

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08044

研究課題名(和文)ヘプシジンによる子牛の鉄代謝調節：ヘプシジン発現と活性調節機構の解明

研究課題名(英文)Role of hepcidin in iron metabolism in calves: regulatory expression of hepcidin

研究代表者

舟場 正幸 (Funaba, Masayuki)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40238655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヘプシジンは血中鉄濃度を負に制御する肝臓由来ホルモンである。本研究では、ウシにおける鉄栄養状態とヘプシジンの関係を検討した。黒毛和種子牛の血漿鉄濃度、血中ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値は1週齢から4週齢まで低値を示し、その後上昇したが、血漿中ヘプシジン、フェリチン濃度は1週齢以降変化しなかった。マウスやヒトにおいて、鉄増加はBMP6発現上昇を引き起こし、Smad1/Smad4を介してヘプシジン転写を促進する。ウシSmad4のヘプシジン転写能はマウスSmad4よりも低いこと、これは、両者のアミノ酸配列の相違では説明できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄恒常性は健康を維持する上で重要である。ヘプシジンは血中鉄濃度を負に制御する上で中心的に働くホルモンである。黒毛和種子牛は1週齢から4週齢まで貧血状態であったが、これはヘプシジンの過剰分泌が原因ではなかった。マウスやヒトでは鉄負荷によるヘプシジン転写はSmad1/Smad4を介して起こることが知られているが、ウシSmad4のヘプシジン転写能はマウスSmad4よりも低いこと、この原因として、両者のアミノ酸配列の相違では説明できないことが明らかになった。これらの基礎知見は、より健康な子牛飼養法の開発に寄与し得る。

研究成果の概要(英文)：Hepcidin is a liver-derived hormone that regulates plasma iron level negatively. The present study explored relationship between systemic iron status and bovine hepcidin. The levels of plasma iron, blood hemoglobin and hematocrit were lower in calves aged 1-4 weeks, and increased thereafter. In contrast, plasma levels of hepcidin and ferritin were relatively constant in calves, except for newborn calves that showed higher hepcidin and ferritin levels. Previous studies reveal that iron overload stimulates murine and human hepcidin transcription that is mediated by Smad1/Smad4 through induction of BMP6 gene. The present study revealed that transcriptional activity of bovine Smad4 was lower than that of murine Smad4, which could not be explained by differences of amino acid sequence between bovine Smad4 and murine Smad4.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：畜産学 栄養学 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 子牛が貧血に陥りやすいことは古くから知られている。子牛の貧血は、食欲不振ならびに体重増加の停滞、元気消失など多くの健康上の弊害を引き起こす。

(2) 一般に、体内で炎症が起こると貧血が惹起される(これは炎症性貧血と呼ばれている)が、最近の研究によると、貧血が炎症を引き起こすことも明らかにされている。とくに、慢性的な炎症は、様々な疾病の発症につながる。

(3) したがって、子牛を貧血から守ることは重要であり、動物生産上解決されるべき問題である。

(4) 哺乳子牛の貧血は、鉄欠乏性の貧血であると考えられている。日本飼養標準肉用牛(2008年版)によると、子牛の鉄要求量は100 mg/kg 乾物である一方、成牛は50 mg/kg 乾物である。

(5) ウシは、出生時において十分量の鉄を肝臓中に蓄積していると理解されている。子牛の鉄要求量が高いのは、体成長に伴って鉄要求量が増加するだけでなく、成長段階によって鉄の利用性が変化することに起因している可能性が考えられる。

(6) つまり、子牛は成牛に比べて鉄の利用性が低いのかかもしれない。実際、子牛に鉄を補給した飼料を給与しても鉄欠乏性貧血は改善されなかったとする報告(Arch Tierernahr, 30: 611. 1980)もあり、哺乳子牛では、鉄吸収が抑制されている可能性がある。

(7) 従来、鉄吸収は摂取する鉄の量や化学形態によってのみ決定されると信じられてきた。

(8) しかしながら、主としてマウスやヒトでの知見を基に、1. 肝臓中鉄濃度はBMP6によってモニターされ、2. 鉄濃度増加に伴って誘導されるBMP6が肝細胞においてヘプシジン遺伝子の転写を促進し、3. 分泌されたヘプシジンが小腸上皮細胞やマクロファージの細胞膜上に発現している鉄排出トランスポーターであるフェロポルチンの細胞内移行・分解を促進することを通して血中鉄濃度の増加を抑制すること、が明らかにされ、ヘプシジンが鉄吸収ならびに再利用の抑制因子として認識されるに至った。

(9) ヘプシジン分泌はヘプシジン転写の制御により調節されていることから、これまでヘプシジン転写制御に関する研究が活発に進められてきた。

(10) 現在、ヘプシジン転写は肝臓の鉄蓄積(によって誘導されるBMP)だけでなく、炎症によって惹起されるインターロイキン(IL)-6によっても促進されることが明らかにされている。

(11) このように、現在、ヒトやマウスの鉄代謝調節に関して、ヘプシジン軸を中心とした理解がなされている。

(12) 研究代表者らもヘプシジン遺伝子発現調節について研究を進めている。

(13) その過程でヘプシジン転写制御に関して種差があることを発見した；炎症性サイトカインであるIL-1によるヘプシジン発現誘導能は、従来知られてきたヘプシジン遺伝子の発現調節領域とは異なる領域を介して起こることを見出したが、この領域の役割はマウスとラット間で異なる。

(14) ヘプシジン発現制御に関して、マウスやヒトのヘプシジン遺伝子での解析がほとんどであり、これまでの知見が必ずしもウシヘプシジン発現制御機構に当てはまらないこと可能性もある。

(15) 実際、マウスやヒトのヘプシジン遺伝子の発現調節領域には、TPA(発がん誘導剤)に応答している配列が認められたが、同等の領域はウシヘプシジンには存在しない。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、仮説 鉄要求量が高い子牛は、ヘプシジン発現が低い筈だが、既知の機構では説明できない理由でヘプシジン発現が高いことにより、鉄吸収が抑制されている。したがって、子牛は鉄欠乏性貧血に陥りやすい。を検証することである。

(2) 具体的には、子牛の成長に伴う血漿ヘプシジン濃度、赤血球・鉄栄養状態指標の変化 ウシヘプシジン遺伝子発現を制御する転写因子やシグナル伝達経路、を明確にすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 子牛の成長に伴う血中鉄関連物質濃度変化を検討するため、京都大学農学研究科附属牧場で3-6産次の母牛から出生した黒毛和種子牛12頭を用い、出生24時間以内に頸静脈より採血を行った。その後、1, 2, 4週齢、2, 3, 4ヶ月齢にも採血し、血漿ヘプシジン、フェリチン、鉄濃度、ヘマトクリット値、血中ヘモグロビン濃度を測定した。また、併せて、乳中ならびに飼料中铁濃度も測定した。

(2) ウシヘプシジン転写は、ルシフェラーゼをレポーターとするレポーターアッセイで評価した。レポーターアッセイを行う細胞として、HepG2 ヒト肝臓由来細胞とSW480.7 ヒト大腸由来細胞を用い、ヘプシジン遺伝子上流をルシフェラーゼの翻訳領域の上流に連結させたレポーター遺伝子を構築した。ヘプシジン遺伝子転写は、鉄濃度に応じてBMP発現の変動を介して促進される。肝細胞において、BMPは受容体結合後、Smadを介してヘプシジン遺伝子の転写を促進すると理解されている。そこで、BMP受容体やSmadの発現ベクターも調製し、ヘプシジン転写に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 血漿鉄濃度ならびにヘマトクリット値は1週齢から4週齢にかけて基準値を下回る傾向を示した。また、血中ヘモグロビン濃度もこれらと同様の変化のパターンを示した。この結果は、この時期の子牛は貧血になりがちである可能性を示している。

(2) 一方、血漿ヘプシジン濃度は、出生24時間以内では高値を示し、それ以降はほぼ一定の値を示した。同様の経時変化は、血漿フェリチン濃度でも認められた。これらの結果は、この時期の鉄代謝調節は、必ずしもヘプシジンによって制御されているわけではないことを示唆している。

(3) また、乳中の鉄濃度は試験期間を通して変化せず、0.56 mg/L程度であった。一方、固形飼料に関して、人工乳が136 mg/kg、サイレージが41 mg/kg、チモシーが31 mg/kgであった。

(4) 上述のように、鉄栄養状態に応じたヘプシジン発現制御は、BMP6を介したSmad1/5経路によって行われていることが知られているので、初生子牛の鉄代謝調節にヘプシジンが関与していない理由の一つは、ウシのヘプシジン発現制御がマウスやヒトで理解されて説では説明できないと考え、ウシヘプシジンプロモーターとマウスヘプシジンプロモーターのBMPシグナルに対する応答性を評価したところ、ウシヘプシジン遺伝子転写の方が、マウスヘプシジン遺伝子転写に比べてBMP応答性は低かった。

(5) 先行研究で、マウスヘプシジンプロモーターは培地中の血清に反応して転写が促進されることが明らかになっており、その応答領域も知られている。プロモーターレポーターを遺伝子導入した細胞を血清処理したところ、ウシヘプシジンプロモーター遺伝子転写の方がマウスヘプシジンプロモーター転写に比べて低いことが判明した。血清応答領域の一つ(TPA応答配列)の遺伝子配列は、ウシとマウスで異なること、マウスでは典型的なTPA応答配列であるに対して、ウシでは変異型TPA応答配列として利用される配列であることが原因の一つと考えられた。

(6) ウシとマウスで推測される異なるヘプシジン発現制御は、ウシとマウスのSmadの転写因子としての機能に違いがあると考え、各動物のSmad発現ベクターを調製し、ヘプシジン転写を検討した。多くの系において、BMPによるSmad1/5を介した細胞内情報伝達にSmad4が必要なことが知られている。そこで、Smad4の発現ベクターも調製した。内因性Smadを発現するHepG2細胞において、Smad1を過剰発現させたところ、ウシSmad1であろうとマウスSmad1であろうとヘプシジン転写は同等に促進された。また、Smad4を単独発現、あるいはSmad1との共発現はヘプシジン転写に影響しなかった。

(7) HepG2において外因性のSmad4がヘプシジン転写を促進しなかった理由の一つとして、HepG2で発現する内因性のSmad4の影響を考えた。そこで、内因性Smad4を欠失しているヒト大腸由来細胞であるSW480.7細胞を用いて、ヘプシジン転写におけるSmad4の役割を検討した。その結果、Smad4を発現させない場合、Smad1誘導性のヘプシジン転写促進は認められない一方、Smad1発現下においてマウスSmad4を発現させるとヘプシジン転写が促進されることが明らかになり、ヘプシジン転写におけるSmad4の関与が示された。

(8) ヘプシジンプロモーターにはSmad1結合領域であり、機能的なBMP応答領域が少なくとも二箇所存在することが知られている。この領域を介して、Smad1/4が転写促進を引き起こしているかを検討するため、この領域の変異レポーターを構築し、検討したところ、両方の変異レポーター転写はSmad1/4誘導性のヘプシジン転写をほぼ完全に抑制し、Smad1/4がこのBMP応答領域を介してヘプシジン転写を促進していると考えられた。

(9) 一方、ウシ Smad4 を発現させた場合、マウス Smad4 を発現させた場合に比べてヘプシジン転写は明らかに抑制された。マウス Smad1、ウシ Smad1 発現ベクターを組み合わせ評価した結果、ウシ Smad4 のヘプシジン転写能がマウス Smad4 に比べて低いことが明らかになった。

(10) BMP シグナルを評価する上で頻用されているレポーターである BRE-luc を用いた場合もウシ Smad1/4 による転写促進はマウス Smad1/4 による転写促進に比べて低く、ウシ Smad4 の転写因子としての機能の低さが示唆された。

(11) ウシ Smad4 タンパク質とマウス Smad4 タンパク質のアミノ酸の相違を相互に置き換えた（つまり、ウシ Smad4 とマウス Smad4 で異なるアミノ酸の相互変換）変異体を作成し検討したところ、個々のアミノ酸置換でも全てのアミノ酸置換でもバックボーン遺伝子としてウシ Smad4 遺伝子を持つ場合は転写活性が低く、マウス Smad4 遺伝子を持つ場合は、たとえアミノ酸配列はウシ Smad4 と同一であっても転写活性が高く、ウシ Smad4 とマウス Smad4 の転写促進活性の違いはアミノ酸配列の違いでは説明できないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanamori Y, Murakami M, Matsui T, Funaba M.	4. 巻 111
2. 論文標題 JNK facilitates IL-1 -induced hepcidin transcription via JunB activation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 295-302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cyto.2018.09.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanamori Y, Murakami M, Matsui, T, Funaba M.	4. 巻 591
2. 論文標題 Identification of novel bone morphogenetic protein- responsive elements in a hepcidin promoter	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3895-3905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.12900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanamori Y, Murakami M, Sugiyama M, Hashimoto O, Matsui T, Funaba M.	4. 巻 110
2. 論文標題 Hepcidin and IL-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vitamins and Hormones	6. 最初と最後の頁 143-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.vh.2019.01.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 定兼熙幸、糸山恵理奈、吉岡秀貢、舟場正幸、松井徹
2. 発表標題 哺乳子牛の成長に伴う血漿中ヘプシジン濃度変化
3. 学会等名 第35回日本微量栄養素学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 定兼 熙幸、糸山恵理奈、吉岡秀貢、舟場正幸、松井徹
2. 発表標題 哺乳期における子牛の貧血とヘプシジンの関係
3. 学会等名 第67回関西畜産学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金森耀平、村上 賢、杉山真言、橋本 統、松井 徹、舟場正幸
2. 発表標題 ヘプシジン転写調節機構について
3. 学会等名 第42回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 定兼熙幸、村上賢、舟場正幸、松井徹
2. 発表標題 ウシSmad1/4を介したヘプシジン発現
3. 学会等名 第126回日本畜産学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	松井 徹 (Matsui Tohru) (40181680)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	