

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830092

研究課題名(和文) 鉄過剰が誘導する糖・脂質代謝異常 肝組織における新規発癌予防・治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Aberrant energy metabolism induced by iron overload; Analysis for novel carcinogenic factor in liver tissue

研究代表者

田中 宏樹 (Tanaka, Hiroki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70596155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：鉄過剰モデル肝組織では正常肝組織と比較しコレステロール合成関連酵素、蛋白質プレニル化酵素の発現亢進が認められ、そのことが細胞増殖シグナルを促進する低分子G蛋白質の活性化に関与していた。一方、鉄を過剰に加えて培養したマウス初代培養肝細胞を用いた実験では、抗酸化剤としてN-アセチルシステインを加えても蛋白質プレニル化酵素の発現亢進は持続した。これらの結果は、肝臓における過剰の鉄は酸化ストレスとは独立した経路によりコレステロール合成関連酵素、蛋白質プレニル化酵素の発現を亢進させ発癌に関与することを示している。

研究成果の概要(英文)：In the iron-loaded mouse livers, genetic expression of metabolic enzymes involved in cholesterol biosynthesis, oxidation and prenylation (Fdps, FTase) were increased. These metabolic pathways are known to modulate Ras proteins post-translationally. In mouse primary hepatocytes, although iron-induced 8OHdG production was neutralized in the presence of the anti-oxidant NAC, phosphorylation of ERK1/2 was not canceled even in the presence of NAC. However, the iron chelator, deferoxamine reduced iron-induced expression of Fdps, FTase and phospho-ERK1/2. These results clearly indicate that iron affects not only the production of oxidative damage but lipid metabolism, thereby promoting a proliferation signal in the liver.

研究分野：病理学

キーワード：鉄過剰 肝癌 脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

肥満、糖尿病、高血圧など生活習慣病に伴う脂肪性肝障害(NASH/NAFLD)が近年増加傾向にある。また、肝臓全体に占めるNASH/NAFLDを背景とした肝臓の割合も増加している。この病態では肝臓内に脂肪とともに鉄が蓄積する。これまでは、生体内における過剰な鉄は主にフェントン反応を介した活性酸素産生亢進により遺伝子変異を誘導し肝臓の原因になっていると考えられている。しかしながら、生体内鉄の多彩な役割を考慮すると直接的遺伝子変異以外の要因も着目すべきである。しかしながら、これまでのところ活性酸素以外の要因で鉄がどのように肝臓に關与するのかは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

脂肪と鉄の細胞内蓄積は、肝臓におけるエネルギー代謝機構の破綻を誘導し、NASH/NAFLD肝臓の進展に直接・間接的に様々な影響を与えていると考えられる。そのため、この病態を理解するには糖・脂質代謝を含む代謝関連分子の複雑なネットワークを高感度かつ網羅的な手法で解析する必要がある。本研究では、ヒト肝臓組織、マウス鉄過剰モデル肝臓組織を対象にRNAシーケンシングによる網羅的遺伝子発現解析を行い、鉄の細胞内代謝に与える影響に着目し、NAFLD/NASHから発生する肝臓の予防・治療標的分子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス鉄過剰モデル

2.5% (w/w) のカルボニル鉄食を8週間与えたマウスと、鉄デキストラン (10 mg iron/day, 5日間) を腹腔内注射したマウスの2種類の鉄過剰モデルマウスを作成した。

### (2) RNAシーケンシング

マウスから肝臓を採取して全RNAを抽出した。全RNAからRibo minus kit (Thermo fisher scientific, Carlsbad, CA, USA)を用いてリボソームRNA分画を除去し、全cDNAライブラリーをtotal RNA-seq kit(Thermo fisher scientific)を用いて作成した。このライブラリーをサンプルとして高出力シーケンサー Ion Proton (Thermo fisher scientific)によりシーケンス反応を行い、全mRNAの配列を同定した。この配列データから解析ソフトウェア Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark)を用い、マウス全遺伝子の発現量を定量した。比較コントロール (n=3) と鉄過剰 (n=3) の比較において Students' t-test を行い、発現変動値が1.5倍以上かつP値が0.05以下の遺伝子を抽出

してパスウェイ解析 (Metacore, トムソンロイター社) を行って病態に關連するシグナル伝達経路、代謝経路を同定した。

### (3) 細胞培養

コラゲナーゼ還流法によりマウス肝細胞を分離培養した。10%牛胎児血清を加えたウイリアムズEメディウムを基本培養液として、各実験によりクエン酸鉄アンモニウム、N-アセチルシステイン、デフェロキサミン、ファルネシルトランスフェラーゼ抑制剤 FTI-277を加えて培養した。

### (4) 免疫蛍光染色

培養した初代培養マウス肝細胞を4%パラフォルムアルデヒドにより固定し、一次抗体として抗80HdG抗体、二次抗体としてAlexa Fluor 488標識抗マウスIgG抗体を反応させ観察を行った。

### (5) デジタルPCR法

マウス肝臓から抽出したRNAからhigh-capacity complementary DNA reverse transcription kit (Thermo fisher scientific)を利用してcDNAを作成し、マウスFdps、Fnta mRNAに対するTaqMan probeを用いてPCR反応を行った。それぞれのmRNAの発現量をQuantStudio 3D Digital PCR system (Thermo fisher scientific)により解析を行った。

### (6) ウェスタンブロッティング

マウス肝臓、初代培養肝細胞からRIPAバッファーを用いて蛋白質を抽出し、ポリアクリルアミドゲルで展開し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。抗FNTA抗体(Abcam, Cambridge, UK)、抗FDPS抗体(Abcam)、抗リン酸化ERK抗体(Cell signaling technology, Danvers, MA, USA)、抗アクチン抗体(BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)を1次抗体として反応させ、HRP標識抗ウサギ抗体あるいは抗マウス抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)抗体を2次抗体として反応させバンドを検出した。

### (7) ELISA法

マウス初代培養肝細胞内のリン酸化ERKについてAlphaScreen SureFire system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)を用いて定量解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マウス鉄過剰感組織におけるRNAシーケンシング

カルボニル鉄食では軽度、鉄デキストラン腹腔内注射では高度な組織内鉄沈着が認められた(図1A)。これらの肝臓におけるNAシーケンシングによる網羅的遺伝子発現解析を行った結果、コントロールとカルボニ

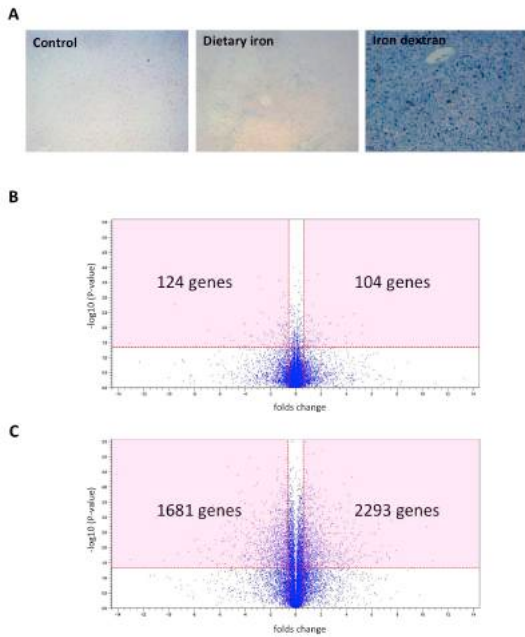


図1 マウス鉄過剰感組織と網羅的遺伝子発現解析(Volcano plot) A. マウス肝組織におけるベルリンブルー染色。B. コントロールとカルボニル鉄食による鉄過剰肝組織の遺伝子発現比較。C. コントロールと鉄デキストラン腹腔内注射による鉄過剰肝組織の遺伝子発現比較

ル鉄食の比較では 228 遺伝子(図 1 B)、コントロールと鉄デキストラン腹腔内注射の比較では 3974 遺伝子が優位に変動するものとして抽出された(図 1 C)。

## (2) パスウェイ解析

カルボニル鉄食による鉄過剰マウス肝組織ではコレステロール合成経路に関連する多くの酵素の発現が亢進しており、大きく影響を受けた経路として抽出された(図 2 A)。一方、鉄デキストラン腹腔内注射による鉄過剰マウス肝組織ではコレステロール合成経路に合わせて細胞骨格のリモデリング、低分子 G 蛋白質を中心とした細胞増殖シグナル経路が主に影響を受けるものとして抽出された(図 2 B)。これら 2 つの解析により、コレステロール合成経路を構成する酵素 FDPS (ファルネシルピロリン酸合成酵素)、低分子 G 蛋白質にコレステロール中間産物であるファルネシルピロリン酸を結合させる酵素 FNTA (ファルネシルトランスフェラーゼ) が両鉄過剰モデルに共通して発現亢進していた。

細胞増殖シグナルなどの起点となる低分子 G 蛋白質はファルネシルピロリン酸の修飾(蛋白質のファルネシル化)を受けて細胞膜に局在し、下流のシグナルを活性化する。すなわち、これらの結果から鉄過剰により活性化したコレステロール合成経路の中間産物が、低分子 G 蛋白質を中心とした細胞増殖シグナルを活性化させたと考えられた。

## (3) ファルネシル化酵素と細胞増殖シグナル分子の発現解析

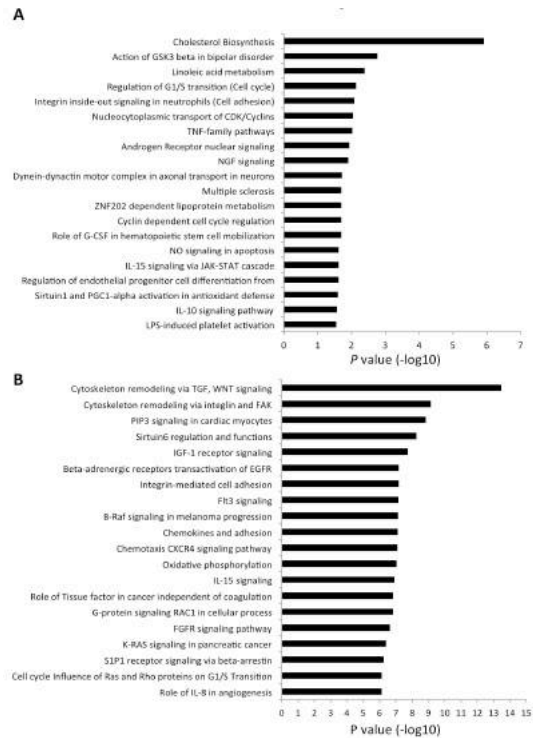


図2 パスウェイ解析 A. コントロールとカルボニル鉄食による鉄過剰肝組織。 B. コントロールと鉄デキストラン腹腔内注射による鉄過剰肝組織

網羅的遺伝子発現解析から同定されたファルネシル化関連酵素と代表的な低分子 G 蛋白質 Ras の下流シグナルの活性化を評価するためにデジタル PCR 法とウェスタンブロット法を行った。その結果、コントロール肝組織と比較して両鉄過剰モデル肝組織での FDPS および FNTA は mRNA と蛋白質両方において発現が亢進していた(図 3 A, B)。さらに、それと同調するように Ras 蛋白質下流の活性化を示す ERK のリン酸化も鉄過剰肝組織では亢進していた。

## (4) マウス初代培養肝細胞における解析

マウス初代培養肝細胞に鉄を加えて培養すると、鉄の濃度に依存して FDPS および FNTA 蛋白質の発現が亢進し、リン酸化 ERK の発現も亢進していた(図 4)。

## (5) マウス鉄過剰肝細胞における抗酸化剤および鉄キレート剤の影響の解析

肝細胞における過剰の鉄は活性酸素による障害を引き起こす。そこで、FDPS、FNTA、リン酸化 ERK の発現亢進が活性酸素による影響であるのか否かを確認する解析を行った。マウス初代培養肝細胞に鉄を加えると酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の染色が陽性となり、そこに抗酸化剤である N-アセチルシステインを加えると 8-OHdG が消失した(図 5 A, B)。しかしながら、FNTA mRNA の発現は鉄過剰により亢進して、N-アセチルシステインを加えても減弱せず、鉄キレート剤であるデフェロキサミンを加えることにより減弱

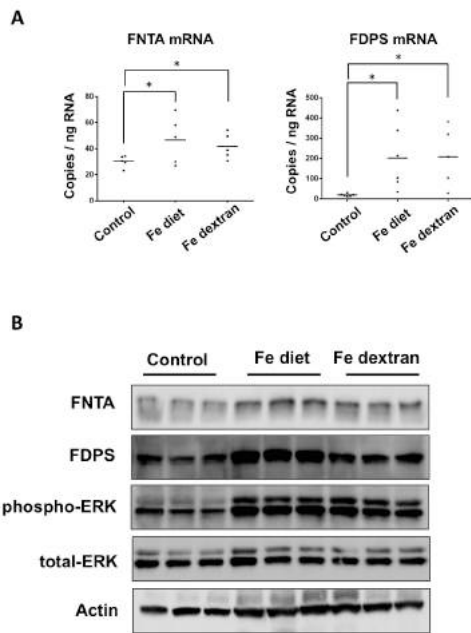


図 4 デジタル PCR およびウェスタンブロット法による遺伝子発現解析 A. デジタル PCR による遺伝子発現解析。 B. ウェスタンブロット法による遺伝子発現解析。

した。すなわち、鉄による FNTA mRNA の発現亢進は活性酸素の亢進に依存するものではなく、鉄そのものの存在がその発現に関連していることを示す。同様条件でリン酸化 ERK について解析を行うとやはり N-アセチルシステインを加えても減弱せず、鉄キレート剤であるデフェロキサミンやフェルネシルトランスフェラーゼ抑制剤 FTI-277 を加えることで減弱した (図 5 C)。

これらの結果は、肝組織における過剰鉄は酸化ストレスとは独立した経路によりコレステロール合成関連酵素、蛋白質プレニル化酵素の発現を亢進させ、肝発癌関連シグナルを亢進させている可能性を示唆している。

#### <引用文献>

1: Toyokuni S. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci.* 2009 Jan;100(1):9-16.

2: Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Iron overload and cofactors with special reference to alcohol, hepatitis C virus infection and steatosis/insulin resistance. *World J Gastroenterol.* 2007 Sep 21;13(35):4699-706.

3: Kew MC. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer.* 2014 Mar;3(1):31-40.

#### 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)

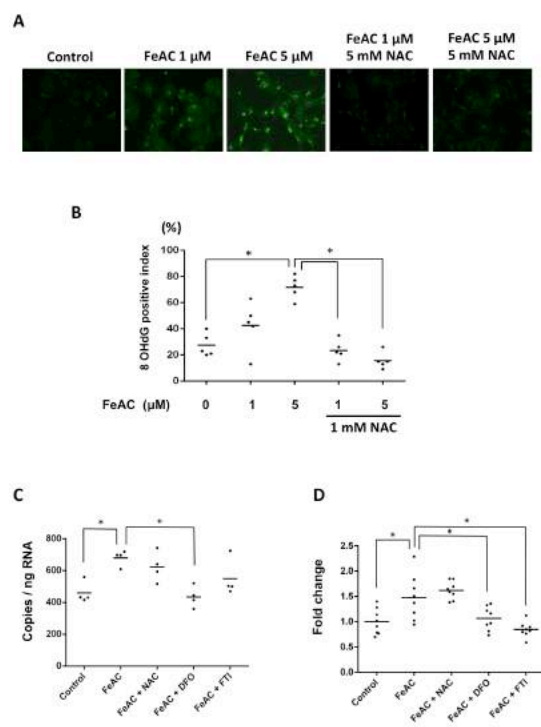


図 5 抗酸化剤および鉄キレート剤の影響の解析 A. 8-OHdG の蛍光免疫染色。 B. 8-OHdG 陽性細胞の割合。 C. デジタル PCR による FNTA mRNA の発現定量。 D. ELISA 法によるリン酸化 ERK の定量評価。

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Masayo Yamamoto, Hiroki Tanaka, Yasumichi Toki, Mayumi Hatayama, Satoshi Ito, Lynda Addo, Motohiro Shindo, Katsunori Sasaki, Katsuya Ikuta, Takaaki Ohtake, Mikihiro Fujiya, Yoshihiro Torimoto, Yutaka Kohgo. Iron-induced epigenetic abnormalities of mouse bone marrow due to aberrant activation of aconitase and isocitrate dehydrogenase. *Int J Hematol*, 2016 in press 査読有
- ② Takumu Hasebe, Hiroki Tanaka, Koji Sawada, Shunsuke Nakajima, Takaaki Ohtake, Mikihiro Fujiya, Yutaka Kohgo. Bone morphogenetic protein binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces iron overload in fatty liver mice. *J Gastroenterol*, 2016 in press 査読有
- ③ Lynda Addo, Hiroki Tanaka, Masayo Yamamoto, Yasumichi Toki, Satoshi Ito, Katsuya Ikuta, Katsunori Sasaki, Takaaki Ohtake, Yoshihiro Torimoto, Mikihiro Fujiya, Yutaka Kohgo. Hepatic nerve growth factor induced by iron overload triggers defenestration in liver sinusoidal endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jan;1852(1):175-83. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 田中宏樹 他、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、2014 年 5 月 29 日、東京都
- ② 田中宏樹 他、Iron-overload alters lipid metabolism and Ras signaling independent of oxidative stress in mouse liver tissue by whole RNA sequencing、米国肝臓学会 2014 年 11 月 10 日、Boston (USA)
- ③ 田中宏樹 他、肝発癌における鉄過剰の新たな役割：鉄過剰が引き起こす脂質代謝異常を介した細胞増殖シグナルの亢進、第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 19 日、米子市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中宏樹 (TANAKA, Hiroki)  
旭川医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70596155