

# 論 文 要 旨

L-Carnitine has a liver-protective effect through inhibition of inducible nitric oxide synthase induction in primary cultured rat hepatocytes

(ラット初代培養肝細胞を用いたL-カルニチンの誘導型一酸化窒素合成酵素の抑制と肝保護効果の研究)

関西医科大学外科学講座

(紹介：友田 幸一学長・外科学講座講座主任事務取扱)

中村 有佑

## 【背景・目的】

小児患者において、長期的な経管栄養に頼らざるを得ない状況下では、二次性カルニチン欠乏症を引き起こすことが報告されている。したがって、予防的な L-カルニチンの補充が必要とされる。一方、成人領域においても、肝硬変患者における肝性脳症や高アンモニア血症に対する L-カルニチンの臨床使用がなされており、その治療効果について多くの報告や総説がある。

しかし、炎症時の肝障害の改善効果に対する L-カルニチンについての報告はほとんど無い。炎症下の肝臓では、様々な炎症性メディエーター (tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , 一酸化窒素 (nitric oxide, NO) など) により Kupffer 細胞や肝細胞が刺激されると、誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase, iNOS) の発現を介して NO の産生が亢進する。iNOS を介して過剰産生された NO は肝障害因子の一つと考えられおり、iNOS 誘導を抑制することが肝障害の軽減に重要である。本研究では、インターロイキン(IL)-1 $\beta$  で刺激したラット初代培養肝細胞 (*in vitro* 肝障害モデル [1]) を用いて、iNOS 誘導・NO 産生の阻害を肝保護の指標として、L-カルニチンの肝保護効果の有無を検討した。

## 【方法】

肝細胞をラット(Wistar 系雄性, 200-250 g)よりコラゲナーゼ灌流と低速遠心にて分離し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。L-カルニチン存在および非存在下に培養肝細胞を炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ ) で刺激し、L-カルニチンの iNOS 誘導・NO 産生やそのシグナル経路におよぼす影響を分析した。

## 【結果】

L-カルニチンは IL-1 $\beta$  との同時投与により、刺激肝細胞での NO 産生を濃度、時間依存性に阻害した (L-カルニチン 30 mg/ml で最大効果を示した)。L-カルニチンは iNOS タンパク質 (western blotting) および iNOS mRNA (RT-PCR) の発現を抑制した。iNOS promoter-luciferase コンストラクトを用いた transfection 実験より、L-カルニチンは iNOS mRNA の合成 (転写調節) と安定化 (転写後調節) をいずれも阻害し、mRNA レベルを抑制したと考えられる。L-カルニチンは iNOS mRNA の発現のみならず、TNF- $\alpha$  mRNA 発現も抑制したが、cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 (ヒト IL-8 アナログ) の mRNA 発現には影響を与えなかった。さらに、L-カルニチンは IL-1 $\beta$  刺激後の後投与においても、強い iNOS 誘導・NO 産生の阻害を示した。

iNOS 誘導には I $\kappa$ B kinase を介した I $\kappa$ B 分解/NF- $\kappa$ B 活性化と phosphatidylinositol 3-kinase/Akt を介した type I IL-1receptor (IL-1RI) 増幅の 2 つのシグナル経路が関与する。L-カルニチンは I $\kappa$ B の分解には影響を与えなかったが、NF- $\kappa$ B 活性化 (NF- $\kappa$ B の核移行と DNA 結合) を阻害した。さらに、Akt のリン酸化 (活性化) を阻害し、IL-1RI の増幅を抑制した。

### 【考察】

L-カルニチンはNF- $\kappa$ B 活性化を阻害し、iNOS や TNF- $\alpha$  mRNA の発現を抑制することにより、炎症時の肝保護を示す可能性が推察された。今後、肝障害動物モデル (*in vivo* 系) を用いて肝保護効果を確認したいと考える。