

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09874

研究課題名(和文)鉄過剰が免疫機能に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文)The impact of iron overload on immune function

研究代表者

江副 幸子 (Ezoe, Sachiko)

大阪大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：90379173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：頻回の輸血による鉄過剰は、造血幹細胞移植後のGHDや骨髄異形成症候群をはじめとする自己免疫疾患に影響を及ぼすことが示されてきた。本研究では、in vitroにおけるnaive T細胞からの分化過程において鉄負荷はIL-6やIL-21の産生を通じてTh17>Tregへの誘導を促進することで免疫を有意に増強することを示した。また、GVHDモデルマウスや腸炎モデルマウスにおいて鉄負荷がTh17の腸粘膜への浸潤を通じて腸炎を悪化させていることを示した。すなわち、鉄過剰状態は、免疫機能を増強することで様々な免疫疾患の病態に関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄の過剰状態が人体の様々な機能に影響することは知られているが、免疫機能に対する影響は明らかにされていない。本研究では鉄負荷がTreg/Th17バランスに影響を及ぼすことを示したが、これらは自己免疫に大きく関わっていることが知られている。骨髄異形成症候群(MDS)では頻回の輸血が必要であり、鉄の過剰が貧血だけでなく、骨髄異形成症候群の病態そのものに影響しているのであれば、鉄負荷のコントロールの重要性はさらに増す。一方、造血幹細胞移植後の様々な合併症は複雑で原因究明が困難であるが、鉄負荷の軽減することにより移植後のGVHDを軽減することができれば移植の成績の改善につながる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that frequent infusion of red blood cells has an impact on the condition of GVHD after hematopoietic stem cell transplantation and autoimmune disease including MDS. In this study, we showed that, in vitro, iron overload can enhance the immune function through the production of cytokines and thus the induction of Th17>Treg differentiation. And in in vivo mouse enterocolitis and GVHD models, we demonstrated that iron overload magnifies the disease inducing Th17 cell-infiltration into intestinal mucosa. Thus, iron overload is deeply involved with the condition of various immune disease through enhancing the immune function.

研究分野：血液内科

キーワード：鉄過剰 免疫機能 GVHD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血や骨髄異形成症候群(MDS)などの難治性貧血や、骨髄移植に先立つ化学療法を行った患者においては、多くの場合頻回の赤血球輸血が必要となる。頻回の輸血により過剰に取り込まれた鉄は、主に肝臓、心臓、脾臓などに蓄積して臓器障害を引き起こす。しかし、2005年にMDSにおける輸血依存による血清フェリチン値がMDSの独立した予後因子であることが明らかにされて以来(Malcovati et al, J Clin Oncol. 23;7594,2005)、輸血依存による鉄過剰症は、再生不良性貧血やMDSの病態をさらに悪化させる要因であることが明らかにされてきた。申請者の教室においても鉄過剰症が赤血球造血に及ぼす影響について研究を行い、ROSを介した赤芽球傷害の機構などが明らかにされつつある。

これら、輸血により汎血球減少を生じる病態においては、重篤な免疫抑制状態となる一方、疾患の病態に自己免疫が関与していることも示唆されている。また、鉄過剰状態が免疫力低下をもたらし、それが腫瘍の発生に影響していることが示されてきた。1995年Arosaらは、鉄はT細胞の機能を弱めることにより免疫力を低下させることを明らかにし(Arosa et al, Cell Immunol.161;138, 1995)、その後、多くのがんの発生や予後と貯蔵鉄のレベルとの関わりが報告されてきた。

一方、骨髄移植前の血清フェリチン値と移植後の有害事象、死亡率、特に真菌感染症やGVHDの発生率や重傷度に対する強い相関があることが示され、さらに移植前に鉄を除去することがGVHDの発生を低下することも報告された。

本研究では鉄過剰のマウスモデルを作成し、マウス末梢血やその他免疫関連臓器におけるT細胞のレパトアの変化を解析し、また、その分子的機構についても解析する。

2. 研究の目的

再生不良性貧血や骨髄異形成症候群などの難治性貧血における輸血後鉄過剰症の病態研究が進み、新たな経口鉄キレート剤デフェラシロクスの開発も行われる中で、鉄過剰症の様々な病態が明らかにされてきた。骨髄移植においては感染症、GVHDなど患者の免疫機能はその予後を決定する重要な因子となり、その病態を明らかにすることはきわめて重要であるが、鉄過剰状態が免疫機能に及ぼす影響についてその詳細はまだまだ明らかにされていない。申請者は、マウスの生体内で鉄過剰のモデルを作成し、それにより免疫担当細胞、特にT細胞のレパトアに及ぼす影響を解析するとともに、その分子的機構についても解析する目的で本研究を計画した。

3. 研究の方法

鉄負荷マウスにおける末梢血、その他免疫組織における免疫担当細胞の増減、特にT細胞の分画について解析する。制御性T細胞やTh17細胞の分化に及ぼす影響とその分子的機序、サイトカインの影響について検討する。また、それらの免疫細胞全体のネットワークの中での影響について解析する。一方、in vitroでのTreg、Th17の誘導培養系においても鉄負荷やその他の細胞の影響について検討する。

さらに患者検体を用いた解析により、鉄負荷が実際の疾患の病態にどのように関わっているかについても検討を加える。

(1)マウス鉄負荷モデルの確立

鉄過剰マウスのモデルとして短期間に過剰な鉄を投与することでacuteモデルとしてどのような影響がでるのか？さらにより実際の輸血依存患者の状態をより反映させるためよりを長期に投与した場合のsubacute鉄過剰モデルを構築した。

ヒト換算で

200単位×18日 (acuteモデル)

50単位 1回/週×25週 (subacuteモデル)

(2) 鉄負荷マウスの末梢血、胸腺、脾臓における免疫担当細胞の分化制御についての解析

末梢血、脾臓、の細胞分画を FACS により解析する。特に Treg、Th17 はそれぞれ、CD4+/FoxP3+、CD4+/IL17A+細胞として検出する。

さらにそれらのマウスにエグジエード（鉄キレート剤）を投与することにより、細胞の分画の変化が解除されるかどうかについても検討する。それにより細胞現象が鉄負荷によるものであることを検証する。

それらのマウスにおいて、さらに以下の検討を行う。

血清のサイトカイン濃度を検索する。（TGF、IL-2、IL-6、IL17、IFN など）

末梢血のマクロファージを単利し、サイトカイン産生について検討する。

免疫関連組織におけるナイーブ T 細胞を分離し、サイトカイン、転写因子の発現について検討することにより、鉄負荷による免疫の乱れの機序について検討する。

Treg の分化に必要であるとされている FoxP3 や、Th17 の分化に必須の分子 ROR γ t の mRNA の発現について、PCR を用いて解析する。これらの検討により、鉄過剰が免疫細胞の分化に及ぼす影響とそのメカニズムについて検討する。

(3) in vitro Treg、Th17 細胞培養系の確立と鉄負荷の影響

我々は、in vitro における Treg 及び Th17 細胞分化誘導の培養系をすでに確立している。正常マウスの脾臓からナイーブ T 細胞を CD4+/CD62L+細胞として分離する。さらにそれらの細胞を CD3 抗体、CD28 抗体、IL-4、IFN γ 、TGF β 存在下で培養すると、多くは FoxP3 陽性の Treg に分化するが、IL-4、IFN γ の代わりに IL-6、IL-1 β を加えると、Th17 への分化を誘導することができる。

それらの分化誘導培養系において、培養上清に鉄を加えることにより、鉄が T 細胞分化に及ぼす直接の影響を検討する。しかし、他のエフェクター細胞が存在することがその細胞分画の変化には必要である場合も考えられ、その場合は in vitro でのそれらの細胞の影響を検討するために、マクロファージや他の分画の T 細胞を加えることにより、パラクライン効果についても検討する。

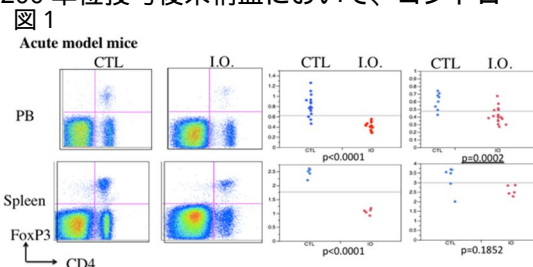
また、マクロファージ単独の培養系において培養上清中に鉄を加えることにより、マクロファージの活性、サイトカイン産生能について解析する。

4. 研究成果

(1) 鉄過剰モデルマウスにおける末梢血及び免疫関連組織の細胞分画の検討

Acute モデルおよび subacute モデルのマウスにおいてそれぞれの末梢血細胞分画に及ぼす影響について検討した。Acute モデルでは、4 日間の 200 単位投与後末梢血において、コントロールのマウスに比べて Hb、好中球、単球は有意に増加していたが、血小板、リンパ球（T 細胞、B 細胞共に）減少を認めた。一方、Treg は他のリンパ球による免疫応答の制御において中心的役割を果たすことから、鉄過剰が免疫システムに及ぼす影響を検討するため、acute モデルと subacute モデルにおけるマウス末梢血 CD4 陽性細胞中の Treg の割合について検討したところ、両方のモデルにおいて Treg の割合は末梢血でも脾臓でも減少していた（図 1）。

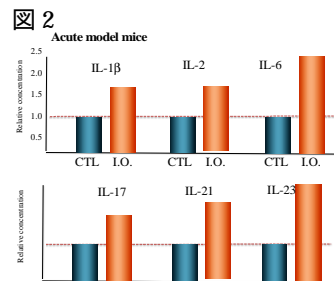
CD4 陽性細胞は Th1、Th2、Th17、Treg の 4 つの分画に分かれ、中でも Th17 は IL17 を産生し Treg と密接な関係を持ちながら Treg とは逆に免疫を刺激する働きを持つことが報告されている。我々は、GVHD の病態の解析を検討するため、さらに大腸および小腸の粘膜固有層リンパ球（LPL）における Th17 の細胞比率を検討した。Subacute モデルにおいて大腸および小腸の LPL では鉄過剰により Th17 細胞が有意に増加していた。これらの結果から鉄過剰状態は急性



期においても慢性期においても naïve Th から Th17 を有意に誘導し、Treg を減少させることが示唆された。

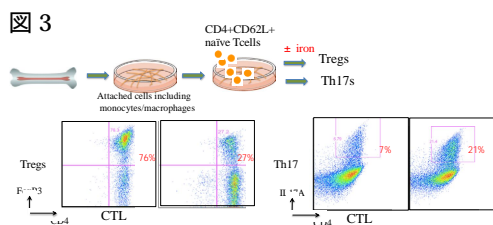
(2) Treg 及び Th17 における遺伝子発現の解析

鉄過剰が上記のように Th 細胞を有意に誘導し、Treg を減少させるメカニズムを検討した。naïve Th 細胞から Treg および Th17 への誘導にはそれぞれ FoxP3 と ROR γ t がマスター遺伝子として働くことが報告されていることから、subacute モデルマウスの脾臓の naïve Th 細胞を分離し、それぞれの遺伝子発現について Real-Time PCR で検討したところいずれもコントロールマウスとの相違は認めなかった。一方、T 細胞の分化には、環境および自己分泌性のサイトカインが深く関わっていることも報告されている。そこで我々は、マウス末梢血中のサイトカイン濃度を検討した。Acute モデルにおける結果であるが、鉄過剰により IL-1、IL-2、IL-6、IL-17、IL-21、IL-23 といった炎症性サイトカインは有意に上昇していることが示された(図2)。これらのサイトカインは naïve Th 細胞から Th17 への分化に強く関わっていることが報告されている。



(3) naïve Th 細胞から in vitro における分化誘導における鉄の影響

マウスの脾臓および骨髄から CD4+CD62L+ の naïve T 細胞を分離し、それぞれ適切なサイトカイン存在下で in vitro にて Treg および Th17 に分化誘導を行った。その際培養液中に鉄またはデキストランを添加してその違いを検討した。その結果、脾臓由来の naïve T 細胞では、添加した鉄の濃度依存性に Treg 細胞への分化が阻害され、また骨髄由来 naïve T 細胞の骨髄間質細胞との共培養では同様に Treg への分化が抑制され、また Th17 への分化が有意に誘導された(図3)。さらに、骨髄間質細胞を単独で培養した際、鉄添加により骨髄間質細胞からの IL-23 および IL-6 の分泌がいずれも濃度依存性に上昇していた。



以上より、鉄過剰は、環境の間質細胞などからのサイトカイン分泌を介して Treg と Th17 への分化のバランスを変化させることにより免疫反応を誘導することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Chihara R, Kitajima H, Ezoe S, et al. Effects of residual H2O2 on the growth of MSCs after decontamination. Regen Ther. 査読有, 9, 2018. 111-115. DOI: 10.1016/j.reth.2018.08.003.

Doi Y, Ezoe S, Kanakura Y, et al. Variable SATB1 Levels Regulate Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity with Distinct Lineage Fate. Cell Rep. 査読有, 23, 2018. 3223-3235. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.05.042.

Ishibashi T, Ezoe S, Oritani K, Kanakura Y. Identification of MS4A3 as a reliable marker for early myeloid differentiation in human hematopoiesis. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 495, 2018. 2338-2343. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.117.

〔学会発表〕(計 8 件)

江副幸子、産業化に向けた「学」の取組み、第 18 回日本再生医療学会総会、2019 年

江副幸子、日本再生医療学会における培養技術者の養成、第 18 回日本再生医療学会総会、2019 年

江副幸子、実態調査班の取組、第 18 回日本再生医療学会総会、2019 年

Nagate Y, Ezoe S, Fujita J, Oritani K, Kanakura Y, et al. Ectonucleosidase CD39 Is Highly Expressed on ATLL Cells and Suppresses the Immune Response through the Adenosine

Pathway. 60th American Society of Hematology Annual Meeting. 2018

Ueda T, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y, et al. ESAM on the Cells of Endothelial Lineage Plays an Important Role in the Development of Definitive Hematopoiesis. 60th American Society of Hematology Annual Meeting. 2018

新開泰宏、横田貴史、江副幸子、柴山浩彦、金倉讓他、自分泌/傍分泌サイトカインシグナル伝達を介した白血球幹細胞の自動的ゆらぎ、第 80 回日本血液学会総会、2018 年

長手泰宏、江副幸子、藤田二郎、織谷健司、金倉讓他、ATLL 細胞は CD39 を高発現し、Adenosine 経路を介して免疫応答を抑制する、第 80 回日本血液学会総会、2018 年

土居由貴子、江副幸子、織谷健司、金倉讓他、クロマチン構造制御蛋白 SATB1 はリンパ球分化における造血幹細胞の機能的ゆらぎに關与する、第 80 回日本血液学会総会、2018 年

〔図書〕(計 3 件)

澤芳樹、江副幸子他、日本再生医療学会、テキストブック 再生医療 ~ 創る、行う、支える ~、日本再生医療学会、640 669, 679 692、2019 年

紀ノ岡正博、江副幸子他、バイオロジカルクリーンルームの設計・維持管理と作業員教育、情報技術協会、147 150、2018 年

紀ノ岡正博、江副幸子他、細胞培養加工施設の構築と運営管理の省力・省コスト化、情報技術協会、394 405、2018 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：金倉 讓

ローマ字氏名：Yuzuru Kanakura

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 20177489

研究分担者氏名：織谷 健司

ローマ字氏名：Kenji Oritani

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70324762

研究分担者氏名：水木 満佐央

ローマ字氏名：Masao Mizuki

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 80283761

研究分担者氏名：藤田 二郎

ローマ字氏名：Jiro Fujita

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 90608720