

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850184

研究課題名(和文)慢性肝疾患における鉄代謝障害の炎症性機序と病理学的役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of inflammatory mechanism and pathologic role in iron dysregulation 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(系)・准教授

研究者番号：20580369

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):慢性肝疾患において、鉄過剰は病態を悪化させるリスクファクターと考えられているが、そのメカニズムには不明点が多い。本研究では、慢性肝疾患モデルラットの病態進展期において、マクロファージと炎症性サイトカインのバランス障害が鉄代謝障害(鉄過剰症)の発症と関連することを示した。また、化合物誘発性肝硬変モデルラットでは食餌性鉄過剰が肝障害を抑制する一方で、代謝性肝疾患モデルラットでは食餌性鉄過剰が炎症を増悪することを示した。本研究から得られた知見は、複雑な慢性肝疾患の進展メカニズムを理解する上で、有用な基礎的データとなりうる。

研究成果の概要(英文):Iron overload is considered as a risk factor for chronic liver diseases; however, the mechanism is still unclear. In this study, we showed that imbalance between macrophages and inflammatory cytokines is related to development of iron overload in the advanced stage of chronic liver disease in rats. We also showed that dietary iron overload suppresses liver injury in rats with chemically-induced liver cirrhosis whereas it enhances liver inflammation in rats with metabolic liver disease. These findings can be useful basic data for understanding the complex mechanism of progression of chronic liver diseases.

研究分野：獣医病理学

キーワード：慢性肝疾患 鉄代謝 肝硬変 代謝性疾患 炎症

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 (C 型, B 型), アルコール性肝炎および非アルコール性肝炎など様々な原疾患に由来する肝疾患の慢性期病変であり, 重篤な肝硬変, 肝癌へと進展し得る難治性疾患である. 獣医学領域においても, テリア犬種などの銅関連慢性肝炎, スパニエル犬種の慢性肝炎など種々の肝疾患が臨床上的の問題となっており, 慢性肝疾患の病態進展機構の解明は医学・獣医学の双方にとって重要な研究課題である.

鉄は酸素運搬や ATP 産生に必要な生体の必須元素であり, 体内の鉄代謝は常に厳密に調節されている. 肝臓はその鉄代謝の中心的臓器であり, 肝細胞とマクロファージ (クッパー細胞) が各種の鉄調節因子を発現することにより, 鉄代謝の調節・維持を担っている. したがって, 肝障害が繰り返されると, これらの鉄調節因子の異常を来し, 鉄過剰を発症することがある.

近年, C 型肝炎や非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) などのヒトの慢性肝疾患において, 鉄過剰が病態を進展させるリスクファクターであることが明らかになりつつあるが, 鉄過剰の発生機序および病態進展に関わる役割については未だ十分に解明されていない.

2. 研究の目的

本研究では, 慢性肝疾患における炎症性細胞, 特にマクロファージによる鉄代謝の調節機構を追究するとともに, 肝細胞傷害に関わる鉄過剰の病理学的意義を検証することにより, 慢性肝疾患の病態進展機序の一端を解明することを目的とした. はじめに, 慢性肝疾患モデルラットの病態初期と進展期で大きく変動するサイトカインを探索し, 進展期の鉄代謝障害に関わるマクロファージの病態生理学的役割を解析した. 次に, 異なる 2 種の慢性肝疾患モデルラットに高鉄含有食を投与し, 鉄過剰によりそれぞれの病態が増悪するか否かを調べ, 慢性肝疾患における鉄過剰の病理学的役割を解析した.

3. 研究の方法

3-1. 慢性肝障害の進展に関わる炎症性サイトカインの解析

6週齢の F344 雄ラットにチオアセトアミド (TAA; 100 mg/kg BW) を反復腹腔内投与し (週 2 回, 最大 25 週間), 慢性肝疾患モデルラットを作製した. 肝病変部より組織切片を作製し, 病理組織学的解析および免疫組織化学的解析による病態解析および炎症細胞の解析を行った. また, マイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR 解析により, 各種炎症細胞の遺伝子発現解析を行った.

3-2. マクロファージ枯渇による鉄調節因子の発現解析

6 週齢の F344 雄ラットに clodronate liposomes または empty liposomes を単回尾静脈投与し, 肝マクロファージ枯渇モデルラットを作製した. 血液生化学的解析, 病理組織学的解析およびマイクロアレイ解析を行い, 肝マクロファージ枯渇による鉄代謝の変動を解析した.

3-3. 肝硬変モデルにおける鉄過剰の病理学的役割の解析

6 週齢の F344 雄ラットに正常食 (Fe: 0.02%) または高鉄含有食 (Fe: 1%) を自由摂餌させ, TAA (100 mg/kg BW) または生食を反復腹腔内投与 (週 2 回, 20 週間) し, 慢性肝疾患の病態進展に関わる食餌性鉄過剰の影響を調べた. 肝病変部より組織標本を作製し, 病理組織学的解析および免疫組織化学的解析により, 肝細胞傷害および炎症細胞の解析を行った.

3-4. NASH モデルにおける鉄過剰の病理学的役割の解析

6 週齢の F344 雄ラットに正常食 (fat: 5%, Fe: 0.03%), 高脂肪食 (fat: 16%, Fe: 0.03%), 高脂肪・高鉄含有食 (fat: 16%, Fe: 0.5%) または高鉄含有食 (fat: 4%, Fe: 0.5%) を最大 30 週間自由摂餌させ, NASH の病態進展に関わる食餌性鉄過剰の影響を調べた. 血液生化学的解析, 病理組織学的解析およびリアルタイム PCR 解析により, 肝病変の病態解析および炎症細胞の解析を行った.

4. 研究成果

4-1. 慢性肝障害の進展に関わる炎症性サイトカインの解析

TAA 誘発慢性肝疾患モデルラットでは, 投与開始後 10 週に肝線維化がみられ, 15 週以降では偽小葉を伴う重篤な肝硬変へと進展した. この肝線維化から肝硬変への進展期に, 血清鉄および肝臓鉄の上昇, および全身鉄代謝の中心的調節因子である hepcidin mRNA の発現低下が認められた. この時期には, MHC class II 陽性抗原提示マクロファージの減少, 炎症性サイトカインの発現上昇 (CX3CL1, CCL28, CCR3, IL11, IL5Ra mRNA) および発現低下 (CCL3, IL2, IL6, IL10, IL12 mRNA) が認められた. また, 鉄代謝の調節に関わることが知られている microRNA miR-122 の発現低下も認められた.

よって, 慢性肝疾患において鉄過剰症が生じる病態進展期 (肝硬変期) には, マクロファージ-サイトカイン軸のバランスが大きく変化することが明らかとなり, 鉄過剰症の発症に関わるマクロファージの重要性が示された.

4-2. マクロファージ枯渇による鉄調節因子の発現解析

clodronate-liposomes 投与ラットでは, 投与後 1 日から類洞内マクロファージの著

しい減数が認められた。同時に、血清鉄の減少、hepcidin 誘導に関わる IL6 mRNA の発現低下、鉄の細胞内取り込みに関わる TFR1 mRNA の発現低下もみられた。類洞内マクロファージは 2 日から徐々に増加（回復）するが、12 日においても再生は不完全であった。また、脾臓においても、マクロファージの著しい減数が認められた。

よって、マクロファージ枯渇ラットでは、一過性の鉄代謝障害（鉄欠乏）が起こることが示され、肝疾患のみならず、正常な肝臓においても、マクロファージが鉄代謝の調節・維持に重要な役割を担っていることが示された。

4-3. 肝硬変モデルにおける鉄過剰の病理学的役割の解析

正常食・TAA 投与群（TAA 群）において、肝硬変の進展期に肝細胞に鉄蓄積が認められ、この細胞では TUNEL 陽性アポトーシスの減少および BrdU 陽性率の減少傾向がみられた。一方、高鉄含有食・TAA 投与群（Fe+TAA 群）では、TAA 群と比較して、肉眼的および病理組織学的に肝臓の線維化が著しく抑制され、マクロファージ、T 細胞および NK 細胞などの炎症細胞浸潤も顕著に抑制された。また、高鉄含有食投与群（Fe 群）では、肝門脈周囲を中心に肝細胞の鉄蓄積が強く認められたが、肝細胞傷害を示唆するような病理組織学的変化は認められなかった。

以上より、TAA 誘発肝硬変モデルにおいて、鉄過剰はアポトーシスを減少させることで、肝硬変への病態進展を抑制する可能性が示された。

4-4. NASH モデルにおける鉄過剰の病理学的役割の解析

高脂肪食投与群（fat 群）では、投与開始後 5 週から肝細胞の脂肪蓄積（steatosis）がみられ、20 週以降では肝小葉内の炎症細胞巣（lobular inflammation）の増加、肝酵素（ALT, AST, ALP）の上昇およびアポトーシスの増加が認められた。高脂肪・高鉄含有食投与群（fat+Fe）群では、fat 群と比較して、小葉内炎症巣の増加、ALT の上昇傾向、炎症性サイトカイン（TNF- α , IFN- γ , IL1, TGF- β mRNA）の発現上昇傾向がみられた。また、fat+Fe 群では、小葉内のマクロファージに鉄沈着が強く認められた。正常食群（cont 群）および高鉄含有食投与群（Fe 群）では、血液生化学的および病理組織学的変化は認められなかった。

よって、NASH モデルにおいて、鉄過剰は炎症の進展を介して、肝病変の増悪に関わ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 4 件)

1. Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, Golbar HM, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. 2015. M1-/M2-macrophages contribute to the development of GST-P-positive preneoplastic lesions in chemically-induced rat cirrhosis. *Exp Toxicol Pathol*, 67(9): 467-475. 査読あり。
2. Izawa T, Horiuchi T, Atarashi M, Kuwamura M, Yamate J. 2015. Anti-fibrotic Role of miR-214 in Thioacetamide-induced Liver Cirrhosis in Rats. *Toxicol Pathol*, 43(6): 844-851. 査読あり。
3. Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Golbar HM, Kuwamura M, Yamate J. 2015. Analysis of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing ductular cells in a rat liver cirrhosis model induced by repeated injections of thioacetamide (TAA). *Exp Mol Pathol*, 98(3): 476-485. 査読あり。
4. Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Murakami H, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Golbar HM, Kuwamura M, Yamate J. 2015. Immunohistochemical characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing cells in a rat liver cirrhosis model induced by repeated injections of thioacetamide (TAA). *Exp Toxicol Pathol*, 67(1): 53-63. 査読あり。

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Dietary iron overload alters hepatic inflammation in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Izawa T, Atarashi M, Miyagi R, Kuwamura M, Yamate J. 2015 ACVP/ASVCP/STP Combined Annual Meeting. Minneapolis Convention Center (Minneapolis, USA). 2015 年 10 月 16 日～22 日。
2. 肝硬変における鉄過剰の病理学的役割の解析 新 真智, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 北里大学 (青森県十和田市). 2015 年 9 月 7 日～9 日。
3. 複合型高脂肪食投与によるラット肝病変の比較検討. 井澤武史, 宮城伶奈, 橋本 愛, 新 真智, 桑村 充, 山手丈至. 第 42 回日本毒性学会学術年会, 石川県立音楽堂 (石川県金沢市). 2015 年 6 月 29 日～7 月 1 日。
4. 非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットにおける鉄過剰の病理学的役割の検討. 井澤武史, 新 真智, 宮城伶奈, 桑村 充, 山手丈至. 第 31 回日本毒性病理学会学術集会, タワーホール船堀 (東

- 京都江戸川区). 2015年1月29日～30日.
5. Analyses of hepatic macrophages depleted by clodronate in rat liver. Pervin M, Golbar HM, Alexandra B, Wijesundera KK, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. ACVP 2014 Annual Meeting. Marriott Marquis Hotel (Atlanta, USA). 2014年11月8日～12日.
 6. Dysregulation of iron homeostasis during progression of thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. Izawa T, Murakami H, Miyagi R, Wijesundera K, Tennakoon A, Golbar HM, Kuwamura M, Yamate J. STP 33rd Annual Symposium. The Marriott Wardman Park (Washington DC), USA. 2014年6月22日～26日.
 7. Characterization of repopulating macrophages in liver after depletion with liposomal clodronate in rats. Pervin M, Golbar HM, Bondoc A, 植村明都, 井澤武史, 桑村 充, 山手文至. 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道大学(北海道札幌市). 2014年9月9日～10日.
 8. 非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットの病理学的解析. 宮城伶奈, 井澤武史, 橋本 愛, 堀内貴至, 田中美有, 桑村 充, 山手文至. 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道大学(北海道札幌市). 2014年9月9日～10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/>

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・准教授
研究者番号: 20580369

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし