

亜鉛欠乏によって誘導される肝線維化のメカニズム

大阪市立大学大学院生活科学研究科栄養機能科学分野 湯浅(小島)明子

要旨

近年、肝硬変患者における血清亜鉛濃度は健常者に比べて低値を示すことが報告されており、亜鉛と肝硬変の病態形成との関連性が示唆されているが、そのメカニズムははまだ明らかにされていない。そこで、亜鉛欠乏によって誘導される肝線維化のメカニズムについて、*in vitro* ならびに *in vivo* 実験系を用いて検討した。その結果、肝線維化・肝硬変の形成に重要な役割を示す肝星細胞は、亜鉛欠乏によってコラーゲン合成能を亢進させること、またそのメカニズムとして、NADPH oxidase による活性酸素種産生量が上昇することによって細胞内グルタチオン量を一過性に低下させ、このことがトリガーとなってコラーゲン合成能が亢進することが明らかとなった。一方、四塩化炭素 (CCl₄) 投与による薬剤性肝障害モデルラットを用いて亜鉛欠乏食の肝障害に対する感受性について検討したところ、コントロール食を摂食した場合には肝障害が認められない低濃度の CCl₄ を投与しても、亜鉛欠乏食の場合では肝線維化を発症したことから、亜鉛欠乏食は肝障害に対する感受性を促進させることが明らかとなった。

これらのことから、亜鉛摂取は肝線維化の予防に重要であることが示唆された。

亜鉛は細胞の生理活性や細胞増殖などにおいて非常に重要な必須微量栄養素であり¹⁾、抗酸化作用による免疫調節作用や細胞保護効果、抗炎症作用など重要な役割を示す²⁾。

近年、肝硬変患者における血清亜鉛濃度は健常者に比べて低値を示すことが報告されている^{3,4)}。また、我々は分離肝細胞を亜鉛欠乏状態で培養するとアポトーシス細胞死が誘導されることを明らかにしている⁵⁾。一方、四塩化炭素による実験的肝硬変モデルラットに亜鉛を投与すると肝障害や脂質過酸化が抑制されること^{6,7)}が報告されている。

これらのことから、亜鉛と肝硬変の病態形成との関連性が示唆されているが、そのメカニズムははまだ明らかにされていない。

肝類洞壁細胞の一つである肝星細胞は、通常ビタミン A を豊富に含む脂肪滴を有する細胞であ

るが、種々の病的刺激によって活性化し、コラーゲン線維などの細胞外マトリックスを多量に産生する筋線維芽細胞様に形質変換する^{8,9)}。このことから、肝星細胞の活性化は肝線維化さらには肝硬変の原因となることが知られている (図 1)。

ここでは、亜鉛欠乏によって誘導される肝線維化のメカニズムについて、*in vitro* ならびに *in vivo* 実験系を用いて検討した結果を紹介する。

1. *In vitro* 実験系—亜鉛欠乏によって誘導される肝星細胞の活性化メカニズムについて

分離肝星細胞は 13-14 週齢の Wister 系雄性ラットの肝臓をプロナーゼ、コラゲナーゼ液で灌流した後、Nycodenz 溶液を用いた密度勾配遠心法によって得た¹⁰⁾。亜鉛のキレート剤として細胞膜非透過性の diethylenetriamine penta-acetic acid

Normal liver

Liver fibrosis

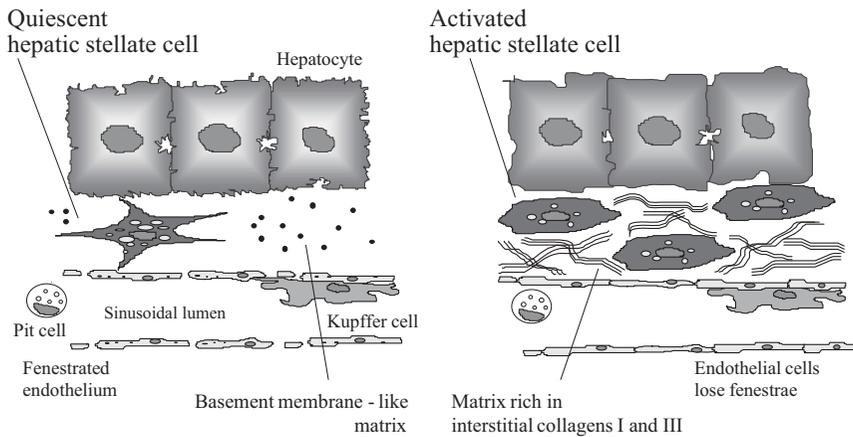


図 1 Activation of hepatic stellate cells

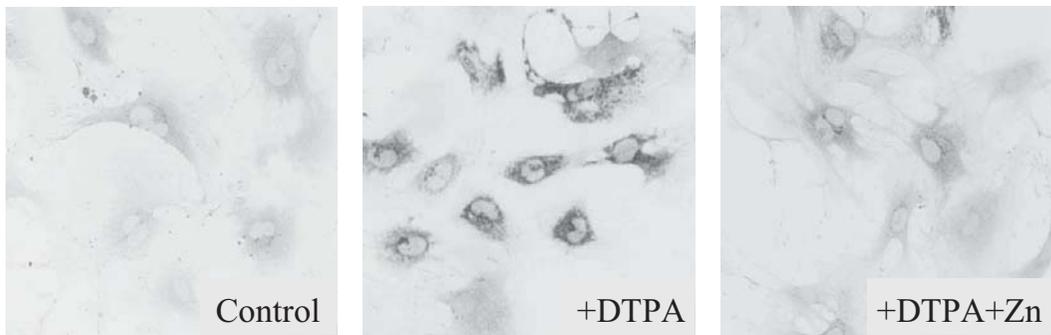


図 2 Effect of zinc deficiency on the expression of type I collagen in hepatic stellate cells
Microphotographs of immunohistochemical staining for type I collagen (original magnification: x200).

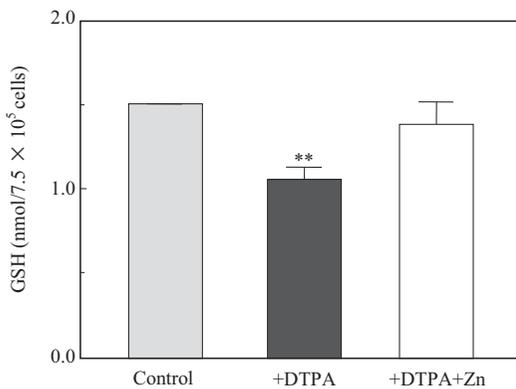


図 3 Effect of zinc deficiency on intracellular GSH
Each bar is the mean ± SD of three experiments
(*: $p < 0.05$ with control cells).

(DTPA) を添加して 24 時間培養したところ、タイプ I コラーゲン (Co I) 合成能はコントロールに比べて有意に亢進したが、亜鉛を再添加すると Co I 合成能はコントロールレベルにまで低下した (図 2)。さらに、亜鉛欠乏によって誘導される肝星細胞の活性化メカニズムについて検討するため、細胞の酸化還元を調節する細胞内グルタチオン (GSH) 量^{11, 12)} の挙動を調べたところ、肝星細胞内の GSH 量は、培養開始後 8 時間で亜鉛欠乏群において有意に低下したが、亜鉛を再添加することによってコントロールレベルにまで回復した (図 3)。

そこで、亜鉛欠乏による細胞内 GSH 量の低下

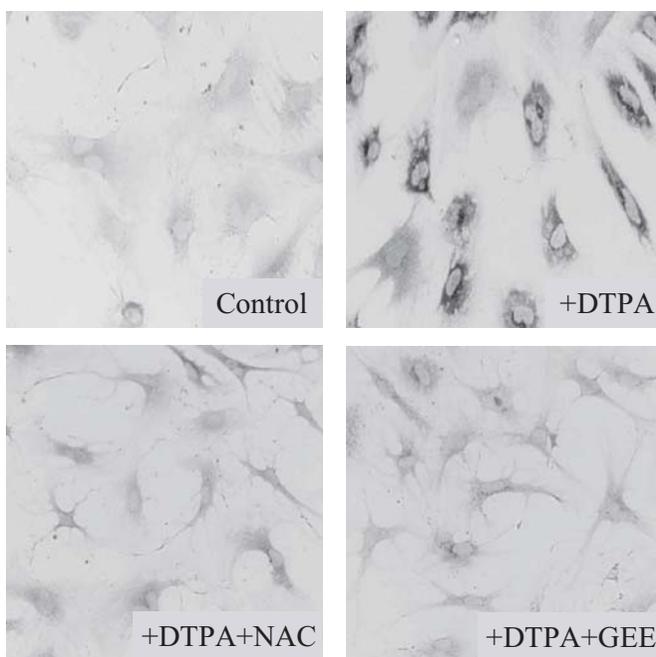


図4 Effect of NAC or GEE on zinc deficiency-induced expression of type I collagen in hepatic stellate cells
Microphotographs of immunohistochemical staining for type I collagen (original magnification: x 200).

が肝星細胞の活性化に関与することを確かめるために、GSHの前駆体であるN-acetylcysteine (NAC) またはGSHのエステル型であるglutathione ethyl ester (GEE)をDTPAと同時に添加することによってDTPAによって低下した細胞内GSH量を回復させると、亜鉛欠乏によって顕著に亢進した肝星細胞のCo I合成能は、コントロールレベルにまで抑制された(図4)。

GSHは活性酸素種(ROS)の除去に重要な役

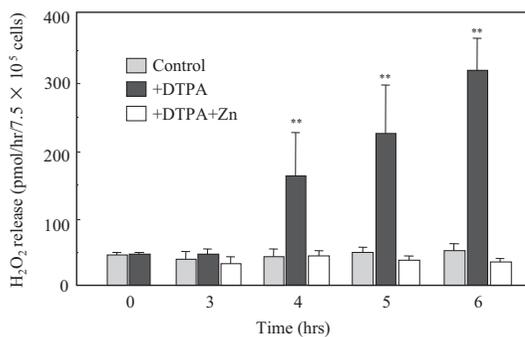


図5 Effect of zinc deficiency on H₂O₂ release
Each bar is the mean ± SD of three experiments
(*: p < 0.05 with control cells at the same time point).

割を示すことから、亜鉛欠乏によって誘導される細胞内GSH量の低下には酸化ストレスが関与していることが示唆されるため、H₂O₂産生量を測定したところ、亜鉛欠乏によって肝星細胞のH₂O₂産生量は時間依存的に顕著に増加した。しかしながら、亜鉛添加群ではコントロールレベルを維持したままであった(図5)。次に、亜鉛欠乏によって産生されたH₂O₂産生にはどの酸化酵素が関与しているのかを明らかにするために、ROS産生に関与する酸化酵素であるNADPH oxidase, mitochondrial oxidaseおよびxanthine oxidaseの阻害剤を用いてH₂O₂産生量の変化を検討したところ、亜鉛欠乏によって過剰に産生されたH₂O₂量はNADPH oxidaseの阻害剤であるdiphenyl iodonium (DPI)を添加することによって顕著に低下した(表1)。しかし、mitochondrial oxidaseの阻害剤であるrotenoneやxanthine oxidaseの阻害剤であるallopurinolを添加してもH₂O₂産生量の抑制効果は認められなかった。また、この時、亜鉛欠乏によって増強したCo I合成能は、DPIを添加することによって顕著に抑制

表 1 Effect of inhibitors of oxidases on zinc deficiency-induced H₂O₂ release

Groups	H ₂ O ₂ release (pmol/hr/7.5 x 10 ⁵ cells)
Control	86.7±26.8 ^a
+DTPA	379.7±92.6 ^b
+DTPA+DPI	149.5±26.9 ^a
+DTPA+rotenone	484.5±140.1 ^b
+DTPA+allopurinol	294.6±99.3 ^b

Values are mean ± SD of three experiments. Data not sharing common alphabet are significantly different (p < 0.05).

されたが rotenone や allopurinol を添加しても Co I 合成能は抑制されなかった。

肝星細胞の活性化メカニズムには多くのサイトカインが関与することが知られている⁹⁾。その中でも特に、TGF-β は細胞外マトリックスの産生を促進することから、肝星細胞の活性化に重要な役割を示すことがすでに明らかにされている^{13, 14)}。そこで、培養液中に遊離した TGF-β 量を経時的に測定したところ、DTPA を添加することによって TGF-β 産生量は経時的有意に増加したが、亜鉛を添加することによってコントロールレベルを維持した (図 6)。

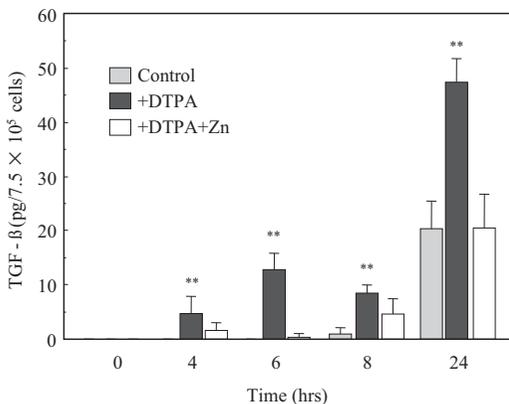


図 6 Time-dependent effect of zinc deficiency on TGF-β production

Each bar is the mean ± SD of three experiments (**; p < 0.05 with control cells at the same time point).

2. In vivo 実験系—薬剤性肝障害モデルラットを用いた亜鉛欠乏食の肝障害に対する感受性について

薬剤性肝障害モデルラットの作製には、Wistar 系雄性ラットに低濃度の四塩化炭素 (CCl₄) (0.125 または 0.25mL/kg BW) をオリーブオイルと 1 : 1 の割合で混合して、週 2 回ずつ腹腔内に投与した。飼料には Research Diets 社製のコントロール食 (亜鉛含量 : 30ppm) または亜鉛欠乏食 (亜鉛含量 : 0.85ppm) を用いて 3 週間飼育した。肝障害の指標である血漿中の逸脱酵素 (LDH, ALT および AST) 活性は、食事中亜鉛含量の違いによって変化しなかった。しかしながら、低濃度の CCl₄ を投与したコントロール食群では、逸脱酵素の値は CCl₄ 無投与群と差が認められなかったのにもかかわらず、低濃度の CCl₄ を投与した亜鉛欠乏食群では有意に高値を示した (図 7)。同様に、肝臓の組織染色においても、低濃度の CCl₄ を投与したコントロール食群では、肝障害はほとんど認められなかったが、低濃度の

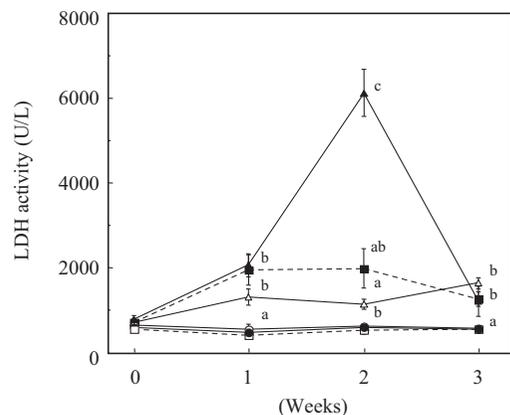


図 7 Effect of diet and CCl₄ on plasma LDH activity

Values represent the mean ± SEM of 5-7 rats. Data points not sharing a common letter are significantly different (p < 0.05).

○ : Control diet, □ : Control diet + CCl₄ (0.125 mL/kg BW), △ : Control diet + CCl₄ (0.25 mL/kg BW), ● : Zn-deficient diet, ■ : Zn-deficient diet + CCl₄ (0.125 mL/kg BW), ▲ : Zn-deficient diet + CCl₄ (0.25 mL/kg BW).

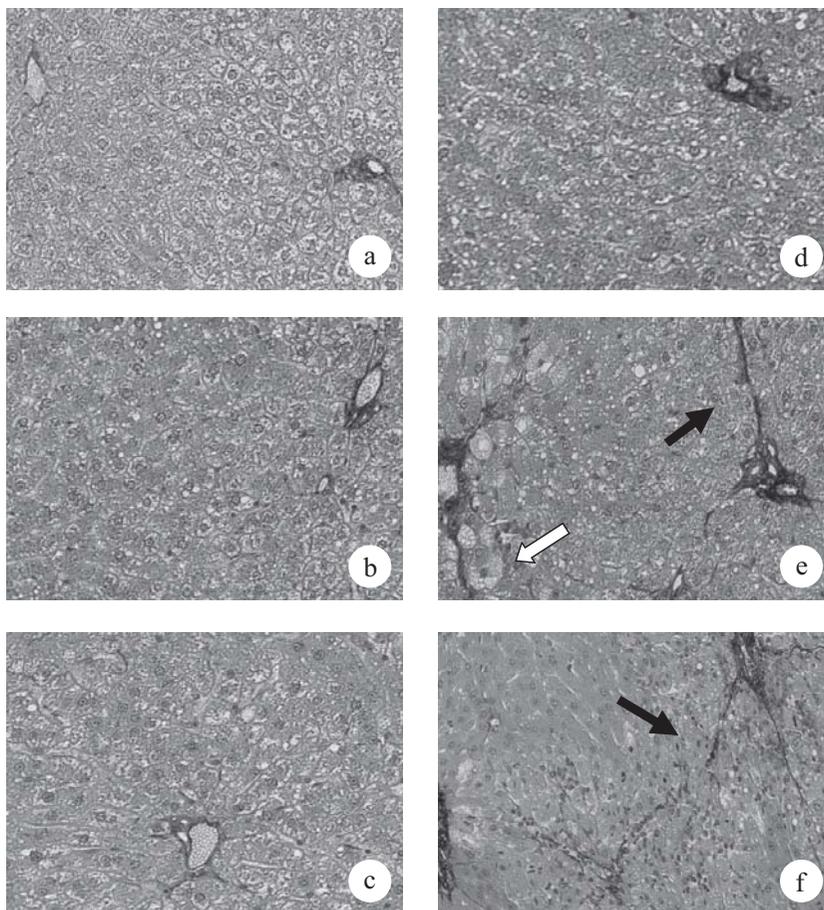


図8 Effect of diet and CCl_4 on morphological changes of the liver

Liver sections were stained by Weigert's elastic van Gieson staining.

(a) ; Control diet, (b) ; Control diet+ CCl_4 (0.125 mL/kg BW), (c) ; Control diet+ CCl_4 (0.25 mL/kg BW), (d) ; Zn-deficient diet, (e) ; Zn-deficient diet+ CCl_4 (0.125 mL/kg BW), (f) ; Zn-deficient diet+ CCl_4 (0.25 mL/kg BW). Significant hepatic necrosis (open arrow) is seen in (e), and fibrosis (arrow) is seen in (e) and (f).

CCl_4 を投与した亜鉛欠乏食群では、肝線維化を発症していた (図8)。

まとめ

In vitro 実験系において、亜鉛欠乏による肝星細胞の活性化メカニズムとして、NADPH oxidase 活性が亢進することによって ROS の急激な産生増加が生じ、それとともに細胞内

GSH 量が低下することによって、コラーゲン合成能の亢進が誘導されたことが示唆された。さらに、*in vivo* 実験系において、亜鉛欠乏食は、コントロール食を摂食した場合には肝障害が認められない低濃度の CCl_4 を投与しても肝線維化が発症したことから、肝障害に対する感受性を促進させることが示唆された。これらのことから、亜鉛は肝線維化の予防に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

◆文 献

- 1) MacDonald RS : The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutri* 130 : 1500S-1508S, 2000
- 2) Zalewski PD, Truong-Tran AQ, Grosser D, Jayaram L, Murgia C, Ruffin RE : Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation : basic mechanisms and clinical targets. A review. *Rharmacol Ther* 105 : 127-149, 2005
- 3) Bode JC, Hanisch P, Henning H, Koenig W, Richter FW, Bode C : Hepatic zinc content in patients with various stages of alcoholic liver disease and in patients with chronic active and chronic persistent hepatitis. *Hepatology* 8 : 1605-1609, 1988
- 4) RodriguezMoreno F, GonzalezReimers E, SantolariaFernandez F, GalindoMartin L, HernandezTorres O, BatistaLopez N, MolinaPerez M : Zinc, copper, manganese, and iron in chronic alcoholic liver disease. *Alcohol* 14 : 39-44, 1997
- 5) Nakatani T, Tawaramoto M, Kennedy DO, Kojima A, Matsui-Yuasa I : Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. *Chem-Biol Interact* 125 : 151-163, 2000
- 6) Chvapil M, Ryan JN, Elias SL, Peng YM : Protective effect of zinc on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Exp Mol Pathol* 19 : 186-196, 1973
- 7) Camps J, Bargallo T, Gimenez A, Alie S, Caballeria J, Pares A, Joven J, Masana L, Rodes J : Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride-treated rats : effect of zinc administration. *Clin Sci* 83 : 695-700, 1992
- 8) Friedman SL : Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275 : 2247-2250, 2000
- 9) Friedman SL : Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 19 : 129-140, 1999
- 10) Kojima-Yuasa A, Ohkita T, Yukami K, Ichikawa H, Takami N, Nakatani T, Kennedy DO, Nishiguchi S, Matsui-Yuasa I : Involvement of intracellular glutathione in zinc deficiency-induced activation of hepatic stellate cells. *Chemico-Biol Interact* 146 : 89-99, 2003
- 11) Young IS, Woodside JV : Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54 : 176-186, 2001
- 12) Hoshi T, Heinemann S : Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* 531 : 1-11, 2001
- 13) Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA : The role of TGF beta 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 30 : 77-87, 1999
- 14) Castilla A, Prieto J, Fausto N : Transforming growth factor beta 1 and alpha in chronic liver disease : effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med* 324 : 933-940, 1991