

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780288

研究課題名(和文) 肝硬変の進展に関わる鉄代謝障害の発現プロファイリングと分子病理学的機序の解明

研究課題名(英文) Molecular pathology of iron dysregulation during progression of liver cirrhosis

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(系)・助教

研究者番号：20580369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：肝硬変モデルラットを用いて、病態進展のリスクファクターである鉄過剰の発生機序を調べた。ヒトと同様に、肝硬変モデルラットでは、病態進展に伴い鉄過剰が進行した。鉄過剰の発症に一致して、鉄代謝の中心的因子であるhepcidinの発現抑制が認められ、さらにhepcidinの誘導に関わるIL6-STAT3系の不活性化が認められた。よって、肝硬変の進展期に生じる鉄過剰の背景には、hepcidinの誘導障害に関わる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular mechanism of iron overload, a risk factor of liver cirrhosis. As in humans, iron overload progressed during the progression of cirrhosis in rats, which was accompanied by suppression of hepcidin transcription (a central regulator of iron homeostasis) and inactivation of IL6-STAT3 pathway (an inducer of hepcidin transcription). These data suggests that the impaired hepcidin induction can be involved in the iron overload during progression of cirrhosis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：肝硬変 鉄代謝障害 鉄調節因子

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患は様々な病因に由来する肝疾患の慢性ステージであり、可逆的な肝線維化、さらに不可逆的な肝硬変へと進展する。特に肝硬変は肝癌へと進展し得る重篤な疾患であり、その病態の解明には医学・獣医学から大きな期待が寄せられているが、肝硬変の進展メカニズムは十分に解明されていない。

鉄は生体の必須元素であり、肝細胞から産生される各種の鉄調節因子により、全身の鉄代謝は厳格に維持されている。鉄欠乏は貧血やエネルギー産生障害を引き起こし、過剰蓄積は酸化ストレスによる組織傷害を惹起すると考えられている。近年、ヒトの慢性肝臓病において、鉄過剰症が病態進展のリスクファクターと報告されてきたが、鉄過剰の分子機構には不明点が多く残されている。

2. 研究の目的

肝硬変の進展に関わる鉄代謝異常の分子病理学的機序を追究することである。初めに、鉄代謝障害モデルラットを用いて、各種鉄調節因子による生理的な鉄代謝の調節機構を調べた。続いて、肝硬変モデルラットを用いて、鉄代謝障害の発生機序を解析した。さらに、miRNA の発現解析により、鉄代謝異常や病態進展に関わる miRNA の役割を検討した。また、動物の肝疾患における鉄代謝障害の関与についても検討を加えた。

3. 研究の方法

1) 鉄代謝障害モデル

ラットに鉄欠乏食または鉄過剰食 (0.5% Fe) を 4 週間給餌し、その後正常食 (0.02% Fe) を 2 週間給餌し、一過性の鉄代謝障害モデルを作製した。各種鉄調節因子の遺伝子発現プロファイリングを行い、鉄代謝調節に関わる各因子の生理学的役割を検討した。

2) 肝硬変モデル

ラットにチオアセトアミドを反復腹腔内投与 (100 mg/kg, 週 2 回, 最長 25 週間) し、肝硬変の初期から進展期までを経時的に観察可能なモデルラットを作製した。また、一過性の肝障害における鉄代謝変化を調べるために、チオアセトアミド単回腹腔内投与による急性肝障害モデルラットを作製した。各種鉄調節因子の遺伝子発現プロファイリングを行い、鉄代謝の調節に関わる各因子の生理学的役割を調べた。また、miRNA の網羅的発現解析・in situ hybridization を行い、病態に関わる miRNA の役割を調べた。

3) 動物の肝疾患

動物の自然発生性肝疾患における鉄代謝障害の関与を明らかにするために、肝疾患罹患犬 (21 例) の生検材料を用いて、鉄代謝の変化を病理学的に解析した。

4. 研究成果

1) 鉄代謝障害モデル

鉄欠乏および鉄過剰モデルラットでは、それぞれ血清鉄の低下および上昇、血清鉄飽和度の低下および上昇、肝臓鉄の軽度低下および上昇が認められた。これらの鉄代謝障害は、正常食の 2 週間給餌により、正常レベルまで回復した。鉄欠乏および鉄過剰の発症パターンと一致して、鉄代謝の中心的因子である hepcidin の発現低下および上昇が認められた。鉄欠乏モデルでは、鉄の細胞内取り込みに関わる DMT1 および TFR1 の発現上昇が認められた。鉄過剰モデルでは、鉄の細胞内貯蔵に関わる FTL1 の発現上昇がみられた。

一方、両モデルにおいて、肝臓に病理組織学的異常は観察されず、肝酵素 (AST, ALT) の上昇も認められなかった。酸化ストレスマーカーの malondialdehyde (過酸化脂質) および dihydroethidium (活性酸素種) の上昇もみられなかった。

以上の結果より、一過性鉄代謝障害からの回復には、鉄代謝の negative regulator である hepcidin の発現変化が重要であることを示した。また、両モデルラットは肝障害を伴わないことから、生理的鉄代謝の解析モデルとして有用であることを示した。

2) 肝硬変モデル

急性肝障害モデルラットでは、肝細胞傷害に一致して、一過性の鉄過剰が誘発される。その後、病変部の肝細胞において hepcidin の発現が上昇する。この発現上昇に一致して、hepcidin 誘導に関わる IL6-STAT3 系の活性化が認められ、さらに IL6 は活性化マクロファージから産生されることを示した。一方、他の hepcidin 誘導経路 (BMP6-SMAD, TFR2-HFE) は不活性化を示していた。よって、肝障害時の hepcidin 誘導には、IL6-STAT3 系の活性化が重要であることを示した。

肝硬変モデルラットでは、病態進展に伴って血清鉄および肝臓鉄の上昇が認められた。肝硬変の病巣内では、偽小葉を形成する肝細胞および線維化部位のマクロファージに鉄蓄積が観察され、ヒトの肝硬変と同様に、鉄過剰が生じていることが示された。各種鉄調節因子の発現解析により、鉄過剰の発症と一致して hepcidin の発現抑制、IL6-Stat3 系の不活性化が観察された。よって、肝硬変の進展期に生じる鉄過剰症の背景には、hepcidin の誘導障害が関与している可能性が示唆された。

鉄過剰の進展に伴って、発現上昇あるいは

低下を示す 77 種の miRNA が認められ、そのうち 2 種の miRNA は線維化部位で高い発現を示したことから、同部位にみられるマクロファージの鉄蓄積と関連する可能性が考えられた。

3) 動物の肝疾患

いくつかの肝疾患罹患犬では、肝臓に鉄蓄積が認められ、その分布は主にクッパー細胞であり、肝細胞への沈着は軽度であった。したがって、鉄蓄積による直接的な細胞傷害よりも、クッパー細胞からの炎症性サイトカイン産生等による間接的な肝細胞傷害が病態に関わっている可能性が考えられた。

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 8 件)

主な論文 (6 件)

1. Wijesundera KK, Izawa T(共同筆頭著者), Tennakoon AH, Murakami H, Golbar HM, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. 2014. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp Mol Pathol*, 96(3): 382-392. 査読有り.
2. Wijesundera KK, Izawa T, Murakami H, Tennakoon AH, Golbar HM, Kato-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. 2014. M1- and M2-macrophage polarization in thioacetamide (TAA)-induced rat liver lesions; a possible analysis for hepato-pathology. *Histol Histopathol*, 29(4): 497-511. 査読有り.
3. Izawa T, Murakami H, Wijesundera KK, Golbar HM, Kuwamura M, Yamate J. 2014. Inflammatory regulation of iron metabolism during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 66(2-3): 155-162. 査読有り.
4. Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Golbar HM, Tanaka M, Ichikawa C, Kuwamura M, Yamate J. 2013. Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing hepatic stellate cells and myofibroblasts in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury. *Exp Toxicol Pathol*, 65(7-8): 1159-1171. 査読有り.
5. Wijesundera KK, Juniantito V, Golbar

HM, Fujisawa K, Tanaka M, Ichikawa C, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. 2013. Expressions of Iba1 and galectin-3 (Gal-3) in thioacetamide (TAA)-induced acute rat liver lesions. *Exp Toxicol Pathol*, 65(6): 799-808. 査読有り.

6. Uehara T, Ainslie GR, Kutanzi K, Pogribny IP, Muskhelishvili L, Izawa T, Yamate J, Kosyk O, Shymonyak S, Bradford BU, Boorman GA, Bataller R, Rusyn I. 2013. Molecular mechanisms of fibrosis-associated promotion of liver carcinogenesis. *Toxicol Sci*, 132(1): 53-63. 査読有り.

[学会発表](計 9 件)

主な発表 (4 件)

1. 食餌性鉄過剰・鉄欠乏によるラット肝臓の病理学的変化。井澤武史, 宮城伶奈, 堀内貴至, 桑村 充, 山手丈至。第 30 回日本毒性病理学会学術集会, 徳島。2014 年 1 月 30 日~31 日。
2. 肝硬変の進展に関わる新規 miRNA の病理学的役割の検討。堀内貴至, 井澤武史, Wijesundera K, 桑村 充, 山手丈至。第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜。2013 年 9 月 20 日~23 日。
3. イヌの肝・胆道系疾患の傾向とその病理学的特徴。堀内貴至, 井澤武史, 井澤敬子, 桑村 充, 山手丈至。第 155 回日本獣医学会学術集会, 東京。2013 年 3 月 28 日~31 日。
4. ラット肝硬変モデルにおける鉄代謝障害の分子メカニズムの解明。村上 宙, 井澤武史, Wijesundera K, Golbar HM, Tennakoon A, 桑村 充, 山手丈至。第 154 回日本獣医学会学術集会, 盛岡。2012 年 9 月 14 日~16 日。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<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