

総説 (教授就任記念講演)

生命金属元素鉄の新たな役割と治療応用

池田 康 将

徳島大学大学院医歯薬学研究部薬理学分野

(令和5年9月6日受付) (令和5年9月14日受理)

はじめに

糖尿病は世界的に増加している。わが国でも患者数は増加しており、糖尿病が強く疑われる、もしくは糖尿病の可能性が否定できない糖尿病予備軍も含めるとさらにその数は多くなる。糖尿病は加齢とともに増加する¹⁾ことから、高齢化社会の急速な進行も患者数増加の一因と考えられ、加齢性疾患ともいえる。肥満、インスリン抵抗性、高血圧、高脂血症のメタボリック症候群は糖尿病発症の高リスク因子であるが、これらを有した患者の増加も糖尿病患者の増加につながっていると考えられる。徳島県では、平成15年よりほぼ毎年のように糖尿病死亡率全国ワースト1位が続いていた。そのため「糖尿病緊急事態宣言」を行い、県・市・医師会がさまざまな糖尿病対策に取り組み、県民の意識を高めるなど一丸となった努力の結果、令和2年はワースト5位、令和3年はワースト13位と徐々に改善してきている²⁾。

糖尿病患者は3大合併症（神経障害・網膜症・腎症）に加え、心腎脳血管疾患³⁾、がん⁴⁾を高率に合併する。これらの発症は生活の質の低下や健康寿命の短縮につながり、また医療費増加の一因ともなる。これまでの糖尿病の病態解明と治療法開発により、糖尿病患者の予後は以前に比べて改善している。しかし、糖尿病のさらなる克服を目指して、精力的に研究が継続されている。

糖尿病は生活習慣病であり、カロリー摂取過多、運動不足、不規則な生活習慣が発症の原因として一般的によく知られている。実際、糖尿病治療は、まず生活習慣の改善を目的として運動療法と食事療法が行われる。

ヒトは食事からは生命活動に必要な栄養素を摂取している。栄養素は、三大栄養素であるタンパク質、炭水化物、脂質を含む多量栄養素と、ビタミン・ミネラル類を

含む微量栄養素に大別される。更にミネラルは、多量ミネラル7種類（カルシウム、リン、カリウム、硫黄、塩素、ナトリウム、マグネシウム）と微量ミネラル9種類（鉄、亜鉛、銅、マンガン、クロム、ヨウ素、セレン、モリブデン、コバルト）に分類される。必須微量栄養素には7つの金属元素が含まれている。その中で、鉄は生体内において最も多く存在する金属元素である。鉄は、ヘモグロビンなどのヘムタンパク質合成、ミトコンドリアのエネルギー産生、酵素活性化、細胞増殖やアポトーシス、エネルギー代謝などさまざまな生理機能に関与して生体内恒常性を維持している（図1）。糖尿病の食事療法ではカロリー制限の範囲内で三大栄養素ならびに必要な微量栄養素中心にバランス良く摂取することが重要であるが、近年、微量金属栄養素の糖尿病への関与⁵⁾が明らかとなり、改めてその意義が注目されるようになっている。鉄も例外ではなく、糖尿病と関連する。また、糖尿病を含めた高血圧、高脂血症などメタボリック症候群の原因として肥満があるが、鉄と肥満も関連することが指摘されている。本稿では、必須微量栄養素の鉄と肥満・糖尿病の関係について、われわれの知見を含めて概説する。

1. 鉄と酸化ストレス

ヒトの体内鉄含有量は一般的に3~5gであり、男性に比べて女性の方が少ない性差がある。女性は月経による出血のために鉄を喪失しているためであり、閉経後にはこの性差は消失する。生体内の鉄の分布について、65%は赤血球のヘモグロビン鉄として、10%は骨格筋のミオグロビンとして存在しており、残りは肝臓、脾臓、骨髄などで貯蔵鉄として存在する。

生体内鉄量は過剰かつ不足にならないように厳密に制

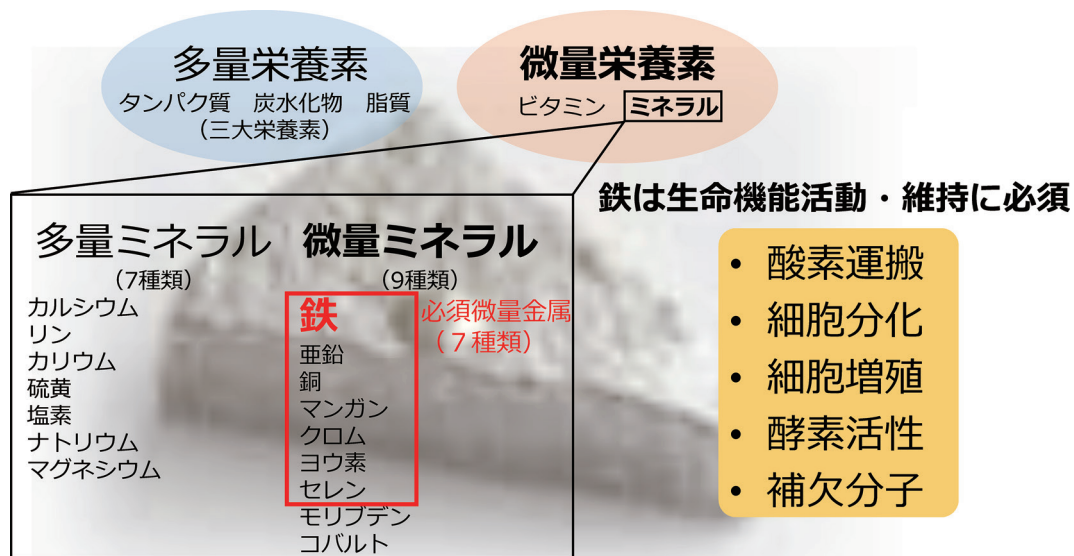


図1 栄養素分類における鉄とその役割

御されている。食事から摂取された鉄は、主に十二指腸より吸収され、汗、尿、糞便、消化管粘膜脱落などから排泄される。しかし、その量は吸収・排泄ともに1 mg/日と非常にわずかであり、通常では積極的に鉄を吸収・排泄する機構がない。よって、生体内には鉄を再利用する機構が存在する。網内系マクロファージに貪食された老化赤血球のヘモグロビンは、ヘムオキシゲナーゼ-1によりビリベルジン、一酸化炭素、遊離二価鉄に分解される。遊離鉄はトランスフェリンと結合して必要な部位まで運搬され再利用される。生体内において鉄貯蔵で最も重要な役割を果たしている臓器は肝臓である。肝細胞内において鉄はフェリチンに格納されて貯蔵される。また、細胞質で合成されたフェリチンの一部は血清中に分泌されることから、血清フェリチン濃度は臨床における生体内貯蔵鉄量のマーカーとして用いられている⁶⁾。

一般的に鉄は、細胞外ではトランスフェリンなどに結合した状態で、細胞内ではフェリチンに格納された状態で存在する。鉄結合タンパク質に格納されないイオン化した遊離鉄は、フェントン反応 ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$) により非常に毒性の強いヒドロキシルラジカル産生を触媒することで細胞傷害性に作用する⁷⁾。遺伝的鉄蓄積疾患であるヘモクロマトーシスや過剰輸血による鉄過剰による心臓、肝臓、膵臓などに生じる臓器障害は、この鉄依存性の酸化ストレスが原因と考えられている

る。われわれは、二価鉄検出プローブとヒドロキシルラジカル検出プローブをそれぞれ用いて、実際に生体内でフェントン反応が生じていることを確認している⁸⁾。また、健常人において血清フェリチンと酸化ストレスのマーカー (8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) が正相関する⁹⁾ ことから、生体内鉄量は酸化ストレスを反映していると考えられる。

2. 鉄と肥満・糖尿病

ここ30年間の研究において、それまで無関係とされていた鉄と糖尿病の関連性が明らかにされている。正常集団と比較して、耐糖能異常や2型糖尿病患者では血清フェリチン値で表される生体内鉄量が高値であること¹⁰⁾、赤身肉などヘム鉄を多く摂取するほど2型糖尿病の発症リスクが増加すること^{11,12)} が報告されている。糖尿病に対する生体内鉄量減少による効果について、瀉血による生体内鉄量減少がインスリン感受性やインスリン分泌能を改善させること^{11,13)} が示されている。また、動物を用いた検討において、瀉血や鉄摂取制限、鉄キレート薬による生体内鉄量減少が、臓器における酸化ストレスを抑制し、インスリン分泌能の維持によって耐糖能が改善することも明らかにされている¹⁴⁻¹⁶⁾。よって、鉄は糖尿病の病態に関与すること、生体内鉄量を減少させることで糖尿病を改善できることが示唆される。

伊藤が提唱したメタボリックドミノ¹⁷⁾において、肥満はドミノの最初に位置しており、糖尿病を含めた各種疾患の原因となる。鉄と肥満に関して、臨床的に腹部CTで計測された内臓脂肪蓄積量と血清フェリチン値が正相関する¹⁸⁾ことが報告されている。基礎研究では、正常マウスと比較して、肥満糖尿病マウスの白色脂肪組織の鉄濃度が高値である¹⁹⁾ことが示されている。これらの結果は、生体内鉄量と肥満の関連性を示唆している。そこでわれわれは、生体内鉄量減少が肥満改善につながる仮説を立てて、肥満糖尿病モデル $KKAy^{Ta/Jcl}$ マウスへの鉄キレート薬デフェロキサミン (DFO) 投与による肥満に対する効果について検証した。

Vehicle 投与群と DFO 投与群の2群に分け、8週齢より2週間 vehicle もしくは DFO の腹腔内投与を行った。DFO により、血清フェリチン値、脂肪組織鉄量は有意に低下し、軽度の貧血を呈しており、生体内鉄量の減少を認めた。DFO 群では、体重増加の抑制傾向がみられ、内臓脂肪組織重量ならびに脂肪組織径は DFO 群で有意に減少しており肥満は抑制された。脂肪組織へのマクロファージ浸潤や炎症性サイトカイン遺伝子発現の増加は DFO 群で抑制された。尿中8-OHdG 排泄量は DFO 投与にて低下し、Dihydroethidium 染色による脂肪組織

のスーパーオキシド産生も減少した。また既報の通り、DFO 群において、インスリン値は有意に低下、HOMA-IR (Homeostasis model assessment-Insulin Resistance) は低値を示し、耐糖能とインスリン感受性の改善が認められた。肥満において、酸化ストレスや炎症性サイトカインの増加はマクロファージ浸潤を亢進させ、さらなる脂肪組織肥大といった悪循環を促進するが、鉄除去はそれらを抑制して肥満を改善した²⁰⁾。われわれは、鉄依存性の炎症と酸化ストレスの総称としての「鉄ストレス」を提唱しており、肥満糖尿病以外にも、腎疾患、血管リモデリング、サルコペニアにおいて鉄ストレスの重要性を報告している (図2)。

3. マクロファージ鉄ストレスと肥満・糖尿病

前述した通り、さまざまな疾患において、生体内鉄量減少によって炎症・酸化ストレス抑制を介した病態改善につながることを明らかにしてきた。しかし、鉄キレート薬や鉄制限食による非特異的鉄除去は貧血が必発のために治療応用は困難であった。そこで、鉄を標的とした治療法開発へと展開するために、病態において鉄が問題となっている細胞種を特定することが必要と考えた。



図2 鉄ストレスと各種疾患

肥満・糖尿病の基盤病態には、低レベルではあるが緩徐に持続・遷延する慢性炎症がある。肥満脂肪組織における浸潤マクロファージの増加は、脂肪細胞との相互作用を介して炎症持続の悪循環形成に関わる。マクロファージは老化赤血球貪食による鉄リサイクル機構によって鉄恒常性維持に重要な役割を果たしている。そこで、鉄代謝が盛んな細胞であるマクロファージにわれわれは着目した。

古典的分類としてマクロファージは、炎症性 M1 と抗炎症性 M2、2つの極性に大別される。この極性は鉄保持タンパクH-フェリチン (FTH) と細胞内鉄量で規定されており、炎症性 M1マクロファージは FTH 発現増加と鉄蓄積を呈する²¹⁾。実際、肥満マウスの脂肪組織において、FTH 発現は浸潤増加したマクロファージ局在と一致している²⁰⁾ (図3)。また、マクロファージ鉄量増加は炎症性サイトカイン産生を促進する²²⁾。よって、マクロファージ FTH 発現と細胞内鉄量の増加は、炎症性 M1 への極性転換を促進して、慢性炎症の持続につながることを示唆される。

マクロファージ極性決定因子としての FTH 機能を解析するため、Lysosome M (LysM)-Cre マウスと FTH-floxed マウスを交配させてマクロファージで FTH を欠失するコンディショナルノックアウト (KO) マウスを作成した。FTHKO マウスは、貧血を呈さずにマクロファージ鉄量が減少していた。このマウスと対照として野生型 (WT) マウスを用いて、高脂肪飼料 (HFD) 負荷による肥満糖尿病モデルにおけるマクロファージ鉄の役割について検討した。

HFD 負荷により、WT マウスは経過とともに体重と脂肪組織重量の増加がみられたが、FTHKO マウスでその程度は軽度であった。HE 染色による脂肪細胞経測定でも、HFD 負荷 WT マウスでみられた脂肪細胞肥大は FTHKO マウスで抑制され、脂肪重量測定の結果と一致していた。カロリー摂取量は正常飼料 (ND)、HFD ともに WT と FTHKO マウスで差は認めなかった。末梢血検査では、FTHKO では貧血を呈しておらず、WT と差がみられなかった。脂肪組織への浸潤マクロファージは、HFD 負荷 WT マウスで増加していたが、FTHKO

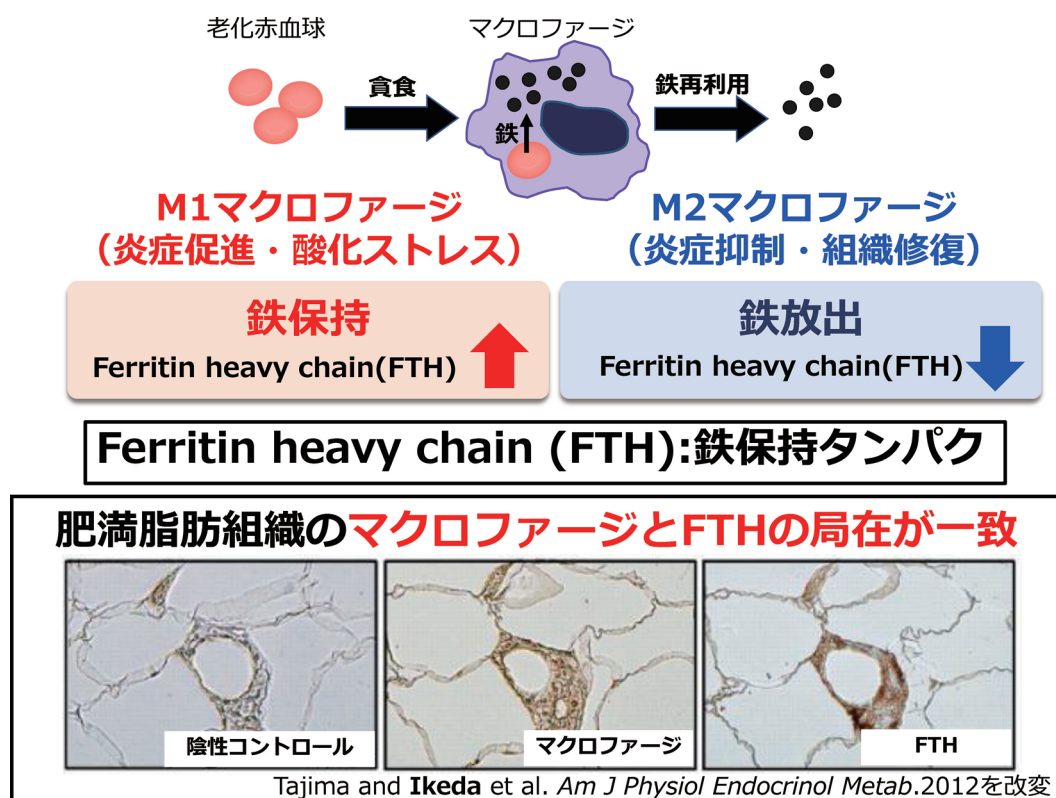


図3 マクロファージ極性決定における FTH と鉄

マウスでは抑制されていた。また、脂肪組織の炎症性サイトカイン遺伝子発現はHFD 負荷 WT マウスで増加していたが、FTHKO マウスでは軽減しており、炎症促進のシグナル経路 JNK リン酸化の増加も FTHKO マウスで抑制された。酸化ストレスについて、脂肪組織の 4-HNE 染色の評価では、HFD 負荷 WT マウスでみられた蛍光輝度増強は FTHKO マウスで抑制された。組織鉄量について、HFD 負荷によって WT マウスでは脂肪組織、脾臓の鉄量は増加し、FTHKO マウスではその増加は抑制された一方、マクロファージの鉄量は WT に比べて FTHKO マウスで減少しており、ND、HFD 間で差を認めなかった。耐糖能、インスリン抵抗性について、WT では HFD 負荷により両者とも増悪したが、FTHKO マウスではそれらは軽減されており、加えて、脂肪組織において、HFD 負荷によるインスリンシグナル (Akt-IR β) 活性化の抑制も FTHKO マウスでは軽度であった。HFD 負荷による体重増加が FTHKO マウスで軽度であったため、メタボリック装置を用いた間接熱量消費測定を行った。HFD 負荷群において、エネルギー代謝・消費量・熱量産生は WT と比較して FTHKO マウスで増加を認め、直腸温も FTHKO マウスで高値であった。また脂肪組織における熱量産生に關与する遺伝子発現は FTHKO マウスで高値であり、脂肪組織の

ベージュ化が示唆された。また、マクロファージへの直接的効果を検討するため、RAW264.7 培養マクロファージ細胞への siRNA 導入による FTH のノックダウンでも、細胞内鉄量の減少がみられ、LPS 刺激による TNF- α 発現増加が抑制された。

以上の結果から、鉄除去による肥満・糖尿病の抑制効果は、主にマクロファージに対する作用であることが示唆された²³⁾。マクロファージ特異的鉄制御により、従来の非特異的除鉄でみられる貧血などの副作用を引き起こさずに病態を改善できる可能性が考えられた。現在、このマウスを用いて他臓器におけるマクロファージ鉄ストレスの役割の解明研究と鉄ストレス標的因子の探索研究を継続している。

おわりに

肥満・糖尿病において、マクロファージ鉄ストレスは病態を負に作用していると考えられる (図 4)。鉄除去や鉄摂取制限は鉄ストレス抑制によって、病態改善効果や糖尿病発症リスク低下が期待できるが、鉄欠乏性貧血を含めた副作用のため、単純に治療へと適用するのは限界がある。マクロファージにおける鉄制御は、非特異的除鉄でみられるような副作用を呈さず、鉄ストレス抑制

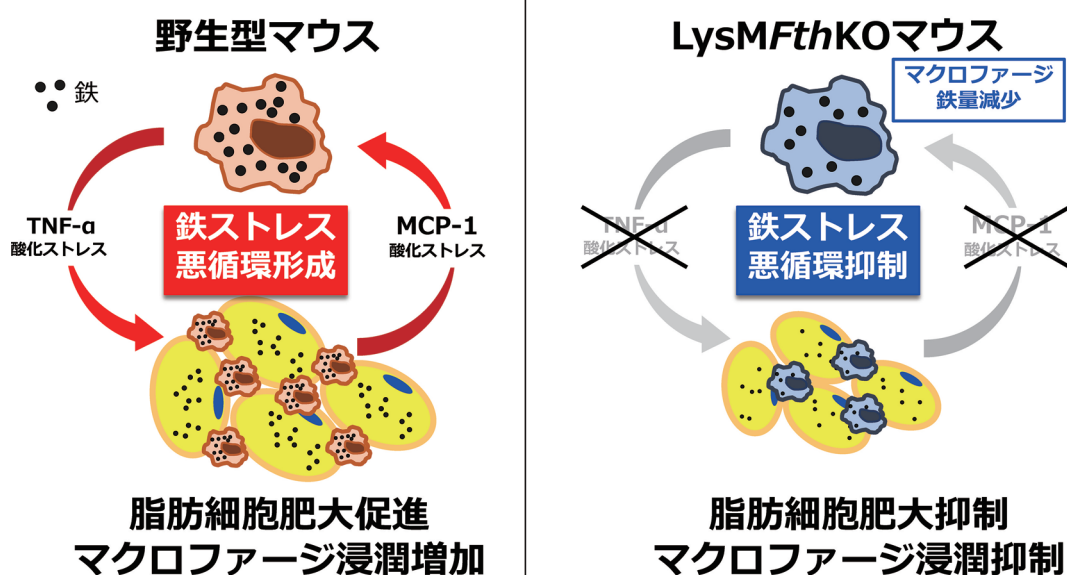


図 4 マクロファージ鉄ストレス抑制による抗肥満・抗糖尿病効果

により病態を改善できる可能性を秘めている。近年、加齢に伴う鉄蓄積は老化を促進するともいわれており、本研究は抗老化研究にもつながることも期待される。今後、鉄ストレス標的因子の発見による鉄制御による治療応用を目指して、研究展開の予定である。

文 献

- 1) 平成28年「国民健康・栄養調査」. 厚生労働省
- 2) 徳島県の糖尿病の現状と対策. 徳島県 HP
- 3) Grundy, S. M., Benjamin, I. J., Burke, G. L., Chait, A., *et al.*: Diabetes and cardiovascular disease : a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.*, **100** : 1134-1146, 1999
- 4) Giovannucci, E., Harlan, D. M., Archer, M. C., Bergenstal, R. M., *et al.*: Diabetes and cancer : a consensus report. *Diabetes Care.*, **33** : 1674-1685, 2010
- 5) 池田康将, 土屋浩一郎, 玉置俊晃 : 糖尿病と食事由来金属元素. *糖尿病*, **56** : 919-921, 2013
- 6) Torti, F. M., Torti, S. V.: Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.*, **99** : 3505-3516, 2002
- 7) Kakhlon, O., Cabantchik, Z. I.: The labile iron pool : characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med.*, **33** : 1037-1046, 2002
- 8) Ikeda, Y., Hamano, H., Horinouchi, Y., Miyamoto, L., *et al.*: Role of ferroptosis in cisplatin-induced acute nephrotoxicity in mice. *J Trace Elem Med Biol.*, **67** : 126798, 2021
- 9) Nakano, M., Kawanishi, Y., Kamohara, S., Uchida, Y., *et al.*: Oxidative DNA damage (8-hydroxydeoxyguanosine) and body iron status : a study on 2507 healthy people. *Free Radic Biol Med.*, **35** : 826-832, 2003
- 10) Ford, E. S., Cogswell, M. E.: Diabetes and serum ferritin concentration among U. S. adults. *Diabetes Care.*, **22** : 1978-1983, 1999
- 11) Jiang, R., Ma, J., Ascherio, A., Stampfer, M. J., *et al.*: Dietary iron intake and blood donations in relation to risk of type 2 diabetes in men : a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.*, **79** : 70-75, 2004
- 12) Rajpathak, S., Ma, J., Manson, J., Willett, W. C., *et al.*: Iron intake and the risk of type 2 diabetes in women : a prospective cohort study. *Diabetes Care.*, **29** : 1370-1376, 2006
- 13) Fernandez-Real, J. M., Lopez-Bermejo, A., Ricart, W.: Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion. *Clin Chem.*, **51** : 1201-1205, 2005
- 14) Dongiovanni, P., Valenti, L., Ludovica, Fracanzani A., Gatti, S., *et al.*: Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver. *Am J Pathol.*, **172** : 738-747, 2008
- 15) Cooksey, R. C., Jones, D., Gabrielsen, S., Huang, J., *et al.*: Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of beta-cell function in the obese (ob/ob lep^{-/-}) mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **298** : E1236-1243, 2010
- 16) Minamiyama, Y., Takemura, S., Kodai, S., Shinkawa, H., *et al.*: Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **298** : E1140-1149, 2010
- 17) 伊藤裕 : Clinical Trend メタボリックドミノとは -- 生活習慣病の新しいとらえ方. *日本臨床*, **61** : 1837-1843, 2003
- 18) Iwasaki, T., Nakajima, A., Yoneda, M., Yamada, Y., *et al.*: Serum ferritin is associated with visceral fat area and subcutaneous fat area. *Diabetes Care.*, **28** : 2486-2491, 2005
- 19) Orr, J. S., Kennedy, A., Anderson-Baucum, E. K., Webb, C. D., *et al.*: Obesity alters adipose tissue macrophage iron content and tissue iron distribution. *Diabetes.*, **63** : 421-432, 2014
- 20) Tajima, S., Ikeda, Y., Sawada, K., Yamano, N., *et al.*: Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAY mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **302** : E77-86, 2012

- 21) Corna, G., Campana, L., Pignatti, E., Castiglioni, A., *et al.*: Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica*, **95** : 1814-1822, 2010
- 22) Tsukamoto, H., Lin, M., Ohata, M., Giulivi, C., *et al.*: Iron primes hepatic macrophages for NF-kappaB activation in alcoholic liver injury. *Am J Physiol*, **277** : G1240-1250, 1999
- 23) Ikeda, Y., Watanabe, H., Shiuchi, T., Hamano, H., *et al.*: Deletion of H-ferritin in macrophages alleviates obesity and diabetes induced by high-fat diet in mice. *Diabetologia*, **63** : 1588-1602, 2020

Novel role of the biometal element iron in the development of therapeutic strategies

Yasumasa Ikeda

Department of Pharmacology, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima, Japan

SUMMARY

Iron is the most abundant trace metal and indispensable for the biogenicity of living organisms. Iron deficiency anemia is often observed in iron-related disorders, and therefore, proactive iron intake is recommended. In contrast, iron causes oxidative stress by catalyzing the Fenton reaction. Recent evidence suggests that iron is involved in the pathophysiology of non-iron-accumulating diseases, and the role of iron has been revisited. In the last three decades, many studies have shown that iron content is associated with diabetes and that high iron intake increases the risk of diabetes onset. Iron reduction by phlebotomy or iron chelators ameliorates insulin sensitivity and secretion. Several studies have shown that high iron levels are also associated with obesity. Therefore, we speculate that iron reduction could exert a favorable effect on obesity. As expected, iron chelators mitigated obesity by inhibiting inflammatory cytokines and oxidative stress in KKAY mice. We advocate that “iron stress” is related to iron-dependent inflammation and oxidative stress, and have reported that iron stress is involved in kidney disease, sarcopenia, vascular dysfunction, and so on. However, non-specific iron reduction always causes iron-deficient adverse effects, such as anemia, and it is difficult to adopt a clinical application. Macrophage plays a critical role in chronic inflammation including obesity and diabetes. M1 inflammatory macrophages exhibit an iron-retention phenotype with elevated H-ferritin (FTH) expression. Mice with macrophage-specific FTH deletion (FTHKO) showed reduced iron concentrations in macrophages, without anemia. HFD-induced obesity and diabetes were alleviated in FTHKO mice by inhibiting inflammation and oxidative stress in adipose tissue, similar to the effect of systemic iron reduction. Therefore, macrophages are the main source of iron stress, leading to new therapeutic strategies for controlling the iron levels in macrophages.

Key words : iron, macrophage, inflammation, oxidative stress