

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	アドリンダ
学位論文題目			
Hepatic nerve growth factor induced by iron overload triggers defenestration in liver sinusoidal endothelial cells 鉄により誘導される肝由来神経増殖因子は肝類洞内皮細胞の篩状構造を欠失させる			
共著者名			
田中宏樹、山本昌代、土岐康通、伊藤 巧、生田克哉、佐々木勝則、大竹孝明、鳥本悦宏、藤谷幹浩、高後 裕			
Biochim Biophys Acta. 2015 Jan;1852(1):175-83.			
研究目的			
<p>肝組織は生体にとって必須金属である鉄の重要な貯蔵器官であり、さらにヘプシジンの分泌等により体内の鉄動態を調節する働きを担っているが、過剰な鉄は肝臓に対し毒性を示し肝硬変や肝癌の発症を引き起こす。こうした肝発癌過程や肝再生において、肝細胞での神経増殖因子 (NGF: Nerve growth factor) の発現が亢進することが報告されてきたが、NGFの肝組織における機能は明らかとなっていない<sup>1) 2)</sup>。一方、肝臓の肝類洞内皮細胞に存在する篩状構造は、血中成分と肝組織内の物質交換において重要な役割を担い、さらにこの篩状構造は肝毒性を示す化合物や活性酸素種に反応し構造を変化させることが知られている<sup>3)</sup>。以上を踏まえ、今回我々は、鉄過剰に対して生体がNGF発現や肝類洞内皮細胞を変化させ対応している可能性に着目し、検討を行った。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p>1. 鉄過剰モデルマウスの作成 C57B1/6雄マウスに、2.5 % (w/w) のカルボニル鉄食を8週間与えたマウス (Fe diet群) と、鉄デキストラン10 mg iron/dayを5日間腹腔内投与したマウス (Fe dextran群) の2種類の鉄過剰モデルマウスを作成した。また、通常食を8週間与えたマウスを対照群とし、各群n=5とした。処理後に屠殺し、血清および肝組織を採取した。肝組織からは蛋白とRNAを抽出し、一部はホルマリン固定した。</p> <p>2. NGF投与マウスの作成 C57B1/6雄マウスにマウスリコンビナントNGF 1 µg/dayを3日間腹腔内投与した。投与後屠殺し、肝組織を採取した。肝組織から蛋白とRNAを抽出し、一部はホルマリン固定した。</p> <p>3. 血清鉄マーカーの解析 2種類の鉄過剰モデルマウスと対照群マウスの血清を用いて、血清鉄および不飽和鉄結合能 (UIBC; unsaturated iron binding capacity) を測定した。</p> <p>4. 肝組織学的検討 2種類の鉄過剰モデルマウスと対照群の肝組織をホルマリンで固定した後薄切し、ヘマトキシリンエオジン染色とベルリンブルー染色 (鉄染色) を行い、肝組織内の鉄沈着について検討した。</p>			

## 5. Western blotting

2種類の鉄過剰モデルマウスと対照群マウスの肝組織から採取した蛋白をニトロセルロース膜に転写し、各種一次抗体（抗NGF抗体、抗HGF抗体、抗VEGF抗体、抗TrkA抗体）を反応させた。その後、二次抗体と反応させ、SuperSignal West Picoを用いて発色させた。アクチンの発現量を内部コントロールとして蛋白発現量を検討した。

## 6. Digital PCR法

2種類の鉄過剰モデルマウスと対照群マウスの肝組織から採取したRNAからcDNAを作成し、TaqManプローブを用いNgfのmRNA発現解析をQuantStudio 3D Digital PCR system (Life technologies) を用いて行った。

## 7. 初代培養肝細胞の採取及びNGF発現解析

通常食を8週間与えたマウスの肝細胞から、コラゲナーゼ還流法によりマウス肝細胞と肝類洞内皮細胞を分離した。肝細胞培養液中にホロトランスフェリン (3 mg/mlおよび5 mg/ml)、クエン酸鉄アンモニウム (1  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ M) を添加後、NGFの発現を各細胞の免疫染色の検鏡と、蛋白を抽出しWestern blotting法を用いて検討した。

## 8. 走査型電子顕微鏡による肝組織および肝類洞内皮細胞における篩状構造の解析

2種類の鉄過剰モデルマウス、対照群マウス、NGF投与マウスの肝組織を走査型電子顕微鏡で観察し、篩状構造の変化を解析した。次に、マウス肝類洞内皮細胞培養上清中に、マウスリコンビナントNGF (5 ng/ml)、NGF中和抗体 (1  $\mu$ g/ml)、NGF受容体 (TrkA ; Tropomyosin receptor kinase A) 抑制剤 (5 ng/ml) を加えて培養し、走査型電子顕微鏡で観察し篩状構造の解析を行った。最後に、対照群マウスから分離したマウス初代培養肝細胞を鉄過剰下で培養して培養上清を採取した。採取した培養上清をマウス肝類洞内皮細胞培養液中に添加し、さらにNGF中和抗体、あるいはTrkA抑制剤を添加し、対照群も含めた3群を走査型電子顕微鏡で観察し篩状構造を解析した。

## 9. 統計処理

統計処理はStudent T-testを用い、 $p < 0.05$ を有意差有りと判断した。

## 成 績

### 1. 鉄過剰モデルマウスにおける鉄動態及びNGFの変化

血清鉄濃度はFe diet群、Fe dextran群いずれも対照群より有意に増加していたが、増加の程度はFe dextran群のほうが高かった。血清UIBCはFe diet群は対照群と有意差はなかったが、Fe dextran群では有意に低下していた。肝組織のベルリンブルー染色では、Fe diet群は門脈域周囲に軽度の鉄沈着を認めるのみであった。一方で、Fe dextran群ではびまん性に肝細胞への高度の鉄沈着を認めた。

Western blotting法で蛋白レベルでのNGF発現量の変化を検討したところ、Fe diet群とFe dextran群いずれも対照群よりもNGF発現が亢進していた。Digital PCR法で検討したmRNAレベルでのNgf発現は、Fe diet群とFe dextran群のいずれもNgfは亢進していた。肝組織の抗NGF抗体を用いた免疫染色では、Fe diet群・Fe dextran群いずれも肝細胞質内で陽性となっており、肝細胞内にNGFが存在していると考えられた。

### 2. マウス初代培養肝細胞を用いた鉄過剰によるNGFの変化

マウス初代培養肝細胞にトランスフェリンまたはクエン酸鉄アンモニウムを負荷した鉄過剰状態では、いずれも免疫染色でNGF発現が亢進していた。Western blotting法を用いた検討で、蛋白レベルでもいずれもNGF発現が亢進していた。

### 3. NGF受容体の発現解析

NGF受容体であるTrkA発現について検討した。鉄過剰モデルマウスから採取した肝組織を用いた免疫染色では、いずれの群でも類洞内皮にTrkAが発現しており、Fe diet群およびFe dextran群では対照群よりも発現が亢進していた。Western blotting法での検討では、マウス初代培養肝細胞ではTrkAは発現していなかったが、マウス肝類洞内皮細胞では発現していた。以上から、TrkAは肝内では肝細胞ではなく類洞内皮細胞で発現していると示唆された。

### 4. 走査型電子顕微鏡を用いた鉄過剰およびNGF負荷による肝篩状構造の解析

#### (1) マウス肝組織での検討

マウス肝組織内における類洞構造を観察するとFe diet群とFe dextran群ではいずれも

篩状構造の欠失を認め、さらにこの現象は腹腔内にマウスリコンビナントNGFを注射したマウスにも観察された。

#### (2) マウス肝類洞内皮細胞を用いた検討

まず、マウス肝類洞内皮細胞にNGFを負荷したところ篩状構造の欠失を認めたが、NGFに加えNGF中和抗体、あるいはTrkA阻害剤を負荷すると篩状構造は変化しなかった。次に、マウス肝類洞内皮細胞にトランスフェリンやクエン酸鉄アンモニウムを負荷したが篩状構造は変化しなかった。さらに、マウス初代肝細胞を鉄過剰条件下で培養し、その培養上清を用いてマウス肝類洞内皮細胞を培養すると、篩状構造の欠失を認めた。また、この現象は同培養上清に抗NGF中和抗体あるいはTrkA阻害剤を加えて培養すると抑制された。以上から、鉄そのものが直接篩状構造を変化させるのではなく、鉄過剰により肝細胞から分泌されたNGFが肝類洞内皮細胞に作用し篩状構造の欠失が起こるものと推察された。

### 考 案

肝組織における過剰な鉄は活性酸素種を発生させ、肝障害を促進する。本研究から過剰の鉄は直接的に肝類洞細胞に影響を与えるのではなく、肝細胞に鉄が蓄積すると肝細胞からのNGFの分泌が促進され、肝類洞内皮細胞に発現するTrkAを介して篩状構造を欠失させると考えられた。肝類洞における篩状構造は血中成分と肝組織内の物質交換を調節することが知られていることから、鉄過剰環境下における肝細胞からのNGFの発現亢進、肝類洞内皮細胞における篩状構造の欠失は、肝組織の過剰の鉄に対する防御機構の一つであることが示唆された。

### 結 論

鉄により誘導される肝由来神経増殖因子は肝類洞内皮細胞の篩状構造を欠失させ、そのことが過剰の鉄に対する防御機構として働くと考えられる。




## 引用文献

1. Kishibe K., Yamada Y., Ogawa K. (2002). Production of nerve growth factor by mouse hepatocellular carcinoma cells and expression of TrkA in tumor-associated arteries in mice. *Gastroenterology*. 122, 1978-1986.
2. Oakley F., Trim N., Constandinou C.M., et al. (2003). Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis. *Am. J. Pathol.* 163, 1849-1858.
3. Wisse E., De Zanger R. B., Charels K., et al. (1985). The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology*. 5, 683-692.

## 参考文献

1. Ito S, Ikuta K, Kato D, Shibusa K, Niizeki N, Tanaka H, Addo L, Toki Y, Hatayama M, Inamura J, Shindo M, Sasaki K, Iizuka N, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. Non-transferrin-bound iron assay system utilizing a conventional automated analyzer. *Clin Chim Acta*. 2014 Nov 1;437:129-35.
2. Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, Shindo M, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. Upregulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon  $\alpha$ . *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Feb;29(2):387-94.
3. Shindo M, Ikuta K, Addo L, Ito S, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. Successful Control of Disseminated Intravascular Coagulation by Recombinant Thrombomodulin during Arsenic Trioxide Treatment in Relapsed Patient with Acute Promyelocytic Leukemia. *Case Rep Hematol*. 2012;2012:908196.
4. Tanaka H, Li Z, Ikuta K, Addo L, Akutsu H, Nakamura M, Sasaki K, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Glass J, Kohgo Y. Iron facilitator LS081 reduces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein and functions as anticancer agent in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2012 Apr;103(4):767-74.

## 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	Lynda Addo
<p>審査委員長 西川 祐司 </p> <p>審査委員 谷口 隆信 </p> <p>審査委員 古川 博之 </p>			
学位論文題目			
<p>Hepatic nerve growth factor induced by iron overload triggers defenestration in liver sinusoidal endothelial cells</p> <p>(鉄により誘導される肝由来神経増殖因子は肝類洞内皮細胞の篩状構造を欠失させる)</p>			
<p>肝は生体内の重要な鉄貯蔵器官であるが、鉄過剰状態において様々な影響を受ける。実際に鉄過剰は主として酸化ストレスを介して肝細胞を傷害し、慢性肝疾患や肝細胞癌などの発症に関わっていることが知られている。しかし、鉄過剰状態において肝細胞と肝細胞以外の細胞、すなわち非実質細胞、の間にどのような相互作用が起こるのかについては不明である。本研究は、鉄過剰が肝細胞からの神経増殖因子 (NGF) の放出を促し、これが類洞内皮細胞に作用することで篩状構造を消失させるという新たな知見を報告している。</p> <p>肝再生や肝発癌過程において肝細胞がNGFを発現することが複数のグループにより報告されているが、本研究ではマウスの2種類の鉄過剰モデルにおいて肝細胞におけるNGFのmRNA、蛋白レベルが亢進することが見出された。また、培養マウス肝細胞を用いた実験でも鉄負荷により肝細胞がNGF蛋白を発現することが確認された。次に、申請者らは肝細胞が放出するNGFが肝にどのような影響を与えるかを、NGFに対する</p>			

高親和性受容体 **TrkA** を発現する類洞内皮細胞に注目して調べた。

その結果、興味深いことに、走査電子顕微鏡での観察で、正常の類洞内皮細胞で認められ、肝での内皮細胞の機能に重要な意義を持つ篩状構造が、鉄過剰もしくは NGF 腹腔内投与により減少することが明らかになった。この構造の減少は培養類洞内皮細胞に NGF を作用させた場合にもみられた。篩状構造は鉄を直接作用させた場合には変化しなかったが、鉄を添加した肝細胞培養上清により減少し、その効果は NGF 中和抗体、**TrkA** 阻害剤により抑制された。以上より、鉄負荷で肝細胞から分泌される NGF が類洞内皮細胞に作用し、篩状構造を減少させることが明らかになった。

鉄過剰状態において、NGF を介した類洞内皮細胞の篩状構造の制御がどのような病態生理学的な意義を持つかは不明であるが、本研究は、肝細胞と非実質細胞のまったく新しい相互作用を見出したものであり、独創的である。

申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な回答が寄せられた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は申請者の努力の結果であり、肝臓病学分野において学術的にも十分貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。