

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790914

研究課題名(和文) 正常造血ならびに白血病発症に体内鉄動態が及ぼす影響についての解析

研究課題名(英文) Effects of iron-overload on normal hematopoiesis and disease progression of hematological malignancies

研究代表者

田中 宏和 (TANAKA HIROKAZU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40360846

研究成果の概要(和文)：本研究では、過剰な遊離鉄が造血細胞の増殖、分化、造血支持細胞の特性に及ぼす影響、さらにはMDSクローンの増殖、白血化に及ぼす影響について解析を行った。その結果、過剰鉄は造血細胞への直接的、造血支持細胞を介した間接的作用により造血を障害することが明らかとなった。また、過剰鉄は正常造血を障害すると同時に、MDSクローンの選択的増殖を誘導し、病勢の進展に寄与している可能性が示唆された。これらの結果は、種々造血器障害の発症機構や治療の方向性を体内鉄動態の観点から考える上で意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted the analyses regarding how does excessive “free” iron affect the growth and differentiation of hematopoietic cells as well as the characteristic of hematopoietic stromal cells. In addition, we investigated the effects of iron overload on the proliferation of MDS clones and the pathological transformation of MDS. As a result, excessive iron impairs hematopoiesis through direct effects on hematopoietic cells and indirect effects mediated by stromal cells. Furthermore, iron overload may induce the selective proliferation of MDS clones during the deterioration of normal hematopoiesis and may be involved in the leukemic transformation. These results are significant to reveal the mechanism and treatment of various hematopoietic disorders in terms of iron-kinetics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：過剰鉄、造血幹細胞、ストローマ細胞、活性酸素種、造血器腫瘍

1. 研究開始当初の背景

生体内において鉄は必須の金属である一方で、遊離鉄は細胞傷害をもたらす活性酸素種(Reactive Oxygen Species, ROS)を生成する。そのため主として血清中では輸送タンパクであるトランスフェリン(以下 Tf)、細胞内ではフェリチンに結合して存在している。しかしながら鉄過剰症や感染症などでは Tf と結合しない鉄(non-transferrin bound iron, NTBI)が血清中に生じていること、また細胞内においても鉄の取込み、利用、貯蔵という過程の中で細胞内小器官間を速やかに行き来する不安定な鉄のプール(labile iron pool, LIP)が生じていることが知られているが、NTBI や LIP の生理的意義や病態との関連は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、体内鉄動態特に NTBI-LIP がどのような機構を介して細胞の増殖、分化、死を制御しているのか、また幹細胞の未分化性維持とはどのような関連があるのか、さらにはその異常がどのような病態をもたらすのかについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 試薬

遊離鉄には硫酸アンモニウム鉄(II)(FerAS)を用い、コントロールとして溶媒である 2mM クエン酸ナトリウム(CTL)を用いた。

(2) マウス骨髄からの造血幹/前駆細胞の分離

Akashi らが確立した方法(Nature 404, 193-197, 2000)に準じ、6-8 週齢のマウス骨髄より下記表面マーカーの細胞を分離した。Lin⁻, Sca-1 high, c-kit high (LSKs)

(3) 細胞培養、コロニーアッセイ

分離した LSKs をサイトカイン(SCF, FL, TPO, IL-6, IL-3)添加培地にて培養し、4 日、7 日における増殖率を ATP アッセイにて測定した。培養後の細胞をメチルセルロース培地(MethoCult H4434)に播種し、各々から形成されるコロニーの種類を 2 週後に観察した。

(4) フローサイトメトリー

細胞内 ROS, LIP については RedCC-1, Calcein-AM(Invitrogen 社)を用いて半定量的に測定した。表面抗原については培養細胞を用いて各分化段階に特異的なマーカーにて染色し評価した。また細胞内 MAPK, NF-κB のリン酸化変化については PhosphoFlow(BD 社)を用いて検討を行った。

(5) OP9 システム

マウス ES 細胞を LIF 非存在下に OP9 stroma 細胞と共培養し、day4.5 に中胚葉系の細胞を採取、至適サイトカイン存在下で再度 OP9

stroma 細胞と共培養し、得られた成熟血球につき解析した。

(6) LSKs にレトロウィルスの系を用いて MDS の原因遺伝子である Runx1 の C 末欠損体(AMLdC)ならびに Evi1 を導入し、(3)と同様の検討を行った。

(7) 倫理面の配慮

大阪大学医学部動物実験施設における委員会の承認のもと本実験を実施した。

4. 研究成果

(1) liquid culture の系における鉄負荷の影響を解析した結果、培養液中に FerAS を添加した場合、CTL と比較して、濃度依存的に LSK 細胞の増殖が抑制された。次に培養 2 日目の LSK 細胞内の Fe 量ならびに細胞内 ROS 量について検討した。Fe 量の判定には Calcein-AM を、ROS 量の判定には RedCC-1 を用いた。FACS にて解析した結果、CTL と比較して FerAS を添加した場合、細胞内 Fe 量が多い細胞においてより多くの ROS の蓄積が認められ、また細胞内 Fe 量が多い細胞は 7-AAD 陽性であり、鉄負荷により細胞死が誘導されていることが示唆された。

次に同じ 2 日間培養した LSK 細胞を用いて、種々ストレス応答に重要な MAPK 及び NF-κB のリン酸化変化について FACS にて検討した結果、FerAS 添加により p38MAPK 及び JNK/SAPK のリン酸化が CTL と比較して増強していた。さらに FerAS 添加による p38MAPK のリン酸化は、抗酸化剤である NAC により、また細胞死は p38MAPK inhibitor, SB203580 や NAC により抑制されたことから、鉄負荷による造血細胞の増殖抑制、細胞死には、生じた ROS により持続的に活性化された p38MAPK を中心とした経路が強く関与していると推測された。

(2) 次に、より生理的な条件下での鉄負荷による影響を解析するため、マウス骨髄単核球及び LSK 細胞を造血支持細胞である MS5 と共培養した。この系では培養 4 日ごろより未分化な血液細胞が MS5 の下に潜り込み、敷石上の cobblestone-like area を形成、その後盛んに増殖、分化した血液細胞が浮遊してくる像が観察される。この系に FerAS を添加し検討を行った。まず共培養による cobblestone-like area 形成能に鉄負荷が及ぼす影響について検討した。共培養 7 日目 CTL では cobblestone-like area 形成が認められ、多くの浮遊細胞の出現が観察されたのに対し、FerAS を添加した場合、濃度依存的に潜り込みの頻度は低下し、さらに浮遊細胞の数も減少する傾向にあった。

共培養による未分化細胞の維持について FACS にて検討を行った結果、共培養 7 日目 FAS 添加の有無にかかわらず、多くの細胞が

lin 陽性を示しており分化が誘導されていたが、CTL では表面マーカー上 LSK 細胞と同様の細胞を数パーセント認めたのに対し、FerAS を添加した場合これらの細胞を認めなかった。また7日間培養後の細胞のコロニー形成能は、FerAS 添加により CFU-Mix, GM, E その種類にかかわらず濃度依存的に減少する傾向にあった。

培養後の細胞における分化マーカーの発現について解析を行った結果、FerAS 添加の有無にかかわらず多くの細胞が Gr-1、B220 といった顆粒球、単球系、及び B cell 系のマーカーを発現していたが、FerAS 添加により赤芽球系のマーカーである Ter119 を発現している細胞を濃度依存的に多く認めた。

(3) さらに血球の発生、分化過程に鉄負荷が及ぼす影響について、OP9 system を用いることでより詳細に検討を行った。SCF, IL-3, EPO 存在下で分化を誘導した場合、赤芽球系その他、顆粒球や巨核球など種々の細胞が確認されたが、FerAS を添加した場合、CTL と比較して多くの細胞が Ter119 陽性を示し、またより多くの細胞が 7-AAD 陽性を示した。

得られた血球を Ter119 及び Tfr (CD71) で染色し、赤芽球系細胞の成熟度を proerythroblast, immature erythroblast, mature erythroblast, erythrocyte の4分面に分類した場合、分化誘導後 CTL ではいずれの fraction の細胞も確認できたが、FerAS 添加により細胞の分化が immature erythroblast で停止していた。

形態的には CTL では正染性～多染性の赤芽球に加え、一部には脱核した赤血球が観察されたのに対し、FerAS 添加により大型で多核の異形成の強い細胞が多く観察された。

またサイトカインの組み合わせを変えることで骨髓単球系、巨核球系へ分化を誘導した場合、いずれの lineage においても FerAS 添加によって若干強く分化が誘導される傾向にあり、またより多くの細胞に細胞死が誘導された。しかしながら各 lineage、形態的には赤芽球系ほど強い異形成は認められず CTL に近い形態を示した。

以上の結果から、過剰鉄は造血細胞において ROS の産生、p38MAPK, SAPK/JNK pathway の活性化を誘導し、増殖抑制、細胞死誘導、赤血球系の分化異常など無効造血の病態をもたらす可能性が示唆された。

(4) 一方、MDS の原因遺伝子の一つである AML1dC、あるいは MDS から AML への移行に関わる Evi1 をマウス造血細胞に導入し、鉄負荷の影響について検討を行った結果、これらのクローンは遊離鉄負荷による細胞死に抵抗性を示した。

以上の結果から、過剰な鉄負荷は正常造血を抑制する一方で MDS クローンの選択的な増殖を誘導し、その病態の進展に関与している可

能性が示唆された。

これらの結果は、鉄過剰が造血システムに及ぼす影響、さらには鉄過剰と造血器障害の進展との関連を明らかにしたものであり、種々造血器障害の発症機構や治療の方向性を体内鉄動態の観点から考える上で意義深いものと考えられる。

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7件)

- ①Fujita J, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y. Myeloid neoplasm-related gene Abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. *Immunol Lett.* 査読あり 136(1):61-73. 2011.

- ②Saito Y, Shibayama H, Tanaka H, Tanimura A, Kanakura Y. A cell-death-defying factor, anamorsin mediates cell growth through inactivation of PKC and p38MAPK. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読あり 405(2):303-307. 2011.

- ③Hara M, Mizote I, Nakaoka Y, Tanaka H, Asano Y, Sakata Y, Komuro I. A case of non-cardiogenic acute pulmonary edema in a patient with POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Hematol.* 査読あり 90(4):489-490. 2010.

- ④Shimomura Y, Hara M, Mizote I, Nakaoka Y, Tanaka H, Asano Y, Sakata Y, Komuro I. Sildenafil and steroid therapy effectively improved POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension.

Int J Hematol. 査読あり 92(5):774-776. 2010.

⑤Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Matsui K, Shibata M, Tanimura A, Oritani K, Matsumura I, Kanakura Y. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1. J Biol Chem. 査読あり 285 (41):30045-30056. 2010.

⑥Fukushima K, Matsumura I, Ezoe S, Tokunaga M, Yasumi M, Satoh Y, Shibayama H, Tanaka H, Iwama A, Kanakura Y. FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells. J Biol Chem. 査読あり 284(12):7719-7732. 2009.

⑦田中宏和, 松村 到, 金倉 譲. 白血病幹細胞研究の動向. Biotherapy. 査読なし 23:364-370. 2009

[学会発表] (計 18 件)

①Satoh Y, Tanaka H, et al. A chromatin modifier SATB1 promotes lymphocyte production from primitive hematopoietic stem/progenitor cells. The American Society of Hematology 52nd Annual meeting. 2010. 12. 4-7. Orlando (USA)

②Fujita J, Tanaka H, et al. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect FLT3-ligand mediated dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. The American Society of Hematology 52nd Annual meeting. 2010. 12. 4-7. Orlando (USA)

③Tanaka H, Matsumura I, Kanakura Y, et al. Iron-overload impairs normal hematopoiesis and would contribute to disease progression of MDS. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010. 9. 24-26. パシフィコ横浜、神奈川

④ 藤田 二郎, 田中宏和 他. Leukemia-related gene abnormalities affect FLT3-ligand-mediated dendritic

cell differentiation. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010. 9. 24-26. パシフィコ横浜、神奈川

⑤徳永正浩, 田中宏和 他. BCR-ABLは下流の Rasシグナルを介して赤芽球造血を抑制し、その抑制にはp21CIP1/WAF1 が関与する. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010. 9. 24-26. パシフィコ横浜、神奈川

⑥Tanimura A, Tanaka H, et al. Anti-apoptotic molecule Anamorsin is crucial for stromal function to support embryonic hematopoiesis. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010. 9. 24-26. パシフィコ横浜、神奈川

⑦松村 到, 田中宏和. AML幹細胞の特性解析. 第 69 回日本癌学会学術総会(招待講演) 2010. 9. 22-24. 大阪国際会議場、大阪

⑧Tanaka H, et al. Effects of iron-overload on normal hematopoiesis and disease progression of myeloid malignancies. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010. 9. 22-24. 大阪国際会議場、大阪

⑨ 藤田 二郎, 田中宏和 他. Leukemia-related gene abnormalities affect steady-state dendritic cell differentiation. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010. 9. 22-24. 大阪国際会議場、大阪

⑩徳永正浩, 田中宏和 他. The activated Ras signal suppresses erythropoiesis downstream of Bcr-Abl by inducing p21CIP1/WAF1. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010. 9. 22-24. 大阪国際会議場、大阪

⑪ 齋藤 有理, 田中宏和 他. A cell-death-defying factor, anamorsin, yields cell growth through inactivation of p38MAPK. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010. 9. 22-24. 大阪国際会議場、大阪

⑫Tanaka H, et al. Excessive reactive iron affects both immature hematopoietic cells and stromal cells, thereby impairing total hematopoiesis. 1st JSH International Symposium 2010. 6. 16-17. Akita University, Akita

⑬Tokunaga M, Tanaka H, et al. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1 15th Congress of the European Hematology Association 2010. 6. 10-13 Barcelona (Spain)

⑭Tanimura A, Tanaka H, et al. Essential role of an anti-apoptotic molecule Anamorsin for both intrinsic and extrinsic regulation of murine fetal liver hematopoiesis. 15th Congress of the European Hematology Association 2010. 6. 10-13 Barcelona (Spain)

⑮Sato S, Tanaka H, et al. C-terminal mutation of RUNX1 deteriorates DNA damage-repair response and promotes the development of acute myeloid leukemia. The American Society of Hematology 51st Annual Meeting. 2009. 12. 5-8. New Orleans (USA)

⑯Sato S, Tanaka H, et al. RUNX1 controls nucleotide excision repair (NER) system through transcriptional regulation of Gadd45a. 第 71 回日本血液学会学術集会 2009. 10. 23-25. 京都国際会議場、京都

⑰谷村 朗, 田中宏和 他. 抗アポトーシス分子Anamorsinの造血幹細胞における発現と機能解析. 第 71 回日本血液学会学術集会. 2009. 10. 23-25. 京都国際会議場、京都

⑱松村 到, 田中宏和, 金倉 譲. 組織鉄の功罪：骨髄における過剰鉄がもたらす毒性. 第 33 回鉄バイオサイエンス学会 2009. 9. 12-13. 倉敷市民会館、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 宏和 (TANAKA HIROKAZU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40360846

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし