

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	市来 一彦
<p>学位論文題目</p> <p>Up-regulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon α (インターフェロンαによるヘプシジンの発現調節)</p> <p>共著者名</p> <p>生田克哉, 高後 裕</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>生体内での鉄代謝は嚴重に調節され、その調節に、肝臓で産生される抗菌ペプチドであるヘプシジンが中心的役割を担う。ヘプシジンは、消化管の鉄の吸収を担う上部小腸の腸管上皮細胞と、老廃赤血球の破壊から鉄を再利用に回す網内系マクロファージ細胞膜表面のフェロポーチン (ferropoietin; 以下、FPN) に結合、その分解が促進されることで鉄の再利用を抑制して、生体内の鉄を負の方向に調節する。しかし、そうした調節が何らかの原因で崩れて鉄代謝異常をきたすと、様々な疾患の病態の形成や修飾に大きく関与する。なかでもC型慢性肝炎では鉄が病勢増悪因子であることが注目されている。一方、C型慢性肝炎では、インターフェロンα (IFNα) が標準治療薬として位置づけられている。この治療中に血清フェリチン値が上昇することや、リバビリン併用peg化インターフェロン治療の治療成功例では抑制されていたヘプシジン分泌能が回復することが報告され、投与したIFNαが鉄代謝に直接影響を与える可能性がある。本研究では、マウスにIFNαを投与し、生体鉄代謝にどのような影響を与えるか検討した。</p>			

材料・方法

(1) 動物実験モデル

6週齢のC57BL/6マウスにマウスIFN α を3~7日間、 10^4 IU/日または 10^5 IU/日で皮下注射にて投与した。コントロール群としてPBSのみを投与する群を作成した。マウスIFN α の投与完了後にマウスを屠殺し、血清と肝、十二指腸組織を採取した。

(2) 細胞培養

ヒト肝癌細胞株であるHepG2はATCCから購入、マウス初代培養肝細胞は6週齢のC57BL/6マウスの肝よりコラゲナーゼ還流法およびPercoll遠心分離法を用いて分離した。

(3) 血清及び肝鉄含有量とIL-6の測定

血清鉄濃度は自動血清分析装置で、肝鉄濃度は原子吸光法で測定した。マウス血清中IL-6はmultiplex bead-based sandwich immunoassay kitを用いて測定した。

(4) リアルタイムRT-PCR

マウス組織あるいは細胞から、RNAを抽出し、マウスのヘプシジン (*Hamp1*) , *transferrin receptor 1 (Tfr1)* , *Tfr2*, フェリチン重鎖、*divalent metal transporter 1 (DMT1)*、*IL-6*の特異的プローブを用いて、リアルタイムRT-PCRを施行した。ヒト肝癌細胞株HepG2でもヘプシジン、*IL-6*について同様に解析した。

(4) 血清ヘプシジン質量解析

液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化タンデムマススペクトロメトリー法でマウスの血清ヘプシジンを定量した。

(5) マウス十二指腸FPNの免疫染色

採取したマウス十二指腸サンプルからホルマリン固定パラフィン包埋試料を用い、一次抗体にanti-FPN1抗体を用いた。

(6) ウェスタン ブロット

HepG2細胞からRIPA bufferを用いてタンパクを抽出しウェスタン ブロットを行った。使用した一次抗体は、anti-STAT3、anti-phospho-STAT3 (Tyr705)、anti-Actin抗体である。

(7) 統計処理

Student' s T検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

- (1) 血清鉄は、IFN α 投与した群で有意な低下を認めた。マウス肝の鉄含有量は、各群間に有意な差を認めなかった。
- (2) 肝鉄代謝関連遺伝子の中で、*Hamp1* mRNAのみ有意に発現が増加した。
- (3) 血清中のヘプシジン濃度はIFN 10⁵ IU/日投与群で有意に増加した。
- (4) 十二指腸FPNの免疫染色では、十二指腸基底膜側のFPN発現が減少した。
- (5) IFN α の投与で、血清中のIL-6濃度は有意に増加した。
- (6) マウス初代培養肝細胞およびヒト肝癌細胞株HepG2の両者で、ヘプシジンのmRNAの発現量はともに増加した。同時に、IFN α β 受容体の中和抗体を作用させた群では、IFN α によるヘプシジン増加作用は消失した。
- (7) マウス初代培養肝細胞およびヒト肝癌細胞株HepG2の両者で、マウスまたはヒトIFN α の添加によって、ヘプシジンプロモータ領域に結合部位が存在するSTAT3の活性化を起こすことが認められた。また、IFN α β 受容体の中和抗体を作用させた群では、IFN α によるSTAT3の活性化は消失した。
- (8) 肝細胞もIL-6産生能を有するが、IFN α によって肝細胞でのIL-6 mRNA発現亢進は認められなかった。

考 案

マウスにIFN α を投与することで、ヘプシジンの発現亢進を肝臓でのmRNAおよびペプチドレベルで確認した。このヘプシジン上昇は、十二指腸のFPNの発現を低下させた。本研究ではIFN α 投与によって血清鉄低下が起こることも確認された。これはFPN低下によって鉄の吸収が抑えられること生じると考えられた。

このIFN α によるヘプシジン発現上昇の機序に関しては、強力なヘプシジン発現誘導作用を有するIL-6の血清中濃度の上昇が認められたことより、生体内で誘導されたIL-6がヘプシジンの発現亢進に寄与する経路が存在することが、まず考えられた。更にIFN α が肝細胞そのものに直接作用して、ヘプシジンの発現を亢進させることが明らかにされた。この直接作用に関しては、IFN α が細胞膜表面でIFN受容体と結合し、その後STAT3を活性化することにより、ヘプシジン発現亢進が起こることを証明した。さらに、肝細胞がIL-6産生能を有することから、IFN α が肝細胞からIL-6を産生させ、間接的にヘプシジン誘導を起こしている可能性をも検証したが、IFN α による肝細胞でのIL-6発現は亢進せず、IFN α が直接、肝細胞のSTAT3の活性化を引き起こし、ヘプシジン遺伝子のプロモータ領域に結合してその発現を亢進させると考えられた。

結 論

IFN α がヘプシジン発現誘導作用を有すること、ヘプシジンが腸管上皮細胞のFPNに作用することを確認した。結論として、生体内ではIFN α は、肝細胞への直接的な作用と、血液中のIL-6の上昇を介した間接的な作用の両者を有し、とくに前者はIL-6とは独立してIFN α そのものがSTAT3の活性化を起こし、ヘプシジン遺伝子発現の増強をすると考えられた。慢性肝炎患者に対するIFN α 投与は生体の鉄代謝からみて、鉄のネガティブ バランスを亢進し、過剰鉄の蓄積状態を緩和するものと考えられた。




引 用 文 献

1. Ryan JD, Altamura S, Devitt E, Mullins S, Lawless MW, Muckenthaler MU, Crowe J. Pegylated interferon- α induced hypoferrremia is associated with the immediate response to treatment in hepatitis C. *Hepatology*. 2012 Feb 15. doi: 10.1002/hep.25666. [Epub ahead of print]
2. Radaeva S, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Fan S, Cai H, Strom S, Liu Y, El-Assal O, Gao B. Interferon-alpha activates multiple STAT signals and down-regulates c-Met in primary human hepatocytes. *Gastroenterology*. 2002;122:1020-1034.

参 考 論 文

1. Inamura J, Ikuta K, Jimbo J, Shindo M, Sato K, Torimoto Y, Kohgo Y. Upregulation of hepcidin by interleukin-1beta in human hepatoma cell lines. *Hepatol Res*. 2005;33:198-205.
2. Hosoki T, Ikuta K, Shimonaka Y, Sasaki Y, Yasuno H, Sato K, Ohtake T, Sasaki K, Torimoto Y, Saito K, Kohgo Y. Heterogeneous expressions of hepcidin isoforms in hepatoma-derived cells detected using simultaneous LC-MS/MS. *Proteomics Clin Appl*. 2009;3:1256-1264.

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	市 来 一 彦
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員長</p> <p>伊藤 喜久</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員</p> <p>高後 裕</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>審査委員</p> <p>若宮伸隆</p>  </div> </div>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Up-regulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon α (インターフェロンαによるヘプシジンの発現調節)</p>			
<p>Hepcidin は 25 個のアミノ酸から構成されるペプチドで、肝臓から産生分泌される。その機能は十二指腸上皮細胞、網状内皮系の Mϕ の細胞表面に存在する鉄排出蛋白フェロポーチンと結合分解し、鉄の細胞内貯留に作用する。近年 C 型肝炎の治療の第一選択薬としてインターフェロン (IFN) が投与され、治療効果が得られるケースでは血中 hepcidin の増加が認められ、IFN の鉄代謝への関与の可能性が示唆されるが、その機序は明らかにされていない。そこで申請者は hepcidin との関連性から IFNα の生体鉄代謝制御に対する影響効果を <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i> の実験系で検索した。</p>			

In vivo の実験は、C57BL/6 マウスに $\text{IFN}\alpha$ を $10^4\sim 10^5$ IU/日を 3—7 日間皮下接種し、血清、肝臓組織、十二指腸組織を採取した。Hepcidin 測定は LC/MS—MS 法、組織内鉄は原子吸光法、インターロイキン 6 (IL-6) は免疫測定法による。肝臓組織における鉄代謝関連因子の mRNA 発現量は RT-PCR 法、腸管上皮細胞におけるフェロポーチンの局在変化は免疫組織染色法により解析した。一方、*in vitro* の実験では、ヒト肝臓細胞株 HepG3 細胞、C57BL/6 マウス肝臓細胞初代培養により同様に検討し、さらに $\text{IFN}\alpha$ のシグナル伝達分子 STAT3 の活性化は Western blotting により解析した。

結果は、1) $\text{IFN}\alpha$ 投与により血清 hepcidin、IL-6 は上昇、鉄は低下傾向を示した。2) マウスの肝臓組織、HepG2 細胞株、マウス肝臓初期培養細胞のいずれにおいても hepcidin 遺伝子 *Hamp1* の mRNA の発現の増強が見られ、 $\text{INF}\alpha/\beta$ レセプターの下流に存在する STAT3 のリン酸化が誘導された。3) $\text{INF}\alpha/\beta$ レセプターに対する特異抗体で発現はブロックされた。4) これに対しトランスフェリンレセプター 1、2、フェリチン重鎖、divalent metal transporter 1 (DMT1) など他の鉄関連代謝因子には発現増強は認められなかった。5) 血清 IL-6 は、 $\text{INF}\alpha$ 濃度依存性に増加を認めたが、IL-6 の mRNA の有意な発現増強は認められなかった。6) 十二指腸免疫組織染色では、フェロポーチンの基底膜側での染色陽性細胞の輝度の低下が示された。

要約すると、 $\text{IFN}\alpha$ は直接シグナル伝達分子 STAT3 の活性化を誘導して、肝細胞における hepcidin の産生を導き、最終的に十二指腸からの鉄の取り込みの減少、鉄再利用低下による血清濃度の低下の可能性を示すなど、Hepcidin 産生増強による $\text{INF}\alpha$ の鉄代謝制御機序の一端を解明した。

C 型肝炎において鉄の肝臓内貯留は、増悪因子として作用する。 $\text{INF}\alpha$ の治療効果は、鉄代謝の面からみて少なくとも Hepcidin がネガティブバランスへと作用することで、鉄の肝臓に対する負荷を軽減し生体恒常性の維持に果たす役割を新たに見出したことは、高く評価される。

また諮問審査に対して適切で論理的な回答を提示し、関連の知識も有するなど高い研究活動が示され、審査委員全員が一致して申請者の論文が学位にふさわしいものであると判定した。