

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15396

研究課題名（和文）傷害肝の修復に鉄が果たす意義の解明

研究課題名（英文）Role of iron in the tissue repair response after liver injury

研究代表者

金森 耀平（Kanamori, Yohei）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：70838903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝細胞における鉄の価数動態が肝炎の進展に及ぼす意義を探索した。FBXL5欠損マウス（肝細胞に2価鉄が蓄積）において、肝炎を誘導すると、野生型に比べて肝線維化の進行が抑制された。一方、FBXL5、IRP2二重欠損マウス（3価鉄が蓄積）では、野生型と同程度の肝線維化が認められた。FBXL5欠損マウスでは、肝傷害、及び、活性化線維芽細胞の数やコラーゲンの遺伝子発現量は野生型と同程度である一方、マトリックスメタロプロテアーゼの発現量の増加が認められた。したがって、肝細胞における2価鉄は、コラーゲン分解系を促進することで、肝炎における線維化の進展を抑制する役割があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝疾患と鉄代謝異常の関連性が古くから提唱されているものの、鉄が肝疾患の進展に果たす意義に関する共通見解は得られていない。鉄は生体内において2価と3価の状態を変化させることにより、生物学的に異なる機能を発揮するため、2価鉄の蓄積と3価鉄の蓄積とは全く違う状況と言える。しかし、2価鉄/3価鉄の価数動態と肝疾患の進展との関係はほとんど明らかにされていない。鉄の総量に注目した過去の研究とは視点の異なる本研究は、肝疾患における鉄の意義に関する議論に新たな展開をもたらすと期待される。

研究成果の概要（英文）：This study explored the role of iron valent status in the progression of hepatitis. Liver fibrosis was ameliorated in liver-specific FBXL5 knockout mice, which exhibit ferrous iron accumulation in the liver, subjected to liver injury. In contrast, liver fibrosis was comparable between wild-type and FBXL5, IRP2 double knockout mice, which exhibit ferric iron accumulation in the liver. These results suggest that ferrous iron specifically exerts antifibrotic roles in liver injury. Hepatic mRNA levels of collagens and the numbers of activated fibroblasts were similar between wild-type and FBXL5 knockout mice. On the other hands, higher expression of matrix metalloproteinases was observed in the livers of FBXL5 knockout mice compared with those of wild-type mice. These results suggest that hepatocyte ferrous iron promotes degradation of collagens, thereby suppressing liver fibrosis progression.

研究分野：鉄代謝

キーワード：鉄代謝 肝臓 組織修復

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝炎における鉄動態と修復

肝炎と鉄代謝異常の関連が古くから提唱されており、一般に鉄は細胞死や炎症等を促進することで肝線維化を増悪させることが知られている。細胞内で鉄は2価(Fe^{2+})と3価(Fe^{3+})の2つの形態をとり、2価鉄は酵素の補因子として様々な生命活動に利用される一方、3価鉄はタンパク質と結合し貯蔵され、そのままの形では利用されない。このように、2価鉄と3価鉄は、各々独自の機能特性を発揮するため、同じ鉄過剰でも2価鉄過剰と3価鉄過剰では生命機能に及ぼす影響が全く異なると言える。しかしながら、2価鉄/3価鉄の動態と肝炎の病態形成の関係は明らかにされていない。

(2) 傷害肝の組織修復

肝傷害後の修復・適応過程において、肝細胞の分裂が代償的に活性化すると組織修復が進行し、逆に遅延すると慢性炎症が進行し肝硬変や肝臓がんの発症に至ることが知られている。即ち、肝炎の進展は、慢性炎症と代償性増殖とのバランスにより決定される。肝炎における代償性増殖の制御メカニズムには未だ不明な点が多い。

(3) 本研究課題の核心をなす学術的問い

申請者は、肝臓特異的に2価鉄過剰を誘導可能なマウスモデル(Alb-Cre/FBXL5^{F/F}マウス)において、慢性肝炎を誘導すると、肝線維化の進行の顕著な抑制を認めることを、研究開始前に予備的知見として見出していた。さらに、このマウスモデルでは増殖性細胞の数が増加するとともに肝重量が有意に増加し、代償性の細胞増殖が亢進する可能性が示唆された。したがって、2価鉄には、肝細胞における代償性増殖を促進することで、肝炎の進行を抑制する役割があると考えられるものの、責任分子や駆動されるシグナルは不明である。

肝炎の進行を促進する要因として知られてきた鉄には、肝細胞に作用し病態形成を抑制する新たな一面があることを見出したが、その詳細は不明である。本研究課題の核心をなす学術的問いは、2価鉄が肝炎の進行を抑制するメカニズムの解明である

2. 研究の目的

本研究では、肝細胞における鉄動態が組織修復応答を調節することにより、肝炎の進展を決定づけている可能性を想定し、肝細胞における2価鉄が肝炎に果たす意義に関して、以下の点を明らかにすることを本研究の目的とする。

- ・肝線維化を抑制するメカニズム
- ・代償性増殖促進に関わるシグナル

3. 研究の方法

鉄と直接結合することで細胞内の鉄センサーとして働くユビキチンリガーゼ FBXL5 は鉄代謝制御因子 IRP2 を基質とすることで、細胞内鉄量、及び、2価鉄の割合を負に制御する働きがあり、FBXL5 欠損は細胞内に2価鉄過剰をもたらす(Cell Metab. 2011;14:339-51)。本研究では、肝臓における鉄動態が、傷害肝の修復応答を制御するメカニズムを明らかにするために、肝臓特異的 FBXL5 欠損マウスに0.1% DDC 含有食を3週間負荷し、各課題に取り組む。

(1) 肝線維化を抑制するメカニズム

一般に、肝炎では、傷害に伴う肝/胆管細胞の細胞死を引き金に、マクロファージ等の免疫細胞を介した炎症が誘導され、慢性化した炎症により線維芽細胞が活性化し線維化が進行する。肝細胞における2価鉄過剰によりどのように肝線維化の抑制に至るのかを検討した。細胞死、炎症、及び、線維化の表現型を、項目ごとの主要な調節因子やシグナルとともに評価し、肝炎の病態形成における FBXL5 欠損の作用点を調べた。また、細胞外マトリックスの合成と分解に関わる因子の発現量を測定し、細胞外マトリックス量の減少に直結する因子の変化を抽出した。これらの解析結果を基に、肝線維化の進展に関わる主要な細胞種 肝細胞、免疫細胞、及び、線維芽細胞 の中で、FBXL5 欠損により病態形成に関わる形質変化を示す細胞種の同定を試みた。

(2) 代償性増殖促進に関わるシグナル

肝傷害に伴う代償性増殖を駆動するために、肝細胞において細胞分裂を促進するシグナルが活性化する。転写共役因子 YAP 及び TAZ は肝細胞の分裂を誘導する主要なシグナルの一つであり、傷害肝においても代償性増殖を惹起し、組織修復を促進する役割を担う。したがって、FBXL5 欠損に伴う代償性増殖の亢進に YAP / TAZ シグナルの活性化が関与している可能性がある。2価鉄過剰による代償性増殖の促進メカニズムに YAP / TAZ シグナルが及ぼす意義を明らかにするために、YAP 及び TAZ を欠損するマウスと FBXL5 欠損マウスを交配した。

(3) 非アルコール性脂肪性肝疾患の進展に2価鉄過剰が及ぼす意義

ライフスタイルの欧米化に伴い我が国においても患者数の増加が指摘され注目されている非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) において鉄動態が及ぼす意義を明らかにするために、高脂肪食を16週間負荷し病態形成を評価した。

4. 研究成果

(1) 肝線維化を抑制するメカニズム

肝細胞に2価鉄を蓄積するマウス(FBXL5欠損)ならびに3価鉄を蓄積するマウス(FBXL5, IRP2二重欠損)において肝炎を誘導すると、前者では肝線維化が抑制されたが、後者では野生型と同程度であったことから、2価鉄には肝炎における修復応答を促進する役割があることが明らかになった。同様の結果はDDC含有食を用いた肝炎誘導モデルのみならず、四塩化炭素を用いた肝炎誘導モデルにおいても認められた(図1)。

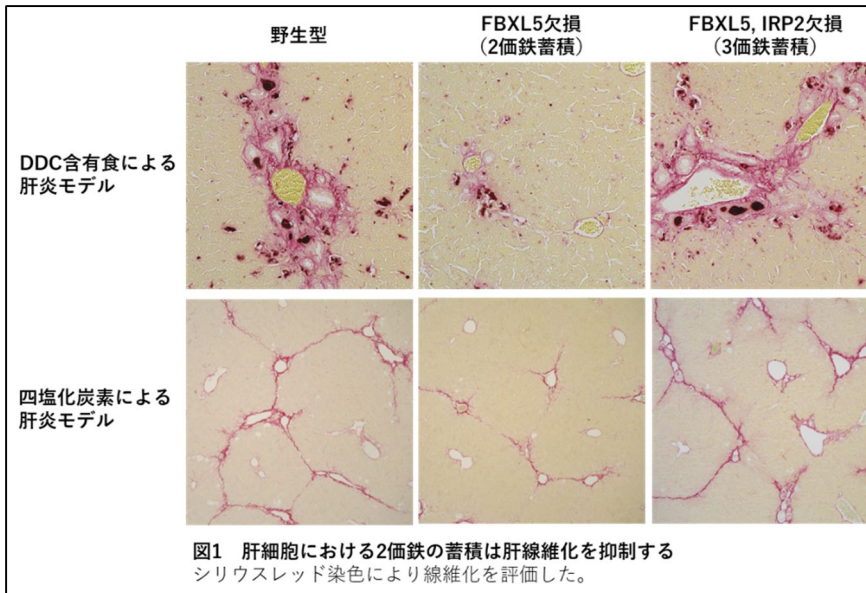


図1 肝細胞における2価鉄の蓄積は肝線維化を抑制する
シリウスレッド染色により線維化を評価した。

Cleaved caspase-3の免疫染色により細胞死を組織学的に評価したが、両群に明らかな差は認められなかったため、細胞死以降の要因により肝線維化の抑制に至るものと考えられた。FBXL5欠損マウスでは、活性化線維芽細胞の数や、コラーゲン、コラーゲンの架橋に関わる酵素の発現量は野生型マウスと同程度であったことから、線維芽細胞によるコラーゲンの産生以外の要因により、線維化の抑制に至ると考えられた。

肝線維化の進展は、線維芽細胞によるコラーゲンの合成と、ミエロイド系細胞等が産生するマトリックスメタロプロテアーゼ(Mmp)を介したコラーゲンの分解とのバランスにより決定される。FBXL5欠損マウスでは、Mmp9ならびにMmp12の発現の亢進が認められた。FACS解析により、FBXL5欠損マウスでは、好中球や浸潤性マクロファージの数の増加が認められるとともに(図2)、FBXL5欠損マウスの肝臓ではケモカインCX3CL1の発現が亢進していた。肝炎に伴い、CX3CL1は肝細胞において発現誘導され、マクロファージを組織修復性に誘導し線維化抑制性に働くことが知られているので、肝細胞鉄動態の変化に伴いマクロファージの形質が組織修復性に誘導されることにより肝線維化の進展が抑制される可能性が示唆された。

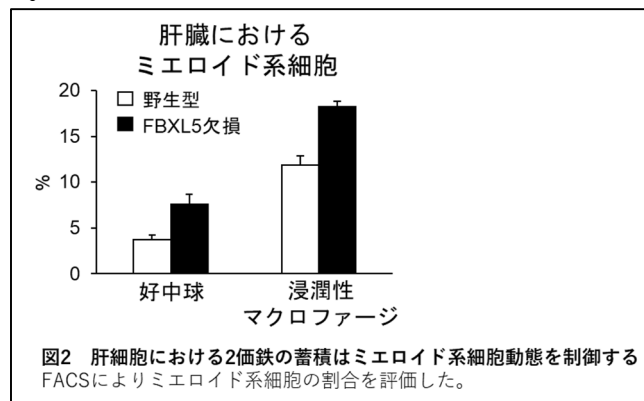


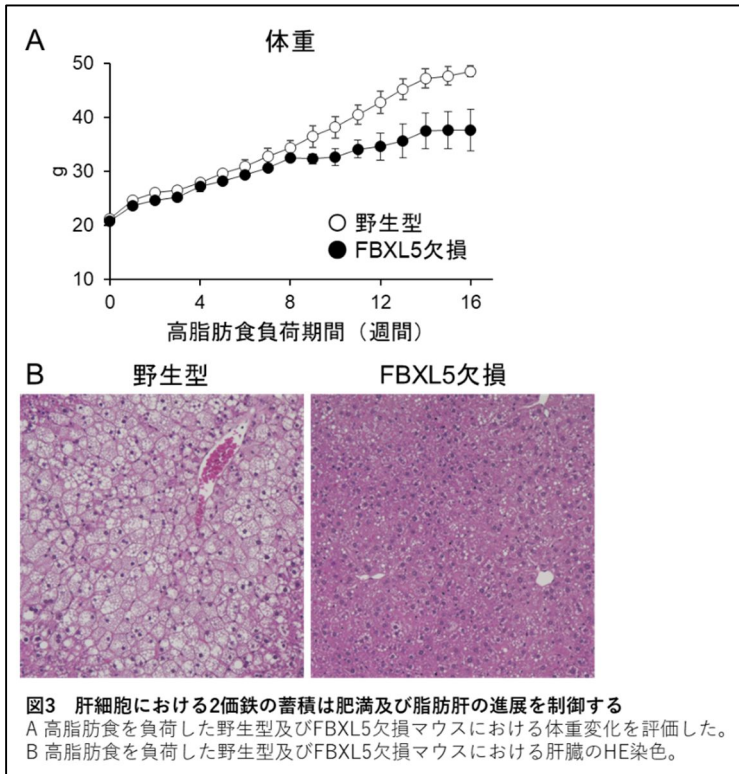
図2 肝細胞における2価鉄の蓄積はミエロイド系細胞動態を制御する
FACSによりミエロイド系細胞の割合を評価した。

(2) 代償性増殖促進に関わるシグナル

肝臓特異的FBXL5, YAP, TAZ三重欠損マウスは得ることができなかったが、肝臓特異的FBXL5, YAP二重欠損マウス、及び、肝臓特異的FBXL5, TAZ二重欠損マウスは繁殖可能であった。肝臓特異的FBXL5, YAP二重欠損マウスは、ビリルビン値の増加と肝線維化を認めた。肝臓におけるYAPの長期的な欠損は、胆道系の異常等により肝傷害を惹起することが知られている。YAPが正常なFBXL5欠損マウスでは、肝傷害に伴い代償性増殖が促進するため組織修復が進行するが、FBXL5, YAP二重欠損マウスでは代償性増殖が遮断されるため、古典的な鉄の毒性の効果により胆道系の異常に端を発した肝傷害が促進したと考えられた。

(3) 非アルコール性脂肪性肝疾患の進展に及ぼす意義

高脂肪食負荷をしたFBXL5欠損マウスでは野生型と比べて、体重増加が抑制されるとともに(図3)皮下脂肪組織重量が低く、脂肪肝の抑制も認められたため、脂肪細胞機能や脂肪組織炎症の改善が示唆された。したがって、肝細胞における鉄の価数動態の意義がNAFLDの進展にも重要な役割を果たす可能性が示唆された。



従来、ミエロイド系細胞は肝傷害や炎症を増悪することが知られていたが、最近、肝傷害後の組織修復を促進することや、慢性肝炎における線維化を抑制する機能を担うこと等が報告されている。本研究は、肝疾患におけるミエロイド系細胞の二面性を決定する上流因子として、肝細胞鉄動態の重要性を示唆するものであり、慢性肝疾患における鉄の意義に関する定説に新たな視点を提供するとともに、肝疾患の新たな治療法の開発にも貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金森耀平、諸石寿朗
2. 発表標題 傷害肝の修復に肝鉄動態が果たす意義
3. 学会等名 日本微量元素学会（招待講演）
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------