様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2013
課題番号：２４６５９３５８

研究課題名（和文）慢性肝疾患の予防、治療法の確立を目指した新規鉄排出トランスポーターの探索

研究課題名（英文）Identification of novel transporter for exporting iron to establish effective therapy for chronic liver disorder

研究代表者
溝上　裕士（Mizokami, Yuji）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：７０２６８５５６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　2,900,000円、（間接経費）　870,000円

研究成果の概要（和文）：過剰な鉄は酸化ストレスを惹起するため、このような状態の肝組織からは鉄を排出させることが望ましい。驚くべきことに、鉄の排出にはFPN1と呼ばれるトランスポーターただ１つしか同定されていない。本研究は、新規な鉄トランスポーターを酸化ストレス防御に中心的な役割を果たす転写因子Nrf2の下流の遺伝子に着目して探索することを目的とした。マイクロアレイによる網羅的な解析から、SLC40A1、HFE、FECH、CYBRD1、ISCU、SLC25A37、TFRCが候補として抽出されたが、いずれの遺伝子についても鉄排出には関与しておらず、新規鉄排出トランスポーターの発見には残念ながら至らなかった。

研究成果の概要（英文）：As excess iron accumulation in body cause oxidative stress, it is needed that effective iron excretion system. Surprisingly, there is only one molecule named FPN1 has been identified in this system. In this study, we aimed to identify novel iron exporting protein by focusing on the genes that expressions are regulated by Nrf2 having central role for anti-oxidative stress gene induction. By using microarray analysis, some candidates such as SLC40A1, HFE, FECH, CYBRD1, ISCU, SLC25A37 and TFRC were listed up, however, all of those did not have iron exporting activity.

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学　鉄代謝　トランスポーター

１．研究開始当初の背景

肝臓は消化管で吸収された鉄が最初に通過する臓器であり、鉄の貯蔵、血液中で鉄を運搬するトランスフェリンの産生、さらに生体の鉄代謝全体を調節するホルモンであるヘプシジンの産生等、鉄代謝において非常に重要な役割を担う臓器である。鉄は必須元素である反面、過剰になると酸化ストレスによる細胞障害をもたらすため、その存在量は厳密に制御されているが、細胞内におけるこうした鉄代謝調節機構の破綻により鉄過剰症が引き起こされる。瀉血、鉄制限食、鉄キレート剤処置により鉄蓄積を防ぐことで臨床症状が軽減できるが、根本的治療法は開発されていない。

代表者らは、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）発症機序における酸化ストレスの関与に関する研究から、一連の抗酸化タンパク質群の発現を制御する転写因子 Nrf2 が NASH 発症防御に重要であることを明らかにしてきた。この中で、興味深いことに Nrf2 欠損マウスより調製した肝培養細胞は、取り込んだトランスフェリン鉄の排出が野生型細胞と比較して著明に低下していることを見出した。重要なことに、この現象には、鉄取り込み量の変化や、現在唯一知られている鉄排出トランスポーターである FPN1 は関与していなかった。従って、肝細胞において鉄は FPN1 以外の経路によって排出される経路も存在し、その経路に Nrf2 により制御される因子が関与することが強く示唆された。そこで、Nrf2 が制御する遺伝子群の中に未知の鉄排出トランスポーターが存在すると考え、本研究の着想に至った。

２．研究の目的

Nrf2 はこれまでに、抗酸化酵素群、異物代謝酵素群などの遺伝子をストレス下で統一的に制御する転写因子であることが明らかになってきており、生体防御における鍵因子として注目を集めている。本研究は野生型、Nrf2 欠損マウス由来の肝培養細胞を用いたマイクロアレイのデータを比較することで、Nrf2 により制御される遺伝子を網羅的に抽出する。その中に含まれる全トランスポーターについて、鉄排出活性を持つものを探索し、FPN1 以外に未知の鉄排出に関わるトランスポーターがあるか否かを明らかにする。これが見つかった場合は、さらにその遺伝子発現の Nrf2 依存性や組織分布などの詳細な基礎データを得る。

３．研究の方法

(1)候補遺伝子の抽出

まず、約４万遺伝子のプローブを搭載したマイクロアレイ（Affymetrix MOE430）解析による発現データ（野生型、Nrf2 欠損マウス肝臓組織、n = 3、既に申請者が未解析データを所有）から、Nrf2 により制御を受けることが予想される遺伝子を抽出した。

次に、これらの遺伝子の構造、鉄代謝との関連などの既知情報を調べ、トランスポーター遺伝子をピックアップする。機能が既知の遺伝子であっても、ここで抽出された遺伝子はすべて次の解析に進むものとした。

(2)候補遺伝子のクローニング

抽出された遺伝子すべてについて、PCR 法により cDNA を増幅した。この際、鋳型には肝組織より調製する total RNA を random hexamer, oligo dT を用いて逆転写した cDNA を用いた。増幅された cDNA 断片を、哺乳動物発現用プラスミドベクターpcDNA3.1 にライゲーションし、CMV プロモーターの制御下でトランスポーターを強制的、過剰に発現するコンストラクトを作製した。

(3)トランスフェリン鉄の調製

初代培養細胞１ウェルあたり、通常の培地に含まれる鉄含量と同等の 0.5μM 程度になるように調製した。処理前日に Human apo トランスフェリン、59FeCl3 を 1:2 の割合で緩衝液中に混合し、一晩室温でインキュベートすることにより作製した。

(4)細胞への処理、放射活性の定量

各トランスポーターを強制発現した肝細胞の培地を鉄不含培地（RPMI1640）に交換し、ここに 59Fe を含むトランスフェリン鉄を添加した。添加後 4 時間インキュベーター内で培養し、トランスフェリン鉄を取り込ませ、細胞を充分量の PBS で 5 回洗った後、DMEM 培地（+0.1% BSA）を加え 24 時間培養した。翌日、培地全量を培地サンプルとして、細胞を良く洗った後に 2% SDS にて溶解したものを細胞サンプルとしてそれぞれ回収し、γカウンターにより含まれる 59Fe 由来の放射活性を測定した。鉄放出率は（培地カウント）／（培地カウント）＋（細胞カウント）で計算し、鉄排出能を評価した。

４．研究成果

(1)候補遺伝子の抽出

野生型、Nrf2 欠損マウス肝臓組織から調製したサンプルを用いたマイクロアレイ解析の結果（n = 3）から、Nrf2 に発現が依存するもの、鉄代謝の関わることが知られている

もの、構造上トランスポーター活性を持つことが予想されるものを指標に、新規鉄トランスポーター候補遺伝子を抽出した。Nrf2 制御遺伝子は約 200 個、その中には鉄代謝に関わるもの、トランスポーターである SLC ファミリーも含まれていた。ここから、比較的発現量が高く、さらに Nrf2 への依存性が高いものに着目し、鉄排出に関わる遺伝子として SLC40A1、HFE、FECH、CYBRD1、ISCU、SLC25A37、TFRC の 7 つを候補として今後の解析に用いることとした。

(2)Nrf2 が鉄排出に関与することの確認

予備検討で Nrf2 欠損細胞は鉄排出活性が低いことが示されていたが、再度初代肝培養細胞を用いて、野生型と Nrf2 欠損マウス細胞における鉄排出活性を比較した。下図に示す通り、鉄排出率は Nrf2 欠損マウス由来の初代肝培養細胞で有意に低く、Nrf2 が鉄排出に関与していることが示された。

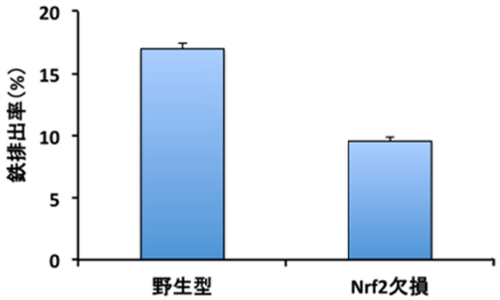

図２　肝初代培養細胞における鉄排出率

^{59}Feラベルした　ランスフェリンを4時間取り込ませ、その後24時間に培地中に放出された鉄の排出率を求めた。Nrf2欠損肝臓細胞は鉄排出能が低下しており、鉄を蓄積し易いことが示された。

(3)候補遺伝子の鉄排出活性の測定

7 つの遺伝子について cDNA をクローニングし、発現ベクターを構築した。HepG2 細胞にリポフェクションにてトランスフェクションさせ、まず、これらの遺伝子が正常に発現しているかを調べた。リアルタイム PCR 法により、すべての遺伝子が高発現することが確認され、市販の抗体のあるものに関してはタンパク質レベルでの高発現を認めた。

この細胞を用いて、トランスフェリン鉄の取り込み後に起きる鉄放出活性をアイソトープを用いて調べた。その結果、いずれの遺伝子の強制発現系においても、その活性はコントロールと同等であり、有為な鉄放出活性の増大は認められなかった。

以上より、新規の鉄排出トランスポーターの発見には至らなかった。今後の検討課題として、発現レベルの低かった遺伝子も候補として挙げる他、トランスポーターについては多くがヘテロダイマーとして働くため、複数の組み合わせで放出活性を比較検討する必要があるものと思われる。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕
なし

〔学会発表〕（計 14 件）

1. Eiji Warabi, Kentaro Akiyama, Junichi Shoda and Tetsuro Ishii. Obesity in p62-KO mice is prevented by estradiol. The Environmental Response, 2014.2.28, Sendai
2. 蕨　栄治、石井哲郎、正田純一. p62/Sqstm1 欠損は中枢におけるレプチン抵抗性により過食を引き起こす. 第 8 回臨床ストレス応答学会 2013.11.15、松本
3. 蕨　栄治、秋山健太郎、正田純一. p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは過食により NASH を自然発症する. JDDW 2013.10.9、東京
4. 秋山健太郎、岡田浩介、正田純一、蕨　栄治. p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症する. 第 68 回日本生化学会　2013.9.11、横浜
5. Tetsuro Ishii, Eiji Warabi, Richard C.M. Siow and Giovanni E. Mann. Interaction of Sequestosome1/p62 with voltage-activated potassium channels in arterial smooth muscle cells in injury-induced arterial remodeling. IUPS2013, 2013.6.21, Birmingham, UK
6. 蕨　栄治、柳川徹、正田純一. p62/Sequestosome1 欠損によるメタボリックシンドローム発症機序の解析. 第 66 回日本酸化ストレス学会 2013.6.13、名古屋
7. 秋山健太郎、正田純一、蕨　栄治. 過食肥満により脂肪性肝炎を自然発症する p62:Nrf2 遺伝子二重欠失マウスの

腸管病変とその病態的意義．第 49 回日本肝臓学会 2013.6.6、東京

8. 秋山健太郎、正田純一、蕨　栄治．過食肥満により脂肪性肝炎を自然発症する p62:Nrf2 遺伝子二重欠失マウスの腸管病変とその病態的意義．第 21 回肝病態生理研究会 2013.6.5、東京
9. 池田瑛、蕨　栄治、正田純一．脂肪性肝炎を自然発症する過食肥満マウスの腸管病変と病態的意義．第 99 回日本消化器病学会総会　2013.3.21、鹿児島
10. 蕨　栄治、岡田浩介、正田純一．Nrf2：p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する JDDW 2012.10.10、神戸
11. Eiji Warabi, Airi Ueda, Tetsuro Ishii. Estradiol prevents obesity formation in Sqstm1/p62-KO mice. 16th SFRRI Biennial Meeting, 2012.9.6, London, UK
12. Sechang Oh, Eiji Warabi, Masayuki Yamamoto, Kiyoji Tanaka, Junichi Shoda. Nrf2 activation remarkably improves exercise endurance capacity in mice. 16th SFRRI Biennial Meeting, 2012.9.6, London, UK
13. 蕨　栄治、岡田浩介、徳重克年、橋本悦子、正田純一．Nrf2/p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する．第 20 回肝病態生理研究会　2012.6.6、金沢
14. 蕨　栄治、岡田浩介、徳重克年、橋本悦子、正田純一．Nrf2/p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する．第 48 回日本肝臓学会総会　2012.6.7、金沢

６．研究組織

(1)研究代表者

溝上　裕士（MIZOKAMI,Yuji）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：70268556

(2)研究分担者

蕨　栄治（WARABI,Eiji）
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：70396612

正田　純一（SHODA,Junichi）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90241827

(3)連携研究者

なし