

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09670

研究課題名（和文）母児間鉄代謝に関わる新規因子の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel factor relating to fetomaternal iron metabolism.

研究代表者

森岡 裕香（MORIOKA, YUKA）

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00360264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）： 独自に作製した遺伝子X欠損マウスでは、胎盤と胎仔肝において鉄代謝関連遺伝子Hampの発現が上昇するとともに、胎仔肝に鉄の蓄積が生じることを明らかにし、Xが母児間鉄代謝に関わる新規因子である可能性を見出した。さらに、胎盤でXが発現していれば、胎仔肝のXが欠損していてもHampの発現上昇や鉄の蓄積が生じないという興味深い知見も得られ、胎盤に発現するXが胎仔肝における鉄代謝を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母児間鉄代謝は、胎盤という特殊な臓器の存在により成体の鉄代謝とは一線を画する機構を有している可能性が示唆されているが、母体・胎盤・胎児の三者が関わる複雑な相互作用が全容解明を困難にしている。本研究では、母児間鉄代謝の解析に有用な動物モデルの作製に成功し、実際に、胎盤が胎仔肝の鉄代謝を制御するメカニズムの解明に向けた、足掛かりとなる結果が得られている。今後の発展も期待できる成果であり、学術的に高い意義を有する。

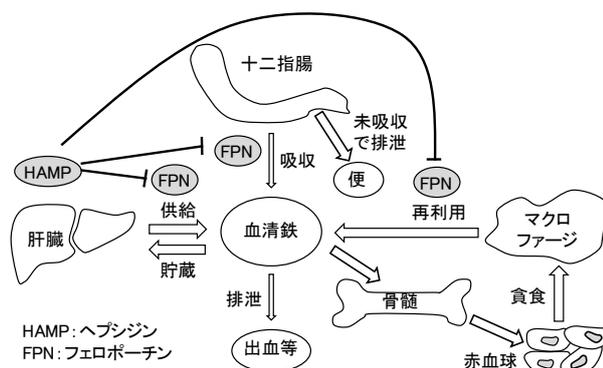
研究成果の概要（英文）： In this study, we demonstrated that X-deficient mice which we generated originally showed enhanced expression of Hamp both in placenta and fetal liver. In addition, accumulation of iron was observed in fetal liver. These results suggest that X is a novel factor relating to fetomaternal iron metabolism. Interestingly, enhanced Hamp expression and iron accumulation did not occur when X was expressed in placenta even if fetal liver showed X-deficiency. This data suggested the possibility that X expressed in placenta instead of fetal liver itself regulate the iron metabolism in fetal liver.

研究分野： 実験動物学・生殖生理学

キーワード： 胎盤 鉄代謝

1. 研究開始当初の背景

鉄は、成体の生命活動に必須の元素である反面、過剰に存在すると細胞や臓器に障害を与えるため、体内での鉄代謝は厳密に制御されている。鉄代謝の分子メカニズムの理解は 2000 年代から飛躍的な進歩を続けており、多くの関連因子が遺伝子レベルで解明されてきたが、なかでも、ヘプシジン-フェロポーチン (HAMP-FPN) システムが中心的な役割を果たしていると考えられている【図 1】。細胞内への鉄の取り込みはトランスフェリンレセプターを介して起こるが、FPN は細胞から鉄を排出するタンパク質であり、HAMP は FPN の発現を低下させることで血中への鉄の放出を抑制する。



【図 1】成体の鉄代謝における HAMP-FPN システム

鉄はまた、胎児の発生にも不可欠であるが、胎児は、胎盤を介して母体血中からのみ鉄を摂取することができる。胎盤は、母体から積極的に鉄を取り込み、自らの機能維持のために鉄を利用するのに加え、発生に必要な鉄を過不足なく胎児に供給する役割を果たしている。胎盤を介した母児間鉄代謝は濃度勾配に関わらない特殊な機構であり、たとえ母体が貧血状態に陥ろうとも、胎児への鉄の供給が優先して起こることが知られている。この現象は、成体の鉄代謝では観察されない特徴と言えるが、母児間鉄代謝で中心的な役割を果たすのもまた、HAMP-FPN システムである可能性が強く示唆されている。

成体の鉄代謝における HAMP の発現制御には、体内貯蔵鉄量、炎症、赤血球新生などが関与していることが報告されているものの、未だその全容解明には至っていない。一方、母児間鉄代謝における HAMP の発現制御についてはほとんど報告されておらず、成体の鉄代謝とは異なる制御因子や機構が存在するのではないかと予想される。

2. 研究の目的

母体・胎盤・胎児の三者が関わる母児間鉄代謝に関しては、複雑な相互作用が全容解明を困難にしており、個体レベルでの解析が必須と考えられる。我々は近年、胎盤での Hamp 発現が亢進する遺伝子 X 欠損マウスの作製に成功しているため、モデル動物として活用する。遺伝子 X は生理的な機能が未解明であり、鉄代謝への関与も全く報告されていないが、胎盤を介した母児間鉄代謝を制御する新規因子である可能性が強く示唆される。そこで本研究では、X に着目した解析を進め、Hamp の発現、ひいては HAMP-FPN システムを制御する新たな機構を明らかにするとともに、成体の鉄代謝との共通点や相違点を見出しながら、母児間鉄代謝についての理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスの胎仔肝における X 発現の解析

本研究では、先行研究において胎盤での Hamp 発現亢進が確認された X 欠損マウスを利用して、母児間鉄代謝の解明を目指す計画であるが、胎仔側で X が発現しているか否かについての報告はないため、肝臓における発現を qPCR で解析した。

(2) X 欠損マウスの胎仔肝における Hamp 発現の解析

胎盤での Hamp 発現が亢進している X 欠損マウスにおいて、胎仔側ではどのような変化があるか、肝臓での Hamp 発現を qPCR で解析した。

(3) X が胎盤ならびに胎仔肝細胞の Hamp 発現に直接的に関与しているかの検証

X 欠損胎盤ならびに胎仔肝における Hamp の発現上昇が、他臓器の表現型に起因する二次的な変化ではなく、各細胞に対する直接的な作用によるものであるかを、培養細胞を用いて検証した。胎盤細胞については先行研究にて、マウス胚性幹細胞 (ES) を一定条件下で胎盤トロフォブラスト細胞 (TB) に分化させる培養系を確立しており、分化誘導した TB が X を発現することを明らかにしている。そこで、まずは X 欠損 ES から TB を分化誘導できるかを検証し、その後、X 欠損 TB における Hamp 発現を qPCR で解析した。

肝臓細胞についてはまず、X を発現している株化培養細胞の探索から着手した。

(4) X 欠損胎盤ならびに胎仔肝における鉄含有量の解析

X 欠損により生じる鉄代謝関連遺伝子 Hamp 発現の亢進が、鉄含有量にどのような変化をもたらしているかを調べるため、胎盤ならびに胎仔肝における鉄濃度をアッセイキットで測定した。

(5) 母体血中鉄濃度の変化が X 欠損マウスに与える影響の解析

母体血中鉄濃度の変化は胎盤や胎仔にも影響を与えることが知られているが、X の欠損により反応性に違いが認められるかを検証した。

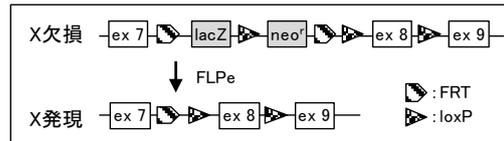
普通飼料で飼育した雌マウスならびに、鉄欠乏飼料または鉄過剰飼料に切り替えて 7 日間飼育した雌マウスを、それぞれ雄マウスと交配し、野生型の仔と X 欠損の仔を同腹に妊娠させた。その後の妊娠期間を通して同じ飼料を与え続けることで母体血中の鉄濃度変化を維持し、胎盤ならびに胎仔肝における Hamp 発現を qPCR で、鉄濃度をアッセイキットで解析した。

(6) 胎仔特異的な X 欠損マウスの作製と解析

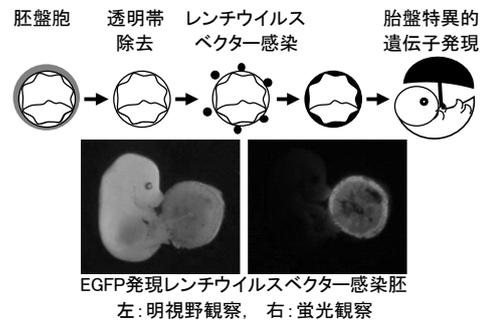
本研究で使用している X 欠損マウスは、FRT 配列で挟まれたジーントラップカセットがイントロン領域に挿入されたコンストラクトを有しており、FLPe を作用させてジーントラップカセットを抜き取ることで、X の発現を回復させることが可能である【図 2】。また我々は先行研究において、透明帯を除去したマウス胚盤胞期胚にレンチウイルスベクターを感染させることで、胎仔に遺伝子を導入することなく胎盤特異的に遺伝子操作する技術【図 3】を開発している。

そこで、透明帯を除去した X 欠損マウスの胚盤胞期胚に FLPe 発現レンチウイルスベクターを感染させることで、胎盤のみで X の発現が回復し、胎仔は X を欠損したままのマウス（胎仔特異的 X 欠損マウス）を作製し、胎盤ならびに胎仔肝における Hamp 発現を qPCR で、鉄濃度をアッセイキットで測定した。同時に、目的通り、X は胎盤では発現するが胎仔肝では発現しないことを、qPCR で確認した。

コントロール実験として、野生型マウスの胚盤胞期胚も使用して同様の解析を行うことで、FLPe の発現が X や Hamp の発現ならびに鉄濃度に影響を与えないことを確認した。さらに、レンチウイルスベクターの感染が X や Hamp の発現ならびに鉄濃度に影響を与えないことも確認するため、EGFP を発現するレンチウイルスベクターを使用して同様の解析を行った。



【図 2】 X 欠損マウスのコンストラクト



【図 3】胎盤特異的遺伝子操作

4. 研究成果

(1) 野生型マウスの胎仔肝における X 発現の解析

胎齢 18.5 日目の胎仔肝において、胎盤ほど高発現ではないものの、X の発現が確認された。

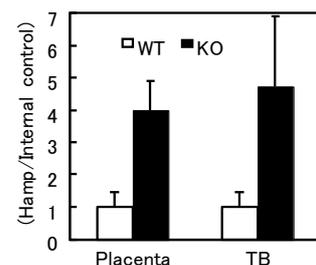
(2) X 欠損マウスの胎仔肝における Hamp 発現の解析

胎齢 18.5 日目の X 欠損胎仔肝での Hamp 発現は野生型の約 11 倍にまで上昇しており、X を欠損させることで胎盤、胎仔肝のいずれの Hamp 発現も亢進することが明らかになった。

(3) X が胎盤ならびに胎仔肝細胞の Hamp 発現に直接的に関与しているかの検証

胎盤細胞については、まず X 欠損 ES から TB への分化誘導を試みたら、形態的にも分化マーカーの発現レベルも野生型と同等の TB が得られ、X は胎盤細胞の分化には関与していないことが示された。そこで次に、野生型 ES ならびに X 欠損 ES からそれぞれ TB を分化誘導し、Hamp 発現を解析したところ、胎盤組織と同様に TB においても、X を欠損させることで野生型と比較して 4 倍程度の Hamp 発現亢進が確認された【図 4】。この結果から、X が胎盤細胞内で直接的に Hamp 発現制御に関与していることが明らかになった。

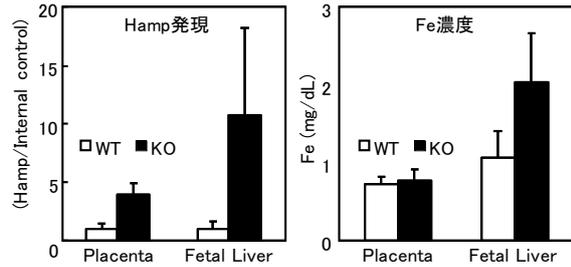
肝臓細胞については、ヒト肝癌細胞株 Hep-G2 や HuH-7、マウス肝癌細胞株 Hepa1-6 における X の発現を RT-PCR で解析したが、いずれも検出限界以下であり、目的の実験には使用できなかった。今後は別の候補として、マウス胎仔肝からの初代培養を試み、X の発現を維持した細胞を得られるか検討予定である。



【図 4】胎盤組織と細胞における Hamp 発現

(4) X 欠損胎盤ならびに胎仔肝における鉄含有量の解析

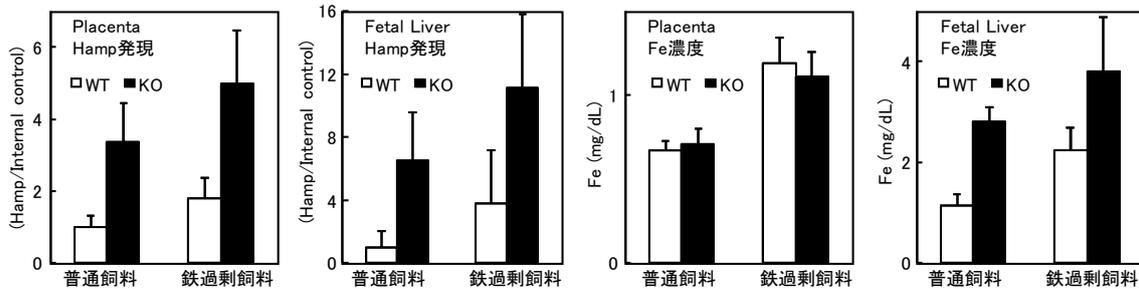
【図 5】左のグラフに示す通り、胎齢 18.5 日目の X 欠損胎盤ならびに胎仔肝ではいずれも、野生型と比較して鉄代謝関連遺伝子 Hamp 発現の亢進が認められた。さらにそれぞれの鉄濃度を測定した結果が【図 5】右のグラフであり、X を欠損しても胎盤の鉄濃度は変化しない反面、胎仔肝の鉄濃度は野生型の 2 倍にまで上昇していた。この結果から、各臓器における Hamp 発現が、直接的に自身の鉄含有量をコントロールしているわけではない可能性が示唆された。



【図 5】胎盤と胎仔肝における Hamp 発現・鉄濃度

(5) 母体血中鉄濃度の変化が X 欠損マウスに与える影響の解析

妊娠マウスに鉄調整飼料を与え、胎齢 18.5 日目の胎盤ならびに胎仔肝における Hamp 発現と鉄濃度を測定した。鉄過剰飼料を与えた場合、Hamp 発現ならびに胎仔肝の鉄濃度は WT < KO、胎盤の鉄濃度は WT = KO、の関係は維持したまま、それぞれの値が上昇した【図 6】。鉄欠乏飼料を与えた場合の解析も行ったが、著しい貧血により発生途中で死亡する個体が多く、さらに、測定値にバラツキが大きく一定の傾向が見出せなかったことから、条件を再検討したうえでの追加解析が必要と考える。現時点では、少なくとも母体から鉄が過剰に供給される状況に対しては、X が欠損していても反応性が維持されている可能性が示された。



【図 6】鉄過剰飼料を与えた場合の胎盤と胎仔肝における Hamp 発現・鉄濃度

(6) 胎仔特異的な X 欠損マウスの作製と解析

コントロール実験として、透明帯を除去した野生型マウスと X 欠損マウスの胚盤胞期胚に EGFP 発現レンチウイルスベクターを感染、または、透明帯を除去した野生型マウスの胚盤胞期胚に FLPe 発現レンチウイルスベクターを感染させて偽妊娠マウスに移植し、胎齢 18.5 日目の胎盤ならびに胎仔肝における X と Hamp の発現、さらに鉄濃度を測定したところ、いずれも未感染の場合と同等の数値が得られた。この結果から、レンチウイルスベクターの感染や FLPe の発現自体は、X と Hamp の発現ならびに鉄濃度に影響を与えないことが確認された。

次に、透明帯を除去した X 欠損マウスの胚盤胞期胚に FLPe 発現レンチウイルスベクターを感染させて偽妊娠マウスに移植し、胎仔特異的な X 欠損マウスを作製した。胎齢 18.5 日目の胎盤ならびに胎仔肝における X 発現を qPCR で解析し、目的通り胎盤のみで X 発現が回復し、胎仔は X 欠損のままであることを確認した。さらに、Hamp 発現と鉄濃度を測定したところ、現段階では例数の少ない予備的なデータではあるが、X を欠損したままであるはずの胎仔肝における Hamp 発現と鉄濃度が、いずれも野生型と同程度にまで減少するという興味深い結果が得られた【図 7】。これは、胎盤に発現する X が胎仔肝における鉄代謝を制御している可能性を強く示唆している。今後は、【図 7】の解析例を増やして再現性を確認するとともに、逆に胎盤のみで X を欠損するマウスも作製して表現型を比較する予定である。

野生型を1とした時の遺伝子発現と鉄濃度

	野生型	KO	胎仔のみ KO
X	1	0	1
Hamp	1	4	2
Fe	1	1	1
胎盤			
胎仔肝			
X	1	0	0
Hamp	1	11	1
Fe	1	2	1

【図 7】X 発現と Hamp 発現・鉄濃度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------