

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	細 木 卓 明
<p>学位論文題目</p> <p>Heterogeneous expressions of hepcidin isoforms -20, -22, and -25 in hepatoma-derived cells by a simultaneous sensitive detection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry</p> <p>(液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計を用いた肝癌培養細胞株の ヘプシジンアイソフォーム-20、-22、-25発現多様性の証明)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>生田 克哉、下中 靖、佐々木 雄亮、安野 秀之、佐藤 一也 大竹 孝明、佐々木 勝則、鳥本 悦宏、斉藤 敬司、高後 裕</p> <p>未 公 表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>ヘプシジンは、肝臓で産生され、生体の鉄代謝を調節する因子で、腸管からの鉄吸収および網内系細胞からの鉄放出を抑制することで、生体全体における鉄代謝を負の方向へ調節する。ヘプシジンはヘモクロマトーシスや慢性炎症に伴う貧血など鉄代謝異常を有する様々な疾患の病態形成にかかわると考えられ、その発現調節などが盛んに研究されてきているが、その定量が極めて困難で、直接蛋白量の変動を検討することができず、遺伝子レベルでの発現変化での検討しかなされてこなかった。しかし、ヘプシジンにはヘプシジン-20, -22, -25の3種のmature isoformが知られている。一般に、その中でもヘプシジン-25が特に鉄代謝と関連が強いと考えられているが、他のアイソフォームの生理機能や発現調節を含めほとんど研究が進んでいない。近年、プロテオミクスの手法などを用いてin vivoにおけるヘプシジン定量が可能となりつつあるが、従来の手法ではin vitroで細胞培養上清でのヘプシジン濃度を測定することが困難で、ヘプシジン発現調節機構の詳細な研究に対し大きな障害となっている。そこで今回我々は、liquid chromatography (LC)-mass spectrometry(MS)/ MSを用いて、細胞培養上清中のヘプシジンアイソフォーム別の定量ができる測定系を構築し、それを用いた各種肝癌細胞株でのヘプシジン発現パターンを検討した。</p>			

材 料 ・ 方 法

細胞および細胞培養・刺激条件など

ヒト肝癌由来細胞株としてHepG2、HuH-1、HuH-2、HuH-4、HuH-6、HuH-7、WRL68、HB611、Hep3B、HLE、HLF、SK-HEP-1、およびヒト肝細胞株Human Primary Hepatocytesを用いた。培養は5%CO₂下で37℃にて行った。各細胞を6穴プレートに80% confluentの状態にしてから、培養液をfresh mediumに交換した。Controlの他に、各種のヘプシジン発現調節因子として、炎症性サイトカインのinterleukin-6 (IL-6)やholo-transferrin (holo-Tf)を培養上清に添加し、そこから48時間培養を行った。HepG2細胞に対しては、desferrioxamine (DFO)、ferric ammonium citrate (FAC)、furin inhibitor Iなどを添加した条件も検討した。培養終了後、培養上清を回収し、一方細胞からはRNAを回収して定量的RT-PCR法によるヘプシジン遺伝子 (*HAMP*) mRNA発現量の検討や蛋白定量を行い培養上清中のヘプシジン濃度の補正を行った。すべての検討はtriplicateで行った。

定量的RT-PCR (quantitative RT-PCR: qRT-PCR)

各種肝癌細胞株のtotal RNAからcDNAを作成した後LightCycler (Roche社)で*HAMP*および*GAPDH* mRNA発現を定量した。増幅酵素とPCR産物の検出は、FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche社)を使用した。

LC-MS/MS分析およびヘプシジンの定量

測定検体である各培養上清に対して、4% trichloroacetic acid (TCA)を等量混合し、攪拌・遠心を行うことで培養液中のfetal bovine serum (FBS)中に含まれる分子量の大きな蛋白を沈殿させ、その後上清を測定した。ヘプシジンの検出はLC-MS/MSを用いて行った。LC-MS/MSは、UPLC ACQUITYTMシステム、PLRP-Sカラム(5 μm, 300 Å 150 mm×2.0 mm i.d.)およびAPI4000を用いて行った。定量は、合成した各ヘプシジンアイソフォームであるヘプシジン-20, -22, -25の標準蛋白を用いて行った。培養上清回収後の細胞に対し蛋白定量を行い、培養上清中のヘプシジン測定値の補正を行った。

成 績

各種の肝癌細胞株の培養上清において、LC-MS/MSによってヘプシジンの3つのアイソフォームの検出が可能であることが確認され、定量性に関しても2-1,000 ng/mlの範囲において直線性が示された。測定しているMS上のピークが各ヘプシジンアイソフォームであることは、合成した各標準蛋白と実際の検体間で得られるprecursor ion、product ionおよびretention timeの一致によって確認した。

この方法を用い、各種ヒト肝癌細胞株におけるヘプシジン発現を検討することとしたが、まずこれらの細胞株における*HAMP*遺伝子発現を定量的RT-PCR法にて検討した。特にHepG2、HuH-7、およびWRL68細胞では*HAMP* mRNAの高い発現を認め、その他の細胞株は低いもしくは中程度の発現を示した。

次に、各種肝癌細胞株の培養上清におけるヘプシジンアイソフォームの定量を行ったが、今回の検討では、*HAMP*遺伝子発現は認めるにも関わらずHLE、HLF、SK-HEP-1、およびHuman Primary Hepatocytesの培養上清においては、どのヘプシジンアイソフォームも検出されなかった。他の細胞株の培養上清ではヘプシジンアイソフォームを測定可能で、これらの細胞株では、ヘプシジンアイソフォーム発現パターンや、各種刺激に対する反応性に大きな差異が存在することが判明した。そのパターンは、

①HepG2:ヘプシジン-22と-25を発現するが-20は検出されないもの、②WRL68:ヘプシジン-20と-22の発現を認めるが、-25が検出されないもの、③HuH-1、HuH-7:ヘプシジン-25のみ発現を認め、-20と-22が検出されないもの、④HB611、Hep3B、HuH-2、HuH-4、HuH-6:ヘプシジン-20のみが発現しており、-22および-25が検出されないもの、と4つに分類された。

各細胞株における培養上清中のヘプシジンアイソフォーム量とHAMP mRNA発現量の関連性について検討を行ったが、HAMP mRNAの発現が多い細胞でヘプシジン-25の発現がやや多く、少ない細胞でヘプシジン-20または-22の発現が認められる傾向はあったが例外も多く、明らかな相関関係は認められなかった。

さらに、今回の研究では、肝癌細胞株として最も汎用されるHepG2に対して、現在までヘプシジンの発現を調節すると報告されている各種刺激を行った。まず、炎症性サイトカインであるIL-6は、ヘプシジン-25の高度の発現上昇を起こし、これは過去の報告と同様と考えられたが、ヘプシジン-22には変化をみなかった。鉄過剰状態ではヘプシジンはin vivoでの検討では発現増加をきたすとされているが、これに関しては、holo-TfやFAC負荷を行ってもヘプシジン-25はむしろ著明な低下を認めており、逆の結果となった。鉄キレート剤であるDFO添加では、ヘプシジン-25の減少が認められたが、ヘプシジン-22は発現上昇を来していた。ヘプシジンの細胞内でのプロセッシングを阻害するfurin inhibitor I負荷ではヘプシジン-25は発現減少をみたが、ヘプシジン-22は発現が増加していた。

培養液に通常含まれるFBSのヘプシジン発現に対する影響も合わせて検討したが、FBS濃度の上昇に従い、ヘプシジン-22および-25ともに発現は増加した。このため無血清の培養液を用いて同様の検討を行ったところ、FBS含有条件下と比べ、ヘプシジンの発現は測定限界程度まで減少した。

考 察

本研究では、LC-MS/MSを用いて、現在まで確立されていなかったin vitroの細胞培養上清におけるヘプシジンそのもの、さらにはその3つのアイソフォームに関して、同時に、しかも各々定量性をもって測定することが可能であることを確認した。近年、血清中や尿中などでのヘプシジン-25の定量に関しては可能になりつつある状況であったが、肝細胞におけるヘプシジンの発現調節に関しては、多くの発現調節物質が存在するとされ、さらに細胞内でのsignal伝達も関与するとされ、複雑であり、in vitroでの検討が必要なのは間違いない事実であるが、その定量の難しさが大きな障壁であり、in vitroでは遺伝子レベルでの検討しかなされていなかった。しかし、ヘプシジンには3つのアイソフォームが存在しそれらの生理機能も十分明らかではない上、細胞内でのプロセッシングや細胞外への分泌に関しても不明な点が多く、遺伝子レベルの解析だけでは不十分な可能性が残り、in vitroでのヘプシジン定量法は切望されていた。本研究によって構築されたヘプシジンアイソフォーム同時定量法は、今後のヘプシジンに関する研究、ひいては生体内鉄代謝研究に対して大きな貢献ができるものと考えられる。

本研究では、各種の肝癌細胞株におけるヘプシジンアイソフォームの発現パターンについても検討した。今回の方法ではいずれのアイソフォームも検出できなかった細胞株と、測定可能であった細胞株に大きく分けられたが、HAMP遺伝子発現とははっきりした相関は認められず、細胞内のプロセッシングや細胞外への分泌機構などによる相違が存在する可能性が考えられた。測定可能であった株でもその発現パターンは本検討だけでもさらに4つのパターンに分類され、かなり多様性が認められることが確認された。これは、生体内において肝細胞は常に均一の機能を果たしているわけではなく、細胞間でその機能を分担して

いる可能性があることを示すと考えられた。そのため、*in vitro*でのヘプシジン発現を検討する実験を行う際には、各種肝癌細胞種ごとのヘプシジン発現パターンの違いに十分留意することが必要と考えられた。

ヘプシジン発現を調節する因子として知られている各種物質添加による発現変化の検討では、IL-6などその変動が一部はこれまでの報告と一致しており説明可能であったが、*in vivo*での結果と異なる結果が得られ現段階では説明のつかない動きも認められ、今後の研究が必要と考えられた。また、FBS濃度変化が予想以上に大きくヘプシジンを変動させていることも確認されたが、無血清の条件下では測定限界程度までヘプシジン発現が低下してしまうため、今回のLC-MS/MSを用いた定量法では、現時点ではFBS添加条件下で検討する必要があると思われるが、FBS濃度設定に関しては厳重に注意する必要があることが示唆された。

結 論

各種肝癌細胞株の培養上清中のヘプシジン-20、-22、-25のLC-MS/MSを用いた同時定量測定法を確立した。この方法にて、肝癌細胞株におけるヘプシジンアイソフォームの発現パターンを検討し、各細胞株間でそのパターンが大きく異なることを初めて見出した。従来のヘプシジン測定法ではアイソフォームごとの検討ができていないため、各ヘプシジンアイソフォームの生理的意義や発現に関する検討を行う上で、今回確立したLC-MS/MSを用いた同時定量測定法は有用な系になりうるものと考えられた。

参 考 論 文

1. Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 2008;112(2):219-30.
2. Murao N, Ishigai M, Yasuno H, Shimonaka Y, Aso Y. Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21(24): 4033-8.
3. Inamura J, Ikuta K, Jimbo J, Shindo M, Sato K, Torimoto Y, Kohgo Y. Upregulation of hepcidin by interleukin-1beta in human hepatoma cell lines. *Hepatol Res.* 2005;33(3):198-205.

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	細 木 卓 明
<u>審査委員長 谷 口 隆 信</u>			
<u>審査委員 高 後 裕</u>			
<u>審査委員 若 宮 伸 隆</u>			
学 位 論 文 題 目			
Heterogeneous expressions of hepcidin isoforms -20, -22, and -25 in hepatoma-derived cells by a simultaneous sensitive detection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計を用いた肝癌培養細胞株の ヘプシジンアイソフォーム-20、-22、-25 発現多様性の証明)			
共 著 者 名			
生田 克哉、下中 靖、佐々木 雄亮、安野 秀之、佐藤 一也 大竹 孝明、佐々木 勝則、鳥本 悦宏、斉藤 敬司、高後 裕			
<p>ヘプシジンは腸管からの鉄吸収を抑制すると同時に、網内系細胞からの鉄放出も抑制して体内の鉄量を負に調節するペプチドホルモンである。ヘプシジンは肝臓で産生され、ヘモクロトーシスや種々の症候性貧血などの病態形成に関わっていることから、その発現調節は鉄代謝研究における重要な課題であるが、これまでそのタンパク質を定量することの困難さのため、遺伝子レベルでの検討しかなされてこなかった。ヘプシジンには一つの前駆タンパク質から生じる3つのisoformが存在することが明らかになっており、これらはC末端のアミノ酸配列が同一で、N末端のペプチド長が数個ずつ異なっている。最も短い20アミノ酸からなるヘプシジン-20、22アミノ酸のヘプシジン-22、最も長い25アミノ酸のヘプシジン-25の3種である。この中で、ヘプシジン-25については鉄代謝との関連で研究がなされているが、他のアイソフォームの生理機能については鉄代謝との関連も含めてほとんど研究が進んでいない。</p>			

また、ヘプシジンはアミノ酸20数個のペプチド鎖の中に4つのS-S結合を持ち、非常にコンパクトに折り畳まれた構造を有しているため、それぞれのisoformを特異的に認識する抗体はこれまで得られておらず、従って、ELISAによるisoformの測定法は実用化されていない。近年、プロテオミクスの手法を用い、ヘプシジンタンパク質の定量が可能となりつつあるが、未だ感度が低く、この定量の困難さがヘプシジン研究におけるボトルネックとなっている。本論文は、この問題に正面から取り組み、liquid chromatography (LC)-mass spectrometry(MS)/MSを用いてヘプシジンのアイソフォームそれぞれの量を同時に測定できるシステムを構築して報告している。

測定に使用したLC-MS/MS装置は、UPLC ACQUITY™システムとPLRP-SカラムおよびAPI4000を組合せたものであり、先ず、ヘプシジンの各アイソフォームを合成し、それぞれ希釈系列を作成して計測し、2-1,000 ng/mlの範囲において直線性をもって定量性が示された。

次いで、HepG2を始めとする12種類のヒト肝癌細胞株および1種類のヒト正常肝細胞株、計13種類の細胞株を用い、その培養上清中のヘプシジンisoformを定量した。定量結果の詳細は省くが、ヘプシジンisoformタンパク質の発現パターンは細胞ごとに異なっており、また、サイトカイン刺激や鉄添加／除去刺激によって興味深い変動を示すことが、世界に魁けて示された。また、mRNAとタンパク質の発現についても検討を行ったところ、細胞株において必ずしも一致するものでもなく、相関の傾向も一定ではなかった。ヘプシジンにおける各isoformへのプロセッシングの違いが大きいことが示唆された結果だと考えられる。

今後、本論文で確立された測定系を用い、各isoformへのプロセッシングを含むヘプシジン代謝経路の解明、病態とヘプシジン発現との関連など、ヘプシジン研究が一気に加速進展することが期待される。本論文に示されたヘプシジンisoformの高感度定量系の確立は、この分野に於いて極めて意義のある研究成果と考えられる。

申請者に対して査問を行い、当該分野に関する申請者の知識／経験／見識は博士に相応しいものであり、論文審査の結果と合わせて、合格と判定したことを御報告致します。