

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	三好 茂樹
学 位 論 文 題 目 Altered expression of iron-related molecules in nonalcoholic fatty liver disease model mice (非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスの鉄関連分子発現変化の解析) 共 著 者 名 大竹孝明、本村 亘、佐々木勝則、生田克哉、高後 裕 未 公 表 研 究 目 的 飲酒を原因とせず、主に内臓肥満を背景として肝細胞に中性脂肪が蓄積する非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)は消化器病領域で最も多い生活習慣病である。本疾患は過栄養・脂質代謝異常・インスリン抵抗性を背景に発症し、二次性に肝臓へ鉄が沈着することが特徴である。C型慢性肝炎(CHC)やアルコール性肝障害(ALD)でも高頻度に肝臓への鉄沈着が報告され、そのメカニズムとして肝で産生される鉄代謝調節因子hepcidin (Hepc)の発現低下が原因であることが基礎研究で証明されているが、NAFLDの鉄過剰症の病態は依然不明である。本研究ではNAFLDにおける鉄代謝異常の原因としてどのような鉄関連分子の発現異常が起きているか、NAFLDマウスモデルと脂肪酸刺激下の培養肝癌細胞株を用いて肝・腸管の鉄関連分子遺伝子の発現について検討した。 材 料 ・ 方 法 ●動物モデル NAFLD マウスモデルとして、①マウス用基本飼料で飼育した過食・肥満を表現型とするレプチン欠損マウス(ob/ob マウス, 6 週齢雄性)または②C57/BL6 マウス(12 週齢雄性)を高脂肪飼料(脂肪カロリー比: 82.0%)で 16 週間飼育した。ob/ob マウスおよび高脂肪飼料負荷マウスの負荷 2, 4, 8, 16 週目での肝、十二指腸組織及び血液を採取した。 ●検討項目 体重、肝重量、血液生化学検査、肝の組織学的所見、肝組織中鉄含量(原子吸光スペクトロフォトメトリー法)、肝組織における血清トランスフェリン鉄の細胞内取り込みに関わる transferrin receptor 1 (TfR1)、Hepc、腸管の鉄吸収にかかわる divalent metal transporter1 (DMT1)、細胞内鉄の細胞外への排泄に関わる ferroportin 1 (FPN1)の mRNA の発現および血清中の活性型 Hepc 濃度を測定した。 ●実験方法 各組織から total RNA を抽出し、1μg 量の total RNA, random decamer および RETROscript™ First Strand Synthesis kit (Ambion)を用いて cDNA を合成し、LightCycler®および FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)を用いて肝の			

TfR1, Hpc、十二指腸の DMT1, FPN1 の mRNA の発現を定量的リアルタイム RT-PCR で解析した。

各遺伝子の蛋白発現は各々の特異抗体を用いて検討し、TfR1 に関しては western blot 法および免疫蛍光法で、肝組織の Hpc 発現に関しては免疫組織化学染色法で、血清中活性型 Hpc 濃度は liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) 法を用いて測定した。

in vitro の検討として肝癌細胞株 Huh7 を 10% FBS 添加 DMEM 下に培養し、脂肪酸(オレイン酸)で刺激し、TfR1, Hpc mRNA の発現を定量的リアルタイム PCR で検討した。

●統計学的解析

各結果の統計学的解析は Student t 検定で行った。

成 績

レプチンが欠損し、遺伝的に過食・肥満の ob/ob マウス群 (O) は野生型群 (W) と比較して有意に体重が増加し (W: 24.3g, O: 48.2g, $p < 0.001$)、肝重量が増加していた (W: 1020mg, O: 2990mg, $p < 0.001$)。肝組織像ではびまん性に肝細胞に大滴性脂肪蓄積、風船様腫大が認められ、著明な脂肪肝の所見を呈し、全肝の鉄含量は有意に増加していた (W: 86mg/Liver, O: 176mg/Liver, $p = 0.004$)。肝組織の TfR1 の mRNA の発現は有意に上昇した (W: 0.9, O: 1.4, $p = 0.05$)。肝組織の Hpc mRNA の発現は有意な減少を認めなかったが (W: 1.60, O: 1.02, $p = 0.10$)、蛋白レベルでは血清中活性型 Hpc 濃度が有意に低下していた (W: 66.3, O: 34.9, $p = 0.01$)。

高脂肪飼料負荷マウスでは、8週目以降から体重が増加し、肝組織像では8週目から中心静脈周辺の Zone 3 の肝細胞内に小滴性脂肪滴が出現し、16週目で大滴性の脂肪蓄積がみられた。肝の TfR1 の mRNA の発現は、脂肪負荷早期の2週目から亢進し (通常飼料 (C): 1.8, 高脂肪飼料 (F): 9.9, $p = 0.001$)、全経過で亢進していた (4週目: C: 1.5, F: 2.6, $p = 0.04$ 、8週目: C: 0.4, F: 1.2, $p = 0.005$ 、16週目: C: 1.2, F: 2.8, $p = 0.01$)。蛋白発現レベルでも2週目の肝の TfR1 の発現は亢進していた (western blot 法及び免疫蛍光法)。肝の Hpc の mRNA の発現は、肝細胞に脂肪滴が出現した8週目以降から低下しており (C: 1.2, F: 0.4, $p = 0.01$)、蛋白発現レベルでも16週目の血清中活性型 Hpc 濃度は低下していた (C: 37.5, F: 19.0, $p < 0.05$)。十二指腸の DMT1 の mRNA の発現は8週目以降から亢進 (8週目: C: 0.95, F: 4.91, $p = 0.02$ 、16週目: C: 0.34, F: 0.58, $p = 0.02$) し、FPN1 の mRNA の発現は2週目以降から亢進 (2週目: C: 0.30, F: 0.61, $p = 0.02$ 、4週目: C: 0.97, F: 1.48, $p = 0.02$ 、8週目: C: 1.55, F: 2.32, $p = 0.03$) していたが、16週目では差を認めなかった (C: 0.36, F: 0.42, $p = 0.17$)。

オレイン酸を肝癌細胞株 Huh7 培養液中に添加すると、細胞質内に脂肪滴を認め、1 μ M の添加で TfR1 の mRNA の発現は亢進していた (コントロール群: 0.83, オレイン酸 1 μ M 群: 1.14, $p < 0.05$)。

考 案

C型慢性肝炎 (CHC)、アルコール性肝障害 (ALD) などでは生じる肝臓の鉄沈着におい

でも、遺伝性クロマトーシスで見られると同様な、鉄関連分子の発現異常が二次的に関与していることが報告されるようになってきた^{1,2)}。我々はCHC, ALDの肝細胞においてトランスフェリン結合鉄の取り込みに働くTfR1の発現亢進を見出している。食餌鉄の吸収は腸管細胞に発現している鉄トランスポーターDMT1とFPN1が関与し、老廃赤血球のヘモグロビン鉄の再利用に働くマクロファージの鉄放出にはFPN1が関与している。とくに、肝で産生される鉄代謝調節因子Hepcが、腸管細胞、マクロファージの細胞膜上のFPN1と結合し、その発現をpost-translationalに調節していることが報告され³⁾, アルコール負荷またはC型肝炎ウイルス蛋白がHepcの発現を抑制して生体を鉄過剰にする可能性が強いことが示唆されている^{1,2)}。一方、NAFLDにおいても鉄の過剰蓄積がしばしばみられ、フリーラジカルを産生し、肝細胞障害の一因となっているが、鉄代謝異常発症のメカニズムは不明である。

今回、我々は過食・肥満マウスと高脂肪飼料負荷マウスのNAFLDモデルを用いて、これら鉄関連分子の発現動態を検討した。これらのモデルでは体重増加、肝重量増加、脂肪肝の形成、肝組織中の脂質過酸化マーカーHNE、血清ALT値の上昇、肝内鉄含量の増加を認めた。組織学的には脂肪沈着は認めたが、炎症細胞浸潤は認めないことからNAFLDのモデルとして妥当と考えられる。

高脂肪飼料負荷マウスでは肝組織におけるTfR1の発現亢進が2週目から認められ、高脂肪飼料負荷が早期からトランスフェリン結合鉄取り込み亢進が生じることが示された。また、8週目以降の脂肪肝が形成された時期にHepcの発現低下をmRNAおよび蛋白レベルの両方で認め、結果的にFPN1のpost-translationalな調節を介して腸管からの食餌鉄吸収亢進、マクロファージからの鉄放出に作用する可能性が示唆された。両分子の発現の変化の機序は今のところ不明であるが、TfR1は高脂肪飼料負荷の初期の段階から発現が亢進していることから、高脂肪食による直接的な影響の可能性が考えられる。Hepcは8週目以降の変化であることから肝細胞への脂肪沈着という細胞内の脂質代謝を含めた代謝系の変化が関与している可能性が考えられる。

十二指腸における鉄関連分子では、DMT1は8週目以降に発現が亢進し、FPN1は2週目から発現が亢進しており、両者とも発現は鉄吸収を促進する方向に動いていた。これはHepcを介さない反応である。さらにFPN1の発現をpost-translationalに抑制するHepcの発現が低下しているのは、FPN1の発現を亢進させている可能性が高く、これらの異常によりNAFLDの鉄代謝異常が生じているものと考えられる。

結 論

動物モデル及び培養細胞株モデルにおいて、過食・脂肪負荷が肝細胞のTfR1の発現亢進を介したトランスフェリン鉄の取り込み亢進を誘導し、さらにHepcの発現抑制を介して腸管からの鉄吸収やマクロファージからの鉄放出を誘導している可能性が示唆された。

引 用 文 献

- 1) Duygu Dee Harrison-Findik, et al. Alcohol Metabolism-mediated Oxidative Stress Down-regulates Hepsidin Transcription and Leads to Increased Duodenal Iron Transporter Expression. J. Biol. Chem 2006;281:22974-22982
- 2) Sohji Nishina, et al. Hepatic C Virus-Induced Reactive Oxygen Species Raise Hepatic Iron Level in Mice by Reducing Hepsidin Transcription Gastroenterology 2008;134:226-238
- 3) Elizabetha Nemeth, et al. Hepsidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. Science 2004;306:2090-2093

参 考 论 文

- 1) Ohtake T, et al. Hepsidin Is Down-Regulated in Alcohol Loading. Alcohol Clin Exp Res 2007;31:2S-8S
- 2) Inoue M, et al. Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. Biochem Biophys Res Commun 2005;336:215-222

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	三好 茂樹
審査委員長 審査委員 審査委員 審査委員 			
学 位 論 文 題 目 Altered expression of iron-related molecules in nonalcoholic fatty liver disease model mice 「非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスの鉄関連分子発現変化の解析」			

本研究では、肥満マウスおよび高脂肪食負荷マウスを用い、組織学的な脂肪肝の進行に伴う肝臓鉄含量の増加と酸化ストレスの上昇を認めた。この時、肝臓におけるトランスフェリン受容体の増加とヘプシジン産生の低下、十二指腸における鉄輸送関連タンパク質である DMT1 および FPN1 の発現上昇を明らかにした。また、培養肝細胞において、脂肪酸の添加によりトランスフェリン受容体の翻訳が亢進することを確認した。

近年、メタボリック症候群などに起因する単純性脂肪肝から非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に進展する症例が増加しており、その発症メカニズムの解明が急務となっている。本研究は、脂肪肝から NASH への進展に、肝臓への脂肪負荷に伴う鉄代謝関連分子の変化による肝臓への鉄の蓄積と、それに基づく酸化ストレスの亢進が重要な役割を果たすことを示唆するものであり、その意義は大きいと考えられる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。