

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	大西 浩平
学 位 論 文 題 目 ヒト血清中可溶性トランスフェリン受容体-HFE 複合蛋白の検出 に関する研究 北海道医学雑誌 第 80 巻 第 1 号 掲載予定 研 究 目 的 トランスフェリン受容体(TfR)は、細胞内への鉄の取り込みに重要な役割を果たしている膜蛋白で、その一部は、血清中に遊離し可溶性トランスフェリン受容体(sTfR)として検出される。sTfR は、赤血球造血や鉄貯蔵を反映する血清マーカーとして認識されているが¹⁾、血中における存在形態はいまだ明らかではない。TfR は、細胞膜上では、遺伝性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子として同定された HFE 蛋白と複合体を形成し²⁾、結合した HFE 蛋白は、TfR を介した細胞内への鉄の取り込みを減少させると考えられている。HFE 蛋白は major histocompatibility complex (MHC) class I と相同性を有する蛋白で、MHC class I 蛋白には可溶性のものの存在が知られており、その臨床的有用性も明らかになってきている。そこで、我々は、HFE 蛋白に可溶性の形態(sHFE)が存在し、血清中で sTfR と複合体を形成しているかどうかを、健常人プール血清を用いて検討した。 材 料・方 法 1. 細胞培養および組織 ヒト肝癌細胞株 HLF をウシ胎児血清(FBS)を添加した RPMI1640 培地を用いて培養した。また、ヒト肝組織は、肝炎患者に対する肝生検の際に得られた肝組織の一部を同意の上使用した。 2. 抗体 抗 TfR 単クローナル抗体、抗 Tf 単クローナル抗体、抗 CD5 単クローナル抗体を用いた。また、抗 HFE 抗血清は、HFE 蛋白の合成ペプチドをウサギに免疫し作成した。 3. 健常人プール血清からの sTfR 複合体の精製 健常人プール血清から、抗TfR抗体を結合させたSepharose-4B7アミノチールカラム、および、monoQカラムによるイオン交換クロマトグラフィー法によりsTfRの含まれる分画を精製した。 4. ELISA法 抗TfR抗体を固相化した96穴マイクロプレートにサンプルを反応させ、検出抗体としてアルカリフォスファターゼ標識した抗TfR			

抗体を使用し、基質にて発色後、吸光度490 nmでその濃度を測定した。

5. SDS-PAGEおよび渡銀染色法

培養細胞およびヒト肝組織を1%NP-40で可溶化後、遠心しlysateを作成した。LysateをLaemmli sample bufferを用いて96℃で5分間処理し、SDS-PAGEにて分離した。渡銀染色には試薬キットを用いた。

6. 免疫沈降法

細胞あるいは組織 lysate および精製 sTfR 分画に一次抗体を加え、次に、protein G-Sepharose を用いて沈降し、SDS-PAGE を施行した。

7. Western Blot 法

SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に transfer し、blocking 後、一次抗体および二次抗体と反応させ、ECL chemiluminescence system にてバンドを検出した。また、抗 HFE 抗体の特異性を確認する際には、免疫原ペプチド存在下に一次抗体と反応させた。

8. 遺伝子導入細胞株の作製

ヒト肝癌細胞株より全 RNA を抽出し、さらに、逆転写反応を行い cDNA を合成した。精製した cDNA を鋳型とし nested PCR を行い、HFE 遺伝子を増幅した。また、PCR 産物を pT7 blue vector にライゲーションした。さらに、HFE cDNA を強制発現ベクターである pRc/CMV vector にライゲーション後 HLF へ遺伝子導入した。

9. sTfR 分画の ^{125}I による標識

精製sTfR分画を、 $\text{IODO-BEADS}^{\text{R}}$, Iodine-125(^{125}I)を用いて標識した。

成 績

1. 健常人プール血清からの sTfR 分画の精製とその性状

血清からSepharose-4BカラムおよびmonoQカラムを用いてsTfR分画を精製した。精製されたsTfR分画の主成分は、渡銀染色において分子量85kDと65kDに明瞭なバンドとして認められた。また、Western blottingにて、分子量85kDのバンドは抗TfR抗体と反応し、65kDのバンドは抗Tf抗体と反応することより、分画の主成分はsTfRとTfであることが確認された。

2. 抗HFE抗体のHFE蛋白に対する特異性の検証

作成した抗HFE抗体の特異性を検証した。HFE蛋白が発現している肝組織、HFE遺伝子の発現が認められないヒト肝癌細胞株HLF、およびHLFにHFE遺伝子を導入したHLF-Tr細胞からlysateを作製し、抗TfR抗体で免疫沈降後、抗HFE抗体を用いてWestern blottingを施行した。肝組織には48kDの位置にHFE蛋白と考えられるバンドが認められた。HLF細胞には、このバンドが認められなかったが、HLF-Tr細胞では、肝組織と同様に48kDの位置にバンドが認められた。抗HFE抗体によるこのバンドに対する反応性は、免疫原の合成ペプチドにて阻害され、作成した抗体がHFEと特異的に反応することが示された。

3. 精製sTfR分画におけるsHFE蛋白の検出

肝組織lysateおよび精製sTfR分画を用いて抗HFE抗体によるWestern blottingを施行した。精製sTfR分画からも、肝組織由来の細胞膜結合型HFEと同じ大きさの分子量48kDのバンドが検出された。さらに ^{125}I で

うパルしたsTfR分画を、抗HFE抗体で免疫沈降後にSDS-PAGEを施行したところ、48kDの位置にバンドが検出された。以上の結果から、精製sTfR分画には、sHFE蛋白が含まれることが明らかとなった。

4. sTfRとsHFEの複合体形成の検討

肝組織lysateおよびsTfR分画を抗TfR抗体で免疫沈降後、抗HFE抗体を用いてWestern blottingしたところ、両者で48kDの位置に明瞭なバンドを認めた。逆に、sTfR分画を抗HFE抗体で免疫沈降し、抗TfR抗体を用いてWestern blottingを施行したところ、85kDの位置にsTfRのバンドが確認された。以上より細胞膜上のHFE蛋白の一部は、細胞膜に存在した時の分子量と同じ状態で、可溶性フォームとして血清中に放出され、sTfRと複合体を形成していることが明らかとなった。

考 案

本研究において、健常人血清からTfR分画を精製し、その主要な成分がsTfRとTfであることを確認した。また、細胞膜表面でTfRと複合体を形成して存在しているHFE蛋白の一部は、ヒト血清中において可溶性フォームとして存在し、sTfRと複合体を形成していることを初めて明らかにした。

HFE 蛋白と相同性を有する MHC class I の可溶性フォームの形態については3種類報告されている。1つ目は細胞膜の直上にて切断されるタイプで、2つ目は alternative splicing による mRNA の細胞膜貫通ドメインの欠損により作られ、これらでは、分子量は膜結合型のものより小さくなる。3つ目は shedding や細胞崩壊により血清中に放出されるもので、この場合、膜に存在した時と同じ分子量である。我々が確認しえた HFE 蛋白の可溶性フォームは、細胞膜表面に存在する HFE 蛋白と等しい分子量であり、細胞膜貫通ドメインおよび細胞質内ドメインを含む形態で血清中に放出されたと考えられた。

HFE 蛋白の主な分布細胞は、肝臓の Kupffer 細胞、十二指腸の crypt cell、組織マクロファージ、顆粒球および血小板である。これら HFE 蛋白の発現制御に関しては明らかではないが、十二指腸での蛋白の発現が、鉄欠乏性貧血(IDA)患者で減少することが報告されており細胞内鉄濃度に依存する可能性が示唆される。また、ヒト HFE mRNA 発現レベルの検討では、alternative splicing により、細胞膜貫通ドメインを欠損した HFE mRNA の報告があり、IDA や遺伝性ヘモクロマチシ患者の十二指腸では、この発現比率が低いと報告されている。これらの結果は、今回の検討で我々の示した、sHFE の他にも、膜貫通ドメインの欠損した sHFE 蛋白の存在を示唆し、さらに、その濃度は、細胞内鉄濃度に深く関連している可能性を示している。

細胞外ドメインのみからなるリコンビナントsHFEがsTfRと複合体を形成するという検討がなされているが³⁾、健常人血清中に両者の複合体を確認した報告は今回が初めてである。しかしながら、sHFEが、sTfRとどのような複合体を形成しているのかは、今後、検討する必要がある。

血清中のsHFE濃度の臨床的な意義に関しては現時点では不明であるが、HFEを発現する細胞の増加や破壊により、sHFEの濃度やその分子形態に差が生じることが予想される。また、TfRの機能を介した生体の鉄代謝に関与する可能性もあり、今後検討する必要があると考える。

結 論

健常人 α - β 血清からsTfR複合体を精製し、複合体の主要な構成蛋白がsTfRとTfであることを確認した。また、HFE蛋白は、細胞膜でTfRと複合して存在するが、細胞膜上のHFE蛋白の一部は、分子量48kDの可溶性フォームとして血清中に放出され、sTfRと複合体を形成していることを初めて明らかとなった。

引 用 文 献

- 1) Kohgo Y, Niitsu Y, Kondo H, Kato J, Tsushima N, Sasaki K, Hirayama M, Numata T, Nishisato T, Urushizaki I. Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. *Blood*. 1987; **70**: 1955-1958.
- 2) Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Wolff RK, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996; **13**: 399-408.
- 3) Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, Feder JN, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*. 1998; **93**: 111-123.

参 考 論 文

- 1) 大西浩平, 鳥本悦宏, 大平基之, 安田淳美, 松本昭範, 村住ゆかり, 水野正巳, 村住和彦, 大田人可, 幸田弘信, 関谷千尋, 並木正義: 劇症肝炎様の経過から救命しえた自己免疫性肝炎の1例. *日本消化器病学会雑誌*. 1994; **91**: 75-81.
- 2) 大西浩平, 青木貴徳, 西野徳之: 当院における画像電送システム運用の実際. *日本医師会雑誌*. 1996; **115**: 1915-1920.
- 3) 大西浩平, 青木貴徳, 西野徳之: 成人T細胞白血病(ATL)リンパ腫の1例. *月刊地域医学*. 1996; **10**: 88-92.
- 4) 大西浩平, 鳥本悦宏, 平井克幸, 田屋登康, 佐藤一也, 吉田暁正, 藤谷佳織, 後藤 充, 高後 裕: All-trans retinoic acid 内服中に血小板増加を認めた急性前骨髄性白血病. *血液フロンティア*. 1999; **9**: 67-69.
- 5) Hirai K, Torimoto Y, Moriichi K, Sato K, Ohnishi K, Taya N, Kohgo Y. Discordant expression of myeloid antigens and myeloperoxidase in a case of t(8;21) positive AML expressing CD7. *Int J Hematol*. 1999; **70**: 30-35.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	大西 浩平
審査委員長 高 後 裕 ㊞ 審査委員 伊 藤 喜 久 ㊞ 審査委員 若 宮 伸 隆 ㊞			
学 位 論 文 題 目 ヒト血清中可溶性トランスフェリン受容体-HFE 複合蛋白の検出			
トランスフェリン受容体(TfR)は、細胞内への鉄の取り込みに重要な役割を果たしている膜蛋白で、その一部は、血清中に遊離し可溶性トランスフェリン受容体(sTfR)として検出される。sTfR は、赤血球造血や鉄貯蔵を反映する血清マーカーとして認識されているが、血中における存在形態はいまだ明らかではない。TfR は、細胞内では、遺伝性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子として同定された HFE 蛋白と複合体を形成し、結合した HFE 蛋白は、TfR を介した細胞内への鉄の取り込みを減少させると考えられている。HFE 蛋白は major histocompatibility complex (MHC) class I と相同性を有する蛋白であり、MHC class I 蛋白には可溶性のものの存在が知られている。本研究では、HFE 蛋白に可溶性の形態(sHFE)が存在し、血清中で sTfR と複合体を形成しているかどうかを、健常人血清中を用いて検討し、以下の結果を得た。 ① 健常人プール血清からの sTfR 分画の精製とその性状 血清からSepharose-4BカラムおよびmonoQカラムを用いてsTfR分画を精製した。精製されたsTfR分画の主成分は、渡銀染色において分子量85kDと65kDに明瞭なバンドとして認められた。また、Western blottingにて、分子量85kDのバンドは抗TfR抗体と			

反応し、65kDのバンドは抗Tf抗体と反応することより、分画の主成分はsTfRとTfであることが確認された。

②抗HFE抗体のHFE蛋白に対する特異性の検証

抗HFE抗体は、家兎にHFEの合成ペプチドを免疫して作成し、その特異性を検証した。HFE蛋白が発現している肝組織、HFE遺伝子の発現が認められないヒト肝癌細胞株HLF、およびHLFにHFE遺伝子を導入したHLF-Tr細胞からlysateを作製し、抗TfR抗体で免疫沈降後、抗HFE抗体を用いてWestern blottingを施行した。肝組織には48kDの位置にHFE蛋白と考えられるバンド*が認められた。HLF細胞には、このバンドが認められなかったが、HLF-Tr細胞では、肝組織と同様に48kDの位置にバンドが検出された。この反応性は、免疫原の合成ペプチド*にて阻害され、作成した抗体がHFEと特異的に反応することが示された。

③精製sTfR分画におけるsHFE蛋白の検出

肝組織lysateおよび精製sTfR分画を用いて抗HFE抗体によるWestern blottingを施行した。精製sTfR分画からも、肝組織由来の細胞膜結合型HFEと同じ大きさの分子量48kDのバンドが検出された。さらに¹²⁵IでラベルしたsTfR分画を、抗HFE抗体で免疫沈降後にSDS-PAGEを施行したところ、48kDの位置にバンド*が検出された。以上の結果から、精製sTfR分画には、sHFE蛋白が含まれることが明らかとなった。

④sTfRとsHFEの複合体形成の検討

肝組織lysateおよびsTfR分画を抗TfR抗体で免疫沈降後、抗HFE抗体を用いてWestern blottingしたところ、両者で48kDの位置に明瞭なバンドを認めた。逆に、sTfR分画を抗HFE抗体で免疫沈降し、抗TfR抗体を用いてWestern blottingを施行したところ、85kDの位置にsTfRのバンドが確認された。以上より細胞膜上のHFE蛋白の一部は、細胞膜に存在した時の分子量と同じ状態で、可溶性フォームとして血清中に放出され、sTfRと複合体を形成していることが明らかとなった。

本研究において、健常人血清からTfR分画を精製し、その主要な成分がsTfRとTfであることを確認した。また、細胞膜表面でTfRと複合体を形成して存在しているHFE蛋白の一部は、ヒト血清中において可溶性フォームとして存在し、sTfRと複合体を形成していることを初めて明らかにした。今回確認しえたHFE蛋白の可溶性フォームは、細胞膜表面に存在するHFE蛋白と等しい分子量であり、細胞膜貫通ドメインおよび細胞質内ドメインを含む形態で血清中に放出されたと考えられた。

血清中のsHFE濃度の臨床的な意義に関しては現時点では不明であるが、HFEを発現する細胞の増加や破壊により、sHFEの濃度やその分子形態に差が生じることが予想される。また、TfRの機能を介した生体の鉄代謝に関与する可能性があり、今後の鉄代謝の研究における重要な新知見と考えられる。

論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。