

第2回 賢人会議

哲学が鉄学に、腎臓学が人創学に、あなたが作る「第2回賢人会議」

Proceedings

平成23年6月16日

於KKRポートヒル横浜

<シンポジウム：私の考える鉄学>

司会 公立松任石川中央病院 内科部長 高澤 和也先生

1. 「透析液清浄化と経口鉄剤投与で TSAT、フェリチン改善は速やかで Hb 維持が容易である」

医療法人社団三思会ひかりクリニック院長 土田 晃靖先生

2. 「生体不安定鉄の生成とその除去」

金沢医科大学先端医療研究部門客員教授 西田 雄三先生

3. 「失血相当分だけは鉄を補充しましょう ～日常臨床と耳学問をたよりに～」

ひまわりクリニック院長 小林 弘忠先生

4. 「V型ダイアライザーの週1回使用による7ヶ月後の各種パラメーターの推移」

熊本中央仁クリニック院長 福井 博義先生

5. 貧血、炎症、鉄蓄積とがんー血清 hepcidin-25 値の上昇はがん患者の mortality と関連がある！？ー

がん・感染症センター都立駒込病院内科部長 安藤 稔先生

1. 「透析液清浄化と経口鉄剤投与で TSAT、フェリチン改善は速やかで Hb 維持が容易である」

医療法人社団三思会ひかりクリニック 土田晃靖 阿部由紀子

<はじめに>

透析患者の貧血への鉄剤補充は日本透析医学会にて鉄剤の静脈内投与を推奨（1）している。透析液清浄化が前提であるが、当院では鉄剤経口投与と静脈内投与を比較（2）した上で、2007 年 9 月から 3 年間経口鉄剤のみで治療可能であった。今回は更に 2010 年 9 月から 2011 年 3 月の半年間、Ferritin 濃度 40ng/ml 以下の患者に経口鉄剤投与で Ferritin 及び TSAT 反応の速さを確認し、鉄補充は鉄剤経口のみで Hb の維持が充分か否かを検証した。

<方法>

対象は当院で維持血液透析している患者 108 名。年齢 67 ± 10.6 歳。平均透析暦 8.4 ± 6.3 年。原疾患糖尿病 57、慢性糸球体腎炎 41、のう胞腎 5 及びその他 5 名。内 Ferritin < 40ng/ml が 35 名で Low Ferritin Group として経口鉄剤 Ferrous Fumarate 100mg 1C/日開始。既に投与している場合は 1C/日追加。TSAT、Ferritin、Hb 及び Erythropoietin 投与量を 1 ヶ月毎に 6 ヶ月間経過を追った。Hepcidin-25 及び Indoxile Sulfate は 2010 年 9 月及び 2011 年 5 月に測定。（東北大地震の影響で 2 度目の採血時期がずれる。）Low Ferritin Group での経過の比較及び開始時に Ferritin > 80ng/ml の High Ferritin Group（25 名）との比較をした。

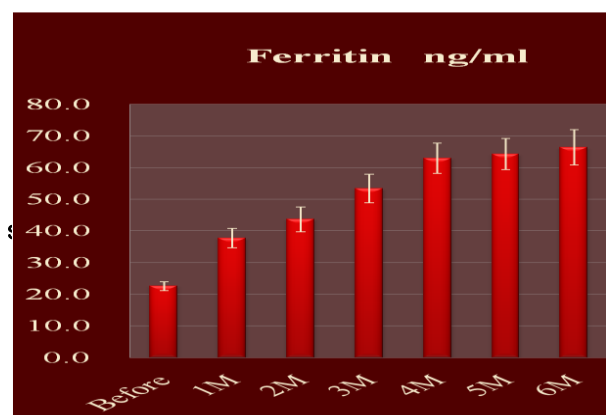


図 1 Ferritin was increased after using iron preparation. The statistical difference was determined by two-sided paired t test. Difference with <0.01 was considered

<結果>

Low Ferritin Group 35 名に鉄剤経口投与開始し、4 週間で TSAT は 21 ± 11 から $27.1 \pm 8.7\%$ に、Ferritin は 20.6 ± 6.8 から 45 ± 21.6 ng/ml へ速やかに増加。更に 6 ヶ月後 TSAT $23.5 \pm 9.3\%$ へ Ferritin 69.7 ± 47.7 ng/ml (図 1) へ増加。8 ヶ月後 Hepcidin-25 は 10.8 ± 14 から 22.6 ± 18.3 ng/ml へ、Indoxile Sulfate は 29933 ± 12811 から 332221 ± 14489 ng/ml へ変化している。Low Ferritin Group と High Ferritin Group の Hepcidin-25 は開始時に 10.8 ± 14 と 49.5 ± 34.1 であった。

<まとめ>

透析液清浄化した際、Low Ferritin (<40ng/ml) Group に経口鉄剤投与で Hb を 10-11g/dl (high activity 患者では 11-12g/dl) に維持可能であり、速やかに Ferritin も増加し、6 か月の間 Epoetin β 及び NESP(3) の必要量も低下を示した (図 3)。Hepcidin-25 は High Ferritin Group で有意差に高値であった。経口鉄剤は安価で、かつ静脈内投与に比べて安全性に優れており、消化器症状が凡そ 5% 出現も管理可能であった。

図 2. Simple comparisons of the means and SD of data were performed using Student's t-test. The

mean HEP25 of High Ferritin (>80ng/ml) Group was 49.5+/-34.1 ng/ml, which was significant higher (P<0.001) than that of Low Ferritin (<40ng/ml) Group (7.3+/-8.9)

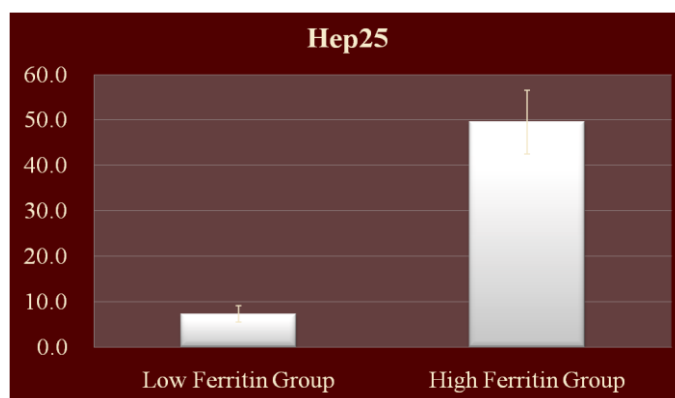
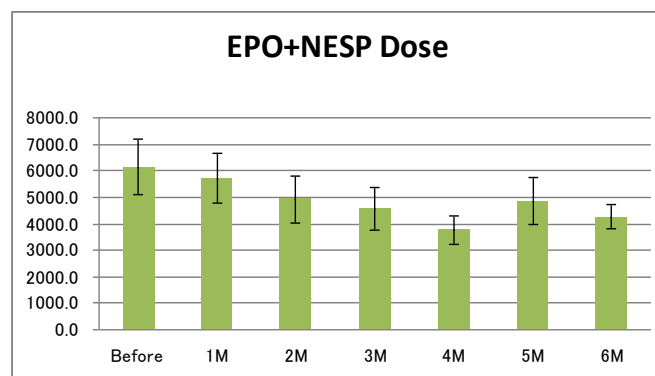
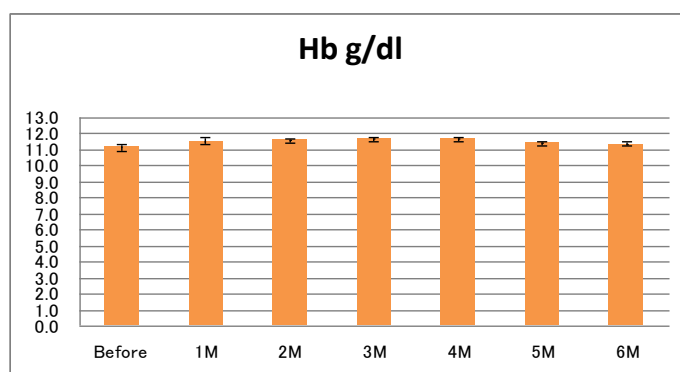


図 3 The dose of epoetin- β & NESP were decreasing for 6 months to keep hemoglobin (Hb) level of 10-11g/dl, except in younger patients who had a high activity, 11-12g/dl (K·DOQI guidelines, 2007).



<文献一覧>

- (1) 2009 JDST Anemia Guidelines 253 Administration of iron therapy. The Proposals of Criteria for administration of iron therapy during ESA therapy.
- (2) EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE 1: 777-781, 2010 Effectiveness of oral iron to manage anemia in long-term hemodialysis patients with the use of ultrapure dialysate
¹AKIYASU TSUCHIDA, ^{1, 2} BISHNUHARI PAUDYAL, ²PRAMILAPAUDYAL, ¹ YOSHITAKA ISHII, ³KEIJYU HIROMURA, ³YOSHIIHISANOJIMA ¹Komai Minoru MD,¹Sanshi Group Hikari Clinic, Internal medicine and kidney dialysis, 1114-Ainoya-machi, Iseaki city, Gunma 379-2201, Japan. Department of ²Diagnostic Radiology and Nuclear Medicine, and ³Medicine and Clinical Science, Gunma University Graduate School of Medicine, Gunma 371-851, Japan.
- (3) Randomized, controlled study of darbepoietin alfa the treatment of anemia in hemodialysis patients. Jin to Toseki 2007; 62: 679-691

2. 「生体不安定鉄の生成とその除去」

金沢医科大学先端医療研究部門客員教授

西田 雄三

<はじめに>

人間は鉄イオンを排泄するための器官を有していないので、自然に排泄されていくもの以外の吸収された鉄イオンのほとんどが体の中に蓄積されることになる。このようにして蓄積された鉄イオンの一部が生体不安定鉄として姿を変えて毒性を示すようになり、多くの生活習慣病・神経疾患の原因となると指摘されているが、[1] 現在でも生体不安定鉄の生成機構をはじめその実態は完全には解っていない。われわれは、人工的に得られる多くの鉄キレート動物投与の実験結果から鉄毒性の発現機構を明らかにしてきたが、[1-3] 生体不安定鉄の除去剤を開発するに当たっては、生体不安定鉄の生成機構・構造を考慮に入れる必要がある。[4]

<方法>

生体不安定鉄の生成機構を理解するには錯体化学の知識が必須である。我々はヘモジリン・水酸化鉄からどのようにして水溶性生体不安定鉄が生成するのかをモデル系を用いて調べ、その構造はたえず変動しているという特徴を明らかにした。[4]

以上の構造的特徴をとらえ、徐鉄剤の開発を行った。徐鉄剤の条件としては、①トランスフェリンの鉄イオンとは相互作用しない ②鉄イオンと特異的に結合し、銅、亜鉛イオンなどの金属イオンとの結合を弱くする、③そこで生成した鉄キレートには毒性が現れないようにする。これらはこれまでの錯体化学の知識をもってすれば合成が可能であるが、更に人体への毒性をゼロにするためにそれらのキレートを高分子に接続して水に溶けない形とし、かつ、水溶性鉄キレートから鉄イオンを捕獲できるようにした（特許）。

<結果>

合成した数種類の化合物は、Fe(III)錯体の溶液から鉄イオンを効率的に取り去ることができることがわかった。Fe(III)錯体の溶液に今回得た徐鉄キレートを加えると、いずれも鉄イオンを取り込んで沈殿し、溶液がほとんど透明になっている（右の写真での右側の2つの瓶、参照）。またこれらの徐鉄キレートは実際の人間の血清中の生体不安定鉄イオンをも効率的に除去できることが明らかになった。



<まとめ>

今回得たいくつかの徐鉄キレートは実際の人間の血清中の生体不安定鉄イオンを効率的に除去できることが明らかになったので、今後は動物実験を繰り返し、ぜひ鉄過剰症患者・生活習慣病・神経性疾患・認知症患者の改善に役立てたいと考えている。

<文献一覧>

[1] 西田雄三「鉄学のすすめ」（青山ライフ出版、2011）

[2] 西田雄三、TCIMail, 2009, No. 141, pp. 2-15.
<http://www.tciamerica.com/tcicemail/backnumber/article/141drE.pdf>.

[3] Y. Nishida, Monatsh. Chem. 142, 375 (2011).

[4] Y. Nishida, The Chemical Times, 2010, No. 218, pp.18-21.

http://www.kanto.co.jp/times/pdf/CT_218_04.pdf.

3. 「失血相当分だけは鉄を補充しましょう ～日常臨床と耳学問をたよりに～」

ひまわりクリニック

小林 弘忠

<はじめに>

ヘプシジン-フェロポルチン系に代表される、精緻な鉄吸収機構を踏えれば、経口鉄剤を含め、少量持続的に鉄補充を行う方法が、安全で合理的です。KDOQI や、JSTD のガイドラインに従う治療は、短期間集中的に、大量の静注鉄が投与され、鉄過剰症を惹起する有害な方法と、考えています。そこで、適正なガイドライン作成を目標とした、Prospective Randomized Controlled Study の素案を、提示します。

<方法>

対象は2010年1月より12月までの、3ヶ月以上透析施行の35症例（男27例、女8例）です。鉄補充は、失血相当分を少量持続的にを行い、なし群 17 例、経口鉄剤（クエン酸第一鉄ナトリウム 50mg-100mg/日）13 例、静注鉄剤（シデフェロン 12.5mg-25mg/週）6 例、経口・静注併用群 2 例 で、重複例もあります。ESA は、Hb 10g/dl の維持を目標に、rHuEPO 週 9000 単位、Darbepoetin は週 60 μ g/週を、上限として投与しました。検査項目は、Hb 値、血清フェリチン値（sFtn）、トランスフェリン鉄飽和率（TSAT）、ESA 投与量とし、ESA 低反応例や ESA 不要例には、ヘプシジン-25、IL -6、EPO 濃度を、測定しています。

<結果>

表 1.は、sFtn 値から検討した結果です。100 以下の群と、101 以上の群を比較すると、100 以下で Hb 10.2, 101 以上では 9.5 でした。sFtn は 101 以上が必要とは、理解しえません。投与方法からの検討を、表 2.に示します。全症例に最良と期待される方法を、施行していますので、どの群も、差異の少ない、良好な成績でした。少量持続鉄補充法の、有用性が示唆されます。表 3.は、ヘプシジンよりの検討です。低値群では、低 sFtn、高 Hb を実現しています。また、ヘプシジンの正常域とされる 22 ± 12 の群での、sFtn 値は 51ng/ml でした。この近位が、望ましい sFtn 値かも知れません。

表1. sFtn値から検討した鉄代謝指標

ひまわりクリニック
(2010. 1. ～2010. 12.)

	Hb (g/dl)	sFtn (ng/ml)	TSAT (%)	EPO投与量 (IU/week)	DA (μ g/week)
Under 12 (n=7)	9. 3	9. 2	11. 4	4500	60
12～100 (n=73)	10. 2	43. 5	23. 1	3000	40
101～200 (n=13)	9. 5	150. 6	27. 9	3750	
Over 200 (n=8)	10. 3	230. 4	29. 4	2250	

(median)

<まとめ>

Hb 値 を ESA, sFtn 値は鉄剤で、調整しえます。さらに sFtn 値は、50 近辺が望ましい事が、理解されました。近年、高 Hb の危険性が強調され、¹⁾ 鉄過剰症による、心血管病変、感染症増悪、発癌なども、注目されています。²⁾ 以上より、表 4.のごとき、Hb を 3 群別、sFtn も 3 群別、合計 9 群構成での、Prospective Randomized Controlled Study の実施を、期待しています。鉄を踏まえた、国際比較も可能な、腎性貧血

のガイドラインが、作成される事になるでしょう。

表2. 投与方法から検討した鉄代謝

ひまわりクリニック
(2010. 1. ~2010. 12.)

投与方法	症例数	Hb (g/dl)	sFtn (ng/ml)	TSAT (%)	EPO投与量 (IU/week)	DA (μ g/week)
経口 (n=203)	13	10.1	44.2	28.2	3000	40
静注 (n=101)	6	10.7	99.9	22.8	3000	
経口静注併用 (n=38)	2	10.9	34.1	19.0	0(1925)	20
なし (n=275)	17	9.7	57.4	20.1	3750	60

(median)

表3. ヘプジジン値から検討した貧血・ESA低反応

ひまわりクリニック
(2007. 10. ~2010. 12.)

	症例数	検査 回数	ヘプジジン (ng/ml)	sFtn (ng/ml)	Hb (g/dl)	ERI (IU/week /Hb/Kg)	Epo 濃度 (mU/ml)	IL-6 (pg/ml)
低値群	6	11	3.4	18.4	11.7	0	7.4	1.3
22 $\pm$ 12群	4	11	24.4	51.0	9.8	9.9	14.1	2.2
高値群	5	18	94.1	442.8	9.1	11.9	3.3	1.0

(median)

表4. 試みたいPRCS:ひまわりクリニック素案
(2011.5.16)

	低フェリチン群	中フェリチン群	高フェリチン群
Hb 値(g/dl) /フェリチン値(ng/ml)	12-60	60-200	200以上
高Hb群 11以上	D	E	F
中Hb群 10-11	A	B	C
低Hb群 9-10	G	H	I

<文献一覧>

- 1) Singh AK, Szczech L, Tang KL, et al : CHOIR Investigators. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. N Engl J Med 335 : 2085-2098, 2006
- 2) 高後 裕 : 特集巻頭言 鉄過剰への対応, 日医雑誌 139:265, 2010

4. 「V型ダイアライザーの週1回使用による6ヶ月後の各種パラメータの推移」

熊本中央クリニック

福井 博義

<はじめに>

ベータ2ミクログロブリンの除去率が1回の透析で80%以上と規定されるV型ダイアライザーはより大きい分子量のUremic Toxinの除去が期待できるが、血清アルブミンの漏出が問題となる。そこで、V型ダイアライザーを週1回だけ使用し、6ヶ月後の血清アルブミンと腎性貧血に関する各種パラメータを測定してその変化を観察し、V型ダイアライザー使用の腎性貧血に対する有用性につき検討した。

<方法>

対象は透析患者28名で、透析方法はHD,18名、On-line HDF,10名である。この患者に対して、それまでの週3回のIV型ダイアライザー使用から、週1回だけ、週初めに同一膜、同一面積のV型ダイアライザーに変更して透析をおこなった。原則的には血流量、透析液流量、透析方法（HDかon-line HDFか）は変えないがV型ダイアライザー使用時はon-line HDFをHDに変更した。月に1回、Hepcidin25,インドキシル硫酸、IL-6, albumin, Fe, フェリチン、CRP, Albumin, β 2MG, Hbを測定し6ヶ月後の値を開始時の値と比較検討した。なお血流量は平均229.5ml/m,透析液流量はHD時は500ml/m、On-line HDF時は600ml/m,使用した。また透析液はultra pure 透析液を使用した。

<結果>

結果は表1に示す。Hepcidin25は16.5ng/mLから11.5ng/mLに低下、インドキシル硫酸は34,343ng/mLから30,509 /mLに低下、IL-6は4.75ng/mLから3.94ng/mLに低下、albuminは3.75g/dLから3.82g/dLに上昇、フェリチンは46.2ng/mLから38.7ng/mLに低下、Hbは10.69 g/dLから11.08 g/dLに上昇、 β 2MGは26.9mg/Lから28.0/mg/Lに上昇した。しかし、全てのパラメータの変化は有意ではなかった。しかしこの結果からalbuminを低下させることなくHbを上昇させることが可能であると推測出来る。なお、Hbの変化に関して、ESAの使用量はエポシン使用量が4083 IU/Wから3750 IU/Wに減量出来た。、ネスプ使用量は変わらず、ESAの非使用患者が3名から4名になった。albuminとHbの推移をそれぞれ図1と図2に示す。

各パラメーターの推移				
平均値の差	2010年4月27日	2010年11月12日	Wilcoxon 順位和検定	t検定
Hep25(ng/mL)	16.5 (±19.9)	11.5 (±14.2)	P=0.4924	P=0.3017
IS(ng/mL)	34,343 (±11809)	30,509 (±10554)	P=0.3032	P=0.2022
IL-6(pg/mL)	4.75 (±7.8)	3.94(±4.6)	P=0.1398	P=0.5002
Alb(g/dL)	3.75 (±0.29)	3.82 (±0.31)	P=0.5533	P=0.5186
Ferritin(ng/mL)	46.2 (±54.2)	38.7 (±26.2)	P=0.9151	P=0.5184
CRP(mg/dL)	0.20 (±0.37)	0.19 (±0.21)	P=0.1701	P=0.8727
Hb(g/dL)	10.69 (±0.89)	11.08 (±0.84)	P=0.0633	P=0.1690
β 2MG(mg/L)	26.9 (±5.51)	28.0 (±6.25)	P=0.6098	P=0.5134

表 1

<まとめ>

V型ダイアライザーの週1回の使用は、次のような結果を示した。

- 1) インドキシル硫酸の値は低下傾向を示した。

- 2) Hepcidin25 とフェリチンは低下傾向を示した。
- 3) Albumin は上昇傾向を示した。
- 4) Hb は上昇傾向であった。
- 5) ESA 製剤は減量出来た。
- 6) β 2MG は低下しなかった。

以上の結果から、V型ダイアライザーの週1回の使用はインドキシル硫酸などの造血抑制作用を持つ尿毒症毒素を除去することにより造血が促され、結果としHepcidin25 とフェリチンの低下傾向が示すように鉄の利用が促進されたことが推察される。しかし危惧された Albumin の低下は見られず、有意差はなかったものの、むしろ増加傾向であったことは特筆されてよい。

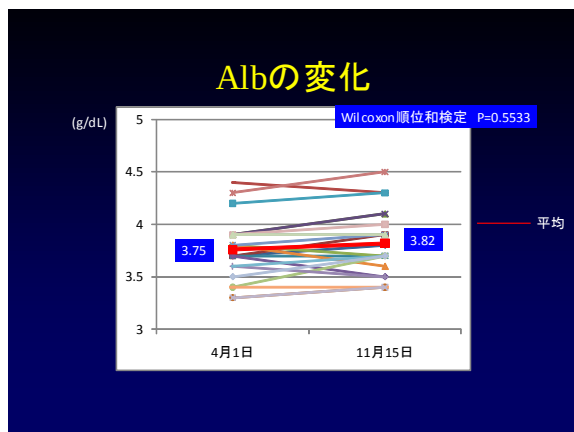


図 1

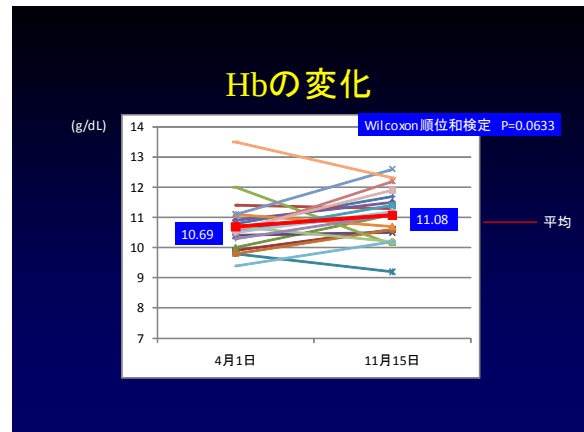


図 2

<文献一覧>

- 1) 小川 昌史、他：セルローストリアセート（CTA）膜ダイアライザー（FB-150UH β ・V型）の性能評価。腎と透析 別冊ハイパフォーマンスマンブレン 2009:51-53,2009
- 2) 高沢 和也、横山 仁、他：APS-E 膜使用による貧血改善効果について。腎と透析 30 別冊ハイパフォーマンスマンブレン '91:32-35,1991
- 3) 五十嵐 茂幸、他：V型ダイアライザーTS-PX/PLX の有用性について—IV型からV型への変更に伴う臨床効果。腎と透析 別冊ハイパフォーマンスマンブレン 2010:41-44,2010
- 4) 野崎 宏、竹村 英生、他：フレゼニウス社製ダイアライザーFX-S140 の短期臨床評価。腎と透析 別冊ハイパフォーマンスマンブレン 2010:62-65,2010
- 5) 高橋 克幸、飯田 真也、他：疼痛と痺れを伴う高齢透析患者へのV型透析器使用例。腎と透析 別冊ハイパフォーマンスマンブレン 2010:95-97,2010
- 6) 斎藤 明：Uremic toxins と透析療法—第 53 回日本透析医学会特別講演より一。透析会誌 42(2) :127-135,2009
- 7) Iain C, Macdougall : Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure Kidney International, Vol, 59, Suppl. 78 (2001), pp. s-67-s-72
- 8) Toshimitsu Niwa: Role of Indoxyl Sulfate in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Experimental and Clinical Effects of Oral Sorbent AST-120. Therapeutic Apheresis and Dialysis 15(2):120-124 .2011

5. 貧血、炎症、鉄蓄積とがん ―血清 hepcidin-25 値の上昇はがん患者の mortality と関連がある！？― がん・感染症センター都立駒込病院内科 安藤 稔

<はじめに>

がん性貧血の本態は炎症性貧血（anemia of inflammation）である。これに低栄養、出血、感染症などが2次的に加わる。がん性貧血の程度は患者の炎症状態の指標と捉えることができ、生命予後に関わることも知られる¹⁻⁴⁾。本研究では、炎症性貧血の中心病態と考えられる鉄代謝異常で鍵を握る hepcidin-25⁵⁾の血中濃度をがん患者で測定し、生命予後との関連を調べた。また、がん患者の蛋白尿の臨床的意義についても検討した。

<方法>

担がん患者を対象とした2年間の前向きコホート研究：血清 hepcidin-25 濃度、蛋白尿と生命予後の関連を調べる。

がん性貧血患者のプロフィール	
No. of cancer patients	N=55
悪性リンパ腫	N=26 (47%)
胃がん	N=14 (25%)
その他のがん	N=15 (28%)
Age (y)	64.0 ± 11.6
Male (%)	65.5
Performance status	2 (0-4)
CKD + (%)	32.7
UN (mg/dL)	16.5 ± 5.6
Cr (mg/dL)	0.85 ± 0.37
eGFR	71.5 ± 30.1
Hb (mg/dL)	8.9 ± 1.2
Fe (μg/dL)	102.8 ± 75.6
TSAT (%)	40.1 ± 28.9
Ferritin (ng/mL)	387.2 ± 477.7
Hepcidin-25 (ng/mL)	46.7 ± 48.8
Hepcidin-25 の参考基準値: 22.2 ± 12.3 ng/mL	

1. 対象は駒込病院化学療法科に入院中の担がん患者のうち、貧血（Hb <12 g/dL と定義）を合併する55例。表にそのプロフィールをまとめた。

血清 hepcidin-25 濃度は 46.7 ± 48.8 ng/mL と健常者参考値 22.2 ± 12.3 ng/mL に比べ約2倍高値であった。

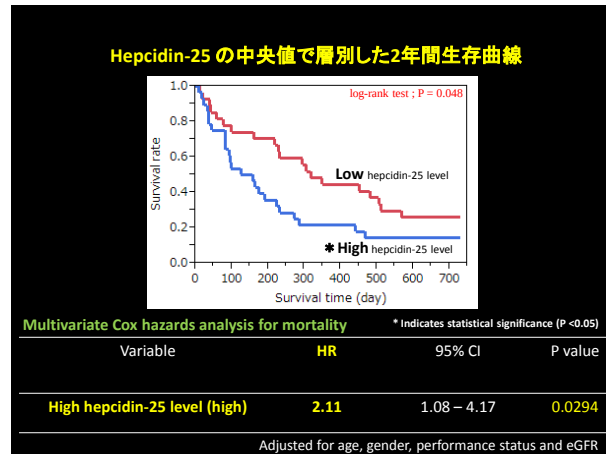
2. Hepcidin-25 は liquid chromatography-mass spectrometry（バイオマーカー研究会に依頼）で測定した。

3. 統計解析は Kaplan-Meier 法、多変量 Cox 比例解析法（年齢、性別、Performance status、eGFR で調整）を用いた。

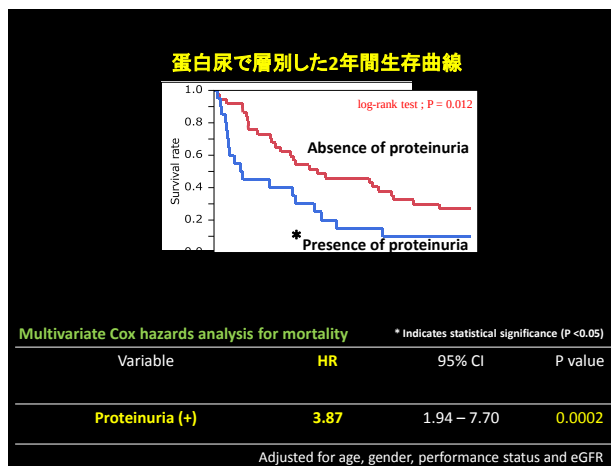
<結果>

1. 患者を血清 hepcidin-25 濃度の中央値（25.1 ng/mL）で層別すると、2年間累積生存率は高 hepcidin 群で有意に低かった（ $P=0.048$ ）。hepcidin 高値が死亡に関連する HR (95% CI) は 2.11

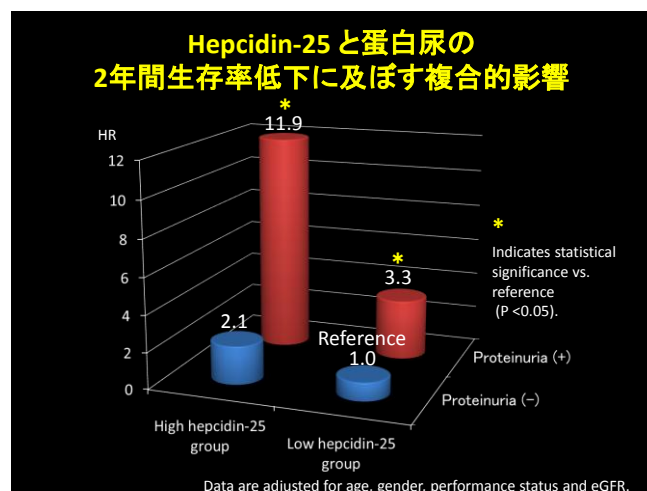
(1.08–4.17) であった (図 1)。



2. 患者を蛋白尿の有無で層別すると、2 年間累積生存率は蛋白尿陽性群で有意に低かった(P=0.012)。蛋白尿陽性が死亡に関連する HR (95% CI) は 3.87 (1.94–7.70) であった (図 2)。



3. Hepcidin-25 高値と蛋白尿陽性の死亡にかかわる複合効果を図 3 に示す。両因子を合併すると HR は約 10 倍上昇することが示唆された。



<まとめ>

1. 化学療法中のがん性貧血患者の平均血清 hepcidin-25 濃度は健常者に比べて上昇していた。

2. Hepcidin-25 が高いがん患者の生命予後は不良である可能性が示唆された。
3. 蛋白尿の有無とがん患者の生命予後に関連がみられた。
4. 高 Hepcidin-25 値と蛋白尿陽性の合併したがん患者の死亡リスクはかなり高かった。

<文献一覧>

1. 中村裕也、土谷健、新田孝作、安藤稔：癌患者における貧血と慢性腎臓病の研究 日腎誌 2011;53:38-45
2. Toyokuni S: Role of iron in carcinogenesis: Cancer as a ferrotoxic disease. Cancer Sci 2009; 100: 9-16
3. Pinnix ZK, Miller LD, Wang W, D' Agostino R Jr, Kute T, Willingham MC, Hatcher H, Tesfay L, Sui G, Di X, Torti FM: Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. Sci Transl Med 2010; 43: 43ra56
4. Kamai T, Tomosugi N, Abe H, Arai K, Yoshida K: Increased serum hepcidin-25 level and increased tumor expression of hepcidin mRNA are associated with metastasis of renal cell carcinoma. BMC Cancer 2009; 9:270-278
5. 友杉直久：ヘプシジンの発見とその後の発展 日内会誌 2010;99:1180-1187

<研究会からの話題>

司会 前田記念腎研究所理事長

前田 貞亮先生

1. 「RNA 結合因子を標的とした抗がん剤開発」

金沢医科大学総合医学研究所先端医学研究領域加齢制御研究分野教授 友杉 直久先生

2. 「MCPH101（純炭サプリメント）を用いた新しい治療法」

金沢医科大学先端医学研究部門非常勤講師

樋口 正人先生

「RNA 結合因子を標的とした抗がん剤開発」

金沢医科大学総合医学研究所先端医学研究領域加齢制御研究分野 友杉 直久

<はじめに>

RBM8A (Y14)は RNA binding motif を持ち、Magoh と heterodimer を形成している。これは、mRNA を核内から細胞質に移動させる exon junction complex (EJC) の一員であり、splicing, mRNA export や nonsense-mediated mRNA decay (NMD)などの mRNA 代謝に必要である。近年 RBM8A や Magoh を knockdown すると、細胞の増殖能が消失することが報告されている。A549 cells の RBM8A を knockdown すると、細胞は M 期に集積し apoptosis に陥った。G1/S arrest からの release ののち、knockdown 細胞は G2/M 期から G1 期に入ることができなかった。さらに、sub-G1 cells の増加とともに、apoptosis marker, caspase 3/7 が活性化されていた。

<方法>

Cell culture: A549 cells were maintained in Dulbecco' s modified Eagle' s medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Transient expression: eYFP-tagged RBM8A expression sequences were inserted in pReceiver-M11 plasmid. The plasmids were transiently transfected into cells using Effectene Transfection Reagent (QIAGEN) and proceeded to immune-staining described below. Knockdown of gene expression with siRNA: Knockdown against RBM8A gene was achieved by Stealth Select RNAi™ siRNAs (HSS115052: shown in “#1” and HSS115053 : shown in “#2”) from Invitrogen with Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). To confirm the knockdown efficiency, western blot was carried out. Mitotic index: Cells were collected by trypsinization and fixed with Carnoy solution. Specimen was stained with Giemsa solution (Sigma). FACS analysis: Cells were collected by trypsinization and fixed with 30% ethanol in PBS. After fixation, cells were treated with 1 mg/ml RNase (Sigma) and stained with 1 mg/ml propidium iodide (Sigma). FITC mouse anti-BrdU set (Becton Dickinson) was used for cell cycle analysis. Detection of Caspase activation: Caspase-Glo 3/7 assay (Promega) was used for detection of apoptotic response of knockdown cells following manufacture' s manual.

<結果>

図1. RBM8A のノックダウンは肺がん由来細胞の M 期集積を引き起こす。

コントロール（左）に比べてノックダウン細胞（右）では染色体を持つ細胞（矢印）の割合が増えている。

RBM8A knock down caused the accumulation of mitotic cells

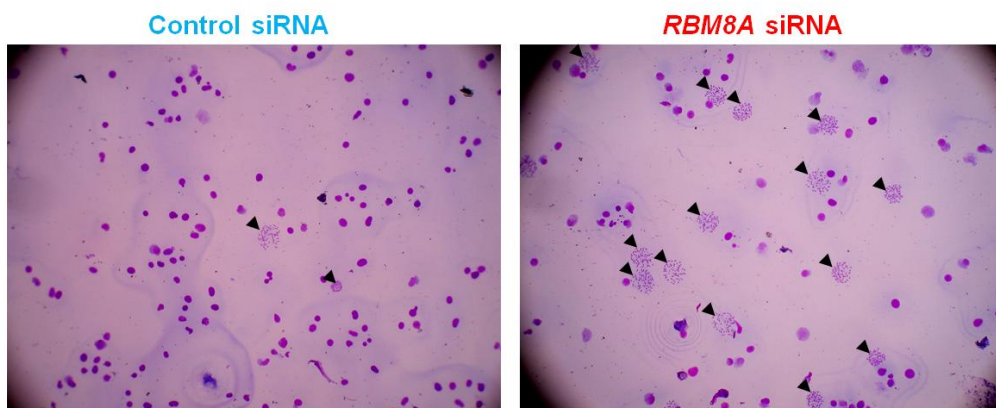


図2. RBM8A のノックダウンは肺がん由来細胞の細胞死を誘導する。

A:コロニー形成法による細胞致死効果の測定結果。ノックダウン細胞ではコロニーの形成が低下していた。
 B:このときのノックダウン効率をウエスタンブロットで解析した結果。C:独立した実験でコロニー形成の定量結果をまとめてグラフにした結果

RBM8A Knock down caused cell death of A549 lung tumor cells

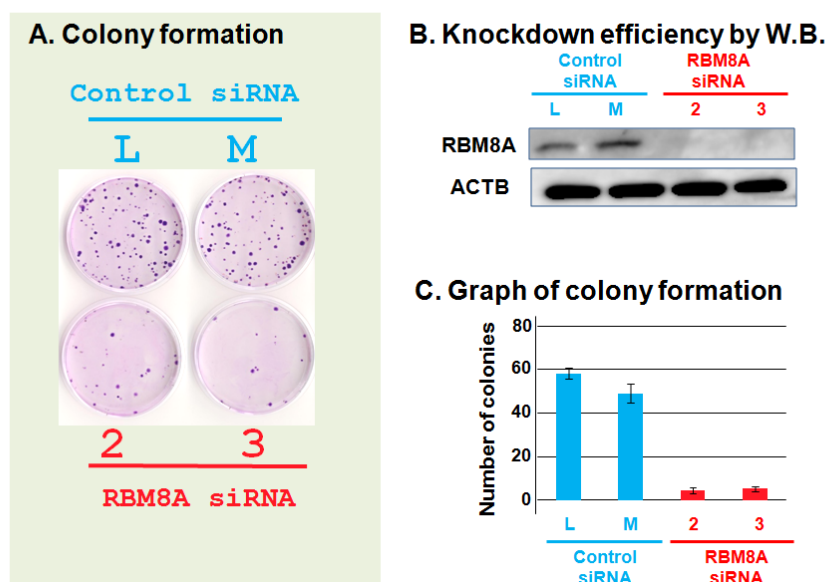
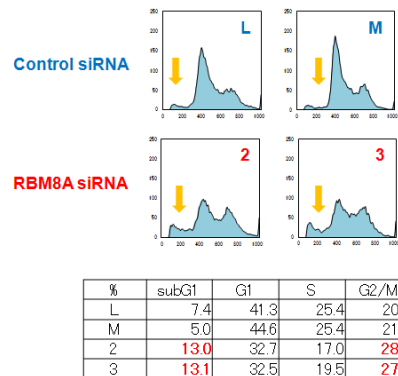


図3. RBM8A のノックダウンはアポトーシスと Caspase の活性化を引き起こす。

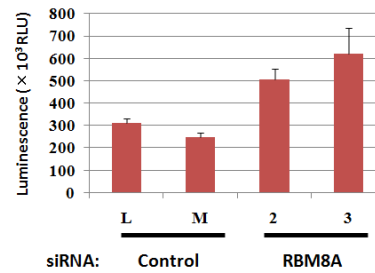
A:FACSによる細胞周期解析結果。ノックダウン細胞ではG2/M期とsubG1期が上昇した。B:Caspase3/7活性化がノックダウンにより観察された。

RBM8A knock down caused Caspase activation and apoptosis

A. FACS analysis



B. Activation of Caspase3/7



<結論>

RBM8A 分子は通常 mRNA の代謝に関与しているが、M 期全般の細胞周期の進行に関わっている。その機能阻害はがん細胞にアポトーシスを誘導できることから、有望な抗癌剤標的になるものと期待される。

「MCPH101（純炭サプリメント）を用いた新しい治療法」

金沢医科大学先端医学研究部門

樋口 正人

<はじめに>

“腸内環境の乱れが種々の疾病の原因と成る”との考え方は、“食欲の増大とインスリン抵抗性が腸内細菌を通じてマウスからマウスに伝播する（Science 328,2010: 228-231）”との報告によって確実性を増すことになった。食の欧米化によって日本人の大腸がんが急増しているように、食生活と疾病は密接に関連しており、腸内環境の正常化および食物中の病因物質除去は現代人の疾病予防に重要である。我々は本コンセプトに基づいて、従来の栄養補助療法とは異なる DAS（Disease Adsorption System）療法を考案した。

<方法>

動脈硬化や腎機能低下を引き起こすインドール化合物並びに大腸がんの原因となる二次胆汁酸などは腸内悪玉菌によって産生される。我々は悪玉菌が作る塩基性物質を吸着除去し、善玉菌有意な腸内環境を作るとともに、近年注目されている生活習慣病惹起物質 AGEs（Advanced Glycation End-products）を強力に吸着除去する新素材（ダイエタリーカーボン）を創製した。

本物質を健常人に約 600 mg/day で 1~2 カ月間投与し、腸内環境の変化および体内 AGEs 蓄積量を検討した。

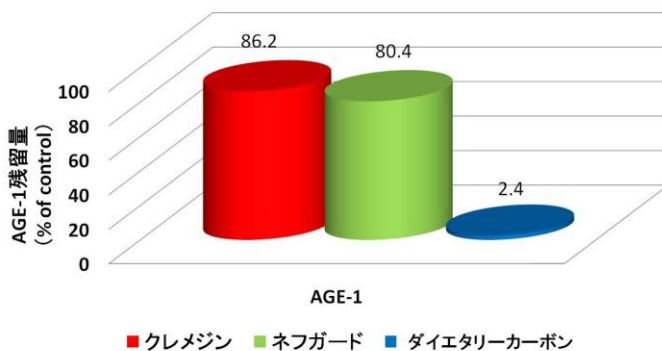


図1 食事に含まれるAGEs(AGE-1)の吸着能比較

食事のAGEsは腸管から吸収され、AGEs受容体の発現増強やTAGE産生亢進を引き起こす。各種カーボンのAGE-1吸着能を比較した結果、クレメジン:13.8%吸着、ネフガード:19.6%吸着に対してダイエタリーカーボン:97.4%吸着であり、非常に高いAGEs吸着能を示した。

<結果>

ダイエタリーカーボンは in vitro においてアンモニアを強力に吸着した（data not shown）。また、食事に含まれる AGE-1 もクレメジン等と比較して非常に高い吸着能を有することを確認した（図1）。本素材を健常人男性 2 名に 2 カ月間投与し、便の pH および乳酸菌、ビフィズス菌量を測定した結果、便の酸性度が高まり（data not shown）、善玉菌の増加が認められた（図2）。

また、健常人女性 67 名に 1 カ月間投与し、AGE リーダーにて体内の AGEs 蓄積量を測定した結果、約 70%に AGEs 蓄積量の低下を認めた（図3）。

<まとめ>

本結果から、ダイエタリーカーボンは腸内で産生されるアンモニア、インドール化合物、二次胆汁酸などの病因物質を除去し、且つ、善玉菌有意な腸内環境を作

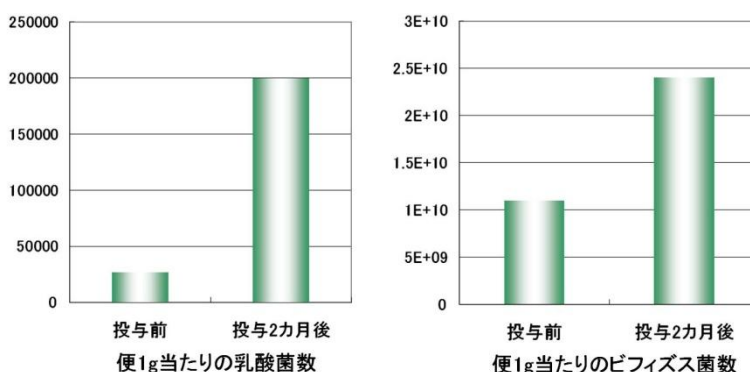


図2 ダイエタリーカーボンによる腸内環境の改善

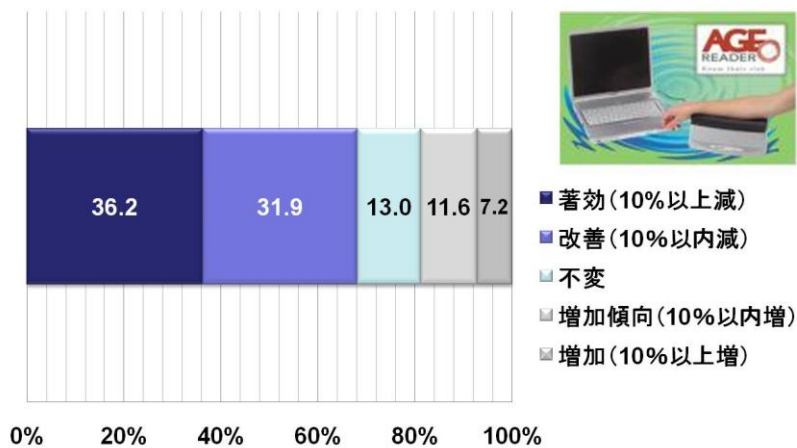


図3 ダイエタリーカーボン投与によるAGEs蓄積量の減少

健常女性にダイエタリーカーボン600 mg/dayを1カ月間投与し、投与前後のAGEs量をAGEリーダー測定した。その結果、約70%に体内AGEsの減少が認められた(n=67)。

り出すことによって健康維持に効果を発揮すると期待される。また、体内の糖化を防ぎ Toxic AGEs(TAGE)の影響を受けないようにするためには①食後高血糖を抑制する、②果糖の摂取を控える、③食事のAGEsを取りすぎない、の三点に注意する必要があるが(図4)、ダイエタリーカーボンは食事中AGEsの体内吸収を抑え、TAGEによる生活習慣病発症を抑制すると考えられる。

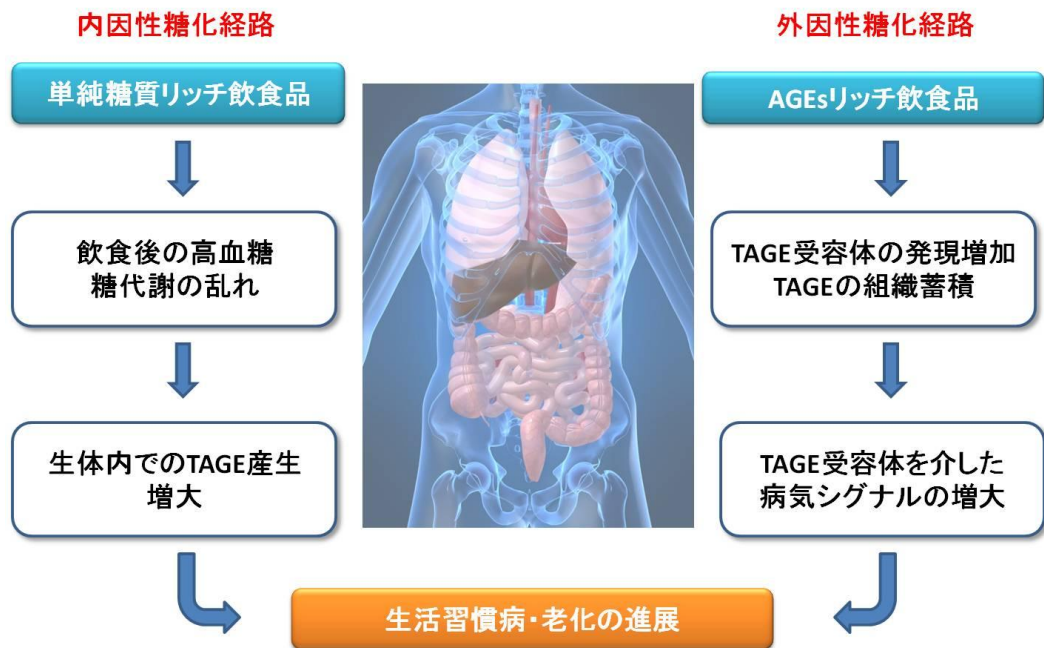


図4 体内の糖化を引き起こす二つの経路

<特別講演>

司会 熊本中央仁クリニック

福井 博義先生

1. 「赤血球変形能はバイオマーカーになり得るか？」

大阪大学大学院工学研究科 機械工学専攻教授

金子 真先生

2. 「慢性的な炎症病態をコントロールできる新たな手段の提案」

熊本大学大学院生命科学研究部遺伝子機能応用学分野教授 甲斐 広文先生

1. 「赤血球変形能はバイオマーカーになり得るか？」

大阪大学大学院工学研究科 機械工学専攻

金子 真

<はじめに>

赤血球はわずか 1 秒間に 10 万個以上も体内で作り出され、そして同数の赤血球が淘汰されている。赤血球は肺で酸素と二酸化炭素を交換し、体中の細胞に酸素を運ぶ重要な役割を担っている。赤血球は硬くなってしまうと、末梢血管を通過しにくくなり、結果的に血圧があがり心臓に負担がかかる。ひいては循環器系障害を引き起こす可能性がある。本講演ではマイクロ流路と高速カメラを用いて赤血球の変形能を計測し、バイオマーカーに成り得るかどうかについて考察した。

<方法>

赤血球の大きさは $6\mu\text{m}\sim 8\mu\text{m}$ である。一方、末梢血管の太さは $4\mu\text{m}$ 程度と赤血球より小さく、赤血球は自分自身を変形させないと末梢血管を通過することはできない。つまり心臓への負担は、赤血球が末梢血管を通過する際に最大になる。そこでこの状態を模擬するため、直径 $4\mu\text{m}$ のマイクロ流路通過中の赤血球の動きを透過型顕微鏡を介して高速カメラで観察し、変形能から硬さ評価指標を導出し、肺高血圧症の患者と正常者に対して臨床試験を行った。

<結果>

以下のように 2 種類の異常赤血球が混ざっている肺高血圧症（図 1）の患者に対して臨床試験を行った。

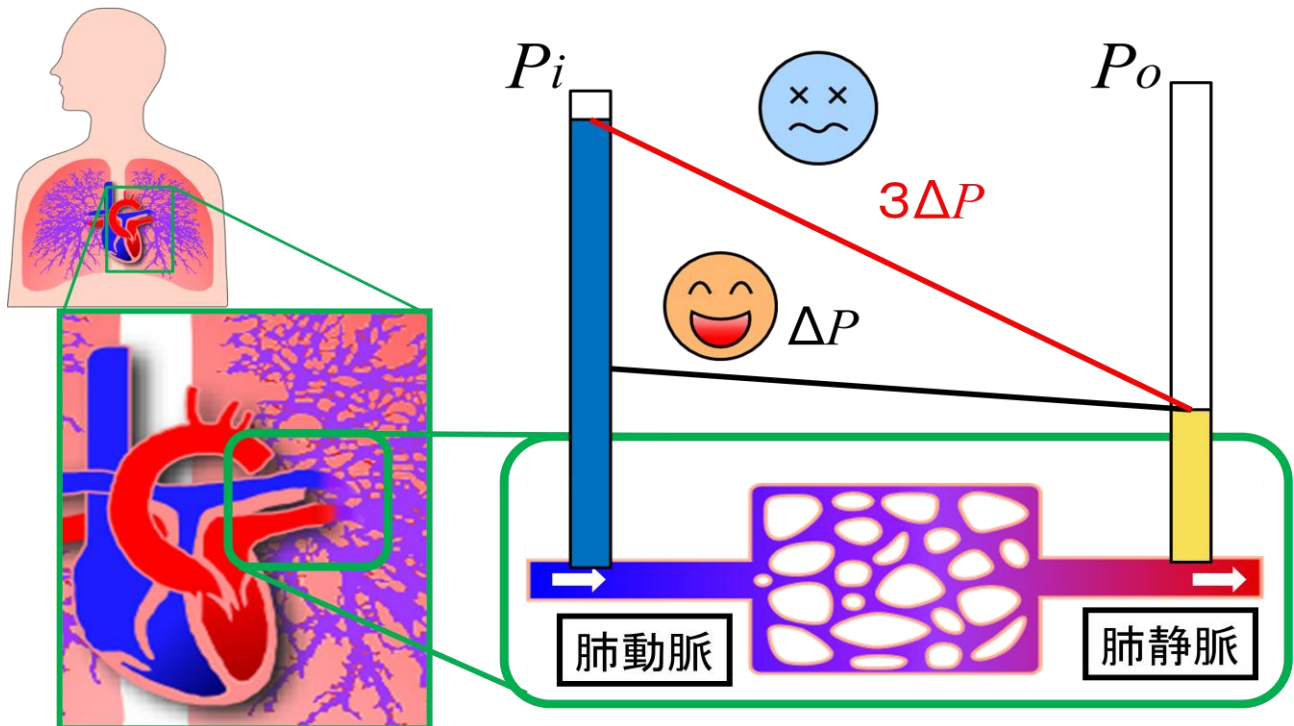


図1 肺高血圧のモデル

(1) 直径 $12\mu\text{m}$ 程度の網状赤血球が 1% の割合で存在していて、この赤血球がマイクロ流路を通過する際に

は、流路がブロックされた形になって通過時間が著しく低下する。(図 2)

(2) 直径 $6\mu\text{m}$ ~ $8\mu\text{m}$ の大きさの赤血球の中にも 10% の割合で平均的な赤血球に比べて通過時間が 3 倍程度かかるものがある。

この患者に対して血管拡張剤と免疫抑制剤を投与することによって 2 ヶ月後には上記二種類の赤血球はほぼ完全に消滅することを確認した。

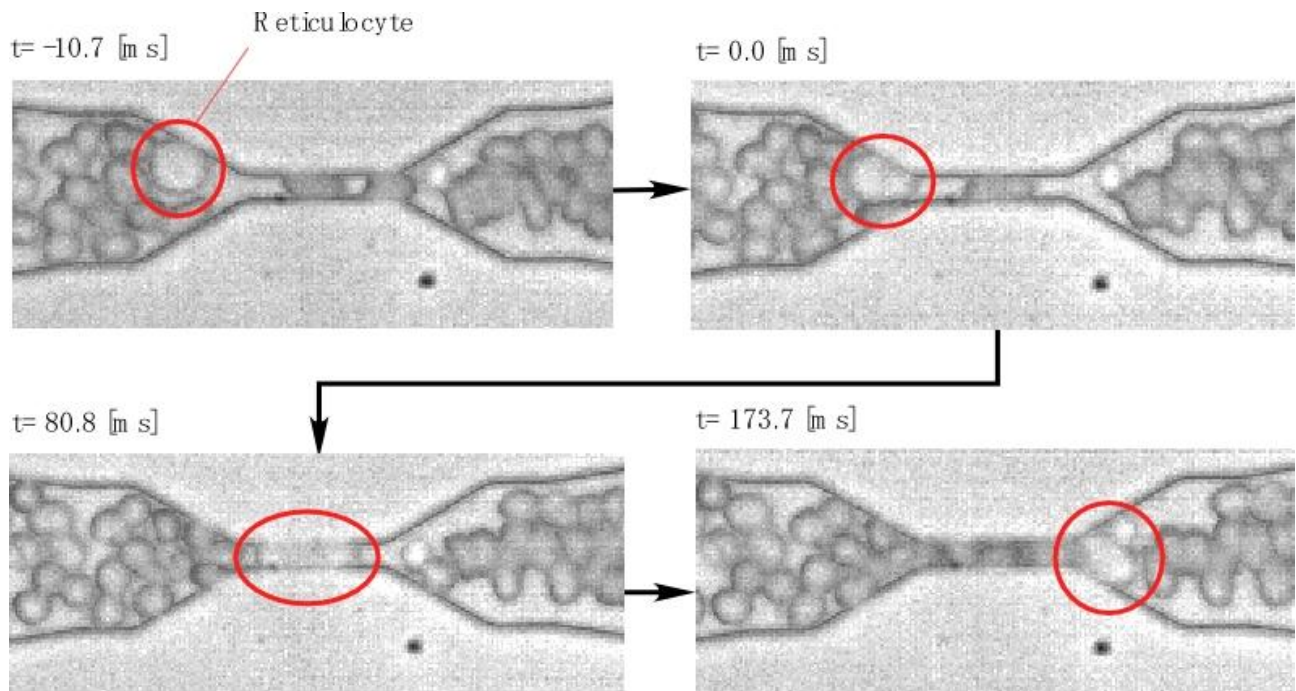


図1 マイクロ流路内での網状赤血球の振る舞い

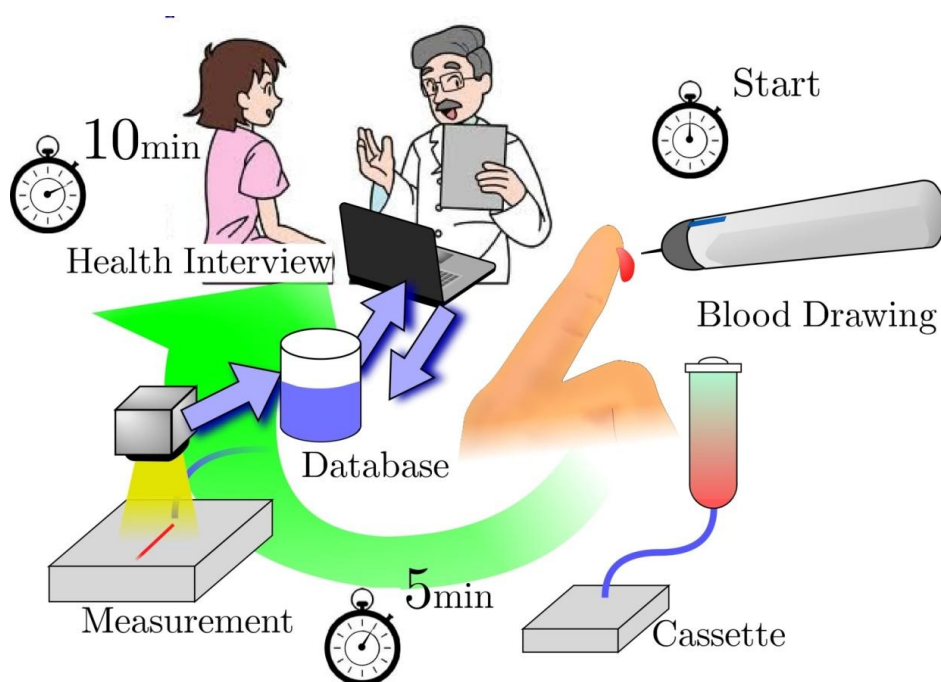


図3 将来の検査イメージ

<まとめ>

血圧上昇には二つの要因が考えられる。一つは血管の収縮でもう一つは赤血球の硬化である。前者についてはこれまで多くの研究者が研究を進めてきたが、後者に関しては臨床研究を含め、ほとんど行われてこなかった。本講演では、赤血球の変形能がバイオマーカーとしての利用可能性を示唆するとともに将来展望についても述べた。(図3)

<文献一覧>

[1]廣瀬優紀, 福井航, 東森充, 多田隈建二郎, 金子真, 新井健生, 坂田泰史, 山本一博, 川原知洋, 山西陽子, 新井史人: 高速ビジョンとマイクロ流路を用いた実時間赤血球硬さ評価, 計測自動制御学会論文集, Vol. 47, No. 5, pp.221-229, 2011.

2. 「慢性的な炎症病態をコントロールできる新たな手段の提案」

熊本大学大学院生命科学研究部遺伝子機能応用学分野 甲斐 広文

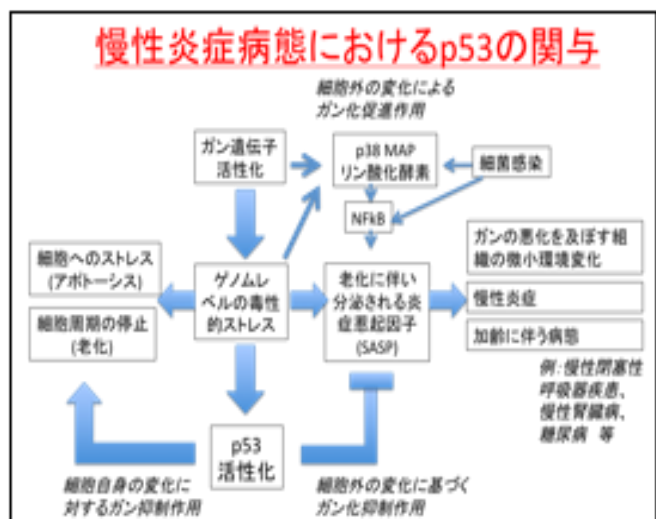
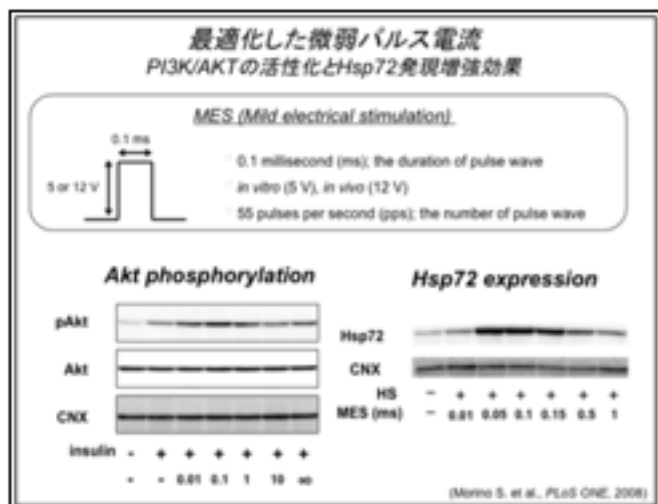
熊本大学生命科学研究部において、生体への悪影響がないレベルの物理的ストレスを、医薬品の開発と同様な基礎研究、臨床研究（代謝内科学分野：荒木栄一教授ら）を実施しつつ、刺激条件を最適化した医療（予防）機器の開発に着手してきていた。この物理的な刺激は、42℃の温熱（HS）と最適化された微弱パルス直流電流（MES）である。本研究における大きな発見のひとつは、左図に示すように、insulin



刺激下の AKT 活性化の増強反応において、および、熱ショック時の Hsp72 の誘導の増強反応において、さらには、p53 の活性化作用（慢性炎症病態との関連から注目）において、刺激電流に最適かつ共通のパルス幅が存在することを見いだしたことである。

もうひとつの大きな発見は、Jurkat 細胞を用いて、電流刺激（2 volt/cm）は PMA/Ionomycin により誘導された IL-2 の産生を劇的に抑制することが明らかになったことである。電流刺激は CD3/CD28 抗体により誘導された IL-2 の産生も顕著に抑制した。さらに、*in vivo* においても電流刺激は ConA 誘導性の IL-2、IFN- γ 、TNF- α の産生を抑制し、炎症症状が軽減することを明らかにした。電流刺激は、一部、プロテアソーム阻害を介して PKC/NF- κ B 経路を抑制することが明らかになった。T 細胞に対する MES の作用を網羅的に解析するために Microarray を行った。その結果、電流刺激は複数の細胞内シグナル経路に対して作用し、様々な炎症性サイトカイン等の産生を抑制して、過剰免疫応答を包括的に抑制していると考えられた。

この最適化された物理的療法は、正常動物には、筋収縮を始め、全く作用を示さないが、糖尿



病モデルマウス (*PLoS ONE* 2008 など)、虚血性再還流障害モデル (*J Surg Res* 2010)、胃潰瘍モデル、慢性腎臓病モデル (投稿中) において有効性を示すことを明らかにしてきた。具体的には、2型糖尿病モデルマウス (高脂肪食負荷マウス、*db/db* マウス) を用いた検討の結果、①全身的に炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ と CRP 産生抑制し、②局所的な炎症である *insulin* 抵抗性を改善し、③膵 β 細胞数が増加し、④筋細胞への糖取り込み能上昇、④脂肪を大量に蓄積した内臓脂肪細胞にアポトーシスを誘導し内臓脂肪を減少させ、2型糖尿病に対する治療効果を見出した (*PLoS ONE* 2008)。

これらの知見を基に、共同研究者である熊本大学医学部附属病院代謝内科学分野の荒木教授および近藤特任助教らがパイロット臨床試験を

実施した。まずは、健常人での安全試験を実施した。その結果、血液中の様々な炎症性サイトカインが低下していることが見いだされた。その後、メタボリックシンドローム対象者や2型糖尿病患者においてクロスオーバーの臨床試験を実施し、極めて良好な結果を得た (投稿準備中)。現在、種々の医療機関や大学に対して、Bio Metronome (バイオメトロノーム：つちやゴム俵、前写真) として提供されている。今後は、慢性腎臓病における腎保存期治療としての展開、ならびに、薬剤との併用効果などについても検討していく予定である。



Biomarker 研究会

〒211-0063

神奈川県川崎市中原区小杉町 1-403 武蔵小杉 STM ビル 6 階

前田記念腎研究所

武蔵小杉クリニック

事務局 古田 美津子

Tel:[044-711-3221](tel:044-711-3221) Fax:044-711-0160

Mail: sc.furuta@maeda-irr.com