

LEC ラット肝炎・肝癌とヒト肝細胞癌の銅およびメタロチオネイン

中山 明弘¹⁾, 福田 浩之²⁾, 江原 正明²⁾,
鈴木 慶二³⁾, 中島 克行⁴⁾, 桜井 弘¹⁾

¹⁾京都薬大・代謝分析, ²⁾千葉大医・第1内科, ³⁾群馬大・医技短大, ⁴⁾大塚アメリカ

Comparison of Copper-metallothionein in the livers of LEC rats and human hepatoma

Akihiro Nakayama¹⁾, Hiroyuki Fukuda²⁾, Masaaki Ebara²⁾,
Keiji Suzuki³⁾, Katsuyuki Nakajima⁴⁾, and Hiromu Sakurai¹⁾

¹⁾ *Dep. of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical Univ.*,

²⁾ *First Dep. of Medicine, School of Medicine, Chiba Univ.*,

³⁾ *Dep. of Pathology, College of Medical Care and Technology, Gumma Univ.*, ⁴⁾ *Otsuka Pharm. Co.*

Long-Evans Cinnamon (LEC) rats develop spontaneous hepatic injury. We obtained evidence which shows unusual accumulation of copper (Cu) in the livers of LEC rats, followed by the finding of copper-metallothionein (Cu-MT) induction. On the other hand, Ebara *et al.* have found that copper is accumulated in the human liver suffered from hepatoma. Thus, we measured MT and 4 metals (Cu, Zn, Fe, and Mn) and compared the Cu-MT levels in the livers of LEC rats and human suffered from hepatoma. The levels of MT and Cu in the LEC rat liver remarkably increased with age. The MT levels in human liver were evaluated as logarithmic concentration ratio [$\log ((\text{concentration in tumor site}) / (\text{concentration in juxta-tumor site}))$] was decreased with the tumor size, but no changes in the Cu levels were found. Then, we separated the MT in human livers by gel filtration on Superose 12. In tumor site of the human liver, MT was determined as Cu-MT, whereas in juxta-tumor site, the presence of Cu, Zn-MT was suggested. These results indicate that MT is induced as Cu-MT in the early stage of hepatoma, but it decreases in the development of hepatoma. Thus, we conclude that the development of hepatoma in LEC rats and human might be understood with respect of the induction of Cu-MT but both rates for the formation and degradation of MT are different between LEC rat and human hepatoma.

Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットは生後約4ヶ月齢より黄疸を発症し、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝癌に至る一連の病態を自然発症する¹⁾。その原因としてLECラット肝臓中に銅が異常蓄積することが知られており、蓄積した銅は金属結合性タンパク質であるメタロチオネイン (MT) と結合し

ていることが報告されている²⁾。これまでMTについて数多くの研究がなされており、主に重金属の無毒化、または金属の恒常性維持を担っている。また分子中にシステイン残基を豊富に含むことからラジカルスカベンジャーとして働き、生体を酸化ストレスから防御することが報告されている。しかしながら我々の研究室ではこれまでに、LECラットから精製されたMTは過酸化水素共存下でヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成を促進する現象を報告してきた³⁾。また、我々はこの $\cdot\text{OH}$ の生成がLECラットにおける肝炎・肝癌の発症機構に関与しているものと考えている。一方、江原らはヒト肝細胞癌患者の肝臓中でも銅が蓄積していることを見いだした⁴⁾。そこで我々は、ヒト肝臓中に蓄積している銅が肝細胞癌の発症や進行に関与しているのか、また肝疾患のモデル動物であるLECラットと類似性もしくは相同性があるかどうかを比較検討することを目的として研究を行った。

実験方法

ヒト肝細胞癌患者の癌部、癌周辺部、およびLECラットの肝組織切片をホモジネートした。ホモジネート中のMTをラジオイムノアッセイで、金属含量 (Cu, Zn, Fe, Mn) を湿式灰化後フレームレス原子吸光光度法でそれぞれ測定した。またMTの化学形態の解析のためにサンプルを105,000×g, 4℃で

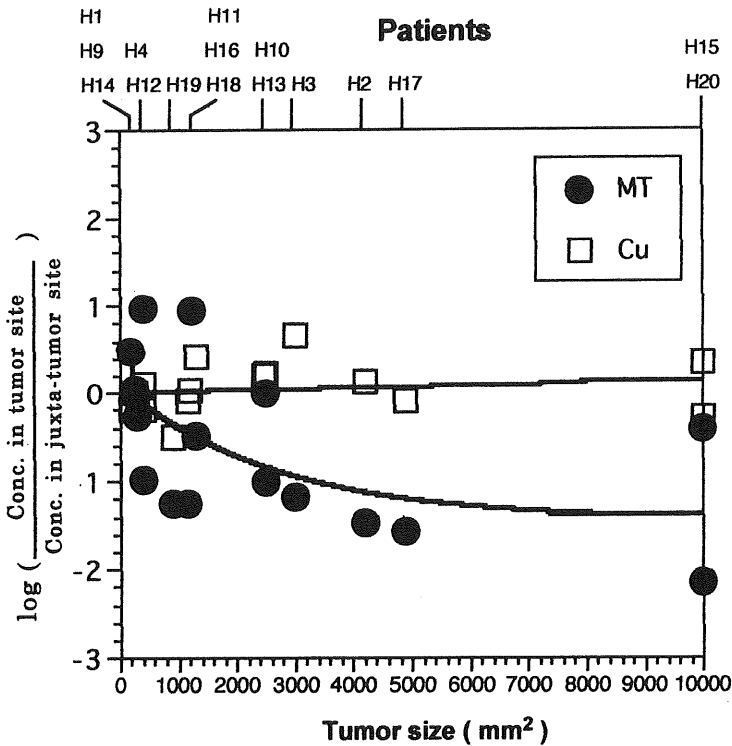


Fig. 1. Relationship between the tumor size and the logarithmic concentration ratio of MT or Cu in human liver suffered from hepatoma

1時間超遠心分離後、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superose 12) にかけて、各フラクション中に含まれる金属含量をフレームレス原子吸光光度法により定量した。

実験結果

ヒト肝細胞癌患者の肝ホモジネート中のMTおよび金属を定量したところ、MTや金属が相対的に癌組織中に多く存在する患者、また逆に癌周辺部に多く存在する患者など様々なパターンが見られた (data not shown)。癌部におけるMTや金属含量を癌周辺部における含量で割り、その対数について、癌の進行を癌部の大きさを目安として評価したところ、癌の進行に伴いMT濃度比に減少傾向が認められたが、銅濃度にはあきらかな変化は認められなかった (Fig. 1)。この結果は週齢依存的にMTと銅レベルが顕著に増加するLECラットとは異なるものであった (Fig. 2)。MTの化学形態について調べるため、ゲルろ過クロマトグラフィーを行ない各画分中に含まれる金属含量を定量したところ、少数の例外は認められたが、癌部ではLECラットと同様にCu-MTが、癌周辺部ではCu、Zn-MTが誘導されていることが示された (Figs. 3, and 4)。

考察

今回の結果から、癌が初期段階にあればMTはCu-MTとして誘導され、癌の進行と共に癌周辺部に対する癌部のMT含量は減少する傾向が見出された。一般に、MTは分子中に多く含まれるチオール基が活性酸素種を消去するためラジカルスカベンジャーとして働き、酸化的ストレスを緩和し、腫瘍などから生体を保護する生体防御因子としての役割が報告されている⁵⁾。しかしながら我々は、LECラット肝臓より得られるMTはラジカルを消去するのではなく、ラジカル特にヒドロキシルラジカルの生成

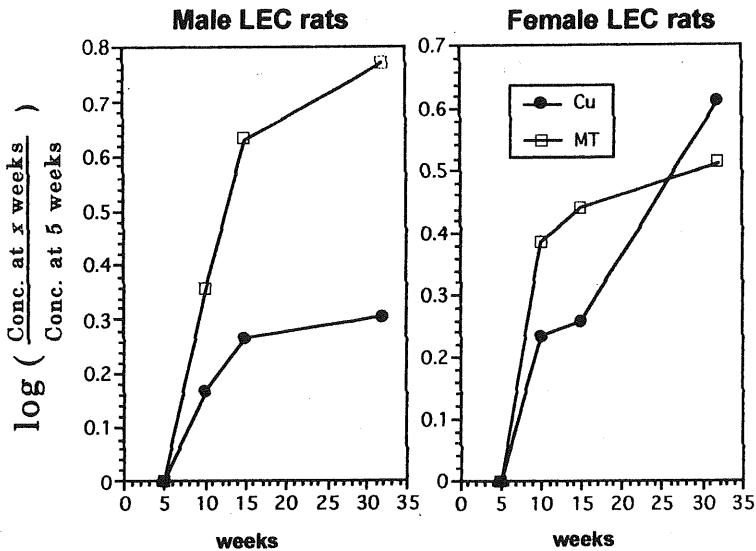


Fig. 2. Relationship between the age and the logarithmic concentration ratio of MT or Cu in the liver of LEC rats

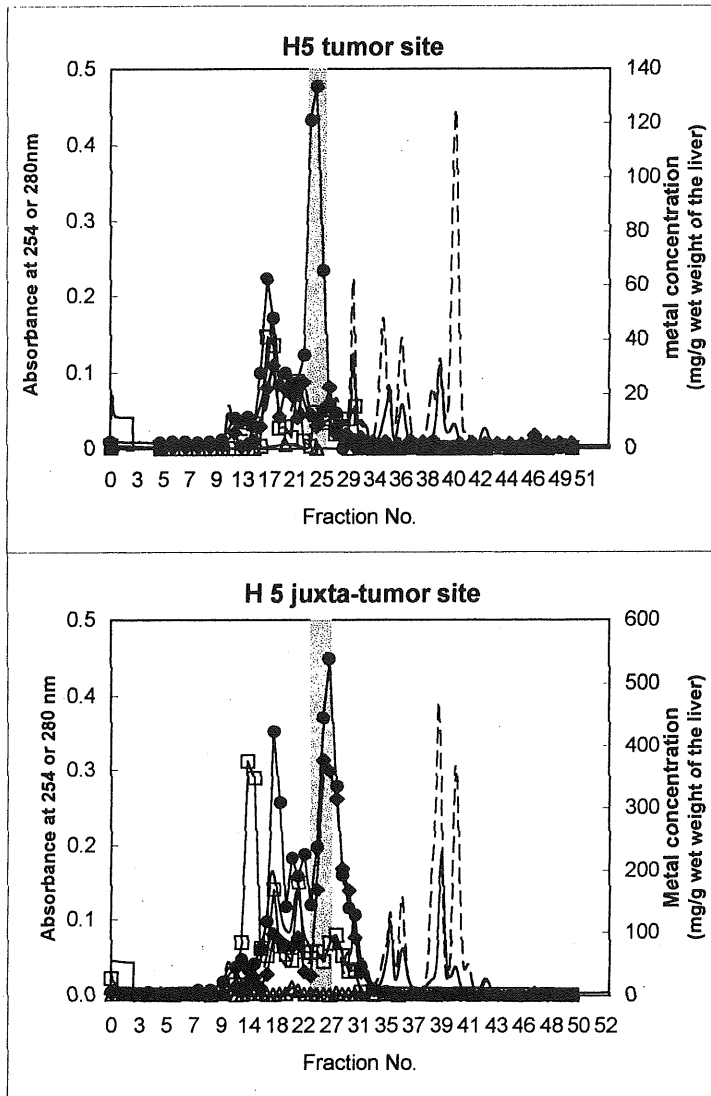


Fig. 3. Superose 12 gel filtration profiles for the liver cytosols of human hepatoma.
 --- : absorbance at 254 nm, — : absorbance at 280 nm, ● : Cu, ◆ : Zn, □ : Fe, △ : Mn,
 and ■ : MT (standard rabbit MT-1)

を促進することを見出している⁵⁾。また、このラジカル産生促進が肝炎発症機構に深く関与するものと考えている。今回の研究から、ヒトにおいても癌の初期段階では LEC ラットと同様に Cu-MT が誘導されていることが見いだされ、Cu-MT が肝癌の発症機構に関与しているという可能性が示された。したがって、この点では LEC ラットの肝炎発症との類似性が見い出せたが、LEC ラットとヒト肝炎では Cu-MT の生成と分解速度に大きな違いがあることが示唆された。この点については今後研究する必要がある。

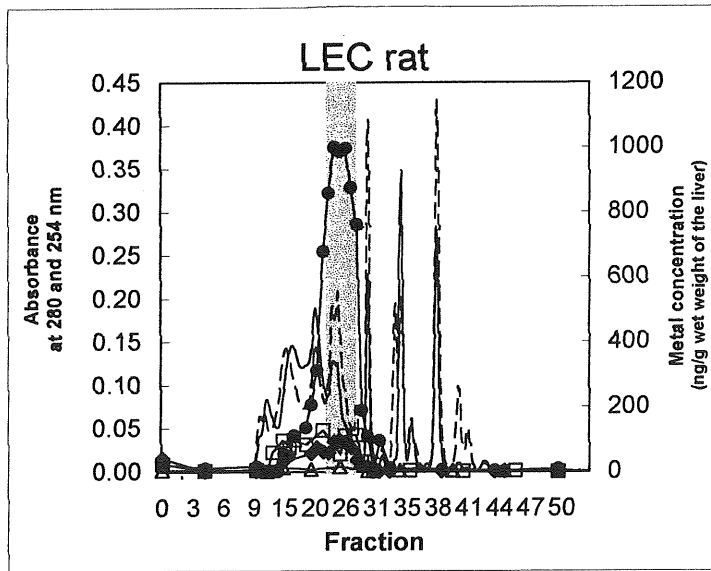


Fig. 4. Superose 12 gel filtration profile for the liver cytosols of LEC rat
 --- : absorbance at 254 nm, — : absorbance at 280 nm, ● : Cu, ◆ : Zn, □ : Fe, △ : Mn,
 and shaded area : MT (standard rabbit MT-1)

参 考 文 献

- 1) 波江野 力, 武市紀年, 内野純一, 小林 博 (1991) 臨床化学 24 : 741
- 2) H. Sakurai, A. Fukudome, R. Tawa, M. Kito, S. Takeshima, M. Kimura, N. Otaki, K. Nakajima, T. Hagino, K. Kawano, S. Hirai, S. Suzuki (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184 : 1393
- 3) H. Sakurai, H. Satoh, A. Hatanaka, T. Sawada, K. Kawano, T. Hagino (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 : 313
- 4) M. Ebara, S. Watanabe, K. Kito, M. Yoshikawa, N. Sugiura, M. Ohto, F. Kondo, Y. Kondo (1991) *Radiology* 180 : 617
- 5) 桜井 弘 (1996) 日本臨床 54 : 2