

学 位 論 文 題 名

Spectrophotometric and biochemical studies
on spontaneous porphyria in the Long-Evans
Cinnamon rat, an animal model
of human Wilson's disease

[ヒト・ウイルソン病モデル動物（Long-Evans Cinnamon ラット）に
おけるポルフィリン代謝異常に関する分光学的及び生化学的研究]

学位論文内容の要旨

ヒト・ウイルソン病は、幼児期に重度な進行性肝障害や中枢神経障害を呈する先天性銅代謝異常症である。その病因は、ATP7B と呼ばれる銅(Cu)の細胞内輸送を担う膜蛋白質遺伝子の異常にあり、日常生活において摂取される Cu が膜蛋白質の異常のために正常に運搬・排泄されず、多量に肝臓・腎臓・脳に蓄積し重度な機能障害を起こすと考えられている。

Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットは、北海道大学理学部実験生物センターにおいて Long-Evans Agouti (LEA) ラットより開発された突然変異系統種である。生後およそ4ヶ月で自然に肝炎を発症し、慢性肝炎に移行した後、およそ1年で広範囲にわたる高分化型の肝細胞癌を生じることから、自然肝炎・肝癌発症ラットとして広く知られていた。近年、この LEC ラット肝臓中に多量の Cu の蓄積が明らかとなり、更には、ヒト・ウイルソン病と同様の病態と遺伝子異常を有していることが報告され、現在ではヒト・ウイルソン病モデル動物として広く研究に用いられている。この LEC ラットやウイルソン病患者の肝臓及び腎臓に異常蓄積される Cu は、メタロチオネイン(MTs)と呼ばれる蛋白質と結合して存在していることが明らかとなっている。

MTs は、分子量およそ6千、構成アミノ酸のおよそ30%がシステイン残基からなり、芳香族アミノ酸を含まない低分子量蛋白質である。そして、Cu、亜鉛、カドミウム等の重金属を多量に結合出来る性質を有している。この MTs には非常に興味深い化学特性があり、第1銅[Cu(I)]と結合した MTs[Cu(I)-MTs]に 300nm 領域の紫外線を照射すると、黄橙色（600nm 領域）の蛍光を発することが報告されていた。

そこで本研究においては、この Cu(I)-MTs を多量に蓄積するヒト・ウイルソン病モデル動物を用いて、Cu(I)-MTs の可視化検出を試みると共に、顕微分光光度計を用いて、分光学的解析から蛍光体の同定を試みた。更に、顕微分光解析によって明らかとなった同ラットのポルフィリン代謝異常に関する検討を行った。

<第一章>

多量に Cu を蓄積した急性肝炎前の15週齢の LEC ラット肝臓を用いて、Cu(I)-MTs 由来蛍光の可視化検出を試みた。

アセトンを用いた穏和な固定と迅速なアクリル樹脂包埋により、Cu(I)-MTs 由来と考えられる黄橙色を細胞下レベルで可視化検出した。また、同ラット肝臓より Cu(I)-MTs を抽出し、ゲルろ過に供して精製を試みたところ、Cu(I)-MTs を含むフラクションに組織切片において観察された黄橙色と同色の蛍光

が認められた。以上の結果より、Cu(I)-MTs は穏和な固定と迅速な樹脂包埋により、組織切片においても可視化検出が可能であることが明らかとなった。

<第二章>

第一章において、Cu(I)-MTs の異常に蓄積した LEC ラット肝臓中に、Cu(I)-MTs 由来と考えられる黄橙色蛍光を可視化検出した。そこで第二章では、黄橙色蛍光の直接的な同定を試みる為に、顕微分光光度計を用いた分光学的解析を試みた。

顕微分光解析の結果、LEC ラット肝臓における黄橙色蛍光は、600nm に発光極大を持つブロードなスペクトルとして検出された。この蛍光特性は、肝臓より精製した Cu(I)-MTs の蛍光スペクトルと一致した。よって、LEC ラット肝臓中の黄橙色蛍光は、顕微分光光度計を用いた分光学的解析によって Cu(I)-MTs 由来であることが同定された。また、細胞内で蛍光体の存在場所による蛍光特性の変化についても解析を行ったところ、細胞質・核・顆粒成分で異なる発光極大を有していることが明らかとなった。

<第三章>

LEC ラットにおいては、慢性肝炎期の腎臓内においても赤橙色及び黄橙色蛍光体の存在が確認され、それらも異常蓄積した Cu(I)-MTs であると考えられていた。そこで第三章では、慢性肝炎期の肝臓及び腎臓における蛍光体の分光学的同定を試みた。

顕微分光解析の結果、慢性肝炎期の肝臓における黄橙色蛍光は、第二章における肝炎発症直前の肝臓と同じく 600nm に発光極大を持つブロードなスペクトルとなって検出され、肝臓より精製した Cu(I)-MTs の蛍光スペクトルと一致した。しかしながら、LEC ラット腎臓の赤橙色蛍光は肝臓における蛍光特性とは異なり、625nm と 650nm 領域に 2 つの発光極大を持つ鋭敏な蛍光スペクトルとなった。この蛍光特性は、腎臓より精製した Cu(I)-MTs の蛍光スペクトルとも異なっていた。そして、その蛍光特性は、Cu(I)-MTs よりもポルフィリンのスペクトル特性に酷似していた。よって、LEC ラット腎臓中の赤橙色蛍光は、ポルフィリンの異常蓄積を示していることが示唆された。

顕微分光解析によって、LEC ラット腎臓におけるポルフィリンの異常蓄積が示唆されたことから、LEC ラットの組織等からのポルフィリンの抽出・定量を試みた。LEC ラット腎臓及び肝臓中の総ポルフィリン濃度は、対照の Long-Evans Agouti (LEA) ラットと比較して各々約 25 倍、2.5 倍と顕著な増加が認められた。腎臓では対照と比較して全てのポルフィリン体に有意な増加が認められ、その中でもウロ、ヘプタポルフィリンが特に顕著な増加を示した。一方、肝臓でも対照と比較し、腎臓ほどの増加は示さないもののウロ、ヘプタポルフィリンの顕著な増加が認められた。また LEC ラット尿においては、対照ラットと比較し総ポルフィリン排泄量は約 4 倍と有意な増加が認められ、特にコプロポルフィリンの増加が顕著であった。

以上の結果から、LEC ラット腎臓において確認された赤橙色蛍光は、顕微分光解析によって、Cu(I)-MTs に由来する蛍光ではなくポルフィリン体由来の蛍光であることが同定され、LEC ラット腎臓におけるポルフィリンの異常蓄積が示唆された。そして、その示唆通りに、ポルフィリン体の抽出・定量によって LEC ラット腎臓でのポルフィリンの異常蓄積が明らかとなった。また、肝臓におけるポルフィリンの異常蓄積とポルフィリンの多量な尿排泄の存在も明らかとなり、これらの症状を特徴とするヘム代謝異常の存在が LEC ラットにおいて初めて明らかとなった。その代謝異常の分子メカニズムに関して、1) 蓄積する重金属による代謝異常、2) 肝障害による代謝異常、3) ヘム代謝に関与する遺伝的な要因による代謝異常の 3 つの原因が推測された。

<結 語>

本研究は、生体自家蛍光物質の同定における分光学的解析の重要性を指摘すると共に、以下の知見を明らかにした。

1. ヒト・ウイルソン病モデル動物 (LEC ラット) の肝臓において、Cu(I)-MTs 由来の黄橙色蛍光を組織・細胞内で可視化検出した。
2. 顕微分光解析によって、Cu(I)-MTs 由来の黄橙色蛍光を組織・細胞内で分光学的に同定した。
3. 細胞下レベルでの顕微分光解析によって、Cu(I)-MTs 由来の黄橙色蛍光が細胞質・核・顆粒成分で

異なる発光極大を有していることを明らかにした。

4. 顕微分光解析によって、慢性肝炎期の LEC ラット腎臓において認められた赤橙色がポルフィリン由来の蛍光であることを同定した。
5. LEC ラットにおいて、腎臓及び肝臓でのポルフィリンの異常蓄積とポルフィリンの多量な尿排泄を特徴とするヘム代謝異常の存在を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	田 村	守
副 査	教 授	谷 口	和 弥
副 査	教 授	矢 澤	道 生
副 査	教 授	菊 池	九二三

学 位 論 文 題 名

Spectrophotometric and biochemical studies on spontaneous porphyria in the Long-Evans Cinnamon rat, an animal model of human Wilson's disease

[ヒト・ウイルソン病モデル動物 (Long-Evans Cinnamon ラット) に
おけるポルフィリン代謝異常に関する分光学的及び生化学的研究]

本論文は、ヒト・ウイルソン病のモデル動物である Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットのポルフィリン代謝異常を検討したものである。LEC ラットは、肝臓中に多量の Cu の蓄積が明らかとなり、ヒト・ウイルソン病と同様の病態と遺伝子異常を有していることが報告され、現在ではヒト・ウイルソン病モデル動物として広く研究に用いられている。この LEC ラットやウイルソン病患者の肝臓及び腎臓に異常蓄積される Cu は、メタロチオネイン (MTs) と呼ばれる蛋白質と結合して存在していることが明らかとなっている。そこで、この Cu(II)-MTs を多量に蓄積するヒト・ウイルソン病モデル動物を用いて、Cu(II)-MTs の可視化検出を試みると共に、顕微分光光度計を用いて、分光学的解析から同定を試みた。

<第一章>多量に Cu を蓄積した急性肝炎前の 15 週齢の LEC ラット肝臓を用いて、Cu(II)-MTs 由来蛍光の可視化検出を試みた。アセトンを用いた穏和な固定と迅速なアクリル樹脂包埋により、Cu(II)-MTs 由来と考えられる黄橙色を細胞下レベルで可視化検出した。また、同ラット肝臓より Cu(II)-MTs を抽出し、ゲルろ過に供して精製を試みたところ、Cu(II)-MTs を含むフラクションに組織切片において観察された黄橙色と同色の蛍光が認められた。

<第二章>第二章では、LEC ラット肝臓中の黄橙色蛍光の分光学的解析を試みた。顕微分光解析の結果、LEC ラット肝臓における黄橙色蛍光は、肝臓より精製した Cu(II)-MTs の蛍光スペクトルと一致した。また、細胞内で蛍光体の存在場所による蛍光特性の変化についても解析を行ったところ、細胞質・核・顆粒成分で異なる発光極大を有していることが明らかとなった。

<第三章>LEC ラットにおいては、慢性肝炎期の腎臓内においても赤橙色及び黄橙色蛍光体の存在が確認され、それらも異常蓄積した Cu(II)-MTs であると考えられていた。そこで第三章では、慢性肝炎期の肝臓及び腎臓における蛍光体の分光学的同定を試みた。この結果、LEC ラット腎臓中の赤橙色蛍光は、

ポルフィリンの異常蓄積を示していることが示唆された。

本研究は、生体自家蛍光物質の同定における分光学的解析の重要性を指摘すると共に、以下の知見を明らかにした。＜1＞Cu(Ⅰ)-MTs を多量に蓄積しているヒト・ウイルソン病モデル動物（LEC ラット）の肝臓において、Cu(Ⅰ)-MTs 由来と考えられる黄橙色蛍光を組織・細胞内で可視化検出した。＜2＞顕微分光解析によって、慢性肝炎期の LEC ラット腎臓において認められた赤橙色がポルフィリン由来の蛍光であることを同定した。＜3＞LEC ラットにおいて、腎臓及び肝臓でのポルフィリンの異常蓄積とポルフィリンの多量な尿排泄を特徴とするヘム代謝異常の存在を明らかにした。

これらの結果は、LEC ラットのポルフィリン代謝異常を初めて明らかにしたものであり、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。