

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月10日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590754

研究課題名（和文）慢性肝障害と鉄代謝調節異常の病態オーバーラップの分子メカニズム解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism of overlap between chronic liver disease and iron metabolism abnormality

研究代表者

大竹 孝明（OHTAKE TAKAAKI）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：10359490

研究成果の概要（和文）：

慢性肝疾患は二次性鉄過剰症を合併することが多い。その肝病態と鉄代謝異常はオーバーラップし、相互作用によって進行する。慢性肝疾患の中で肥満を背景に発症する非アルコール性脂肪性肝疾患も二次性に肝内鉄沈着を起こし、酸化ストレス増強、肝細胞障害・線維化・発癌の原因となる。本研究ではマウス及び培養細胞株モデルを用いて、過食・脂肪負荷がトランスフェリン結合鉄取り込みに関与するトランスフェリン受容体、腸管の鉄吸収に関与するDMT1、さらに細胞からの鉄放出を調節するヘプシジンなどの鉄関連分子の発現異常とそのメカニズムを示した。

研究成果の概要（英文）：

Excess iron is frequently accumulated in chronic liver diseases. The pathogenesis and iron metabolism abnormality are overlapped, which may be progressed by the interaction. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) also frequently merges with secondary hepatic iron accumulation, which contributes to the development of oxidative stress, liver cell damage, fibrosis and carcinogenesis. In this study, we investigated the expression of iron-related molecules in liver and duodenum tissue in mice fatty liver model and human hepatocellular in vitro model. Obesity and high-fat diet up-regulate TfR1 expression and down-regulate Hpc expression in the liver. Furthermore they up-regulate the iron transporter expressions in the duodenum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患、アルコール性肝障害、トランスフェリン受容体、ヘプシジン、鉄トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

鉄は生体にとって必須の金属栄養素であるが、過剰状態になると反応性に富む自由鉄

が増え、活性酸素種(ROS)を産生することによって細胞毒性をもたらす。肝臓は鉄の貯蔵、利用および代謝調節の中心臓器である。この

肝臓において C 型慢性肝炎 (CHC)、アルコール性肝障害 (ALD)、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) などの慢性肝疾患は二次性鉄過剰症を合併することが知られている。そして、個々の肝障害の原因病態と鉄代謝異常はオーバーラップし、相互作用によって進行し、肝疾患の終末像である肝硬変症は原因に関わらず鉄過剰症を合併することが多い。主に内臓肥満を背景として肝細胞に中性脂肪が蓄積する NAFLD では鉄も肝臓に沈着することが特徴である。CHC、ALD の鉄過剰症においては肝細胞で産生される鉄代謝調節因子ヘプシジンの発現低下が起きていることが基礎研究で証明されているが、NAFLD/NASH の鉄過剰症の病態においては不明である。

2. 研究の目的

NAFLD における鉄代謝恒常性破綻のメカニズムを解明するために、過食肥満、高脂肪負荷マウスの鉄関連分子発現を解析した。

3. 研究の方法

[動物モデル]

NAFLD マウスモデルとして、①レプチン欠損マウス (ob/ob、6 週齢、雄性、Charles River Japan, Inc. Tokyo, Japan) を用いて、野生型の C57BL/6J マウスを対象群とした。②12 週齢の雄 C57BL/6J マウスで、高脂肪食負荷群として脂肪として 82% のカロリーを含有する高脂肪食 (F2HFD2, Oriental Yeast Company Ltd, Tokyo, Japan) を与えた。コントロール群のマウスには、脂肪として 13.2% のカロリーを含有する通常食 (MF, Oriental Yeast Company Ltd, Tokyo, Japan) を与えた。マウスから採血、肝臓、十二指腸を採取し下記解析を施行した。全ての実験は、旭川医科大学動物実験委員会が定める規則とガイドラインに則って遂行した。

[検討項目および方法]

鉄関連分子：トランスフェリン受容体 1 (TfR1)、ヘプシジン (Hepc)、腸管の鉄吸収にかかわる divalent metal transporter1 (DMT1)、細胞内鉄の細胞外への排泄に関わる ferroportin 1 (FPN1) の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法、肝組織の TfR1、pSMAD の蛋白発現は各々の特異抗体を用いた免疫蛍光法、western blot 法で、肝組織の Hepc 発現に関しては免疫組織化学染色法、血清中活性型 Hepc 濃度は liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) 法を用いて測定した。

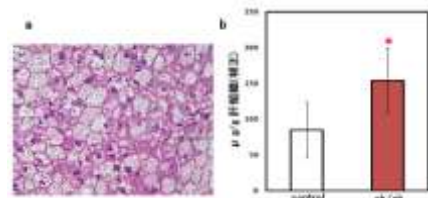
[細胞培養]

in vitro の検討として肝癌細胞株 Huh7 を 10% FBS 添加 DMEM 下に培養し、脂肪酸 (オレイン酸) で刺激し、TfR1、Hepc mRNA の発現を定量的リアルタイム PCR 法で検討した。

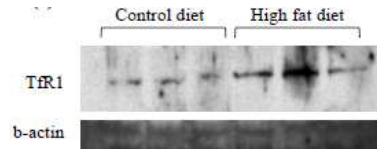
4. 研究成果

過食・肥満 (ob/ob) マウスと高脂肪飼料負荷マウスの NAFLD モデルを用いて、鉄関連分子の発現動態を検討した。ob/ob マウス (O) は野生型マウス (W) に比べて有意に体重が増加し (W:24.3g, O:48.2g, $p < 0.001$)、肝重量が増大していた (W:1020mg, O:2990mg, $p < 0.001$)。Hematoxylin-Eosin 染色での肝組織像では肝小葉全体に肝細胞への大滴性脂肪蓄積、風船様腫大が認められ、著明な脂肪肝の所見を呈していたが、炎症性細胞浸潤、肝線維化は認めず、NAFLD モデルとして妥当と考えられた (図 1 a)。Prussian blue 染色では肝組織に鉄沈着は認めないが、原子吸光スペクトロメトリー法による脂肪的の体積で補正した肝組織内鉄濃度は有意に上昇していた (図 1 b)。

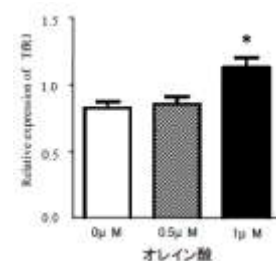
(図 1)



高脂肪飼料負荷マウスでは肝組織における TfR1 の発現亢進が 2 週目から認められ、高脂肪飼料負荷が早期からトランスフェリン結合鉄取り込み亢進が生じることが示された (図 2)。

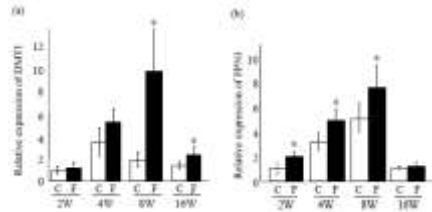


高脂肪飼料による直接的な影響の可能性が考えられ、オレイン酸を肝癌細胞株 Huh7 培養液中に添加する負荷実験を行うと、細胞質内に脂肪滴を認め、1 μ M の添加で TfR1 の mRNA の発現は亢進していた (コントロール群:0.83, オレイン酸 1 μ M 群:1.14, $p < 0.05$) (図 3)。

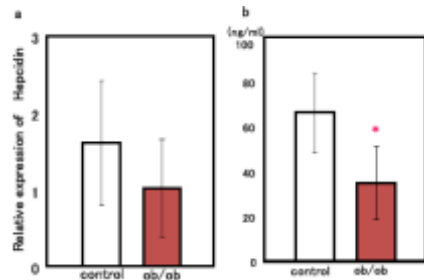


2 つの脂肪肝モデルにおいて、腸管からの鉄吸収の動態を明らかにするために、腸管細胞における鉄トランスポーター:DMT1 と FPN1 の mRNA の発現について検討した。ob/ob マウ

ス十二指腸における DMT1 と FPN1 の mRNA の発現は、野生型マウスと差を認めなかったが、高脂肪飼料負荷マウスの十二指腸の DMT1 の mRNA の発現は 8 週目以降から亢進し (図 4 a)、FPN1 の mRNA の発現は 2 週目以降から亢進し (図 4 b)、高脂肪飼料による影響が考えられた。

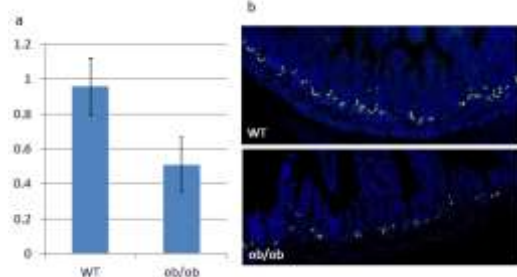


一方、ob/ob マウス肝臓における鉄代謝調節因子 Hcp mRNA は低下傾向にあり (W:1.60, O:1.02, $p=0.10$) (図 5 a)、血清活性型ペプチド Hcp 濃度は ob/ob マウスで有意に低下していた (W:66.3, O:34.9, $p=0.01$) (図 5 b)。



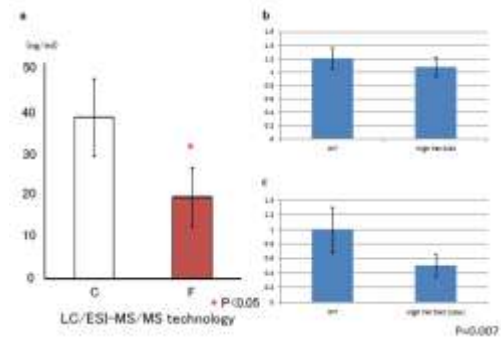
同様に高脂肪飼料負荷マウスにおいても 8 週目以降の脂肪肝が形成される時期には Hcp の発現低下を mRNA および蛋白レベルの両方で認め、結果的に FPN1 の post-translational な調節を介して腸管からの食餌鉄吸収亢進、マクロファージからの鉄放出に作用する可能性が示唆された。

Hcp の発現調節系に関する検討として BMP6 の発現を検討した。ob/ob マウス肝臓における BMP6 mRNA の発現は低下し、十二指腸の BMP6 mRNA の発現も有意に低下していた (図 6 a)。免疫蛍光染色では BMP6 の発現は陰窩部の腸管細胞に認められ、ob/ob マウスで発現が低下していた (図 6 b)。



さらに 16 週間の高脂肪飼料負荷で誘導したマウス脂肪肝でも、同様に血清 Hcp 濃度は低下し ($p<0.05$) (図 7 a)、肝、小腸の BMP6 mRNA

の発現も低下していた (図 7 b, c)。BMP-6 シグナル伝達系である肝臓の Smad 蛋白発現について Western-Blotting 法でシグナルが減弱していることを確認した。



レプチン遺伝子欠損および高脂肪食による脂肪肝マウスにおいて腸管からの鉄吸収と網内皮系細胞からの鉄放出に対して抑制的に働く鉄代謝因子 Hcp の発現が肝組織の遺伝子発現レベルだけでなく、血清蛋白レベルでも低下していることを確認した。そして、Hcp 発現抑制のメカニズムとして BMP-Smad シグナル系の変化が関与していることを示した。この鉄関連遺伝子の発現異常が NAFLD の病態に深く関与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Torimoto Y, Kato J. Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol.* 23:S78-81. 2008.
DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05290.x
- ② Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.* 88: 7-15. 2008.
DOI: 10.1007/s12185-008-0120-5
- ③ 大竹孝明, 生田克哉, 高後裕. 【鉄代謝の臨床 鉄欠乏と鉄過剰 診断と治療の進歩】 最近の話題 鉄と発癌. *日本内科学会雑誌.* 99 巻 1277-1281. 2010.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Ohtake T, Miyoshi S, Abe M, Suzuki Y, Kohgo Y. Metabolic steatosis and alcohol-loading synergistically regulate the expression of iron-related molecules in mice liver. The 2nd USA-Japan Joint Workshop on Alcohol-Related Problems. September 17, 2008. Yokohama, Japan.

- ②大竹孝明, 生田克哉, 高後裕. 肥満およびアルコール負荷によるマウスヘプシジンの発現変化に関する検討. 第45回日本肝臓学会総会. 2009年6月4-5日, 神戸.
- ③Ohtake T, Ikuta K, Sawada K, Abe M, Hosoki T, Miyoshi S, Suzuki Y, Sasaki K, Torimoto Y, Kohgo Y. Metabolic steatosis and alcohol-loading regulate the expression of transferrin receptor 1 and hepcidin in mice liver. 2009 International BioIron Society Meeting. June 7-11, 2009. Porto, Portugal.
- ④大竹孝明, 澤田康司, 阿部真美, 三好茂樹, 鈴木康秋, 高後裕. アルコールと肥満は相加的な鉄関連遺伝子発現異常を介して肝内鉄過剰をもたらす マウスモデルでの検討. 第44回日本アルコール・薬物医学会総会. 2009年9月8-9日. 横浜.
- ⑤三好茂樹, 大竹孝明, 高後裕. 脂肪負荷は鉄関連分子発現調節不全を介して酸化ストレスを誘導する 基礎的検討. JDDW 2009. 2009年10月15日. 京都.
- ⑥大竹孝明, 生田克哉, 高後裕. NAFLDにおける鉄毒性の検討—非トランスフェリン結合鉄(NTBI)測定より—. 第96回日本消化器病学会総会. 2010年4月22日. 新潟.
- ⑦澤田康司, 大竹孝明, 阿部真美, 鈴木康秋, 高後裕. マウス脂肪肝モデルにおける小腸鉄トランスポーター発現の解析. 第46回日本肝臓学会総会. 2010年5月27日. 山形.
- ⑧Ohtake T, Ikuta K, Hasebe S, Nakajima S, Sawada K, Abe M, Hosoki T, Suzuki Y, Sasaki K, Torimoto Y, Kohgo Y. Alcohol-loading and obesity regulate the expression of transferrin receptor 1 and hepcidin in mice liver. Falk Workshop October 5-6, 2010. Freiburg, Germany.
- ⑨大竹孝明, 高後裕. 肥満とアルコール性肝障害における鉄代謝異常. 第45回日本アルコール・薬物医学会総会 2010年10月8日, 小倉.
- ⑩大竹孝明, 鈴木康秋, 高後裕. NAFLD患者における血清NTBI測定に関する検討. JDDW 2010 第14回日本肝臓学会大会. 2010年10月14日, 横浜.
- ⑪Ohtake T. NAFLD/NASH and Iron Metabolism. The 9th JSH Single Topic Conference “NASH 2010” (November 19 2010. Tokyo, Japan.
- ⑫Hasebe T, Ohtake T, Ikuta K. Gut-Liver linkage of iron metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases; role of intestinal BMP-6 in obese ob/ob mouse model. 4th Congress of the International BioIron Society. May

22-26, 2011. Vancouver, Canada.

- ⑬ Hasebe T, Ohtake T, Ikuta K. Significance of BMP-6 signaling in iron-hepcidin metabolic disorder of non-alcoholic fatty liver disease model mice. The 6th International Symposium on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis. October 20-21, 2011. Fukuoka, Japan.
- ⑭長谷部拓夢, 大竹孝明. マウス脂肪肝の鉄代謝異常におけるBMP発現変化に関する検討. 第97回日本消化器病学会総会. 2011年5月13日. 東京.
- ⑮阿部真美, 大竹孝明. C型肝硬変における血清NTBI値測定の意義—合併症・肝予備能との関連性について—. 第97回日本消化器病学会総会. 2011年5月13日. 東京.
- ⑯大竹孝明. 飲酒の鉄代謝におよぼす影響. JDDW2011 第15回日本肝臓学会大会. 2011年10月21日. 福岡.

[図書] (計3件)

- ①大竹孝明, 高後裕. 中外医学社. NASH診療 best approach. 2008.
- ②大竹孝明. 最新医学社. アルコールと金属代謝、新しい診断と治療のABC 62 消化器9 アルコール性肝障害. 2009.
- ③大竹孝明, 高後裕. 日本臨牀社. 肝・胆道系症候群(第2版) その他の肝・胆道系疾患を含めて 肝臓編(上) 遺伝と代謝へモクロマトーシス. 2010.

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
なし
- 取得状況 (計0件)
なし

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大竹 孝明 (OHTAKE TAKAAKI)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10359490

(2) 研究分担者

生田 克哉 (IKUTA KATSUYA)
旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00396376

佐々木 勝則 (SASAKI KATSUNORI)
旭川医科大学・医学部・特任准教授
研究者番号：60336394

佐藤 一也 (SATOU KAZUYA)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：50360988

(3)連携研究者
なし