

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461400

研究課題名(和文) 赤血球造血系と鉄代謝制御系のクロストークの解析

研究課題名(英文) Crosstalk between erythropoiesis and iron homeostasis

研究代表者

川端 浩 (KAWABATA, Hiroshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10329401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球造血系はヘモグロビン合成のために大量の鉄を消費し、体内の鉄はヘプシジンによって制御されている。本研究ではヘプシジン・プロモーターのバイオアッセイ系を構築し、化合物ライブラリーからヘプシジン発現抑制因子を複数見出した。血清中の鉄は主としてトランスフェリンに結合してトランスフェリン受容体1を介して赤芽球に取り込まれるが、細胞内の鉄貯蔵蛋白であるHフェリチンも同じ受容体を介して、異なった様式で赤芽球に取り込まれることを見出した。Hフェリチンは赤血球系コロニーを抑制した。さらに、造血幹細胞移植前の血清ヘプシジン値やフェリチン値が高いと移植後の全生存率が低下し、血小板生着が遅延することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The erythropoietic system consumes a large amount of iron, and hepcidin regulates systemic iron homeostasis. We developed a hepcidin-promoter bioassay system and identified several compounds that inhibit hepcidin expression. Iron is mainly carried by transferrin in the circulation and taken up by cells through transferrin receptor 1. We found that H-ferritin, an iron storage protein, can be also taken up by the cells through the same receptor with different manners. H-ferritin suppressed BFU-erythroid colony formation in vitro. We also found that elevated pre-transplant serum hepcidin or ferritin levels are associated with poorer prognosis and delayed platelet engraftment in patients with hematologic malignancies.

研究分野：血液内科学

キーワード：血液内科 鉄代謝 ヘプシジン フェリチン 赤血球造血

1. 研究開始当初の背景

鉄はあらゆる生命体に必須の微量元素であり、ヘムあるいは鉄-硫黄クラスターとして酸素の運搬、酸化還元反応、核酸合成など様々な生命機能に重要な役割を担っている。造血系に供給される鉄が不足すると、ヘモグロビン合成が滞って貧血を生じる。一方、過剰の鉄はフェントン反応を介して反応性の高い活性酸素種を生成し、糖尿病、肝障害、心不全を引き起こす。鉄過剰症は血液腫瘍の独立した予後不良因子とされている。組織における鉄の蓄積と、発がん、老化、神経変性疾患との関連も示唆されている。

鉄代謝制御の要になる液性因子は、肝臓で産生されるヘプシジンである。ヘプシジンの発現は、鉄負荷と炎症によって増加し、低酸素と赤血球造血刺激によって減少する。ヘプシジンは細胞外への鉄輸送体フェロポルチンを分解へと導き、腸管からの鉄の取り込みと網内系から造血系への鉄の供給を抑制する。HFE、トランスフェリン受容体2(TFR2)、ヘモジュベリン(HJV)などの遺伝子変異はヘプシジンの産生を低下させて遺伝性鉄過剰症(ヘモクロマトーシス)を引き起こす。逆に慢性炎症によってヘプシジンの発現が亢進すると、造血系に供給される鉄が減少して貧血を呈する。これまでにヘプシジンの発現制御機構に関する多くの研究がなされているが、鉄負荷によるヘプシジン発現シグナルについては *in vitro* で再現できないことから十分な解明はされていない。また、赤血球造血系からヘプシジン産生を抑制するなんらかのシグナルが出ていることは事実であるが、その正体は明らかになっていない。

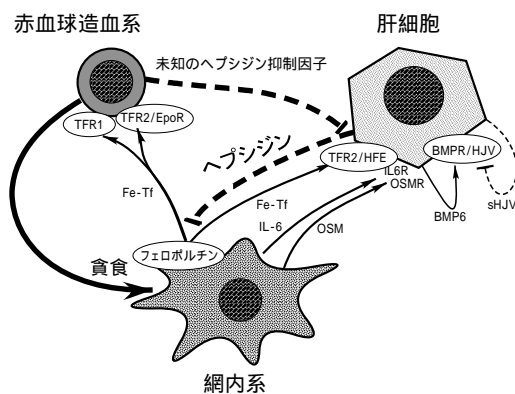


図 液性因子を介した造血系と鉄代謝のクロストーク

研究代表者が着目するもう一つの鉄代謝関連の液性因子はフェリチンである。フェリチンはHとLの2種類のサブユニットから構成される細胞内の鉄貯蔵蛋白である。細胞外へも分泌されるため、その血清中濃度は体内の貯蔵鉄量のマーカーとして広く用いられている。血清中に分泌されたフェリチンの挙動や役割についてはよくわかっていなかったが、最近、ヒトにおいてはトランスフェリン受容体1(TFR1)がHフェリチンの受

容体であるという研究が報告された。しかしながら、血清中に存在するフェリチンがどういった細胞にどのように取りこまれて、どのような機能を持っているのかについては未知のままである。

2. 研究の目的

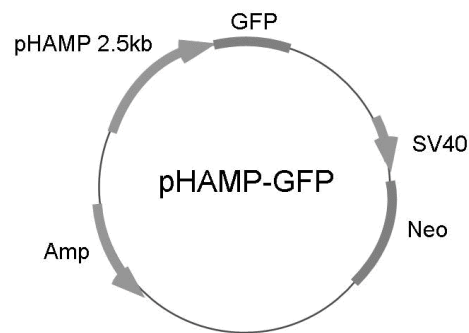
(1)ヘプシジン・プロモーターのバイオアッセイ系を構築し、ヘプシジンの発現に影響を与える物質を探索する。さらには前臨床的な創薬研究へと繋げる。同じ系を用いて健康人血清および血液疾患患者の血清中に存在するヘプシジン抑制因子を同定する。

(2)赤芽球系細胞によるHフェリチンの取り込み機序と、その生理学的機能、および血液病理学的な役割を解明する。

(3)造血幹細胞移植患者の移植前血清ヘプシジン値が移植後の血球回復に及ぼす影響を調べる。

3. 研究の方法

(1)ヘプシジン・プロモーター制御下にGFPを発現する遺伝子を導入した肝がん細胞株(Hep3B)を96穴プレートにて培養し、これに試料を添加して、48時間後にプレートリーダーでGFP発光を定量する。これを活用してヘプシジンの発現を変化させる物質を化合物ライブラリからスクリーニングする。みつかった化合物の活性は、リアルタイムPCR、培養上清中のヘプシジン定量(LC-MS マス・スペクトロメトリ法)で確認する。ヒトの血清の利用については京都大学医の倫理委員会の承認を受けて行う。



(2)ヒトのHおよびLフェリチンを、大腸菌を用いて合成し、クロマトグラフィーで精製する。これにAlexa 蛍光標識して、蛍光顕微鏡及びフローサイトメトリーを用いて、さまざまな細胞への取り込みを解析する。ヒトの赤芽球系細胞株HEL、UT7/EP0、K562、ヒトの骨髄細胞などをもちいて、コロニーアッセイ、細胞周期解析、ヘモグロビン合成能、表面抗原解析による分化誘導能の解析、マイクロアレイや定量的リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析、ウェスタン・プロット法

による蛋白発現解析などでHフェリチンの取り込みや赤芽球系細胞の分化、増殖に対するHフェリチンの作用について解析する。

(3) 造血幹細胞移植患者の移植前血清ヘプシジン値と、移植後の血球回復や感染症の発症等との関連を統計学的手法で解析する。この研究は京都大学医の倫理委員会の承認および患者の書面による同意を受けて行う。

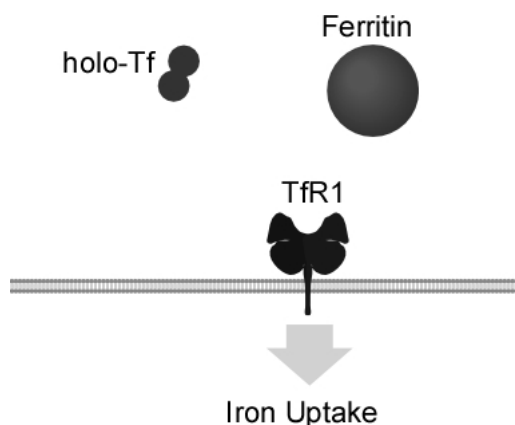
#### 4. 研究成果

(1) ヘプシジン・プロモーター制御下に GFP を発現する遺伝子を導入した肝がん細胞株 Hep3B をもちいた、プロモーターのバイオアッセイ系を構築した。この系によって、トランスフェクションの影響を排除した、高感度で high throughput なプロモーター・アッセイが可能となった。これを活用してヘプシジンの発現を変化させる物質のスクリーニングを行った。その結果、既知のヘプシジン発現刺激因子であるインターロイキン 6、骨形成蛋白 6 (BMP6)、およびオンコスタチン M はヘプシジンのプロモーター活性を著しく刺激した。一方、既知の抑制剤である Dorsomorphin、ヘパリン、および塩化コバルトはこの活性を強力に抑制した。1280 の化合物のスクリーニングによって、apomorphin、benzamil、etoposide、CGS-15943、kenpaullone、および rutaecarpine は、細胞のバイアピリティーに影響を与えない濃度でヘプシジン・プロモーターを抑制した。特に CGS-15943 は最も強力に BMP6 によるヘプシジン・プロモーター刺激を打ち消した。これらの抑制効果は、リアルタイム PCR、および培養上清中のヘプシジン定量 (LC-MS マス・スペクトロメトリ法) で確認した。CGS-15943 には、ヘモジュベリンとトランスフェリン受容体 2 の発現を減弱させる効果も見られた (Kawabata H, et al. Exp hematology 43: 404-413, 2015)。

さまざまな血液疾患患者の血清をもちいてヘプシジン・プロモーター活性に影響を与えるか否かを検討した。一部の貧血患者の血清が、ヘプシジン・プロモーター活性を抑制することを見出した (unpublished data)。

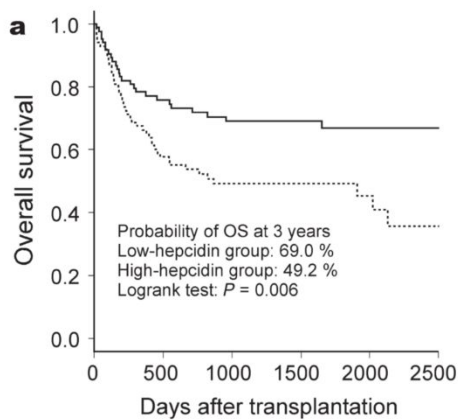
(2) 貯蔵鉄のバイオマーカーであるフェリチンが造血系のこういった細胞に取り込まれているかについて、蛍光標識した合成ヒト H フェリチンおよびヒト L フェリチンを用いてフローサイトメトリーで解析した。その結果、H フェリチンは赤芽球系・巨核球系細胞株と、骨髄の赤芽球に特異的な高い取り込みを認めただけに対し、L フェリチンの取り込みは単球などでみられ非特異的なものであった。さまざまな遺伝子変異を導入したトランスフェリン受容体 1 および 2 を安定的に発現させた CHO-TRVb 細胞を用いた実験で、トランスフェリンと H フェリチンは異なった様式でトランスフェリン受容体 1 を介して細

胞に取り込まれることを見出した。トランスフェリン受容体 2 にはフェリチンを取り込む働きはみられなかった。H フェリチンの細胞への取り込みは、閾値以上のレベルのトランスフェリン受容体 1 の発現が必要であることを見出した (Sakamoto S, Kawabata H, et al. PLoS one 10: e0139915, 2015)。このことから、トランスフェリンの取り込みとは異なり、H フェリチンの取り込みには複数のトランスフェリン受容体が必要ではないかと考えられる。トランスフェリンとフェリチンは全く異なった分子構造をしているがいずれも鉄を運搬できる。赤芽球においてはこれらがトランスフェリン受容体 1 を介して取り込まれることは興味深い。



さらに、ヒト骨髄細胞を用いたコロニーアッセイで、H フェリチンが赤芽球系の BFU-E コロニーの形成を選択的に抑制することを見出した。その機序を明らかにするために、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞から赤芽球系に分化誘導した細胞に、Hフェリチン、Lフェリチンなどを添加して、その遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより解析した。多くの遺伝子の発現がこれらの処理により変化した。これらの遺伝子には機能不明のものも多く、造血系に關与することが知られているものはなかった (unpublished data)。

(3) 血液腫瘍患者の造血幹細胞移植前の血清ヘプシジン値、血清フェリチン値と、移植成績、生着、移植後の合併症等の関係を解析した。移植前の血清ヘプシジン値、あるいは血清フェリチン値が高いと、有意に移植後の全生存率が低下した。移植前のヘプシジン値が高いと、血小板生着が有意に遅延したが、赤血球と好中球の生着には影響を与えなかった。これらの結果から、移植前の血清ヘプシジン値は、鉄過剰状態だけでなく、骨髄環境に關連した指標となるのではないかと推測した (Sakamoto S, Kawabata H, et al. Cancer Med 6: 120-128, 2017)。



## 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 12 件)

Kawabata H: The mechanisms of systemic iron homeostasis and etiology, diagnosis, and treatment of hereditary hemochromatosis. *Int J Hematol.* (査読あり) 2018;107 (31-43).  
 DOI: 10.1007/s12185-017-2365-3

Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kitano T, Kondo T, Hishizawa M, Tomosugi N, Takaori-Kondo A: High pretransplant hepcidin levels are associated with poor overall survival and delayed platelet engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. (査読あり) *Cancer Med* 2017;6 (120-128)  
 DOI: 10.1002/cam4.974

川端浩: Overview 臨床血液学—最新情報と今後の展望 2017—赤血球系疾患. *臨床血液*(査読なし) 2017;58 (327-328)  
 DOI: 10.11406/rinketsu.58.327

川端浩: 鉄代謝研究の進歩. *臨床血液*(査読あり) 2017;58 (56-63)  
 DOI: 10.11406/rinketsu.58.1864

Yamakawa N, Oe K, Yukawa N, Murakami K, Nakashima R, Imura Y, Yoshifuji H, Ohmura K, Miura Y, Tomosugi N, Kawabata H, Takaori-Kondo A, Mimori T: A novel phenotype of a hereditary hemochromatosis type 4 with ferroportin-1 mutation, presenting with juvenile Cataracts. *Intern Med.* (査読あり) 2016;55 (2697-2701)  
 DOI: 10.2169/internalmedicine.55.6565

Katsurada T, Kawabata H, Kawabata D, Kawahara M, Nakabo Y, Takaori-Kondo

A, Yoshida Y: A Japanese family with X-linked sideroblastic anemia affecting females and manifesting as macrocytic anemia. *Int J Hematol.* (査読あり) 2016;103 (713-717)  
 DOI: 10.1007/s12185-016-1949-7

川端浩, 坂本宗一郎, 増田太郎, 内山達樹, 大森勝之, Koeffler HP, 高折晃史: 赤血球造血におけるトランスフェリン受容体の役割. *臨床血液* (査読あり) 2016;57 (951-958)  
 DOI: 10.11406/rinketsu.57.951

川端浩: 鉄剤不応性の鉄欠乏性貧血. *臨床血液* (査読あり) 2016;57 (104-109)  
 DOI: 10.11406/rinketsu.57.104

Uchiyama T, Kawabata H, Miura Y, Yoshioka S, Iwasa M, Yao H, Sakamoto S, Fujimoto M, Haga H, Kadowaki N, Maekawa T, Takaori-Kondo A: The role of growth differentiation factor 15 in the pathogenesis of primary myelofibrosis. *Cancer Med.* (査読あり) 2015;4 (1558-1572)  
 DOI: 10.1002/cam4.502

Sakamoto S, Kawabata H, Masuda T, Uchiyama T, Mizumoto C, Ohmori K, Koeffler HP, Kadowaki N, Takaori-Kondo A: H-Ferritin is preferentially incorporated by human erythroid cells through transferrin receptor 1 in a threshold-dependent manner. *PLoS One.* (査読あり) 2015;10 (e0139915)  
 DOI: 10.1371/journal.pone.0139915

Kawabata H, Uchiyama T, Sakamoto S, Kanda J, Oishi S, Fujii N, Tomosugi N, Kadowaki N, Takaori-Kondo A: A *HAMP* promoter bioassay system for identifying chemical compounds that modulate hepcidin expression. *Exp Hematol.* (査読あり) 2015;43 (404-413 e405)  
 DOI: 10.1016/j.exphem.2015.01.005

川端浩, 高折晃史: 赤血球の生理機能と産生調節. *日本内科学会雑誌* (査読あり) 2015;104 (1367-1374)

[学会発表](計 5 件)

川端浩: 本邦の遺伝性ヘモクロマトーシス: 第 12 回臨床ストレス応答学会, (シンポジウム講演) 2017

川端浩: 鉄代謝研究の進歩: 第 79 回日本血液学会学術集会. 東京, 2017

川端浩, 友杉直久: Congenital Iron overload in Japan (シンポジウム講演) 第 89 回日本生化学会, 2016

川端浩, 坂本宗一郎, 増田太郎, 内山

達樹, 大森勝之, Koeffler HP, 高折晃史:  
Roles of Transferrin Receptors in  
Erythropoiesis(シンポジウム講演): 第 77  
回日本血液学会学術集会, 2015

川端浩: 多中心性キャスルマン病に  
みられる高ヘプシジン血症と炎症性貧血(シ  
ンポジウム講演): 第 39 回日本鉄バイオサ  
イエンス学会学術集会, 2015

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川端 浩 (KAWABATA, Hiroshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号: 1 0 3 2 9 4 0 1

### (2)研究分担者

なし。

### (3)連携研究者

友杉 直久 (TOMOSUGU, Naohisa)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号: 8 0 1 5 5 5 8 0

### (4)研究協力者

増田 太郎 (MASUDA, Taro)

大石 真也 (OISHI, Shinya)

坂本 宗一郎 (SAKAMATO, Soichoro)

内山 達樹 (UCHIYAMA, Tatsuki)