

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：34535

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07181

研究課題名(和文) マクロファージを標的とした輸血後鉄過剰症治療薬の探索

研究課題名(英文) Search for therapy of transfusion iron overload by targeting macrophage

研究代表者

井本 しおん (Imoto, Shion)

神戸常盤大学・保健科学部・客員教授

研究者番号：50263380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージにヘム鉄(ヘミン)が負荷されると、活性酸素種(ROS)産生、不安定鉄(LIP)上昇、細胞死誘導が見られるが、非ヘム鉄では見られないことがわかった。鉄キレート剤はヘミンによる細胞死を抑制した。その作用はデフェラシロクス(DSX)が最強で、治療レベルよりも低濃度で抑制効果が得られた。高脂血症治療薬スタチンはヘミン細胞死を抑制し、DSXと併用すると単独よりも抑制作用を増強した。トロンボポエチン受容体作動薬エルトロンボパグ(ELT)は、低濃度でDSXと同等以上にヘミン細胞死誘導を抑制した。ELTとスタチンの併用、ELTとDSXの併用は、いずれも単独より抑制作用を増強することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

輸血後鉄過剰症では、まずマクロファージがヘム鉄によって傷害され、その後に臓器傷害が進展するため、ヘムによるマクロファージ傷害を抑制することが重要である。我々は、ヒト単球系細胞THP-1と無血清培地によるアッセイシステムを開発し、ヘミンによる細胞傷害を抑制する薬剤を探索した。スタチンが単独でも抑制効果を示すこと、鉄キレート剤デフェラシロクス(DSX)およびエルトロンボパグはいずれも低濃度で抑制作用を示すとともに、スタチンとの併用で抑制効果が増強されることを示すことができた。スタチンを併用すると、より低濃度のDSXで治療効果が得られる可能性を示すことができ臨床的に有意義な成果と思われる。

研究成果の概要(英文)：We have explored therapeutic agents for transfusion iron overload, using human monocyte/macrophage cell line THP-1 and hemin.

We could demonstrate that roading of hemin on macrophage induced ROS (reactive oxygen species) generation and LIP (labile iron pool) elevation and resulted in cell death, but non-heme iron did not. Among three iron chelators, deferasirox (DSX) most effectively suppressed hemin-induced cell death with low concentrations. Statins, cholesterol lowering agents, could suppress hemin-induced cell death. Addition of statin on DSX could enhance suppressive effects. Eltrombopag (ELT), an TPO receptor agonist, suppressed hemin-induced cell death more potently than DSX. Addition of statin on ELT could enhance suppressive effects. Moreover, combination of DSX and ELT enhance suppressive effects more than single use.

研究分野：hematology

キーワード：transfusion iron overload macrophage heme deferasirox eltrombopag statins ferroptosis

### 1. 研究開始当初の背景

高齢や合併症のため強力な化学療法や造血細胞移植を受けられない造血障害患者では、輸血は生命維持および QOL 維持に不可欠である。しかし、長期間の輸血は鉄過剰症をもたらす患者の生命予後を悪化させる。輸血後鉄過剰症の第一選択は経口鉄キレート剤である。(鉄過剰症の診療ガイド 厚生省・造血障害研究班 2008 年)。臨床では経口製剤であるデフェロキサ (DSX) が用いられるが、腎障害などの副作用で継続できなくなる患者が、特に高齢者では少なくない。鉄キレート剤の治療効果を安全に高めることができる薬剤があれば、鉄キレート剤を減量でき、副作用をきたすことなく継続できることが期待される。

鉄は輸血された赤血球のヘム鉄として負荷される。ヘム鉄は、赤血球貪食あるいは遊離ヘムの取り込みにより、まずマクロファージに負荷される。鉄負荷がマクロファージの処理能力を超えると、続発的に鉄負荷が実質臓器へと進行する (Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2008 p166)。したがって、輸血後鉄過剰症の主役は単球/マクロファージであると言える。日本では輸血後鉄過剰症の大部分がこの病態に該当する。しかし、マクロファージを標的とする輸血後鉄過剰症の研究はまだ進んでいない。マクロファージの細胞内で鉄は ROS 産生や脂質過酸化作用などに関与するが、フェリチンと結合することで貯蔵鉄として安定して存在できる。マクロファージ細胞内のフェリチン発現は、鉄負荷による細胞傷害からの防御として重要と思われる。また、ヘム鉄による単球/マクロファージへの細胞傷害は非ヘム鉄よりも強力であり、我々はその機序にフェルトーシスに関与していることを報告している (Imoto et al. Transfus Apher Sci. 57:524, 2018)。ヘム鉄による単球/マクロファージ細胞傷害の機序を解明することは、輸血後鉄過剰症の治療方法開発につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

ヘム鉄による単球/マクロファージの細胞傷害機序の探求と、長期輸血が必要な高齢者が安全に継続できる輸血後鉄過剰症治療方法を開発することである。具体的目標は以下の 2 項目である。

ヘム鉄によるマクロファージの細胞死を、鉄キレート剤と協働的に抑制できる薬剤の探索  
フェリチン発現量の変動がマクロファージのヘム鉄による細胞死に及ぼす影響の検討

### 3. 研究の方法

ヘム鉄の単球/マクロファージのモデルとしてヒト単球系培養細胞株 THP-1、ヘム鉄としてヘミンを用い、無血清培養液を用い、in vitro で細胞傷害を測定した。細胞死は Annexin-V/PI、ROS 産生は CM-H2DCFDA、細胞内不安定鉄 (LIP) は calcein-acetoxymethyl ester (CA-AM)、を各々用いて、フローサイトメトリー (FCM) で測定した。細胞内フェリチン量はウェスタンブロットティング (WB) で測定した。

### 4. 研究成果

ヘミンによるマクロファージの細胞死を、鉄キレート剤と協働的に抑制できる薬剤の探索

- 1) 鉄キレート剤の抑制効果比較：ヘミンの細胞傷害に対する抑制作用を、臨床で使用される 3 種の鉄キレート剤 (DSX、デフェロキサミン (DFO)、デフェリプロン (DFP)) で比較した。抑制作用は、DSX が最も強く、DFP と DFO はほぼ同レベルであった。
- 2) スタチンの抑制効果：高齢者で使用頻度が高い高脂血症治療薬スタチンが、ヘミンによる細胞傷害を抑制できるかどうかを、国内で使用されている 6 種類のスタチン (プラバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチン、ピタバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン) を用いて検討した。いずれのスタチンも細胞死抑制作用を示したが、プラバスタチンの抑制作用は小さく、他のスタチンより 10 倍以上高濃度を要した。プラバスタチンを除く 5 種類のスタチンを比較した結果を示す (図 1)。細胞生存率は無処理で 1、ヘミン処理で 0.7 に低下したが、スタチンで 16 時間前処理すると 0.8~0.9 に回復した。細胞死抑制作用はフルバスタチン (Flu) が最も強かった。

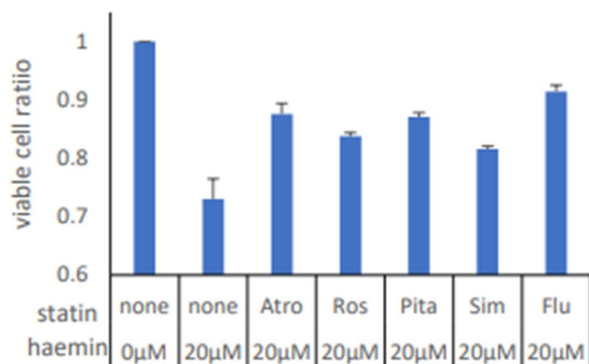


図 1

3) エルトロンボパグの抑制効果： トロンボポエチン受容体作動薬エルトロンボパグ(ELT)は鉄キレート作用がある。ELTは、低濃度(1~4 $\mu$ M)でヘミン細胞死抑制作用を示し、ROS産生およびLIP上昇を抑制した(図2)。ELTは高濃度(8~16 $\mu$ M)では単独で細胞死を誘導した。

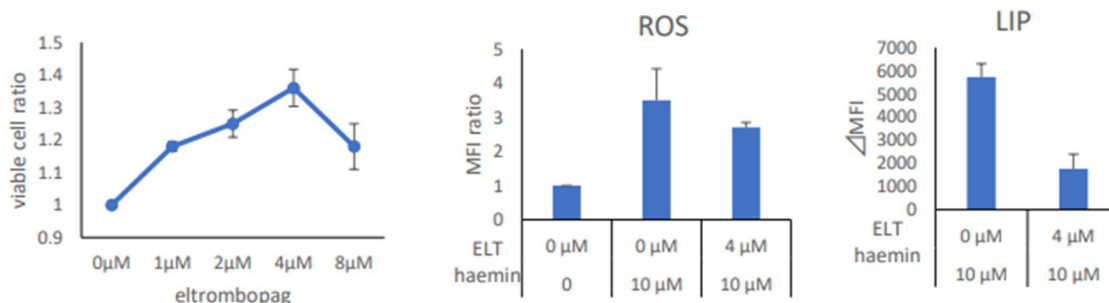


図2 エルトロンボパグによるヘミン細胞傷害の抑制

4) 鉄キレート剤DSXとスタチンFlu、ELTの併用効果：DSXとFluまたはELTを併用するとヘミン細胞死抑制効果を増強できるかどうかを検討した。DSX単独に比べ、Flu併用は抑制効果を増強した。ELT併用も抑制効果を増強した。また、ELTとFluの併用は、単独よりも高い抑制効果を示した(図3)。

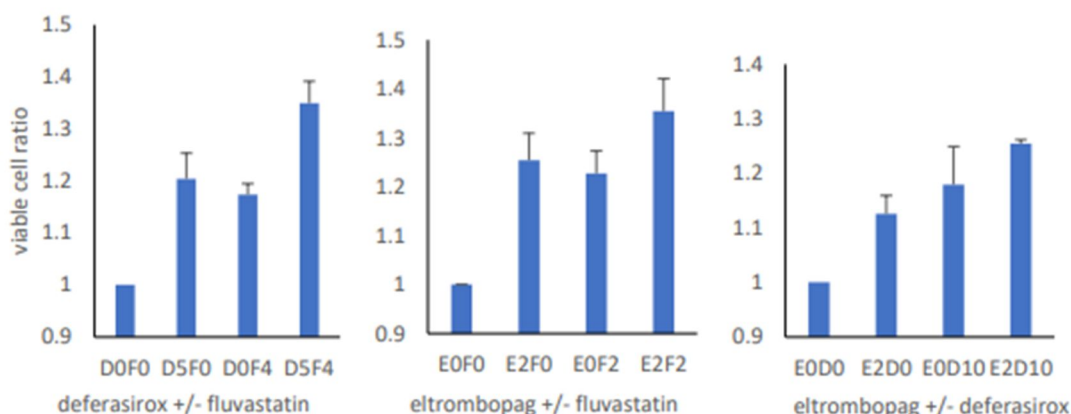


図3 DSX、Flu、ELTの併用によるヘミン細胞死抑制効果の増強

フェリチン発現量の変動がマクロファージのヘム鉄による細胞死に及ぼす影響の検討

- ヘミンまたは非ヘム鉄負荷による細胞内フェリチン量の変動：ヘミンまたは非ヘム鉄(2価鉄：硫酸アンモニウム第一鉄(FAS)、3価鉄：クエン酸アンモニウム第二鉄(FAC))を負荷すると、ヘミン処理では細胞死増加、ROS産生増加、LIP上昇が認められたが、FAC、FAS処理では細胞死、ROS産生、LIP上昇はいずれも軽微であった。WBで測定した細胞内フェリチン発現量は、ヘミン、FAS、FACいずれの処理でも処理前と比べて明らかな変動は見られなかった。ニトロソPSAP法で測定した細胞内非ヘム鉄量は、FAC処理後の方がヘミン処理後よりも高い傾向が認められた。以上の成果は論文報告済みである(Imoto et al. Transfus Apher Sci. 2022 Apr;61(2):103319)。

ヘミンによる細胞傷害機序の検討

- ヘミン処理後の細胞内ヘムオキシゲナーゼ発現量の変動：ヘム/ヘミンは細胞内でヘムオキシゲナーゼ(HO)によって分解され、鉄を遊離する。HOには2つのアイソザイム(恒常的に発現するHO-1と炎症などで誘導されるHO-2)が存在する。細胞内の非ヘム鉄量をニトロソPSAP法で測定すると、ヘミン処理1時間後には上昇し、以後時間および濃度依存性により上昇した。HOの発現量をWBで測定したところ、HO-2はヘミン処理前から発現が認められ、処理後にやや低下傾向を示したが、HO-1はヘミン処理前には検出できず、ヘミン処理4時間後に発現が誘導された。以上の結果から、ヘミンは細胞内でまずHO-2によって分解され鉄を遊離すると考えられた。異常の成果は論文報告済みである(Imoto et al. Transfus Apher Sci. 2019 Dec;58(6):102662)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imoto Shion, Sawamura Tohru, Shibuya Yukiko, Kono Mari, Ohbuchi Ayako, Suzuki Takashi, Mizokoshi Yuji, Saigo Katsuyasu	4. 巻 61
2. 論文標題 Labile iron, ROS, and cell death are prominently induced by haemin, but not by non-transferrin-bound iron	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 103319 ~ 103319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transci.2021.103319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kono Mari, Matsuhiroya Shiori, Obuchi Ayako, Takahashi Takayuki, Imoto Shion, Kawano Seiji, Saigo Katsuyasu	4. 巻 48
2. 論文標題 Deferasirox, an iron-chelating agent, alleviates acute lung inflammation by inhibiting neutrophil activation and extracellular trap formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of International Medical Research	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300060520951015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 井本 しおん, 西郷 勝康, 大淵 絢子, 河野 麻理	4. 巻 14
2. 論文標題 鉄リサイクルと鉄ホメオスタシスにおける単球とマクロファージの役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 神戸常盤大学紀要	6. 最初と最後の頁 1 - 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Imoto Shion, Shibuya Yukiko, Kono Mari, Ohbuchi Ayako, Sawamura Tohru, Suzuki Takashi, Mizokoshi Yuji, Sawada Hirohide, Saigo Katsuyasu	4. 巻 58
2. 論文標題 After haemin treatment intracellular non-haem iron increases prior to haem oxygenase-1 induction: A study in human monocytic cell line THP-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 102662 ~ 102662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transci.2019.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井本しおん、渋谷雪子、澤村暢、西郷勝康、河野麻理 ほか
2. 発表標題 単球系培養細胞THP-1へのヘム鉄負荷後の細胞内鉄量とヘムオキシゲナーゼ発現の解析
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	澤村 暢  (Sawamura Tohru)  (20709042)	神戸常盤大学・保健科学部・講師    (34535)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------