

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月23日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790902

研究課題名（和文）ヘプシジン発現調節における生体内鉄感知機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the iron sensing mechanism involved in the regulation of hepcidin expression

研究代表者

生田 克哉（IKUTA KATSUYA）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00396376

研究成果の概要（和文）：

本研究では、まずトランスフェリン受容体2（TfR2）のトランスフェリン（Tf）との結合様式、さらには鉄の取り込み機能に関して、従来から知られる TfR1 との分子レベルでの差異を明らかにした。その後、TfR2 や、同様に遺伝性ヘモクロマトーシス責任分子である HFE に関して、各々その強制発現、逆に発現 knockdown を行って安定細胞株を樹立し、各々の発現評価を RT-PCR やウエスタン法にて行った。次に、細胞培養上清中の Tf-Fe₂ 濃度を変化させてヘプシジン発現変化も検討したが、当初の予想とは異なりヘプシジン発現に有意差は認めなかったが、肝細胞以外が鉄センサーとして機能している可能性に注目し、単球・マクロファージ系がその機能を担う可能性を見出し、鉄のセンサーは肝細胞だけではない可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

At first I demonstrated the characteristics of binding to transferrin and iron uptake of transferrin receptor 2 (TfR2) compared to 1 (TfR1). Then, I tried to establish the stable cell lines that overexpress TfR2 or HFE, and the stable cell lines in that TfR2 or HFE expression was suppressed by knockdown. The changes of the expression levels of those were determined by RT-PCR or western blot. Next, the effects of the changes of Tf-Fe₂ concentration in cell culture medium on hepcidin expressions in hepatoma-derived cells were determined, but I did not observe any significant change against my expectation. However, I focused on the possibility that non-hepatocyte might have function to sensor iron status, and found that monocyte-derived cell line might have that.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液内科学、鉄代謝

1. 研究開始当初の背景

生体の鉄代謝異常は、鉄欠乏性貧血、鉄過剰症ばかりでなく慢性炎症、発癌など多くの疾患の病態を修飾する。生体には鉄を積極的に体外に放出する機構がないため、鉄は消化管での吸収と網内系からの放出過程において主に調節を受けるが、その負の調節因子として肝細胞で産生されるヘプシジンが注目されている。ヘプシジンの発現調節に関しては、遺伝性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子産物 HFE や hemojuvelin の関与や、申請者らの報告 (Inamura J, Ikuta K et al. Upregulation of hepcidin by interleukin-1 β in human hepatoma cell lines. *Hepatology Res.* 2005) を含め炎症性サイトカインである IL-6 や IL-1 β の関与があるが、最も重要な命題である鉄代謝の状態変化そのものによるヘプシジン発現調節の直接的証拠は現在までなく、大きな謎である。鉄を貯蔵する機能とヘプシジンを産生する機能を併せ持つ肝細胞に目を向けると、その表面には他の細胞にも認められるトランスフェリン受容体 1 (transferrin receptor 1 : TfR1) は少数しか発現しておらず、TfR2 α と呼ばれる TfR1 のホモログ分子が多く発現している。TfR2 α は、TfR1 と比較すると 25-30 倍程度弱いながらも Tf-Fe₂ との結合能を有するため、もし TfR2 α が細胞内に鉄を取り込む機能をもつだけならば、その変異は TfR1 と同様、鉄欠乏の phenotype を示す可能性があるが、その遺伝子異常は鉄過剰症であり、重要なパラドックスを提示している。すなわち、TfR2 α は、むしろ鉄代謝を調節する何らかの機構とリンクしていると考えられるほか説明できない。実際、TfR2 α ノックアウトマウスでは鉄過剰を示し、ヘプシジン発現は鉄過剰状態にもかかわらず増加が認められないことが報告されている。

申請者は以前の研究で (Ikuta K et al. Recycling, degradation and sensitivity to the synergistic anion of transferrin in the receptor-independent route of iron uptake by human hepatoma (HuH-7) cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004)、Tf-Fe₂ のヒト肝細胞への取り込みは、TfR1 や TfR2 α によるものより、主に TfR 非依存性経路によるという結果を得ていたため、TfR2 α が細胞への鉄の取り込み以外にも生理機能を有する可能性を強く考えていた。そのため、TfR2 α を強制発現させた培養細胞株での preliminary な検討も行っていたが、TfR2 α は細胞内に鉄を取り込むものの、Tf-Fe₂ に対する親和性は非常に低い結果であった。

生体において鉄の状態を反映するものとして Fe₂-Tf 濃度があるが、申請者が得た TfR2 α の Tf-Fe₂ に対する親和性を考えると、

生体内の生理的 Tf-Fe₂ 濃度付近では、Tf-Fe₂ 濃度がわずかに変化しただけで、肝細胞表面の TfR2 α の Tf-Fe₂ による占有率が大きく変化する可能性が考えられる。これらのことより、生体内での Tf-Fe₂ 濃度もしくは Tf 飽和度が変化すると、肝細胞表面の TfR2 α の占有率が変化し、その変化が最終的に肝細胞内でのヘプシジン発現調節に關与する可能性を着想するに至り、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト肝細胞由来の培養細胞株を用い、TfR2 α を介した鉄の感知によりヘプシジン発現調節が起こるかどうかの検討を主たる目的とした。具体的には、実際に TfR2 α が、細胞外の Tf-Fe₂ 濃度の変化を感知し、それに反応してヘプシジンの発現が変化するかどうか、である。このため、①ヘプシジンを産生する肝細胞由来の培養細胞株 (HuH-7 など) に対しさらに TfR2 α の強制発現を行い、Tf-Fe₂ 濃度変化に応じたヘプシジン発現の変化の有無につき検討していく。②逆に HuH-7 細胞に siRNA を用いて TfR2 α を knock-down させ、その細胞では鉄の感知機能が消失することを確認する。③現在までに報告されている TfR2 や HFE 遺伝子変異に相当する変異を導入した発現 vector を作成し、それらを細胞に発現導入することで、鉄の感知機能に障害が生じるかどうか確認し、遺伝性ヘモクロマトーシス発症の機序に迫りたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) TfR2 α の Tf との分子間 interaction および細胞内への鉄取り込みの検討

以前から構築していたヒト TfR2 α 発現 vector を利用し (図 1)、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞や肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞などに強制発現を行い、細胞膜表面における Tf との結合様式を、atomic force microscopy (AFM) を用いて解析し、TfR1 との差異を検討した。また、強制発現細胞株を用いて、TfR2 の Tf との結合や鉄取り込みを functional assay にて検討した。

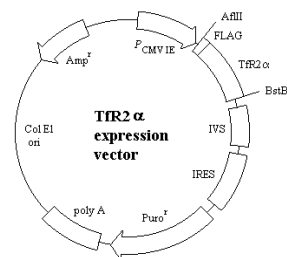


図 1. TfR2 α 発現ベクター

(2) ヒト肝癌細胞株へのsiRNAによる Tfr2 α knockdown

申請者が以前より研究に用いているHuH-7細胞は、肝癌由来であるが正常な肝細胞の機能を多く残しており、Tfr2 α とヘプシジンの発現を既に確認している。これに対し、siRNAを産生するvector (Tfr2-sh-plasmid: sc-42997-SH, Santa Cruz)を導入しTfr2 α 発現をknockdownさせた細胞株を作成すべく、同様にpuromycinでの長期間selectionを行い多くの安定細胞株を樹立した。さらに、HuH-7細胞以外にも、肝癌由来細胞株であるHLF、Hep3B、HepG2などの細胞株でも同様の安定細胞株樹立を目指した。

(3) ヒト肝癌細胞株への正常HFE強制発現およびsiRNAによるHFE knockdown

HFEは遺伝性ヘモクロマトーシスの大部分で変異が認められる肝細胞膜表面に発現するタンパクで、Tfr2やヘプシジン発現と密接に関連すると推定されているため、(2)と同様の手法でHFEの強制発現およびknock-downも行い、安定細胞cloneを樹立した。使用した発現ベクターは、既に以前の研究で構築していたvector (Ikuta K, et al. BBA 2000)を用い、knock-downにはshRNA vector (HFE-sh-plasmid: sc-43832-SH, Santa Cruz)を用いた。細胞株には、HuH-7、HLF、Hep3B、HepG2を用いた。

(4) ヒト肝癌細胞株へのsiRNAによる Tfr1 knockdown

ヒト肝癌細胞株では、発現量自体は少ないながらもTfと高い親和性で結合するTfr1が細胞膜表面に表出している。Tfと非常に高いaffinityを有するため、Tfr2強制発現にてTfr2の機能解析を行う場合には、Tfr1の発現が障害になる。また、このTfr1はHFEと細胞膜表面で結合することが知られており、Tfr2と細胞膜表面においてTfとの結合に関して競合するとも考えられ、肝細胞のTf結合鉄による鉄のセンサー機能に大きく関与する可能性がある。これらの理由から、Tfr1の発現をknock-downさせた細胞株の作成を試みた。使用したvectorはshRNA vector (Tfr1-sh-plasmid: sc-37070-SH, Santa Cruz)で、細胞株としてはHuH-7、HLF、Hep3B、HepG2を用いた。

(5) 各種樹立安定細胞株におけるHFE、Tfr2、Tfr1発現の検討

各親細胞株と樹立された遺伝子導入株に対し、強制発現もしくはknock-downさせたHFE、Tfr2、Tfr1に関して、real-time PCR (Taqman probes; Tfr1: Hs99999911_ml; Tfr2: Hs00162690_ml; HFE: Hs00373474_ml; 18S: VIC-MGB4319413E-0909046 (Applied Biosystems))を用いてその発現変化をスクリーニングした。

(6) 高濃度Tf-Fe₂存在下での肝癌細胞株におけるヘプシジン発現変化の検討

肝細胞が細胞外のTf-Fe₂濃度変化を感知して

ヘプシジン発現を変化させるかどうかを検討するため、特にヒト体内でのTf-Fe₂濃度に近い条件とするため30 μ M Tf-Fe₂という高濃度となるように調節を行い、5 μ Mとの間で変化させてヘプシジン発現が変化するかどうかを検討した。ヘプシジンは培養上清中のペプチドレベルを、研究者らが構築して報告しているLC-tandem MS法 (Hosoki T, Ikuta K, et al. Proteomics Clin Appl 2009)にて検討した。

(7) 単球/マクロファージ系細胞の鉄センサー機能の可能性の検討

肝細胞以外の細胞が体内鉄動態の変化を感知している可能性を考え、鉄代謝に肝と同様に重要な単球/マクロファージ系のモデルとしてU937細胞を用意し、HuH-7細胞と共培養を行い、培養液中のTf-Fe₂濃度を変化させてヘプシジン発現の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) Tfr2 α のTfとの分子間interactionおよび細胞内への鉄取り込みの検討

Tfr2は、細胞内鉄取り込み分子であるTfr1と相同性を持つものの、その機能は単なる鉄取り込みではなく、生体内鉄代謝調節因子であるヘプシジンの発現調節への関与の可能性が注目され、homologue分子でありながら大きく異なる生理機能を有する可能性があるが、詳細は未だ明らかではない。研究者はまず細胞膜表面に発現するisoformであるTfr2 α を培養細胞に強制発現させ、トランスフェリンとの結合様式をAFMにてviableな状態の細胞で検討した。その結果、特にdynamic force spectroscopyによるTfとのunbinding forceの検討で、Tfr1とTfはenergy barrierが2つであるのに対して、Tfr2とTfではenergy barrierが1つであることを示唆され、大きな相違点が見出された(図2)。

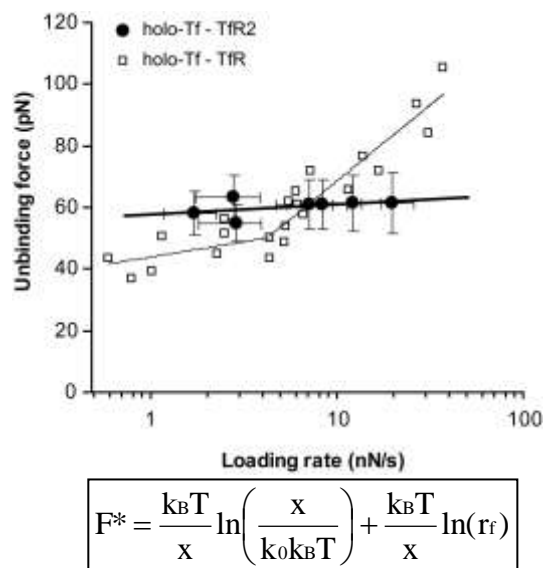


図2. Dynamic force spectroscopyによるTfと

の unbinding force (F : force, K_0 : dissociation rate constant, r_f : loading rate applied, X : width of the energy barrier along the direction of the applied force, k_B : Boltzmann's constant, T : temperature)

さらには Tf との binding affinity や鉄の取り込み機能に関して、Tf との結合がほとんどない CHO 細胞である TRVb 株に TfR2 α を強制発現させて functional assay を行ったところ、TfR1 と Tf との affinity はかなり低く、Association constant は $K_a = 5.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であったが (図 3A)、鉄取り込み機能も有することが確認された (図 3B)。これらは、従来の TfR1 との分子レベルでの機能的差異を明らかにした成果と言える (Ikuta K, et al. J Mol Biol 2010; 397: 375-384)。

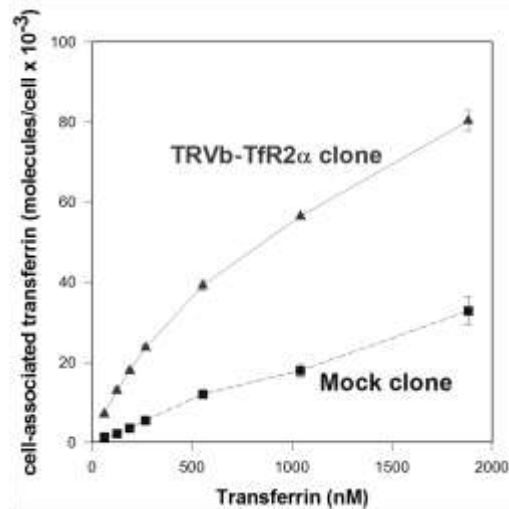


図 3A. TfR2 α 強制発現による ¹²⁵I-Tf-Fe₂ との細胞膜表面での binding 増加

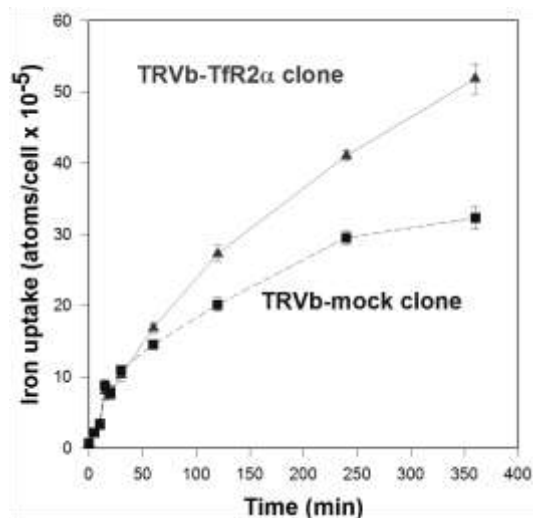


図 3B. TfR2 α 強制発現による鉄取り込み増強

(2) ヒト肝癌細胞株での TfR2 α knockdown

HuH-7をはじめとした各種肝癌由来細胞株に

対して TfR2 の shRNA vector を遺伝子導入して puromycin にて selection を行い安定細胞株を樹立した。しかし、real-time PCR による TfR2 発現のスクリーニングでは、80%程度までの発現 knock-down が認められた clone も存在したが、細胞増殖や細胞形態に親細胞と比較して変化が生じていた。そうした変化が認められない clone では 50-60%の発現低下にとどまっていた (HuH-7 のデータを図 4 として示す)。Western blot による解析も同様の結果であった。

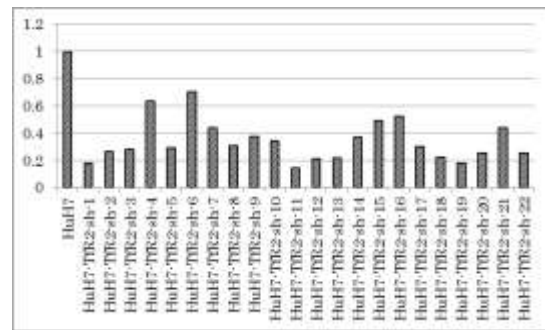


図 4. Real-time PCR による TfR2 mRNA 発現解析 (18S 発現で補正、縦軸は親細胞を 1 とした時の相対発現量を示す)

(3) ヒト肝癌細胞株への正常 HFE 強制発現および siRNA による HFE knockdown

同様に、HuH-7をはじめとした各種肝癌由来細胞株に対して HFE 遺伝子の shRNA vector を遺伝子導入して puromycin にて selection を行い安定細胞株を樹立した。しかし、real-time PCR による HFE 発現スクリーニングでは、HuH-7 で 30%程度まで、HLF でも 50-60%程度の発現 knock-down にとどまった (図 5A、図 5B)。逆に、HFE 強制発現に関しては、親細胞と比較して非常に高い HFE mRNA 発現を呈する安定細胞株を得ることができた (図 6A)。強制発現させた HFE (EGFP との融合蛋白) は、通常の HFE と同様に細胞膜表面に発現していることが蛍光顕微鏡で確認された (図 6B)。

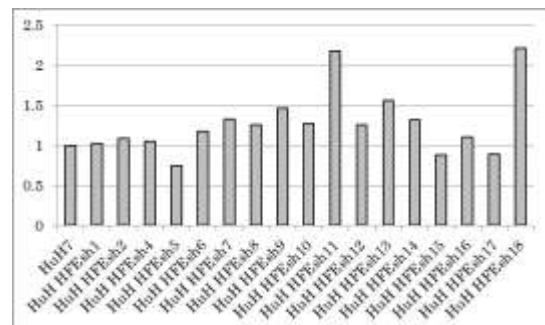


図 5A. HuH-7-derived clones での HFE mRNA 発現 (Real-time PCR 法、18S 発現で補正、縦軸は親細胞を 1 とした時の相対発現量を示す)

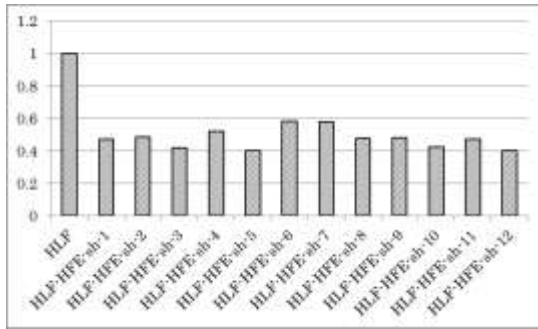


図 5B. HLF-derived clones での *HFE* mRNA 発現 (Real-time PCR 法、18S 発現で補正、縦軸は親細胞を 1 とした時の相対発現量を示す)

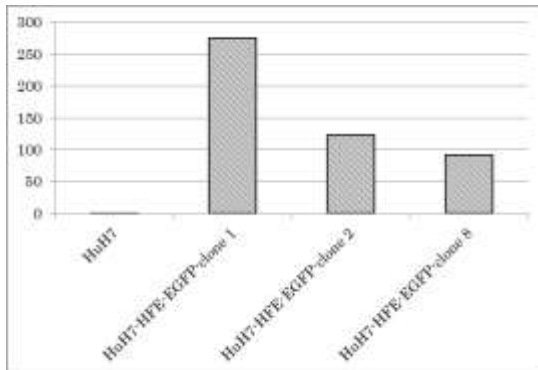


図 6A. HuH-7 に対し HFE を強制発現させた安定細胞 clone での *HFE* mRNA 発現 (Real-time PCR 法、18S 発現で補正、縦軸は親細胞を 1 とした時の相対発現量を示す)

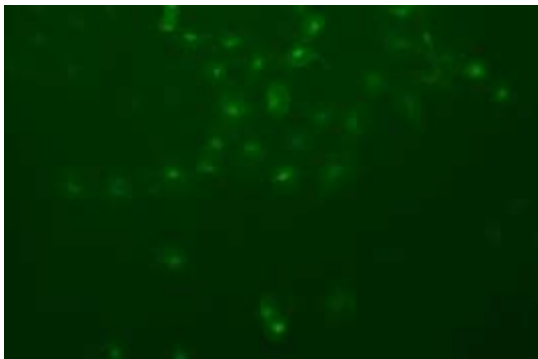


図 6B. HuH-7 に対し HFE-EGFP fusion protein を強制発現させた安定細胞 clone の蛍光顕微鏡所見 (HuH7-HFE-EGFP-clone 2)

(4) ヒト肝癌細胞株への siRNA による *TfR1* knockdown

さらに、HuH-7 をはじめとした各種肝癌由来細胞株に対して *TfR1* 遺伝子の shRNA vector を遺伝子導入して puromycin にて selection を行い安定細胞株を樹立した。real-time PCR による *TfR1* 発現のスクリーニングでは、knock-down が全く認められなかった (HuH-7 のデータを図 7 として示す)。

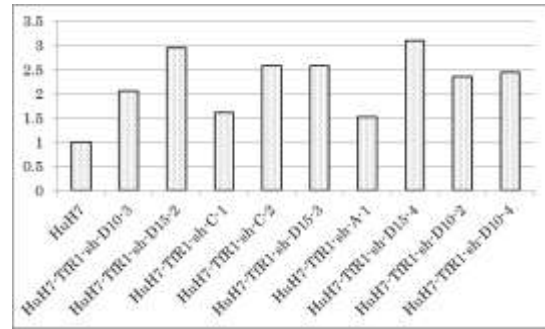


図 7. HuH-7-derived clones での *TfR1* mRNA 発現 (Real-time PCR 法、18S 発現で補正、縦軸は親細胞を 1 とした時の相対発現量を示す)

(2) ~ (4) は、Puromycin を高濃度に設定したり、selection 期間を延ばして得られた clone でも高い抑制効率が得られておらず、siRNA を利用した方法の限界と思われた。特に *TfR1* に関しては本方法が全く効果を呈しておらず、別のアプローチが必要であることや、*TfR1* が肝細胞生存にも必須である可能性が示唆された。

(5) *Tf-Fe₂* 濃度変化によるヘプシジン発現変化の検討

当初の予想とは異なり、*Tf-Fe₂* 濃度を低濃度から高濃度まで大きく変化させても、ヘプシジン発現の変化の有無を検討した (図 8)。HepG2 および HuH-7 細胞を使用して、2 days と 4 days で培養液中のヘプシジン濃度を LC-tandem MS 法にて測定したが、4 days で培養液中ヘプシジンが 2 days に比較して上昇しているため、各細胞は各条件で viable であったと考えられるが、当初の予想に反して *Tf-Fe₂* 濃度変化では特にヘプシジン量に有意な変化は生じていなかった。

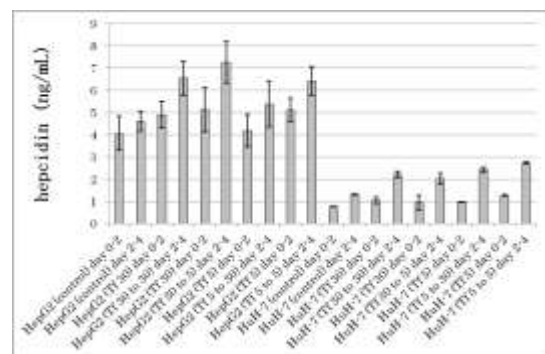


図 8. HepG2 および HuH-7 細胞における *Tf-Fe₂* 濃度変化に対するヘプシジン発現変化

(6) 単球/マクロファージ系細胞の鉄センサー機能の可能性

しかし、この点に関し、肝細胞以外の細胞が鉄センサーとして機能している可能性にも注目し、単球/マクロファージ系の細胞である

U937 細胞と HepG2 細胞を直接共培養させたところ、培養液中に添加した Tf-Fe₂ 濃度変化を感知してヘプシジン発現を亢進させるという結果を得た (図 9)。

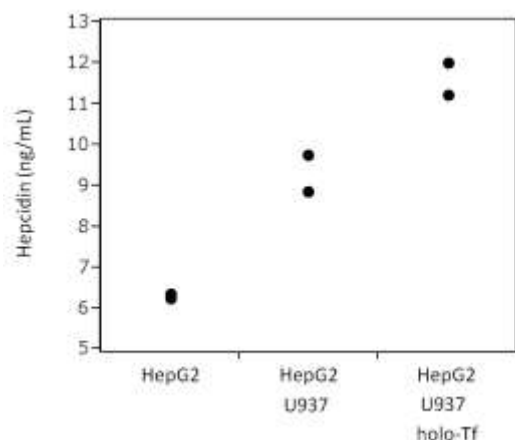


図 9. U937 細胞と HepG2 細胞の共培養による Tf-Fe₂ 濃度変化感知・ヘプシジン発現亢進

さらに、肝細胞が Tf 結合鉄ではなく、Tf と結合していない形態の鉄である非トランスフェリン結合鉄 (non-transferrin-bound iron: NTBI) を感知している可能性も想定しており、同時に構築を進めていた non-metal HPLC を利用した高感度 NTBI 測定法を完成させた (Sasaki K, Ikuta K, et al. Mol Med Reports 2011; 4: 913-918)。これを利用して培養上清中の NTBI を調整し、肝細胞におけるヘプシジン発現の変化の有無の検討を始めており、研究期間自体は終了しているが、現在も研究を継続している。

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 9 件) うち査読付論文 6 件

1. Ikuta K, et al. Interference of deferasirox with assays for serum iron and serum unsaturated iron binding capacity during iron chelating therapy. Clin Chim Acta. 2011; 412: 2261-6. DOI:10.1016/j.cca.2011.08.020
2. Sasaki K, Ikuta K, et al. Improved quantification for non-transferrin-bound iron measurement using high-performance liquid chromatography by reducing iron contamination. Mol Med Reports 2011; 4: 913-918. doi: 10.3892/mmr.2011.518.
3. Ikuta K, et al. Characterization of the interaction between diferric transferrin and transferrin receptor 2 by functional assays

and atomic force microscopy. J Mol Biol. 2010; 397: 375-384. doi: 10.1016/j.jmb.2010.01.026

4. Hosoki T, Ikuta K, et al. Heterogeneous expressions of hepcidin isoforms in hepatome-derived cells detected using simultaneous LC-MS/MS. Proteomics -Clinical Applications. 2009; 3: 1256-1264. doi: 10.1002/prca.200900112. 他、計 9 件

〔学会発表〕(計 19 件)

1. Ikuta K, et al. Diferric Transferrin-Sensed Hepcidin Upregulation in Human Hepatoma-Derived Cell Line Is Differentially Controlled in Each Isoform 20, 22, 25; Confirmation by a Novel Simultaneous Quantification by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. Annual Meeting of American Society of Hematology, Dec 7th, 2009 in New Orleans, U.S.A.
2. Ikuta K, et al. A novel simultaneous quantification of hepcidin isoforms by liquid chromatography-mass spectrometry. 第 71 回日本血液学会学術集会 (優秀演題) (2009 年 10 月 25 日、京都：国立京都国際会館) 他、計 19 件

〔図書〕(計 3 件)

1. 生田克哉. 鉄過剰と臓器障害、Annual Review 2011 血液、p73-78 (中外医学社) 他、計 3 件

〔産業財産権〕該当なし

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕該当なし

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

生田 克哉 (IKUTA KATSUYA)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：00396376

(2)分担研究者

なし

(3)連携研究者

なし