博士論文（要約）

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）

旭川医科大学大学院医学系研究科　医学専攻

アド　リンダ

（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）

【研究目的】

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、さらに鉄代謝調節因子ヘプシジンの分泌等により体内の鉄動態全体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おこす。こうした肝発癌過程や肝再生において、肝細胞において神経増殖因子（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[1, 2]。

一方、肝臓の肝類洞内皮細胞に存在する篩状構造は、血液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報告されている[3]。

これらの背景を踏まえ、肝細胞 NGF および肝類洞内皮細胞を介した鉄過剰に対する生体防御メカニズムを明らかにする目的で検討を行った。

【研究の方法・材料】

1. 鉄過剰モデルマウスの作成

C57Bl/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た。各群は 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、一部はホルマリンで固定した。

2. NGF 投与マウスの作成

C57Bl/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、一部はホルマリンで固定した。

3. 血清鉄代謝マーカーの解析

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。

4. 肝組織切片の組織学学的検討

2 種類の鉄過剰モデルマウス（Fe diet 群および Fe dextran 群）と対照群の肝組織をホルマリン固定後に薄切し、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。

5. Western blotting

2 種類の鉄過剰モデルマウス（Fe diet 群および Fe dextran 群）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（Thermo Scientific 社）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比較検討した。

6. Digital PCR 法

2 種類の鉄過剰モデルマウス（Fe diet 群および Fe dextran 群）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 社）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臓から、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 µM および 5 µM）を添加して培養し、NGF の発現について各細胞の免疫染色と、Western blotting 法により検討した。

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（Fe diet 群および Fe dextran 群）、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。また、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 μg/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。次に、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、その培養上清をマウス肝類洞内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の変化を解析した。

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。

【結果】

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 群ではび漫性に肝細胞への高度の鉄沈着を認めた。

蛋白レベルでの NGF 発現量の変化を Western blotting 法で検討したところ、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 群のいずれも対照群より亢進していた。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

ムを負荷して鉄過剰状態としたところ、いずれも免疫染色で NGF 発現の亢進が確認された。Western blotting 法を用いた蛋白レベルでの検討でも、いずれにおいても NGF 発現が亢進していた。

3. NGF 受容体の発現解析

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 NGF 受容体である 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ことが考えられた。

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 を投与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。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。以上の結果から、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考えられた。

【考察】

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。本研究の結果から、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ことが判明した。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。

【結語】

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

【引用文献】

1. Kishibe K., Yamada Y., Ogawa K. Production of nerve growth factor by mouse hepatocellular carcinoma cells and expression of TrkA in tumor-associated arteries in mice. Gastroenterology. 2002; 122: 1978-1986.

2. Oakley F., Trim N., Constandinou C.M., et al. Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis. Am J Pathol. 2003; 163: 1849-1858.

3. Wisse E., De Zanger R. B., Charels K., et al. The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. Hepatology. 1985; 5: 683-692.