

hepcidin : 血液透析患者における鉄代謝制御因子

友杉直久*¹ 石川 勲*²

*1 金沢医科大学総合医学研究所 先進医療研究部門 プロテオミクス研究分野/腎機能治療学 *2 浅ノ川総合病院腎臓内科

key words : hepcidin, 鉄代謝制御因子, IL-6, 血液透析, 質量分析法

要 旨

hepcidin は肝臓で産生され、血中に分泌され、尿中へ排泄される低分子ペプチドである。hepcidin は腸管からの鉄吸収や、貯蔵鉄を有する網内系細胞からの鉄の放出を ferroportin を介して制御している。hepcidin の発現は鉄負荷や炎症で誘発され、貧血、低酸素状態や erythropoietin 投与で抑制されると考えられているが、これまで血清 hepcidin が測定できなかったため、その臨床的意義は明確にはなっていない。近年、質量解析法を用いた測定法が開発され、臨床的に血清 hepcidin を捉えることが可能になった。血液透析患者では、しばしば hepcidin 高値を呈するが、主な原因は鉄の過剰投与であると考えられる。高 hepcidin 血症では血清鉄の供給が抑制されるため、容易に機能的鉄欠乏状態に陥ることを考慮すると、hepcidin 値に基づく血液透析患者への新たな鉄投与基準が必要になる。

はじめに

近年の鉄代謝制御機構は、transferrin, transferrin receptor, ferritin, iron regulatory protein, divalent metal transporter 1, ferroportin, HFE, hemojuvelin, hepcidin などの分子レベルで理解されるようになってきている¹⁻³⁾。これらの中で、血清蛋白質は trans-

ferrin, ferritin, hepcidin であり、臨床的には鉄結合能や貯蔵鉄の指標として transferrin や ferritin が測定されてきた。

hepcidin は肝臓で産生される一種のペプチドホルモンであり、鉄代謝制御機構の中心的役割を演じていると考えられているが、これまで尿中 hepcidin が研究室レベルで測定されているのみであり、血中の hepcidin は測定することができなかった⁴⁾。今回われわれは、質量解析法を用いて血中 hepcidin の測定系を開発したことにより、臨床への応用も可能となった⁵⁾。そこで本稿では、慢性腎不全患者での hepcidin 発現について、われわれの研究結果を含め、最新の知見を概説する。

1 hepcidin の発見

hepcidin は、まず抗菌ペプチドとしてヒトサンプルから発見された。2000年 Krase ら⁶⁾は血液透析液から抗菌ペプチドを抽出し、これが肝臓で産生されることから liver-expressed antimicrobial peptide 1 (LEAP-1) と命名した。このペプチドは、2001年 Ganz ら⁷⁾が尿中から発見し hepcidin と名付けた抗菌ペプチドと同一のものであった。

一方、2001年 Pigeon ら⁸⁾は、マウスの鉄過剰状態で発現する遺伝子が、ヒト hepcidin 遺伝子 (HAMP) と類似していることを確認し、さらにマウスは二つの

Hepcidin : a regulator of iron metabolism in hemodialysis patients

Proteomics Research Unit, Division of Advanced Medicine, Medical Research Institute, Kanazawa Medical University/Division of Nephrology

Naohisa Tomosugi

Division of Nephrology, Asanogawa General Hospital

Isao Ishikawa

hepcidin 遺伝子 (hepc 1, hepc 2) を持つことを見出した。ちなみにヒトの hepcidin 遺伝子は 1 個である。また、2001 年 Vaulont ら⁹⁾は、転写因子 USF 2 近傍に位置する hepcidin 遺伝子のノックアウトマウスでは肝臓や脾臓に著明な鉄沈着をきたすことを報告した。

このような過程で、鉄制御と炎症の要に位置する hepcidin が発見された。

2 hepcidin の作用：鉄代謝制御作用と抗菌作用

hepcidin の主たる役割は鉄代謝制御である。図 1 のように、鉄には汗、胆汁、尿への排泄や皮膚、腸管上皮の剥離などに伴う 1~2 mg/日程度の喪失以外には、能動的に排泄する経路がないため、鉄の血中への移行は厳密に制御されている^{3, 4)}。

血清鉄が供給される経路は三つある。第一に食物中の鉄が主に十二指腸の絨毛上皮で吸収され、その際 duodenal cytochrome B によって 3 価から 2 価に還元され、divalent metal transporter 1 によって上皮細胞内に取り込まれ、この鉄は膜輸送蛋白 ferroportin

を介して門脈に入る。経口からの吸収は 1~2 mg/日程度である。第二に、門脈に入った鉄は hephaestin により酸化され再び 3 価になり、transferrin と結合し、門脈から transferrin receptor 2 を介して肝細胞に取り込まれ、必要に応じて ferroportin を介して血中に放出される。第三に、老化赤血球を処理した網内系マクロファージが細胞内に鉄を貯蔵し、必要に応じて ferroportin を介して血中に鉄を供給する。

このように、血清中に鉄が放出される時には、いずれの場合にも ferroportin が必要であり、hepcidin はこの機能をコントロールしているのである¹⁰⁾。ferroportin は hepcidin の受容体であり、hepcidin と結合し、これを内部移行させライソゾームで分解する。その際 ferroportin 自体も hepcidin と一緒に分解されるため、ferroportin が膜輸送蛋白として再生されるまでの間は、細胞から鉄を汲み出すことができないことになる¹¹⁾。つまり、hepcidin の発現が上昇すると、膜 ferroportin が減少し、血清鉄の供給が低下するわけである。血清鉄のプールは 3~4 mg ときわめ

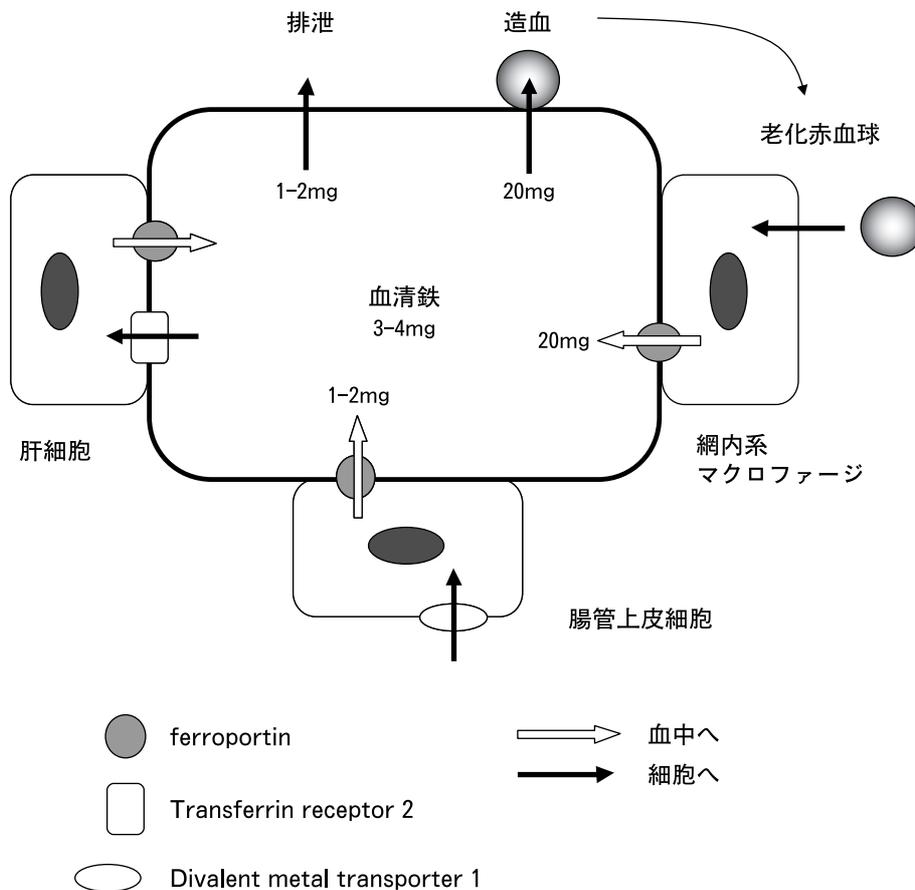


図 1 鉄の代謝

血清鉄のプールは 3~4 mg ときわめて少ない。造血に要する血清鉄は、リサイクルされた網内系からの鉄供給に負うところが大きい。

て少ないため、供給が低下すれば容易に機能的鉄欠乏状態に陥ることになる。

一方、hepcidin は自然免疫システムとして存在する抗菌ペプチドのうちの一つでもある。その作用機序は不明であるが、hepcidin 自体の抗菌作用に加え、鉄を低下させることで抗菌作用を発揮しているものと考えられている。つまり、多くの病原体はその増殖に多量の鉄を要するため、鉄を低下させることは菌の増殖を抑制することを意味する。現在 hepcidin-25 は鉄制御作用と抗菌作用を持ち、また hepcidin-22 は抗菌作用を持ち、一方 hepcidin-20 は hepcidin-25 より抗菌作用が強いが鉄制御作用は持たないものと考えられている^{7, 12)}。

3 hepcidin の発現制御

hepcidin は主に肝臓で発現するが、鉄負荷と炎症性 cytokine による二つの経路により刺激されている¹⁰⁾。鉄負荷状態では hepcidin の産生は亢進するが、この分子機構は不明であり、培養細胞では鉄が負荷されても hepcidin の産生増加はみられない。また炎症時には IL-6 や IL-1 の刺激で hepcidin 産生が亢進することから、慢性炎症性疾患に伴う貧血の原因分子と考えられている¹³⁾。

一方、hepcidin の発現は貧血、酸素、erythropoietin により抑制される^{14, 15)}。貧血や低酸素状態では、erythropoietin の発現が刺激され造血亢進状態になる。これに対応して hepcidin 産生は低下するため、

その ferroportin 抑制作用がみられず、鉄が血清中へ供給されやすくなる。

4 hepcidin の測定

以上のように、主にマウス実験から hepcidin の機能が解析されてきたが、臨床での影響を理解するには血清 hepcidin を測定することが不可欠である。しかし、これまでその測定は不可能であった。

ヒト hepcidin 遺伝子は hepcidin 前駆体である pro-hepcidin の 84 アミノ酸をコードしている¹⁶⁾。活性型 hepcidin-25 は、プロテアーゼで切断された C 末端部の 25 アミノ酸からなり、さらに切断され 22、および 20 アミノ酸の hepcidin-22、hepcidin-20 も存在する。活性型 hepcidin は 8 個のシステインを持ち、4 個の S-S 結合を形成している。このような構造上の特異性のため、活性型 hepcidin には特異抗体の作製がきわめて困難とされている。これまで様々な試みがなされているが、未だに特異抗体は得られていない。

現在市販されている測定キットは prohepcidin 抗体を利用したものであり、活性型 hepcidin を捉えたものではない。そのため、これまでの臨床報告は混乱しているように思われる^{17~20)}。

そこでわれわれは、表面改良型レーザー脱離イオン化法 (surface-enhanced laser desorption/ionization) を利用した質量解析法 ProteinChip System (Ciphergen) を用い、分子量レベルでの血清 hepcidin の検出を試みた⁵⁾。

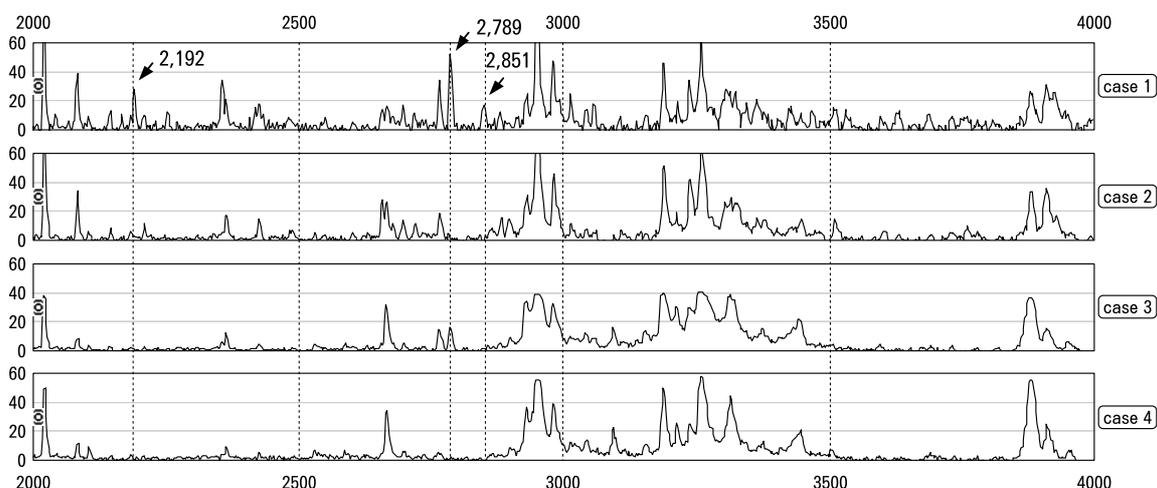


図2 血清ペプチドの2,000 から4,000 m/zのプロファイリング

case 1 と 2 は血液透析患者。case 3 と 4 は腎機能正常者。2,192, 2,789 および 2,851 m/z は case 1 でみられるが、case 2 と 4 ではみられない。case 3 では 2,789 m/z が軽度上昇している。(文献5より)

分子量 1,000 から 15,000 Da のあいだには 114 個のペプチドピークが検出されたが (図 2), それらの発現と Hb, Ht, RBC, ferritin などの造血指標因子と

の相関を調べると, ferritin とのみ強い相関をもつ 3 種のペプチド 2,192, 2,789, 2,851 m/z がみつかった ($r=0.93, 0.83, 0.80$, 図 3 A). Swiss Prot によるデータベース検索では, ペプチド 2,192, 2,789 m/z は hepcidin-20 と hepcidin-25 の分子量と一致していた. 2,789 Da ペプチドを精製し, タンデム質量分析法 (MS/MS) で同定したアミノ酸配列は, hepcidin-25 に一致していた. 合成 hepcidin-25 を用いた ProteinChip System での測定系では, 測定限界は 16 nM であり, 256 nM まではほぼ直線の検量線 (CV 42.7~4.6%) がえられ, 判定量法として臨床応用が可能であった.

鉄代謝における主要分子である活性型 hepcidin-25 の測定が可能になったことで, ヒト疾患での貧血の解析手段が一つ得られたことになる.

5 血液透析患者の hepcidin

血液透析患者は, 腎性貧血に対して erythropoietin や鉄投与で治療されていることが多いが, 血清 hepcidin の動態は不明であった. 質量解析法を用いたわれわれの検討では, 血液透析患者でみられた血清 hepcidin-25 の発現量と血清 ferritin との強い相関は, 正常人においても同様にみられた. しかし, 血液透析患者では hepcidin のクリアランスが低下しているためか, 同じ ferritin 値に対する hepcidin-25 の発現は正常人に比べ高かった (図 3 B).

次に血液透析患者への鉄剤投与の影響を検討した.

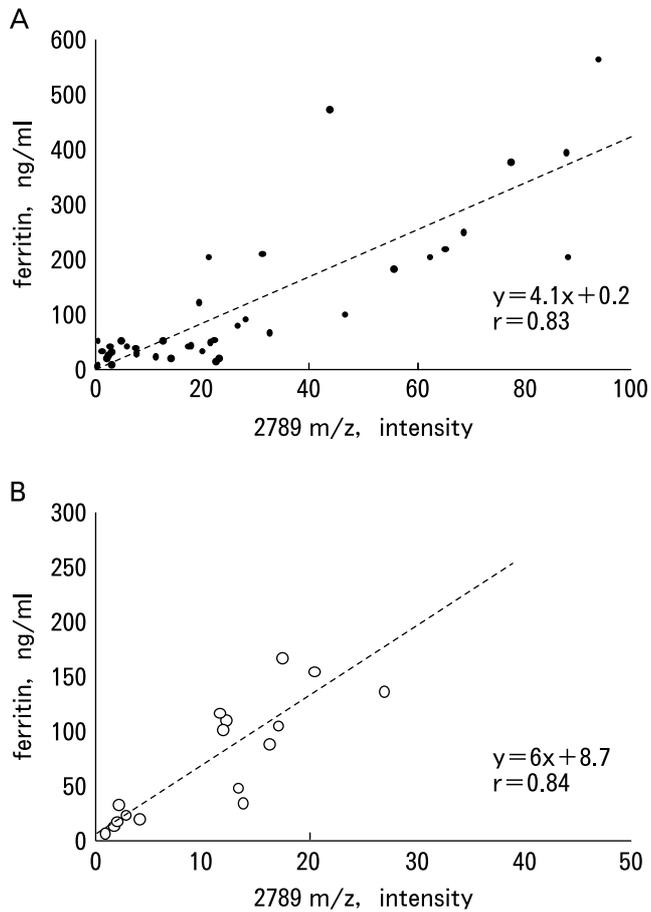


図 3 2,789 m/z ペプチド (血清 hepcidin-25) と ferritin の相関
A: 血液透析患者 (n=40), B: 腎機能正常者 (n=16)

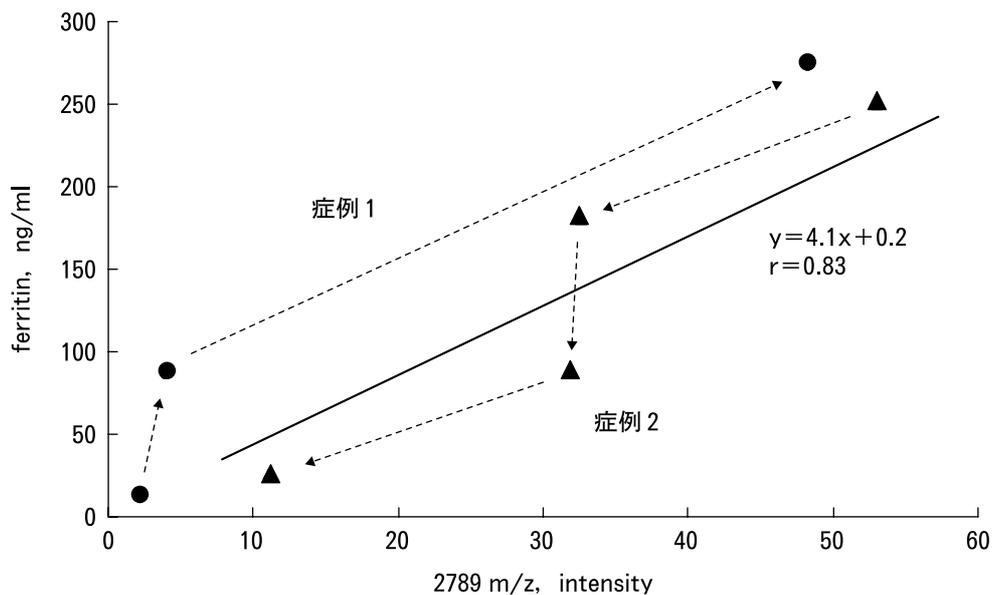


図 4 血液透析患者における血清 hepcidin-25 と ferritin の相関
鉄投与 (症例 1) と出血 (症例 2) による推移は, 図 3 A の回帰直線に絡んでいる.

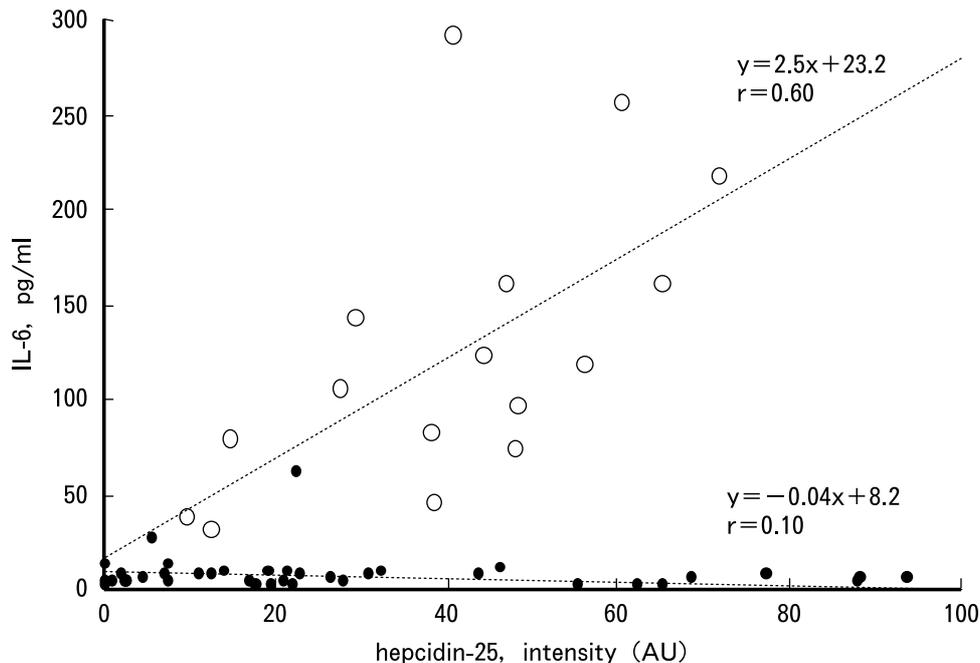


図5 hepcidin-25 と IL-6 の相関

血液透析患者（黒丸）では、SLE以外の症例は血清 IL-6 値は 30 pg/mL 以下であった。感染症患者（白丸、n=16）では、 $r=0.60$ の相関がみられた。（文献5より）

血液透析導入期において強度の貧血を呈した患者に対し、週2回の鉄 40 mg 静脈注射を8週間続けたところ、導入前には血清 hepcidin の発現はみられなかったが、鉄剤投与により ferritin ととも hepcidin の発現は徐々に増加した（図4, 症例1）。一方、生理による出血に伴い ferritin 低下を認めた症例では、hepcidin 発現は徐々に減少した（図4, 症例2）。これらの変動は、図3A で求められた回帰直線に絡むものであった。

血液透析患者は鉄剤を投与されることが多く、それが過剰であれば、ferritin と同時に hepcidin が発現し、一旦 hepcidin が産生されれば、そのクリアランスが低下しているため血中での半減期は延長するものと考えられる。

また血液透析患者では CRP 陽性者が多く見られることから²¹⁾、炎症所見を繰り返すために hepcidin が上昇する可能性も考えられているが、図5のように IL-6 に反応して hepcidin が上昇する感染症例の反応とは異なり、透析患者の hepcidin 上昇には IL-6 の影響は見られなかった。

以上の所見からは、血液透析患者で本質的に hepcidin を上昇させる因子は、不適切な鉄投与であることが多いものと推測される。hepcidin の高値が続けば、腸管からの鉄の吸収と貯蔵鉄からの鉄の供給は抑制されることになる。

おわりに

— hepcidin からの問題提起 —

hepcidin 高値の状態をどうとらえるか、重要なヒントが Riviera ら¹²⁾から報告された。彼らは、合成 hepcidin をマウスに投与すると、血清鉄が1時間以内に低下し、この状態が2日間続き3日目には改善することを確認した。これは、前述したように、hepcidin と結合し、endocytosis の過程でライソゾームで分解された ferroportin が、新たに合成されるまでの期間であり、この間血清への鉄の供給が低下したものと推測される。

ヒトでは、新たな造血に1日 20 mg の鉄を必要としており、これに対し貯蔵鉄からは1日に 20 mg の鉄が血清中に供給されている¹⁰⁾。つまり造血のためには1時間当たり 0.8~1.0 mg の鉄が血清中に供給される必要があり、この供給が低下すれば急速に血清鉄は低下することが推測される。

血液透析患者の場合、hepcidin 高値は主に鉄の経静脈的過剰投与に限られていることを考えると、今後の鉄投与方法を検討する場合には、血清 hepcidin のモニタリングが重要になる。ヒトの場合、血清鉄を低下させ機能的鉄欠乏状態をもたらす血清 hepcidin 濃度は未だ不明だが、今後、血清 hepcidin 値を基準と

して適切な鉄投与量の検討を行いたい。

文 献

- 1) Andrews NC: Molecular control of iron metabolism. *Best Pract Res Clin Haematol*, 18; 159-169, 2005.
- 2) Fleming RE: Advances in understanding the molecular basis for the regulation of dietary iron absorption. *Curr Opin Gastroenterol*, 21; 201-206, 2005.
- 3) 川端 浩, 河南崇典, 友杉直久, 他: Heparin—最近の進歩. *血液・腫瘍科*, 51; 174-182, 2005.
- 4) Ganz T: Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 102; 783-788, 2003.
- 5) Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, et al.: Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System (R). *Blood* Apr, 18; 2006 [Epub ahead of print]
- 6) Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al.: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*, 480(2-3); 147-150, 2000.
- 7) Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al.: Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, 276(11); 7806-7810, 2001.
- 8) Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al.: A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*, 276(11); 7811-7819, 2001.
- 9) Vallet VS, Henrion AA, Bucchini D, et al.: Glucose-dependent liver gene expression in upstream stimulatory factor 2 -/- mice. *J Biol Chem*, 272(35); 21944-21949, 1997.
- 10) Ganz T: Heparin—a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol*, 18(2); 171-182, 2005.
- 11) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al.: Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306(5704); 2090-2093, 2004.
- 12) Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, et al.: Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*, 106(6); 2196-2199, 2005.
- 13) Lee P, Peng H, Gelbart T, et al.: Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(6); 1906-1910, 2005.
- 14) Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al.: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*, 110(7); 1037-1044, 2002.
- 15) Krijt J, Vokurka M, Chang KT, et al.: Expression of Rgmc, the murine ortholog of hemojuvelin gene, is modulated by development and inflammation, but not by iron status or erythropoietin. *Blood*, 104(13); 4308-4310, 2004.
- 16) Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, et al.: The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem*, 277(40); 37597-37603, 2002.
- 17) Taes YE, Wuyts B, Boelaert JR, et al.: Prohepcidin accumulates in renal insufficiency. *Clin Chem Lab Med*, 42(4); 387-389, 2004.
- 18) Hsu SP, Chiang CK, Chien CT, et al.: Plasma pro-hepcidin positively correlates with hematocrit in chronic hemodialysis patients. *Blood Purif*, 24(3); 311-316, 2006.
- 19) Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, et al.: Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*, 53(5); 735-743, 2004.
- 20) Brookes MJ, Sharma NK, Tselepis C, et al.: Serum pro-hepcidin: measuring active hepcidin or a non-functional precursor? *Gut*, 54(1); 169-170, 2005.
- 21) Panichi V, Migliori M, De Pietro S, et al.: C-reactive protein as a marker of chronic inflammation in uremic patients. *Blood Purif*, 18(3); 183-190, 2000.