

称号及び氏名 博士(獣医学) 新 真智

学位授与の日付 2021年3月31日

論文名 Pathological studies on the modulation of chronic liver diseases
by dietary iron overload using rat experimental models
(ラット実験モデルを用いた食餌性鉄過剰による慢性肝疾患
の病態修飾に関する病理学的研究)

論文審査委員 主査 山手 丈至
副査 長谷川 貴史
副査 桑村 充
副査 森山 光章
副査 井澤 武史

緒言

慢性肝疾患は肝硬変や肝がんへと進行する難治性疾患で、その主要な原疾患としてウイルス性肝炎、アルコール性肝炎などが挙げられる。近年、急速に増加している非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、①基準値以下のアルコール摂取量 (純アルコール換算で、男性 30 g/日、女性 20 g/日以下) であること、②肝病理組織検査あるいは超音波画像検査で脂肪肝と診断されること、および③NAFLD 以外の慢性肝疾患が除外されること、の 3 項目を満たす疾患であり、肥満、糖尿病、脂質異常症などのメタボリックシンドロームに関連して発症する。病理学的には、顕著な炎症や肝細胞傷害を伴わない非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver; NAFL; いわゆる脂肪肝) と、進行性で炎症、肝細胞傷害、および線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) に大別される。NAFLD のほとんどが NAFL に分類され、NASH 患者は NAFLD 患者全体の 10-20% と想定されている。NASH の病態進展機序として、酸化ストレス、インスリン抵抗性、腸内細菌叢の変化に伴う自然免疫系の賦活化、およびミトコンドリア機能異常などの複数の因子が関連する multiple parallel hits 仮説が提唱されている。しかし、NAFL から NASH へ至るには 10 年~20 年にもおよぶ長い期間が必要で、その病態や変遷のメカニズムには未だ不明点も多い。医薬品によるウイルス性肝疾患の病態制御が可能となった現在、世界の成人の 25% が罹患する NAFLD が肝がんの最も主要な原因となりつつあることから、NAFLD と肝がんとの関連性の解明が強く求められている。

鉄は生体にとって必須の微量栄養素であるが、体内で二価鉄が過剰になると、フェントン反応を介したフリーラジカルが産生されて細胞傷害を惹起してしまう。生体内で鉄代謝は厳密に調節されているが、慢性肝疾患ではその調節機構が破綻し、鉄過剰状態に陥ることも知られている。NAFLD 患者の約 1/3 において肝臓の鉄蓄積が認められるとともに、肝マクロファージへの鉄蓄積と NAFLD の組織学的重症度を表す NAFLD activity score (NAS)、肥満度および糖尿病の重症度にそれぞれ正の相関があり、鉄過剰と NAFLD には関連性があることが示唆されている。一方、肝鉄含有量と NAS に有意な相関を認めないという報告もあり、鉄過剰が NAFLD の病態には関連しないという考えも提唱されている。

本研究では、NAFLD の病態に関わる鉄過剰の役割を解明する目的で、脂肪性肝炎、肝硬変、および肝がんの各ステージを再現するラットモデルに食餌性鉄過剰状態を付加することで、NAFLD の病態に及ぼす鉄過剰の影響を解析した。

第 1 章 NASH ラットモデルにおける食餌性鉄過剰の役割

はじめに、脂肪肝 (NAFL) から NASH への病態進展を再現するモデルの作製を試みた。F344 雄ラットに高脂肪食 (11% ココアバター、1% コレステロール含有; 脂質カロリー比 35%) を 30 週間給餌したところ、正常食 (脂質カロリー比 5%) を給餌した対照群と比較して、びまん性の小滴性脂肪化を伴う脂肪肝の発現、ALT 優位型の肝逸脱酵素上昇、TNF α 、IL1 β および IL6 などの炎症性サイトカインの発現上昇を伴う肝実質の炎症巣の増加が認められ、本モデルがヒト NASH の病態と類似していることが示された。また、高脂肪食給餌により腸内の *Oscillospira* 属菌と *Ruminococcus* 属菌の減少および *Akkermansia* 属菌の増加が認められ、ヒト NAFLD 類似腸内細菌叢の変化 (Dysbiosis) を伴うことが確認できた。本モデルはヒトの NASH に類似した肝病変の進展および腸内細菌の変化を呈する有用な実験モデルになりえ

ると考えられた。

この NASH モデルに鉄過剰食 (0.5% Fe 含有) を併用した高脂肪・鉄過剰食群では、高脂肪食群と比較して、TNF α の発現上昇を伴う肝実質内の炎症巣数の増加が認められた。また、高脂肪・鉄過剰食群では、鉄沈着は肝細胞よりも類洞内のマクロファージにおいて顕著であった。高脂肪・鉄過剰食群では、腸内の *Oscillospira* 属菌と *Ruminococcus* 属菌の減少および *Akkermansia* 属菌の増加が認められ、高脂肪食群と同様の Dysbiosis が起こっていた。肝臓中の酸化ストレス関連分子については、全ての群間で有意差は認められなかった。

以上の結果から、食餌性鉄過剰による脂肪性肝炎の増悪には、鉄が過剰蓄積した類洞内マクロファージを介した炎症の活性化が関わっていることが示され、ヒト NAFLD に合併する肝鉄過剰症が炎症を増悪させて肝炎をより進展させてしまう可能性が考えられた。

第 2 章 チオアセトアミド (TAA) 誘発肝硬変モデルにおける食餌性鉄過剰の役割

第 1 章において、NASH モデルにおける鉄過剰の役割を明らかにしたが、今回の NASH モデルでは線維化や肝硬変などの進展病変は認められなかった。そこで、NASH の進展病変である肝線維化・肝硬変における鉄過剰の役割を調べるため、TAA モデルを用いることとした。TAA は肝細胞の選択的傷害を誘発する肝毒性物質で、反復投与によって肝線維化・肝硬変を誘発できる。F344 雄ラットに TAA を反復腹腔内投与 (週 2 回で最長 20 週間) したところ、投与開始後 6 週から初期の肝線維化像、すなわち小葉中心性の線維化が認められ、20 週では肝逸脱酵素 (ALT, AST) の顕著な上昇、および広範な線維化 (bridging fibrosis) と偽小葉の形成を伴う小結節性肝硬変の発現が認められた。

TAA の反復投与とともに、20 週間鉄過剰食を給餌した鉄過剰・TAA 群では、当初の予想に反して、肉眼的に肝臓は平滑で、組織学的にも線維化および肝硬変の形成は認められなかった。TAA 群と比較して、鉄過剰・TAA 群では、血清鉄および肝臓鉄が有意に上昇する一方で、肝逸脱酵素は有意に低下しており、食餌性鉄過剰下においては肝障害と肝臓の線維化が著しく抑制された。TAA 群と比べて、鉄過剰・TAA 群では肝臓の脂質過酸化が亢進する一方で、肝細胞の DNA 傷害は軽減されており、鉄過剰状態下では肝硬変進展に関与する酸化ストレスは低減されているものと考えられた。また、鉄過剰・TAA 群では、肝細胞の TUNEL 陽性アポトーシスが減少し、カスパーゼ 3 切断の抑制を伴っていた。以上のことから、鉄過剰・TAA 群では、肝細胞のアポトーシス抑制を介して、TAA 誘発肝線維化の発現・進展を抑えた可能性が考えられた。

本章では、食餌性鉄過剰によって化合物誘発肝硬変が著しく抑制されることが示された。これは鉄過剰が酸化ストレスを介して病態を悪化させるという通説とは反する結果で、本研究より、鉄過剰は肝臓に対して保護作用を発揮しうる可能性のあることが明らかになった。

第 3 章 Western diet (WD)・ジエチルニトロサミン (DEN) 誘発肝腫瘍モデルにおける食餌性鉄過剰の役割

1 章と 2 章を通じて、NASH と肝硬変の状態における肝鉄過剰の役割が明らかとな

ったが、いずれのモデルも肝腫瘍の形成には至らなかった。そこで本章では、慢性肝疾患のエンドポイントである肝がんの発現に関わる鉄過剰の役割を調べた。F344 雄ラットの 8 週齢時に遺伝毒性発がん物質である DEN を単回腹腔内投与し、その後 WD (高脂肪・高炭水化物食; 乳脂肪 20%・フルクトース 34%含有; 脂質カロリー比 40%) および糖水を 26 週間投与して脂肪肝・肝腫瘍モデルを作製した。WD 群と WD・DEN 群において、体重増加、高脂血症 (中性脂肪・コレステロールの増加)、脂肪肝の形成がみられるとともに、WD・DEN 群では 2/6 例 (33%) に肝腫瘍が形成され、肝臓の前癌病巣のマーカーである glutathione S-transferase p (GST-p) 陽性肝細胞巣の増加を伴っていた。さらに WD・DEN 群では、ヒト NAFLD と組織学的に類似した肝細胞の大滴性脂肪化に加えて、ヒト NASH の特徴である肝細胞の風船様変性に類似した変化もみられた。今回の WD・DEN モデルでは、メタボリックシンドロームと NAFLD を背景とした肝腫瘍形成を誘発できることが示された。

WD・DEN モデルに鉄過剰食を併用投与した鉄過剰・WD・DEN 群では、対照群と比べて肝臓の GST-p 陽性巣が増加しているものの、肝腫瘍の形成は認められなかった。また、WD・DEN 群と鉄過剰・WD・DEN 群間で GST-p 陽性巣に有意差は認められなかった。また、鉄過剰・WD・DEN 群では、肝臓のシリウスレッド染色陽性面積が増加しており、線維化が増加していることが示された。この線維化は、対照群と比べて、DEN 群と WD・DEN 群でも増加傾向にあることから、鉄過剰・WD・DEN 群における線維化の増加は DEN と鉄過剰の併用によって誘発された変化と考えられた。鉄過剰・WD・DEN 群では、線維化領域に鉄沈着が認められ、鉄が蓄積している細胞は形態的にマクロファージと考えられた。

以上の結果から、WD と DEN の併用投与により、26 週間という短期間で NAFLD を背景とした肝腫瘍形成モデルを作製できることが示された。一方で、本モデルでは、食餌性鉄過剰による腫瘍形成の促進は認められず、前癌病変から肝腫瘍形成までの進展過程を抑制する可能性が示された。また、食餌性鉄過剰は DEN に誘発される線維化を促進することが示された。

総括

1. 本研究で作製された 3 種の疾患モデルラットは、それぞれ NASH, 肝硬変および肝腫瘍の NAFLD の病態を再現でき、NAFLD の病態解析に有用と考えられる。
2. NASH モデルラットにおいて、食餌性鉄過剰は、過剰鉄が蓄積したマクロファージの活性化を介して脂肪性肝炎を増悪する。
3. TAA 誘発肝硬変モデルラットにおいて、食餌性鉄過剰は、肝細胞のアポトーシスの抑制を介して、肝臓の線維化を著しく抑制する。
4. WD・DEN 誘発肝腫瘍モデルラットにおいて、食餌性鉄過剰は肝臓の前癌病変から肝腫瘍の形成過程を抑制する可能性がある。
5. 食餌性鉄過剰は、非遺伝毒性物質の TAA 誘発肝線維化を著しく抑制する一方で、遺伝毒性物質の DEN 誘発線維化を促進する。すなわち、実験に用いる化合物によって鉄過剰の病態修飾機構が異なる可能性が考えられる。
6. 本研究によって、鉄過剰は NAFLD の病態進展を促進する場合と抑制する場合の相反する二面性を持つことを初めて明らかにした。本実験モデルを用いたさらなる NAFLD の病態進展メカニズムを解析することでヒト NAFLD の複雑な病理発生機序を解明しうる可能性が示された。

審査結果の要旨

慢性肝疾患は肝硬変や肝がんへと進行する難治性疾患で、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎などが原疾患として挙げられる。近年、医薬品によるウイルス性肝疾患の病態制御が可能となった一方で、肥満、糖尿病、脂質異常症などのメタボリックシンドロームを基に発症する非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の患者数が増加している。そのNAFLDは、世界の成人の約25%が罹患しており、肝がんの最も主要な原因となりつつある。NAFLDは、病理学的に炎症や肝細胞傷害の乏しい非アルコール性脂肪肝（NAFL; いわゆる脂肪肝）と、炎症、肝細胞傷害、および線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に大別される。NASHの病態進展機序として、酸化ストレス、インスリン抵抗性、腸内細菌叢の組成変化に伴う自然免疫系の賦活化、およびミトコンドリア機能異常などの複数の因子が同時並行的に関わるという“multiple parallel hits”仮説が提唱されている。しかし、NAFLからNASHへの進展には10年以上の長い期間が必要で、その病態進展メカニズムには未だ不明点が多い。

鉄は生体に必須の微量栄養素である一方で、体内で鉄が過剰になると、フェントン反応を介したフリーラジカルの産生により細胞傷害を惹起する。慢性肝疾患では鉄の調節機構が破綻し、鉄過剰状態に陥ることがある。NAFLD患者の約1/3において肝臓の鉄蓄積が認められ、特に肝マクロファージへの鉄蓄積は、NAFLDの組織学的重症度を表すNAFLD activity score（NAS）、肥満度および糖尿病の重症度にそれぞれ正の相関があるとされている。

本研究は、脂肪性肝炎、肝硬変、および肝がんの各ステージを再現するラットモデルに食餌性鉄過剰を負荷することで、NAFLDの病態に関わる鉄過剰の役割を解明することを目的として実施されている。

第1章では、脂肪肝（NAFL）からNASHへの病態進展を再現するラットモデルを用いて、食餌性鉄過剰のNASH形成に関わる役割を解析している。その結果、高脂肪食給餌群では、びまん性の小滴性脂肪化を伴う脂肪肝の発現、ALT優位型の肝逸脱酵素上昇、炎症性サイトカインの発現上昇を伴う肝実質の炎症巣の増加が認められている。加えて、この群では、ヒトNAFLDに類似した腸内細菌叢の組成変化が生じており、ヒトNASHに類似した肝病変を再現できる有用な実験モデルであることを示している。このNASHモデルに鉄過剰食を併用すると、高脂肪食単独群よりも炎症性サイトカインの発現がより高く、肝実質内の炎症巣が増加し、類洞内の鉄蓄積マクロファージが増加していた。すなわち、食餌性鉄過剰による脂肪性肝炎の増悪には、鉄が過剰蓄積した類洞内マクロファージを介した炎症の活性化が関わることを明らかにしている。この結果は、ヒトNAFLDに合併する肝鉄過剰症が肝炎をさらに進展させる可能性を示している。

第2章では、チオアセトアミド（TAA）の反復投与によってNASHの進展病変である肝硬変モデルラットを作製し、肝硬変形成に関わる食餌性鉄過剰の役割を解析している。TAA単独投与群では偽小葉の形成を伴う小結節性肝硬変の発現が認められたのに対し、TAA投与と鉄過剰食給餌を併用した群では、肝硬変が形成されず、肝逸脱酵素も上昇しなかった。さらに、鉄過剰によって肝障害と肝線維化が著しく抑制されることが分かった。加えて、鉄過剰によるTAA誘発肝線維化の形成抑制には、アポトーシスの抑制が関わることを明らかにしている。この結果

は、TAA誘発肝硬変モデルにおいては、食餌性鉄過剰は肝保護作用を発揮する可能性を示している。

第3章では、慢性肝疾患の最終的な病態である肝がんを想定したモデルの作製を目指し、イニシエーターとしてジエチルニトロサミン（DEN）、プロモーターとしてウェスタンダイエット（WD：高脂肪・高炭水化物食）および鉄過剰食を給餌し、NAFLDを基盤とした肝がんの発現に関わる鉄過剰の役割を解析している。WD・DEN投与群において、高脂血症、肝細胞の大滴性脂肪化、肝炎症巣の増加、および肝細胞の風船様変性が認められ、さらに肝細胞がんの発現があった。この成果は、WDとDENを併用することにより、メタボリックシンドロームと脂肪肝を基盤とした肝腫瘍誘発の可能性を示している。さらに、WD・DENモデルに鉄過剰食を併用した鉄過剰・WD・DEN群では、対照群と比べて前がん病巣は増加するものの、肝腫瘍は認められなかった。この群では、また、肝線維化が増加し、線維化領域のマクロファージに高度の鉄沈着がみられた。すなわち、DENと鉄過剰食の併用では、肝線維化は促進されるものの、肝腫瘍が形成されなかったことから、鉄過剰は肝腫瘍の形成を抑制する可能性があることを示している。

本研究の遂行により、鉄過剰はNAFLDの病態進展の促進と抑制の相反する二面性を持つことを初めて明らかにしている。本モデルを用いたメカニズム研究によって、ヒトNAFLDの複雑な病理発生機序の解明がさらに進展することが期待される。よって、この研究は、実験病理学を通じた生命科学の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。