

令和元年6月12日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19325

研究課題名(和文) NAFLD鉄過剰の網羅的遺伝子発現解析を用いた疾患メカニズムと治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Analyzing the mechanism of iron overload on NAFLD by RNA sequencing.

研究代表者

長谷部 拓夢 (Hasebe, Takumu)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：10596282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患では鉄代謝恒常性破綻することが知られているが、そのメカニズムはまだ十分に解明されていない。本研究で用いた脂肪肝マウスでは鉄代謝調節分子ヘプシジンの発現が低下しており、これらのメカニズムに関して遺伝子発現解析を行った。その結果、脂肪肝マウスの肝組織において、BMP-SMADシグナルを抑制するBMPERの発現亢進があることを見だし、BMPER発現亢進に伴うヘプシジン産生抑制が鉄代謝恒常性破綻をもたらすことを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肥満による脂肪肝モデルマウスを用いて、その病態形成に鉄過剰症が関与することについて検討した。その結果、鉄制御蛋白であるヘプシジンの発現低下が関与することを指摘し、この制御にBMPシグナルの破綻があることを見いだした。非アルコール性脂肪性肝疾患の病態は依然不明な点が多く、本研究結果が非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明につながるとともに、今後の治療介入に関して治療標的となる分子を検討する助けとなる。

研究成果の概要(英文)：Iron overload is often seen in non-alcoholic fatty liver disease condition, however, the mechanism is not clear. Our study demonstrated that the fatty liver model mice had decreased expression of iron regulating molecule hepcidin. To further elucidate the mechanism of iron overload, we performed RNA-seq. The result showed that the decreased hepcidin was due to decreased level of BMP-SMAD signal pathway. BMPER which is an inhibitor of BMP signaling was increased in the liver. Also we demonstrated that the BMPER is expressed by liver sinusoid epithelial cells. Thus, we described that increased BMPER in the fatty liver is one of the mechanisms for iron overload.

研究分野：肝臓

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 鉄過剰症 ヘプシジン BMP BMPER 類洞内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は肥満、インスリン抵抗性を背景に発症する脂肪肝-脂肪性肝炎 (NASH)-肝硬変-肝癌の一連の進行性慢性肝疾患である。NAFLD の患者は世界的に増加しており、病態進展により心血管系疾患、慢性腎疾患、肝外悪性腫瘍等の予後を規定する肝外病変のハイリスク群でもあることから、NASH の発生機序を解明し予防・治療戦略を構築することは急務である。

NAFLD では C 型肝炎やアルコール性肝障害と同様に、軽度から中等度の肝内鉄過剰蓄積がみられる。鉄過剰状態ではフェリチン蛋白に格納しきれない不安定鉄が増加し、reactive oxygen species (ROS) 産生増加を介した酸化ストレスを増強するため、NAFLD における肝組織および肝外諸臓器、血管内皮の障害の一因になっていると想定されている。

NAFLD の鉄代謝恒常性破綻メカニズムは未だ解明されていない。生体には鉄の排泄調節機構がなく、必要な鉄のほとんどをヘモグロビン鉄の再利用でまかない、その鉄代謝恒常性が絶妙に保たれている。その Key 分子が鉄代謝調節因子ヘプシジンである。ヘプシジンの機能はマクロファージや腸管上皮細胞に発現する鉄トランスポーター；フェロポルチン 1 (FPN1) の翻訳後分解を促進し、これら細胞からの鉄放出を抑制する。ヘプシジンの発現は TGF- β ファミリーの BMP-SMAD シグナル、炎症性サイトカインの IL6-STAT3 シグナル、トランスフェリン鉄による TfR シグナルの大きく 3 経路により調節を受ける。さらに最近、低酸素状態に関連する エリスロポエチンや GDF15、ER ストレスに関連する転写因子 C/EBP β 、さらに Ras/RAF/MAPK や mTOR シグナルの関与も指摘されている。このようにヘプシジン発現調節は複雑に連関しており、特定の分子のみの解析では病態の解明にまで至らない。

肝細胞のみのヘプシジン発現に注目した場合に上記のような経路が既知であるが、最近 BMP による調節機構には肝細胞自身のオートクラインループ以外に、肝非実質細胞がパラクライン作用により調節していることが示された。ペプチドの産生細胞として肝細胞がこれまで注目されていたが、他の非実質細胞の関与が示されたことで、肝内の細胞群が互いに作用し合って絶妙な恒常性を保っていることが示唆される。そのため NAFLD の鉄代謝異常の病態解明には、全肝組織における遺伝子・蛋白発現解析に加えて、肝臓の各構成細胞別の解析を行い、各細胞が肥満や NAFLD の環境においてどのようにクロストークしているのかを検討することが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、NAFLD における鉄代謝恒常性破綻のメカニズムの研究と病態進展に関わる分子の探索を行うことを目的とした。本研究開始にあたり、すでに過食による肥満モデルのレプチン欠損マウスと、高脂肪食負荷による脂肪肝マウスで鉄過剰症とヘプシジン発現低下を認める予備的な研究結果を得ていた。これらの研究結果から鉄代謝異常発現メカニズムの解析と新規分子の探索に加え、治療標的となり得るものの探索を進めるため、候補分子については *in vitro* での発現・調節のメカニズム解析も行うこととした。

以上のことから下記のような目的で研究を実施している。

- 1) NAFLD モデルマウスの鉄代謝以上と鉄代謝調節分子ヘプシジン発現変動に関与する分子を探索し特定するため、高出力シーケンサを用いた網羅的遺伝子発現解析を実施する。
- 2) 標的分子の産生や作用について解析するために初代培養細胞など *in vitro* の実験系を用いて解析を実施する。

3. 研究の方法

1) 脂肪肝マウスモデルの作成と鉄動態と鉄関連分子発現の解析

食餌負荷による脂肪肝モデルマウスとして、C57BL/6 に対する高脂肪食負荷による NAFLD マウスを作成した。高脂肪食負荷 NAFLD モデルでは 16, 48 週目の経時的な変化を検討する。このマウスに関して肝臓の組織染色 (Hematoxylin & Eosin, Azan) により炎症や線維化の評価を行った。体内鉄の評価としては、血清鉄およびフェリチンと肝内鉄含有量、肝組織の鉄染色による鉄沈着評価を行った。

鉄代謝異常に関して、肝内のヘプシジン発現を確認するために Hamp mRNA 発現および血清ヘプシジン濃度を測定した。

2) 肝臓の網羅的遺伝子発現解析と発現制御分子の解析

肝臓などの標的臓器から RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成し、高出力シーケンサ (Ion Proton, Life Technologies) を用いて、全 mRNA 解析 (RNA sequencing) による網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現変動は Genomics workbench (CLC bio) により解析し、得られた発現変動遺伝子のデータをパスウェイ解析ソフト (MetaCore, Thomson Reuters) に導入し、関連シグナルに関与する遺伝子発現変化と照らし合わせた。この結果から Key となるシグナル経路および分子を絞り込み、各シグナル経路の Key となる遺伝子発現や発現制御分子の変化について、mRNA 発現や蛋白発現の解析を行った。

3) マウス肝の細胞間連関の検討

候補分子に関して、マウス肝組織の免疫染色による局在を検討した。引き続き、C57BL/6 マウスの肝臓を用い、肝細胞および類洞内皮細胞に肝組織構成細胞を分離して候補分子の発現に関して検討した。

4. 研究成果

1) 高脂肪食負荷肥満マウスにおける鉄動態

16 週間の高脂肪食負荷によってマウスは著明な脂肪肝を呈するが、肝線維化は指摘されなかった。しかし、48 週間の高脂肪食負荷は Pericellular fibrosis で説明される肝線維化進展が指摘され、長期間の高脂肪食が肝炎の病態進展をもたらすことを示した。血清中の鉄やフェリチンは高脂肪食負荷によって増加し、鉄過剰状態が病態に関与することが示唆された。

2) 肥満マウスの網羅的遺伝子発現解析

Ion Proton を用いた RNA sequencing を実施し、通常食群と高脂肪食群で変動する遺伝子発現の経路を行った。引き続き、MetaCore で変化が起きたパスウェイ解析を行い、SMAD や STAT3 シグナルに関連する経路が多く抽出された。これらのパスウェイは鉄代謝調節分子ヘプシジンの発現調節にも関わることから、鉄代謝に関与する分子の発現に注目し、以降の検討を進めた。

3) 鉄代謝調節分子の発現変動

鉄代謝調節分子ヘプシジンは体内の鉄代謝を負に調節することが知られているが、高脂肪食摂餌による肥満マウスでは遺伝子発現および蛋白発現のいずれも低下していることを示した。ヘプシジン発現は SMAD やトランスフェリン受容体、STAT3 シグナルによって調節されることが知られており、RNA sequencing の解析結果から BMP-SMAD シグナルに関連する因子の変動がいくつか認められることがわかった(表 1)。蛋白発現解析から肥満マウスの肝内では SMAD のリン酸化が低下していることも指摘され、SMAD リン酸化を調節する分子 BMP (Bone Morphogenetic Protein) に注目して検討した。

	遺伝子	発現蛋白質	発現比	P 値
Hepcidin	<i>Hamp</i>	Hepcidin anti microbial peptide	-3.322	0.027
	<i>Bmp4</i>	Bone Morphogenetic Protein 4	1.601	0.032
	<i>Bmp6</i>	Bone Morphogenetic Protein 6	1.039	0.788
BMP-SMAD シグナル	<i>Bmper</i>	BMP Binding Endothelial Regulator	5.242	0.035
	<i>Bmpr2</i>	Bone Morphogenetic Protein Receptor 2	1.331	0.007
	<i>Hfe2</i>	Hemojuvelin	1.88	0.011
	<i>Smad1</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 1	1.011	0.936
トランスフェリン	<i>Tfrc</i>	Transferrin Receptor Protein 1	1.195	0.25
受容体シグナル	<i>Tfr2</i>	Transferrin Receptor Protein 2	-1.014	0.784
IL-6-STAT3	<i>Il6</i>	Interleukin 6	1	1
シグナル	<i>Stat3</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	1.236	0.004
その他	<i>Epor</i>	Erythropoietin Receptor	2.303	0.047
	<i>Gdf15</i>	Growth Differentiation Factor15	4.226	0.015

表 1. RNA sequencing での鉄代謝関連因子の発現変動

4) BMP 関連分子の発現変化

肝内でヘプシジン発現変化に関わる BMP は BMP6 とされている。しかし、前述の網羅的遺伝子発現解析では BMP6 に明らかな発現変動が指摘されなかった。これに対して、BMP と競合してそのシグナル伝達を抑制する BMPER (BMP binding endothelial regulator) の発現は網羅的遺伝子発現解析で亢進していることに注目した。BMPER は脂肪肝マウスの肝内遺伝子発現が亢進しており、BMPER が血清中に遊離している状態で BMP シグナルを抑制することから、血清中でも蛋白発現が亢進している傾向にあることを示した(図 1)。これらのことから、脂肪肝マウスでは BMPER 発現亢進が SMAD シグナル低下によるヘプシジン発現低下によって鉄過剰症をもたらしていることが明らかとなった。

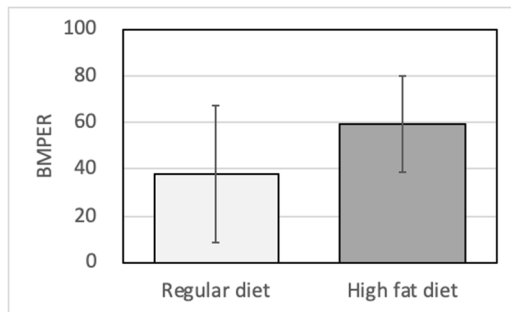


図 1. マウス血清の BMPER 濃度変化

5) BMPER 発現の局在

BMPER は前述のようにパラクライン作用が BMP シグナル発現に関与していると考えられた。このことから、肝内での BMPER 発現を検討すると、肝組織中では類洞内皮細胞に発現が局在していた。BMPER 発現が類洞内皮細胞にあることと確認するため、マウスの肝組織を用いて肝細胞と類洞内皮細胞を分離・初代培養し、遺伝子発現と蛋白発現の検討を行った。その結果、肝細胞ではヘプシジン遺伝子である Hamp mRNA 発現がある (図 2) のに対して、類洞内皮細胞では Bmper mRNA 発現が高く (図 3) 免疫染色でも類洞内皮細胞に BMPER 発現が認められた。これらのことから、BMPER は肝内の類洞内皮細胞が産生しており、脂肪肝の病態形成に関与することがわかった。

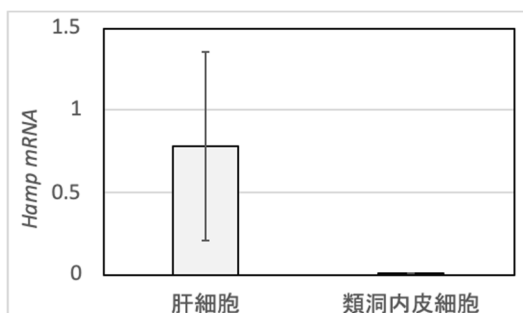


図 2. 初代培養細胞の Hamp mRNA 発現

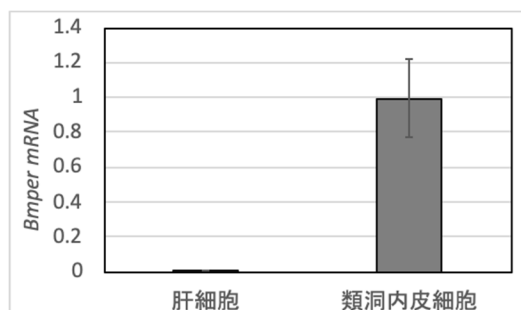


図 3. 初代培養細胞の Bmper mRNA 発現

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nakajima S, Tanaka H, Sawada K, Hayashi H, Hasebe T, Abe M, Hasebe C, Fujiya M, Okumura T. Polymorphism of receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta gene in the development of non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol. 2018 Jan;33(1):283-290. doi: 10.1111/jgh.13820.

Hasebe T, Tanaka H, Sawada K, Nakajima S, Ohtake T, Fujiya M, Kohgo Y. Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces iron overload in a fatty liver mouse model. J Gastroenterol. 2017 Mar;52(3):341-351. doi: 10.1007/s00535-016-1237-6.

〔学会発表〕(計 6 件)

長谷部拓夢, 澤田康司, 奥村利勝. EXO1 遺伝子多型が癌細胞増殖を促進し NAFLD 肝発癌に関与する. 第 42 回日本肝臓学会東部会. シンポジウム口演, 2018 年

澤田康司、田中宏樹、林秀美、長谷部拓夢、中嶋駿介、生田克哉、藤谷幹浩、奥村利勝、NAFLDにおける *Lactobacillus brevis* SBL8803 の有用性に関する検討、第 42 回日本肝臓学会東部会。一般口演。2018 年

長谷部拓夢、澤田康司、田中宏樹、中嶋駿介、藤谷幹浩、奥村利勝。NAFLD における肝発癌に EXO1 遺伝子多型が関与する。第 53 回日本肝臓学会総会。ワークショップ口演、2017 年

長谷部拓夢、田中宏樹、奥村利勝。高脂肪食負荷・筋萎縮マウスモデルによる NAFLD 進展の解析。第 103 回日本消化器病学会総会。パネルディスカッション口演、2017 年

Shunsuke Nakajima, Hiroki Tanaka, Koji Sawada, Takumu Hasebe, Hidemi Hayashi, Masami Abe, Chitomi Hasebe, Toshikatsu Okumura. Genetic polymorphism of PTPRD (rs35929428) and risk of non-alcoholic liver disease in Japanese. The International Liver Congress 2017, Poster presentation, 2017 年

Takumu Hasebe, Koji Sawada, Hiroki Tanaka, Shunsuke Nakajima, Mikihiro Fujiya, Toshikatsu Okumura. Genetic variant of exonuclease1 correlate with cirrhosis and hepatocellular carcinogenesis acting on dysplastic nodule. AASLD The Liver Meeting 2016, Poster presentation, 2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。