

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790484

研究課題名 (和文) 肝発癌におけるネオジェニンシグナル標的因子の網羅的探索

研究課題名 (英文) Comprehensive analysis of neogenin signaling factors in liver carcinogenesis.

研究代表者

土谷 博之 (TSUCHIYA HIROYUKI)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00403402

研究成果の概要：ネオジェニンシグナルの重要な因子であるヘモジュベリンが、レチノイドによって転写レベルで発現制御されることを見出した。またレチノイドはヘモジュベリンの発現抑制を介して、肝臓内鉄量とそれに伴う酸化ストレスを減少させることを明らかとした。このことからネオジェニンシグナルは、ヘモジュベリンが中心的な役割を持ち、肝酸化ストレスを亢進させることによって肝発癌に寄与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：1. 肝鉄代謝、2. 肝発癌、3. 肝酸化ストレス、4. ヘモジュベリン、5. ネオジェニン、6. レチノイド

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、肝臓に過剰蓄積した鉄が、慢性肝炎からの肝癌への進展における酸化ストレスの亢進に重要な役割を担っているとして注目されている。

また肝星細胞では、活性化に伴い細胞内の貯蔵レチニルエステルの減少が観察されており、このことから肝細胞におけるレチノイドシグナルの低下による肝発癌機構が示唆されている。

この仮説をもとに申請者はこれまでレチノイドによる肝癌制御メカニズムについて

研究を行ってきた。その成果として、肝細胞特異的にレチノイン酸シグナルを抑制したトランスジェニックマウスにおいて肝癌が発症することを明らかにした。

さらに最近、肝細胞における鉄代謝関連遺伝子の一つであるヘモジュベリン (HJV) の発現制御機構に、レチノイドが関与していることを明らかにした。

(2) 近年、この HJV の受容体としてネオジェニン (NEO) が同定された。これまでの報告において、NEO の強制発現は細胞への鉄の

過剰蓄積を引きおこし、その作用は HJV との共発現により増強されることが示唆されている。

NEO は膜蛋白質であり、元来、神経細胞の軸索誘導因子の受容体として単離されたが、その後の解析により、NEO の発現はほぼすべての臓器に分布していることが明らかにされた。また NEO は、生殖器官において非常に強く発現していることや、筋・神経細胞への分化を促進すること、細胞障害を受けた膵島細胞の再生時に発現誘導されること、食道癌において発現亢進すること、などが報告されている。また肝臓では、肝線維症患者のマイクロアレイ解析結果より、肝臓では線維化から肝癌への進展に伴って発現が亢進していることが見出された。

(3) 上記のように NEO の生理機能は多岐に渡っており、特に肝臓においては、鉄代謝調節作用に加えて、細胞の癌化・増殖・浸潤についても深く関わっている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

NEO シグナルと肝発癌との関連性について明らかとするため、その中心的因子である HJV について、*in vitro* および *in vivo* の解析を行う。またレチノイドによる鉄代謝制御との関連についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HJV 強制発現細胞株の樹立

HJV 発現ベクターを構築し、HuH7 細胞へエレクトロポレーション法により導入した。この細胞集団の中から、安定に HJV 遺伝子を発現する細胞を単離し、以降 HuH-HJV と名付けた。

(2) cDNA マイクロアレイ解析

HuH7 細胞および HuH-HJV 細胞から TRIzol 試薬により mRNA を回収し、illumina 社製 BeadArray_Sentrix BeadChip Array Human-6_V2 を使用して遺伝子発現の網羅的解析を行った。

(3) Western blot 解析

細胞を RIPA バッファーに回収し、超音波破碎後、遠心分離を行った。上清を 6x サンプルバッファーと混合し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により蛋白質を分子量ごとに分離した。続いてゲルを PVDF メンブレンに転写し、ブロッキング、1 次抗体、ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体処理を行い、最後に化学発光法により、特定のタンパクのバンドを検出した。

(4) Real-time reverse-transcript PCR

(real-time RT-PCR) 解析

細胞から TRIzol 試薬により mRNA を回収し、Invitrogen 社製、SuperScriptII 逆転写酵素を使用して、相補的 DNA (cDNA) を合成した。得られた cDNA をテンプレートに、遺伝子特異的プライマーおよび Roche 社製 Fast Start SYBR Green 試薬を使用して real-time RT-PCR 反応を行った。PCR 産物の測定は、Roche 社製 LightCycler システムによって行った。

(5) 細胞内非ヘム鉄量の定量

細胞内非ヘム鉄量は、バソフェナントロリン法により行った。細胞を及び肝組織を酸性溶液中、65°C で 20 時間以上、インキュベートし、遠心分離を行った。遠心後、回収した上清を、バソフェナントロリン試薬と混合し、535 nm における吸光度を測定した。

(6) レチノイド過剰食マウスに対する鉄負荷による *in vivo* の解析

通常食に加え、ビタミン A 欠乏食、50 mg/kg all-trans レチノイン酸 (ATRA) 添加食それぞれ調製し、C57BL/6J マウスに 1 ヶ月間与えた。続いて 1 mg の鉄デキストランを 1 日 1 回、5 日間投与し、鉄過剰状態にした。マウスの肝臓を回収し、非ヘム鉄量、グルタチオン量、FPN に対する Western blot 解析、Erythropoietin (Epo) mRNA 発現量の real-time RT-PCR 解析をそれぞれ行った。

(7) マウス骨髄細胞の赤芽球分化に対するレチノイドの影響

マウス骨髄細胞を単離し、レチノイドおよび EPO 添加メチルセルロース培地で 10 日間培養後、赤芽球コロニー (CFU-E) を顕微鏡下でカウントした。

4. 研究成果

(1) cDNA マイクロアレイ解析の結果、HuH-HJV 細胞では、ヘプサイジン (HEPC) の発現量が発現上昇していた (5.8 倍)。一方、発現量が低下していた鉄代謝関連遺伝子は、ceruloplasmin (0.5 倍)、hephaestin (0.3 倍)、フェロポーチン (FPN) (0.005 倍) であった。今後この遺伝子の発現制御と HJV シグナルとの関連について詳細な検討を行う予定である。

(2) HuH7 および HuH-HJV 細胞を 0, 10, 20, 40 μ M 相当の鉄イオン (Fe-NTA) 存在下で 96 時間培養し、細胞内の非ヘム鉄量を定量した。

その結果、HJV 遺伝子の強発現は、細胞内非ヘム鉄蓄積を有意に促進することが明らかとなった (図 1)。

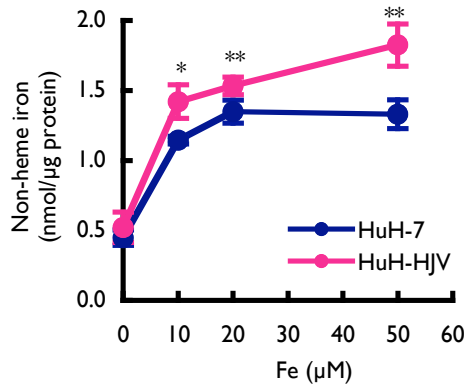


図1 HuH-HJV 細胞による細胞内非ヘム鉄量
培地中に、終濃度 0、10、20、40 μM Fe^{3+} となるように、 FeNTA を添加し、 37°C 、96 時間細胞をインキュベートした。その後細胞を回収し、それぞれの細胞内非ヘム鉄量を定量した。(データは平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$) で表示。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$ vs. HuH7 細胞: t 検定)

(3) HuH-HJV 細胞における鉄代謝関連遺伝子の発現を real-time RT-PCR 法により測定したところ、HuH7 細胞と比較して、HEPC および 2 型トランスフェリン受容体(TfR2)の発現量が有意に亢進していた(図 2 b, c)。一方、FPN の発現量に有意な変化は認められなかった(図 2 d)。さらにこのとき all-trans レチノイン酸 (ATRA) および非環式レチノイド NIK-333 を処理したところ、HuH-HJV 細胞における TfR2 および FPN の発現量は、HuH7 細胞と同様、レチノイドによって有意に低下した(図 2 c, d)。一方、HuH-HJV 細胞では、HJV 遺伝子だけでなく(図 2 a)、HEPC の発現量についてもレチノイド添加による発現抑制が解消されていた(図 2 b)。このことはレチノイドによる鉄代謝調節において、HEPC は HJV-ネオジェニンシグナルを介して制御されており、一方 TfR2 および FPN はそれ以外の未知の経路によって制御されていることを示すものと考えられた。

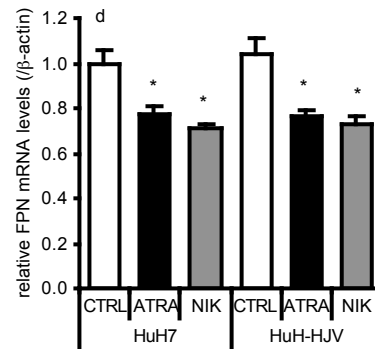
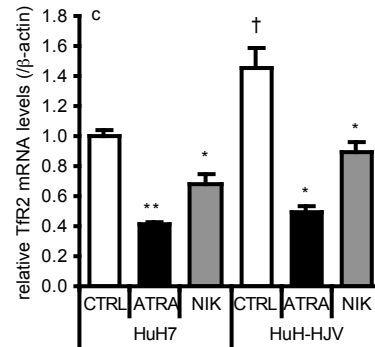
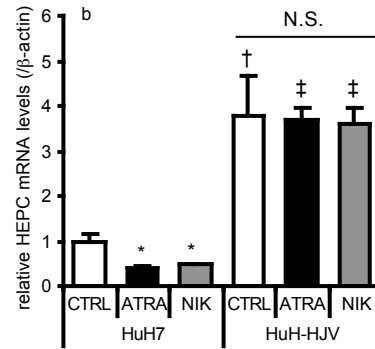
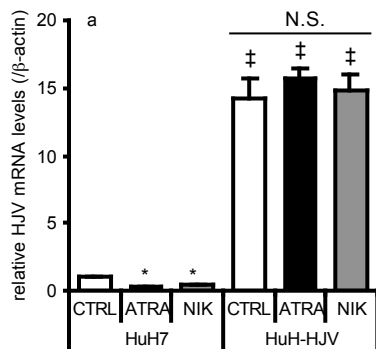


図2 HuH-HJV 細胞における鉄代謝関連遺伝子発現

a. HJV、b. HEPC、c. TfR2、d. FPN (データは平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$) で表示。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$ vs. コントロール (CTRL) : †, $P<0.05$; ‡, $P<0.01$ vs. HuH7 細胞: t 検定)

(4) レチノイド過剰添加によるマウス肝臓鉄代謝関連遺伝子発現量の解析

食餌中に含まれるレチノイド量に応じて(レチノイド欠乏食、通常食、レチノイド過剰食)マウス肝臓における HJV の発現量は低下していた。このことは in vitro で観察された結果と同様であった。このとき肝臓における非ヘム鉄量は有意に低下し、さらに鉄を負荷した後も、レチノイド過剰食を与えた群では、速やかな肝非ヘム鉄量の低下を認めた(図 3)。

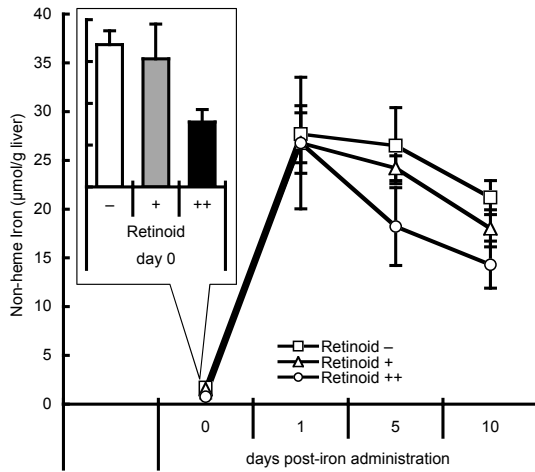


図3 レチノイド食を与えたマウスにおける肝臓非ヘム鉄量の変化
Retinoid -, レチノイド欠乏食群; Retinoid +, 通常食群; Retinoid ++, レチノイド過剰食群

さらにこのときの肝酸化ストレス状態について、グルタチオンを指標に調べたところ、肝非ヘム鉄量と一致して、レチノイド添加食群で、酸化ストレスの有意な低下が認められた(データは示さない)。以上のことから、レチノイド過剰食を与えた群では、HJV シグナルの低下を来していることが考えられた。そこでこのときの鉄代謝関連遺伝子発現量を調べたところ、レチノイド過剰食を与えたマウス肝臓において Fpn 蛋白質の発現が強く亢進していた(図4)。

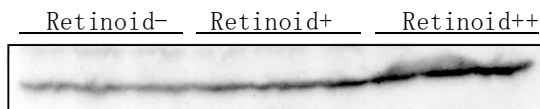


図4 レチノイド食を与えたマウスにおける肝臓 Fpn 蛋白質発現量の変化
Retinoid -, レチノイド欠乏食群; Retinoid +, 通常食群; Retinoid ++, レチノイド過剰食群

(5) レチノイドによる赤芽球分化促進作用

上記マウスの肝臓における Epo mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法により定量したところ、レチノイド過剰食群で有意な発現上昇を認めた。Epo の産生は、低酸素など赤血球産生を要求する生理的条件下で主に腎臓で行われることが知られているが、肝臓においても腎臓と同様の制御システムによって、Epo の産生が制御されることが報告されている。そこで、レチノイドによる鉄代謝

調節のもう一つのメカニズムとして、赤血球産生亢進による肝臓から鉄の動員の促進が関与していると考えて、赤芽球コロニーフォーメーションアッセイを行った。

その結果、ATRA および NIK-333 とともに CFU-E 形成を促進することが明らかとなった(表1)。

Supplements	CFU-E/ 10^4 bone marrow cells (means \pm SD)	P-value (vs control)
Control (0.0125% DMSO)	22.5 \pm 1.7	
5 μ M ATRA	43.3 \pm 5.0	0.0025
5 μ M NIK-333	30.7 \pm 4.3	0.0369

表1 レチノイドの赤芽球コロニー形成に与える影響

この結果と、肝臓における Fpn 発現上昇の結果より、in vivo においてレチノイドは造血亢進による肝臓からの鉄の動員を促進していることが示唆された。

今後、in vivo において HJV-ネオジェニンシグナルと、赤芽球形成及び肝臓からの鉄の動員との関係について、検討を進めていく予定である。

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10件)

- ① 土谷博之、明地雄司、池田レミナ (17名中1番目)、「Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in the liver.」、Gastroenterology、136巻、341-350、2009、査読有
- ② 石井恭子、吉田陽子、明地雄司 (17名中13番目)、「Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta.」、Hepatology、48巻、597-606、2008、査読有
- ③ 権田一絵、土谷博之、坂部友彦 (17名中2番目)、「Synthetic retinoid CD437 induces mitochondria-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma cells.」、Biochemical and Biophysical Research Communications、370巻、629-633、2008、査読有

- ④ 吉田陽子、下村隆、坂部友彦、(17名中9番目)、「A role of Wnt/beta-catenin signals in hepatic fate specification of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells.」、American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology、293巻、G1089-1098、2007、査読有
- ⑤ 坂部友彦、土谷博之、遠藤路子(13名中2番目)、「An antioxidant effect by acyclic retinoid suppresses liver tumor in mice.」、Biochemical Pharmacology、73巻、1405-1411、2007、査読有
- ⑥ 土谷博之、明地 雄司、坂部 友彦、星川 淑子、汐田 剛史「レチノイドによる鉄代謝関連遺伝子発現制御の意義」、消化器科、46巻、222-228、2008、査読無
- ⑦ 汐田剛史、土谷博之、星川淑子「レチノイン酸とNASH」最新医学、63巻、1730-1737、2008、査読無
- ⑧ 汐田剛史、土谷博之、星川淑子「レドックス制御と抗酸化治療戦略の将来を探る」分子消化器病、5巻、58-65、2008、査読無
- ⑨ 星川淑子、土谷博之、汐田剛史「肝疾患における酸化ストレスとレチノイン酸シグナルの関係」酸化ストレスと肝疾患、4巻、43-50、2008、査読無
- ⑩ 土谷博之、坂部友彦、汐田剛史「レチノイン酸による肝発癌制御：鉄過剰蓄積へのレチノイン酸の関与」酸化ストレスと肝疾患、3巻、71-76、2007、査読無

[学会発表] (計11件)

- ① 汐田剛史、土谷博之、"Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in liver." Joint EASL-AASLD Monothematic Conference. 2009年2月27日、Vienna、Austria.
- ② 土谷博之、坂部友彦、星川淑子、汐田剛史、"Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in liver by downregulation of hemojuvelin." AASLD The Liver Meeting. 2007年11月2-6日、Boston, MA, USA.
- ③ 土谷博之、坂部友彦、星川淑子、汐田剛史、"Effect Of Retinoic Acid On Iron Metabolism In Liver" Asian Pacific Association for the Study of the Liver

(APASL). 2007年3月27-30、京都.

- ④ 土谷博之、遠城寺宗近、星川淑子、中牟田誠、汐田剛史、「非アルコール性脂肪肝におけるレチノイドシグナルと鉄代謝・抗酸化ストレス関連遺伝子発現」、第44回日本肝臓学会総会、2008年6月、松山
- ⑤ 土谷博之、坂部友彦、星川淑子、石橋直人、柳田真悟、汐田剛史、「レチノイドによる肝臓鉄代謝制御を介した酸化ストレス抑制」日本レチノイド研究会第19回学術集会、2008年11月、東京
- ⑥ 土谷博之、遠城寺宗近、中牟田誠、汐田剛史、「非アルコール性脂肪性肝疾患における鉄代謝・抗酸化ストレス関連遺伝子発現とレチノイドシグナルの関連」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008)、2008年12月、神戸
- ⑦ 土谷博之、坂部友彦、汐田剛史、「レチノイン酸による鉄代謝制御を介した抗酸化ストレス作用」、第93回日本消化器病学会総会、2007年4月、青森
- ⑧ 土谷博之、坂部友彦、星川淑子、汐田剛史、「レチノイン酸シグナルを介した鉄代謝制御」、第43回日本肝臓学会総会、2007年5月、東京
- ⑨ 土谷博之、坂部友彦、石橋直人、柳田真悟、汐田剛史、「レチノイドシグナルによる鉄代謝を介したレドックス制御」第14回肝細胞研究会、2007年6月、鹿児島
- ⑩ 土谷博之、坂部友彦、汐田剛史、「レチノイン酸の抗酸化作用：鉄代謝を中心として—in vitro および in vivo での解析」JDDW2007 第11回肝臓学会大会、2007年10月18-21、神戸
- ⑪ 土谷博之、坂部友彦、星川淑子、汐田剛史、「ヘモジュベリンを介したレチノイドによる肝鉄代謝制御」第66回日本癌学会学術総会、2007年10月、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 博之 (TSUCHIYA HIROYUKI)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00403402