから、L-carnosineが亜鉛錯体を形成していることが抗線維化作用に大きく寄与していると考えられる。

SMAはHSC活性化のマーカーであり、活性化されたHSCsはTGF- $\beta$ 1の主な産生源となる。TGF- $\beta$ 1は肝臓において強力なprofibrogenic mediatorsの1つであり、TGF- $\beta$ 1合成を抑えることが抗線維化にとって重要である。polaprezinc200mg投与群ではSMA発現やTGF- $\beta$ 1産生が低下していることから、HSCの活性を抑制していると考えられる。MMP-2は主

に活性化されたHSCsに起因し、MMP-9はKupffer細胞と白血球から産生され線維化の指標として考えられている。TAAの持続投与によってMMP-2, MMP-9は増加していたが、MMP-9活性はpolaprezincを含めいずれの併用薬剤の影響を受けなかった。MMP-2活性は線維化の程度に相関し、polaprezincの抗線維化作用が示唆されたことからpolaprezincのHSC活性を特異的に抑制すると考えられる。

酸化ストレス関連マーカーを比較すると、polaprezinc200投与群で強い抗酸化ストレス作用が確認された。すなわち、polaprezincは肝内で酸化ストレスを軽減することでHSCの活性化を抑制し、抗線維化作用をもたらすものと推測された。

また、polaprezinc 500mg/kg/day (Zn 102mg/kg/day)を10週間にわたり単独投与した安全性試験では薬剤性障害を認めず、慢性肝疾患患者への長期投与が可能であると考えられた。

### 結 論

亜鉛-アミノ酸錯体構造という特色をもつpolaprezincは、持続する肝障害に起因する線維形成に対し、線溶系酵素の金属補酵素である亜鉛の効率的な肝臓への補充と酸化ストレス軽減によって、肝線維化進展を遅延させる可能性がある。




### 引 用 文 献

- 1) Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 209-18
- 2) Stamoulis I, Kouraklis G, Theocharis S. Zinc and the liver : an active interaction. *Dig Dis Sci* 2007;52(7):1595-612
- 3) Salguero Palacios R, Roderfeld M, Hemmann S , et al. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2008;88(11):1192-203

### 参 考 論 文

- 1) Ebisawa Y, Kono T, Asama T. et al. Direct evidence that induced nitric oxide production in hepatocytes prevents liver damage during lipopolysaccharide tolerance in rats. *J Surg Res.* 2004 May 15;118(2):183-9.
- 2) Kono T, Kotani H, Asama T. et al. Protective effect of pretreatment with low-dose lipopolysaccharide on D-galactosamine-induced acute liver failure. *Int J Colorectal Dis.* 2002 Mar;17(2):98-103.
- 3) Kono T, Kashiwade Y, Asama T. et al. Preventive effect of urinary trypsin inhibitor on the development of liver fibrosis in mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011 Nov 1;236(11):1314-21. Epub 2011 Oct 20.
- 4) Kono T, Chisato N, Asama T. et al. Impaired nitric oxide production of the myenteric plexus in colitis detected by a new bioimaging system. *J Surg Res.* 2004 Apr;117(2):329-38.
- 5) Ohara K, Kono T, Asama T. et al. Acetic acid-derived prostaglandin-dependent colonic adaptive cytoprotection is preserved in chronic colitis: role of cyclo-oxygenase. *Int J Colorectal Dis.* 2003 May;18(3):260-6. Epub 2002 Nov 30.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	浅間 俊之
<p>審査委員長 西川 祐司 </p> <p>審査委員 羽田 勝計 </p> <p>審査委員 古川 博之 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Polaprezinc prevents ongoing thioacetamide-induced liver fibrosis in rats (Polaprezinc は thioacetamide 投与による肝硬変ラットモデルにおいて、進行中の肝線維化を抑制する)</p>			
<p>慢性肝傷害による肝線維化は肝硬変をもたらすとともに肝癌の発生を促進する。肝疾患の臨床において、肝線維化を抑制することはきわめて重要であるが、有効な治療薬はほとんどないのが現状である。肝硬変患者では線維化の進行とともに亜鉛欠乏が生じやすいため、亜鉛と L-carnosine の錯体である polaprezinc が亜鉛補給に用いられている。後ろ向き試験において polaprezinc が肝線維化を抑制する可能性が示唆されているが、その効果は線維化の血中バイオマーカーで見出されたものであり、実際の肝組織で線維化が抑制されたかは不明である。また、そのメカニズムについてはまったく検討されていない。</p> <p>申請者は本研究において、動物実験モデルを用いて polaprezinc が肝線維化を抑制することを検証するとともに、その効果に関わるメカニズムのいくつかを明らかにした。実験モデルとしては thioacetamide の長期間投与によるラット肝硬変モデルを用い、polaprezinc および対照薬剤（硫酸亜鉛、亜鉛-L-asparagine 錯体）の効果を比較検討</p>			

した. Thiocetamide 含有飲料水を 10 週間与えた時点 (初期の肝硬変状態) で, polaprezinc の経口投与を開始した. Thioacetamide 投与 20 週後の肝線維化の状態は polaprezinc により著明に改善していることが組織学的, 生化学的検討により明確に証明された. 対照薬剤はほとんど効果を示さず, 亜鉛と L-carnosine の錯体形成が抗線維化作用に重要であることが明らかになった. また, 申請者は polaprezinc の効果が肝星細胞の活性化抑制に基づくことを, 免疫染色, TGF- $\beta$  測定, ゼラチンザイモグラフィなどの手法を用いて証明した. さらに polaprezinc は肝における酸化ストレスを軽減させる効果があることも示し, これが肝星細胞の活性化抑制に関与することを示唆している.

本研究は, polaprezinc による亜鉛補給が肝線維化を抑制するという臨床的知見に実験的な基礎付けを与えるものであり, 今後の亜鉛を用いた肝線維化治療の実現に大きく寄与するものと期待される.

申請者に対して, 各審査委員から論文内容, 関連領域について試問がなされ, これに対して適切な回答が寄せられた.

本審査委員会では慎重な意見交換を行い, 本論文は申請者自身の着眼および努力の積み重ねの結果であり, 肝臓学分野において学術的にも十分に貢献したことを認め, 学位を授与する価値があると結論した.