

氏名(本籍)	菅野 さな枝 (千葉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,287号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	銅代謝に関するメタロチオネインの役割
主査	筑波大学教授 医学博士 村上正孝
副査	筑波大学教授 医学博士 中井利昭
副査	国立環境研究所 農学博士 三浦卓 環境健康部長(筑波大学併任教授)
副査	筑波大学教授 医学博士 山下亀次郎
副査	筑波大学助教授 医学博士 目崎登

論文の要旨

〈目的〉

銅(Cu)は生体に必須な微量元素であり、生命維持に重要な生理的役割を担っている。その一方で、過剰なCuは強い毒性を示すため、生体におけるCuの恒常性は、厳密な機構により制御されていると考えられる。過剰のCuが肝臓中に取り込まれた場合には、低分子量の金属結合タンパク質であるメタロチオネイン(MT)を誘導し、それに結合することによってCuの毒性を防御することが知られている。MTの生物学的役割については、必ずしも明らかでないが、肝臓のCu代謝に関与していることが推定される。

本研究では、Cu代謝疾患であるWilson病のモデル動物として確立されたLEC(Long-Evans Cinnamon)ラットを実験に用いて、LECラットの銅の異常蓄積の要因、及び発症機構の解明を通じて、肝臓におけるCu代謝の制御機構にMTがどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

〈実験方法〉

I. LECラットの肝臓へのCuの異常蓄積と肝炎発症の相関性

LECラットを2週齢から肝炎発症まで経時的に屠殺し、肝臓へのCuの蓄積過程及び存在形態を調べた。さらに急性肝炎の発症過程におけるそれらの変化も調べた。

II. LECラットとLEAラットのメタロチオネイン合成の誘導能の比較

1) LECラットの野性型であるLEA(Long-Evans Agouti)ラットに塩化銅を連続皮下投与し、肝臓

中の Cu 濃度を LEC ラットと同じレベルまで増加させ、Cu の存在形態及び MT mRNA の発現量を比較した。

2) Cu のキレート剤であるテトラチオモリブデートを LEC と LEA ラットに連続腹腔内投与し、MT に結合している Cu を除去した。それらのラットから初代培養系肝実質細胞を分離した後、塩化銅を 1.25~25 μ M の濃度で暴露し、細胞内への Cu の取り込み量と MT mRNA の発現量を LEC と LEA ラットで比較した。また Cu 以外の MT 合成の誘導剤として知られているカドミウム (Cd)、亜鉛 (Zn) やグルココルチコイドを暴露し、MT mRNA の発現量を比較した。

〈結果〉

I. LEC ラット肝臓中では、黄疸の症状がでるまでは Cu は次第に蓄積し、この Cu は MT に結合し無毒化された状態で存在していた。しかし、Cu の蓄積がさらに増加すると、MT では捕捉されない Cu が遊離し、MT や Cu-Zn 酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 以外の高分子量タンパク質に非特異的に結合するようになり、急性肝炎を発症した。肝臓中の Cu 濃度が約 250 から 300 μ g/g まで蓄積すると急性肝炎を発症した。

II. 1) LEA ラットに Cu を投与することにより、肝臓内に LEC ラットとほぼ等しい濃度の Cu を蓄積し得るにもかかわらず、LEA ラットの肝臓中で合成された MT の量は、LEC ラットに比較すると非常に少なく、また MT mRNA の発現量も少量であった。

2) 肝実質細胞に Cu を暴露すると、LEC と LEA ラットの肝実質細胞内にはほぼ同じ濃度の Cu が取り込まれたにもかかわらず、LEC ラット肝臓では LEA に比べ常に MT mRNA の発現量が 2 倍以上多かった。それは低濃度の Cu を暴露した際に顕著であった。また、Cd、Zn やグルココルチコイド暴露では、LEC と LEA ラットの MT mRNA の発現量に差がなかった。

〈考察〉

これまで、LEC ラット肝臓中の Cu 異常蓄積の要因として様々な推定がなされてきたが、本研究により、LEC ラット肝臓中において MT 合成の誘導能が高いことが原因である可能性が初めて示された。LEC ラットの肝臓中に Cu が異常蓄積する機構として、1) MT の過剰合成により、2) 肝細胞内に取り込まれた Cu が MT に捕捉されてしまい、3) MT に捕捉された Cu は細胞外に流出できないために、4) Cu の異常蓄積が起こることが示唆された。さらに Cu の蓄積が増加すると MT では捕捉できない Cu イオンが増加し、これが細胞毒となり、急性肝炎を引き起こすことが示唆された。また、Cu 以外の MT 合成の誘導剤では LEC と LEA ラット由来の肝実質細胞では MT mRNA の発現量はほとんど差がないことより、LEC ラットにおける高い MT 合成の誘導能は Cu に特異的であることが示唆された。MT は、重金属の解毒作用を持つ生体防御タンパク質の役割だけでなく、肝臓内の Cu 濃度を決定する重要な因子であることが示された。

審 査 の 要 旨

本研究は、近年、肝炎、肝癌、Wilson 病の実験モデル動物として開発された LEC (Long-Evans

Cinnamon)ラットを用いて、その動物の肝臓中へのCuの異常蓄積の経過を検討し、その原因に金属結合タンパク質であるメタロチオネイン(MT)がどのようにかかわっているかを解明する目的で行われた。この研究の評価すべき点の一つは、Cu代謝疾患動物として確立されたばかりのLECラットを用いて、Whole body、さらに初代培養系肝実質細胞系のレベルで、きわめて周到な手順で実験が遂行されており、その事実確認について異議の出ようがないこと。第二点は、LECラットの肝臓中へのCuに異常蓄積の原因としてMTの誘導能が高いことが原因であり、最終的にはMTより遊離したCuイオンにより肝細胞障害を惹起し、肝炎にいたるというメカニズムの可能性をはじめて示した点である。本研究をさらに発展させることにより、今後Wilson病等のCu代謝疾患の原因解明、治療法の開発に貢献することが期待される。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。