

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

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

長谷部 拓夢

1 博士学位論文

2
3 表題

4 マウス脂肪肝の鉄調節因子ヘプシジン発現低下に
5 BMP binding endothelial regulator が関与する

6
7 短縮題名

8 マウス脂肪肝での BMPER 発現亢進

9
10
11 長谷部 拓夢

12 旭川医科大学 内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野

13
14 主任：高後 裕 教授

15
16 原稿総頁数：27

17 図表総数：7

18
19 連絡者：長谷部 拓夢

20 宛先：078-8510 旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目 1-1

21 旭川医科大学 内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野

22 電話番号 0166-68-2462

23 FAX 番号 0166-68-2469

24 電子メールアドレス taku-has@asahikawa-med.ac.jp

25

緒言

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) は肝内脂肪沈着を来す疾患で、一般的にはエタノール換算で男性 30g/日超、女性 20g/日超の飲酒を伴わないものを指す。NAFLD は肝内の脂肪沈着のみである非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver; NAFL) とそれに炎症を伴い肝硬変・肝癌に進展し得る非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) に分けられる。NAFLD の発症には肥満や糖尿病などの生活習慣病との関連が指摘され、NAFLD/NASH 患者はアメリカ、ヨーロッパのみならずアジアの多くの地域においても増加している[1-3]。肥満患者が増加し続ける昨今において、NAFLD/NASH の病態解明と治療標的の探索は世界的に重要な課題である。

ウイルス性肝炎やアルコール性肝障害 (alcoholic liver disease; ALD)、NASH などの慢性肝疾患は病態が進展すると肝硬変や肝発癌を来す。NASH の病態進展において、Day 等は 1998 年に two-hit theory を提唱した[4]。まず first hit として肥満、脂質代謝異常、耐糖能異常が関連して NAFL を起こし、そこに second hit として種々の酸化ストレスによって肝内の炎症が誘導され、NASH に進展するとした。肝内の炎症が長期間持続したとき、NASH は他の慢性肝疾患と同様に肝硬変に進展し発癌に至る。NASH の進展要因となる酸化ストレスの原因として、脂質過酸化や腸内細菌の bacterial translocation、鉄過剰が知られている。しかし、NAFLD/NASH の発症・進展にはこの two-hit theory では説明できない点もあり、2010 年に Tilg 等は multiple parallel hits hypothesis を提唱している[5]。これは脂肪組織に由来するサイトカインやアディポサイトカイン分泌異常、腸管由来の細菌関連分子の関与が段階的に起きるわけではなく、多くの遺伝的因子、環境因子と並行して肝臓に作用し、NAFLD/NASH の病態に関与しているというものである。

NAFLD/NASH の病態増悪因子のひとつとして肝内鉄の増加がある。過剰な鉄は酸化ストレスを増強し臓器障害の原因となる。鉄過剰状態では、細胞内自由鉄が増加し、その結果フェントン反応を介して強力な酸化力を持つヒドロキシルラジカルが産生される。ヒドロキシルラジカル

1 は、脂質，蛋白質，核酸を酸化することにより容易に細胞を傷害し，線
2 維化，発癌を誘導する[6]．種々の鉄関連分子の遺伝子変異によって鉄が
3 臓器沈着し障害を起こす疾患の典型は遺伝性ヘモクロマトーシスである．
4 一方，鉄関連分子の遺伝子に異常のない二次性鉄過剰症の代表として輸
5 血依存性貧血の骨髄異形成症候群，再生不良性貧血，サラセミアがある
6 が，慢性肝疾患である ALD，C 型慢性肝炎（chronic hepatitis C; CHC）も
7 高頻度に軽度から中等度の肝内鉄過剰を合併し，肝障害の増悪に関与し
8 ている[6-8]． Sorrentino は NAFL から NASH や肝硬変，肝細胞癌への進
9 展が肝内の鉄沈着によって引き起こされることを指摘した[9]．この肝内
10 鉄沈着は肥満やインスリン抵抗性との関連性が指摘され，具体的には
11 NASH 患者において血清学的にはフェリチン値の増加，組織学的には肝
12 臓可染鉄がみられ，2 次性の鉄過剰状態となり，このような症例では瀉血
13 療法が有効であるとする報告がある[10, 11]．

14 生体活動維持に必要な鉄は，ほとんどが老廃赤血球ヘモグロビン鉄
15 の再利用で賄われ，食事からは 1 日わずか 1 mg 程度吸収されているだけ
16 である．そのため，鉄の貯蔵および体内調節は種々の鉄関連分子によっ
17 て巧妙に制御されている．吸収された食餌鉄は消化管から，また，老廃
18 ヘモグロビンからのリサイクル鉄はマクロファージから放出され，トラ
19 ンスフェリン（Tf）と結合し血中を運搬され，細胞表面のトランスフェ
20 リン受容体（TfR）を介して細胞内に取り込まれる．TfR にはトランスフ
21 ェリン受容体 1（transferrin receptor 1; TfR1）とトランスフェリン受容体 2
22 （transferrin receptor 2; TfR2）の 2 つの isoform があるが，Tf 結合鉄を細
23 胞内に取り込む役割は TfR1 である．細胞膜上に発現している鉄トランス
24 ポーターとして Divalent metal transporter 1（DMT1）は肝細胞エンドソーム
25 内の鉄を細胞質に放出し，また，腸管細胞における腸管管腔側から食
26 餌鉄を取り込む機能を担っている．同じく鉄トランスポーターの
27 Ferroportin 1（FPN1）は腸管細胞，マクロファージ内の鉄を血中に放出す
28 る機能を担っている．肝細胞で産生される鉄代謝制御分子ヘプシジンは
29 25 のアミノ酸からなるペプチドで，鉄負荷や炎症によって肝臓から分泌
30 され，FPN1 に結合して分解を促進し，腸管細胞とマクロファージから血

1 中への鉄放出を抑制し，鉄代謝を負に調節する[12].

2 ヘプシジン発現は鉄過剰や炎症で誘導され，低酸素，貧血で抑制さ
3 れる[13]. ヘプシジンの主要な発現調節は骨形成タンパク質（Bone
4 morphogenetic protein; BMP）受容体 - SMAD1/5/8 シグナル経路とインタ
5 ーロイキン（IL）-6 受容体-シグナル伝達兼転写活性化因子（Signal
6 Transducer and Activator of Transcription; STAT）3 シグナル経路，トランス
7 フェリン受容体の3つが知られている[14]. これらのシグナルはヘプシジ
8 ンをコードする *Hamp* 遺伝子の転写を促進し，鉄吸収を負に調節する.
9 遺伝性ヘモクロマトーシスでは *Hamp* 遺伝子または上記シグナル系路の
10 構成分子である HFE, TfR2, ヘモジュベリンをコードする遺伝子の変異
11 で，ヘプシジンの発現が低下することによって発症する[15-17].

12 これまで、アルコール負荷がヘプシジンの発現を低下させること
13 を我々と他の研究グループが報告している[18-20]. また，C 型肝炎ウイル
14 ス（HCV）トランスジェニックマウスにおいては，小胞体ストレスを
15 介したヘプシジン発現低下が示され[8], CHC 患者のインターフェロン治
16 療著効例でのヘプシジン発現の回復が報告された[21]. ALD や CHC の鉄
17 過剰にヘプシジン発現低下の関与の可能性が示唆されている. 一方，
18 NASH 患者では炎症反応や肝内鉄沈着と相関してヘプシジンの発現は増
19 加しているという報告や[22, 23], 逆にヘプシジン低下による鉄吸収亢進
20 が起きているという報告もある[24]. このように，NAFLD の鉄過剰の機
21 序に関して一定の見解がない.

22 本研究では，肝脂肪化における鉄調節障害とそのメカニズムの詳細
23 を明らかにするため，高脂肪食負荷による NAFLD モデルマウスを用い，
24 RNA シークエンシングによる網羅的遺伝子発現解析を行い，鉄代謝に関
25 与する重要な遺伝子を探索した.

26

27

27 材料と方法

28 1. 高脂肪負荷肥満モデルマウスの作成

29 8 週齢の雄性 C57BL/6 マウス（三協ラボサービス，東京，日本）に
30 マウス用通常飼料（MF，オリエンタル酵母株式会社）またはラードを主

1 成分とした脂肪 82% (カロリー比) の高脂肪食 (F2HFD2, オリエンタル
2 酵母株式会社) を 16 週間投与し屠殺した. 各飼料 100 g 中の鉄含有量は
3 それぞれ 10.6 mg (MF) と 6.0 mg (F2HFD2) である. 飼育環境は温度 22°C,
4 湿度 50~60%, 12 時間毎の明暗切り替えで調節され, 飼料と水は自由摂
5 取とした. マウスは屠殺 10 時間前から絶食, ジエチルエーテルで麻酔し,
6 体重測定, ヘパリンを含む注射器で右心室穿刺による採血をした後, 右
7 心耳を切開して左心室より 5 ml のリン酸緩衝液 (PBS) で全身を灌流し
8 た. 肝臓を摘出して肝重量を測定した後, 病理組織標本および免疫組織
9 化学染色, RNA シークエンシングおよびリアルタイム定量ポリメラーゼ
10 連鎖反応 (real-time quantitative polymerase chain reaction; RT-qPCR) 解析
11 用の total RNA 抽出, ウェスタンブロット解析, 肝鉄含有量測定のための
12 処理をした. これらの動物実験は, 旭川医科大学実験委員会の審査・承
13 認を受けて行った.

14

15 2. マウスからの初代培養肝細胞および非実質細胞の分離

16 C57BL/6 マウスをジエチルエーテル麻酔下に開腹し, 門脈からハン
17 クス液で肝内を灌流した後に 0.1% のコラゲナーゼ (和光純薬, 大阪, 日
18 本) を含むハンクス液で 10 分間灌流し, 肝組織の細胞を PBS で懸濁した.
19 懸濁された細胞を 100 μ m のセルストレイナー (Corning Life Sciences, 東
20 京, 日本; 08-771-19) を通した後 3 分間 500 rpm で遠心して, 得られた沈
21 殿を肝細胞として Williams' E 溶液に懸濁後, コラーゲンコートされてい
22 る培養皿に移して 1 時間静置し細胞を接着させた. 再度 Williams' E 溶液
23 で洗浄し, 残存した接着細胞を肝細胞として用いた.

24 前述 3 分間 500 rpm 遠心後の上清は非実質細胞が含まれる画分として
25 回収し, 3 回 3 分間 500 rpm で遠心して残存する肝細胞を除去した. 3 分
26 間 1500 rpm で遠心して得られた沈殿を, 10% ウシ胎児血清を含む DMEM
27 に懸濁してコラーゲンコートされている培養皿に移し, 1 時間静置して細
28 胞を接着させた. DMEM で激しく洗浄し, コラーゲンと強固に接着して
29 いる残存した接着細胞を非実質細胞として用いた.

30

1 3. 血漿成分の解析

2 心臓血をヘパリン採血後, 5 分間 15000 g で遠心して血漿を回収した.
3 血漿内のアラニンアミノ基転移酵素 (Alanine aminotransferase; ALT) と血
4 漿鉄を日立自動分析装置 (日立, 東京, 日本) で測定した. マウス血漿
5 フェリチンを mouse ferritin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
6 (ALPCO, Salem, NH, USA; 41-FERMS-E01) で測定した. 血漿内活性型へ
7 プシジン濃度を Liquid chromatography/electrospray Ionization-tandem mass
8 spectrometric technology (LC/ESI-MS/MS) で測定した[25].

9
10 4. 原子吸光法による肝鉄貯蔵量の測定

11 本測定のために回収した肝組織 100 mg に対して 1 ml のクロロホルム
12 を用いて脱脂した. 脱脂した肝臓は超小型遠心式濃縮機スピンドライヤ
13 ーミニ (タイテック, 埼玉, 日本; VC-15SP) を用いて乾燥させ, 乾燥肝
14 組織重量を測定した. 乾燥重量 20 mg に対して 1 ml の濃硝酸を添加し,
15 組織が完全に溶解するまで 90°C のヒートブロックで処理した. 溶解液は
16 硝酸が 0.1 mM となるよう鉄フリーのイオン交換水で希釈された. 原子吸
17 光光度計 (日立; Z-8100) で鉄の原子化吸光度を測定した. 標準液として
18 100 mg/l 鉄標準液 (和光純薬) を用いて鉄量を解析し mg Fe/g dry liver
19 weight で表した.

20
21 5. 病理組織

22 肝臓は 10% 中性緩衝ホルマリンを用いて 4°C で 24 時間固定した. 固
23 定された組織は PBS で洗浄し, 脱水を経てパラフィンに包埋した後 3 μm
24 の厚さに薄切しガラススライドに伸展した. スライドをヘマトキシリ
25 ン・エオジン染色とベルリンブルー染色で評価した.

26
27 6. RNA シークエンシングによる網羅的遺伝子発現解析

28 16 週通常食摂取群および 16 週高脂肪食負荷群それぞれ 3 サンプルよ
29 り得たマウス肝組織から, QIAGEN RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo,
30 Netherlands) を用いて RNA を抽出し, RiboMinus Eukaryote System (Life

1 technologies, Carlsbad, CA, USA) でリボゾーム RNA を除去した。リボゾ
2 ーム RNA 除去後の RNA から Ion Total RNA-Seq Kit (Life technologies)
3 を用いて cDNA ライブラリーを作成し, 高出力シーケンサー Ion Proton
4 (Life technologies) を用いてシーケンスデータを得た。網羅的遺伝子
5 発現解析は Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark) を用い,
6 mRNA 発現値として Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped
7 reads (RPKM 値) を算出した。通常食群, 高脂肪食群それぞれの各遺伝
8 子について RPKM 値の平均値を算出して, 発現比 (fold change) と Student
9 t 検定による p 値を計算した。発現比の絶対値が 1.5 より大きく (通常食
10 群/高脂肪食群 > 1.5 あるいは高脂肪食群/通常食群 > 1.5), かつ $P < 0.05$
11 の条件をみたす遺伝子を発現変動遺伝子として抽出した。

12

13 7. リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR)

14 肝組織および培養細胞の RNA を QIAGEN RNeasy Mini Kit (Qiagen)
15 を用いて抽出し, 濃度を一致させた RNA を RETRO script (Life
16 Technologies) を用いて逆転写し cDNA を得た。7300 Real-time PCR system
17 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で *Hamp*, *Bmper*, *18S rRNA*
18 の TaqMan probe (Applied Biosystems; Mm04231240, Mm01175806,
19 4352930E) を用いて Ct 値を測定した。サンプルは 96 穴プレートに
20 EagleTaq Master mix with ROX (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz;
21 06427022190) 10 μ l, *18S rRNA* プライマー 1 μ l, ターゲット遺伝子プライ
22 マー 1 μ l, サンプル cDNA 250 ng と RNase free water を全量 20 μ l となる
23 ように混合し, RT-qPCR を行った。インターナルコントロールとして *18S*
24 *rRNA* の Ct 値で RNA 量を標準化し, 比較 Ct 法により発現量を測定した。

25

26 8. ウェスタンブロット

27 マウス肝組織より RIPA バッファー (150 mM NaCl, 0.25% デオキシ
28 コール酸ナトリウム, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) を用いてタ
29 ンパク質を抽出した。タンパク濃度は Bio-Rad protein assay (Bio-Rad,
30 Hercules, CA, USA; 500-0006) を用いて Bradford 法により測定した。12%

1 Mini PROTEAN TGX™ Precast gel (Bio-Rad; 456-1045) を用いて、各サン
2 プル 30 µg のタンパク質を SDS 緩衝液と混合して電気泳動し、ニトロセ
3 ルロースメンブレン (Bio-Rad; 162-0115) に転写後 Super Block Blocking
4 Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 37515) でブロッキング
5 グを行った。1 次抗体として抗 Phospho SMAD1/5/8 抗体 (Cell Signaling
6 Technology; CST, Danvers, MA, USA; 9511) と抗 SMAD1 抗体 (CST, 9743),
7 抗 Actin 抗体 (BD Biosciences; 612656), 抗 BMPER 抗体 (Abcam, Cambridge,
8 England; ab73900), 抗 BMP6 抗体 (Abcam, ab155963) を用い、2 次抗体
9 として Goat Anti-Rabbit IgG (R&D systems, Minneapolis, MN, USA; HAF008)
10 を用いた。SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher
11 Scientific) を用いて可視化した。各タンパク質の発現量は画像処理ソフ
12 トウェア ImageJ を用いて各バンドの濃淡を数値化し解析した。

13

14 9. 免疫化学染色・免疫蛍光染色

15 肝組織切片をキシレンで脱パラフィンした後、エタノールで親水さ
16 せて 10 mM クエン酸緩衝液で 10 分間オートクレーブして抗原賦活した。
17 Super Block Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific; 37515) でブロッキ
18 ングし、抗 BMPER 抗体 (Abcam, ab73900) を 1:200 に希釈し、4°C で一
19 晩反応させた。2 次抗体として ImmPRESS reagent kit (Vector laboratories,
20 Burlingame, CA, USA; MP-7500) を使用し、ジアミノベンジジンで発色し、
21 マイヤー・ヘマトキシリンで核染色した。

22 マウス初代培養肝細胞および非実質細胞をカバーガラス (AGC テク
23 ノグラス, 静岡, 日本; 4925-010) 上に培養し、PBS で洗浄し 4%PBS 緩
24 衝パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。カバーガラスは 0.1%
25 Triton-X100 含有 PBS で 2 分間処理し、Super Block Blocking Buffer でブ
26 ロッキングし、E-Cadherin 抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA;
27 610182) および VE Cadherin 抗体 (Abcam; ab33168) を 1:200 で Super Block
28 Blocking Buffer で希釈し室温で 1 時間静置した。二次抗体として Alexa
29 Fluor 594 Goat Anti-Mouse IgG と Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG
30 (Life technologies; A-11032, A-11034) を使用し、DAPI で核を染色した

1 後，蛍光顕微鏡（キーエンス，大阪，日本; BZ-9000）で観察した。

3 10. マウス血漿の免疫沈降

4 Dynabeads (Life Technologies; 10003D) にそれぞれ 2 μ g の BMPER 抗
5 体 (Abcam; ab73900) かウサギ IgG (Abcam; ab37416) を用いて，10 μ l
6 ずつのマウス血漿から免疫沈降した．免疫沈降したサンプルを SDS 緩衝
7 液に溶解し，ウェスタンブロットにより免疫沈降されたタンパク発現を
8 解析した．

10 11. 統計処理

11 全ての結果は平均値で示し，図は box plot で示した．統計学的解析に
12 は 2 群間の解析に関して Student の t 検定を用いて，*P* 値が 0.05 未満を有
13 意とした．

16 結果

17 1. 高脂肪食負荷マウスにおける脂肪肝，肝炎の発症

18 マウス体重 (BW) と肝重量，血漿 ALT 値は 16 週間の高脂肪食負荷
19 マウス (HF 群) において 16 週間通常食摂取マウス (R 群) に比べて有
20 意に高値を示した (図 1A-C) (BW; R 群, 28.6 g; HF 群, 51.9 g; *P*<0.0001: 肝
21 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
22 U/l; *P*<0.0001)．肝組織は中心静脈域を優位とした大滴性脂肪化を HF 群
23 に認めた．R 群と HF 群のいずれにおいても明らかな炎症細胞浸潤は認め
24 なかった (図 1D-G)．

26 2. 高脂肪食負荷マウスにおける血漿鉄，血漿フェリチンと肝内鉄含有量 27 の変化

28 血漿鉄と血漿フェリチン濃度は R 群に対して HF 群で有意に高値を示
29 した (図 2A, B) (鉄; R 群, 136.1 μ g/dl; HF 群, 172.1 μ g/dl; *P*=0.033: フェ
30 リチン; R 群, 593.5 ng/ml; HF 群, 826.2 ng/ml; *P*<0.0001)．しかし，肝内鉄

1 含有量はいずれの群においても上昇しておらず (図 2C) (R 群, 0.126 mg
2 Fe/g dry wt; HF 群, 0.143 mg Fe/g dry wt; $P=0.49$), ベルリンブルー染色で
3 は R 群と HF 群のいずれも肝内に鉄沈着を認めなかった (図 2D, E). し
4 たがって, 肝内可染鉄の有意な増加はないものの, 血漿鉄と血漿フェリ
5 チンの増加から, 肝内可染鉄を認めない軽度の鉄過剰が生じていると考
6 えられた.

7 8 3. RNA シークエンシングによる網羅的発現解析とヘプシジン調節因子の 9 変化

10 作成した cDNA ライブラリーから高出力シーケンサーを用いてシ
11 ークエンスデータが得られた遺伝子は総数 38114 種類で, これらの遺伝
12 子を解析し, 発現比の絶対値が 1.5 より大きく, $P<0.05$ を満たす遺伝子
13 を発現変動遺伝子とし, 2314 種類が検出された (図 3). 対象を鉄関連遺
14 伝子およびヘプシジン発現調節因子となり得る炎症性サイトカインや
15 BMP を含む TGF- β 関連遺伝子等が含まれる 302 遺伝子に絞ると, ヘプシ
16 ジンをコードする *Hamp* を含め計 53 遺伝子の発現変化があった. 302 遺
17 伝子のうちヘプシジン発現変動に関与し得る遺伝子は 38 遺伝子で, この
18 うち発現変動遺伝子として *Bmp4*, *Bmper*, *Epor*, *Gdf15*, *Hamp*, *Hfe2* の
19 6 因子が検出され, 他の鉄関連遺伝子は発現比の絶対値が 1.5 倍未満また
20 は $P<0.05$ で発現変動遺伝子として検出されなかった (表 1). ヘプシジン
21 発現変動に関与する遺伝子は, 各々 BMP4, BMP binding endothelial
22 regulator (BMPER), エリスロポエチン受容体 (EPOR), 増殖分化因子 15
23 (Growth differentiation factor; GDF15), ヘプシジン, ヘモジュベリンを
24 コードする遺伝子である. BMP4 は BMP ファミリーのひとつ, BMPER
25 は BMP 受容体-SMAD シグナル経路の抑制系, EPOR と GDF15 は低酸素
26 応答によるヘプシジン発現抑制系, ヘモジュベリンは BMP 受容体の補因
27 子である. また, フェリチン H 鎖 (*Fth1*) mRNA は発現比が 1.5 を超え
28 ないものの, 有意な発現増加を認めた (発現比 1.49 倍, $P=0.008$). その
29 他 *Fth1* 以外にも 1.5 倍以上の発現変化がないものの, $P<0.05$ で有意な変
30 動差を認めるものを *Bmpr2*, *Cp*, *Hfe*, *Stat3*, *Tmprss6* の 5 遺伝子認めた.

1

2 4. 高脂肪食負荷マウスにおけるヘプシジン発現と肝内調節分子発現の変
3 化

4 HF 群における血漿鉄と血漿フェリチンの上昇に関して RNA シーク
5 エンシングで認めたヘプシジンをコードする *Hamp* 遺伝子の発現低下を
6 RT-qPCR で確認した. 全ての R 群と HF 群で RT-qPCR を用いて *Hamp*
7 mRNA 発現を定量したところ, *Hamp* mRNA 発現量は HF 群で有意に低下
8 していた (図 4A) (R 群, 1.03; HF 群, 0.53; $P=0.0029$). 次に, *Hamp* の翻
9 訳産物である血漿ヘプシジン濃度を LC/ESI-MS/MS で測定したところ,
10 HF 群で有意に低下していた (図 4B) (R 群, 140.7 ng/ml; HF 群, 77.7 ng/ml;
11 $P=0.0141$). HF 群における血漿鉄と血漿フェリチンの上昇にヘプシジン
12 発現低下が関与していると考えられた.

13 RNA シークエンシングの結果から *Hamp* 遺伝子発現調節系のうち
14 IL-6 受容体-STAT シグナル経路, トランスフェリン受容体に関連する遺
15 伝子群には変動がないが, BMP 受容体-SMAD シグナル経路に関与する
16 *Bmp4*, *Bmper*, *Hfe2* が変動していた. そのため, BMP 受容体-SMAD シ
17 グナル経路に関して R 群と HF 群の肝組織のリン酸化 SMAD と SMAD1
18 の発現量を比較することで SMAD の活性化状態を評価した. リン酸化
19 SMAD の発現は, SMAD1 の発現に対して HF 群で有意な低下を認めた (図
20 4C, D) (R 群, 0.99; HF 群, 0.60; $P=0.0158$).

21

22 5. マウス肝組織と血漿の BMPER 発現の検討

23 本研究で BMP 受容体-SMAD シグナル経路に関連する遺伝子では
24 *Bmp4*, *Bmper*, *Hfe2* の 3 遺伝子が高脂肪で発現が変動した. BMP4 は BMP
25 受容体のリガンドのひとつであるが, 生体内におけるヘプシジン発現誘
26 導活性は乏しいと考えられている. *Hfe2* 遺伝子がコードするヘモジュベ
27 リンは BMP 受容体の補因子である. HF 群ではヘプシジン発現低下とリ
28 ン酸化 SMAD の発現低下がみられ, *Bmp4*, *Hfe2* の挙動は相反する動きで
29 ある. 一方, ヘプシジン抑制系の *Bmper* の発現増加はヘプシジン発現低
30 下とリン酸化 SMAD 発現低下の結果と対応している. よって, *Bmper* 遺

1 伝子とその翻訳産物である BMPER に注目して解析した．R 群と HF 群から
2 得られた肝組織の RNA を用いた RT-qPCR で *Bmper* mRNA 発現の定量
3 を行ったところ，HF 群で有意な増加を認めていた（図 5A）（R 群, 1.06; HF
4 群, 5.29; $P<0.0001$ ）.

5 さらに，BMPER は血漿中の BMP6 と結合することで BMP6 の BMP
6 受容体結合と競合し，シグナルを抑制すると考えられている．本モデル
7 において血漿中の BMPER の存在と BMP6 との結合性に関して検討する
8 ために R 群と HF 群の血漿から抗 BMPER 抗体を用いて免疫沈降し，ウェ
9 スタンプロットを行って BMPER 抗体で検出した．ウサギ IgG による免
10 疫沈降では BMPER の検出はなく，BMPER 抗体で選択的に BMPER が免
11 疫沈降されていた．また，BMPER 抗体による免疫沈降で BMP6 が共免疫
12 沈降していることも確認された（図 5B）.

13

14 6. BMPER のマウス肝組織と肝細胞および非実質細胞における発現

15 R 群から得たマウス肝組織の BMPER 抗体による免疫染色では，肝細胞
16 の染色は陰性であったが類洞内腔に陽性像が確認された（図 6A）.
17 BMPER の発現局在を確認するため，通常飼料で飼育した C57BL/6 マウス
18 より初代培養肝細胞および非実質細胞を回収し，肝細胞では E-Cadherin
19 が陽性で，非実質細胞では類洞内皮細胞などに特異的に発現する
20 VE-Cadherin が陽性であることを確認した（図 6B, C）. 各細胞における
21 *Bmper* mRNA 発現を RT-qPCR で測定し，非実質細胞で有意に高値であっ
22 た（肝細胞, 1.00; 非実質細胞, 34.42; $P<0.0001$ ）（図 6D）.

23

24

24 考察

25 本研究では，16 週間の高脂肪食負荷による NAFL モデルマウスで血
26 漿鉄と血漿フェリチン値の増加から，肝可染鉄濃度の変化としては認め
27 られない軽度の鉄過剰状態になっていることが示された．貯蔵鉄を反映
28 するマーカーである血漿フェリチン値は，NASH 症例の組織学的な炎症
29 活動性と線維化進展度と相関することが報告されている[24]. 本研究では
30 16 週間の高脂肪食負荷マウスでは，炎症性細胞の浸潤はないが，ヒトの

1 NAFLに類似した中心静脈領域(Zone3)優位の大滴性脂肪滴沈着を呈し、
2 ALT、血漿鉄とフェリチンの上昇を認めた。フェリチンはRNAシーケン
3 シングの結果から転写レベルでも有意に上昇しており、原子吸光法に
4 よる肝内鉄濃度では明らかな差を認めなかったが、肝細胞内の鉄は増加
5 している可能性が示唆された。NAFLD/NASH進展に過剰鉄がROS産生
6 を介して肝細胞障害、線維化進展、肝発癌に関与していることが指摘さ
7 れており、それを裏付けるものと言えよう[24, 26]。ところで、Day等が
8 提唱したtwo-hit theoryでは、鉄が酸化ストレスを誘導するsecond hitと
9 して考えられていた[4]。しかし、今回の炎症性細胞浸潤のない肝脂肪化
10 だけの段階で既に分子レベルで食餌鉄吸収促進に代謝変化し、それに伴
11 うフェリチンの上昇や鉄酸化ストレスの基盤が形成され始めていること
12 を示しており、これは鉄代謝においてもTilg等が提唱したmultiple parallel
13 hits hypothesisを支持するものである[5]。

14 今回の研究では、鉄吸収促進の機序に関してヘプシジンの発現変化
15 を想定していながらも、特定の遺伝子に絞り込まないで網羅的に解析し
16 たことに意義がある。これはこれまでの報告においてNAFLD/NASH症例
17 におけるヘプシジンの発現変化に関して一定の見解がないことと、ヘ
18 シジン発現調節シグナルに多くの分子が関与し得るためである。RNAシ
19 ーケンシングによる網羅的遺伝子発現解析によって、鉄関連遺伝子お
20 よびヘプシジン発現調節因子となり得る炎症性サイトカインやBMPを含
21 むTGF- β 関連遺伝子等の302遺伝子のうちヘプシジンをコードする*Hamp*
22 を含め53遺伝子の発現変化があった。

23 網羅的遺伝子発現解析により発現変動した遺伝子のなかにヘプシジ
24 ン発現変動に関与する遺伝子として*Bmp4*, *Bmper*, *Epor*, *Gdf15*, *Hfe2*
25 の5遺伝子が検出された。BMP受容体のリガンドとしてヘプシジン発現
26 においてはBMP6が最も重要であるが[27]、今回誘導されていたBMP4
27 も*in vitro*でBMP/SMADシグナルを刺激することが知られている。しか
28 し、既にBMP4はBMP2とともに生体内においてヘプシジン発現を調節
29 する機能が低いことが動物実験で証明されている[27]。本研究ではBMP6
30 発現に差がないことからヘプシジン発現の観点ではBMP受容体の総リガ

1 ンド量は変化していないと考えているが, BMP4 が高脂肪食負荷マウスに
2 おいてどの程度ヘプシジン発現を誘導するかは今後の研究課題である.
3 BMP 受容体の補因子であるヘモジュベリンをコードする *Hfe2* の誘導に
4 関しても今後の検討課題である. 一方, 実際のヘプシジン発現抑制の表
5 現型と合った抑制系遺伝子として *Bmper*, *Epor*, *Gdf15* の 3 遺伝子が検出
6 された. これらの中で *Epor* と *Gdf15* はエリスロポエチンを介した低酸素
7 応答性のヘプシジン制御に関与している遺伝子であることが既に報告さ
8 れている[28, 29]. 本 NAFL モデルにおいても Zone3 領域の高度脂肪沈着
9 によってこの領域が相対的低酸素状態になっている可能性が考えられる.
10 BMPER は BMP/SMAD シグナルの抑制系として知られていたが[30], 肝
11 臓においては遺伝子改変による低トランスフェリン血症マウスにおいて
12 ヘプシジン抑制因子として作用していることが指摘された[31]. 我々は本
13 NAFL モデルで新たに BMPER が肝内でのヘプシジン抑制シグナルとな
14 ることを示した.

15 CHC や ALD においては主にヘプシジンの発現異常が 2 次的に起きて
16 いる可能性が指摘されている[8, 19]. しかし, NAFLD/NASH の肝臓にお
17 いてはヘプシジン発現に関して一定の見解がなく, その他の鉄関連分子
18 の発現動態とその意義づけについては, 明らかとなっていない. NAFLD
19 の肝内鉄沈着においてもヘプシジン発現低下による鉄吸収亢進が関与し
20 ているという報告はあるが[24], 多くの報告で鉄沈着の程度に相関してヘ
21 プシジン発現が亢進していることが指摘され, これは肝内での炎症が関
22 わっているためと考察されている[22, 23, 32]. Mitsuyoshi 等は NAFLD 患
23 者の 74 の生検検体を用いて Hpcidin mRNA とフェリチンの比もしくは
24 Hpcidin mRNA と HIS (hepatic iron score) の比は NAFL 患者より NASH
25 患者で低下していると報告している[33]. しかし, 炎症の少ない脂肪肝で
26 のヘプシジン発現は報告がない. 本研究におけるマウスは NASH モデル
27 ではなく, 炎症を伴わない肥満・NAFL モデルである. この NAFL マウ
28 スのヘプシジン発現は, マウス肝組織の mRNA レベルおよび血漿中の活
29 性型ヘプシジン濃度のいずれにおいても低下していた. これらの結果か
30 ら, 肥満あるいは肝脂肪化はヘプシジン発現のベースラインを下げる可

1 能性が考えられる。

2 ヘプシジン発現は鉄感知シグナルのトランスフェリン受容体と
3 TGF- β ファミリーシグナルの BMP，炎症シグナルの IL-6 によって亢進す
4 ることが知られている。トランスフェリン受容体は BMP 受容体と協調し
5 て作用することが示唆されているが，未だ十分に解明されていない。そ
6 れに対して BMP シグナルから活性化するリン酸化 SMAD と IL-6 シグナ
7 ルから活性化するリン酸化 STAT3 シグナルに関しては研究が進んでいる。
8 本研究で 16 週間食餌負荷マウスの通常食と高脂肪食いずれにおいても組
9 織学的な炎症が少なく，RNA シークエンシングでも IL-6 の発現変動はみ
10 られないことから，IL-6 の関連シグナルは本モデルのヘプシジン発現に
11 対する関与がないと考えられた。高脂肪食負荷マウス肝のリン酸化
12 SMAD1/5/8 は対照群に対して有意に低下しており，当モデルでのヘプシ
13 ジン量の低下が BMP シグナルの低下によってもたらされていると考えら
14 れた。ヘプシジンシグナル抑制因子として，Gdf15 や Matriptase-2, Twisted
15 gastrulation protein homolog 1 (TWSG1)，エリスロフェロン，
16 Ras/RAF/MAPK 経路，mTOR 経路なども指摘されているが[34-38]，今回
17 の網羅的 RNA シークエンシングでは BMP シグナルを低下させる因子と
18 して *Bmper*, *Epor*, *Gdf15* の 3 遺伝子の発現上昇が検出され，本研究で新
19 たに見出された高脂肪食摂取時の *Hamp* 転写制御過程における BMPER の
20 役割に注目して検討を進めた。

21 BMPER がヘプシジン発現を抑制する分子の一つであることは，低ト
22 ランスフェリン血症マウスにおいてリコンビナント BMPER を用いた研
23 究で，BMPER が BMP と結合して BMP/SMAD シグナルを抑制すること
24 より起こると報告されている[31]。BMPER は生体内で BMP2,4,6 と結合
25 しその作用を抑制することも報告されている[30, 39]。さらに，BMPER
26 の形態は分泌型と細胞膜関連型があり，このうち特に分泌型において
27 BMP シグナル抑制能があることが指摘されている[40]。本研究において
28 マウス血漿と BMPER 抗体を用いた免疫沈降により BMPER がマウス血漿
29 内に発現しており，高脂肪食負荷群で増加していることがわかった。肝
30 ヘプシジン発現においては BMP6 が BMP シグナルの主要調節分子である

1 事が知られている[27, 41]. 本研究では血漿中で BMPER が発現しており,
2 BMP6 が共免疫沈降されていることから血漿中で BMP6 と結合している
3 ことが確認された. これにより, 高脂肪食負荷マウスにおいて BMPER
4 は肝内発現が上昇し, 分泌型として BMP6 と結合することで, ヘプシジ
5 ン発現抑制的に作用していることが示唆された. 本研究で分泌型 BMPER
6 の発現量を検討するために, 免疫沈降で得られたバンド濃度測定を行っ
7 たが R 群と HF 群で有意な差が得られなかった (データ提示なし). これ
8 は免疫沈降処理過程における抗体とエピトープの親和性の影響, 飽和性
9 の限界から定量性が失われたためと考える. BMPER 発現量の詳細な検討
10 のためには, 今後, 高感度 ELISA 法の確立が必要と考えられる.

11 　　これまで肝内での BMPER 発現局在に関しては明らかでなかったが,
12 肝細胞が様々な蛋白合成能を持つことから肝細胞が発現部位であること
13 が想定されていた[42]. 一方, BMPER は血管新生を促進する作用があり,
14 皮膚や心臓, 肺の血管内皮細胞から分泌されることが報告されていた[43].
15 本研究では肝細胞と類洞内皮細胞を主とする非実質細胞を分離すること
16 により, BMPER は非実質細胞において強く発現していることがわかった.
17 ヘプシジン調節において BMPER は非実質細胞から産生されて, 肝細胞に
18 対してパラクライン的に働くことで発現を調節していることが示唆され
19 た. 近年, BMP/SMAD シグナル系の主要リガンドである BMP6 も肝内の
20 特に非実質細胞から発現することが示され, ヘプシジン発現において肝
21 細胞自体からのオートクラインだけでなく, 非実質細胞からのパラクラ
22 イン的調節の重要性が指摘されているが, 抑制系の BMPER もパラクラ
23 インで作用することは特筆すべき発見である.

24 　　鉄代謝調節にヘプシジンが大きな役割を果たすことは知られている
25 が, ヘプシジンの発現には様々な分子が複雑なクロストークを介して発
26 現調節を行っており, 未知な部分が多い. NASH 患者のヘプシジン発現
27 の検討で一定の変化を示さないのも[22-24], ヘプシジン調節に多くの調
28 節因子が関与しているためと考えられる. 今回の NAFL モデルにおいて
29 も他の鉄代謝関連分子や炎症性サイトカイン, TGF- β 関連の遺伝子が
30 遺伝子変動している. これらの遺伝子発現の変化と本モデルの鉄蓄積増

1 加またはヘプシジン発現シグナルとの関連性に関しては今後の検討課題
2 である。また、鉄関連遺伝子のなかで今回用いた基準である発現比 1.5
3 を超えないものの、*P* 値では有意差が得られているものが 6 遺伝子認め
4 られた (*Bmpr2*, *Cp*, *Fth1*, *Hfe*, *Stat3*, *Tmprss6*)。これらの発現変化の
5 小さな遺伝子も、病態に重要な意味を持つ発現変化の可能性があり、今
6 後の検討が必要である。さらに、今回解析に用いたのは肝組織のみであ
7 り、鉄代謝に関係の強い腸管や脾臓、骨髄のほか、肥満と関連する脂肪
8 組織など他臓器とのクロストークも未知であるため、これらも検討の必
9 要がある。

10 今後、NAFLD における BMPER 発現亢進は、その病態解明と新たな
11 治療方法の開発に繋がることが期待される。

12

13 結語

14 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伴い、
15 鉄制御分子ヘプシジンの発現低下も見られることを明らかにした。この
16 機序として肝内から産生される BMP シグナル制御分子 BMPER の上昇が
17 関与し、BMPER は肝細胞に比べて非実質細胞から優位に発現しているこ
18 とを示した。BMPER は NAFLD に合併する鉄過剰症の病態メカニズムと
19 その治療重要分子であると考えられる。

20

21 謝辞

22 稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、研究の立案と
23 論文作成にご指導・ご助言を賜りました旭川医科大学医学部 内科学講座
24 消化器・血液腫瘍制御内科学分野 高後裕 教授と、実験に関し直接ご指
25 導を頂きました、旭川医科大学 臨床消化器・肝臓学診療連携講座 大竹
26 孝明 特任教授、田中宏樹 特任講師に深謝します。

27

28 参考文献

29

30 1 Browning J D, Szczepaniak L S, Dobbins R, Nuremberg P, Horton J D, Cohen

- 1 J C, Grundy S M, Hobbs H H. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population
2 in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; **40**: 1387-1395.
3
- 4 2 Fan J G, Saibara T, Chitturi S, Kim B I, Sung J J, Chutaputti A. What are the
5 risk factors and settings for non-alcoholic fatty liver disease in Asia-Pacific? *J*
6 *Gastroenterol Hepatol* 2007; **22**: 794-800.
7
- 8 3 Chitturi S, Farrell G C, Hashimoto E, Saibara T, Lau G K, Sollano J D.
9 Non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: definitions and overview
10 of proposed guidelines. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; **22**: 778-787.
11
- 12 4 Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*
13 1998; **114**: 842-845.
14
- 15 5 Tilg H, Moschen A R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver
16 disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; **52**: 1836-1846.
17
- 18 6 Bacon B R, Britton R S. The pathology of hepatic iron overload: a free
19 radical--mediated process? *Hepatology* 1990; **11**: 127-137.
20
- 21 7 Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala
22 S, Brittenham G M. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin*
23 *Invest* 1995; **96**: 620-630.
24
- 25 8 Nishina S, Hino K, Korenaga M, Vecchi C, Pietrangelo A, Mizukami Y,
26 Furutani T, Sakai A, Okuda M, Hidaka I, Okita K, Sakaida I. Hepatitis C virus-induced
27 reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin
28 transcription. *Gastroenterology* 2008; **134**: 226-238.
29
- 30 9 Sorrentino P, D'Angelo S, Ferbo U, Micheli P, Bracigliano A, Vecchione R.

1 Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on
2 non-alcoholic steato-hepatitis. *J Hepatol* 2009; **50**: 351-357.
3

4 10 Valenti L, Fracanzani A L, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G,
5 Manzini P, Vanni E, Fargion S. Iron depletion by phlebotomy improves insulin
6 resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia:
7 evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 1251-1258.
8

9 11 Kowdley K V, Belt P, Wilson L A, Yeh M M, Neuschwander-Tetri B A,
10 Chalasani N, Sanyal A J, Nelson J E. Serum ferritin is an independent predictor of
11 histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver
12 disease. *Hepatology* 2012; **55**: 77-85.
13

14 12 Nemeth E, Tuttle M S, Powelson J, Vaughn M B, Donovan A, Ward D M,
15 Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and
16 inducing its internalization. *Science* 2004; **306**: 2090-2093.
17

18 13 Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan J L, Bigard X, Devaux I, Beaumont C,
19 Kahn A, Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is
20 regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002; **110**: 1037-1044.
21

22 14 Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*
23 2012; **1823**: 1434-1443.
24

25 15 Vujic M. Molecular basis of HFE-hemochromatosis. *Front Pharmacol* 2014;
26 **5**: 42.
27

28 16 Pietrangelo A, Caleffi A, Corradini E. Non-HFE hepatic iron overload. *Semin*
29 *Liver Dis* 2011; **31**: 302-318.
30

1 17 Wallace D F,Subramaniam V N. Non-HFE haemochromatosis. World J
2 Gastroenterol 2007; **13**: 4690-4698.
3

4 18 Ohtake T, Saito H, Hosoki Y, Inoue M, Miyoshi S, Suzuki Y, Fujimoto
5 Y,Kohgo Y. Hepcidin is down-regulated in alcohol loading. Alcohol Clin Exp Res
6 2007; **31**: S2-8.
7

8 19 Harrison-Findik D D, Schafer D, Klein E, Timchenko N A, Kulaksiz H,
9 Clemens D, Fein E, Andriopoulos B, Pantopoulos K,Gollan J. Alcohol
10 metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and
11 leads to increased duodenal iron transporter expression. J Biol Chem 2006; **281**:
12 22974-22982.
13

14 20 Bridle K, Cheung T K, Murphy T, Walters M, Anderson G, Crawford D
15 G,Fletcher L M. Hepcidin is down-regulated in alcoholic liver injury: implications for
16 the pathogenesis of alcoholic liver disease. Alcohol Clin Exp Res 2006; **30**: 106-112.
17

18 21 Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, Tomosugi N, Tanaka H, Takeo M, Iwasa
19 M, Kobayashi Y, Hayashi H, Kaito M,Takei Y. Patients with chronic hepatitis C
20 achieving a sustained virological response to peginterferon and ribavirin therapy
21 recover from impaired hepcidin secretion. J Hepatol 2008; **49**: 702-710.
22

23 22 Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, Iannelli A,
24 Staccini-Myx A, Casanova D, Ben Amor I, Saint-Paul M C, Huet P M, Sadoul J L,
25 Gugenheim J, Srai S K, Tran A,Le Marchand-Brustel Y. Increased adipose tissue
26 expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH.
27 Gastroenterology 2006; **131**: 788-796.
28

29 23 Senates E, Yilmaz Y, Colak Y, Ozturk O, Altunoz M E, Kurt R, Ozkara S,
30 Aksaray S, Tuncer I,Ovunc A O. Serum levels of hepcidin in patients with

1 biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Metab Syndr Relat Disord* 2011; **9**:
2 287-290.

3

4 24 Nelson J E, Wilson L, Brunt E M, Yeh M M, Kleiner D E, Unalp-Arida
5 A, Kowdley K V. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and
6 histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011; **53**:
7 448-457.

8

9 25 Hosoki T, Ikuta K, Shimonaka Y, Sasaki Y, Yasuno H, Sato K, Ohtake T,
10 Sasaki K, Torimoto Y, Saito K, Kohgo Y. Heterogeneous expressions of hepcidin
11 isoforms in hepatoma-derived cells detected using simultaneous LC-MS/MS.
12 *Proteomics Clin Appl* 2009; **3**: 1256-1264.

13

14 26 Valenti L, Fracanzani A L, Bugianesi E, Dongiovanni P, Galmozzi E, Vanni E,
15 Canavesi E, Lattuada E, Roviato G, Marchesini G, Fargion S. HFE genotype,
16 parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty
17 liver disease. *Gastroenterology* 2010; **138**: 905-912.

18

19 27 Andriopoulos B, Jr., Corradini E, Xia Y, Faasse S A, Chen S, Grgurevic L,
20 Knutson M D, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin H Y, Babitt J L. BMP6 is a key
21 endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 2009;
22 **41**: 482-487.

23

24 28 Yoon D, Pastore Y D, Divoky V, Liu E, Mlodnicka A E, Rainey K, Ponka P,
25 Semenza G L, Schumacher A, Prchal J T. Hypoxia-inducible factor-1 deficiency
26 results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse
27 development. *J Biol Chem* 2006; **281**: 25703-25711.

28

29 29 Liu Q, Davidoff O, Niss K, Haase V H. Hypoxia-inducible factor regulates
30 hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin Invest* 2012; **122**:

1 4635-4644.
2
3 30 Moser M, Binder O, Wu Y, Aitsebaomo J, Ren R, Bode C, Bautch V L,
4 Conlon F L, Patterson C. BMPER, a novel endothelial cell precursor-derived protein,
5 antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation.
6 Mol Cell Biol 2003; **23**: 5664-5679.
7
8 31 Patel N, Masaratana P, Diaz-Castro J, Latunde-Dada G O, Qureshi A,
9 Lockyer P, Jacob M, Arno M, Matak P, Mitry R R, Hughes R D, Dhawan A, Patterson
10 C, Simpson R J, McKie A T. BMPER protein is a negative regulator of hepcidin and is
11 up-regulated in hypotransferrinemic mice. J Biol Chem 2012; **287**: 4099-4106.
12
13 32 Nelson J E, Klintworth H, Kowdley K V. Iron metabolism in Nonalcoholic
14 Fatty Liver Disease. Curr Gastroenterol Rep 2012; **14**: 8-16.
15
16 33 Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y,
17 Okanou T, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of
18 fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol Res 2009; **39**:
19 366-373.
20
21 34 Tanno T, Noel P, Miller J L. Growth differentiation factor 15 in erythroid
22 health and disease. Curr Opin Hematol 2010; **17**: 184-190.
23
24 35 Folgueras A R, de Lara F M, Pendas A M, Garabaya C, Rodriguez F,
25 Astudillo A, Bernal T, Cabanillas R, Lopez-Otin C, Velasco G. Membrane-bound
26 serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis.
27 Blood 2008; **112**: 2539-2545.
28
29 36 Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh S J, Byrnes C, Bhupatiraju A, Lee Y T,
30 Goodnough J B, Harandi O, Ganz T, Paulson R F, Miller J L. Identification of TWSG1

1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human
2 cells. *Blood* 2009; **114**: 181-186.

3

4 37 Mleczko-Sanecka K, Roche F, da Silva A R, Call D, D'Alessio F, Ragab A,
5 Lapinski P E, Ummanni R, Korf U, Oakes C, Damm G, D'Alessandro L A,
6 Klingmuller U, King P D, Boutros M, Hentze M W, Muckenthaler M U. Unbiased
7 RNAi screen for hepcidin regulators links hepcidin suppression to proliferative
8 Ras/RAF and nutrient-dependent mTOR signaling. *Blood* 2014; **123**: 1574-1585.

9

10 38 Kautz L, Jung G, Valore E V, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of
11 erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014; **46**:
12 678-684.

13

14 39 Moser M, Patterson C. Bone morphogenetic proteins and vascular
15 differentiation: BMPing up vasculogenesis. *Thromb Haemost* 2005; **94**: 713-718.

16

17 40 Zhang J L, Huang Y, Qiu L Y, Nickel J, Sebald W. von Willebrand factor type
18 C domain-containing proteins regulate bone morphogenetic protein signaling through
19 different recognition mechanisms. *J Biol Chem* 2007; **282**: 20002-20014.

20

21 41 Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth M P.
22 Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat*
23 *Genet* 2009; **41**: 478-481.

24

25 42 Liu S Q, Tefft B J, Roberts D T, Zhang L Q, Ren Y, Li Y C, Huang Y, Zhang
26 D, Phillips H R, Wu Y H. Cardioprotective proteins upregulated in the liver in
27 response to experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*
28 2012; **303**: H1446-1458.

29

30 43 Heinke J, Wehofsits L, Zhou Q, Zoeller C, Baar K M, Helbing T, Laib A,

1 Augustin H, Bode C, Patterson C, Moser M. BMPER is an endothelial cell regulator
2 and controls bone morphogenetic protein-4-dependent angiogenesis. *Circ Res* 2008;
3 **103**: 804-812.
4

図表の説明

図 1. 高脂肪食負荷によるマウスの体格変化と肝炎, 肝線維化の推移.

16週高脂肪食負荷マウス (HF 群, $n = 10$) では16週通常食摂取マウス (R 群, $n = 10$) に比べて有意に体重が増加し (A), 肝重量も増加した (B). 血漿 ALT は HF 群で有意に高値を示した (C). R 群のヘマトキシリン・エオジン染色では脂肪沈着を認めなかった (D 100 倍, E 400 倍). HF 群で中心静脈周囲の大滴性脂肪化を認めた (F 100 倍, G 400 倍). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

図 2. 高脂肪食負荷によるマウスの鉄過剰症発現.

血漿鉄濃度および血漿フェリチン濃度は HF 群で有意な増加を示した (A, B). R 群と HF 群の肝内鉄含有量は有意な差を認めなかった (C) (各群 $n = 10$). ベルリンブルー染色では R 群 (D) と HF 群 (E) のいずれも鉄沈着を認めなかった. n.s. 有意差なし, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

図 3. RNA シークエンシングの遺伝子発現.

RNA シークエンシングで得られた各遺伝子の R 群と HF 群の発現比 (単位 \log_2) と Student t 検定により得られた P 値 (単位 $-\log_{10}$) の図を示す. RNA シークエンシングは発現比の絶対値が 1.5 より大きく (R 群 / HF 群 < -1.5 あるいは HF 群 / R 群 > 1.5 ; $\log_2 1.5 = 0.585$) $P < 0.05$ ($-\log_{10} 0.05 = 1.301$) の条件をみたす遺伝子を発現変動遺伝子として抽出した (赤枠内). この赤枠内に 2314 種類の遺伝子が検出された.

表 1. 16 週間食餌負荷マウスの RNA シークエンシング.

発現変動遺伝子のうち, 鉄関連遺伝子を抽出し, その発現比と P 値, サンプルから得られた RPKM 値 (平均値 \pm 標準偏差) を示した. *Bmp4*, Bone morphogenetic protein 4; *Bmper*, Bone morphogenetic protein binding endothelial regulator; *Epor*, Erythropoietin receptor; *Gdf15*, Growth differentiation factor 15; *Hamp*, Hecpudin antimicrobial peptide; *Hfe2*, Hemochromatosis type 2 (juvenile) の 6 遺伝子が発現変動遺伝子として検出

1 された。また、発現比は 1.5 を超えないものの、有意差が得られたものに
2 *Bmpr2*, Bone morphogenetic protein receptor type II; *Cp*, Ceruloplasmin; *Fth1*,
3 Ferritin Heavy Polypeptide 1; *Hfe*, hemochromatosis; *Stat3*, Signal Transducer
4 and Activator of Transcription 3; *Tmprss6*, Transmembrane Protease Serine 6
5 の 6 遺伝子があった。

6

7 図 4. 高脂肪食負荷マウスのヘプシジンおよびリン酸化 SMAD の発現変
8 化。

9 R 群と比較して HF 群でヘプシジンをコードする *Hamp* mRNA の発現
10 が有意に低下していた (各群 n = 10) (A). 血漿ヘプシジン濃度も HF 群
11 で有意に低下していた (各群 n = 10) (B). R 群と比較して HF 群の肝内
12 リン酸化 SMAD は SMAD 1 に比較して有意な低下を示した (各群 n = 5)
13 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

14

15 図 5. 16 週間食餌負荷マウスの BMPER 発現変化。

16 R 群に比較して HF 群で BMPER mRNA 発現が有意に増加していた (各
17 群 n = 10) (A). R 群 2 匹と HF 群 2 匹の血漿からウサギ IgG か BMPER
18 抗体を用いて免疫沈降 (IP) をし, ウェスタンブロット (WB) して BMPER
19 抗体と BMP6 抗体で発現をみた (B). ウサギ IgG による IP で BMPER 発
20 現は少なく, BMPER 抗体による IP で特異的にバンドが観察された. BMP6
21 抗体での WB により BMP6 が共免疫沈降されていることも確認された。
22 *** $P < 0.001$

23

24 図 6. マウス肝内の BMPER 発現。

25 R 群の肝組織における BMPER 発現は類洞内腔に陽性像を認めた (A).
26 マウス肝から分離した初代培養肝細胞 (B 400 倍) と非実質細胞 (C 400
27 倍) で E-Cadherin (赤), VE-Cadherin (緑) と DAPI (青) を用いた三重
28 染色を行った。細胞に厚みのある肝細胞は細胞周囲に E-Cadherin 陽性像
29 を認め, 細胞が薄い非実質細胞では類洞内皮細胞に発現する VE-Cadherin
30 が細胞全体に陽性像を認めた。肝細胞と非実質細胞で BMPER mRNA 発

- 1 現を検討すると，非実質細胞で有意な発現亢進を認めた（肝細胞 $n = 6$ ，
- 2 非実質細胞 $n = 6$) (D). *** $P < 0.001$

表1

遺伝子	発現蛋白質	発現比	P 値	R群 (RPKM値) (平均±標準偏差)	HF群 (RPKM値) (平均±標準偏差)
<i>Bmp4</i>	Bone Morphogenetic Protein 4	1.601	0.032	0.882 ± 0.145	1.412 ± 0.245
<i>Bmper</i>	Bone Morphogenetic Protein Binding Endothelial Regulator	5.242	0.035	0.068 ± 0.071	0.360 ± 0.144
<i>Epor</i>	Erythropoietin Receptor	2.303	0.047	0.448 ± 0.100	1.034 ± 0.342
<i>Gdf15</i>	Growth Differentiation Factor15	4.226	0.015	1.682 ± 1.942	7.111 ± 1.232
<i>Hamp</i>	Hepcidin Antimicrobial Peptide	-3.322	0.027	345.4 ± 122.2	104.0 ± 6.195
<i>Hfe2</i>	Hemochromatosis type 2 (juvenile)	1.880	0.011	17.71 ± 2.304	33.30 ± 5.544
<i>Bmp6</i>	Bone Morphogenetic Protein 6	1.039	0.788	1.802 ± 0.358	1.873 ± 0.231
<i>Bmpr1a</i>	Bone Morphogenetic Protein Receptor 1a	1.214	0.218	2.709 ± 0.441	3.289 ± 0.528
<i>Bmpr2</i>	Bone Morphogenetic Protein Receptor 2	1.331	0.007	8.236 ± 0.596	10.96 ± 0.709
<i>Cebpa</i>	CCAAT/enhancer Binding Protein Alpha	-1.007	0.954	147.9 ± 16.14	146.9 ± 23.06
<i>Chrd</i>	Chordin	-1.204	0.517	0.957 ± 0.218	0.795 ± 0.331
<i>Cp</i>	Ceruloplasmin	1.415	0.015	47.56 ± 7.517	67.31 ± 3.723
<i>Fam132b</i>	Erythroferrone	1.000	1.000	0 ± 0	0 ± 0
<i>Fth1</i>	Ferritin Heavy Chain	1.492	0.008	941.3 ± 72.99	1404. ± 144.6
<i>Ftl1</i>	Ferritin Light Chain	1.273	0.223	1542. ± 166.5	1963. ± 476.9
<i>Furin</i>	Furin	1.068	0.393	35.28 ± 3.400	37.66 ± 2.674
<i>Hamp2</i>	Hepcidin Antimicrobial Peptide 2	-1.421	0.224	42.03 ± 13.02	29.57 ± 7.443
<i>Hfe</i>	Human Hemochromatosis Protein	1.231	0.046	9.280 ± 1.235	11.42 ± 0.393
<i>Hgf</i>	Hepatocyte Growth Factor	1.327	0.126	3.704 ± 0.629	4.915 ± 0.887
<i>Il6</i>	Interleukin 6	1.000	1.000	0 ± 0	0 ± 0
<i>Nog</i>	Noggin	1.000	1.000	0 ± 0	0 ± 0
<i>Raf1</i>	RAF Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase	1.058	0.571	8.276 ± 1.226	8.758 ± 0.565
<i>Slc11a2</i>	Divalent Metal Transporter 1	1.331	0.060	3.479 ± 0.699	4.631 ± 0.312
<i>Slc40a1</i>	Ferroportin 1	1.241	0.121	25.71 ± 5.237	31.90 ± 1.549
<i>Smad1</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 1	1.011	0.936	3.269 ± 0.602	3.306 ± 0.442
<i>Smad2</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 2	-1.167	0.483	4.053 ± 1.009	3.474 ± 0.816
<i>Smad3</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 3	1.211	0.257	3.223 ± 0.519	3.903 ± 0.725
<i>Smad4</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 4	1.103	0.163	6.265 ± 0.261	6.907 ± 0.597
<i>Smad5</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 5	1.295	0.073	2.628 ± 0.455	3.403 ± 0.317
<i>Smad6</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 6	1.355	0.173	2.008 ± 0.542	2.722 ± 0.514
<i>Smad7</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 7	1.071	0.731	3.447 ± 0.899	3.692 ± 0.718
<i>Smad9</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 8	-1.430	0.102	2.202 ± 0.345	1.540 ± 0.418
<i>Stat3</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	1.236	0.004	9.093 ± 0.618	11.24 ± 0.168
<i>Tfr2</i>	Transferrin Receptor Protein 2	-1.014	0.784	136.4 ± 7.029	134.5 ± 8.410
<i>Tfrc</i>	Transferrin Receptor Protein 1	1.195	0.250	1.689 ± 0.130	2.018 ± 0.404
<i>Tmprss6</i>	Matriptase 2	1.223	0.006	92.90 ± 4.391	113.6 ± 5.243
<i>Trf</i>	Transferrin	1.208	0.104	3589. ± 466.5	4334. ± 401.7
<i>Twsg1</i>	Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator 1	1.178	0.055	9.158 ± 0.887	10.78 ± 0.570

图1

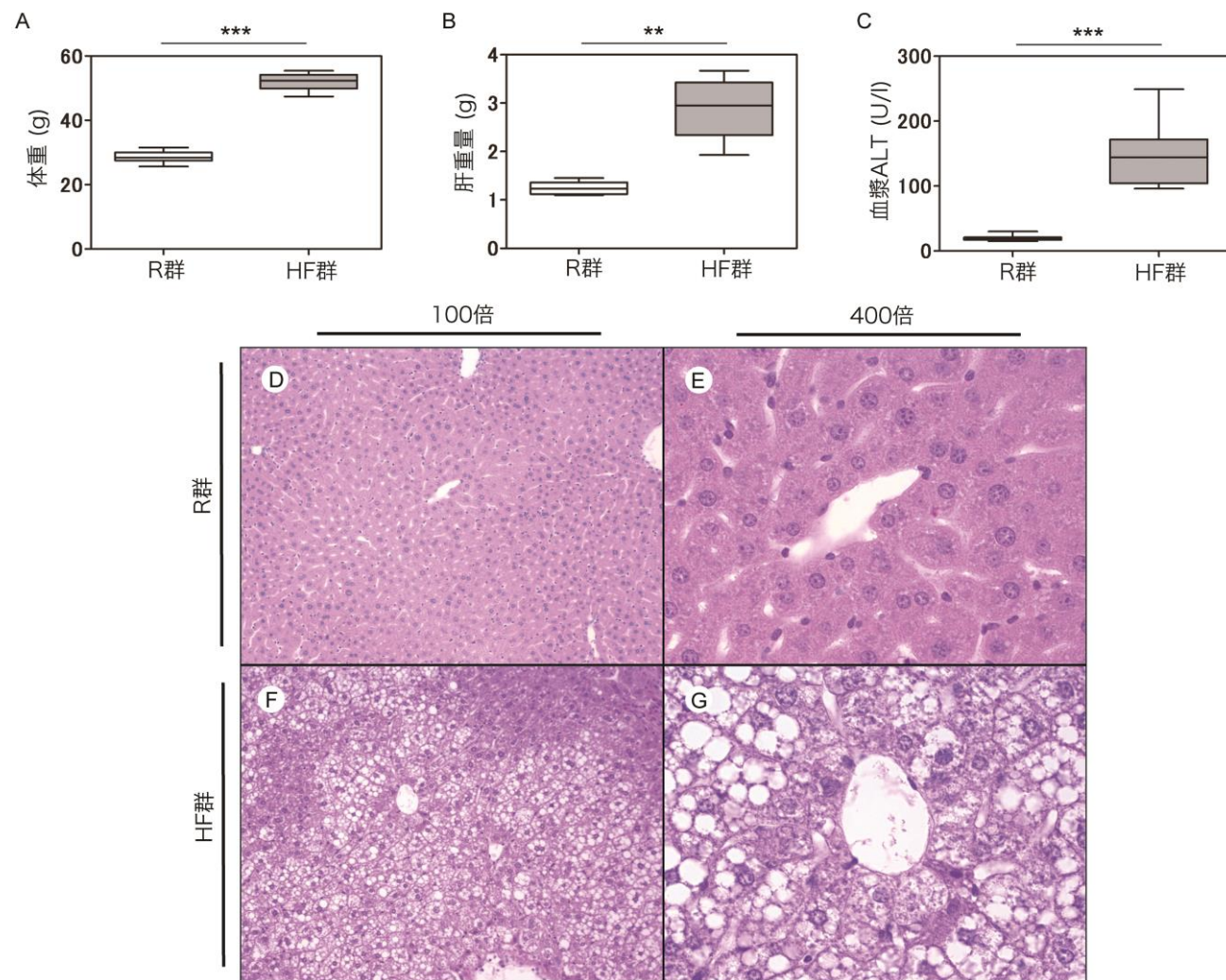


図2

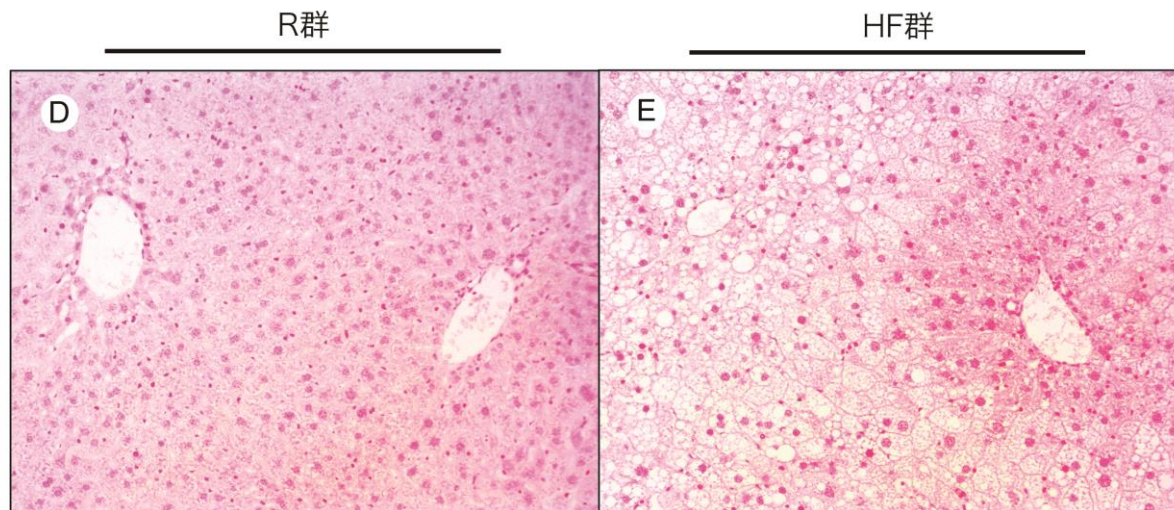
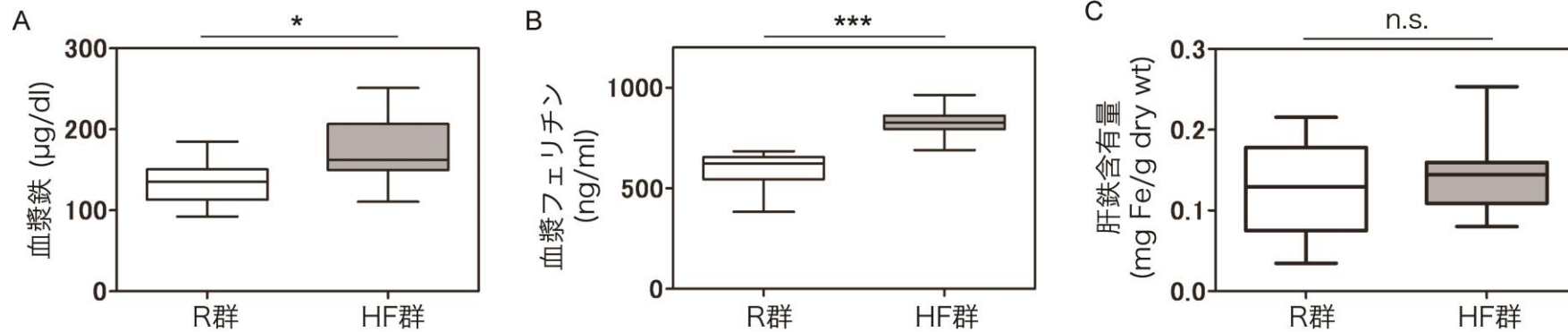


図3

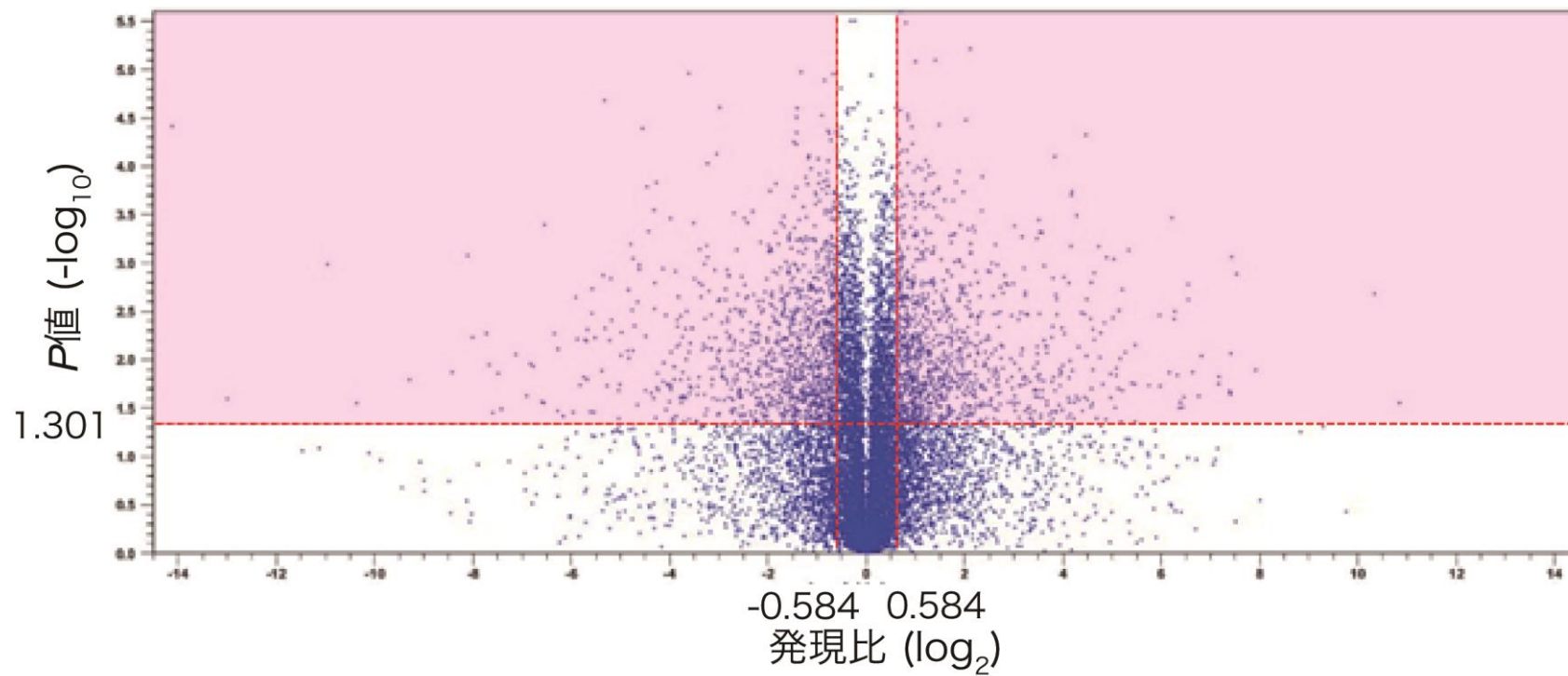


図4

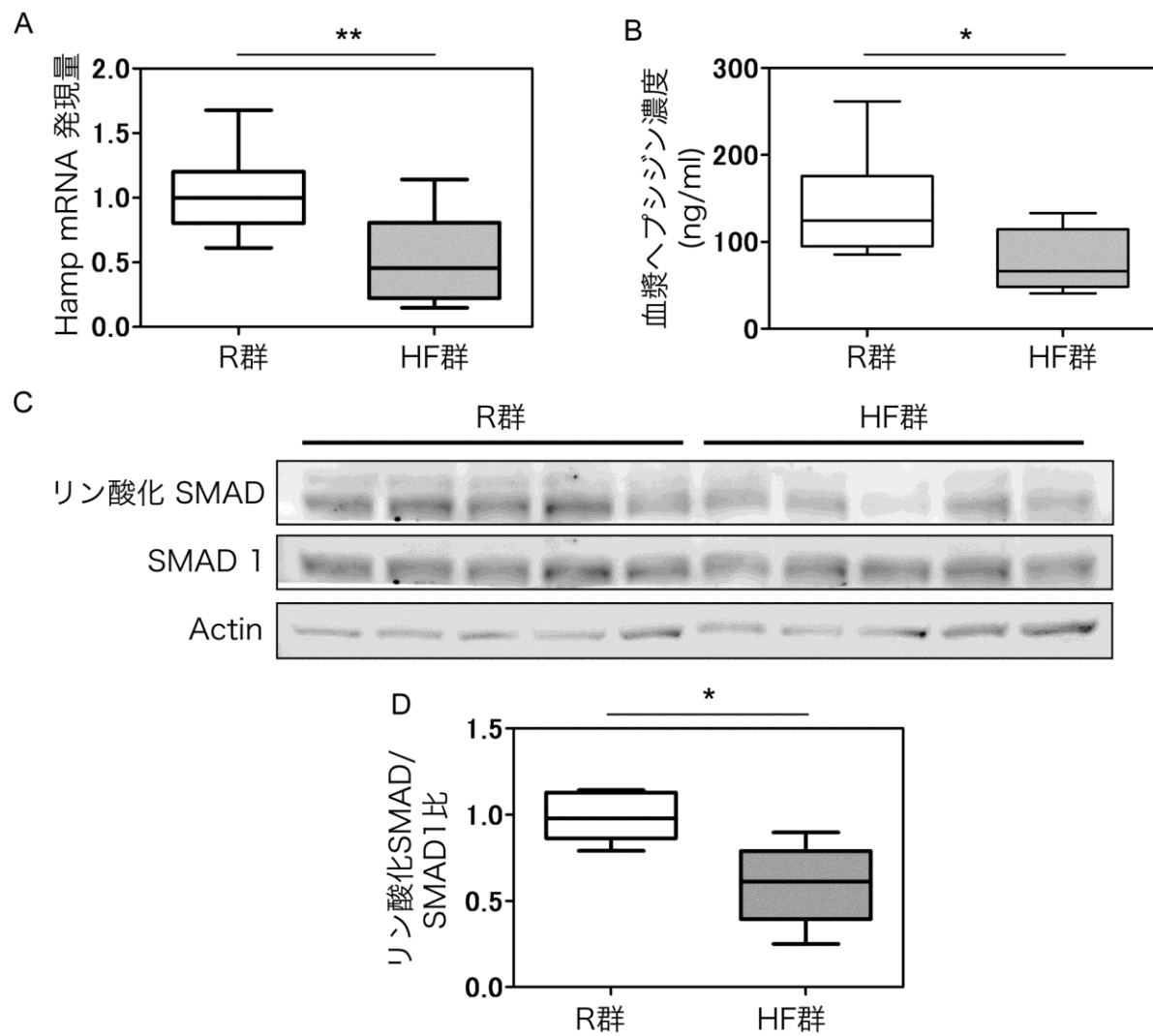
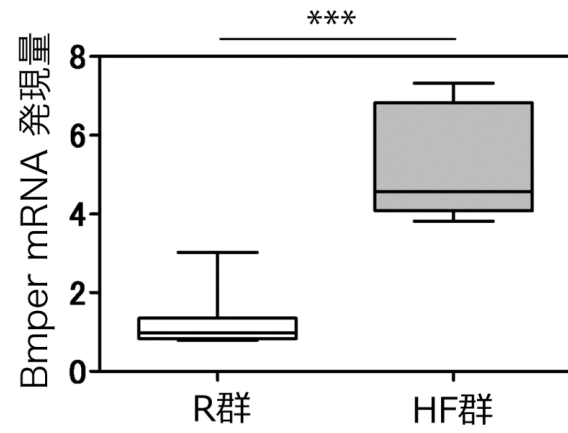


図5

A



B

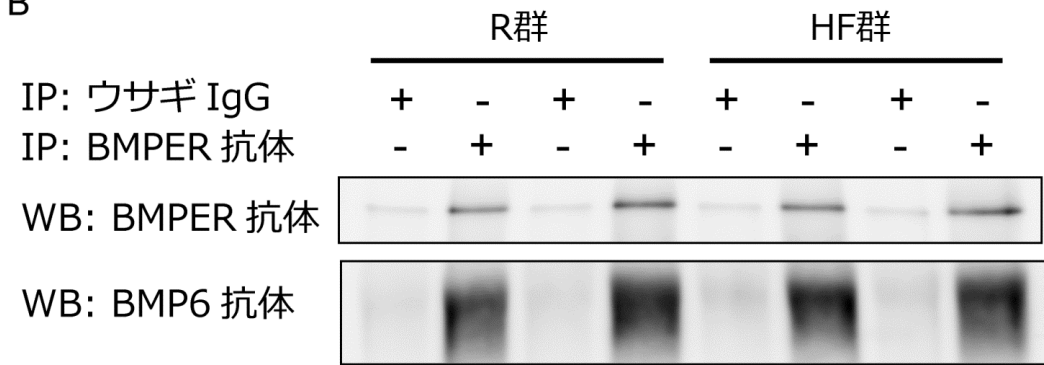
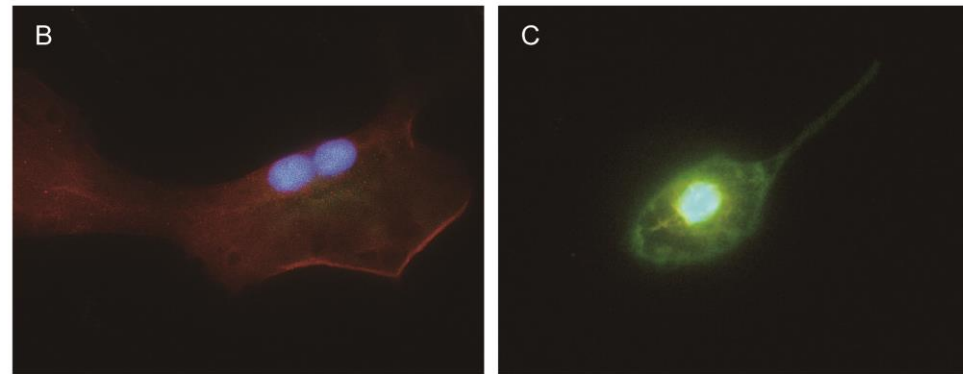
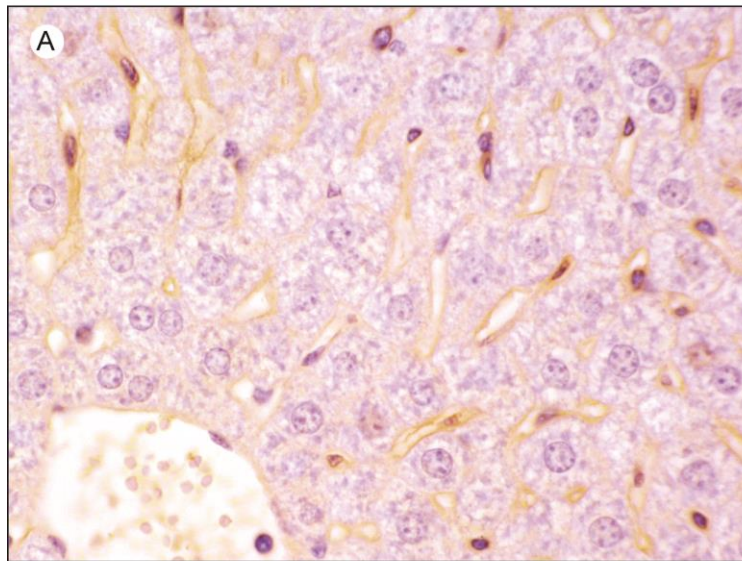


図6



E-Cadherin, VE-Cadherin, DAPI

