

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22～24 年度

課題番号：22591033

研究課題名（和文） 鉄代謝制御因子ヘプシジンの発現制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of hepcidin, the central regulator of body iron homeostasis

研究代表者 川端 浩 (HIROSHI KAWABATA)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：10329401

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヘプシジンやフェリチンなどの鉄代謝関連分子の基礎的および臨床的研究を通して、鉄代謝異常症の病態解明と、診断法および治療法の開発を目的として行った。本研究によって、肝がん細胞のヘプシジンの発現が pH によって変化すること、鉄貯蔵蛋白フェリチンのなかで H-フェリチンがトランスフェリン受容体 1 を介して赤芽球系細胞に取りこまれること、高フェリチン血症が造血幹細胞移植後の細菌感染症や再発の頻度の増加と関連していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： The purpose of this study was to clarify the pathogenesis of iron disorders through basic and clinical studies of iron metabolism-associated molecules such as hepcidin and ferritin. We identified that hepcidin expression by hepatoma cells was affected by microenvironmental pH. We also found that iron storage protein H-ferritin was selectively taken up by erythroid cells through transferrin receptor 1. Furthermore, we demonstrated that pre-transplant hyperferritinemia was a risk factor for bacterial infection and disease relapse after allogenic stem cell transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
H22 年度	1300000	390000	1690000
H23 年度	1200000	360000	1560000
H24 年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：鉄代謝、ヘプシジン、フェリチン、造血幹細胞移植、GVHD、鉄過剰症

1. 研究開始当初の背景

鉄は生体に必須の微量元素であると同時に、過剰に存在すればフリーラジカルの生成を介して糖尿病、肝硬変、心不全などの様々な臓器障害を引き起こし、生命を脅かす。したがって、生体内の鉄は厳密にコントロール

されなければならない。しかしながら、いくつかの遺伝性疾患や後天性の血液疾患では鉄代謝制御に破綻を生じ、鉄欠乏症あるいは鉄過剰症を呈する。生体内の鉄代謝制御機構に中心的な役割を果たしているのが、ペプチドホルモンのヘプシジンである。ヘプシジン

は、約 10 年前に世界 4 つのグループによって鉄代謝と炎症をつなぐ液成因子として同定され、以来この分子に関する多くの研究がなされている (FEBS Lett 480:147-50;2000, PNAS 98:8780-5;2001, JBC 276:7806-10;2001, JBC 276:7811-9;2001)。

ヘプシジンは主に肝臓で産生され、消化管からの鉄の吸収と網内系細胞からの鉄の放出を抑制する。ヘプシジンの発現低下は鉄過剰症を、発現増加は鉄欠乏症を引き起こす。ヘプシジンの発現制御機構の解明は、鉄代謝異常症の病態を理解し治療法を開発する上できわめて重要であると考えられており、世界各国の研究者がしのぎを削って研究を行っている。その結果、近年多くの知見がもたらされている。ヘプシジンの発現は、炎症性サイトカインのインターロイキン 6 (IL6) と鉄負荷刺激により増加し、低酸素と赤血球造血により減少する。鉄によるヘプシジン発現刺激には bone morphogenetic protein 6 (BMP6) が必須である (Nat Genet 41:478-81;2009)。膜型セリンプロテアーゼのマトリプターゼ 2 はヘプシジンの発現を抑制しており (Science 320:1088-92;2008)、その遺伝子変異が鉄剤不応性の鉄欠乏性貧血を引き起こす (Nat Genet 40:569-71.2008)。ヘプシジンの発現は、細胞内の ER ストレスによっても増加する (Science 325:877-80;2009)。研究代表者らは、肝臓における鉄のセンサーとされるトランスフェリン受容体 2 (TfR2) を分子クローニングし (Kawabata H, et al. JBC 274:20826-32,1999)、この遺伝子の変異がヘプシジンの発現低下と鉄過剰症を引き起こすことを明らかにした (Kawabata H, et al. Blood 105:376-81,2005)。また、炎症性サイトカインのオンコスタチン M が IL6 よりもはるかに低濃度 (2ng/ml) で肝細胞由来細胞株のヘプシジンの発現を強く刺激することを見いだした (Kanda J, Kawabata H, et al. Int J Hematol, 2009)。

こういった知見により、ヘプシジンの発現制御の大枠はかなりはっきりしてきたが、解明されていない点も多く残されている。まず、赤血球造血がヘプシジン発現を抑制する機序がまだよく分かっていない。βサラセミアなどにおいては赤血球造血前駆細胞が GDF15 を出して肝臓でのヘプシジン発現を抑制することが Tanno らによって示されているが (Nat Med 13:1096-101;2007)、他の多くの無効造血疾患や造血細胞移植時においては GDF-15 と異なる未知なヘプシジン抑制因子が働いている可能性が高く (Kanda J, Kawabata H, et al. Haematologica 93:1550-4, 2008)、その因子は未だに同定されていない。また、鉄負荷がヘプシジン発現を刺激する機序についても詳細は分かっていない。マウスに鉄を過剰投与すると肝臓におけるヘプシジンの発現が増加するが、in vitro で、これを再現できる系は確立されていない。ごく最近 Enns らは、HFE を肝癌細胞株に過剰発現させることによって、in vitro で鉄によるヘプシジン発現刺激を再現できたと報告したが (Cell Metab. 9:217-27;2009)、これを再現した報告はまだなく、応募者の研究室でもこの結果を再現できていない。

ヘプシジンの発現異常が遺伝性ヘモクロマトーシスやβサラセミアでみられる鉄過剰症の原因になっていることは明らかであるが、我が国の実地臨床でみられる鉄過剰症の多くは血液疾患と肝疾患である。このうち白血病や骨髄異形成症候群、再生不良性貧血などの血液疾患においても、輸血のみならず、無効造血に関連したヘプシジンの発現異常が鉄過剰症の原因になっている可能性がある。また、いくつかの研究により鉄過剰症がこれらの疾患の予後を悪化させることが示されている (Blood 109:4586-8,2007 など)。しかしながら、これらの血液疾患におけるヘプシジンの動態についてはほとんど調べられていない。

2. 研究の目的

生体内の鉄代謝の制御に中心的な役割を果たすペプチドホルモン、ヘプシジンの発現がどのように制御されているかについて解明する。得られた知見によって、遺伝性ヘモクロマトーシス、炎症性貧血、骨髄不全症などの先天性および後天性の鉄代謝異常症の病態の理解を深め、診断法および治療法の開発へとつなげていく。

このほか、ヘプシジンをはじめとした鉄代謝関連分子の血清中濃度と造血器疾患・鉄代謝異常症の病態との関連について、疫学的な解明を行う。

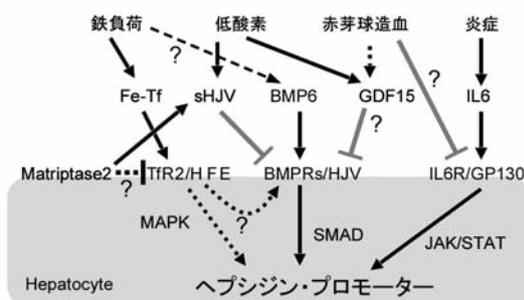


図1 肝細胞におけるヘプシジン発現の制御

3. 研究の方法

(1) 細胞レベルでの鉄代謝制御機構の解析

ヘプシジンの発現を制御する因子に関して、肝細胞株 (HepG2, Huh-7, Hep3B) をモデルシステムとして構築した。これらの肝細胞株にさまざまな刺激を加え、ルシフェラーゼアッセイ、定量的 real-time PCR、培養上清中の LC-MS/MS 法による成熟ヘプシジン 25 の定量により、ヘプシジンの発現を制御する因子を検索した。また、ヘプシジンのプロモーターに GFP を結合した遺伝子を肝細胞株に安定的に導入して、ヘプシジン・プロモーター活性に影響を与える因子を 96-well ベースでスクリーニングできるバイオアッセイ・システムを構築した。さらに、細胞膜表面に発現する鉄代謝関連分子 (TfR1, TfR2, HJV, HFE, FPN1, マトリプターゼ 2 など) の相互作用について、293T 細胞に共発現させて、免疫沈降-ウェスタンブロット法により解析を行った。

フェリチンは鉄貯蔵蛋白であり体内貯蔵鉄のマーカーとして臨床的に用いられている。ヒトのフェリチン (H および L 型) を合成して蛍光標識し、さまざまな細胞への取り込みについて、フロー・サイトメトリなどを用いて解析を行った。

(2) 血液疾患患者の鉄代謝関連分子の動態

京都大学医の倫理委員会の承認と、さまざまな血液疾患の患者からの同意を得て、血清・尿を収集・保存し、フェリチン、ヘプシジン 25、リポカリン 2、GDF15 などの液性因子を LC/MS-MS や ELISA 法などによって測定した。こういった液性因子の値の推移と、それぞれの患者の臨床像や造血幹細胞移植の成績に関する疫学研究を行った。

(3) 鉄代謝関連遺伝子の変異に関する研究

京都大学医の倫理委員会の承認と鉄代謝異常症の患者から同意を得たうえで、遺伝性の鉄過剰症に関する遺伝子診断を行った。

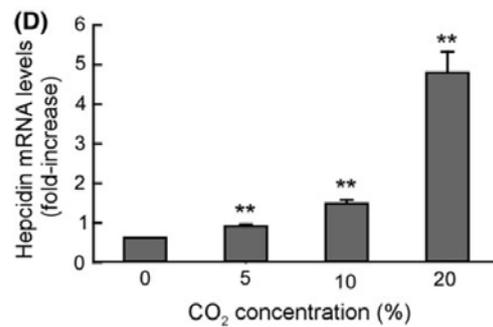
4. 研究成果

(1) 細胞レベルでの鉄代謝制御機構の解析

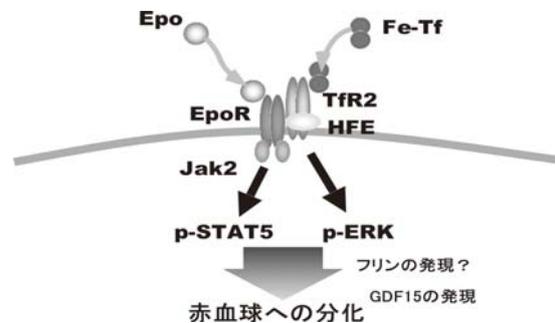
微小環境中の水素イオン濃度がヘプシジンの mRNA の安定性を介して発現に影響を与えていることを見いだした。すなわち、乳酸や CO₂ などにより培養液中の pH が低下すると、ヘプシジンの発現が増加する。

この変化は、ヘプシジンのプロモーター活性の変化ではなく、ヘプシジンの mRNA の安定性の変化によってもたらされていた。この結果は、敗血症や腎不全などにおける肝臓の微小環境の pH の変化が、これらの病態でみられる鉄代謝異常の一因である可能性を示唆している。

(Mizumoto, et al. Int J Hematol 2012;96 (701-709)、下図)。



細胞膜表面に発現する鉄代謝関連分子に関しては、TfR2 が EPO 受容体と複合体を形成することを確認し、若干の新規データ、考察を加えて公表した (川端浩: 臨床血液 2011;52 (399-405)、下図)。



96-well ベースのヘプシジン・プロモーター・バイオアッセイ・システムを構築した。現在、これを用いて、血液疾患患者の血清中に存在するヘプシジン発現抑制物質についての解析などを行っている。

鉄貯蔵蛋白のフェリチンに関しては、健康者の末梢血あるいは骨髄中のさまざまな細胞のなかで、赤芽球系細胞だけが特異的かつ選択的にヒトの H-フェリチンを取り込むことを見いだした。また、H-フェリチンがトランスフェリン受容体 1 を介して細胞に取り込まれていること、その取り込みはトランスフェリンとは競合しないことなどを見いだした (一部は第 73 回日本血液学会学術集会で発表。投稿準備中)。

(2) 血液疾患患者の鉄代謝関連分子の動態

①造血幹細胞移植前のフェリチン値が移植後早期の細菌感染症を予測する因子であること、移植前の高フェリチン血症は独立した予後不良因子であることをみいだした

(Kanda, et al. Bone Marrow Transplant 2011;46 (208-216))、

②骨髄異形成症候群や骨髄線維症などのさまざまな血液疾患で血清 GDF15 が異常高値を示すことを見いだした。また、血清 GDF15 値が貧血の重症度と比例して高値を示すこと

をみいだした(第73回日本血液学会学術集会にて発表、投稿準備中)。

③血液腫瘍に対する造血幹細胞移植前の高フェリチン血症が、移植後の予後不良因子であること、急性GVHDの発症頻度には影響を与えなかったが慢性GVHDの発症頻度を減少させて、血液腫瘍の再発を増加させる因子であることを見いだした(Sakamoto, et al. Int J Hematol 2013;97(109-116))。

(3) 鉄代謝関連遺伝子の変異に関する研究

鉄過剰症と貧血がみられた成人症例について、遺伝子検査により先天性赤血球異形成貧血1型と診断した(Kawabata H, et al. Intern Med 2012;51(917-920))。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

- 1 Kawabata H, Kadowaki N, Nishikori M, Kitawaki T, Kondo T, Ishikawa T, Yoshifuji H, Yamakawa N, Imura Y, Mimori T, Matsumura Y, Miyachi Y, Matsubara T, Haga H, Takaori-Kondo A: Clinical features and treatments of multicentric castlemans disease: A retrospective study of 21 japanese cases in a single institute. J Clin Exp Hematopathol in press. (査読有り)
- 2 Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, Yamashita K, Ichinohe T, Ishikawa T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A: Differing impacts of pretransplant serum ferritin and c-reactive protein levels on the incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Int J Hematol 2013;97(109-116) (査読有り、10.1007/s12185-012-1229-0 [doi])
- 3 川端浩: 鉄代謝のバイオマーカー < 検査指標 3 > ヘプシジン. 臨床検査 2012;56(1064-1069) (査読無し)
- 4 川端浩: 鉄センサーの分子機構. 細胞(1346-7557) 2012;44(287-290) (査読無し)
- 5 Mizumoto C, Kawabata H, Uchiyama T, Sakamoto S, Kanda J, Tomosugi N, Takaori-Kondo A: Acidic milieu augments the expression of hepcidin, the central regulator of iron homeostasis. Int J Hematol 2012;96(701-709) (査読有り、10.1007/s12185-012-1223-6 [doi])
- 6 Kawabata H, Doisaki S, Okamoto

A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A: A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a japanese adult with a cdan1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. Intern Med 2012;51(917-920) (査読有り、JST.JSTAGE/internalmedicine/51.6978 [pii])

7 諫田淳也, 川端浩: バイオマーカーとしてのフェリチン. 血液フロンティア 2011;21(75-84) (査読無し)

8 川端浩: Transferrin receptor 2 による鉄代謝シグナル. 臨床血液(0485-1439) 2011;52(399-405) (査読有り)

9 川端浩: ヘプシジン (hepcidin) — そのがん性貧血における意義. 癌と化学療法(0385-0684) 2011;25(603-608) (査読無し)

10 Kanda J, Mizumoto C, Ichinohe T, Kawabata H, Saito T, Yamashita K, Kondo T, Takakura S, Ichiyama S, Uchiyama T, Ishikawa T: Pretransplant serum ferritin and c-reactive protein as predictive factors for early bacterial infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2011;46(208-216) (査読有り、10.1038/bmt.2010.108 [doi])

11 Kanda J, Kawabata H, Chao NJ: Iron overload and allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. Expert Rev Hematol 2011;4(71-80) (査読有り、10.1586/ehm.10.81 [doi])

12 川端浩, 諫田淳也, 石川隆之: 鉄過剰症と造血器腫瘍の予後. 血液フロンティア 2010;20(1025-1033) (査読無し)

13 川端浩: 炎症性貧血. 感染・炎症・免疫 2010;40(291-293.) (査読無し)

14 川端浩: 鉄代謝の分子機構. 日本内科学会雑誌 2010;99(1173-1179) (査読無し)

15 川端浩: トランスフェリンレセプター 2. 日本医師会雑誌 2010;139(330) (査読無し)

16 川端浩: 鉄代謝異常と病態. 日本検査血液学会雑誌 2010;11(1-12) (査読有り)

17 Song S, N., J., Tomosugi N, Kawabata H, Ishikawa T, Nishikawa T, Yoshizaki K: Downregulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-il-6 receptor antibody (tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric castlemans disease (mcd) Blood 2010;116(3627-3634) (査読有り、10.1182/blood-2010-03-271791 [doi])

〔学会発表〕(計9件)

1 内山達樹, 川端浩, 友杉直久, 高折晃史: 血液疾患における GDF15 と鉄代謝異常 (シンポジウム講演)、第36回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、2012年09月02日、京王プラザホテル札幌・札幌市

2 川端浩, 諫田淳也, 上田恭典, 友杉直久, 高折晃史: キャッスルマン病と炎症性貧血、第35回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、2011年9月10日・11日、徳島文理大学・徳島市

3 Soichiro Sakamoto, Hiroshi Kawabata, Taro Masuda, Tatsuki Uchiyama, Chisaki Mizumoto, Katsuyuki Ohmori and Akifumi Takaori-Kondo: Ferritin uptake by human leukocytes and leukemia cell lines (ヒト白血球および白血病細胞株のフェリチン取り込み)、第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14日～16日、名古屋国際会議場・名古屋市・愛知県

4 Soichiro Sakamoto, Hiroshi Kawabata, Junya Kanda, Tatsuki Uchiyama, Chisaki Mizumoto, Tadakazu Kondo, Kouhei Yamashita, Tatsuo Ichinohe, Takayuki Ishikawa, Norimitsu Kadowaki, Naohisa Tomosugi and Akifumi Takaori-Kondo: Impact of pre-transplant hepcidin-25 in patients undergoing allo-SCT for hematologic malignancies (造血器腫瘍に対する同種造血幹細胞移植における移植前ヘプシジン値の影響)、第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14日～16日、名古屋国際会議場・名古屋市・愛知県

5 Uchiyama Tatsuki, Kawabata Hiroshi, Kanda Junya, Tomosugi Naohisa, Sakamoto Soichiro, Mizumoto Chisaki, Takaori-Kondo Akifumi: 種々の血液疾患における血清 GDF15 値 (Serum levels of GDF15 in various hematological disorders)、第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14日～16日、名古屋国際会議場・名古屋市・愛知県

6 Soichiro Sakamoto, Hiroshi Kawabata, Junya Kanda, Tatsuki Uchiyama, Chisaki Mizumoto, Tadakazu Kondo, Kouhei Yamashita, Tatsuo Ichinohe, Takayuki Ishikawa, Norimitsu Kadowaki, Naohisa Tomosugi and Akifumi Takaori-Kondo: PROGNOSTIC IMPACT OF PRE-TRANSPLANT SERUM HEPcidIN LEVELS ON CLINICAL OUTCOMES AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION、16th Congress of the European Hematology Association、June 9-12, 2011、Excel, London, United Kingdom

7 川端浩: Transferrin receptor 2 による鉄代謝シグナル (シンポジウム)、第72回日本血液学会学術集会、2010年9月

25日、パシフィコ横浜・横浜市

8 Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, Ichinohe T, Ishikawa T, Takaori-Kondo A.: Impact of Serum Ferritin Levels on the Incidence of Chronic Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. :The American Society of Hematology 52nd Annual Meeting、December 4-7, 2010、Orland, FL, USA.

9 Sakamoto S, Mizumoto C, Masuda T, Uchiyama T, Kanda J, Kawabata H. : Cellular machinery for ferritin uptake. 第72回日本血液学会学術集会、2010年9月25日、パシフィコ横浜・横浜市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/research/regulation.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川端 浩 (HIROSHI KAWABATA)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号: 10329401

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

友杉直久 (TOMOSUGI NAOHISA)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号: 80155580

森潔 (MORI KIYOSHI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 60343232