

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	進藤 基博
<p>学位論文題目</p> <p>Functional role of DMT1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell HLF</p> <p>(ヒト肝細胞および肝癌細胞株 HLF によるトランスフェリン非依存性の鉄取り込みにおける DMT1 の機能的役割)</p> <p>共著者名 鳥本 悦宏、斉藤 浩之、藤本 佳範、高後 裕 掲載学会雑誌名 未公表</p> <p>研究目的</p> <p>血清中の鉄は、主にトランスフェリン(Tf)鉄の形で存在し、トランスフェリン受容体(TfR)を介したエンドサイトーシス機構により、ヘモグロビンが合成されている赤芽球や、分裂増殖が盛んな種々の細胞へ取り込まれる。一方、無トランスフェリン血症患者や TfR を欠如したマウスは重度の貧血となるが、同時に他臓器に鉄過剰蓄積がみられることから、赤血球系細胞では、Tf-TfR を介した鉄取り込み機構が必須であるのに対し、他の細胞ではそれ以外の鉄取り込み機構も存在していることが示される。ヘモクロマトーシスなど Tf が鉄で飽和した状態では、血清中にトランスフェリン非結合鉄(NTBI)が出現する。NTBI は主に肝細胞にとりこまれ、その結果肝臓に鉄が沈着すると考えられているが、NTBI の肝細胞への取り込み機構については未だ不明な点が多い。</p> <p>最近、十二指腸上皮において食物中の Fe^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} といった 2 価の金属イオンを細胞内に取り込む輸送蛋白として DMT1 (divalent metal transporter 1) がクローニングされた。DMT1 は同時に、TfR を介して取り込まれた鉄をエンドゾームから細胞質内に輸送する際にも重要な役割を果たしている。DMT1 には 2 つのアイソフォームがあり、3'UTR(untranslated regions)に iron responsive element (IRE)を有するフォームと有しないフォームがある。TfR やフェリチンのような鉄代謝蛋白は、IRE とそれに対する結合蛋白である iron regulatory protein (IRP)によって発現が調節されていることから、IRE を有する DMT1 も IRP/IRE システムで発現が制御されている可能性がある。本研究では IRE フォームのヒト DMT1 を認識する polyclonal 抗体を作製し、肝組織および肝癌細胞株 HLF における DMT1 の局</p>			

在を検討した。また、DMT1 を強制発現させた HLF 細胞を用いて、NTBI の取り込みにおける DMT1 の肝細胞における役割を明らかにすることを目的とした。

材 料・方 法

1. ヒト DMT1 抗体の作製
3'UTR に IRE を有するヒト DMT1 mRNA の cDNA を基に C 末端側の 15 ペプチドをウサギに免疫し、DMT1 に対する抗体を作成した。
2. 細胞
ヒト肝芽腫細胞株 HepG2、ヒト大腸癌細胞株 Caco2 および ヒト肝癌細胞株 HLF を使用した。
3. 遺伝子導入細胞株の作製
DMT1 遺伝子を pRc/CMV vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) に組み込み、HLF 細胞にリポフェクション法にてトランスフェクションし、48 時間後細胞を回収した。また、終止コドンはずした DMT1 遺伝子を pEGFP-N3 vector (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) にライゲーションし、DMT1-GFP (green fluorescent protein) 融合遺伝子を作製後、HLF 細胞にリポフェクション法でトランスフェクションし、DMT1-GFP 融合蛋白を強発現している clone (HLF-Tr) を選択した。
4. 免疫組織染色
正常十二指腸組織および肝組織のパラフィン包埋切片を用いて DMT1 抗体による免疫組織染色を施行した。切片は一次抗体に DMT1 抗体を 50 倍に希釈し使い、ABC 法で染色し、アルカリフォスファターゼで発色した。
5. 免疫沈降および Western blot 法
DMT1 抗体の特異性を確認するため、DMT1 を一過性に発現させた HLF 細胞より抽出した蛋白を、DMT1 抗体を用いた Western blot 法で検出した。また、HLF および HLF-Tr 細胞より抽出した蛋白を GFP polyclonal 抗体を用いて免疫沈降し、GFP monoclonal 抗体による Western blot 法で検討した。
6. 蛍光顕微鏡
カバーガラス上で細胞を培養し、パラフォルムアルデヒドで固定後、蛍光顕微鏡にて、DMT1-GFP 融合蛋白の局在を観察した。また、デフェロキサミン(DFO)で鉄をキレート、または、クエン酸アンモニウム鉄で鉄を負荷して培養した HLF 細胞を、1 次抗体(DMT1 抗体または TfR 抗体)で免疫染色し、Alexa で蛍光発色した後、蛍光顕微鏡にて観察した。
7. トランスフェリン鉄の取り込み
既報²⁾のごとく ⁵⁹Fe-bound transferrin を用いて、鉄の細胞内への取り込みを 2、4、6 時間後で検討した。また、100 倍過剰量の非標識トランスフェリン鉄を共存させ非特異的取り込みについても検討した。
8. 2 価鉄の取り込み
⁵⁹FeCl₃ を ascorbic acid により 2 価鉄の状態に保ち、鉄の細胞内への取り込みを 2、4、6 時間後で検討した。また、1000 倍過剰量の非標識トランスフェリン非結合鉄を共存させ非特異的取り込みについても検討した。

成 績

1. 作製したヒト DMT1 抗体の特異性について検討した。DMT1 を強制発現させた HLF 細胞の DMT1 抗体を用いた Western blot 法では、予測された分子量の 66kDa の位置にバンドが観察された。また、免疫染色では、十二指腸微絨毛刷子縁に顆粒状に染色され、Caco2 細胞では細胞膜に強くその発現が認められた。これらの結果は今まで報告されてきた DMT1 抗体の反応性と一致した。
2. 肝細胞はトランスフェリン鉄および NTBI の 2 つの鉄取り込み機構を有する。HLF 細胞でも、Caco2 細胞と比較して、トランスフェリン鉄の取り込みが中心であったが、有意な NTBI の取り込みも認められた。
3. DMT1 抗体を用いて HLF 細胞および正常肝組織での DMT1 の発現を検討すると、HLF 細胞では細胞質に主に発現し細胞膜の発現は弱かった。正常肝組織でも主に細胞質に DMT1 の発現を認めた。以上より、HLF 細胞は鉄代謝機構およびその発現様式において肝細胞と類似であり、以後の解析に肝細胞を代表する細胞として使用できることを確認した。
4. 3'UTR に IRE を有する TfR mRNA は細胞内鉄濃度により IRP を介して蛋白発現量が調節されており、同様に、DMT1 蛋白も IRE 配列を有することから、細胞内鉄濃度により発現量が変化するかどうか検討した。DFO 処理により細胞内鉄濃度を低下させた HLF 細胞では、TfR の発現は増加し、同様に DMT1 の発現も細胞膜、細胞質に増加して認められた。
5. DMT1 の発現、機能をより明らかにするために、HLF 細胞に DMT1-GFP 融合遺伝子を導入した。免疫沈降 Western blot 法により融合遺伝子の遺伝子産物の発現を確認し、蛍光顕微鏡により DMT1-GFP 融合蛋白の発現様式を検討すると、DFO 処理した HLF 細胞における DMT1 の発現と同様に、融合蛋白は細胞質および細胞膜に認められた。
6. 遺伝子導入細胞株における鉄取り込みを検討した。その結果、DMT1 の過剰発現はトランスフェリン鉄の細胞内への取り込みには影響しなかったが、NTBI の細胞内への取り込みを著明に増強した。

考 察

今回の研究で、DMT1 は十二指腸上皮では微絨毛先端に主に発現しているのに対し、正常肝組織では細胞質で優位に、細胞膜表面でわずかに発現していることが明らかにされた。DMT1 は十二指腸細胞の細胞膜表面で鉄を外から中へ運ぶ役割を担っているが、それに対して、肝細胞では主に TfR を介したエンドサイトーシスによって取り込まれた鉄を、エンドゾームから細胞質内に輸送することに関与していると考えられる。しかしながら、鉄濃度を低下させた状態では、肝細胞膜の DMT1 の発現が増加することから、DMT1 も肝細胞内鉄濃度の多寡によって、TfR と同じような IRP/IPE システムによって発現が調節されていると考えられる。DMT1 を強制発現させた HLF 細胞では、細胞内鉄濃度を低下させたときと同じように、細胞質だけではなく細胞膜にも DMT1 を発現した。発現が増強した DMT1 は、TfR を介する鉄の取り込みには影響せず、TfR を介さない NTBI の取り込みに重要な役割

を担っていると考えられた。

肝組織における DMT1 の発現について、我々は、ヒトの肝組織で細胞質を中心に発現している事を見いだした。それに対しラットの肝組織を用いた報告では、肝細胞の類洞壁側表面に発現し、鉄負荷によって発現が増強するとしている。しかしながら、肝臓に鉄が沈着する鉄過剰マウスを用いた報告では、肝組織における DMT1 mRNA の発現は増加しないとされ、また、他のヒト肝癌細胞株 HFP2G においても DMT1 は細胞質内に検出されている。このことは、肝細胞では DMT1 は主に細胞質内に局在し、その発現はむしろ鉄除去で増加した今回の結果に一致する。

DMT1 の 3'UTR に存在する IRE が機能するかどうかは興味のあるところである。鉄欠乏食で飼育したマウスでは十二指腸細胞で IRE フォームを持つ DMT1 の mRNA の激増が見られ、Caco2 細胞でも鉄負荷により DMT1 の mRNA および蛋白レベルの低下があるのに対し、マウス線維芽細胞では IRP 活性が増強しても、DMT1 の発現がなかったとの報告があり、DMT1 の mRNA の発現の調整が細胞内鉄濃度によって調節されるか否かは発現細胞により違いがあることが考えられる。我々の用いた HLF 細胞による検討では、細胞内鉄減少で DMT1 蛋白の発現が増強し、DMT1 強発現細胞では 2 価鉄(NTBI)の取り込みが増強したことから、肝細胞において DMT1 が IRE/IRP を介した発現調節を受けるとともに、細胞内への NTBI の取り込みポンプとして機能していると考えられる。

結 論

本研究の結果は、肝細胞において TfR を介さない NTBI の取り込みに DMT1 が重要な役割を担っていることを示唆するものである。

引 用 文 献

1. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997; 388: 482-488.
2. Ikuta K, Fujimoto Y, Suzuki Y, Tanaka K, Saito H, Ohhira M, Sasaki K, Kohgo Y. Overexpression of hemochromatosis protein, HFE, alters transferrin recycling process in human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1496(2-3): 221-231.
3. Andrews NC, Fleming MD, Gunshin H. Iron transport across biologic membranes. *Nutr Rev*. 1999; 57: 114-123.

参 考 論 文

1. Taya N, Torimoto Y, Shindo M, Hirai K, Hasebe C, Kohgo Y. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C. *Br J Haematol*. 2000; 110(1): 89-97.

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	進藤 基博
審査委員長 油 野 民 雄 ㊟ 審査委員 高 後 裕 ㊟ 審査委員 牧 野 勲 ㊟			
学 位 論 文 題 目 Functional role of DMT1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell HLF (ヒト肝細胞および肝癌細胞株 HLF によるトランスフェリン非依存性の鉄取り込みにおける機能的役割)			
<p>トランスフェリン(Tf)-トランスフェリン受容体(TfR)を介した鉄取り込み機構が必須である赤芽球系細胞に対し、肝細胞などの他の細胞ではそれ以外の鉄取り込み機構も存在することが示されているものの、その詳細に関しては未だ不明な点が多い。本論文は、肝細胞における Tf-TfR 機構以外の鉄取り込み機構を解明することを目的として、最近十二指腸上皮においてクローニングされた 2 価の金属イオンを細胞内に取り込む輸送蛋白である divalent metal transporter 1 (DMT1) に着目して、DMT1 の肝細胞における局在のみならずトランスフェリン非結合鉄 non-transferrin bound iron (NTBI) の肝細胞への取り込みにおける DMT1 の機能的役割を明らかにすべく、検討したも</p>			

のである。

その結果、1)肝細胞および肝癌細胞 HLF の鉄摂取には、主たる Tf-TfR 機構以外に、NTBI 取り込み機構も存在すること、2)iron-responsive element (IRE) フォームのヒト DMT1 を認識する polyclonal 抗体を作製しての検討より、DMT1 は肝細胞および肝癌細胞 HLF とともに発現するものの、細胞質優位に発現すること、3)desferrioxamin (DFO)処理により細胞内鉄濃度を低下させると、TfR の発現増加とともに、細胞膜および細胞質における DMT1 の発現増加も見られること、4)DMT1-GFP 遺伝子を HLF 細胞に導入した検討より、細胞質および細胞膜に融合遺伝子と融合蛋白の発現が見られること、5)遺伝子導入細胞での検討より、DMT1 の過剰発現は Tf 結合鉄の細胞内取り込みには影響しないものの、NTBI の取り込みの著明な増強がもたらされること等が、明示された。したがって、これらの結果は、DMT1 は 1)Tf-TfR 機構とは無関係に、肝細胞への鉄取り込みに密接に関与していること、2)細胞膜と細胞質の両方に発現するものの、細胞質優位の発現を示すこと、3) TfR と同様に、IRE/IRP システムにより発現調節を受けていること、4)細胞内への取り込みポンプとして機能していることなど、肝細胞における Tf-TfR 機構以外の鉄取り込み機構における DMT1 の機能的役割を明らかにした点で、極めて重要な知見を含んでおり高く評価されると思われた。

なお各審査委員による論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的な解答が得られ、関連領域に関する十分な知識を有していることが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は本論文が博士(医学)の学位にふさわしいものと判定した。