

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19720

研究課題名（和文）肝細胞におけるエクソソームによる鉄排出機構の解明と鉄過剰症への治療応用

研究課題名（英文）Deciphering iron efflux mechanism by exosomes in hepatocytes

研究代表者

酒井 真志人（Sakai, Mashito）

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：40643490

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：鉄は生体に必須の金属だが、過剰な鉄は活性酸素種の生成を亢進させ、組織の障害を引き起こす。肝臓は全身の鉄恒常性維持に中心的な役割を果たしており、肝細胞は鉄調節ホルモンであるヘプシジンを分泌する一方で、主要な鉄貯蔵の場である。本研究では、肝細胞のエクソソーム依存性鉄排出の分子機構を明らかにするために、鉄負荷モデルの肝臓中エクソソームのプロテオーム解析を実施した。また、鉄負荷モデルの肝細胞の鉄排出による治療を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性鉄過剰症である遺伝性ヘモクロマトーシスは、コーカソイドでは頻度の高い疾患であり、肝硬変、糖尿病、心筋症などの原因となる。一方、わが国では、鉄代謝関連分子の変異に起因しない続発性鉄過剰症が主体だが、最も頻度の高い輸血後鉄過剰症では、同様の全身性の病態を呈する。本研究では、新しい治療原理に基づく鉄過剰症治療の開発を目的として、肝細胞のエクソソーム依存性鉄排出の治療応用を検討した。

研究成果の概要（英文）：Iron is an essential metal for cell survival; however, excess iron increases the production of reactive oxygen species and causes tissue damage. The liver plays a central role in maintaining systemic iron homeostasis, while serving as the primary site of iron storage. In this study, we carried out a proteomic analysis of exosomes in the livers of iron-loaded mice. Additionally, we investigated the therapeutic implications of iron export from hepatocytes in the iron-loaded model.

研究分野：病態生化学

キーワード：鉄代謝 肝細胞 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

鉄は生体に必須の金属だが、過剰な鉄は活性酸素種の生成を亢進させ、組織の障害を引き起こす。原発性鉄過剰症である遺伝性ヘモクロマトーシスは、コーカソイドでは頻度の高い疾患であり、肝硬変、糖尿病、心筋症などの原因となる。一方、わが国では、鉄代謝関連分子の変異に起因しない続発性鉄過剰症が主体だが、最も頻度の高い輸血後鉄過剰症では、同様の全身性の病態を呈する。また、ウイルス性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) でも肝細胞への鉄蓄積が病態進展に関与する。肝臓は全身の鉄恒常性維持に中心的な役割を果たしており、肝細胞は鉄調節ホルモンであるヘプシジンを分泌する一方で、主要な鉄貯蔵の場である。血清鉄濃度が高くなると、肝細胞ではヘプシジンの発現が誘導される。ヘプシジンは、マクロファージや腸管上皮細胞に多く発現する鉄輸送体であるフェロポーチンの分解を促進し、マクロファージからの鉄の放出と、腸管上皮細胞からの鉄の吸収を減少させて、血清鉄濃度を減少させる。このように、鉄恒常性は主に血中への鉄の流入を抑制することで維持されており、積極的に十分量の鉄を排出する機構がないことが鉄過剰症の治療を困難なものとしている。現在、鉄過剰症は、瀉血と鉄キレート剤による尿中への鉄排泄促進による除鉄によって治療されているが、その効果は十分ではない。

細胞内で鉄は、鉄結合性タンパク質フェリチンの内部に安定な Fe<sup>3+</sup>として貯蔵される。一方、鉄利用時にはフェリチンファジーによってフェリチンが分解され鉄が取り出されるが、その際有害な Fe<sup>2+</sup>が生成される。最近、フェリチンはエクソソームによって細胞外に放出されることが *in vitro* で示された。実際、腫瘍細胞の一部は、PROM2 がフェリチン内包エクソソームの生成を促進して細胞内鉄量を減少させることで、フェロトーシス (鉄に依存した脂質の過酸化によって惹起される細胞死) を免れる (Brown et al. *Dev. Cell.* 2019)。ヘモクロマトーシスでは、胆汁の鉄濃度が 2 倍に、フェリチン濃度が 5 倍に増加することが報告されている (Hultcrantz et al. *Gastroenterol.* 1989)。肝細胞由来エクソソームの一部は胆汁中に分泌されることと併せて考えると、鉄過剰状態で肝細胞はエクソソームによって胆汁中にフェリチン鉄を排出していることが想定される。

## 2. 研究の目的

本研究では、肝細胞が貯蔵鉄を胆汁中に排出する分子機構を同定し、鉄過剰症への治療応用を目指す。肝臓では PROM2 の発現は胆管細胞に限られ、肝細胞におけるエクソソーム依存性の鉄排出機構は明らかとなっていない。そこで、肝細胞のエクソソーム依存性鉄排出の分子機構を、鉄負荷モデルのエクソソームのプロテオミクス解析などによって解析する。また、PROM2 を肝細胞に発現させることで、新しい治療原理に基づく鉄過剰症治療を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝細胞における鉄排出の新規分子機構の探索

#### 鉄負荷モデルにおける肝細胞の遺伝子発現解析

6 週齢の C57BL/6 マウスに 1g/kg の鉄剤 (iron dextran) を 6 週間、週 1 回腹腔内投与して、鉄負荷マウスを作製した。コントロール・鉄負荷マウスより肝組織を採取して RNA-seq を実施し、エクソソームの形成と分泌、鉄代謝に関与する遺伝子、下記の実験で同定した候補タンパク質遺伝子の発現変動を検討した。

#### 鉄負荷モデルにおける肝臓中エクソソームのプロテオーム解析

6 週齢の C57BL/6 マウスに 1g/kg の鉄剤 (iron dextran) を 6 週間、週 1 回腹腔内投与して、鉄負荷マウスを作製した。鉄負荷マウスとコントロールマウスの肝臓中よりエクソソームを精製してプロテオミクス解析を行い、鉄負荷時のエクソソームに特異的なタンパク質を同定した。

### (2) 肝細胞における鉄排出の治療応用の検討

腫瘍細胞の一部は、PROM2 がフェリチン内包エクソソームの生成を促進して細胞内鉄量を減少させることで、フェロトーシスを免れることが報告されている。そこで、肝細胞特異的な ApoE.HCR.hAAT プロモーターにより Prom2 を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV8-ApoE.HCR.hAA-Prom2) と、ApoE.HCR.hAAT プロモーターにより蛍光タンパク質 ZsGreen を発現するコントロールのアデノ随伴ウイルス (AAV8-ApoE.HCR.hAA-ZsGreen) を作製して、肝細胞における Prom2 強発現の効果を検討した。

6 週齢の C57BL/6 マウスに 1g/kg の鉄剤 (iron dextran) を 6 週間、週 1 回腹腔内投与して、鉄負荷マウスを作製する。9 週齢の鉄負荷マウスとそのコントロールマウスの肝細胞に、AAV8-ApoE.HCR.hAA-Prom2 もしくは AAV8-ApoE.HCR.hAA-ZsGreen を感染させて、12 週齢における治療効果を、肝臓の遺伝子発現解析等によって判定した。また、肝臓中エクソソーム、肝組織、および血清中の鉄・フェリチン量を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 肝細胞における鉄排出の新規分子機構の探索

鉄負荷マウス、および、そのコントロールマウスの肝組織を用いて、RNA-seq による遺伝子発現解析を実施した。Gene ontology 解析の結果、鉄負荷により肝臓では自然免疫に関連した遺伝子の発現が増加し、糖新生系酵素遺伝子など、代謝関連遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。一方で、鉄負荷マウス、および、そのコントロールマウスの肝臓中エクソソームを精製してプロテオーム解析を実施したところ、鉄負荷マウスの肝臓由来のエクソソームにおいて 730 のタンパク質が、コントロールよりも多く同定された。鉄負荷マウスの肝臓由来エクソソームにおいて増加する 730 のタンパク質のうち、414 のタンパク質の mRNA 発現が増加していた。今後、初代培養肝細胞の培地に FeCl<sub>3</sub> を添加することで鉄負荷を行い、培地に分泌されたエクソソームを精製して同様のプロテオーム解析を実施して、鉄負荷肝細胞から分泌されるエクソソームに特徴的なタンパク質の同定を進めていく。

##### (2) 肝細胞における鉄排出の治療応用の検討

まず、コントロールマウスに AAV8-ApoE.HCR.hAA-Prom2 を尾静脈注することで、肝細胞に Prom2 を強発現したマウスを作製して、RNA-seq による遺伝子発現解析を実施した。その結果、Prom2 の強発現によって、肝細胞で鉄負荷によって増加する鉄調節ホルモン *Hamp* の発現が有意に減少することが明らかとなった。この結果から、肝細胞における Prom2 の発現が肝細胞の鉄負荷を解除する可能性を考えて、上記のように鉄負荷マウスの肝細胞に AAV8-ApoE.HCR.hAA-Prom2 もしくは AAV8-ApoE.HCR.hAA-ZsGreen を感染させて、治療効果を検討した。これらのマウスの肝臓における *Prom2* の遺伝子発現を検討したところ、同時に Prom2 を発現させたコントロールマウスと比較して、*Prom2* の発現が大きく減少していることが明らかとなった。この結果は、上記の方法で作製された鉄負荷マウスの肝細胞死は Prom2 の強発現によって防ぐことができなかったことを示唆している。今後、鉄投与量を減少させて、Prom2 の強発現が鉄負荷マウスの表現型に与える影響の検討を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sakai Mashito	4. 巻 14
2. 論文標題 Exploring the signal-dependent transcriptional regulation involved in the liver pathology of type 2 diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 15 ~ 20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-022-00610-0	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
---------	---------