

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 24 年 5 月 27 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591137

研究課題名（和文）Wilson 病の肝癌発症の機序とその予防

研究課題名（英文）The mechanism of liver cancer onset in Wilson disease and its prevention

研究代表者

児玉 浩子（KODAMA HIROKO）

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00093386

研究成果の概要（和文）：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。近年、本症患者で肝がん発症の報告が散見している。本研究の目的は、本症の肝障害の発症機構を明らかにし、その予防方法を開発することである。モデルラットを用いた検討の結果、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ことが明らかになった。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。更に、本症患者体内の酸化ストレスプロファイル（OSP）を解析した結果でも、ある種の脂溶性抗酸化物質の血清値が低下している傾向が認められた。OSP 解析プロットでは、本症患者の約半数が酸化ストレス予防能の低い「低活性ゾーン」におり、これらの抗酸化物質の摂取で体内の抗酸化能を改善し、肝障害の進行及び肝がん発症を予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Wilson disease (WD) causes various disorders by copper accumulation in the liver. The purpose of this study is to elucidate the onset mechanism of the liver damage including carcinogenesis in WD, and get the knowledge about its prevention. Using the model rat, it was revealed that copper accumulated and a mitochondrial disorder was induced in the liver from an early stage after birth, in addition, oxidative stress could not be controlled normally. Furthermore, the results of oxidative stress profile (OSP) analysis of the WD patient bodies suggested that a serum level of the certain fat-soluble antioxidants were decreasing, and about half of the patients are in the low active zone which means to have low antioxidant ability. These results suggested that the treatment with these antioxidants might prevent the progress of hepatic disorders including carcinogenesis in WD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：Wilson 病、銅、LEC ラット、酸化ストレス、肝癌、予防

1. 研究開始当初の背景

Wilson 病は常染色体劣性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。本症では銅輸送 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。さらに様々な臓器 (脳、腎臓など) に銅が蓄積し、神経障害や腎障害をきたす。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。治療としてキレート薬や亜鉛が有効で、長期生存例も多くなっている。近年、本症患者で、治療が有効になされているにも関わらず、肝細胞がん発症の報告が相次いでいる。また、Wilson 病モデルラットである LEC ラットは高率に肝細胞がんを発症する。近年、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。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。私たちは、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、その病態が肝機能障害・肝がん発症に関与しているとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LEC モデルラットを用いて、Wilson 病と酸化ストレス、肝機能障害・肝がん発症の関連を解明することである。更に、本症患者における酸化ストレスマーカー、抗酸化物質の変動についても解析し、予防・治療方法についての知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 検体のサンプリング

Wilson 病モデル LEC ラット及びコントロールとしての LEA ラットの血清及び臓器を経時的にサンプリングした。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。帝京大学小児科で採取された本症患者の血清及び尿は $-80^\circ C$ にて凍結後、酸化ストレスプロファイル解析のため、日研ザイルに送られた。

(2) 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 $400 \mu l$ を添加し、 $120^\circ C$ で分解、乾固した後、2N 硝酸 1 ml に溶解して稀硝酸溶液とし、原子吸光光度法にて銅濃度を測定した。

(3) 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%blocking 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。

(4) 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 (PIERCE) にて抽出した。抽出したタンパクは BCA assay (PIERCE) 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。

(5) 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 $100 \mu g$ を Western Blotting に使用した。

(6) 肝臓組織における cleavedcaspase-3 の検出

作成した切片を脱パラフィンした後、免疫組織染色 (酵素抗体法) により標的タンパク質を検出した。

(7) ラット血清中のビタミン C 及び A 濃度の測定

各週齢の LEC、LEA ラット血清中ビタミン C 及び E 濃度は日研ザイルに依頼して測定した。

(8) 本症患者における酸化ストレスプロファイルの解析

酢酸亜鉛製剤治療を継続している本症患者（8名）、及び健常者（2名）の血清および尿を採取し日研ザイルに依頼して、酸化ストレスプロファイル(OSP)を解析した。

4. 研究成果

(1) 肝臓内銅濃度の推移

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1週間未満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可能性が示唆された (Fig. 1)。今回の分析では、LEA ラットでも生後2週目あたりまで比較的高い肝臓内銅濃度を示した。LEA ラットに比べLEC ラットでは銅濃度の個体差が大きく、個体による銅蓄積の度合いの違いを反映していると考えられた。

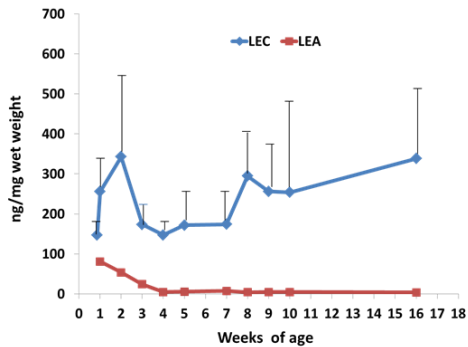


Fig. 1 肝臓組織内銅濃度

(2) ラット肝臓中の apoptosis 関連タンパク質の検出

肝臓に蓄積した銅がフェントン反応により活性酸素種を賛成し、ミトコンドリアを傷害すると考えアポトーシス関連タンパク質の検出を行った。ミトコンドリアが傷害された際、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 (Fig. 2a)。更に LEC ラットでは caspase-3 の活性型である cleaved caspase-3 が認められた (Fig. 2b)。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下していることが確認され

た (Fig. 2c)。

更に、組織学的検討においても、LEC ラット肝臓で cleaved caspase-3 タンパク positive 細胞が認められ、確認することができた (Fig. 3)。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を示唆している。

LEC ラットにおいて酸化ストレス消去機構が低い可能性、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可能性が考えられた。

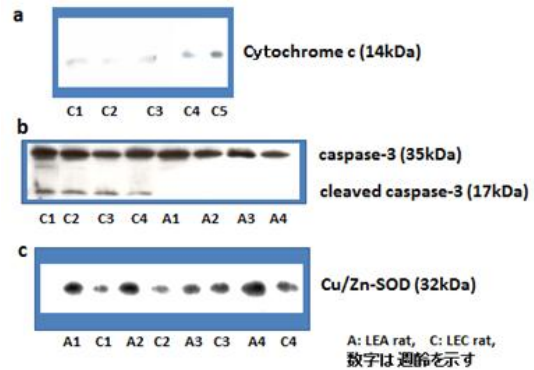


Fig. 2 cytochrome c, caspase-3, Cu-Zn SODの検出



Fig.3 肝臓組織中cleaved caspase-3

(3) ラット血清中ビタミンC (水溶性抗酸化物質) 濃度

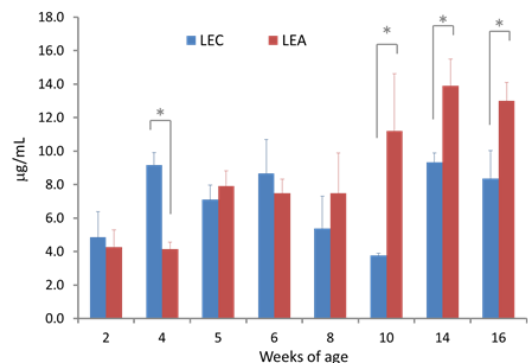


Fig.4 Vitamin C濃度

* p<0.05

生体内には様々な活性酸素消去機構が存在する。Vitamin C は水溶性ビタミンで抗酸化作用を持ち、更に容易に摂取可

能であることから、ラットの検体数を増やして、血清中の Vitamin C 濃度を比較検討した(Fig. 4)。今回の検討では、LEA ラットに比べ LEC ラットで 4 週齢で有意に高値を示したが、その後 10 週齢まで低下する傾向にあった。また、10 週齢以降、LEA ラットと比較して有意に低値を示した。

(4) ラット血清中のビタミン E (脂溶性抗酸化物質) 濃度

ビタミン E は脂溶性抗酸化物質に分類され、ビタミン C・B 群や脂質の酸化を防ぎ、細胞膜を活性酸素による酸化から守る作用がある。LEC ラット血清中ビタミン E 濃度は、LEA ラットと比較して 14, 16 週齢で有意に低値であった。また、LEC ラットで、週齢とともにその濃度が低下する傾向が認められた(Fig. 5)。LEC ラットでは週齢とともに酸化ストレスが過剰となって、ビタミン E などの主要な抗酸化物質が過剰に消費され、抗酸化能が低下している可能性が示唆された。

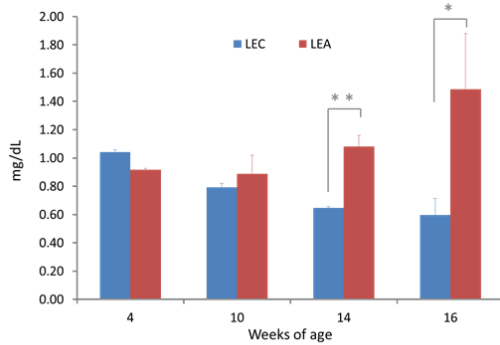


Fig.5 Vitamin E濃度

(5) Wilson 病患者での酸化ストレスプロファイルの解析

酢酸亜鉛製剤治療を続けている 8 名の本症患者及び 2 名の健常人の血清・尿を採取し、酸化損傷、酸化前駆因子、水溶性・脂溶性抗酸化物質などを分析し、酸化ストレスプロファイル(OSP)を解析した(日研ザイル)。血清中ビタミン C 濃度は健常人平均値(日研ザイル)と比較して半数の患者で高めの値を示した。一方、 α -トコフェロール(ビタミン E)濃度は、健常人平均値と比較して、すべての本症患者で低い傾向を示した。今回は 2 名の健常人の α -トコフェロール値も低めであった。さらに、脂溶性抗酸化物質に分類される「ルテイン+ゼアキササンチン」の血清値は、6 名の本症患者で健常人平均値と比較して低い傾向を示し、平均値で比較すると 2 名の健常人の値の 1/2.5(36.5%)であった。

さらにコントロールも含めて検体数を増やし詳細に検討する必要がある。

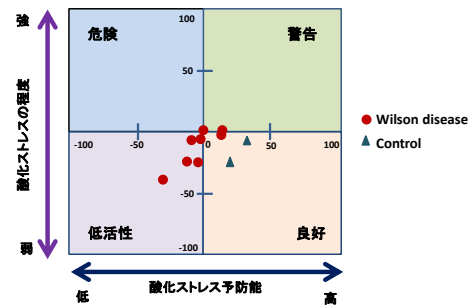


Fig.6 酸化ストレス評価プロット(日研ザイル)

全体の酸化ストレス評価プロットを Fig.6 にまとめた。2 名の健常人(コントロール)が「良好ゾーン」に在るのに対し、本症患者の半数が「低活性ゾーン」に在り、体内の酸化ストレス予防能が低い傾向にあることが示唆された。

(6) 総括

Wilson 病モデル LEC ラットでは肝障害発生前に、出生後早期から、ミトコンドリア障害によるアポトーシスが出現していることが示唆された。また、抗酸化作用のあるビタミン E の血清値が経時的に減少する傾向が認められた。

更に、酢酸亜鉛製剤治療を続けている本症患者(8名)及び健常人(2名)の血清および尿を採取し日研ザイルに依頼して、酸化ストレスプロファイル(OSP)を解析した。その結果、本症患者において、脂溶性抗酸化物質であるルテイン+ゼアキササンおよび α -トコフェロール(ビタミン E)値が、健常人平均値(日研ザイル)より低値である傾向が認められ、体内の抗酸化能が低下している状態であると考えられた。本症患者で血清中 α -トコフェロール(ビタミン E)値が低い傾向は、LEC ラットでの結果と一致している。さらに、OSP 解析プロットでは、本症患者の約半数が酸化ストレス予防能の低い「低活性ゾーン」に在り、抗酸化物の摂取などで抗酸化能を改善できる可能性、すなわち本症患者にルテイン、ゼアキササンチン、ビタミン E を投与することの有効性が示唆された。

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4件）

- ①Hiroko Kodama, Chie Fujisawa, Wattanaporn Bhadrprasit, Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment, Current Drug Metabolism, 査読有、Vol. 13, 2012, pp. 237-250
- ②神田隆、児玉浩子、廣瀬源二郎、ウィルソン病100年、BRAINE and NERVE: 神経研究の進歩、査読無、64巻、2012、1035-1046
- ③児玉浩子、【小児・思春期診療 最新マニュアル】(4章) よくみられる疾患・見逃せない疾患の診療、代謝・内分泌疾患、ウィルソン病、日本医師会雑誌、査読無、141巻、2012、S243-S244
- ④児玉浩子、先天性銅代謝異常症の進歩と課題、脳と発達、査読無、44巻、2012、107-112

〔学会発表〕（計1件）

- ①児玉浩子、神経障害をきたす先天性代謝異常症、診断・治療の Update、Wilson 病、Menkes 病治療の最近の進歩、第54回日本小児神経学会総会、2012.5.17~5.19、札幌

〔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

児玉 浩子 (KODAMA HIROKO)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：00093386

(2) 研究分担者

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

(3) 研究協力者

廣木伴子 (HIROKI TOMOKO)
帝京大学・医学部・研究員