

学位論文題名

先天性銅代謝異常症ウィルソン病における  
セルロプラスミンに関する研究

学位論文内容の要旨

1. はじめに

ウィルソン病は、先天性の銅代謝異常症であり、銅の蓄積による肝機能障害と知能障害を特徴とする疾患である。ウィルソン病の特徴の一つとして、血中セルロプラスミン (CP) の減少があげられる。CPとは、血漿蛋白質の一つで、活性中心に銅を持つフェロキシダーゼである。その生理的機能は組織や酵素への銅の運搬であり、血中銅の95%がCPに結合している。肝臓中に運ばれた銅の排泄経路には、CP銅として血流中に流れるものと胆汁へ排泄されるものとの二つがある。ウィルソン病では、血流中に流れるCP銅の減少が知られているが、主要な排泄経路となる胆汁中への排泄も障害されていることが予測される。

1993年、ウィルソン病患者にP-type ATPase遺伝子の変異が発見された。

P-type ATPaseの異常により血流中および胆汁中への銅の排泄が障害されているものと思われるが、どのように銅排泄が障害されるのか、特に血中の銅輸送蛋白質であるCPが何故減少するのか、胆汁中の銅はどのような形で排泄されているのかが依然不明のままである。

本研究ではCPと銅蓄積に焦点をあて、ホロCPにのみ特異的に反応するモノクローナル抗体を作製し、それを用いてウィルソン病におけるCPの解析を行い、ウィルソン病患者肝臓中、血液中のアポCPの存在と、その性質、および成因を明らかにした。また、胆汁中への銅排泄においてもCPが関与している可能性が示された。

2. CPのオキシダーゼ活性部位認識抗体の作製

モノクローナル抗体の作製は常法に従った。得られたハイブリドーマ14株から腹水を調製し、腹水と精製CPをインキュベートし抗原抗体複合体を形成させた。Native-PAGEにより抗原抗体複合体、未反応の遊離CPおよびモノクローナル抗体をそれぞれ分離後、オルトジアニシジンを用いたオキシダーゼ活性染色を行った。CPオキシダーゼ活性を失っている複合体を検出し、CP活性中和能を持つ抗体を選び出した。活性中和能を持つ(活性部位認識)抗体ID-2と活性中和能を持たない(非活性部位認識)抗体ID-1が得られた。

3. ウィルソン病患者におけるアポ型CPの解析

ID-1抗体を下部抗体に、ベルオキシダーゼ標識ID-2抗体を上部抗体に用いたサンドイッチELISAにもとづく活性型CP測定系により、ウィルソン病患者血清中の活性型CPを測定した。その結果、健常人、健常小児に比べウィルソン病患者では活性型CPが著しく減少していることがわかった。

さらに、下部抗体に抗CPポリクローナル抗体、上部抗体にID-1抗体およびID-2抗体を用いたサンドイッチELISAにより、総CP、活性型CPをそれぞれ定量した。健常人、健常小児では総CP、活性型CPがほぼ同程度の値を示したが、ウィルソン病患者血清では、総CPに比べ活性型

CPの値が著しく低く、非活性型CPの存在がウィルソン病患者血清中で確認された。

現在、厚生省「心神障害に関する研究班」で本測定法を用いたマスキングの可能性に関する評価が行われている。

また、患者肝組織を氷冷下でホモジナイズした後、生理食塩水（PBS）にて希釈し、ポリクローナル抗体とID-1抗体およびID-2抗体の組み合わせによるサンドイッチELISAにより、総CPと活性型CPを定量した。その結果、活性型CPは半分程度に減少しているものの総CPは患者と健常人であまり差がみられなかった。即ち、患者血清中では活性型CPの減少と共に総CPも減少していたが、肝臓中では総CP量は変わらないことが明らかになった。患者血清中の総CPの低下は、肝臓から血中への分泌機構に欠陥があるか、あるいは血液中でのCPの分解機構が亢進しているかによると考えられる。

#### 4. ウィルソン病患者における銅蓄積の解析

##### a. ウィルソン病モデル動物を用いた解析

LECラットは、その発症機構、病態がウィルソン病と酷似していることから、ウィルソン病のモデル動物とされている。

ラットCPがID-1抗体およびID-2抗体と交差することを確認した後、抗ラットCPポリクローナル抗体とID-1抗体およびID-2抗体を用いたサンドイッチELISAを確立した。その系を用いて、LECラットとLEAラットの血清中のCP量を測定した結果、ウィルソン病患者と同様にLECラットでは活性型CPの著しい減少と非活性型CPの存在が確認された。

ラット肝細胞のミクロソーム分画とゴルジ分画を用い、サンドイッチELISAによる活性型CP、総CPの測定を行った結果、ゴルジ体で活性型CPの存在が明らかになった。

また、ESRを用いて各分画でのCP銅のシグナルを検出した結果、ゴルジ体でCP銅のシグナルが検出され、ゴルジ体でのCPのホロ化が示された。そして、LECラットの血清では、スーパーファインストラクチャーの崩壊およびタイプI銅のシグナルの減少が見られ、非活性CPはタイプI銅を失った、アポ型CPであることが示唆された。

##### b. 活性型CPと非活性型CPの細胞内免疫電子顕微鏡観察

細胞内での活性型CPと非活性型CPの挙動を観察するために、ID-1抗体とID-2抗体を用いて、健常人肝臓組織、ウィルソン病患者肝臓組織の免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、健常人肝細胞中で、毛細胆管の回りおよび腔内にもCPの局在が認められた。

元来、胆汁中へのCPの分泌は考えられていなかったが、本検討の結果より胆汁への銅排泄にCPも関与していることが示唆された。さらに、胆管腔内に、健常人の場合はホロCPの存在が確認できたが、ウィルソン病患者の場合、ホロCPの存在は確認できなかった。本結果は、胆汁への銅排泄においても血流中への分泌と同様、ウィルソン病患者では分泌機構に欠陥がある可能性を示している。

##### c. CP遺伝子異常症

CP遺伝子異常症の患者の血中、肝臓中にCPが発現していないことを発見した。本症は、家族性の疾患であり、高齢になってから神経症状を呈すること、肝臓中に鉄の蓄積がみられること、フェリチン値の上昇がみられること、およびCP遺伝子の変異が発症原因であることがわかった。本症例の場合、ウィルソン病様症状は見られず、また肝臓中に銅の蓄積もみられないため、ウィルソン病患者の肝中銅蓄積はCPの異常のみによるものではないことが示唆された。

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	横	沢	英	良
副査	教授	長	沢	滋	治
副査	助教授	高	橋	和	彦
副査	助教授	沢	田		均

学位論文題名

### 先天性銅代謝異常症ウィルソン病における セルロプラスミンに関する研究

ウィルソン病は、銅の蓄積による肝機能障害と知能障害を伴う先天性の銅代謝異常症であり、最近、P-type ATPase遺伝子の変異が発見された。ウィルソン病の特徴の一つとして、組織や酵素への銅の運搬を担う銅輸送蛋白質セルロプラスミンの減少があげられるが、血中のセルロプラスミンがなぜ減少するのか、また、肝臓中に運ばれた銅の排泄経路にはセルロプラスミンと結合して血流中に流れるものと胆汁へ排泄されるものとの二つの経路が考えられるが、ウィルソン病で血流中および胆汁中への銅の排泄がどのように障害されているのかなど、不明の点が多く残されている。

本研究では、ウィルソン病におけるセルロプラスミンと銅の蓄積に焦点をあて、ホロ酵素特異的モノクローナル抗体の作成と、セルロプラスミンの動態に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) セルロプラスミンのオキシダーゼ活性に対する阻害作用を指標にして、活性中和能を持つモノクローナル抗体（活性部位認識抗体）ID-2と活性中和能を持たないモノクローナル抗体ID-1を作成した。次に、下部抗体にセルロプラスミンに対するポリクローナル抗体、上部抗体にペルオキシダーゼ標識したID-1抗体あるいはID-2抗体を用いたサンドイッチELISAにより、総セルロプラスミン量と活性型セルロプラスミン量をそれぞれ定量する系を確立した。

(2) 上記のサンドイッチELISAを用いて、ウィルソン病患者血清中の総セルロプラスミン量、活性型セルロプラスミン量を測定し、健常人や健常小児に比べてウィルソン病患者では活性型酵素量が著しく減少していること、健常人や健常小児では総酵素量、活性型酵素量がほぼ同程度であるのに対して、ウィルソン病患者血清では総酵素量に比べて活性型酵素量の値が著しく低く、非活性型酵素がウィルソン病患者血清中に存在することを

明らかにした。また、上記のサンドイッチELISAがウィルソン病患者のマススクリーニングに有用である可能性を明らかにした。

次に、ウィルソン病患者の肝組織ホモジネートを用いて総セルロプラスミン量、活性型セルロプラスミン量を測定し、ウィルソン病患者では健常人に比べて活性型酵素量が半分程度に減少しているが、総酵素量は両者でほとんど差がないことを明らかにした。即ち、患者の血清中では活性型セルロプラスミンの減少と共に総酵素量も減少しているが、肝臓中では総酵素量は変わらないことを明らかにした。それらの結果をもとに、患者血清中の総酵素量の低下は、肝臓から血中への分泌機構に欠陥があるか、あるいは、血液中で分解機構が亢進しているかによるという仮説を提案した。

(3) ウィルソン病のモデル動物LECラットを用いて血清中のセルロプラスミン量を測定し、ウィルソン病患者と同様に、LECラットでも活性型酵素量の著しい減少と非活性型酵素の存在を明らかにした。

次に、正常ラット肝細胞のミクロソーム分画とゴルジ分画を用いて、セルロプラスミン量を測定してゴルジ体での活性型酵素の存在を明らかにし、また、セルロプラスミン銅のシグナルをESRにより測定してゴルジ体でセルロプラスミン銅のシグナルを検出し、ゴルジ体でセルロプラスミンのホロ化が起きていることを明らかにした。さらに、LECラットの血清での、スーパーファインストラクチャーの崩壊およびタイプI銅のシグナルの減少を検出し、非活性型セルロプラスミンはタイプI銅を失ったアポ型酵素であることを明らかにした。

(4) セルロプラスミンの細胞内局在性を免疫電子顕微鏡を用いて観察し、健常人の肝組織で毛細胆管の回りおよび腔内にセルロプラスミンの局在を検出し、胆汁への銅排泄にセルロプラスミンが関与することを明らかにした。また、ホロ型酵素が、健常人の胆管腔内に存在するが、ウィルソン病患者の場合では存在しないことを明らかにした。それらの結果をもとに、ウィルソン病患者では、血流中への分泌の場合と同様に、胆汁への銅排泄においても分泌機構に欠陥があるという仮説を提案した。

(5) セルロプラスミン遺伝子異常症患者の血中や肝臓中にセルロプラスミンが存在しないことを発見した。本症例の場合、ウィルソン病様症状は見られず、また、肝臓での銅の蓄積も検出されないことから、ウィルソン病患者肝臓での銅蓄積はセルロプラスミンの異常のみによるものではないことを明らかにした。

以上の新知見およびそれを得るために用いた新研究技法は、先天性銅代謝異常症であるウィルソン病の病態や成因の理解にとどまらず、多くの代謝異常症を解明する上で重要な寄与をなすものである。

審査員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。