

鉄代謝異常症とヘプシジン

川 端 浩

(京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学*)

Iron Metabolism and Hepcidin

Hiroshi Kawabata

Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Summary

Iron is essential for a variety of cellular functions, but it can cause tissue damage when present in excess. Due to its dual nature, the amount of iron in the body should be strictly controlled. One of the key molecules for maintaining iron homeostasis in the body is hepcidin, a peptide hormone mainly produced in the liver. Expression of hepcidin is upregulated by iron loading and inflammatory cytokines such as interleukin-6, and down-regulated by hypoxia and erythropoietic stimuli. Hepcidin decreases both iron absorption from the intestine and iron release from macrophages through down-regulation of ferroportin, the only iron exporter of the cells. *HFE*, *TFR2* (transferrin receptor 2) and *HJV* (hemojuvelin) are expressed in the liver, and these are related to the iron sensing machinery. Mutations of one of these genes or *HAMP* (hepcidin) gene cause down-regulation of hepcidin expression, resulting in increased iron absorption from the intestine and iron accumulation in the body (hereditary hemochromatosis). In contrast, mutations of *TMPRSS6* (matriptase-2) gene cause an increase of hepcidin expression, resulting in hereditary iron deficiency anemia. Hepcidin is also upregulated in chronic inflammation, causing anemia of chronic disease. In this review, I will attempt to provide an integrated view of physiology and pathophysiology of iron metabolism in the body by focusing on hepcidin.

鉄は生命にとって必須の要素であり、酸素の運搬、酸化のリン酸化、核酸合成など様々な生命活動に関わる。人体では鉄が欠乏すると貧血や爪の変形など様々な臨床症状を引き起こす。一方、鉄の過剰もフェントン反応による活性酸素の生成を介して肝臓、心臓、膵臓などの臓器障害を引き起こし、発がんとの関わりも示唆されている。このため、生体内の鉄は厳密にコントロールされなければならない。

遺伝性ヘモクロマトーシスは、生体の鉄代謝制御機構の破綻による鉄過剰症で、白人に高頻度にみられる。近年、その責任遺伝子群が次々と明らかになり、生体の鉄代謝制御機構の理解が大幅に進んだ。遺伝性ヘモクロマトーシスの責任遺伝子として、*HFE*、*TFR2* (トランスフェリン受容体2)、*HAMP* (ヘプシジン)、*HJV* (ヘモジュベリン)、*FPN1* (フェロポルチン：細胞外への鉄の輸送タンパク) が見つかった。このうち中心的な役割を果たしているのが肝臓で産生されるペプチド・ホルモンのヘプシジンである。*HFE* と *TFR2* は細胞膜上で複合体を形成して、トランスフェリン鉄 (Fe-Tf) のセンサーとして働いているものと考えられている。*TFR2*-*HFE* 複合体の下流には *HJV* と *BMP* (*TGFβ* スーパーファミリーの液成因子) 受容体

の複合体があり、ヘプシジン・プロモーターへのシグナルを伝える。したがって、これらのいずれかの遺伝子に異常があるとヘプシジンの産生が低下する。ヘプシジンは生体の鉄代謝を負に制御する因子であり、ヘプシジンが低下すると腸管からの鉄の取り込みが増加してヘモクロマトーシスになる。

鉄過剰症は、遺伝性ヘモクロマトーシス以外にも輸血によるものや、サラセミアなどの無効造血に伴うものがあり、臨床的大きな問題となっている。とくに、βサラセミアでは輸血を受けていなくても鉄過剰症が起これり、これが心不全や肝硬変など重篤な合併症を引き起こしている。βサラセミアでは growth differentiation factor 15 (*GDF15*) が無効造血の骨髄から大量に分泌され、これが肝臓でのヘプシジン産生を抑制して、鉄過剰症を引き起こしている。遺伝性赤芽球異形成貧血 I 型や、骨髄異形成症候群の *RARS* (環状鉄芽球を伴う不応性貧血) でも血清 *GDF15* が異常高値となっていることが示されている。

肝臓におけるヘプシジンの発現は、Fe-Tf のほかに、炎症性サイトカインであるインターロイキン 6 (*IL6*) 刺激によっても増加する。これは、感染症に対する生体防御反応、

*所在地：京都市左京区聖護院川原町 54 (〒606-8507)

本稿は、平成 21 年 6 月 5 日に京都で開催された第 26 回日本微量栄養素学会における発表をもとに書き上げたものである。

すなわち、病原微生物の利用できる鉄を減らす反応として理解できる。キャッスルマン病などでみられる慢性炎症性貧血は、IL6によるヘプシジンの過剰産生が一因と考えられる。すなわち、炎症により増加したIL6がヘプシジンの発現を刺激し、増加したヘプシジンが腸管からの鉄の吸収と網内系細胞からの鉄の放出を抑制する。その結果、造血系が利用できる鉄が減少して貧血を引き起こす。実際キャッスルマン病では、抗IL6受容体抗体投与により血清ヘプシジンの低下、血清鉄の上昇、ついで貧血の改善がみられる。一方、低酸素刺激は、筋肉から可溶性HJVを放出させて、これが肝臓でのヘプシジンの発現を負に制御する。赤芽球造血も、何らかの液性因子を介してヘプシジンの発現を負に制御する。これらの制御機構は、低酸素あるいは造血亢進状態で多くの鉄が必要となることから、目的的といえる。

このように、近年ヘプシジンを中心とした鉄代謝制御に関する知見はめざましく進展しており、様々な原因による鉄代謝異常症の病態の理解が進んでいる。本稿では、分子レベルから臨床に至るまでの鉄代謝に関し、最近のトピックも併せて概説する。

はじめに

生命が誕生した太古の海には大量の鉄イオンが存在していたと考えられている。27億年前、光合成を行うシアノバクテリウムが大量に発生して酸素を作り出して以降、鉄は酸素と結びついて酸化鉄となり沈殿し、それに伴って海水中に解けていた鉄が急速に減少したという。生命体にとって、これまで豊富にあった鉄が、なかなか手に入らないものになってしまったわけである。こういった歴史的な経緯から、生命体はなるべく鉄を保持して外に逃がさないような仕組みを維持するようになった¹⁾。これが今日、臨床問題となっている、ヘモクロマトーシスなどの鉄過剰症の遠因となっている。

1. 鉄欠乏症と鉄過剰症

鉄欠乏性貧血は、原因が鉄の欠乏であり、鉄の補充で改善する。原因も治療も解明された過去の病気と思われがちだが、日本赤十字に献血にくる女性のなかで貧血のために献血が出来ない方の割合は年々増加している²⁾。日本人女性の鉄分摂取量は戦後一貫して減少しており、1955年には1日あたり14 mgほどあったものが、2003年には8 mg以下まで減っている²⁾。

鉄欠乏性貧血の多くは閉経以前の若年女性にみられ、月経による失血がその原因である。男性や閉経以降の女性にみられる場合には消化管出血を疑う。繰り返す便検査で消化管出血がみられない場合、原因不明の鉄欠乏性貧血として血液内科医に紹介となることが多い。

こういった貧血の原因の一部は、鉄の吸収障害である。

鉄の吸収障害による鉄欠乏性貧血の一部にヘリコバクター・ピロリ菌による慢性萎縮性胃炎があり、除菌によって貧血が改善することが報告されている³⁾。また、自己免疫性の慢性萎縮性胃炎も鉄の吸収障害をきたす⁴⁾。

一方、鉄過剰症は、肝臓、脾臓、心臓などに鉄が蓄積し、進行すると肝硬変、糖尿病、心不全など生命を脅かす臓器障害を引き起こしうる。鉄過剰症の原因は様々であるが、遺伝子異常によるもの（遺伝性ヘモクロマトーシス）、無効造血を伴う血液疾患に随伴するもの（サラセミアや骨髄異形成症候群）、輸血によるもの、C型肝炎などの肝疾患に伴うものなどがある。

遺伝性ヘモクロマトーシスはわが国では稀であるが、ケルト人を祖先に持つ白人では非常に高頻度にみられる。この疾患の特徴は肝臓への高度の鉄の蓄積で、脾臓の鉄はそれほど増加しない。検査値ではトランスフェリン飽和度と血清フェリチンの上昇がみられる。白人にみられるヘモクロマトーシスの原因の多くはHFEという遺伝子の異常である。この遺伝子は6番染色体のHLAの遺伝子座にあり、HLAとの相同性から発見当初はHLA-Hと呼ばれた⁵⁾。HLAはヒトの主要組織適合性複合体(Major Histocompatibility Complex, MHC)である。HFEも他のMHCクラスI分子と同様に、β2マイクログロブリンと複合体を形成して細胞膜上に存在する。白人に多いHFE遺伝子の変異はC282Y(282番目のアミノ酸システインからチロシンに置き変わっている変異)である。

頻度は少ないが、HFE以外のいくつかの遺伝子の変異も遺伝性ヘモクロマトーシスの原因となる。こういったnon-HFEヘモクロマトーシスの責任遺伝子の一つがTFR2(トランスフェリン受容体2)である⁶⁾。私がこの遺伝子の発見に関わった経緯から、これについて少々述べたい⁷⁾。

2. トランスフェリン受容体2の分子クローニング

1996年にロサンゼルス市のCedars-Sinai Medical CenterのDr. Koefflerの研究室に留学した私は、骨髄系細胞の分化に重要な転写因子であるC/EBPαに相同性の高い新規の分子を見つけるために、5'RACEという方法で遺伝子探しをしていた。まだヒト・ゲノム・プロジェクトはなく、ヒトの遺伝子配列が決定されていなかった時代である。とれてきた遺伝子のほとんどは既知のものか、たまたまプライマー部分だけが似ていてC/EBPとはまったく相同性のない、いわゆるジャンク配列であった。半年ほど過ぎ、ほとんどこのプロジェクトを終了しようと考えていた頃、ジャンク配列に分類したcDNAクローンの中に、アミノ酸レベルでトランスフェリン受容体(transferrin receptor 1, TfR1)とある程度の相同性のある未知のクローンを見つけた。もともとのプロジェクトから離れて、私はこの遺伝子のcDNAの全長をクローニングした。このcDNAは801個のアミノ酸をコードし、全長に渡ってTfR1とある程度の相同性をもっていた。私はこの分子をトランスフェリン受

容体2 (TfR2) と名付け、その機能解析をすることにした。

3. TfR2 の発現と機能解析

TfR1 はトランスフェリン鉄 (Fe-Tf) を取り込むための受容体で、ほとんどの臓器や細胞株に普遍的に発現している。一方、TfR2 の発現は赤芽球系細胞株と肝臓に局限していた (Fig. 1a)。TfR2 がトランスフェリンと結合するかどうかを調べるために、トランスフェリンに対する受容体を欠く細胞株 (CHO-TRVb) を入手した。この細胞に

TFR1 あるいは *TFR2* を遺伝子導入して安定的に発現する細胞株を作成し、この細胞表面に Fe-Tf が結合するかどうかを、フローサイトメトリーを用いて調べた。その結果、TfR2 は TfR1 と同様に Fe-Tf と結合することが分かった。ただし、Fe-Tf に対する TfR2 の親和性は TfR1 と比べて 1/30 程度と低かった (Fig. 1b)。アイソトープ標識した鉄を用いて細胞内への鉄の取り込み能力を調べた結果、TfR2 は TfR1 と同程度に Fe-Tf を取り込むことが分かった (Fig. 1c)。

次に、TfR2 の発現が細胞増殖に与える影響について調べることにした。通常の培養条件では、TfR 欠損 CHO 細

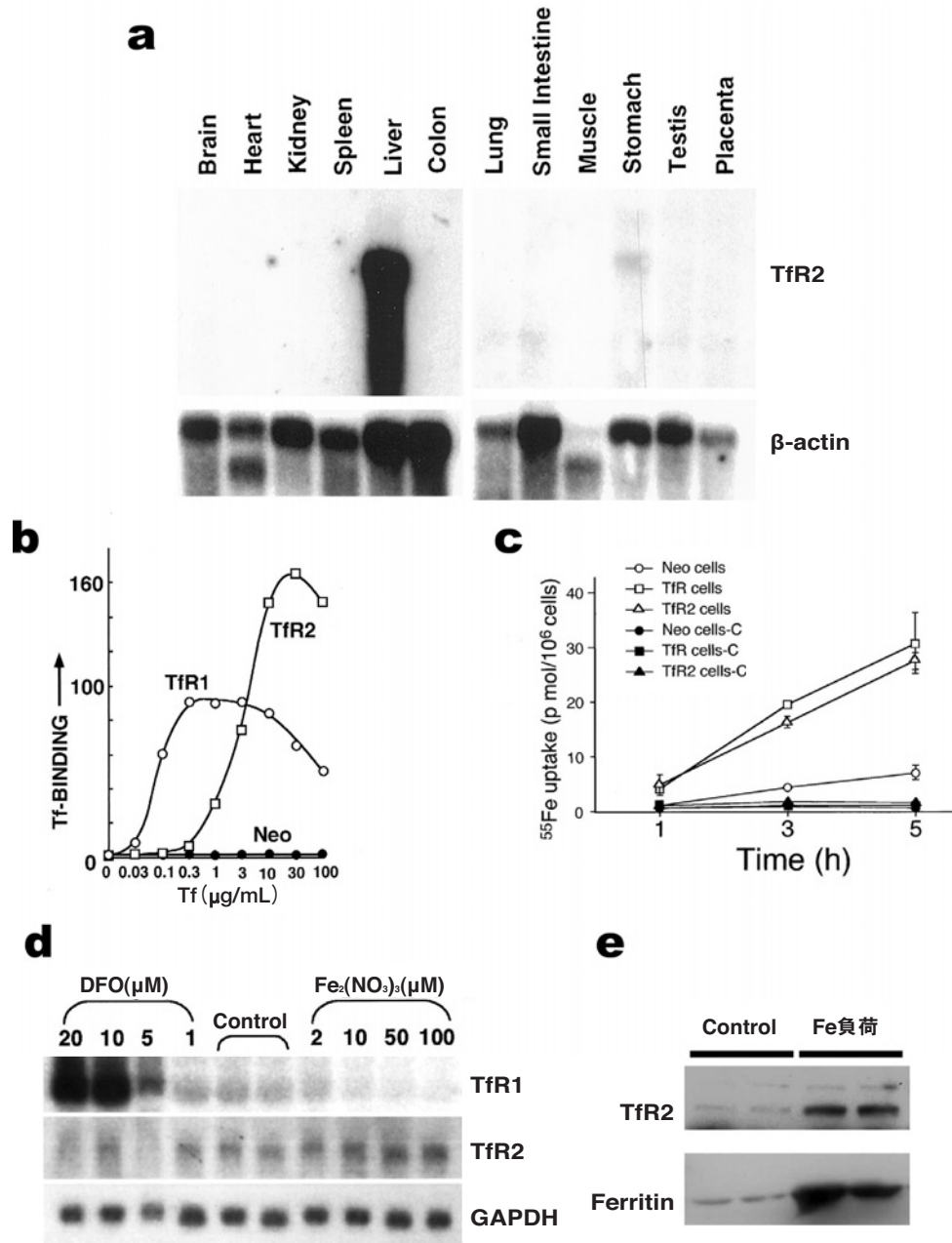


Fig. 1 トランスフェリン受容体2 (TfR2) の発現と機能解析。(a) Northern blot による TfR2 の発現解析。発現は肝臓に特異的である。(b) フローサイトメトリーを用いたトランスフェリン結合アッセイ。TfR2 は TfR1 の約 1/30 の親和性で、トランスフェリン鉄と結合した。(c) ^{55}Fe を用いた鉄の取り込み実験。TfR2 を発現する細胞では TfR1 を発現する細胞と同様にトランスフェリンを介した鉄の取り込みの促進がみられた。(d) K562 細胞株に鉄キレート剤 desferrioxamine (DFO) あるいは $\text{Fe}_2(\text{NO}_3)_3$ を添加して、TfR1 と TfR2 の発現を Northern blot でみたもの。TfR1 の発現は鉄キレート剤で強く誘導されたが、TfR2 の発現はむしろ鉄の添加で増加した。(e) マウスの腹腔内にデキストラン鉄を投与すると、フェリチンと同様に肝臓での TfR2 タンパクの発現が増加した。(a, b, d) Kawabata H, *et al.* (2000) *J Biol Chem* 275:16618, (c) Kawabata H, *et al.* (2000) *J Biol Chem* 275:16618, (e) Kawabata H, *et al.* (2005) *Blood* 105:376 より改変引用 ((a-d): © ASBMB, (e): © the American Society of Hematology)。

細胞, TfR1 発現細胞, TfR2 発現細胞のいずれも同様に増殖した。ところが、鉄キレート剤 (desferrioxamine) 存在下では、TfR 欠損細胞は増殖しなかったが、TfR1 あるいは TfR2 発現細胞は増殖し、細胞周期の S 期の割合が維持された。ヌードマウスの皮下に TfR 欠損 CHO 細胞を接種しても腫瘍を形成しなかったが、TfR1 発現 CHO 細胞を接種すると腫瘍を形成した。TfR2 発現 CHO 細胞は巨大な腫瘍を形成した。こういったことから、TfR2 の発現は TfR1 の発現と同様に、おそらく鉄の獲得を介して細胞増殖に有利に働くものと考えられた⁸⁾。

では、TfR2 は単に TfR1 と同様に鉄を細胞内に取り込むための受容体なのであろうか。

TfR1 の発現は、その mRNA の 3 末端側非翻訳領域にある iron responsive elements (IRE) と鉄制御タンパク (iron responsive protein-1, -2; IRP1, IRP2) により、細胞内の鉄の状態に依存して大きく変化する。すなわち、鉄が欠乏した状態では IRP は TfR1 の mRNA 上の IRE に結合してこれを安定化させるため TfR1 の発現が増加する。一方、鉄過剰状態では IRP は IRE から外れて、TfR1 の mRNA は分解される。これは、細胞内の鉄のホメオスタシスを保つためのフィードバック機構と考えられる。こういった機序で、TfR1 の発現は鉄キレート剤存在下で著しく増加し、鉄過剰状態では減少する。これに対して、TfR2 の発現は鉄キレート剤存在下でやや減少し、鉄過剰状態ではむしろ増加した (Fig. 1 d, e)。これは、TfR2 が鉄を細胞内に取り込むための受容体と考えると説明が困難な結果であった。

4. TFR2 変異による遺伝性ヘモクロマトーシス

2000 年に、イタリアの女性研究者 Camaschella らは、*HFE* に変異のみられないシチリア島の遺伝性ヘモクロマトーシスの家系で *TFR2* に遺伝子変異がみられたことを報告した⁶⁾。これを受けて、われわれはマウスの *Tfr2* 遺伝子に同様の変異を導入した。この遺伝子改変マウスでは、ヒトの遺伝性ヘモクロマトーシスと同様に肝臓への鉄の蓄積が起こった⁷⁾。その後、ポルトガルや日本など世界各地から、*TFR2* 遺伝子変異によるヘモクロマトーシスの家系が次々に報告されるようになった¹⁰⁻¹⁴⁾。

TfR2 はトランスフェリンと結合しエンドサイトーシスで細胞内に取り込む働きがある。しかしながら、*TFR2* の変異は鉄欠乏ではなく鉄過剰症を引き起こす。また、TfR2 の発現は鉄過剰状態でむしろ増加する。こういった矛盾を解く鍵が、2000 年から 2001 年にかけて 4 つのグループから報告されたヘプシジンであった¹⁵⁻¹⁸⁾。

5. ヘプシジンの発見

UCLA の Tomas Ganz は、1980 年代から抗菌ペプチドであるディフェンシン (defensin) の研究をしていた。ディフェンシンは、生体防御に重要な役割を果たすシステインが豊富なカチオニック・ペプチドであるが、Ganz らは尿中に排泄される同様の性質を持つ未知のペプチドを分離精製し、アミノ酸配列を決定した (Fig. 2)。彼らは、この分子の遺伝子発現が肝臓特異的であったことと抗菌活性を持つことから (hepatic bactericidal protein)、ヘプシジン (hepcidin) と命名した¹⁷⁾。

ほぼ同じころ、Krause らは透析液中の抗菌活性を持つペプチドを精製し、LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide) と名付けたが、これはヘプシジンと同じものであった¹⁵⁾。Pigeon らは、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法で、鉄負荷によりマウスの肝臓で発現が著しく増加する遺伝子を発見し、*Hamp* (hepatic antimicrobial peptide) と命名した。*Hamp* はヘプシジンをコードする遺伝子で、遺伝子名としてはこちらが用いられる¹⁸⁾。*HAMP* によりコードされるヘプシジンの成熟型として、尿中から 20, 22, 25 アミノ酸からなる 3 つのアイソフォームが見つかった。

ヘプシジンは抗菌活性を持ち、インターロイキン 6 (interleukin 6, IL6) や IL1 などによる炎症刺激で発現が増加する。また、ヘプシジンの発現は鉄過剰状態で増加し、鉄欠乏状態で低下する。ヘプシジンのノックアウト・マウスではヒトのヘモクロマトーシスのような鉄過剰症を呈し¹⁶⁾、ヘプシジンのトランスジェニック・マウスでは逆に鉄欠乏性貧血を呈する¹⁹⁾。すなわち、ヘプシジンは鉄代謝の負の制御因子と言える。

ヘプシジンの発現異常による鉄代謝異常症は、マウスだ

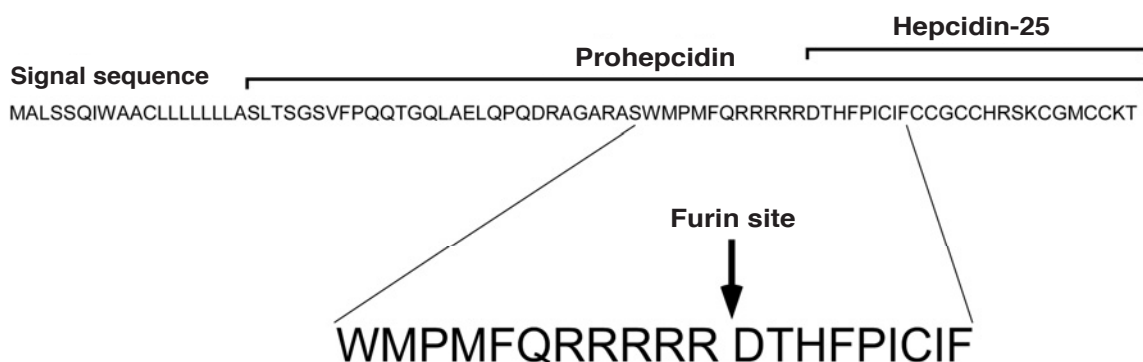


Fig. 2 ヘプシジンの一時的構造。前駆体である preprohepcidin からシグナル・ペプチドがはずれて prohepcidin になり、フリリン (furin) のような convertase によって切断されて 25 アミノ酸の成熟型となり血中に分泌される。

けでなくヒトでも同様にみられた。Weinsteinらは、ヘプシジン産生肝腫瘍の患者で鉄欠乏性貧血がみられ、腫瘍切除でその貧血が改善したことを報告した²⁰⁾。また、重症の若年型遺伝性ヘモクロマトーシスの家系でHAMP遺伝子の変異がみつかった²¹⁾。このように、ヒトでもマウスでもヘプシジンの過剰発現は鉄欠乏を引き起こし、ヘプシジンの発現低下は鉄過剰症を引き起こすことが明らかになった。

ヘプシジンはペプチドホルモンであるから、受容体があるはずである。GanzグループのNemethらは、その受容体がフェロポルチン(ferroportin, FPN1、遺伝子はFPN1/SLC40A1)という鉄輸送タンパクであることを見いだした²²⁾。FPN1は細胞外へ鉄を輸送する唯一のエクスポーターである。ヘプシジンはFPN1に結合して、エンドサイトーシスによりリソソームへ誘導して分解する。したがって、ヘプシジンの発現が高まるとFPN1のタンパク発現が低下し、細胞外へ鉄を出せなくなる。

6. 生体内における鉄の動態とヘプシジン

前述のように、生命進化の過程において鉄は大変貴重なものであった。このため体内から鉄の能動的な排出機構はなく、鉄のホメオスタシスは入り口、すなわち十二指腸上皮で制御されている。食物中の鉄の腸上皮細胞への取り込みはヘム鉄と非ヘム鉄で経路が異なるが、腸上皮細胞から門脈側へはFPN1を介して輸送される。門脈側に運ばれた鉄はトランスフェリンと結合して肝臓へと運ばれる。肝臓には何らかの鉄のセンサーが存在すると考えられ、Fe-Tfが増加するとヘプシジンを分泌する。ヘプシジンはFPN1の分解を介して、腸管からの鉄の取り込みを抑制すると同時に、マクロファージなど網内系細胞からの鉄の放

出も抑制する。このように、生体内の鉄のホメオスタシスはヘプシジンを中心として制御されているものと考えられる(Fig.3)。

Tfr2はヘプシジンと同様に肝臓に特異的に発現が高い。また、Fe-Tfと結合する能力を有している。また、前述のように、TFR2の遺伝子変異はヒトにおいてもマウスにおいても鉄過剰症を惹起する。これらのことから、われわれはTfr2が肝臓におけるFe-Tfのセンサーであるという仮説を立て、Tfr2変異マウスにおけるヘプシジン発現を調べた。その結果、Tfr2変異マウスでは肝臓のヘプシジン発現が低下しており、このマウスに鉄を過剰投与してもヘプシジンの発現がほとんど増加しなかった(Fig.4)²³⁾。TFR2変異による遺伝性ヘモクロマトーシス患者でも尿中ヘプシジンが減少していた²⁴⁾。

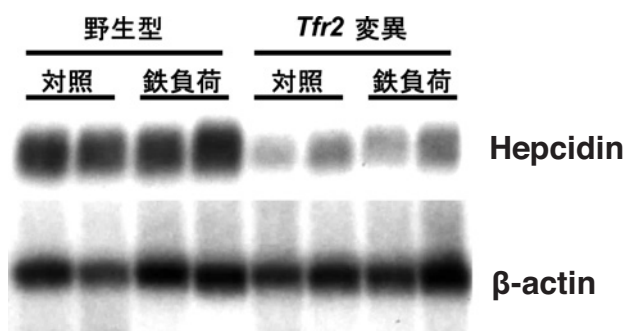


Fig. 4 野生型および *Tfr2* 変異マウスにおけるヘプシジンの発現。腹腔内に生理食塩水あるいはデキストラン鉄を投与したのちに、肝臓における発現をNorthern blotにより解析した。*Tfr2* 変異マウスではヘプシジンの発現は低く、鉄負荷でもほとんど増加しなかった。Kawabata H, et al (2005) Blood 105: 376より改変引用 (© the American Society of Hematology)。

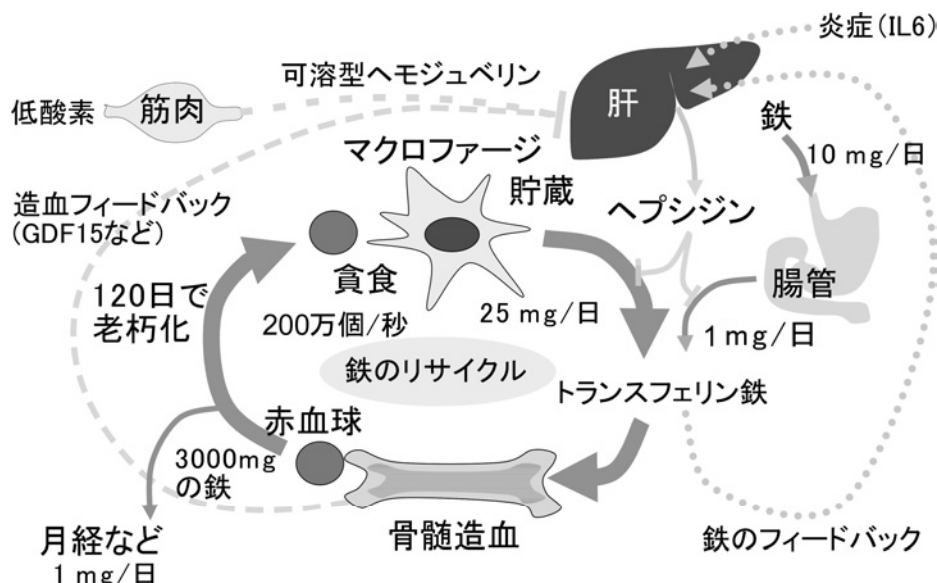


Fig. 3 生体内の鉄の動態。生体内の鉄の約7割は赤血球に存在している。一秒間に200万個の割合で老朽化した赤血球がマクロファージに貪食され、取り出された鉄は再び赤血球造血に再利用されている(鉄のリサイクル・システム)。肝臓から出るヘプシジンは、腸管からの鉄の吸収と網内系マクロファージからの鉄の放出を同時に抑制する。ヘプシジンの発現は炎症性サイトカイン(インターロイキン6, IL6)とトランスフェリン鉄(鉄によるフィードバック)により増加し、低酸素状態と造血刺激(造血フィードバック)により抑制される。

7. 遺伝性ヘモクロマトーシスとヘプシジン

遺伝性ヘモクロマトーシスの責任遺伝子は、これまで述べてきた *HFE*, *TFR2*, *HAMP* (ヘプシジン) のほか, *HJV* (ヘモジュベリン遺伝子, *RGMc/HFE2*) がある²⁵⁾。*HFE* と *TFR2* の変異は比較的軽症のヘモクロマトーシスを引き起こし, *HAMP* と *HJV* の変異は重症の若年型ヘモクロマトーシスを引き起こす。これらの遺伝子変異はいずれも, ヒトにおいてもマウスにおいてもヘプシジンの発現を低下させる。ヘプシジン発現の低下は鉄輸送タンパク *FPN1* の発現を増加させて, 腸管からの鉄の取り込みに抑制がかからなくなり, 鉄過剰症を引き起こす。

8. ヘプシジンの発現制御機構

肝臓におけるヘプシジンの発現は, 鉄と炎症 (おもに *IL6*) により刺激されて増加し, 低酸素状態と造血刺激により抑制される。その機序を順にみていくことにする (Fig. 5)。

マウスを鉄欠乏食で飼育すると肝臓でのヘプシジン発現が低下し, 腹腔内に鉄を注射するとそれが著しく増加する。ヘモクロマトーシスに関連する *HFE*, *Tfr2*, *HJV* はこの鉄のセンサーの経路に関与するものと考えられる。*HFE* は *Tfr2* と細胞膜上で複合体を形成する (Fig. 6)。*HJV* は, 骨形成タンパク (bone morphogenetic protein, *BMP*) 受容体と複合体を形成する。これらの複合体同士も直接あるいは間接的に結びついているものと考えられる。この複合体は, *Fe-Tf* によって刺激を受け, *BMP* 受容体から *SMAD* を介してヘプシジンのプロモーターを刺激する²⁶⁻²⁸⁾。*BMP* は transforming growth factor β (*TGF β*) スーパーファミリーに属する液性因子で, その中でも特に *BMP6* が鉄によるヘプシジン発現刺激に関与している²⁹⁾。

鉄によるヘプシジンの発現制御機構で, 興味深い分子が見つかった。Beutlerらは脱毛と鉄欠乏性貧血を特徴とする

マウスの系統を見だし, そのマウスで *Tmprss6* 遺伝子に変異がみられ, ヘプシジンが高発現していることを2007年の米国血液学会で報告した³⁰⁾。この *Tmprss6* 遺伝子がコードするタンパクはマトリプターゼ2 (*matriptase 2*) と呼ばれ, 肝臓特異的に高発現する細胞膜上のセリン・プロテアーゼである。その後, ヒトでも, 遺伝性の鉄欠乏性貧血の家系でこの遺伝子の異常が報告された^{31,32)}。マトリプターゼ2は, 鉄によるヘプシジンの発現刺激の経路を抑制する分子と考えられる。

炎症によるヘプシジン発現は, *IL6* や *IL1* といった炎症性サイトカインによるものと考えられている。とくに *IL6* のヘプシジン発現誘導能が強い。肝細胞に *IL6* を添加すると, 4時間後にはヘプシジンの mRNA が顕著に増加する。これは *IL6* 受容体から *JAK/STAT* 経路を介して, ヘプシジンのプロモーターの *STAT* 部位を刺激するためである。

一方, ヘプシジンの発現を抑制する刺激としては, 低酸素と貧血 (造血刺激) がある。低酸素状態でヘプシジンの

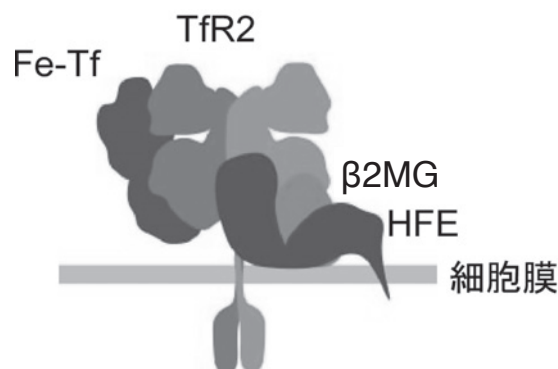


Fig. 6 Tfr2-HFE 複合体の想像図。細胞膜上で Tfr2 は二量体を形成しており, 生理的な pH で鉄飽和トランスフェリン (*Fe-Tf*) と結合し, 酸性条件ではアポ・トランスフェリンと結合する。HFE は $\beta 2$ マイクログロブリン ($\beta 2$ MG) と複合体を形成する。これらの Tfr2 複合体と HFE 複合体は図のように大きな複合体を形成し, 鉄のセンサーの役割を果たしているものと考えられる。

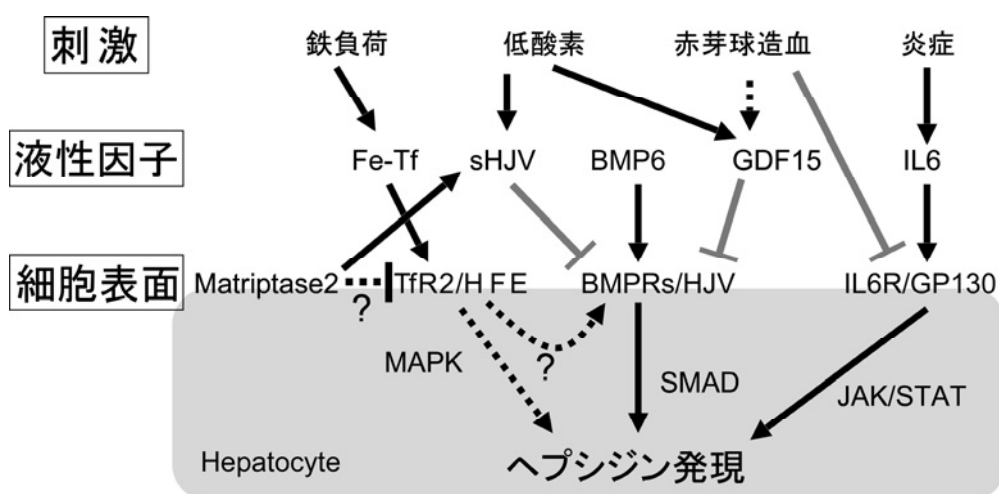


Fig. 5 ヘプシジンの発現制御機構。鉄負荷は, トランスフェリン鉄から Tfr2-HFE 複合体, *BMP* 受容体/ヘモジュベリン (*HJV*) 複合体を介して *SMAD* 経路を刺激し, ヘプシジンの発現を増加させる。低酸素状態は可溶性 *HJV* や *GDF15* を介して, 鉄の経路を抑制しているものと考えられる。赤芽球造血は *GDF15* および未知の因子を介してヘプシジン発現を抑制する。炎症性サイトカインであるインターロイキン6 (*IL6*) は, *JAK/STAT* 経路を介してヘプシジンの発現を増加させる。

発現が低下する機序として、可溶性 HJV の関与が報告されている³³⁾。HJV の発現は肝臓と筋肉で高い。これらの臓器で低酸素状態になると、フリニン (furin) というタンパク分解酵素が誘導され、細胞膜上の HJV が切断されて可溶性となり分泌される (Fig. 2)。可溶性 HJV は、BMP 受容体/膜型 HJV から SMAD を介してヘプシジン発現を誘導する経路を遮断して、ヘプシジンの発現を低下させるという。

造血刺激によるヘプシジン抑制の機序は、まだ十分には解明されていない。一般に、貧血があるとヘプシジンの発現は低下する³⁴⁾。また、エリスロポイエチンや溶血発作、瀉血などで赤血球造血を刺激するとヘプシジンの発現が低下する。生体内の鉄の約 7 割が赤血球内にヘモグロビンとして存在しており、赤血球造血が盛んになると鉄が多く必要になることから、骨髄から何らかの液性因子が出て肝臓でのヘプシジン産生を抑制していると考えると合理的である。そういった液性因子の一つの候補が growth and differentiation factor 15 (GDF15) である³⁵⁾。

9. 無効造血とヘプシジン

骨髄から出るヘプシジン抑制因子として GDF15 が見いだされたのは、 β サラセミアの研究からであった。 β サラセミアは遺伝性のヘモグロビン異常症で、末梢血では貧血がみられ、骨髄は過形成で無効造血となっている。 β サラセミアでは、輸血をしていない場合でも鉄過剰症になることが古くから知られていた。これは消化管からの鉄の吸収が亢進しているためである³⁶⁾。サラセミアのモデル・マウスを用いた研究で、その原因が肝臓でのヘプシジン産生の低下であることがわかった³⁷⁻³⁹⁾。また、サラセミア患者の血清は、肝がん細胞株のヘプシジン産生を抑制した⁴⁰⁾。

Tanno らはサラセミアの無効造血の骨髄から放出されるヘプシジン抑制因子が、TGF β スーパーファミリー関連分子であろうという仮説をたてた。その理由は、同じファミリーに属する BMP がヘプシジン発現を刺激するからである。Tanno らはヒトの造血幹細胞が赤芽球系へ分化する際に発現が増加する TGF β スーパーファミリー関連分子を検索し、GDF15 と TWSG1 の二つを見いだした³⁵⁾。実際に、 β サラセミア患者では血清 GDF15 濃度が異常高値であった。こういった高濃度の GDF15 は、イン・ビトロで肝細胞のヘプシジン産生を抑制した。

その後、 β サラセミア以外でも、先天性赤芽球異形成貧血 I 型や、骨髄異形成症候群の RARS といった無効造血を特徴とする疾患においても血清 GDF15 が異常高値となり、これがヘプシジン産生を抑制して鉄過剰症を引き起こすことが明らかになった^{41,42)}。遺伝性溶血性貧血など他の無効造血を伴う疾患においてもしばしば鉄過剰症がみられるが、これらについても GDF15 あるいは未知の液性因子を介したヘプシジン発現の抑制がその原因になっている可能性がある。

10. 慢性炎症による貧血とヘプシジン

初期のヘプシジンの臨床研究のネックになっていたのは、血清中の濃度が測定できなかったことである。ヘプシジンに対するよい抗体がなく、臨床検体を測定できる ELISA が出来なかった。尿中のヘプシジンは UCLA の Ganz のグループが測定していたが、これはまず尿をカラムで精製して、これを SDS-PAGE で展開し、ウエスタン・ブロットで検出されたバンドの濃さをデンストメトリで定量するといった解析法で、定量的とはいえない手法であった。他の方法としては肝生検の検体中のヘプシジン mRNA を定量するしかなかった。

私は当時、金沢医科大学にいたが、同大学の腎臓内科の友杉直久先生は SELDI-TOF-MS を用いた臨床検体中の小分子の検出をされていた。そこで私は友杉先生にヘプシジンの定量システムの開発を持ちかけた。このプロジェクトは実を結び、血清中のヘプシジンを半定量する系を確立できた (その後、友杉先生は LC-MS/MS を用いた、より定量的なヘプシジン測定システムを開発されている)。このシステムにより、血清および尿中のヘプシジン 25 が測定できるようになった。臨床検体を用いて実際に調べてみると、血清ヘプシジン 25 値は血清フェリチンおよび CRP と強く相関し、透析患者では同じフェリチン値で補正すると血清ヘプシジン 25 値が高いことが分かった⁴³⁾。

慢性炎症をきたす疾患では、高頻度に貧血を合併する。その機序は複合的であるが、鉄代謝異常が大きな原因となっている。炎症性疾患では鉄のリサイクル・システムが滞って、造血系に鉄が供給されないために貧血が起こるのである。鉄のリサイクルが滞る原因と考えられるのがヘプシジンである。ヘプシジンの発現が炎症性サイトカインの IL6 で増加するからである (Fig. 3)。

慢性炎症による貧血をきたす代表的な疾患のひとつにキャッスルマン病がある。この疾患では、リンパ節腫脹、炎症反応、小球性貧血などの症状を呈し、その病態に炎症性サイトカインである IL6 が深く関わっている。実際、抗 IL6 受容体抗体であるトシリツマブが、この疾患の症状緩和に有効であることが示されている⁴⁴⁾。われわれは、トシリツマブ投与前後でのキャッスルマン病患者の血清ヘプシジン値および鉄代謝指標の推移を調べることにした。有効例では、トシリツマブ投与翌日には血清ヘプシジン値が著明に低下し、それに遅れて CRP が正常化し、さらに遅れて血清フェリチンの減少と貧血の改善がみられた⁴⁵⁾。この結果は、キャッスルマン病においては IL6 経路の遮断によりヘプシジンの産生が抑えられて鉄代謝が変化し貧血が改善することと、ヘプシジンの血中半減期が短いことを示している。また、キャッスルマン病以外の炎症性貧血に対しても、IL6 経路の遮断が有効な可能性も示唆している。

11. 造血細胞移植とヘプシジン

ヘプシジンと造血の関係を見る上で、造血細胞移植は格好のモデルを提供する。というのは、移植前の抗がん剤や放射線治療による前処置によって骨髓造血が一旦完全に破壊され、その後移植片の生着によって造血が回復していく過程をみることができるからである。われわれは、京都大学医学部附属病院で造血細胞移植を受けた患者にインフォームド・コンセントをいただいて、通常検査の残血清をもちいて造血細胞移植前後のヘプシジンなどの鉄代謝関連因子を測定した。その結果、造血細胞移植後には造血の指標となる網状赤血球数あるいは可溶性 TfR1 値が低下し、それに呼応して血清ヘプシジンが増加した。造血の回復に伴ってヘプシジン値は減少したが、造血の回復が遅れた症例ではヘプシジンが高値のまま持続した。このように、ヘプシジン値と造血指標は逆相関の関係にあった。これは、CRP や IL6 の影響を除いて多変量解析しても同様であった。この結果は、造血細胞がヘプシジンを抑制する因子を出しているという仮説と合致する。その因子が、サラセミアなどでみられる GDF15 ではないかと考えたが、GDF15 の血清中濃度は移植後の造血抑制期にむしろ増加した。これらの結果は、移植後の回復期にみられるヘプシジン抑制因子が GDF15 ではないことを示している⁴⁶⁾。

われわれはまた、造血細胞移植前のヘプシジン値と移植後の予後についての解析を行っている。移植前のヘプシジン値が 50 ng/mL 以上の場合はそれ以下の場合と比較して有意に移植後早期の細菌感染症の頻度が増加していた。これは、ヘプシジン高値が鉄過剰、造血能低下、潜在的な炎症の 3 つの要素を反映しており、これらの要素のそれぞれが細菌感染のリスクになったものと考えている⁴⁷⁾。

おわりに

鉄は多すぎても少なすぎても様々な疾患につながり、生命を脅かす。生体の鉄代謝制御における分子機構について、ヘプシジンの発現制御を中心に概説してきた。ヘプシジンは炎症と鉄代謝をつなぐ鍵であり、その発見により生体内の鉄のホメオスタシス維持機構や、遺伝性ヘモクロマトーシス、炎症性貧血などの鉄代謝異常症の病態を合理的に説明することができるようになった。この分野は近年大きな進歩があったが、まだ分かっていない部分も多い。臨床的な観点からも、鉄代謝制御機構のさらなる研究の進展が望まれる（なお、本稿は、平成 21 年 6 月 5 日に京都で開催された第 26 回日本微量栄養素学会における発表をもとに書き上げたものである）。

謝 辞

ご紹介した TfR2 に関する研究の多くは Cedars-Sinai Medical Center の Dr. Phillip Koeffler の研究室で行ったも

のであり、*Tfr2* 変異マウスは Saint Luis University の Dr. Robert Fleming に作成していただいた。ヘプシジンの測定に関しては金沢医科大学の友杉直久先生のお力なしには実現し得なかった。ヘプシジン測定を中心とした臨床研究は京都大学血液腫瘍内科の諫田淳也先生、水本智咲先生、一戸辰夫先生、近藤忠一先生、石川隆之先生、内山卓先生のご協力とご支援のもとで行った。この場をお借りして、これらの先生方に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 矢田 浩 (2005) 鉄理論 = 地球と生命の奇跡, 講談社, 東京.
- 2) 内田立身 (2004) 日本人女性の貧血 最近の動向とその成因. 臨床血液 45: 1085-1089.
- 3) Hershko C, Ianculovich M, Souroujon M (2007) A hematologist's view of unexplained iron deficiency anemia in males: impact of *Helicobacter pylori* eradication. *Blood Cells Mol Dis* 38: 45-53.
- 4) Hershko C, Patz J, Ronson A (2007) The anemia of achylia gastrica revisited. *Blood Cells Mol Dis* 39: 178-183.
- 5) Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Jr., Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13: 399-408.
- 6) Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P (2000) The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 25: 14-15.
- 7) Kawabata H, Yang R, Hirama T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP (1999) Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 274: 20826-20832.
- 8) Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP (2000) Transferrin receptor 2- α supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and *in vivo*. *J Biol Chem* 275: 16618-16625.
- 9) Fleming RE, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Koeffler HP, Kawabata H, Britton RS, Bacon BR, Sly WS (2002) Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10653-10658.
- 10) Roetto A, Totaro A, Piperno A, Piga A, Longo F, Garozzo

- G, Cali A, De Gobbi M, Gasparini P, Camaschella C (2001) New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* 97: 2555–2560.
- 11) Le Gac G, Mons F, Jacolot S, Scotet V, Ferec C, Frebouret T (2004) Early onset hereditary hemochromatosis resulting from a novel TFR2 gene nonsense mutation (R105X) in two siblings of north French descent. *Br J Haematol* 125: 674–678.
 - 12) Majore S, Milano F, Binni F, Stuppia L, Cerrone A, Tafuri A, De Bernardo C, Palka G, Grammatico P (2006) Homozygous p.M172K mutation of the TFR2 gene in an Italian family with type 3 hereditary hemochromatosis and early onset iron overload. *Haematologica* 91: 92–93.
 - 13) Hsiao PJ, Tsai KB, Shin SJ, Wang CL, Lee ST, Lee JF, Kuo KK (2007) A novel mutation of transferrin receptor 2 in a Taiwanese woman with type 3 hemochromatosis. *J Hepatol* 47: 303–306
 - 14) Hayashi H, Wakusawa S, Motonishi S, Miyamoto K, Okada H, Inagaki Y, Ikeda T (2006) Genetic background of primary iron overload syndromes in Japan. *Intern Med* 45: 1107–1111.
 - 15) Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K (2000) LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 480: 147–150.
 - 16) Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8780–8785.
 - 17) Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806–7810.
 - 18) Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276: 7811–7819.
 - 19) Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S (2002) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4596–4601.
 - 20) Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC (2002) Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 100: 3776–3781.
 - 21) Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C (2003) Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 33: 21–22.
 - 22) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090–2093.
 - 23) Kawabata H, Fleming RE, Gui D, Moon SY, Saitoh T, O’Kelly J, Umehara Y, Wano Y, Said JW, Koeffler HP (2005) Expression of hepcidin is down-regulated in Tfr2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis. *Blood* 105: 376–381.
 - 24) Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C (2005) Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* 105: 1803–1806.
 - 25) Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radoski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP (2004) Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 36: 77–82.
 - 26) Truksa J, Lee P, Beutler E (2009) Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP, SMAD1, and HJV responsiveness. *Blood* 113: 688–695.
 - 27) Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E (2006) Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10289–10293.
 - 28) Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX (2005) A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2: 399–409.
 - 29) Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP (2009) Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 41: 478–481.
 - 30) Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y, Khovananth K, Mudd S, Mann N, Moresco EM, Beutler E, Beutler B (2008) The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* 320: 1088–1092.
 - 31) Guillem F, Lawson S, Kannengiesser C, Westerman M, Beaumont C, Grandchamp B (2008) Two nonsense mutations in the TMPRSS6 gene in a patient with micro-

- cytic anemia and iron deficiency. *Blood* 112: 2089–2091.
- 32) Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, Mayo MM, Samuel SM, Strouse JJ, Markianos K, Andrews NC, Fleming MD (2008) Mutations in *TMPRSS6* cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 40: 569–571.
 - 33) Silvestri L, Pagani A, Camaschella C (2008) Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 111: 924–931.
 - 34) Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 110: 1037–1044.
 - 35) Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NL, Wang RH, Eling TE, Childs R, Ganz T, Leitman SF, Fucharoen S, Miller JL (2007) High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 13: 1096–1101.
 - 36) Pippard MJ, Callender ST, Warner GT, Weatherall DJ (1979) Iron absorption and loading in β -thalassaemia intermedia. *Lancet* 2: 819–821.
 - 37) Adamsky K, Weizer O, Amariglio N, Breda L, Harmelin A, Rivella S, Rachmilewitz E, Rechavi G (2004) Decreased hepcidin mRNA expression in thalassaemic mice. *Br J Haematol* 124: 123–124.
 - 38) Weizer-Stern O, Adamsky K, Amariglio N, Rachmilewitz E, Breda L, Rivella S, Rechavi G (2006) mRNA expression of iron regulatory genes in β -thalassaemia intermedia and β -thalassaemia major mouse models. *Am J Hematol* 81: 479–483.
 - 39) Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P, Guy E, Breda L, Chadburn A, Liu Y, Amariglio N, Rechavi G, Rachmilewitz EA, Breuer W, Cabantchik ZI, Wrighting DM, Andrews NC, de Sousa M, Giardina PJ, Grady RW, Rivella S (2007) Ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood* 109: 5027–5035.
 - 40) Weizer-Stern O, Adamsky K, Amariglio N, Levin C, Koren A, Breuer W, Rachmilewitz E, Breda L, Rivella S, Cabantchik ZI, Rechavi G (2006) Downregulation of hepcidin and hemojuvelin expression in the hepatocyte cell-line HepG2 induced by thalassaemic sera. *Br J Haematol* 135: 129–138.
 - 41) Tamary H, Shalev H, Perez-Avraham G, Zoldan M, Levi I, Swinkels DW, Tanno T, Miller JL (2008) Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Blood* 112: 5241–5244.
 - 42) Ramirez JM, Schaad O, Durual S, Cossali D, Docquier M, Beris P, Descombes P, Matthes T (2009) Growth differentiation factor 15 production is necessary for normal erythroid differentiation and is increased in refractory anaemia with ring-sideroblasts. *Br J Haematol* 144: 251–262.
 - 43) Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, Ishikawa I (2006) Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood* 108: 1381–1387.
 - 44) Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T (2005) Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood* 106: 2627–2632.
 - 45) Kawabata H, Tomosugi N, Kanda J, Tanaka Y, Yoshizaki K, Uchiyama T (2007) Anti-interleukin 6 receptor antibody tocilizumab reduces the level of serum hepcidin in patients with multicentric Castleman's disease. *Haematologica* 92: 857–858.
 - 46) Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Uchiyama T (2008) Serum hepcidin level and erythropoietic activity after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 93: 1550–1554.
 - 47) Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T (2009) Clinical significance of serum hepcidin levels on early infectious complications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 956–962.