

| | | |
|---------|---|-------|
| 称号及び氏名 | 博士(獣医学) | 稲井 洋平 |
| 学位授与の日付 | 2023年9月23日 | |
| 論文名 | Pathological studies on bleeding diathesis and modulation of acute liver injury 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出血性素因および急性肝障害の病態修飾に関する病理学的研究) | |
| 論文審査委員 | 主査 | 桑村 充 |
| | 副査 | 東 泰孝 |
| | 副査 | 笹井 和美 |
| | 副査 | 井澤 武史 |

論文要旨

緒言

肝臓は、血中鉄濃度の負の調節因子であるヘプシジンの産生を通じて、鉄の恒常性維持を担っているが、慢性肝疾患 (CLD) では、肝ヘプシジン合成の減少による血中鉄の増加 (鉄過剰) を引き起こす。鉄過剰はフェントン反応を介してヒドロキシラジカルの生成を誘発し、細胞傷害をもたらすことから、鉄過剰は CLD の進行におけるリスク因子として認識されている。鉄過剰は、CLD 患者の約 35~52% に認められるが、瀉血による血中鉄レベルの抑制は、慢性 C 型肝炎、アルコール性肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者において病態を改善する報告がある。一方、瀉血は NAFLD の病態を改善しないとする別の報告もある。このように、CLD における鉄過剰の役割には不明点が多い。

げっ歯類を用いた化学物質誘発肝障害モデルは、肝疾患の病態プロセスの理解に有用と考えられる。種々のげっ歯類モデルの研究から鉄過剰が肝毒性に対する感受性を変化させることが示されており、例えばチオアセトアミド (TAA) 誘発肝障害では鉄過剰による肝障害の増悪と減弱の二面性が報告されており、肝障害における鉄過剰の病理学的役割に関する詳細な研究が必要である。TAA と四塩化炭素 (CCl₄) は肝臓の研究において広く利用される肝毒性物質であり、その傷害メカニズムも比較的良好に知られている。本研究では、2 種の肝毒性物質誘発肝障害モデルの比較により、鉄過剰が急性肝障害に及ぼす影響を詳細に解明することを目的とした。

また、当研究室の食餌性鉄過剰モデルラットを用いた一連の研究の中で、一部のラットで予期せぬ出血傾向に遭遇した。出血は血中鉄濃度を低下させるため、肝毒性の感受性を変化させる交絡因子となる可能性がある。この出血傾向の原因やメカニズムを解明することは、安定した食餌性鉄過剰モデルを確立するために重要である。

本研究では、第1章においてビタミンK添加量の少ない高鉄含有食を給餌したラットを用いて、出血傾向のメカニズムを検討した。さらに、飼料中へのビタミンKの添加が出血傾向に与える影響を検討し、出血のない安定した食餌性鉄過剰モデルラットの確立を試みた。第2章では、確立した食餌性鉄過剰モデルラットを用いて、TAAおよびCCl₄による急性肝障害に対する肝鉄過剰の影響について検討した。第3章では、本研究で得られた知見について、包括的な考察を行った。

第1章 鉄過剰モデルラットの出血傾向の解析

第1節 鉄過剰モデルラットにおける出血傾向の特徴

鉄過剰モデルラットにおける出血傾向の特徴を解析した。6週齢のF344ラットに低ビタミンK添加高鉄含有食（ビタミンK₁ 18.2 µg/100 g diet, AIN-76相当；鉄1% [クエン酸第二鉄6%]）を4週間給餌し、出血関連変化の評価を行った。高鉄食給餌群では、血清鉄の増加、トランスフェリンの飽和、MCV（平均赤血球容積）、MCH（平均赤血球ヘモグロビン量）、ヘモグロビン濃度（HGB）の増加を認めた。凝固関連パラメータでは、APTT（活性化部分トロンボプラスチン時間）およびPT（プロトロンビン時間）の延長、ビタミンK依存性凝固因子IIおよびVII活性の低下が認められたが、血小板数およびビタミンK非依存性凝固因子VIII活性は変化が認められなかった。高鉄食給餌群のうち出血を伴う個体では、上述の変化に加えて、出血に起因すると考えられる赤血球数とトランスフェリン飽和度の低下を認めた。以上より、潜在的な食餌性ビタミンK不足に対して食餌性鉄過剰が併存することで、ビタミンK依存性凝固因子の活性低下を伴う出血傾向をラットに引き起こすことが示された。

第2節 ビタミンK添加による凝固因子活性および出血頻度に対する影響

第1節で出血にビタミンK不足が関与している可能性が示されたことから、飼料へのビタミンK添加による凝固因子活性や出血頻度に対する影響を解析した。6週齢のF344ラットに高ビタミンK添加高鉄含有食（ビタミンK₁ 88.2 µg/100 g diet, AIN-93M相当；鉄0.8%もしくは1% [クエン酸第二鉄4.7%もしくは6%]）を4週間給餌したところ、高ビタミンK添加高鉄含有食給餌ラットにおいて、鉄濃度依存的な血清鉄、トランスフェリン飽和度の増加、および凝固因子IIおよびVII活性の低下が認められたが、凝固因子VIII活性の変化は認められなかった。

また、6週齢のF344ラットに低もしくは高ビタミンK添加高鉄含有食を給餌した一連の試験において、給餌開始後4週以内の出血もしくは出血関連死の発現頻度を集計した。低ビタミンK添加高鉄含有食では、鉄濃度0%、0.02%、0.5%、0.8%、および1%群での出血/死亡頻度は0%、0%、0%、8.6%、および16.9%であった。一方、高ビタミンK添加高鉄含有食では、鉄濃度0.02%、0.8%、および1%群で出血/死亡頻度はすべて0%であった。出血は血中の鉄の喪失により鉄過剰状態に影響するが、栄養学的に十分量のビタミンK添加により出血が認められなくなったことから、高ビタミンK添加高鉄含有食を給餌したラットはより安定的な鉄過剰モデルであると考えられた。

第2章 TAA および CCl₄誘発急性肝障害モデルラットにおける鉄過剰の役割

第1節 鉄過剰による TAA および CCl₄誘発急性肝障害の修飾作用

鉄過剰による肝障害の病理学的役割を検証するために、第1章で確立した食餌性鉄過剰モデルを用いて、TAA および CCl₄ 誘発急性肝障害における鉄過剰の影響を解析した。6週齢のF344ラットに正常食 (Cont) , 0.8% (0.8% Fe) または1%高鉄含有食 (1% Fe) を4週間給餌後、Saline (i.p.) , TAA (100 mg/kg, i.p.) または CCl₄ (0.75 mL/kg, p.o.) を単回投与し、24時間後に採材した。Cont群では、TAA または CCl₄投与後、血清肝酵素値の増加を認められた。CCl₄+0.8% Fe, TAA+0.8% Fe および TAA+1% Fe 群では、CCl₄+Cont 群もしくは TAA+Cont 群と比較して、肝酵素値のさらなる増加を示した。病理所見の形態解析の結果、Saline 群と比較して、TAA 群における肝細胞壊死面積の増加、CCl₄群における肝細胞壊死、変性、空胞化、小滴性脂肪化の増加が認められた。さらに、CCl₄群において、0.8%および1% Fe 群では、Cont 群と比較して肝細胞変性面積が増加するが、小滴性脂肪化面積は逆に減少した。この CCl₄群における肝細胞変性面積は、1% Fe 群よりも0.8% Fe 群で大きかった。以上より、食餌性鉄過剰は TAA および CCl₄による急性肝障害を増悪するとともに、形態学的異常も変化させることが示された。

第2節 鉄過剰による TAA および CCl₄誘発急性肝障害増悪作用のメカニズム

鉄過剰による急性肝障害増悪に DNA 傷害の増強が寄与しているかを明らかにするため、DNA 傷害マーカーである γ H2AX の免疫染色を実施した。 γ H2AX 陽性肝細胞の割合は、TAA および CCl₄ 投与後、Cont 群と比較して0.8%および1%Fe 群でいずれも増加し、血清 ALT 値と正の相関を示した。よって、DNA 傷害は両モデルの肝細胞傷害の主たる要因であり、鉄過剰による肝細胞傷害の増悪にも強く関与することが示された。

鉄過剰による急性肝障害の増悪に、NF-E2-related factor 2 (Nrf2) によるストレス応答が関連しているかを明らかにするため、Nrf2 の標的分子である抗酸化酵素 NQO1 の免疫染色を実施した。Saline+0.8%Fe 群および TAA+Cont 群と比較して、TAA+0.8%Fe 群で NQO1 陽性領域の増加が認められた。すなわち、食餌性鉄過剰ラットの TAA 投与後の肝病変部内では、抗酸化酵素 NQO1 の発現が増加することが示された。

鉄過剰による急性肝障害増悪に酸化ストレスが関与しているかを明らかにするため、酸化ストレスマーカーの評価を行った。TAA 投与により、組織の酸化還元状態の指標である肝マロンジアルデヒド (MDA) 量または肝 GSSG/GSH (酸化型/還元型グルタチオン) 比は変化しなかった。一方、CCl₄投与により肝 MDA 量および肝 GSSG/GSH 比が増加し、特に0.8% Fe 群では Saline 群と比べて肝 MDA 量の増加が顕著に認められた。組織学的な肝細胞変性面積と同様に、肝 MDA 量は CCl₄+1% Fe 群よりも CCl₄+0.8% Fe 群で高かった。以上より、食餌性鉄過剰は TAA 投与後の酸化還元状態には影響しないが、CCl₄投与後の肝臓を酸化的に変化させ、酸化ストレスを増悪することが示された。

第3章 鉄過剰による凝固系および急性肝障害の修飾作用に関する総合考察

本研究により、高鉄含有食における出血傾向は鉄過剰と潜在的な食餌性ビタミンK不足の組み合わせによって誘発されるビタミンK依存性凝固因子の活性低下が原因と示されたが、これには凝固因子II, VII, IX, X, XIおよびXIIの活性化体であるセリンプロテアーゼの鉄過剰による活性阻害が関与している可能性が考えられる。

鉄過剰による CCl₄ 誘発肝障害の増悪が 0.8% Fe 群の方が 1% Fe 群よりも強かった点に関するメカニズムは不明であるが、0.8% Fe 群と比べて 1% Fe 群で Nrf2 系などのストレス応答がより強く働いた結果、肝毒性が 1% Fe 群で減弱した可能性が考えられる。ただし、本モデルでは NQO1 の発現変動を認めなかったことから、他の Nrf2 ターゲット分子の関与などを検討する必要がある。

総括

本研究から、以下の結論を得た。

1. 鉄過剰と潜在的な食餌性ビタミン K 不足が併存することで、ビタミン K 依存性凝固因子の活性低下に起因した出血がラットに誘発される。
2. 栄養学的に十分量のビタミン K の飼料への添加は、鉄過剰による出血を抑制するが、ビタミン K 依存性凝固因子の活性低下を完全には回復させない。
3. 鉄過剰は、DNA 傷害の増大により TAA および CCl₄ 誘発急性肝障害を増悪させるが、その修飾メカニズムは両化合物で異なる。すなわち、TAA 誘発肝障害では酸化ストレスの関与を伴わず、CCl₄ 誘発肝障害では酸化ストレスの亢進を介する。
4. 鉄過剰による CCl₄ 誘発肝障害の増悪は、飼料中铁濃度に依存しない。そのメカニズムは不明であるが、Nrf2 系の活性化による肝障害の軽減が可能性として考えられる。
5. 本研究で確立した鉄過剰ラットモデルは、肝障害や出血を伴わずに全身性および肝鉄過剰を誘発できることから、肝障害における鉄過剰の病態修飾機構の研究に有用と考えられる。

審査結果の要旨

薬物性肝障害は医薬品の開発中止や市場撤回の主な要因であり、慢性肝疾患の罹患など患者の環境要因が発症に影響を与えると考えられる。鉄は生体内の重要な生化学プロセスに関与し、肝臓はペプチドホルモンであるヘプシジンの産生を介して、鉄の恒常性維持を担う。ウイルス性肝炎などの慢性肝疾患では、ヘプシジンの産生低下により、1/3 以上の患者に肝鉄過剰症が認められる。過剰鉄の沈着は酸化ストレス性細胞傷害をもたらすことから、肝鉄過剰症は薬物性肝障害の病態増悪要因となり得る。

げっ歯類を用いた化合物誘発肝障害モデルは、薬物性肝障害の病態プロセスの理解に有用である。実験的鉄過剰により肝毒性の感受性が変化することが報告されるが、そのメカニズムは不明である。本研究では、チオアセトアミド (TAA) と四塩化炭素 (CCl₄) の 2 種の肝毒性物質を用いて、鉄過剰が化合物誘発急性肝障害に及ぼす影響を解析した。また、申請者が実験に用いる食餌性鉄過剰モデルラットの一部で予期せぬ出血傾向が発生した。出血は血中铁濃度を低下させるため、肝毒性感受性を変化させる交絡因子となり得ることから、本研究では鉄過剰モデルラットにおける出血のメカニズムの解明ならびに出血を抑制できるモデル動物の確立を試みた。

第1章では、食餌性鉄過剰モデルラットの出血傾向の原因を解析し、モデル動物の改良を図った。低ビタミンK添加高鉄含有食（ビタミンK₁ 0.18 ppm; 鉄1%）の4週間給餌により、血液凝固系の活性化部分トロンボプラスチン時間およびプロトロンビン時間の延長、ビタミンK依存性凝固因子IIおよびVII活性の低下が認められた。血小板数やビタミンK非依存性凝固因子VIIIの活性は変化しないことから、潜在的な食餌性ビタミンK不足に食餌性鉄過剰が併存することで、ラットに出血傾向を引き起こすことが示された。また、高ビタミンK添加高鉄含有食（ビタミンK₁ 0.88 ppm; 鉄0.8%もしくは1%）を4週間給餌したところ、鉄過剰によるビタミンK依存性凝固因子の活性低下は改善されないが、出血は完全に抑制された。よって、栄養学的に十分量のビタミンK補充により、出血リスクを排除した安定的な鉄過剰モデルラットを確立することができた。

第2章では、第1章で確立したモデルラットを用いて、化合物誘発急性肝障害における鉄過剰の影響を解析した。正常食（鉄0.02%）給餌と比べて、0.8%および1%高鉄含有食の4週間給餌により、TAA投与1日後の血清肝逸脱酵素（ALT）の上昇と肝細胞壊死の増加、およびCCl₄投与1日後の血清ALTの上昇と肝細胞変性の増加・肝細胞脂肪化の減少がみられ、鉄過剰はTAAおよびCCl₄投与による急性肝障害を増悪するとともに、形態学的異常も変化させることが示された。また、TAAモデルでは、鉄過剰により酸化ストレスの指標である肝マロンジアルデヒド含有量や酸化型/還元型グルタチオン比は変化せず、一方でDNA傷害マーカーの γ H2AX陽性肝細胞数と抗酸化酵素NQO1の免疫反応性が増加した。CCl₄モデルでは、鉄過剰により肝マロンジアルデヒド含有量、酸化型/還元型グルタチオン比、 γ H2AX陽性肝細胞が増加した。よって、鉄過剰はTAA投与後の酸化還元状態には影響しないが、CCl₄投与後の肝臓を酸化的に変化させ、脂質過酸化や酸化ストレスを増悪することが示された。

第3章では、鉄過剰による凝固系および急性肝障害の修飾作用に関する総合考察を行った。本研究で十分量のビタミンKを補充しても鉄過剰ラットの凝固因子活性の低下が改善しなかった原因として、鉄過剰自体による凝固因子II, VII, IX, X, XIおよびXIIの活性化体であるセリンプロテアーゼ活性阻害の関与が考えられる。また、酸化ストレスの亢進を欠くTAAモデルラットにおいて、鉄過剰により肝細胞のDNA傷害と抗酸化応答が増加したメカニズムとして、TAAの活性代謝物である親電子物質（TASO₂）由来のストレスが関わる可能性が考えられる。CCl₄モデルラットにおいて、鉄過剰により肝細胞の変性が増加し、一方で脂肪化が減少するメカニズムとして、鉄過剰に起因するヘモグロビン濃度の増加によってCCl₄の活性代謝物かつ脂肪化の原因代謝物であるトリクロロメチルラジカルの生成量が減少した可能性が考えられる。

本研究では、食餌性鉄過剰モデルラットで観察された出血性素因の原因を明らかにし、出血を抑制できる安定した実験モデルを確立した。また、そのモデルを用いて化学物質による急性肝障害に対する鉄過剰の病態修飾作用を解析した。今回得られた成果は、鉄過剰による肝毒性の修飾機序や病理学的変化が化学物質によって大きく異なることを明らかにし、基礎獣医学ならびに基礎医学の発展・展開に貢献するものと考えられる。従って、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。