

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461452

研究課題名(和文)炎症性貧血におけるヘプシジン-フェロポルチン制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文)The elucidation and clinical application of the hepcidin-ferroportin regulation mechanism in inflammatory anemia

研究代表者

中沢 宗健 (Nakazawa, Soken)

大阪大学・産業科学研究所・招へい准教授

研究者番号：00535958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：複数の炎症性サイトカインによるヘプシジンの産生と炎症性貧血(AI)への関与機序が不明である。本研究は、サイトカイン阻害治療をツールとした関節リウマチ(RA)貧血の発症機構の解析により、IL-6阻害治療によりRA患者の血中ヘプシジンが低下し、ヘモグロビンの正常化が見られた一方、TNF- α 阻害治療ではヘモグロビンとヘプシジンを正常化させることは困難であることによって、IL-6がヘプシジンの産生亢進によるRA貧血に直接的に関与することが明らかになった。基礎的研究によって、IL-6によるヘプシジンの発見増強及びTNF- α によるヘプシジン発見抑制に関与する新しいメカニズムを示した。

研究成果の概要(英文)：The role of hepcidin and its regulation by multiple inflammatory cytokines in patients with anemia of inflammation (AI) is still largely unknown. In this study, by using anti-cytokine biologics as a tool, we investigated the mechanism of AI in patients with rheumatoid arthritis (RA). We found that tocilizumab (an anti-IL-6 receptor antibody) can reduce serum hepcidin and improve anemia in RA patients, but TNF- α inhibitors (TNFi) displayed significantly weaker effects than tocilizumab on suppressing serum hepcidin levels and increase hemoglobin (Hb) levels. And serum hepcidin reduction by TNFi was accompanied by a decrease in serum IL-6 suggesting that TNFi on reduction of hepcidin was indirect. Our findings indicated that IL-6-induced hepcidin mediated iron metabolism contribute to the pathogenesis of RA-related anemia directly. We also identified the novel regulation mechanisms involving IL-6-mediated induction and TNF- α -mediated inhibition of hepcidin production.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：炎症性貧血 ヘプシジン IL-6 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA)、癌、キャッスルマン病 (CD) など長期炎症状態が存在する多種多様な疾患に伴う貧血は、炎症性貧血 (Anemia of inflammation, AI) と呼ばれ、鉄の利用障害が関与する。炎症がなぜ貧血を誘導するのかその機序は不明であった。ところが 2000 年に、ヒトの血液と尿中から鉄代謝の調節機能を有する抗菌ペプチド Heparin (ヘプシジン) が発見された (Krause A, FEBS Lett. 2000)。そのヘプシジンは生体内鉄代謝における負の調節因子として、鉄輸送体のフェロポルチン (ferroportin) に直接結合し、十二指腸での鉄吸収の阻害とマクロファージからの鉄放出を阻害する機能を示す (Nemeth, Science. 2004)。肝臓から分泌されるヘプシジンは鉄負荷あるいはサイトカイン (IL-6 など) 刺激で増加する。Nemethら (J Clin Invest. 2004) は、肝細胞を用いた in vitro 実験系で IL-6 がヘプシジン発現を著明に増加させることを示した。ヒトでも IL-6 を静脈投与すると、鉄の低下とともに、ヘプシジン産生が上昇している。このような所見から、炎症性疾患では IL-6 によりヘプシジンが産生され、鉄の供給が低下し、機能的鉄欠乏性貧血に陥ると考えられる。我々は、IL-6 を分泌するキャッスルマン病に対し、抗 IL-6 受容体抗体治療により血清中ヘプシジンが低下し、引き続いて貧血関連因子の正常化が見られることにより、IL-6 がヘプシジンを介して炎症性貧血に直接的に関与することを証明した (Soken-Nakazawa J Song, Blood. 2010) (図 1)

図 1.

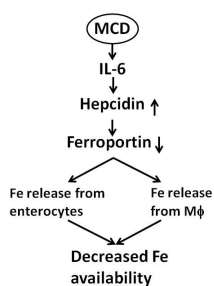
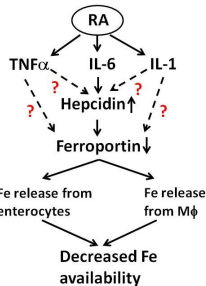


図 2.



しかし関節リウマチ (RA) 等多くの炎症性疾患の場合、複数の炎症性サイトカイン (IL-6、TNF α 、IL-1) の過剰産生が病態に関わっており、それを標的とする分子標的治療が RA に有効であるが、貧血改善度の相違が認められることにより、RA 貧血の原因は IL-6-hepcidin-ferroportin-axis 以外の機序があると考えられている (図 2)。

ところで IL-6 はヘプシジン発現を誘導する因子としても知られている。またヘプシジンのプロモーター上には STAT3、C/EBP β (NF-IL-6)、HNF4、AP-1 の結合領域が存在することが知られ、これらの転写因子の関与

が示唆されている。

2. 研究の目的

関節リウマチ (RA) 等多くの炎症性疾患は IL-6 以外に複数の炎症性サイトカインの機能亢進が認められる。多彩なサイトカインが生体内においてどのようにヘプシジンの発現を調節して、RA 貧血に関与するかについて全く解明されていない。今回 RA 患者に抗 IL-6R 抗体、抗 TNF α 抗体治療前後におけるヘプシジン 25 を含む鉄代謝マーカーと TNF α 、IL-6 を含む複数のサイトカインを経時的に測定・解析し、臨床病態の関連を検討する。基礎的研究としては、ヘプシジン発現における IL-6、TNF α また臨床から示唆された貧血関連因子の転写活性を調べる。このことにより、RA を代表とする慢性炎症における真の炎症性貧血病態機序を明らかにする。

3. 研究の方法

臨床的研究：RA に対する IL-6 や TNF α 阻害治療での貧血関連検査値とヘプシジン値の推移を検討する。インフォームド・コンセントを得た患者の臨床検査の残余血清を用いて、ヘプシジン、鉄代謝関連因子の測定を行う。ヘプシジンについては定量的 LC-MS 法を用いて測定する。EPO や BMP については ELISA 法にて測定する。血清鉄、フェリチン、Hb の測定は臨床検査データを用い、約 27 の網羅的サイトカインやケモカインの測定は、Bio-plex にて定量する。

基礎的研究：IL-6、TNF- α など複数のサイトカイン刺激による、異なるヘプシジン及び ferroportin の発現機序をシグナル伝達と転写レベルで解析する。単球細胞株の U937 細胞や肝腫瘍細胞由来の PLC/PEF/5、Hep3B、HepG2 細胞株に、炎症性サイトカインや BMP、エリスロポエチン (Erythropoietin, EPO) などを添加し、ferroportin、ヘプシジン、シグナル転写因子、鉄代謝関連因子の発現変化を調べる。ヘプシジンなど鉄代謝関連遺伝子を発現ベクターに組み込んで細胞株に導入し、これらの発現や相互作用を Real-time PCR や Luciferase Assay、Western-blot、EMSA、Chip-Assay などを用いて調べる。

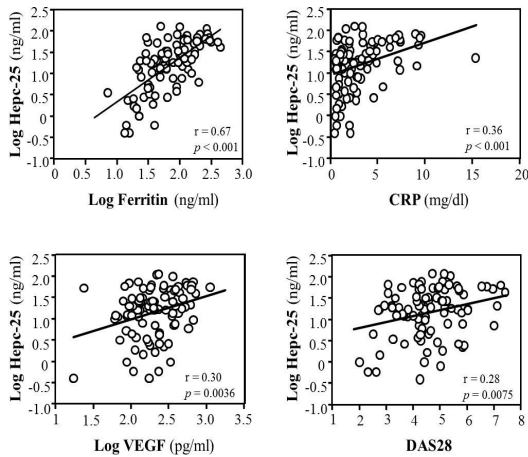
4. 研究成果

本研究は、炎症性サイトカインによる hepcidin の産生が慢性貧血に関与する機序の解明を目指した。主な研究成果を以下にまとめる。

1). 95 名 RA 患者に抗 IL-6 receptor 抗体 (tocilizumab, TCZ)、抗 TNF α 抗体 (TNFi) 治療前後におけるヘプシジン 25 を含む鉄代謝マーカーと TNF α 、IL-6 を含む複数のサイトカインを経時的に測定・解析し、臨床病態の関連を検討した。その結果：

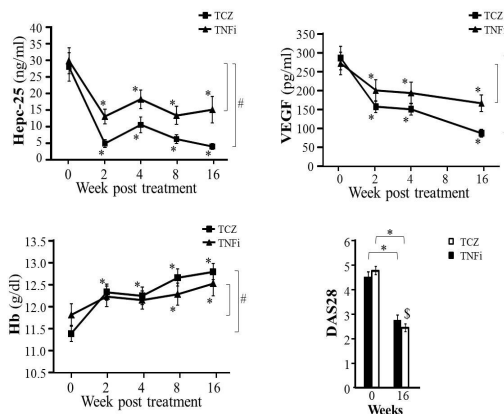
(1) RA患者の血中に IL-6, BMPs, EPO, TNF- α を含む複数の hepcidin の正、負制御因子が上昇した。血清ヘプシジン値は鉄貯蔵蛋白 Ferritin、急性期タンパク質 CRP、疾患活動性(DAS28)と正相関を示したが(図3) IL-6 値とは有意な相関性を示されなかった。この結果より、IL-6 のみならず、複数の炎症性サイトカインは hepcidin 産生に関わっており、この hepcidin 産生量は貧血及びRA病態に影響を与えることを示唆した。

図3



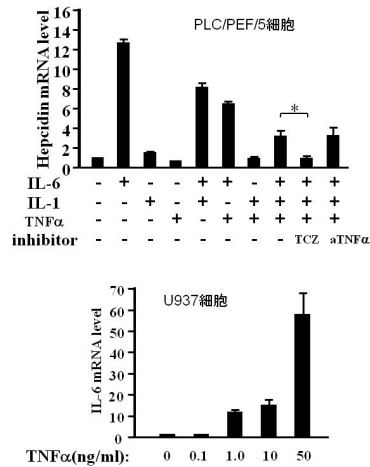
(2) 血清ヘプシジン値が治療前から高値であり、サイトカイン阻害治療によりヘプシジンが早期に低下し、その後貧血(Hb)と関節・全身炎症症状(CRP, DAS28, VEGF)は徐々に改善した。TCZとTNFi両者とも有効であったが、TCZはTNFiよりさらに有効であった。(図4)

図4



(3) 培養実験においても、U937単球細胞株におけるIL-6産生はTNF刺激により、dose dependenceで増加された。一方、IL-6+TNF+IL-1刺激におけるPLC/PEF/5細胞のヘプシジン産生は、TCZで完全に抑制したが、TNFiでは抑制しなかった(図5)。

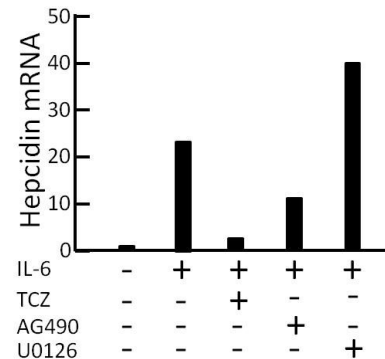
図5



以上の結果から、RA患者に対するTCZ治療により血清中ヘプシジンが低下し、ヘモグロビンの正常化が見られたことによって、IL-6がヘプシジンの産生亢進によるRA貧血に直接的に関与することを明らかにした。一方、TNFi治療ではヘモグロビンとヘプシジンを正常化させることは困難であり、また、血清ヘプシジン低下に伴うIL-6の減少、in vitroの実験でもTNF-によるヘプシジン産生の誘導を示されなかったことから、TNF-は直接にヘプシジンを介してRA貧血に関与しないことを示唆した。

2). ヒト化抗IL-6受容体抗体(tocilizumab), Jak2阻害剤(AG490), MAPKの阻害剤(U-0126)などを用いて、肝細胞におけるIL-6刺激後のhepcidinの発現を検討したところ、IL-6によるhepcidinの産生はtocilizumabによって完全に抑制され、AG490が部分的に抑制した。一方、U-0126はIL-6によるhepcidinの発現を抑制せず、逆に増強させた。すなわち、IL-6シグナル下流に位置するJAK/STAT3系はhepcidinの発現を増強させる。一方、IL-6シグナル下流のMAPK/CEBP β 系は、抑制傾向を示した(図6)。この結果より、IL-6刺激の際にJak2/STAT3とMAPK/CEBP β シグナル伝達とはhepcidin発現作用が異なることを示唆した。

図6



3). 肝細胞株 (Hep3B と HepG2) を用いてリアルタイム定量的 RT-PCR の系で、BMP6 による hepcidin の発現誘導も、IL-6 によるのと同様に、TNF- α の刺激により、dose dependence で抑制された。従って、TNF- α による hepcidin の抑制は STAT3 と Smad 経路によらず、新しい pathway を有することが示唆された。続いて (1) 肝細胞株 (Hep3B と HepG2) を用いてリアルタイム定量的 RT-PCR の系で、肝細胞内在性 hepcidin mRNA の発現は TNF- α 刺激によって抑制された同時に、転写因子 C/EBP α mRNA の発現も同じ pattern で抑制されたことが確認された。(2) hepcidin プロモーター (pGL3-hepc-624) と C/EBP α 転写因子の plasmid の強制共発現では、TNF- α 刺激によって抑制された hepcidin プロモーター (pGL3-hepc-624) のルシフェラーゼ活性を元に戻すことが出来た。

以上の結果より、炎症性病態における TNF- α 産生は転写因子 C/EBP- α 発現の抑制及び C/EBP α の hepcidin プロモーターへの結合阻害によって、炎症生体における hepcidin の産生が抑制されることを示唆した。

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 6 件)

1. Soken-Nakazawa J. Song and Kazuyuki Yoshizaki. Tocilizumab for Treating Rheumatoid Arthritis: an Evaluation of Pharmacokinetics/Pharmacodynamics and Clinical Efficacy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* (2015) 11:307-316.
2. Uno K, Yoshizaki K, Iwahashi M, Yamana J, Yamana S, Tanigawa M, Yagi K. Pretreatment Prediction of Individual Rheumatoid Arthritis Patients' Response to Anti-Cytokine Therapy Using Serum Cytokine / Chemokine/ Soluble Receptor Biomarkers. *PLoSOne.* (2015) 10(7):e0132055.
3. Takasawa K, Tomosugi N, Takaeda C, Maeda T, Ueda N. Regulation of Hecpudin-25 by Short- and Long-Acting rhEPO May Be Dependent on Ferritin and Predict the Response to rhEPO in Hemodialysis Patients. *Nephron Extra.* (2014)16;4(1):55-63.
4. Soken-Nakazawa J Song, Mitsuhiro Iwahashi, Naohisa Tomosugi, Kazuko Uno, Jiro Yamana, Seizou Yamana, Tomoyasu Isobe, Hiroki Ito, Hiroshi Kawabata and Kazuyuki Yoshizaki. Comparative Evaluation of the Effects of Treatment with Tocilizumab and TNF- α Inhibitors on

Serum Hecpudin, Anemia Response and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* (2013)15:R141.

5. Tomoyasu Isobe, Soken-Nakazawa J. Song, Prabha Tiwari, Hiroki Ito, Yuki, Yamaguchi and Kazuyuki Yoshizaki. Activation-induced Cytidine Deaminase Auto-activates and Triggers Aberrant Gene Expression. *FEBS letter.* (2013) 587: 2487-2492.
6. Prabha Tiwaria, Lokesh P. Tripathib, Teppei Nishikawa-Matsumuraa, Shandar Ahmadb, Soken-Nakazawa J. Song, Tomoyasu Isobe, Kenji Mizuguchi, Kazuyuki Yoshizaki. Prediction and Experimental Validation of a Putative Non-consensus Binding Site for Transcription Factor STAT3 in Serum Amyloid A Gene Promoter. *BBA-General Subjects.* (2013)1830:3650-3655.

[学会発表](計 10 件)

1. Yoshizaki K, Soken-Nakazawa J Song and Uno K. Opposite role of Soluble Forms of IL-6 Receptor, sIL-6R and sgp130, on the Regulation of Inflammatory Status in Rheumatoid Arthritis. 12th World Congress on Inflammation. Boston, USA. Aug 8-12, 2015.
2. Kazuyuki Yoshizaki, Soken Nakazawa and Kazuko Uno. Two Soluble Forms of IL-6 Receptor, sIL-6R and sgp130, Regulate Physiological Status and Affect Inflammatory Status Pathologically. FOCIS2015. San Diego, California, USA. June 24-27 2015.
3. Kazuyuki Yoshizaki, Soken-Nakazawa J. Song and Hiroshi Kawabata. Suppressing Hecpudin by Tocilizumab Effectively Improve Anemia in Inflammatory Diseases: Clinical Evidence and Basic Mechanisms. The 56th ASH Annual Meeting, San Francisco, CA, USA. Dec 6-9, 2014.
4. Soken-Nakazawa J. Song and Kazuyuki Yoshizaki, Tocilizumab is More Effective than Tumor Necrosis Factor- α Inhibitors for Improving Anemia in Rheumatoid Arthritis by Inhibiting Hecpudin Production. MidTerm Conference of ICIS, Interleukin 6 Biology-Pathophysiology-Therapy. Kiel Germany. (As an Invited Speaker), May 14-17, 2014.
5. Kazuyuki Yoshizaki and Soken-Nakazawa J Song. Mechanism of IL-6 induced SAA production and amyloid A deposition in AA Amyloidosis patients with RA. XIVth International Symposium on Amyloidosis. Indianapolis, Indiana, USA. April

- 27-May 1, 2014.
6. Soken-Nakazawa J. Song, Hiroshi Kawabata and Kazuyuki Yoshizaki. Analysis of the Molecular Mechanisms Leading to Significantly Higher Serum Heparin and More Severe Anemia in Multicentric Castleman's Disease (MCD) Patients Than in Rheumatoid Arthritis (RA) Patients. The 55th ASH Annual Meeting, New Orleans USA, Dec 6-10. 2013.
 7. Kazuyuki Yoshizaki and Soken-Nakazawa J Song. Different mechanism of anemia in chronic inflammatory disease and improvement of anemia by IL-6 blocking therapy. International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR). San Francisco USA, Sep 28-Oct 3, 2013
 8. 吉崎和幸, 中沢宗健. ヘプシジンを介する炎症性貧血のサイトカイン制御機構. 第34回日本炎症再生学会, 京都 2013.7.2-3
 9. 吉崎和幸, PLABHA Tiwari¹, 中沢宗健, 松村哲平, 荻原圭祐, 伊東大貴. AA アミロイドーシスにおける IL-6 による血清アミロイド AA (SAA) 産生メカニズムとその IL-6 標的治療. 第42回日本臨床免疫学会, 東京 2014.9.25-27
 10. 吉崎和幸, 中沢宗健. サイトカインによる急性期タンパク (SAA, CRP, Heparin) 発現機序. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会 -, 札幌 2014.6.19-20

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沢宗健 (Soken Nakazawa)

大阪大学 産業科学研究所 招へい准教授

研究者番号: 00535958

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

吉崎和幸 (Kazuyuki Yoshizaki)

大阪大学 産業科学研究所 特任教授

研究者番号: 90144485

友杉直久 (Naohisa Tomosugi)

金沢医科大学 医学部 教授

研究者番号: 80155580

川端 浩 (Hiroshi Kawabata)

京都大学 医学部 講師

研究者番号: 10329401

宇野賀津子 (Kazuko Uno)

(財)ルイ・パストゥール医学研究センター

研究室室長

研究者番号: 50211082

谷川美紀 (Miki Tanigawa)

大阪大学 産業科学研究所 研究員

研究者番号: 10604635

伊東大貴 (Hiroki Ito)

大阪大学 産業科学研究所 招へい研究員

研究者番号: 60590635