

総 説

細胞内鉄動態と酸化ストレス抵抗性

富田 和男,^a 桑原 義和,^{a,b*} 五十嵐健人,^a 高 裕子,^{a,c} 長澤 大成,^a 山西沙祐里,^{a,d}
西谷 佳浩,^c 漆原 佑介,^e 宮脇 正一,^d 栗政 明弘,^b 福本 学,^f 佐藤 友昭^a

Iron Dynamics and Oxidative Stress Resistance

Kazuo TOMITA,^a Yoshikazu KUWAHARA,^{a,b*} Kento IGARASHI,^a Yuko TAKASHI,^{a,c} Taisuke NAGASAWA,^a
Sayuri YAMANISHI,^{a,d} Yoshihiro NISHITANI,^c Yusuke URUSHIHARA,^e Shouichi MIYAWAKI,^d
Akihiro KURIMASA,^b Manabu FUKUMOTO,^f and Tomoaki SATO^a

^aDepartment of Applied Pharmacology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University;

^bDivision of Radiation Biology and Medicine, Faculty of Medicine, Tohoku Medical and Pharmaceutical University;

^cDepartment of Restorative Dentistry and Endodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University; ^dDepartment of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University; ^eLaboratory for Radiation Biology, Graduate School of Medicine, Tohoku university; ^fRIKEN Center for Advanced Intelligence Project.

(Received November 20, 2019)

Iron is the most abundant metal in our body, and is very important for vital phenomena such as oxygen transport in red blood cells. Iron is involved not only in oxygen transport but also in collagen, DNA, and ATP synthesis. Therefore, lack of iron has an adverse effect on the cellular level. In addition, it has been reported if iron is excessive, carcinogenesis, diabetes and neurodegenerative diseases may occur. It has been also reported the sensitivity to oxidative stress was changed by intracellular and mitochondrial iron dynamics. We will discuss about the mechanism of incorporation of iron into the body, uptake and reuse of iron in the cell and mitochondria iron metabolism because mitochondria are the main iron-utilizing organelles in the cell.

Key words — Iron, Oxidative Stress Sensitivity, Mitochondria, ρ^0 cell, CRR cell

1. はじめに

鉄は、生体内において酸素運搬やエネルギー産生などの生命現象に必須の原子であり、生体内に最も多く存在する金属元素である。ヒトの生体内において、鉄の約70%は血液中で酸素分子と結合し、全身へ酸素を運搬する役割を担う赤血球におけるヘモグロビンの構成要素として存在している。残りの30%は、骨格筋におけるミオグロビンの構成要素、もしくは肝臓、脾臓、骨髄などで貯蔵鉄として存在している。そして細胞内において、鉄は電子伝達系代謝酵素の補酵素としても利用されている。¹⁾

鉄は酸素の運搬だけでなく、コラーゲン合成、

リボヌクレオチドリダクターゼによるDNA合成、電子伝達系への電子の授受によるATP合成等にも関与している。そのため、鉄不足により鉄運搬が低下し鉄欠乏性貧血が起こる。鉄不足により鉄を生合成に要求するコラーゲン合成が低下し、皮膚や骨、血管の強度低下を招き、あざができやすくなったり内出血を起こしやすくなったりする。また、鉄不足により、活性中心が鉄であるDNA合成に関与するリボヌクレオチドリダクターゼの酵素が働かなくなるためDNA合成に支障をきたし、電子伝達系への電子の授受ができなくなるため、ATP合成が阻害され細胞に悪影響がでる。

鉄が不足するだけでなく、鉄が過剰となっても生体に悪影響が出ることが分かっている。例えば、活性酸素の産生を介して発がんが起きたり、鉄が肝臓に沈着しインスリン抵抗性を惹起することにより糖尿病が発症したり、アストロサイトに鉄が沈着することにより活性酸素の産生が促され、神経変性疾患を発症したりすることが報告されている。

^a 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科応用薬理学分野, ^b 東北医科薬科大学医学部放射線基礎医学教室, ^c 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科保存学分野, ^d 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科矯正学分野, ^e 東北大学大学院医学系研究科放射線生物学分野, ^f 理化学研究所革新知能統合研究センター

*e-mail: y-kuwahara@tohoku-mpu.ac.jp

生体内では赤血球のヘモグロビン, 血漿中のトランスフェリン, 筋肉中のミオグロビン, 細胞内で鉄の保存に関わるフェリチン等により鉄の過不足がないようコントロールされており, その分子メカニズムについては近年になってかなり理解が進んできた. これは, 鉄代謝に関わる重要な分子として, 上記の他, 細胞内から血中に Fe^{2+} を輸送するタンパク質であるフェロポーチン, 細胞内に Fe^{2+} を取り込む輸送タンパク質である divalent metal transporter 1 (DMT1), 肝臓で合成される鉄代謝ホルモンであるヘプシジン, 細胞質からミトコンドリアへの鉄輸送タンパク質として働くミトフェリン, ミトコンドリアで鉄シャペロンタンパク質として働くフラタキシンなどが明らかとなり, 細胞内の鉄量が, Iron response element (IRE) と Iron regulatory protein (IRP) による翻訳制御システムで調節されることや, 鉄を介した細胞死, いわゆるフェロトーシスの概念が提唱されるなど,²⁾ 鉄分子の細胞内動態が次々と明らかとなってきたためである.

さらに, 細胞内鉄動態により酸化ストレスへの感受性が変化することが報告されているが, これは細胞内の主たる鉄利用細胞内小器官であるミトコンドリアの鉄動態ともリンクしていることが明らかとなった. 生体内の鉄代謝のメカニズムは複雑であるが, その根幹をなす部分についての理解は急速に進んできており, これらの研究により新たな鉄疾患病態の解明や, 分子標的薬の創薬につながる可能性が高まってきている.

本総説では, 生体の鉄代謝メカニズムおよび放射線や過酸化水素 (H_2O_2) などの酸化ストレスによってもたらされた鉄を介した細胞応答について, 筆者らの研究成果を含め概説する.

2. 生体内への鉄の取り込みと再利用

健常な成人の体内の鉄の総量は通常 3–4 g といわれている. 鉄は, 汗, もしくは腸管粘膜や皮膚上皮の剥離・脱落でわずかに失われるものの, 積極的な排出機構は存在していないといわれており, 失われた鉄 (1–2 mg/日) は食事から補充されている.³⁾

大気中の酸素分圧が高いため鉄は通常 Fe^{3+} の状態で存在しているが, これは水に溶けない. 従って鉄の生体内への取り込みは, この Fe^{3+} を何らかの形でキレートして取り込むか, Fe^{3+} を還元して

Fe^{2+} とし, 水への溶解性を高めた上で取り込むことになる.⁴⁾

食事から摂取した鉄の吸収を行っているのは主に十二指腸および小腸上部の上皮である. ここで Fe^{3+} は鉄還元酵素である Cytochrome b-like ferrireductase (Dcytb) により Fe^{2+} に還元され, DMT1 によって細胞内に取り込まれる. 取り込まれた鉄は, フェリチンと結合して貯蔵されるか, 細胞膜上のフェロポーチンによって血中に排出される.⁵⁾

また, フェロポーチンに結合し, その分解を促進することで, 腸上皮から血中への鉄の排出を抑制するヘプシジンが報告されている.⁶⁾ ヘプシジンは肝臓から分泌される唯一のペプチドホルモンであり, 血中のヘプシジンがフェロポーチンに結合すると, エンドサイトーシスにより細胞質に取り込まれ, 共にリソソームで分解される. これにより細胞膜上のフェロポーチンの量が低下し, 鉄の細胞内から血中への排出が抑制される.

生体内で最大の鉄代謝の場である赤血球では, 鉄量に換算すると 1 日 20–25 mg の鉄が代謝されているが, そのほとんどは老化した赤血球をマクロファージが処理することで生成される. マクロファージに貪食された赤血球は, 活性酸素種 (ROS) と加水分解によりヘムを放出し, ヘムオキダーゼ 1 (HO-1) と酸素により Fe^{2+} が放出されることが報告されており, その後, Fe^{2+} はフェロポーチンによって血中に排出され, トランスフェリンにより骨髄をはじめとした利用器官に運搬され, トランスフェリンレセプターと結合後, エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ再利用される.⁷⁾

3. 細胞内鉄動態

鉄代謝に関わる遺伝子の 5'UTR もしくは 3'UTR には, IRE と呼ばれるステムループ構造が保存されており, そこに IRP と呼ばれる RNA 結合タンパク質が結合することで, その遺伝子翻訳を制御している.⁸⁾

例えば, フェリチン, フェロポーチン, ミトコンドリアマトリクスにおけるクエン酸回路の酵素アコニターゼ (ACO2), 低酸素誘導因子 HIF-2 α の 5'UTR には IRE が存在し, 鉄濃度が低い場合には活性化した IRP1 がここに結合し, これらの翻訳が抑制される. その結果, 細胞内鉄利用, 貯蔵,

排出が抑制され細胞内の鉄濃度が上昇する。

一方、トランスフェリン受容体やDMT1には3'UTRにこのIREが存在し、ここにIRP1が結合すると、エンドヌクレアーゼによるmRNA分解が起きなくなりmRNAが安定し、これらの翻訳が亢進する。その結果、細胞内への鉄の取り込みが亢進し、細胞内の鉄濃度が高まる方向へと変化する。

逆に鉄が過剰な場合、IRP1はIREに結合せず、5'UTRにIREがあるフェリチンやACO2等の翻訳は亢進、3'UTRにIREがあるトランスフェリン受容体やDMT1の翻訳はエンドヌクレアーゼによりmRNAが分解されることで抑制され、細胞内鉄濃度は減少する。

4. ミトコンドリアと鉄代謝

ミトコンドリアは、ヘモグロビン合成に関わるなど、主たる鉄利用細胞内小器官である。真核生物は、大きく分けてヘムと鉄-硫黄クラスターという2種類の鉄結合様式を介して鉄量の変化を感知しているといわれている。

ヘムはヘモグロビン、シトクロム p450、シトクロムオキシダーゼなどの活性中心として機能しており、この合成はミトコンドリアマトリックスの鉄付加酵素 (ferrochelatase: FECH) により最終的に触媒される。⁹⁾ このFECHはミトコンドリアに存在し、鉄の取り込みを担うトランスポーターであるミトフェリンと複合体を形成することが報告されており、¹⁰⁾ ヘム合成に効率的に機能していると考えられている。

一方、鉄-硫黄クラスターは鉄と硫黄からなる構造体であり、その構造はほとんどの場合タンパク質内部のシステイン残基に配位している。鉄-硫黄クラスターは、ミトコンドリアにおいては呼吸鎖電子伝達複合体、ビタミン合成、ACO2などで機能している。¹¹⁾

また、細胞質型アコニターゼ (ACO1) と細胞内鉄量を制御するIRP1は同一の分子であることが報告されており、¹²⁾ IREに結合すると鉄関連タンパク質のmRNA制御因子、鉄-硫黄クラスターに結合すると酵素であるACO1として働く。IRP1はACO2の5'UTRにも結合することが報告されており、³⁾ また、ROS等によって低下したACO2活性は鉄シャペロンとして知られているフラタキシンによってその活性が修復され、鉄-硫黄クラスター分解を保護することにより、遊離鉄の蓄積と

それに伴うヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成を防いでいることが報告されている。¹³⁾

5. 鉄動態と疾病との関与

体内に鉄が過剰になると、 Fe^{2+} と H_2O_2 の存在下でいわゆるフェントン反応を介して $\cdot\text{OH}$ が産生される。 $\cdot\text{OH}$ は脂質の過酸化を惹起して細胞膜を傷害することで、フェロトーシスをはじめとした細胞死を導く。また、 $\cdot\text{OH}$ はDNA損傷を引き起こして発がんを誘発すること、過剰な鉄が免疫細胞を分化・増殖させることにより慢性炎症を増悪させること、さらには、アストロサイトへの鉄沈着や $\cdot\text{OH}$ がアルツハイマー病をはじめとした神経変性疾患の発症に関与するとの報告もある。^{14,15)}

鉄過剰症として遺伝性のヘモクロマトーシスが挙げられる。この疾患は欧米諸国で多く見られる疾患であるが、80%以上にhemochromatosis (HFE) 遺伝子のC282Y変異がみられる。HFEは β -microglobulinをアンカーとして、細胞表面でトランスフェリン受容体と会合し、トランスフェリン受容体に対する結合親和性を制御しているが、この変異が起これると、HFEの細胞表面への表出が阻害されることにより細胞膜上でのトランスフェリンとの会合が阻害され、その結果、過剰な鉄蓄積を引き起こす。^{16,17)} この疾患では肝細胞がんの発症率が対照の200倍以上に達するといわれており、鉄過剰とがんの関与が示されている。また、ミトコンドリアへの鉄蓄積を呈する疾病としてフリードライヒ運動失調症がある。この原因遺伝子は、前出のミトコンドリア鉄シャペロンのフラタキシンであることが報告されている。¹⁸⁾

長期の鉄過剰が引き起こす生体の不利益の例として、サラセミアが挙げられる。ヘモグロビンの量的異常によって引き起こされるこの遺伝性貧血は、長期にわたる定期的な輸血により生存期間を明らかに延長するが、その後、輸血による鉄過剰症により心臓や肝臓に障害を生じ、合併症を引き起こしやすくなる。この鉄過剰症は、鉄キレート剤 (deferasirox) の投与により防止できることから、鉄過剰による生体内鉄動態の制御は非常に重要である。鉄キレート剤投与以外の鉄過剰の治療法には、瀉血による鉄の体外への排出がある。瀉血は、C型慢性肝炎患者における肝臓への鉄蓄積抑制効果もあることが報告され、¹⁹⁾ 日本ではC型慢性肝炎患者の瀉血は保険適用となっている。

鉄欠乏によって生じる最も代表的な疾患は鉄欠乏性貧血であり, 10 g/dl 未満となった場合に鉄剤による治療を行う。また, 消化器系のがん, 潰瘍では, 消化管出血が生じ鉄不足に陥ることがある。消化管出血の原因であるがんや潰瘍を薬剤や外科的手術により消失させた後, 経口鉄剤の服用などで失われた鉄を補充する。

6. 酸化ストレス感受性・抵抗性モデル細胞における鉄動態

鉄代謝が異常となると様々な疾病が引き起こされる。これは5.でも述べたが, 細胞内の Fe^{2+} が H_2O_2 と反応することにより $\cdot\text{OH}$ を生じるためである。筆者らは子宮頸がん細胞株である HeLa および舌がん細胞株である SAS 細胞より, H_2O_2 に感受性の細胞 (ρ^0 細胞) と抵抗性の細胞 (CRR) を樹立した。^{20,21)} これらの細胞におけるミトコンドリア内の遊離の Fe^{2+} 量を MitoFerro-Green にて検討した結果, ρ^0 細胞における遊離の Fe^{2+} は親株と比べ多く, 逆に CRR 細胞では少なかった (Figure

1)。また, ミトコンドリア内だけでなく細胞質全体での遊離の Fe^{2+} 量について FerroOrange にて測定したところ同様の結果であった (Figure 2)。²²⁾ これらの結果から, これらの細胞は, 遊離の Fe^{2+} 量が異なるために H_2O_2 に対して感受性, もしくは抵抗性を示すと考えられた。

H_2O_2 に感受性を示す ρ^0 細胞は, mtDNA が欠失した細胞であり, ピルビン酸とウリジンを添加する特別な条件で維持・培養される。ヒト細胞における ρ^0 細胞は King らによりはじめて樹立された。²³⁾ ρ^0 細胞は低濃度のエチジウムブロマイド処理で比較的容易に樹立できることから, 現在では多くの研究室にて多様な ρ^0 細胞が樹立され研究が行われている。CRR 細胞は, 桑原らによって段階的な放射線照射を行うことにより樹立された。²¹⁾

樹立した ρ^0 細胞はミトコンドリアの電子伝達系が不全となり, ρ^0 細胞における ATP 量が親株に比べ有意に減少していることが分かっている。一方, H_2O_2 処理前の親株および ρ^0 細胞の膜の状態を代表的な脂質の過酸化物質マーカーである HNE 抗

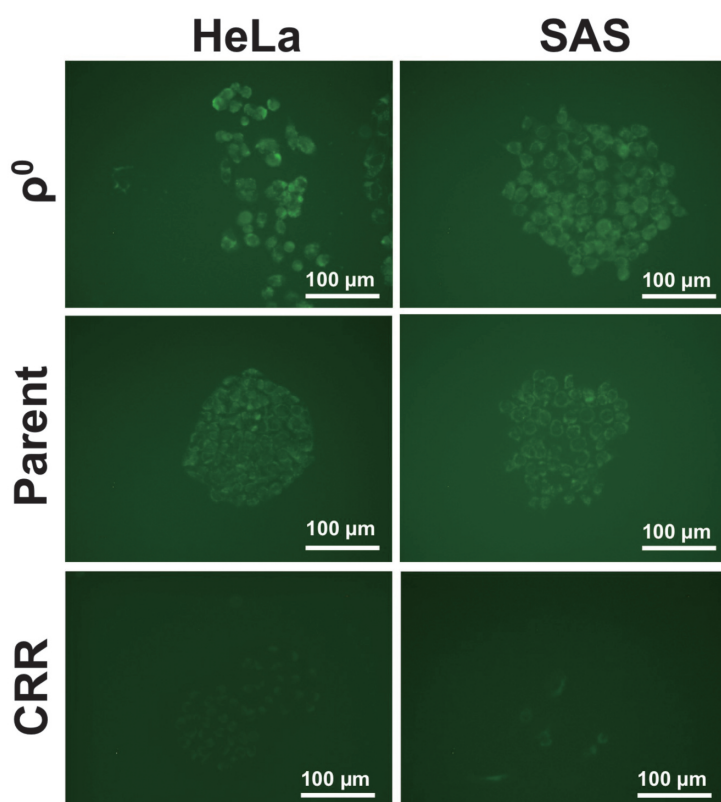


Fig. 1. Mitochondrial Fe^{2+} detection in ρ^0 and CRR cells (HeLa and SAS Cells). Mitochondrial Fe^{2+} was detected using Mito-FerroGreen (Dojindo, Kumamoto, Japan, 5 μM) according to the manufacturer's protocol. Cells on glass-bottomed dishes (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) were washed 2 times by HBSS (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) to remove FBS. Then cells were treated with Mito-FerroGreen with HBSS for 30 min at 37°C. After incubation, Mito-FerroGreen was washed out with HBSS three times. Fluorescence images were obtained using BZ-8000 fluorescence microscope (KEYENCE Corporation, Osaka, Japan).

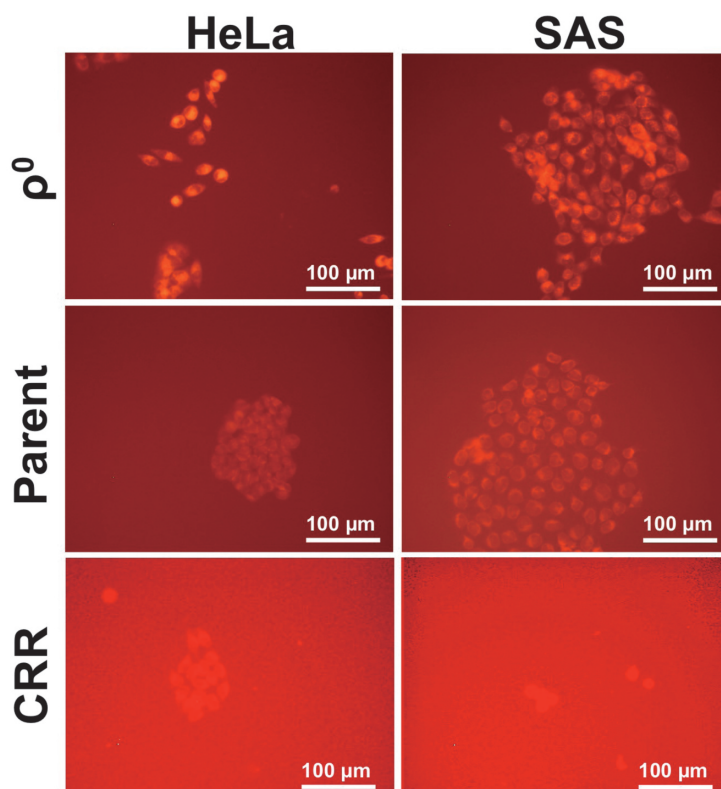


Fig. 2. Intracellular Fe²⁺ detection in ρ^0 and CRR cells (HeLa and SAS Cells). Intracellular Fe²⁺ was detected using FerroOrange (Goryo Chemical Inc., Hokkaido, Japan, 1 μ M). FerroOrange staining was performed in the same procedure as Mito-FerroGreen.

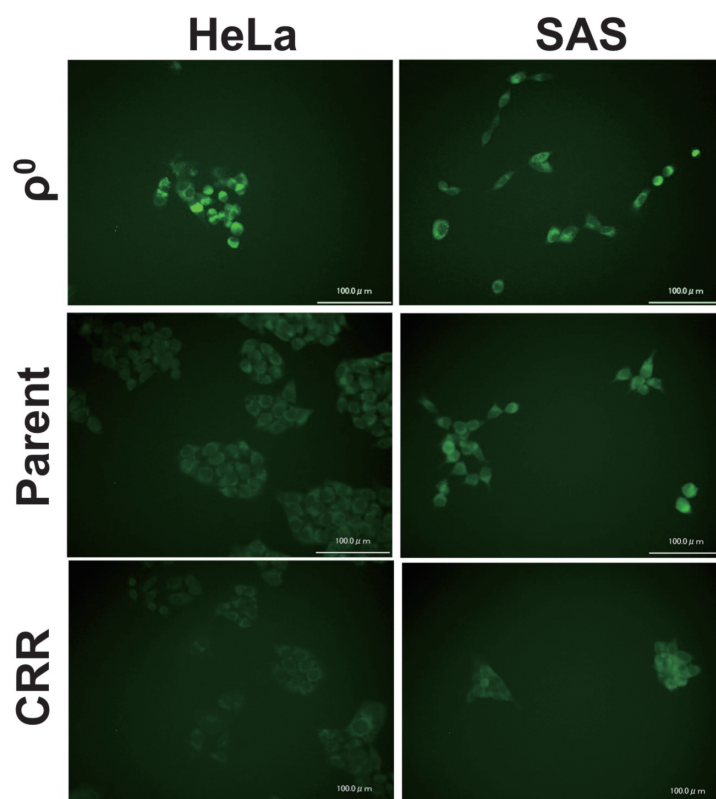


Fig. 3. \cdot OH detection in ρ^0 and CRR cells (HeLa and SAS Cells). \cdot OH was detected using HPF (Goryo Chemical Inc, 10 μ M) according to the manufacturer's protocol. Fluorescent images were obtained using a BZ-8000 fluorescence microscope (KEYENCE Corporation) with microscope observation (MIC) buffer (130 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 2 mM glucose, 20 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 2.5 mM NaHCO₃, 1 mM ascorbic acid, 1.5 mM CaCl₂, and 1.5 mg/ml BSA) in glass-bottomed dishes.

体を用いて免疫染色を行ったところ, 親株細胞に比べて ρ^0 細胞では脂質の過酸化が増大しており, CRR 細胞では減少していた.^{23,24)} また, ρ^0 細胞ではフェントン反応の産物と思われる $\cdot\text{OH}$ 量が増大, CRR 細胞では減少していることも示された (Figure 3). 安定同位元素を用いた実験により, ρ^0 細胞においては細胞内の安定同位元素量が親株に比べて増加しており, CRR 細胞では有意な増加は見られなかった.^{24,25)} これらのことから, ρ^0 細胞では細胞内活性酸素 ($\cdot\text{OH}$) 量が増大し, 細胞膜自体が既に過酸化状態であり, 脆弱かつストレス物質を透過させやすい状態のために感受性を示し, CRR 細胞では逆に細胞膜が親株に比べ酸化されておらず, H_2O_2 に抵抗性を示すと考えられた.

おわりに

生体内の鉄動態ががんをはじめとした様々な疾病の原因となっていることが続々と明らかとなってきた。また, 我々の研究により, 鉄量の違いによって細胞の酸化ストレス感受性が左右されることも分かった。CRR 細胞においては, その抵抗性を制御する因子の候補として miRNA アレイにより miR-7-5p が同定され, この miR-7-5p の下流因子にミトフェリンの存在が示された。²²⁾ 実際に, ミトフェリンをノックダウンすると放射線抵抗性を示したことより, ミトコンドリアの鉄動態が放射線抵抗性を制御する因子であることを示唆している。鉄動態を変化させる薬剤を用いた薬剤や放射線への抵抗性を制御できる可能性がみえてきており, 今後のより一層の研究が期待される。

謝辞 本研究は科研費 19K10318 の助成を受けて行った。

利益相反

開示すべき COI はない。

REFERENCES

- 1) Andrews N.C., *New England J. Med.*, **341**, 1986–1995 (1999).
- 2) Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., *Cell*, **149**, 1060–1072 (2012).
- 3) Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Andrews N.C., *Cell*, **117**(3), 285–297 (2004).
- 4) Kosman D.J., *J. Biol. Chem.*, **285**, 26729–26735 (2010).
- 5) Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J., Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T.C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palis J., Fleming M.D., Andrews N.C., Zon L.I., *Nature*, **403**, 776–781 (2000).
- 6) Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M., Ganz T., Kaplan J., *Science*, **306**, 2090–2093 (2004).
- 7) Poss K.D., Tonegawa S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 10919–10924 (1997).
- 8) Kühn L.C., *Metallomics*, **7**, 232–243 (2015).
- 9) Taketani S., Nakahashi Y., Osumi T., Tokunaga R., *J. Biol. Chem.*, **265**, 19377–19380 (1990).
- 10) Chen W., Dailey H.A., Paw B.H., *Blood*, **116**, 628–630 (2010).
- 11) Johnson D.C., Dean D.R., Smith A.D., Johnson M.K., *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 247–281 (2005).
- 12) Artymiuk P.J., Green J., *Structure*, **14**, 2–4 (2006).
- 13) Bulteau A.L., O'Neill H.A., Kennedy M.C., Ikeda-Saito M., Isaya G., Szweda L.I., *Science*, **305**, 242–245 (2004).
- 14) Gaschler M.M., Stockwell B.R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **482**, 419–425 (2017).
- 15) Zecca L., Youdim M.B., Riederer P., Connor J.R., Crichton R.R., *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 863–873 (2004).
- 16) Allen K.J., Gurrin L.C., Constantine C.C., Osborne N.J., Delatycki M.B., Nicoll A.J., McLaren C.E., Bahlo M., Nisselle A.E., Vulpe C.D., Anderson G.J., Southey M.C., Giles G.G., English D.R., Hopper J.L., Olynyk J.K., Powell L.W., Gertig D.M., *N. Engl. J. Med.*, **358**, 221–230 (2008).
- 17) Salter-Cid L., Brunmark A., Li Y., Leturcq D., Peterson P.A., Jackson M.R., Yang Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 5434–5439 (1999).
- 18) Pandolfo M., *J. Neural. Transm. Suppl.*, **70**, 143–146 (2006).
- 19) Hayashi H., Takikawa T., Nishimura N., Yano M., Isomura T., Sakamoto N., *Am. J. Gastroenterol.*, **89**, 986–988 (1994).
- 20) Tomita K., Kuwahara Y., Takashi Y., Tsukahara T., Kurimasa A., Fukumoto M., Nishitani Y., Sato T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **490**, 330–335 (2017).

-
- 21) Kuwahara Y., Li L., Baba T., Nakagawa H., Shimura T., Yamamoto Y., Ohkubo Y., Fukumoto M., *Cancer Sci.*, **100**, 747–752 (2009).
- 22) Tomita K., Fukumoto M., Itoh K., Kuwahara Y., Igarashi K., Nagasawa T., Suzuki M., Kurimasa A., Sato T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **518**, 712–718 (2019).
- 23) King M.P., Attardi G., *Science*, **246**, 500–503 (1989).
- 24) Tomita K., Takashi Y., Ouchi Y., Kuwahara Y., Igarashi K., Nagasawa T., Nabika H., Kurimasa A., Fukumoto M., Nishitani Y., Sato T., *Cancer Sci.*, **110**, 2856–2866 (2019).
- 25) Tomita K., Kuwahara Y., Takashi Y., Igarashi K., Nagasawa T., Nabika H., Kurimasa A., Fukumoto M., Nishitani Y., Sato T., *Tumor Biol.*, **40**, 1–11 (2018).

