

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：27101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22580141

研究課題名（和文）大豆イソフラボンによるアセトアミノフェン肝障害抑制効果の解析と応用

研究課題名（英文）Analyses of protective effects of soy-derived isoflavone against acetaminophen-induced liver injury

研究代表者

平野 雄（HIRANO TAKESHI）

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号：40258629

研究成果の概要（和文）：大豆イソフラボンのひとつゲニステイン（GNS）によるアセトアミノフェン（APAP）肝障害抑制効果を検討した。まず培養細胞を用いて APAP 肝障害に対する GNS の抑制効果を検討した。対照には *N*-アセチル-L-システイン（NAC）を用いた。次に、GNS の APAP 肝障害抑制効果におけるエストロゲン受容体（ER）の関与を検証した。さらにマウスを用いて同様の解析を行った。培養細胞実験では、GNS は APAP 肝障害に対し、NAC と同等もしくはそれ以上の抑制効果を示した。また、ER 阻害剤の投与により、GNS の APAP 肝障害抑制効果は低下した。マウス実験でも、GNS による APAP 肝障害抑制効果が認められた。GNS は ER を介して、APAP 肝障害を抑制すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We found that genistein, a soybean phytoestrogen, reduced APAP-induced cytotoxicity of two cultured liver cell lines; HepG2 (human hepatocellular carcinoma cell line) and NCTC Clone 1469 (a mouse non-parenchymal hepatocyte). When these cell lines were treated with 5 mM APAP, the cell viabilities were decreased to 21.0% and 8.6% at 48 hr, respectively. However, 10 μ M genistein restored the both cell viabilities up to 66.1% and 52.8%, respectively. Analyses of reactive oxygen species (ROS) production level revealed that genistein reduced ROS produced by APAP in both cell lines. Taken together, these findings indicated that genistein might have protective effects against APAP-induced hepatotoxicity via anti-oxidative stress activities. On the other hand, we observed that genistein showed protective effects on APAP-induced acute mouse liver injury in combination with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC). Because genistein is a common food factor, it should be a promising protective chemical agent against APAP-induced liver injury. In the future, we are planning to establish the improved therapeutic use of genistein for APAP-induced liver injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ゲニステイン、アセトアミノフェン、肝障害

1. 研究開始当初の背景

アセトアミノフェン (*N*-acetyl-para-aminophenol, APAP) は、総合感冒薬の配合成分や解熱鎮痛剤として広く使用されている、比較的安全な薬剤であり、小児、高齢者、妊婦等に好んで処方される。しかしながら、代謝産物である *N*-acetyl-para-benzoquinone imine (NAPQI) に肝毒性があり、長期服用による肝機能障害や、自殺企図などの大量服用による中毒性肝障害などの副作用が知られている。急性薬物性肝障害のおよそ 42% は APAP によるものとする米国の報告もあり、看過できない問題として認識されている。APAP は広く用いられている有用な薬剤であるだけに安全性の確保は特に重要である。このような肝障害に対し、現時点では特段の予防策はなく、急性毒性に対しても活性炭の使用やグルタチオン前駆体である *N*-アセチル-L-システイン (*N*-acetyl-L-cystein, NAC) の経口投与が治療法の基本となっているのみである。ただし、これらは APAP 摂取の早期にのみ有効であり、対応が遅れると劇症型の肝不全を惹起し、致命的ともなり得る。しかも、APAP をもっとも頻用するのは慢性疼痛に悩む高齢者であることを考慮すると超高齢化社会を迎える我国にとって APAP 肝障害の予防や治療は医療費抑制の観点からも重要な問題のひとつと言える。従って、適切な予防法や更なる有効な治療法の確立が望まれるのである。

2. 研究の目的

エストロゲン受容体を発現しているマウス培養肝非実質細胞をアセトアミノフェン処理することで細胞障害を惹起させ、その細胞障害に対するゲニステインの抑制効果を評価した。

3. 研究の方法

(1) アセトアミノフェン肝障害とゲニステインによる抑制効果の評価：培養細胞実験

ヒト肝癌由来細胞 (HepG2) を 5×10^4 cells / mL の細胞密度で播種し、24 時間培養後に 5 mM APAP を添加した。その後、72 時間まで細胞生存率を計測した。また、5 mM APAP を添加した HepG2 の培地に $10 \mu\text{M}$ GNS を同時添加した場合の 48 時間後の細胞生存率、細胞内活性酸素生成量を測定した (DCFDA 法)。GNS の APAP 肝障害抑制効果の比較対照として $10 \mu\text{M}$ NAC を用いた。

(2) ゲニステインのアセトアミノフェン肝障害抑制効果におけるエストロゲン受容体の関与の検討

GNS による APAP 肝障害抑制効果におけるエストロゲン受容体 (ERs) の関与を調べるために、ERs 阻害剤である 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) と fluvestrant をそれぞれ $10 \mu\text{M}$ の濃度で同時添加した。薬剤添加 48 時間後に細胞生存率を計測した。

(3) 実験動物におけるゲニステインのアセトアミノフェン肝障害抑制効果の確認

8 週齢の C57Bl/6J Jc1 雄性マウス (体重 20.6 ± 2.2 g) をコントロール群、APAP 単独投与群、APAP+GNS 投与群、APAP+NAC 投与群、及び APAP+GNS+NAC 投与群の 5 群に分けた。APAP は 25 mg / mL 溶液、GNS は 10 mg / mL 溶液、NAC は 20 mg / mL 溶液とした。24 時間絶食マウスに APAP (500 mg / kg BW) を腹腔内投与し、更にその 1 時間後に GNS (100 mg / kg BW) あるいは NAC (200 mg / kg BW) を経口投与した。さらに別の APAP 投与マウスに GNS と NAC を同時投与した。3 日後に屠殺、肝臓を回収後、肝湿重量、血清 ALT 値の測定、および肝組織の病理学的解析を行なった。

4. 研究成果

(1) アセトアミノフェン処理による肝細胞生存率低下とゲニステインによる抑制効果

HepG2 の生存率は 24 時間まで 70% 程度を維持していたが、48 時間になると 30% 程度にまで急激に低下した (図 1)。

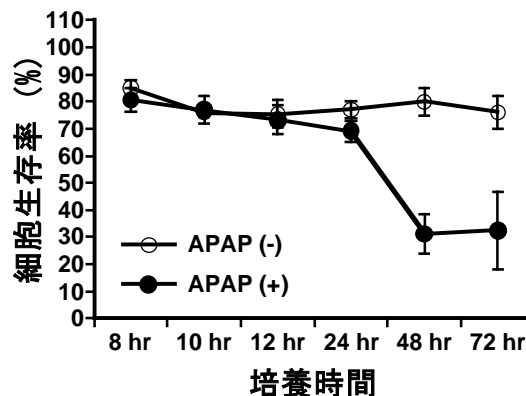


図 1 アセトアミノフェン (APAP) 負荷した場合の HepG2 生存率の経時的変化

48 時間で低下した細胞生存率は $10 \mu\text{M}$ の GNS

を同時処理することで 55%程度にまで回復した (図2)。

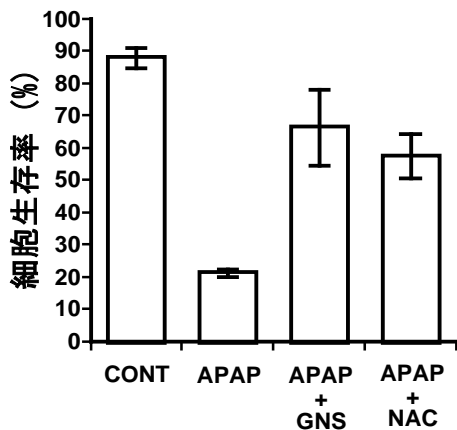


図2 APAP肝障害に対するGNSおよびNACの抑制効果 (細胞生存率)

一方、同様の実験を 10 μ M の NAC について行なうと、その生存率は 40%程度となった。即ち、培養細胞レベルの実験では、APAP 肝障害の抑制にGNSは極めて有効であり、その効果はNACと同等かそれ以上であることが明らかとなった。細胞内活性酸素生成量においても同様の結果が得られた。即ち、APAP 投与で肝細胞内活性酸素生成量は増加したが、GNS同時投与でその生成量はコントロールレベルにまで低下した (図3)。この効果は NACと同程度であった。

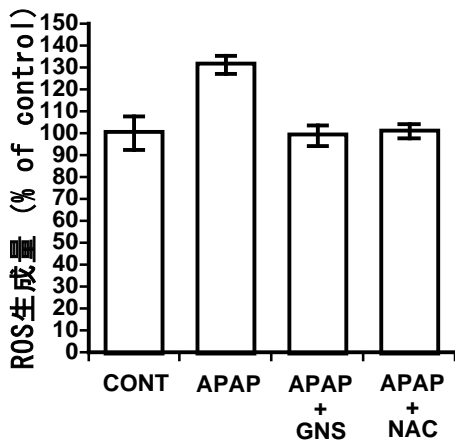


図3 APAP肝障害に対するGNSおよびNACの抑制効果 (細胞内活性酸素 (ROS) 生成量)

(2) エストロゲン作用の関与

2種類の ERs 阻害剤 (4-OHT、Fluvestrant) の投与により、GNSにより回復した細胞生存率はどちらの阻害剤においても低下し、GNSのAPAP肝障害抑制効果が阻害される結果となった (図4)。

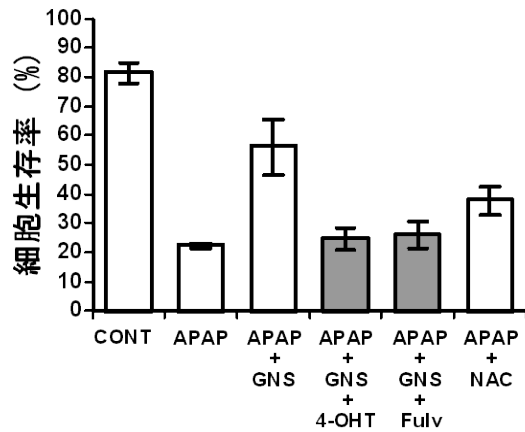


図4 アセトアミノフェン (APAP) 肝細胞障害に対するゲニステイン (GNS) の抑制効果におけるエストロゲン受容体の関与。CONT: コントロール、4-OHT: 4-Hydroxytamoxifen、Fulv: Fulvestrant、NAC: N-アセチル-L-システイン

(3) マウスにおけるアセトアミノフェン肝障害に対するゲニステインとNACの抑制効果
すべてのマウスの生存率は 100%であった。肝臓の湿重量はコントロール群に対し、APAP単独投与群で約 1.3 倍、APAP+GNS 投与群で約 1.4 倍、APAP+NAC 投与群で約 1.5 倍と増加していたが、APAP+GNS+NAC 投与群では 1.2 倍程度に抑えられていた。血清中の alanine aminotransferase (ALT) 値は APAP 投与で 3 倍以上上昇していたが、GNS 投与によりその上昇は僅かに抑えられた (図5)。

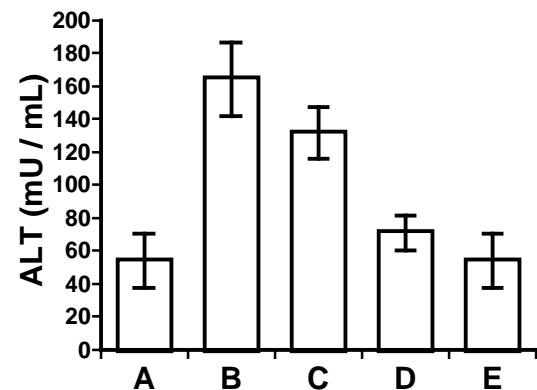


図5 薬剤投与した場合のマウス血清中の alanine aminotransferase (ALT) 値。A: コントロール群、B: アセトアミノフェン (500 mg / kg BW) 投与群、C: アセトアミノフェン (500 mg / kg BW) +ゲニステイン (100 mg / kg BW) 投与群、D: アセトアミノフェン (500 mg / kg BW) +NAC (200 mg / kg BW) 投与群、E: アセトアミノフェン (500 mg / kg BW) +ゲニステイン (100 mg / kg BW) +NAC (200 mg / kg BW) 投与群。

NAC : N-アセチル-L-システイン

ただし、NAC 投与では ALT 値が顕著に抑えられ、現行の治療法の有効性を示す結果となった。以上の結果より、マウス実験でも、GNS による APAP 肝障害抑制効果が有意に認められ、GNS の有効性が示された。特に GNS と NAC の同時投与で抑制効果が高かった。病理所見では APAP 単独投与群で見られた肝細胞索の乱れ、細胞の空胞化などの異常所見が APAP +GNS 投与群で軽減していた (図6)。

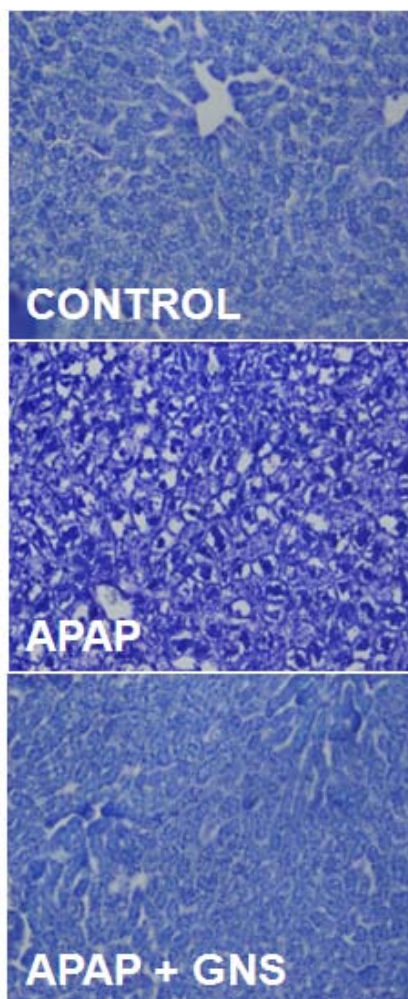


図6 薬剤投与したマウス肝臓の病理所見。
APAP : アセトアミノフェン (500 mg / kg BW)、
GNS : ゲニステイン (100 mg / kg BW)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計7件)

- ① 仁田暁大、長尾章平、中島民治、玉江和義、船木舞、宮ノ下充、森永賀亮、平野雄 大豆イソフラボンによるアセトア

ミノフェン肝細胞障害抑制に関する研究 第85回 日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡国際会議場(福岡市)

- ② 長尾章平、仁田暁大、中島民治、玉江和義、船木舞、宮ノ下充、森永賀亮、平野雄 アセトアミノフェン誘導マウス肝障害に対するゲニステインの抑制効果 第85回 日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡国際会議場(福岡市)
- ③ 平野雄 ゲニステインによるアセトアミノフェン肝障害の抑制 第34回 日本臨床栄養学会総会、2012年10月6日、都市センターホテル(東京都)
- ④ 平野雄、玉江和義 アセトアミノフェン肝障害とゲニステインによる抑制効果 第82回 日本衛生学会総会、2012年3月25日、京都大学(京都)
- ⑤ Hirano, T. and Tamae, K. The role of estrogenic action of genistein in acetaminophen-induced hepatotoxicity 第34回 日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜国際会議場(横浜市)
- ⑥ 平野雄、松野康二、河井一明、玉江和義、甲斐久博、花田亜侑子、加茂華子、上和田啓太、渡部翔太 大豆イソフラボンによるアセトアミノフェン肝障害抑制効果 第33回日本分子生物学会年会・第83回 日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010)、2010年12月9日、神戸国際会議場(神戸市)
- ⑦ Matsuoka S., Hanada A., Kamo H., Matsuno K., Kai H., and Hirano T. Genistein protects liver cells from acetaminophen-induced hepatotoxicity. The 6th International Symposium on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis (ISALPD/C). 2011 Fukuoka、2010年10月21日、福岡国際会議場(福岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://hirano-lab.main.jp> (準備中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 雄 (HIRANO TAKESHI)

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号：40258629

(2) 研究分担者

松野 康二 (MATSUNO KOJI)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：40131940

河井 一明 (KAWAI KAZUAKI)
産業医科大学・産業生態科学研究所・教授
研究者番号：60161262