

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461262

研究課題名(和文)腎性貧血治療における鉄貯蔵状態と造血細胞分化・鉄利用の関係の検討

研究課題名(英文)Erythroid differentiation and iron metabolism in bone marrow of renal failure

研究代表者

中西 健 (NAKANISHI, TAKESHI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70217769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：従来腎性貧血の原因はEPO(エリスロポエチン)の産生低下が主因と考えられてきたが、最近骨髄中の赤芽球系細胞の分化の異常を認める報告があり、慢性腎不全(RF)マウスモデルを用いて flow cytometryにより骨髄での赤芽球系細胞の分化や、肝の造血・鉄代謝に関わる蛋白の発現について検討した。RFでは、主に骨髄における後期の赤芽球の割合の減少傾向を認めた。また、血清ヘプシジン高値、血清鉄低下、血清フェリチン増加、肝AMP(ヘプシジン)mRNAの有意な増加を認めた。赤芽球系の後期分化、CD71発現に原因がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anemia in chronic renal failure has been believed to be mainly caused by inadequate EPO production, but the major cause has not been well clarified. In the present study, we examined the differentiation pattern of erythroid in the hematopoietic system of bone marrow (BM) using flow cytometry(FACS), and hepcidin expression in liver using mouse model of adenine-induced renal failure (RF). FACS showed the percentages of Pro erythroblast (CD71+/Ter119-) and Basophilic erythroblast(CD71+/Ter119+), those are in the steps of late differentiation, were decreased in the BM of femur of RF compared with Control(C). No change of erythroblast differentiation was observed in cells from spleen of RF. Hepatic Hamp mRNA expression was increased and serum hepcidin levels were also higher in RF than C. Finally we presumed that the increase in hepcidin expression could be associated with the dysregulated erythroblast differentiation and the decrease in CD71(TfR) expression in RF.

研究分野：腎臓内科

キーワード：erythroblasts differentiation hepcidin CD71

1. 研究開始当初の背景

腎性貧血治療においては腎由来とされるエリスロポエチンのみならず鉄の管理が重要である。2012年に発表された国際的な腎性貧血治療ガイドライン Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO) guideline では、「鉄過剰(充足)状態」が腎性貧血治療における erythropoiesis stimulating agent (ESA) に対する反応性を改善し、貧血改善に有利であり安全な治療法とされている。一方本邦においては、多くの患者で「必要最小限の鉄貯蔵状態」で治療がなされている。「必要最小限の鉄貯蔵状態」と「鉄過剰状態」のいずれの条件の腎性貧血治療が、(1)造血に対して有効か、(2)遊離鉄増加に由来する生体の酸化ストレスの有無に相違があるかを明らかにする必要がある。鉄調節ホルモン「ヘプシジン」の作用を考えると、過量の鉄貯蔵量は高ヘプシジン血症を介して鉄の再利用を妨げることが考えられ、鉄貯蔵量のどのような状態が生体に安全で、かつ貧血治療に役立つかを明らかにする必要がある。本研究では、鉄貯蔵状態と「骨髄・脾臓の造血細胞の分化の程度」や「肝・脾臓からの鉄の動員」の関係の検討から、効率的で安全な腎性貧血に対する治療法を基礎的に解明する。

2. 研究の目的

当初の本研究の目的は、腎不全状態における貧血の治療において鉄状態(鉄剤投与)による ESA に対する反応性を改善することの是非を明らかにすることであったが、腎不全における骨髄での鉄代謝と赤芽球系細胞の分化を検討する中で、内因性エリスロポエチン(EPO)の産生低下が主因であるとする従来の考え方が必ずしも腎不全モデルではあたらぬことが明らかとなり、研究の方向性が変わってきた。最近、EPO欠損マウスや慢性炎症マウスモデルで、赤芽球分化に影響が見られるとの報告があり、EPOの産生と同様にヘプシジンの高値に伴う鉄代謝もまた腎性貧血の進行に影響を及ぼしているのではないかと考え、腎性貧血の主因を探ることとなった(1, 2)。

3. 研究の方法

当初は C57BL/6J マウスを用いて 5/6 腎摘モデルの作成を行った。8 週齢、雄性 C57BL/6J マウスを麻酔下に片腎摘し、その 1 週間後に対側の 2/3 腎摘を行った。血液検査や尿検査にて腎不全状態や貧血の程度の確認を行い酸化ストレスマーカー 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG) の測定を行った。また real time PCR で鉄取り込み蛋白 ((divalent metal transporter 1 (DMT1), transferrin receptor (TfR)) や鉄汲みだし蛋白 (ferroportin 1 (FP1)), ミトコンドリア蛋白 Frataxin の発現の程度を検討した。また、大腿骨より骨髄細胞を採取し、flow

cytometry (FACS) を用いて赤血球分化の程度について、正常と腎不全の違いの有無などについて検討した。しかし 5/6 腎摘モデル作成の中で、麻酔や手術による侵襲、残存腎の程度の差にばらつきがあるため貧血・鉄代謝の変動が大きくなり、安定した貧血状態での検討が困難であるなどの問題があり、アデニン投与による慢性腎不全モデルマウスの作成を試みることとなった。

8 週齢、雄性の C57BL/6J マウスにコントロール群 (C 群) には 0%、腎不全群 (RF 群) には 0.15% から 0.3% のアデニンを含む飼料を 8 週間投与することにより安定した腎不全状態を得ることができるようになった。

そこで、腎不全状態を惹起した後、血液、大腿骨、脛骨、肝臓、脾臓を採取した。大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞と脾臓細胞を用いて、CD71 および Ter119 抗体を用いて flow cytometry (FACS) 法により赤芽球系の分化を検討した。また、血液・生化学検査を用いて貧血や腎不全の程度、血清鉄、フェリチン、ヘプシジンなどの鉄代謝に関連する項目を検討した。また real time PCR 法により肝臓の HAMP (ヘプシジン) mRNA、腎臓の EPO mRNA、とともに肝ヘプシジンを調節するとされる骨髄細胞の Fam132b 等を検討した。

4. 研究成果

5/6 腎摘マウスモデルにおける結果：血液検査において 5/6 腎摘マウスの BUN 60-90 mg/dL の高窒素血症と Hb 7-10g/dL 程度の貧血を認めた。また観察においてはマウスと比して体重増加が乏しく、皮膚の状態も乾燥し、脱毛が著しかった。尿中 8-OHdG については 5/6 腎摘マウスでは上昇すると予想していたが、測定不可のサンプルが多く、一定の結果に至っていない。Real time PCR については正常マウスと 5/6 腎摘マウスの心臓、腎臓、肝臓、脾臓を用いて FP1、DMT1、TfR、Frataxin の発現をみたところ、正常マウスに比して 5/6 腎摘マウスでは FP1、Frataxin の発現低下、DMT1、TfR の発現亢進の傾向が見られた。骨髄細胞の FACS による検討では、Ter119 および CD71 の発現から、正常マウスと比して 5/6 腎摘マウスでは有意ではないが Ter119(-)CD71(+) 細胞が多いことから、未熟な赤芽球が多い傾向が示唆された。しかし手術・腎不全状態・実験手技の不安定さがあり、一定の結果に至らなかった。

アデニン誘発慢性腎不全マウスモデル (RF 群) における検討：RF 群における血液検査では、C 群と比して BUN 111.7 ± 3.15 vs. 31.90 ± 0.94 mg/dL と有意に上昇を認め、Hb 8.89 ± 0.32 vs. 13.44 ± 0.11 g/dL と有意な低下を認め、明らかな高窒素血症と貧血を呈していた。Real-time PCR については以下にも示す通り肝臓の Hamp (Hepcidin) mRNA および腎の EPO mRNA 発現増加に加え、心筋における FP1 mRNA 発現と Frataxin mRNA 発現の低下、腎の TfR mRNA の発現

の有意な増加を認めた。また、TNF などのサイトカインを調節する蛋白であるZFP(Zink finger protein) mRNA 発現の有意な増加を肝・脾臓において認めた。

大腿骨・脛骨由来骨髓細胞の FACS を用いた検討から、RF 群で主に骨髓細胞における前赤芽球 (CD71+/Ter119-) と好塩基性赤芽球 (CD71+/Ter119+) の割合の減少を認め、特に大腿骨由来骨髓細胞では、その変化は有意であった(図1、図2)。

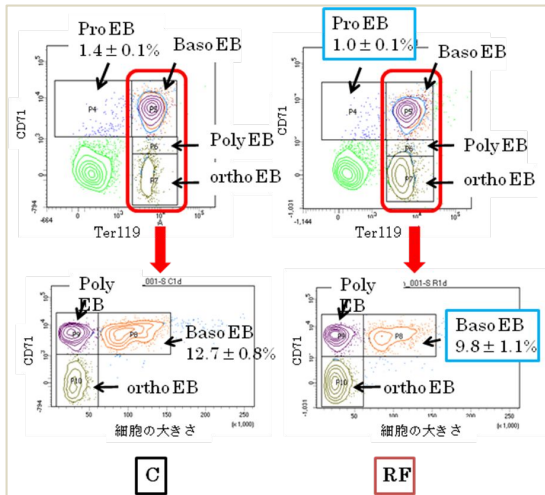


図1：大腿骨骨髓細胞の FACS による解析
ProEB, proerythroblast 前赤芽球; BasoEB, basophilic erythroblast 好塩基性赤芽球; polyEB, polychromatic erythroblast 多染性赤芽球; orthoEB, orthochromatic erythroblast 正染性赤芽球

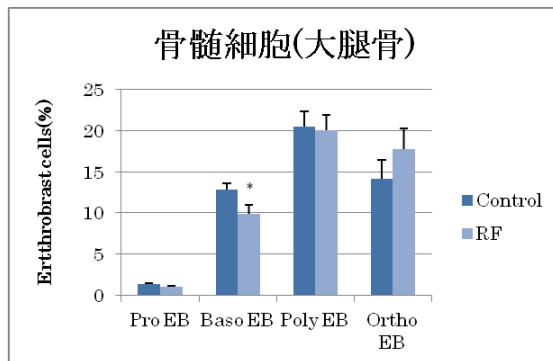


図2：図1の定量結果 (*p<0.05)

一方、脾臓細胞の FACS 解析では、未熟な赤芽球 (CD71+/Ter119-) および成熟赤芽球 (CD71-/Ter119+) とともに有意差は認めなかった(図3、図4)。

また、FACS による骨髓細胞での apoptosis の検討では、赤芽球系細胞の eryptosis の亢進は認めず、必ずしも赤血球寿命の短縮は認めなかった。

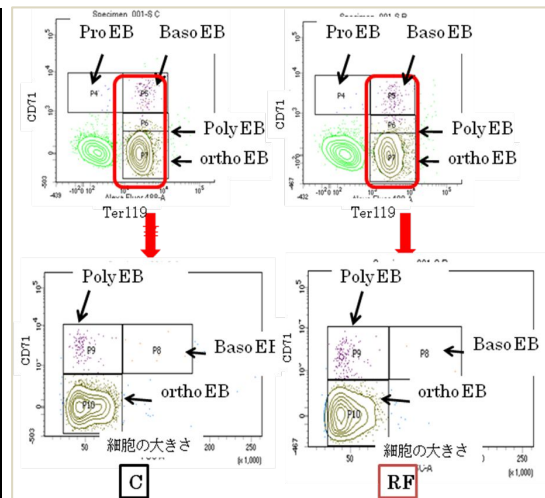


図3. 脾臓細胞の FACS による解析

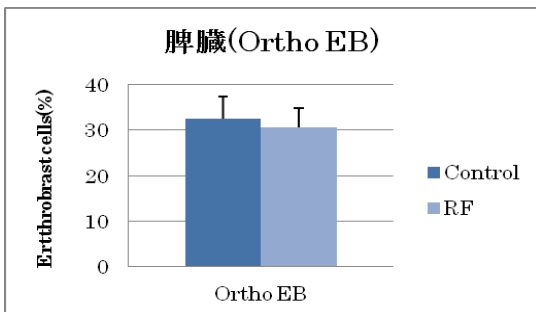
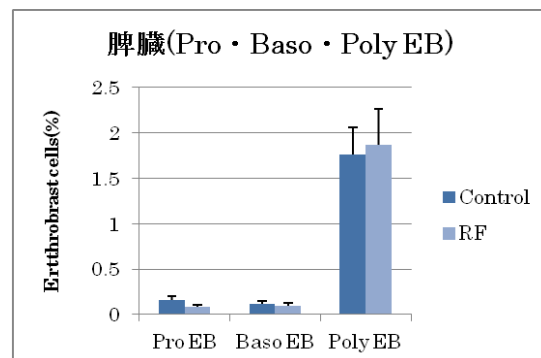


図4. 図3の定量結果 (n.s.)

RF 群における血清 EPO 濃度は C 群と有意差を認めなかった (154.80 ± 10.21 vs. 147.11 ± 15.16 pg/mL) が、real time PCR では腎臓の EPO mRNA の有意な増加をみとめた (図5)。

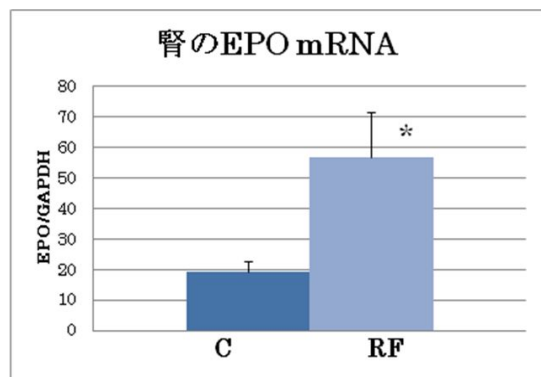


図5. 腎 EPO mRNA 発現 (* p < 0.05)

すなわち、従来腎機能障害に伴う貧血の原因としてEPOの産生低下や赤血球寿命の短縮が主因と考えられてきたが、本研究では骨髓細胞の分化過程でEPOによる影響が少ないと考えられる赤芽球系の後期分化に主因がある可能性が示唆された。

また、RF群では血清Hepcidinの高値とともに、血清鉄の低下(図6)、血清フェリチンの上昇(図7)を認め、同時に肝臓のHAMP(ヘプシジン)mRNAの有意な増加(図8)も確認した。

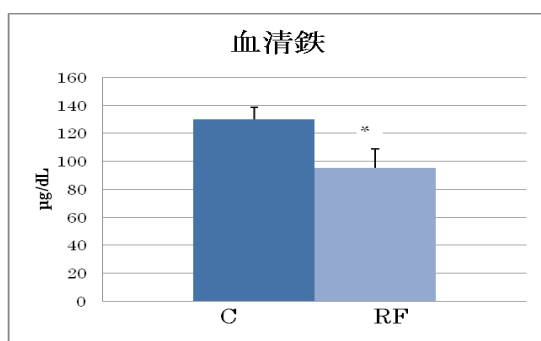


図6. 血清鉄濃度 (* p<0.05)

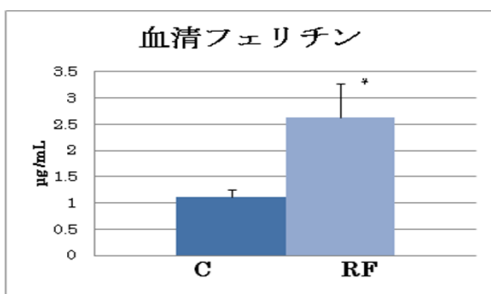


図7. 血清フェリチン (* p < 0.05)

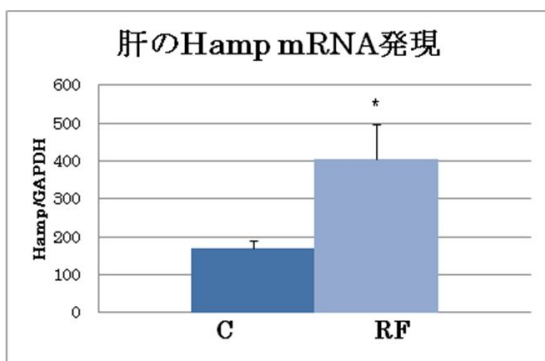


図8. 肝Hamp mRNA発現 (* p<0.05)

以上の結果から、骨髓細胞の後期分化の異常の原因として、これらの細胞でのTfR低下とヘプシジン増加による鉄代謝障害、血清鉄の低下などが赤芽球系の後期分化と関連する可能性が示唆された。またRF群における血清EPO濃度はC群と有意差を認めなかったが、real time PCRでは腎臓のEPO mRNAの増加をみとめ、今後この差異についての検討が必要であることが明らかになった。また、今後さらに骨髓細胞のFam132bについても確

認し鉄代謝の検討が必要である。

引用文献

- 1) B.M. Zeigler et al. A mouse model for an erythropoietin-deficiency anemia Disease . Models & Mechanisms 3, 763-772 (2010)
- 2) W.P. Lafuse et al. Leishmania donovani Infection Induces Anemia in Hamsters by Differentially Altering Erythropoiesis in Bone Marrow and Spleen. PLOS ONE March 2013 , Volume 8, Issue 3

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

代表者名：Tomoko Kimura, Kiyoko Yamamoto, Yuki Morikami, Sayuri Kawada, Takanori Nagai, Masayoshi Nanami, Yukiko Hasuike, Takahiro Kuragano, Takeshi Nakanishi

標題： Pathophysiology of anemia in a mouse model of chronic kidney disease; hepcidin and erythropoiesis

学会名：第 53 回欧州腎臓学会・欧州透析移植学会(ERA-EDTA 2016)

発表年月日：2016年5月22日

都市名(国名)：ウィーン(オーストリア)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中西 健(NAKANISHI, TAKESHI)

兵庫医科大学 医学部・教授

研究者番号：70217769

(2)研究分担者

倉賀野 隆裕(KURAGANO, TAKAHIRO)

兵庫医科大学 医学部・准教授

研究者番号：60411998

蓮池 由起子(HASUIKE, YUKIKO)

兵庫医科大学 医学部・講師

研究者番号：80399146

(3)連携研究者

なし