

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06415

研究課題名（和文）鉄過剰による新規肝保護機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel mechanism for hepatoprotection by iron overload

研究代表者

井澤 武史（Izawa, Takeshi）

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・准教授

研究者番号：20580369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々の先行研究により肝鉄過剰が肝疾患を増悪と軽減の両方向に修飾することを明らかにしてきたが、そのメカニズムには不明点が多い。本研究では、食餌性鉄過剰によってアシルアルコール誘発急性肝障害が著しく増悪し、その増悪にはフェロトシス（鉄依存性細胞死）の亢進が寄与する可能性を明らかにした。また、食餌性鉄過剰はアポトーシスの抑制を介して四塩化炭素誘発肝障害を抑制する可能性を示した。さらに、食餌性鉄過剰は脂質異常症を伴う脂肪性肝炎を増悪し、炎症の増悪には鉄蓄積マクロファージによるNF- κ B経路の活性化を伴う炎症促進が関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肝疾患における肝鉄過剰の役割には未だ不明点が多い。本研究結果により、鉄過剰肝では化学物質に対する肝毒性の感受性が変質している可能性が示されたことから、慢性肝疾患患者の治療薬の選択時に肝鉄過剰の有無を考慮することで、より安全で効果的な治療法の選択につながることを期待される。また、肝鉄過剰を併発した非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）患者では脂質異常症や肝炎が増悪する可能性があることから、鉄代謝障害とマクロファージの活性化を標的としたNAFLDの新たな治療法の考案が期待される。

研究成果の概要（英文）：Our previous study revealed that hepatic iron overload can cause both exacerbation and suppression of liver diseases; however, the mechanism remains to be elucidated. The present study showed that hepatic iron overload can alter susceptibility to acute hepatotoxicity. Considering the presence of iron overload for the selection of therapeutic options would lead to more safe and effective therapy in patients with chronic liver diseases. Additionally, the present study raised the possibility that hepatic iron overload may worsen dyslipidemia and steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Development of new therapeutic strategies targeting iron dysregulation and macrophage activation is anticipated.

研究分野：獣医病理学

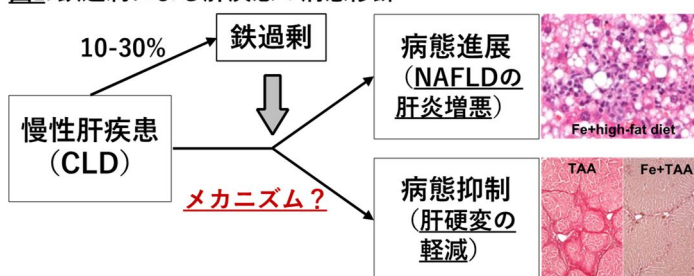
キーワード：慢性肝疾患 肝鉄過剰 肝毒性 脂肪性肝疾患 細胞死

1. 研究開始当初の背景

鉄は酸素運搬や ATP 合成など生体に不可欠な必須微量元素であり、その恒常性は肝臓から産生される hepcidin などの鉄調節因子により厳格に維持される。慢性肝疾患 (Chronic liver disease; CLD) はウイルス性肝炎や非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) など様々な病因に基づく慢性疾患で、進行すると肝硬変や肝癌へと至る。CLD では、持続的・反復的な肝傷害により鉄調節機構が破綻して肝鉄過剰症が生じ、さらにフェントン反応を介した酸化ストレスの亢進によって、肝病変の進展に寄与すると考えられてきた。実際に、C 型・B 型肝炎や NAFLD 患者の約 1/3 では、肝病変部に鉄沈着が認められる。しかしながら、ヒト CLD における鉄過剰の病態進展機序には依然不明点が多い。

申請者は、これまでに CLD における鉄過剰発症メカニズムやその病理学的役割について、モデル動物を用いた *in vivo* 研究に従事し、高脂肪食誘発 NAFLD モデルラットに肝鉄過剰症を惹起すると、鉄貪食マクロファージによる炎症の過剰な活性化が生じ、脂肪性肝炎が増悪することを明らかにした (Nutrients. 2018; 10:

図1. 鉄過剰による肝疾患の病態修飾

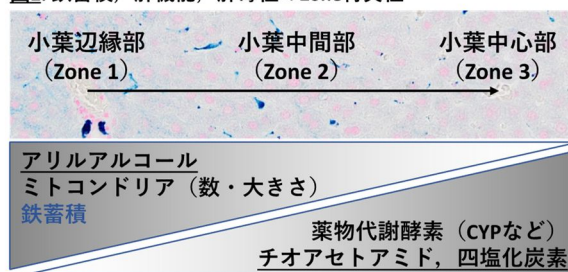


175)。一方で、チオアセトアミド (TAA) 誘発肝硬変モデルラットに肝鉄過剰症を惹起すると、肝線維化が著しく軽減することを明らかにした (Nutrients. 2018; 10: 1400)。この肝線維化の軽減には、肝細胞のアポトーシスの抑制が関わっており、鉄過剰肝では何らかのメカニズムによって傷害刺激から肝細胞を保護する機構が存在する可能性が示された (図 1)。本研究課題では、申請者の先行研究の結果に基づき、「どのようなメカニズムによって鉄過剰による肝保護機構はたらくか？」を研究の核心をなす学問的問いとして、その究明を目的とした。

2. 研究の目的

我々の先行研究にて、肝鉄過剰により肝小葉中心部を傷害する TAA 誘発肝硬変が著しく抑制されたことから、肝鉄過剰は化合物誘発肝毒性の病態を修飾すると考えられた。また、鉄過剰肝では鉄の沈着は小葉中心部 (Zone 3) よりも小葉辺縁部 (Zone 1) で強いことから、鉄過剰による肝障害の修飾に Zone 特異的な機序が存在する可能性が考えられた (図 2)。本研究では、Zone 1 を傷害するアリルアルコール、または Zone 3 を傷害する四塩化炭素誘発肝障害モデルを用いて、肝鉄過剰による病態変化を解析する。両化合物とも酸化ストレスを介した肝障害を誘発するという点が共通していることから、両モデルで病態を比較することで、肝鉄過剰による部位特異的な肝毒性の修飾機構の解明を目指した。

図2. 鉄蓄積、肝機能、肝毒性のZone特異性



また、我々の先行研究にて、肝鉄過剰により高脂肪食誘発 NAFLD モデルラットの肝炎が増悪することが示されたことから、本研究ではその炎症活性化機構の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

A) 食餌性肝鉄過剰モデルラットを用いた化合物誘発肝毒性の部位特異的修飾機構の解析

6 週齢の雄 F344 ラットに標準食 (0.02% Fe 含有; DC-8, 日本クレア) または鉄過剰食 (0.8% Fe 含有; クエン酸第二鉄添加) を 4 週間連続給餌した後に、アリルアルコール (35 mg/kg, i.p.), 四塩化炭素 (0.75 mL/kg, p.o.) または生食を単回投与し、投与後 24 時間で採材し、病理組織学的検査や分子病理学的検査による病態評価を行った。

B) 食餌性肝鉄過剰モデルラットを用いた Western diet 誘発脂肪性肝疾患の修飾機構の解析

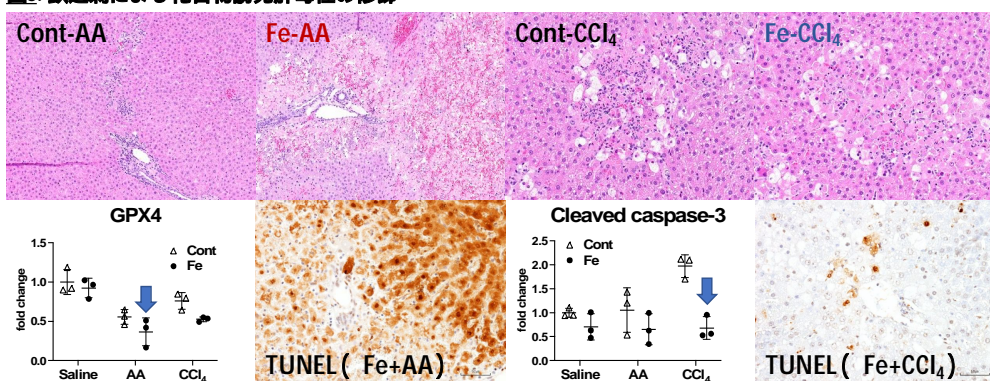
10 週齢の雄 F344 ラットに標準食 (Cont 群; 13 kcal% 脂質, 0.03% Fe 含有; CE-2, 日本クレア), 高脂肪食 (Western diet 群; 36 kcal% 脂質, 0.03% Fe 含有; ココアバターおよびクエン酸第二鉄添加) と糖水 (23.1 g/L フルクトースおよび 18.9 g/L グルコース含有), 高脂肪・鉄過剰食 (Western diet+Fe 群; 37 kcal% 脂質, 1% Fe 含有) と糖水, または鉄過剰食 (Fe 群; 13 kcal% 脂質, 1% Fe 含有) を 26 週間投与した後に採材し、その病態評価を行った。

4. 研究成果

A) 食餌性肝鉄過剰モデルラットを用いた化合物誘発肝毒性の部位特異的修飾機構の解析

標準食 (DC-8) 投与ラットと比較して、鉄過剰食投与ラットではアリルアルコール (AA) 誘発 Zone 1 肝障害が著しく増悪し、病変部に浸潤する CD3 陽性 T 細胞および CD68 陽性クッパー細胞/マクロファージの増数、サイトカイン (TNF α , IL6, CCL2, IL4) の肝発現上昇を伴っていた。この肝病変部では、マロンジアルデヒド (脂質過酸化マーカー) の増加, GPX4 (フェロトシス抑制因子) の発現低下, γ H2AX (DNA 傷害マーカー) 陽性肝細胞の著増に加えて、傷害肝細胞が TUNEL 法にて細胞質と核の両方がびまん性に陽性 (ネクローシスパターン; DNA 断片の核から細胞質への流出) を示したことから、鉄過剰によるアリルアルコール誘発肝障害の増悪にはフェロトシス (鉄依存性細胞死) の亢進が寄与することが示された。四塩化炭素 (CCl₄) 投与モデルでは、標準食 (DC-8) 投与ラットと比べて、鉄過剰食投与ラットにおいて Zone 3 肝障害が軽減され、病変部の CD68 陽性クッパー細胞/マクロファージの減数とサイトカイン (TNF α , CXCL1, IL10) の肝発現低下を伴っていた。この肝病変部では、アポトーシスの指標である Caspase-3 開裂の抑制が認められたことから、鉄過剰による四塩化炭素誘発肝障害の抑制にはアポトーシスの抑制が関わる可能性が示された。以上より、アリルアルコールと四塩化炭素の肝毒性に対する鉄過剰の病態修飾にはそれぞれ異なるメカニズムが存在すること、すなわち Zone 特異的な肝障害修飾機構が存在する可能性が見出された。

図3: 鉄過剰による化合物誘発肝毒性の修飾

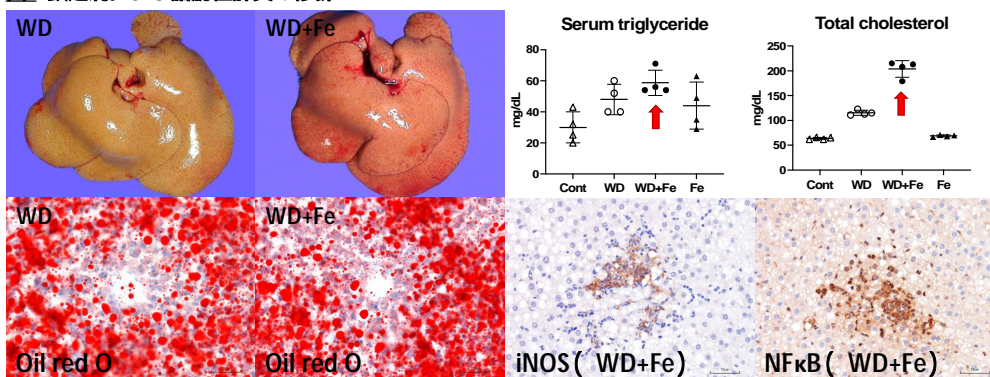


この Zone 得意的な肝障害の修飾機構をさらに調べるために、ストレス応答に関わる転写因子 Nrf2 とその標的遺伝子の発現を RNA-seq 法で解析した。鉄過剰肝では、DNA 修復 (*Rad51*, *Cdkn1a*, *Xrcc3*), アポトーシス (*Ark1b10*), 酸化ストレス反応 (*Hmox1*), 解毒代謝 (*Aldh1a1*, *Cyp1b1*, *Gsta3*, *Gstm3*, *Abcg2*), 脂質代謝 (*Scd*, *Mthfd2*, *Fgf21*, *Pparg*, *G6pd*) に関わる 40 種以上の Nrf2 標的遺伝子の発現変動が認められた。そのうち *Rad51*, *Ark1b10*, *Aldh1a1*, *Gsta3*, *Abcg2*, *Scd*, *Pparg*, *G6pd* は Zone 3 で発現上昇, *Cdkn1a*, *Cyp1b1*, *Hmox1* は Zone 3 で発現低下, *Gstm3*, *Xrcc3*, *Mthfd2*, *Fgf21* は Zone 1 で発現上昇を示し、鉄過剰による Zone 特異的な肝障害修飾機構に Nrf2 とその関連遺伝子の変化が関わる可能性が示された。

B) 食餌性肝鉄過剰モデルラットを用いた Western diet 誘発脂肪性肝疾患の修飾機構の解析

Western diet 群では、体重増加と脂質異常症を伴う脂肪肝が認められ、肝小葉内に大小の炎症巣が散見された。これらの表現型はヒトの非アルコール性脂肪性肝疾患の単純性脂肪肝から脂肪性肝炎に相当すると考えられた。Western diet に 1% Fe を添加した Western diet+Fe 群では、Western diet 群と比べて、脂質異常症 (高トリグリセライド血症, 高コレステロール血症) と肝臓の炎症の増悪がみられた。この Western diet+Fe 群では、類洞内および炎症巣内のクッパー細胞/マクロファージに強い鉄蓄積が認められ、炎症巣内の白血球の多くは iNOS 陽性および NF κ B 陽性を示した。加えて肝病変部では、脂質過酸化の亢進, NF κ B 核移行の増加, 炎症促進性 (Th1 型/M1 型) サイトカインの発現上昇がみられたことから、肝鉄過剰による脂肪性肝炎の増悪には、鉄蓄積マクロファージによる酸化ストレスや NF κ B 経路を介した炎症促進 (M1 分極化) が関わることを示された。以上より、代謝異常に基づく脂肪性肝疾患 (NAFLD) モデルラットにおいて、肝鉄過剰は脂質異常症や肝臓の炎症の増悪にはたらくことが示された。

図4: 鉄過剰による脂肪性肝炎の修飾



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 3件）

1. 著者名 Mori Mutsuki, Izawa Takeshi, Inai Yohei, Fujiwara Sho, Aikawa Ryo, Kuwamura Mitsuru, Yamate Jyoji	4. 巻 12
2. 論文標題 Dietary Iron Overload Differentially Modulates Chemically-Induced Liver Injury in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2784 ~ 2784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12092784	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 Inai Yohei, Izawa Takeshi, Mori Mutsuki, Atarashi Machi, Tsuchiya Seiichirou, Kuwamura Mitsuru, Yamate Jyoji	4. 巻 34
2. 論文標題 Analyses of hemorrhagic diathesis in high-iron diet-fed rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 33 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2020-0004	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 Fujiwara Sakura, Izawa Takeshi, Mori Mutsuki, Atarashi Machi, Yamate Jyoji, Kuwamura Mitsuru	4. 巻 12
2. 論文標題 Dietary iron overload enhances Western diet induced hepatic inflammation and alters lipid metabolism in rats sharing similarity with human DIOS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-25838-3	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 -

〔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 Inai Y, Izawa T, Fujiwara S, Tanaka M, Kuwamura M
2. 発表標題 Influence of vitamin K on bleeding tendency in rats fed high-iron diets
3. 学会等名 The 38th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology and the 1st Meeting of the Asian Union of Toxicologic Pathology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Izawa T, Mizuguchi E, Yamate J, Kuwamura M
2. 発表標題 Influence of diabetes induction on rat NAFLD model
3. 学会等名 The 38th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology and the 1st Meeting of the Asian Union of Toxicologic Pathology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原 奨, 井澤 武史, 相川 諒, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 鉄過剰による薬物性肝障害の修飾に関わるオートファジーの解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新 真智, 井澤 武史, 水口 恵理, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 ラット脂肪肝-肝腫瘍モデルにおける食餌性鉄過剰の病態修飾
3. 学会等名 第37回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相川 諒, 井澤 武史, 森 睦貴, 稲井 洋平, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 鉄過剰による化合物誘発肝障害の軽減メカニズムの解明
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水口 恵理, 井澤 武史, 新 真智, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 リポポリサッカライド投与を併用した代謝性肝疾患モデルの病態解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲井 洋平, 井澤 武史, 瓶井 知美, 田中 美有, 山手 丈至, 桑村 充
2. 発表標題 AI画像解析による肝毒性所見の定量化と血清ALT, ASTとの相関解析
3. 学会等名 第39回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱田 菜々子, 井澤 武史, 新 真智, 瓶井 知美, 藤原 奨, 田中 美有, 田口 恵子, 山本 雅之, 桑村 充
2. 発表標題 鉄過剰による化合物誘発肝硬変の抑制に関わる転写因子 Nrf2の役割
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022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)	大阪公立大学・大学院生活科学研究科 教授 (24405)	

6. 研究組織（つづき）

	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	桑村 充 (Kuamura Mitsuru) (20244668)	大阪公立大学・大学院獣医学研究科・教授 (24405)	

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