

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19790743

研究課題名（和文）Wilson病患者における肝障害発症機序の解明と治療

研究課題名（英文）Treatment and elucidation of generation mechanism of the liver trouble in Wilson's disease

研究代表者

藤澤 千恵 (FUJISAWA CHIE)

帝京大学・医学部・リサーチフェロー

研究者番号：10393000

研究成果の概要：

Wilson 病は肝臓に銅が蓄積することにより様々な障害を引き起こす。本研究では本症の肝障害の発症機構を明らかとし、将来的に肝障害への移行を予防する治療を検討する事が目的である。モデルラットを用いて検討した結果、生後早期から肝臓に銅が蓄積しミトコンドリア障害が誘導されていると考えられた。また、酸化ストレス制御機構が低下している可能性が示唆された。本研究結果から本症ではレドックス制御の正常化による治療効果の検討が必要であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：(1) Wilson 病 (2) 肝臓内銅濃度 (3) アポトーシス (4) ミトコンドリア損傷
(5) 肝臓組織学的検索 (6) LEC ラット

1. 研究開始当初の背景

Wilson 病は常染色体遺伝の先天性銅代謝異常症で、発症頻度は 3.5 万人に 1 人と高い。本症は銅輸送 ATPase (ATP7B) 遺伝子変異により、ATP7B が機能せず、肝臓からの銅分泌が障害され、肝臓に銅が蓄積する。本症では様々な臓器に銅が蓄積し、神経障害や腎障害をきたすが、これら臓器での銅蓄積は肝での銅蓄積による二次的な変化と考えられている。肝障害のタイプは症例により異なり、急性劇症型肝炎、慢性肝炎、肝硬変など様々な病態を

示す。また、神経型 Wilson 病でも銅は肝臓に著明に蓄積している。さらに、近年、長期にキレート薬などの本症治療を受けている患者でも徐々に肝硬変は進行したり、肝癌が発症しやすいと指摘されている。このように患者により肝障害の程度やタイプは様々である。しかしながら、今までの報告および私たちの研究では、肝障害と肝銅濃度とは相関せず、genotype と phenotype にも関連がない (Kodama H et al. Life Sci. 9: 899-907, 1997; Shimizu N. et al. No To Hattatsu. 28 (5): 391-397.

1996)。すなわち、肝障害のタイプが異なる理由は現在全く不明である。

一方、肝癌や肝障害発症の1機序として、細胞内の活性酸素種 ($\cdot O_2$, H_2O_2 , $\cdot HO$) 産生に伴う酸化ストレスとその消化機構であるレドックス制御の不均衡が報告されている (Zhan SS, et al. *Hepatology*. 43(3):435-443, 2006)。銅は遷移元素であるので、細胞内で過剰となった銅はフェントン反応により $\cdot HO$ を生じると考えられる。私は、本症患者肝細胞では蓄積銅により、活性酸素種が過剰に産生されているだろうと考えた。しかし、肝細胞内のどの小器官でどの活性酸素種が過剰かなどの検討は全くなされていない。さらに、近年、肝障害に活性酸素種とその消化酵素及び抗酸化物質のバランスが関与しているとの報告がなされている (Cazeczot H. et al. *Acta Biochim Pol* 53 : 237-242. 2006, Vail L. et al. *World J Gastroenterol* 12:1086-1091. 2006)。上記に述べた Wilson 病患者の肝障害の程度と銅蓄積量が相関せず、患者により症状が異なるのは、肝細胞での過剰銅により活性酸素種が増加し、増加した活性酸素種を消化するレドックス制御機能が患者により異なるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Wilson 病モデルラットである LEC ラットを用いて、肝障害の進行状況と細胞内活性酸素種産生量として酸化ストレスマーカー、抗酸化物質、ROS 消去酵素を定量測定することにより、酸化物質増加とレドックス制御機能の関連を以下の研究で明らかにする。さらに、肝障害を予防する適切な抗酸化物質を見つけることである。

3. 研究の方法

(1) 検体の回収

Wilson 病モデルラットである LEC ラット及びそのコントロールとして LEA ラットを各週齢経時的にサンプル回収した。血清は採血後遠心、使用まで $-80^{\circ}C$ にて保存した。各ラットは放血死後肝臓を摘出、銅濃度測定用、各種検査用に $-80^{\circ}C$ にて凍結保存した。また、ホルマリン固定を行い組織学的検索用に保存した。

(2) Agent

各種抗体は Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, GAPDH, Cytochrome c, caspase-3(Cell Signaling)、Cu/Zn SOD(assay designs)、Anti Hexanoyl-Lysine adduct(HEL)、Anti 4-Hydroxy-2-bibebal(4-HNE) (日研ザイル)を使用した。

(3) Wilson 病モデルラットにおける肝臓内銅濃度測定

急性肝炎を発症するといわれている生後 12 週齢より以前、特に組織学的に肝臓に障害が認められない 4 週齢以前の LEC ラットにおける肝臓内銅濃度測定を行った。肝臓は 20 mg 前後計量採取し、 $120^{\circ}C$ で乾燥した後再度計量し dry weight を算出した。乾燥したサンプルに濃硝酸 400 μl を添加し、 $120^{\circ}C$ で濃縮乾固した後、2N 硝酸 1 ml で希釈、原子吸光光度計にて銅濃度を測定した。

(4) 肝臓の組織学的検索

ホルマリン固定した肝臓をパラフィン包埋した後、4 μm の組織切片を作成した。組織切片は脱パラフィンした後、hematoxylin & eosin (HE) 染色にて病理組織学的判定を行った。

(5) アポトーシス細胞の検出

肝臓におけるアポトーシス細胞の検出を ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit(CHEMICON)にて行った。薄切した切片を脱パラフィンした後、20 mM Tris-HCl pH 9.0 にて抗原賦活化し、TdT enzyme で $37^{\circ}C$ 1 hr 反応させた。反応停止後 Digoxigenin-Fluorescein で蛍光反応させ観察した。

(6) Western Blotting

各濃度の肝臓蛋白質を 15%Tris-HCL SDS ゲルにて泳動後 PVDF membrane に transfer した。転写した membrane は 5%blockng agent(GE Healthcare)で 1hr ブロッキング後各濃度に希釈した 1 次抗体にて over night で反応させた。0.05% Tween-20 TBS Buffer にて洗浄後 2 次抗体を 1hr 反応させ、ECL Plus Western Blotting Detection System で X 線フィルムにて検出を行った。

(7) Western Blotting による活性型カスパーゼ、Cu/Zn SOD の検出

肝臓組織タンパクを NE-PER®Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (PIECE)にて抽出した。抽出したタンパクは BCA assay (PIECE)によりタンパク濃度を測定した後それぞれのタンパク濃度を Western Blotting に使用した。

(8) Western Blotting による cytochrome c の検出

肝臓組織からミトコンドリア分画を除いた細胞質における cytochrome c タンパクの検出を行った。ミトコンドリア分画以外の細胞質タンパクの抽出には Mitochondria Isolation Kit for Tissue (PIERCE)を用いた。抽出したタンパクは

BCA assay によりタンパク濃度を測定した後 100 μ g を Western Blotting に使用した。

(9) 肝臓組織における各種タンパクの検出
組織における各種タンパクの検出を TSA kit 蛍光抗体による免疫染色にて確認した。薄切した切片を脱パラフィンした後、20 mM Tris-HCl pH 9.0 にて抗原賦活化した。内因性因子をおさえる為 3% H_2O_2 で 1hr 処理を行い 1% Blocking Buffer にて blocking した後、blocking buffer にて希釈した 1 次抗体を over night 反応させた。1 次抗体除去後 HRP で 1 hr 反応させた後 tyramide にて蛍光発色させた。

(10) 血清におけるビタミン C の検出
各週齢のラット血清中ビタミン C をビタミン C 測定キット(日研ザイル)にて測定を行った。

(11) 血清、肝臓組織中における 8-OHdG の検出

血清及び肝臓組織中 8-OHdG 濃度の測定を高感度 8-OHdG Check(日研ザイル)を用いて測定した。肝臓組織の DNA 抽出は DNA エキストラクター TIS キット(和光純薬工業(株))を用いて行い、前処理には 8-OHdG 測定前処理試薬セット(和光純薬工業(株))を使用した。血清は Microcon YM-10(日本ミリポア社)で限界濾過した後使用した。

4. 研究成果

(1) 肝臓内銅濃度の推移

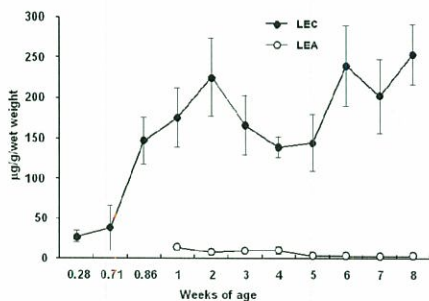


Figure 1. 肝臓内銅濃度

LEA ラットに比べ LEC ラットの肝臓内銅濃度は有意に高い値を示した。LEC ラットにおいては生後 2 日目から既に肝臓内銅濃度が高く、胎生期から既に肝臓に銅が蓄積していると考えられた。また、LEA ラットに比べ LEC ラットでは銅濃度に個体差が認められた。このことは 12 週齢付近で認められる急性肝炎により死亡する場合と慢性肝炎へと移行し肝硬変、肝臓癌となるという症状の違いに関与しているものと考えられた。

(2) 肝臓内組織学的検討

4 週齢までの LEC ラット肝臓において顕著な細胞障害の像は認められなかった。しかしながら apoptosis を起こした細胞は生後 1 週齢からすでに確認された (Figure 2)。LEC ラットにおける apoptosis 細胞は 12 週齢に著しく増加する事が報告されているが、生後まもなくから細胞が傷害され apoptosis が誘導されていると考えられた。

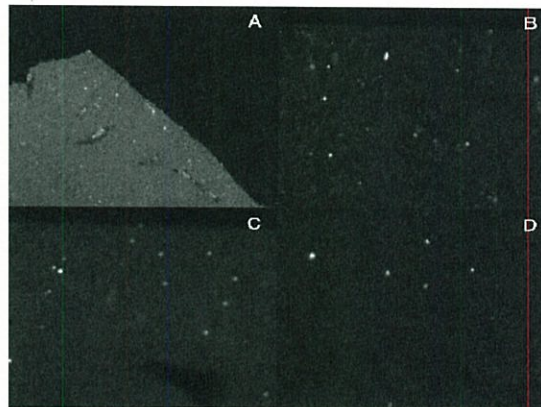
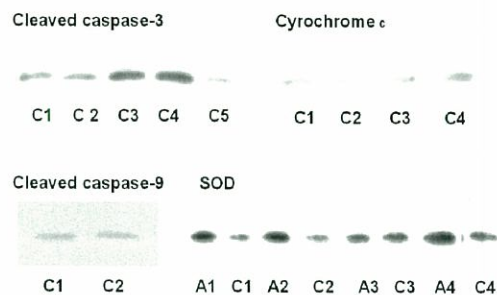


Figure 2 LEC ラット肝臓における apoptosis 細胞の検出 A, B; 1 weeks of age C, D; 2 weeks of age, A, C; x10, B, D; x400

(3) apoptosis 関連タンパクの検出

Figure 2 における LEC ラットの生後 1 週齢の apoptosis 誘導は肝臓内の銅の蓄積によるミトコンドリア障害によるものと考え、ミトコンドリア障害関連タンパクの検出を行った (Figure 3)。



A; LEA rat, C: LEC rat 数字は各週齢を示す

ミトコンドリアが傷害されるとミトコンドリアから放出される cytochrome c は LEC ラット肝臓において 1 週齢から確認された。また、cytochrome c により活性化されることにより生じる cleaved caspase-9 は LEC ラット 1, 2 週齢において認められた。更に LEC ラットでは caspase-3 の活性化型である cleaved caspase-3 が認められた。このような apoptosis 誘導タンパクは LEA ラットでは認められなかった。このことから LEC ラットでは出生後早期からミトコンドリア障害に

よる apoptosis 伝達経路が活性化し、apoptosis が誘導されていると考えられた。また、活性酸素種消化酵素である Cu/Zn-SOD タンパクの発現は LEA ラットと LEC ラットの各週齢で比較すると LEC ラットでは LEA ラットに比べタンパク量が低い事が確認された。このことから LEC ラットにおける酸化ストレス消去機構が低いもしくは早期から消去機構が働き通常より減少しているため十分に消去されず酸化ストレスが過剰となっていると考えられた。このことはミトコンドリアが酸化ストレスにより障害されている可能性が示唆された。

(4) 肝臓内における各種蛋白質の検出

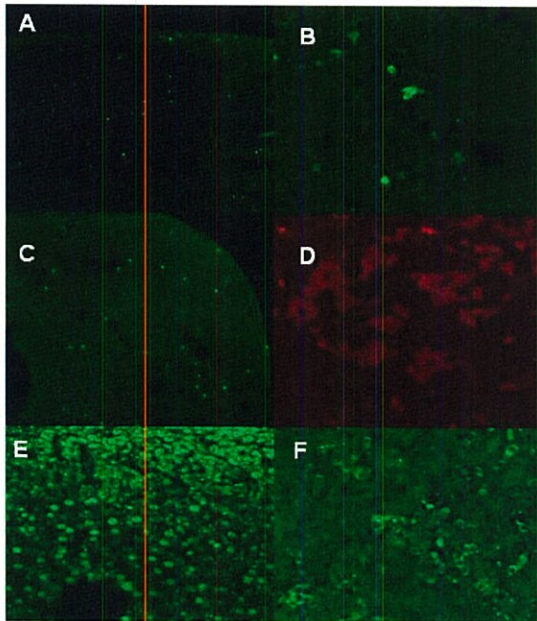


Figure 4
A,B: LEC rat 1wk of age, cleaved caspase-3 A: x100, B: x400
C: cleaved caspase-9, D: 4-HNE, E,F: Cu/Zn SOD
C,D: LEC rat 2day of age, E: LEA rat F: LEC rat

Western blotting で確認されたタンパクを蛍光染色にて確認した(Figure 4)。

Cleaved caspase-3 は 1 週齢から認められた(A, B)。また、Cleaved caspase-9 は生後 2 日から認められ、生後すぐにミトコンドリア障害が誘導されている可能性が考えられた(C)。酸化ストレス産物として産生される過酸化脂質分解物の 4-HNE もまた生後 2 日から認められ、酸化ストレスが早期から発生していると推測された(D)。Figure3 で認められたように Cu/Zn-SOD は LEC ラットは LEA ラットに比べその発現が低い事が確認された(E, F)。

(5) 肝臓内 8-OhdG の測定

Figure3, Figure4 から LEC ラット肝臓において酸化ストレスが発生していると考えられた事から活性酸素の作用により遺伝子 DNA 中のグアニン塩基が酸化損傷を受けることで生成される 8-OHdG の測定を行った(Figure5)。

活性酸素により起こる DNA 障害の生成物としての 8-OHdG は肝臓組織内では LEC ラットのほうが高い傾向が認められた。また、血清中の 8-OHdG 量は LEA ラット、LEC ラット間において差は認められなかった。LEC ラットにおける肝臓障害は個体差が認められるため、更なる検体の比較を行う必要がある。

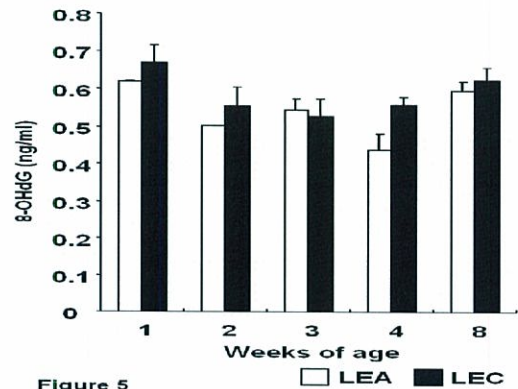


Figure 5

(6) 活性酸素消去機構としての Vitamin C の測定

生体内には様々な活性酸素消去機構が存在する。Vitamin C は抗酸化作用を持ち、更に体内に摂取可能であることから血清中の Vitamin C 濃度の比較検討を行った(Figure6)。

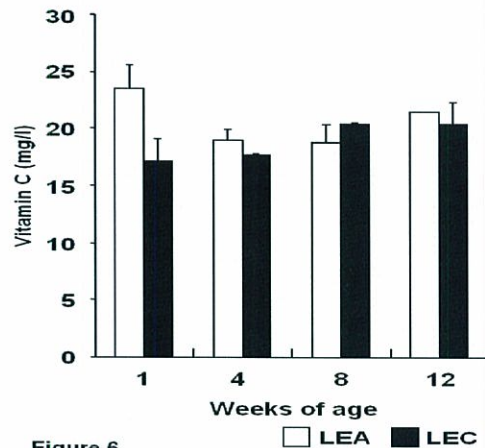


Figure 6

生後 1 週齢の肝臓中 Vitamin C 濃度は LEA ラットに比べ LEC ラットのほうが低い傾向が認められた。このことは LEC ラットにおける抗酸化作用が低いもしくは消去機構が動き Vitamin C が使われている可能性が示唆された。今後検体数を増やし更なる検討が必要であると考えられる。また、Vitamin C は摂取が可能である事から Vitamin C 摂取による抗酸化作用の向上について検討する必要がある。

(7) 総括

本研究では Wilson 病モデルラットである LEC ラットを用いて肝障害発症以前の生後

早期における肝細胞障害についての検討を行った。肝炎発症にはミトコンドリア障害を中心とした肝細胞障害が関与しているものと考えミトコンドリア障害関連タンパクについて調べたところミトコンドリア障害により誘導される apoptosis 関連タンパクの発現が LEC ラットでは生後まもなくからその発現が確認された。また、生後早期から肝臓内に銅の蓄積が認められることから銅による酸化ストレスがミトコンドリア障害の引き金になっている可能性が示唆された。また、酸化ストレスに対する消去機構の役割を有する Cu/Zn SOD 及び Vitamin C が LEC ラットにおいて低かった事からレドックス制御が不十分の為肝障害が起こりやすい環境となっていると考えられた。銅の蓄積と肝障害の関連については更なる検討が必要であるが今後はこれらレドックス制御を早期の内に正常化することにより後に起こる肝炎の予防をする事を検討する必要があると思われる。

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)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤澤 千恵 (FUJISAWA CHIE)
帝京大学・医学部・リサーチフェロー
研究者番号：10393000

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者