

骨髓内鉄過剰症が造血に及ぼす影響 —マウスモデルを用いた検討—

小林 弘 典

新潟大学大学院医歯学総合研究科 血液学分野

(主任：内藤 眞教授)

Influences of Iron Overloads in the Bone Marrow on Hematopoiesis — Analysis by Mice Model —

Hironori KOBAYASHI

Department of Hematology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Makoto NARU)

要 旨

【背景と目的】鉄は赤血球におけるヘモグロビン合成や細胞内の酸化還元反応，細胞増殖のために重要な役割を担っている。生体内鉄代謝は半閉鎖経路であるのが特徴で，輸血による強制的な鉄の体内移入や無効造血により容易に鉄過剰状態に陥る。過剰鉄は活性酸素種（ROS）を介して細胞を傷害したり，アポトーシスに関与することにより各種臓器障害をもたらすと考えられているが，骨髓機能への影響は明らかではない。これまで鉄過剰症の病態解析は先天性ヘモグロビン症や遺伝性ヘモクロマトーシスにおいて行われてきた。骨髓異形成症候群や再生不良性貧血に代表される骨髓不全症も鉄過剰症をもたらす代表的疾患であるが，過去の報告からは生体内鉄代謝の観点から，骨髓不全症における鉄過剰症の原因は先天性ヘモグロビン症などとは違い輸血が主体であると推測される。先天性ヘモグロビン症などとは異なり輸血後鉄過剰症の動物モデルについての報告はないため，骨髓内鉄過剰マウスモデルを作製し，鉄過剰が造血に及ぼす影響について解析を行った。

【方法】C57BL/6J マウスに含糖酸化鉄を腹腔内投与して鉄過剰群とし，生理食塩水を投与したマウスをコントロールとした。末梢血血算の評価とともに，末梢血鉄代謝マーカーの評価，病理学的に骨髓と肝臓の鉄染色を行い，生体内鉄過剰の検討を行った。骨髓では赤血球前駆細胞の割合，細胞内 ROS 量，アポトーシスを来している細胞の割合を評価した。

【結果】鉄過剰群では末梢血中の血清鉄及びトランスフェリン飽和率の有意な上昇を認めた。病理学的には肝臓では鉄過剰群においてびまん性に著明な肝細胞内の鉄沈着を認めたのに対し，骨髓においてはマクロファージと血管内皮細胞に強い鉄の沈着を認め，血液細胞には明らかな鉄の沈着を認めなかった。血算では鉄過剰群において有意な貧血を認めたが，白血球数と血小板数には有意差を認めなかった。骨髓では幼若赤芽球の割合の有意な低下を認め，比較的成熟

Reprint requests to: Hironori KOBAYASHI
Department of Hematology
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科血液学分野
小林 弘 典

した赤芽球の割合には有意差がなかった。幼若赤芽球の細胞内 ROS 量に有意差を認めず、アポトーシスを来している細胞の割合にも有意差を認めなかった。

【考察】今回の輸血後鉄過剰症マウスモデルは、末梢血鉄代謝マーカーの有意な変化と骨髄及び肝での鉄の沈着を証明できたことから、輸血後鉄過剰症を *in vivo* で解析する有用なモデルとなると考えられた。肝臓でびまん性に鉄の沈着を認めたのに対して、骨髄ではマクロファージと血管内皮細胞に特異的な鉄の沈着を認め、輸血後鉄過剰症での両組織における鉄代謝や分布の違いを反映している可能性が示唆された。輸血後鉄過剰症における造血抑制は赤血球系統に強く出現し、これは幼若赤芽球の分化段階における造血抑制の結果であると考えられたが、赤芽球内への明らかな鉄沈着がなく、細胞内 ROS の上昇やアポトーシスの亢進は認められず、マクロファージや血管内皮細胞への鉄の沈着を認めた。マクロファージは赤血球特異的な造血支持細胞であり、血管内皮細胞もその詳細には不明な点も多いが造血支持細胞の一つと考えられていることから、輸血後鉄過剰による赤血球造血の抑制は赤血球系細胞への直接障害ではなく、造血微小環境への障害による可能性が示唆された。

キーワード：輸血後骨髄内鉄過剰、マウスモデル、赤血球造血、造血微小環境

緒 言

鉄は赤血球におけるヘモグロビン合成や細胞内の酸化還元反応、細胞増殖のために重要な役割を担っている。生体内鉄代謝は半閉鎖経路であるのが特徴¹⁾で、大部分の鉄は老廃赤血球から再利用されている。生体には積極的に鉄を排出する経路が存在せず、消化管粘膜上皮や皮膚の剥離・脱落による1日1mg程度の喪失しか起こらない²⁾。そのため、輸血による強制的な鉄の体内移入や無効造血により容易に鉄過剰状態に陥る。

血液中では鉄は主にトランスフェリン (Tf) と結合した状態であるが、Tfの鉄に対する親和性は非常に高く、正常な状態では鉄は free な状態にならない³⁾。何らかの原因によって高度な鉄過剰状態となり、血清中のトランスフェリン飽和率が50～80%を超えるとトランスフェリン (Tf) の鉄結合能を超えて非トランスフェリン結合鉄 (non-transferin bound iron; NTBI) が血中に存在するようになる⁴⁾⁵⁾。鉄と結合したTfが多くなると、全身の細胞内での鉄取り込みも増加するが、Tf結合鉄の細胞内への取り込みは各種細胞膜表面に存在するTf受容体1 (Transferrin receptor1; TFR1) がその特異的受容体として関与しているためある程度の

制御がなされる⁶⁾。しかし、NTBIはTfR1非依存的に様々な経路で細胞内に取り込まれる^{7)–12)}ため、過剰なNTBIが血中に持続的に存在する状態では容易に細胞内鉄過剰が引き起こされる。一方細胞内の鉄はフェリチンに格納されることで、有害な反応を来さないよう隔離されているが¹³⁾¹⁴⁾大量の鉄過剰状態が長期に及ぶと、細胞内の free な形態の鉄として不安定鉄プール (labile iron pool; LIP)^{15)–17)}が増加する。LIPは2価と3価の間を容易に移行し、この際Fenton反応やHerber Weiss反応によって、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を産生する。ROSは膜の過酸化やDNA損傷を引き起こし細胞を傷害し、さらにFasを介したアポトーシスにも関与していることが示唆されている¹⁸⁾¹⁹⁾。以上のような機序により、鉄過剰状態は心臓、肝臓、脾臓など生体内の各臓器に対し障害をもたらすと考えられているが、骨髄機能に与える影響は明らかにされていない。

これまで鉄過剰症の病態解析は先天性ヘモグロビン症、特にサラセミアについて行われてきた。サラセミアはグロビン遺伝子の異常によっておこる遺伝性の貧血で、無効造血のため骨髄では赤芽球系過形成を呈し、しばしば髄外造血が見られる。重

症型では頻回の赤血球輸血を要するため鉄過剰症を来すが、貧血の進行に伴って腸管からの鉄の吸収が亢進することが古くから知られていた^{20)–23)}。近年、肝臓で産生されるペプチドホルモンであるヘプシジンが生体内の鉄のリサイクルを調節していることが明らかになった。ヘプシジンの発現は鉄過剰状態と炎症で増加し、フェロポチンの蛋白発現を抑制することで、網内系を介した鉄のリサイクルと腸管上皮からの鉄の吸収を負に制御し、造血系で利用できる鉄を減少させる²⁴⁾。サラセミアマウスモデルにおいてはヘプシジンをコードする遺伝子 HAMP1 の発現が低下していることが示されており²⁵⁾、その他にもモデル動物や患者検体において、サラセミアや遺伝性ヘモクロマトーシスでは肝臓のヘプシジン産生が低下することが確かめられている^{26)–29)}。また、 β サラセミア症例では Growth differentiation factor 15 (GDF15) とよばれる、赤芽球系への分化の際に発現が増加する液性因子が異常高値で、高濃度の GDF15 は *in vitro* で肝細胞あるいは肝癌細胞株のヘプシジン産生を抑制する³⁰⁾。したがってサラセミアを含む先天性ヘモグロビン異常症や遺伝性ヘモクロマトーシスにおける鉄過剰症は輸血による鉄の過剰移入の他に鉄代謝異常も大きく関与していると考えられる。

一方、骨髄異形成症候群 (MDS) や再生不良性貧血 (AA) に代表される骨髄不全症も鉄過剰症をもたらす代表的疾患である。最近の報告からは輸血依存の低リスク MDS 症例において鉄過剰が生存の負の因子であることが示唆され^{31)–33)}、World Health Organization (WHO)-based Prognostic Scoring System (WPSS) においては、輸血依存が独立した予後不良因子として採用されている³⁴⁾。また、鉄キレート療法により骨髄不全症の予後改善が報告されている。

MDS における鉄過剰の原因としてはサラセミアのように無効造血のため GDF15 を介してヘプシジン発現が低下する可能性が考えられる。実際 MDS の亜型である環状鉄芽球を伴う不応性貧血 (refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS)) では GDF15 が異常高値となりヘプシ

ジン産生が低下することが報告されている³⁵⁾。しかしその他の MDS や AA においては GDF15 やヘプシジンの異常や肝臓における HAMP1 発現の異常を来したとする報告は見られない。また、輸血非依存性の患者では鉄過剰症の合併は認められない。このため、先天性ヘモグロビン症と異なり骨髄不全における鉄過剰症は輸血による鉄の過剰移入が原因の大部分を占めていると推測され、輸血による鉄過剰症の病態を明らかにすることは造血不全症の治療上重要であると考えられる。

先天性ヘモグロビン異常症や遺伝性ヘモクロマトーシスと異なり、輸血による鉄過剰症のマウスモデルはこれまで報告がなく *in vivo* での病態解析が十分進んでこなかった。今回我々は野生型マウスに自由鉄を投与することによって、骨髄内鉄過剰マウスモデルを作製し、鉄過剰が造血に及ぼす影響について解析を行った。

対象と方法

1. マウスと自由鉄負荷プロトコール

6 週齢の C57BL/6J マウス (オス) を日本クレア株式会社より購入した。鉄過剰群マウスには 6 週齢のマウスに含糖酸化鉄 (フェジン® (日医工)) を 2 週間かけて、1 回 5mg/250 μ l を計 10 回 (含糖酸化鉄として計 50mg) 腹腔内投与し、16 週齢で解析を行った。また同じ容量の生理食塩水を腹腔内投与し、同期間経過したマウスをコントロールとして同様に解析を行った (図 1)。

なお、すべてのマウスは新潟大学動物実験施設内の SPF 環境下で飼育し、実験プロトコールは新潟大学動物実験倫理委員会の審査を受け、新潟大学学長の承認を得た。

2. 末梢血算と鉄代謝マーカーの検討

鉄過剰モデルマウスとコントロールマウスを頸椎脱臼により屠殺し、マウス心腔内から末梢血液を採取した。白血球数、血小板数、網状赤血球数はフローサイトメトリー法で、赤血球数、平均赤血球容積 (MCV) は電気抵抗検出法で、ヘモグロビンは SLS-Hb 法で測定した。血清鉄と不飽和

C57/BL6J マウス(オス)

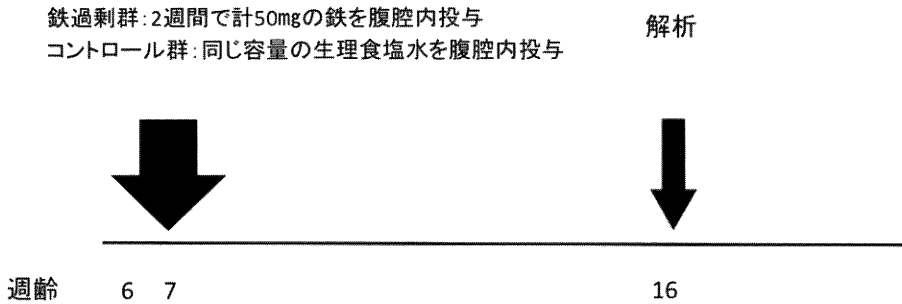


図1 自由鉄負荷プロトコール

6週齢のC57BL/6Jマウスに対し、鉄過剰群では含糖酸化鉄(フェジン®(日医工))を2週間かけて、1回5mg/250 μ lを計10回(含糖酸化鉄として計50mg)腹腔内投与し、コントロール群では同じ容量の生理食塩水を腹腔内投与した。16週齢で屠殺し、各種解析を行った。

鉄結合能(UIBC)は比色法で解析した。総鉄結合能(TIBC)及びトランスフェリン飽和率(%)はそれぞれ標準的に血清鉄+UIBC、血清鉄/TIBC \times 100として算出した。

3. 病理学的検討

マウス大腿骨及び肝臓を採取し、ホルマリン固定後に切り出しを行った。水洗後にアルコールを用いて脱水し、キシレンを用いて脱アルコール処理を行った。パラフィン浸透後にパラフィン包埋し、マイクロトーム薄切してスライドガラスに貼付した。キシレンとアルコールにて脱パラフィン操作後に水洗し、ベルリン青法による鉄染色を行った。

2%フェロシアン化カリウム液と2%塩酸を等量混合してベルリン青液を作製し、5分間染色後に水洗した。次いでヌクレオファスト赤液で1分間染色し、水洗してアルコールによる脱水、キシレンによる透徹を行い、封入して観察した。

4. 骨髓造血細胞のフローサイトメトリー

骨髓細胞はマウス両側大腿骨から21ゲージ針を用い、2%のウシ胎児血清を加えたRPMI-1640

液(コージンバイオ株式会社)でフラッシュして採取した。

骨髓細胞数を $1 \times 10^6/100\mu$ lに調製し、PE-Cy7標識マウス抗Ter119抗体を2.5 μ l、及びFITC標識抗CD71抗体を1 μ l(ともにeBioscience)とともに暗所にて4 $^{\circ}$ C 20分インキュベートした。その後、細胞数を $1 \times 10^5/100\mu$ lに調製し、アポトーシス細胞の特定にPE標識Annexin Vを5 μ l、ネクロトーシス細胞の除外に7-Amino-actinomycin D(7-AAD)を5 μ l(ともにBD Pharmingen)を加え、暗所室温で15分インキュベートした。

赤血球系前駆細胞の同定はCD71及びTer119染色により行ったが、これは過去の報告と同様の手法を採用した³⁶⁾⁻³⁹⁾。CD71陽性Ter119陽性の細胞集団は幼若な赤芽球系前駆細胞で、CD71陰性Ter119陽性の細胞集団は比較的成熟した赤芽球系前駆細胞とされている。

細胞内ROSの評価は骨髓細胞を $1 \times 10^6/100\mu$ lに調製し、PE-Cy7標識抗Ter119抗体2.5 μ l、APC標識抗CD71抗体0.625 μ l(ともにeBioscience)とともに暗所にて4 $^{\circ}$ C 20分インキュベートした。その後5 μ MのDCFDA(Invitrogen)で暗所にて37 $^{\circ}$ C 30分インキュベートした。DCFDAの蛍光はFITC

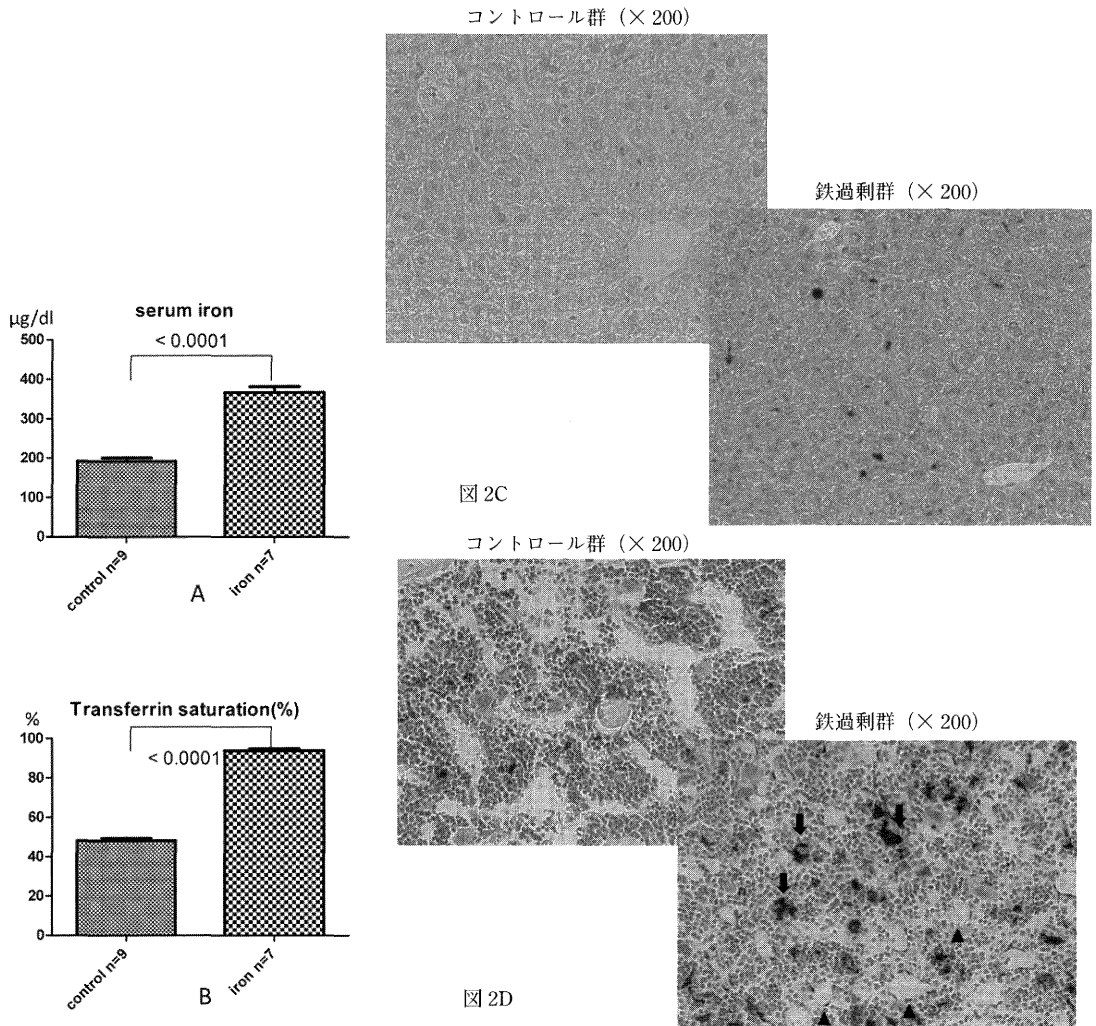


図2 鉄過剰マウスモデルの作成

- (A・B) 末梢血においてはコントロール群に比し、鉄過剰群で有意な血清鉄及びトランスフェリン飽和率の上昇を認めた (コントロール群 n = 9, 鉄過剰群 n = 7).
- (C) 鉄染色による肝臓の病理学的検討では、鉄過剰群でびまん性に肝細胞内の著明な鉄沈着を認めた.
- (D) 骨髄の鉄染色では鉄過剰群で著明なマクロファージ内 (矢印) と血管内皮細胞内 (矢頭) へ鉄沈着を認めたが、血液細胞内への明らかな鉄沈着は認められなかった.

のフィルターで検出した。

データの取得には FACS Aria flow cytometer (Becton Dickinson) を用い、データ解析には FlowJo software (Tree Star) を使用した。

5. 統計解析

すべての結果は平均値±標準誤差として示した。統計解析には Student's t test により検定し、差は $p < 0.05$ をもって有意とした。

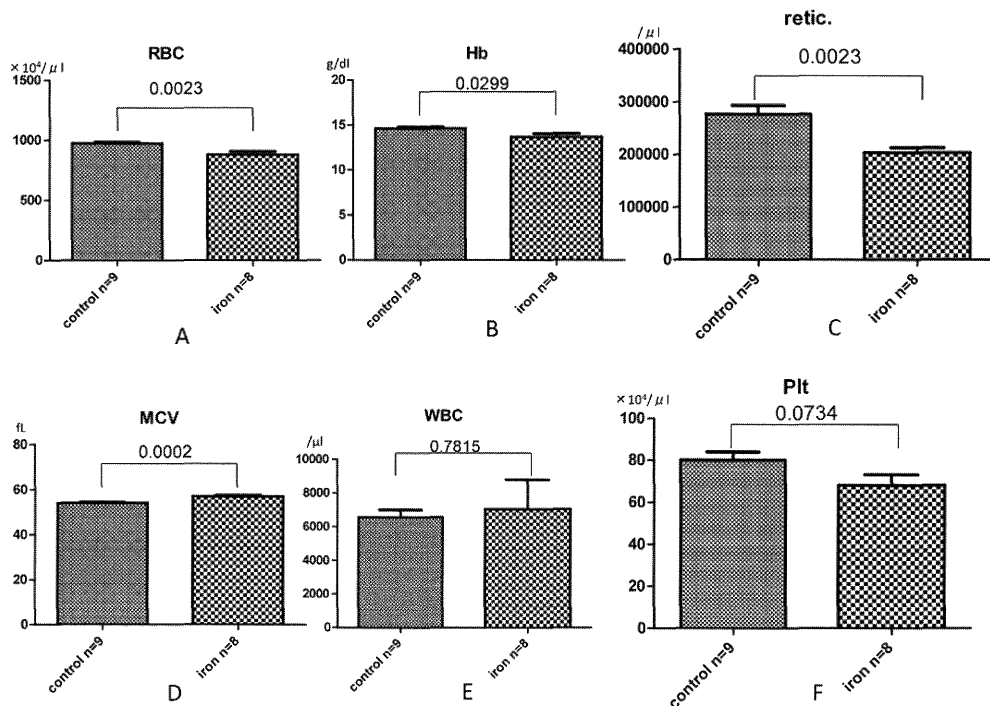


図3 末梢血血算の解析

(A・B・C・D) コントロール群に比し、鉄過剰群では赤血球数、Hb値、網状赤血球数の有意な減少を認め、MCVの有意な増大を認めた(コントロール群n=9, 鉄過剰群n=8)。

(E・F) 白血球数と血小板数には有意差は認められなかった(コントロール群n=9, 鉄過剰群n=8)。

結 果

1. 骨髄内鉄過剰マウスモデルの作製.

末梢血の血清鉄はコントロール群で $192 \pm 8 \mu\text{g/ml}$ 、鉄過剰群において $367 \pm 15 \mu\text{g/ml}$ と鉄過剰群で有意な増加を認めた ($p < 0.0001$) (図2A)。トランスフェリン飽和率はコントロール群で $48.1 \pm 1.2\%$ 、鉄過剰群で $93.8 \pm 1.0\%$ と有意な上昇を認めた ($p < 0.0001$) (図2B)。

また、病理学的には肝臓では鉄過剰群においてびまん性に著明な肝細胞内の鉄沈着を認めた(図2C)のに対し、骨髄においてはマクロファージと血管内皮細胞に強い鉄の沈着を認め、造血細胞には明らかな鉄の沈着を認めなかった(図2D)。

2. 鉄過剰群では有意な貧血を認めた.

末梢血の血算は、赤血球数がコントロール群で $974 \pm 8 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、鉄過剰群で $881 \pm 25 \times 10^4/\mu\text{l}$ と鉄過剰群で有意な減少を認めた ($p = 0.0023$) (図3A)。Hbはコントロール群で $14.6 \pm 0.1\text{g/dl}$ 、鉄過剰群で $13.7 \pm 0.4\text{g/dl}$ と鉄過剰群で有意に低値だった ($p = 0.0299$) (図3B)。網状赤血球数はコントロール群で $276710 \pm 16850/\mu\text{l}$ 、鉄過剰群で $203610 \pm 9170/\mu\text{l}$ と鉄過剰群で有意な減少を認めた ($p = 0.0023$) (図3C)。平均赤血球容積(mean corpuscular volume: MCV)はコントロール群で $54 \pm 0\text{fl}$ 、鉄過剰群で $57 \pm 1\text{fl}$ と鉄過剰群で有意に高値だった ($p = 0.0002$) (図3D)。

白血球数はコントロール群で $6556 \pm 444/\mu\text{l}$ 、鉄過剰群で $7038 \pm 1746/\mu\text{l}$ と有意差を認めな

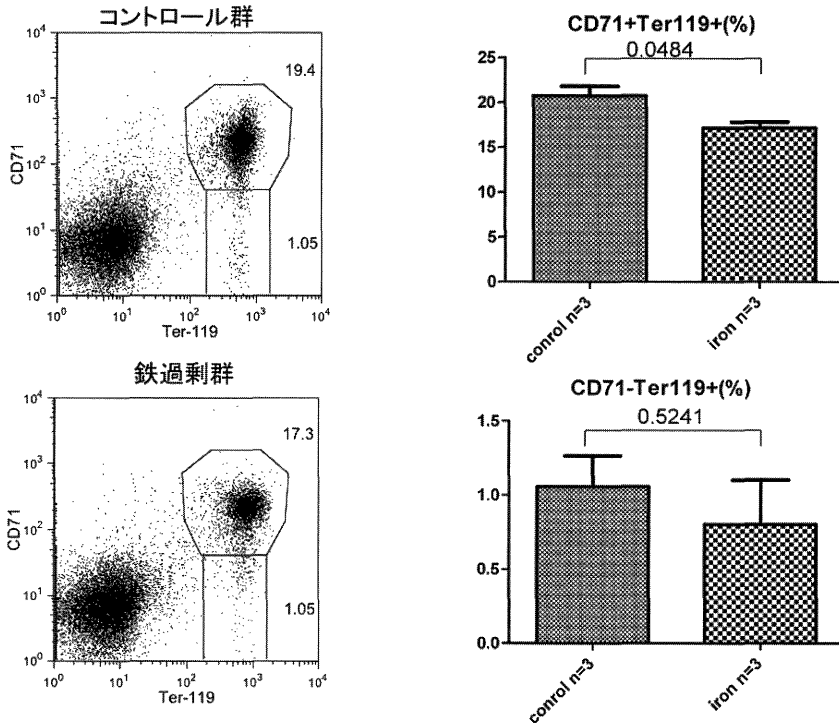


図4 CD71及びTer119染色による骨髄内赤芽球系細胞の解析

コントロール群に比し、鉄過剰群においてはCD71陽性Ter119陽性の幼若赤芽球の割合の有意な低下を認めたが、CD71陰性Ter119陽性の比較的成熟した赤芽球の割合には有意差を認めなかった(コントロール群n=3,鉄過剰群n=3)。

った ($p = 0.7815$) (図 3E). 血小板数はコントロール群で $80.1 \pm 3.8 \times 10^4/\mu\text{l}$, 鉄過剰群で $68.0 \pm 5.1 \times 10^4/\mu\text{l}$ と有意差を認めなかった ($p = 0.0734$) (図 3F).

3. 骨髄中の幼若赤芽球の有意な減少を認めた.

末梢血にて鉄過剰群で有意な貧血を認めたため、骨髄における赤芽球系細胞割合をフローサイトメトリー法で解析を行った. CD71陽性Ter119陽性の比較的幼若な赤芽球の割合はコントロール群で $20.7 \pm 1.1\%$, 鉄過剰群で $17.1 \pm 0.7\%$ と鉄過剰群で有意な減少を認めた ($p = 0.0484$). CD71陰性Ter119陽性の成熟した赤芽球の割合はコントロール群で $1.1 \pm 0.2\%$, 鉄過剰群で $0.8 \pm 0.3\%$ と有意差がなかった ($p = 0.5241$) (図 4).

4. 幼若赤芽球内 ROS 産生.

CD71陽性Ter119陽性細胞の減少を認めたため、この細胞集団における細胞内ROSの解析を行った. 細胞内DCFDAの蛍光強度の平均値はコントロール群で 351 ± 16 , 鉄過剰群 397 ± 49 と有意な差は見られなかった ($p = 0.4231$) (図 5A).

5. 幼若赤芽球のアポトーシスの割合.

CD71陽性Ter119陽性細胞集団においてアポトーシスを来している細胞の割合はコントロール群で $2.5 \pm 0.7\%$, 鉄過剰群で $2.9 \pm 0.4\%$ と有意差は見られなかった ($p = 0.6397$) (図 5B).

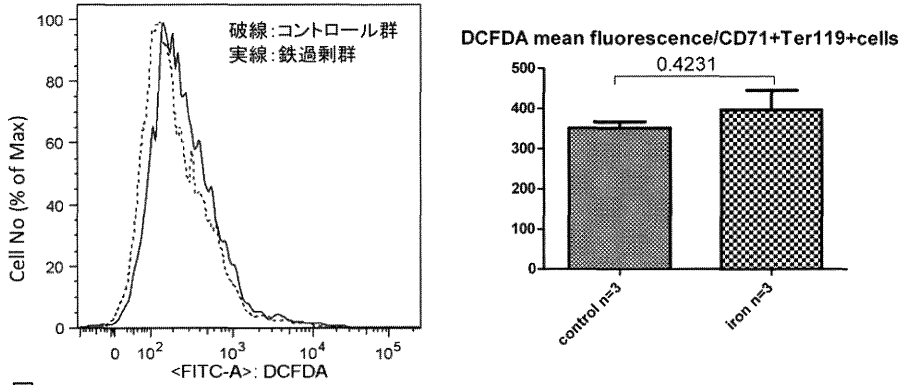


図5A

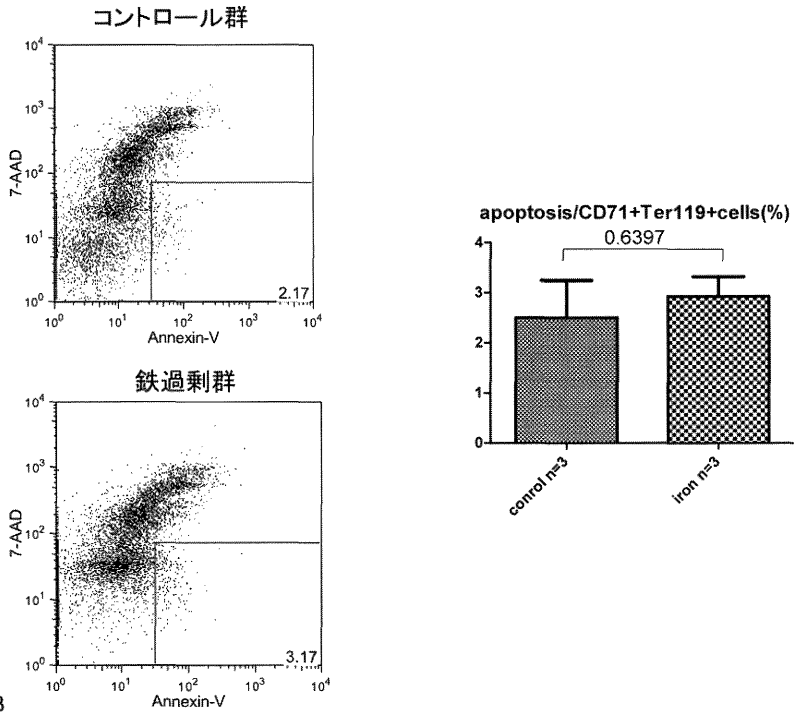


図5B

図5 CD71陽性 Ter119陽性幼若赤芽球の細胞内ROS及びアポトーシス解析

- (A) コントロール群と鉄過剰群では、CD71陽性 Ter119陽性細胞内のDCFDA蛍光値の平均値に有意差は見られなかった(コントロール群 n = 3, 鉄過剰群 n = 3)。
- (B) コントロール群と鉄過剰群では、CD71陽性 Ter119陽性細胞のアポトーシスを来している細胞の割合に有意差は見られなかった(コントロール群 n = 3, 鉄過剰群 n = 3)。

考 察

今回作成した輸血後鉄過剰症マウスモデルで骨髄及び肝での鉄の沈着を証明できた。これまで先天性ヘモグロビン異常症や遺伝性ヘモクロマトーシスのマウスモデルは存在するが、輸血後鉄過剰症モデルについての報告はない。今回作成したマウスモデルは輸血後鉄過剰症を *in vivo* で解析する有用なモデルとなると考えられる。

輸血後鉄過剰症モデルでは肝臓でびまん性に鉄の沈着を認めたのに対して、興味深いことに骨髄ではマクロファージと血管内皮細胞に特異的な鉄の沈着を認めた。これは輸血後鉄過剰症での両組織における鉄代謝や分布の違いを反映している可能性が唆される。一方遺伝性ヘモクロマトーシスのマウスモデルにおける生体内、特に骨髄内における過剰鉄の分布の特徴に関する報告はこれまでなく、今後輸血後鉄過剰症モデルとの異同について検討することにより、鉄沈着の分布が鉄過剰による臓器障害の発症機序に与える影響を解析できると考えられる。

自由鉄が正常造血に及ぼす影響に関して *in vivo* での報告はこれまでなされておらず、*in vitro* での報告が散見されるのみである。Juvonen Eらは健常ドナーから得られた赤血球系幹細胞である erythroid burst forming unit (BFU-E) を自由鉄の存在下で培養すると、自由鉄の濃度依存性にコロニーの数及び大きさがともに抑制され、これらの増殖抑制は、自由鉄を補足するアポフェリチンを培地に加えることにより緩和されることを報告している⁴⁰⁾。これは自由鉄の赤芽球系細胞に対する直接障害を示唆している。今回の輸血後骨髄内鉄過剰モデルでは、鉄過剰群で有意な貧血と比較的幼若な赤芽球細胞の段階で強い造血抑制を認めたことから、輸血後鉄過剰症における造血抑制は赤血球系統に強く出現し、これは比較的幼若な赤芽球の分化段階における造血抑制の結果であると考えられた。幼若赤芽球の造血が自由鉄によって強く抑制される点においては、過去の *in vitro* の報告と矛盾しない結果であった。しかしながら、今回の検討では赤芽球内への明らかな鉄沈着がな

く、細胞内 ROS の上昇やアポトーシスの亢進が見られないことから、本研究で認められた赤血球造血の抑制は細胞内 ROS を介した過剰鉄による直接的な赤芽球障害とは異なる機序によって生じている可能性がある。

輸血後鉄過剰モデルでの鉄沈着の分布は骨髄中のマクロファージ内および血管内皮細胞への鉄の沈着が特徴的であった。骨髄内マクロファージは赤芽球島の一部をなし、赤血球系細胞の増殖や分化に重要な役割を担っていることは広く知られている⁴¹⁾。マクロファージは赤芽球島の中心に位置し、種々の分化段階の赤血球系先駆細胞がマクロファージを取り囲むように存在している。赤血球系前駆細胞は赤芽球島において分化・増殖し、最終的に脱核して、網状赤血球となって赤芽球島から離れていくとされている。赤芽球島においては様々な細胞間接着分子や液性因子などによって、赤血球前駆細胞の分化・増殖が正あるいは負に制御されていることが明らかにされている。輸血後鉄過剰モデルの赤血球系造血の抑制の機序としてマクロファージ内に鉄が沈着したことによって、赤血球系特異的な造血支持細胞（いわゆる niche）としてのマクロファージ機能に何らかの異常を来し、赤血球系のみに関連した造血抑制を来した可能性が考えられ、今後詳細な機序について検討を続けていきたい。

また骨髄血管内皮細胞は造血幹細胞の niche の一つであると考えられており⁴²⁾、骨髄内鉄過剰状態が血管内皮細胞を niche とする造血分化過程にも何らかの異常を来している可能性が考えられる。骨髄血管内皮細胞の niche 機能の lineage 特異性は十分明らかにされていない。本モデルは血管内皮細胞の niche 機能の解析にも有用であると考えられる。

結 論

骨髄内鉄過剰マウスモデルを作製し、自由鉄が正常造血に及ぼす影響とその機序についての解析を行った。輸血後鉄過剰モデルにおいては骨髄内で特徴的な鉄の分布を示し、幼若赤芽球の分化段

階における造血抑制を来した。自由鉄による赤血球造血抑制の機序は赤血球系細胞への直接障害ではなく、マクロファージや血管内皮細胞といった造血微小環境への障害である可能性が示唆された。

謝 辞

本研究においてご指導を賜りました、新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞病理学分野教授 内藤 眞先生、同准教授 長谷川 剛先生、同助教 大橋瑠子先生、新潟大学医歯学総合病院第一内科講師 鳥羽 健先生、同講師 塙 晴雄先生、新潟大学医歯学総合病院高密度無菌治療部助教 増子正義先生に深謝致します。

文 献

- 1) Andrews NC and Schmidt PJ: Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 69: 69 - 85, 2007.
- 2) 小澤敬也：輸血後鉄過剰症の診療ガイド，厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業－特発性造血障害に関する調査研究. 2008.
- 3) Sahlstedt L, von Bonsdorff L, Ebeling F, Ruutu T and Parkkinen J: Effective binding of free iron by a single intravenous dose of human apotransferrin in haematological stem cell transplant patients. *Br J Haematol.* 119: 547 - 553, 2002.
- 4) McNamara L, MacPhail AP, Mandishona E, Bloom P, Paterson AC, Rouault TA and Gordeuk VR.: Non - transferrin - bound iron and hepatic dysfunction in African dietary iron overload. *J Gastroenterol Hepatol.* 14: 126 - 132, 1999.
- 5) Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C and Cabantchik ZI: Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood.* 102: 2670 - 2677, 2003.
- 6) Aisen P: Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 2137 - 2143, 2004.
- 7) Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL and Hediger MA: Cloning and characterization of a mammalian proton - coupled metal - ion transporter. *Nature.* 31; 388: 482 - 488, 1997.
- 8) Oudit GY, Sun H, Trivieri MG, Koch SE, Dawood F, Ackerley C, Yazdanpanah M, Wilson GJ, Schwartz A, Liu PP and Backx PH: L - type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron - overload cardiomyopathy. *Nat Med.* 9: 1187 - 1194, 2003.
- 9) Shindo M, Torimoto Y, Saito H, Motomura W, Ikuta K, Sato K, Fujimoto Y and Kohgo Y: Functional role of DMT1 in transferrin - independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell, HLF. *Hepatol Res.* 35: 152 - 162, 2006.
- 10) Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD and Cousins RJ: Zip14 (Slc39a14) mediates non - transferrin - bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 13612 - 13617, 2006.
- 11) Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y and Kato J: Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.* 88: 7 - 15, 2008.
- 12) Gao J, Zhao N, Knutson MD and Enns CA: The hereditary hemochromatosis protein, HFE, inhibits iron uptake via down - regulation of Zip14 in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 283: 21462 - 21468, 2008.
- 13) Harrison PM and Arosio P: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1275: 161 - 203, 1996.
- 14) Arosio P and Levi S: Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 33: 457 - 463, 2002.
- 15) GREENBERG GR and WINTROBE MM: A labile iron pool. *J Biol Chem.* 165: 397, 1946.
- 16) Kakhlon O and Cabantchik ZI: The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes (1). *Free Radic Biol Med.* 33: 1037 - 1046, 2002.
- 17) Miyazaki E, Kato J, Kobune M, Okumura K, Sasaki K, Shintani N, Arosio P and Niitsu Y: Denatured H - ferritin subunit is a major constituent of haemosiderin in the liver of patients with iron overload. *Gut.* 50: 413 - 419, 2002.
- 18) Um HD, Orenstein JM and Wahl SM: Fas medi-

- ates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway. *J Immunol.* 156: 3469 - 3477, 1996.
- 19) Sato T, Machida T, Takahashi S, Iyama S, Sato Y, Kuribayashi K, Takada K, Oku T, Kawano Y, Okamoto T, Takimoto R, Matsunaga T, Takayama T, Takahashi M, Kato J and Niitsu Y: Fas - mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in Jurkat cells. *J Immunol.* 173: 285 - 296, 2004.
- 20) Pippard MJ, Warner GT, Callender ST and Weatherall DJ: Iron absorption and loading in beta - thalassemia intermedia. *Lancet.* 2: 819 - 821, 1979.
- 21) de Alarcon PA, Donovan ME, Forbes GB, Landaw SA and Stockman JA 3rd: Iron Absorption in the Thalassemia Syndromes and Its Inhibition by Tea. *N Engl J Med.* 300: 5 - 8, 1979.
- 22) Van Wyck DB, Popp RA, Foxley J, Witte MH, Witte CL and Crosby WH: Spontaneous iron overload in alpha - thalassemic mice. *Blood.* 64: 263 - 266, 1984.
- 23) Pootrakul P, Kitcharoen K, Yansukon P, Wasi P, Fucharoen S, Charoenlarp P, Brittenham G, Pippard MJ and Finch CA: The effect of erythroid hyperplasia on iron balance. *Blood.* 71: 1124 - 1129, 1988.
- 24) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T and Kaplan J: Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 306: 2090 - 2093, 2004.
- 25) Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P, Guy E, Breda L, Chadburn A, Liu Y, Amariglio N, Rechavi G, Rachmilewitz EA, Breuer W, Cabantchik ZI, Wrighting DM, Andrews NC, de Sousa M, Giardina PJ, Grady RW and Rivella S: Ineffective erythropoiesis in beta - thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down - regulation of hepcidin and up - regulation of ferroportin. *Blood* 109: 5027 - 5035, 2007.
- 26) Adamsky K, Weizer O, Amariglio N, Breda L, Harmelin A, Rivella S, Rachmilewitz E and Rechavi G: Decreased hepcidin mRNA expression in thalassemic mice. *Br J Haematol.* 124: 123 - 124, 2004.
- 27) Orly WS, Konstantin A, Ninette A, Eliezer R, Laura B, Stefano R and Gideon R: mRNA Expression of Iron Regulatory Genes in β - Thalassemia Intermedia and β - Thalassemia Major Mouse Models. *Am J Hematol.* 81: 479 - 483, 2006.
- 28) Antonis K, Ioannis P, Danai P, Filia A, Angeliki G, Vassilis L, Nikos S and George P: The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica.* 91: 809 - 812, 2006.
- 29) Orly WS, Konstantin A, Ninette A, Carina L, Ariel K, William B, Eliezer R, Laura B, Stefano R, Z Ioav C and Gideon R: Downregulation of hepcidin and haemojuvelin expression in the hepatocyte cell - line HepG2 induced by thalassaemic sera. *Br J Haematol.* 135: 129 - 138, 2006.
- 30) Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NL, Wang RH, Eling TE, Childs R, Ganz T, Leitman SF, Fucharoen S and Miller JL: High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* 13: 1096 - 1101, 2007.
- 31) Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglini E, Passamonti F, Arcaini L, Maffioli M, Bernasconi P, Lazzarino M and Cazzola M: Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol.* 23: 7594 - 7603, 2005.
- 32) Jabbour E, Kantarjian HM, Koller C and Taher A: Red blood cell transfusions and iron overload in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer.* 112: 1089 - 1095, 2008.
- 33) Alessandrino EP, Della Porta MG, Bacigalupo A, Malcovati L, Angelucci E, Van Lint MT, Falda M, Onida F, Bernardi M, Guidi S, Lucarelli B, Rambaldi A, Cerretti R, Marengo P, Pioltelli P, Pascutto C, Oneto R, Pirolini L, Fanin R and Bosi

- A: Prognostic impact of pre-transplantation transfusion history and secondary iron overload in patients with myelodysplastic syndrome undergoing allogeneic stem cell transplantation: a GITMO study. *Haematologica*. 95: 476 - 484, 2010.
- 34) Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, Strupp C, Lazzarino M, Aul C and Cazzola M: Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 25: 3503 - 3510, 2007.
- 35) Ramirez JM, Schaad O, Durual S, Cossali D, Docquier M, Beris P, Descombes P and Matthes T: Growth differentiation factor 15 production is necessary for normal erythroid differentiation and is increased in refractory anaemia with ring sideroblasts. *Br J Haematol*. 144: 251 - 262, 2009.
- 36) de Jong K, Emerson RK, Butler J, Bastacky J, Mohandas N and Kuypers FA: Short survival of phosphatidylserine-exposing red blood cells in murine sickle cell anemia. *Blood*. 98: 1577 - 1584, 2001.
- 37) Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C and Lodish HF: Ineffective erythropoiesis in *Stat5a* (-/-) *5b* (-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*. 98: 3261 - 3273, 2001.
- 38) Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH and Socolovsky M: Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood*. 108: 123 - 133, 2006.
- 39) Li H, Rybicki AC, Suzuka SM, von Bonsdorff L, Breuer W, Hall CB, Cabantchik ZI, Bouhassira EE, Fabry ME and Ginzburg YZ: Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice. *Nat Med*. 16: 177 - 182, 2010.
- 40) Juvonen E, Sahlstedt L, Parkkinen J and Ruutu T: Inhibition of erythroid and granulocyte-macrophage colony formation by non-transferrin-bound iron in vitro: protective effect of apo-transferrin. *Eur J Haematol*. 79: 126 - 131, 2007.
- 41) Chasis JA and Mohandas N: Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*. 112: 470 - 478, 2008.
- 42) Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C and Morrison SJ: SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 121: 1109 - 1121, 2005.

(平成24年1月17日受付)