

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591107

研究課題名（和文） 鉄の利用障害による慢性貧血の病態解明

研究課題名（英文） Impaired Iron Metabolism in Anemia of Chronic Disease

研究代表者

川端 浩 （KAWABATA HIROSHI）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10329401

研究成果の概要：

慢性疾患の貧血の主な原因は鉄の利用障害とされる。最近、生体内の鉄を制御する重要な因子として肝臓由来のペプチドホルモンの hepcidin が見いだされた。我々は、様々な血液疾患や造血細胞移植前後における血清 hepcidin および他の鉄代謝・造血関連因子を測定した。その結果は、これらの病態でみられる鉄代謝異常に hepcidin が重要な役割を果たしていることを示した。また、造血細胞移植における血清 hepcidin 値や血清フェリチン値が臨床上重要な意味を持っている可能性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床内科学・血液内科学

キーワード：血液内科学、鉄代謝

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群などの造血器腫瘍、自己免疫関連や慢性感染症等の炎症性疾患、慢性腎不全などでみられる貧血は「慢性炎症の貧血 (anemia of chronic disease)」と呼ばれ、鉄の利用障害が関与する。鉄代謝制御に関する知見は近年おびただしく増加し、特に遺伝性ヘモクロマトーシスの研究から見いだされた HFE, トランスフェリン受容体2 (TfR2), HJV, hepcidin などの新規の分子は、生体内の鉄のホメオスタシス制御における我々の旧来の考え方を一変させた。これらの分子の

なかで中心的な役割を担っているのが肝臓由来のペプチドホルモン hepcidin である (Review としては Ganz T and Nemeth E. Biochim Biophys Acta. 2006;1763:690-9 などがある)。これは主に肝臓から分泌される鉄代謝の負の制御因子である。Hepcidin の発現は鉄負荷あるいは炎症性サイトカイン刺激 (IL-6 など) で増加する。hepcidin は、腸管や網内系細胞の鉄輸送蛋白 ferroportin の発現を低下させることによって造血系が利用できる鉄を減少させる。慢性疾患に伴う貧血では hepcidin の過剰な産生あるいは血液中での蓄積がおこっているとされ、その血

清中濃度の測定は貧血の病態把握に有用と考えられる。しかしながら、血清中の hepcidin の検出は、ごく最近まで実現していなかった。我々は金沢医科大学の友杉教授との共同研究でマス・スペクトロメトリー法による血清および尿中の hepcidin の半定量の系を確立し、臨床検体測定用に実用化した (Tomosugi N, Kawabata H, et al. *Blood*. 2006; 108: 1381-1387)。この測定系を用いた臨床検体の hepcidin 測定は、鉄代謝異常を伴う貧血の病態解明に役立つものと期待される。

遺伝性ヘモクロマトーシスの責任遺伝子である HFE、TfR2、HJV の変異はいずれも hepcidin の発現を低下させる (Kawabata H, et al. *Blood*. 2005;105, 376-81 など)。このうち TfR2 は、研究代表者の川端がトランスフェリン・レセプター 1 (TfR1) に相同性の高い分子としてクローニングし (Kawabata H, et al. *J Biol chem*. 1999; 274, 20826-20832)、その後も継続的にその生理的役割についての研究を行っている (Fleming RE, Kawabata H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10653-10658, Kawabata H et al. *Br J Haematol*. 2004;127:464-473 など)。TfR2 の発現は肝臓のみならず赤芽球系前駆細胞で高いが、造血系における機能についてはまだよく分かっていない。我々は、TfR2 が鉄のセンサーとして働いているという仮説を持っているが、いまだ証明することができていない。

血清中の鉄の主なキャリア蛋白はトランスフェリンであるが、トランスフェリンと結合していない鉄を輸送する分子として、ヘム蛋白、ラクトフェリン、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal, lipocalin-2) などがある。Ngal は、シデロフォアとの結合を介して細菌から鉄を奪うことで hepcidin と同様に生体防御機構として働いているものと考えられている。研究分担者の森は Ngal がシデロフォアを介して鉄を抱合し輸送しうること (J Yang, K Mori, et al. *Mol Cell* 10:1045-1056, 2002, Barasch J and Mori K. *Nature* 432:811-813, 2004)、虚血再灌流による腎障害に対し保護的に働くこと (Mori K, et al. *J Clin Invest* 115:610-621, 2005)、心臓手術後の急性腎障害のバイオマーカーとなること (Mishra J, Mori K, et al. *Lancet* 365:1231-1238, 2005) を報告している。最近 Ngal の受容体が赤芽球上にも存在し、in vitro において Ngal が赤芽球系の分化と増殖を抑制するという報告が筑波大学のグループから出されているが (Miharada K, et al. *FASEB J*. 2005;19:1881-3) その臨床的な意義については未知のままである。

## 2. 研究の目的

最終的な研究の目的は、鉄の利用障害に関連する、いわゆる「慢性疾患の貧血」の治療法の開発であるが、今回の研究期間ではその前提となる病態解明をめざした。臨床的な研究として、hepcidin をはじめとする様々な鉄代謝関連因子・指標を特に造血系や鉄代謝が激変する造血細胞移植をモデルとして経時的に測定し、臨床病態との関連を分析した。これらの研究では、生体の鉄代謝制御機構の解明のみならず、造血細胞移植における鉄代謝動態とその予後に与える影響についても分析し、臨床への新知見の還元を目指した。基礎的な研究としては、鉄代謝制御の要であるヘプシジンの発現制御機構を、主に細胞生物学、分子生物学的な手法で解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床的研究

インフォームド・コンセントを得た患者の臨床検査の残余検体を用いて、鉄代謝・造血関連因子の測定を行った。Hepcidin については定量的 LC-MS/マス・スペクトロメトリー法を用いて測定した。IL-6、GDF-15、エリスロポイエチンについては ELISA 法にて測定した。フェリチン、血清鉄、UIBC の測定は、臨床検査データを用いるか、SRL に外注した。さまざまな臨床検体中のこれらの因子と、病態との関連を解析した。この研究は、京都大学医の倫理委員会の承認を得て行っている。

### (2) 基礎的研究

HEK293 や Huh7 などの培養細胞に鉄負荷や鉄にキレート剤添加、炎症性サイトカイン添加などを行い、鉄代謝関連分子の発現の変化を調べた。Hepcidin、TfR2、HFE、matrilysin-2 などの鉄代謝関連遺伝子を発現ベクターに組み込み、細胞株に遺伝子導入して、これらの発現や相互作用を real-time PCR、ウエスタンブロット、免疫沈降などを用いて調べた。Hepcidin については、そのプロモーター領域をルシフェラーゼ・プラスミドに組み込み、どのような刺激で hepcidin のプロモーター活性が上昇するかを調べた。

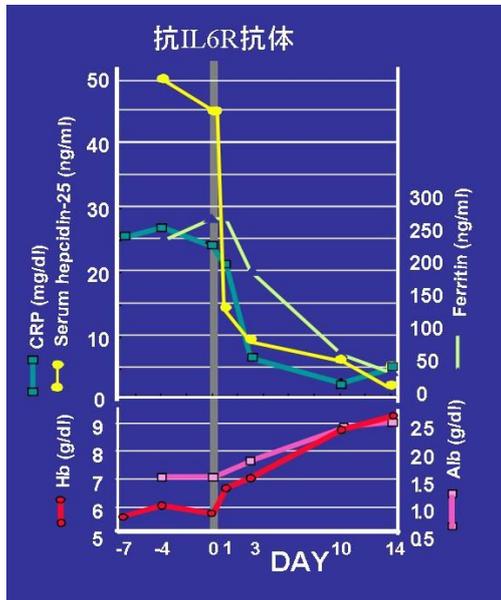
マウスに鉄負荷を行い、肝臓や脾臓における鉄代謝関連分子の発現の変化を調べた。

## 4. 研究成果

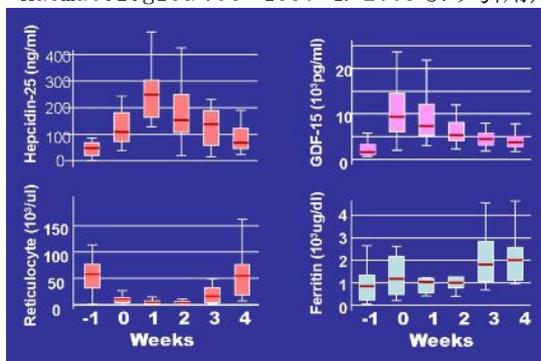
### (1) 慢性貧血患者の血清中の hepcidin の測定

我々は、「慢性疾患の貧血」をきたす代表的疾患であるキャスルマン病で見られる貧血が、IL-6 の過剰産生 ⇒ hepcidin の

高発現を介した、鉄の吸収・利用障害に起因すること、抗 IL-6 受容体抗体治療により血清中へプシジンが 24 時間以内に低下し、引き続き鉄代謝の正常化と貧血の改善がみられることを報告した。この結果は、慢性炎症における貧血の治療に IL-6 経路の阻害が有望であることを示している（下図は Kawabata H, Tomosugi N, et al. Haematologica;92: 857-8. 2007 より改変）。

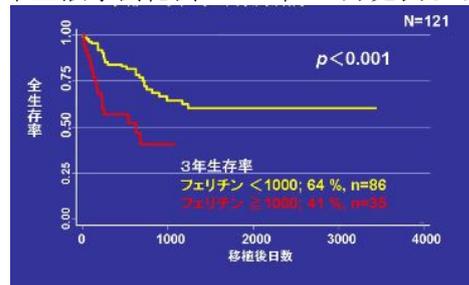


(2) 造血細胞移植患者における血清 hepcidin および他の造血・鉄代謝指標の解析  
造血系および鉄代謝が激変するヒトの造血細胞移植をモデルとし、血清中の hepcidin を測定し、病態との関連を解析した。その結果、血清 hepcidin 値が移植前から高値であること、移植後 1 週目にピーク値となること、また、多変量解析で、造血回復期の血清 hepcidin 値が赤血球造血の指標である網状赤血球数や可溶性トランスフェリン受容体と負の相関があることを示した。これらの結果は、hepcidin の発現が赤血球造血によって負に制御されていることを支持している（下図は Kanda J, Kawabata H, et al. Haematologica ;93: 1550-4. 2008 より引用）。



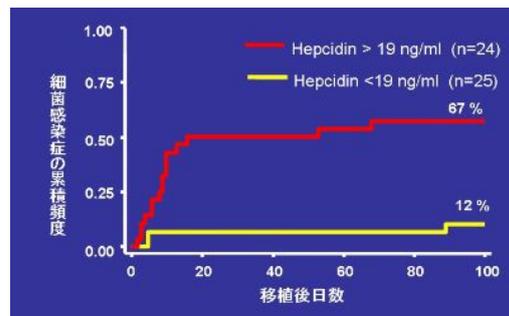
(3) 造血細胞移植患者における移植前血清フェリチンの予後に与える影響  
われわれは、当院における造血細胞移植患

者の移植前の血清フェリチン値と予後について後方視的に解析し、移植前のフェリチン高値が治療関連死の危険因子であることを確認した（下図は水本智咲、他。第 70 回 日本血液学会総会 2008 年 10 月発表より）。



(4) 造血細胞移植前の血清 hepcidin が予後に与える影響

造血細胞移植前の血清 hepcidin が予後に与える影響について多変量解析を行い、hepcidin の高い例で移植後の細菌感染症が有意に多いことを示した（下図は Kanda J, Kawabata H, et al. 50th ASH Meeting, 2008 Abstr より改変引用）。



(5) hepcidin 発現・分泌制御機構の解明

我々はヒトの hepcidin promoter をクローニングし、これを用いてルシフェラーゼ・アッセイを行い、IL-6 以外で hepcidin の promoter 活性を変動させる未知の因子を検索し、現在までにいくつか同定している（未発表）。これらの因子の鉄代謝制御における生理的役割について、現在も研究を継続している。また、トランスフェリン受容体 2、HFE、ヘモジュベリン、マトリプターゼ 2 などの鉄代謝制御に関わる膜蛋白の相互作用について、in vitro の系で研究を継続している。

(6) 血液疾患における鉄代謝関連因子 NGAL の血清・尿中濃度の測定と病態との関連

現在、解析が進行中で、興味深いデータが集まりつつある（投稿準備中）。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1 Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo

K, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T and Uchiyama T. Clinical Significance of Serum Hcpidin Levels on Early Infectious Complications in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant;in press

2 Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K and Uchiyama T. Serum hepcidin level and erythropoietic activity after haematopoietic stem cell transplantation. Haematologica;93: 1550-4. 2008

3 Kawabata H, Tomosugi N, Kanda J, Tanaka Y, Yoshizaki K and Uchiyama T. Anti-interleukin 6 receptor antibody tocilizumab reduces the level of serum hepcidin in patients with multicentric Castleman's disease. Haematologica;92: 857-8. 2007

[学会発表] (計 10 件)

1 Kawabata H and Tomosugi N. Cause of Iron Overload - Hcpidin;5th General Assembly of Asian Hematology Association-2009, Kobe, Feb 19, 2009 (Symposium)

2 Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Kondol T, Ishikawa T and Uchiyama T. Clinical significance of serum hepcidin-25 levels on early treatment-related complications after hematopoietic stem cell transplantation 50th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, December 6-9, 2008 - San Francisco, CA (Poster)

3 諫田 淳也、水本 智咲、川端 浩、内山 卓、土田 秀行、友杉 直久、松尾 恵太郎. 造血幹細胞移植における血清ヘプシジン値と造血能. 第 32 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 於・ホテルアラスカ(青森市) 2008 年 9 月 13-14 日

4 水本智咲、諫田淳也、川端浩、一戸辰夫、菱澤方勝、錦織桃子、高折晃史、門脇則光、山下浩平、近藤忠一、石川隆之、内山卓. 移植前血清フェリチン値が造血器腫瘍に対する同種造血幹細胞移植の成績に与える影響の検討. 第 70 回 日本血液学会総会 於・国立京都国際会館, 京都 2008 年 10 月 10-12 日

5 川端浩. 炎症性貧血におけるヘプシジンとサイトカインの関与;第 36 回臨床免疫学会イブニングセミナー, 東京, 2008 年 10 月 17 日

6 Kawabata H, Tomosugi N, Kanda J, Tanaka Y, Kadowaki N, Ichinohe T, Ishikawa T and Uchiyama T. ANTI-INTERLEUKIN 6 RECEPTOR ANTIBODY TOCILIZUMAB REDUCES THE LEVELS OF SERUM HEPCIDIN IN PATIENTS WITH MULTICENTRICCASTLEMAN' S DISEASE. International BioIron Society Meeting 2007. Kyoto Japan, April 4 2007, (Oral presentation).

7 Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Tomosugi N and Uchiyama T. THE SERUM LEVEL OF HEPCIDIN AFTER STEM CELL TRANSPLANTATION. International BioIron Society Meeting 2007. Kyoto Japan, April 4 2007, (Poster).

8 Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Tsuchida H, Tomosugi N, Uchiyama T. Serum Level of Hcpidin and Erythropoietic Activity after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Atranta, Georgia, USA, December 8-11, 2007 (Poster).

9 Kawabata H, Tomosugi N, Kanda J, Mizumoto C, Tanaka Y, Ichinohe T, IKadowaki N, Ishikawa T, Yoshizaki K, Uchiyama T. Monitoring Of Serum Hcpidin-25 In Multicentric Castleman s Disease Patients Treated With Tocilizumab, An Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Atranta, Georgia, USA, December 8-11, 2007 (Poster).

10 川端 浩: シンポジウム: 鉄を起点としてがんを考える「細胞増殖とトランスフェリン受容体 2」, 第 31 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会, 京都, 2007 年 4 月 6 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川端 浩 (KAWABATA HIROSHI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 10329401

### (3) 連携研究者

森 潔 (MORI KIYOSHI)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 60343232

友杉直久 (TOMOSUGI NAOHISA)  
金沢医科大学・総合医学研究所・教授  
研究者番号: 80155580