

博士(理学) 小野 教 夫

学位論文題名

# GENETIC STUDIES ON ABNORMAL COPPER METABOLISM IN LEC RATS ASSOCIATED WITH HEREDITARY HEPATITIS

(遺伝性肝炎発症 LEC ラットの銅代謝異常に関する遺伝学的研究)

## 学位論文内容の要旨

LECラットは遺伝性肝炎を発症する系統として樹立された近交系ラットで、出生後約4ヶ月で黄疸・肝細胞壊死を伴う劇症肝炎を発症し、約30%の個体が死亡するが、黄疸を回復した個体は慢性肝炎を発症し、やがて肝癌を発症する。LECラット肝炎の遺伝様式は常染色体性劣性でその遺伝子としてhtsが想定されているが、この本体はまだ明にされていない。最近、LECラットでは生体内の銅輸送に関わる血漿セルロプラスミン(Cp)活性が低下していること、さらに、肝臓に著しい銅の蓄積が見いだされ、このような銅代謝異常が肝炎の原因ではないかと考えられている。そこで、本研究はLECラットの肝炎発症と銅代謝異常との関連性および銅代謝異常の発生機構の解明、さらにhts遺伝子の同定を目的とした。

### (1) LECラットの肝炎と銅代謝異常の連鎖分析

肝炎と銅代謝異常の関連性について、まず、最も銅の代謝に関与している銅輸送タンパクである血漿セルロプラスミン(Cp)活性(フェロオキシダーゼ活性として測定)と、次に肝臓・血漿における銅の動態などについて分析した。LECラットにおいては、Cp活性および血漿銅濃度ともに低値を示し、その値は他の系統(LEA, BN, WKAH)と比較して、Cp活性では約5分の1、血漿銅では約3分の1であり、月齢を問わず低値であった。また、肝臓における銅蓄積はLECラットにおいて著しく、他系統ラットに比べ200~300倍の高値を示し、銅の異常蓄積は出生直後から観察された。さらに、戻し交配ラット[(BNxLEC)xLEC]を用いた連鎖分析によって、LECラットのこのような銅代謝異常は遺伝性であり、肝炎発症と強く連鎖していることが分かった。Cpは肝臓から血液への主要な銅輸送タンパクであり、銅と結合したholo-Cpの状態では活性化され肝臓内の

銅を排出していると考えられている。従って、LECラットにおけるCp活性の低下は、肝臓から血液への銅輸送能の低下をもたらし、肝臓での銅蓄積に直接関わっているものと考えられた。

### (2) LECラットのCpフェロオキシダーゼ低活性機構

LECラット肝の銅の異常蓄積に関わっていると考えられるCpフェロオキシダーゼ低活性の原因を解明するために、LECラットのCp遺伝子の単離ならびにCp遺伝子発現について分析した。まず、Cp遺伝子発現として、肝臓におけるCpのmRNAをノーザンブロット法で分析したところ、発現量および大きさともにLECラットにおいては他系統(BNおよびLEA)ラットと同様な値を示し、差は見られなかった。次ぎに、肝臓および血漿におけるCpをウエスタンブロット法により分析した。その結果、LECラットにおいては、肝臓および血漿のCpポリペプチドの大きさならびに量のいずれも対照群として用いたLEAラットと同様な値を示し、両系統では差が見られなかった。さらに、LECラットのCp cDNAを単離しその塩基配列をSDラットのcDNAと比較したところ、LECラットではアミノ酸の置換が7箇所で見いだされたが、これらの置換はCpの銅結合部位の領域ではなかった。また、LECラットの低Cp活性について、戻し交配ラット[(WKAHxLEC)xLEC]を用いたCp遺伝子との連鎖分析では、42%の高組換え率を示し、Cp遺伝子と低Cp活性は連鎖していないことが分かった。これらの結果は、Cp遺伝子そのものはLECラットの低Cp活性化に直接関与していないことを示しており、LECラットにおけるCp活性の低下と肝臓における銅蓄積は、他の機構によるものと考えられた。すなわち、肝臓では、銅とCpとの結合においてその結合を仲介するmediatorが存在し、LECラットではこのmediatorの機能障害のために、銅がCpに結合できずapo-Cpが生成され、結果的にCpフェロオキシダーゼ活性が低下し、銅が蓄積するものと考えられた。

### (3) 銅代謝異常および肝炎発症の原因遺伝子(hts)の同定

LECラットの臨床所見はヒトの銅代謝異常疾患であるウィルソン病(WD)と極めて類似性が高いので、銅代謝異常の原因遺伝子も相同である可能性がある。極く最近、ヒトWD遺伝子が単離され塩基配列が決定されたので、これをもとにプローブを作製し、hts遺伝子との関連性を知るために戻し交配[(WKAHxLEC)xLEC]ラットを用いて連鎖分析を行った。その結果、hts遺伝子はWD遺伝子との組換えはなく、完全に連鎖している結果が得られた。このことは、ラットhtsがヒトWDに相同な遺伝子であることを示している。

この相同性については、ラットから単離したcDNAの塩基配列構造解析からも確認された。これらの結果から、ラットにおけるhts遺伝子はヒトWD遺伝子と同じく銅輸送性ATPase遺伝子であることが分かった。また、LECラットでは、WD相同遺伝子は約2.8k塩基対、cDNAでは最低192塩基対の部分欠失が見いだされ、これらの欠失は銅輸送性ATPaseの膜結合部位とストップコドンの部位に相当しているものと考えられた。また、LECラットにおけるWD相同遺伝子の欠失は肝炎発症、銅蓄積および低Cp活性と強く連鎖しており、従って、LECラットにおける突然変異は銅輸送性ATPaseを支配するWD相同遺伝子の部分欠失であり、これが、肝臓における銅輸送の異常を引き起こし、低Cp活性化・銅蓄積につながっているものと考えられた。この銅輸送性ATPaseは肝細胞中でCpに銅を受け渡すmediatorとしての役割を持つこと、さらに銅の胆汁中への排出にも関わっていることが予想された。

WD遺伝子はヒト染色体13q14に局在し、エステラーゼD (ESD)遺伝子、網膜芽細胞腫 (RB1)遺伝子座と近接した連鎖群を形成している。今回行ったラットにおけるこれら遺伝子のマッピングにおいて、ESD、RB1は15番染色体に、WD相同遺伝子は16番染色体q12に位置づけできた。したがって、WD、ESDおよびRB1遺伝子の連鎖群はヒトとラットでは異なっており、この連鎖群は種分化あるいは核型進化の過程で分散したものと考えられる。

以上の結果はLECラットの肝疾患がその病態だけでなく原因となるWD遺伝子のレベルにおいて、ヒトウィルソン病と同様に欠失をともなった突然変異がその原因であることを示すものである。したがって、今後、ウィルソン病の発症機構の解明や治療法の確立等に、さらには銅の肝細胞内での動態の解明にLECラットは極めて有効なモデル動物であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 迪 弘  
副 査 教 授 堀 浩  
副 査 助 教 授 阿 部 周 一

## 学位論文題名

### GENETIC STUDIES ON ABNORMAL COPPER METABOLISM IN LEC RATS ASSOCIATED WITH HEREDITARY HEPATITIS

(遺伝性肝炎発症 LEC ラットの銅代謝異常に関する遺伝学的研究)

小野教夫提出の学位論文(英文)は遺伝性肝炎発症 LEC ラットの銅代謝異常の遺伝学的研究に関するものである。LEC ラットは生後約4ヶ月で黄疽・肝細胞壊死を伴う劇症肝炎を発症し、約30%の個体が死亡するが、黄疽を回復した個体は慢性肝炎を発症し、やがて肝癌を発症し、癌死する。LEC ラットでは肝臓に著しい銅の蓄積が見いだされ、このような銅代謝異常が肝炎の原因ではないかと考えられている。申請者は LEC ラットの肝炎発症と銅代謝異常との関連性および銅代謝異常の発生機構並びに肝炎遺伝子 *hts* の同定を目的とし研究を行った。

(1) LEC ラットの肝炎と銅代謝異常の連鎖分析: 銅輸送タンパクである血漿セルロプラスミン(Cp)活性と、肝臓・血漿における銅の動態について分析した。LEC ラットでは Cp 活性、血漿銅濃度ともに出生後から低値(他の系統ラットの約1/5~1/3)を示し、また、肝臓における銅蓄積は他系統ラットの200~300倍の高値であった。さらに、LEC ラットのこのような銅代謝異常は遺伝性であり、肝炎発症と強く連鎖していることを明らかにした。しかしながら、LEC ラットの Cp の mRNA およびポリペプチドの大きさと量には正常ラットとの差がなく、また、Cp 遺伝子にも異常がみられなかった。したがって、Cp 遺伝子そのものは LEC ラットの低 Cp 活性化と銅蓄積に直接関与しておらず、これらについては他の機構、すなわち、肝臓では、銅と Cp との結合においてその結合を仲介する mediator が存在し、LEC ラットではこの mediator の機能障害のために、銅が Cp に結合

できず apo-Cpが生成され、結果的にCpフェロオキシダーゼ活性が低下し、銅が蓄積するものと考えられた。

(2) 銅代謝異常および肝炎発症の原因遺伝子(hts)の同定: LECラットの臨床所見はヒトの銅代謝異常疾患であるウィルソン病(WD)と極めて類似性が高く、銅代謝異常の原因遺伝子も相同である可能性がある。ヒトWD遺伝子より作製したプローブを用いhts遺伝子との関連性調べた。その結果、hts遺伝子はヒトWDに相同な遺伝子であることが分かった。この相同性については、ラットから単離したcDNAの塩基配列の構造解析からも確認できた。これらの結果から、ラットにおけるhts遺伝子はヒトWD遺伝子と同じく銅輸送性ATPase遺伝子であることが分かった。また、LECラットでは、hts遺伝子は約2.8k塩基対、cDNAでは最低192塩基対の部分欠失が見いだされ、この部分は銅輸送性ATPaseの膜結合部位とストップコドンの部位に相当しているものと考えられた。従って、LECラットにおける突然変異は銅輸送性ATPaseを支配するhts遺伝子の部分欠失であり、これが、肝臓における銅輸送の異常を引き起こし、低Cp活性化・銅蓄積につながっているものと考えられた。また、銅輸送性ATPaseは肝細胞中でCpに銅を受け渡すmediatorとしての役割を持つこと、さらに銅の胆汁中への排出にも関わっていることが予想された。また、hts遺伝子はラット第16染色体q12に位置づけした。

これらの成果はLECラットの肝疾患がその病態だけでなく原因となる遺伝子のレベルにおいて、ウィルソン病のモデルであることを実証したものとして注目されている。

参考論文は主論文の内容に直接関与した6編の論文の他に、核型進化、細胞分裂に関する遺伝子単離およびマッピングに関する論文等計15編よりなり、いずれも国内外の国際学術専門誌に発表し、それらの内容はいずれも新知見を含むものとして関連分野において高く評価されている。

審査員一同は主論文と参考論文の内容を慎重に検討した上で、申請者が博士(理学)の学位をうけるに十分な資格をもつことを認めた。