

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

臨床血液 (2007.01) 48巻1号:36～45.

鉄代謝におけるヘプシジンの機能

生田克哉, 鳥本悦宏, 高後裕

総説

鉄代謝におけるヘプシジンの機能

生田 克哉、鳥本 悦宏、高後 裕

(旭川医科大学内科学第三講座)

Function of hepcidin in iron metabolism

Katsuya Ikuta, Yoshihiro Torimoto, Yutaka Kohgo

(Third Department of Internal Medicine,

Asahikawa Medical College)

Key Words: iron metabolism, hepcidin, anemia of chronic
disease (ACD), hemochromatosis

連絡 : 生田 克哉

住所 : 〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東 2-1-1-1

旭川医科大学第三内科

電話 : 0166-68-2462

FAX : 0166-68-2469

e-mail : ikuta@asahikawa-med.ac.jp

【はじめに】

ヘプシジンは当初内因性抗菌ペプチドとして発見された物質であるが、鉄代謝を調節するホルモンとしての機能を持つことが判明し、注目されている。ヘプシジンは、84アミノ酸からなるプロヘプシジンとして主に肝臓で産生されるが、活性型ヘプシジンは25個のアミノ酸からなり、その分子内に8個のシステインを持ち、4個のS-S結合を形成した特徴的なヘアピンカーブ構造を呈する。ヘプシジンは、液性因子として体内を循環し、消化管における鉄吸収を抑制し、また、網内系マクロファージからの鉄の放出を抑制する作用をもち、生体内鉄代謝における負の調節因子negative regulatorと考えられている。詳細な分子生物学的作用機序や発現調節機構など今後さらに解明すべき点は多いが、ヘモクロマトーシスや慢性炎症に伴う貧血（anemia of chronic disease: ACD）における病態形成に深く関与しており、今後の研究の発展に伴い、現段階では有効な治

療法が確立されていないこれらの疾患に対する新たな治療法として登場する可能性がある。

【生体内鉄代謝の分子機構】

生体内において鉄は、DNA合成や酸素の運搬、エネルギー産生などの幅広い化学反応において必須の元素であるが、過剰に存在すると逆に細胞に障害を与えるため、生体内の鉄代謝は厳密に制御されている¹。ヘプシジンは、生体内の鉄の制御を行っている分子であるが、その機能を理解するためには、生体内鉄代謝の概要、とくに、最近明らかになってきた分子機構についての理解が必須である。

ここ数年の間に多くの鉄代謝関連分子が新規に同定され、鉄の吸収、運搬、利用、貯蔵の生体内での動態は、Fig. 1のように理解されるようになっている。鉄は主に3価鉄の形で食事中に含まれるが、上部小腸における腸管上皮細胞の腸管内腔側細胞膜上に存在するduodenal cytochrome b (Dcytb)によって

2 価鉄に還元される²。2 価となった鉄は divalent metal transporter 1 (DMT1) によって腸細胞内に取り込まれ、その後腸細胞の血管内腔側に存在する ferroportin (IREG1/MTP1) によって血管内腔に放出される³。その際には、2 価鉄として放出された鉄は hephaestin と呼ばれるセルロプラスミン (ceruloplasmin : Cp) と相同性をもつ分子により 3 価鉄に酸化される⁴。血管内腔に入った 3 価鉄は、通常 1 分子のトランスフェリン (transferrin : Tf) に対し 2 分子の鉄が結合し、トランスフェリン結合鉄 (血清鉄) の形で全身に運搬される。一部の鉄は肝細胞でトランスフェリン受容体 1 (transferrin receptor 1 : TfR1) および 2 (transferrin receptor 2 : TfR2) を介して取り込まれるが、多くの鉄は骨髄における赤血球造血に利用される^{1,5,6}。ここではほとんどが TfR1 によって赤芽球内に鉄は取り込まれると考えられている。産生された赤血球は全身を循環するが、老廃赤血球は網内系のマクロファージにより捕捉され破壊され

る。そうして得られた鉄は網内系マクロファージ細胞膜表面の ferroportin を介して 2 価鉄として放出されるが、その際には Cp の持つ鉄酸化作用によって 3 価鉄に酸化され、Tf に結合して、再び体内を循環し再利用されることになる^{7,8,9}。一方、生体は鉄を積極的に体外に放出する機構を備えておらず、このように再利用される鉄が、生体における鉄の大部分を占めており、半閉鎖的な回路を構築している。

生体に鉄を積極的に排泄する機構が存在しないということは、生体内で利用される鉄の調節は必然的に消化管での吸収と網内系からの放出において行われることになる。これらの調節は、骨髄での造血状態や肝での鉄貯蔵状態に影響を受けることが古くから知られていたが、鉄の利用・吸収・再利用の部位が物理的に離れているため、鉄の調節を担う液性因子の存在が長年想定されていた。最近、新規の内因性抗菌ペプチドとして発見されたヘプシジンが、この鉄調節を担うホルモンとして働いているこ

とが明らかとなり、生体内鉄代謝についての理解が飛躍的に進んできている。

【ヘプシジンの発見】

自然免疫を担当する抗菌ペプチドをクローニングにより探索していた Park らは、ヒト尿から新規ペプチドを単離し¹⁰、肝臓 (hep-) 由来の抗菌物質

(-cidin) であったことから、ヘプシジン hepcidin と命名した。同時期に Kraus らも、血漿の限外濾過分画から新規のペプチドを抽出し、LEAP-1

(liver-expressed antimicrobial peptide) と名づけていたが、これらは最終的に同一の蛋白質であった¹¹。

【ヘプシジン遺伝子と蛋白構造】

ヘプシジン遺伝子はヒトの他、マウスやラット、豚や bass などの魚類でも認められ、種を越えてその塩基配列はよく保存されている¹⁰。ヒトのヘプシジン遺伝子は、第19番染色体 (19q13) に位置し 2.5

kbにわたり、Fig. 2に示すように、3つのエクソンと2つのイントロンからなり、0.4 kbのmRNAへ転写される¹⁰。プロヘプシジンは84アミノ酸からなる前駆体で、endoplasmic reticulumへのシグナル配列とプロホルモン・コンバーターゼによる切断部位を有している。活性型ヘプシジンは主に25アミノ酸からなり、8個のシステイン残基を持つ。これは、内因性抗菌ペプチドのデフェンシン・ファミリーと共通性があり、この二次構造からペプチドは陽性荷電状態になって、細菌の細胞膜を破壊する作用を持つとされる。NMRでの解析により、ヘプシジン分子は、図3に示すように、8個のシステインからなる4つのS-S結合によって、2つのアームが急なヘアピンを形成するような構造をとっている¹²。尿中にはこの25アミノ酸からなるものの他に、20アミノ酸や22アミノ酸からなるものも検出されているが、これらはN末端の切断点が異なるもので、4つのS-S結合は保たれている。

ヘプシジン mRNA の発現は、胃、大腸、肺、心臓などにも弱い発現は認めるものの、ほぼ肝臓に限局している¹⁰。

ヒトではヘプシジン遺伝子はゲノムに一つしか存在しないが、マウスにおいてはゲノム中に二つのヘプシジン遺伝子が存在する。ただ、現在までの検討で、そのうちヘプシジン 1 のみが鉄代謝における機能を有していると考えられている¹³。

【ヘプシジンの抗菌活性】

ヒトのヘプシジンは、*in vitro* においては、 $10 - 30 \mu\text{M}$ の濃度で抗菌活性や抗真菌活性を示す¹⁰。尿中のヘプシジンの濃度は $3 - 30 \text{ nM}$ 程度と考えられており、感染においてはその 10 倍程度の濃度になるものとされているが、これらのことからヘプシジンが尿中で実際に抗菌活性を示すとは考えにくい。肝臓や血液中におけるヘプシジンの濃度はまだ詳しくわかってはおらず、ヘプシジンの抗菌活性が実際

に生体において重要な生理作用であるかどうかに関しては、結論がでていない。

【ヘプシジンと鉄代謝の関連性の発見】

当初は鉄代謝と無関係に発見されたヘプシジンであったが、Pigeonらは suppressive subtractive hybridizationの手法により、鉄過剰状態のマウス肝臓においてヘプシジン遺伝子の発現が誘導されることを初めて見出した¹⁴。Nicolasらも、upstream stimulatory factor 2 (USF2) 遺伝子のノックアウトマウスにおいて、ヘプシジン遺伝子も同時に欠損することによって鉄過剰状態がもたらされることを発見した¹⁵。そのマウスでは肝臓や脾臓に鉄が過剰に沈着していたが、脾臓は鉄がむしろ欠乏した状態であり、ヒトの遺伝性ヘモクロマトーシスと類似していた。これらの事実から、ヘプシジンは鉄の消化管での吸収およびマクロファージからの鉄の放出を抑制する作用を持つことが推測され、ヘプシジンこそ長

い間捜し求めていた鉄調節ホルモンであると考えられるようになった¹⁶⁵。

この時点では、まだ USF2 遺伝子の関与が否定できていたわけではなかったため、Nicolas らはさらに、別の USF2 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、このマウスではヘプシジン mRNA 発現が正常であり、鉄代謝異常は生じないことを示し、USF2 遺伝子そのものの欠損が鉄代謝異常の原因ではないことを証明した¹⁷。さらに、ヘプシジン遺伝子のトランスジェニックマウスでは、極度の鉄欠乏性貧血のため生下直後に死亡することも示し、胎生期における胎盤からの鉄輸送に関しても、negative regulator として機能することを示した¹⁷。

消化管上皮における鉄吸収の抑制に関しては、当初、ヘプシジンは腸管上皮 crypt cell の basolateral 側細胞膜表面において、TfR1 などに作用して鉄吸収を上昇させると想定された。そうすると、その crypt cell では鉄吸収に必要な分子の発現が低下し、

mature enterocyte に分化した際に鉄吸収が抑制されるというモデルが出来あがることになる。このモデルでは、ある時点でのヘプシジン発現量によって crypt cell に一度設定された鉄吸収関連分子発現量は、そのままその crypt cell が mature enterocyte となり最終的に villous top から剥離脱落してしまうまで、変化しないことになる。しかしながら、その後、Frazer らが、このモデルに疑問を抱かせる結果を報告した¹⁸。Frazer らは、はじめ鉄が十分含まれた餌を与えられたラットを、ある時点から鉄が欠乏した餌に代えて飼育すると、消化管上皮細胞において、DMT1 や Dcytb、ferroportin といった腸管上皮細胞での鉄取り込みに関与する分子の発現が増加し、鉄吸収が実際に亢進することを示したが、これらの反応は、ヘプシジン発現低下と非常に相関しており、しかも、ヘプシジンの低下とこれらの鉄輸送蛋白の発現上昇には時間的にほとんど差がなかった。当初のモデルで考えると、鉄欠乏によってヘプシジン発現が低下し

ても、mature enterocyte において鉄吸収関連分子発現が上昇するまでには、crypt cell から mature enterocyte になるまでの時間差が必要なはずであり、これより、ヘプシジンは crypt cell にではなく、直接 mature enterocyte に作用すると考えられるようになった。

網内系マクロファージからの鉄放出抑制に関しては、Knutson らが、ferroportin を過剰発現させた J774 細胞において、erythrophagocytosis 後の鉄の放出はヘプシジンによる直接作用によって抑制されることを示している¹⁹。

【ヘプシジンが関与した鉄代謝異常を呈する疾患】

ヘプシジンの生理作用が、消化管からの鉄吸収とマクロファージからの鉄放出の抑制であることから、病態の詳細が不明である慢性炎症における貧血 ACD や、ヘモクロマトーシスへの関与も想定されるようになった。

(1) ヘプシジンと ACD

慢性炎症に伴う貧血（ACD）は炎症性貧血（anemia of inflammation）とも呼ばれる。結核や真菌などを含む様々な感染症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎などの自己免疫性疾患、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患、癌や肉腫などの悪性腫瘍など、炎症状態が存在すると考えられる多種多様な疾患において認められる貧血である。多くは小球性低色素性貧血から正球形正色素性貧血のパターンをとり、日常診療においては、特に鉄欠乏性貧血との鑑別が重要となる。

QOL を著しく損なう場合があり、臨床上重要である²⁰。

炎症性貧血の発生機序として、赤血球寿命の短縮、骨髄赤血球産生能の低下、および鉄代謝異常（網内系鉄ブロック）が考えられていたが、現在、最も重要な因子と考えられるようになってきているものが、鉄代謝異常である。慢性炎症の状態において

は、古くから、十二指腸での鉄吸収とマクロファージからの鉄放出が抑制され、血清鉄濃度が低下し、そのため造血に利用できる鉄が減少することで、最終的に貧血をきたすであろうことは想定されていたが、そういう状態が何故生じるのかが不明で、解明が進まないままであった。しかし、ヘプシジンが発見され、その生理作用が、まさに直接網内系からの鉄放出と消化管鉄吸収を阻害することであると推測されるようになると、ACDの病態はヘプシジンの発現亢進により十分説明できるものと考えられるようになり、一躍注目を浴びることになった。

ACDはまず何らかの感染や炎症が体内に存在することからその病態が形成されるが、感染や炎症とヘプシジンの関連については、Shikeらが、細菌に感染させたwhite bassの肝臓においてヘプシジン mRNA が4500倍にも増加したことを報告した²¹。Nicolasらは、マウスにおいて、炎症惹起物質であるturpentine投与でもヘプシジン mRNA 発現が増強し、血清鉄が減

少することを報告したが、USF2/ヘプシジン欠損マウスにおいては、turpentine投与によっても血清鉄減少が生じないため、これはヘプシジンの作用によるものと考えられた²²。

さらに、ヒトにおいても、Weinsteinらは、巨大肝腫瘍と重症の鉄不応性貧血を持つ患者において、肝腫瘍の除去により貧血が改善したこと、また、同時にそれらの肝腫瘍でのヘプシジン mRNA 発現が増強していたことから、ヘプシジンが ACD の mediator である可能性を報告した²³。Nemethらは、ACD の患者の尿中ヘプシジンが 100 倍にも増加することを示した。また、鎌状赤血球症などによる貧血に対する輸血による鉄過剰の患者においても尿中ヘプシジンが 100 倍程度に増加することも示し、さらには、そうしたヘプシジンの増加は鉄過剰や炎症状態において上昇する血清フェリチンとよく相関することを示した²⁴。

こうして発現亢進したヘプシジンは体内を循

環し、消化管での鉄吸収および網内系マクロファージからの鉄放出を抑制し、結果的に血清鉄の減少をきたし、造血に利用されうる鉄が減少することになるため、最終的に貧血を来たすことになると考えられる。現在では、ACDの基本的な病態は、こうしたヘプシジンの発現亢進によるものと考えられるようになっている。

(2) ヘプシジンとヘモクロマトーシス

鉄代謝調節機構が破綻して生じる病態として、鉄が生体内に過剰に蓄積するようになり非可逆的な障害をもたらすヘモクロマトーシス hemochromatosis がある²⁵。ヘモクロマトーシスには様々な原因があり、鉄代謝関連遺伝子の異常に起因する原発性のものと、輸血やC型肝炎などから生じる続発性（二次性）のものに大別されるが、そのなかでも、原発性鉄過剰症のほとんどを占める遺伝性ヘモクロマトーシス (hereditary hemochromatosis: HH) に

において、ヘプシジンが密接に関与していると考えられるようになってきた。

まず、遺伝性ヘモクロマトーシスは、その原因となる遺伝子によって、現在では Table 1 のように分類されている。遺伝性ヘモクロマトーシスの 85% 程度においては、*HFE* 遺伝子に C282Y 変異が検出されているが²⁶、*HFE* 遺伝子変異を認めない一部の若年性ヘモクロマトーシスと呼ばれる一群が存在する²⁷。その中に、ヘプシジンの遺伝子異常に起因すると考えられる症例が存在する。ヘプシジン遺伝子にフレームシフトが起こり異常プロヘプシジンが産生される家系や、ストップ・コドンが介入する家系²⁸があり、発症にヘプシジンが関与すると考えられる。また、S-S 結合を形成するシステインの変異を起こすものもあり²⁹、ヘプシジンの活性には二次構造の安定性が重要であることが示唆されている。5' 側非翻訳領域に変異を持つ症例も報告されている³⁰。

ヘプシジン遺伝子自体に変異が認められない場

合でも、ヘプシジンはヘモクロマトーシスの病態形成に関わっていることも考えられている。ヘモクロマトーシスでは、鉄が体内に過剰な状態にあるため、当初ヘプシジンは高値となっているものと想像されていたが、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* 遺伝子のノックアウトマウスでは、鉄過剰を呈するもののヘプシジンはむしろ低値をとることが報告され³¹、さらに実際に *HFE* 遺伝子変異を持つヘモクロマトーシス患者においても鉄過剰に反してヘプシジンの発現が低下していることが報告された³²。鉄過剰状態に対するヘプシジン発現誘導減弱のメカニズムに関する詳細はまだ不明で、今後 *HFE* とヘプシジン発現の関与につき明らかにする必要があると思われる。

アルコール性肝障害においても、肝に鉄過剰状態が認められることは、古くから知られていたが、その詳しい病態はわかっていなかった。最近になり、アルコールによってヘプシジンの発現が低下

し、それが引き金となって、結果的に生体を鉄過剰に導くことになることが指摘されるようになった。

Bridle らは、アルコール含有餌にて12週飼育されたラットにおいて、肝臓でのヘプシジン発現が低下することを示しており³³、Harrioso-Findik らは、エタノールを与えたマウスにおいてヘプシジン発現が低下することを示している³⁴。我々も、健常人と比較するとアルコール性肝障害の症例において、有意に血清プロヘプシジン濃度が低いことを報告している³⁵（Fig. 3）。また、エタノール含有餌で飼育されたマウスでは、コントロールと比較して肝でのヘプシジン-1 mRNA 発現が有意に低いことも、定量的 RT-PCR 法にて確認している。さらに、プロヘプシジンに対する抗体を用いた免疫染色を行い、プロヘプシジンはマウス肝細胞の細胞質に発現しているが、それがエタノール負荷で減少することも示している（Fig. 4）³⁵。このように、アルコールは、ヘプシジンを介して鉄過剰を引き起こすことが示唆される

ようになり、今後注目される分野である。

【ヘプシジン発現調節機構】

肝臓におけるヘプシジン発現調節機構に関しては、未だ明らかにしなくてはいけない点が多い。マウスでは、鉄負荷によってヘプシジン産生が増強されることは報告されているが、3価鉄や鉄飽和トランスフェリンを肝細胞に直接暴露してもヘプシジン mRNA の誘導は起こらず、より高濃度の鉄はむしろ抑制をきたすため、現在では直接の鉄分子の関与は否定的と考えられている²⁴。実際、フェリチンなど多くの鉄関連分子の転写後調節に関わる mRNA の鉄反応エレメントは、ヘプシジン mRNA には認められない。これらから、鉄を肝細胞が直接感知するのではなく、網内系などが関与した間接的な調節機構が働いていることが想定されている。

ヘプシジン mRNA の発現は、これまでに述べたように、鉄負荷ばかりでなく、炎症惹起でも増強する

ことが明らかにされている。Nemeth らは、isolated primary human hepatocytes において、ヘプシジン mRNA が、lipopolysaccharide (LPS) や、LPS に刺激された monocyte から放出された monokine によって強く誘導されることを示し²⁴。なかでも、IL-6 が強くヘプシジン mRNA を誘導することを報告している。また、実際にヒトにおいても、IL-6 投与により hepcidin 発現が誘導されることを報告している³⁶。

その後、Lee らは、IL-6 だけではなく、同じく炎症性サイトカインのひとつである interleukin-1 β (IL-1 β) も、マウスの肝細胞においてヘプシジン mRNA の発現を亢進させることを示した³⁷。

我々は、ヒト肝癌細胞株の HuH-7 を用いて、IL-1 β がヘプシジン mRNA 発現誘導作用を示し、この作用はむしろ IL-6 よりも強いという結果を、定量的 RT-PCR 法による検討より得ている³⁸ (Fig. 5A)。また、その発現誘導作用は、IL-1 β 濃度が 0.2 ng/ml という低濃度で強く、それ以上の濃度ではむしろ弱く

なることが示された。一方で、IL-6は、2 ng/ml以上の濃度においてヘプシジン mRNA 発現誘導作用が出現してくる結果であった (Fig. 5B)。ACDにおけるサイトカイン濃度に関しては様々な報告があるが、一例をあげると、慢性関節リウマチ患者の血清 IL-1 β 濃度は 98.2 ± 7.9 pg/ml³⁹、血清 IL-6 濃度は 37.5 ± 12.5 pg/ml⁴⁰ との報告があるように、炎症を伴う疾患においても概して低濃度である。肝組織中における正確なサイトカイン濃度は詳細が明らかではないものの、こうした血清中のサイトカイン濃度を考えると、IL-6よりもIL-1 β の方が生理的に重要である可能性を示唆するものと考えている。ここで、肝細胞はIL-1 β 刺激によりIL-6を分泌するため⁴¹、IL-1 β によるヘプシジン mRNA 発現誘導作用が、肝細胞からのIL-6分泌増加を介した間接的な作用である可能性が生じたが、抗IL-1 β 抗体と抗IL-6抗体を用いた検討により、IL-1 β によるヘプシジン mRNA 発現誘導作用は、IL-6を介した間接的なものではなく、別経路

を介するものであることが示唆されている³⁸ (Fig. 6)。これらのサイトカインを含め、ヘプシジン発現に関与する因子については、今後のさらなる解明が待たれる。

また、細胞内シグナル伝達物質 Smad4 が、ヘプシジン発現を増加させる方向に機能していることが報告された⁴²。さらに、若年性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子産物である hemojuvelin が、bone morphogenetic protein (BMP) co-receptor であることが判明し、BMP signaling を介してヘプシジン発現を増加させることが、最近報告された^{43,44}。これらは、鉄代謝と細胞内シグナル伝達の関連を示唆するもので、非常に注目されている⁴⁵。

ヘプシジン遺伝子のプロモーター領域の研究では、CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) と hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) の結合部位が存在することが判明している。C/EBP α および HNF4 α は、どちらも肝臓に強く発現している転写因子であり、肝臓に特異

的に発現する遺伝子群の調節に関与している。

Courselaudらは、レポーターアッセイにより、C/BEP α がヘプシジン遺伝子の転写を亢進させ、HNF4 α は逆に転写を抑制することを示した⁴⁶。また、C/EBP α のノックアウトマウスでは、ヘプシジンの発現低下と中等度の鉄過剰が認められるのに対し、HNF4 α のノックアウトマウスでは、ヘプシジンの発現亢進がみられることも報告している。

また、最近では、アルコールでも、C/EBP α のDNA-binding activityが低下し、ヘプシジン発現が低下することが示された³⁴。この作用は、ビタミンEやN-acetylcysteinといった抗酸化物質によって抑制されることから、アルコール代謝によって生じる酸化ストレスが、C/EBP α を介してヘプシジン遺伝子の転写を抑えるものと想定される。

【ヘプシジンの分子生物学的作用機構】

ヘプシジンの分子生物学的作用機構に関して

は、最近 Nemeth らが、消化管上皮や網内系細胞に発現し細胞内鉄イオンの細胞外へのくみ出しポンプとして機能する ferroportin が、ヘプシジンと結合し、ferroportin のエンドサイトーシスと分解が亢進され、細胞膜における ferroportin 発現が低下するため、結果的に細胞内から細胞外への鉄のくみ出しが障害されることを示した⁴⁷。

さらに、Nemeth らは、様々な変異を導入したヘプシジンを合成し、その活性を調べることで、ヘプシジンの N 末端が必須のものであることを報告している⁴⁸⁷。また、ヒトにおいて報告されている G71D や K83R 変異を導入したヘプシジンは、*in vitro* では活性低下は認められなかったが、*in vivo* では活性低下を認めており、生体内での stability の低下が重要である可能性を示唆している。

【ヘプシジンの測定系】

ヘプシジンの臨床応用を考えると、本来活性型

のヘプシジンが測定可能になることが望ましいが、
現段階ではまだ確立した測定系はない。ただ、

Kulaksiz らが報告したように、血清中での60アミノ
酸からなるプロヘプシジンの測定は可能になっている⁴⁹。
ヘプシジンの正確な測定系が確立し、臨床上
広く応用されるようになると、鑑別に難渋する貧血
症例においても重要な情報をもたらすことが期待さ
れる。

【ヘプシジンの臨床応用への展望】

ヘプシジンの臨床への応用について考えると、
ヘプシジン低下状態に対する合成ペプチドの補充ま
たは遺伝子治療により、ヘモクロマトーシス治療の
可能性があると考えられる。実際にヘモクロマトー
シス・モデルマウスである HFE ノックアウトマウス
におけるヘプシジン発現低下に対し、ヘプシジン・
トランスジェニックマウスを掛け合わせるとヘモク
ロマトーシスの症状は改善する⁵⁰。さらに、ヘプシ

ジンの受容体や標的分子およびその下流のシグナル伝達分子が解明されれば、ヘプシジンの拮抗薬開発の可能性も生じ、特に現在臨床の場において治療に難渋するエリスロポエチン抵抗性のACDの治療薬になることも期待される。

References

1. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; **33**: 940-959.
2. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 2001; **291**: 1755-1759.
3. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 2000; **403**: 776-781.
4. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transporter, is defective in the sla mouse. *Nat Genet.* 1999; **21**: 195-199.
5. Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; **36**: 2137-2143.
6. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 20826-20832.
7. Osaki S, Johnson DA, Frieden E. The mobilization of iron from the perfused mammalian liver by a serum copper enzyme, ferroxidase I. *J Biol Chem.* 1971; **246**: 3018-3023.
8. Yoshida K, Furihata K, Takeda S, et al. A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat Genet.* 1995; **9**: 267-272.
9. Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, MacGillivray RT, Gitlin JD. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; **92**: 2539-2543.
10. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 7806-7810.
11. Krause A, Neitz S, Mägert H-J, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000; **480**: 147-150.
12. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution

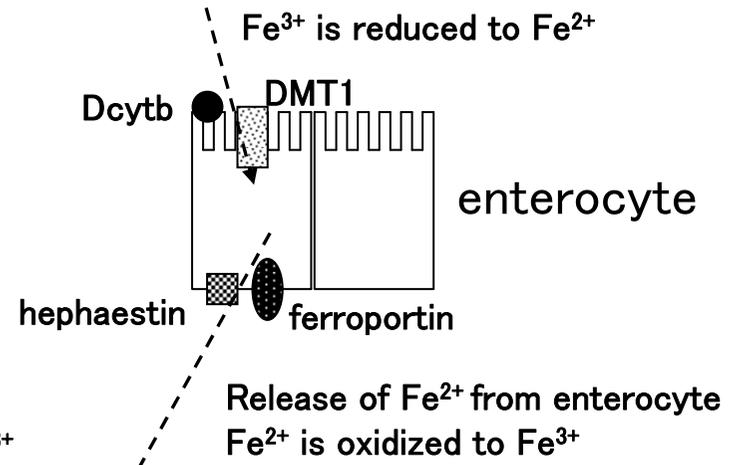
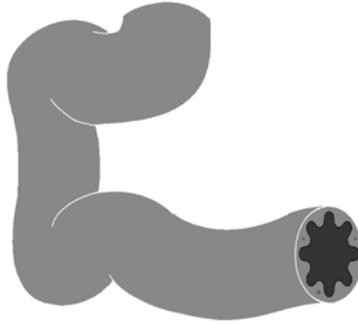
- structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 37597-37603.
13. Lou D-Q, Nicolas G, Lesbordes J-C, et al. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood.* 2004; **103**: 2816-2821.
 14. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 7811-7819.
 15. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; **98**: 8780-8785.
 16. Fleming RE, Sly WS. Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease [editorial]. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; **98**: 8160-8162.
 17. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; **99**: 4596-4601.
 18. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, et al. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology.* 2002; **123**: 835-844.
 19. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; **102**: 1324-1328.
 20. Means R : Anemias secondary to chronic disease and systemic disorders. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology* 11th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004: 1445-1465.

21. Shike H, Lauth X, Westerman ME, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem.* 2002; **269**: 2232-2237.
22. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 2002; **110**: 1037-1044.
23. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood.* 2002; **100**: 3776-3781.
24. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.* 2003; **101**: 2461-2463.
25. Pietrangelo A. Hemochromatosis. *Gut.* 2003; **52**: 23-30.
26. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* 1996; **13**: 399-408.
27. Cox TM, Halsall DJ. Hemochromatosis-neonatal and young subjects. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; **29**: 411-417.
28. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 2003; **33**: 21-22.
29. Delatycki MB, Allen KJ, Gow P, et al. A homozygous HAMP mutation in a multiply consanguineous family with pseudo-dominant juvenile hemochromatosis. *Clin Genet.* 2004; **65**: 378-383.
30. Matthes T, Aguilar-Martinez P, Pizzi-Bosman L, et al. Severe hemochromatosis in a Portuguese family associated with a new mutation in the 5' -UTR of the HAMP gene. *Blood.* 2004; **104**: 2181-2183.
31. Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC, et al. Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; **29**: 361-366.
32. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, et al. Disrupted hepcidin

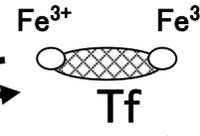
- regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet*. 2003; **361**: 669-673.
33. Bridle KR, Cheung TK, Murphy T, et al. Heparin is down-regulated in alcoholic liver injury: implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; **30**: 106-112.
 34. Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. (in press).
 35. Ohtake T, Saito H, Hosoki Y, et al. Heparin is down-regulated in alcohol-loading. *Hepatol Res* (in press).
 36. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004; **113**: 1271-1276.
 37. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; **102**: 1906-1910.
 38. Inamura J, Ikuta K, Jimbo J, et al. Upregulation of hepcidin by interleukin-1 β in human hepatoma cell lines. *Hepatol Res*. 2005; **33**: 198-205.
 39. Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinton FM, di Giovine FS, Duff GW. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1988; **332**: 706-709.
 40. Wellby ML, Kennedy JA, Pile K, True BS, Barreau P. Serum interleukin-6 and thyroid hormones in rheumatoid arthritis. *Metabolism*. 2001; **50**: 463-467.
 41. Kohda H, Ono M, Torimoto Y, et al. Induction of interleukin 6 production by interleukin 1 and tumor necrosis factor in human hepatoma cells. *Gastroenterol Jpn*. 1992; **27**: 685.
 42. Wang RH, Li C, Xu X, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005; **2**: 399-409.

43. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* 2006; **38**: 531-539.
44. Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E. Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci USA.* (in press).
45. Anderson GJ, Frazer DM. Iron metabolism meets signal transduction. *Nat Genet.* 2006; **38**: 503-504.
46. Courselaud B, Pigeon C, Inoue Y, et al. C/EBP α regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 41163-41170.
47. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004; **306**: 2090-2093.
48. Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood.* 2006; **107**: 328-333.
49. Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, et al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut.* 2004; **53**: 735-743.
50. Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, et al. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet.* 2003; **34**: 97-101.

Proximal
small
intestine

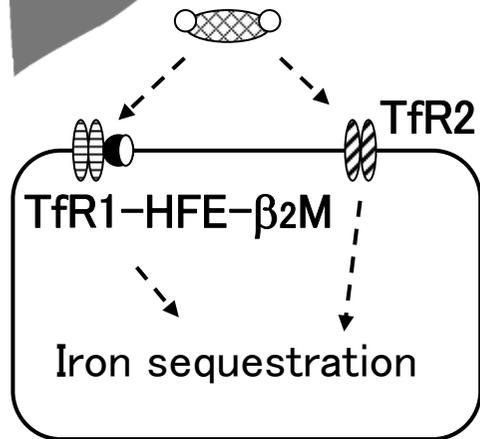
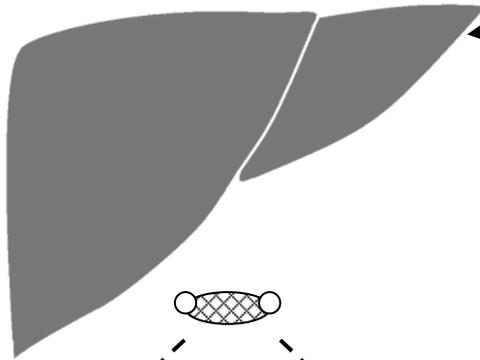


Two molecules of Fe^{3+}
are bound to Tf



Liver

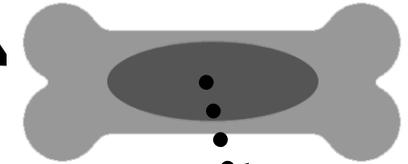
Sequestration



Hepatocyte

Utilization for erythropoiesis

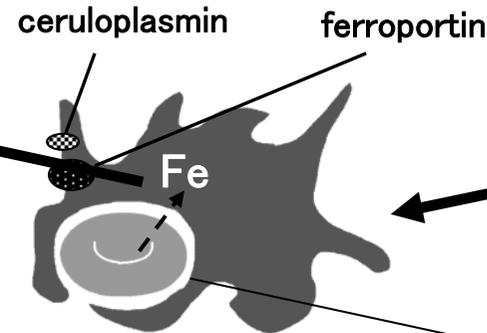
Bone marrow



Erythrocytes



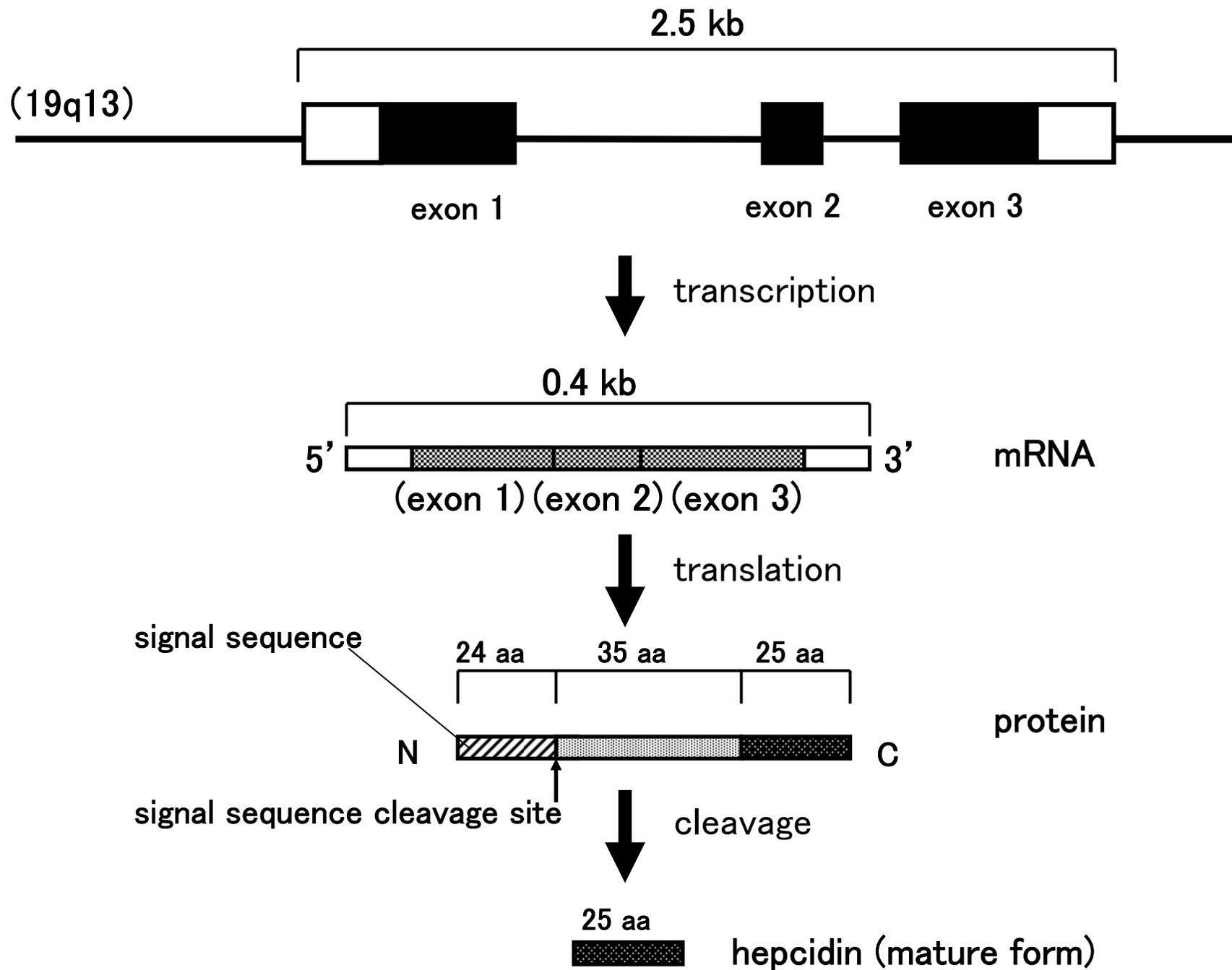
Re-utilization



Macrophage

Senescent
erythrocyte

Lost by exfoliation of
enterocytes



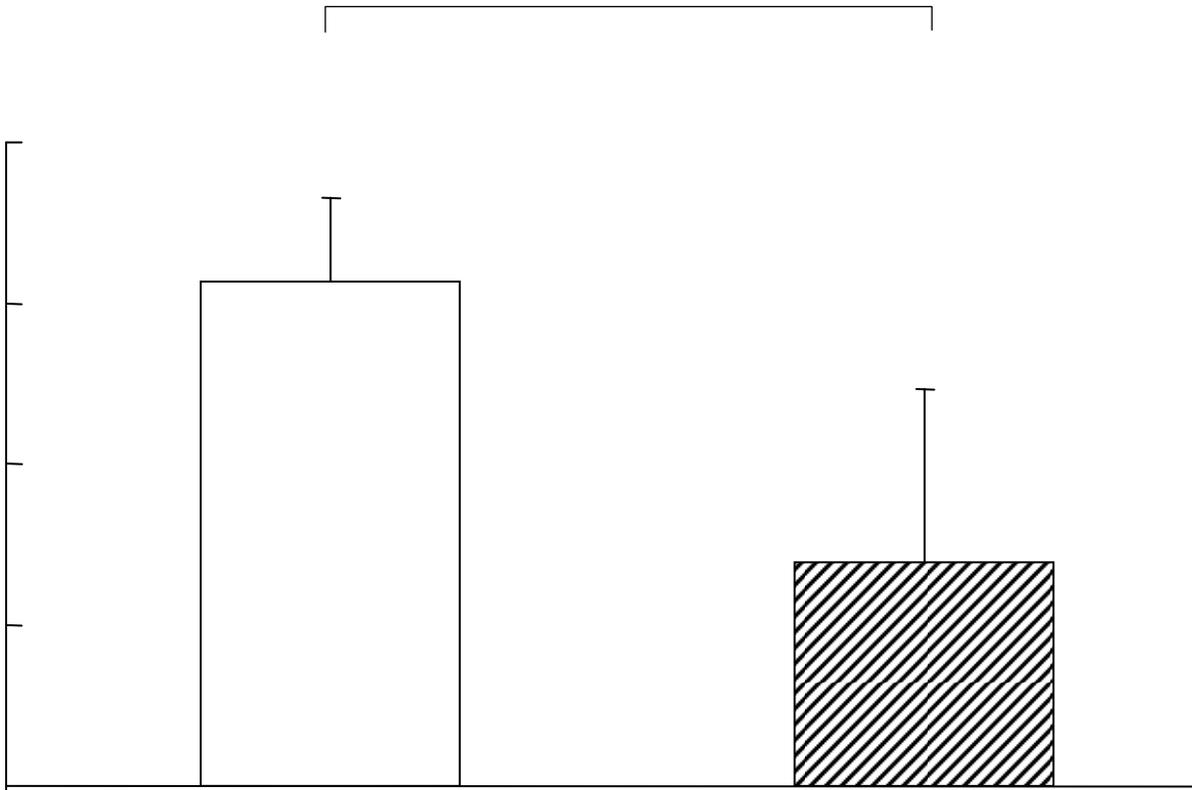
Serum concentration
of prohepcidin
(ng/ml)

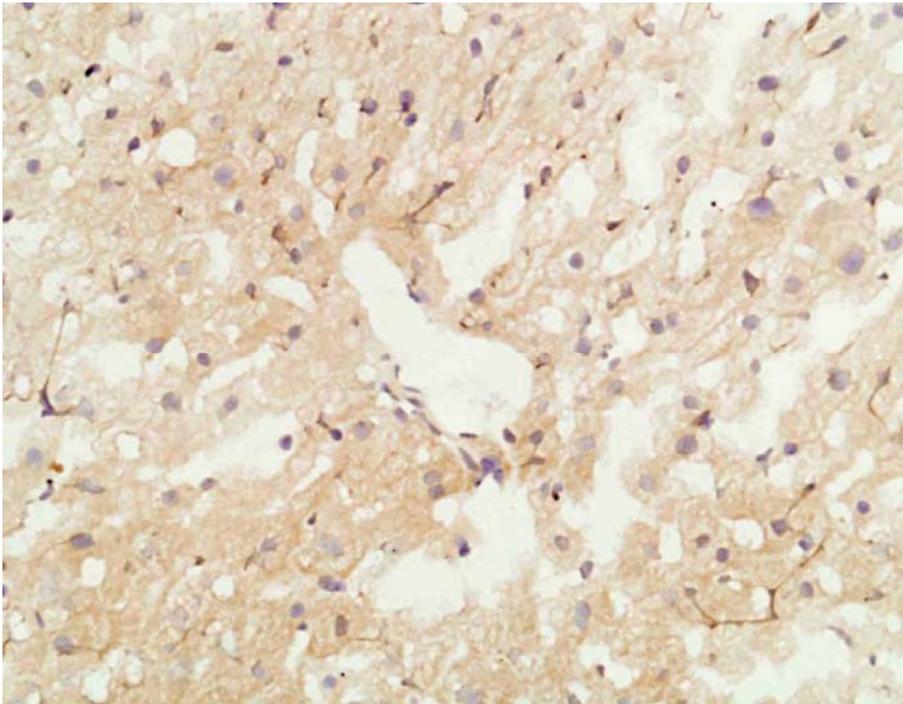
3000
2000
1000
500
0

$p < 0.001$

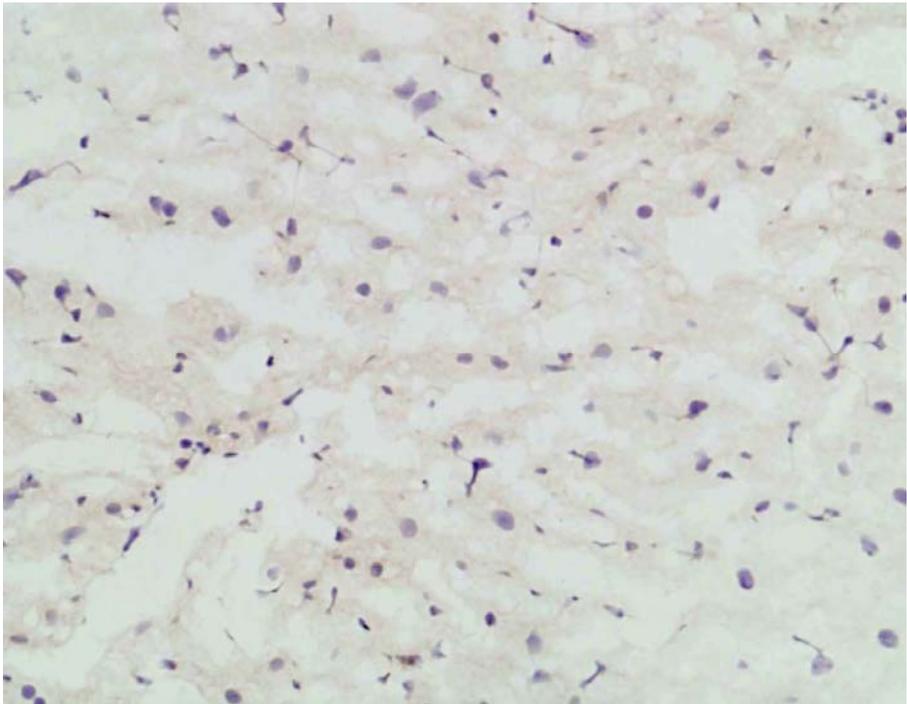
Healthy subjects

Alcoholic liver disease

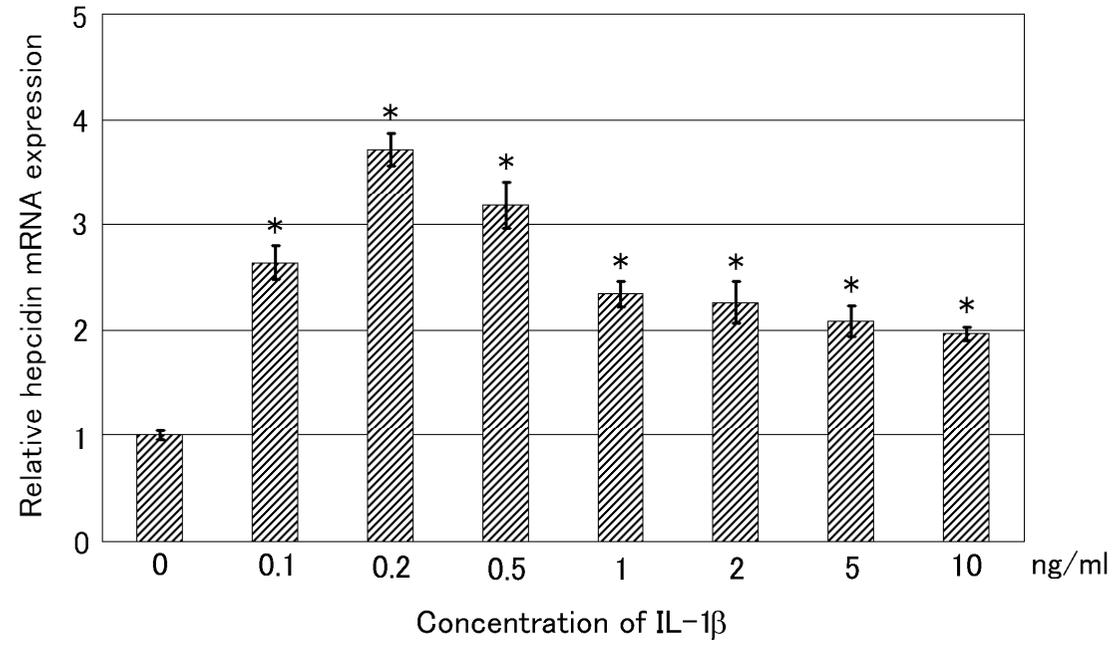
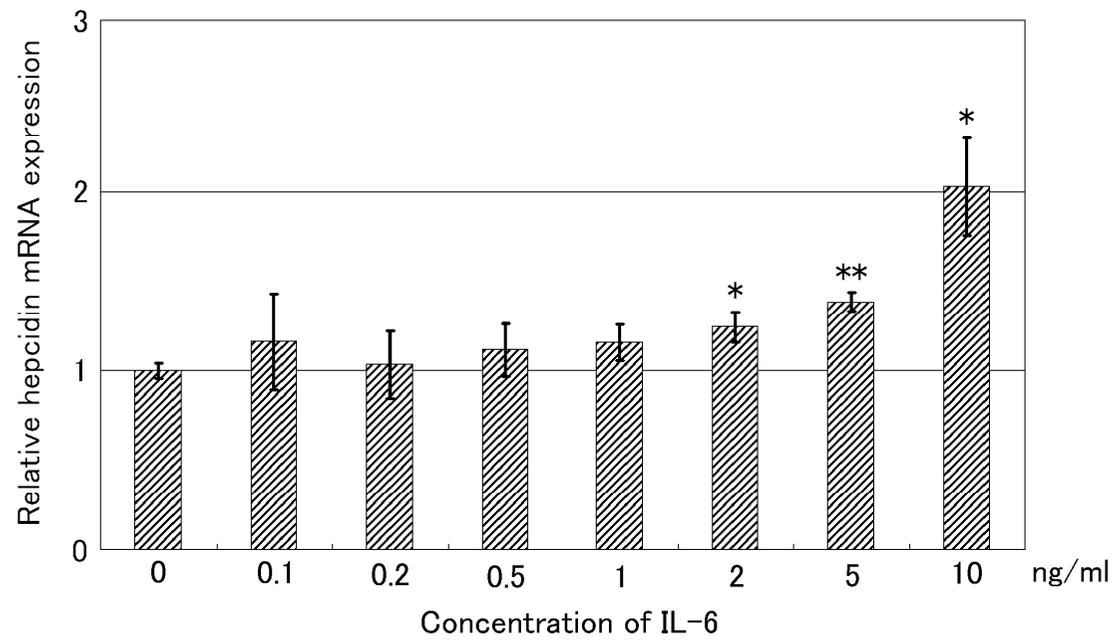




Control mouse



Alcohol-loaded mouse

A**B**

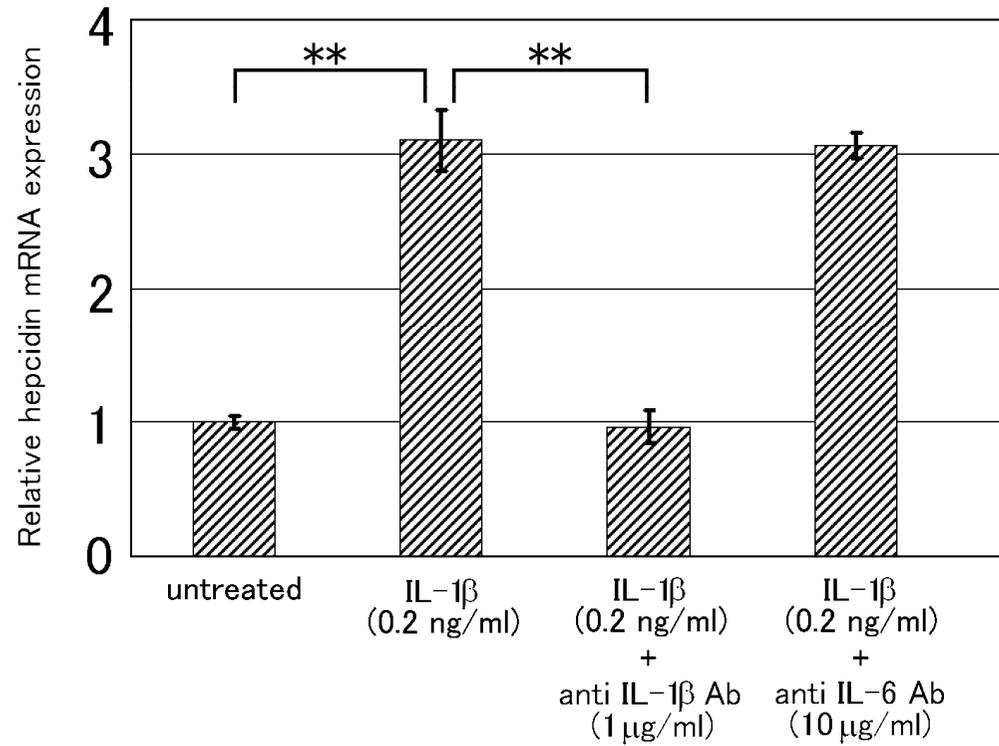
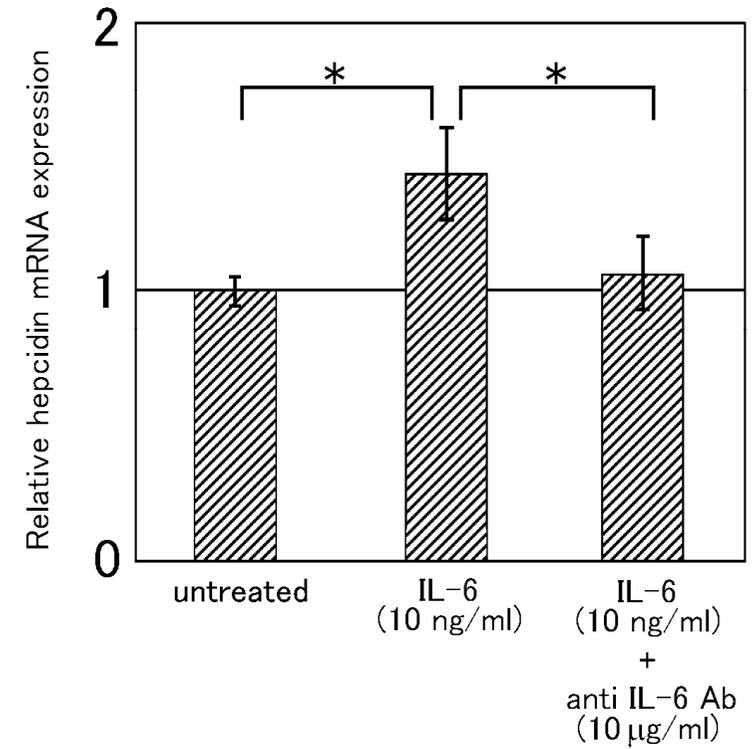
A**B**

Table 1. Classification of hereditary hemochromatosis

		Implicated gene (its location)	Gene product	Patterns of inheritance
Type 1		<i>HFE</i> (6p21.3)	HFE	AR*
Type 2	Subtype A	<i>HJV</i> (1q21)	hemojuvelin	AR*
	Subtype B	<i>HAMP</i> (19q13)	hepcidin	AR*
Type 3		<i>TfR2</i> (7q22)	Transferrin receptor 2	AR*
Type 4		<i>SLC40A1</i> (2q32)	Ferroportin	AD**

* AR: autosomal recessive、 ** AD : autosomal dominant

Figure 1: Schematic diagram depicting body iron metabolism. Tf: transferrin, TfR1: transferrin receptor 1, TfR2: transferrin receptor 2, $\beta 2M$: β 2-microglobulin.

Figure 2: Hepcidin gene and peptide. Hepcidin gene, 2.5 kb in length, is on chromosome 19, and consists of three exons and two introns. The mRNA is 0.4 kb in length and translated into prohepcidin (84 aa peptide). Mature form of hepcidin is 25 aa peptide. aa: amino acids.

Figure 3: Serum concentration of prohepcidin in normal subjects and alcoholic liver disease. Compared to normal subjects, prohepcidin concentration is significantly decreased in patients with alcoholic liver disease ($p < 0.001$). (ref. 35)

Figure 4: Immunohistochemical analysis for prohepcidin. Compared with control mouse liver, hepcidin expression is decreased in alcohol-loaded mouse. (ref. 35)

Figure 5: Induction of hepcidin mRNA expression by (A) IL-1 β and (B) IL-6 in human hepatoma cell line, HuH-7 cells. The maximal induction of hepcidin mRNA was observed when cells were cultured with 0.2 ng/ml IL-1 β . In contrast, the significant upregulation of hepcidin mRNA by IL-6 appeared when cells were cultured with IL-6 at the concentrations more than 2 ng/ml. (ref. 38)

Figure 6: Inhibition of the effect of IL-1 β on hepcidin mRNA expression by antibodies against IL-1 β and IL-6 (A). The upregulation of hepcidin mRNA by IL-1 β was almost completely inhibited by anti IL-1 β antibody (Ab), indicating that the effect of IL-1 β on hepcidin mRNA level is independent of IL-6. An inhibitory effect of anti-IL-6 antibody was also confirmed (B). (ref. 38)