

機関番号：20101

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2008～2010

課題番号：20590787

研究課題名（和文）

C 型肝炎における鉄代謝調節因子 GDF15-ヘプシジン制御機構の解明とその治療応用

研究課題名（英文）

Analysis of iron regulating factors in chronic hepatitis C

研究代表者

宮西 浩嗣 (Kouji Miyanishi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：60372819

研究成果の概要（和文）：

C型肝炎患者において肝内鉄過剰が生じる機序について、十二指腸粘膜からの鉄吸収関連分子と、十二指腸からの鉄吸収を抑制する働きをもつ肝由来のヘプシジン、ならびにこれを抑制する成長分化因子 GDF15 の関与を検討し、鉄吸収が亢進し肝に鉄貯留が生じる原因として、肝での Hcpidin 低下により FP-1 発現が増強していること示した。また Hemojuvelin 発現の低下がその原因であることと治療として hepcidin 補充が有効である可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Increased iron absorption from the gastrointestinal tract causes hepatic iron accumulation, resulting in hepatic oxidative damage. We found that hepcidin expression increases and it upregulates FP-1 expression in small intestine in patients with chronic hepatitis C.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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遺伝子 ②ウイルス ③細胞組織 ④内科 ⑤臨床 ⑥C 型慢性肝炎 ⑦鉄過剰

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、C型肝炎において細胞内の過剰遊離鉄が活性酸素種（ROS）の産生を亢進させ、肝細胞傷害や肝線維化を惹起する原因になることや、肝内に 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) が増加することにより G:C→A:T 型の遺伝子変異を誘発し HCC の原因となることを見出し、瀉血療法に鉄制限食事療法を併用する除鉄療法により肝炎を鎮静化でき、肝の線維化を

改善させ、増加している 8-OH-dG 量を正常化できること、さらに実際に除鉄療法を C 型慢性肝炎（F2/F3 grade）に約 12 年間行ってきた結果、HCC の発生率が年率 0.9%（対照群では 3.9%）に低下することを明らかにした。しかし C 型慢性患者において肝内鉄過剰が生じる機序については未だ明らかとはなっていない。鉄吸収の主要な場である十二指腸粘膜からの鉄吸収関連分子としては、DMT1、チトクローム b、フェロポルチン 1、

hephaestinの4種が同定されている。この他に十二指腸からの鉄吸収を抑制する働きをもつ肝由来のペプチド（ヘプシジン）が鉄代謝ホルモンとして同定されている。またサラセミアにおいて成長分化因子GDF15がヘプシジン発現抑制因子であることが報告されているがC型肝炎におけるGDF15の意義は不明である。

2. 研究の目的

C型慢性肝炎患者の肝におけるヘプシジン発現の低下を確認し、さらにGDF15発現量を測定しヘプシジン発現との相関を検討する。またGDF15、ヘプシジン発現異常がHCV感染により生じるのかあるいはHCV感染の結果の慢性的なラジカル暴露により生じるのかを検索し、ヘプシジン遺伝子の発現制御部位を特定し、HCV構成蛋白と各々のinteractionを解析することにより、C型慢性肝炎患者におけるヘプシジン発現異常の機序を明らかにする。さらにGDF15、ヘプシジンと同様に十二指腸粘膜のDMT1、チトクロームb、フェロポルチン1、hephaestin発現を測定し、ヘプシジンと十二指腸鉄吸収関連分子発現と鉄吸収能の因果関係を解析することによって、C型慢性肝炎において何故肝臓に鉄が蓄積するのかを消化管からの鉄吸収の面から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 肝組織と十二指腸粘膜の採取

本研究の内容に対して十分なインフォームドコンセントを行い、同意が得られたC型慢性肝炎、肝硬変患者から局所麻酔・超音波ガイド下に16G・22mm組織生検針を用いて肝組織片を採取する。約12mmの組織片をホルマリン固定して、病理組織学的検討および免疫組織学的検討に用いる。残りは一時-80℃にて凍結保存し、後に10mmの組織からRNAを抽出し、ヘプシジン発現の定量を行う。十二指腸粘膜組織は内視鏡下生検により2片採取し、1片はホルマリン固定して、免疫組織学的検討に用いる。他片は-80℃にて凍結保存し、後にRNAを抽出して十二指腸鉄吸収関連分子発現の定量を行う。

2) 十二指腸組織と肝組織における鉄調節因子 mRNA 発現の定量

凍結保存した十二指腸と肝組織よりRNAを抽出し、ランダム primer および Superscript II を用いて逆転写反応を行う。得られた cDNA から Taqman realtime-PCR assay により mRNA 発現を定量化する。各種プライマーの設定は ABI PRISM & reg ; 7700 sequence detection sy

stem を用い、スタンダードには GAPDH を用いる。

3) HCV ウイルス感染 Huh7 細胞 における GDF15 とヘプシジン発現量の測定

Huh 細胞を 6 穴プレートに撒き、サブコンフルエントになるまで培養する。1 ウェルに対して HCV ウイルス粒子量を 10^2 - 10^9 個に濃度を変え添加する。ウイルス粒子添加後、24-72 時間の短時間培養させた細胞および 1-2 週間の長時間培養させた細胞より、RNA を抽出し精製する。感染している HCV ウイルス量は上述の HCV・RNA マイナス鎖を用いた定量的 RT-PCR で行う。GDF15 とヘプシジン mRNA 発現量は Taqman realtime-PCR assay を用いて測定する

4) HCV 構成蛋白の添加による Huh7 細胞における GDF15 とヘプシジン発現の検討

HCV 構成蛋白である core, E1, E2, NS3, NS4A/B, NS5A を Huh7 細胞に添加し、0-24 時間の経時的な GDF15 とヘプシジン mRNA 量の変化を Taqman realtime-PCR で測定する。

5) ラジカル負荷による Huh7 細胞における GDF15 とヘプシジン発現の検討

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼの基質-酵素反応によって活性酸素（この場合 O_2 ）を産生させ、それを Huh7 細胞に添加し、0-24 時間の経時的な GDF15 とヘプシジン mRNA 量の変化を Taqman realtime-PCR で、ヘプシジン蛋白量の変化を免疫船側で測定する。産生された活性酸素量の確認は、発光試薬（ルミノール）で化学発光させルミノメーターで定量することで行う。

4. 研究成果

1) C型慢性肝炎(CHC)では健常人に比べ有意に鉄吸収が亢進し、十二指腸と肝組織(20検体)よりRNAを抽出し、Taqman realtime-PCR assay により DMT1、チトクロームb、フェロポルチン1、hephaestin とヘプシジンの mRNA 発現を定量化したところ、クエン酸第一鉄 100mg を経口投与後 120 分の血清鉄濃度(Fe120m)とヘプシジン mRNA の間に負の相関(相関係数-0.54)が認められた。また Fe120m とフェロポルチン 1 mRNA の間に正の相関(相関係数 0.62)が認められた。なお DMT1、チトクロームb、フェロポルチン 1、hephaestin の各因子間には相関関係が認められなかった。CHC では十二指腸粘膜の FP-1 レベルが上昇していた。また血清 Heparin 濃度および肝 Heparin 発現が低下

していた。Hepcidin 発現は Hemojuvelin 発現と有意な正の相関 ($p=0.0006$) を有した(図1)が、Matriptase-2, BMP6, TMPR, GDF15 とは相関がなかった。CHC では、十二指腸 FP-1 発現が増強していることにより鉄吸収が亢進し肝に鉄貯留が生じていると考えられた。また肝での Hepcidin 低下により FP-1 発現が増強していることが示唆され、Hemojuvelin 発現の低下がその原因である可能性が示された。

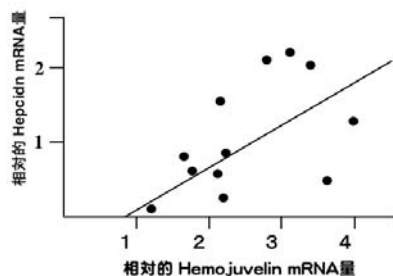


図1. C型慢性肝炎患者におけるHepcidin mRNA量とHemojuvelin mRNA量の相関

2) Caco-2 細胞を two-chamber plate で培養により単層膜を作製し、十二指腸粘膜鉄吸収関連4分子を発現させた上で、Hepcidin を添加し FP-1, hephaestin, DMT-1, Dcytb の mRNA 発現量を Taqman-PCR で測定したところ、FP-1 mRNA の有意な発現低下が認められた(図2)。これまで Hepcidin は FP-1 の degradation と internalization を惹起することが知られていたが、これに加え mRNA 発現を抑制するという新たな知見が得られ、CHC の治療として hepcidin 補充の可能性が見出された。

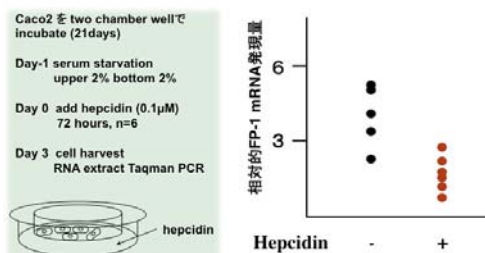


図2. Hepcidin 添加によるFP-1 mRNA量の変化 -Caco-2 monolayersを用いた検討-

3) HCV 構成蛋白のうちNS3, NS4A/B, NS5A をHuh7細胞に添加し、0-24時間の経時的なへ

プシジン mRNA 量の変化を Taqman real time-PCRで測定したが、これらのHCV構成蛋白の添加自体によってはへプシジン発現量の有意な変化は認められなかった。

4) ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼの基質-酵素反応によって活性酸素(この場合 O_2^-) を産生させ、それを Huh7 細胞に添加し、0-24 時間の経時的なへプシジン mRNA 量の変化を Taqman real time-PCR で測定したが、このラジカル負荷ではへプシジン発現に有意な変化は認められなかった。

以上の結果より、CHC では、十二指腸 FP-1 発現が増強していることにより鉄吸収が亢進し肝に鉄貯留が生じていると考えられた。また肝での Hepcidin 低下により FP-1 発現が増強していることが示唆され、Hemojuvelin 発現の低下がその原因である可能性が示された。またこれまで Hepcidin は FP-1 の degradation と internalization を惹起することが知られていたが、これに加え mRNA 発現を抑制するという新たな知見が得られ、CHC の治療として hepcidin 補充の可能性が見出された。

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2件)

- ① 小船雅義, 井山諭, 加藤淳二. フェロポルチン. 日医雑誌 2010, 139 (2):1338. 査読有
- ② 加藤淳二, 宮西浩嗣. C 型慢性肝炎における肝細胞がん発生と鉄の関係. 日医雑誌 2010, 136 (2):307-310. 査読有

[学会発表] (計1件)

- ① 宮西浩嗣, 加藤淳二
JDDW2010 パネルディスカッション 7-3
C 型慢性肝炎における鉄代謝異常の発生機序と除鉄療法の肝発癌抑制効果の検討
2010 年 10 月、東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮西 浩嗣 (Miyanishi Koji)
札幌医科大学医学部 講師
研究者番号： 60372819

(2) 研究分担者

加藤 淳二 (Kato Junji)
札幌医科大学医学部 教授
研究者番号： 20244345

(3) 連携研究者

なし