

## 小型ピロプラズマ病貧血機構解析のための牛ヘプシジン測定手法の開発

中村義男<sup>1)</sup>, 金平克史<sup>2)</sup>, 清水眞也<sup>3)</sup>, 広田次郎<sup>3)</sup>

Development of bovine hepcidin assays for analyses on the mechanisms of anemia in theileriosis.

Yoshio NAKAMURA<sup>1)</sup>, Katsushi KANEHIRA<sup>2)</sup>, Shinya SHIMIZU<sup>3)</sup> & Jiro HIROTA<sup>3)</sup>

### 背景

小型ピロプラズマ病は貧血を主徴とする牛の血液原虫病である。その損耗は原虫増殖の程度よりも貧血発症の程度に依存するといわれており、本病における貧血発生機構の解明が、診断法の高度化、原虫の感染・増殖抑制技術の開発とともに防除に向けての重要課題となる。本病発病時には血色素濃度が低下し、血清鉄濃度の上昇と組織におけるヘモジデリン沈着の亢進がみられる。

生体の鉄代謝は閉鎖系で管理されており、出血がなければわずかな量が小腸粘膜細胞を介して吸収・排泄されるだけである。本病における赤血球崩壊は網内系細胞の貪食によって起こり、血管内溶血を起こさないため血色素尿症は発現しない。このため発病時に血色素由来鉄の体外流出はほとんど増加せず、総合的な鉄欠乏には陥らないと推察される。また、少なくともエリスロポエチンが関与する段階の造血応答は阻害されず、急性期を耐過した牛は時間を要するが貧血回復に向かう。我々はこれまでに、発病牛へのデキストラン鉄製剤の連日投与が貧血の軽減と改善に有効であることを見出した。鉄欠乏に陥っていない牛の貧血緩和に鉄の投与が有効であったことから、本病においては造血に必要な量の鉄を効率的に調達できない状況にあるのではないかと、この着想を得た。

近年、ヘプシジンがヒトの貧血研究において注目されている。ヘプシジンは当初抗菌ペプチドとして発見されたが、炎症や微生物感染、腫瘍等の際に主に肝細胞で産

生され、小腸における鉄吸収や各組織の鉄貯蔵細胞であるマクロファージ系細胞からの鉄放出を抑制する作用を有し、多様な疾病において貧血を誘発する因子であることが明らかにされつつある。マクロファージの鉄排出分子フェロポーチンに作用して崩壊させることがその原因機構であることが明らかにされている。

原虫感染にともなう血液酸化が本病における貧血発生機構の一つであることが明らかにされている。我々は以下の仮説を立てた。1) 貧血発生により血色素由来鉄を処理する必要が生じ、ヘプシジン応答が誘導される。また、ヘプシジンの抗微生物活性の側面から、増殖した原虫の刺激によってヘプシジン応答が直接的に誘導される可能性も考えられる。2) ヘプシジンの作用により血色素由来鉄の大部分が貯蔵される方向に強く制御される。3) その結果、造血機能は損なわれていないが貧血の亢進や長期化といった重篤化が起こる。

これまでに牛ヘプシジン活性の測定法は確立されておらず、本病を含めた牛の貧血性疾病におけるヘプシジンの関与については不明である。本稿では、我々が進めている牛ヘプシジン測定手法の開発研究について概要を紹介する。

### 研究の概要

#### 牛ヘプシジン活性測定のための細胞アッセイ法の確立

1) 牛フェロポーチン・GFP融合蛋白発現細胞を用いる蛍光アッセイ法

鉄貯蔵細胞の膜に発現しているフェロポーチンにヘプシジンが作用すると、フェロポーチンが細胞質内に収納されリソソーム内で分解されることが明らかにされている

1) 動物衛生研究所 細菌・寄生虫病研究チーム  
2) 動物衛生研究所 人獣感染症研究チーム  
3) 動物衛生研究所 次世代製剤開発チーム

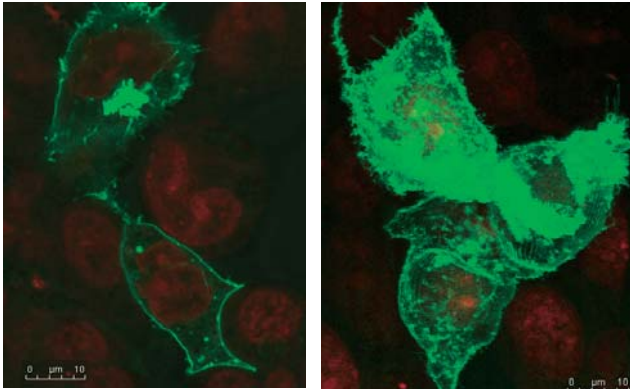


図1. 牛フェロポーチン・GFP融合蛋白発現293T細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像  
黄緑色部分が融合蛋白。左；断面画像，右；連続断面合成画像。

る。そこで、牛フェロポーチン・GFP融合蛋白を発現する293T細胞およびCos7細胞を作成して株化した(図1)。融合蛋白の蛍光の多くが細胞膜の位置に検出された。フォトブリーチング後蛍光復活(FRAP)法による解析の結果、融合蛋白は細胞膜に発現していることが確認された。発現細胞に合成ヒトあるいはマウスヘプシジン感を作ることにより、細胞膜に発現していた融合蛋白が細胞質内に取り込まれることが確認された(図2)。上皮成長因子ペプチドの感作では融合蛋白の内在化はみられなかった。今後、融合蛋白がヘプシジン感作により濃度依存的に内在化・崩壊するか、合成あるいは組換え牛ヘプシジンを用いて検証し、牛ヘプシジン活性測定法として確立していきたい。

## 2) 牛フェロポーチン発現細胞を用いる放射鉄アッセイ法

牛フェロポーチンを単独で発現する293T細胞を作成した。トランスフェリン・<sup>59</sup>Fe結合体を取り込ませた細胞に合成ヒトあるいはマウスヘプシジン感を作ることにより、細胞外に排出される放射鉄が減少することを確認した。今後、排出される放射鉄がヘプシジン感作により濃度依存的に減少するか、合成あるいは組換え牛ヘプシジンを用いて検証する予定である。

## 組換え牛ヘプシジン産生細胞株の作出

ヘプシジンはプロホルモンとして産生された後に切断され、S-S結合を4か所もつ25アミノ酸残基のペプチドが生理活性を示す。活性型牛ヘプシジンのカスタム合成は経費がかかるため、組換え活性型牛ヘプシジンを発現する細胞株の作出を進めているところである。

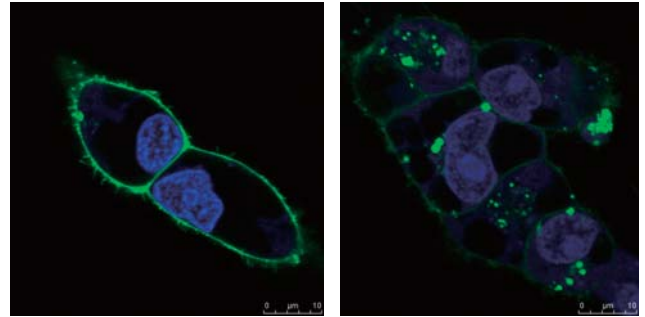


図2. ヘプシジン感作によるフェロポーチンの内在化  
牛フェロポーチン・GFP融合蛋白発現293T細胞に活性型ヒトヘプシジン感を作ることにより、細胞膜に発現していた融合蛋白(黄緑色部分)が細胞質内に取り込まれた(右)。左はヘプシジン非感作対照。

## 牛ヘプシジンに対する単クローン抗体の作出

牛ヘプシジンの推定配列から抗原性が高いと考えられる部位を検討し、15アミノ酸残基のペプチドを合成した。キーホールリンペットヘモシアニン結合ペプチドで3回免疫したマウス脾細胞とミエローマ細胞を融合して、単クローン抗体の作出を進めている。現在までにIgM産生細胞が2株得られたが、ともに反応性が弱いものであった。今後、反応性の強いIgG抗体産生細胞株の作出をめざし、牛ヘプシジン濃度の定量が可能なELISA法の開発に進展させていきたい。

## 小型ピロプラズマ病貧血における鉄貯蔵量の推定

本病貧血における鉄の組織内貯蔵量を推定するために、原虫感染試験牛計13頭のデータを用いて血液中の鉄の増減を計算した。その結果、原虫感染前と貧血極期の血清鉄濃度の差は $0.18 \pm 0.02\text{mg/dl}$ (発病により増加)、血色素濃度の差は $4.75 \pm 0.45\text{g/dl}$ (発病により減少)であった。血色素に含まれる鉄量を血色素重量の0.334%として計算すると、発病により血液中から失われた鉄量は $15.88 \pm 1.52\text{mg/dl}$ で、増加した血清鉄の約88倍の量であった。すなわち、本病貧血における血清鉄の増加分はわずかであり、小腸粘膜細胞とともに排泄される鉄量が若干増えるとしても、血液から大量に消失した鉄の大部分が組織内のマクロファージ等に貯蔵されることが推察された。

## 今後に向けて

ヘプシジンと病態の関連については、ヒトの遺伝性貧血でよく調べられているが、炎症性疾患や慢性感染症、腫瘍等、多くの疾病にみられる貧血にヘプシジン応答が

関与することが明らかにされつつあり、研究の裾野が広がっている。原虫病に関してはマラリア患者のヘプシジン解析が始まったばかりである。我々は小型ピロプラズマ病研究の一環として、牛ヘプシジンの測定手法を確立し、PCR法や質量分析法等の手法とも組み合わせて、本病における貧血応答や鉄代謝動態の解析に役立てていきたい。本病重症例にみられる貧血は、出血がないのに数割の赤血球を失う驚愕的な体の異変である。貧血発生機構の解明が損耗防除技術への発展や、原虫の生存戦略解明につながっていくことを期待したい。

### 謝 辞

本研究は平成21年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施した。

### 参考文献

鉄代謝について：

Smith (1989) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 4th ed. (Kaneko, ed.), 256-273, Academic Press.

ヘプシジンについて：

Ganz (2003) *Blood* 102, 783-788, Ganz & Nemeth (2006) *Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1763, 690-699, 菱川, 岩井 (2005) *日本臨床免疫学会誌* 28, 372-380.

小型ピロプラズマ病貧血について：

中村ほか (2010) *動衛研研究報告* 116, 1-10, 塩野 (2007) *動衛研ニュース* 26, 6-8, 高橋 (1976) *酪農学園大学紀要* 6, 179-248.