

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08084

研究課題名(和文)慢性肝疾患における鉄過剰の病態修飾機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism for disease modulation by iron overload in chronic liver diseases

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・准教授

研究者番号：20580369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝鉄過剰モデルラットでは、チオアセトアミドやアセトアミノフェンによる肝細胞傷害が軽減し、アリルアルコールによる肝細胞傷害が増悪する。この病態修飾には、薬物代謝酵素の変動が関わることを示された。また、肝鉄過剰によって、チオアセトアミド誘発肝硬変が著しく抑制されるが、そのメカニズムとしてアポトーシスの抑制が関わることを示された。また、肝鉄過剰によって、活性化高脂肪食誘発脂肪性肝炎が増悪されるが、これには局所の過剰な炎症活性化が関わることを示された。本研究によって、肝鉄過剰が肝疾患に対して増悪/抑制の二面性を発揮するメカニズムの一端が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行によって、慢性肝疾患において、肝臓の鉄蓄積が時に病態を増悪し、時に抑制するという二面性を発揮するメカニズムの一端が解明された。慢性肝疾患の1つである非アルコール性脂肪性肝疾患は、国内の成人の約20～30%が罹患していると考えられており、肝臓の鉄蓄積はその3割程度にみられることが予測される。本研究で得られたデータが慢性肝疾患の病態解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study showed that experimental hepatic iron overload suppresses thioacetamide- or acetaminophen-induced liver injury and exacerbates allyl alcohol-induced liver injury, via changes in xenobiotic enzymes. It also showed that the hepatic iron overload also abrogates thioacetamide-induced liver cirrhosis, by suppression of hepatocellular apoptosis. The hepatic iron overload was shown to enhance high-fat diet-induced steatohepatitis, by excess activation of local lobular inflammation. The present study elucidated some mechanisms for the dual role in the modulation of liver diseases by iron overload.

研究分野：獣医病理学

キーワード：鉄過剰 慢性肝疾患 代謝性肝疾患 薬剤性肝傷害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患 (chronic liver disease; CLD) はウイルス性肝炎, アルコール性肝炎および非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) など種々の病因に基づく肝疾患の慢性ステージであり, 難治性の肝硬変, 肝癌へと進展する重篤な疾患である。我が国の肝硬変患者は 50 万人に上り, 肝硬変により年間約 17,000 人が, 肝癌により年間約 30,000 人が亡くなっている (肝炎情報センター <http://www.kanen.ncgm.go.jp/index.html>)。一方, 獣医学領域においても, テリア犬種の銅関連慢性肝炎やコッカースパニエル犬種の慢性肝炎など, 慢性肝疾患が臨床上の問題となっている (Pathology of Domestic Animals, 6th Edition, 2016)。よって, 肝硬変の病態解明は, 医学・獣医学の双方における重要な研究課題と考えられる。

鉄は酸素運搬や ATP 産生に関わる生体の必須元素であり, 肝細胞から産生される hepcidin などの鉄調節因子により, 生体内の鉄代謝は厳格に維持されている (Cell 142:24-38, 2010)。よって, 持続的・反復的な肝障害が起こると, 鉄調節機構の破綻により鉄代謝障害 (鉄過剰) が生じる。この鉄過剰は肝疾患の病態を増悪させると考えられている。例えば, C 型肝炎では鉄過剰が病態進展の一因と捉えられており, 瀉血により病態が改善することから, 有用な治療法の 1 つと考えられている (日本肝臓学会編 C 型肝炎治療ガイドライン第 4 版, 2015)。また, NASH 患者では, 瀉血療法の効果が低い (Hepatology 61:1555-1564, 2015) という報告と, 肝臓の鉄沈着が重症度と相関する (Hepatology 53:448-57, 2011) という報告があり, 未だ結論が得られていない。一方で, 肝再生時には肝臓の鉄要求量が増大することから, 鉄過剰は病態進展のみならず, 組織再生にも重要な役割を果たすと考えられる。このように, 慢性肝疾患における鉄過剰の役割は, 病因や病期によって大きく変わり得るが, そのメカニズムについては未だ不明である。

### 2. 研究の目的

申請者は, これまでに慢性肝疾患における鉄過剰の発症メカニズムやその病理学的役割に関する研究を行ってきた。その成果として, NASH モデルラットにおいて, 鉄過剰食の投与により NASH の病態が悪化する可能性を示した。一方で, チオアセトアミド (TAA) 誘発急性肝障害モデルラットにおいては, 鉄過剰食投与により肝障害が軽減される可能性を示した。すなわち, 肝病変の病因やステージによって, 鉄過剰の役割が大きく変わり得ることを明らかにしたが, そのメカニズムや規定因子については未だ不明である。

本研究では, メカニズムの異なる種々の肝障害を与えた際に, 鉄過剰が肝病変をどのように変化させるかを解析し, 鉄過剰による肝疾患の増悪/抑制機構およびその規定因子を追究した。

### 3. 研究の方法

(1) ラットに正常食または鉄過剰食を 4 週間給餌した後, メカニズムの異なる肝毒性物質 (チオアセトアミド, アセトアミノフェン, アリルアルコール) をそれぞれ単回投与し, 一過性の肝障害を誘発させ, その病態を解析した。

(2) ラットに正常食または鉄過剰食を給餌し, 生食またはチオアセトアミド (TAA; 100 mg/kg) を週 2 回, 20 週間反復投与し, その病態を解析した。

(3) ラットに正常食 (脂質 5%, Fe 0.03%), 高脂肪食 (脂質 16%, Fe 0.03%), 高脂肪・鉄過剰食 (脂質 16%, Fe 0.5%) または鉄過剰食 (脂質 5%, Fe 0.5%) を 30 週間投与し, その病態を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 正常食給餌群と比べて, 鉄過剰食給餌群では, チオアセトアミドやアセトアミノフェンの投与による血清肝逸脱酵素 (AST, ALT) 値が低下し, 組織学的な小葉中心性肝細胞壊死も軽減した。一方で, 鉄過剰食給餌群では, アリルアルコール投与によって肝逸脱酵素が上昇し, 組織学的な小葉辺縁部主体の肝細胞壊死も増悪していた。よって, 化合物によって, 急性肝傷害に関わる鉄過剰の役割が異なる可能性を示した。

鉄過剰による肝病変の修飾機構を追求するために, 鉄過剰肝と正常肝で薬物代謝酵素の発現を解析したところ, 鉄過剰肝ではチオアセトアミドの毒性発現に関わる代謝酵素 (CYP2E1, FM03) の発現低下が認められ, アリルアルコールの毒性発現に関わる代謝酵素 (ADH) の発現上昇が認められた。また, トランスクリプトーム解析により, 鉄過剰肝において, 第 I 相酵素 (Cyp1a1 や Adh1 など 12 種が上昇; Cyp2d4 など 12 種が低下), 第 II 相酵素 (Gsta3 など 4 種が上昇; Ugt2a3 など 4 種が低下) および薬物トランスポーター (Abcg2 など 3 種が上昇; Slco3a1 など 7 種が低下) の遺伝子発現が変動することが示された。よって, 肝鉄過剰による化合物誘発肝傷害の病態修飾には, 薬物代謝酵素の変動が関わる可能性を示した。

(2) 正常食・TAA 投与群では, 実験開始後 20 週において高度な線維化を伴う肝硬変がみられたが, 鉄過剰食・TAA 投与群では線維化が著しく抑制され, 肝硬変の発現は認められなかった。正

常食群・TAA 投与群と比較して、鉄過剰食・TAA 投与群では血清鉄が約 3 倍、肝臓鉄が約 8 倍に上昇し、鉄過剰状態が顕著に誘発されていた。肝臓中マロンジアルデヒド含有量は、正常食・TAA 投与群と比較して、鉄過剰食・TAA 投与群で約 4 倍上昇し、肝硬変の著しい抑制に反して脂質過酸化レベルが上昇していることが示された。TAA の肝毒性発現に関わる薬物代謝酵素 (CYP2E1, FM03) の肝発現量は、両群間で差はみられなかった。正常食・TAA 投与群と比較して、鉄過剰食・TAA 投与群では TUNEL 陽性肝細胞が減少し、カスパーゼ-3 の開裂が減少していた。一方で、アポトーシスの初期分子である Bax の肝発現量が増加していた。以上より、食餌性鉄過剰は化学物質誘発性肝硬変を顕著に抑制し、そのメカニズムにはアポトーシスの抑制が関わる可能性が示された。

(3) 鉄過剰食の併用によって、高脂肪食給餌により誘発される肝小葉内の炎症巣が増加し、肝臓中および血清中の TNF の上昇を伴っていた。一方で、高脂肪食給餌群と高脂肪・鉄過剰食給餌群の間で、肝臓中のトリグリセライド含有量やマロンジアルデヒド含有量には著変は認められなかった。さらに、盲腸内容物から腸内細菌叢解析を行ったところ、正常食給餌群と比較して、高脂肪食給餌群および高脂肪・鉄過剰食給餌群において、*Oscillospira* 属および *Ruminococcus* 属の減少、*Akkermansia* 属の増加が認められたが、これらの菌種の割合は鉄過剰の有無によって変化しなかった。よって、鉄過剰による代謝性肝疾患の肝炎増悪には、肝組織全体の酸化ストレスレベルや腸内細菌の変化よりも、局所の炎症活性化が重要な役割を果たす可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Machi Atarashi, Takeshi Izawa, Mutsuki Mori, Yohei Inai, Mitsuru Kuwamura, Jyoji Yamate	4. 巻 10
2. 論文標題 Dietary iron overload abrogates chemically-induced liver cirrhosis in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu10101400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Machi Atarashi, Takeshi Izawa, Rena Miyagi, Shoko Ohji, Ai Hashimoto, Mitsuru Kuwamura, Jyoji Yamate	4. 巻 10
2. 論文標題 Dietary iron supplementation alters hepatic inflammation in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu10020175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 新 真智, 井澤 武史, 桑村 充, 山手 丈至	4. 巻 154
2. 論文標題 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態進展に関わる鉄過剰の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 61-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.154.61	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森 睦貴, 井澤武史, 稲井洋平, 新 真智, 桑村 充, 山手丈至
2. 発表標題 鉄過剰による化合物誘発性肝障害の部位特異的修飾メカニズムの解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Izawa T, Mori M, Atarashi M, Tsuchiya S, Kuwamura M, Yamate J
2. 発表標題 Analysis of hemorrhagic diathesis in rats fed a high-iron diet
3. 学会等名 STP (Society of Toxicologic Pathology) 37th Annual Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井澤武史, 大地祥子, 新 真智, 宮城伶奈, 橋本 愛, 桑村 充, 山手丈至
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットの肝炎進展に関わる全身免疫の役割
3. 学会等名 第34回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大地祥子, 稲井洋平, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至
2. 発表標題 高脂肪食誘発性肝疾患に対するラットの週齢感受性の解析
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Izawa, T., Horiuchi, T., Atarashi, M., Kuwamura, M., Yamate, J
2. 発表標題 Anti-fibrotic role of miR-214 in chemically induced liver cirrhosis in rats
3. 学会等名 STP (Society of Toxicologic Pathology) 37th Annual Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井澤 武史, 新 真智, 稲井 洋平, 森 睦貴, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 実験的鉄過剰による肝疾患の修飾多様性
3. 学会等名 第43回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 咲春, 井澤 武史, 森 睦貴, 新 真智, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) モデルラットにおける鉄過剰の病態修飾機序の解明
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新 真智, 井澤 武史, 宮城 伶奈, 大地 祥子, 橋本 愛, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎における鉄過剰の役割
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	竹中 重雄  (Takenaka Shigeo)  (10280067)	大阪府立大学・総合リハビリテーション学研究所・教授    (24403)	

