

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2016.3) 16:31-34.

平成25・26年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 18) マウス  
脂肪肝の肝内鉄蓄積における鉄代謝調節因子ヘプシジン発現異常のメ  
カニズムの解明

長谷部 拓夢

18) マウス脂肪肝の肝内鉄蓄積における鉄代謝調節因子ヘプシジン発現異常のメカニズムの解明

研究代表者 長谷部 拓夢

【目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は病態の進行に酸化ストレスが関わり、しばしば併発する鉄過剰症がその要因となる<sup>1)</sup>。鉄代謝は主に肝細胞で産生される鉄代謝調節分子ヘプシジンが中心的な役割を果たす<sup>2)</sup>。我々はこれまでに NAFLD モデルマウスにおいてヘプシジン発現が低下することを見出していた。しかし、鉄代謝は生体環境に応じて変化することが必要で複雑に調節されており、完全な解明はされていない。今回の研究では、肝脂肪化による肝内低酸化の関与を想定し、肥満・脂肪肝モデルマウスの鉄関連分子およびヘプシジン制御系遺伝子の発現に着目して、ハイスループットゲノムシーケンサーによる RNA シークエンシングを行い、背景の分子機構の探索を行った。

【方法】

1. モデルマウスによる検討

NAFLD モデルマウスは 8 週齢の C57BL/6 マウスにラードを主とした高脂肪食を 16 週間投与して作成した。対照群として同期間通常食を投与した C57BL/6 マウスを用いた。低酸素環境での肥満マウスとして 12 週齢のレプチン欠損マウスである ob/ob マウスを用い、対照群としては同週齢の C57BL/6 マウスを用いた。肝細胞分離のためには通常食で飼育した C57BL/6 マウスを用いた。

2. RNA シークエンシング

高脂肪食負荷マウス肝から抽出した RNA を用いてハイスループットゲノムシーケンサー (IonTorrent) により発現解析を行った。解析ソフトとして Genomics Workbench (CLC bio) を用い、通常食群と高脂肪食群の発現量を比較して、発現比と t 検定による P 値を算出した。

3. 低酸素環境下での検討

16 週間の食餌負荷を行ったマウス肝では、低酸素反応性の HIF-1 $\alpha$  蛋白発現を評価した。肥満状態での低酸素感受性を評価するため、ob/ob マウスと対照マウスを低酸素飼育器で飼育し 1 週間後に低酸素環境下で屠殺した。この際、屠殺直前に低酸素状態を評価するため Pimonidazole (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>; コスモバイオ) を腹腔内投与した。In vitro モデルとして C57BL/6 マウス肝からコラゲナーゼ灌流により分離した初代培養肝細胞もしくは非実質細胞の一つである類洞内皮細胞を用い、低酸素培養器で 24 時間培養して低酸素によるヘプシジン遺伝子 Hamp とその発現に関与する Gdf15 や Bmper の mRNA 発現に関して RT-PCR で検討した。

【結果】

高脂肪食負荷マウスによる mRNA シークエンシングでは表 1 に示す鉄関連遺伝子発現変動の結果が得られた。ヘプシジンをコードする Hamp の低下や Hamp シグナルを抑制する Bmper、Gdf15 の発現亢進が見られ、エリスロポエチン (EPO) 受容体をコードする Epor mRNA も亢進していた。マウスの EPO シグナル評価のため、血漿 EPO 濃度を ELISA で測定すると、高脂肪食群で有意に高値を示した (図 1)。

マウス肝の HIF-1 $\alpha$  蛋白発現は肝組織全体で観察された (図 2 a)。高脂肪食マウスの HIF-1 $\alpha$  発現も肝組織全体で観察されたが、高度の肝脂肪化のため蛋白発現量の多寡を評価するに至らなかった。低酸素で飼育したマウスでの Hypoxyprobe<sup>TM</sup> による低酸素状態の評価では対照マウスでも中心静脈域優位の陽性像を認めたが、ob/ob マウスでは肝全体に陽性像を認めた (図 2 b)。

低酸素曝露に対する初代培養肝細胞と類洞内皮細胞の遺伝子発現評価を行った。肝細胞では低酸素曝露のみで Hamp mRNA 発現が抑制され、Hamp を抑制する Gdf15 の発現は亢進していた (図 3)。類洞内皮細胞で

表 1 mRNA シークエンシングの鉄関連遺伝子発現変動

	遺伝子	発現蛋白質	発現比	P値
Hepcidin	<i>Hamp</i>	Hepcidin anti microbial peptide	-3.322	0.027
BMP-SMAD シグナル	<i>Bmp4</i>	Bone Morphogenetic Protein 4	1.601	0.032
	<i>Bmp6</i>	Bone Morphogenetic Protein 6	1.039	0.788
	<i>Bmper</i>	BMP Binding Endothelial Regulator	5.242	0.035
	<i>Bmpr2</i>	Bone Morphogenetic Protein Receptor 2	1.331	0.007
	<i>Hfe2</i>	Hemojuvelin	1.88	0.011
	<i>Smad1</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 1	1.011	0.936
トランスフェリン 受容体シグナル	<i>Tfrc</i>	Transferrin Receptor Protein 1	1.195	0.25
	<i>Tfr2</i>	Transferrin Receptor Protein 2	-1.014	0.784
IL-6-STAT3 シグナル	<i>Il6</i>	Interleukin 6	1	1
	<i>Stat3</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	1.236	0.004
その他	<i>Epor</i>	Erythropoietin Receptor	2.303	0.047
	<i>Gdf15</i>	Growth Differentiation Factor15	4.226	0.015

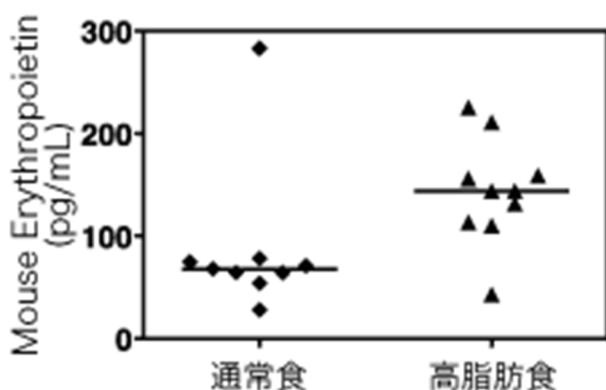


図 1 マウス血漿エリスロポエチン濃度 P = 0.025

は *Hamp* 抑制因子である *Bmper* と *Gdf15* の発現変化は認められなかった (図 4)。

**【考 察】**

EPO は低酸素により腎からの発現が誘導され、*Gdf15* は EPO による *Hamp* 抑制に関わるとされている<sup>3)</sup>。高脂肪食負荷マウスでは EPO 発現亢進があることから恒常的に低酸素に曝露されており、肝内では *Gdf15* 発現低下があることから、低酸素がヘプシジン発現低下とそれに引き続く鉄過剰症の原因となることが示唆される。肥満マウスにおいて低酸素感受性が亢進していることから、肥満と低酸素、ヘプシジン発現、鉄代謝異常が密接に関連すると考えられる。

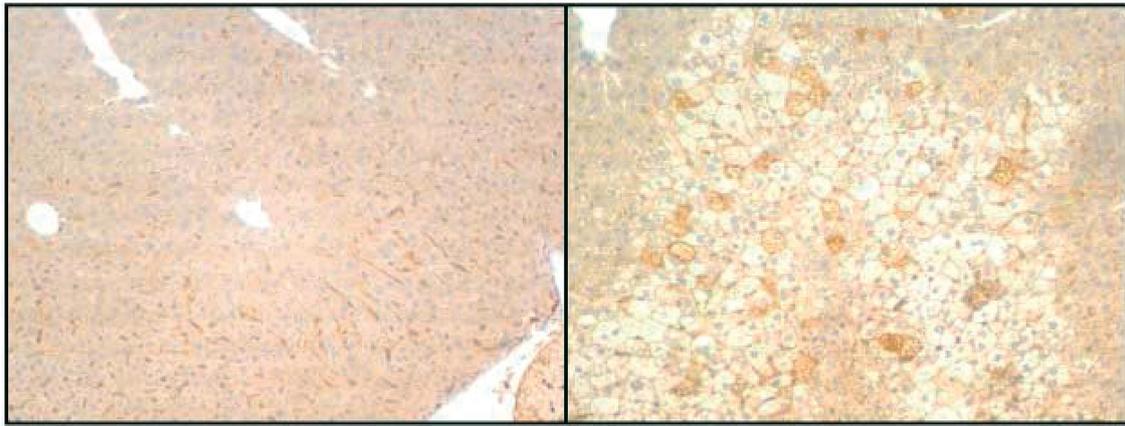
初代培養肝細胞の検討では、肝細胞自体が低酸素に応答してヘプシジン発現を低下させており、肥満マウ

スにおける恒常的な低酸素がヘプシジン発現に影響していることがわかる。先に BMP シグナル発現低下がヘプシジン発現に影響している可能性を見出していたため、BMP シグナルに関連する類洞内皮細胞の低酸素に対する影響も検討したが、今回の検討では明らかな関連が指摘できなかった。これらの結果から、低酸素自体はヘプシジン主要調節系である BMP シグナルを介さずに、ヘプシジン発現に影響を与えることが示唆された。

**【文 献】**

- 1) Sorrentino P, et al. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009 ; 50 : 351-357.
- 2) Nemeth E, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004 ; 306 : 2090-2093.
- 3) Qingdu Liu, et al. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin Invest.* 2012 ; 122 (12) : 4635-4644.

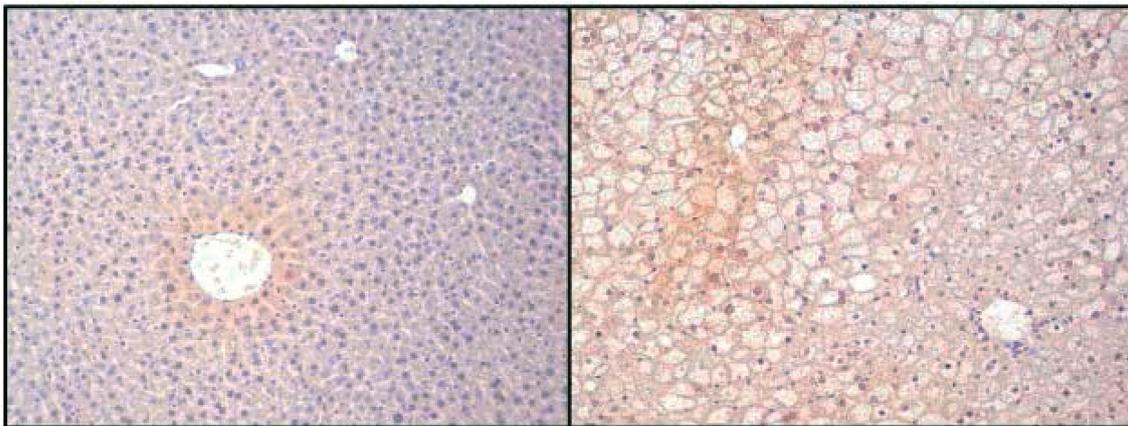
a.



通常食

高脂肪食

b.



C57BL/6

ob/ob

図2 マウス肝組織免疫組織化学染色像 HIF-1 $\alpha$  染色 (a ; 200 倍)、Hypoxyprobe 染色 (b ; 200 倍)

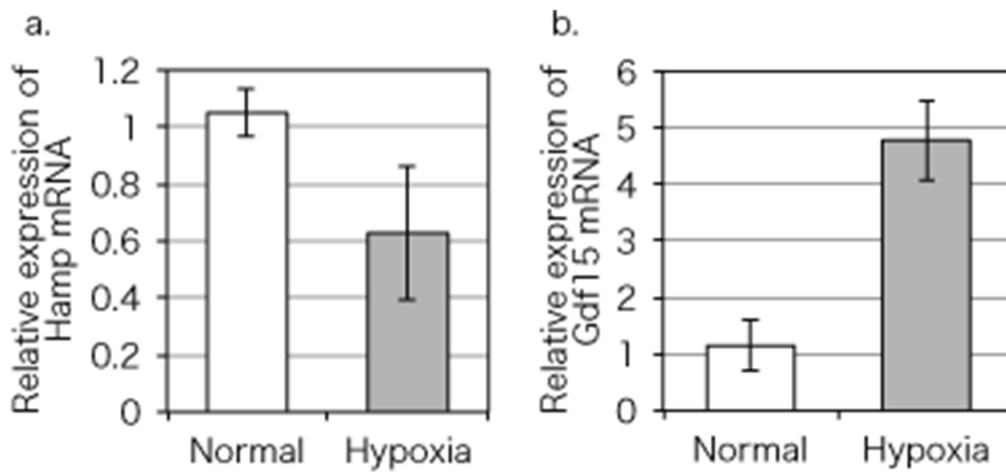


図3 初代培養肝細胞の RT-PCR 結果 Hamp mRNA (a ;  $P = 0.006$ )、Gdf15 mRNA (b ;  $P < 0.001$ )

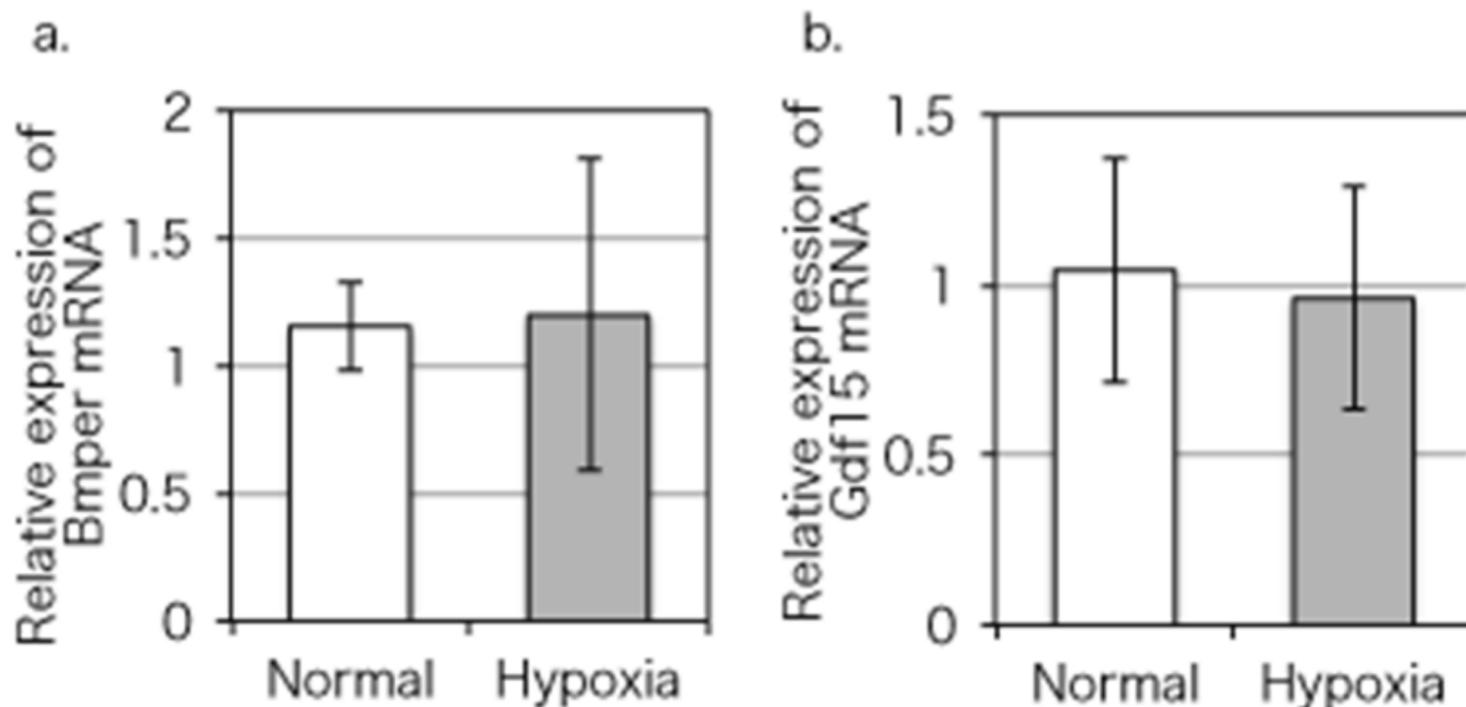


図4 初代培養類洞内皮細胞の RT-PCR 結果 Bmper mRNA (a)、Gdf15 mRNA (b)