

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 4 月 11 日現在

機関番号：24403

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880029

研究課題名（和文） ミエリン疾患および肝線維化モデルラットにおける鉄代謝の病理学的役割の解明

研究課題名（英文） Pathological roles of iron metabolism in rat models of myelin disease and hepatic fibrosis

研究代表者

井澤 武史 (IZAWA TAKESHI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：20580369

研究成果の概要（和文）：

ミエリン疾患および肝疾患の発病・進展に関わる鉄代謝の経時的变化を解析した。dmy ミュータントラットの脱髓の病理発生には鉄蓄積およびそれに伴う酸化ストレスが関与するが、mv ミュータントラットでは鉄蓄積の関与が低いことを明らかにした。チオアセトアミド誘発急性肝障害モデルラットでは、肝臓に一過性の鉄蓄積が引き起こされるが、hepcidin を中心とする各種鉄調節因子の機能亢進により、鉄代謝が正常に回復することを示した。肝線維化モデルラットでは、線維化の進展と一致して、肝鉄過剰症が生じることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We examined changes in iron metabolism in rat models of CNS myelin and liver diseases. It was found that abnormal iron accumulation and oxidative stress are involved in the pathogenesis of the demyelinating dmy mutant rat, but not in the hypomyelinating mv rat. Rats with acute hepatic injury, induced by a single injection of thioacetamide, develop transient iron accumulation in the liver, which is recovered by upregulation of iron regulatory factors such as hepcidin, a central regulator of systemic iron homeostasis. Hepatic iron overload is induced in rats with hepatic fibrosis induced by repeated injection of thioacetamide.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,240,000 | 372,000 | 1,612,000 |
| 2011 年度 | 1,140,000 | 342,000 | 1,482,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,380,000 | 714,000 | 3,094,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：鉄代謝，鉄調節因子，難治疾患，肝線維化，ミエリン疾患

1. 研究開始当初の背景

鉄は酸素運搬や ATP 合成など生命維持に

不可欠な栄養素であり、生体内の鉄代謝は種々の鉄調節因子の相互作用により厳格に維持されている。肝臓は全身の鉄代謝を調節

する中心的臓器である一方で、鉄過剰により肝線維化が進展することが知られている。また、中枢神経系は鉄要求量が最も高い臓器の一つであり、鉄欠乏ならびに鉄過剰によりミエリン疾患が引き起こされることが報告されている。これらの臓器では、鉄代謝障害が各種疾患の病理発生に深く関わっていると考えられるが、その機序には不明点が多く残されている。

中枢神経系のミエリン疾患は重篤な神経症状を伴う進行性疾患であり、現在のところ根本的な治療法はない。肝線維化は肝硬変および肝癌に進展し得る難治性進行性疾患であり、我が国の肝硬変患者は50万人を数える。これらの難治疾患の早期克服が望まれているが、その実現のためには疾患の病態解明が不可欠である。本研究では、中枢神経系のミエリン疾患と肝線維化の病理発生を明らかにするため、各疾患における鉄代謝の病理学的役割を詳細に調べる必要があると考え、研究を計画した。

2. 研究の目的

前述の通り、中枢神経系および肝臓では、鉄代謝が種々の生理学的機能に重要な役割を果たしていることから、ひとたび鉄代謝が障害されると、臓器は病的状態に陥ると考えられる。そこで本研究では、中枢神経系のミエリン疾患および肝線維化の病態進展には、鉄調節因子群の機能障害に基づく鉄代謝障害が背景にあると仮説を立てた。本研究の目的は、ミエリン疾患モデルラットおよび肝疾患モデルラットを用いて、病変形成期から進展期における鉄代謝変化および各種鉄調節因子の発現動態を解析し、ミエリン疾患および肝線維化の発病・進展に関わる鉄代謝の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ミエリン疾患モデル

2種の異なるミエリン疾患ミュータントラット (dmy ラット, mv ラット) を用いて、ミエリン病変の形成期から進展期における鉄代謝変化を経時的に解析した。これら2種のミュータント系統では、劣性ホモ型個体 (dmy/dmy, mv/mv) の生後ミエリン形成期において、進行性のミエリン疾患が発現する。各ミュータント系統の遺伝子型の同定には、血液から抽出したゲノムDNAを用いて、変異部位に特異的なプライマーによるPCR法あるいはPCR-RFLP法を実施した。対照群には野生型およびヘテロ型個体を使用した。

はじめに、ミエリン病変部の鉄の動態を調べる目的で、ラットをイソフルラン深麻酔下

で4%パラホルムアルデヒド液にて経左心灌流固定し、脊髄を摘出、30%スクロース加PBSに浸漬後、凍結用コンパウンドに包埋し、クリオスタット (CM1900, Leica) にて10 μmの凍結切片を作製した。次に、各種鉄調節因子の発現動態を調べるために、脊髄病変部からtotal RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを合成した後、SYBR greenを用いたリアルタイムPCR法 (Linegene, Bioflux) により、ferritin, heme oxygenase-1 (heat shock protein 32) およびtransferrinのmRNA発現量を解析した。続いて、これらの鉄調節因子の病変部における発現分布を調べるために、脊髄凍結切片を用いたHRP-DAB検出法により、ferritin, heme oxygenase-1, transferrinの免疫組織化学を実施した。さらに、各因子の発現細胞を同定するために、各因子と3種のグリア細胞マーカー (GFAP; アストロサイト, CNP; オリゴデンドロサイト, Iba-1; ミクログリア) の二重蛍光免疫染色を行い、コンフォーカル顕微鏡システム (Clsi, ニコン) を用いた共局在の解析を行った。得られたデータを2種のミエリン疾患モデル間で比較検討した。

(2) 肝線維化モデル

2-1 急性肝障害モデル

7週齢の雄F344ラットにthioacetamide (300 mg/kg BW) を単回腹腔内投与し、急性肝障害の発病から回復まで(投与後10時間, 1, 2, 3, 5, 7, 10日) 経時的に肝臓および末梢血を採材した。対照群には生理食塩水を投与した。全身の鉄代謝機能を評価するために、末梢血および肝臓から血清鉄, 血清トランスフェリン, 肝臓鉄を生化学的に測定した。肝病変部から組織切片を作製し、HE染色による病理組織学的解析を行った後、DAB増感法を用いた鉄組織化学法により、肝組織中の鉄の分布を調べた。各種鉄調節因子の発現動態を調べるために、肝病変部からtotal RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを合成した後、Taqmanプローブ (Applied Biosystems) を用いたリアルタイムPCR法により、15種類の鉄調節因子のmRNA発現量を解析した。

2-2 慢性肝線維化モデル

7週齢の雄F344ラットにthioacetamide (100 mg/kg BW) を週2回反復腹腔内投与し、肝線維化の発病から肝硬変の進展期に至るまで(投与後5, 10, 15, 20, 25週) 経時的に肝臓および末梢血を採材した。対照群には生理食塩水を投与した。全身の鉄代謝機能を評価するために、末梢血および肝臓から血清鉄, 血清トランスフェリン, 肝臓鉄を生化学的に測定した。肝病変部から組織切片を作製し、HE染色による病理組織学的解析を行った。

後、DAB増感法を用いた鉄組織化学法により、肝組織中の鉄の分布を調べた。各種鉄調節因子の発現動態を調べるために、肝病変部からtotal RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを合成した後、Taqmanプローブを用いたリアルタイムPCR法により、15種類の鉄調節因子のmRNA発現量を解析した。得られたデータを、急性および慢性肝疾患モデル間で比較検討した。

4. 研究成果

(1) ミエリン疾患モデル

中枢神経系の脱髄モデルであるdmyラットにおいて、ミエリン病変の進展と一致して、病変部のグリア細胞に鉄の過剰蓄積が認められた。ミエリン低形成モデルであるmvラットでは、病変部に鉄蓄積はみられなかった。dmyラットでは病変の進展時期と一致して、鉄貯蔵蛋白ferritinと抗酸化酵素heme oxygenase-1の発現上昇が認められた。mvラットではこれらの因子の発現変化は認められなかった。dmyラットの脱髄病変部において、ferritinの発現はアストロサイトとオリゴデンドロサイトに認められ、鉄染色における鉄蓄積の分布パターンと一致していた。また、病変部のオリゴデンドロサイトにおいて、heme oxygenase-1の発現上昇が認められた。以上の結果より、dmyラットの脱髄の病理発生には、鉄の過剰蓄積による酸化ストレスが関与することが示唆され、鉄代謝障害がミエリン病変のトリガーとなる可能性が示された。一方、mvラットのみエリン低形成の病理発生には、鉄代謝変化の関与が低いことが示された。本研究では、2種のミエリン疾患モデル間において、病変の進展に関わる鉄代謝の役割に違いがあることが示された。

(2) 肝線維化モデル

2-1 急性肝障害モデル

肝毒性物質であるthioacetamideの投与により、投与1日目から小葉中心性の肝細胞壊死、2日目から病変部に炎症細胞浸潤（マクロファージ、リンパ球）が認められたが、病変は5日目から減弱し、10日目にはほぼ正常に回復した。肝細胞壊死に一致して、1日目に血清鉄が一過性に上昇し、続いて5日目をピークに肝細胞の鉄蓄積量が上昇し、10日目の肝病変の回復とともに鉄代謝は正常レベルにまで回復した。病変部では、ヘモジデリン貪食マクロファージが散見された。全身の鉄代謝のcentral regulatorであるhepcidinの発現は、血清鉄上昇後の投与2日目に一過性に上昇した。投与3日目には、肝細胞内の鉄蓄積と一致して、鉄の細胞内取り込みに関

わるtransferrin receptor 1 (CD71)や鉄貯蔵蛋白ferritinの発現上昇が認められた。その後の鉄蓄積からの回復と関連して、鉄の細胞外排出因子ferroportin (Slc40a1)の発現上昇がみられた。以上の結果から、急性肝障害により一過性の鉄過剰症が惹起されたものの、hepcidinの発現上昇を中心として、鉄の肝細胞内取り込み・貯蔵の亢進およびその後の細胞外排出亢進により、鉄代謝が正常に回復することが示された。

2-2 慢性肝線維化モデル

thioacetamideの反復腹腔内投与により、投与5週目から小葉中心部を主体とする線維化が、10週目から偽小葉の形成が認められ、20週目以降は著しい細胆管反応を伴う進行性肝硬変の像を呈した。線維化病変の進展に一致して、10週目以降から偽小葉を形成する肝細胞内に鉄蓄積が認められた。また、線維化病変部において、ヘモジデリン貪食マクロファージが散見された。肝細胞の鉄蓄積の進行に伴って、hepcidinなどの鉄調節因子の異常な発現パターンが認められた。以上の結果より、肝線維化の進展に鉄代謝障害（鉄過剰症）が関わること、およびこの鉄代謝障害は鉄調節因子の機能異常に起因す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2件）

- ① Izawa T, Murai F, Akiyoshi H, Ohashi F, Yamate J, Kuwamura M. Encapsulating peritoneal sclerosis associated with abnormal liver development in a young dog. The Journal of Veterinary Medical Science. 査読有, 73(5), 2011, 697-700.
- ② Izawa T, Yamate J, Franklin RJ, Kuwamura M. Abnormal iron accumulation is involved in the pathogenesis of the demyelinating dmy rat but not in the hypomyelinating mv rat. Brain Research. 査読有, 1349, 2010, 105-14.

〔学会発表〕（計1件）

- ① 井澤武史. Thioacetamide誘発ラット急性肝障害における鉄調節因子群の発現プロファイリング. 第28回日本毒性病理学会学術集会, 東京. 2012年2月3日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/path/path.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井澤 武史 (IZAWA TAKESHI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：20580369

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし