

# 総説

## 亜鉛と消化管

### ～熱ショックタンパク質 (HSPs) の解析から～

京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学 内藤裕二

#### 要約

亜鉛は、亜鉛含有酵素の活性化、皮膚代謝、成長・発育、ホルモン、感覚機能などの機能活性化に重要である。なかでも、亜鉛は各種酵素の構成成分、つまり金属酵素として存在しており、生体の維持に欠かせない多くの酵素において、酵素蛋白質の特定の部位と結合し、活性の中心をなしている。インドメタシンやアスピリンなどの薬剤による消化管粘膜障害を予防することは極めて重要な臨床的課題である。亜鉛製剤はすでに抗胃潰瘍薬として臨床応用されているが、薬剤による消化管粘膜傷害、細胞死を著明に抑制し、その分子機構に熱ショックタンパク質 (HSP) が関与する可能性も示されているため、今後の臨床応用が期待されている。

#### はじめに

亜鉛は人体にも微量ながら含まれており、鉄や銅などとともに生体内必須微量元素と呼ばれている。その多くは食品として摂取されており、牡蠣、卵黄、牛肉、アーモンド、抹茶などに多く含まれている。従来亜鉛欠乏は稀と考えられてきたが、最近になって、味覚障害に限らず多くの不定愁訴の原因に亜鉛欠乏が関与している可能性が報告され始めている。明らかな亜鉛欠乏症ではないものの、潜在的亜鉛欠乏症 (marginal zinc deficiency) の状態にあると考えられる人は比較的多いとされている。生体における亜鉛の役割としては、亜鉛含有酵素の活性化、皮膚代謝、成長・発育、ホルモン、感覚機能などへの影響が考えられる。なかでも、亜鉛は各種酵素の構成成分、つまり金属酵素として存在しており、生体の維持に欠かせない多くの酵素において、酵素蛋白質の特定の部位と結合し、活性の中心をなしている。消化管粘膜損傷の治療においても亜鉛は重要な役割を果たしており、すでに臨床においては亜鉛製剤 (ポラプレジンク®) が抗潰瘍薬として臨床応用されている。

本稿では、潰瘍治療ならびに非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) による粘膜障害における亜鉛の役割、NSAID による小腸粘膜上皮細胞死の分子機構とその亜鉛による抑制、ならびに熱ショックタンパク質 (HSPs) の解析から見えてきた分子機構などについて紹介した。

#### 1. 潰瘍治療と亜鉛

皮膚における潰瘍治療と亜鉛の意義については多くの研究が行われている<sup>1)</sup>。

まず、細胞分裂に関与する RNA ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼが亜鉛含有酵素で、新陳代謝に関係している。皮膚にある CuZn-superoxide dismutase (SOD) も亜鉛の存在が活性に重要である。SOD は活性酸素であるスーパーオキシドを除去する酵素で、炎症を抑えたり、老化を防いだりする大切なものである。性ホルモンも亜鉛により活性化されるので、皮膚の艶などに関与する。亜鉛が不足すると、表皮が肥厚 (厚くなり) 錯角化 (かさかさ) し、肌の色はくすんでくることが臨床的に知られており、以前からニキビ、乾癬、

難治性潰瘍などに亜鉛治療をして効果があるとされ、亜鉛含有軟膏薬が臨床応用されてきた。

皮膚潰瘍における亜鉛の作用機序の分子機構についてもいくつかの知見が得られている。その基本的作用機構は、創傷部位の debris の分解促進と上皮化 epithelialization の促進作用によるとされている。創傷部位の debris の分解促進作用には matrix metalloproteinase (MMP) 活性化の関与が大きい。MMP は亜鉛依存性の金属プロテアーゼであり、collagenase, stromelysin, genatinase などに分類される。なかでも MMP-1(collagenase) は皮膚損傷後早期に MMP-1 mRNA 発現が線維芽細胞に発現し、早期の潰瘍治癒に関与することが見いだされてきている。一方、亜鉛による上皮化 epithelialization の促進作用に関しては、内因性の成長因子の発現亢進を介していることが明らかになりつつある。特に、insulin-like growth factor-1 は上皮化の促進作用があり、亜鉛による発現増強作用がある。血小板由来成長因子の関与も指摘されている。

胃潰瘍治癒における亜鉛の影響についても報告がある。会田ら<sup>2)</sup>は、20%酢酸溶液 50 $\mu$ l をラット腺胃部前壁漿膜下に局注して潰瘍を作成し、一方には通常亜鉛飼料を、他方には低亜鉛飼料を与え、潰瘍治癒への影響をみた。その結果、低亜鉛

飼料群では通常亜鉛飼料群にくらべ、酢酸注入後 14 日および 21 日目において有意に損傷係数が高く、治癒の遅延が認められた。Watanabe ら<sup>3)</sup>も同様に酢酸胃潰瘍モデルで亜鉛欠乏ラットにおける潰瘍治癒遅延作用を報告し、その作用機序として胃粘膜上皮細胞増殖の低下が関与するとしている。

## 2. 亜鉛と活性酸素消去

亜鉛と胃潰瘍治癒に関連が示唆されたため、亜鉛製剤を抗潰瘍薬として開発しようとする取り組みの中で、亜鉛と L-カルノシンとのキレート化合物ポラプレジンクが候補となった。ポラプレジンクには、種々の実験潰瘍モデルを用いた検討において強力な潰瘍阻止効果が認められた。この強力な抗潰瘍作用は、胃酸分泌抑制作用によるものではなく、プロスタグランジン合成酵素阻害剤の併用によっても消失しないことが確認されたため、本剤の強力な活性酸素消去作用、脂質過酸化抑制作用による可能性が指摘されている<sup>4)</sup>。

磁気共鳴スピン捕捉法によりスーパーオキシド消去活性を検討した結果<sup>4)</sup>、L-carnosine や硫酸亜鉛には消去作用は認められないが、そのキレート化合物ポラプレジンクは濃度依存性にその消去

表 1 ポラプレジンクの抗酸化作用

	Polaprezinc	ZnSO4	L-Carnosine
スーパーオキシド消去	(+)	(-)	(-)
ヒドロキシルラジカル消去	(+)	(+)	(-)
一重項酸素消去	(+)	(-)	(-)
好中球活性酸素産生抑制			
PMA刺激	(-)	(-)	(-)
オプソニン化ザイモザン刺激	(+)	(+)	(-)
脂質過酸化抑制	(+)	(+)	(-)
フェロキシダーゼ活性	(-)	(-)	(+)
胃粘膜上皮IL-8産生抑制	(+)	(+)	(-)

作用が増強していた。硫酸亜鉛には、ヒドロキシルラジカル消去作用、好中球活性化抑制作用、脂質過酸化抑制作用、胃粘膜上皮インターロイキン8産生抑制作用などが認められ、それらの抗酸化作用はポラプレジンクにも同様に観察された(表1)。さらに、ヘリコバクター・ピロリ菌抽出液により刺激された好中球の血管内皮細胞への接着反応に対する影響を検討した結果、ポラプレジンク、硫酸亜鉛は濃度依存性にその接着反応を抑制していた<sup>5)</sup>。このように、ポラプレジンクの強力な抗酸化作用は亜鉛そのものに由来するものと、L-カルノシンとのキレート化合物によるものがあり、それらが総合的に作用し、in vivo、ヒト臨床における強力な抗潰瘍作用につながっているものと考えられた。

### 3. NSAIDs 消化管粘膜傷害に対する対策

インドメタシンやアスピリンによる胃や小腸の粘膜障害を予防することは極めて重要な臨床的課題である。NSAIDsによる粘膜障害の成因として、プロスタグランジン(PG)の低下による粘膜血流低下と、接着分子の発現を介しての好中球の活性化の関与が重要視されてきた。このNSAIDsによる消化管合併症の予防として本邦では多くの粘膜防御系薬剤が使用されているが、その有効性が証明されている薬剤は少ない。われわれは、アスピリンによる胃粘膜傷害の成因に活性酸素、好中球活性化の関与を報告してきたが、強力な抗酸化作用を有するポラプレジンクについてもin vivoモデルを用いて評価した。その結果、ポラプレジンクは濃度依存性にアスピリンによる胃粘膜傷害を抑制し、胃粘膜で増加する脂質過酸化物質や好中球浸潤を有意に抑制していた<sup>6)</sup>。さらに急性炎症反応の惹起に重要であるtumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )のmRNA発現、粘膜内蛋白レベルをポラプレジンクは有意に抑制しており、本剤の抗炎症作用がアスピリンにより惹起される胃粘膜傷害の抑制作用に密接に関与しているものと考えられた。

近年、NSAIDsによる消化管傷害は胃粘膜だけに限らず、小腸、大腸など広く全消化管に見られることが明らかとなってきている。カプセル内視鏡やダブルバルーン内視鏡の臨床応用によりそれら病変がより多く発見されるようになってきている。胃酸の存在しない小腸、大腸においてNSAIDsによる消化管障害の予防対策を構築する必要があり、ポラプレジンクのような粘膜防御系薬剤の有用性についても再評価する必要があると考えている。われわれは、培養粘膜上皮細胞(RIE細胞)を用いてNSAIDsによる細胞障害の基礎検討を進めており、最近興味ある知見を得ているため紹介する。

### 4. NSAIDsによる細胞障害とHSPs

ラット胃粘膜上皮細胞(RGM1細胞)、ラット小腸粘膜上皮細胞(RIE細胞)にインドメタシンアスピリンなどのNSAIDsを処理すると薬剤の濃度、時間依存性に細胞死が誘導される。この細胞死はプロスタグランジンE2同時処理により抑制出来ないため、COX阻害作用に非依存的な経路によるアポトーシスシグナルの関与が示唆されたため、まずミトコンドリア機能の評価を行った。NSAIDs処理の早期からRGM1、RIE細胞のミトコンドリア由来活性酸素産生が増加し、酸化ストレス軽減作用のあるカタラーゼを同時処理することによりNSAIDsによる細胞死は明らかに抑制されていた<sup>7)</sup>。この結果は、NSAIDsによる粘膜細胞死に活性酸素に由来するアポトーシスが関与する可能性を示しており、抗酸化作用を有する薬剤に細胞保護作用が期待できることを示すものである。この細胞障害モデルを用いてポラプレジンクの効果を検討した結果、明らかに細胞死を抑制し、その作用はカルノシンではなく亜鉛によるものと考えられた。さらに興味深い点は、インドメタシン処理により特定のタンパク質が酸化修飾を受けていることが明らかとなり、ポラプレジンクの処理はこの酸化修飾タンパク質の生成を著明に抑制していた(図1)<sup>8)</sup>。さらに、アスピリン処理後のRIE細胞ではミトコンドリア由来活性酸素が著明

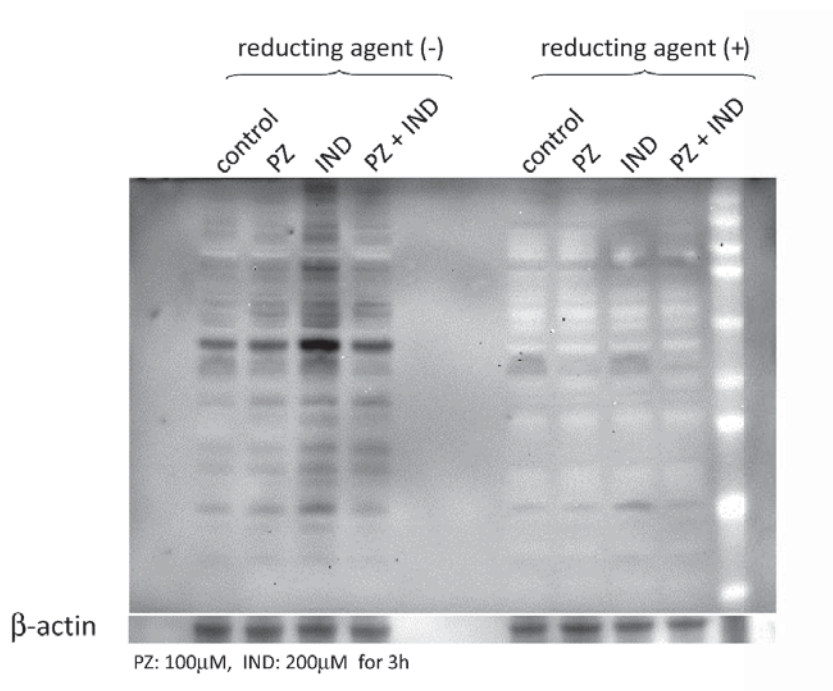


図1 インドメタシン処理は小腸 RIE 細胞に酸化修飾タンパク質を増加させ、亜鉛-カルノシンはその増加を抑制する

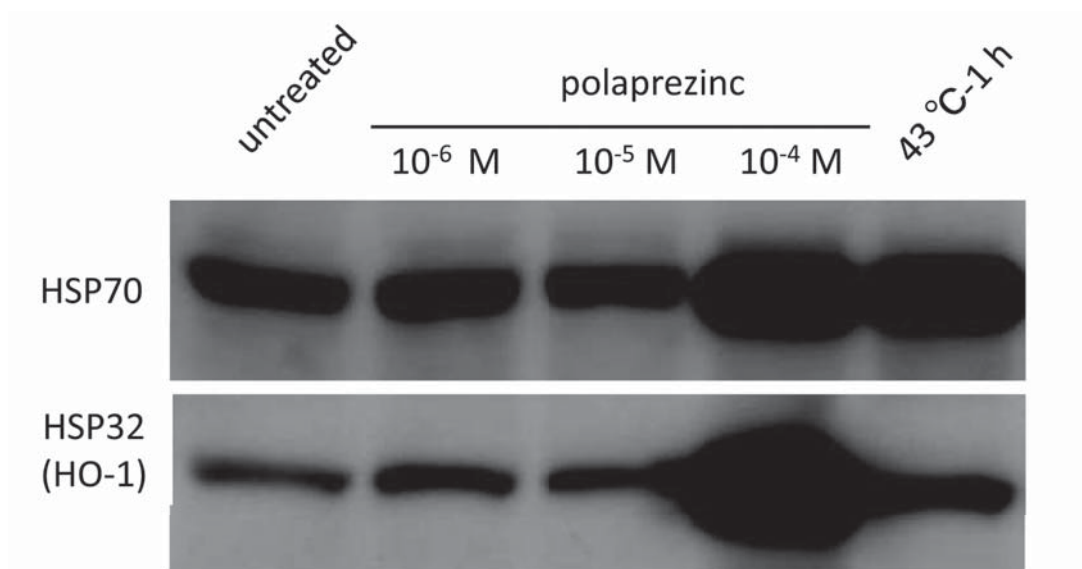


図2 ポラプレジンクは HSP70 および HSP32 (HO-1) の発現を増大させる RIE 細胞をポラプレジンクで 6 時間刺激した後、HSP70 と HSP32 (HO-1) の発現をウエスタンブロッティングにより検出

に増加しているが、ポラプレジンクの前処理はその活性酸素酸性を明らかに抑制していた<sup>9)</sup>。

ポラプレジンクの消化管粘膜傷害、炎症に対する著明な効果を活性酸素消去作用だけで説明することは難しい点があるため、新たな分子機構の研究を進めた。ポラプレジンクの新たな細胞保護作用を検討するために、RIE細胞をポラプレジンクで刺激後誘導されるタンパク質の解析を進めた。その結果、図2に示すようにポラプレジンクによるHSP70、HSP32が著明に誘導されることを明らかにした。HSP70の消化管粘膜における重要性、ポラプレジンクの細胞保護作用との関わりを明らかにするために、HSP70高発現RGM1、HSP70欠損RIE細胞を樹立し、インドメタシンによる細胞障害を評価した。HSP70高発現RGM1はインドメタシン傷害に対して抵抗性を獲得しており<sup>10)</sup>、ポラプレジンクによる細胞保護

作用はHSP70欠損細胞ではキャンセルされた。以上の結果は、ポラプレジンクによる細胞保護作用は亜鉛による作用であり、その少なくとも一部は亜鉛によるHSP70タンパク質の誘導が関わっていることを示すものである。

## おわりに

臨床的には、潜在的亜鉛欠乏症 (marginal zinc deficiency) が話題である。血清亜鉛濃度がどのような疾患のバイオマーカーとなるかについては、いくつかの臨床研究が進行中である。今回、NSAIDsによる消化管粘膜傷害の予防にポラプレジンクの有用性を実験的研究により明らかにしたが、抗酸化作用以外にも興味あるHSP誘導作用も明らかとなりつつあり、今後の臨床応用が期待される薬剤でもある。

## ◆文献

- 1) Lansdown ABG, et al : Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration* 15: 2-16, 2007
- 2) 会田浩幸ほか : *Ulcer Research* 20(2): 127, 1993
- 3) Watanabe T, et al : Zinc deficiency delays gastric ulcer healing in rats. *Dig Dis Sci* 40: 1340-1344, 1995
- 4) Yoshikawa T, et al : The antioxidant properties of a novel zinc-carnosine chelate compound, N-(3-aminopropionyl)- L-histidinato zinc. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 1115: 15-22, 1991
- 5) Handa O, et al : Inhibitory effect of polaprezinc on the inflammatory response to *Helicobacter pylori*. *Can J Gastroenterol* 16: 785-789, 2002
- 6) Naito Y, et al : Effects of polaprezinc on lipid peroxidation, neutrophil accumulation, and TNF- $\alpha$  expression in rats with aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 46: 845-851, 2001
- 7) Omatsu T, Naito Y, et al : Involvement of reactive oxygen species in indomethacin-induced apoptosis of small intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 44: 30-34, 2009
- 8) Omatsu T, Naito Y, et al : Reactive oxygen species-quenching and anti-apoptotic effect of polaprezinc on indomethacin-induced small intestinal epithelial cell injury. *J Gastroenterol* 45: 692-702, 2010
- 9) Qin Y, Naito Y, et al : Heat shock protein 70-dependent protective effect of polaprezinc on acetylsalicylic acid-induced apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *J Clin Biochem Nutr* 49: 174-181, 2011
- 10) Hirata T, Naito Y, et al : Heat-shock protein 70-overexpressing gastric epithelial cells are resistant to indomethacin-induced apoptosis. *Digestion* 79: 243-250, 2009