

# ヒト赤芽球の transferrin receptor mRNA の発現に関する研究

— ヒト赤芽球の分離法並びに transferrin  
receptor mRNA の定量法の検討を含めて —

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

伊 丹 滋 人

(平成 6 年 2 月 15 日受稿)

**Key words :** transferrin receptor mRNA, Northern blot analysis,  
erythroblasts, cell separation, immunomagnetic beads

## 緒 言

鉄は、電子伝達系への関与<sup>1)</sup>とともに ribonucleotide reductase の活性維持<sup>2)</sup>を介して細胞へのエネルギー供給や DNA 合成に重要な役割を担い、生体にとって必須の要因として働いている。しかし一方で鉄は、hydroxyl radical の生成を触媒し<sup>3)</sup>、また発癌との関連も指摘<sup>4)5)</sup>されるなど、過剰の鉄は生体にとって有害と考えられている。かかる鉄の細胞内取り込みは、主として transferrin receptor (TfR) を介して行われ、この TfR はさまざまな細胞<sup>6)-8)</sup>にその存在が確認されているが、その発現の調節には細胞内の鉄が深く関わっていることが明らかにされつつある<sup>9)-12)</sup>。すなわち、細胞内鉄濃度により TfR mRNA の 3'untranslated region に存在する iron-responsive element (IRE) と、細胞質内蛋白である IRE-binding protein (IRE-BP) の親和性が変化して、TfR の発現が調節されると考えられている。

ところで、赤芽球系細胞はその分化過程で hemoglobin (Hb) を合成するが、その際多量の鉄が赤芽球内に取り込まれ、これらの多くは非hemin鉄からhemin鉄へと移行する。この過程で非hemin鉄を示す可溶性鉄顆粒が観察されるが、教室の木村<sup>13)-15)</sup>は、赤芽球系造血におけるかかる可溶性鉄顆粒の生理的、並びに病的意

義を報告してきた。しかし、本顆粒と TfR 発現の関係は不明であり、またヒト骨髄の赤芽球系細胞の TfR に関しての報告<sup>16)-20)</sup>は少なく、in vivo における赤芽球系細胞の TfR 発現を調節する因子についての詳細は不明であった。この点に関して教室の木村(文)<sup>21)22)</sup>が、ヒト骨髄赤芽球の TfR 発現は個々の赤芽球間の比較では Hb 濃度により down-regulation を受けるものの可溶性鉄顆粒数とは関連はなく、症例間の比較では鉄貯蔵状態により、平均可溶性鉄顆粒数と平均 TfR 数の間に明瞭な負の相関関係が認められることを報告した。一方、骨髄異形成症候群 (MDS) については露野<sup>23)24)</sup>が症例間における平均可溶性鉄顆粒数と平均 TfR 数の負の相関関係は認められず、平均可溶性鉄顆粒数の増加にもかかわらず平均 TfR 数の減少が認められないことを報告した。すなわち MDS では、平均可溶性鉄顆粒数によって代表される赤芽球内の鉄量による平均 TfR 数の調節機構が変調をきたしている可能性が想定される。しかし、その変調が TfR 発現のどの段階で起こっているかは不明であり、また赤芽球内の機能鉄と可溶性鉄顆粒の異同については慎重に考える必要があると思われる。

今回著者は、mRNA のレベルでの TfR の発現調節がどのように行われているかを可溶性鉄顆粒との関連から検討することが、これら不明

な点の解明につながり、ひいては MDS を含めた各種疾患の赤芽球系細胞における TfR の発現調節機構、さらには鉄代謝機構の解明につながると考えた。そこで、まずヒト骨髄細胞中より immunomagnetic beads 法を応用して赤芽球を分離し、その分離赤芽球の TfR mRNA 発現を Northern blot analysis により症例ごとに比較検討する方法を考案した。さらにこの方法を応用して、鉄貯蔵状態が異なる症例間における TfR mRNA と平均可溶性鉄顆粒数の関係について検討した。

### 対象と方法

#### 1. 対象

表 1 に示す如く岡山大学医学部第二内科並びにその関連施設で診断を受けた MDS 2 例、鉄欠乏性貧血 (IDA) 2 例を対象とした。MDS の 2 例の内訳は、Refractory anemia with excess of blasts in transformation (RAEB-t) 1 例と Refractory anemia (RA) 1 例であった。なお、対照には血液疾患を有さない健康人 2 例 (27歳・男, 29歳・男) を用いた。

#### 2. 方法

##### 1) 赤芽球の分離

ヘパリン加骨髄液約 5 ml を採取し、phosphate-buffered saline (PBS) で約 5 倍に希釈後、70% (v/v) Percoll (1.081 g/ml) 上に重層し、400×g で 30 分間遠心した。その中間細胞層を回収し、10ml の PBS を加えよく混和した後、250×g で 10 分間遠心した。さらに PBS で 2 回洗浄後、0.1% bovine serum albumin (BSA) 加 PBS に再浮遊させ、これに mouse anti-glycophorin-A monoclonal antibody (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) 10~20μg

を加え、4℃で30分間反応させた。次いで細胞を 2 回洗浄することにより未反応の抗体を除去し、10<sup>7</sup>個の細胞につき 25μl (10<sup>7</sup>beads) の anti-mouse IgG 結合 immunomagnetic beads (Dynabeads M-450 sheep anti-mouse IgG, Dynal A. S, Oslo, Norway) を加え、4℃で30分間反応させた。反応終了後、magnetic particle concentrator (Dynal MPC 1, Dynal A.S, Oslo, Norway) を用いて immunomagnetic beads と結合した細胞を磁力により分離し、さらに 2 回洗浄することにより赤芽球分画細胞を得た。なお、得られた細胞については、細胞数を算定するとともに、cytocentrifuge スライド標本を作成し May-Giemsa 染色を行い、その赤芽球の purity と yield を求めた。

##### 2) RNA の抽出

分離細胞の total RNA の抽出には、RNAzol™ B (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX, USA) を用いた。RNA pellet は 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) に溶解し、電気泳動に使用するまで凍結保存した。

##### 3) RNA の電気泳動

抽出した total RNA 2.5μg を、2.2M formaldehyde を含んだ 1% agarose gel で電気泳動した。マーカー用色素には、bromophenol blue (BPB) を用い、泳動用緩衝液には 20mM 3-[N-morpholino] propanesulfonic acid (MOPS), 5 mM sodium acetate, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む溶液を用いた。

##### 4) RNA の vacuum transfer

電気泳動終了後、RNA の nylon membrane (Hybond™-N, Amersham International plc, Buckinghamshire, UK) への vacuum transfer

表 1 対象症例とその臨床検査成績

症例	年齢	性	診断	RBC (×10 <sup>4</sup> /μl)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	WBC (/μl)	Platelet (×10 <sup>4</sup> /μl)	Fe (μg/dl)	TIBC (μg/dl)	Ferritin (ng/ml)
1	27	M	(Normal)	474	14.5	43.8	92.4	30.6	33.1	4400	24.9	71	288	100
2	29	M	(Normal)	465	15.2	45.8	98.5	32.7	33.2	8100	28.3	154	299	140
3	71	M	RAEB-t	201	7.0	20.0	99.5	34.8	35.0	1000	21.4	44	147	616.2
4	45	F	RA	199	7.6	21.6	108.5	38.2	35.2	3400	5.3	129	199	44.4
5	80	M	IDA	276	6.8	22.6	82.0	24.6	30.1	7700	36.5	10	297	9
6	81	F	IDA	417	10.3	34.5	82.7	24.7	29.9	4100	28.3	31	405	7.7

を行った。装置は VacuGene XL Vacuum Blotting System (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) を用い、真空圧は 50~55cmH<sub>2</sub>O に設定した。transfer に先だって gel を蒸留水で洗浄し、formaldehyde を除去した。次いで gel をアルカリ溶液 (50mM NaOH, 10mM NaCl) で処理後、中和液 (0.1M Tris-Cl, pH7.4) にて処理し、その後 20×SSC (3 M NaCl, 0.3M sodium citrate) を転写液に用い、30分以上 vacuum transfer を行った。RNA の nylon membrane への固定は、80℃で 2 時間加熱処理することにより行った。

#### 5) hybridization

まず prehybridization を以下の方法にて実施した。すなわち、プラスチックバッグに nylon membrane を入れ、あらかじめ 95℃で 5 分間加熱後急冷し、1 本鎖に変性させておいた 10mg/ml サケ DNA (From salmon testes phenol-chloroform extracted, ethanol precipitated, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 100 $\mu$ l と prehybridization 緩衝液 (0.5% SDS, 6×SSC, 5×Denhardt's solution=0.1% BSA+0.1% ficoll+0.1% polyvinylpyrrolidone) 約 10ml を加えて空気を追い出し密封した。この状態で恒温振盪器にて 65℃で 1 時間以上加温した。

TfR cDNA の probe には高後裕博士 (札幌医科大学第四内科) より供与された pCD-TR 1 (originally provided by Dr. L. C. Kühn, Swiss Institute for Experimental Cancer Research)<sup>25)26)</sup>由来の full-length human TfR cDNA 500ng を用い、さらに対照として human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G 3 PDH) cDNA probe (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA) 25ng を用いた。標識は Random primed DNA labeling kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) により [<sup>32</sup>P] dCTP (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA, USA) で行った。

prehybridization 終了後、プラスチックバッグの封を切り中の液を捨て、10mg/ml サケ DNA 100 $\mu$ l と上記で標識済みの probe を 95℃

で 5 分間加熱後急冷し、hybridization 緩衝液 (0.5% SDS, 6×SSC) 約 10ml とともにプラスチックバッグに入れ再び密封した。この状態で恒温振盪器にて 65℃で 12 時間以上加温した。

#### 6) autoradiography

hybridization 終了後、プラスチックバッグから nylon membrane を取り出し、1×SSC+0.1% SDS で 20℃, 20 分間洗浄を 1 回、0.2×SSC+0.1% SDS で 65℃, 20 分間洗浄を 3 回行った。洗浄終了後、nylon membrane の水分をとりサララップで包装し、カセットに X-ray film (New RX 20.3×25.4cm, 富士写真フイルム株式会社, 南足柄) とともに入れて -70℃で一晩以上露光し、その後、型の如く現像、定着を行った。

#### 7) TfR mRNA の定量化

densitometer (ScanningImager 300 SX, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) にて TfR と G 3 PDH のバンドの density を測定し、その比 (TfR/G 3 PDH) を TfR mRNA の発現量とした。

#### 8) 赤芽球胞体内可溶性鉄顆粒数の算定

骨髓塗抹標本を Kaplan ら<sup>27)</sup>の変法にて鉄染色後、赤芽球 100 個の胞体内可溶性鉄顆粒数を算定し、その平均値を求めて平均可溶性鉄顆粒数とした。

## 結 果

### 1. 骨髓細胞中からの赤芽球の分離

immunomagnetic beads による分離後の赤芽球分画の cyto centrifuge スライド標本の May-Giemsa 染色所見は、図 1 に示す如く beads に結合した赤芽球を確認可能であった。これらの標本から算定した immunomagnetic beads による分離前後の総有核細胞数とその赤芽球比率および purity は、表 2 の如く分離前の赤芽球比率が  $14.8 \pm 4.3\%$  (mean  $\pm$  S. D.) に比し、分離後には赤芽球の purity は  $89.5 \pm 4.5\%$  と高率になった。さらに、これらの結果から赤芽球の yield を算定したところ  $19.9 \pm 6.7\%$  となった。なお、赤芽球分画細胞中の赤芽球以外の細胞はリンパ球が主体であり、リンパ球における TfR の発現は木村文昭によれば (私信)、赤芽球の TfR の発現に比べ著明に低いとされ、従って、今回分離

表2 immunomagnetic beads による赤芽球の分離成績

症例	診 断	分 離 前 骨 髄		分 離 後 赤 芽 球 分 画	
		総有核細胞数 ( $\times 10^6$ )	赤芽球比率 (%)	総有核細胞数 ( $\times 10^6$ )	赤芽球purity (%)
1	(Normal)	108.850	16.8	4.725	83.0
2	(Normal)	206.625	15.8	9.528	90.0
-----					
3	RAEB-t	133.125	21.8	5.929	86.0
4	RA	51.750	12.6	2.075	89.5
5	IDA	46.000	10.0	0.650	95.0
6	IDA	105.750	11.8	1.625	93.5

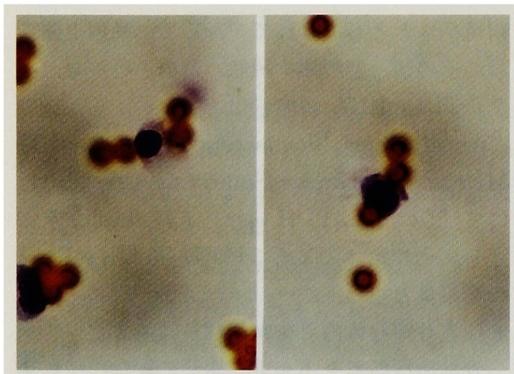


図1 immunomagnetic beads と結合した赤芽球  
茶色の immunomagnetic beads に結合した  
赤芽球が認められた (May-Giemsa 染色,  $\times 1000$ ).

した赤芽球分画細胞はヒト骨髄赤芽球の TfR mRNA の検討に応用可能と判断した。

また、添加した anti-glycophorin-A 抗体は、症例1のみが $20\mu\text{g}$ であり症例2~6は $10\mu\text{g}$ としたが、症例1と症例2~6の両群の間で分離された細胞数などに明らかな差は認められなかった。

## 2. 赤芽球の TfR mRNA の発現量

赤芽球 TfR mRNA の Northern blot analysis による hybridization の結果は、図2の如く TfR と G3PDH の mRNA のバンドをそれぞれ認めた。TfR のバンドの density は表3に示す如く、健常人の2例に比し IDA は増加(症例5)、あるいは若干高めではあるがほぼ同等(症例6)であり、MDSの2例では低下していた。さらに TfR と G3PDH のバンドの density の

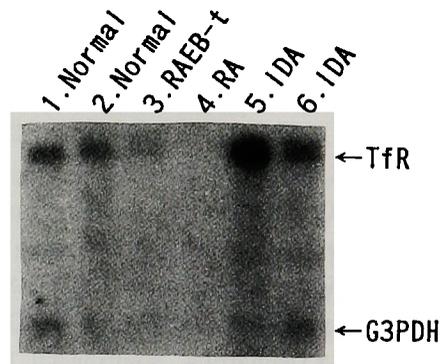


図2 TfR と G3PDH mRNA の Northern blot analysis

4.9kb の TfR mRNA のバンドを認めた (upper arrow)。TfR mRNA の発現量は、G3PDH mRNA のバンド (lower arrow) を対照として、その比 (TfR/G3PDH) をとることにより求めた。

比をとることにより TfR mRNA の発現量を求めたところ、IDA では mRNA は健常人に比し増加(症例5)、あるいは同等(症例6)であった。また、MDSの2例については健常人とほぼ同等であった。次に、これらの mRNA の発現と平均可染性鉄顆粒数との関係を検討したところ、図3に示す如くある程度の平均可染性鉄顆粒数の変動では mRNA は健常人とほぼ同等(症例3, 4, 6)であるが、平均可染性鉄顆粒数の変動(減少)が強くなると mRNA が増加(症例5)していることが判った。

## 考 察

ヒト赤芽球の TfR mRNA の in vivo におけ

表3 densitometer による mRNA 量の測定結果

症例	診断	TfR (OD・mm)	G 3 PDH (OD・mm)	TfR/G 3 PDH
1	(Normal)	5.558	4.436	1.253
2	(Normal)	5.087	2.919	1.743
3	RAEB-t	2.859	2.991	0.956
4	RA	1.605	1.760	0.912
5	IDA	19.62	3.969	4.943
6	IDA	6.884	4.351	1.582

る変動やその発現調節因子については不明の点が多い。そこで今回著者は、赤芽球系細胞における TfR の発現調節機構を解明する目的で、mRNA のレベルにおける TfR の発現調節と可溶性鉄顆粒との関連を検討した。すなわち、まずヒト赤芽球を immunomagnetic beads と anti-glycophorin-A 抗体による positive selection 法を応用して分離し、その TfR mRNA を Northern blot analysis で症例ごとに比較検討する方法を確立した。次いでこの方法を用いて、ヒト骨髓液から  $89.5 \pm 4.5\%$  の purity,  $19.9 \pm 6.7\%$  の yield で赤芽球を分離することに成功し、その赤芽球の TfR mRNA は、IDA では 1 例は健常人に比し増加していたが、もう 1 例は同等、また MDS では健常人とほぼ同等であった。さらに TfR mRNA と平均可溶性鉄顆粒数の関係を検討したところ、ある程度までの平均可溶性鉄顆粒数の変動では mRNA は健常人とほぼ同等 (症例 3, 4, 6) であるが、平均可溶性鉄顆粒数の変動 (減少) が強くなると mRNA が増加 (症例 5) していることが示され、可溶性鉄顆粒数の変動により mRNA の発現が影響され得る可能性が示唆された。

かかる赤芽球の TfR mRNA の検討をするためには、heterogeneous な集団である骨髓細胞より赤芽球を高い purity を保ちつつ分離する必要がある。そこで著者は、まず赤芽球の分離方法を検討した。赤芽球の分離方法としては従来さまざまな方法が試みられており、velocity sedimentation<sup>28)-30)</sup>, density gradient centrifugation<sup>29)30)</sup>, complement-mediated lysis<sup>31)</sup>, fluorescence-activated cell sorter (FACS)<sup>19)32)</sup>による方法などが報告されている。

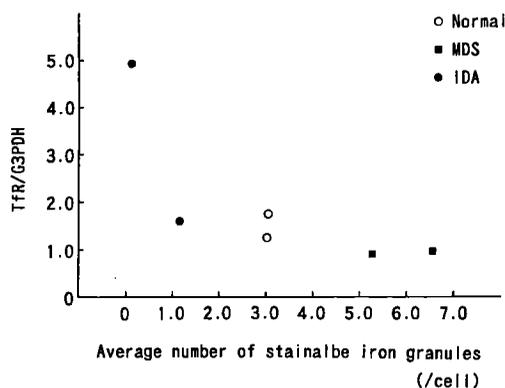


図3 TfR mRNA 発現量と赤芽球平均可溶性鉄顆粒数の関係

しかし velocity sedimentation による方法は、sedimentation tank などの器材が必要となり簡便さに問題がある。この点は FACS についても同様であり、また complement-mediated lysis による方法は分離細胞への傷害の可能性を完全には否定できないために代謝の実験などに応用するには注意が必要と考えられ、すべての実験系に適しているとはいえない。density gradient centrifugation などの centrifugation による細胞分離法は、比較的簡便であり、近年広く応用されている方法であるが、十分な purity を得るためには、この方法の前後に他の方法を組み合わせることが必要と考えられる。そこで著者は、最初に Percoll を用いた centrifugation により主に赤血球や顆粒球を除去し、その後 immunomagnetic beads と anti-glycophorin-A 抗体を用いた磁力による positive selection 法により赤芽球を分離することを試みた。6 例の骨髓穿刺液にこの方法を適用し、purity  $89.5 \pm 4.5\%$ , yield  $19.9 \pm 6.7\%$  で赤芽球を分離することができた。骨髓中の赤芽球を分離するのに immunomagnetic beads を用いたのは本報告が初めてであるが、本法は簡単な設備で比較的簡便に行えるものであり、今後赤芽球の研究において有効に活用し得る方法と思われる。

さて、生体は細胞内への鉄の取り込みを主として TfR 発現の多寡により調節しているが、この TfR の生合成は細胞内の鉄濃度により調節されている<sup>9)-12)</sup>。TfR mRNA の 3' untranslated

region には IRE と呼ばれる stem-loop 構造があり、これに IRE-BP が結合すると mRNA は RNase による分解を受けにくくなり、また逆に IRE-BP が外れると mRNA は分解されやすくなる。一方この IRE と IRE-BP の親和性は細胞内鉄濃度により規定されており、細胞内鉄濃度が低くなると親和性は上昇し、鉄濃度が高くなると親和性は低下する。したがって例えば鉄濃度が低くなると、IRE と IRE-BP の親和性は上昇し TfR mRNA は分解されにくくなり、その結果 TfR の発現が亢進することになる。このように細胞内の鉄量と TfR の発現は密接に関連していると考えられ、TfR の発現の機序を解明するためには、同時に細胞内の鉄量を評価することが必須と考えられる。ところで、赤芽球内に取り込まれた鉄はその多くは非 hemin 鉄から hemin 鉄へと移行していくが、この動的過程において細胞内の非 hemin 鉄を示す可溶性鉄顆粒が観察される。可溶性鉄顆粒は赤芽球内においては原形質に存在するもの、鉄芽球性貧血でみられるミトコンドリア中に存在するものの二種類の存在形態をとるとされ、Kaplan ら<sup>27)</sup>はこの顆粒を有する正赤芽球に sideroblasts なる名称を与えた。当教室においては、従来より木村<sup>13)-15)</sup>が赤芽球の可溶性鉄顆粒に注目し、赤芽球系造血における可溶性鉄顆粒の意義について検討し、sideroblastogram を通して各種血液疾患における鉄代謝異常を解明してきた。その本態や ferritin, hemosiderin, cytosol iron との異同については不明の点も残されているが、本顆粒は赤芽球内の鉄代謝過程の非 hemin 鉄を示すものであり、その多寡は各種血液疾患の鉄代謝状態を反映するものとして重要な意義がある。したがって TfR mRNA の発現とともに可溶性鉄顆粒の多寡を検討することは、TfR の発現調節のメカニズムを理解していく上で非常に有意義であると考えられる。

以上の如き観点から、今回著者は TfR mRNA と平均可溶性鉄顆粒数の関係を検討したところ、症例 5 の IDA では TfR mRNA の増加を認めた。この症例においては同時に平均可溶性鉄顆粒数の減少を認めており、これは in vivo における細胞内鉄量による TfR 発現の調節機構に

IRE と IRE-BP が関与することを示唆するものと考えられる。すなわち、細胞内の鉄量が減少することにより IRE と IRE-BP の親和性が上昇し、mRNA が分解されにくくなり mRNA が増加していると考えることができ、非常に興味深い。症例 6 の IDA については TfR mRNA は健常人と同等であったが、その原因としては貧血の程度が軽いこと、平均可溶性鉄顆粒数の減少が明らかでないことが考えられる。さらに、一般的に可溶性鉄顆粒は Hb を含有する赤芽球で算定されているのに対し、TfR は赤芽球の成熟の前半期において多いと報告<sup>21)</sup>されており、この点を考慮して結果を評価することも必要と思われる。

さて、症例 5 の結果から考えると、細胞内の鉄量と TfR の発現は赤芽球系細胞においても互いに関連し合っていることが推察されるが、Hradilek ら<sup>33)</sup>は heme 合成に伴う非 heme 鉄の消費が TfR の発現維持に重要であると報告しており、赤芽球系細胞における TfR の発現調節には heme との関連も重要と考えられる。教室の木村(文)<sup>22)</sup>は、同一症例内の個々の赤芽球の単位面積当たりの Hb 量と TfR 密度の間には  $r = -0.71$  の負の相関が認められると報告し、TfR の発現調節に関与する因子としての Hb の意義を重要視している。さらに藤井ら<sup>34)</sup>は TfR 発現と各種臨床検査成績との関連を検討し、平均 TfR 数は MCHC と強い負の相関を示すと報告した。今後、赤芽球系細胞の TfR の発現調節機構を解明していく過程において、細胞内鉄量とともに Hb の変動についても検討を加えていくことが必要であると考えられる。

一方、MDS については今回の 2 例の検討では、健常人とほぼ同等の mRNA の発現となった。TfR 数の検討では、教室の露野<sup>24)</sup>は MDS においては平均可溶性鉄顆粒数が健常人に比して著明に増加するにもかかわらず平均 TfR 数は健常人に比し差がないことを示し、鉄貯蔵状態の異なる健常人、鉄欠乏、鉄過剰の症例間で平均可溶性鉄顆粒数と平均 TfR 数の間に強い負の相関を認めるとする木村(文)の報告<sup>21)</sup>から大きく逸脱することを報告した。この報告と今回の 2 例の MDS の結果を勘案すると、MDS における

mRNA と TfR 数は平行した発現態度をとることが予想される。しかし、Abe ら<sup>30)</sup>は鉄過剰状態においては mRNA と TfR 数が平行した発現態度をとらず、TfR 数は鉄負荷によって変化しないが mRNA は減少すると報告している。また、今回の MDS の mRNA の結果は、可染性鉄顆粒数が細胞内機能鉄の多寡を示すとすれば、IRE と IRE-BP による regulation 機構からだけでは説明できない発現態度をとっていると考えられ、やはり Hb の関係などについても検討の余地があるとともに、特に MDS のように赤芽球内の鉄代謝異常を伴う病態における機能鉄と可染性鉄顆粒の異同についても考慮を要すると思われる。症例を追加しさらに検討していくことが必要であり、その結果赤芽球系細胞の TfR の発現調節機構が明らかになるものと思われる。

## 結 論

赤芽球系細胞の TfR の発現調節機構を解明する目的で、骨髄細胞より赤芽球を分離精製し Northern blot analysis により TfR mRNA の発現を検討する方法を考察した。さらにこの方法を応用して、鉄貯蔵状態が異なる症例間における TfR mRNA と平均可染性鉄顆粒数の関係を検討し、以下の結果を得た。

1. immunomagnetic beads と anti-glycophorin-A 抗体を用い骨髄細胞中より、 $89.5 \pm 4.5\%$  の purity,  $19.9 \pm 6.7\%$  の yield で赤芽球を分離精製することができた。

2. IDA の TfR mRNA は、1例は健常人に比し増加していたが、もう1例は同等であった。

3. MDS の TfR mRNA は健常人とほぼ同等であった。

4. TfR mRNA の増加を認めた IDA の平均可染性鉄顆粒数は減少していた。

以上、今回考察した簡易な赤芽球分離法を応用することにより、さらに症例数を増やして mRNA を検討し、可染性鉄顆粒を含めた各種因子と赤芽球の TfR mRNA の発現の関係を明らかにすることが可能となろう。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深謝致しますとともに、終始懇切なる御指導、御助言をいただいた高橋清講師、宗田良博士、大本英次郎助手、木村文昭助手に深謝致します。

また、pCD-TR1 を供与していただいた高後裕博士、L. C. Kühn 博士に深謝致します。

なお、本論文の要旨は第55回日本血液学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Williams RJP : Haem-proteins and oxygen ; in Iron in Biochemistry and Medicine, Jacobs A and Worwood M eds, Academic Press, London (1974) pp 183—219.
- 2) Reichard P and Ehrenberg A : Ribonucleotide reductase — A radical enzyme. Science (1983) 221, 514—519.
- 3) Pippard MJ : Clinical use of iron chelation ; in Iron in Immunity, Cancer and Inflammation, de Sousa M and Brock JH eds, Wiley, Chichester (1989) pp 361—392.
- 4) Bomford A and Williams R : Long term results of venesection therapy in idiopathic haemochromatosis. Q J Med (1976) 45, 611—623.
- 5) 岡田 茂 : フリーラジカルと悪性腫瘍。最新医学 (1990) 45, 1743—1747.
- 6) Seligman PA, Schleicher RB and Allen RH : Isolation and characterization of the transferrin receptor from human placenta. J Biol Chem (1979) 254, 9943—9946.
- 7) Soda R and Tavassoli M : Liver endothelium and not hepatocytes or Kupffer cells have transferrin receptors. Blood (1984) 63, 270—276.
- 8) Soda R and Tavassoli M : Transendothelial transport (transcytosis) of iron-transferrin complex in

- the bone marrow. *J Ultrastruct Res* (1984) **88**, 18—29.
- 9) Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, Caughman SW, Rouault TA, Klausner RD and Harford JB : Iron-responsive elements : Regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* (1988) **240**, 924—928.
  - 10) Koeller DM, Casey JL, Hentze MW, Gerhardt EM, Chan LNL, Klausner RD and Harford JB : A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) **86**, 3574—3578.
  - 11) Casey JL, Koeller DM, Ramin VC, Klausner RD and Harford JB : Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *EMBO J* (1989) **8**, 3693—3699.
  - 12) Theil EC : Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J Biol Chem* (1990) **265**, 4771—4774.
  - 13) 木村郁郎 : Sideroblast に関する研究. 第一編 血液疾患と Sideroblast. *岡山医誌* (1957) **69**, 1773—1798.
  - 14) 木村郁郎 : Sideroblast に関する研究. 第二編 骨髓機能 (実験的貧血) と Sideroblast. *岡山医誌* (1957) **69**, 1799—1812.
  - 15) 木村郁郎 : Sideroblast に関する研究. 第三編 赤芽球と鉄代謝. *岡山医誌* (1957) **69**, 1813—1825.
  - 16) Parmley RT, Hajdu I and Denys FR : Ultrastructural localization of the transferrin receptor and transferrin on marrow cell surfaces. *Br J Haematol* (1983) **54**, 633—641.
  - 17) Horton MA : Expression of transferrin receptors during erythroid maturation. *Exp Cell Res* (1983) **144**, 361—366.
  - 18) Sieff C, Bicknell D, Caine G, Robinson J, Lam G and Greaves MF : Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation. *Blood* (1982) **60**, 703—713.
  - 19) Loken MR, Shah VO, Dattilio KL and Civin CI : Flow cytometric analysis of human bone marrow : I. Normal erythroid development. *Blood* (1987) **69**, 255—263.
  - 20) Muta K, Nishimura J, Ideguchi H, Umemura T and Ibayashi H : Erythroblast transferrin receptors and transferrin kinetics in iron deficiency and various anemias. *Am J Hematol* (1987) **25**, 155—163.
  - 21) 木村文昭 : ヒト赤血球系細胞におけるトランスフェリン受容体の発現機構に関する研究. 第一編 トランスフェリン受容体の定量化とその発現への細胞形態, 成熟度, 非ヘミン鉄の影響についての検討. *岡山医誌* (1991) **103**, 645—657.
  - 22) 木村文昭 : ヒト赤血球系細胞におけるトランスフェリン受容体の発現機構に関する研究. 第二編 トランスフェリン受容体発現に対するヘモグロビンの影響についての検討. *岡山医誌* (1991) **103**, 659—669.
  - 23) 露野理津朗 : 骨髓異形成症候群におけるヒト赤芽球トランスフェリン受容体発現に関する研究. 第一編 赤芽球トランスフェリン受容体発現に及ぼす形態, 成熟度, ヘモグロビン濃度, 可溶性鉄顆粒数の影響について. *岡山医誌* (1991) **103**, 869—877.
  - 24) 露野理津朗 : 骨髓異形成症候群におけるヒト赤芽球トランスフェリン受容体発現に関する研究. 第二編 骨髓異形成症候群におけるトランスフェリン受容体発現の特徴について. *岡山医誌* (1991) **103**, 879—888.
  - 25) Kühn LC, McClelland A and Ruddle FH : Gene transfer, expression, and molecular cloning of the human transferrin receptor gene. *Cell* (1984) **37**, 95—103.
  - 26) McClelland A, Kühn LC and Ruddle FH : The human transferrin receptor gene : Genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* (1984) **39**, 267—274.
  - 27) Kaplan E, Zuelzer WW and Mouriquand C : Sideroblasts. A study of stainable nonhemoglobin iron in marrow normoblasts. *Blood* (1954) **9**, 203—213.

- 28) Denton MJ and Arnstein HRV : Characterization of developing adult mammalian erythroid cells separated by velocity sedimentation. *Br J Haematol* (1973) **24**, 7—17.
- 29) Harrison FL, Beswick TM and Chesterton CJ : Separation of haemopoietic cells for biochemical investigation. Preparation of erythroid and myeloid cells from human and laboratory-animal bone marrow and the separation of erythroblasts according to their state of maturation. *Biochem J* (1981) **194**, 789—796.
- 30) Ninfali P, Palma F, Baronciani L and Piacentini G : Glucose-6 -phosphate dehydrogenase activity and protein turnover in erythroblasts separated by velocity sedimentation at unit gravity and percoll gradient centrifugation. *Mol Cell Biochem* (1991) **106**, 151—160.
- 31) Ali FMK, May A, Jones BM and Jacobs A : Enrichment of erythroblasts from human bone marrow using complement-mediated lysis : measurement of ferritin. *Br J Haematol* (1983) **53**, 227—235.
- 32) Robinson J, Sieff C, Delia D, Edwards PAW and Greaves M : Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation. *Nature* (1981) **289**, 68—71.
- 33) Hradilek A, Fuchs O and Neuwirt J : Inhibition of heme synthesis decreases transferrin receptor expression in mouse erythroleukemia cells. *J Cell Physiol* (1992) **150**, 327—333.
- 34) 藤井紀彦, 藤井総一郎, 伊丹滋人, 花房純弘, 木村文昭, 宗田 良, 高橋 清, 木村郁郎 : ヒト赤芽球トランスフェリン受容体発現に係わる各種臨床検査成績の検討. *Acta Haematol Jpn* (1992) **55** suppl 1, 234.
- 35) Abe Y, Muta K, Nishimura J and Nawata H : Regulation of transferrin receptors by iron in human erythroblasts. *Am J Hematol* (1992) **40**, 270—275.

**Expression of transferrin receptor mRNA in human erythroblasts :  
A method for separating erythroblasts  
and measuring transferrin receptor mRNA**

**Shigeto ITAMI**

**Second Department of Internal Medicine,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. I. Kimura)**

A method for separating erythroblasts and measuring transferrin receptor (TfR) mRNA was developed to investigate the mechanism of TfR expression. Using this method, the relationship between TfR mRNA and the average number of stainable iron granules was examined. Erythroblasts were separated using immunomagnetic beads and mouse antiglycophorin A monoclonal antibody with a purity of  $89.5 \pm 4.5\%$  and a yield of  $19.9 \pm 6.7\%$ . Northern blot analysis was performed with these separated cells and the following results were obtained. A patient with iron deficiency anemia presented a higher TfR mRNA level and a lower average number of stainable iron granules than healthy volunteers. However, another patient with iron deficiency anemia and two patients with myelodysplastic syndrome demonstrated almost the same TfR mRNA levels as healthy volunteers. TfR mRNA appeared to be regulated by cellular iron, but other factors such as hemoglobin may participate in this regulation. This newly developed method will be helpful in investigating the regulation of TfR mRNA and in clarifying the mechanism of iron metabolism in hematological disorders.