

審査の結果の要旨

氏名 田岡 和城

本研究は、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ものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス骨髄 c-kit+10⁴個に SCF、EPO 付加の鉄過剰状態でコロニーアッセイを行った。鉄なしから 50 μ M まで鉄付加を行ったところ、鉄 10 μ M 投与下が最もコロニー形成能が良好であった。また、30 μ 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 μ M 過剰負荷状態に deferoxamine (DFO) を追加すると、100 μ M まで追加したときコロニー形成の改善が認められた。CD34 陽性ヒト末梢血幹細胞の鉄過剰負荷時での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 以上からコロニー形成が減少した。コロニー形成の低下を認めた鉄 100 μ M 負荷の状態、DFO により除鉄を行ったところ BFU-E コロニー形成の改善を認めた。鉄過剰状態で除鉄をおこなうことにより、赤芽球造血機能の改善を認めることが示された。

2. マウスの赤芽球分化系において、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で未分化な proerythroblast が認められた。フローサイトメトリーでの評価は、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分化抑制がみとめられる鉄過剰負荷 50 μ M の状態から deferoxamine による除鉄の効果 OP9 共培養系で評価した。その結果、鉄過剰 50 μ M 負荷、DFO100 μ M で除鉄を行ったところ赤芽球分化の改善を認めた。

3. ヒトの赤芽球系分化において 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未分化でやや大型の細胞が多く認められ proerythroblast が主体であると考えられた。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 共培養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 deferoxamine 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。

4. ヒト末梢血幹細胞の鉄過剰負荷および除鉄による OP9 共培養系での活性酸素 (Reactive Oxygen Species:ROS) の発現評価を行った。分化抑制のかかった Glycophorin 陽性 CD71 強陽性の細胞集団を回収して ROS の発現を評価した。鉄過剰負荷により、ROS は上昇し、除鉄に伴い ROS は減少した。このことは、OP9 共培養系の鉄過剰負荷により ROS が増加し、除鉄により活性酸素が減少していることが示された。

5. 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、アポトーシスを評価した。鉄過剰負荷により、AnnexinV 陽性率は上昇し、除鉄に伴い AnnexinV 陽性率は減少した。
6. 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。
7. 抗酸化剤である N-acetyl cystein(NAC) を OP9 共培養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。
8. 今後の展望として、iPS 細胞を用いることで、赤芽球分化のみならず 3 系統分化および造血幹細胞への鉄過剰の影響を見ることができる。健常人の骨髄 CD34 陽性細胞を、Episomal vector で Oct4, Sox2, Klf4, L-myc, shp53 を導入し iPS を樹立 3 系統に分化誘導することが可能であった。今回、ROS を制御することが、造血回復の治療につながるということがわかったが、新たな ROS を制御する薬剤スクリーニングに有用な実験系であるとより有効な造血改善の薬剤や組み合わせの検討をすることができると考えられた。

以上、本論文は、鉄過剰及び除鉄における赤芽球分化制御について解明した研究である。臨床的に、除鉄が造血機能の改善につながるということが報告されてきたが、作用機序を明らかにした論文である。基礎的な研究であるが臨床的にも重要と考えられる論文である。今後、iPS 細胞を用いた 3 系統への評価も重要な研究成果が得られるものと期待され、学位の授与に値する論文と判断した。