

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	長谷部 拓夢
<p>学位論文題目</p> <p>マウス脂肪肝の鉄調節因子ヘプシジン発現低下に BMP binding endothelial regulatorが関与する</p> <p>北海道医学雑誌 第90巻1号 平成27年5月 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、飲酒習慣なしに肥満やメタボリックシンドロームの合併によって肝内脂肪沈着を来し、一部が肝硬変や肝臓に進展する慢性肝疾患である。NAFLDは種々の肝内酸化ストレスが作用することによって進展する。その中の一つに肝内鉄過剰による酸化ストレスが肝硬変、肝臓への進展に関与することが知られており [1]、2次性の鉄過剰状態にあるNAFLDに対しての瀉血療法の有効性が報告されている。肝細胞で産生される鉄代謝制御分子ヘプシジンは、鉄トランスポーターFerroportin 1の発現を調節して鉄代謝の恒常性を保つ役割を持つ。遺伝性ヘモクロマトーシスはヘプシジン発現調節に関与するHFE、トランスフェリン受容体2、ヘモジュベリン、またはヘプシジン自身の遺伝子異常によってヘプシジンの発現低下が起き、全身性鉄過剰となる。ヘプシジンの発現は、鉄過剰状態によってBone Morphogenetic Protein (BMP)-SMADシグナル経路またはトランスフェリン受容体経路が活性化し、炎症状態によってインターロイキン(IL)-6-STAT3シグナル経路が活性化して発現を誘導することで調節される。</p> <p>これまでアルコール性肝障害やC型慢性肝炎においては、ヘプシジン発現低下が合併する2次性鉄過剰症の原因と指摘されてきた。しかし、NAFLDにおける鉄過剰の機序については一定の見解がない。これはヘプシジンを中心とした鉄調節機構が、BMPやIL-6を含む様々な分子による複雑な調節を受けているためであると考えられる。</p> <p>本研究では、NAFLDモデルマウスの肝臓を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、NAFLDにおける鉄代謝異常に関係する重要な遺伝子を探索することを目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. NAFLDモデルマウスの作成

8週齢雄性C57BL/6マウスに通常飼料、または高脂肪食(F2HFD2、オリエンタル酵母、脂肪カロリー比82%)を16週間投与し屠殺し、血液および肝臓を採取し、以後の解析に用いた。

2. 血漿成分の解析

血漿内のアラニンアミノ基転移酵素 (ALT) と血漿鉄を日立自動分析装置で、マウス血漿フェリチンをmouse ferritin ELISAで、血漿内活性型ヘプシジン濃度をLC/ESI-MS/MSで測定した。

3. 肝病理組織による脂肪肝、肝炎、鉄沈着の評価

肝組織病理所見をヘマトキシリン・エオジン染色と鉄染色 (ベルリンブルー染色) により、肝内脂肪沈着や炎症、鉄沈着を評価した。

4. 原子吸光分析法による肝鉄貯蔵量の測定

肝組織をクロロホルムで脱脂し、乾燥後、濃硝酸で加熱溶解した。原子吸光光度計で鉄の原子化吸光度を測定し、標準曲線から鉄量 (mg Fe/g dry liver) を解析した。

5. 網羅的遺伝子発現解析

通常食群 (n=3) と高脂肪食群 (n=3) のマウス肝組織よりRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成し高出力シーケンサーIon Proton (Life Technologies) を用いて全mRNAシーケンス解析を行った。データ解析はCLC Genomics Workbenchを用いて個々の遺伝子発現量としてRPKM値 (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) を算出し、RPKM値の比の絶対値が1.5倍以上でStudent t検定により得られたP値が0.05未満の遺伝子を発現変動遺伝子として抽出した。

6. リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR)

サンプルRNAからcDNAを作成し、TaqManプローブを用いてHamp (ヘプシジン)、Bmper (BMP binding endothelial regulator)、18S rRNAに対してRT-qPCR解析を施行し、比較Ct法により遺伝子発現量を測定した。

7. ウェスタンブロット

肝組織あるいは免疫沈降されたマウス血漿サンプルからRIPAバッファーを用いてタンパク質を抽出し、SDS緩衝液と混合して電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写してリン酸化SMADとSMAD1、Actin、BMPER、BMP6の発現量を解析した。

8. 免疫化学染色・免疫蛍光染色

肝組織切片におけるBMPER発現をジアミノベンジジン発色による免疫化学染色で評価した。初代培養肝細胞と非実質細胞におけるE-CadherinとVE-Cadherinの発現をDAPIも加えた3重免疫蛍光染色により評価した。

9. マウス血漿の免疫沈降

Dynabeads (Life Technologies) とBMPER抗体を用いてマウス血漿の免疫沈降を行った。得られたサンプルのタンパク質発現をウェスタンブロットにより評価した。

10. マウス肝組織からの初代培養肝細胞および非実質細胞の分離

コラゲナーゼを含むHanks溶液を灌流した通常食飼育のマウス肝組織をPBSに懸濁し、遠心で得られた沈殿を肝細胞が含まれる分画として培養し、上清を非実質細胞が含まれる分画として培養して用いた。

11. 統計処理

有意差検定にはStudent t検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

成 績

1. 高脂肪食負荷マウスにおける脂肪肝、肝炎の発症と鉄動態の変化

通常食負荷マウス (R) に比べて高脂肪食負荷マウス (HF) では有意な体重増加、肝重量の増加、血漿ALT値の増加を認めた (BW; R群, 28.6 g; HF群, 51.9 g; $P < 0.0001$: 肝重量; R群, 1.24 g; HF群, 2.91 g; $P = 0.0029$: ALT; R群, 19.5 U/L; HF群, 147.6 U/L; $P < 0.0001$)。HFでは肝組織に著明な脂肪沈着を認めたが、明らかな炎症細胞浸潤は認めなかった。血漿鉄と血漿フェリチンは有意に高値を示した (鉄; R群, 136.1 $\mu\text{g}/\text{dL}$; HF群, 172.1 $\mu\text{g}/\text{dL}$; $P = 0.033$: フェリチン; R群, 593.5 ng/mL ; HF群, 826.2 ng/mL ; $P < 0.0001$)。

肝内鉄含有量はいずれの群においても上昇しておらず、鉄染色でも肝内鉄沈着を認めなかった。

2. 網羅的遺伝子発現解析

網羅的に遺伝子発現を解析した38114種類の遺伝子のうち、有意な発現変動が認められた遺伝子数は2314種類であった。このうち、ヘプシジン発現に関連する遺伝子に絞ると *Bmp4*、*Bmper*、*Epor* (エリスロポエチン受容体)、*Gdf15* (増殖分化因子15)、*Hamp*、*Hfe2* (ヘモジュベリン) の6遺伝子であった。

3. ヘプシジン発現と調節因子の検討

Hamp 遺伝子の発現がHFで低下していることをRT-qPCRで確認した (R群, 1.03; HF群, 0.53; $P=0.0029$)。翻訳産物の血漿ヘプシジン濃度はHFで有意に低下していた (R群, 140.7 ng/mL; HF群, 77.7 ng/mL; $P=0.0141$)。 *Bmp4*、*Bmper*、*Hfe2* の3遺伝子の翻訳産物がBMPシグナルに関与するため、伝達分子であるSMADのリン酸化を検討し、HFで有意な低下を認めた (R群, 0.99; HF群, 0.60; $P=0.0158$)。

4. マウスのBMPER発現の検討

ヘプシジン発現低下とリン酸化SMAD発現低下に対して *Bmp4*、*Hfe2* の挙動は相反する動きである。一方、*Bmper* 発現増加はそれに対応する発現変動であった。よって、今後の検討をBMPERに注目して進めた。マウス肝組織のBMPERをコードする *Bmper* mRNA 発現はHFで有意な増加を示した (R群, 1.06; HF群, 5.29; $P<0.0001$)。可溶性BMPERがBMP6と結合して抑制的に働くことから、RとHFの各群から得られた血漿をBMPER抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロットで蛋白発現を解析した。血漿中のBMPERはBMPER抗体で選択的に免疫沈降され、BMPERの阻害するターゲットであるBMP6が共免疫沈降されていた。

5. マウス肝組織の肝細胞と非実質細胞におけるBMPER発現解析

通常食投与マウス肝組織の免疫化学染色ではBMPERが類洞内腔に陽性像を示した。マウス肝組織におけるBMPER発現局在を確認するため、肝細胞と類洞内皮細胞を主とする非実質細胞を分離した。各細胞における *Bmper* mRNA 発現を測定したところ、非実質細胞で有意に高値を示した (肝細胞, 1.00; 非実質細胞, 34.42; $P<0.0001$)。

考 案

本研究では、可染鉄を認めない軽度の肝内鉄過剰状態を合併する16週間の高脂肪食負荷による脂肪肝モデルマウスで、網羅的遺伝子発現解析を行った。脂肪肝マウスにおける鉄過剰状態の機序に鉄代謝制御分子ヘプシジンの発現変化を想定してはいるが、特定の遺伝子に絞り込まないで遺伝子発現を網羅的に解析した。 *Hamp* 遺伝子の発現と翻訳蛋白ヘプシジンの発現が低下していることを確認し、発現変動遺伝子の中にヘプシジン発現変動に関与する遺伝子として5遺伝子を見出した。ヘプシジンは鉄吸収を負に調節する作用があり、発現低下によって鉄吸収が亢進して鉄過剰の原因となる。ヘプシジン発現低下の原因として、ヘプシジンを調節する主な上流シグナルであるSMADのリン酸化が低下していることを見出した。そして5遺伝子の中で、SMADシグナルを抑制的にする方向で変動している *Bmper* 遺伝子に注目した。

BMPERはBMP2,4,6の各々と結合しそのシグナル伝達を阻害することが知られており、低トランスフェリン血症マウスにおいてBMPERがBMP-SMADシグナルを抑制することでヘプシジン発現を抑制することが報告されている[2]。本研究では脂肪肝モデルでBMPER発現亢進がヘプシジン発現抑制の原因であることを示した。さらにBMPERが血中でBMP6と結合していることを証明した。これまでの報告では、肝組織中におけるBMPER発現局在は肝細胞と想定されていたが、本研究ではBMPERの発現が非実質細胞において優位であることを示した。ヘプシジン発現調節において、促進系のBMP6の発現が肝細胞のオートクライン調整より、非実質細胞からのパラクライン調節の方が重要であると示されているが[3]、抑制系のBMPERの発現もパラクラインで作用することは特筆すべき発見である。

結 論

高脂肪食負荷によるNAFLモデルマウスにおいて鉄過剰症が合併し、鉄制御分子ヘプシジンの発現低下が見られることを示した。この機序としてBMPシグナル制御分子BMPER発現亢進が関与し、さらに非実質細胞がBMPERを産生しパラクライン調節を行っていることを示した。BMPERはNAFLに合併する鉄過剰症の病態メカニズム上、重要な分子と考えられる。




引用文献

1. Sorrentino P, D'Angelo S, Ferbo U, et al. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steato-hepatitis. *J Hepatol* 2009; 50: 351-357.
2. Patel N, Masaratana P, Diaz-Castro J, Latunde-Dada G O, Qureshi A, Lockyer P, Jacob M, Arno M, Matak P, Mitry R R, Hughes R D, Dhawan A, Patterson C, Simpson R J, McKie A T. BMPER protein is a negative regulator of hepcidin and is up-regulated in hypotransferrinemic mice. *J Biol Chem* 2012; 287: 4099-4106.
3. Enns C A, Ahmed R, Wang J, Ueno A, Worthen C, Tsukamoto H, Zhang A S. Increased iron loading induces Bmp6 expression in the non-parenchymal cells of the liver independent of the BMP-signaling pathway. *PLoS One* 2013; 8: e60534.

参考文献

1. Ueno N, **Hasebe T**, Kaneko A, Yamamoto M, Fujiya M, Kohgo Y, Kono T, Wang CZ, Yuan CS, Bissonette M, Chang EB, Musch MW. TU-100 (daikenchuto) and ginger ameliorate anti-CD3 antibody induced T cell-mediated murine enteritis: microbe-independent effects involving Akt and NF- κ B suppression. *PLoS One*. 9(5): e97456. 2014.
2. **Hasebe T**, Sawada K, Nakajima S, Maeda S, Abe M, Suzuki Y, Ohtake T, Hasebe C, Fujiya M, Kohgo Y. Effective Control of Relapsing Disseminated Intravascular Coagulation in a Patient with Decompensated Liver Cirrhosis by Recombinant Soluble Thrombomodulin. *Internal Medicine*. 53(1): 29-33, 2014.
3. Sawada K, Ohtake T, **Hasebe T**, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatol Res*. 44(8): 920-934, 2014.

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	長谷部 拓夢
<p>審査委員長 山本 明美 </p> <p>審査委員 西川 祐司 </p> <p>審査委員 羽田 勝計 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>マウス脂肪肝の鉄調節因子ヘプシジン発現低下にBMP binding endothelial regulatorが関与する</p>			
<p>長谷部拓夢氏提出の学位論文「マウス脂肪肝の鉄調節因子ヘプシジン発現低下に BMP binding endothelial regulator が関与する」について、試問審査を行いました。さらに博士論文発表会での発表態度、質疑応答も審査いたしました。</p> <p>本論文は非アルコール性脂肪性肝疾患のモデルマウスにおける鉄過剰の機序を、主として網羅的遺伝子発現解析の手法を用いて明らかにしたものであります。</p> <p>諮問や発表会の聴講の結果、長谷部氏から本研究論文の内容、将来的な展望について、適切かつ明解な解答が得られ、また同氏が当該分野に関して、十分な知識を有していることが確認できました。また、本論文はヒトの脂肪肝の病態解明、新たな治療戦略の開発にも有益な示唆を与えるものであることが確認できました。</p> <p>また長谷部氏はすでに国際誌に筆頭著者として当該分野の疾患の症例報告を論文発表され、共著者としての原著論文もあり、医学研究者としての実績をしっかりとつんでいると考えます。</p> <p>よって、本論文は医学博士の学位論文に値すると判断いたしました。</p> <p>以上、ご報告申し上げます。</p>			