

主論文の要旨

**Copper Accumulates in Hemosiderins in Livers of
Patients with Iron Overload Syndromes**

〔 銅は鉄過剰症候群患者の肝臓内のヘモジデリンに蓄積する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：後藤 秀実 教授)

小野 幸矢

【緒言】

鉄代謝による酸化還元反応は、生体には不可欠だが時に有害であるため、銅蛋白により厳密に調節されている。肝臓は鉄のホメオスタシスを維持するために重要であり、肝細胞は体内の鉄の主な貯蔵部位である。過剰な鉄はまずフェリチン分子として、その後それらが重合し、リソソームにおいてヘモジデリンという形で貯蔵される。また肝臓は銅のホメオスタシスにとっても重要な役割を果たす。銅は肝臓においてマルチ銅オキシダーゼや銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼなどの銅蛋白質を合成するために利用される。肝細胞のリソソーム高密度小体は様々な起源の鉄や銅を貯蔵し、特定の酸性化システムを通じて必要な場合にそれらを放出する。鉄や銅などの遷移元素を貯蔵することに加えて、リソソーム高密度小体は微量元素のホメオスタシスを維持するための中心的な細胞小器官である可能性がある。鉄誘発性酸化ストレスは、活性酸素種を介して細胞膜や細胞小器官を損傷し、細胞内酸化還元状態は、ミトコンドリアや他の反応性の高い鉄含有細胞内小器官において銅蛋白質により厳密に調節されている。今日まで、鉄過剰症患者の肝臓内の銅の貯蔵・リサイクルシステムの変化に関して、詳細な検討は行われていない。エネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX) を備えた透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた微量分析は、光学顕微鏡を用いた組織化学分析よりも鉄や銅を可視化するのにより有用であると考えられる。本研究では、TEM-EDX を用いて、銅代謝の鉄過剰症候群での変化を検討した。

【対象および方法】

本研究では 11 名の鉄過剰症患者を対象とした (表 1)。11 名の臨床診断は、無セルロプラスミン血症 (n=2)、ヘモクロマトーシス (n=5)、フェロポーチン病 (n=2)、及び過剰な静脈内鉄補給摂取 (n=2) であった。肝臓検体は細針生検又は外科的楔状生検により採取し、光学顕微鏡と X 線分析装置を装備した透過型電子顕微鏡を用いて解析した。光学顕微鏡では、肝臓検体を 10% 中性ホルマリン溶液で固定し、標準的な組織学的解析用のパラフィンブロックに包埋した。ベルリンブルー染色を用いて鉄を検出し、ロダン酸を用いて銅を検出した。透過型電子顕微鏡では、1 mm³ の肝臓検体の 2 片を 0.1 M リン酸緩衝液で希釈した 2% グルタルアルデヒド溶液で固定し、その後エポキシ樹脂 TAAB812 に包埋し、ウラニル溶液で染色し、超薄切した切片をゴールドグリッド上にマウントし、TEM (JEOL-1400) を用いて検討した。TEM-EDX (JEM-2010) では EDS スペクトルを測定し、微量元素の有無を解析した。鉄の蓄積は 3 段階に分類し、ほとんどの高密度小体に大量の鉄が認められる場合を Fe(+3)、中等度の鉄が認められる場合を Fe(+2)、少量の鉄が認められる場合を Fe(+1) として表した。銅については、高密度小体の 10% 以上が銅 K・ピーク陽性の場合を Cu(+), 高密度小体の 10% 未満が陽性の場合を Cu(+/-)、銅 K・ピークが観察されない場合を (-) とした。TEM-EDX (EM-2800) により高密度小体が豊富に存在する細胞質を 480 秒間スキャンする事により、鉄及び他の元素の 2 次元分布をマッピングした。臨床的特徴に基づいて、全ての患者を対象として遺伝的背景を調査した。HFE、TFR2、HAMP、HJV、SLC40A1、CP 遺伝子を対象とした。

末梢血細胞から DNA を抽出し、各遺伝子のコード領域とスプライシング部位をポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、その増幅産物の配列を決定した。

【結果】

肝組織像は、ほぼ正常なものから肝硬変にまで及んだ。全 11 人の患者の肝細胞や細網内皮細胞内のほぼすべての顆粒が鉄陽性であった。静脈内鉄補給を受ける 1 名の患者や 2 名の無セルロプラスミン血症患者で鉄沈着が肝実質内選択的に、5 名のヘマクロマトーシス患者では肝実質内優位に、鉄補給を受ける 1 名の患者や 2 名のフェロポーチン病患者では実質と細網内皮細胞の両方で認められた(表 1)。鉄が大量に存在することが原因で全粒子の色が元々ブロンズ色であるため、ロダン酸による銅染色は評価が困難であった。TEM により観察された肝細胞の鉄に富む高密度小体の超微細構造は、異なる疾患患者でも類似していた。銅特有の X 線ピークが鉄の高いピークを持つ高密度小体に現れることから、銅が鉄を多く含む高密度小体と共存している事が示唆された。二次元画像化により、肝細胞やクッパー細胞の鉄に富むヘモジデリンには、酸素やリンと結合した大量の鉄に加えて、少量の銅や硫黄が含まれている事が分かった。二次元画像化により、肝細胞の多くの高密度小体が鉄、リン、酸素から構成され、これらの 3 つの元素は高密度小体マトリックス内で同様な分布パターンを示したが、リンのレベルはやや少なかった。鉄と銅の共局在化は限られた数の鉄に富む高密度小体で確認されたが、銅のレベルは比較的低かった (Fig1)。クッパー細胞と実質細胞で銅と鉄の共局在に違いは認められなかった。クッパー細胞の金属に富む小体の密度は、鉄と銅の含量が異なることに関係していた。鉄過剰症の診断/応答遺伝子名は、2 名の患者で aCP/CP、2 名で HH/HJV、3 名で HH/TFR2、さらに 1 名で FPN/SLC40A1 であった。フェロポーチン病の患者 1 名、静脈内鉄過剰の患者 2 名には、鉄過剰症に関連する変異は認められなかった。

【考察】

鉄過剰症を発症する 11 名の日本人患者の肝臓において、鉄と銅の相互作用を評価した。二次元画像化により、様々な症状の鉄過剰症を発症するすべての患者の肝臓の高電子密度小体において、大量の鉄と少量の銅の共存性が明らかになった。鉄はリンや酸素と共存していたことから、ヘモジデリンにおけるリン酸化-酸化鉄複合体の形成が示唆されたが、鉄に富むヘモジデリンで銅が硫黄と共存していた事から、銅成分が銅蛋白質から派生した事が示唆された。鉄に富むヘモジデリンのマトリックス内で、鉄錯体と銅蛋白質が均質に分布していた。以上の結果により、高度の鉄過剰がヘモジデリンにおける銅蛋白質の蓄積に関与する事が示唆された。鉄と銅の共存性は、慢性胆汁滞留症や末期肝疾患と関連する事が以前に報告されている。今回の対象患者のうち 2 名の無セルロプラスミン血症患者と 1 名の鉄過剰投与患者においては全く線維化がなかった事より、銅蓄積は慢性胆汁滞留症や肝硬変だけに起因しない可能性が示唆された。全てではないが一部の銅は、滞留以外の新たなメカニズムが原因でヘモジデ

リンに蓄積する可能性も考えられた。リソソームは鉄や銅など少量の遷移元素を生理的に貯蔵し、これらの元素を古い細胞小器官と新たな細胞小器官の入れ替えの際に再利用する。酸化還元状態がマルチ銅オキシダーゼや銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼを含む銅蛋白質により厳密に制御される事が知られているため、貯蔵された大量の鉄に加えて、鉄錯体、銅蛋白質のいずれの再利用も鉄過剰状態にある患者で活性化される可能性がある。微量元素のリサイクルプロセスで、余分な銅は生理的に胆汁中に分泌されると考えられているが、過剰鉄は分泌経路がないため、その存在量とは無関係に、鉄は肝細胞リソソームの高密度小体に貯蔵される。この事が鉄に富むヘモジデリンでは限られた量の銅しか存在しない事を説明するメカニズムである可能性がある。ヘモジデリン中の銅蛋白質の起源は依然ほとんど明らかになっていない。リソソーム内の銅沈着は胆汁への銅の生理的分泌が遮断されているウィルソン病や慢性胆汁滞留症において同定されている。今回の検討における鉄に富む高密度小体と銅蛋白質との共存の知見は、過剰鉄によって増強されるリソソームにおける銅蛋白質の産生が、銅代謝増強のインタフェースとして働くという新たなメカニズムの存在を強く示唆している。本研究で対象とした 11 名の患者はすべて日本人であり、HFE-HH を発症する白人は含まれなかった。

【結論】

今回の研究において、TEM-EDX による形態学的検討により、鉄に富む高密度小体と銅蛋白質は共存している可能性が明らかとなり、肝臓内における銅の新たな生体内における役割が示唆された。