

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591377

研究課題名(和文)非トランスフェリン結合鉄による赤血球造血抑制と鉄キレート剤での造血回復効果の検討

研究課題名(英文) Investigation for the inhibition of erythropoiesis by non-transferrin-bound iron and its recovery by iron chelation

研究代表者

生田 克哉 (IKUTA, Katsuya)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00396376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、鉄過剰による造血障害や鉄キレートによる造血回復の機序を、鉄過剰状態で血液中出现する非トランスフェリン結合鉄(NTBI)の関与を含めて明らかにする目的で行った。骨髄鉄沈着、血清鉄とフェリチン上昇、さらにNTBI増加、および造血障害を呈する鉄過剰モデルマウスを作成し、このモデルに鉄キレートを行った群も作成した。骨髄細胞の網羅的遺伝子解析の比較から、糖代謝のTCA回路に關与するACO1やIDH遺伝子発現が鉄過剰に応じて亢進していることが判明した。さらに2-HG増加やDNAメチル化亢進も確認できた。鉄過剰によるこれらの変化が造血障害や白血化をきたす機序の一端を説明できる結果を得たと考えた。

研究成果の概要(英文)：The present study was performed to elucidate the mechanisms for the inhibition of hematopoiesis by iron overload and its recovery by iron chelation. Mice were administrated with iron dextran, and these mice showed iron deposition in bone marrow, increased serum iron and serum ferritin, and non-transferrin-bound iron (NTBI). Iron chelation therapy was also performed for those iron-overloaded mice. Comparison of gene expressions between those models indicated that the expressions of the genes related to glucose metabolism were changed responding to iron status. Among them, the expressions of aconitase and isocitrate dehydrogenase, those were important in TCA cycle, increased in iron overload and improved by iron chelation. 2-hydroxyglutarate (2-HG) and DNA methylation were also increased. Combining our data, iron overload can increase DNA methylation via increase of 2-HG even without any mutation in IDH gene, finally resulting in the inhibition of hematopoiesis or leukemic change.

研究分野：血液内科学

キーワード：非トランスフェリン結合鉄 鉄過剰症 造血障害 糖代謝異常

1. 研究開始当初の背景

鉄は生体内に最も多く存在する金属で、赤血球におけるヘモグロビン (hemoglobin: Hb) 合成、細胞内での酸化還元反応、細胞増殖などに関与し必要不可欠である。しかし、逆に鉄が過剰に存在すると容易に free radical 産生からの細胞障害をもたらす。全身の臓器障害をきたす。そのため、生体内の鉄の量的多寡は厳密に制御されている。ここ十数年間の分子生物学的研究の進展に伴い、多くの新規鉄代謝関連分子が相次いで発見され、数多くの関連分子が密接かつ複雑、巧妙に調節されていることがわかってきた。通常は非常に厳密に制御されている生体内鉄代謝であるが、何らかの原因によってその制御機構が破綻し、生体に鉄が過剰に蓄積してしまう病態が鉄過剰症である。鉄過剰症の原因には、遺伝性ヘモクロマトーシスと呼ばれる各種の鉄代謝関連遺伝子異常に起因する原発性のものや、骨髄異形成症候群をはじめとした無効造血や再生不良性貧血など長期の輸血を余儀なくされるもの、また C 型慢性肝炎、アルコール性肝障害をはじめとする続発性のものなど、多数存在する。この中で、本邦での鉄過剰症の主たる原因は、骨髄異形成症候群や再生不良性貧血などの骨髄不全症に対する輸血に起因する輸血後鉄過剰症であることが我々のこれまでの研究成果を含め判明している (Takatoku M, et al. Eur J Haematol, 2007, Ikuta K et al. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, October 2011, 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「ヘモクロマトーシスの実態調査と診断基準作成」平成 22 年度研究報告書)。

このように鉄過剰症の原因は様々なものが存在するが、細胞内に過剰鉄が蓄積することで細胞障害がもたらされることが本質である。細胞内では過剰鉄から遊離鉄イオンが生じることで活性酸素種の生成を刺激し、DNA 損傷、脂質過酸化、アポトーシスなど組織障害を引き起こし、ひいては、肝機能障害、肝臓の線維化、心筋線維の変性、心肥大、心不全、皮膚の色素沈着、性腺機能障害、糖尿病など全身の様々な臓器の障害をもたらす。生命予後にも影響し、それに対する治療的介入が必要となる。生体は鉄を能動的に体外に放出する機構を備えていないため、過剰鉄を除去する方法として瀉血療法や鉄キレート療法が行われる。瀉血療法は安全かつ効果的な古典的治療法であるが、貧血が存在する病態には適応にならない。本邦で多い鉄過剰症は、骨髄不全での高度貧血に対して輸血を行うことで鉄過剰症となるものあり、瀉血療法は適応とならず、鉄キレート療法が行われる。鉄過剰症を呈する骨髄不全症に対して鉄キレート療法を行うと、鉄過剰により引き起こ

される肝機能障害や心不全といった臨床症状の改善が見込めるが、それだけにとどまらず、造血まで回復する症例がみられることが明らかになってきた。こうした症例は古くに報告はあったが、特に近年新規経口鉄キレート剤 deferasirox が臨床応用され広く鉄キレート療法が施行されるようになって注目を集め、最近では輸血後鉄過剰症の 10-20% でそうした効果が認められると言われている。このことは、鉄過剰そのものが造血を抑制している可能性を想起させる。しかしながら、この機序に関しては詳細な検討はなされていない。通常、骨髄不全症では鉄の利用が低下していたり無効造血のために血清鉄、すなわち血清中のトランスフェリン (transferrin: Tf) 結合鉄濃度は高くなっていると考えられるが、赤芽球の Tf 結合鉄の取り込みに関しては、特異的受容体であるトランスフェリン受容体 1 (transferrin receptor 1: TfR1) を介しての取り込みのため、赤芽球内にある程度鉄が増加するとそれ以上の鉄取り込みは抑制されてしまうはずで、これだけでは説明がつかず、他の機構が関与している可能性が極めて強い。そこで申請者が特に着目したのが、鉄過剰状態で出現する非トランスフェリン結合鉄 (non-transferrin-bound iron: NTBI) である。NTBI は細胞内への取り込みに制御がないため、NTBI が存在すると赤芽球内も強制的に鉄が過剰になり、造血障害をもたらしている可能性に着想するに至り、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では過剰鉄が赤血球造血に与える影響を、特に NTBI の関与に関しては国内唯一の高感度 NTBI 測定系を生かし詳細に解析し、さらに鉄キレート剤による鉄過剰に伴う造血抑制の解除に関する機序解明を目的として行った。本研究で鉄過剰による造血障害やその機序、および鉄キレート療法での改善効果の詳細が明らかになれば、骨髄不全で鉄過剰症症例のうちどのような症例において鉄過剰や NTBI が特に悪影響を及ぼしているのか、また、どのような症例に対して特に積極的に鉄キレート療法での介入が望ましいかを考える上での新たな情報になり、輸血量の低減の可能性も出るものと考え、臨床に直結した大きな研究成果を生み出すことを目的とした。また、NTBI による直接的造血障害が明らかになれば、NTBI 測定の臨床的意義も検討もできると考え研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 鉄過剰・造血障害モデルマウス作成
これらの動物実験は旭川医科大学実験委員会の審査・承認を受けて行った。12 週齢の C57Bl/6 マウスに iron dextran (Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, USA) 1 mg/head/day もしくは 10 mg/head/day を 5 日間腹腔内投与し、鉄過剰モデルを作成した (n=10)。コントロールのマウスには PBS を 5 日間腹腔内投与を行った (n=10)。各群マウスの下大静脈より末梢血を採取し、血清鉄、不飽和鉄結合能、血清フェリチン値 (ELISA) を測定した。両大腿骨より骨髓細胞を採取し細胞数カウントした。

(2) 新規 NTBI 測定系 (生化学自動分析装置対応測定試薬開発) とマウス血清 NTBI 測定への応用

このモデルの NTBI の関与の検討に関して、従来我々が使用してきた HPLC 法を用いると、少量の血清での測定では測定の安定性が保てず比較的大量の血清が必要であり問題となった。しかし、別研究として進めていた少量血清で NTBI 測定が可能で、さらに検体数処理能力を飛躍的に改善した自動分析装置対応 NTBI 測定試薬の開発を進め、マウス血清や細胞培養上清での測定の信頼性などに関して検討したうえで、本測定系で鉄過剰モデルマウス血清の NTBI 測定を行った。

(3) 鉄過剰・造血障害モデルに対する鉄キレート療法

鉄キレート療法モデルとして、iron dextran 投与マウスに対し、鉄キレート剤 deferoxamine (DFO) 100 mg/kg/day を 5 日間腹腔内投与を行った (n=10)。キレート療法による鉄動態の変化を見るため、末梢血を採取し、血清鉄、不飽和鉄結合能、血清フェリチン値 (ELISA) を測定した。また、両大腿骨および両上腕骨より骨髓細胞を採取し、細胞数カウントおよび塗抹標本を作製しベルリンブルー染色を行った。鉄負荷量の検討原子吸光分析法による骨髓細胞内鉄濃度の測定骨髓細胞を 0.1 N の硝酸に溶解し、原子吸光度計 (日立 Z-8100) により鉄濃度を測定した。標準として鉄標準液 100 mg/L を用いた。

(4) 鉄過剰・造血障害モデルマウスおよび鉄キレート療法モデルマウスを用いた網羅的遺伝子解析および digital PCR 解析

当初、各種鉄代謝関連遺伝子群 (Tfr1 および TfR2、ヘプシジン、hemojuvelin、ferroportin、フェリチンなど) の変動は real-time PCR や western blotting 法での解析を予定していたが、当研究室に次世代シーケンサーが導入されたため研究方法を一部修正し鉄代謝関連遺伝子を含む多くの遺伝子変動を網羅的に解析した。マウス骨髓細胞より RNA を抽出し、リボゾーム RNA を除去した。リボゾーム RNA 除去後の RNA から Ion Total RNA-Seq Kit (Life technologies) を用いて cDNA ライブラリーを作成し、高出力シーケンサー Iron Proton (Life technologies) を

用いてシーケンサーデータを得た。遺伝子発現解析は CLC bio 社 Genomics Workbench (Aarhus, Denmark) を用い、Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads (RPKM 値) を算出しクラスター解析を行った。網羅的遺伝子解析により糖代謝関連遺伝子群が有意に変動していたため、Aco1, Idh1 についてさらに Digital PCR を用いて定量的解析を行った。マウス骨髓細胞より抽出した RNA から cDNA を作成し、TaqMan probe を用いて QuantStudio 3D Digital PCR system (Life technologies) にて発現解析を行った。

(5) 骨髓細胞内 total 2-HG 測定および DNA メチル化の測定

マウス骨髓細胞を 0.1N の塩酸に溶解し、塩化ナトリウムを加え有機酸を塩析させ、酢酸エチルを加えて有機酸を抽出した。抽出した有機酸にトリメチルシリル化剤を加えて誘導体化し、質量分析計 JMS-T100GCV (日本電子) を用いてガスクロマトグラフ質量分析を行い total 2-HG を定量評価した。DNA メチル化測定は、マウス骨髓細胞から DNA を抽出し、Methyl Flash Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA) を用い全 DNA 量に占めるメチル化シトシンの割合 (5-mC%) を算出した。測定には、Multimode plate reader EnsPire (PerkinElmer) を用いた。

(6) 鉄負荷による K562 細胞の増殖への影響の検討

鉄過剰による赤芽球系細胞の増殖抑制効果を検討するため、K562 細胞および 50 mM NaB による分化誘導をかけた K562 細胞に対し、0-10 μ M のクエン酸アンモニウム鉄負荷を行い、72 時間までの MTT assay を行った。

4. 研究成果

(1) 鉄過剰・造血障害モデルマウス作成

Iron dextran 5 mg および 50 mg 腹腔内投与にて作成した鉄過剰モデルマウスでは急性の鉄毒性は認められず、肝臓や脾臓には鉄の沈着が確認でき、血清中では血清鉄上昇 (図 1A)、不飽和鉄結合能低下、トランスフェリン飽和度上昇 (図 1B)、ELISA で測定した血清マウス・フェリチン (図 1C) の上昇も認め、鉄過剰・造血障害モデルが成立していると確認できた。

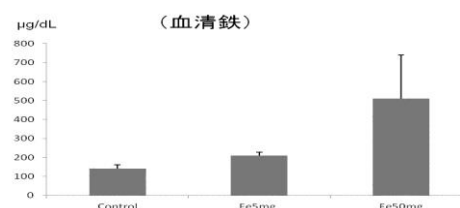


図 1A. 鉄投与マウスの血清鉄

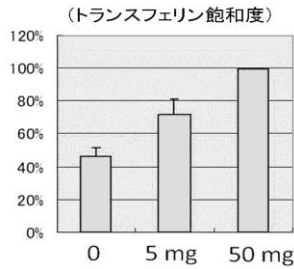


図 1B. 鉄投与マウスのトランスフェリン飽和度

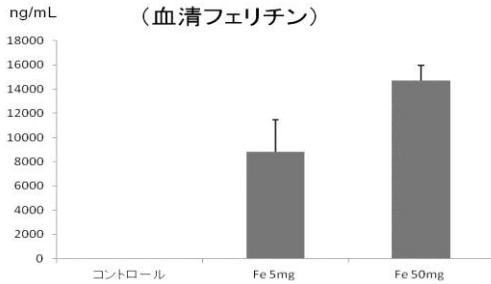


図 1C. 鉄投与マウスの血清フェリチン

これらの鉄投与群では、鉄投与後 2 カ月の時点ではヘモグロビン値の低下は認めなかったものの (図 2A)、骨髄中有核細胞数の著明な減少を認め (図 2B)、さらに鏡検では分化細胞の低下を認め造血障害も確認できた。

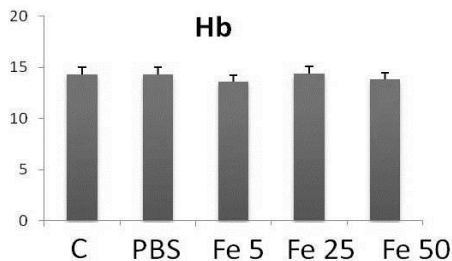


図 2A. 鉄負荷 2 カ月後のヘモグロビン値

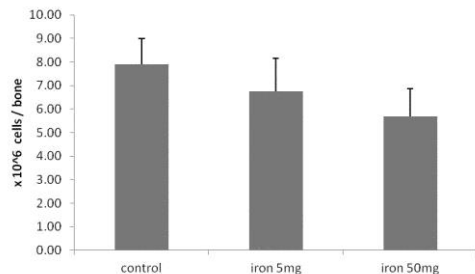


図 2B. 鉄負荷での骨髄有核細胞数の減少

(2) 新規 NTBI 測定系 (生化学自動分析装置対応測定試薬開発) とマウス血清 NTBI 測定への応用

本新規測定系の測定原理であるが、血清中の NTBI は Tf 結合鉄とは異なりアルブミンやクエン酸などの物質と非常に弱い親和性で結合しているが、まずそこに第一試薬として nitrilotriacetic acid (NTA) を加える。HPLC 法ではこの段階でまだ鉄を結合していない apo-Tf を予めコバルトイオンで飽和させておく必要があったが、この新規測定系では 5 分という非常に短時間の反応時間のためそれを必要としない。この NTA-NTBI 複合体に対しアスコルビン酸で鉄を 2 価に還元し、その 2 価鉄を第二試薬として加える nitroso-PSAP と結合させる。5 分の反応の後、鉄を結合した nitroso-PSAP は 750 nm に特徴的な吸光度ピークをきたすため、これを測定することで NTBI 値が 10 分という極短時間で生化学自動分析装置で測定ができる。この系を用いてマウスの血清を測定した結果、5 mg 投与群では僅かな上昇にとどまったが、50 mg 投与群では著明に NTBI 高値となることが確認でき、50 mg 投与群の方が NTBI の造血障害への関与の研究モデルとして適切と考えた (図 3)。

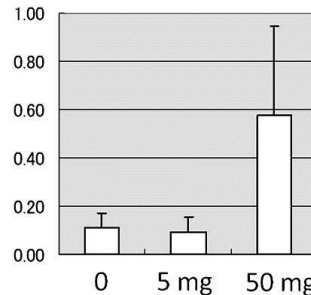


図 3. 鉄投与マウスにおける NTBI 値

(3) 鉄過剰・造血障害モデルマウスおよび鉄キレート療法モデルマウスにおける骨髄鉄沈着の検討

鉄過剰群および鉄キレート群における骨髄塗沫標本のベルリンブルー染色では、鉄過剰群ではコントロール群と比べ著明な鉄沈着を認め、鉄キレート群では鉄沈着が改善しているのが確認された (図 4A)。

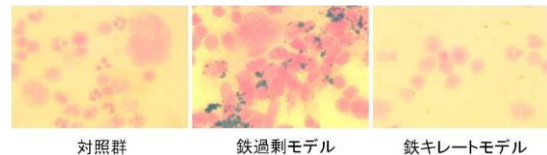


図 4A. 骨髄細胞のベルリンブルー染色

原子吸光法で測定した骨髄細胞内鉄濃度 (n=10) は、鉄過剰群では対照群に比べ有意に上昇し (p=0.0000007)、鉄キレート群では鉄過剰群と比べ有意に低下していた

($p=0.001$) (図 4B)。これらの結果から iron dextran により骨髄も鉄過剰となり、DFO の投与により鉄が除去されたと考えられ、鉄キレート療法モデルとして適切と考えた。

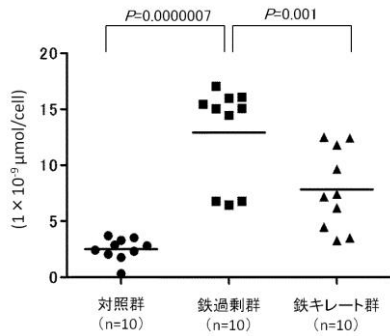


図 4B. 骨髄細胞内鉄濃度 (日立 Z-8100 を用いた測定原子吸光法にて測定)

(4) 鉄過剰・造血障害モデルマウスおよび鉄キレート療法モデルマウスを用いた網羅的遺伝子解析および digital PCR 解析
 コントロール群と鉄過剰群の相互で得られた RPKM 値の比が 1.5 倍以上、かつ鉄キレート群と鉄過剰群の相互で得られた RPKM 値の比が 1.5 倍以上の値をとった遺伝子を取り上げたところ、複数の糖代謝関連遺伝子群が変動していることが明らかになった (表 1)。

	遺伝子名	関連する蛋白	fold change	P value
鉄過剰で発現が増加し鉄キレートで発現が戻った糖代謝関連遺伝子	Pgm1	ホスホグルコムターゼ1	2.0	0.004
	Agf1	グリコーゲン分枝酵素	6.8	0.001
	Idh1	イソクエン酸脱水素酵素1	4.8	0.035
	Idh3a	イソクエン酸脱水素酵素3a	2.8	0.038

表 1. 鉄過剰に呼応して遺伝子発現が変化していた糖代謝関連酵素

これらは TCA 回路の酵素群であった (図 5A)。以前より TCA 回路の一酵素として機能し鉄過剰により酵素活性が亢進することが知られている Aco1 も加え、さらに digital PCR analysis を用いて詳しく発現の変化を検討したところ、Idh1 および Aco1 (図 5B) (n=10) は、鉄過剰群で対照群と比較し有意に発現が上昇し、鉄キレート群では鉄過剰群よりも有意に発現が低下しているのが確認された。

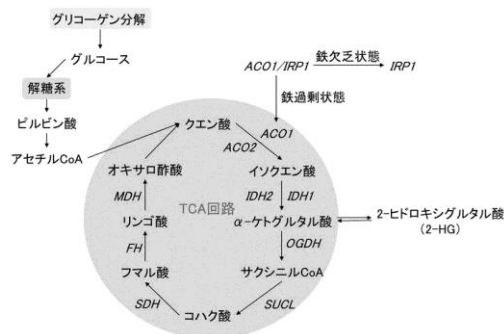


図 5A. TCA 回路に関する酵素群

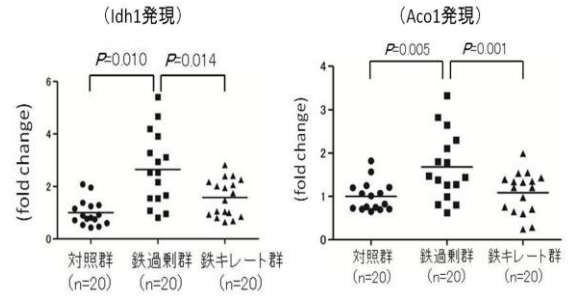


図 5B. 鉄過剰およびキレート時の Idh1 および Aco1 発現変化

Idh1 や Aco1 の変動は 2-HG の産生量に影響を及ぼす可能性があると考え、次に鉄過剰および鉄キレート療法時における 2-HG の産生量の変化を検討した (図 6A) (n=10)。その結果、鉄過剰群では対照群よりも有意に total 2-HG が増加し ($p=0.00004$)、鉄キレート群では鉄過剰群よりも有意に減少していた ($p=0.00019$)。2-HG の増加は DNA メチル化に作用する可能性があり、さらに DNA メチル化の変化についても検討したところ (n=10)、鉄過剰群では対照群よりも有意に DNA メチル化が亢進しており ($p=0.041$)、鉄キレート群では鉄過剰群よりも有意に低下していた ($p=0.008$) (図 6B)。

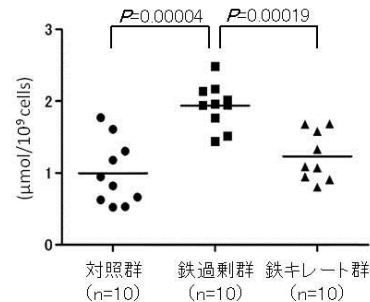


図 6A. 鉄過剰およびキレート時の 2-HG 変化

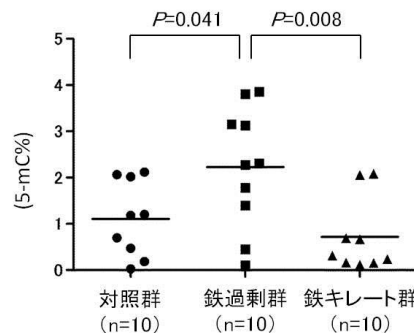


図 6B. 鉄過剰およびキレート時の DNA メチル化の変動

(5) 鉄負荷による K562 細胞増殖抑制の検討

K562 細胞に対し 0-10 μ M までの鉄負荷を行っても、MTT assay では細胞増殖抑制効果は

確認されなかった。そのため、赤芽球系への分化誘導状態での検討をすべく、K562細胞に対し NaB 添加を行い、Hb 合成増加や Gata1 発現増加を確認し同様の実験を行ったが、やはり 72 時間までの MTT assay では鉄負荷による明確な増殖抑制作用は観察できなかった (図 7)。in vitro での有用な鉄過剰・造血障害モデルの作成に関しては、今後さらに検討していきたいと考えている。

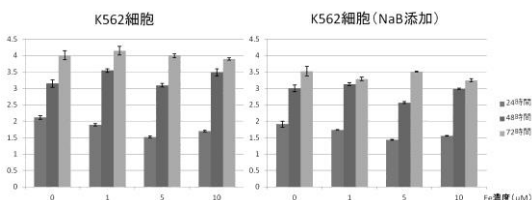


図 7. 鉄負荷による K562 細胞増殖への影響

【まとめ】本研究では、特にマウスモデルを使用した検討結果で新規の知見が多く得られた。鉄過剰状態では、Idh1 などに遺伝子変異を有さない個体であっても 2-HG の産生が亢進し DNA メチル化の亢進が引き起こされ、白血化や造血障害をもたらしている可能性を示すとともに、鉄キレートにはそれを抑制する作用がある可能性を示唆していると考えられ、臨床で観察される事象を説明する根拠の一つとなり意義深い結果を得られた。

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 10 件) うち査読付論文 4 件

- ① 生田克哉. 生体内鉄代謝における 2 つの新規マーカー — ヘプシジンと非トランスフェリン結合鉄 —. 臨床血液、査読無、第 56 巻第 2 号、2015、194-203. doi: 10.11406/rinketsu.56.194.
- ② Ito S, Ikuta K, Kato D, Shibusa K, Niizeki N, Tanaka H, Addo L, Toki Y, Hatayama M, Inamura J, Shindo M, Sasaki K, et al (16 名中生田 2 番目、伊藤 1 番目、佐々木 12 番目). Non-transferrin-bound iron assay system utilizing a conventional automated analyzer. Clin Chim Acta. 査読有 2014; 437: 129-135. doi: 10.1016/j.cca.2014.07.013.
- ③ Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, et al (13 人中生田 2 番目、佐々木 7 番目、伊藤 8 番目). Up-regulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon α . J Gastroenterol Hepatol. 査読有 2014; 29: 387-394. doi: 10.1111/jgh.12348.
- ④ Goto T, Ikuta K, Inamoto Y, Kamoshita S, Yokohata E, Koyama D, Onodera K, Seto A, Watanabe K, Imahashi N, Tsukamoto S, Ozawa Y, Sasaki K, et al (16 人中生田 2 番目、佐々木 13 番目). Hyperferritinemia after

adult allogeneic hematopoietic cell transplantation: quantification of iron burden by determining non-transferrin-bound iron. Int J Hematol. 査読有 2013; 97: 125-34. doi: 10.1007/s12185-012-1252-1. 他、計 10 件

[学会発表] (計 18 件)

- ① Yamamoto M, Tanaka H, Toki Y, Hatayama M, Ito S, Inamura J, Shindo M, Ikuta K, Sasaki K, et al. Iron-induced epigenetic abnormality of mouse bone marrow through aberrant activation of aconitase and isocitrate dehydrogenase without gene mutation: analysis by high throughput sequencer and GC-MS. 19th Congress of European Hematology Association、査読有 in Milan, Italy (June 14th, 2014)
- ② Ito S, Ikuta K, et al. Functional validation and clinical significance of a newly established non-transferrin-bound iron (NTBI) assay system utilizing Conventional Automated Analyzer. Annual Meeting of American Society of Hematology 2013、査読有、Dec 7th, 2013, New Orleans, U.S.A.
- ③ Ikuta K, Ito S, et al. Novel quantification system of non-transferrin-bound iron (NTBI) utilizing automatic analyzer. Fifth Congress of the International BioIron Society、査読有、Apr 15th, 2013 (presentation), London, United Kingdom
- ④ Ikuta K. Iron metabolism and its novel markers. 第 75 回日本血液学会学術集会. symposium、英語講演、2013 年 10 月 12 日 (札幌) 他、計 18 件

[図書] (計 3 件)

- ① 生田克哉、畑山真弓、伊藤 巧. 鉄代謝のバイオマーカー (Mini Lecture). プリンシプル血液疾患の臨床: 新戦略による貧血治療. P23-28, 中山書店、2014 他、計 3 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生田 克哉 (IKUTA, Katsuya)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00396376

(2) 分担研究者

佐々木 勝則 (SASAKI, Katsunori)
旭川医科大学・医学部・特任教授
研究者番号: 60336394

伊藤 巧 (ITO, Satoshi)
旭川医科大学・医学部・特任助教
研究者番号: 80548686