



Role of hepcidin upregulation and proteolytic cleavage of ferroportin 1 in hepatitis C virus-induced iron accumulation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2023-11-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 太田, 和義 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/0002000051

博士（医学）太田 和義

論文題目

Role of hepcidin upregulation and proteolytic cleavage of ferroportin 1 in hepatitis C virus-induced iron accumulation

（C型肝炎ウイルスによって誘導される鉄蓄積におけるヘプシジンの発現上昇とフェロポーチン1のタンパク質分解切断の役割）

論文の内容の要旨

[はじめに]

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓への持続感染により肝硬変や肝細胞がんの発症につながるだけでなく、脂質や鉄の代謝障害の誘因となる。過剰な鉄はフェントン反応を介して活性酸素種を発生させ、DNA 損傷、細胞障害を引き起こし、線維化・発がんのリスクを上昇させる。実際、C型肝炎患者における肝臓への鉄沈着は広く知られており、現在の直接作用型抗ウイルス薬による治療が確立する以前には過剰な鉄の除去のため瀉血療法が補助治療として行われていた。しかしながら鉄過剰に至る詳細な分子機構については十分に解明されていない。細胞から血中への鉄イオンの排出を担う膜タンパク質フェロポーチン1(FPN1)と肝細胞で産生されるペプチドホルモンであるヘプシジンは、FPN1にヘプシジンが結合することによって分解が誘導され、細胞外への鉄放出が阻害されることで鉄の恒常性維持に重要な役割を果たしている。本研究では、C型肝炎における鉄代謝異常の分子機構解明を目指し、ヘプシジン-FPN1システムへのHCV感染の影響を解析した。

[材料ならびに方法]

HCV感染実験にはヒト肝がん由来細胞株 Huh7.5.1 を用い、各遺伝子の mRNA レベルは定量 RT-PCR 法で測定した。メタロアッセイ法および鉄(II)イオン検出プローブを用いて細胞内鉄を測定した。プロモーター活性はルシフェラーゼアッセイで評価、cyclic-AMP responsive element-binding protein hepatocyte specific (CREBH)、mothers against decapentaplegic homolog 1 (SMAD1) のプロモーター結合はクロマチン免疫沈降法で解析した。CREBH ノックアウト細胞は CRISPR-Cas9 系で作製した。細胞培養上清および血清中のヘプシジンは液体クロマトグラフィー質量分析法で測定した。FPN1 タンパク質発現はフローサイトメトリー法とウエスタンブロット法で解析し、エドマン分解法で N 末端アミノ酸解析を行った。8 週齢の C57/BL6J マウスおよび同系 CREBH ホモノックアウトマウスに HCV タンパク質発現アデノウイルスベクターを接種し、肝組織中の mRNA、タンパク質発現、血清鉄を解析した。ベルリンブルー染色およびナノスーツ法を応用した元素分析により組織内鉄沈着を解析した。本学組換え DNA 実験安全委員会(承認番号:27-15、27-17、28-07、28-22、29-03、29-05)、動物実験委員会(承認番号:H30-054)、臨床研究倫理委員会(承認番号:15-299、15-301、16-287、17-253)の承認のもと各当該実験を実施した。

[結果]

HCV 感染細胞において、感染量および感染時間に比例したヘプシジン mRNA 発現上昇および細胞内鉄量の増加がみられ、ヘプシジン転写誘導に伴いヘプシジンプロモーターへの CREBH および SMAD1 の結合と bone morphogenetic protein 6 (BMP6)プロモーターへの CREBH 結合の亢進がみられた。CREBH ノックアウト細胞では HCV 感染によるヘプシジンおよび BMP6 の発現誘導は完全にキャンセルされた。ヘプシジン転写誘導は HCV ポリタンパク質 Core/E1/E2/p7/NS2 (Core-NS2) の発現で再現し、CREBH ノックアウトマウスでは Core-NS2 発現による肝臓でのヘプシジンおよび BMP6 誘導がキャンセルされた。HCV 感染細胞培養上清中のヘプシジン濃度は非感染細胞上清より高く、患者血清中ヘプシジン濃度は抗ウイルス療法による HCV 排除によって低下した。HCV 感染細胞において FPN1 発現の低下がみられ、HCV 遺伝子型 1b、2a、3a それぞれの NS3-4A プロテアーゼ発現において FPN1 部分断片がヘプシジン非依存的に検出され、この FPN1 切断は NS3-4A プロテアーゼ不活性変異体発現または NS3-4A 阻害薬存在下では認めなかった。NS3-4A プロテアーゼの認識配列が FPN1 の中央部に存在し、実際にこの部位で FPN1 が切断されることを N 末端アミノ酸解析で明らかにし、切断部位 2 アミノ酸置換により切断が阻害されることを示した。マウス肝臓での NS3-4A 発現により、マウス FPN1 もヒトと同様に切断されることを示した。マウス肝臓への HCV Core-NS2 あるいは NS3-4A の各発現による鉄沈着誘導を示し、共発現による鉄沈着量の有意な増加を見出した。

[考察]

細胞表面 FPN1 レベルの低下は細胞内の鉄蓄積を誘導する。本研究では HCV がヘプシジン-FPN1 システムに介入し、鉄蓄積による持続的な活性酸素種の発生から肝病態の発現に繋がり得る以下の分子機構を見出した。HCV 感染に起因する小胞体ストレスにより CREBH が活性化しヘプシジンプロモーターを正に制御、同時に CREBH は BMP6 発現誘導および SMAD 経路の活性化にも寄与しヘプシジン発現が亢進する。FPN1 へのヘプシジン結合は FPN1 のユビキチン化・分解を誘導する。また、HCV NS3-4A プロテアーゼ活性によって FPN1 の中央部が切断されることにより、FPN1 の鉄排出能が低下、消失する。この分子機構の解明は C 型肝炎に対する既存の鉄制限治療や瀉血療法の裏付けとなるだけでなく C 型肝炎の病原性発現機構の全容解明への礎となり得る。C 型肝炎はウイルス排除後も肝発癌に至る症例が散見され、今後の研究により鉄蓄積が病勢の進行や肝発癌に寄与する分子機構の解明が期待される。また、鉄蓄積はアルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患でもみられ、細菌感染においても鉄獲得機構が存在することが知られている。ヘプシジン-FPN1 システムの調節異常をきたす分子機構に関する知見は、C 型肝炎以外の鉄代謝関連疾患の病態解明や治療法開発に寄与することも期待される。

[結論]

HCV 感染は、主要な細胞内鉄制御機構であるヘプシジン-FPN1 システムの転写お

よび翻訳後の調節過程に介入し攪乱する。HCV 感染細胞では、ヘプシジンの発現誘導による FPN1 の分解亢進およびウイルスプロテアーゼによる FPN1 切断を介した鉄排出機能の低下によって鉄蓄積が進行することを明らかにした。