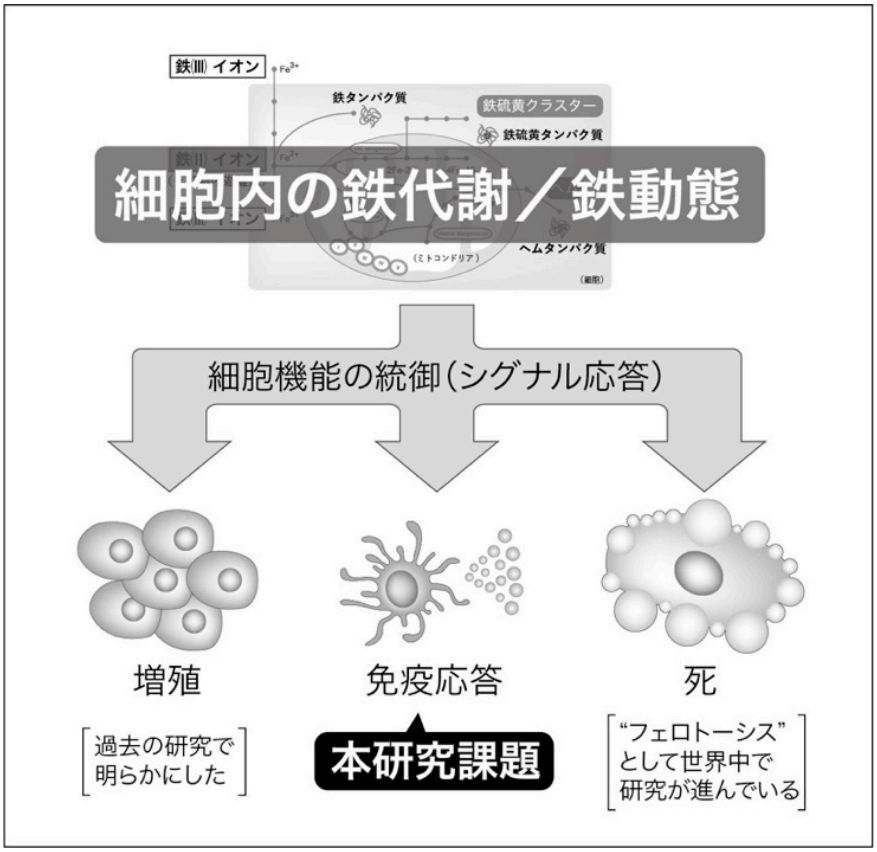
166　鉄による細胞内シグナル制御機構の解明	諸石　寿朗

【目的】鉄は地球上に重量比で最も多く存在する元素であり、生命はその起源から鉄を利用して代謝活動を行ってきた。われわれ哺乳類においても、鉄や鉄補欠分子族（ヘムなど）は呼吸鎖複合体や代謝経路、エピジェネティクスの制御などに関わる酵素の活性に必須である。このように、鉄は電子を容易に授受しやすい化学的性質から酸化還元反応の足場となり、多くの酵素の補因子として働くため、ほとんどの生物にとって広範な生命機能に必須の役割を担う。われわれは過去の研究において、細胞における鉄代謝が細胞内シグナルと連動して細胞機能を制御する可能性を見出した。特に、癌の進展において鉄代謝の変容と免疫応答の変化が示唆された。そこで、本研究では、全身性の鉄代謝制御に重要な役割を担うマクロファージに着目し、近年腫瘍微小環境中で存在が注目されている細菌に対する応答性と細胞内鉄量の関係性を調べることにより、鉄による細胞機能の新たな制御機構の解明を目指した。

【方法】腫瘍微小環境に存在することが知られている細菌（*Fusobacterium nucleatum*）とヒトTHP-1マクロファージを共培養し、細胞内鉄量の増減と遺伝子発現変化の関係をRNAシーケンス法にて調べた。また、細胞内鉄量の変化に伴うシグナル応答の変化について、分子生物学・細胞生物学的手法により検討した。さらに、ヒト大腸癌において*F. nucleatum*感染とマクロファージにおける鉄の蓄積、および患者予後の関係性を調べた。

【結果】マクロファージにおける細胞内鉄量の変化は、NFκBシグナルに影響を及ぼすことにより*F. nucleatum*に対する炎症応答を制御することが分かった。この現象はヒトの大腸癌の進展に関与している可能性があり、生体における鉄とシグナル応答の連関の重要性が示唆された。

本研究のねらい：鉄による炎症・免疫応答の新たな制御機構を解明する



166. 鉄による細胞内シグナル制御機構の解明

諸石　寿朗

熊本大学 大学院生命科学研究部 シグナル・代謝医学講座

Key words：鉄代謝，炎症，がん，シグナル応答

緒　言

鉄は地球上に重量比で最も多く存在する元素であり、生命はその起源から鉄を利用して代謝活動を行ってきた。真核生物や真正細菌、および古細菌の共通祖先と考えられている LUCA（the last universal common ancestor）は、まだ地球上に酸素が存在しない時代に、二酸化炭素、窒素、水素、硫黄、および鉄を利用して嫌気的代謝を行い、その生命を維持していたと考えられている［1］。われわれ哺乳類においても、鉄や鉄補欠分子族（ヘムなど）は呼吸鎖複合体や代謝経路、エピジェネティクスの制御などに関わる酵素の活性に必須である。このように、鉄は電子を容易に授受しやすい化学的性質から酸化還元反応の足場となり、多くの酵素の補因子として働くため、ほとんどの生物にとって広範な生命機能に必須の役割を担う。

細胞は内外の環境変化に即応して細胞機能を制御することで生命活動を維持しているが、これまで、この応答の主体を担うのはタンパク質などの酵素であり、鉄は酵素の役割を補う補助的なものと捉えられてきた。しかし、最近の研究で、鉄自体が細胞死やミトコンドリア機能の制御など様々な様式の細胞機能調節を通して多彩な生命機能を発揮することが示唆されてきている。例えば、これまで鉄による細胞傷害の分子基盤は明確ではなかったが、近年、鉄による脂質の過酸化が惹起する新しい細胞死のコンセプトとしてフェロトーシス（ferroptosis）が報告された［2］。フェロトーシスは、アポトーシスやネクローシスなど他の細胞死と異なり、細胞膜には明らかな異常を認めずミトコンドリアの縮小などを形態的な特徴とする制御性壊死と捉えられており、鉄が誘導する細胞死として現在盛んに研究が行われている。これらの知見は、鉄が細胞死などの細胞機能を能動的に制御することを示唆しているが、その分子機序や生理的・病的意義は未解明である。

細胞内鉄代謝の厳密な管理のためには、細胞内鉄濃度に応じて鉄代謝関連分子の量を迅速に変化させる必要があるが、このメカニズムは長い間不明のままであった。われわれは鉄と直接結合することで細胞内の鉄センサーとして働くユビキチンリガーゼ FBXL5 が、RNA 結合タンパク質 IRP1/2 を鉄濃度に応じて分解することで、生体内における鉄代謝の恒常性が維持されることを明らかにしてきた［3, 4］。FBXL5 を全身で欠損するマウスは細胞内遊離鉄の蓄積により胎生致死となるが、一方で、神経幹細胞における *FBXL5* の欠損は幹細胞の異常増殖を引きおこした［5］。これらの知見から、細胞における鉄代謝は細胞内シグナルと連動して細胞機能を能動的に制御しているのではないかとの着想に至り、実際に鉄代謝が細胞増殖に重要な役割を担うことをこれまでの研究で明らかにした。そこで、本研究課題では、鉄による細胞機能の新たな制御機構として炎症・免疫応答に着目し、細胞内外の環境変化に応じた鉄代謝と免疫シグナルのクロストークを明らかにし、鉄が統御する生命機能の動作原理の一端を解明することを目指して研究を進めた（図 1）。その結果、マクロファージにおける鉄代謝が脱リン酸化酵素の活性制御を介して NFκB シグナルに影響を与え、細菌に対する免疫応答の性質を変化させることが分かった。さらに、この現象はヒトの大腸癌進展に関与している可能性があり、生体における鉄代謝とシグナル応答の連関の重要性が改めて示唆された。

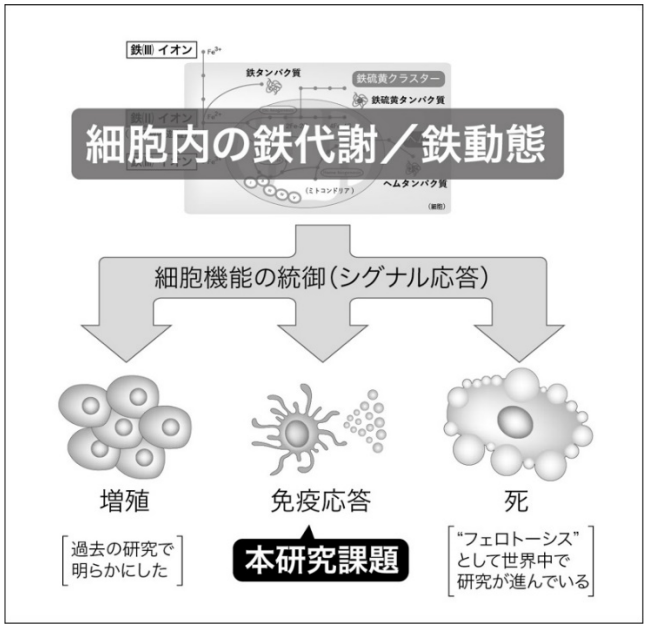


図 1. 研究のねらい

鉄代謝は細胞内シグナルと連動して様々な細胞機能を制御する可能性があり、本研究においては鉄代謝と炎症・免疫応答の関係を調べる。

方　法

1. マクロファージにおける細胞内鉄代謝と炎症応答の連関解明

細菌に対するマクロファージの炎症応答と細胞内鉄代謝の関係を RNA シーケンス法にて調べた。

2. 細胞内鉄代謝による炎症応答制御機構の解明

細胞内鉄代謝が炎症応答に影響を与えるメカニズムを解明するため、リポ多糖（LPS：Lipopolysaccharide）にて THP-1 マクロファージを刺激し、その後のシグナル応答をウエスタンブロッティング、蛍光免疫染色、リアルタイム PCR 法などの手法により調べた。また、その応答に関与すると考えられた分子について、CRISPR-Cas9 法を用いた遺伝子欠損や阻害剤による実験を通してその関連を検証した。

3. ヒト大腸癌における鉄代謝と炎症応答の関連性の検証

ヒト大腸癌における鉄代謝と炎症応答の関連を調べるため、組織鉄染色法を用いて腫瘍微小環境に存在するマクロファージにおける鉄の蓄積と予後の関係を調べた。

結果および考察

1. マクロファージにおける鉄代謝は細菌に対する炎症応答に影響を及ぼす

われわれは最近の研究において肝臓における鉄代謝と肝臓癌進展の関連性を報告しており［6］、肝臓における鉄の過剰が慢性炎症を引き起こすことを明らかにした。そこで、免疫細胞の機能と鉄動態の関連をさらに調べるため、細菌感染に応答したマクロファージの炎症応答と鉄代謝の関係性を詳細に調べることとした。この理由として、① 免疫細胞の一種であるマクロファージは、老廃赤血球を貪食しヘモグロビン中に含まれていた鉄を取り出し再利用することにより、全身の鉄代謝制御において重要な役割を担うこと［7］、および、② 腫瘍微小環境に存在する細菌（特に *Fusobacterium nucleatum*）が炎症応答や癌の予後に関与することが注目されており［8］、マクロファージは細菌感染に応答してサイトカインを産生し炎症応答を誘導すること、の 2 点が挙げられる。

THP-1 マクロファージと *F. nucleatum* を鉄存在下（FAC：ferric ammonium citrate）および鉄非存在下（DFO：deferoxamine）において共培養し、細菌に対するマクロファージの遺伝子発現応答を RNA シーケンス法にて調べた。その結果、鉄過剰状態においては 63 の遺伝子発現が増加し、210 の遺伝子発現が減少することが分かった（図 2A、B）。鉄過剰状態において遺伝子発現が上昇した遺伝子群のジーンオントロジー（GO）解析を行った結果、GO term として“CCR chemokine receptor binding”に属する遺伝子の増加が確認され、CXCL6、CCL8、CCL15 などのサイトカインが鉄過剰状態で特に誘導されることが分かった（図 3A）。これらの結果は、マクロファージにおける鉄代謝が *F. nucleatum* に対するマクロファージのサイトカイン産生に影響を及ぼすことを示唆している。

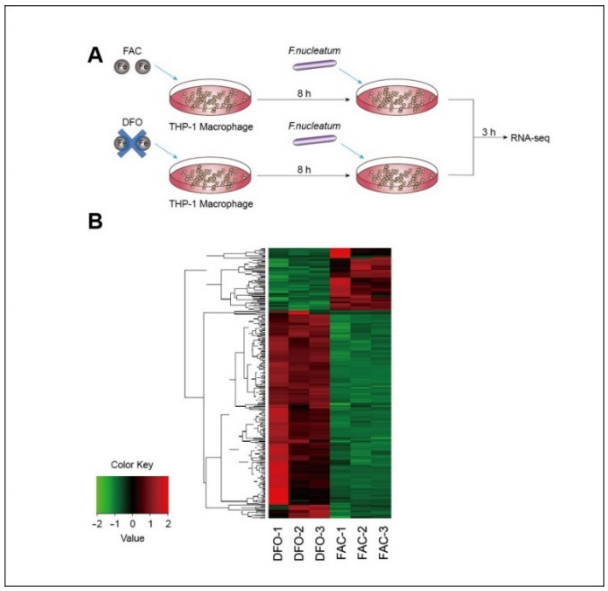


図 2. THP-1 マクロファージと *F. nucleatum* の共培養実験

A） 実験の概要図。

B） マクロファージにおける鉄代謝の状態と遺伝子発現の違いを表すヒートマップ。

2. マクロファージにおける鉄代謝は NF κ B シグナルに影響を与えることでサイトカイン産生に影響を及ぼす

F. nucleatum はグラム陰性菌であるため、表面にあるリポ多糖（LPS：Lipopolysaccharide）を介して TLR4 - NF κ B シグナルを刺激し、マクロファージのサイトカイン産生を刺激すると考えられた。実際に TLR4（LPS を認識する細胞表面の受容体）の阻害剤 TAK-242 によって *F. nucleatum* によるマクロファージのサイトカイン産生は減弱し、LPS 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生は NF κ B 転写因子の構成因子 RELA の遺伝子欠損により抑制された（図 3B）。これらの結果は、*F. nucleatum* は LPS を介した NF κ B シグナルの活性化により、マクロファージにおいて CCL8 などのサイトカイン産生を刺激することを示唆している。

そこで、次に LPS による NF κ B の活性化において細胞内鉄代謝が担う役割を検証した。LPS 刺激により NF κ B は核内へと移行しサイトカイン産生を増強させるが、細胞内鉄量の変化は LPS 刺激による NF κ B の核内移行には影響を及ぼさなかった（図 3C）。一方、NF κ B は LPS によって活性化されると抑制性のリン酸化修飾を受けることで負のフィードバックがかかることが知られており［9］、このリン酸化（S536）レベルを調べたところ、マクロファージ内の鉄量が少ない状況においては抑制性のリン酸化が増強していることが分かった（図 3D）。この理由を調べるため、NF κ B の抑制性リン酸化（S536）をもたらすキナーゼ（IKK）および脱リン酸化酵素（PP2）の関与を調べたところ、キナーゼの活性増強ではなく、脱リン酸化酵素の活性減弱が関与することが示唆された。即ち、これらの結果は、マクロファージ内の鉄が過剰にある条件下では NF κ B の抑制性リン酸化（S536）を取り除く脱リン酸化酵素の活性が増強することにより同リン酸化が低下し、これにより NF κ B の転写活性が維持されることにより、CCL8 などのサイトカイン産生能が増強されることを示唆している。

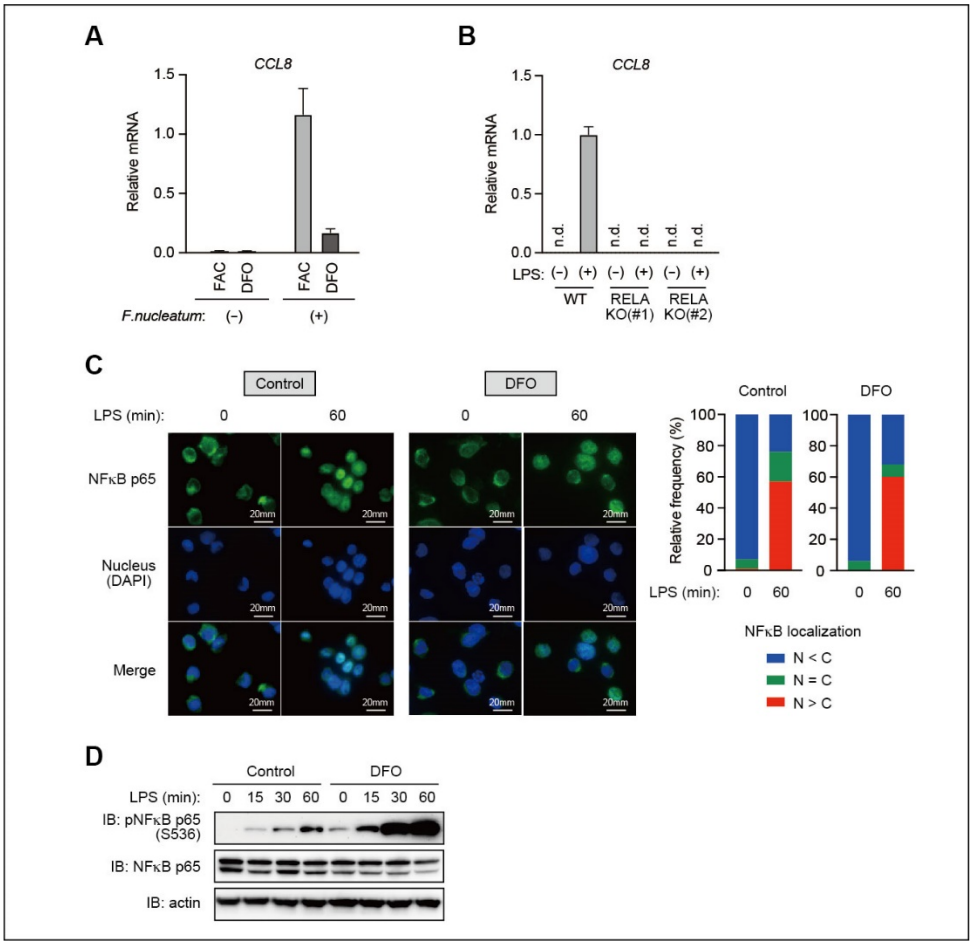


図 3. マクロファージにおける鉄代謝は NF κ B シグナルに影響を与える

A) 細胞内鉄量は *F. nucleatum* による *CCL8* 遺伝子発現誘導に影響を与える。

B) NF κ B の欠損により LPS 刺激による *CCL8* 遺伝子発現誘導が抑制される。

C) 細胞内鉄量は LPS 刺激後の NF κ B 核内移行に影響を与えない。

D) 細胞内鉄量は NF κ B の抑制生リン酸化修飾に影響を与える。

3. マクロファージにおける鉄過剰は *F. nucleatum* 陽性大腸癌の予後不良因子となる

マクロファージにおける細胞内鉄量が *F. nucleatum* に対する応答に影響を及ぼすことが明らかとなったため、ヒト大腸癌において、① 全身の鉄状態（トランスフェリン飽和度）、② 腫瘍微小環境中のマクロファージにおける鉄量、③ *F. nucleatum* 感染の有無、④ 患者予後、の関係性を調べた。その結果、*F. nucleatum* 陽性大腸癌患者においてはトランスフェリン飽和度が高いと予後が悪く、このような患者では腫瘍微小環境中のマクロファージに鉄が蓄積していることが分かった。一方、*F. nucleatum* 陰性大腸癌患者においてはトランスフェリン飽和度の違いによる患者予後の差は認められなかった。これらの結果は、*F. nucleatum* 感染にマクロファージにおける鉄過剰が加わることで大腸癌の予後が増悪する可能性を示唆しており、マクロファージにおける適正な鉄代謝・鉄動態の管理とシグナル応答が大腸癌の進展に重要な役割を担うことを示唆している。

共同研究者・謝辞

研究の共同研究者は、熊本大学大学院生命科学研究部消化器外科学講座の馬場秀夫教授である。本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団ならびに関係の諸先生方に心より深く感謝申し上げます。

文 献

1) Weiss MC, Sousa FL, Mrnjavac N, Neukirchen S, Roettger M, Nelson-Sathi S, et al. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. Nat Microbiol. 2016;1(9):16116. Epub 2016/08/27. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.116. PubMed PMID: 27562259.

2) Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012;149(5):1060-72. Epub 2012/05/29. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042. PubMed PMID: 22632970; PubMed Central PMCID: PMCPMC3367386.

3) Muto Y, Nishiyama M, Nita A, Moroishi T, Nakayama KI. Essential role of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis in maintenance of hematopoietic stem cells. Nat Commun. 2017;8:16114. Epub 2017/07/18. doi: 10.1038/ncomms16114. PubMed PMID: 28714470; PubMed Central PMCID: PMCPMC5520054.

4) Moroishi T, Nishiyama M, Takeda Y, Iwai K, Nakayama KI. The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. Cell Metab. 2011;14(3):339-51. Epub 2011/09/13. doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.011. PubMed PMID: 21907140.

5) Yamauchi T, Nishiyama M, Moroishi T, Kawamura A, Nakayama KI. FBXL5 Inactivation in Mouse Brain Induces Aberrant Proliferation of Neural Stem Progenitor Cells. Mol Cell Biol. 2017;37(8). Epub 2017/01/11. doi: 10.1128/MCB.00470-16. PubMed PMID: 28069738; PubMed Central PMCID: PMCPMC5376637.

6) Muto Y, Moroishi T, Ichihara K, Nishiyama M, Shimizu H, Eguchi H, et al. Disruption of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis promotes liver carcinogenesis. J Exp Med. 2019;216(4):950-65. Epub 2019/03/17. doi: 10.1084/jem.20180900. PubMed PMID: 30877170; PubMed Central PMCID: PMCPMC6446870.

7) Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. Nat Rev Immunol. 2015;15(8):500-10. Epub 2015/07/15. doi: 10.1038/nri3863. PubMed PMID: 26160612; PubMed Central PMCID: PMCPMC4801113.

8) Brennan CA, Garrett WS. Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium. Nat Rev Microbiol. 2019;17(3):156-66. Epub 2018/12/14. doi: 10.1038/s41579-018-0129-6. PubMed PMID: 30546113; PubMed Central PMCID: PMCPMC6589823.

9) Pradere JP, Hernandez C, Koppe C, Friedman RA, Luedde T, Schwabe RF. Negative regulation of NF-kappaB p65 activity by serine 536 phosphorylation. Sci Signal. 2016;9(442):ra85. Epub 2016/08/25. doi: 10.1126/scisignal.aab2820. PubMed PMID: 27555662; PubMed Central PMCID: PMCPMC5327697.