

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460969

研究課題名(和文) ERストレスを介した鉄代謝調節とUPR破綻による鉄過剰のメカニズム

研究課題名(英文) Iron overload by iron metabolism dysregulation and UPR breakdown through the ER stress

研究代表者

大竹 孝明(Ohtake, Takaaki)

旭川医科大学・医学部・その他

研究者番号：10359490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患にしばしば鉄過剰症が合併する。これは遺伝性ヘモクロマトーシスと同じようにヘプシジンの発現抑制による鉄代謝異常と考えられる。BMPERは肝細胞外でBMPと結合し、BMP-SMADシグナルを抑制しヘプシジンの発現を低下させている。このBMPERは肝細胞ではなく、涙道内皮細胞で産生されている。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease frequently coexist iron overload. Iron dysregulation by hepcidin down-regulation is considered to be the cause as same as hereditary hemochromatosis. Bone morphogenetic protein binding endothelial regulator (BMPER) is inhibiting BMP-SMAD signaling by binding BMP extracellularly, subsequently reduces hepcidin transcription. Although BMPER was thought to be expressed by hepatocytes because of its vast protein expressing functions, it is noteworthy that we found out BMPER is expressed dominantly in liver sinusoid endothelial cells rather than hepatocytes.

研究分野：肝臓病学

キーワード：脂肪肝 鉄代謝異常

1. 研究開始当初の背景

(1) ER ストレスは、正常な高次構造に折り畳まれなかった unfolded protein が小胞体に蓄積し、それにより正常細胞生理機能が阻害させる状態である。これに対して、細胞内代謝の恒常性維持のため unfolded protein response (UPR) が起きている。unfolded protein は ER ストレスセンサーである IRE1 (inositol-requiring 1), ATF6 (activating transcription factor 6), PERK (PKR-like ER kinase) によって感知され、UPR を誘導している。UPR は翻訳量の低下、分子シャペロン発現増加によって unfolded protein の除去効率をあげ、ER ストレスを回避しようと働く。しかし、過剰の ER ストレスでは UPR による細胞修復機能が破綻し、アポトーシスが誘導される。ER ストレスの原因となる unfolded protein は、遺伝子変異、ウイルス感染、炎症、有害化学物質により増加する。肝臓学領域では、HCV コア蛋白が ER ストレスを誘導している。また、最近では、脂肪酸が ER ストレスを介してインスリン抵抗性を誘導し、NAFLD を発症させることが注目されている。

鉄は必須元素であるが、同時に強い毒性があるため、鉄代謝恒常性の破綻は臓器障害の原因となる。肝臓は鉄の貯蔵臓器であり、代謝調節臓器でもある。肝細胞は主に鉄感知と炎症性シグナルによってヘプシジンを発現しているが、ER ストレスシグナルも転写因子 CREBH, CHOP を介して発現調節している。また、鉄貯蔵蛋白：フェリチン、鉄トランスポーター蛋白：フェロポルチン (FPN1) も ER ストレス誘導転写因子で発現調節されていると考えられている。つまり、ER ストレスシグナルは鉄代謝恒常性維持に重要な経路と言える。しかし、実際の肝疾患病態における意義に関しては不明である。加えて、鉄負荷による ER ストレスの誘導に関しては全く検討されていない。しかし、最近、遺伝性ヘモクロマトーシス (HH) の原因遺伝子 HFE の C282Y 変異、H63D 変異では ER ストレスを誘導すると報告された。これらの検討では変異蛋白が unfolded protein となって ER ストレスを誘導すると考察しているが、導入遺伝子の強制発現のモデルであり、疑問点も多い。そもそも鉄負荷によって細胞内に不安定鉄プールが増加すると、遊離の 2 価鉄が Fenton 反応、Harber-Weiss 反応によって活性酸素 ($\cdot\text{O}_2^-$) から強力なヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{HO}$) を産生し、蛋白質、脂質と反応する。よって、鉄が unfolded protein 増加に関与し ER ストレスを誘導する可能性がある。これに対し ER ストレスシグナルがヘプシジン発現を鉄過剰是正の方向に調節していることから、これは鉄による ER ストレスから回避機能と考えることができる。

これら知見・推論から、鉄は直接的または間接的に肝細胞の ER ストレスに関与し、正常状態では ER ストレス誘導転写因子によって鉄関連遺伝子発現にフィードバック制御

がかけられていると考えられる。そして、この UPR による制御系が破綻すると鉄代謝恒常性を維持することが困難になる。特に HepC, NAFLD ではウイルス蛋白、脂肪酸の影響でこの閾値が低い状態であると考えられる。この ER ストレス応答を介した鉄代謝調節系は、是非解明しなければならない重要な細胞内鉄代謝経路と考えられる。

(2) 鉄負荷マウスと高脂肪食負荷マウスを用いて ER ストレス応答遺伝子、鉄関連遺伝子発現を NGS トランスクリプトーム解析で検討し、鉄負荷による ER ストレス誘導を検討する。

(3) 本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

HepC, NAFLD の病態では病初期から ER ストレスが関与し、非硬変期からも鉄代謝異常を合併し、病期進展に寄与している。この病態背景から海外では抗ウイルス療法不応性の HepC や NASH に対して鉄キレート剤 (ICL670) の臨床治験が行われている。申請者は鉄負荷が細胞内酸化ストレスを介して ER ストレスを誘導し、さらに UPR 機能を低下させ、鉄関連分子の発現異常を招き、肝細胞内不安定鉄を増加させ、アポトーシスを誘導すると想定している。これまで肝臓病領域では鉄によるミトコンドリア、ミクロゾーム、リソゾームなどのオルガネラ機能障害に関する検討はあったが、ER ストレスに関するものは検討されていない。

本研究では鉄負荷による ER ストレス誘導とその破綻のメカニズムに関して最新技術を駆使して解明する。このような視点の肝臓病研究は非常に独創的と考えられる。本研究計画では遺伝子発現の網羅的解析が多いが、これは NGS の新技術があって可能となった。本研究の成果は将来のトランスレーショナル研究や橋渡し研究の理論的根拠となり、さらに鉄過剰や鉄酸化ストレスの新たなバイオマーカー、新規治療標的分子の探索につながると思われる。

2. 研究の目的

慢性肝疾患、特に C 型肝炎 (HepC)、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の病態において小胞体 (ER) ストレスの重要性が指摘されている。その原因分子としてウイルス蛋白と脂肪酸が指摘されているが、さらに重要な因子として鉄が ER ストレスを誘導すると想定する。一方で、ER ストレスシグナルが鉄代謝調節因子：ヘプシジンの発現を調節しており、鉄負荷による ER ストレスからの回避機能と考えられる。これらの調節系が破綻した時にアポトーシスが誘導される。本研究では鉄負荷による ER ストレス誘導とその破綻のメカニズムに関して次世代シーケンサ (NGS) を駆使して解明する。鉄キレート療法の理論的背景を得るだけにとどまらず、新規治療標的

子の同定も目指す。

3. 研究の方法

(1) 実験モデル・サンプリング

NAFLD モデルマウスの作成

8 週齢雄性 C57BL/6 マウスに通常飼料、または高脂肪食(F2HFD2、オリエンタル酵母、脂肪化カロリー比 82%)を 16 週間投与し屠殺し、血液および肝臓を採取し、以後の解析にに用いた。

(2) ER ストレス関連遺伝子、鉄関連遺伝子に対する NGS トランスクリプトーム解析

ER ストレスセンサー：IRE1, ATF6, PERK, XBP1, eIF2, ATF4, ER ストレス誘導転写因子：CHOP, CREBH, ER シャペロン発現：GRP78/BiP, GRP94/HSP90, GRP170/HSP70, calnexin, calreticulin, HSP47, ERp29, Protein disulfide isomerase (PDI), Peptidyl prolyl cis-trans-isomerase (PPI), ERp57, 鉄関連分子：Tf, HAMP, フェリチン H-L 鎖, TFR1, TFR2, HFE, ヘモジュベリン (HFE2), DMT1, FPN1, IRP1, IRP2, HO-1, mitochondria ferritin の網羅的解析。

(3) リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR)

サンプル RNA から cDNA を作成し、TaqMan プローブを用いて Hamp (ヘプシジン)、Bmper (BMP binding endothelial regulator)、18S rRNA に対して RT-qPCR 解析を施行し、比較 Ct 法により遺伝子発現量を測定した。

(4) ウェスタンブロット

肝組織あるいは免疫沈降されたマウス血漿サンプルから RIPA バッファーを用いてタンパク質を抽出し、SDS 緩衝液と混合して電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写してリン酸化 SMAD と SMAD1、Actin、BMPER、BMP6 の発現量を解析した。

(5) 免疫化学染色・免疫蛍光染色

肝組織切片における BMPER 発現をジアミノベンジジン発色による免疫化学染色で評価した。初代培養肝細胞と非実質細胞における E-Cadherin と VE-Cadherin の発現を DAPI も加えた 3 重免疫蛍光染色により評価した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食負荷マウスにおける脂肪肝、肝炎の発症と鉄動態の変化

通常食負荷マウス (R) に比べて高脂肪食負荷マウス (HF) では有意な体重増加、肝重量の増加、血漿 ALT 値の増加を認めた (BW; R 群, 28.6 g; HF 群, 51.9 g; $P < 0.0001$: 肝重量; R 群, 1.24 g; HF 群, 2.91 g; $P = 0.0029$: ALT; R 群, 19.5 U/l; HF 群, 147.6 U/l; $P < 0.0001$)。HF では肝組織に著明な脂肪沈着を認めたが、明らかな炎症細胞浸潤は認めなかった。血漿鉄と血漿フェリチンは有意に高値を示した (鉄; R 群, 136.1 $\mu\text{g/dl}$; HF 群, 172.1 $\mu\text{g/dl}$; $P = 0.033$: フェリチン; R 群, 593.5 ng/ml; HF 群, 826.2 ng/ml; $P < 0.0001$)。肝内鉄含有量はいずれの群においても上昇

しておらず、鉄染色でも肝内鉄沈着を認めなかった。

(2) 網羅的遺伝子発現解析

網羅的に遺伝子発現を解析した 38114 種類の遺伝子のうち、有意な発現変動が認められた遺伝子数は 2314 種類であった。このうち、ヘプシジン発現に関連する遺伝子に絞ると Bmp4、Bmper、Epor (エリスロポエチン受容体)、Gdf15 (増殖分化因子 15)、Hamp、Hfe2 (ヘモジュベリン) の 6 遺伝子であった。

(3) ヘプシジン発現と調節因子の検討

Hamp 遺伝子の発現が HF で低下していることを RT-qPCR で確認した (R 群, 1.03; HF 群, 0.53; $P = 0.0029$)。翻訳産物の血漿ヘプシジン濃度は HF で有意に低下していた (R 群, 140.7 ng/ml; HF 群, 77.7 ng/ml; $P = 0.0141$)。

Bmp4、Bmper、Hfe2 の 3 遺伝子の産物が BMP シグナルに参与するため、伝達分子である SMAD のリン酸化を検討し、HF で有意な低下を認めた (R 群, 0.99; HF 群, 0.60; $P = 0.0158$)。

(4) マウスの BMPER 発現の検討

ヘプシジン発現低下とリン酸化 SMAD 発現低下に対して Bmp4、Hfe2 の挙動は相反する動きである。一方、Bmper 発現増加はそれに対応する発現変動であった。よって、以後の検討を BMPER に注目して進めた。マウス肝組織の BMPER をコードする Bmper mRNA 発現は HF で有意な増加を示した (R 群, 1.06; HF 群, 5.29; $P < 0.0001$)。BMPER が BMP6 と結合して抑制的に働くことから、R と HF の各群から得られた血漿を BMPER 抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロットで蛋白発現を解析した。血漿中の BMPER は BMPER 抗体で選択的に免疫沈降され、BMPER の阻害するターゲットである BMP6 が共免疫沈降されていた。

(5) マウス肝組織の肝細胞と非実質細胞における BMPER 発現解析

通常食投与マウス肝組織の免疫化学染色では BMPER が類洞内腔に陽性像を示した。マウス肝組織における BMPER 発現局在を確認するため、肝細胞と類洞内皮細胞を主とする非実質細胞を分離した。各細胞における Bmper mRNA 発現を測定したところ、非実質細胞で有意に高値を示した (肝細胞, 1.00; 非実質細胞, 34.42; $P < 0.0001$)。

(7) 考案

本研究では、高脂肪食負荷マウスにおいて鉄関連遺伝子の発現変化を認めたが、ER ストレス応答遺伝子との関連においては明らかなのは発見できなかった。

可染鉄を認めない軽度の肝内鉄過剰状態を合併する 16 週間の高脂肪食負荷による脂肪肝モデルマウスで、網羅的遺伝子発現解析を行った。脂肪肝マウスにおける鉄過剰状態の機序に鉄代謝制御分子ヘプシジンの発現変化を想定してはいるが、特定の遺伝子に絞り込まないで遺伝子発現を網羅的に解析した。Hamp 遺伝子の発現と翻訳蛋白ヘプシジンの発現が低下していることを確認し、発現変

動遺伝子の中にヘプシジン発現変動に関与する遺伝子として5遺伝子を見出した。ヘプシジンは鉄吸収を負に調節する作用があり、発現低下によって鉄吸収が亢進して鉄過剰の原因となる。ヘプシジン発現低下の原因として、ヘプシジンを調節する主な上流シグナルである SMAD のリン酸化が低下していることを見出した。そして5遺伝子の中で、SMADシグナルを抑制的にする方向で変動している Bmper 遺伝子に注目した。

BMPER は BMP2,4,6 の各々と結合しそのシグナル伝達を阻害することが知られており、低トランスフェリン血症マウスにおいて BMPER が BMP-SMAD シグナルを抑制することでヘプシジン発現を抑制することが報告されている[2]。本研究では脂肪肝モデルで BMPER 発現亢進がヘプシジン発現抑制の原因であることを示した。さらに BMPER が血中で BMP6 と結合していることを証明した。これまでの報告では、肝組織中における BMPER 発現局在は肝細胞と想定されていたが、本研究では BMPER の発現が非実質細胞において優位であることを示した。ヘプシジン発現調節において、促進系の BMP6 の発現が肝細胞のオートクライン調整より、非実質細胞からのパラクライン調整の方が重要であると示されているが[3]、抑制系の BMPER の発現もパラクラインで作用することは特筆すべき発見である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Suzuki Y, Ohtake T, Nishiguchi S, Hashimoto E, Aoyagi Y, Onji M, Kohgo Y; Japan Non-B, Non-C Liver Cirrhosis Study Group. Survey of non-B, non-C liver cirrhosis in Japan. *Hepatol Res.* 2013 Oct;43(10):1020-31. doi: 10.1111/hepr.12056. 査読有

Nata T, Fujiya M, Ueno N, Moriichi K, Konishi H, Tanabe H, Ohtake T, Ikuta K, Kohgo Y. MicroRNA-146b improves intestinal injury in mouse colitis by activating nuclear factor- κ B and improving epithelial barrier function. *J Gene Med.* 2013 Jun-Jul;15(6-7):249-60. doi: 10.1002/jgm.2717. 査読有

Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatol Res.* 2014 Aug;44(8):920-34. doi: 10.1111/hepr.12199. 査読有

Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, Shindo M, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto

Y, Kohgo Y. Upregulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon γ . *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Feb;29(2):387-94. doi: 10.1111/jgh.12348. 査読有

Fujiya M, Konishi H, Mohamed Kamel MK, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene.* 2014 Oct 2;33(40):4847-56. doi: 10.1038/onc.2013.429. 査読有

Hasebe T, Sawada K, Nakajima S, Maeda S, Abe M, Suzuki Y, Ohtake T, Hasebe C, Fujiya M, Kohgo Y. Effective control of relapsing disseminated intravascular coagulation in a patient with decompensated liver cirrhosis by recombinant soluble thrombomodulin. *Intern Med.* 2014;53(1):29-33. 査読有

Addo L, Tanaka H, Yamamoto M, Toki Y, Ito S, Ikuta K, Sasaki K, Ohtake T, Torimoto Y, Fujiya M, Kohgo Y. Hepatic nerve growth factor induced by iron overload triggers defenestration in liver sinusoidal endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jan;1852(1):175-83. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.11.014. 査読有

Kashima S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. Polyphosphate, an active molecule derived from probiotic *Lactobacillus brevis*, improves the fibrosis in murine colitis. *Transl Res.* 2015 Aug;166(2):163-75. doi: 10.1016/j.trsl.2015.02.002. 査読有

Ando K, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Ikuta K, Tanabe H, Ohtake T, Kohgo Y. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Improves the Intestinal Injury by Regulating Apoptosis Through Trefoil Factor 2 in Mice with Anti-CD3-induced Enteritis. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Jul;21(7):1541-52. doi: 10.1097/MIB.0000000000000401. 査読有

[学会発表](計13件)

Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Nakajima S, Abe M, Tanaka H, Kohgo Y. Fatty acids induce the expression of TLRs as the pro-inflammatory state in NAFLD mice liver. The 64th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. November 1-5, 2013, Washington, DC

澤田康司、前田重明、阿部真美、大竹孝明、高後裕 .NAFLD 病態における TLR シグナル異常と腸内フローラの意義 . 第 49 回日本肝臓学会総会、ワークショップ 1 : ASH, NASH の最前線、2013 年 6 月 6 日、東京

大竹孝明、澤田康司、高後裕 . アルコール性肝障害の肝線維化進展および発癌リスク予測に関する解析 . 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (J-ANDAC 2013)、第 48 回日本アルコール・薬物医学会、シンポジウム「アルコール性肝障害の新たな展開 : 新診断基準をふまえて」2013 年 10 月 4 日、岡山コンベンションセンター

Sasaki K, Ikuta K, Tanaka H, Ohtake T, Torimoto Y, Fujiya M, Kohgo Y. Splicing abnormality of HAMP transcript by frameshift-causing deletion of SF1 gene. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、横浜

澤田康司、長谷部千登美、前田重明、阿部真美、鈴木康秋、大竹孝明、高後裕 . Drug free を目指した B 型慢性肝炎 sequential 療法の HBs 抗原推移に関する検討 . JDDW 2013、第 17 回日本肝臓学会大会、2013 年 10 月 9~12 日、東京

大竹孝明、中嶋駿介、前田重明、澤田康司、阿部真美、鈴木康秋、長谷部千登美、高後裕 . 選択的バソプレシン V2-受容体拮抗剤トルバプタンが有効であった難治性腹水の 3 例 . JDDW 2013、第 17 回日本肝臓学会大会、2013 年 10 月 9~12 日、東京
鈴木康秋、大竹孝明、高後裕 . 我が国における ASH/NASH 肝癌の実態 -非 B 非 C 肝硬変の全国集計調査より-. JDDW 2013、第 17 回日本肝臓学会大会 ワークショップ 8. 「ASH/NASH 肝癌の臨床像とフォローアップ体制の確立」2013 年 10 月 9~12 日、東京

Tanaka H, Ohtake T, Addo L, Yamamoto M, Toki Y, Sawada K, Nakajima S, Hasebe T, Ikuta K, Sasaki K, Torimoto Y, Fujiya M, Kohgo Y. Iron-overload alters lipid metabolism and Ras signaling independent of oxidative stress in mouse liver tissue by whole RNA sequencing. The 65th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. November 7-11, 2014, Boston.

澤田康司、大竹孝明、中嶋駿介、阿部真美、藤谷幹浩、高後裕 . Cathelicidin 誘導を介した脂肪酸の Toll-like receptors 発現誘導に関する検討 . 第 100 回日本消化器病学会総会、2014 年 4 月 23-26 日、東京 .

田中宏樹、中嶋駿介、澤田康司、阿部真美、生田克哉、佐々木勝則、大竹孝明、鳥本悦宏、藤谷幹浩、高後裕 . 鉄過剰が誘導

するエネルギー代謝異常 トランスクリプトーム解析による肝発癌関連分子の探索 . 第 50 回日本肝臓学会総会、ワークショップ 9 「肝障害における金属元素の役割」2014 年 5 月 29-30 日、ホテルニューオータニ東京 .

澤田康司、大竹孝明、高後裕 . NAFLD 病態における腸内フローラ・脂質代謝・自然免疫の相互作用 . 第 51 回日本肝臓学会総会 (一般演題口演) 2015 年 5 月 21 日 同仁堂 (熊本)

長谷部拓夢、大竹孝明、高後裕 . 肝非実質細胞産生の BMPER がマウス脂肪肝の鉄代謝異常を誘導する . 第 51 回日本肝臓学会総会 パネルディスカッション 6 : 生活習慣がもたらす肝疾患 : アルコール性肝障害と NAFLD . 2015 年 5 月 22 日 熊本ホテルキャッスル

長谷部拓夢、澤田康司、中嶋駿介、大竹孝明、藤谷幹浩、高後裕 . マウス脂肪肝鉄代謝異常における非実質細胞パラクライン作用に関する研究 . JDDW 2015 第 19 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2015 年 10 月 8 日 グランドプリンスホテル新高輪

〔産業財産権〕

出願状況 : なし

取得状況 : なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大竹 孝明 (OHTAKE, Takaaki)

旭川医科大学・医学部・客員教授

研究者番号 : 10359490

(2) 研究分担者

佐々木 勝則 (SASAKI, Katsunori)

旭川医科大学・医学部・特任教授

研究者番号 : 60336394

田中 宏樹 (TANAKA, Hiroki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70596155