

インターフェロンと 亜鉛・メタロチオネイン

群馬大学大学院保健学研究科 長嶺竹明

要約

1. C型慢性肝炎のインターフェロン（IFN）治療において、亜鉛併用の有用性を報告してきた。亜鉛はC型肝炎ウイルスmRNA、蛋白発現を抑制するとの研究がある。そこで、U937細胞（ヒト白血病細胞）を用いて、IFN α/β 受容体発現に及ぼす亜鉛の作用を検討した。その結果、亜鉛はIFN受容体mRNA、蛋白を誘導した。またポラプレジン（亜鉛とL-カルノシンの錯体）は、亜鉛単独よりもIFN受容体誘導作用が強かった。
2. 亜鉛、IFNはメタロチオネイン（MT）を誘導するが、肝疾患におけるMTの生理的役割は未だ十分に解明されていない。当教室で開発したMT ELISA測定系は臨床検体（血清や尿など）のMT測定に応用可能であり、各種病態における亜鉛欠乏のスクリーニングに有用であろう。
3. 大気マイクロPIXE法は単一細胞内微量元素分布が測定可能であり、細胞内における亜鉛動態の解明に有用である。我々はHepG2細胞（肝がん細胞）を用いて、IFNで誘導される亜鉛の細胞内分布をマイクロPIXEで測定した。IFNで細胞内へ取り込まれた亜鉛はブロムと一致する局在を認めることから細胞核内への移行が示唆された。

1. インターフェロンの抗ウイルス作用と亜鉛

1. インターフェロン（Interferon）とは？

インターフェロン（IFN）は動物体内でウイルスなどの侵入に反応して細胞が分泌する蛋白質でサイトカインの一種に属する。ヒトのIFNの型は3種類あり、その中でIFN- α, β は抗ウイルス薬（B型肝炎、C型肝炎）や抗腫瘍薬（腎癌、骨髄腫、白血病など）として臨床応用されている。

2. 亜鉛の抗C型肝炎ウイルス作用

我々は、C型慢性肝炎症例のIFN治療において、治療効果を向上させる目的で亜鉛併用療法を行った¹⁻³⁾。

亜鉛によるC型肝炎ウイルス（HCV）増殖抑制については、湯浅らがHCVレプリコン細胞を用いた実験で報告している⁴⁾。その研究によると硫酸亜鉛50 μ M、塩化亜鉛100 μ M投与によって、HCVの非構造蛋白（NS3、NS5B）発現およびHCVmRNA replicationが有意に抑制されている。

3. 亜鉛のIFN受容体誘導作用

我々は塩化亜鉛によるIFN α/β 受容体蛋白、mRNAの誘導実験を行った⁵⁾。

方法：U937細胞（ヒト慢性骨髄性白血病細胞） 1×10^4 個を37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で培養。塩化亜鉛（0、50、100、200 μ M）添加し、24、48時間後細胞を回収し遠心。一次抗体（抗IFN α/β 受容体抗体）を添加し、1時間反応。遠心洗浄後、2次抗体

FITC を添加し 1 時間反応. 遠心, 洗浄後, IFN α/β 受容体蛋白発現を FACS で測定した. 同時にトータル RNA を抽出し, cDNA を作成し増幅反応を行った. IFN α/β 受容体 mRNA の定量は real time PCR 法で測定し, 18S リボゾーム RNA に対する比で表した.

成績: ①亜鉛投与 24 時間後, IFN α/β 受容体蛋白発現が増加することを確認した. 亜鉛投与 48 時間においても IFN α/β 発現は経度増加していた (図 1).

②亜鉛投与 24 時間後, IFN α/β 受容体 mRNA はコントロールに比べ, 約 1.3 倍増加した. 48 時間後では IFN α/β 受容体 mRNA 発現はむしろ抑制傾向であった (図 2).

次に, ポラプレジンク (亜鉛と L-カルノシンの錯体) による IFN α/β 受容体蛋白, mRNA の誘導実験を行った.

方法: U 937 細胞 1×10^4 個を一晩培養. ポラプ

レジンク (亜鉛換算 0, 50, 100, 150, 200 μM) を添加, さらに 12, 24 時間培養. IFN α/β 受容体蛋白発現を FACS で, IFN α/β 受容体 mRNA 発現を real time PCR 法で測定した. また L-カルノシン (0, 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加, 24 時間後の IFN α/β 受容体蛋白発現を測定した.

成績: ①ポラプレジンク投与 24 時間後, IFN α/β 受容体蛋白は増強し, その発現誘導は塩化亜鉛による誘導より顕著であった. ポラプレジンク投与 12 時間後では IFN α/β 受容体蛋白の増加を認めなかった (図 3). 一方, L-カルノシン単独投与では IFN α/β 受容体蛋白の発現増強を認めなかった (図 4).

ポラプレジンク投与 24 時間後, Zn 換算 100 ~ 200 μM の濃度で IFN α/β 受容体 mRNA 発現誘導を認めた. しかし, 12 時間後では IFN α/β 受容体 mRNA の誘導は明らかでなかった (図 5).

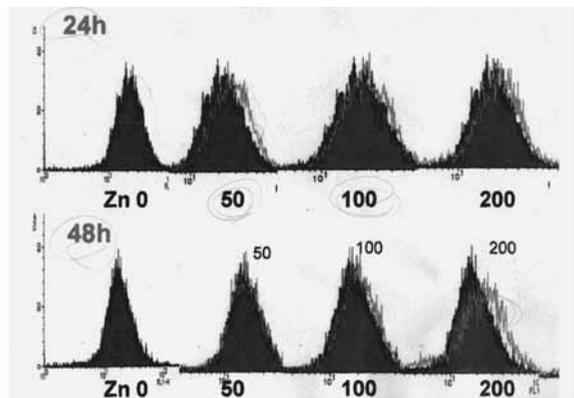


図 1 塩化亜鉛によるインターフェロン α/β 受容体蛋白の誘導

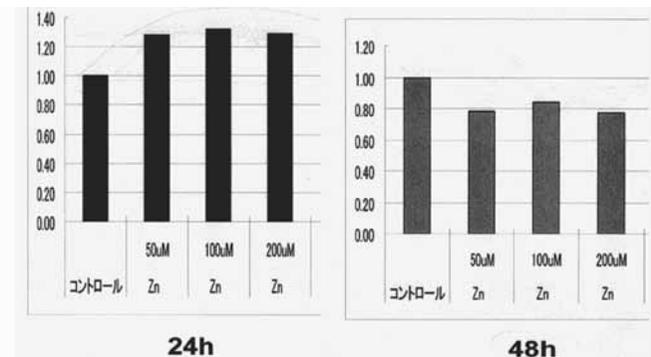


図 2 塩化亜鉛によるインターフェロン α/β 受容体蛋白の誘導

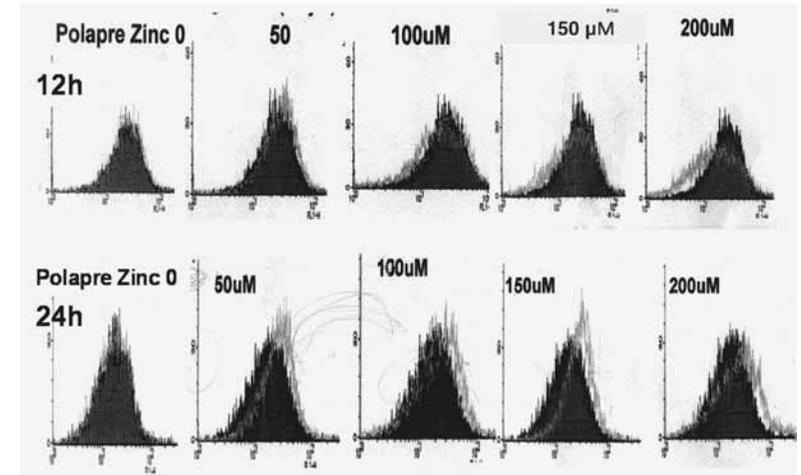


図 3 ポラプレジンクによるインターフェロン α/β 受容体蛋白の誘導

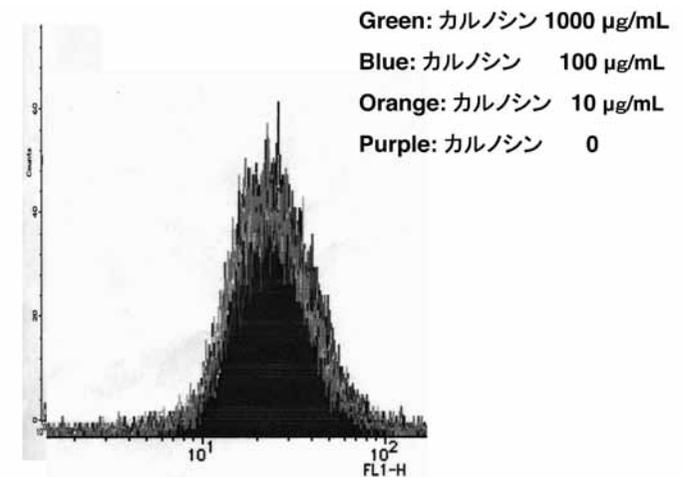


図 4 L-カルノシンによるインターフェロン α/β 受容体蛋白の誘導

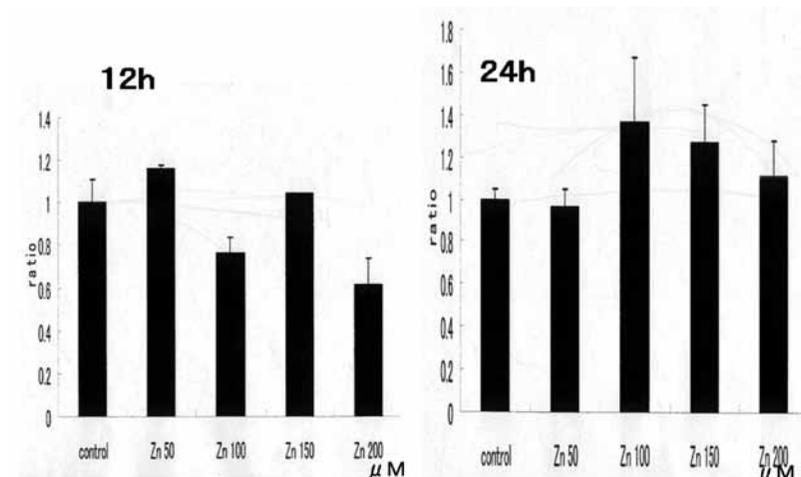


図 5 ポラプレジンクによるインターフェロン α/β 受容体 mRNA の誘導

2. C型慢性肝炎症例に対する IFN + 亜鉛併用療法

1. 難治性C型慢性肝炎に対する

IFN α 2b + ポラプレジンク併用療法の多施設間の検討

(1996年9月～1998年5月)²⁾

対象：肝生検で診断した、C型慢性肝炎のうち、Genotype 1 b, かつ HCVRNA100kcopies/ml 以上の 68 症例。IFN 単独群と IFN + 亜鉛併用群間で、背景因子に有意差を認めなかった (表 1)。
方法：IFN α 10MU を 4 週間連続皮下注、その後 24 週まで週 3 回投与した。ポラプレジンクは 1 日 150 mg (亜鉛 34 mg) (分 2) の経口投与とし

表 1 Comparison of clinical data in HCV patients

		IFN+Zn group	IFN group	
entry		32	36	
age(y.o)		47.7 ± 11.1	50.1 ± 9.6	n.s
gender	male	19	26	n.s
	female	13	10	
histology	CAH2A	26	25	n.s
	CAH2B	5	11	
	unknown	1	0	
serum ALT level(IU/ml)		66.4 ± 31.7	79.0 ± 76.6	n.s
serum AST level(IU/ml)		65.9 ± 40.3	76.5 ± 65.9	n.s
serum zinc level(μg/dl)		84.1 ± 19.8	75.4 ± 21.3	n.s

N.S.:not significant

た、なお、ポラプレジンク併用の有無は主治医の判断にゆだねた。

効果判定：治療終了 24 週後に血清中 HCVRNA および肝機能検査を測定して、以下の判定基準に基づいた。

HCV RNA (-) /AST, ALT 正常：Complete Responder(CR)

HCV RNA (+) /AST, ALT 正常：Incomplete Responder (IR)

NR, CR 以外：Nonresponder (NR)

成績：CR 率は INF 単独群 11.1%, IFN + 亜鉛併用群 37.5% となり、両群間で有意差を認めた。また、CR + IR 率も IFN + 亜鉛併用群で有意に高率であった。とりわけウイルス量 100 ~ 500 kcopies/ml の症例で有効であった (図 6)。

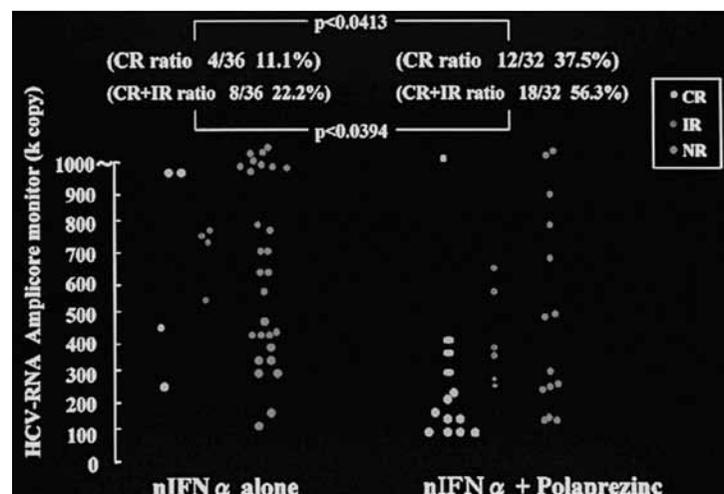


図 6 C 型慢性肝炎における亜鉛併用療法の成績

2. C型慢性肝炎に対する

IFN α 2b + リバビリン併用における経口亜鉛製剤の Randomized study (2002年1月～2003年12月)³⁾

対象：群馬大学および関連施設において Genotype 1 b, かつ HCVRNA100kIU/ml 以上の C 型慢性肝炎 102 症例を、封筒法で無作為に亜鉛投与の有無を割り付けた。

亜鉛併用群では非併用群間に比べ女性の比率が有意に高率であったが、それ以外は両群間の背景因子に差異はなかった (表 2)。

プロトコール：

* IFNα10MU を 4 週間連日皮下注、その後 20 週間、週 3 回皮下注

* リバビリン 600 ~ 800 mg/日 (経口、分 2)

* 亜鉛群：ポラプレジンク 150 mg (亜鉛 34 mg 含有) /日 (経口、分 2)

成績：亜鉛投与による効果は、HCVRNA100 ~ 499 k IU / ml や、治療開始 1 ~ 4 週後においてウイルス消失率がやや高かったが、有意差は無く、全体でも著効率は 33.3% と対照群と同率であった (図 7)。

治療前の血中亜鉛濃度が 67 μg/dl 以上の症例

表 2 Comparison of clinical data of chronic hepatitis C in two treatment groups

	Zinc group	Control
Male/female	24/26	38/14
Age	57 ± 23	53.8 ± 9.8
BMI(kg/m ²)	23.5 ± 3.1	23.4 ± 2.1
Naïve/Retreatment	34/15 (31%)	40/11 (22%)
Biochemistry		
HCV RNA(kcopy/ml)	700(100 ~ 1490)	720(110 ~ 2310)
ALT(U/I)	95.6 ± 61.1	97.4 ± 59.8
Serum Zn(μg/dl)	73.3 ± 20.3	69.8 ± 17.2
Histology		
F 0/1/2/3/4	3/12/23/10/1	1/20/15/13/1
A 1/2/3	26/20/2	20/24/5

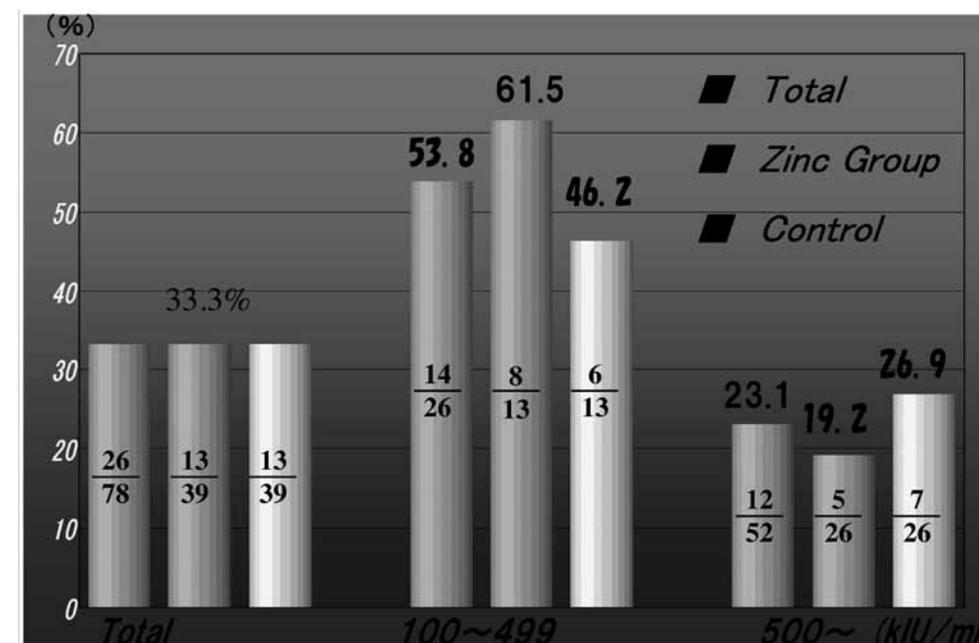


図 7 Response rate

に限ると亜鉛投与群は有意差をもって著効率が高かった(表3)。

副作用においても亜鉛投与において問題は無く、むしろ消化器症状の改善も期待できる結果であった。

3. メタロチオネインと亜鉛

1. メタロチオネインとは

メタロチオネイン (MT) は、熱に安定な低分子量 (6000 ~ 7000) タンパク質である。MT は 61 ~ 68 のアミノ酸で構成されており、その約 30% をシステインが占め、芳香族アミノ酸を含まず、重金属 (Cd, Zn, Cu など) と高い結合性を持つ。哺乳類の MT は 4 種類のアイソフォームが報告されているが、MT1 と 2 は主要なアイソフォームであり、さらにいくつかのサブフォームを形成して、殆どすべての臓器中に存在している。MT3 は主として脳に局在し、他臓器での mRNA の発現は少なく、MT4 は分化型の扁平上皮細胞に特異的に存在することが報告されている⁶⁾。

MT の生理活性は、①重金属の解毒作用、②ラジカル除去作用、③細胞増殖、分化の制御、④金属 (亜鉛、銅など) の代謝、など多岐にわたる。MT を誘導する物質として、亜鉛、カドミウム、グルココルチコイド、活性酸素、TNF α 、IL 6 などが知られている。

2. IFN による MT 1 / 2 誘導と亜鉛

ラットを使用した実験で、IFN は亜鉛を肝臓内に取り込むことによって、MT を誘導することが報告されている。そこで我々は培養肝細胞を使用して、IFN による MT1/2 誘導における亜鉛の果たす役割について検討した⁷⁾。

方法:TRL1215 細胞 (ラット正常肝細胞) を培養。コンフルエントに達した後、培養液中に亜鉛 100 μ M, IFN α / β 100 U / ml + 亜鉛 100 μ M 添加, 24 時間後に MT1/2 発現を免疫染色で検討した。また細胞を回収し、ホモゲナイズした後、亜鉛濃度を原子吸光法で測定した。

成績:亜鉛単独投与によって、MT 発現は無添加群 (コントロール) に比べ増強するが、IFN + 亜鉛では MT 発現は更に顕著であった (図 8)。

肝細胞内亜鉛濃度は IFN + 亜鉛群 > 亜鉛群 > コントロールの順に高値を示した。

3. 各種肝疾患における MT 1 / 2 の代謝

我々は、新たに MT の ELISA 測定系を開発したが、その検出感度は 5 ~ 1000ng/ml と高感度であり、臨床検体の MT 濃度測定に応用可能である。本測定系の特異性を確認するため、各種亜鉛濃度で飼育したラットの血中 MT 濃度を測定した。その結果、MT 濃度は飼料中亜鉛濃度に従い上昇を認めたことから、本 MT 測定系の特異性が確認された (図 9)。

そこで、各種肝疾患症例の血清中 MT 濃度を測定した (図 10)。

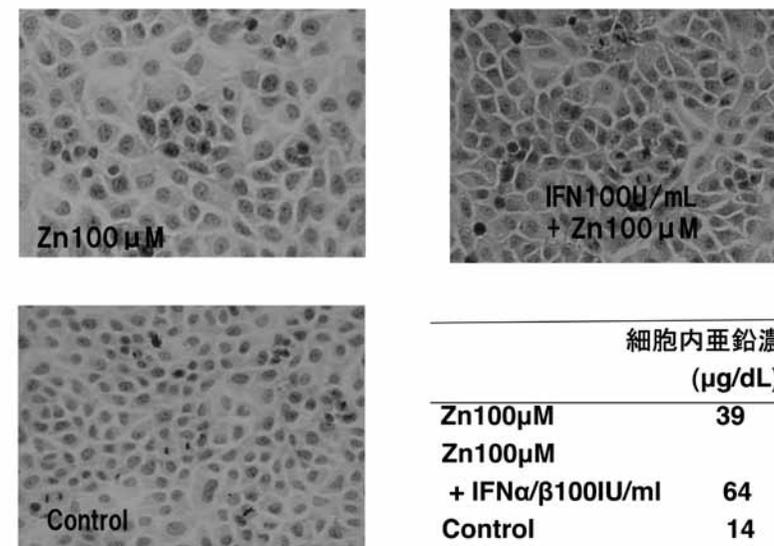


図 8 亜鉛, インターフェロン α によるメタロチオネイン誘導: TRL1215 細胞

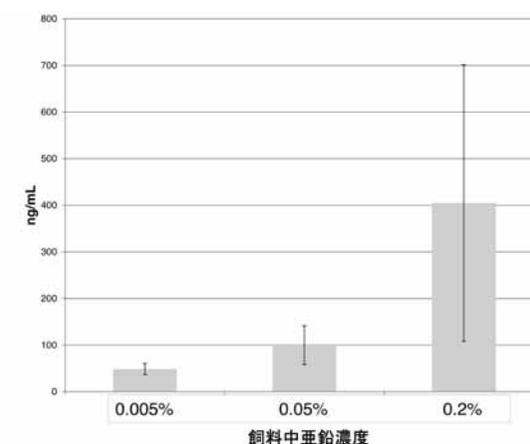


図 9 亜鉛摂取量の違いによるラット血漿 MT1/2 濃度

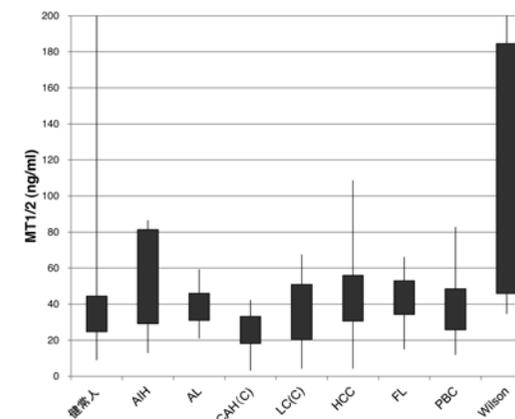


図 10 健康人, 各種肝疾患症例の血清 MT1/2 値

表 3 Comparison of clinical data of chronic hepatitis C in two treatment groups (serum Zn \geq 67)

	Zinc group	Control	
Male/female	10/9	12/5	n.s
Age	51(38 ~ 66)	59(40 ~ 70)	n.s
BMI(kg/m ²)	24(20 ~ 29)	24(20 ~ 30)	n.s
HCV RNA(kcopy/ml)	480(100 ~ 850)	740(110 ~ 850)	n.s
100 ~ 199	3	4	
200 ~ 499	7	4	
500 ~	9	9	
ALT(U/l)	74(31 ~ 196)	99(29 ~ 331)	n.s
Serum Zn(µg/dl)	79(67 ~ 146)	78(68 ~ 127)	n.s
Histology			
F 0 ~ 1/2 ~ 4	4/14	5/11	n.s

N.S.:not significant

Wilson 病は最も高く、次いで自己免疫性肝炎で高値を呈した。一方、C 型慢性肝炎は低値であった。C 型慢性肝炎症例の治療効果別に MT 濃度を判定してみると、IFN で治療した 4 例中 3 例は正常範囲 (27 ~ 50ng/ml) であり、未治療症例は 44% が正常値以下であり、正常上限を超えた症例は 1 例もなかった。

肝臓癌の MT 値は低値から高値までばらばらであり、今後症例数を増やして更なる検討が必要である。

4. 亜鉛研究における大気マイクロ PIXE の導入

1. 大気マイクロ PIXE 分析システムとは

イオンマイクロビームと Particle-induced X-ray emission (PIXE) 法の組み合わせによる高感度、高空間分解 (1 μm) 元素分析システムである。特徴としては、①薄膜を使用し、大気中での分析が可能である、②単一細胞内微量元素分布測定ができる、③凍結乾燥法による試料調節が可能であることから、生きた状態の細胞を反映するなどである。図 11 に日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の大気マイクロ PIXE 測定装置を供覧する。

2. IFN による細胞内亜鉛の誘導⁷⁾

大気マイクロ PIXE 用試料の作成：HepG2 細

胞 (5 × 10⁵ 細胞数/ml) をマイラー膜上で一晚培養。BrdU (細胞核のマーカー) 100 μM 添加したメデイウムと交換し、24 時間培養。亜鉛 100 μM, IFN50 (又は 100) U/ml, 亜鉛 100 μM + IFN50 (又は 100) U/ml の入ったメデイウムと交換し、さらに 6 時間培養。

細胞を洗浄し、凍結乾燥後、ホルダーに固定 (図 12) し、PIXE 装置で測定。

成績：コントロール (無添加) や IFN 単独投与群では亜鉛の X 線スペクトルの検出は軽度であるが、亜鉛群や IFN + 亜鉛群では亜鉛の X 線スペクトルが増強している (図 13)。

細胞内の亜鉛の分布をみるとリン (P) の分布とほぼ一致しており、核内への取り込みが示唆される (図 14)。次に、亜鉛と Br の細胞内分布を示す。亜鉛は Br と一致して局在したり、あるいは単独でバラバラに細胞内分布する像を認める。IFN で誘導される亜鉛の一部は細胞核内へ移動する可能性が示唆される (図 15)。

以上の成績から、我々は IFN で誘導される MT 代謝に関する仮説を想定している (図 16)。IFN は肝細胞膜の Zip を誘導し、血清中亜鉛を細胞内へ取り込み、MT を誘導して、MT のチオール残基と結合する。細胞周期が S 期になると MT は核内へ移動し、遊離した Zn を Zn-Finger protein に供給する。また NF κ B などの転写因子への関与も想像される。

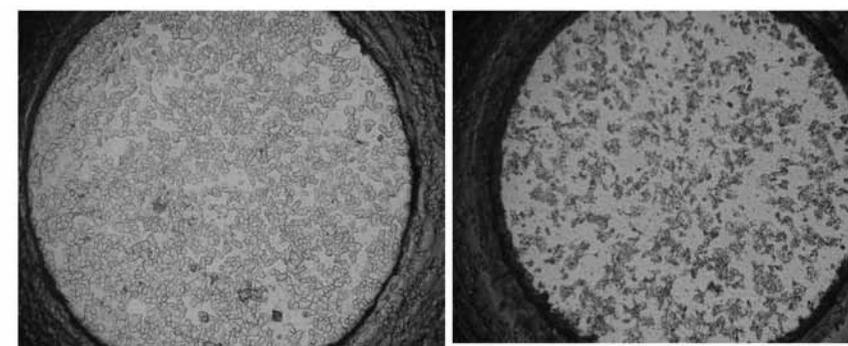


図 12 大気 microPIXE 試料：HepG2 cells

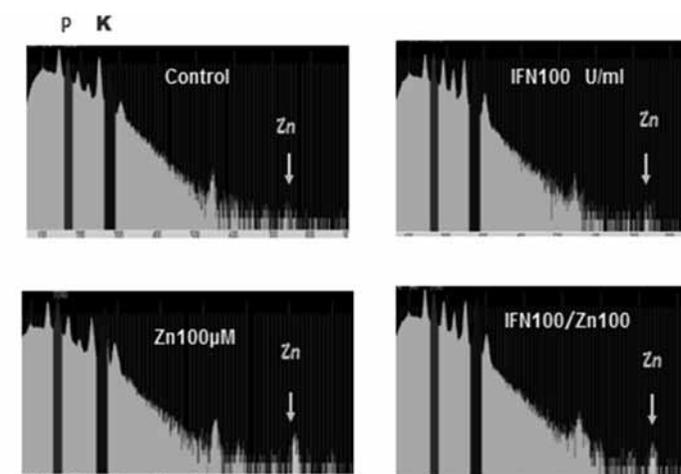


図 13 X 線スペクトル：HepG2 細胞

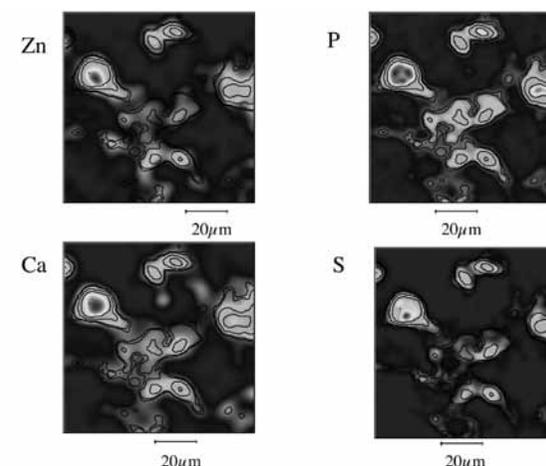


図 14 細胞内元素分布：HepG2 細胞

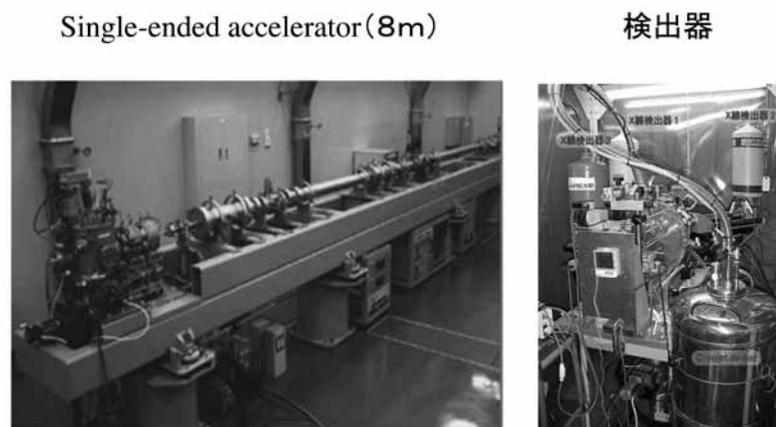


図 11 大気マイクロ PIXE 分析装置—日本原子力研究開発機構 高崎量子応用研究所—

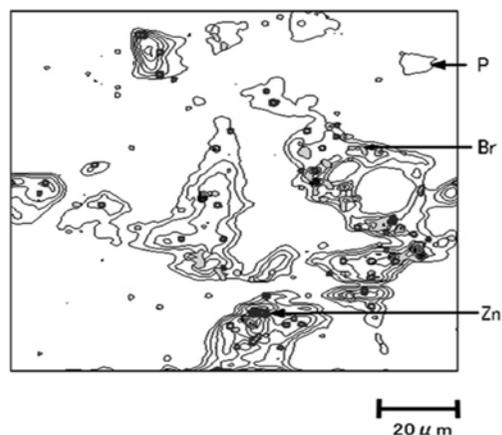


図 15 IFN50 IU/ml+Zn100 μM 投与後の細胞内 Zn, Br の分布

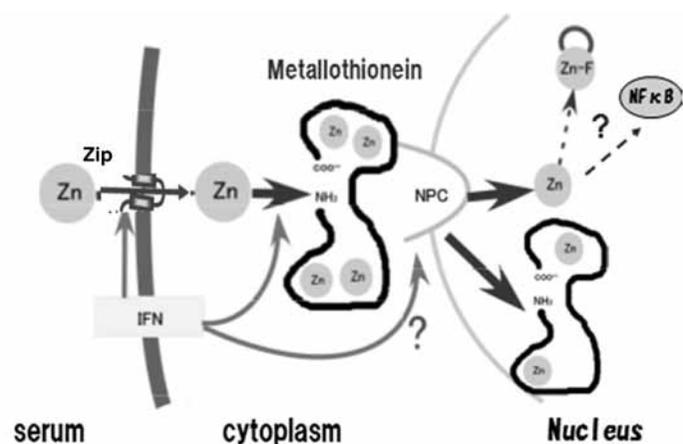


図 16 Possible mechanism underlying interferon-induced metallothionein

◆文献

- 1) Nagamine T, Takagi H, Takayama H, et al: Preliminary study of combination therapy with interferon- α and zinc in chronic hepatitis C patients with genotype 1b. *Biol Trace Element Res* 75: 53, 2000
- 2) Takagi H, Nagamine T, Abe T, et al: Zinc supplementation enhances the response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepatitis* 8: 367, 2001
- 3) Suzuki H, Sato K, Takagi H, et al: Randomized controlled trial of consensus interferon with or without zinc for chronic hepatitis C patients with genotype 2. *World J Gastroenterol* 12: 945, 2006
- 4) Yuasa K, Naganuma A, Sato K, et al: Zinc is a negative regulator of hepatitis C virus RNA replication. *Liver Int.* 26: 1111, 2006
- 5) Nagamine T, Nakajima K, Takada H, et al: Induction of type 1 interferon receptor by zinc in U937 cells. *Cytokine* 46: 345, 2009
- 6) Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH: Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res.* 533: 201, 2003
- 7) Nagamine T, Kusakabe T, Takada H, et al: Interferon β -induced changes in metallothionein expression and subsellular distribution of zinc in HepG2 cells. *Cytokine* 34: 312, 2006

◆Abstract

We have reported the beneficial effect of combined therapy with interferon (IFN) and zinc for chronic hepatitis C patients.

Previously, anti-viral effect of zinc for hepatitis C virus (HCV) was reported, in which zinc suppressed HCV replication and HCV protein. We have evaluated zinc effect on IFN α / β receptor expression using U937 cells. Our study showed that zinc mildly induced mRNA and protein of IFN α / β receptor. In addition, polaprezinc (combined with zinc and L-carnosine) moderately increased IFN α / β receptor levels, whereas IFN α / β receptor was not induced by L-carnosine alone.

2. It is well known that metallothionein (MT) is rapidly increased by zinc and IFN. MT exerts many biological activities such as detox city for heavy

metals, radical scavenger, and modulation of cell proliferation, but the physiological role of MT in liver diseases is not clarified yet. We have established ELISA method for MT assay; this assay is very sensitive enough to determine MT levels in clinical sample of serum and urine. Using this assay, we are planning to evaluate the latent zinc deficiency in various diseases.

3. In-air micro PIXE method can detect the distribution of intracellular trace element, and is useful for the research on the intracellular zinc kinetics. We analyzed the zinc distribution within HepG2 cells after IFN dosing using micro PIXE system. Zinc was localized with Br, suggesting that zinc was moved into nucleus.

◆長嶺竹明略歴

- | | |
|---------|---------------------------------------|
| 昭和 51 年 | 群馬大学医学部卒業 |
| | 群馬大学医学部第一内科入局 |
| 昭和 63 年 | 群馬大学医学部第一内科助手 |
| 平成 6 年 | 群馬大学医学部第一内科講師 |
| 平成 8 年 | 米国 NIH, National Cancer Institute 研究員 |
| 平成 10 年 | 群馬大学医学部保健学科教授 |
| 平成 23 年 | 群馬大学大学院保健学研究科教授 |
| | ～現在に至る |