

学位論文の要旨

| 学位の種類 | 博 士 | 氏 名 | 稲 村 純 季 |
|--|-----|-----|---------|
| <h3>学 位 論 文 題 目</h3> <p>Upregulation of hepcidin expression by inflammatory cytokine interleukin-1β in human hepatoma cell lines</p> <p>(ヒト肝癌細胞株におけるインターロイキン-1βによるヘプシジン発現誘導に関する研究)</p> <h3>共 著 者</h3> <p>生田克哉、神保絢子、進藤基博、佐藤一也、鳥本悦宏、高後裕</p> <h3>未 公 表</h3> <h3>研 究 目 的</h3> <p>Anemia of chronic disease (ACD)は、膠原病、悪性腫瘍、慢性感染症などで認められる貧血で、血清鉄低値と、フェリチン高値を特徴とする臨床の現場で最も多く見られる貧血の一つである。その発症機序として、網内系鉄の利用障害があり、interleukin-1 (IL-1)、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor-α (TNF-α)などの炎症性サイトカインが関与することが示されていたが、その詳細は不明であった。最近内因性抗菌ペプチドの一つとして発見されたヘプシジンが、十二指腸での鉄吸収および網内系細胞からの鉄放出を抑制させることで、ACDの病態形成に関与するとする仮説が提唱された。ヘプシジンは肝で合成され、その発現が炎症性サイトカインの一つであるIL-6によって増強することが報告されているが、他の炎症性サイトカインがヘプシジン発現に関与しているかどうかは明らかにされていない。本研究では、2種の肝癌細胞株を用いて、炎症性サイトカインによるヘプシジン発現調節に関する検討を行った。</p> | | | |

材 料 ・ 方 法

【細胞及び細胞培養】 ヒト肝癌細胞株のHuH-7 細胞およびヒト肝芽腫細胞株のHepG2 細胞を使用した。培養は 10 % fetal bovine serumを含有したDulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)にて 5 %CO₂ 下で 37 °Cにて行った。

【Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)解析】 細胞からのRNA 抽出にはRNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN社)およびRNase-Free DNase Set (QIAGEN 社)を使用した。RNA 1 µgを鋳型として、M-MLV reverse transcriptase (Promega社)および Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen社)を使用した逆転写反応にてcDNAを作成した。ヘプシジン、IL-6、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に関しPCRおよび電気泳動を行った。

【定量的RT-PCR (quantitative RT-PCR: qRT-PCR)】 Total RNAからcDNAを作成した後 LightCycler (Roche社)でGAPDH、ヘプシジン、IL-6 の発現を定量した。増幅酵素とPCR産物の検出は、FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche社)を使用した

【炎症性サイトカイン存在下におけるmRNA発現の解析】 HuH-7 およびHepG2 細胞を IL-1β、IL-6、TNF-αの存在下で 24 時間培養後、total RNAを回収し、ヘプシジンmRNA 発現などに関してRT-PCRまたはqRT-PCRによる検討を行った。

【中和抗体によるIL-1β、IL-6 のヘプシジンmRNA誘導阻害】 HuH-7 細胞をIL-1β 0.2 ng/mlおよびIL-6 10 ng/ml存在下にてそれぞれ培養し、中和抗体(抗IL-1β抗体 1 µg/ml、抗IL-6抗体 10 µg/ml)存在の有無によるヘプシジンmRNA発現量の変化をqRT-PCRにて測定した。

成 績

肝細胞由来のHuH-7 とHepG2 細胞ではqRT-PCRにてヘプシジンmRNAの発現が確認された。これらの細胞を、IL-1β、IL-6、TNF-αの存在下で 24 時間培養し、ヘプシジン mRNAの発現量をqRT-PCRにて調べた。HuH-7 細胞においては、IL-1βおよびIL-6 刺激

によってヘプシジンmRNA発現量は有意に増加した。HepG2 細胞においてもIL-1 β 刺激によってヘプシジンmRNA発現量は有意に増加したが、IL-6 刺激ではヘプシジンmRNA発現増加を認めなかった。TNF- α 存在下ではHuH-7、HepG2 細胞ともにヘプシジンmRNA発現量は低下した。

IL-6 刺激によりヘプシジンmRNAの発現が増加するHuH-7 細胞を以後の検討に選択し、IL-1 β によるヘプシジンmRNA発現増加に関してさらに検討した。種々の濃度(100 pg/ml～10 ng/ml)のIL-1 β およびIL-6 存在下でのヘプシジンmRNA発現量をqRT-PCRで測定した。その結果、IL-1 β 濃度が 200 pg/mlのときにヘプシジンmRNA濃度は最大となり、これより高濃度ではヘプシジンmRNA誘導効果は低くなった。これに対してIL-6 刺激では、濃度依存性にヘプシジンmRNA発現量は増加した。

肝細胞においては、IL-1 β 刺激によってIL-6 発現が誘導されるという報告があり、IL-1 β 刺激によるヘプシジンmRNA発現増加が、IL-1 β の直接作用ではなく、IL-6 発現増加を介した間接的なものであるという可能性がある。そこで、HuH-7 細胞をIL-1 β で刺激し、IL-6 mRNA発現をRT-PCRにより検討したところ、IL-1 β 刺激なしではIL-6 mRNAは検出できなかったが、IL-1 β 刺激によりIL-6 mRNA発現が誘導された。次に、培養液中のIL-1 β 濃度を変化させ、IL-1 β 刺激によるIL-6 mRNA発現に与える影響をqRT-PCRにて検証した。その結果、IL-1 β の濃度が 2 ng/mlまではIL-6 mRNA発現は濃度依存性に増加し、それ以上ではほぼ横ばいとなり、IL-1 β によるヘプシジンmRNA誘導のパターンとは異なっていた。さらに、IL-1 β によるヘプシジンmRNA発現に対する、中和抗体(抗IL-6 抗体)の作用をqRT-PCRにて検証したところ、IL-6 刺激によるヘプシジンmRNA誘導は抗IL-6 抗体により完全に阻害されたが、IL-1 β 刺激によるヘプシジンmRNA発現誘導は、全く阻害されなかった。

考 案

本研究ではヒトの肝細胞由来であるHuH-7 およびHepG2 細胞において、従来報告されているIL-6 のみならずIL-1 β によってヘプシジンmRNA発現が誘導されることを明らかにした。HuH-7 細胞では、ヘプシジンmRNA発現増加が最大となるIL-1 β の至適濃度(200 pg/ml)が存在し、それより高いIL-1 β 濃度では、ヘプシジンmRNAの発現誘導を抑えるような何らかの阻害作用が働くことが推察された。肝細胞をIL-1 β によって刺激した場合に肝細胞からのIL-6 発現が誘導されることから、ヘプシジンmRNAのIL-1 β による発現増加が、

IL-1 β の直接作用であるのか、IL-6 発現増加を介した間接作用であるのかを検討した。結果として、IL-1 β 刺激によるIL-6 mRNA発現誘導はIL-1 β 刺激によるヘプシジンmRNA発現増加と比較しdose response patternが異なっていたこと、IL-6 刺激によるヘプシジン発現増加がIL-6 濃度依存性であったこと、さらに、IL-6 に対する中和抗体はIL-1 β によるヘプシジンmRNA発現誘導を阻害しなかったことを合わせて考慮すると、IL-1 β はIL-6 発現誘導を介してヘプシジンmRNA発現増加をきたすものではなく、IL-1 β の直接作用でヘプシジンmRNA発現を誘導するものと考えられた。IL-1 β は、細胞内鉄濃度を変化させるとともに、鉄貯蔵に機能するフェリチンの発現を直接増加させるなど、鉄代謝への関与が数多く報告されているが、本研究結果ではさらに鉄代謝調節ホルモンと考えられているヘプシジンの発現を調節することで、ACDの病態形成に重要であることが判明した。ACDは臨床上頻繁に遭遇する病態であるものの、それ自体に特異的な治療法は現在のところない。その新たな治療法の標的としてIL-1 β の作用抑制の検討も今後有用であると考えられた。

結 論

ヒト肝癌細胞株HuH-7において、IL-1 β はその直接作用でヘプシジンmRNA発現を誘導することが示された。IL-1 β もIL-6と同様にACDの病態形成に関与する事が示唆された。

引 用 文 献

- [1] E. Nemeth, E.V. Valore, M. Territo, G. Schiller, A. Lichtenstein, T. Ganz, Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein, *Blood* 101 (2003) 2461-2463.
- [2] E. Nemeth, S. Rivera, V. Gabayan, C. Keller, S. Taudorf, B.K. Pedersen, T. Ganz, IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 1271-1276.
- [3] T. Ganz, Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation, *Blood* 102 (2003) 783-788.

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 | 稲村純季 |
| 審査委員長 小川勝洋 ㊟ 審査委員 葛西真一 ㊟ 審査委員 高後裕 ㊟ | | | |
| 学位論文題目 Upregulation of hepcidin expression by inflammatory cytokine interleukin-1 β in human hepatoma cell lines (ヒト肝癌細胞株におけるインターロイキン-1 β による ヘプシジン発現誘導に関する研究) | | | |
| <p> 膠原病、悪性腫瘍、慢性感染症等ではしばしば血清鉄低下とフェリチン値上昇を特徴とする貧血が見られ、anemia of chronic disease (ACD)と呼ばれている。その発症機序についてはIL-6, IL-1β, TNFαなどの炎症性サイトカインが関与することが示されているが、最近、肝臓で産生される抗菌ペプチドの一つであるヘプシジンが重要な働きをする可能性が指摘されている。ヘプシジンは十二指腸での鉄吸収を抑制するとともに網内系に蓄えられている貯蔵鉄の利用を抑制する働きがあり、また、肝臓でのヘプシジンの産生は炎症性サイトカインの一つであるIL-6によって亢進することが報告されている。しかし、ヘプシジンの産生にIL-6以外のサイトカインが関係するか否かについては未だ明らかでない。 </p> <p> 本学位論文提出者はヒト肝癌細胞株を用いてヘプシジンの産生にIL-6以外のサイトカインが関与するか否かについて検討した。ヒト肝癌細胞株をIL-1β, IL-6, TNF-αで処理後、RT-PCRによりヘプシジン mRNA の発現を調べたところ、TNFαでは発現亢進が見られなかったが、IL-1β, IL-6 では見られた。また、ヘプシジン mRNA の上昇は、IL-6 では容量依存的であったのに対して、IL-1βでは低容量でピークが見られ、高容量では低下した。一方、IL-1βは肝細胞に対してIL-6の発現を誘導する働きがあることから、IL-1βによるヘプシジン誘導はIL-6を介している可能性が考えられる。実際、IL-1βで肝癌細胞を処理し </p> | | | |

学位論文の審査結果の要旨

たところ、容量依存的に IL-6 mRNA の発現が亢進した。しかし、このときに培養液中に IL-1 β の中和抗体を加えたところ、ヘプシジン mRNA の発現が抑制されたが、IL-6 中和抗体を加えてもそのような抑制効果は見られなかった。したがって、IL-1 β によるヘプシジン mRNA 発現亢進は IL-6 を介するものではなく、IL-1 β 自身の働きによることが明らかになった。

本論文はヘプシジンの発現に IL-6 のほかに、IL-1 β が関与することをはじめて明らかにしたものであり、慢性疾患に伴う貧血の病態や治療を考えるうえで貴重な知見をもたらすものである。当該論文提出者に対する試問審査を行った結果、的確な回答が得られ、関連領域について十分な知識を有することが明らかになった。よって本審査委員会は、本論文が学位論文に値するものと判定した。