

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460672

研究課題名(和文) ELISA法を用いた生体内メタロチオネイン- / 及び- 測定の基礎的検討

研究課題名(英文) Study of determination of metallothionein (MT) - 1/2 and MT-3 in human and experimental animal with ELISA

研究代表者

中里 享美 (Nakazato, Kyomi)

群馬大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：80241909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新たに開発したメタロチオネイン(MT)- 測定ELISAは、ヒト血清測定時に不安定な非特異反応がみられたため、再検討を行ったが未だ解決に至っていない。MT- / 抗体及びMT- / 測定ELISAやMT- 抗体を用いた検討では、NASH肝においてMT- / の有意な発現低下が認められた。前立腺がん患者では健常者に比べて血中、尿中ともにMT- / 値が有意に高値となった。ウィルソン病・メンケス病においても、モデル動物、患者ともに血中MT- / 値が有意に高値となり、早期診断のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed a new competitive ELISA for determination of metallothionein (MT)- . However, it was more difficult to measure MT- in human serum, and further efforts to improve the assay system for MT- determination in serum is now undergoing in our laboratory. In the study using MT- / antibody and ELISA, the MT- / level was significantly reduced in the liver with NASH compared with NAFLD and control. The serum and urine MT- / levels in prostate cancer patients were significantly higher than healthy controls. The serum MT- / levels in Wilson's disease and Menkes disease patients were significantly higher than healthy controls, and similar result was found in LEC rat (model animal of Wilson's disease) and Macular mouse (model animal of Menkes disease). In conclusion, the measurement of serum MT- / is suggested to be a potentially useful diagnostic tool in patients with some diseases, particularly Wilson's disease or Menkes disease.

研究分野：臨床検査学(臨床化学・病理学)

キーワード：メタロチオネイン- / メタロチオネイン- 前立腺がん ウィルソン病 メンケス病

1. 研究開始当初の背景

メタロチオネイン (MT) は、その構成アミノ酸の約 1/3 をシステインが占める特異な低分子量 (6,000~7,000) の金属結合蛋白質であり、ヒトなどの哺乳類では 4 種のアイソフォーム (MT⁻、⁻、⁻、⁻) が存在する。この中でも主要なアイソフォームである MT⁻、⁻ は肝・腎をはじめ全身の種々の臓器に存在し、有害重金属の解毒や必須微量元素の代謝調節を行い、様々なストレスにより生じるフリーラジカルの消去作用などの抗酸化作用、細胞の増殖・分化、化学発がんの防御などに関与することが知られている (1-3)。また、MT⁻ は主に脳に存在し、神経突起の成長抑制、亜鉛代謝などに関与し、アルツハイマー病との関連も示唆されている (4-6)。したがって、これら MT の局在やアイソフォーム間の相互作用、動態を明らかにすることは様々な疾患の病態解明にも有用と考えられた。

しかしながら、一般的に行われていた MT 蛋白質の測定法は、細胞や組織を用いた免疫染色やウェスタンブロット法、原子吸光、ICP-MS を用いた Cd-hem 法などであり、これらは測定感度や測定法の煩雑さなどから、MT 蛋白質量の発現や生理学的役割を検討するには不向きであった。特に、MT⁻ に関しては、MT⁻ 蛋白質の定量法がなかったため、RT-PCR による mRNA の検出や免疫染色による局在性の検討のみで (7-9) MT⁻ とアルツハイマー病との関連が強く示唆されながらもその研究は遅れていた。

2. 研究の目的

我々は、これまでに新たな抗 MT⁻ / ポリクローナル抗体とその抗体を用いた高感度 MT⁻ / 測定 ELISA 法を独自に開発し (10) マウス・ラットにおける MT⁻ / の生体内動向について研究、報告してきた (11)。今回、新たに抗 MT⁻ モノクローナル抗体を作製し、本抗体を用いた MT⁻ 測定 ELISA 法を開発した。そこで、これらの抗 MT⁻ / 抗体と抗 MT⁻ 抗体による免疫染色法及びそれぞれの ELISA 法を用いて、様々な臓器、特に肝臓、腎臓、脳などにおける MT⁻ / 及び MT⁻ の発現や誘導能の違い、相互作用などについて検討を行うこととした。

本研究において、MT⁻ / 及び MT⁻ の発現や誘導について ELISA 法と免疫染色法を用いて解析することにより、アルツハイマー病を含む中枢神経系疾患や悪性腫瘍等様々な病態と MT の役割との関係がより明確になることが期待される。同時に、このような臨床的意義を持つ MT の測定が、将来、アルツハイマー病等の診断指標の一つとして臨床検査項目となることも期待される。

3. 研究の方法

(1) 生体試料 (組織・血液) 中の MT⁻ 測定 ELISA 法の確立: 独自に開発した MT⁻

測定 ELISA について、動物組織 (肝・腎・脳) やヒト血清などの生体試料を用いた測定のための前処理法や測定条件を検討する。さらに、これら試料を用いた ELISA 測定法と PCR 法の結果を比較検討して、生体試料での ELISA 測定法の確立を目指す。

(2) 免疫染色による組織内の MT⁻ 局在と ELISA による MT⁻ 測定値の比較検討: MT⁻ / または MT⁻ ノックアウトマウスやアルツハイマー病モデルマウス等の実験動物の組織 (肝・腎・脳) を用いて、組織の MT⁻ 免疫染色と ELISA による組織中の MT⁻ 測定を行い、両者の結果を比較検討する。

(3) 免疫染色及び ELISA 法による MT⁻ / と MT⁻ の発現の違いの検討: (2) で用いた実験動物の試料について、以前に開発した MT⁻ / 抗体とその抗体を用いた高感度 MT⁻ / 測定 ELISA 法により MT⁻ / の組織内局在や発現を測定し、MT⁻ 発現との違いを比較検討する。また、様々な疾患の患者試料 (血清・尿など) の MT⁻ / 及び MT⁻ 値を ELISA 法により測定、発現の違いを比較検討する。

4. 研究成果

(1) 生体試料 (組織・血液) 中の MT⁻ 測定 ELISA 法確立のための検討: 独自に開発した MT⁻ 測定 ELISA 法で行った野生型 (正常コントロール) 及び MT⁻ / ノックアウト、MT⁻ ノックアウトマウスの肝、腎、脳の組織中 MT⁻ 測定では、肝、腎の MT⁻ 含有量はいずれのマウスも低値で有意差はみられなかったが、脳の MT⁻ 含有量は MT⁻ ノックアウトマウスで野生型や MT⁻ / ノックアウトマウスに比べて有意な低値を示した (図 1)。

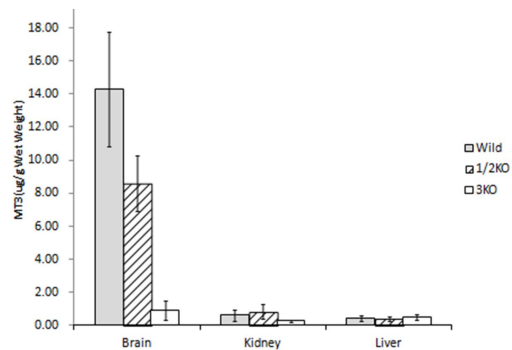


図 1 ELISA 法で測定した野生型 (Wild) MT⁻ / ノックアウト (1/2KO) MT⁻ ノックアウトマウス (3KO) マウスの MT⁻ 濃度

次に、血清での MT⁻ 測定の検討を行ったが、マウスなどの動物血清に比べてヒト血清では希釈系列が直線にのらないなどの不安定で非特異的な反応がみられた。そのため、血清中で MT と結合し、ELISA による測定に影響していると考えられる物質について、

メガリン等いくつかの候補物質のMTとの結合、含まれる分画などを分析し、検討を行ったが、問題の解決には至らなかった。そこで、これらの物質の影響を受けにくい新たな抗MT-抗体の作製とその抗体を用いたELISA法の開発に向けた検討を行っている。

(2) ヒト脂肪肝における免疫染色によるMT- / とMT- の発現の検討: 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) 及び正常部のヒト肝生検組織のMT- / 及びMT- 免疫染色を行った。MT- / とMT- とでは明らかに異なる染色性を示し、MT- / ではNASHは他の脂肪肝や正常肝に比べて、その陽性率が有意に低値であった(図2)。MT- では染色性に有意差はみられなかった。本結果から、NASHにおいてはMT- / が病態のマーカーとなり得る可能性が示唆された。

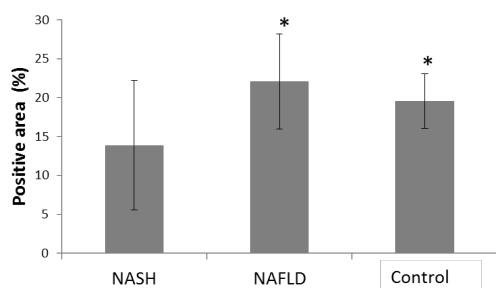


図2. 肝生検組織のMT- / 免疫染色の陽性率 (*: 有意差あり、 $p < 0.05$ vs NASH)

(3) 前立腺がんにおけるMT- / 及びMT- 発現の検討: 前立腺がん生検組織のMT- / 及びMT- 免疫染色と同患者の血中、尿中MT- / 濃度の測定を行った。前立腺がん組織ではMT- / 陽性率とPSA陽性率との正の相関が認められたが、非がん部組織では相関はみられなかった。MT- 免疫染色では、本生検例で有意な発現はみられなかった。また、ELISA法によるMT- / 測定では、前立腺がん患者は健常者に比べて、血中、尿中ともにMT- / 値が有意に高値となる結果が得られた。

(4) ウィルソン病・メンケス病におけるMT- / 及びMT- 発現の検討: 先天性銅代謝異常症であるウィルソン病とメンケス病それぞれのモデル動物であるLECラットとマクラマウスを用いて、MT- / 及びMT- 発現の検討を行った。免疫染色において、LECラット肝でMT- / 、MT- とともに正常コントロールラットに比べて有意に高い陽性率を示し、LECラット脳でMT- / が正常コントロールラットに比べて有意に低い陽性率を示した。マクラマウスでは、肝のMT- / と腎のMT- / でメンケス病治療薬剤投与群が非投与群に比べて有意に低い陽性率を示した。ELISA法によるMT- / 測定値は、LECラットの肝、腎、血清で正常コントロールラ

ットに比べて有意な高値を示した。マクラマウスは小脳で正常コントロールマウスに比べて有意な低値を示し、腎及び血中濃度では有意な高値を示した。マクラマウス腎のMT- / 値は、薬剤投与群 (MAC) で非投与群 (MAC-N) に比べて有意に低下していた(図3)。

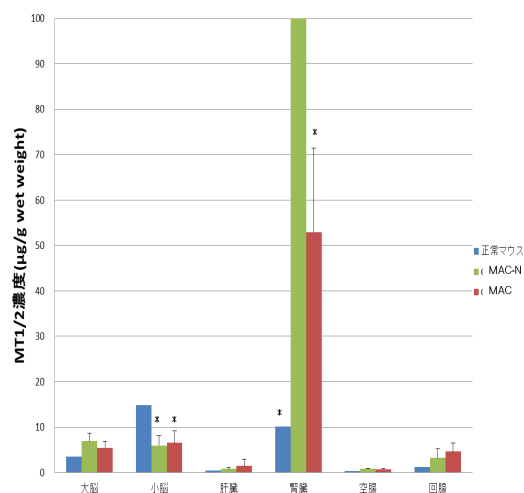


図3. ELISA法によるマクラマウス臓器のMT- / 測定値 (*: 有意差あり、小脳 $p < 0.05$ vs 正常マウス、腎臓 $p < 0.05$ vs MAC-N)

LECラットとマクラマウスの免疫染色では、MT- / 、MT- の局在とMT受容体の一つと考えられるメガリンの局在との関連についても検討を行った。LECラット、マクラマウスともに、腎ではMT- / とメガリンは尿管上皮に局在し、発現も強く、良く一致していたが、肝や脳では強い関連性はみられなかった。MT- / はいずれの組織でもメガリンとの関連性はみられなかった。

さらに、ウィルソン病とメンケス病患者の血清MT- / 値をELISA法で測定した。ウィルソン病及びメンケス病患者では、血中MT- / 値は有意に高値を示した。特に、メンケス病患者においては、血清銅、亜鉛、セロプラスミン値に異常値を示さなかった患者でも血清MT- / 値は健常者に比べて有意に高値を示し、血中MT- / 値測定がメンケス病の早期診断のマーカーとしても有用である可能性が示唆された。

【参考文献】

- (1) Kagi JHR, Nordberg M. Metallothionein: Birkhauser Verlag, 1979
- (2) Satoh M. et al. Biomed Res Trace Elem 11:138-144, 2000
- (3) Satoh M. et al. Free Radic Biol Med 14: 325-337, 1993
- (4) Uchida Y. et al. Neuron 7:337-347, 1991
- (5) Palmiter RD. et al. Proc Natl Acad Sci USA 89:6333-6337, 1992
- (6) Hidalgo J. et al. Exp Biol Med 231: 1450-1458, 2006

- (7) Erickson JC. Et al. Neurosci 17: 1271-1281, 1997
 (8) Pang LY. Et al. J Biochem Mol Biol 38: 646-649, 2005
 (9) Haung UW. Et al. Brain Research 894: 37-45, 2010
 (10) Nakajima K. et al. Clinica Chimica Acta 411:758-761, 2010
 (11) Nakazato K. et al. J. Toxcol. Sci. 37: 169-175, 2012

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 2 件)

Kyoumi Nakazato, Satoru Tomioka, Katsuyuki Nakajima, Hidetoshi Saito, Mihoko kato, Tsukasa Kodaira, Shin-ichi Yatsuzuka, Younosuke Shimomura, Tomoko Hiroki, Kahoko Motoyama, Hiroko Kodama, Takeaki Nagamine, Determination of the serum metallothionein (MT) 1/2 concentration in patients with Wilson's disease and Menkes disease. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 28, 査読有, 2014, 441-447
 Hiromi Ono, Akira Tanaka, Kyoumi Nakazato, Yutaka Hasegawa, Ke Ih Kim, Soo Ryang Kim, Katsuyuki Nakajima, Takeaki Nagamine, Stress-induced Biomarkers in Liver with Non-alcohol Fatty Liver Diseases and Non-alcohol steatohepatitis. THE KITAKANTO MEDICAL JOURNAL 64, 査読有, 2014, 13-22

〔学会発表〕(計 8 件)

中里享美、齋藤秀俊、加藤美穂子、小平司、宮川誠、廣木伴子、児玉浩子、近藤宏樹、岡村隆行、中嶋克行、長嶺竹明、LEC ラット (Wilson 病) 及び Macular マウス (Menkes 病) 臓器におけるメタロチオネイン (MT) 受容体 Megalin と MT-1/2 並びに MT-3 の局在の検討、メタルバイオサイエンス研究会 2015、2015 年 8 月 27 日、名古屋国際センター ホール (愛知県名古屋市)
齋藤秀俊、加藤美穂子、宮川誠、廣木伴子、児玉浩子、近藤宏樹、岡村隆行、町田哲男、中嶋清美、角野博之、村上正巳、中里享美、中嶋克行、長嶺竹明、ウィルソン病患者および LEC ラット検体のメタロチオネイン濃度の測定とその生化学的性状、メタルバイオサイエンス研究会 2015、2015 年 8 月 27 日、名古屋国際センター ホール (愛知県名古屋市)
中里享美、齋藤秀俊、加藤美穂子、小平司、宮川誠、廣木伴子、児玉浩子、近藤宏樹、岡村隆行、中嶋克行、長嶺竹明、

LEC ラット肝臓、腎臓、脳におけるメタロチオネイン (MT) 受容体 Megalin と MT-1/2 並びに MT-3 の局在の検討、第 26 回日本微量元素学会学術集会、2015 年 7 月 4 日、北海道大学 (北海道札幌市)
齋藤秀俊、加藤美穂子、宮川誠、廣木伴子、児玉浩子、近藤宏樹、岡村隆行、町田哲男、中嶋清美、角野博之、村上正巳、中里享美、中嶋克行、長嶺竹明、ウィルソン病患者および LEC ラット検体の Metallothionein 濃度の測定、第 26 回日本微量元素学会学術集会、2015 年 7 月 4 日、北海道大学 (北海道札幌市)
中里享美、中嶋克行、熊坂文成、加瀬嘉明、山中英壽、黒澤功、齋藤秀俊、小平司、長嶺竹明、前立腺組織におけるメタロチオネイン (MT) 発現と血中及び尿中 MT 濃度の比較検討、第 25 回日本微量元素学会学術集会、2014 年 7 月 3 日、岡山大学 (岡山県岡山市)
Katsuyuki Nakajima, Hidetoshi Saito, Tsukasa Kodaira, Kyoumi Nakazato, Satoru Tomioka, Takeaki Nagamine, Enzyme-linked immunosorbent assay for metallothionein- in humans and experimental animals. 第 10 回国際微量元素学会、2013 年 11 月 19 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
Takeaki Nagamine, Satoru Tomioka, kyoumi Nakazato, Katsuyuki Nakajima, Hiroko Kodama, Plasma metallothionein / in liver diseases. 第 10 回国際微量元素学会、2013 年 11 月 19 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
富岡智、中里享美、中嶋克行、小平司、児玉浩子、長嶺竹明、メンケス病モデル動物マクアラマウスにおける血中並びに組織中の MT1/2 濃度について、メタルバイオサイエンス研究会 2013、2013 年 9 月 26 日、静岡県立大学 (静岡県静岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中里 享美 (NAKAZATO, Kyoumi)
 群馬大学・大学院保健学研究科・准教授
 研究者番号：80241909

(2) 研究分担者

中嶋 克行 (NAKAJIMA, Katsuyuki)
 群馬大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
 研究者番号：10444051

長嶺 竹明 (NAGAMINE, Takeaki)
 群馬大学・名誉教授
 研究者番号：90180520