

# 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類

博 士

氏 名

鈴木 晶子

## 学 位 論 文 題 目

Induction of Transferrin Receptor by Ethanol in Rat Primary Hepatocyte Culture  
(ラットの初代培養肝細胞におけるエタノールによるトランスフェリンレセプターの発現誘導)

### 共著者名

藤本佳範, 細木弥生, 鈴木康秋, 生田克哉, 斉藤浩之, 高後 裕

### 未公表

## 研 究 目 的

アルコール性の慢性肝障害患者ではしばしば肝に鉄の過剰蓄積をきたすことが知られている。ラットを用いた動物実験においても、アルコールを慢性摂取させると肝に鉄が沈着し、アルコールによる肝障害を増悪させることが報告され、肝細胞内の過剰鉄がフリーラジカルを産生し肝細胞に障害を与えるものと考えられている。既に、我々はアルコール性肝障害患者の肝組織生検を用いた免疫組織化学染色により、鉄の蓄積とフリーラジカルの産生が相関すること、細胞内への鉄取り込みに関与する主要蛋白である **transferrin receptor (TfR)** の発現が肝細胞で増加しており、禁酒によりその発現が低下することを報告してきた。今回我々はアルコール性肝障害患者における肝細胞での鉄過剰蓄積に **TfR** がどのように関与しているかを明らかにするため、ラットの初代培養肝細胞を用いてエタノール負荷による **TfR** の発現の変化とその調節機構について解析した。

## 材 料 ・ 方 法

### (1) 細胞培養

6 週から 8 週齢 (約 200g) 雄の Sprague-Dawley ラットを用いた。エーテルで麻酔後、肝臓を露出させコラゲナーゼ液を環流し肝細胞を分離した。Collagen-I をコートした 10cm シャーレに  $3 \times 10^6$  個ずつ撒き、37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。培養液は EGF を含む L-15 medium を使用し 24 時間ごと medium を交

換した。

## (2) 実験プロトコール

細胞を分離培養してから 24 時間後より 96 時間まで以下のプロトコールで 24 時間ごとに蛋白と RNA を採取した。

- ① コントロール群；鉄・エタノールを負荷せず細胞培養
- ② 鉄負荷群；5, 10, 20, 50 $\mu$ M の ferric citrate (Fe)存在下で細胞培養
- ③ 鉄・アルコール負荷群；20 $\mu$ M の Fe と 25mM のエタノールの同時存在下で細胞培養
- ④ 鉄キレート群；100 $\mu$ M のデフェロキサミン存在下で鉄を培地から除去して細胞培養
- ⑤ アルコール代謝阻害群；Fe (20 $\mu$ M)・エタノール(25mM)存在下でエタノールの代謝における alcohol dehydrogenase (ADH)を阻害する 4-methylpyrazole (4-MP), acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)を阻害する cyanamide を加えて細胞培養

## (3) Western blot 解析

cell lysate (30 $\mu$ g)を直接 8% polyacrylamide gel に apply し電気泳動した。nitrocellulose membrane に transfer した後 TFR の抗体 (anti-rat CD71 TFR) を用いて Western blot を行い ECL で検出した。

## (4) 共焦点レーザー顕微鏡による免疫染色

培養細胞を collagen I-coat の cell culture slide (2well)に撒き、鉄 (20 $\mu$ M) と鉄 (20 $\mu$ M) +エタノール (25mM) の負荷群とこのどちらも負荷しないコントロール群の 3 群にわけ 24 時間培養後染色を行った。Anti-rat CD71 TFR を一次抗体, Alexa 488 anti-mouse IgG を二次抗体として蛍光発色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。

## (5) $^{35}$ S 標識による TFR 蛋白合成解析

各群に 1 シャーレあたり 37 $\mu$ Ci  $^{35}$ S を 24 時間ラベルした。ラベル後蛋白を採取し anti-rat CD71 TFR 抗体で免疫沈降後、10 - 20% SDS-polyacrylamide gel を用い 24, 48, 72h 後での TFR の発現量を評価した。

## (6) 細胞障害

medium 中の LDH 活性及び総蛋白合成能によりエタノールと鉄による細胞障害を検討した。LDH 活性は LDH 測定キットを用いて評価した。

## (7) transferrin (Tf)結合型と Tf 非結合型の $^{59}$ Fe の取り込みの検討

Apo-Tf と  $^{59}$ FeCl<sub>3</sub> を用いてアイソトープで標識した  $^{59}$ Fe-bound Tf を作成し、各培養液で 24 時間培養後  $^{59}$ Fe-bound Tf を 1 時間加え TFR を介した鉄の細胞内への取り込みを検討した。また、TFR を介さない鉄の取り込みについては、1 $\mu$ M ferrous iron ( $^{59}$ Fe)を ascorbic acid を添加した Tf free medium 中に 24 時間加え検討した。

## (8) band-shift assay による iron regulatory protein (IRP)活性の検討

$^{32}$ P で標識した iron responsive element (IRE)の塩基配列を含む RNA を T7 RNA polymerase を用いて作成 ( $^{32}$ P-IRE) し、各培養細胞から抽出した蛋白と混和し IRP-IRE 結合体を作成した。この結合体を 6% non-denaturing polyacrylamide gel で泳動し IRP 活性を検討した。

成績

#### (1) 鉄負荷による TfR の発現抑制

初代培養肝細胞では、遊離操作による増殖刺激や培地の低鉄濃度により、肝細胞の TfR 発現が亢進していることが知られている。culture 後 24 時間目から 0, 5, 10, 20, 50 $\mu$ M の鉄を 96 時間まで負荷し、鉄負荷による TfR の発現を Western blot で解析した。鉄を負荷しない状態では TfR の発現は強く、5 および 10 $\mu$ M の鉄負荷では軽度の発現となり、20 および 50 $\mu$ M ではほぼ完全に抑制されバンドが検出されなかった。この効果は 96 時間まで継続された。我々は肝臓に鉄が存在する状態でエタノールによる TfR の発現への影響を評価できるようにするため、培養肝細胞の TfR をほぼ完全に抑える 20 $\mu$ M の鉄を負荷し、エタノールの TfR の発現におよぼす影響を検討することとした。

#### (2) エタノールによる TfR の発現誘導

アルコール飲酒者の末梢血アルコール濃度は 100mM を越えることも報告されている。しかし、ラットの初代培養肝細胞において 50mM のエタノール負荷はアポトーシスを生じると報告されているため、25mM の濃度のエタノールを今回の研究に用いた。培養細胞の免疫染色を負荷後 24 時間で検討した。鉄とエタノールを負荷しないコントロール群では TfR は細胞膜と細胞質の核周囲の両方に発現を認めた。一方、鉄を負荷した肝細胞では総 TfR 量は低下し細胞質の核周囲に認めるのみであった。エタノールを負荷することで細胞膜と細胞質の両方に TfR の発現増強を認めた。Western blot ではエタノールを負荷して 24 時間目に TfR の強い発現増加が認められその後は発現は低くなるも 96 時間まで認められた。<sup>35</sup>S-methionine metabolic label による TfR の合成もエタノールを負荷して 24 時間目に TfR の強い発現増加が認められその後発現は低下した。

#### (3) 鉄とエタノール負荷による LDH 活性の変化と総蛋白合成能の変化

今回の研究で使用した濃度の鉄とエタノール負荷が細胞障害を生じているか検討した。鉄負荷により medium 中の LDH 活性の増加は認めたが、鉄に加えて 25mM のエタノールを加えても LDH 活性は増強しなかった。

#### (4) エタノールによる Tf 結合型 <sup>59</sup>Fe の取り込みの増加

エタノール負荷による TfR の発現の増加が、鉄の取り込みを増加させるかについて検討した。<sup>59</sup>Fe-Tf の肝細胞への取り込みはエタノールにより増加した。しかし、nonTf-Fe の細胞内への取り込みは変化しなかった。エタノールによる肝細胞への鉄の蓄積は TfR の発現増加に伴う TfR を介した鉄の取り込み増加により生じていると考えられた。

#### (5) エタノールによる IRP 活性の上昇

鉄による TfR の発現調節は通常 IRP/IRE を介して post-transcriptional に行われている。エタノールによる TfR の発現誘導にも IRE を介した調節が存在するか否か検討した。IRP 活性は鉄・エタノール負荷後 24 時間で測定した。コントロールと比較して鉄負荷群では IRP 活性は減少したが、鉄に加えて 25mM のアルコールを加えると活性は増加した。

#### (6) エタノール代謝阻害剤における TfR 発現の変化

alcohol dehydrogenase inhibitor である 4-MP 添加により TfR の発現は減少し acetaldehyde dehydrogenase inhibitor である cyanamide 添加では TfR の発現は増加した。このことから、acetaldehyde がアルコールによる TfR の発現増強に関与している事が示唆された。

## 考 按

ラット初代培養肝細胞を用いた本研究で、以下のことを明らかにした。(1) エタノールにより蛋白レベルで TfR の発現が増加した。(2) エタノールにより TfR を介した鉄の取り込みが増加した。(3) エタノールにより IRP 活性が増加した。(4) acetaldehyde が TfR 発現誘導に関与していた。以上の結果より、エタノール、特にその代謝産物であるアセトアルデヒドが IRP 活性の上昇を介して TfR の発現を誘導し、これにより TfR を介した鉄の取り込みが増加したと推論され、このことがアルコール性肝障害患者の肝における鉄の過剰蓄積の機序のひとつであると考えられた。

ラット初代肝細胞では、TfR の発現は、遊離細胞調整後の増殖刺激等により亢進することが知られている。今回の検討でも遊離肝細胞では TfR は蛋白レベルで亢進が認められた。それに対して、鉄を過剰負荷することにより、TfR の発現は低下し、IRP/IRE を介した TfR 調節機構が働いていることが示唆された。一方、鉄とアルコールを同時投与した群では、鉄による TfR の発現抑制がおこらず、むしろ、最初 24 時間で蛋白レベルの発現亢進がみられたことは注目される。この現象は、ヒトアルコール肝障害患者の患者組織で肝細胞内に鉄が蓄積しているにもかかわらず、TfR の免疫学的発現をみとめたことを、実験的に支持するものと考えられる。

このようなエタノールによる TfR の発現誘導が、どのような機序によるものか、興味深い点である。本研究ではエタノール負荷により IRP 活性の上昇を認め、その上昇が TfR の発現の誘導に関与したことが示唆されたが、蛋白レベルの上昇に比べ、IRP 活性の上昇が少ないことより、蛋白レベルでの TfR の発現増加には、IRP を介した機構は一部で、他の機序も関与していると考えられる。これまでに、TfR の発現調節には通常鉄濃度依存性に行われている IRP/IRE を介した post-transcriptional な調節のほか、細胞増殖や hypoxia の際に行われる transcriptional な調節が報告されている。また、ferritin で報告されている cytokine による IRP を介さない post-transcriptional な調節機構の存在も示唆されている。今後エタノールによる TfR の発現誘導には IRP を介した調節に加えてこれらの機序についての解析が必要であろう。これらの機序の中で、今回新たな手がかりが得られたものは、エタノールによる TfR の発現誘導にはアセトアルデヒドの産生が重要であることが明かとなったことである。アセトアルデヒドは強い細胞毒性に加えて脂質過酸化反応などを介してフリーラジカルを産生することが報告されている。フリーラジカルが IRP 活性に影響を及ぼすと報告と考えあわせると興味深い。また、我々は既にアルコール性肝障害において鉄の蓄積とフリーラジカルの産生が相関することを、脂質過酸化反応により生じる 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) protein adducts の発現を検討することで明かとしているが、今回の結果は、その免疫組織学的検討の結果を支持するものでもある。これらのことより、今後、アルコール性肝障害患者における鉄蓄積機序の解明にはアセトアルデヒドとフリーラジカルによる TfR 合成調節機構についてより詳細に検討することが必要と考えられる。

## 結 論

我々はラットの初代培養肝細胞において、エタノールが TfR の発現を誘導し、TfR を介した鉄の取り込みを増加させることを明らかとし、このことがアルコール性肝障害患者における肝細胞内鉄蓄積の機序のひとつ

であると結論した。




### 引用文献

1. Moirand R, Kerdauid F, Loreal O. Regulation of ferritin expression by alcohol in a human hepatoblastoma cell line and in rat hepatocyte culture. *J. Hepatology* 1995; 23: 431-439.
2. Kurose I and Higuchi H. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 1997; 25: 368-378.
3. Ohhira M, Ohtake T, Matsumoto A, Saito H, Ikuta K, Fujimoto Y, Ono M, Toyokuni S, Kohgo Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal-modified-protein adducts in human alcoholic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 145S-149S.

### 参考論文

1. Tanaka K, Fujimoto Y, Suzuki M, Suzuki Y, Ohtake T, Saito H and Kohgo Y: P13-kinase p85 $\alpha$  is a target molecule of proline-rich antimicrobial peptide to suppress proliferation of ras-transformed cells: *Jpn. J. Cancer Res.* 2001; 92: 959-967.
2. Suzuki Y, Fujimoto Y, Hosoki Y, Suzuki M, Sakurai S, Ohhira M, Saito H, Kohgo Y; Clinical utility of sequential imaging of hepatocellular carcinoma by contrast-enhanced power doppler ultrasonography: *Eur J Radiol.* (in press)
3. Ohhira M, Saito H, Suzuki Y, Naraki T, Sakurai S, Ohtake T, Suzuki M, Ohhira M, Fujimoto Y, Kohgo Y; A variant of des-gamma-carboxy prothrombin was increased in alcoholic liver diseases without hepatocellular carcinoma. *Alcohol clin Exp Res* 2001; 25: 46S-50S.
4. Suzuki Y, Saito H, Suzuki M, Hosoki Y, Sakurai S, Fujimoto Y, Kohgo Y; Up-regulation of transferrin receptor expression in hepatocytes by habitual alcohol drinking is implicated in hepatic iron overload in alcoholic liver disease: *Alcohol clin Exp Res* 2002; 26: 26S-31S.

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	鈴木 晶子
<p>審査委員長 若宮伸隆 </p> <p>審査委員 松原和夫 </p> <p>審査委員 高後 裕 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Induction of Transferrin Receptor by Ethanol in Rat Primary Hepatocyte Culture</p> <p>(ラットの初代培養肝細胞におけるエタノールによるトランスフェリンレセプターの発現誘導)</p>			
<p>アルコール性の慢性肝障害患者ではしばしば肝臓に鉄の過剰蓄積をきたすことが知られており、この過剰鉄がフリーラジカルを産生しアルコールによる肝障害を増悪させると考えられている。論文発表者らは、以前、アルコール性肝障害患者の肝生検組織を用いた免疫組織化学染色により、鉄の蓄積とフリーラジカルの産生が相関すること、細胞内への鉄取り込みに関与する主要蛋白である <b>transferrin receptor (TfR)</b> の発現が飲酒者の肝細胞で増加し、禁酒によりその発現が低下することを報告してきた。しかし、エタノールによる鉄過剰蓄積の機序は未だ解明しておらず、本機序を解明することはエタノールによる肝細胞障害を防ぐためには重要である。本論文では、アルコール性肝障害患者における肝細胞での鉄過剰蓄積の機序を解明するため、鉄取り込み受容体である <b>TfR</b> がどのように関与するかを、ラットの初代培養肝細胞を用いて検討を行ったものである。</p> <p>方法はラットの初代培養肝細胞にエタノールを負荷し <b>TfR</b> の発現とその合成を <b>Western blot</b> 解析と <b><sup>35</sup>S-methionine metabolic label</b> による <b>TfR</b> の合成量で検討した。その結果、エタノールにより <b>TfR</b> の発現は増加し、また、<b>TfR</b> の合成量もエタノールにより増加した。さらに、抗 <b>TfR</b> 抗体を用いて培養細胞を免疫染色し共焦点レーザー顕</p>			

微鏡で観察したところ、細胞膜と細胞質の核周囲の両方に TfR の発現増強を認めた。次に、エタノールにより発現増加した TfR を介して鉄の取り込みが増加しているかを  $^{59}\text{Fe-Tf}$  を用いて検討したところ、 $^{59}\text{Fe-Tf}$  の肝細胞内への取り込みは増加していた。この結果から、エタノールによる肝細胞内への鉄蓄積には TfR が関与しており、この TfR の発現増加に伴って TfR を介し過剰に鉄が蓄積することが示唆された。

一方、TfR の発現調節は通常翻訳調節因子である鉄応答配列結合蛋白 (iron-responsive element binding protein = IRP) と TfR の mRNA 上に存在する鉄応答エレメント (iron-responsive element = IRE) を介して転写後に行われている。そこで、エタノールによる TfR の発現調節も IRP 活性上昇によるものか検討したところ、エタノール負荷により IRP 活性の増加を認めた。さらに、エタノールはそれ自体直接的に肝障害を生じないため、エタノール代謝阻害剤を用いてエタノール代謝のどの過程で TfR の発現が調節されているか検討したところ、alcohol dehydrogenase inhibitor (4-MP) により TfR の発現は減少し acetaldehyde dehydrogenase inhibitor (cyanamide) により TfR の発現は逆に増加したことから、acetaldehyde がアルコールによる TfR の発現誘導に深く関与している事が示唆された。

以上から、エタノールによる TfR の発現誘導は IRP/IRE を介した調節機構が考えられ、この誘導には acetaldehyde が重要であることが明らかとなった。

本研究はアルコール性肝障害患者による肝細胞内鉄過剰蓄積のメカニズムを明らかにした重要な論文であり、この分野の研究の発展に寄与すると考えられる。

なお、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を確認した。以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値するものと判定した。