

7) 鉄代謝調節因子ヘプシジンの発現アデノウイルス
・ベクターを用いた細胞内鉄イオン濃度の調整と遺
伝子治療応用へ向けた基礎検討

研究代表者 佐々木勝則

生田 克哉

[背景・目的]

ヘプシジン (*HAMP* gene 由来) は十二指腸上皮細胞や網内系マクロファージの細胞表面に発現している鉄汲み出し蛋白のフェロポルチン1 (FPN1) に作用し鉄放出を抑制するペプチドとして発見された。このヘプシジンはシグナル・ペプチドを含む84アミノ酸からなるプレプロヘプシジンとして肝臓で産生され、25アミノ酸の成熟型 (hepcidin-25) として循環血液内へと分泌され、消化管での鉄代謝調節に関与する。近年、*HAMP* gene のプロモーター領域の変異により、プロモーター活性の低下に伴うヘプシジン発現低下が起こり、その結果鉄過剰症が起こる症例の存在などが明らかとなってきた。このように、ヘプシジン発現低下が遺伝子上の問題である疾患に対する治療方法としてウイルスを用いた正常遺伝子の導入は有望な手段である。特に、ヘプシジンは肝臓を産生の場としている点において、肝臓に指向性のあるアデノウイルス (Ad) は治療遺伝子の運搬体として適した材料といえる。

そこで、本研究ではまず初めにヘプシジン発現アデノウイルスを作製し、その有用性を *in vitro* 実験で確認することを目的とした。

[方法・結果]

本研究では、将来の臨床応用を視野に入れ、本邦で開発した独創性のある遺伝子組換え Ad 産生用コスミド：pAx3¹⁾を採用した。ヘプシジン発現 Ad は以下の工程に従い作製した。シグナル・ペプチドを含む全84 アミノ酸をコードするプレプロヘプシジン cDNA を CA promoter と rabbit β -globin polyA との間に組み込んだヘプシジン発現ユニット (CAHAMP) を作製し、この CAHAMP DNA フラグメントを pAx3 上の Ad DNA/E 1 欠失部位に挿入した (pAx3CAHAMP)。HEK293 細胞へ遺伝子導入したのちウイルスを産生する3クローン (Ax3CAHAMP, clone: G-10, G-12, H-5) を選択した。ヘプシジン発現 Ad の DNA 構造を図1に示した。

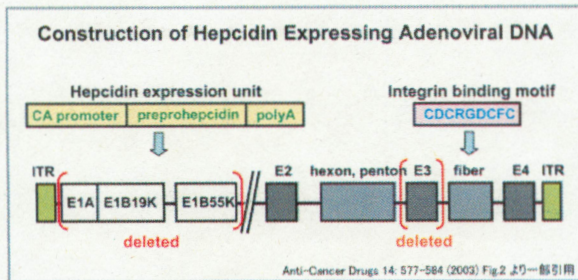


図1 ヘプシジン発現アデノウイルスの DNA 構造

これら3クローンの培地中に hepcidin-25 が分泌されていることを LC tandem MS/MS²⁾で確認することができた。図2-Aに clone: G-12 のデータを示した。対象は外来遺伝子が挿入されていないアデノウイルス：Ax3(null)を用いた (図2-B)。

アデノウイルス hepcidin-25 の生物活性を、その標的分子である FPN 1 の動態変化で評価した。この FPN 1 の動きを捉える目的で蛍光発光蛋白のひとつである EGFP を FPN 1 の N 末側に付加した EGFP-FPN 1 fusion protein を用いることとし、その発現プラスミド (pEGFP-FPN 1) をリポフェクション法にて HEK293T 細胞に遺伝子導入を行い、一過性ながらも細胞表面への EGFP-FPN 1 fusion protein の発現を確認した。そこに、hepcidin-25 の産生を確認した培地を添加し12時間培養を継続した後、hepcidin-25 の刺激による EGFP-FPN 1 の変化を蛍光顕微鏡にて観察し、さらにその蛍光強度をフロー・サイトメトリー (FACS) にて解析した。その結果、

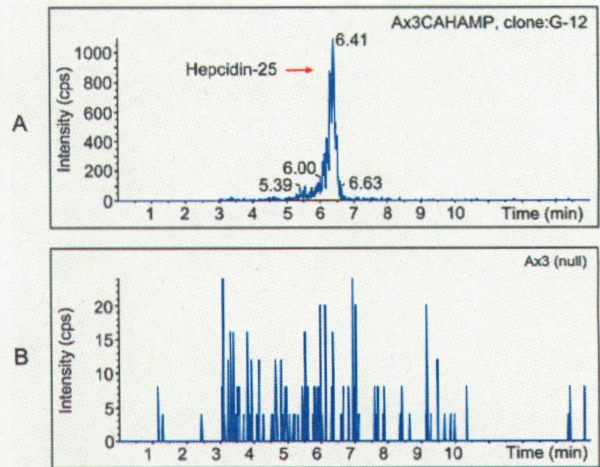


図2 LC tandem MS/MS によるヘプシジン-25の検出

細胞表面に diffuse に分布していた EGFP-FPN 1 蛋白 (図3-D) は hepcidin-25 の存在により集合し patch 状を呈した (図3-B)。さらに FACS 解析では、ヘプシジン発現ユニットを含まないアデノウイルス：Ax3 (null) を感染させた系での Median Fluorescence Intensity (MFI)：662.68 (図3-C) に対して、ヘプシジン発現アデノウイルス：Ax3CAHAMP を感染させた系では MFI：454.57 (図3-A) と、蛍光強度の低下を認めた。この現象は、これまでいわれているヘプシジンの機能：hepcidin-25 が FPN 1 と結合した後に FPN 1 の内在化が起こり FPN 1 の分解に導く、という機能を反映しているものと考えられることができる。このように、アデノウイルス由来ヘプシジンは生物活性を保有するペプチドであることが確認できた。

そこでヘプシジン発現 Ad を用いた *in vitro* 実験を計画し、その有用性を確認した。対象は12種類の肝がん細胞株の中で、その培地中に hepcidin-25 を検出することができなかった8種類の細胞株であり²⁾、その中から Hep3B 細胞および WRL68 細胞について表1にまとめた。これら細胞株のプレプロヘプシジン mRNA は RT-PCR 法にて陰性であった。このような状態の細胞株に Ax3CAHAMP (clone: G-12) を感染させ、48時間後の培養上清を LC tandem MS/MS にて解析したところ、hepcidin-25 の存在を確認した。つまり、これら細胞株はプレプロヘプシジンから hepcidin-25 へのプロセシング機能は正常に維持されていたことを証明するものである。

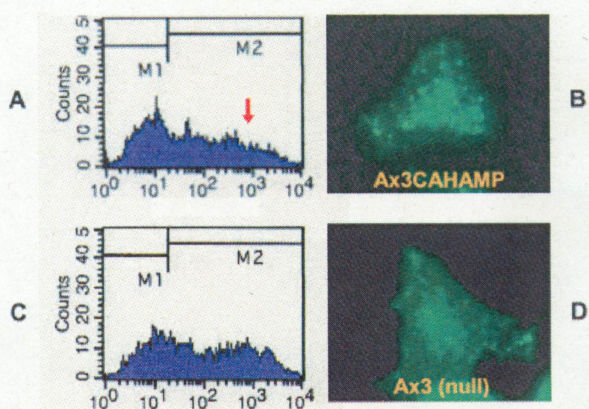


図3 EGFP-FPN1の一過性発現とヘプシジン-25の作用
 A, C: フローサイトメトリーによるEGFP 蛍光強度変化を測定
 B, D: 蛍光顕微鏡によるEGFP-FPN1の動態変化を観察

表1 ヘプシジン発現アデノウイルス感染後のヘプシジン-25検出(培養上清)

	No infection	Ax3 (null)	AxCAZ3 (<i>lacZ</i>)	Ax3CAHAMP
Hep3B	n.d.	n.d.	n.d.	detected
WRL68	n.d.	n.d.	n.d.	detected

n.d.: not detected

[考察]

今回作製したヘプシジン発現アデノウイルスは生物活性を保有したヘプシジン-25を産生することが確認され、その有用性が示唆されたことより、これまでその存在が確認されているがその産生機序に関しては未解明な hepcidin-20 および hepcidin-22 の分子生物学的研究 (*in vitro*) や各種肝疾患におけるヘプシジン発現低下³⁾に対する治療 (*in vivo*) などへの応用が期待される。

[文献]

- 1) Tanaka, et al., Clin. Cancer Res., 12: 3803-3813, 2006
- 2) Hosoki, et al., Proteomics-Clinical Applications, 3: 1256-1264, 2009
- 3) Ohtake, et al., Alcohol Clin. Exp. Res., 31: 2S-8S, 2007