

## 博士論文(要約)

# Hepcidin production in response to iron is controlled by monocyte-derived humoral factors

(鉄負荷によるヘプシジン産生誘導は単球由来液性因子を介して制御される)

佐々木 雄亮

(下中 靖, 生田 克哉, 細木 卓明, 佐々木 勝則, 鳥本 悦宏,  
金田 浩孝, 森口 佳之, 高後 裕)

## 研究背景および研究目的

鉄は生体において必須の元素であるが、一方で過剰に蓄積した鉄は酸化ストレス・細胞障害を惹起するため、体内鉄動態は厳密に制御される必要がある。この鉄代謝調節の中心を担うペプチドホルモンがヘプシジンである。ヘプシジンは主に肝臓で産生され、鉄輸送膜タンパクであるフェロポルチンと結合、その分解促進によって貯蔵鉄利用および小腸からの鉄吸収を抑制する。ヘプシジンの発現は、炎症、造血活性等のシグナルの他、鉄負荷により制御されることが知られている。ヒトやマウスへ鉄が負荷された後、肝臓でのヘプシジンの遺伝子発現が亢進することが報告されており、負荷された鉄の感知は肝細胞で行われると考えられてきた。しかし、肝臓由来細胞株に直接鉄を添加した検討では鉄負荷後のヘプシジン発現亢進が認められず、鉄負荷後の肝細胞でのヘプシジン産生亢進の機序は解明されていない。そこで我々は、負荷された鉄を感知するセンサーは肝実質細胞外にあり、鉄負荷後このセンサーを介して肝細胞でヘプシジン産生は誘導されるという仮説を立て、鉄剤投与ラットおよび肝細胞株培養系を用いて鉄負荷後のヘプシジン産生亢進機序を解析した。

## 材料・方法

### 1. 正常ラットへの鉄剤投与実験

雄性、10週齢のWistarラットに2または5 mg/kgの含糖酸化鉄 (Saccharated Ferric Oxide, SFO)、または溶媒を尾静脈内投与し、1、3、6、12、18、24、30時間後に採血を行い、血清を分離した。

### 2. 細胞培養実験

ヒト肝臓由来細胞株HepG2およびヒト単球由来細胞株THP-1(American Type Culture Collection)を用いた。培養は5%CO<sub>2</sub>、37°C下に行った。

HepG2細胞単培養実験では10%FBSを含む培地で培養した。HepG2細胞を6穴プレートに播種し、interleukin (IL)-6、holo-Transferrin (holo-Tf)、または前記鉄剤投与動物実験で採取した血清にて48時間刺激後、培養上清を回収した。

HepG2細胞とその他の細胞の共培養実験では2%FBSおよび1%BSAを含む培地で培養した。HepG2細胞とTHP-1細胞、Wistarラットから採取した脾細胞を共培養し、holo-Tfにて48時間刺激後、培養上清を回収した。HepG2細胞とTHP-1細胞との共培養実験では、cell culture insertを用いた非接触共培養実験も実施した。ヘプシジン産生へのIL-6の影響を検証する実験においては、ヒト化抗ヒトIL-6受容体抗体tocilizumab(中外製薬株式会社)を用いた。

### 3. ヘプシジン濃度測定

SFO投与ラット血清および培養上清中のヘプシジン濃度は、liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS)を用いて測定した。

#### 4. ラット血清鉄濃度および血清中 non-transferrin bound iron (NTBI)濃度測定

ラット血清鉄濃度は自動化学分析装置を用いて測定した。血清中 NTBI 濃度は、metal-free high-performance liquid chromatography 法にて測定した。

#### 5. 統計解析

Tukey 検定および Student's T 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結果

1. ラットへの SFO 投与 12 時間後、血清中のヘプシジン濃度は溶媒投与群に比して有意に高値を示し、その後減少した。

2. HepG2 細胞培養上清中のヘプシジン濃度は、IL-6 添加群で non-treat 群と比して有意に高値を示した一方で、holo-Tf 添加群では non-treat 群と同等であった。SFO 投与ラット血清を添加した HepG2 培養上清中のヘプシジン濃度は、溶媒投与ラット血清を添加した群と比して高値を示した。ラット血清を添加した HepG2 培養上清中のヘプシジン濃度とラット血清中ヘプシジン濃度は正相関を示した。

3. ラット血清鉄濃度は SFO 投与 1 時間後に溶媒投与群に比して高値を示し、その後減少した。ラット血清中 NTBI 濃度は SFO 投与後変化が認められなかった。ラット血清中ヘプシジン濃度と血清鉄濃度および NTBI 濃度は相関が認められなかった。

4. HepG2 細胞とラット脾細胞の共培養実験では、培養上清中のヘプシジン濃度は、holo-Tf 添加群で non-treat 群と比して有意に高値を示した。

5. HepG2 細胞と THP-1 細胞の共培養実験では、培養上清中のヘプシジン濃度は、holo-Tf 添加群で non-treat 群と比して有意に高値を示した。また、holo-Tf 添加で増加した培養上清中のヘプシジン濃度は、tocilizumab 添加で抑制されなかった。HepG2 細胞と THP-1 細胞の非接触共培養実験においても、同様に、培養上清中のヘプシジン濃度は holo-Tf 添加群で non-treat 群と比して有意に高値を示した。

## 考察

本研究では、鉄負荷後のヘプシジン産生亢進機序解析を目的として、SFO 投与ラットおよび肝細胞株培養系を用いて検討した。

ラットへの SFO 投与後血清中ヘプシジン濃度は増加し、その血清中に HepG2 からのヘプシジン産生を誘導する液性因子が含まれることが確認された。ラット血清中ヘプシジン濃度と血清鉄濃度および NTBI 濃度は相関が認められず、血清中の IL-6 および IL-1 $\beta$  は検出されなかったこと

から(data not shown)、この液性因子はこれまでにヘプシジン産生に与える影響に関して報告のない因子の可能性が考えられた。

次に我々は、負荷された鉄を感知するセンサーは、生体内で鉄の主な貯蔵庫である脾臓にあるという仮説を立て、その候補細胞として脾臓内に多く存在しこれまでに鉄代謝との関係が報告されている単球に注目し研究を進めた。細胞培養実験では、我々のこれまでの研究においてタンパクレベルでの高いヘプシジン産生能が確認されている HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞単培養実験では holo-Tf 添加後ヘプシジン産生は亢進しなかったが、ラット脾細胞との共培養実験では holo-Tf 添加後ヘプシジン産生が亢進した。また、HepG2 細胞とヒト単球由来細胞株 THP-1 との共培養実験においても holo-Tf 添加後ヘプシジン産生が亢進し、これは接触および非接触培養系いずれにおいても確認されたことから、holo-Tf 添加後 THP-1 細胞由来の液性因子を介して HepG2 細胞からのヘプシジン産生が誘導されることが示唆された。

HepG2 細胞と THP-1 細胞との共培養時 holo-Tf 添加後に亢進したヘプシジン産生は tocilizumab 添加で抑制されなかったことから、鉄負荷に応答して THP-1 細胞から分泌される液性因子は IL-6 ではないと考えられた。近年、肝臓内で鉄を感知しヘプシジン産生を制御する因子として、bone morphogenetic protein (BMP) 6 が報告されているが、本研究において、HepG2 細胞と THP-1 細胞との共培養時 holo-Tf 添加後も上清中の BMP6 濃度は上昇しなかった(data not shown)。

ヘプシジンは、我々が開発した LC/ESI-MS/MS 測定法の他、様々な測定法が開発されており、また血中および尿中から検出できることから、慢性腎臓病や慢性 C 型肝炎など鉄代謝障害を伴う疾患において、鉄動態を把握する有用なバイオマーカーになる可能性を有すると考える。一方で、ヘプシジンの発現は炎症、造血活性等種々のシグナルで制御されており、これまでヘプシジンが鉄動態のみを反映しない点が懸念されてきた。今回我々が示唆した鉄負荷に応答して単球より分泌されるヘプシジン産生誘導因子は、鉄動態をより正確に診断できるバイオマーカーになる可能性がある他、治療標的になる可能性も有すると考える。

## 結論

鉄負荷は肝細胞に対し、単球由来液性因子を介してヘプシジン産生を誘導することが示唆され、この液性因子はこれまでにヘプシジン産生に与える影響に関して報告のない因子である可能性が考えられた。単球は生体内において鉄センサーとして機能し、肝臓にヘプシジン産生を促すことで鉄代謝を調節することが考えられた。