

## LECラット肝臓とヒト肝細胞癌の銅とメタロチオネインの動態

中山明弘<sup>1)</sup>, 江原正明<sup>2)</sup>, 福田浩之<sup>2)</sup>,  
鈴木慶二<sup>3)</sup>, 中嶋克行<sup>4)</sup>, 桜井弘<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 京都薬大・代謝分析\*, (<sup>2)</sup> 千葉大医・第1内科\*\*, (<sup>3)</sup> 群馬大医・保健科学\*\*\*, (<sup>4)</sup> 大塚製薬(株)\*\*\*\*)

### **Metal and metallothionein levels in the livers of LEC rats and human hepatocellular carcinoma : acceleration of cellular oxidative stress**

Akihiro NAKAYAMA,<sup>1)</sup> Masaaki EBARA,<sup>2)</sup> Hiroyuki FUKUDA,<sup>2)</sup>  
Keiji SUZUKI,<sup>3)</sup> Katsuyuki NAKAJIMA<sup>4)</sup> and Hiromu SAKURAI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *Dep. of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical Univ.,*

<sup>2)</sup> *First Dep. of Medicine, School of Medicine, Chiba Univ.,*

<sup>3)</sup> *Dep. of Pathology, College of Medical Care and Technology, Gumma Univ.,*

<sup>4)</sup> *Otsuka Pharmaceuticals Co.*

Long-Evans rats with cinnamon coat color (LEC rats) develop spontaneous hepatic injury associated with unusual accumulation of copper (Cu) in their livers, followed by the finding copper-metallothionein (Cu-MT). We have reported that the reaction of the Cu-MT and hydrogen peroxide form hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) and that this reaction may cause the hepatic injury in LEC rat livers. Likewise, Ebara *et al.* have reported that copper is accumulated in human livers with hepatocellular carcinoma (HCC). Thus, we measured hepatic metal and MT levels, incidence of metal species found in MT and oxidative stress to compare the parameters in the livers of LEC rats and human with HCC. Cu and MT levels in the livers of LEC rats were increased age-dependently, and Zinc (Zn) levels were increased at 32 weeks. Cu levels in human livers were increased with the development or the progression of HCC, in contrast, Zn levels were significantly decreased. MT levels in human livers

---

\* 所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

\*\* 所在地：千葉市中央区亥鼻1丁目8-1 (〒260-8670)

\*\*\* 所在地：群馬県前橋市昭和町3丁目39-15 (〒371-0034)

\*\*\*\* 所在地：群馬県高崎市西横手町351-1 (〒370-0021)

were decreased with the development of HCC, and then increased at the progression of HCC. The chemical forms of MT, that separated from LEC rat livers, were Cu-MT. And that from normal human livers were entirely Zn-MT, but those were changed from Zn-MT to Cu-MT via Cu, Zn-MT with the development and progress of HCC. Likewise, hepatocellular oxidative stress in terms of thiobarbituric acid assay or 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, which might be associated with the accumulation of Cu-MT, were increased in both livers of LEC rats and human. On the basis of present results, we concluded that the development and/or progression of HCC might be understood with the advance of oxidative stress associated with the accumulation of hepatic Cu and Cu-MT.

Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットは肝臓に銅 (Cu) を異常蓄積し、肝炎から肝癌に至る一連の病態を自然発症する<sup>1)</sup>。過剰に蓄積したCu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<sup>2)</sup>。MTはシステイン残基に富む分子量約6,000の低分子タンパク質であり、種を超えて生物界に広く存在している。その生理的役割として重金属イオンの解毒および恒常性維持、ラジカル消去作用が報告されており、様々なストレスからの細胞保護因子として位置付けられる<sup>3)</sup>。しかしながら、我々は分子内にCuを多く含むMT (Cu-MT) は過酸化水素と反応してヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) を産生することを見出し、LECラット肝組織ではこの $\cdot\text{OH}$ の産生が肝疾患の発症に深く関与していると提案した<sup>4)</sup>。一方、ヒト肝細胞癌の癌組織でもCuレベルが上昇していることが近年報告されている<sup>5)</sup>。そこで、LECラット肝臓およびヒト肝細胞癌中のCuおよびCu-MTあるいは酸化的ストレスについて比較検討し、ヒト肝細胞癌の発症あるいは進行の機構解明を試みた。

## 方 法

### 1. 肝組織中の金属およびMTレベルの定量

LECラット肝組織、ヒト正常肝組織およびヒト肝細胞癌組織の癌部と癌周辺部をそれぞれ0.25M ショ糖溶液中でホモジネートした。肝組織中の金属はホモジネートを湿式灰化後、グラファイト炉原子吸光法で定量した。MTはホモジネートを100℃加熱処理後、ELISA法で定量した。

### 2. MTの化学形態の解析

ゲルろ過クロマトグラフィーはホモジネートを105,000gで1時間超遠心分離後、Superose 12を担体として50本のフラクションに分画した。得られたフラクションを原子吸光法、ELISA法にて金属およびMTレベルをそれぞれ定量し、MTの化学形態を推定した。

### 3. 酸化的ストレスの評価

酸化的ストレスはTBA法および8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 量で評価した。TBA法測定時、各患者間で脂質量に差異が認められたため、Folchらの変法<sup>6)</sup>を用いて組織から脂質を抽出した後、TBA法でTBARS量を定量した。8-OHdGは組織から核をフェノール法で抽出後、ELISA法で定量した。

なお、ヒト肝細胞癌の癌の進行の指標として組織学的分化度を用い、高分化型肝細胞癌から中分化型、低分化型肝細胞癌となるほど癌が進行しているとなした。

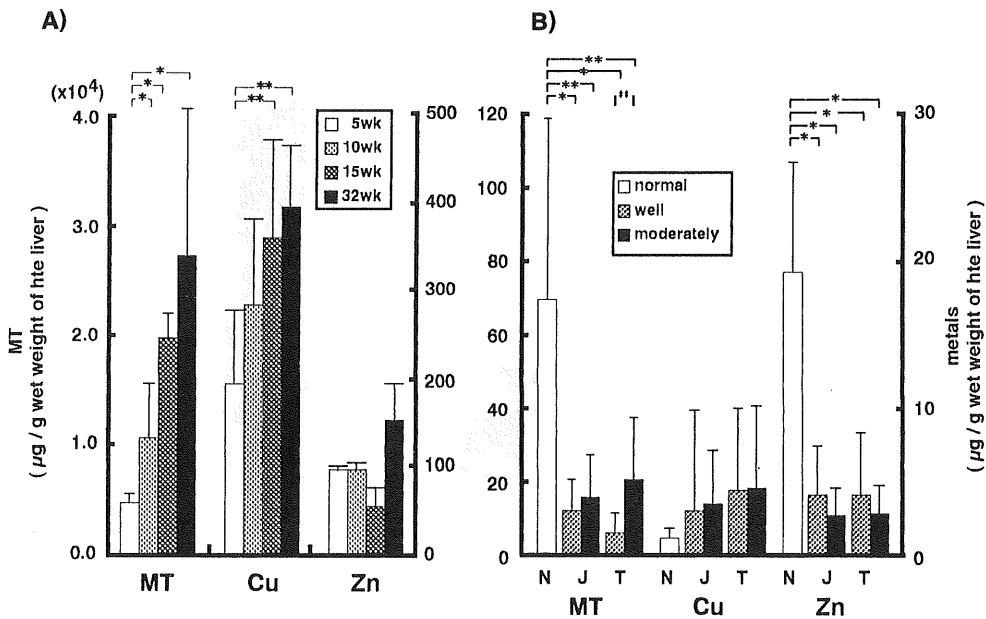
## 結 果

## 1. 肝組織中の金属およびMTレベルの動態

LECラット肝組織中のCuおよびMTレベルは、週齢依存的に顕著に増加した。また、Zn、FeおよびMnレベルは、15週齢付近まで顕著な増加は見られなかったが、32週齢では顕著に増加した (Fig. 1A)。

一方、ヒト肝組織では、Cuレベルは癌の発症および進行に対して増加し、Znレベルは逆に顕著に減少した (Fig. 1B)。Mnレベルは正常組織と比べ癌部、癌周辺部で増加しており、Feレベルは癌周辺部で高い傾向が得られた (data not shown)。MTレベルは癌の発症時に顕著に減少したが、その後の癌の進行に対して増加する傾向が得られた (Fig. 1B)。

以上より、LECラット肝組織とヒト肝細胞癌との間で、そのレベルに差は見られるが共にCuレベルの上昇がみられた。しかし、MTやZnレベルの動態には大きな差が見られた。



**Fig. 1** MT, Cu and Zn levels A) in the livers of LEC rats and B) at tumor (T) and juxta-tumor (J) portion of human hepatocellular carcinoma against histological differentiation and those in normal livers (N).

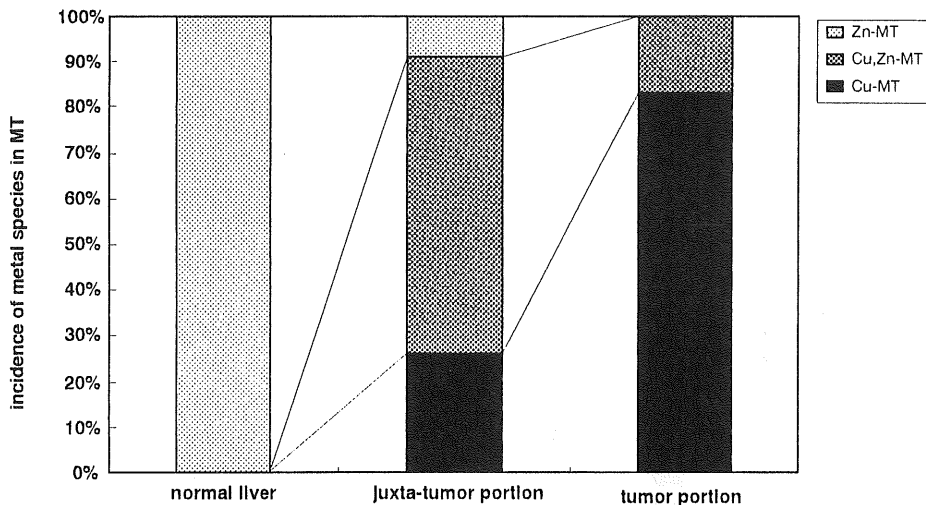
\* and \*\*: significant difference at the levels of \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.05$ , respectively.

## 2. 肝組織の細胞質画分のゲルろ過クロマトグラフィーとMTの化学形態

LECラットおよびヒト肝組織の細胞質画分をゲルろ過クロマトグラフィーを用いてMTを部分精製し、MT画分中に含まれる金属レベルを定量した。ゲルろ過ピークパターンを解析したところ、MTのピークとCuのピークが一致しており、LECラット肝MTの化学形態はCu-MTであることを確認した (data not shown)。

同様に、ヒト肝組織のMTの化学形態を分析したところ、ヒト正常肝組織のMTの化学形態は分析した4症例全てにおいてZn-MTであった。ヒト肝細胞癌組織のMTは (Fig. 2) に示すように24症例中20症例 (83%) がCu-MTであり、残る4症例 (17%) はCu, Zn両金属を含むCu, Zn-MTであった。今回分析した症例の中にZn-MTは見られなかった。また、癌周辺部では23症例中15症例 (65%) がCu, Zn-MTであり、以下6症例 (26%) がCu-MT、2症例 (9%) がZn-MTであった。癌の進行に対する癌部、癌周辺部のMTの化学形態を解析すると、癌部、癌周辺部いずれも癌の進行とともにMTに含まれるCu比率の増加が見られた (data not shown)。

以上のことから、LECラット肝MTの化学形態はCu-MTであり、ヒト肝細胞癌におけるMTの化学形態は組織全体のZnレベルの減少とCuレベルの増加により、癌の発症および進行と共にZn-MTからCu-MTへと変化することが明らかとなった。



**Fig. 2** Incidence of metal species in MT found in the livers of normal human and tumor or juxta-tumor portion of HCC.

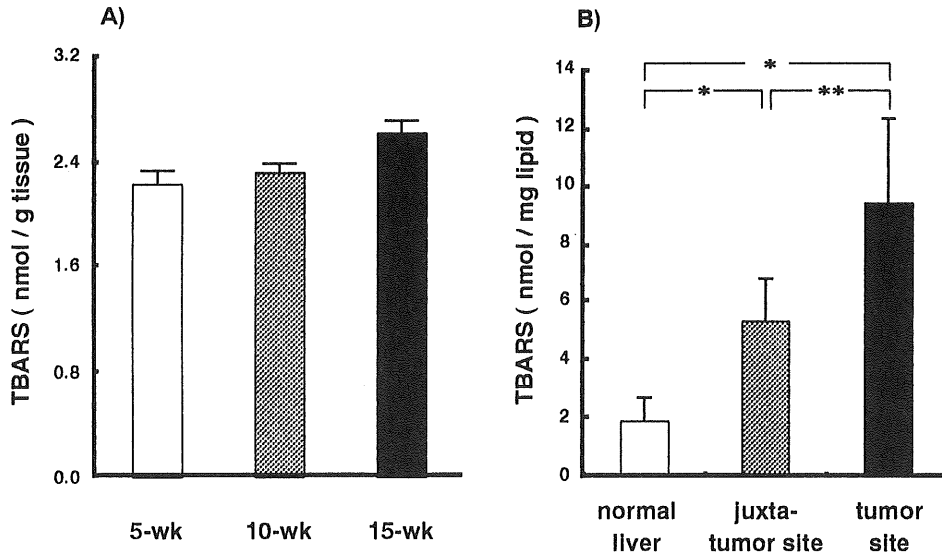
### 3. 酸化ストレスの検討

我々はLECラットから得られるCu-MTは過酸化水素と反応し、 $\cdot\text{OH}$ を産生することを報告した<sup>4)</sup>。したがって、今回得られたヒト肝細胞癌におけるCu-MTの増加は癌組織に酸化ストレスを亢進させているのではないかと推測した。そこで、TBARSおよび8-OHdGの生成を目安として酸化ストレスを評価した。

LECラット肝組織のTBARSは週齢依存的に増加しており (Fig. 3A)、酸化ストレスはCuやCu-MTの増加傾向と一致していた。一方、8-OHdGレベルは10週齢で高値を示し、以降15週齢では10週齢と比

べ変化が見られなかった (data not shown)。このことは8-OHdGの修復除去により、8-OHdGの生成と除去が平衡していると考えられた。

ヒト肝組織のTBARS量は正常肝組織、癌周辺部、癌部の順に高く、癌化による酸化的ストレスの亢進が示唆された (Fig. 3B)。また、TBARSと組織中Cuレベルの相関をみると2相性を示し、Cuレベルが低ければTBARS値は急激に増加し、逆にCuが高レベルになるとTBARS値は減少した (data not shown)。一方、8-OHdG量はCuレベルのより高い癌部において高値を示した (data not shown)。



**Fig. 3** Cellular oxidative stress evaluated by TBA assay in the livers of A) LEC rat and B) human with or without HCC.

\* and \*\*: significant difference at the levels of \*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.05$ , respectively.

## 考 察

LECラットではウィルソン病遺伝子 (ATP7B) 欠損による組織Cuレベルの増加が起きていると考えられた。一般に、生体内ではCuよりZnが多く、MTは主にZnにより調節されていると言われ、その化学形態もZn-MTであると言われている<sup>7)</sup>。しかし、LECラット肝組織では過剰なCuの蓄積により、MTが多く誘導合成され、また化学形態もCu-MTであると考えられた。一方、ヒト肝細胞癌におけるMTの化学形態の変化については以下のように推察される。組織Znレベルの減少によりMTレベルが減少するが、癌の進行と共にCuレベルが上昇し、MTが誘導合成される。Znレベルの減少の機構は肝疾患にともなう肝機能の低下によりアルブミン合成能が低下することが関与すると考えられる。すなわち、血中アルブミンレベルの低下により、アルブミンが関与するといわれるZnの腸管吸収は抑制され、血中Znレ

ベルが減少し、肝組織のZnレベルも低下すると考えられた<sup>8)</sup>。MTの化学形態の変化はCu/Zn比の変化によると考えられる。また、MTへの金属の親和性はZnよりCuの方が強いことが知られている<sup>9)</sup>。したがって、CuおよびZnの量的な変化と親和性の違いにより化学形態がZn-MTからCu-MTへと変化したと推察された。

次に酸化ストレスについて、LECラットでは週齢依存的に、ヒト肝細胞癌では癌化により酸化ストレスが亢進していることが示唆された。我々はこれまでにLECラット肝臓から得られるCu-MTは過酸化水素と反応し、 $\cdot\text{OH}$ を産生することを報告してきた<sup>4)</sup>。この現象は他の研究者らによっても支持され、Cu-MTは酸化ストレスを亢進すると考えられる。これらの知見は、ヒト肝細胞癌でMTの化学形態がCu-MTへ変化すると共に酸化ストレスが亢進していた今回の結果を支持している。しかし、LECラット肝SODレベルは変化しないのに対し<sup>10)</sup>、ヒト肝細胞癌組織では低下しているという報告があり<sup>11)</sup>、酸化ストレスの亢進にはそれらの因子の総合的な評価が必要であると考えられる。また、ヒトにおける酸化ストレスとCuとの関係については、Cuレベルが高く、Feレベルの低い癌部でより高い8-OHdGレベル値が見られたことから、同じ酸化ストレスを促進すると考えられるCuとFeではCuの方がより直接的に核に影響を与えると考えられた。一方、TBARS量はCuレベルと相関関係を示し、Cuレベルが低ければCuの増加と共にTBARS量は急激に増加することが示唆された。しかし、Cuが高レベルに存在するとCuの毒性により細胞が壊死し、TBARS量は減少すると考えられた。

以上の結果より、LECラット肝炎・肝癌とヒト肝細胞癌の間には金属やMTの動態に相異は見られるが、共通してCu-MTの増加とそれにもなうと考えられる酸化ストレスの亢進が見られた。したがって、肝癌の発症または進行にはCuとCu-MTの増加にもなう酸化ストレスの亢進が寄与していることが示唆された。

## 参 考 文 献

- 1) Sasaki, M., M.C. Yoshida, K. Kagami, N. Takeichi, H. Kobayashi, K. Dempo and M. Mori (1985) *Rat New Lett.* 14 : 4-6
- 2) Sakurai, H., A. Fukudome, R. Tawa, M. Kito, S. Takeshima, M. Kimura, K. Otaki, K. Nakajima, T. Hagino, K. Kawano, S. Hirai and S. Suzuki (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184 : 1393-1397
- 3) Kagi, J. H. R. (1991) *Method Emzymol.* 205 : 613-626
- 4) Sakurai, H., H. Satoh, A. Hatanaka, T. Sawada, K. Kawano, T. Hagino and K. Nakajima (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 : 313-318
- 5) Ebara, M., S. Watanabe, K. Kita, M. Yoshikawa, N. Sugiura, M. Ohta, F. Kondo and Y. Kondo (1991) *Radiology.* 180 : 617-621
- 6) Ways, P., C.F. Reed and D.J. Hanahan (1961) *J. Clin. Invest.* 40 : 1088
- 7) Tashiro-Itoh, T., T. Ichida, Y. Matsuda, T. Satoh, M. Sugiyama, Y. Tanaka, T. Ishikawa, S. Itoh, M. Nomoto and H. Asakura (1997) *Liver.* 17 : 300-306

- 8) Pramoolsinsap, C., N. Promvanit, S. Komindr, P. Lerdverasirikul and S. Srianujata (1994) *J. Gastroenterol.* 29 : 610-615
- 9) 桜井 弘, 田中 久 編著 (1993) 生物無機化学 (第2版) 廣川書店
- 10) Sakurai, H., K. Nakajima, H. Komada, H. Satoh, N. Otaki, M. Kimura, K. Kawano and T. Hagino (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192 : 893-898
- 11) Liaw, K., P. Lee, F. Wu, J. Tsai and S. Lin-Shiau (1997) *Am. J. Gastroenter.* 92 : 2260-2263