

氏 名

大江 晋司

論文題目(欧文の場合、和訳を付すこと)

Copper induces hepatocyte injury due to the endoplasmic reticulum stress in cultured cells and patients with Wilson disease

(ウイルソン病患者と培養細胞において銅は小胞体ストレスによる肝細胞障害を引き起こす)

論文要旨






[目的] 銅は生体における必須微量元素であるが、過剰に存在するとラジカルを発生し、細胞障害をもたらす。小胞体は蛋白の適切な folding に関わる小器官であり、異常蛋白が小胞体に蓄積することで小胞体ストレスを生じる。酸化ストレスが小胞体ストレスを誘導することが知られており、小胞体ストレス応答によるストレス回避が困難になるとアポトーシスが誘導される。肝臓やその他全身臓器に過剰な銅の蓄積を起こす先天性代謝異常症がウイルソン病である。小胞体ストレスは非アルコール性脂肪性肝疾患、アルコール性肝疾患、ウイルス性肝炎等でその関連について報告されてきた。ウイルソン病では銅と酸化ストレスについての報告がなされているが、小胞体ストレスについての報告はない。またウイルソン病では肝発癌が低いとされるが、過剰な銅が発癌リスクとなる報告もある。また亜鉛は腸管上皮でのメタロチオネイン産生を増やし、腸管からの銅の吸収を抑制することによりウイルソン病の治療に用いられているが、亜鉛の肝細胞への直接的な作用についてはまだ不明なことも多い。今回我々は、培養細胞を用いて、過剰な銅が及ぼす影響を酸化ストレスおよび小胞体ストレスを中心に検討した。

[方法] 培養細胞を硫酸銅、銅キレート剤 (bathocuproine disulfonate: BCS)、抗酸化剤 (n-acetyl-L-cysteine: NAC)、化学シャペロン (4-phenylbutyrate, ursodeoxycholic acid) ならびに酢酸亜鉛で処理した。過剰な銅による細胞障害について酸化ストレス、小胞体ストレス、アポトーシスを検討し、アポトーシスの検討では少量のプロテアソーム阻害剤 (acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal, epoxomicin) を併用した評価も行った。また細胞増殖について Ki67 の免疫染色で検討し、DNA 損傷については γ H2AX の免疫染色で検討した。

[成績] 過剰な銅は酸化ストレスだけでなく小胞体ストレス、DNA 損傷を誘導した。また少量のプロテアソーム阻害剤を併用することでアポトーシスを亢進した。BCS、NAC、化学シャペロンの併用においてこれら細胞障害は改善した。Ki67 の免疫染色では過剰な銅の投与により陽性細胞が減少し、BCS、NAC、化学シャペロンの併用では発現低下を抑制した。反対に過剰な銅は γ H2AX 陽性細胞数を増加したが、BCS、NAC、化学シャペロンの併用で抑制された。亜鉛は過剰な銅による酸化ストレス、小胞体ストレス、DNA 損傷、アポトーシスを抑制したが、細胞増殖抑制には関与しなかった。

[考察・結論] 肝培養細胞において、過剰な銅は細胞障害を誘導し、抗酸化剤や化学シャペロンはその細胞障害を抑制した。過剰な銅による細胞増殖抑制や DNA 損傷についても抗酸化剤や化学シャペロンが有用であった。ウイルソン病において酸化ストレスだけでなく小胞体ストレスもその病態に関与し、抗酸化剤や化学シャペロンが有効な治療薬となる可能性が示された。亜鉛はウイルソン病における銅の肝細胞障害を直接抑制する可能性が示された。

学位論文審査結果要旨

氏 名	大江 晋司				
論文審査委員	主査 所属	環境・産業生態 系	環境適応医学 部門	足立 弘明	
	副査 所属	生体適応 系	機能調節 部門	柳原 延章	
		生体情報 系	病態情報 部門	西澤 茂	
		系	部門		
		系	部門		
論文題目					
<p>Copper induces hepatocyte injury due to the endoplasmic reticulum stress in cultured cells and patients with Wilson disease. (ウイルソン病患者と培養細胞において銅は小胞体ストレスによる肝細胞障害を引き起こす)</p>					
学位論文審査結果要旨					
<p>ウイルソン病は、肝臓やその他の全身臓器に過剰な銅の蓄積を起こす先天性代謝異常症である。銅は生体における必須微量元素であるが、過剰に存在するとラジカルを発生し、細胞障害をもたらす。また、亜鉛は腸管上皮でのメタロチオネイン産生を増やし、腸管からの銅の吸収を抑制するため、ウイルソン病の治療に用いられているが、亜鉛の肝細胞への直接的な作用については不明であった。酸化ストレスは小胞体ストレスを誘導することが知られており、小胞体ストレス応答によるストレス回避が困難になるとアポトーシスが誘導される。ウイルソン病では銅と酸化ストレスについての報告がなされているが、小胞体ストレスについての報告はなく、本研究では培養細胞を用いて、過剰な銅が及ぼす影響を酸化ストレスおよび小胞体ストレスを中心に検討され、亜鉛の作用も検討された。</p> <p>方法は、肝培養細胞を硫酸銅、銅キレート剤 (bathocuproine disulfonate: BCS)、抗酸化剤(n-acetyl-l-cysteine: NAC)、化学シャペロン (4-phenylbutyrate、ursodeoxycholic acid)ならびに酢酸亜鉛で処理した。過剰な銅による細胞障害について酸化ストレス、小胞体ストレス、アポトーシスを検討し、アポトーシスの検討では少量のプロテアソーム阻害剤 (acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal、epoxomicin)を併用した評価も行われた。細胞増殖については、Ki67、DNA 損傷については γH2AX の免疫染色で検討された。</p> <p>結果は、過剰な銅は酸化ストレス、小胞体ストレス、DNA 損傷を誘導し、プロテアソーム阻害剤がアポトーシスを誘導した。BCS、NAC、化学シャペロンの併用は細胞障害を改善した。過剰な銅の投与により Ki67 陽性細胞が減少し、BCS、NAC、化学シャペロンの併用ではその発現低下を抑制した。一方、過剰な銅は γH2AX 陽性細胞数を増加し、BCS、NAC、化学シャペロンの併用で抑制された。亜鉛の投与は、過剰な銅による酸化ストレス、小胞体ストレス、DNA 損傷、アポトーシスを抑制した。</p> <p>本研究によって、肝培養細胞において、過剰な銅が細胞障害を誘導し、抗酸化剤や化学シャペロンはその細胞障害を抑制し、細胞増殖抑制や DNA 損傷も改善することが示された。ウイルソン病において、酸化ストレスだけでなく小胞体ストレスもその病態に関与し、抗酸化剤や化学シャペロンが有効な治療薬となる可能性が示され、同時に亜鉛の銅による肝細胞障害を直接抑制する作用も示された。以上のように、本論文はウイルソン病の病態解明と新規治療法が期待される結果を導き出したことより、本学の学位論文として適格であると判断した。</p>					
					平成 28 年 12 月 27 日