

論文の内容の要旨

論文題目

The effect of iron overload and chelating on erythroid differentiation

(赤芽球分化における鉄過剰及び除鉄の影響)

田岡和城

序論：骨髄異形成症候群、再生不良性貧血、骨髄線維症などの骨髄不全症候群で輸血依存となる症例では、長期にわたる輸血は鉄過剰状態となる。鉄過剰症では、血液中の非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) 及び細胞内の labile iron pool (LIP) が増加する。NTBI は、肝臓や心臓へ速やかに取り込まれるが、トランスフェリンを介さずに無秩序に細胞内に取り込まれ肝機能障害や心機能障害を起こすことが知られている。さらに、鉄過剰は造血系の障害も及ぼすと考えられ、近年、deferoxamine (DFO) や経口剤である deferasirox (DFX) などの除鉄剤により、貧血をはじめとした造血機能の改善が報告されてきた。近年経口鉄キレート剤による除鉄療法が可能となったが、鉄過剰または除鉄による造血能への影響はまだ十分解明されていない。今回我々は、マウス骨髄及びヒト末梢血幹細胞を用いて、赤芽球分化系において鉄過剰及び除鉄による赤芽球分化機能への影響を検討した。

実験方法：マウス骨髄細胞の鉄過剰投与時及び除鉄による赤芽球系分化実験を行った。実験系としては、コロニーアッセイ系、Liquid culture 系、OP9 系で、サイトカインは SCF と EPO を用いて赤芽球系に分化させた。マウス骨髄から c-kit ソートした骨髄幹細胞を鉄過剰状態、及び鉄過剰負荷した状態で DFO を併用し除鉄を行った。Erythroid 分化の評価は、サイトスピンにて形態を、フローサイトメトリーにて赤芽球系抗原である CD71, Ter119 の発現を評価した。

ヒトの末梢血幹細胞採取時の残余検体を用いて鉄過剰負荷及び除鉄による赤芽球分化実験を行った。本実験は、ヒトの末梢血幹細胞採取時の残余検体は、同種移植のドナーの健康者の末梢血幹細胞採取時の健康人の検体を用いており、東京大学倫理委員会にて承認された (2678)。末梢血幹細胞を SCF 及び SCF したコロニーアッセイ及び OP9 系で鉄過剰及び除鉄により赤芽球分化を行った。それぞれの細胞を回収しサイトスピン及び CD71、grycophorinA の発現をフローサイトメトリーで赤芽球分化を評価した。また、活性酸素の発現、アポトーシスを AnnexinV にて評価した。

実験結果：マウス骨髄細胞から c-kit 陽性細胞 10^4 個に SCF、EPO 付加でコロニーアッセイを行った。鉄を $10\mu\text{M}$ が最もコロニー形成能が良好であった。また、 $30\mu\text{M}$ 以上負荷するとコロニーの減少が認められた。明らかなコロニーの減少が認められた鉄 $50\mu\text{M}$ 負荷した状態に DFO を負荷すると、 $100\mu\text{M}$ まで負荷したときコロニー形成の改善が認められた。

マウス骨髄幹細胞の鉄過剰負荷による赤芽球系コロニー細胞をサイトスピンおよび CD71 及び Ter119 でフローサイトメトリーにより赤芽球系分化を評価した。鉄過剰を行っていないコロニーでは主に小型の erythroblast が、鉄過剰 200 μ M 負荷のコロニーではやや大型の proerythroblast が認められた。また、フローサイトメトリーでは、Erythroid の分化が亢進している Ter119 陽性、CD71 low の細胞集団の割合が鉄過剰状態にともない減少を認めた。マウス骨髄幹細胞の鉄過剰負荷時の OP9 系での赤芽球分化をフローサイトメトリーで評価した。OP9 系において、Erythroid 分化は鉄 10 μ M 負荷の状態では、鉄なしと比較して赤芽球分化が良好であったが、鉄 50 μ M 過剰負荷から著明な赤芽球分化抑制を認めた。マウス骨髄幹細胞の分化抑制がみとめられる鉄過剰負荷 50 μ M の状態から DFO による除鉄の効果を OP9 系で評価した。鉄過剰 50 μ M 負荷、DFO100 μ M で除鉄を行うところ赤芽球分化の改善を認めた。

ヒト末梢血幹細胞の鉄過剰負荷によるコロニーアッセイをおこなったところ、鉄過剰負荷 50 μ M まではコロニー形成が良好であったが、100 μ M からコロニー形成が減少した。また、コロニー細胞のサイトスピンを行ったところ鉄負荷なしのコロニーでは小型細胞の erythroblast が、鉄 200 μ M 負荷したコロニー細胞はやや大型の細胞が多く認められ proerythroblast と考えられた。また、鉄過剰 200 μ M のものでは、多核の赤芽球、核の断片化が認められた。鉄染色では、細胞内に鉄の著明な取り込みを認めた。フローサイトメトリーにて赤芽球分化を評価したところ、鉄過剰 200 μ M 負荷を行った細胞では Glycophorin 陽性 CD71low の分化した細胞の著明な減少が認められ、鉄過剰負荷により赤芽球分化抑制が認められた。

ヒト末梢血幹細胞の鉄過剰負荷時および除鉄による OP9 系での赤芽球分化をフローサイトメトリーで評価した。鉄過剰負荷 100 μ M より Glycophorin 陽性 CD71low の細胞集団の減少を認め、OP9 系においても鉄過剰負荷により赤芽球分化抑制をみとめた。また、分化抑制を認めた 100 μ M 鉄過剰負荷時に DFO を用いて除鉄を行ったところ glycophorin 陽性 CD71low の細胞集団の増加を認め、除鉄により分化抑制の回復を認めた。

ヒト末梢血幹細胞の鉄過剰負荷および除鉄による OP9 系での活性酸素の評価を行った。分化抑制のかかった Glycophorin 陽性 CD71high の細胞集団をそれぞれの条件で回収して ROS の発現を評価した。鉄過剰負荷により、ROS の平均は上昇し、除鉄に伴い ROS の平均は減少した。このことは、OP9 系の鉄過剰負荷により活性酸素が増加し、除鉄により活性酸素が減少していることを示している。また、分化抑制のかかった Glycophorin 陽性 CD71high の細胞集団をそれぞれの条件で回収し、アポトーシスを AnnexinV を用いて評価した。鉄過剰負荷により、AnnexinV は上昇し、除鉄に伴い AnnexinV は減少した。回収した細胞の発現解析では、アポトーシス関連遺伝子としては、bc12 が、有意に鉄過剰により減少し、除鉄により上昇した。

考察

マウス骨髄細胞及びヒト末梢血幹細胞における *in vitro* のそれぞれの赤芽球分化系において鉄過剰負荷により Ter119 陽性 CD71 low の細胞集団が多く認められた。鉄過剰負荷によって、造血幹細胞から赤芽球系の分化への抑制が認められた。また、DFO による除鉄によりそれぞれ

Ter119 陽性 CD71 high の細胞集団が多く認められ赤芽球系の分化抑制の改善を認めた。

分化抑制のかかった Grycophorin 陽性 CD71high の細胞集団をそれぞれの条件で回収して ROS を H2DCFDA の発現をフローサイトメトリーの解析したところ、鉄過剰によって、H2DCFDA は増加し、除鉄によって減少した。このことは、鉄過剰負荷により活性酸素が増加し、除鉄により活性酸素が減少していることを示している。Ghoti らは、MDS 患者の末梢血中の赤血球、血小板において ROS が健常人より多量に蓄積していた。また、ROS の蓄積は血清フェリチン値と関連する傾向にあり、過剰な鉄が ROS の蓄積に関与していることが示唆されている。

赤芽球分化において、鉄過剰負荷により活性酸素の上昇が認められアポトーシスが亢進した。また、除鉄により活性酸素が除去されアポトーシスの改善が認められた。細胞内の自由鉄が増加し活性酸素が増加することにより、細胞内の蛋白質や核酸がダメージを受け、その結果アポトーシスが誘導されたと考えられる。我々が行った鉄過剰状態の赤芽球分化の発現解析において、鉄過剰状態では bc12 の発現を抑制してアポトーシスを促進し、除鉄によって bc12 の抑制を解除しアポトーシスを抑制させていると考えられた。

鉄過剰状態での赤芽球系細胞は、多核や核変形の核異常が認められた。これらは、MDS の患者に認められるような形態異常に類似していた。Kerr らによると、アポトーシスの過程で、染色体の凝縮、核の分断化、細胞質の収縮分断化がおこり、分断が進むと、くびれとられアポトーシス小体が形成される。本実験の *in vitro* の鉄過剰状態では、細胞内に鉄の沈着が認められ、活性酸素が上昇しアポトーシスが亢進していると考えられた。赤芽球系の様々な形態異常はアポトーシスを反映した可能性がある。

抗酸化剤である NAC を OP9 culture 系で鉄過剰負荷の赤芽球培養系で投与した。NAC を投与することによって、活性酸素が除去され赤芽球分化障害の改善が認められた。鉄過剰状態の赤芽球分化系において DFO などの鉄キレート剤だけでなく、NAC の投与により活性酸素が除去され、赤芽球分化障害の改善が認められた。活性酸素の消去を行うことができる抗酸化剤である NAC が *in vivo* での結果ではあるが、今後の鉄過剰症における治療の選択肢の一つとして考えられた。