

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06365

研究課題名(和文)ウシのヘプシジン(鉄代謝調節ホルモン)発現制御機構の特異性解明

研究課題名(英文)Characterization of regulatory expression of bovine hepcidin, a hormone responsible for iron homeostasis

研究代表者

舟場 正幸(Funaba, Masayuki)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：40238655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヘプシジンは鉄恒常性維持を担う肝臓由来ホルモンである。本研究は、ウシヘプシジン発現の特徴を動物実験ならびに細胞培養試験から検討した。新生子牛にみられる貧血は鉄補給によって改善されたが血漿ヘプシジン濃度は鉄補給によって変化しなかった。肥育牛の血漿鉄濃度はビタミンA制限により高値を示したが肝臓でのヘプシジン発現は変化しなかった。ウシSmad4 mRNAの安定性は低く、その結果としてSmad4タンパク質発現が低いことが原因でヘプシジン遺伝子は転写されにくかった。また、PPARsはウシヘプシジン転写を促進すること、MITF/TFEはマウスヘプシジン転写を促進することが明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄恒常性は健康維持上重要である。ヘプシジン発現制御を通して鉄恒常性は維持される-鉄栄養の変化に応じてヘプシジン発現の増減は起こる-ことがマウスやヒトでの知見から明らかにされている。本研究において、ウシヘプシジン発現は鉄栄養状態の変化に鋭敏には応答しないこと、その理由の一つとして、ヘプシジン転写を促進するSmad4の発現制御がウシで特徴的であること、ウシヘプシジン転写を促進する新規の因子を明らかにした。本研究結果は、マウスやヒトでの知見は必ずしもそのままウシに適用できないことを明示している。

研究成果の概要(英文)：Hepcidin is a liver-derived hormone responsible for iron homeostasis. The present study characterized regulatory expression of bovine hepcidin in animal studies as well as cell culture studies. Anemia in newborn calves was improved by iron supplementation, but plasma hepcidin levels were not changed by iron supplementation. Plasma iron levels in fattening cattle were elevated by vitamin A restriction, but hepatic hepcidin expression was unaffected. Activity of bovine Smad4 to mediate hepcidin transcription was weaker than that of murine Smad4 due to lower stability of bovine Smad4 mRNA and consequently low Smad4 protein levels. PPARs promoted bovine hepcidin transcription, and MITF/TFE promoted mouse hepcidin transcription.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：畜産学 栄養学 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 子牛が貧血に陥りやすいことは古くから知られている。鉄補給によって貧血が改善されないケースもある。

(2) 鉄過剰に陥った肉牛は、下痢、代謝性アシドーシス、低体温、食欲不振ならびに増体不良といった牛肉生産上重篤な問題を引き起こす。また、鉄過剰はフェロトキシスを惹起する。

(3) NRC (米国学術研究会議)/NASEM (米国科学工学医学アカデミー) によると肉牛の鉄要求量は 50 mg/kg でブタと同程度 (40 mg/kg) であるが、肉牛の鉄最大許容水準はブタと大きく異なる (肉牛: 500 mg/kg; ブタ: 3000 mg/kg)。また、肉牛の最小毒性量は、ラットの 14 分の 1 程度である (Food Chem Toxicol 74: 68. 2014)。つまり、ウシは他の動物よりも鉄過剰に陥りやすい。

(4) 国内の肉牛用飼料の鉄含量は高く、500 mg/kg を上回る場合もあり、肉牛生産現場では、鉄過剰に注意を払う必要がある。

(5) 鉄恒常性維持ホルモンであるヘプシジンの発見により鉄代謝恒常性の概念は根本的に覆った。血漿・肝臓中鉄濃度の増加に伴って肝臓類洞内皮細胞では BMP6 産生が亢進し、これが肝細胞に作用し、Smad1-Smad4 複合体の形成を通してヘプシジン遺伝子の転写を促進し、産生・分泌されたヘプシジンが小腸上皮細胞の側底膜上に発現している鉄排出トランスポーターであるフェロポルチンの内在化・分解を促進し、鉄吸収の抑制を通して血漿鉄濃度の増加を抑える。

(6) このヘプシジン発現制御機構はヒトやマウスに由来する細胞での知見に基づいて提唱されているが、ウシヘプシジン発現制御はマウスヘプシジン発現制御と異なる可能性がある。

(7) マウス・ヒトの血漿ヘプシジン濃度は鉄栄養状態を鋭敏に反映するが、研究代表者らの研究により哺乳子牛の血漿ヘプシジン濃度と鉄濃度は関連する変化を示さないことが明らかになった: 血漿鉄濃度は生後 1-4 週目に低下し、その後回復するが、ヘプシジン濃度は出生直後だけ高値を示す。

(8) また、予備的な検討において、BMP シグナルに対するウシヘプシジン転写亢進は、マウスに比べて明らかに低いことを見出した。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、1. ウシヘプシジン発現調節が、マウスやヒトと異なる点はどこか? 2. ウシ独自のヘプシジン発現調節の分子機構は何か? という学術的「問い」に対する解答を得ることである。

(2) 具体的には、1. 哺乳子牛の鉄補給に応じた血中ヘプシジン濃度変化、2. 肥育牛における鉄栄養状態とヘプシジン発現の関係、3. BMP シグナルに対するウシヘプシジン転写亢進が低い理由、4. ウシとその他の動物のヘプシジンプロモーターの共通点と相違点を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 新生子牛に対する鉄補給が血中鉄関連物質濃度に及ぼす影響を検討するため、京都大学農学研究科附属牧場で 3-6 産次の母牛から出生した黒毛和種子牛 14 頭を用い、出生 24 時間以内に頸静脈より採血を行った。7 頭の子牛にはその直後にデキストラン鉄 (鉄として 1000 mg) を筋注射し (残りの 7 頭の子牛には筋注せず) その後、1, 2, 4 週齢、2, 3 ヶ月齢の時点で採血し、血漿ヘプシジンを含む鉄代謝関連因子の測定を行った。

(2) 22 ヶ月齢黒毛和種肥育牛 20 頭を供試した。10 頭の肥育牛にはビタミン A を制限した慣行肥育を 12 ヶ月齢より実施し、残りの 10 頭の肥育牛にはより厳しいビタミン A 制限を実施した。頸静脈から採血を行い、血漿鉄濃度を測定した。また、肝臓をバイオプシーし、肝臓でのヘプシジン発現を検討した。

(3) ヘプシジン転写は、ルシフェラーゼをレポーターとするレポーターアッセイで評価した。レポーターアッセイを行う細胞として、HepG2 ヒト肝臓由来細胞と SW480.7 ヒト大腸由来細胞を用い、ウシを含む色々な動物のヘプシジン遺伝子上流をルシフェラーゼの翻訳領域の上流に連

結させたレポーター遺伝子を構築した。上述のように、ヘプシジン遺伝子転写は、鉄濃度に応じた BMP6 発現の変動を介して制御される：肝細胞において、BMP6 は受容体結合後、Smad を介してヘプシジン遺伝子転写は促進される。BMP 受容体や Smad の発現ベクターも調製し、ヘプシジン転写に及ぼす影響を検討した。また、様々な発現ベクターを遺伝子導入し、ヘプシジン転写に影響を及ぼす因子の解明も試みた。

(4) また、Hepa1-6 マウス肝臓由来細胞、BH5 ウシ肝臓由来細胞、MDBK ウシ腎臓由来細胞における内因性 Smad 発現、Smad mRNA 安定性などを調べた。

4. 研究成果

(1) 子牛のヘマトクリット値、血中ヘモグロビン濃度ならびに血漿鉄濃度は総じて 1 週齢から 4 週齢にかけて基準値を下回り、これは鉄補給によって改善した。つまり、初生子牛で起こる貧血は鉄欠乏性貧血であり、これは鉄補給で改善することが明らかになった。

(2) 一方、血漿ヘプシジン濃度は、出生 24 時間以降減少し、これは鉄補給によって変化しなかった。ヒトやマウス、ブタでの先行研究によると、血漿ヘプシジン濃度は鉄欠乏状態で減少し、鉄栄養状態の改善にしたがって上昇することが明らかにされている。これらの結果と併せて考えると、子牛のヘプシジン発現は必ずしも鉄栄養によって厳密に制御されているわけではない可能性が考えられた。

(3) 慣行肥育された 22 ヶ月齢の肥育牛に比べて、より厳しいビタミン A 制限を行った肥育牛の方が血漿鉄濃度は高値を示したが、肝臓におけるヘプシジン発現量は影響を受けなかった。この結果もまた、ウシヘプシジン発現が鉄栄養状態によって鋭敏に制御されているわけではないことを示している。

(4) 初生子牛や肥育牛で鉄栄養状態の変化に応じたヘプシジン発現制御が起きない理由の一つは、BMP 経路によるウシヘプシジン発現制御に特徴があるからと考え、ウシヘプシジンプロモーターとマウスヘプシジンプロモーターの BMP シグナルに対する応答性を評価した。その結果、ウシヘプシジン遺伝子転写の方が、マウスヘプシジン遺伝子転写に比べて BMP 応答性は低いことが明らかになった。

(5) BMP シグナルによるヘプシジン転写は Smad1/Smad4 を介して起こるが、このうち、ウシ Smad4 の転写因子としての機能が低いことが原因でウシヘプシジン転写促進は低いことが明確になった。その理由として、ヒト由来肝細胞に比べてウシ由来肝細胞での Smad4 mRNA 安定性が低いこと、その結果として、Smad4 タンパク質量が低いことによる可能性が考えられた。実際、ヒト由来肝細胞、マウス由来肝細胞に比べてウシ由来肝細胞ならびにウシ由来の腎臓系細胞の Smad4 タンパク質量は低く、ウシ由来肝細胞では BMP6 によるヘプシジン発現誘導が起きなかった。

(6) つまり、ウシでは Smad4 タンパク質量が少ないことも一因となり鉄栄養の変化と連動したヘプシジン発現調節が起きにくい可能性が考えられた。

(7) Smad4 はヘプシジン転写のみならず、TGF- β グループ、アクチビングループ、BMP グループからなる TGF- β ファミリー全般の情報伝達を担う転写因子である。ウシ Smad4 を介した低いシグナル伝達はヘプシジン転写制御だけでなく、TGF- β ファミリー全般の転写制御に及ぶ可能性が示された。

(8) ヘプシジン発現は鉄栄養によって制御されているだけでなく、炎症性サイトカインによっても制御されていることが知られている。先行研究において、炎症性サイトカインの一つである IL-1 β はマウスヘプシジン転写を促進することが明らかにされているが、IL-1 β はウシヘプシジン転写を促進しないことが判明した。マウスヘプシジンプロモーターにおける IL-1 β 応答領域の塩基配列はウシヘプシジンプロモーターの該当箇所と異なることから、このことが原因でウシ細胞では IL-1 β 応答性が生じない可能性が考えられたが、当該領域をマウスヘプシジンプロモーターの塩基配列に置換しても依然として IL-1 β 応答は起こらず、マウスヘプシジンプロモーターの IL-1 β 応答領域をウシヘプシジンプロモーターの当該領域に置き換えても IL-1 β 応答性の低下は生じなかったことから IL-1 β 応答性を引き起こす新規領域の存在が明らかになった。

(9) 様々な因子を遺伝子導入し、ウシヘプシジンプロモーター活性を評価したところ、PPAR にウシヘプシジン転写促進能があることが判明した。この責任領域の塩基配列はマウスヘプシジンプロモーターには保存されておらず、実際、PPAR によるマウスヘプシジン転写促進は起きなかった。

(10) 上記と同様の解析をマウスヘプシジンプロモーターで行ったところ、ヘプシジン転写を促進する新規遺伝子として MITF を見出した。MITF は組織特異的転写因子で、色素細胞、破骨細胞、マスト細胞などで発現する。MITF と構造上の類似性を有する TFE にもヘプシジン転写促進能力があることも見出した。

(11) つまり、本研究の結果、ヘプシジン転写には動物種特異的制御があること、これまで解明されている要因以外にもヘプシジン転写に影響を及ぼす因子は多岐にわたることが明示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumura Manami, Murakami Masaru, Funaba Masayuki	4. 巻 40
2. 論文標題 Transcriptional activation of hepcidin by the microphthalmia/transcription factor E family	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Function	6. 最初と最後の頁 742 ~ 749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbf.3739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 舟場正幸・松村愛実・村上賢
2. 発表標題 ウシヘプシジン発現の特異性
3. 学会等名 第46回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 迫田翔太郎・舟場正幸・塚本篤士・堀江悟・村上賢
2. 発表標題 ヒト肝がん由来細胞株HepG2におけるヘプシジン遺伝子発現抑制機構
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田万優子・村上賢・舟場正幸・松井徹
2. 発表標題 肝臓非実質細胞における鉄負荷に対する応答
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 迫田翔太郎・舟場正幸・塚本篤士・堀江悟・村上賢
2. 発表標題 ヒト肝がん由来細胞株HepG2におけるヘプシジン遺伝子発現抑制機構
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松村愛実・村上賢・糸山恵理奈・下河史枝・吉岡秀貢・松井徹・舟場正幸
2. 発表標題 炎症性サイトカインIL-1 はウシヘプシジン発現を促進しない
3. 学会等名 日本畜産学会第129回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村愛実・村上賢・下河史枝・松井徹・舟場正幸
2. 発表標題 PPAR 2/RXR はウシヘプシジン転写を促進する新規転写因子である
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	松井 徹 (Matsui Tohru) (40181680)	京都大学・農学研究科・名誉教授 (14301)	2022年3月31日まで

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	村上 賢 (Murakami Masaru)		
研究協力者	糸山 恵理奈 (Itoyama Erina)		
研究協力者	吉岡 秀貢 (Yoshioka Hidetsugu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関