

鉄代謝調節ホルモンであるヘプシジンの発現調節

金森 耀平¹⁾, 村上 賢²⁾, 松井 徹¹⁾, 舟場 正幸¹⁾
 (1)京都大学大学院 農学研究科 応用生物科学専攻*, (2)麻布大学 獣医学部 分子生物学**)

Regulatory Expression of Hepcidin, an Iron-Regulatory Hormone

Yohei KANAMORI¹⁾, Masaru MURAKAMI²⁾, Tohru MATSUI¹⁾ and Masayuki FUNABA¹⁾
¹⁾ *Division of Applied Biosciences, Kyoto University Graduate School of Agriculture*
²⁾ *Laboratory of Molecular Biology, Azabu University School of Veterinary Medicine*

Summary

The liver-derived peptide hormone hepcidin is a master regulator of systemic iron homeostasis. Hepcidin binds to an iron exporter ferroportin expressing on the basolateral membrane of enterocytes and induces the internalization and degradation of ferroportin, leading to a decrease in intestinal iron absorption. Various stimuli such as body iron stores, inflammation, erythropoiesis, and hypoxia affect hepcidin expression through the transcriptional regulation. This mini-review summarizes current understandings on the factors affecting hepcidin expression.

1. はじめに

鉄は必須元素であり、酸素運搬タンパク質や酸化還元酵素の補因子として機能する。成人男性の体内鉄 (3~4 g) は、赤血球ヘモグロビン (2~3 g), 血中のトランスフェリン鉄 (2~3 mg), あるいは肝臓や脾臓中の貯蔵鉄 (1 g) としておもに分布している。血中で鉄は、三価鉄2個がトランスフェリンと結合したトランスフェリン鉄として存在し、多くが骨髄で赤血球新生に利用される (20~25 mg/日)。老化した赤血球は脾臓でマクロファージにより貪食され、鉄が取り出され、血中にトランスフェリン鉄として放出され再利用される (20~25 mg/日)。体内からの鉄の損失は、皮膚や小腸の上皮細胞の脱落や出血によって起こり (1~2 mg/日)、これを補うために食事により鉄が補充される必要があるが、この量はヒトでは約8 mg/日とされている。これまで、内因性鉄の調節性排泄機構は知られておらず、摂取鉄の吸収の調節こそが鉄恒常性の維持に重要であると考えられている¹⁾ (Fig. 1A)。

食事で摂取された鉄の吸収は十二指腸で行われる。ヘム鉄やフェリチンの吸収機構については不明な点が多いのに対して、無機鉄の吸収については解明が進んでいる。無機鉄は、まず、腸上皮細胞の刷子縁膜側に発現するフェリレクターゼ DcytB により三価鉄から二価鉄に還元される。その後、細胞表面に発現するインポーターである DMT1 により細胞内に吸収され、側底膜側に発現しているエクス

ポーターのフェロポルチン (FPN) により細胞外に放出されるが、その際、細胞表面のフェロキシダーゼであるヘファスチンにより三価鉄に酸化される。三価鉄はトランスフェリンと結合し、血中を循環する (Fig. 1B)。トランスフェリン鉄の細胞内への取り込みは、トランスフェリン1型受容体 (TfR1) を介して起こる。トランスフェリン鉄が TfR1 に結合すると、トランスフェリン鉄-TfR1 複合体はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。エンドソーム内で、三価鉄から二価鉄に還元された鉄は、エンドソーム表面の DMT1 を介して細胞質に移行する。一方、細胞質から血中へ鉄が放出される場合は、FPN を介して二価鉄が細胞外に汲み出され、フェロキシダーゼであるセルロプラスミンやヘファスチンにより三価鉄に酸化され、トランスフェリン鉄として血中を運搬される^{2,3)} (Fig. 1C)。

ペプチドホルモンのヘプシジンは84個のアミノ酸からなる前駆体として産生され、8つのシステイン残基間で4つの分子内ジスルフィド結合が形成された25アミノ酸からなる成熟型として、分泌される¹⁾。ヘプシジンは元々、抗菌ペプチドとして血漿透析液中から単離された⁴⁾。その後、鉄過剰に伴って肝臓で発現が上昇すること⁵⁾、鉄吸収抑制機能があること⁶⁾が明らかにされた。ヘプシジンは脂肪組織などでも発現しているが、肝実質細胞で高発現しており^{5,7)}、血中ヘプシジン濃度は基本的に肝臓における発現で説明される。ヘプシジンが FPN に結合すると、

*所在地：京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

**所在地：相模原市中央区淵野辺1-17-71 (〒252-5201)

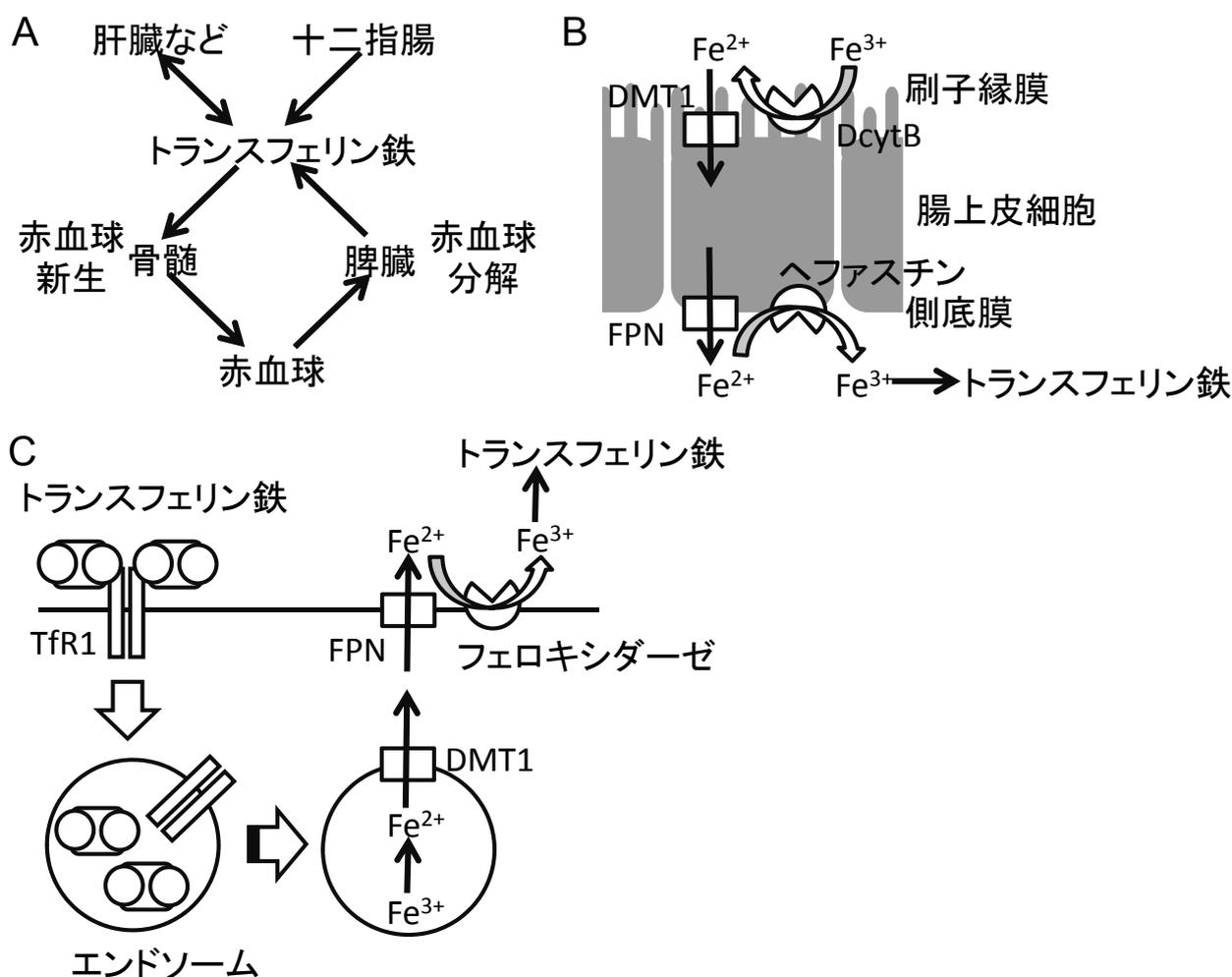


Fig. 1 全身の鉄恒常性とヘプシジン

血中で鉄はトランスフェリン鉄として存在し、骨髄で赤血球新生に利用される。老化した赤血球は脾臓でマクロファージにより貪食され、鉄が取り出され、血中にトランスフェリン鉄として放出され再利用される。皮膚や小腸の上皮細胞の脱落や出血など体内からの鉄の損失を補うために食餌より鉄が補充される (A)。無機鉄は、腸上皮細胞の刷子縁膜にてDcytBにより三価鉄から二価鉄に還元され、DMT1により細胞内に吸収される。一方、側底膜に発現しているFPNにより二価鉄は細胞外に放出されるが、その際、ヘパースチンにより三価鉄に酸化される。三価鉄はトランスフェリンと結合し、血中を循環する (B)。トランスフェリン鉄がTfR1に結合すると、トランスフェリン鉄-TfR1複合体はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。エンドソーム内で、三価鉄から二価鉄に還元された鉄は、エンドソーム表面のDMT1を介して細胞質に移行する。細胞質から血中へ鉄が放出される場合は、FPNを介して二価鉄が細胞外に汲み出され、フェロキシダーゼにより三価鉄に酸化され、トランスフェリン鉄として血中を運搬される (C)。

FPNの細胞質側のチロシン残基がJAK2によりリン酸化され、FPNのエンドサイトーシスが起る。細胞内移行したFPNは脱リン酸化、ユビキチン化を受けて、リソソームで分解される⁸⁻¹⁰⁾。

肝臓における鉄の過剰蓄積によりヘプシジン発現が増加すると、小腸上皮細胞側底膜のFPNが減少して、結果として食事由来の鉄の吸収が減少する。通常、細胞内に取り込まれ生じた余剰な二価鉄はフェリチンと結合して安定化する。鉄過剰が進むと、このフェリチン結合鉄が変性したヘモシデリンの蓄積(ヘモシデロシス)が起こるが、このとき、鉄は遊離態ではなく、ヘモシデリンとして結合態を維持している。一方、先天性あるいは後天性の理由でヘプシジン発現不全が生じると鉄吸収が亢進し、体内で鉄が過剰に蓄積している状態であるヘモクロマトーシスが起こる。鉄過剰のため血中のトランスフェリンが鉄で飽和する

と、非トランスフェリン結合鉄が増加し、肝臓などに取り込まれ、フェリチンの結合能を上回る大量の二価鉄が生じる¹¹⁾。遊離二価鉄はフェントン反応により活性酸素種を産生し、脂質膜、タンパク質、DNAなどの細胞構成成分を酸化して、細胞障害を引き起こし、肝臓がんなどの発症の原因になる¹²⁾。したがって、肝臓における適切なヘプシジン発現は健康を維持する上で重要である。

ヘプシジン発現を制御する生理的要因は体内貯蔵鉄量に限らない。感染症、慢性疾患、腫瘍性疾患など急性あるいは慢性的の炎症でも、ヘプシジンの発現は亢進し、その結果、赤血球新生に利用できる血中鉄量が減少するため、炎症性貧血が生じる。一方、赤血球新生が亢進するとヘプシジンの発現は抑制される。ヘプシジン発現を調節する因子は多数知られているものの、これらの作用は基本的に、貯蔵鉄系、炎症系、あるいは赤血球新生系という3大調節系のい

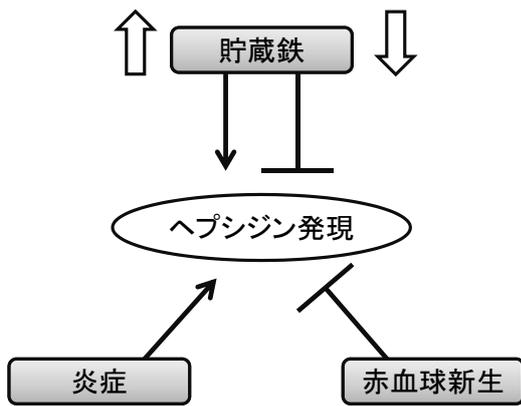


Fig. 2 ヘプシジン転写を制御する3大調節系
ヘプシジンの発現を調節する因子は多数知られているが、基本的に、貯蔵鉄系、炎症系、あるいは赤血球新生系という3大調節系のいずれかの変化を介した転写レベルでの調節である。

いずれかの変化を介した転写レベルでの調節である²⁾ (Fig. 2)。この3大調節系にはそれぞれ独立のシグナル伝達経路が存在する。このうち、エリスロポエチンを介した赤血球新生系によるヘプシジン発現調節については最近の総説がある^{13, 14)}。本ミニレビューでは、IL-6/STAT3経路を介した炎症系とBMP6/Smad経路を介した貯蔵鉄系によるヘプシジン発現調節機構について概説する。

2. 炎症性貧血とIL-6/STAT3経路

内毒素であるリポ多糖 (LPS) を投与し炎症を誘発したマウスの肝臓において、ヘプシジンの発現が亢進する⁵⁾ことが明らかにされたことを端緒にして、炎症性貧血とヘ

プシジンの関係に関する研究が幕を開けた。起炎症物質 turpentine を用いた炎症誘発モデルマウスの肝臓ではヘプシジンの発現が亢進し、血清鉄濃度が減少するが、ヘプシジン発現不全マウスでは turpentine による血清鉄濃度の低下が起こらないことから、炎症時の貧血へのヘプシジンの関与が明らかにされた¹⁵⁾。Nemeth ら¹⁶⁾ は、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -6 にヘプシジン発現誘導活性があることを *in vitro* で示した。さらに、IL-6 ノックアウト (KO) マウスでは turpentine により炎症を誘発しても、ヘプシジンの発現亢進ならびに血清鉄の低下が起こらないことから、炎症によるヘプシジン発現亢進は IL-6 を介して起こることが明らかにされた¹⁷⁾。一方、Lee ら¹⁸⁾ は野生型マウスと IL-6-KO マウスに IL-6 同様に炎症性サイトカインである IL-1 α や IL-1 β を腹腔内投与するとヘプシジン発現が誘導されることから、IL-1 にもヘプシジンの発現を誘導する活性があることを示している。

IL-6 は IL6R α (gp80) と gp130 を受容体として情報を細胞内に伝達する。IL-6 が細胞表面の IL6R α に結合すると、2分子の gp130 が IL-6/IL6R α 複合体と結合する。これにより、細胞内の JAK が活性化して、gp130 のチロシン残基をリン酸化する。リン酸化チロシンには STAT1 や STAT3 が結合し、JAK はさらに STAT のチロシン残基をもリン酸化し、リン酸化された STAT は STAT 間でホモあるいはヘテロダイマーを形成し、核移行後、標的遺伝子発現を調節する¹⁹⁾ (Fig. 3A)。IL-6 の腹腔内投与により、マウスの肝臓では STAT1 のリン酸化は誘導されず STAT3 のみがリン酸化される²⁰⁾。肝臓特異的 gp130-KO マウス、gp130 の STAT 結合部位が欠損した gp130 Δ STAT

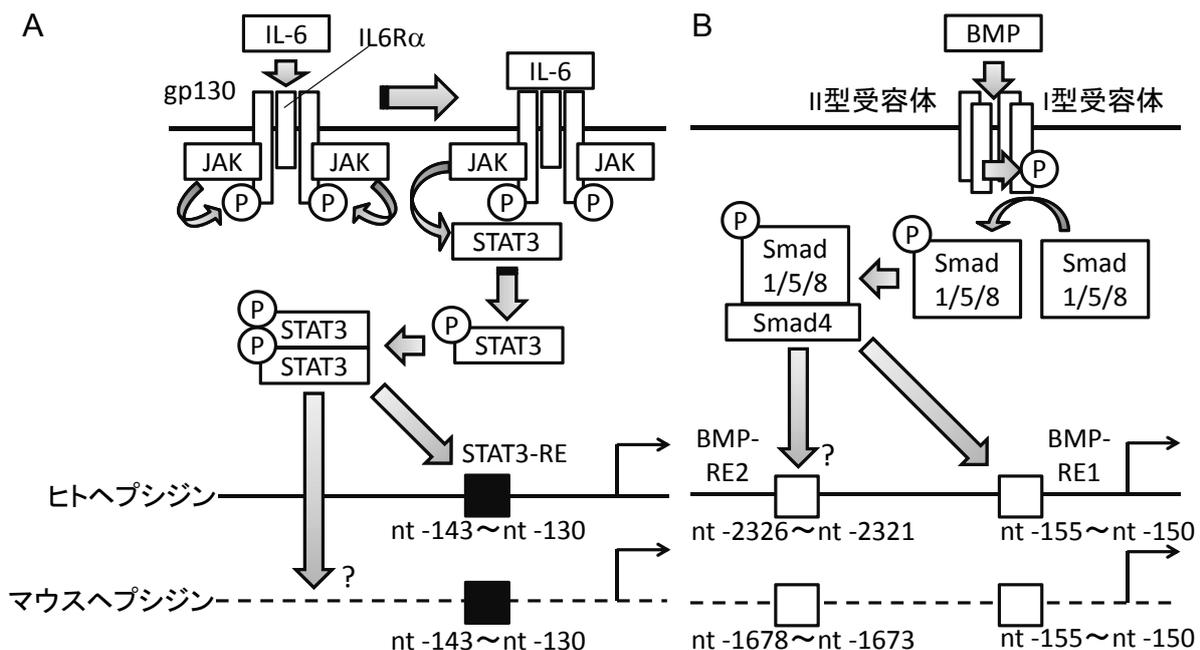


Fig. 3 ヘプシジン発現を調節する2大シグナル伝達経路
炎症時には、IL-6 が STAT3 をリン酸化・活性化してヘプシジン転写を亢進する (A)。BMP は Smad1/5/8 をリン酸化・活性化してヘプシジン転写を亢進する。特に、鉄過剰時には BMP6 の発現量が上昇しヘプシジン発現を誘導する (B)。

を発現するマウス、あるいは、肝臓以外の臓器では野生型 gp130 を発現し肝臓でのみ gp130^{ΔSTAT} を発現するマウスに対して、IL-6 を腹腔内投与したところ、いずれのマウスでも肝臓におけるヘプシジン発現上昇が起こらない²⁰⁾。また、継代肝細胞 HepG2 細胞では IL-6 によりヘプシジン転写は促進されるが、STAT3 遺伝子をノックダウンすると IL-6 処理でもヘプシジン転写活性化は起こらない²¹⁾。したがって、IL-6 を介したヘプシジン発現の誘導には gp130 を介した STAT3 の活性化が重要であると理解されている^{20, 21)}。

活性化された STAT3 がヘプシジン転写を引き起こす機構についても研究は進められている。ヒトヘプシジンプロモーターの翻訳開始点より上流 143 ~ 130 bp (nt -143 ~ nt -130) は、STAT の結合が予測される配列であり、nt -143 ~ nt -141 を変異させたレポーター遺伝子では IL-6 刺激ならびに恒常活性化型 STAT3 の遺伝子導入に対する応答性が低下する²¹⁾。また、HepG2 細胞では、IL-6 刺激に応じてヘプシジンプロモーターの nt -143 ~ nt -130 近傍領域に結合する STAT3 の量が増加することがクロマチン免疫沈降法により示されている²¹⁾。これらの結果から nt -143 ~ nt -130 は STAT3 応答領域 (STAT3-RE) であるとされている。STAT3-RE と同一の配列はマウスヘプシジン遺伝子の nt -143 ~ nt -130 にも存在する。Truksa ら²²⁾ は、マウスヘプシジン遺伝子の nt -134 を変異させても、IL-6 に対する応答性が変化しないことを示し、ヒトヘプシジンプロモーターとは異なりマウスヘプシジンプロモーターの場合 IL-6 応答に STAT3-RE は関与していないと結論付けている。しかしながら、この試験ではヒトで STAT3 応答性を低下させた変異 (nt -143 ~ nt -141 の変異) とは異なる配列を変異させたレポーター遺伝子を用いているため、厳密には STAT3-RE (nt -143 ~ nt -130) 全体が IL-6 応答に関与しないということを証明したとは言えない。その一方で、Truksa ら²³⁾ は、また、マウスヘプシジンプロモーターの 5' 欠損レポーターを利用して、STAT3-RE を部分的に欠損した上流 140 bp のレポーター遺伝子でも IL-6 応答性は消失しないことも明らかにしている。マウスヘプシジンプロモーターの STAT3-RE について変異型レポーターを用いた試験は、著者らの知る限り、Truksa らの報告以外になく、マウスヘプシジンプロモーターの STAT3-RE の意義についてはいまだ不明である。

IL-6 以外にも、oncostatin M, IFN- α , leptin などにも STAT3 を介したヘプシジン発現亢進作用があるとされているものの詳細な解析はなされていない²⁴⁻²⁶⁾。

3. 鉄過剰と BMP6/Smad 経路

3-1. BMP/Smad 経路によるヘプシジン転写

Bone morphogenetic protein (BMP) は TGF- β スーパーファミリーに属する分泌性タンパク質である。TGF-

β ファミリーは TGF- β 群、アクチビン群、BMP 群に大別される。BMP のシグナル伝達は、固有の I 型および II 型受容体と BMP が複合体を形成することに端を発する。I 型受容体ならびに II 型受容体はともに細胞内にセリン/スレオニンキナーゼ領域を有しており、リガンドの結合に伴って II 型受容体セリン/スレオニンキナーゼが I 型受容体をリン酸化し I 型受容体キナーゼを活性化する。I 型受容体は細胞質で Smad1, Smad5, Smad8 (BR-Smad) をリン酸化し、リン酸化 BR-Smad は Smad4 と複合体を形成した後、核内に移行し、標的遺伝子の発現を調節する (Fig. 3B)。一方、TGF- β やアクチビンは固有の I 型および II 型受容体を介して Smad2 および Smad3 (AR-Smad) をリン酸化する。リン酸化 AR-Smad/Smad4 複合体は核内にて標的遺伝子の発現を調節する²⁷⁾。

Wang ら²⁸⁾ は TGF- β /アクチビンならびに BMP 経路の共通のシグナルメディエーターである Smad4 を肝臓特異的にノックアウトしたマウスにおいてヘプシジン発現が減少することを見出した。また、野生型マウスから樹立した継代肝細胞を用いた試験では TGF- β や BMP によりヘプシジン発現が上昇するが、Smad4-KO マウス由来の継代肝細胞では発現上昇が誘導されない²⁸⁾。その後、TGF- β やアクチビンのヘプシジン誘導能に関しては供試する細胞によって異なり、基本的に BMP に比べると誘導能は弱いものに対して^{29, 30)}、BMP は強力なヘプシジン発現誘導因子であることが多くの報告で示されるようになり²⁹⁻³⁴⁾、現在では、BMP/Smad 経路が主要なヘプシジン転写調節経路と考えられている。

Wang ら²⁸⁾ は野生型マウス由来の継代肝細胞を用いた試験で、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド存在下でも BMP によりヘプシジンの発現が誘導されることを認めた。この結果から、彼らは BMP によるヘプシジン遺伝子発現の誘導に新規タンパク質合成は関与していないと結論付けている。しかしながら、この実験では、シクロヘキシミド処理を行った細胞に対して、BMP 刺激を行った経時変化を観察したに過ぎず、シクロヘキシミド不在下での BMP 応答性との比較はなされていないので、BMP 誘導性ヘプシジン発現がシクロヘキシミド不感受性であるかどうかは不明である。Babitt ら³¹⁾ は HepG2 細胞を用いて、BMP によるヘプシジン発現の誘導はシクロヘキシミドの影響を受けないことを示している。しかしながら、マウスやラットの肝臓あるいは初代肝細胞では比較的高いヘプシジン発現が検出できる一方、HepG2 細胞では定量 PCR の検出下限付近の低い発現量であり、ヘプシジン mRNA の解析に HepG2 細胞は適さない³⁵⁾ (Fig. 4A)。著者らは、ラット初代肝細胞において、シクロヘキシミド存在下でヘプシジンの BMP 応答性が部分的に低下するという Babitt らとは異なった結果を得ている³⁵⁾ (Fig. 4B)。また、ラット初代肝細胞では、BMP によるヘプシジン発現の亢進が BMP 刺激開始後 12 時間でピークに達するという結果も著者らは得ており、BMP によるヘプシジン発現の誘導は

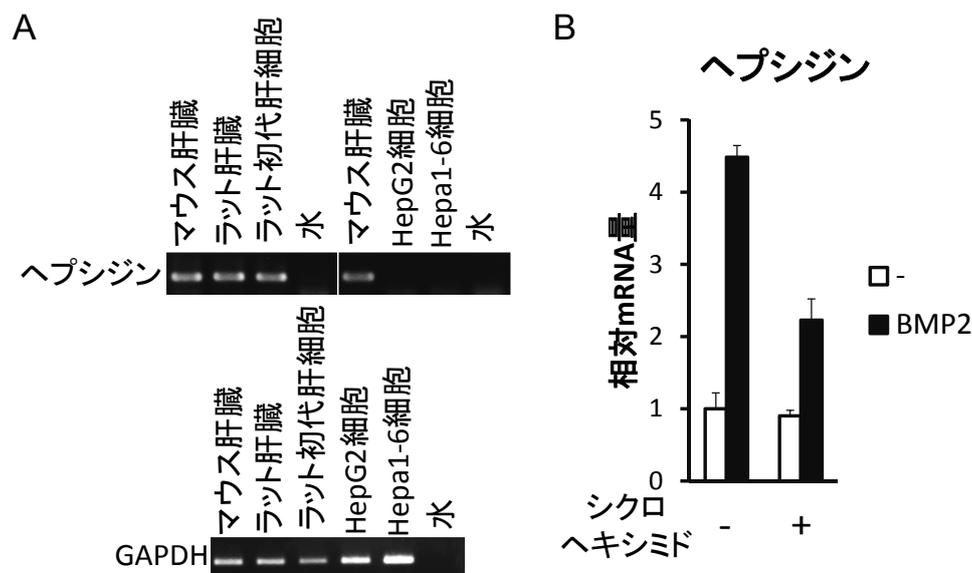


Fig. 4 肝臓・培養肝細胞におけるヘプシジン発現，ならびに BMP によるヘプシジン遺伝子発現と新規タンパク質合成
 マウスならびにラット肝臓，ラット初代肝細胞，HepG2 細胞，及び Hepa1-6 細胞から RNA を抽出し，RT-PCR 法によりヘプシジン遺伝子発現を検出した (A)。ラット初代肝細胞をシクロヘキシミド存在下もしくは非存在下で BMP2 処理を行った。RNA を抽出し定量 RT-PCR 法によりヘプシジン発現を測定した (B)。

直接的な転写レベルの調節だけでなく，BMP により発現が誘導される因子の関与を想定している。

代表的な BMP 応答遺伝子に Id1 がある。Id1 のプロモーター領域では，BR-Smad 複合体がパリンドローム配列 GGCGCC に結合する³⁶⁾。Casanovas らはヒトヘプシジンプロモーターの翻訳開始点より上流 155 ~ 150 bp, 2326 ~ 2321 bp, 2372 ~ 2367 bp の 3 か所に，GGCGCC 配列を見出し，それぞれ BMP-RE1, BMP-RE2, BMP-RE3 と命名した。このうち，BMP-RE1, BMP-RE2 のいずれかを変異させたプロモーターを用いてレポーターアッセイを行うと，BMP 応答性が低下し，両方を変異させると BMP 応答性が完全に消失したことから，BMP によるヘプシジン遺伝子転写には，BMP-RE1 ならびに BMP-RE2 への BR-Smad の結合が関与していると考えられている³⁷⁾。一方，BMP-RE3 を変異させても BMP 応答に変化は生じないことから，BMP-RE3 は BMP によるヘプシジン転写亢進には関与しない³⁷⁾。マウスヘプシジンプロモーターに関しては，Truksa らが，5' 欠損レポーター遺伝子を用いた試験により，BMP 応答に重要な領域が nt -200 ~ nt -140 と nt -1800 ~ nt -1600 の 2 か所存在することを示した²³⁾。この 2 領域にはそれぞれ GGCGCC 配列が存在し (nt -155 ~ nt -150 と nt -1678 ~ nt -1673)，ヒトヘプシジンプロモーターの BMP-RE1, BMP-RE2 に相当すると考えられている。BMP-RE1, BMP-RE2 に相当する配列はラット，ウシ，イヌ，ネコのプロモーターにも存在するが，その機能は確認されていない。別の BMP 標的遺伝子のプロモーターでは，GGCGCC 配列以外の BMP 応答配列が同定されている^{38, 39)} ことを考えると，ヘプシジン遺伝子上流の BMP-RE1, BMP-RE2 だけが BMP 応答領域と考えるのは早計であろう。

BMP 処理した HepG2 細胞の核抽出物と，野生型ならびに変異型 BMP-RE1 領域を含むプローブを用いた EMSA の結果，BMP-RE1 には BMP 刺激に応じて BR-Smad ならびに Smad4 が結合することが明らかにされている⁴⁰⁾。マウスの肝臓を用いたクロマチン免疫沈降法により BMP-RE1 あるいは BMP-RE2 の近傍領域に BR-Smad である Smad1 が結合することが示されているが⁴¹⁾，BMP 刺激に伴う Smad タンパク質の BMP-RE2 への結合量変化に関する報告はない。さらに，BMP-RE1 と BMP-RE2 の機能的差異についても不明であり，今後検討する必要がある。

BMP/Smad 経路によるヘプシジン遺伝子発現調節の生理的意義は，Kautz ら⁴²⁾ により明らかにされた。鉄含量の高い飼料を給餌したマウスで発現する遺伝子群を網羅的に解析したところ，ヘプシジン以外に BMP6, Id1, Smad7, Atoh8 の発現上昇が見出された⁴²⁾。Id1, Smad7, Atoh8 は BMP 応答遺伝子として知られている³⁴⁾。したがって，この結果は鉄負荷により肝臓で BMP/Smad 経路が活性化していることを示唆している。ヘプシジン発現と同様，BMP6 発現と体内鉄量は正の相関を示すこと⁴²⁾，肝臓でのリン酸化 Smad1/5/8 量は鉄過剰により亢進すること⁴²⁾，BMP6-KO マウスでは，肝臓におけるヘプシジンの発現が低くなることから^{43, 44)}，体内鉄量を感じしヘプシジン発現を制御する因子は BMP6 であると考えられている⁴²⁻⁴⁴⁾。肝臓には，肝実質細胞以外に，非実質細胞 (クッパー細胞，類洞内皮細胞，星細胞) が存在するが，鉄過剰に反応して BMP6 発現が上昇する細胞は，実質細胞ではなく非実質細胞であると報告されている⁴⁵⁾。鉄による肝臓での BMP6 の発現制御に関しては今後の課題である。

3-2. BMP 共受容体としての hemojuvelin

ヘモクロマトーシスの原因遺伝子のひとつ hemojuvelin (HJV) は、RGM ファミリーに属する GPI アンカー型の膜タンパク質であり RGMc とも呼ばれる^{46,47)}。HJV の発現は肝臓、筋肉、心臓などに限られている⁴⁸⁾。HJV-KO マウスはヘプシジンの発現が低く、血清や肝臓中鉄濃度が高く、典型的なヘモクロマトーシスの症状を示す^{49,50)}。HJV は BMP によるヘプシジンの発現の誘導を増幅する³¹⁾。また、HJV は BMP と結合すること³¹⁾、HJV は BMP I 型受容体の ALK2, ALK3 または ALK6, BMP II 型受容体の BMPRII と ActRIIA を介した BMP シグナルを増幅することが明らかにされており⁵¹⁾、HJV は BMP の共受容体として働くと考えられている⁵¹⁾。

HJV の可溶性 Fc キメラタンパク質 (HJV-Fc) を継代肝細胞 Hep3B 細胞の培地中に添加すると、BMP 存在下、非存在下でともにヘプシジン mRNA レベルが低下し²⁹⁾、マウスの血管内に HJV-Fc を投与すると、肝臓のリン酸化 Smad1/5/8 量ならびにヘプシジン遺伝子発現量がともに低下する²⁹⁾。実際、HJV には細胞膜の外側に係留された GPI アンカー型以外に、GPI アンカー型が PI-PLC あるいはプロテアーゼにより切断されて生じる分泌型の存在が知られている⁵²⁾。プロテアーゼ分泌型 HJV には furin によって切り出されるものと matryptase-2 (MT-2) により切り出される 2 種類が存在する⁵³⁾。分泌型 HJV のうち furin 切断型は BMP6 と結合できる一方、MT-2 切断型は BMP6 と結合できない⁵³⁾。また、furin 切断型 HJV は BMP6 誘導性ヘプシジン発現を抑制するが、MT-2 切断型では抑制されない⁵³⁾。これらの結果は、furin による HJV 切断タンパク質は BMP の中和タンパク質として機能する可能性を示している。一方、培養肝細胞を用いた試験において、MT-2 の過剰発現は BMP によるヘプシジン発現上昇を抑制するとともに⁵⁴⁾、HJV 誘導性のヘプシジン転写を抑制することから^{54,55)}、MT-2 による HJV の切断は、細胞表面で BMP 共受容体として機能する HJV を減少させることで BMP/Smad シグナルを負に調節すると考えられている。さらに MT-2-KO マウスではヘプシジンの発現が増加し貧血になることも知られている⁵⁶⁾。BMP/

Smad 経路を介したヘプシジン発現における MT-2 の役割はさらなる検討を要する。

3-3. Neogenin

Neogenin (Neo) は、HJV と相互作用してヘプシジンの発現を調節する因子であると理解されている。膜貫通タンパク質である Neo は、肝臓や骨格筋で発現しており⁵⁷⁾、HJV と複合体を形成する⁴⁶⁾。HJV を恒常的に発現させた HepG2 細胞に Neo siRNA を導入すると、BMP によるヘプシジンの発現の誘導が著しく抑制されたことから、Neo は BMP/Smad 経路による HJV を介したヘプシジン発現亢進を正に調節すると考えられている³³⁾。この結果と一致して、Neo-KO マウスは肝臓におけるリン酸化 Smad1/5/8 量ならびにヘプシジン発現が低く、鉄過剰の表現型を示す³⁴⁾。また、Neo-KO マウスの初代肝細胞では BMP 処理による Smad1/5/8 のリン酸化ならびにヘプシジン発現の誘導が抑制される³⁴⁾。

Neo が BMP/Smad 経路を活性化する理由として、Lee ら³⁴⁾ は、Neo は HJV の切断を抑制することで BMP/Smad 経路を正に調節するという機構を提唱している (Fig. 5A)。一方、安定的に HJV を発現する HepG2 細胞に、Neo の siRNA を導入すると、MT-2 による切断が抑制されたことから、Neo は、MT-2 による HJV の切断を促進するという報告もあり⁵⁸⁾ (Fig. 5B)、Neo と HJV を介した BMP/Smad 経路の関係を合理的に説明する機構はまだ見出されていない。

3-4. Tfr2 と HFE

ヘモクロマトーシスの原因変異として知られている遺伝子に細胞表面タンパク質 HFE やトランスフェリン受容体 2 (Tfr2) がある⁵⁹⁾。HFE, Tfr2, あるいはこれら両方の欠損マウスは鉄過剰の表現型を示す⁶⁰⁻⁶²⁾。Tfr2 の発現は、全身で発現している Tfr1 とは異なり、主に肝臓、小腸、赤血球前駆細胞に局限している。また、Tfr2 は Tfr1 に比べてトランスフェリン鉄に対する親和性が低く、トランスフェリン鉄の細胞内への取り込みに Tfr2 がどの程度の重要性を持つかは不明である⁶²⁾。

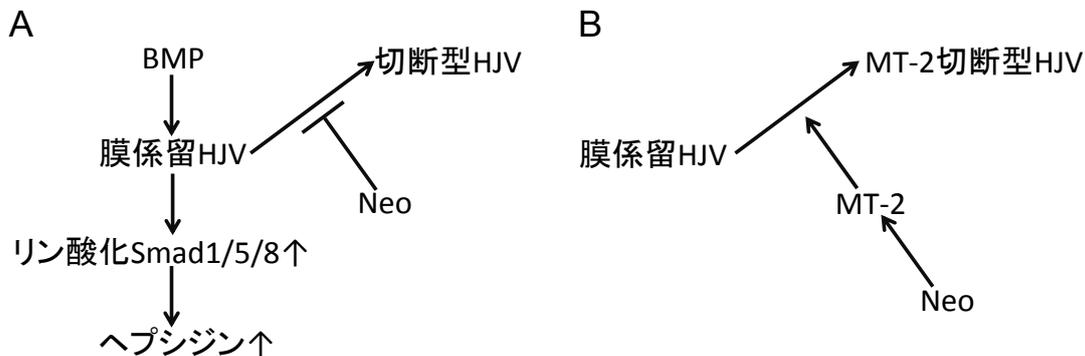


Fig. 5 Neo と HJV の切断

Neo は HJV の切断を抑制して BMP/Smad 経路を介したヘプシジンの発現を正に調節するという機構が提唱されている (A)。一方で、Neo は MT-2 による HJV の切断を促進するという報告もある (B)。

TfR2, HFE, あるいは両方をノックアウトしたマウスでは、肝臓でBMP6の遺伝子発現が有意に亢進するが、Smad1/5/8のリン酸化は亢進せず、ヘプシジンの発現も亢進しない^{60, 62, 63}。また、これらのKOマウスに高鉄食を給餌しても肝臓におけるBMP6の発現誘導ならびにSmad1/5/8のリン酸化促進は起こらず、ヘプシジンの発現上昇も起こらない⁶²。HFE-KOマウスにデキストラン鉄を腹腔内投与した場合も同様の結果が報告されている⁶⁴。HFEはBMP I型受容体ALK3と相互作用することや、HFEはALK3のユビキチン化を抑制することで、プロテアソームによる分解を阻害し、ALK3の安定性を高める機能があるということがin vitroで明らかにされている⁶⁵。実際、HFE-KOマウスの肝臓ではALK3の発現量が低い⁶⁵。このようにTfR2とHFEはBMP6によるSmad1/5/8のリン酸化を正に制御していると考えられるが、その機構は不明である。

4. BMP/Smad 経路による IL-6/STAT3 経路の調節

IL-6/STAT3経路は炎症によって、BMP/Smad経路は鉄過剰の際に、それぞれ活性化するヘプシジン発現亢進経路である。ヒトヘプシジンプロモーターではIL-6はSTAT3を活性化しSTAT3-REを介して、BMPはSmad1/5/8を活性化しBMP-RE1ならびにBMP-RE2を介して転写を促進する。この2大経路は、炎症、鉄過剰と明確に役割が区別され、シグナル介在因子もSTAT3, Smadと異なり、独立経路のように見える。実際、HepG2細胞をBMPで処理してもSTAT3のリン酸化は誘導されず⁶⁶、継代肝細胞HuH-7細胞では、ヒトヘプシジンプロモーターのSTAT3-REを変異させたレポーター遺伝子のBMP応答性は変化しない³⁷。

しかしながら、IL-6/STAT3経路によるヘプシジン発現誘導には、明らかにBMP/Smad経路が必要である。肝臓特異的ALK3-KOマウスでは、IL-6によるヘプシジン発現誘導が消失する⁶⁶。HepG2細胞ではALK3のFcキメラタンパク質存在下で、IL-6によるヘプシジン発現亢進が抑制される⁶⁷。一方、肝臓で高発現しているもう一つのBMP I型受容体ALK2を肝臓特異的にノックアウトしても、IL-6によるヘプシジン発現亢進は抑制されない⁶⁶。Hep3B細胞やHepG2細胞ではBMP I型受容体の阻害剤であるdorsomorphinあるいはLDN-193189の存在下で、IL-6によるヘプシジン発現の誘導が抑制される^{67, 68}。LDN-193189を前投与したマウスにIL-6を腹腔内投与した場合でも、ヘプシジンの発現の誘導が起こらない⁶⁷。以上の結果は、IL-6によるヘプシジン発現上昇にはBMP経路が必須であること、ならびにALK3が関与していることを示している。

HepG2細胞をIL-6で刺激したときSmad1/5/8のリン酸化の亢進は起こらない⁶⁶。一方、HepG2細胞ではLDN-193189存在下で、IL-6によるSTAT3のリン酸化

は抑制されない⁶⁶。さらに、肝臓特異的Smad4-KOマウスにIL-6を腹腔内投与してもヘプシジンの発現が誘導されない²⁸。これらの知見から、IL-6によってSmad1/5/8のリン酸化は亢進しないが、IL-6によるヘプシジン発現亢進には、内在的にリン酸化されたSmad1/5/8とSmad4が必要であると考えられる。HuH-7細胞では、ヒトヘプシジンプロモーターのBMP-RE2を変異させてもIL-6応答性が低下しないが、BMP-RE1を変異させるとIL-6応答性が低下することが示されており³⁷、IL-6によるヘプシジン発現誘導は、Smadタンパク質がBMP-RE1に結合することで正に調節されると考えられる (Fig. 6)。

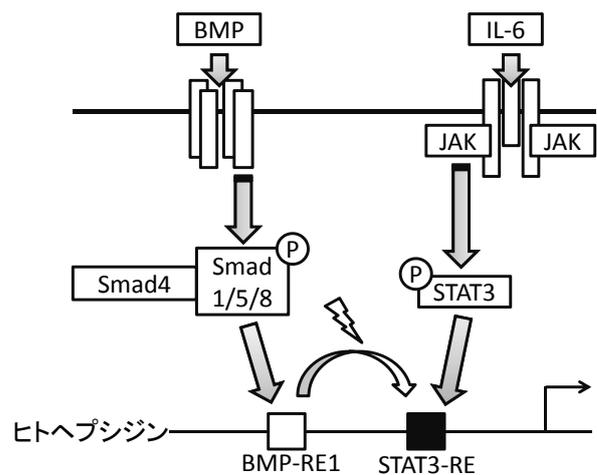


Fig. 6 BMP/Smad 経路による IL-6/STAT3 経路の調節
BMP/Smad 経路によるヘプシジン発現の誘導が、IL-6/STAT3 経路により調節されるという報告はない。一方で、IL-6/STAT3 経路によるヘプシジン発現の誘導には、内在性の BMP/Smad 経路が必要であり、内在性リン酸化 Smad1/5/8 と Smad4 の複合体が BMP-RE1 に結合することが必要であるとされている。

5. おわりに

ヘプシジンの発現を制御する因子については他にも数々の報告がある¹⁴。小胞体ストレスによって転写因子 CREBH が活性化され STAT3 と協調的に作用することでヘプシジン発現は正に調節される⁶⁹。GDF15 や TWSG1 は BMP によるヘプシジンの発現の誘導を阻害する活性があり、骨髄におけるこれらの発現の亢進が鉄過剰貧血β-サラセミアと関連がある^{70, 71}。トランスフェリン機能喪失変異マウスではヘプシジンの発現が著しく低いが、それには BMP/Smad シグナルの抑制因子 BMPER の発現が肝臓で亢進することが関与している⁷²。テストステロンはアンドロゲンレセプターを介して、Smad1/5/8 のヘプシジンプロモーターへの結合を抑制することでヘプシジンの発現を抑制する機能がある⁴¹。一方、エストロゲンはヘプシジンの発現を亢進することを示した報告や抑制することを示した報告がある⁷³⁻⁷⁵。また、著者らは、AP1 転写因子群 c-fos や junB が STAT3-RE の直下に隣接する AP1 サイトを介してヘプシジンの発現を促進することを明らか

にしている⁷⁶⁾。

ヘプシジン発見から13年が経過した今でもヘプシジンの発現調節機構に関する報告は途絶えることがないが、一方で、すでに定説になった発現調節機構の根本部分が脆弱であると思えてならない。マウスを用いた炎症性貧血の研究は数多くなされているが、上述のようにマウスヘプシジンプロモーターでIL-6/STAT3応答性に重要な領域はいまだに不明である。BMP6/Smad経路はヘプシジンによる鉄吸収抑制の引き金として揺るぎない地位を確立しているが、鉄過剰に応じて肝臓でBMP6の発現が亢進する機構は不明である。さらに、BMP-RE1とBMP-RE2の機能的差異は明らかにされていない。TFR2とHFEはよく知られたヘモクロマトーシス原因遺伝子であり、BMP6/Smad経路を正に調節する機能があることが示唆されているが、その機構は不明である。NeoはBMP/Smad経路によるHJVを介したヘプシジン発現亢進を正に調節することが明らかにされているが、NeoがHJVに及ぼす作用に関しては一貫した結論が得られていない。

炎症、貯蔵鉄によるヘプシジン発現調節系の本体としてIL-6、BMP6が同定され、いまやヘプシジン研究の趨勢は新規発現調節因子の探索と、炎症性貧血や鉄代謝関連疾患の治療にシフトしつつある。それらの研究が重要なことは言うまでもない。しかしながら、既知のヘプシジン発現調節機構についてもまだまだ研究の余地があるように思える。最も基本的なミネラルの一つ鉄の代謝機構について一層理解するためにも、ヘプシジン研究は、適切な共試材料、適切な試験設定、高い再現性に基づいた堅固たる基盤データに基づいて、進められる必要がある。

参考文献

- 1) Ganz T, Nemeth E. (2012) Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1434-43.
- 2) Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. (2010) Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 142: 24-38.
- 3) Ganz T. (2013) Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* 93: 1721-41.
- 4) Krause A, Neitz S, Mägert 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: 147-50.
- 5) Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal 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: 7811-9.
- 6) Laftah AH, Ramesh B, Simpson RJ, Solanky N, Bahram S, Schümann K, Debnam ES, Srai SK. (2004) Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. *Blood* 103: 3940-4.
- 7) Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. (2001) Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806-10.
- 8) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. (2004) Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090-3.
- 9) De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, Ganz T, Musci G, Kaplan J. (2007) The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 18: 2569-78.
- 10) De Domenico I, Lo E, Ward DM, Kaplan J. (2009) Heparin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3800-5.
- 11) Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. (2012) Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1820: 403-10.
- 12) Takami T, Sakaida I. (2011) Iron regulation by hepatocytes and free radicals. *J Clin Biochem Nutr* 48: 103-6.
- 13) Kautz L, Nemeth E. (2014) Molecular liaisons between erythropoiesis and iron metabolism. *Blood* 124: 479-482.
- 14) Meynard D, Babitt JL, Lin HY. (2014) The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood* 123: 168-76.
- 15) 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: 1037-44.
- 16) Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. (2003) Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101: 2461-3.
- 17) Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. (2004) IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113: 1271-6.
- 18) Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. (2005) Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U*

- S A 102: 1906–10.
- 19) Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. (2003) Principles of interleukin(IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374: 1–20.
 - 20) Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, Garuti C, Rump A, Corradini E, Ernst M, Klein C, Trautwein C. (2007) STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology* 132: 294–300.
 - 21) Wrighting DM, Andrews NC. (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108: 3204–9.
 - 22) Truksa J, Lee P, Beutler E. (2007) The role of STAT, AP-1, E-box and TIEG motifs in the regulation of hepcidin by IL-6 and BMP-9: lessons from human HAMP and murine Hamp1 and Hamp2 gene promoters. *Blood Cells Mol Dis* 39: 255–62.
 - 23) Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E. (2007) Different regulatory elements are required for response of hepcidin to interleukin-6 and bone morphogenetic proteins 4 and 9. *Br J Haematol* 139: 138–47.
 - 24) Chung B, Matak P, McKie AT, Sharp P. (2007) Leptin increases the expression of the iron regulatory hormone hepcidin in HuH7 human hepatoma cells. *J Nutr* 137: 2366–70.
 - 25) Chung B, Verdier F, Matak P, Deschemin JC, Mayeux P, Vaulont S. (2010) Oncostatin M is a potent inducer of hepcidin, the iron regulatory hormone. *FASEB J* 24: 2093–103.
 - 26) Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, Shindo M, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. (2014) Upregulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon α . *J Gastroenterol Hepatol* 29: 387–94.
 - 27) Feng XH, Derynck R. (2005) Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659–93.
 - 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) Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. (2007) Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 117: 1933–9.
 - 30) Mleczko-Sanecka K, Casanovas G, Ragab A, Breitkopf K, Müller A, Boutros M, Dooley S, Hentze MW, Muckenthaler MU. (2010) SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. *Blood* 115: 2657–65.
 - 31) Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY. (2006) Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 38: 531–9.
 - 32) 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: 10289–93.
 - 33) Zhang AS, Yang F, Wang J, Tsukamoto H, Enns CA. (2009) Hemojuvelin-neogenin interaction is required for bone morphogenetic protein-4-induced hepcidin expression. *J Biol Chem* 284: 22580–9.
 - 34) Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z, Xie JX, Jung JU, Liu Y, Xi CX, Mei L, Xiong WC. (2010) Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood* 115: 3136–45.
 - 35) Kanamori Y, Murakami M, Matsui T, Funaba M. (2014) Hepcidin expression in liver cells: evaluation of mRNA levels and transcriptional regulation. *Gene* 546: 50–5.
 - 36) Korchynskiy O, ten Dijke P. (2002) Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 277: 4883–91.
 - 37) Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU. (2009) Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med (Berl)* 87: 471–80.
 - 38) Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K. (2000) Smad6 is a Smad1/5-induced Smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem* 275: 6075–9.
 - 39) Kusanagi K, Inoue H, Ishidou Y, Mishima HK, Kawabata M, Miyazono K. (2000) Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell* 11: 555–65.
 - 40) Island ML, Jouanolle AM, Mosser A, Deugnier Y, David V, Brissot P, Loréal O. (2009) A new mutation in the hepcidin promoter impairs its BMP response and contributes to a severe phenotype in

- HFE related hemochromatosis. *Haematologica* 94: 720-4.
- 41) Guo W, Bachman E, Li M, Roy CN, Blusztajn J, Wong S, Chan SY, Serra C, Jasuja R, Travisson TG, Muckenthaler MU, Nemeth E, Bhasin S. (2013) Testosterone administration inhibits hepcidin transcription and is associated with increased iron incorporation into red blood cells. *Aging Cell* 12: 280-91.
 - 42) Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH, Deng C, Vaulont S, Mosser J, Coppin H, Roth MP. (2008) Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood* 112: 1503-9.
 - 43) Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL. (2009) BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 41: 482-7.
 - 44) 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: 478-81.
 - 45) Enns CA, Ahmed R, Wang J, Ueno A, Worthen C, Tsukamoto H, Zhang AS. (2013) Increased iron loading induces Bmp6 expression in the non-parenchymal cells of the liver independent of the BMP-signaling pathway. *PLoS One* 8: e60534.
 - 46) Zhang AS, West AP Jr, Wyman AE, Bjorkman PJ, Enns CA. (2005) Interaction of hemojuvelin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 280: 33885-94.
 - 47) Kuninger D, Kuns-Hashimoto R, Kuzmickas R, Rotwein P. (2006) Complex biosynthesis of the muscle-enriched iron regulator RGMc. *J Cell Sci* 119: 3273-83.
 - 48) Niederkofler V, Salie R, Sigrist M, Arber S. (2004) Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. *J Neurosci* 24: 808-18.
 - 49) Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS, Fleming MD, Andrews NC. (2005) A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest* 115: 2187-91.
 - 50) Niederkofler V, Salie R, Arber S. (2005) Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest* 115: 2180-6.
 - 51) Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY. (2008) Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood* 111: 5195-204.
 - 52) Kuninger D, Kuns-Hashimoto R, Nili M, Rotwein P. (2008) Pro-protein convertases control the maturation and processing of the iron-regulatory protein, RGMc/hemojuvelin. *BMC Biochem* 9: 9.
 - 53) Maxson JE, Chen J, Enns CA, Zhang AS. (2010) Matriptase-2- and proprotein convertase-cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the down-regulation of hepcidin expression. *J Biol Chem* 285: 39021-8.
 - 54) 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: 1088-92.
 - 55) Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. (2008) The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 8: 502-11.
 - 56) Folgueras AR, de Lara FM, Pendás AM, Garabaya C, Rodríguez F, Astudillo A, Bernal T, Cabanillas R, López-Otín C, Velasco G. (2008) Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood* 112: 2539-45.
 - 57) Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller BK, Strittmatter SM. (2004) Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat Cell Biol* 6: 756-62.
 - 58) Enns CA, Ahmed R, Zhang AS. (2012) Neogenin interacts with matriptase-2 to facilitate hemojuvelin cleavage. *J Biol Chem* 287: 35104-17.
 - 59) Chen J, Enns CA. (2012) Hereditary hemochromatosis and transferrin receptor 2. *Biochim Biophys Acta* 1820: 256-63.
 - 60) Kautz L, Meynard D, Besson-Fournier C, Darnaud V, Al Saati T, Coppin H, Roth MP. (2009) BMP/Smad signaling is not enhanced in Hfe-deficient mice despite increased Bmp6 expression. *Blood* 114: 2515-20.
 - 61) Wallace DF, Summerville L, Crampton EM, Frazer DM, Anderson GJ, Subramaniam VN. (2009) Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology* 50: 1992-2000.

- 62) Corradini E, Rozier M, Meynard D, Odhiambo A, Lin HY, Feng Q, Migas MC, Britton RS, Babitt JL, Fleming RE. (2011) Iron regulation of hepcidin despite attenuated Smad1,5,8 signaling in mice without transferrin receptor 2 or Hfe. *Gastroenterology* 141: 1907-14.
- 63) Corradini E, Garuti C, Montosi G, Ventura P, Andriopoulos B Jr, Lin HY, Pietrangelo A, Babitt JL. (2009) Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis. *Gastroenterology* 137: 1489-97.
- 64) Vujić Spasić M, Sparla R, Mleczko-Sanecka K, Migas MC, Breitkopf-Heinlein K, Dooley S, Vaulont S, Fleming RE, Muckenthaler MU. (2013) Smad6 and Smad7 are co-regulated with hepcidin in mouse models of iron overload. *Biochim Biophys Acta* 1832: 76-84.
- 65) Wu XG, Wang Y, Wu Q, Cheng WH, Liu W, Zhao Y, Mayeur C, Schmidt PJ, Yu PB, Wang F, Xia Y. HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood*. (in press)
- 66) Mayeur C, Lohmeyer LK, Leyton P, Kao SM, Pappas AE, Kolodziej SA, Spagnoli E, Yu B, Galdos RL, Yu PB, Peterson RT, Bloch DB, Bloch KD, Steinbicker AU. (2014) The type I BMP receptor Alk3 is required for the induction of hepatic hepcidin gene expression by interleukin-6. *Blood* 123: 2261-8.
- 67) Steinbicker AU, Sachidanandan C, Vonner AJ, Yusuf RZ, Deng DY, Lai CS, Rauwerdink KM, Winn JC, Saez B, Cook CM, Szekely BA, Roy CN, Seehra JS, Cuny GD, Scadden DT, Peterson RT, Bloch KD, Yu PB. (2011) Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. *Blood* 117: 4915-23.
- 68) Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, Lin HY, Bloch KD, Peterson RT. (2008) Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* 4: 33-41.
- 69) Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, Pietrangelo A. (2009) ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* 325: 877-80.
- 70) 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: 1096-101.
- 71) Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, Lee YT, Goodnough JB, Harandi O, Ganz T, Paulson RF, Miller JL. (2009) Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 114: 181-6.
- 72) Patel N, Masaratana P, Diaz-Castro J, Latunde-Dada GO, Qureshi A, Lockyer P, Jacob M, Arno M, Matak P, Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A, Patterson C, Simpson RJ, McKie AT. (2012) BMPER protein is a negative regulator of hepcidin and is up-regulated in hypotransferrinemic mice. *J Biol Chem* 287: 4099-106.
- 73) Hou Y, Zhang S, Wang L, Li J, Qu G, He J, Rong H, Ji H, Liu S. (2012) Estrogen regulates iron homeostasis through governing hepatic hepcidin expression via an estrogen response element. *Gene* 511: 398-403.
- 74) Ikeda Y, Tajima S, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. (2012) Estrogen regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes. *PLoS One* 7: e40465.
- 75) Yang Q, Jian J, Katz S, Abramson SB, Huang X. (2012) 17 β -Estradiol inhibits iron hormone hepcidin through an estrogen responsive element half-site. *Endocrinology* 153: 3170-8.
- 76) Kanamori Y, Murakami M, Matsui T, Funaba M. (2014) The regulation of hepcidin expression by serum treatment: requirements of the BMP response element and STAT- and AP-1-binding sites. *Gene* 551: 119-26