

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592260

研究課題名(和文)急性肝炎時におけるビタミンE誘導体ETS-GS投与の改善効果の検討

研究課題名(英文)Effects of Vitamin E Derivative, ETS-GS for the treatment of acute hepatitis

研究代表者

新宮 千尋(Shingu, Chihiro)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：30295191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性肝炎の新規治療法開発を目標に、ラットを用いたアセトアミノフェン投与による急性肝障害モデルを作成し、非ステロイド骨格化合物である新規合成のビタミンE誘導体ETS-GSの有効性を検討した。肝組織のHE染色所見、血清生化学検査、酸化ストレスマーカー等を比較し、ETS-GS投与がアセトアミノフェンにより誘発される肝傷害を軽減することを示すことができ、新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated effects of ETS-GS, a new vitamin E derivative, in rat model of acute hepatitis due to acetaminophen-administration. We compared at histological and biological change, that ETS-GS attenuates acetaminophen-induced liver injury, and the result suggested potential therapeutic ability of ETS-GS.

研究分野：医歯薬学

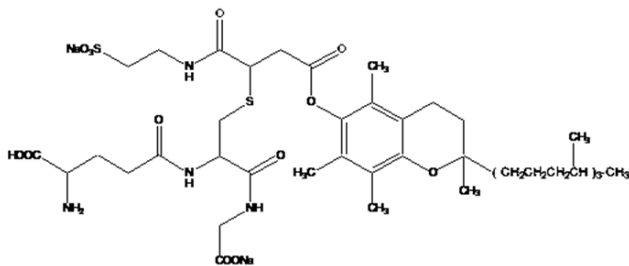
科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生

キーワード：急性肝障害 酸化ストレス ビタミンE タウリン グルタチオン

1. 研究開始当初の背景

肝疾患に対する治療学の飛躍的な進歩によって、肝炎に対する知識が深まってきており、原因別に様々な治療法 (ex ウイルス性肝炎に対するインターフェロン療法) が開発されている。急性肝炎の原因は多岐にわたり、アルコール性、自己免疫性、薬剤性、ウイルス性などが代表的である。中でも、ウイルス性の肝炎は感染していた医薬品を使用することで広まったことから、社会的にも大きな問題になっており、この病態のメカニズム解明と克服が肝臓治療の大きな課題でとなっている。しかしながら現状では急性増悪を起こした急性肝炎に対しては有効な医薬品は少なく新規薬剤の開発が待望されている。我々は肝虚血再灌流障害の原因として再灌流時に産生されるラジカルに注目し、新規抗酸化物質 ETS-GS (-L-Glutamyl-S-[2-[[[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltri-decyl)-2H-1-benzopyran-6-yl]oxy]carbonyl]-3-oxo-3-[(2-sulfoethyl)amino]propyl]-L-cysteinyglycine sodium salt) が肝虚血再灌流障害時のラジカル産生を抑制し、本病態に効果を示すのではないかと仮説をたてた。ETS-GS は抗酸化物質として知られたビタミン E の誘導体である。ビタミン E は油溶性で水溶化には、リン酸エステル、コハク酸エステルなどの誘導体が知られている。しかし、ビタミン E リン酸エステルは 0.1% 以上の濃度では溶血作用が生ずるため、注射剤としては好ましくな

ETS-GS



い。また、ビタミン E コハク酸エステルのカルシウム塩は結晶性で水に不溶性であり、そのナトリウム塩は水溶性ではあるものの不安定である。このようにビタミン E はその強い抗酸化作用にもかかわらずその物質的不安定性のために薬剤としては問題があった。我々は大分大学医学部麻酔科客員研究員の緒方一美博士と共同でビタミン E に無水マレイン酸を作用させてビタミン E マレイン酸エステルを合成し、これにシステインやグルタチオンを付加させ、水溶性ビタミン E 誘導体として満足できる安定な化合物を合成し、これにマレイン酸残基にアミンやアミノ酸を結合させて ETS-GS の合成に成功した。ETS-GS は水溶性で安定性がよく、溶血作用もなく、今までのところ、配合禁忌も見当たらない。我々は、これまでに ETS-GS の作用と

して、心臓の虚血再灌流傷害等にて強力な臓器保護効果があることを見出し報告している。

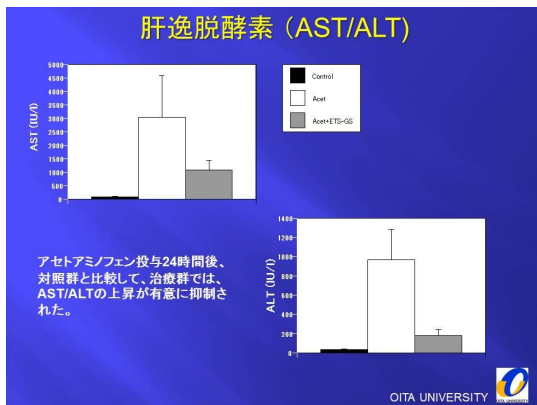
現在までの研究成果から、ETS-GS は心臓以外の臓器における各種臓器障害の治療薬への応用が可能であり、本物質は各種臓器障害に広く応用が可能であると考えた。そこで、本研究では、アセトアミノフェン誘発急性肝炎モデルへの効果を確認し、急性肝炎への治療薬としての応用のための基礎研究を計画した。

2. 研究の目的

薬剤性やウイルス性の急性肝障害は現在もなお治療法が確立しておらず、新規の治療薬の開発が待たれている疾患の一つである。我々は最近新規ビタミン E 誘導体である ETS-GS が強力な肝保護効果を有し、アセトアミノフェン誘発肝障害に対して著しく有効であることを発見した。ETS-GS はビタミン E 誘導体であるが、水溶性でかつ安定であり、これまでの同種誘導体の欠点が見られない。本研究では、培養細胞ならびにラットを用いた毒性実験ならびに薬理作用の分子メカニズムの解明を推進し、新規薬剤としての臨床応用への道を切り開くことを目的とする。

3. 研究の方法

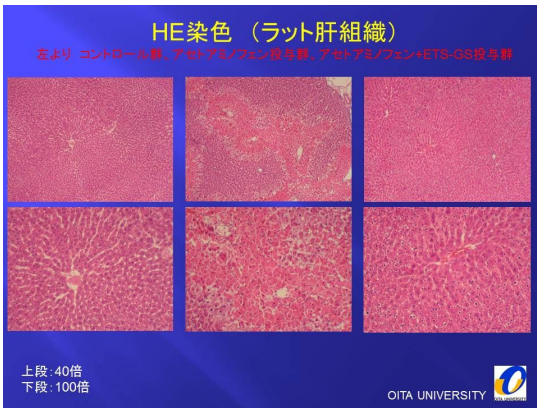
Wistar 系雄性ラット (体重 250-300g) を用いて、アセトアミノフェン誘発急性肝炎モデルを作成した。ラットは無作為に以下の 3 各群に分けた。a) コントロール群・・・全身麻酔下に生理食塩水のみを投与、b) アセトアミノフェン投与群・・・アセトアミノフェン



のみの投与、c) ETS-GS 投与 + アセトアミノフェン群・・・アセトアミノフェンと ETS-GS を投与。アセトアミノフェンは単回腹腔内投与で 1.0 g /kg, ETS-GS は 10 mg/kg, 1 回を腹腔内投与した。

モデル作成 24 時間後、以下の項目を測定。

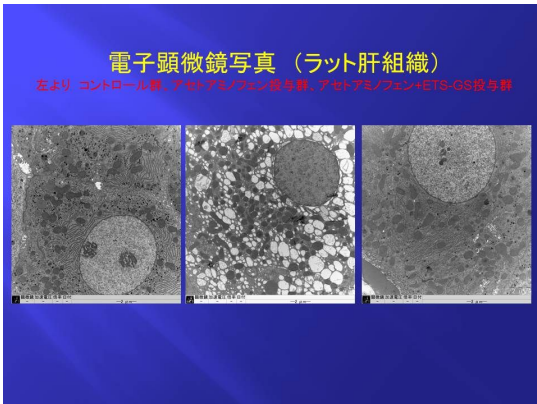
- 1) 血液中の AST 及び ALT
- 2) 肝臓の HE 所見
- 3) 肝臓の電子顕微鏡所見
- 4) 肝臓のグルタチオン含量



5) 肝臓のMDA 含量

6) 24時間の生存率

これらの検討を行うことで、急性肝障害における酸化ストレスの影響を明らかにし、最終的には、ETS-GSの急性肝障害における有効性や有用性を証明することで、本疾患群における新たな治療法の候補としての基礎的研究を行う。

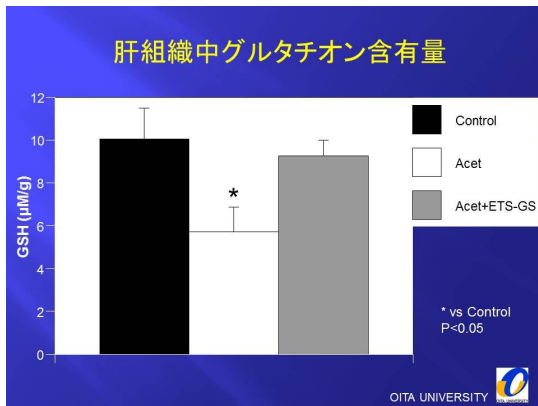


3. 結果

以下に、今回の研究により得た結果を順次示す。

1) 血液中のAST及びALT

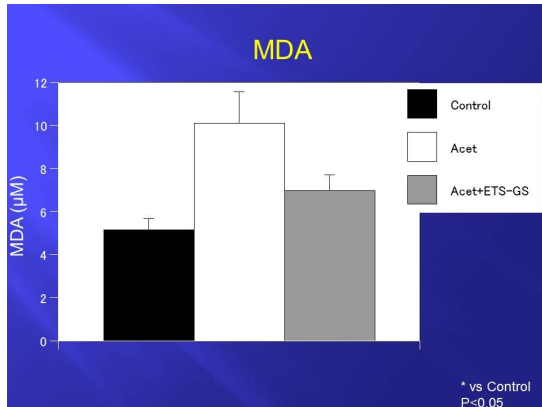
各群における、24時間後の血液中AST並びにALTの値を示す。コントロール群に比べて、アセトアミノフェンを投与することで、有意



に上昇したが、ETS-GSを同時投与することで上昇を抑制することが出来た。

2) 肝臓のHE所見

左からコントロール群、アセトアミノフェン投与群、ETS-GS投与+アセトアミノフェン群のHE所見を示す。アセトアミノフェンを投与した真ん中の写真では、小葉構造の破壊等の急性肝障害の像を示したが、ETS-GSを投与することで、これらの変化を抑制することが出来た。



3) 肝臓の電子顕微鏡所見

左からコントロール群、アセトアミノフェン投与群、ETS-GS投与+アセトアミノフェン群の電子顕微鏡所見を示す。アセトアミノフェンを投与した真ん中の写真では、ミトコンドリア構造の破壊等の細胞破壊像を示したが、ETS-GSを投与することで、これらの変化を抑制することが出来た。

4) 肝臓のグルタチオン含量

左からコントロール群、アセトアミノフェン投与群、ETS-GS投与+アセトアミノフェン群の肝細胞中グルタチオン量を示す。アセトアミノフェンを投与すると細胞内のグルタチオンが有意に減少するが、ETS-GSを投与することで、グルタチオンの減少を抑制することが出来た。

5) 肝臓のMDA含量

左からコントロール群、アセトアミノフェン投与群、ETS-GS投与+アセトアミノフェン群の細胞内酸化ストレスを定量化するためにMDA濃度の測定した結果を示す。アセトア

各群の生存率

	生存	全数	生存率
生食群	17	30	56.6%
ETS群	12	15	80%

ミノフェンを投与することで、細胞の酸化ストレスが上昇し、MDA が増加したが、ETS-GS を投与することで、細胞内の酸化ストレスを抑制でき、結果として MDA の変化を抑制することが出来た。

6) 24 時間の生存率

上段に、アセトアミノフェン群を下段にアセトアミノフェン+ETS-GS 群の 24 時間後における生存率を示す。アセトアミノフェン投与群では約半数のラットが 24 時間以内に死亡したが、ETS-GS を投与することで、生存率の上昇を認めた。

最後に、新規ビタミン E 誘導体に毒性がないかについて検討を行った。セボフルレン吸入全身麻酔下に前述の薬剤を 1 日 2 回 7 日間連日皮下に投与し、臓器障害が生じるかについて検討を行った。新規ビタミン E 誘導体である ETS-GS を 10mg/Kg 投与した時、腎障害をはじめとした臓器障害を生じることもなく安全に使用できることを示した。このことは、今回用いた新規ビタミン E 誘導体は副作用がなく、安全に使用できる薬剤である事を示した。

本年度までの科学研究費を用いた研究を行うことで、当初目標としていた新規ビタミン E 誘導体である ETS-GS のラットアセトアミノフェン誘発急性肝障害モデルにおける有効性並びに基礎的なレベルであるが本誘導体の安全性を評価することが出来たと考えている。しかし、今回の研究では、1) 人での有効性に対する検討が行われていない。2) 様々な要因で生じる急性肝障害に対して、今回はあくまでもアセトアミノフェンのみのデータであり、他のタイプの肝障害に本研究結果が応用できるかの検討が行われていないこと 3) 安全性についても比較的短期の安全性のみであり、長期の安全性や催奇形性などの更なる安全性を検討していくことが求められるなどの研究の限界が存在している。しかしながら本研究結果は、世界で初めて合成された新規ビタミン E 誘導体である ETS-GS の可能性を示した事実は変わらず、今後は、最終目標としている新規薬剤として急性肝傷害という病気と闘っている多くの患者様に届けられるよう、上記点を解決すべく更なる研究を計画している。

この研究計画を実行するために、本研究結果を元に、科学研究費への継続的な応募や厚生労働省科学研究費などの他の研究費へ応募するなどし、研究費を継続して獲得することで実験を強力に推進していくことで、最終的な目標に早く近づくよう研究・検討を続けていく予定にしている。

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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
新宮 千尋 (Shingu Chihiro)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号 30295191
- (2) 研究分担者