

(54)

氏名(生年月日) 小 島 原 典 子
 本 籍
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学位授与の番号 乙第1581号
 学位授与の日付 平成7年10月20日
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当 (博士の学位論文提出者)
 学位論文題目 **Defective copper binding to apo-ceruloplasmin in a rat model and patients with Wilson's disease**
 (LEC ラットおよびウィルソン病患者におけるセルロプラスミンへの合成障害に関する研究)
 論文審査委員 (主査) 教授 林 直諒
 (副査) 教授 小林 槇雄, 相川 英三

主 論 文 の 要 旨

〔目的〕

LEC (Long-Evans-Cinnamon) ラットは、肝臓への銅の蓄積が発見されて以来、ヒト Wilson 病の疾患モデルとして注目を集めている。本研究では、両者に共通する ceruloplasmin (Cp) 活性低値の機構を明らかにする目的で、LEC ラットにおける Cp の合成過程を解析し、その障害につき検討した。

〔材料および方法〕

LEC, 対照の LEA (Long-Evans-Agouti) ラットおよび PVG との戻し交配ラット (LPL) を用い肝臓および血清を採取した。肝臓より抽出した Cp mRNA は、RNA protection assay 法にて半定量し、血中 Cp 蛋白量は、ELISA 法、paraphenyldiamine (PPD) oxidase 活性にて測定した。また、Cp の蛋白質化学的検索のため、immunoblot 法ならびに PPD oxidase 活性染色を行った。血清、肝臓中の銅濃度は、原子吸光度計にて測定した。

〔結果〕

LEC ラット肝臓では、LEA ラットとほぼ同量の Cp mRNA 量が検出された。LEC ラットの血中 Cp 量は、ELISA 法では、LEA ラット Cp の約70%であったが、PPD oxidase 活性は、16%と低下が著しかった。immunoblot 法で解析すると、LEC, LEA ラットともに、分子量約13.6万の band を示した。native PAGE で LEA ラットの血中 Cp を解析すると、2本の band (相

対移動度0.36と0.41) を示し、PPD oxidase 活性染色と NaCN 透析による脱銅操作の結果から、各々銅を持つ holo-Cp (活性型) と銅のない apo-Cp (不活性型) に相当することがわかった。この分離同定法を用いて LEC ラット Cp を解析すると総 Cp に対する apo-Cp の比が著しく上昇していることが明らかとなった。泳動緩衝液を変更しヒト Cp を分離すると、apo-Cp (0.44), holo-Cp (0.49) に分離可能で、Wilson 病患者では LEC ラット同様 apo-Cp 優位のパターンを示した。

〔考察〕

ヒト Cp は、134kDa の糖蛋白で1分子に8個の Cu を結合し、apo-Cp は、肝臓で Cu を結合し holo-Cp となって初めて PPD oxidase 活性を有する。本研究では、native PAGE を用い、LEC ラットおよび Wilson 病患者における apo-Cp 異常蓄積を明らかにした。また、戻し交配群を用い、apo-Cp の異常蓄積が LEC ラットの発症と遺伝的に相関することを確認した。以上より、LEC ラットおよび Wilson 病における Cp 異常低値は、Cp 合成過程の最終段階—銅結合過程—に障害があるためと考えられた。近年、Wilson 病の原因遺伝子が copper transporting ATPase の変異によることが明らかとなり、apo-Cp への銅の結合もこの銅輸送蛋白質が関与する可能性が推定された。

〔結論〕

native PAGE の immunoblot 法にて、LEC ラットでは、Cp 蛋白合成は行われているが、活性を持たない apo-Cp の割合が非常に大きいことを明らかにした。

LEC ラットおよび Wilson 病では、肝臓での apo-Cp から holo-Cp の合成過程—銅転移反応—に障害があることが強く示唆された。

論文審査の要旨

ヒト Wilson 病は銅代謝異常を示し予後不良の疾患である。近年、先天的に銅代謝異常を示す Long-Evans-Cinamon (LFC) ラットが見いだされた。本論文では両者に見られる血中セルロプラスミン (Cp) 活性値の低下の機序を検討した。肝臓内 Cp mRNA は、Northern blot 法、血中 Cp 量は ELISA, paraphenyldiamine (PPD) oxidase 活性、血清・肝臓中の銅濃度は原子吸光光度計にて測定した。また immunoblot 法、PPD oxidase 活性染色での Cp の蛋白化学的検討を加えた。その結果、両者とも Cp mRNA 量はコントロールと同量であった immunoblot 法で銅を持つ holo-Cp と、銅のない apo-Cp の区別ができることが判明し、この方法から LEC ラットもヒト Wilson 病もともに Cp 蛋白合成は行われているが活性を持たぬ、apo-Cp から holo-Cp への銅転移反応に障害があることが明らかとなった。

以上のごとく本論文は臨床的にも基礎的にも極めて価値あるものと判断する。

主論文公表誌

Defective copper binding to apo-ceruloplasmin in a rat model and patients with Wilson's disease (LEC ラットおよびウィルソン病患者におけるセルロプラスミンへの合成障害に関する研究)

Liver Vol 15 135-142頁 (1995年発行) 小島原典子, 中林啓記, 志方俊夫, 江角真理子

副論文公表誌

- 1) 特発性門脈圧亢進症として経過を観察されていた中年女性の先天性肝線維症の1例. 肝臓 33(8): 643-648 (1992) 小島原典子, 橋本悦子, 谷合麻紀

子, 小林潔正, 奥田博明, 久満董樹, 小幡 裕

- 2) LEC ラットにおけるセルロプラスミンの合成障害. 肝臓 34(6): 486-487 (1993) 小島原典子, 中林啓記, 池田忠生, 鈴木 健, 森 道夫, 志方俊夫, 江角真理子

- 3) Abnormal accumulation of apo-ceruloplasmin in a rat model of Wilson's disease (ウィルソン病モデルラットにおけるアポセルロプラスミンの異常蓄積). Int Hep Comm 1: 228-232 (1993) 小島原典子, 中林啓記, 池田忠生, 森 道夫, 志方俊夫, 江角真理子