

# AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2017) 第17巻:45-47.

平成27年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 8)肥満・脂肪肝  
モデルマウスにおける鉄過剰発現メカニズムの解明

長谷部 拓夢

8) 肥満・脂肪肝モデルマウスにおける鉄過剰発現メカニズムの解明

Analyzing the mechanism of iron overload in obese fatty liver mice.

研究代表者 長谷部拓夢

当該研究は Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces

iron overload in a fatty liver mouse model. *J Gastroenterol.* 2016 Jun 30. (文献 1) として公表されている。

## 【目的】

我が国で増加傾向にある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一因となる<sup>2)</sup>。我々はこれまでに NAFLD モデルマウスの鉄調節分子ヘプシジン発現変動の関連を見出していた。しかし、鉄代謝は生体環境に応じて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、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 モデルマウスとして 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。鉄過剰と肝線維化進展確認のために通常食または高脂肪食を 48 週間投与したマウスを用いた。マウスから回収した肝組織は病理学的検討と mRNA 発現の検討、蛋白発現解析に用いた。血液は血漿を回収して血清学的検討と蛋白濃度を測定した。

### 2. RNA シークエンシング

通常食および高脂肪食負荷マウス各群 3 匹ずつの肝臓から抽出した 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. 肝細胞と類洞内皮細胞の分離

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。マウス肝にコラゲナーゼを含む溶液を門脈から灌流し、遠心分離により肝細胞および類洞内皮細胞を回収した。それぞれの細胞に関して標的分子に関する遺伝子発現と蛋白発現を検討した。

## 【結果】

マウスは著明な脂肪肝および長期間摂餌による肝線

維化と鉄沈着を呈し、血漿 ALT およびフェリチンの上昇を認め、脂肪肝とそれに伴う鉄過剰状態を合併していた。

RNA シークエンシングでは複数の鉄代謝に関連する発現変動遺伝子 (Bmp 4, Bmper, Epor, Gdf15, Hamp, Hfe 2) を認めた。このうち Hamp mRNA は鉄代謝を調節するヘプシジンをコードしており、血清ヘプシジン濃度は高脂肪食群で有意に低下していた。ヘプシジン発現調節に強く関与する BMP-SMAD シグナルに関わる 3 分子 (Bmp 4, Bmper, Hfe 2) の発現変動を認めており、Hamp mRNA 発現の上流である SMAD1/5/8 のリン酸化が高脂肪食群で有意な低下を示したため、BMP-SMAD シグナル経路に注目した。上記発現変動遺伝子の中でも BMP-SMAD シグナルの制御に関与する Bmper の発現変動が 5 倍以上の大きな変動を示しており、Bmper に注目して検討を進めた。

Bmper mRNA 発現は高脂肪食群で有意に高値であり、血清 BMPER も高い傾向にあった。肝臓の細胞分離ではカドヘリン発現の差異とヘプシジン産生を認めることで類洞内皮細胞と分離されていることを確認した。BMPER 発現について比較したところ、BMPER は類洞内皮細胞優位に発現していた。

## 【考察】

肝内鉄沈着やフェリチンによって示される体内鉄過剰は、肝内の炎症や線維化と関連することが示されている<sup>3)</sup>。この鉄過剰はヘプシジン発現低下によって引き起こされると指摘され、ヘプシジンは BMP-SMAD シグナルによって主に調節を受けることが示されている。本検討でも BMP-SMAD シグナルを抑制する BMPER (Bone morphogenetic protein binding endothelial regulator) に注目して検討した。BMPER 発現は肝内で有意な亢進を示しており、SMAD リン酸化が低下していることから、高脂肪食負荷マウスのヘプシジン発現低下および鉄過剰に関与したと考えられた。

ヘプシジンの BMP-SMAD シグナル調節において、BMP 6 が生体内で最も重要とされるが、Enns らは BMP 6 が肝臓内の非実質細胞から産生されることを示した<sup>4)</sup>。BMPER は分泌型蛋白質として BMP と結合しその抑制能を発揮することも知られているため、本検討では BMPER の発現細胞についても検討した。その結果、肝細胞ではなく類洞内皮細胞で優位に発現し

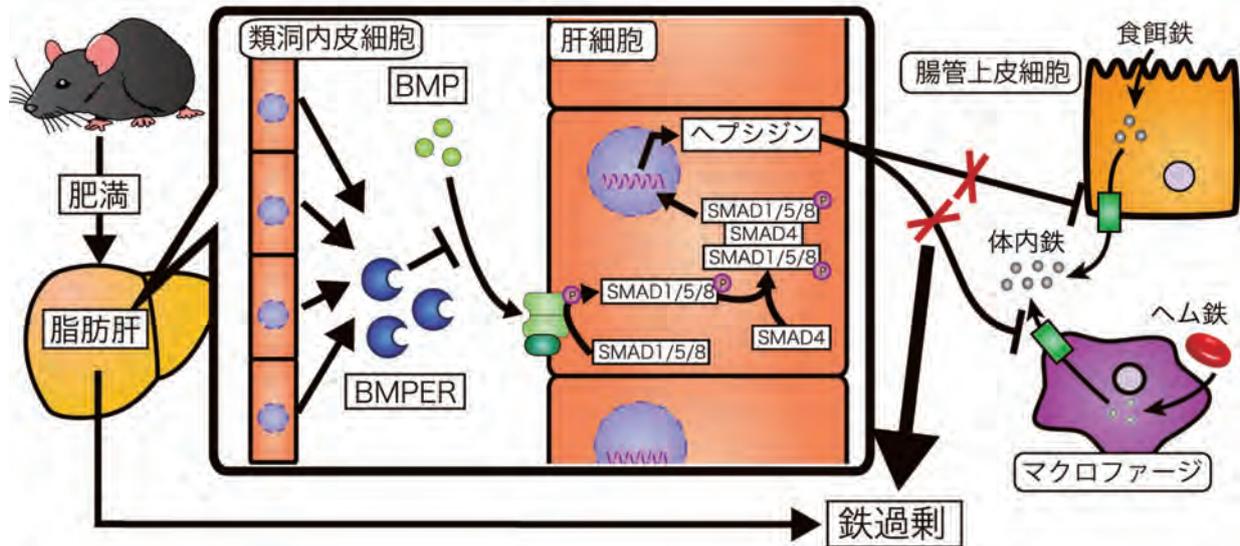


図 1 本研究の概要

高脂肪食により誘導した脂肪肝モデルマウスが鉄過剰を呈することを示した。この変化で重要なのが肝内の BMPER 発現亢進で、BMPER は類洞内皮細胞から産生されることを示した。BMPER は肝細胞からのヘプシジン産生を抑制することで、腸管上皮細胞やマクロファージからの鉄吸収抑制機構を破綻させ、鉄過剰をもたらすと考えられた。

ていることがわかった。

図 1 にその概要をまとめているが、本研究では、高脂肪食により誘導した脂肪肝モデルマウスが鉄過剰を呈することを示した。この変化の中で重要なのが脂肪肝マウスでの BMPER 発現亢進であり、BMPER は類洞内皮細胞から産生されることで肝細胞からのヘプシジン産生を抑制し、鉄過剰をもたらしていることが明らかとなった。

independent of the BMP-signaling pathway. PLoS One. 2013;8 (4):e60534.

【文 献】

- 1) Hasebe T, et al. Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces iron overload in a fatty liver mouse model. J Gastroenterol. 2016 Jun 30. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27364348>)
- 2) Sorrentino P, et al. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 2009;50:351-357.
- 3) Nelson JE, et al. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2011;53 (2):448-57.
- 4) Enns CA, et al. Increased iron loading induces Bmp6 expression in the non-parenchymal cells of the liver