The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	緑茶カテキン成分と協働因子による肝障害保護に関する研究
Author(s)	加賀谷, 紀貫
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46544
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【11】

氏　　名	加賀谷　紀　貴（かがや　のり　たか）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　１９８７６　号
学位授与年月日	平成 17 年 12 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	**緑茶カテキン成分と協働因子による肝障害保護に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　八木　清仁 （副査） 教　授　田中　慶一　　教　授　松田　敏夫　　教　授　村上　啓寿

論文内容の要旨

肝障害における薬物療法では多剤併用が一般的であり、これが直接的なあるいはアレルギー作用を介した副作用によって肝障害を誘発することがある。肝臓に障害が起きた場合、自覚症状がなかなか現れにくいことがよく知られており、しばしば深刻な症状をもたらす。そこで、より安全な薬物治療を進めるためには肝保護物質の開発が重要な課題となってくる。これは肝疾患の治療においても同様である。これらの観点から、本研究では緑茶カテキンおよび協働因子により、新規で安全な肝保護物質の開発を目指した。

種々の細胞障害において、活性酸素は直接的・間接的に主要な攻撃的役割を果たしている。そこでラジカル攻撃性を有し、細胞に対するネクローシス誘導作用のあるブロモベンゼン（BB）をモデル毒物として用い、カテキンの肝細胞保護効果に関するスクリーニングを行った。実験にはラットより単離した初代培養肝細胞を用い、BB と同時に４種類のカテキンで 24 h 処理を行った。その結果、EGCG および EGCG-3"-OMe が BB 毒性に対して濃度依存的な細胞保護効果を示した。BB は生体内において、CYP による代謝的活性化を受けエポキシドやラジカルなどの高反応性中間体を生じ、細胞ダメージを引き起こすことが知られている。そこで、まず、細胞内 CYP 2E1 の発現に及ぼすカテキンの影響について検討した。しかし、RT-PCR による CYP 2E1 発現量の比較では各条件で相対量に大きな相違は見られなかった。次に、DPPH 法によりカテキンのラジカル捕捉能を測定したところ、EGCG は濃度依存的な活性を示した。以上のことから、カテキンによる細胞保護のメカニズムとして、ラジカルなどの高反応性中間体の捕捉作用が主要な因子であると考えられた。

続いて、アポトーシス誘導作用のあるカビ毒ルブラトキシン B（RB）による肝障害に対するカテキンの効果を検討した。BB 系と同様にしてスクリーニングを行ったところ、EGCG および EGCG-3″-OMe で濃度依存的な保護効果が見られた。また、アポトーシスの指標として caspase-3 活性を測定したところ、カテキンは RB により誘導される caspase-3 の活性化を有意に抑制することが示された。次に、RB の作用によって活性化されるアポトーシス経路を特定することを目的として、DNA マイクロアレイで発現変化が確認された MAPK p38 経路の因子について RT-PCR により発現解析を行った。RB 処理では p38 およびその上流因子の MKK6 が誘導された一方、EGCG との同時処理ではこれらの発現がコントロールレベルにまで抑えられることがわかった。さらに、細胞を p38 阻害剤である SB203580 で前処理した場合、EGCG と同様に RB の毒性が軽減されることがわかった。これらのことから、RB の毒性発現においては p38 経路の活性化が重要であり、さらに EGCG はこの経路の活性化を抑制していることが示された。また、カスパーゼ経路においては RB 処理により caspase-8,9、および caspase-3 の発現が見られた。以上の結果より、肝細

胞におけるRBの毒性誘導においては、p38経路の活性化により何らかのアポトーシス作用性のサイトカインの発現が促され、それらのサイトカインが細胞にオートクリン的に作用することによってアポトーシスが誘導されていると考えられた。

続いて、これまで検討した緑茶カテキンの肝保護効果を重金属により修飾することを試みた。ある種のカテキンは金属に対して錯体形成を起こすことが知られており、これまで重金属によるポリフェノール類の生理活性の修飾が種々報告されている。初めに、金属によりEGCGの肝保護効果が増強されるかBBモデルを用いて検討した。保護効果のないEGCG濃度において3種類の金属と等濃度混合溶液を調製したところ、亜鉛に有意な効果増強が確認された。一方、亜鉛単独では保護効果はなかった。また、EGCG濃度を一定にし、それに対する亜鉛の添加比を変化させると、両者の比率が0.57まで用量依存的に効果が増強された。この結果より、亜鉛とEGCGは量論比1：2の錯体を形成しており、この錯体形成が保護効果増強に重要であることが示唆された。亜鉛による効果増強のメカニズムを検討するために、錯体のRedox特性をサイクリックボルタンメトリーで評価したが明らかな変化は見られなかった。そのため効果増強の可能性としては、EGCGが亜鉛と錯体形成することによって代謝や自動酸化による消費が阻害されること、あるいは錯体形成が作用点における濃度を高めたり受容体の感受性を増大させることが理由として考えられる。

続いて、上述した肝保護効果に重要と考えられる亜鉛に着目し、これにYoshikawaらの方法を用いて脂質親和性・膜透過性を高める効果が知られているマルトールリガンドを配位させた合成亜鉛錯体 $Zn(Mal)_2$ を調製しその効果を検討した。初めに $Zn(Mal)_2$ のBB毒性に対する細胞保護効果を測定した。その結果、$Zn(Mal)_2$ は特定濃度範囲において細胞保護効果を示し、同時にラジカル消去能も有することがわかった。続いて、*in vivo*におけるconA肝障害モデルへの適用を試みた。conAは免疫系を刺激し、種々のサイトカインを介した肝障害を誘導することが知られている。そのため、先ずconAの本作用に対する $Zn(Mal)_2$ の働きを細胞レベルで検討するために、*in vitro*においてマウス脾細胞を用いた実験系を作製した。実験の結果、$Zn(Mal)_2$ はconAの作用による脾細胞の凝集を抑制し、さらに濃度依存的に脾細胞からのサイトカイン放出を抑制した。この結果を受けて*in vivo*におけるマウスconA肝障害モデルに対し、conA投与の2h前に $Zn(Mal)_2$ を予めi.p.投与した。12、24h後に血清トランスアミナーゼ活性を測定した結果、$Zn(Mal)_2$ により活性の上昇が抑制されることがわかった。

論文審査の結果の要旨

本論文では緑茶カテキンの成分Epigallocatechin-3-gallate（EGCG）およびEpigallocatechin-3-(3-O-methyl) gallateが、ネクローシスおよびアポトーシス誘導性の細胞毒性に対して肝細胞保護効果を有することを示し、また、カビ毒ルブラトキシンBがMAPK p38経路で肝細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした上で、カテキンがp38を含む経路のシグナル伝達を阻害し、アポトーシスを抑制することを明らかとした。さらにEGCGの肝保護効果は亜鉛の添加によって増強することを見出した。亜鉛自体に保護効果はないことから錯体形成が効果を増強する上で重要な因子であると考えられた。同様に本論文においてマルトールを配位した亜鉛錯体 $Zn(Mal)_2$ が、*in vitro*および*in vivo*における肝障害モデルに対して肝保護効果を示した。$Zn(Mal)_2$ は多岐にわたる生理活性を持ち合せていることが示され、それらが複合的に作用し肝臓保護効果を発揮していることを明らかとした。現在肝臓病に対して有効な治療法が限られており、カテキンおよびマルトールなど、本研究で明らかとなった肝保護効果を有する物質が有望な肝臓病薬として用いられることが大いに期待できると考えている。したがって本論文で示した結果は博士（薬学）の学位論文として相応しい成果であると判断する。