

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07914

研究課題名(和文) NASH病態形成におけるマクロファージ鉄ストレスの役割解明と鉄制御による治療応用

研究課題名(英文) The role of macrophage Iron stress in NASH

研究代表者

池田 康将 (IKEDA, Yasumasa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：60432754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)におけるマクロファージ鉄ストレスの役割について検討した。マクロファージ特異的フェリチン欠損(KO)マウス(KO)と対照群の野生型マウスを用いて、NASHモデルを作成して正常試料群と比較した。病理組織の脂質蓄積と線維化との増加や、炎症性サイトカインと線維化の遺伝子発現増加はKOで軽度であった。酸化ストレスとマクロファージ浸潤増加・CLS形成はKOマウスで軽減され、NASH進展後の肝がん発症もKOマウスで抑制された。マクロファージ鉄のNASH病態への関与と治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASH病態には鉄が関与することが知られているが、どの細胞腫に鉄が関与するかは踏めであった。本研究により、NASH病態において、マクロファージが鉄由来の炎症・酸化ストレス(鉄ストレス)の中心であることが明らかとなった。以前報告した肥満糖尿病でのマクロファージ鉄ストレスが病態の中心にあることも含めて、慢性炎症ではマクロファージの鉄が治療標的となると考えられた。トランスクリプトーム解析から、マクロファージ鉄を減じると抗酸化経路、脂質代謝に関与する遺伝子発現が多く含まれていたことも、それを支持するものと考えられる。マクロファージ鉄制御による新規治療法の可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of macrophage iron stress in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by using macrophage-specific Fth knockout (KO) mice showing half-content of iron in macrophage. WT mice with NASH showed increase of NAS and fibrosis score in histological analysis, the elevated mRNA expression of inflammation and fibrosis, and increment of oxidative stress and macrophage infiltration with crown-like structure, which were alleviated in KO mice. In addition, the occurrence of hematoma with NASH were reduced in KO mice. These findings suggest that macrophage iron maybe a therapeutic target in the development of NASH.

研究分野：薬理学、循環器内科学

キーワード：鉄 マクロファージ 脂肪肝炎

1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリック症候群の肝臓表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患の増加が注目されている。非アルコール性脂肪肝における脂肪蓄積が、酸化ストレス・炎症を惹起して非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcohol steatohepatitis: NASH) に進行すると考えられている。NASH では肝線維化のため 10-20%は肝硬変に進行し、肝がんの原因となる。よって、NASH の病態解明とその予防法・治療法の開発は喫緊の課題である。

メタボリック症候群に共通する病態基盤に慢性炎症がある。慢性炎症は酸化ストレスと連関して悪循環を形成することによる、臓器線維化を促進する原因となる。慢性炎症においてマクロファージが重要な役割を担っていることが知られており、NASH も例外ではない。肝臓は常在性マクロファージ (クッパー細胞) が存在しているが、NASH が生じる骨髄由来の疾患マクロファージが浸潤増加して病態に影響する。よって、マクロファージの役割を解明することは、NASH の病態解明や治療法開発につながると考えられる。

NASH 病態には鉄が関与することが知られている。鉄は必須微量元素である一方、Fenton 反応を触媒してヒドロキシルラジカル生成による酸化ストレス産生により、臓器障害の原因となる。研究代表者は、鉄が酸化ストレス・炎症を介して肥満・糖尿病、腎臓病、サルコペニアなどの病態を増悪させ、鉄除去によりそれらの病態が改善することを見出し、鉄による酸化ストレスと炎症である「鉄ストレス」の役割を明らかにしてきた。しかし鉄キレート薬や鉄摂取制限の非特異的鉄除去は、貧血などの副作用により治療応用に限界があった。

マクロファージは、老化赤血球を貪食し鉄をリサイクルする鉄代謝が盛んな細胞である。(1) 炎症性マクロファージは保持タンパク質 H-フェリチン(FTH)発現が増加し鉄蓄積の表現型を呈すること (Haematologica. 2010)、(2) マクロファージ鉄量増加は炎症を促進すること (Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol. 1999)、(3) 肥満脂肪組織における FTH とマクロファージ局在が一致する (Tajima and Ikeda, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012) こと、から FTH はマクロファージ鉄量規定因子と考えた。マクロファージ特異的 FTH(LysM-CreFth) 欠損(KO)マウスの作成・解析を行い、KO マウスでは野生型(WT)マウスと比較してマクロファージ鉄量が半減し、肥満・糖尿病モデルでは脂肪組織の酸化ストレス・炎症性サイトカイン増加と耐糖能・インスリン抵抗性悪化が KO マウスで軽度であった (Ikeda, et al. Diabetologia 2020)。これは、マクロファージが鉄ストレスの中心であり、マクロファージ鉄が酸化ストレス・炎症の制御標的であることを示唆している。また、HFD 負荷は軽度の脂肪肝を誘導するが、HFD 負荷 WT マウスは病理組織において脂肪肝を呈し、肝臓中性脂肪含有量も増加していたが、KO マウスでは、その程度が軽度と対照的であった。鉄除去による NASH 改善効果の標的細胞は明らかでないものの、前述の結果から、マクロファージ鉄ストレスが NASH を含めた非アルコール性肝疾患の病態に関与している可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、NASH の炎症—線維化連関におけるマクロファージ鉄ストレスの役割を解明し、マクロファージ鉄制御に関わる新規遺伝子を探索・同定し、鉄ストレス制御による NASH 治療法の開発へとつながる基礎的知見を集積することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NASH におけるマクロファージ鉄ストレス役割解明、(2) 細胞内鉄量を制御する新規遺伝子の探索・同定、のため、以下の実験を行った。

(1) マクロファージ特異的 FTH 欠損マウスを用いた NASH モデルの解析

12 週間の高脂肪食/四塩化炭素/ブドウ糖シヨ糖負荷による NASH モデルと正常試料群 (ND) を対照群として比較・検討した。

- ① NASH モデルにおける鉄代謝変化の評価：NASH モデルで肝臓鉄量が増加するか肝臓組織鉄量をフェロジン法で測定し、鉄量の変化を評価した。
- ② マクロファージ鉄ストレスが肝機能と脂質蓄積に与える影響の検討：肝障害や肝臓脂質蓄積について、肝細胞逸脱酵素、病理学的所見 (steatosis, ballooning, inflammation) の数値化、肝臓中性脂肪測定で評価した。また脂質代謝に関連する遺伝子発現もリアルタイム PCR で調べた
- ③ マクロファージ鉄ストレスの炎症と線維化に及ぼす変化の検討：炎症性サイトカインや線維化に関わる遺伝子発現を調べた。病理組織学的に CD68, F4/80 の免疫染色や Picrosirius-red 染色を行い、マクロファージ浸潤の変化や線維化の程度を評価した。
- ④ 酸化ストレスの評価：酸化ストレスについて、4-hydroxynonenal (HNE) のタンパク質発現と免疫組織化学で相対量と局在性を評価した。
- ⑤ 肝がん発症についての評価：高脂肪食/四塩化炭素/ブドウ糖シヨ糖負荷による NASH モデルは期間を伸ばすことで肝がんを発症する。本研究では NASH 確立後、さら 30 週間まで負荷を行い、NASH モデルの肝がん発症について、正常試料群 (ND) を対照群として比較・検討した。

(2) マクロファージ鉄量を規定する新規因子の網羅的解析

マウス腹腔内マクロファージの RNA-seq トランスクリプトーム解析を行い、WT マウスと KO マウスの遺伝子発現変化を比較した。また、鉄非依存性の FTH 発現を制御する新規因子が存在するか調べた。

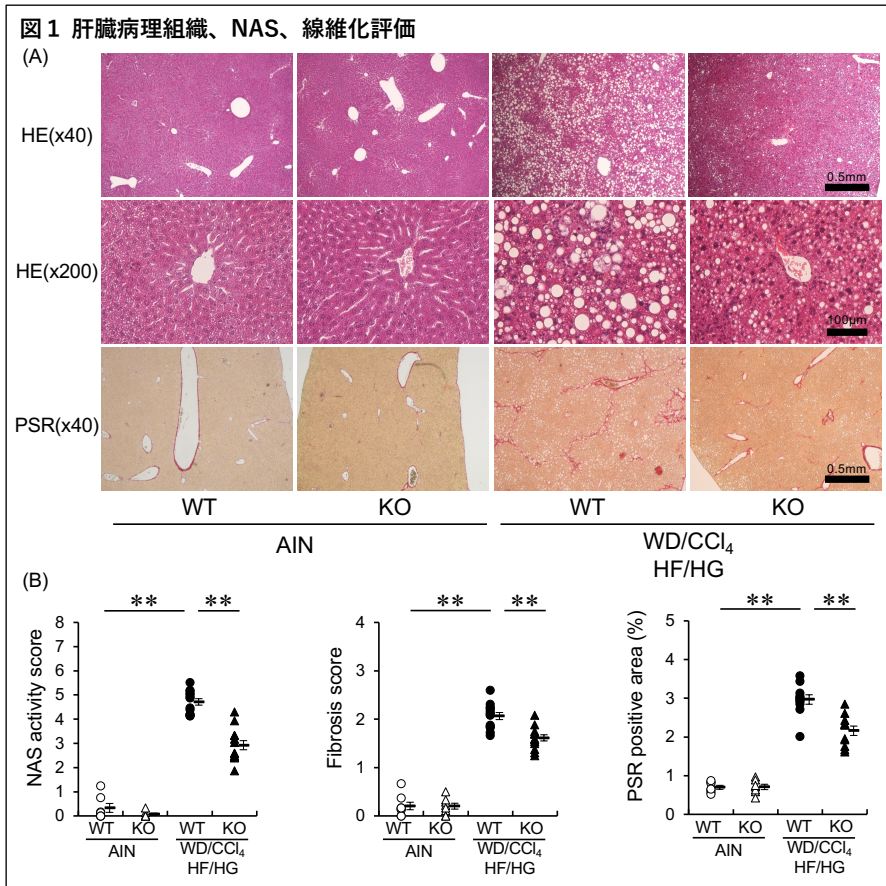
4. 研究成果

体重について、ND 群と比較すると NASH 群は体重増加の抑制傾向がみられたものの、ND 群、NASH 群ともに WT、KO マウス間に差を認めなかった。一方、肝臓重量について、NASH モデルでは肝臓重量の増加がみられたが、WT に比べて KO マウスではその程度は軽度であった。肝臓逸脱酵素は NASH で上昇したが、KO マウスで軽度であった。NASH の WT マウスの肝臓中性脂肪は NASH の WT マウスで増加したが、KO マウスでは抑制された。また、肝臓鉄量について、ND 群と比べて NASH 群で鉄濃度が低い傾向がみられたが、ND 群、NASH 群ともに WT、KO マウス間に統計学的な差を認めなかった (表 1)。

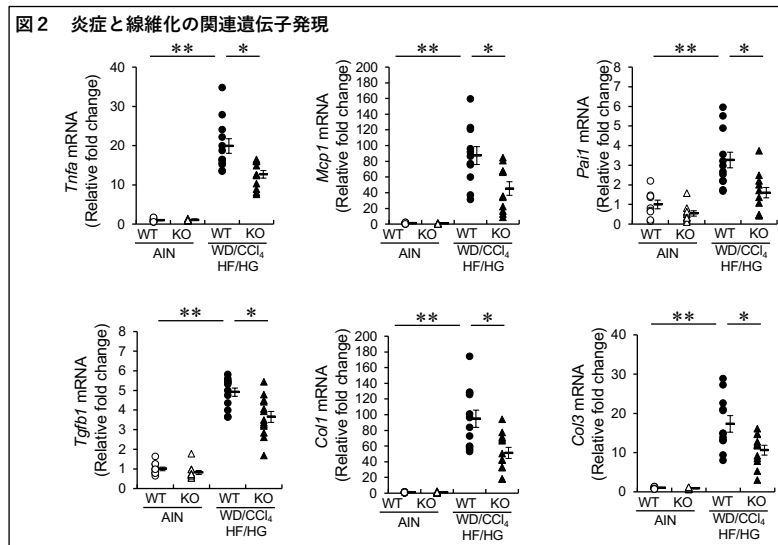
	ND		WD+CCL ₄ /HF+HG	
	WT	LysM-Cre <i>Fth</i> KO	WT	LysM-Cre <i>Fth</i> KO
Initial body weight (g)	21.8 ± 0.4	22.3 ± 0.3	22.3 ± 0.3	22.1 ± 0.2
Last body weight (g)	30.4 ± 0.6	27.3 ± 0.6	28.9 ± 0.5	28.8 ± 0.6
Liver weight (mg)	954 ± 40	924 ± 20	2117 ± 78 ^{***}	1627 ± 53 ^{***††}
LW/BW	31.2 ± 1.1	33.8 ± 1.1	73.1 ± 1.9 ^{***}	56.6 ± 1.7 ^{***††}
AST(IU)	55 ± 8	55 ± 4	171 ± 14 ^{***}	122 ± 7 ^{***††}
ALT(IU)	17 ± 1	30 ± 10	206 ± 16 ^{***}	119 ± 7 ^{***††}
Fasting blood glucose (mg/dl)	77 ± 3	78 ± 2	168 ± 10 ^{***}	161 ± 7 ^{***}
Triglyceride (mg/dl)	62 ± 4	49 ± 4	46 ± 3 ^{**}	34 ± 4 ^{**†}
Hepatic TG (mg/g tissue)	59 ± 4	49 ± 5	93 ± 4 ^{***}	65 ± 6 [†]
Hepatic iron (µg Fe/g tissue)	9.7 ± 1.2	10.9 ± 1.5	7.7 ± 1.4	6.8 ± 1.0

Data represent mean ± SEM; n = 6-13; *P < 0.05, **P < 0.01 vs. WT-ND; #P < 0.05, ###P < 0.01 vs. LysM-*Fth* KO-ND, †P < 0.05, ††P < 0.01 vs. WT- WD+CCL₄/HS+HG

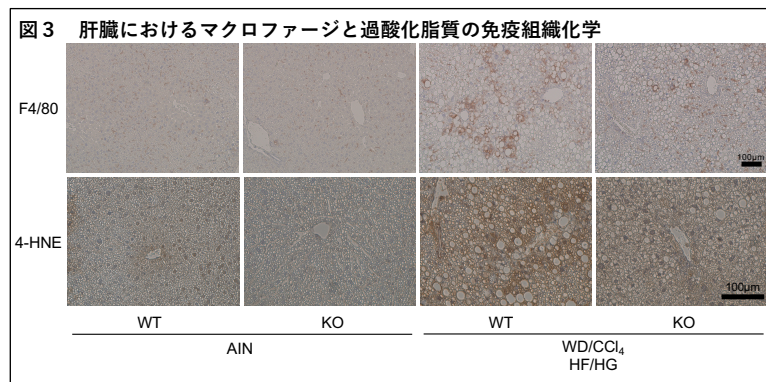
病理組織による NAS と fibrosis score について、NASH 誘導による値の増加は、WT と比較して KO では軽度であった (図 1)。



肝臓炎症性サイトカインの遺伝子発現は、ND マウス群と比較して、NASH 群では増加がみられたが、WT マウスに比べて KO マウスでは軽度であった。同様に、線維化関連遺伝子の発現増加も KO で軽減されていた (図 2)。NASH 誘導により、WT マウスでみられた炎症性経路 JNK 経路と線維化経路 TGFβ1-Smad 経路活性化も KO で抑制された。

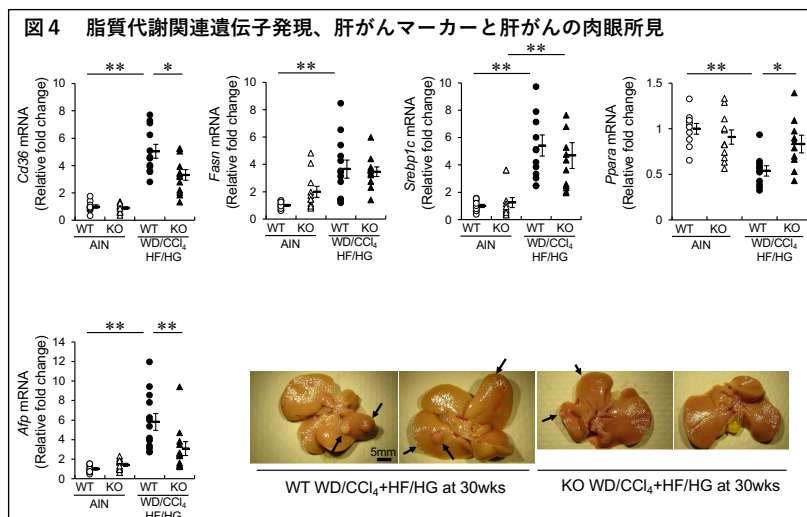


NASH 誘導により、脂質過酸化 4HNE のウエスタンブロット、免疫組織化学ともに WT で発現は増加したが、KO では抑制されていた。NASH 誘導による肝臓への F4/80 マクロファージ浸潤増加と CLS 形成も KO で軽減された (図 3)。

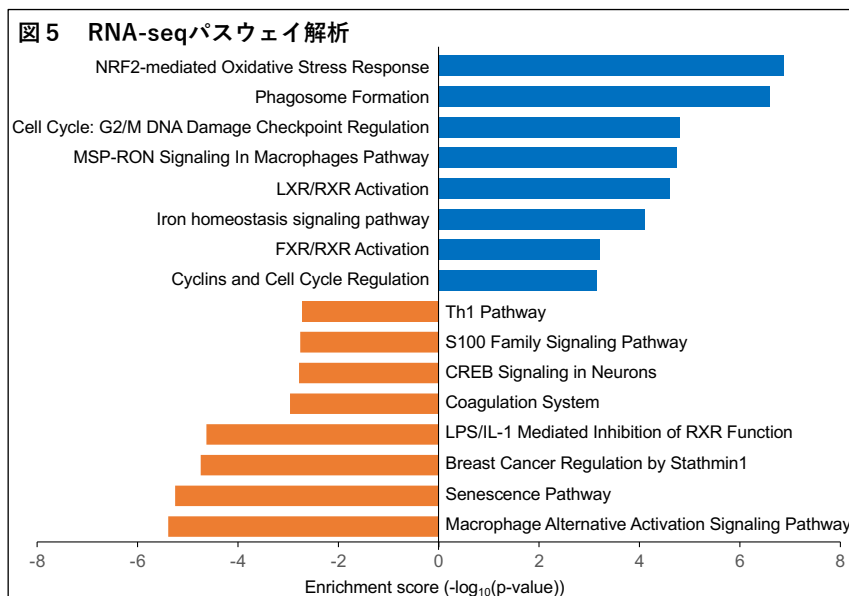


NASH モデルにおける肝臓脂肪酸取り込み・脂質蓄積に関わる遺伝子発現増加、脂肪酸分解に関わる遺伝子発現低下は KO マウスでは正されたが、Fasn など脂肪酸合成に関わる遺伝子発現は NASH で増加するも WT マウスと KO マウス間で差を認めなかった。一方、腫瘍マーカーである AFP 発現は NASH で増加したが、WT マウスと比べて KO マウスで軽度であった (図 4 上)。

30 週間にわたる高脂肉食/四塩化炭素/ブドウ糖シヨ糖負荷により NASH に加えて肝がんを誘導した。WT マウスは 85%が肝がんを呈したが、NASH KO では 60%であった。腫瘍数、最大腫瘍径は KO で低値であった (図 4 下)。



腹腔内マクロファージのトランスクリプトーム解析での発現変動遺伝子について、KOでの増加遺伝子には抗酸化経路に関する遺伝子群が、低下遺伝子群には炎症と老化に関する遺伝子群が、多く含まれていた(図5)。また、変動遺伝子について鉄応答エレメントを有するものを調べたところ、鉄欠乏で翻訳が阻害される5'側にIREがある24遺伝子、鉄欠乏で翻訳が促進される3'側にIREがある126遺伝子を同定した。IREを有する変動遺伝子のGO解析では、5'側IRE24遺伝子はアミド輸送が、3'側IRE126遺伝子抗酸化経路が上位の結果であった。



以上より、高脂肪食/四塩化炭素/ブドウ糖シヨ糖負荷による NASH はマクロファージ特異的フェリチン欠損によって抑制され、マクロファージ鉄の NASH 病態進展への関与と治療標的となることが示唆された。今後、肝臓から単離したマクロファージでトランスクリプトーム網羅解析を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikeda Yasumasa, Funamoto Masafumi, Tsuchiya Koichiro	4. 巻 69
2. 論文標題 The role of iron in obesity and diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.69.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda Yasumasa, Funamoto Masafumi, Kishi Seiji, Imanishi Masaki, Aihara Ken-ichi, Kashiwada Yoshiki, Tsuchiya Koichiro	4. 巻 103
2. 論文標題 The novel preventive effect of a Japanese ethical Kampo extract formulation TJ-90 (Seihaito) against cisplatin-induced nephrotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phytomedicine	6. 最初と最後の頁 154213 ~ 154213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phymed.2022.154213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Funamoto Masafumi, Sunagawa Yoichi, Katanasaka Yasufumi, Kato Toru, Funada Junichi, Ajiro Yoichi, Komiyama Maki, Akao Masaharu, Yasoda Akihiro, Yamakage Hajime, Satoh-Asahara Noriko, Wada Hiromichi, Ikeda Yasumasa, Morimoto Tatsuya, Hasegawa Koji	4. 巻 2
2. 論文標題 Effects of high-absorption curcumin for the prevention of hypertensive heart disease: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Heart Journal Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ehjopen/oeac057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hara Tomoyo, Uemoto Ryoko, Sekine Akiko, Mitsui Yukari, Masuda Shiho, Yamagami Hiroki, Kurahashi Kiyoe, Yoshida Sumiko, Otoda Toshiki, Yuasa Tomoyuki, Kuroda Akio, Ikeda Yasumasa, Endo Itsuro, Honda Soichi, Yoshimoto Katsuhiko, Kondo Akira, Tamaki Toshiaki, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Plasma Heparin Cofactor II Activity Is Inversely Associated with Hepatic Fibrosis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.63752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Yasumasa	4. 巻 100
2. 論文標題 Novel roles of HIF-PHIs in chronic kidney disease: the link between iron metabolism, kidney function, and FGF23	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 14 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2021.04.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Yasumasa, Hamano Hirofumi, Horinouchi Yuya, Miyamoto Licht, Hirayama Tasuku, Nagasawa Hideko, Tamaki Toshiaki, Tsuchiya Koichiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Role of ferroptosis in cisplatin-induced acute nephrotoxicity in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Trace Elements in Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 126798 ~ 126798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtemb.2021.126798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara Tomoyo, Uemoto Ryoko, Sekine Akiko, Mitsui Yukari, Masuda Shiho, Kurahashi Kiyoe, Yoshida Sumiko, Otoda Toshiki, Yuasa Tomoyuki, Kuroda Akio, Ikeda Yasumasa, Endo Itsuro, Honda Soichi, Yoshimoto Katsuhiko, Kondo Akira, Tamaki Toshiaki, Matsumoto Toshio, Matsuhisa Munehide, Abe Masahiro, Aihara Ken ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Plasma heparin cofactor II activity is inversely associated with albuminuria and its annual deterioration in patients with diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 2172 ~ 2182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Shimon, Takechi Kenshi, Jozukuri Natsumi, Niimura Takahiro, Chuma Masayuki, Goda Mitsuhiro, Zamami Yoshito, Izawa-Ishizawa Yuki, Imanishi Masaki, Horinouchi Yuya, Ikeda Yasumasa, Tsuchiya Koichiro, Yanagawa Hiroaki, Ishizawa Keisuke	4. 巻 902
2. 論文標題 Examination of the antiepileptic effects of valacyclovir using kindling mice search for novel antiepileptic agents by drug repositioning using a large medical information database	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 174099 ~ 174099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2021.174099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Kenji, Taguchi Kensei, Kishi Seiji, Brooks Craig R., Ochi Arisa, Kadoya Hiroyuki, Ikeda Yasumasa, Miyoshi Masashi, Tamaki Masanori, Abe Hideharu, Aihara Ken-ichi, Kashihara Naoki, Nagai Kojiro	4. 巻 556
2. 論文標題 Dual disruption of eNOS and ApoE gene accelerates kidney fibrosis and senescence after injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 142 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamano Hirofumi, Ikeda Yasumasa, Goda Mitsuhiro, Fukushima Keijo, Kishi Seiji, Chuma Masayuki, Yamashita Michiko, Niimura Takahiro, Takechi Kenshi, Imanishi Masaki, Zamami Yoshito, Horinouchi Yuya, Izawa-Ishizawa Yuki, Miyamoto Licht, Ishizawa Keisuke, Fujino Hiromichi, Tamaki Toshiaki, Aihara Ken-ichi, et al.	4. 巻 99
2. 論文標題 Diphenhydramine may be a preventive medicine against cisplatin-induced kidney toxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 885 ~ 899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2020.10.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 池田 康将、船本 雅文、今西 正樹、土屋 浩一郎
2. 発表標題 漢方薬の新規腎保護作用の検討
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船本雅文、池田 康将.
2. 発表標題 生薬由来化合物のオウゴンによるドキシソルピシンの心毒性に対する効果検討
3. 学会等名 第31回日本循環薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船本雅文、池田 康将
2. 発表標題 ドキソルビシンの心毒性に対する生薬由来化合物オウゴンンの効果検討
3. 学会等名 第140回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 康将, 濱野 裕章, 堀ノ内 裕也, 宮本 理人, 玉置 俊晃, 土屋 浩一郎
2. 発表標題 シスプラチン誘発性腎毒性における鉄依存性細胞死の役割の検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学教育研究者総覧 http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/219499/profile-ja.html 徳島大学大学院医歯薬学研究所 医学域 医科学部門 生理系 薬理学分野 ホームページ https://yasuike2.wixsite.com/website
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------