



鉄欠乏性貧血回復期における マウス脾臓マクロファージの分極化と役割

株式会社林原 研究部門

須山 晶／新井成之／宮田聡美／河野恵三／太田人水／原島 哲／
有安利夫／三鼓仁志／牛尾慎平

● 要旨

目的：鉄欠乏性貧血からの回復期におけるマクロファージの分極化とその役割を検証することを目的とした。マクロファージの分極化と役割について鉄欠乏性貧血モデルマウスを用いて検討し、併せて細網内皮系マクロファージを活性化する NK-4 の影響を比較解析した。

方法：4 週齢の雌性 BALB/c マウスに 8 週間鉄欠乏飼料 (LID) を与え、鉄欠乏性貧血の特徴である小球性低色素性赤血球の出現を確認した。次いで全群の飼料を通常飼料 (ND) に戻し、貧血からの回復を促した。ND への切替えと同時に細網内皮系マクロファージを活性化する NK-4 (100, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) の経口投与を開始し、2 週間継続した。血液学的検査、病理組織学的検査およびフローサイトメトリー法による脾臓中のマクロファージ解析を行った。

結果：ND への切替えにより、LID 群 - 対照群へのヘモグロビン値は徐々に増加したが、2 週間では完全には回復しなかった。このとき NK-4 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) の経口投与により、ヘモグロビン値は増加し、ND 群と同等まで回復した。貧血回復期に、脾臓マクロファージ (F4/80⁺) に占める赤脾髄マクロファージ (F4/80^{hi}, VCAM1⁺, CD11b^{lo}) および抗炎症型マクロファージ (M2; F4/80⁺, CD206⁺) 様細胞は増加し、さらに NK-4 投与により M2 の増加は顕著に亢進した。

結論：鉄欠乏性貧血の回復期に、脾臓 M2 の増加がヘモグロビン値の回復に寄与することを明らかにした。NK-4 はマクロファージの分極化を亢進して貧血回復を促進した。

キーワード：鉄欠乏性貧血, マクロファージ, M2, ヘモグロビン, NK-4

はじめに

生体内の鉄は、赤血球による酸素運搬や細胞内における DNA 合成酵素等の活性中心、ミトコンドリアでの酸化還元反応など様々な役割を果たすことが知られているが、その大部分は赤血球中にヘモグロビンとして存在している¹⁾。何らかの要因でそれらの鉄が減少すると、生体の恒常性維持機構が働きフェリチンなどの貯蔵鉄を利用することで補われる。さらに、体内の貯蔵鉄が枯渇すると赤血球産生機能が低下し、鉄欠乏性貧血に陥る。その症状は動悸、息切れ、倦怠感などがあり、血液検査所見では血清フェリチン値やヘモグロビン値の減少、小球性

低色素性赤血球の出現で鉄欠乏性貧血と診断される²⁾。

鉄代謝や赤血球産生には様々な因子が関わるが、脾臓や骨髄における細網内皮系細胞マクロファージの役割は大きい。脾臓の赤脾髄に存在する赤脾髄マクロファージ (F4/80^{hi}, VCAM1⁺, CD11b^{lo}) は、老化や変性した赤血球を取り込んでヘモグロビンを分解し、鉄を再利用可能な状態に変換するとともに、余剰となった鉄を安定な形にしてその胞体内に貯蔵する^{3)~5)}。またこれらのマクロファージは赤血球前駆細胞である赤芽球の成熟に関与しており、赤芽球集合体である赤芽球島を形成して鉄を受け渡すとともに、赤芽球を脱核させ赤血球産生に寄与す

表1 鉄欠乏飼料 (LID) と通常飼料 (ND) の組成および鉄含量

成分		鉄欠乏飼料 (LID)		通常飼料 (ND)	
		配合量*	鉄含量*	配合量*	鉄含量*
鉄含有成分	コーンスターチ (鉄含有量 0.0008%)	62,625	19	62,435	19
	ミルクカゼイン (鉄含有量 0.0003%)	22,000	18	22,000	18
	FeC ₆ H ₅ O ₇ ·nH ₂ O (鉄含有量 16.67%)	—	—	190	3,167
鉄不含成分	結晶セルロース	5,000	—	5,000	—
	精製大豆油	4,000	—	4,000	—
	ミネラル類 (鉄以外)	6,010	—	6,010	—
	ビタミン類	365	—	365	—
合計		100,000	37	100,000	3,204

* : mg/100 g - 飼料

る⁶⁾。

マクロファージはその機能から、病原菌などの感染防御に働く炎症型のマクロファージ (M1) と組織修復を担う抗炎症型のマクロファージ (M2) の2つのフェノタイプに大別されてきたが、近年 *in vitro* 試験によるアプローチからもマクロファージ分極と鉄代謝について解析されている。周囲の環境に応じてマクロファージが M1 もしくは M2 に分極すると鉄の貯蔵や放出の挙動は変化し、M1 は鉄をフェリチンとして貯蔵するが、M2 はヘム鉄を積極的に取り込み分解した後、鉄を細胞外に放出すると報告されている^{7,8)}。

以上のように鉄代謝におけるマクロファージ機能についてはさまざまに報告されているものの、貧血回復期におけるマクロファージの分極化およびその役割については明らかになっていない。我々はマウスを用いて鉄欠乏性貧血モデルを作出した後、貧血回復期に細網内皮系を活性化させる NK-4 (クリプトシアニン O.A.1) を経口投与することにより、脾臓マクロファージの造血機能に関わる分極化を比較解析したので報告する。

I 材料と方法

1 動物

本試験は(株)林原研究部門動物実験管理委員会の承認を得た後、同動物実験規程に則り実施した。3週齢、雌性 BALB/c マウス 32 匹を日本クレア(株)から

購入し、温度 23 ± 3°C、湿度 55 ± 15%、明期 12 時間 (7:00 ~ 19:00) の環境下、通常飼料 (CE-2、日本クレア(株)) と脱イオン水を自由摂取させて予備飼育した後、4 週齢から試験に供した。

2 鉄欠乏性貧血の誘導と回復処置

4 週齢の雌性 BALB/c マウス 32 匹を体重が均等になるように、通常食 (Normal diet ; ND) 群 (n = 8) と鉄欠乏食 (Low iron diet ; LID) 群 (n = 24) の2群に分け、ND もしくは LID を脱イオン水とともに自由摂取させた。各飼料は日本クレア(株)から購入し、飼料組成を表1に示した。鉄含有量は、ND : 320.4 ppm, LID : 3.7 ppm であり、それぞれマウスの鉄要求量 (~ 35 ppm) の約 10 倍、約 1/10 の鉄を含有する。鉄欠乏性貧血の誘導状態を確認するため、LID 給与開始 5 週目 (9 週齢) から伏在静脈血の血液学的検査を行い、8 週目 (12 週齢) に鉄欠乏性貧血が誘導されたと判断した。

貧血誘導が確認された 12 週齢時に、LID 群 24 匹について血液パラメータ (ヘモグロビン値、赤血球数、平均赤血球色素量 (MCH)、赤血球サイズ、網状赤血球数) を指標として 3 群 (各 n = 8) に分けた。次いで全群の飼料を ND に切替え、NK-4 (100 もしくは 500 μg/kg/day) を 2 週間経口投与した。その間、経時的に伏在静脈採血し血液学的検査を行った後、深麻酔下で全採血して脾臓を採取した。貧血ストレスによって試験中に尾を噛み切った個体 (LID - 対照群, n = 1) は、断尾による影響

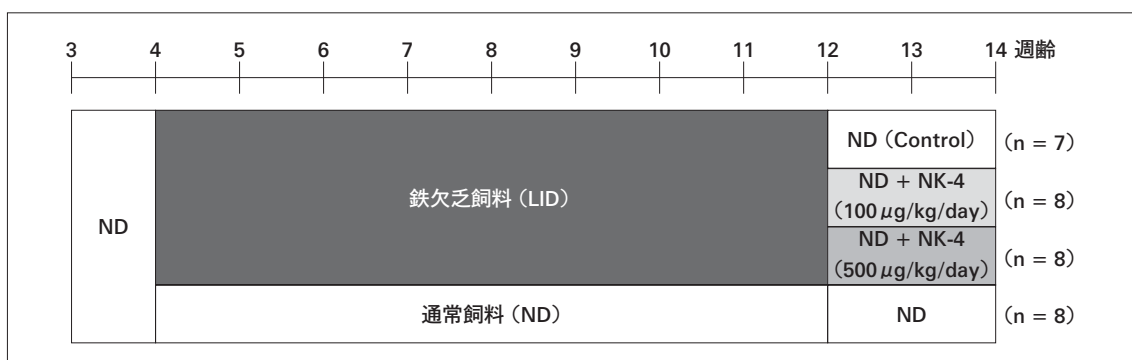


図1 試験スケジュール

が大きいため、データ解析から除外した。試験スケジュールは図1に示した。

3 NK-4

NK-4 (クリプトシアニン O.A.1, 1-ethyl-4-[(1Z,3E,5E)-1-(1-ethylquinolin-1-ium-4-yl)-5-(1-ethylquinolin-4-ylidene) penta-1,3-dien-3-yl] quinolin-1-ium; iodide, PubChem CID: 5489539, 図2) は、(株)林原で製造した微粉末結晶を、0.5 w/v%のカルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液で終濃度 100 もしくは 500 μg/mL となるように懸濁し、1 mL/kg - 体重を口腔内滴下することで経口投与、嚥下を確認した。ND 群および LID - 対照群には、0.5 w/v%の CMC 溶液を同様に経口投与した。

4 血液学的検査

抗凝固処理のためヘパリン管に採取した血液で、ヘモグロビン値はヘモグロビン B テストワコー (#271-83901, 富士フィルム和光純薬(株)) を用いて測定した。

赤血球数、赤血球サイズ、網状赤血球数、網状赤血球サイズは、フローサイトメーター (FCM; GALLIOUS/Beckman Coulter) を用いて測定した。抗凝固処理血液を 0.1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水 (BSA/PBS) で 500 倍希釈し、網状赤血球染色のためアクリジンオレンジ (終濃度 0.05 μg/mL) を添加、転倒混和後、遮光して室温で 30 分静置した。次いで血球数換算用の内標準ビーズ (Flow-Count™ 標準粒子, #7547053, Beckman Coulter) を添加し、標準ビーズ 1000 個に対する赤血球画分の細胞数から赤血球数を、その内 FL2 陽性細胞の割合を網状赤血球数として算出した。また前方散乱光 (FS) の強度は細胞サイズ

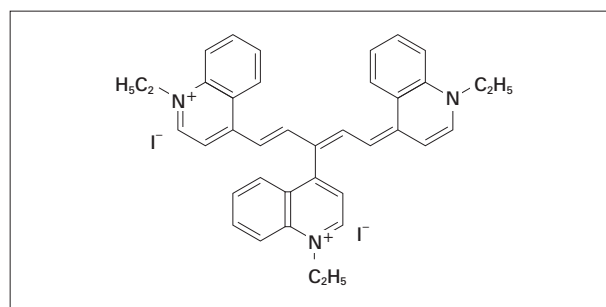


図2 NK-4の構造式

を反映しているため、その強度により各細胞の粒度を解析した。

血清フェリチン量は、剖検時に採取した血液の血清を Ferritin (Mouse) ELISA Kit (#KA1941, Abnova Corporation) を用いて定量した。

5 脾臓および骨髄の組織観察

剖検により採取した脾臓を二分割し、スライドガラスにスタンプ塗抹した後、組織を固定した。常法により、パラフィン包埋、組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色と鉄染色 (ベルリンブルー法)、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色を施し、Olympus BX50 および Olympus cellSens を使用して写真撮影、画像解析を行った。スタンプ標本は、メタノール固定、ギムザ染色して観察した。骨髄は左右の大腿骨を EDTA 脱灰処理した後パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して観察した。組織に存在する成熟赤芽球の抽出は、Olympus cellSens を用いた画像解析により染色性と大きさ (面積) で行い、一定面積中のオブジェクト数を赤芽球数とした。

6 FCM を用いた脾臓のマクロファージ解析

二分割した脾臓をセルストレイナー (メッシュ

70 μ m, Corning Inc.) を用いて分散した脾細胞を用いた。5%ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地で脾細胞を遠沈管に回収し、遠心分離(1,000 rpm, 4°C, 5分)した。上清を除去し、溶血剤(168 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, EDTA・2Na 1 mM, pH 7.3) 600 μ Lを添加後、静置(室温, 4分)して赤血球を溶血させた。反応停止のため20倍量の(-)ハンクス平衡塩溶液を加え、遠心分離(1,000 rpm, 4°C, 5分)後に上清除去した。細胞濃度が約 1×10^8 cells/mLとなるように0.1% BSA/PBSを添加し、脾細胞懸濁液を調製した。脾細胞懸濁液をU底96穴プレート(Thermo Fisher Scientific)に10 μ Lずつ分注し、2倍濃度のPurified rat anti-mouse CD16/CD32 (#553142, BD Biosciences)を10 μ L添加し、インキュベーションした(室温, 5分)。続いて、赤脾髄マクロファージ評価用抗体カクテルもしくはM1/M2評価用抗体カクテルを20 μ L添加し、インキュベーションした(室温, 30分)。なお赤脾髄マクロファージ評価用抗体カクテルは、抗CD11b (M1/70)-Alexa 488抗体(#53-0112-82, Thermo Fisher Scientific, 終濃度12.5 μ g/mL), 抗F4/80-PE抗体(#123110, BioLegend Inc., 終濃度0.5 μ g/mL), 抗VCAM1-APC抗体(#105718, BioLegend Inc., 終濃度1.25 μ g/mL)を混合して調製した。M1/M2評価用抗体カクテルは、抗CD86-Alexa488抗体(#105018, BioLegend Inc., 終濃度5 μ g/mL), 抗F4/80-PE抗体, 抗CD206-APC抗体(#141708, BioLegend Inc., 終濃度1.25 μ g/mL)を混合して調製した。各抗体カクテル処理後、0.1% BSA/PBSを200 μ L添加し遠心分離(1,500 rpm, 5分), 上清除去後、再度500 μ Lの0.1% BSA/PBSで細胞を懸濁し、FCM測定に供した。脾臓のF4/80⁺細胞に占めるF4/80^{hi}, VCAM1⁺, CD11b^{lo}細胞を赤脾髄マクロファージ率(%), F4/80⁺, CD86⁺細胞をM1様細胞率(%), F4/80⁺, CD206⁺細胞をM2様細胞率(%), F4/80⁺, CD206⁺細胞をM2様細胞率(%)としてそれぞれ算出した。

7 統計解析

パラメトリック解析としてND群とLID群の2群比較はStudent's t検定, LID(対照)群を軸とする4群の比較にはDunnnett's検定を用い、危険率5%未満を有意差ありとした。全ての統計解析は、SPSS(ver. 25, 日本アイ・ビー・エム(株))を使用

した。

II 結 果

1 鉄欠乏性貧血モデルマウスの作製

4週齢からLIDを8週間摂取させたマウス(12週齢)の血液所見を図3に示した。試験期間を通じて赤血球数の有意な減少は見られなかったが、ヘモグロビン値はND群 18.7 ± 0.5 g/dLに対し、LID群 11.7 ± 0.3 g/dLと有意に低値($p < 0.01$)を示した(図3(a))。さらに、LID群のMCHは著しく減少していた(図3(a))ことから、鉄欠乏性貧血の特徴である小球性低色素性赤血球の出現が示され、血液塗抹(図3(b))および赤血球粒度分布(図3(c))においてもその出現を確認した。赤血球新生の指標である網状赤血球は、LID群でND群に比べ有意に増加していたが小球性であった(図3(a)(c))。体重や一般状態に両群に顕著な差は認められなかった(データ未掲載)。

2 鉄欠乏性貧血からの回復期間の血液学的推移

12週齢の鉄欠乏性貧血モデルマウスに対し飼料をNDに切替え、NK-4(100もしくは500 μ g/kg/day)を2週間経口投与したときのヘモグロビン値の推移を表2に示した。2週間のND摂取によりLID-対照群のヘモグロビン値は徐々に増加し、14.0週齢では 15.4 ± 0.3 g/dLに達したものの、依然としてND群(16.4 ± 0.1 g/dL)より有意に低かった。それに対しNK-4 500 μ g/kg/dayを投与した群では、13.6週齢以降でヘモグロビン値はLID-対照群よりも有意に増加し、14.0週齢では 16.3 ± 0.3 g/dLとND群と同等まで回復し、差は認められなかった。

赤血球数, 赤血球サイズ, MCH, 網状赤血球数は、試験期間中、NK-4投与による有意な変化は認められなかった。

3 体内貯蔵鉄に対するNK-4の影響

試験終了時の血清フェリチン量を図4(a)に示した。ND群に比べて何れのLID群の血清フェリチン量は極度に少なく、体内貯蔵鉄は回復していなかった。NK-4投与による血清フェリチン量の有意な増加は認められなかったものの、個体差があった。

脾臓組織標本のベルリンブルー陽性顆粒(貯蔵鉄ヘモジデリン)の画像解析結果を図4(b)に示した。ベルリンブルー陽性顆粒は、ND群では赤脾髄に比

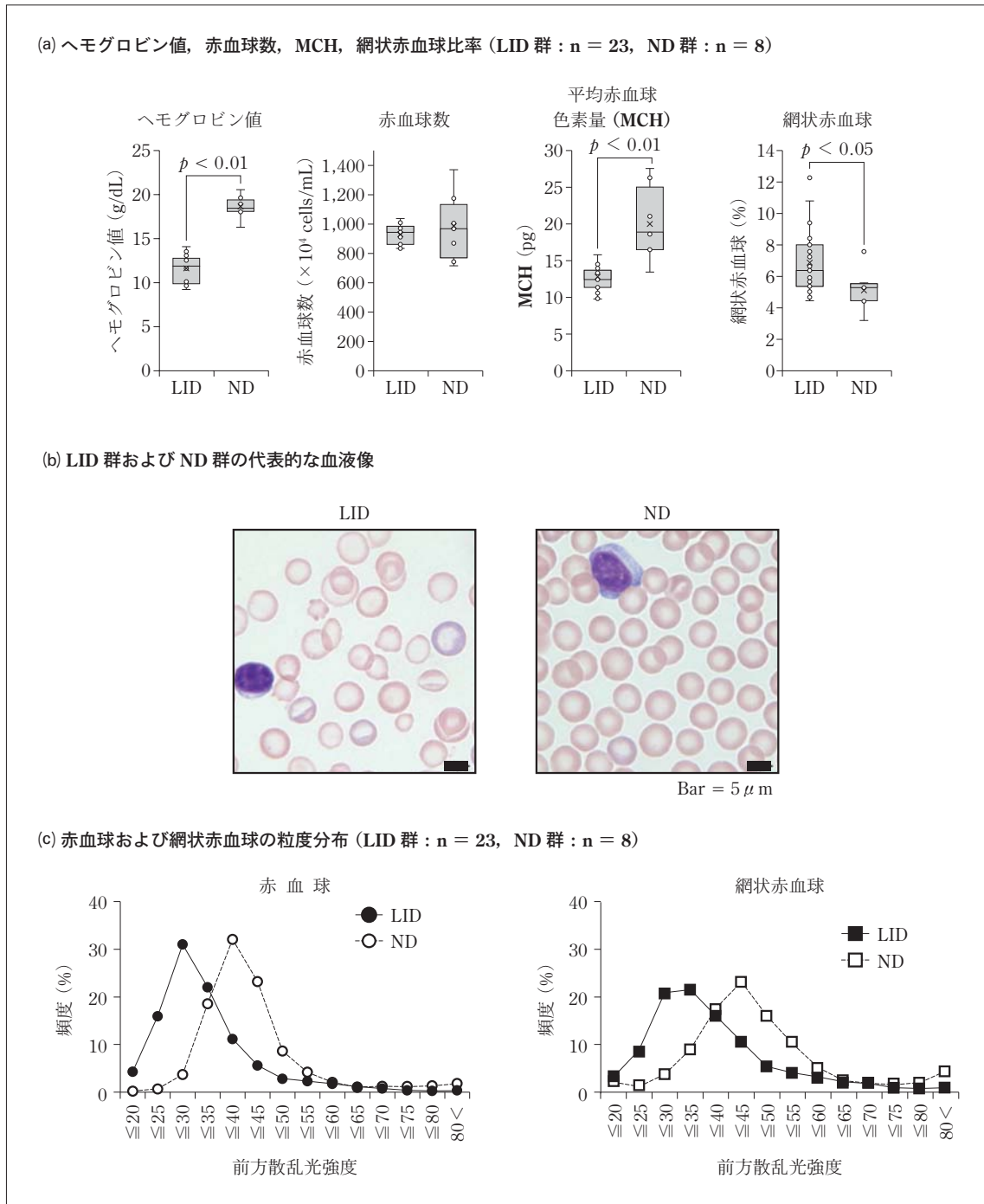


図3 12週齢鉄欠乏性貧血モデルマウスの血液学的検査

較的多く認められたが, LID 群ではほとんど認められず, NK-4 投与の影響もなかった。

4 脾臓および骨髄の病理組織学的観察

脾臓の組織学的観察ではいずれの群でも赤脾髄に赤血球を貪食したマクロファージが散見され, それらは PAS 陽性を示した。そこで赤脾髄の PAS 陽性マクロファージ数を計測すると, LID 群で ND 群より増加する傾向がみられたが有意差はなかった

(図5(a))。脾臓包膜下や脾洞の毛細血管周囲には LID 群で多数の赤芽球集積が見られ, 画像解析した赤脾髄に占める赤芽球の割合を図5(b)に示した。同様に骨髄の赤芽球比率を図5(b)に示した。両者ともに NK-4 投与によって増加する傾向が認められた。脾臓スタンプ標本では各所にマクロファージを中心とする赤芽球島が見られ, NK-4 投与群でマクロファージを取り囲む赤芽球の増加が確認された

表2 鉄欠乏性貧血の回復期におけるヘモグロビン値 (g/dL) の推移

週 齢		12.3	12.6	13.0	13.3	13.6	14.0
LID +	0	11.3 ± 0.3	12.2 ± 0.5	14.0 ± 0.5	14.9 ± 0.3	14.2 ± 0.2	15.4 ± 0.3
NK-4	100	11.1 ± 0.4	12.1 ± 0.4	13.7 ± 0.3	14.9 ± 0.2	14.5 ± 0.2	16.1 ± 0.2
($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	500	11.4 ± 0.4	12.5 ± 0.7	13.5 ± 0.3	14.5 ± 0.4	14.7 ± 0.2 *	16.3 ± 0.3 *
ND		17.8 ± 0.4 **	17.8 ± 0.4 **	17.5 ± 0.3 **	18.0 ± 0.4 **	17.1 ± 0.1 **	16.4 ± 0.1 *

結果は、平均値 ± 標準誤差で示した (n = 7 ~ 8, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs LID - 対照群)。

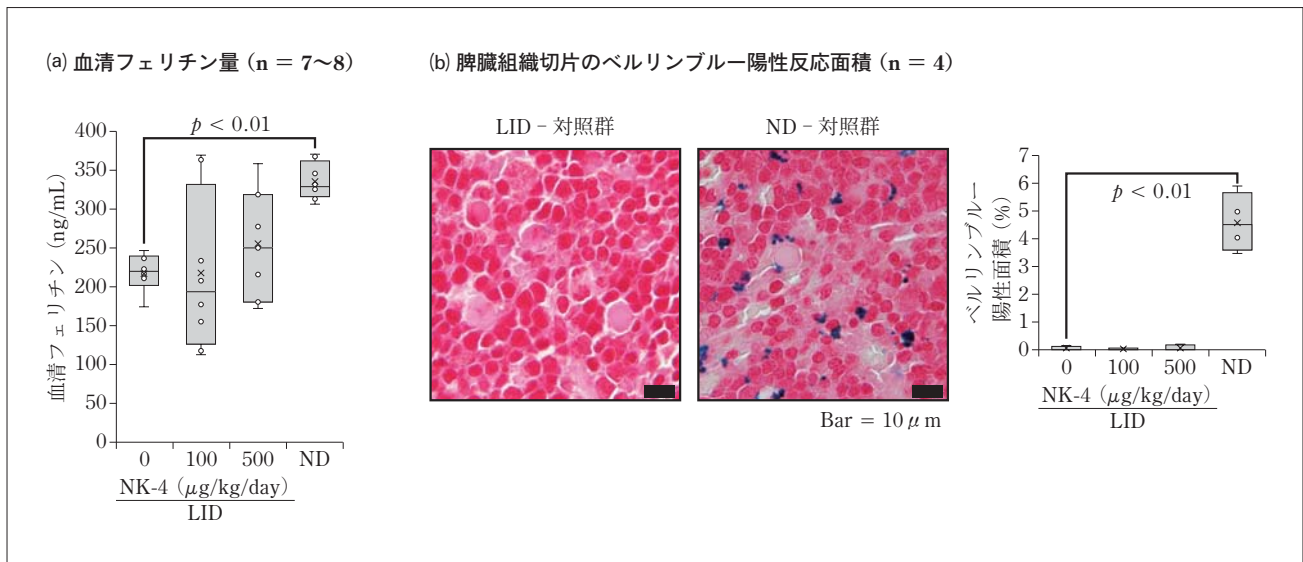


図4 14週齢マウスにおける脾臓貯蔵鉄

(図5(c))。

5 脾臓マクロファージのFCM解析

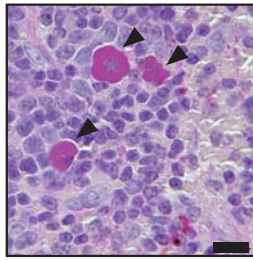
赤血球の鉄回転に関わる赤脾髄マクロファージ (F4/80^{hi}, VCAM1⁺, CD11b^{lo}; 図6(a)) の割合は、ND群 9.0 ± 1.0% に対し LID - 対照群で 12.4 ± 1.2% と顕著に増加していたものの、NK-4投与の影響は認められなかった (図6(b))。脾臓マクロファージのM1 (F4/80⁺, CD86⁺) とM2 (F4/80⁺, CD206⁺) の分極化をみると (図7(a)), M1は各群30 ~ 40%程度で貧血回復誘導やNK-4投与による変化は認められなかった (図7(b))。一方、M2はND群 15.3 ± 1.1% に対し、LID - 対照群 20.2 ± 1.1% と有意な増加がみられた。さらに、NK-4の投与用量に応じてM2の割合は増加し、LID - NK-4 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群では 25.0 ± 1.1% と LID - 対照群に比べ有意に増加していた (図7(c))

III 考 察

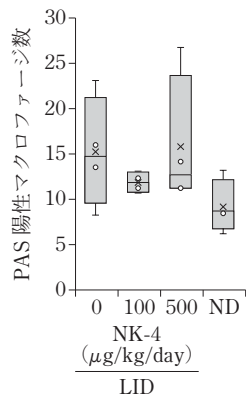
貧血回復時の赤血球産生に関わるマクロファージ

の分極化とその役割を明らかにするため、マウスを用いて鉄欠乏性貧血を誘導し、脾臓マクロファージを解析した。Kobayashiらの方法⁹⁾に準じて幼若マウスにLIDを給餌し体内貯蔵鉄を枯渇させることで、小球性低色素性赤血球の出現をみる鉄欠乏性貧血モデル動物を8週間で作出することができた。マウスからは血液パラメータ以外のいわゆる貧血症状は見られず、飼料中の鉄以外の栄養組成が等しいため一般状態に変化が見られなかったと考えられた。また、試験期間中に顕著な赤血球減少は認められず、失血等による急激な貧血誘導とは異なり緩やかにヘモグロビン値が減少し鉄欠乏状態が進行した。BALB/cマウスの赤血球寿命は約43日と報告されている¹⁰⁾ことから、LID給餌開始時期に産生された正常な赤血球は試験開始から1カ月は残存しており、試験初期の鉄需要は老化した正常赤血球中の鉄と体内貯蔵鉄によって補われるため、実際の鉄欠乏はLID給餌後1カ月以上経てから生じたと考えられた。緩やかに病態が進行する本鉄欠乏性貧血モデ

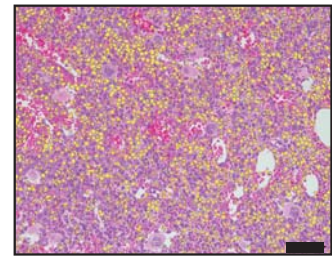
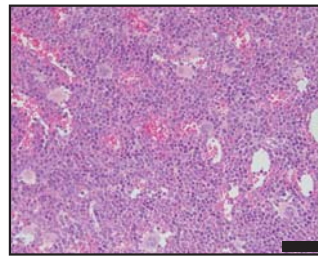
(a) 過ヨウ素酸シッフ (PAS) 陽性マクロファージの代表的な画像およびその数 (▲; PAS 陽性マクロファージ, n = 4)



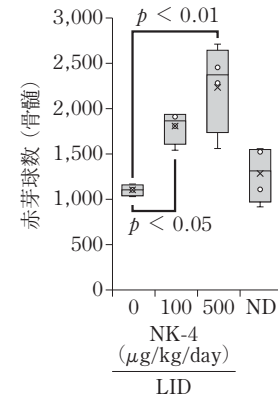
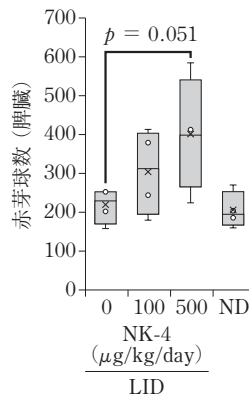
Bar = 10 μm



(b) 骨髄の赤芽球数計測に使用した代表的な画像処理例 (抽出した赤芽球を黄色で示した) と脾臓および骨髄の赤芽球数 (ヘマトキシリン・エオジン染色, n = 4)

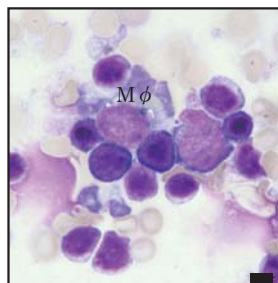


Bar = 50 μm

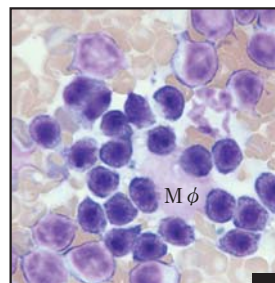


(c) LID - 対照群と LID - NK-4 投与群 (500 μg/kg/day) の脾臓の代表的な赤芽球島像 (Mφ: 赤芽球島を形成するマクロファージ; ギムザ染色)

LID - 対照群



LID - NK-4 投与群 (500 μg/kg/day)



Bar = 5 μm

図5 14週齢マウスの脾臓および骨髄の組織学的観察

ルは、一般的なヒトの鉄欠乏性貧血と類似した妥当なモデルといえる。

鉄欠乏性貧血モデルマウスに対し、NDを2週間与えて病態回復を促すと、ヘモグロビン値の緩やかな回復は認められたものの完全には回復せず、血清フェリチン量および脾臓貯蔵鉄量も著しく低く体内貯蔵鉄はほとんど回復していなかった。鉄欠乏性貧血の回復期では、初めにヘモグロビン等の生体維持

に必須の鉄、続いて体内貯蔵鉄の順に鉄を補給するため¹¹⁾、本試験ではヘモグロビン回復後期から体内貯蔵鉄回復初期を観察したと考えられた。マクロファージを活性化するNK-4を2週間継続して経口投与すると、ヘモグロビン値の回復は促進され、ほぼ正常値まで回復したことから、マクロファージがヘモグロビン値回復に関与することが示唆された。今回の試験ではNK-4投与による体内貯蔵鉄の回復

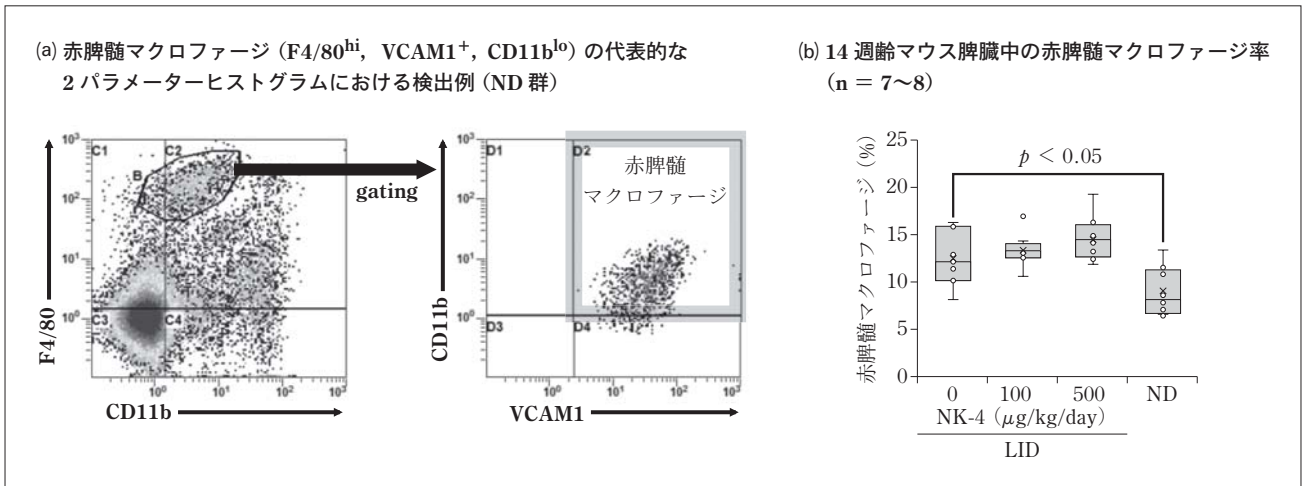


図6 14週齢マウスの脾臓における赤脾髄マクロファージの比率

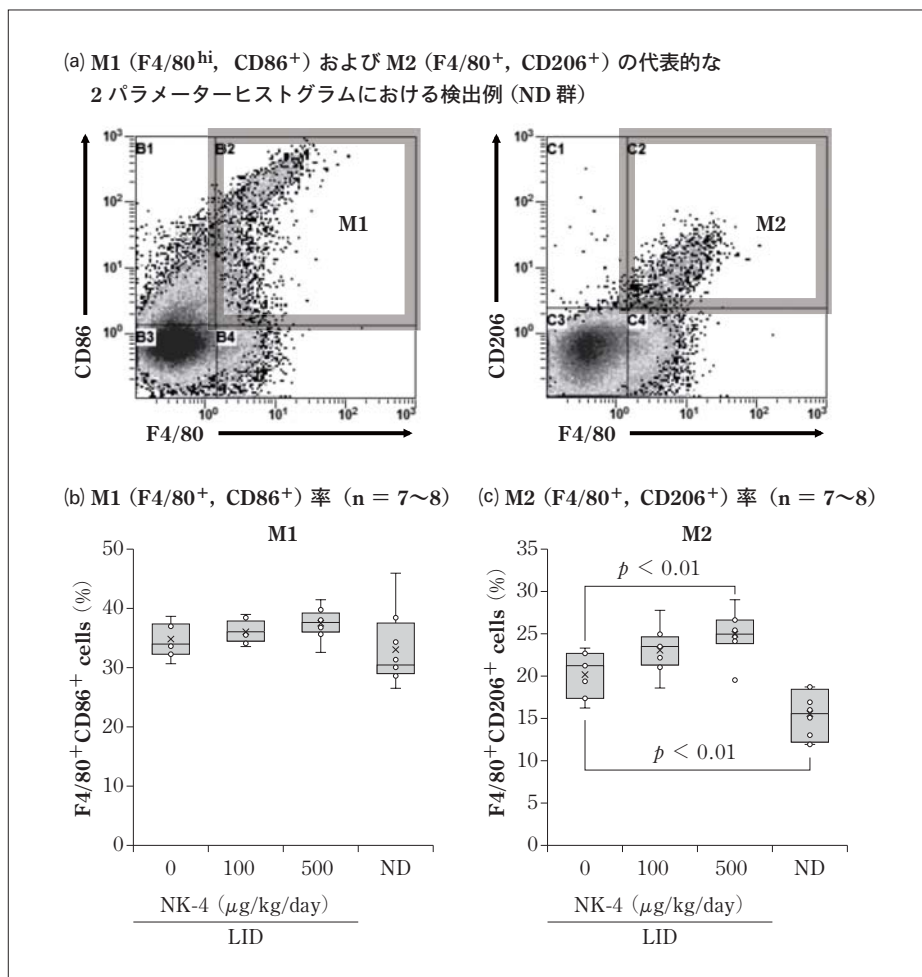


図7 14週齢マウスの脾臓におけるM1, M2の比率

は認められなかったが、NK-4はヘモグロビン値の回復を早めていた。血清フェリチン量もNK-4投与で個体差があるものの応答がみられることから、摂取期間を延長すればNK-4は体内鉄の回復をも促進

する可能性がある。

脾臓では、特にLID群で赤血球を貪食した赤脾髄に局在するマクロファージが見られるとともに、FCM解析においてもLID群の赤脾髄マクローファー

ジが増加しており、貧血回復に赤脾髄マクロファージが関与することが示された。貧血回復期の赤脾髄マクロファージは、鉄欠乏で菲薄化した赤血球を貪食し、その鉄を赤血球産生に補ったと推察されるが、NK-4投与による赤脾髄マクロファージの増加はみられなかったため、ヘモグロビン値の回復促進に赤脾髄マクロファージは関与しないと考えられた。一方、脾臓マクロファージのM1/M2の分極化をみると、M1は各群に差はなかったが、M2は貧血誘導後の回復時に増加し、NK-4投与によってその増加は亢進したことから、ヘモグロビン値回復に関与するマクロファージはM2である可能性が示された。一般的に赤脾髄マクロファージのような組織常在性マクロファージはM2様であると言われるものの¹²⁾、今回の結果では赤脾髄マクロファージとM2は一致しておらず、赤脾髄マクロファージとは異なる機能を有するM2が増加したと考えられた。その他の組織常在性マクロファージとして、白脾髄濾胞辺縁部で生体防御に関与する辺縁帯マクロファージや白脾髄中で免疫寛容に関係する可染体マクロファージが挙げられるが¹³⁾、脾臓所見ではこれらの顕著な違いは認められなかった。組織常在性マクロファージ以外の特異的な脾臓所見として、LID群の脾臓では髓外造血および赤芽球島の形成を認め、NK-4投与群では対照群よりも赤芽球数が増加し、中心のマクロファージを取り囲む赤芽球数が多い傾向にあった。骨髄においてもNK-4投与による赤芽球数の増加が認められ、赤芽球島マクロファージの活性化が示唆された。赤芽球島のマクロファージは赤芽球に鉄を積極的に受け渡すことから⁶⁾ M2様であると考えられ、今回観察されたM2の増加は、赤芽球島を形成するマクロファージの増加を反映した可能性が考えられた。赤芽球島マクロファージが増加して機能を発揮するには、そこに鉄を補給するマクロファージの増加が必要と推測されるが、今回の測定時点では他のマクロファージに顕著な差は認められず、さらなるマクロファージ分極の解明には、経時的な観察が必要であると推察された。

近年、NK-4がマクロファージにも発現するTRPV2に作用することが報告され、その作用機作も明らかになりつつあるが¹⁴⁾¹⁵⁾、マクロファージの分極化については未解明であり、今後さらなる評価が必要である。In vivoのような複雑な条件下にお

けるマクロファージ分極の評価法については議論の余地があるものの、今回初めて鉄欠乏性貧血回復期の生体内でM2の増加が観察されたことは、今後のマクロファージ分極の解明の一助になると言える。

ま と め

本研究では、鉄欠乏性貧血モデルマウスを作成し、鉄欠乏性貧血回復期における血液パラメータの推移とマクロファージの分極を評価した。貧血回復期において、マクロファージはM2に分極することが明らかとなり、NK-4経口投与によってM2の増加とヘモグロビン値の回復が促進されたことから、M2への分極がヘモグロビン値の回復を促進する可能性が示された。以上より、鉄欠乏性貧血の回復期におけるマクロファージ分極の重要性を明らかにした。

利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, et al. A red carpet for iron metabolism. *Cell* 2017; **168**: 344-361.
- 2) 塩崎宏子, 泉二登志子. II. 鉄欠乏: 4. 鉄欠乏性貧血の検査と診断. *日内会誌* 2010; **99**: 1213-1219.
- 3) Kohyama M, Ise W, Edelson BT, et al. Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 2009; **457**: 318-321.
- 4) Youssef LA, Rebbaa A, Pampou S, et al. Increased erythrophagocytosis induces ferroptosis in red pulp macrophages in a mouse model of transfusion. *Blood* 2018; **131**: 2581-2593.
- 5) Kurotaki D, Uede T, Tamura T. Functions and development of red pulp macrophages. *Microbiol Immunol* 2015; **59**: 55-62.
- 6) de Back DZ, Kostova EB, van Kraaij M, et al. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol* 2014; **5**: 1-11.
- 7) Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, et al. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169⁺ and TCR⁺ macrophages. *Front Immunol* 2015; **6**: 1-15.
- 8) Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, et al. Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol* 2011; **32**: 241-247.
- 9) Kobayashi M, Kato H, Hada H, et al. Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. *Haematologica* 2017; **102**: 454-465.
- 10) Coupland LA, Cromer D, Davenport MP, et al. A novel fluorescent-based assay reveals that thrombopoietin

- signaling and Bcl-X(L) influence, respectively, platelet and erythrocyte lifespans. *Exp Hematol* 2010; **38**: 453-461.
- 11) 岡田 定. II. 鉄欠乏 : 5. 鉄欠乏性貧血の治療指針. *日内会誌* 2010; **99**: 1220-1225.
- 12) Davis LC, Jenkins SJ, Allen JE, et al. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 2013; **14**: 986-995.
- 13) 香山雅子. 組織マクロファージのサブセットとその分化機構. *化学と生物* 2015; **53**: 593-599.
- 14) Iwata Y, Katayama Y, Okuno Y, et al. Novel inhibitor candidates of TRPV2 prevent damage of dystrophic myocytes and ameliorate against dilated cardiomyopathy in a hamster model. *Oncotarget* 2018; **9**: 14042-14057.
- 15) Link TM, Park U, Vonakis BM, et al. TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol* 2010; **11**: 232-239.

Polarization and Roles of Mouse Splenic Macrophages in the Recovery Phase of Iron Deficiency Anemia

Aki SUYAMA / Shigeyuki ARAI / Satomi KOYA-MIYATA / Keizo KOHNO / Hitomi OHTA /
Akira HARASHIMA / Toshio ARIYASU / Hitoshi MITSUZUMI / Shimpei USHIO

R&D Division, Hayashibara Co., Ltd.

Abstract

Objectives: The purpose of this study was to evaluate the polarization and the roles of macrophages during the recovery phase of iron deficiency anemia in mice. In addition, the effect of NK-4, which is known to activate reticuloendothelial macrophages, was examined on the recovery from iron deficiency anemia.

Methods: Four-week-old female BALB/c mice were given low iron diet (LID) for 8 weeks to induce the appearance of microcytic hypochromic erythrocytes, which is a feature of low iron deficiency anemia. Then, they were given normal diet (ND) for two weeks to recover from anemia. Some mice were orally administered NK-4 (100 or 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) during the recovery phase. After 10 weeks, they were hematologically and histopathologically examined. The population of splenic macrophages were analyzed by flow cytometry.

Results: The hemoglobin levels in the LID (control) group were gradually increased after switching to ND, but they did not reach the levels of ND group of mice in two weeks. Administration of NK-4 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) promoted the increase in the hemoglobin levels, and finally the levels were recovered to comparable levels of the ND group of mice. Both the ratios of red pulp macrophages (F4/80^{hi}, VCAM1⁺, CD11b^{lo}) and alternatively activated macrophages (M2; F4/80⁺, CD206⁺) to the total splenic macrophages (F4/80⁺) were increased in every group of mice during the anemia recovery phase. Especially, the increase in the population of M2 macrophages was significantly promoted by NK-4 administration.

Conclusion: We found that the increase in the M2 macrophage population contributed to recovery from iron deficiency anemia. Furthermore, our study indicated that NK-4 promoted the recovery from anemia through increasing the M2 macrophage population.

Key Words: Iron deficiency anemia, Macrophage, M2, Hemoglobin, NK-4