

第3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3回賢人会議」

Proceedings

平成24年6月2日
於KKRポートヒル横浜

<一般演題>

17:30-18:00 (各 10 分)

1. アポトランスフェリンの挙動とマンガン脳症

金沢医科大学総合医学研究所先端医療分野客員教授

西田 雄三

2. 透析患者のインドキシル硫酸の体内動態

金沢医科大学総合医学研究所先端医療分野客員教授

出口 喜三郎

3. CKD 患者の酸化ストレスに及ぼす尿毒症物質吸着剤の影響～アルブミン酸化度による解析

熊本中央病院薬剤部

宮村 重幸

4. AN69 膜透析器による透析患者における鉄過剰症の治療経験—ヘプシジン 25 を用いた評価—

ひまわりクリニック

小林 弘忠

<軽食 time>

18:00-18:30

<特別講演> 司会 金沢医科大学総合医学研究所先端医療分野教授 友杉 直久

1. 「健常人と CKD 患者の鉄・造血関連・炎症マーカー等の相違点」

18:45～19:15

新潟労働衛生協会

加藤 公則

2. 「心筋梗塞と鉄代謝」

19:15～19:45

新潟大学第一内科・医歯学総合病院講師

鳥羽 健

<休憩・歓談 time>

19:45～20:00

<教育講演> 司会 新潟大学第一内科・医歯学総合病院講師 鳥羽 健

1. 「血清アルブミンのレドックス特性と酸化ストレスマーカーとしての有用性」

20:00～20:30

熊本大学薬学部医療薬剤分野教授

丸山 徹

2. 「プロテアーゼの基質と阻害剤で病気に迫るお話」

20:30～21:00

九州工業大学大学院生命体工学研究科 名誉教授

西野 憲和

3. 「リボソームタンパク質 S19 のリボソーム外機能特異的不全マウスとその創薬への応用」

21:00～21:45

熊本大学大学院生命科学研究部 分子病理学分野教授

山本 哲郎

「アポトランスフェリンの挙動とマンガン脳症」

金沢医科大学総合医学研究所先端医療分野客員教授

西田 雄三

<はじめに>

鉄イオンは人体にとって必須な金属イオンであり不足すれば当然であるが、それが過剰になってもいろいろな生活習慣病の原因になることが明らかにされてきている。しかし、鉄イオンを正常に摂取していても、それで安全だということにはならない。たとえば、無セルロプラスミン血症患者では、脳・すい臓などで鉄沈着がみられ多くの神経性異常が観測される。また 20 数年前欧州で大問題となった狂牛病であるが、感染型であれ孤発性であれ、脳において鉄代謝異常とマンガンイオンの異常な蓄積とが一体となって現れる。これらの症状を引き起こす共通項を明らかにし、それらを除外する方法を開発した。

<方法>

上で述べた共通項とは、過酸化水素と過剰マンガンイオンである。マンガンイオンも人体にとって必須な金属イオンの一つであるが、脳に過剰なマンガンイオンが蓄積された状態（マンガン脳症）は憂慮すべき事態である。通常の状態（鉄イオンが不足していない）ではマンガン脳症は起こらないことなどから、脳へのマンガンイオンの輸送体としてはトランスフェリンのほうがより重要だと考え、我々はアポトランスフェリンとマンガン化合物との相互作用を検討した。

<結果>

マンガンイオンは通常は 2 価状態が非常に安定で、このままではトランスフェリンに移行することはほとんどない。しかし、過酸化水素が存在すると、2 価のマンガンキレートは容易に 3 価、4 価状態のマンガンイオンに酸化され、アポトランスフェリンに取り込まれ、脳への移動が容易に起きることが解った。このような毒性の高いマンガンイオンを labile plasma manganese ions と呼ぶことにするが、これらの挙動はすべてアポトランスフェリンの特性により発生することを認識する必要がある。

<まとめ>

過酸化水素はプリオン病に感染した時にも発生するが、この過酸化水素はアポトランスフェリンによる鉄イオンの正常な取り込みを妨害し（無セルロプラスミン症患者に見られる症状：この機構については昨年 2 回賢人会議で詳細に説明した）、同時にマンガンイオンのトランスフェリンへの取り込みを大きく促進させることが解った。このような観点から、過酸化水素と毒性の高いマンガンイオンのみを除去する化合物を開発した。これらは、多くの神経性疾患の予防に威力を発揮すると期待される。

<文献一覧>

Nishida Y. Med Hypothesis Res 1, 227 (2004); Nishida Y. (2010) The Chemical Times, No. 2, 18-22. http://www.kanto.co.jp/times/pdf/CT_218_04.pdf.
Nishida Y. (2008) The Chemical Times, No. 2, 15-21. http://www.kanto.co.jp/times/pdf/CT_208_03.pdf. Nishida Y. Monatsh. Chem. 142, 375 (2011). Nishida Y, et al. Z. Naturforsch. 63c, 154-156 (2008).

「透析患者のインドキシル硫酸の体内動態（２）」

金沢医科大学総合医学研究所先端医療分野客員教授

出口 喜三郎

＜はじめに＞

インドキシル硫酸（IS）は、腎不全の進行因子として証明されている唯一の尿毒素である[1,2]。慢性腎疾患（CKD）患者の血清中 IS 濃度は（数～数十 ppm）と異常に高く（健常人は 1ppm 以下）、人工透析による除去効率も悪い厄介な代謝物である。IS を慢性腎疾患マーカーとして用いる場合、その日内、日間変動を把握しておくことが必要である。今回、健常人（2 日間）および慢性腎疾患（CKD）患者の長期間（1.5 年）の IS 分析を行いその変動を調べたので報告する。

＜方法＞

（１）除タンパク質処理：血清（10 μ L）を PBS で 5 倍希釈後、4%TCA（50 μ L）を添加する。1500rpm で 10 分間遠心分離した後、上清液（75 μ L）を得る。

（２）HPLC 分離分析：除タンパク質処理された血清 2.5 μ L を高速液体クロマトグラフ（HPLC）に注入し、逆相（C8）カラムで分離する。蛍光検出器（Ex:275 nm, Em:350 nm）で検出し、外部標準添加（STD-ADD）検量線法で定量する。

＜結果＞

最近、フランスにおける CKD 患者（130 人）のステージ 2～5 と IS 濃度および GFR との関係が報告された[2]。以下はその結果の抜粋である。IS 濃度はステージと共に増加し、また、血清中のクレアチニン値（SCr）から算出される GFR 値とも相関している。

図 1 は第一回腎人会議で報告した結果にクレアチニン値（SCr）を追加したものである。慢性腎疾患（CKD）保存期患者の 5 年間の血清中インド

ール化合物（Serotonin, IS, p-Cresol, IA）濃度の推移を示している。濃度上昇の傾向は共通に見られるが、IS の変化は特に顕著である。最近 2 年間に急上昇しており、IS 濃度が 10ppm を超えた時期に透析治療に移行している。また、IS 及び SCr(x10 倍)値の比較から、SCr(GFR)より IS の方が腎疾患の経過観察に適していると言える。

Clin J Am Soc Nephrol 4: 1551-1558, 2009

Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients

Fellype C. Barreto,^{*,†} Daniela V. Barreto,^{*,†} Sophie Liabeuf,^{*,†} Natalie Meert,[‡] Griet Glorieux,[‡] Mohammed Temmar,[‡] Gabriel Choukroun,^{*,§} Raymond Vanholder,[‡] and Ziad A. Massy^{*,§} on behalf of the European Uremic Toxin Work Group (EUTox)

^{*}INSERM ERI-12 (EA 4292), Amiens, France; [†]Clinical Research Centre, Division of Clinical Pharmacology, Amiens University Hospital, and the Jules Verne University of Picardy, Amiens, France; [‡]Nephrology Section, Department of Internal Medicine, University Hospital, Gent, Belgium; and [§]Division of Nephrology, Amiens University Hospital, Amiens, France

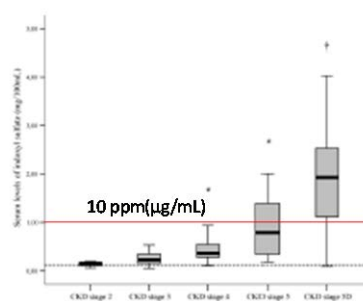


Figure 1. Serum levels of IS as a function of CKD stages. * $P < 0.05$ versus CKD stages 2, 3 or 5D; $^{\dagger}P < 0.05$ versus CKD stages 2, 3, 4, or 5. The dotted line indicates the reference value for healthy controls.

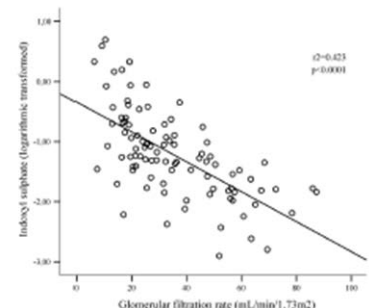


Figure 2. Linear regression curve. Relationship between serum levels of IS and the estimated GFR for patients at CKD stages 2 to 5 ($n = 95$).

図2は健常人3人の2日間における血清中IS濃度の変動を観察した結果である。個人差はあるが、いずれもIS濃度は1ppm以下である。2人(B&C)のIS濃度変動はRSD:15.3&19.6%であるが、1人(A)は、約2倍の変動が1回起こったためにRSD:46.9%となった。原因は不明であるが、IS濃度にはこのような突発的な変動要因があることに留意する必要がある。図3は透析患者

(3人)の1.5年間(1M~18M)の血清中IS濃度を観察した結果である。

変動はRSD=16~36.9%であるが、患者(B)は前半と後半に大きな変化が見られる。これも今のところ原因は不明であるが、尿以外の代謝系に変化があったためかと推察される。

保存期患者の血中インドール化合物の経時変化

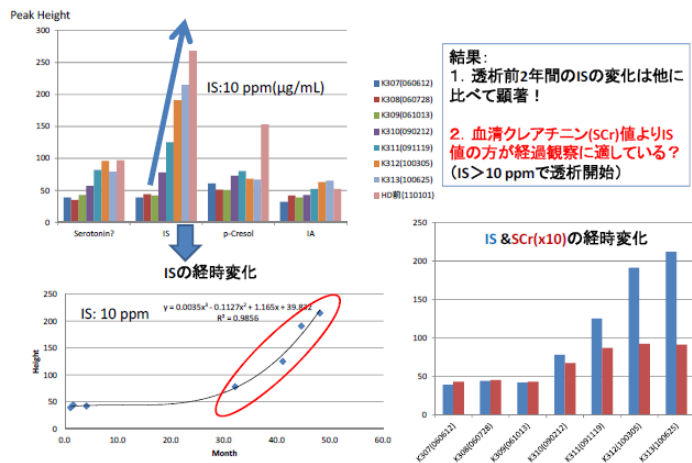


図1 慢性腎疾患 (CKD) 保存期患者の血清中 IS 濃度と SCr 値の経時変化

3健常人の血中ISの2日間における変動

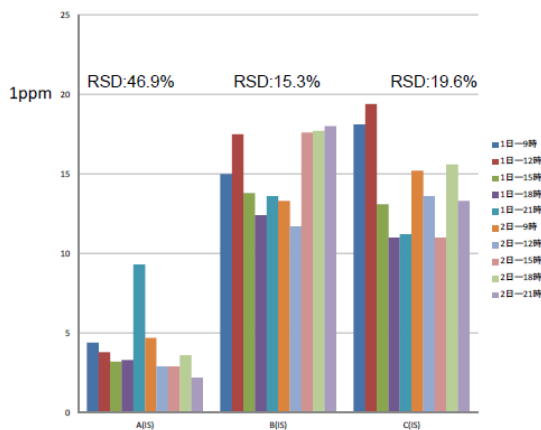


図2 健常人の血清中 IS 濃度変動 (二日間)

3透析患者の血中ISの1.5年間における変動

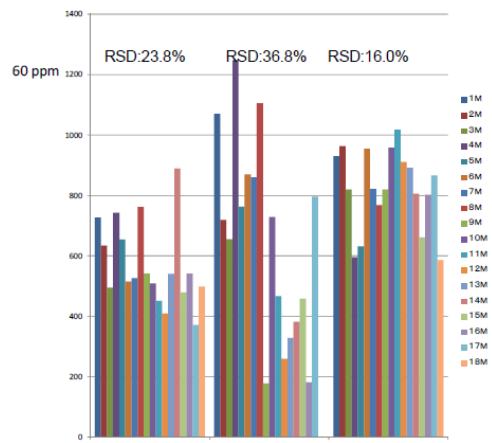


図3 透析 (HD) 患者の血清中 IS 濃度変動 (1.5年間)

<まとめ>

慢性腎疾患 (CKD) 保存期の観察において、血清中 IS 濃度は血清クレアチニン値 (SCr や GFR) より適していることが示唆された。ただし、原因不明の突発的な大きな変動要因も存在する。従って、単発的な IS 測定ではなく、継続的な測定による IS 濃度の経過観察が必要である。

<文献一覧>

- [1] 丹羽 利充、現代医学 47 巻 1 号、55-61,1999.
- [2] F. C. Barreto, et. al, Clin J Am Soc Nephrol 4: 1551-1558, 2009.

「CKD 患者の酸化ストレスに及ぼす尿毒症物質吸着剤の影響」アルブミン酸化度による解析

熊本中央病院薬局 宮村 重幸

<はじめに>

ヒト血清アルブミン（HSA）は血中に最も多く存在する蛋白質であり、その構造中の 34 位のシステインにフリーの SH 基が存在し、抗酸化作用を示す。この 34 位のシステインの SH 基がフリーな還元型 HAS は可逆的あるいは不可逆的な酸化によって酸化型の HAS となる。これまでに腎疾患などの酸化ストレス疾患で酸化型 HAS の存在比率が上昇することが報告されている。

今回のアルブミン酸化度は ESI-TOF/MS によって測定しました。これまで 34 位のシステインのモニタリングを HPLC 法を用いて行ってきた。

<方法>

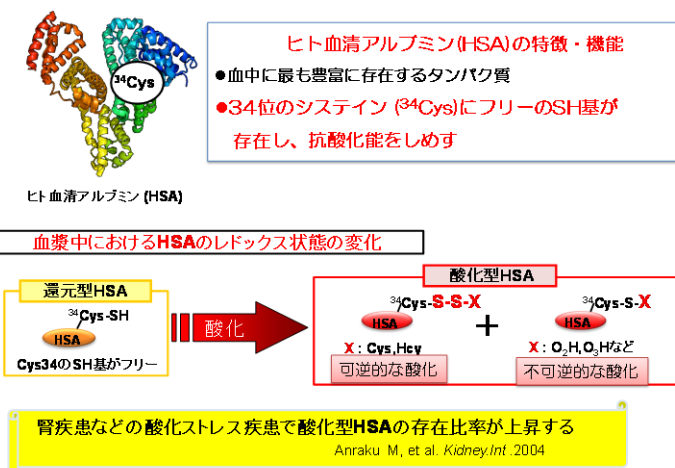
HPLC 法は感度が非常に高く、病態の進展を予測する上で有用な方法だが、比較的大量の試料を要し、測定に時間がかかるということから多数の患者資料を測定するには適していない。そこで HPLC 法に変わる測定法として質量分析、特に ESI-TOF/MS を用いた方法を確立した。ESI-TOF/MS 法は資料の前処理が容易、検出感度が高い、測定時間が短い、翻訳後修飾を分子レベルで測定可能、などの特徴を有しているため、★Cys34 のレドックス解析の臨床応用を考える上で非常に有用な測定方法である。

血液透析患者におけるシグナルは、この分子量 66500 付近にフリーの SH 基を有する還元型アルブミンのシグナルがみられる。さらに 34 位にシステインが付加した酸化型のアルブミンのシグナルが右の図である。これを還元処理すると還元型アルブミンが増加し、酸化型アルブミンが減少する。

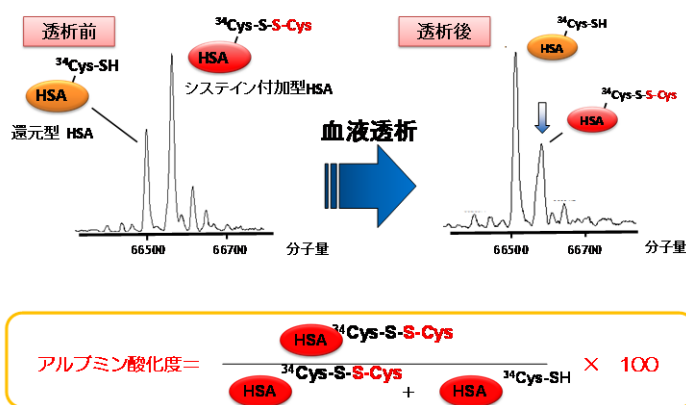
ここでは、アルブミンの酸化度をシステイン付加型 HSA と 34 位がフリーの還元型 HSA の総計に対するシステイン付加型 HAS の存在比率としている。

一方、アルブミン酸化度を上昇させる尿毒症物質の一つとしてインドキシル硫酸がある。IS は食物中の蛋白質から得られるトリプトファン由来の物質で、経口吸着炭素製剤である AST-120（商品名クレメ

ヒト血清アルブミン(HSA)と酸化ストレス



ESI-TOF/MSを用いた³⁴Cysのレドックス解析（血液透析患者）



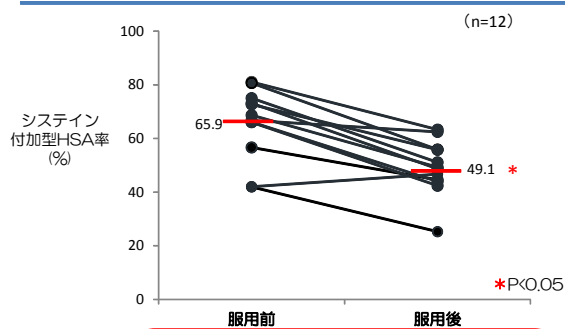
ジン)によって吸着され体外へ排泄される。ISに関する報告としては、CKD患者にAST120を投与し、ISを減少させることでCVDの進行を抑制した。このようにISがCVDを引き起こす因果関係を示す報告がある。

<結果>

そこで今回の検討は、血液透析患者に対する純炭のアルブミン酸化度と尿毒症物質に対する影響を検討した。

対象は中央仁クリニックにて透析療法を施行されている患者12名。この12名に純炭(きよら)を1日6Cap1ヶ月間服用してもらい、服用前後でアルブミン酸化度、尿毒症物質の変化を調査した。

純炭服用前後のアルブミン酸化度



シスチン付加型HAS率
(アルブミン酸化度)は有意に減少した。

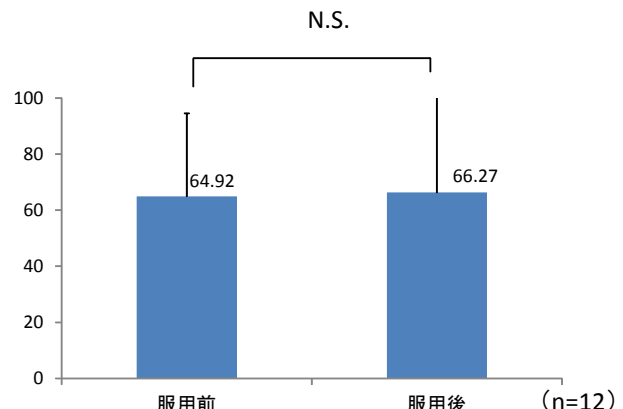
れた。

他の要因としてヘプシジン25、およびペントシジン濃度を測定したが、どちらも有意な差はみられなかった。血液生化学データのBUN、血清リン濃度、血清カルシウム濃度、インタクトPTHいずれも純炭服用前後での有意差はみられなかった。

<まとめ>

この結果から、純炭のアルブミン酸化度を低下させる機序は明らかになっていないが、透析患者のCVDの発症・進展に対する予防効果の可能性が示唆された。

純炭服用前後のIS濃度



IS濃度に変化はみられなかった。

まず、尿毒症物質のインドキシル硫酸の濃度変化を示す。純炭服用前後でのインドキシル硫酸の血清中濃度の低下はみられず、純炭にはクレメジンのようなISの吸着作用はないことが示唆された。

次に、シスチン付加型HAS率(アルブミン酸化度)を示す。12例のうち1例を除いてアルブミン酸化度は減少し、平均では服用前が65.9%であったのに対して服用後は49.1%と有意に減少した。前のスライドで示したように血清中IS濃度の変化はみられていないため、他の物質の吸着など他の要因が考えら

AN69 膜透析器による透析患者における鉄過剰症の治療経験—ヘプシジン 25 を用いた評価— 医療法人社団弘愈会 ひまわりクリニック 小林 弘忠

<はじめに>

透析患者の貧血治療において、低フェリチン(sFtn) 状態が、鉄毒性を回避するのみならず、ESA 使用量も削減しえる、優位性を有している。1) そこで強い陰性荷電のAN69膜透析器H12-4000 2) を用いて、sFtn 739.5 ng/ml の症例を対象に、デスフェラル治療をこころみた。

<方法>

症例は、1968 年 2 月生まれ、男、原疾患は CGN、2000 年 10 月に透析導入した。胃潰瘍出血があり、輸血や、静注鉄剤投与を施行していた。当院転院の後、鉄過剰症、ESA 低反応性貧血と診断し、2010 年 8 月より、H12 - 4000 を用いたデスフェラル治療を開始した。鉄代謝関連指標は、Hb 値、ESA 投与量、sFtn、TSAT、hepcidin - 25 3)とした。各透析ごとの前後値、クリアランス、そして、各指標の経時的な変化、推移を、検討した。

<結果>

sFtn 値は、開始時の 739.5 ng/ml より、2012 年 3 月では、326ng/ml へ、低下した。TSAT は変動が大きい が、2012 年 3 月で 20%であった。(図 1) そして、EPO 週投与量 3000 IU で、Hb 9.0 g/dl から、2012 年 3 月では、2250 IU で、10.9 g/dl を獲得している。(図 2) 各透析で、hepcidin - 25 (MW 2810) 値 3) は (n=15)、前値 94.6 ng/ml より後値 47.2 ng/ml、除去率は、50.4%、クリアランスは、161.7 ml/min. であり、H12-4000 透析で、hepcidin - 25 に対する、除去能を、認めた。さ

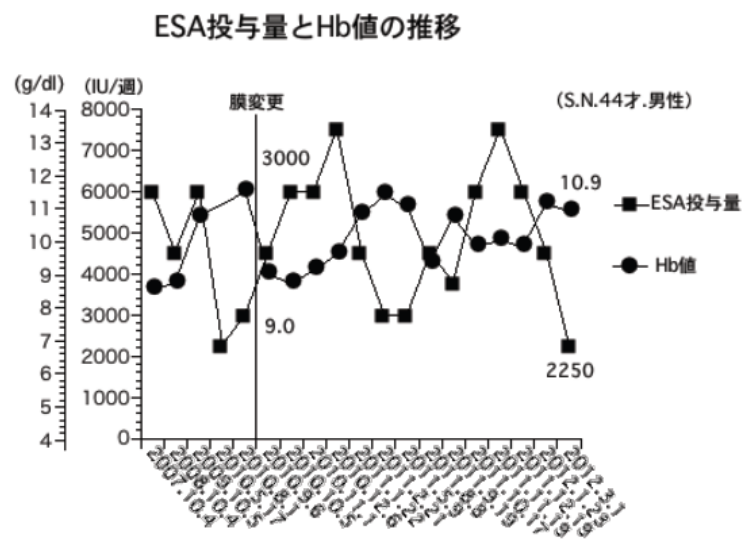


図1

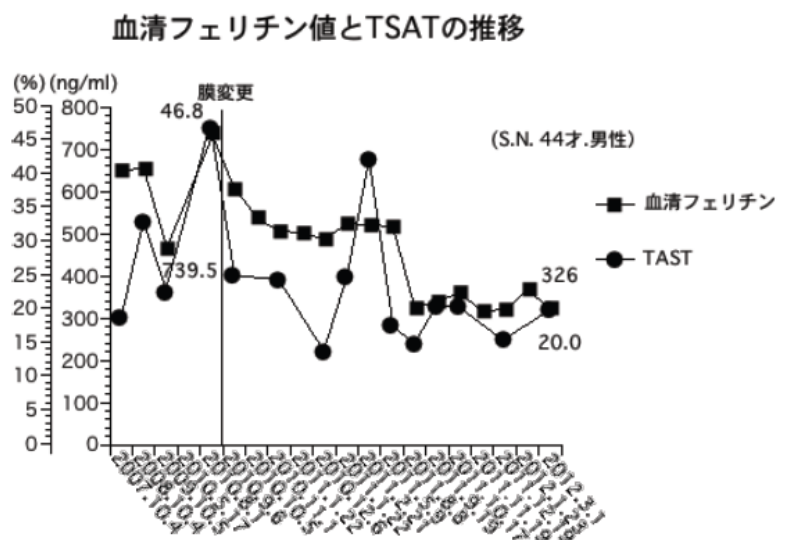


図2

らに、血清鉄は、前値 54.3 $\mu\text{g/d}$ より 75.3 $\mu\text{g/d}$ と上昇していた。(表 1)

<考案>

HA12 は、前田も執筆している、温故知新総編集号に、紹介されているように、1969 年誕生の PAN 膜透析器で、-100mV と強い陰性荷電を有している。この特性から、慢性炎症管理や、栄養状態の維持などに有用な、『患者に優しい透析器』とされ、今も、根強い支持を得ている。2) 今回、当透析器を、除鉄を目的に、用いてみた。トランスフェリンと結合し

た血清鉄を、HA12 透析は、直接的には、除去しえず、除水などの交絡因子もあろうが、むしろ増加していた。他方、MW 2810 の hepcidin - 25 を除去し得た。その理由は、陰性荷電による膜吸着にあると、推論している。鉄を排泄せず、再利用するシステムこそ、人類の鉄代謝の基本と考えると、4) HA12 による透析は、hepcidin - 25 の軽減を介して、貯蔵系鉄を、造血系鉄へとシフトさせる、つまり、鉄過剰症を軽減し、同時に造血を促進する、魅力的な、治療法と評価しえよう。本透析治療の集積として、経時的に、sFtn を減少せしめ、ESA 使用量も減少しえた事は、我々の発想が、的を得ていたと、理解している。

<文献一覧>

- 1) 倉賀野隆裕、松村 治、清元秀泰、村田敏晃、北村健一郎、藤元昭一、長谷弘記、深津敦司、井上 徹、板倉行宏、中西 健：維持透析患者における ESA 低反応性に及ぼす因子の検討. 第 19 回 腎とエリスロポエチン研究会 Proceedings. 2011. P.65 - 68.
- 2) 前田貞亮：Plate type Dialyzer . AN69 膜誕生 40 周年記念誌 温故知新 vol.1 ~vol.5 総集編号. 2012 . p.26 .
- 3) Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, Ishikawa I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System . Blood 2006 ; 108(4):1381-7.
- 4) 友杉直久：総論 危険な鉄の安全域 . 細胞 2012 ; 44 (6) :272 - 274 .

AN69膜によるヘプシジン-25、 血清鉄の透析前後値およびクリアランス

	ヘプシジン-25 (ng/ml)	Fe ($\mu\text{g/dl}$)
透析前値	94.6 (n=15)	54.3 (n=3)
透析後値	47.2 (n=15)	75.3 (n=3)
除去率	50.4 % (n=15)	- 37.7 % (n=3)
クリアランス	94.6 ml/min (n=5)	

表1

健常人における鉄・造血関連・炎症マーカー等の検討

新潟県労働衛生医学協会

加藤 公則

＜はじめに＞

鉄代謝の亢進は動脈硬化の進展に寄与しているという報告がある^{1,2)}。また、糖尿病や高血圧は慢性腎臓病を惹起し、慢性腎臓病がさらなる動脈硬化の進展を促すという悪循環も知られている³⁾。当然ながら、造血と鉄代謝は密接に関連していることから、鉄代謝を制御している重要なホルモンであるヘプシジン、造血ホルモンとしてエリスロポエチン、尿毒症毒素であるインドキシル硫酸⁴⁾、糖尿病における臓器障害の原因物質である Toxic-AGE⁵⁾の動態を健常人において明らかにすることは、基礎的データとして重要であると考えられる。以上より、職域健診においてそれらの指標を測定し、健診で得られた高感度 CRP 等の指標とも比べながら、その正常値を明らかにしたい。

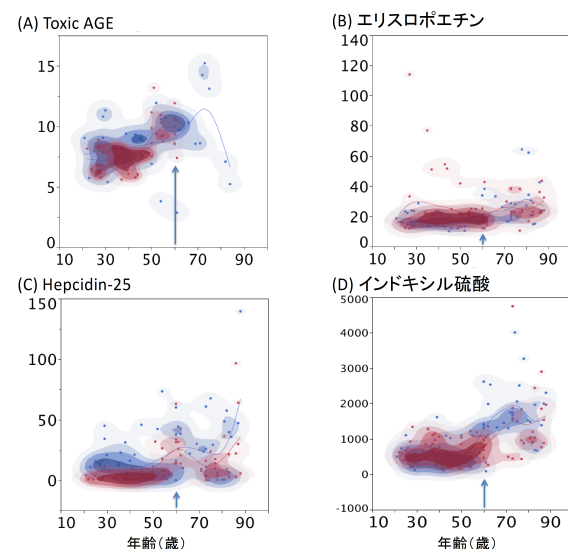
＜方法＞

対象は、調査の目的に賛同した 20 歳代から 80 歳代までの健康診断受診者男女各 10 名、合計 140 名から、健康診断時の採血の残血を用いて、インドキシル硫酸、Hepcidin-25、エリスロポエチン、Toxic-AGE を測定し、血算、生化学検査等の指標と比較検討した。さらに、4 つの因子の年齢による分布を検討した結果、後述するように 60 歳を境に、各因子の分布が大きく変化することから、60 歳未満と 60 歳以上の集団における各因子の正常値を検討した。この際、外れ値検定を用いて、極端な値は排除した。

統計は、多群間の検定には分散分析を用いた後、

図 1

図 1. 各指標の年齢に因る分布 ●男性、●女性。—男性、—女性。各プロットの密度が等高線にて表されている。



Tukey-Kramer の HSD 検定を用い、2 群間の検定には、対応のない t 検定を用いた。また、各因子に独立して関与する因子を割り出すために、多変量解析を用いた。全ての検討は、JMP® 9.0.3 を用いて行い、有意差は 0.05 未満とした。

＜結果＞

表 1 に、男女別年代別の各因子の平均値と標準偏差を示した。男性の 60 歳以降に、上記の 4 つの因子のうち、インドキシル硫酸のみが上昇した。また、Hepcidin-25 は女性の 50 歳未満において、男性より優位に低い値を示した。表 2 に多変量解析の結果を示す。また、図 1 に

表 2. 各因子に影響する因子の検討-多変量解析-

独立因子	説明因子	推定値	標準誤差	t値	p値
エリスロポエチン	白血球数	-0.0015	0.0007	-2.11	0.0369
	ヘモグロビン	-4.8456	0.9495	-5.10	<0.0001
	性別	3.6290	1.6494	2.20	0.0295
Hepcidin-25	年齢	0.2458	0.0644	3.81	0.0002
	高感度CRP	8.9567	0.9957	9.00	<0.0001
	フェリチン	0.1112	0.0113	9.81	<0.0001
	クレアチニン	-21.0640	7.6909	-2.74	0.0070
インドキシル硫酸	年齢	16.7491	3.3477	5.00	<0.0001
	クレアチニン	886.7789	399.6415	2.22	0.0282
Toxic AGE	年齢	0.0624	0.0166	3.76	0.0003
	ヘモグロビン	0.4041	0.2019	2.00	0.0489

説明因子：収縮期血圧、白血球数、高感度CRP、ヘモグロビン、血清鉄、フェリチン、クレアチニン、HbA1c、随時血糖

示したように、60 歳未満では各因子とも等高線が密に一塊となっているが、60 歳を超えるとバラツキが多くなることがわかった。そこで、60 歳を境に 2 群間に分けて、表 3 に正常値を示した。

＜まとめ＞

ほぼ健常と思われる健診者からのデータを集め検討した。腎機能も比較的保たれており、炎症反応も強くない集団においてさえ、エリスロポエチンはやはり貧血の影響を受けていた。Hepcidin-25 は、炎症と組織鉄量に強く関連しており、特に女性において閉経前後において劇的な変化をしており、男性も含めて年齢と強い関連があった。従って、Hepcidin-25 の正常値にも、60 歳を境にして大きな変化が認められている。インドキシル硫酸は、やはりクレアチニンと独立して関係しており、さらに年齢と強い関連があった。また、Toxic AGE は、ほぼ健常者の集団では糖代謝の指標と関連がなく、年齢はやはり強い因子であったが、何故ヘモグロビンと関連するかは今のところ不明である。

表3. 各因子の正常値

男性	年代	人数	平均	標準偏差	下側95%	上側95%
TAGE	60歳未満	30	8.24	1.83	7.55	8.92
	60歳以上	13	10.14	2.78	8.46	11.82
エリスロポエチン	60歳未満	40	17.65	4.24	16.29	19.00
	60歳以上	28	23.82	7.62	20.87	26.78
Hepcidin-25	60歳未満	34	8.57	6.17	6.41	10.72
	60歳以上	29	26.69	21.44	18.53	34.85
インドキシル硫酸	60歳未満	39	553.17	329.69	446.30	660.00
	60歳以上	28	1526.19	602.72	1292.50	1759.90

女性	年代	人数	平均	標準偏差	下側95%	上側95%
TAGE	60歳未満	36	7.72	1.42	7.24	8.21
	60歳以上	6	9.67	1.60	8.00	11.35
エリスロポエチン	60歳未満	33	18.43	3.68	17.12	19.73
	60歳以上	30	24.77	8.96	21.43	28.12
Hepcidin-25	60歳未満	34	1.90	1.80	1.27	2.53
	60歳以上	29	20.22	16.56	13.92	26.52
インドキシル硫酸	60歳未満	40	638.25	324.18	534.57	741.90
	60歳以上	28	1089.91	558.33	873.41	1306.40

＜文献一覧＞

- 1) Sullivan JL: Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. Exp Biol Med (Maywood). 2007;232:1014-1020.
- 2) Valenti L, Swinkels DW, Burdick L, et al: Serum ferritin levels are associated with vascular damage in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD. 2011;21:568-575.
- 3) Go AS, Chertow GM, Fan D, et al: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. The New England journal of medicine. 2004;351:1296-1305.
- 4) Niwa T: Uremic toxicity of indoxyl sulfate. Nagoya journal of medical science. 2010;72:1-11.
- 5) Takeuchi M, Takino J, Yamagishi S: Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: A novel therapeutic strategy. Current drug targets. 2010;11:1468-1482.

表1. 各年代における基礎的データの検討

男性																								
項目	単位	20歳代			30歳代			40歳代			50歳代			60歳代			70歳代			80歳代				
		人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差		
体重	kg	10	64.46	8.12	10	75.14	9.43	10	68.56	6.96	10	65.08	8.06	10	66.57	15.00	10	62.23	4.84	10	54.40	6.59		
収縮期血圧	mmHg	10	120.1	13.7	10	122.1	7.0	10	122.5	18.1	10	126.8	19.3	10	120.9	17.0	10	133.7	15.6	10	128.2	12.4		
拡張期血圧	mmHg	10	70.2	12.1	10	75.0	3.7	10	75.6	9.3	10	84.0	10.3	10	75.7	9.4	10	76.7	11.7	10	68.0	10.5		
Toxic AGE	U/mL	10	7.94	1.52	8	7.96	1.77	5	8.37	1.00	7	8.88	2.76	8	8.90	2.57	4	12.79	2.92	*	2	6.15	1.31	
エリスロポエチン	mU/mL	10	17.73	4.09	10	18.13	4.97	10	16.69	4.10	10	18.04	4.29	10	23.83	8.67	10	25.96	14.17	10	29.58	14.27		
Hepcidin-25	ng/mL	10	17.10	12.61	10	12.29	9.83	10	11.01	14.00	10	15.93	23.48	10	30.28	18.22	10	23.25	23.97	10	37.83	42.13		
インドキシル硫酸	ng/mL	10	523.85	299.05	10	657.57	458.09	10	534.85	351.16	10	602.81	382.07	10	1520.82	733.92	*	10	2081.60	942.58	*	10	1399.12	571.37
白血球数	/ μ L	10	7220	3088	10	6550	1277	10	5890	1600	10	5500	1214	10	6340	2040	10	5510	1010	10	5890	1431		
高感度CRP	mg/dL	10	0.021	0.019	10	0.115	0.136	10	0.126	0.194	10	0.139	0.331	10	0.117	0.129	10	0.115	0.095	10	1.417	3.258		
ヘモグロビン	g/dL	10	15.29	0.96	10	15.20	0.65	10	15.00	0.58	10	14.81	1.13	10	14.35	1.02	10	13.67	1.58	*	10	12.90	1.44	
血清鉄	μ g/dL	10	101.3	30.8	10	106.4	39.7	10	106.4	43.3	10	106.2	43.0	10	108.3	45.6	10	74.3	31.5	10	63.1	27.7		
フェリチン	ng/mL	10	159.4	42.1	10	192.0	75.1	10	105.1	76.2	10	139.1	73.6	10	206.3	208.3	10	152.1	155.5	10	178.7	150.5		
クレアチニン	mg/dL	10	0.78	0.15	10	0.87	0.05	10	0.85	0.14	10	0.91	0.18	10	0.90	0.13	10	0.98	0.18	10	0.92	0.21		
HbA1c	%	10	4.81	0.23	10	5.14	0.13	10	5.03	0.21	10	5.19	0.26	10	5.70	1.14	*	6	5.30	0.30	3	5.33	0.42	
随時血糖	mg/dL	10	102.3	24.3	10	103.7	23.4	10	100.1	14.9	10	105.5	21.8	10	131.6	84.2	6	97.3	16.2	3	90.0	1.0		
血圧治療中	人	0			0			2			2			2			5			5				
糖尿病治療中	人	0			0			0			0			0			1			1				
脂質異常症治療中	人	0			0			1			1			1			1			2				

女性																																
項目	単位	20歳代			30歳代			40歳代			50歳代			60歳代			70歳代			80歳代												
		人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差										
体重	kg	10	48.70	4.82	†	10	51.05	6.01	†	10	54.31	10.35	†	10	57.02	11.22	10	51.31	5.59	†	10	52.15	12.10	†	10	47.85	7.96					
収縮期血圧	mmHg	10	109.6	7.1	†	10	110.9	10.6	†	10	118.2	7.1	†	10	119.9	11.0	10	121.3	11.6	10	122.8	16.5	10	109.6	7.1	†	10	121.1	18.5			
拡張期血圧	mmHg	10	68.1	7.4	†	10	68.0	9.0	†	10	75.1	7.9	†	10	71.1	8.9	†	10	76.0	10.1	10	65.4	13.0	10	68.1	7.4	†	10	74.3	12.6		
Toxic AGE	U/mL	9	7.15	1.15	†	10	7.35	0.90	†	9	7.05	0.84	†	9	10.00	1.64	*	6	9.67	1.60	*	0	-	-	0	-	-	0	-	-		
エリスロポエチン	mU/mL	10	27.58	31.02	†	10	28.18	19.95	†	10	25.42	15.04	†	10	21.97	7.81	†	10	20.40	8.69	†	10	26.86	9.20	†	10	27.06	8.17	†	10	27.06	8.17
Hepcidin-25	ng/mL	10	3.49	4.94	†	10	1.73	1.91	†	10	1.30	1.01	†	10	10.90	10.71	†	10	29.10	15.46	*	10	10.05	7.58	†	10	29.15	30.24	*	10	29.15	30.24
インドキシル硫酸	ng/mL	10	593.15	332.48	†	10	839.73	292.24	†	10	448.50	264.62	†	10	671.60	317.53	†	10	779.56	348.04	†	10	1475.85	1279.13	†	10	1562.04	717.02	*	10	1562.04	717.02
白血球数	/ μ L	10	6140	1064	†	10	5200	856	†	10	5860	1154	†	10	5620	1160	†	10	5170	1365	†	10	5640	1445	†	10	5270	1441	†	10	5270	1441
高感度CRP	mg/dL	10	0.081	0.191	†	10	0.018	0.018	†	10	0.086	0.147	†	10	0.062	0.054	†	10	0.035	0.021	†	10	0.319	0.841	†	10	0.959	2.075	†	10	0.959	2.075
ヘモグロビン	g/dL	10	13.08	1.45	†	10	12.38	1.05	†	10	13.21	1.39	†	10	13.16	1.03	†	10	13.22	0.71	†	10	12.00	0.77	†	10	12.19	1.45	†	10	12.19	1.45
血清鉄	μ g/dL	10	74.6	38.4	†	10	93.9	44.1	†	10	90.2	62.4	†	10	85.2	32.9	†	10	103.7	29.6	†	10	71.3	19.4	†	10	74.9	39.0	†	10	74.9	39.0
フェリチン	ng/mL	10	24.6	16.6	†	10	23.7	13.4	†	10	26.3	20.3	†	10	73.5	26.8	*†	10	93.4	54.6	*	10	59.8	34.0	†	10	104.7	50.8	*	10	104.7	50.8
クレアチニン	mg/dL	10	0.66	0.07	†	10	0.65	0.08	†	10	0.66	0.07	†	10	0.68	0.10	†	10	0.64	0.08	†	10	0.76	0.16	†	10	0.70	0.18	†	10	0.70	0.18
HbA1c	%	10	4.98	0.15	†	10	5.02	0.27	†	10	4.88	0.31	†	10	5.15	0.20	†	6	5.15	0.27	†	0	-	-	†	10	4.98	0.15	†	10	4.98	0.15
随時血糖	mg/dL	10	100.7	28.5	†	10	90.0	9.1	†	10	83.6	8.0	†	10	97.0	24.5	†	6	96.3	11.3	†	9	-	-	†	10	100.7	28.5	†	10	100.7	28.5
血圧治療中	人	0			0			0			0			0			0			0			9			1			1			
糖尿病治療中	人	0			0			0			0			0			0			0			2			0			0			
脂質異常症治療中	人	0			0			0			0			0			4			6			4			1			1			

p < 0.05 対20歳代、†p < 0.05 対男性

*p < 0.05 対20歳代, †p < 0.05 対男性

「心筋梗塞と鉄代謝」

新潟大学医歯学総合病院第一内科・講師

鳥羽 健

＜はじめに＞

慢性心不全患者のかかなりの症例で貯蔵的減少が認められ、鉄の補充により心機能の改善が観察されるが、一方で鉄過剰状態は心リモデリングを介した重篤な心機能障害の原因となりうる。健康人を対象とした前向き研究でも血清 Ferritin 高値群や TfR/Ferritin 比低値群の心筋梗塞発症率は有意に高く、鉄過剰と動脈硬化の関連が考えられている。心筋梗塞急性期における心筋からの含鉄分子群の細胞外への逸脱と Fenton 反応を介した ROS 生成は Reperfusion injury の原因となりうる。

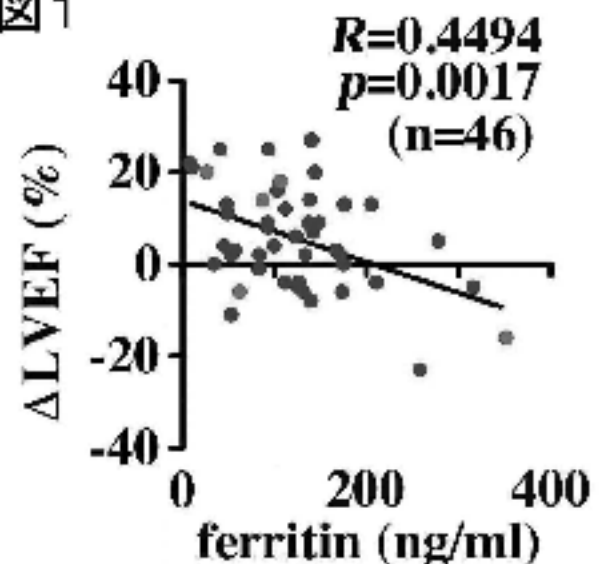
＜方法＞

- (1) 新潟市民病院 CCU に収容された 53 例の心筋梗塞患者について、PCI による血行再建をする前の血清を保存し、鉄代謝関連マーカー（IL-6, EPO, Hepcidin, sFe, UIBC, Ferritin）を測定した。急性期および 6 ヶ月後の左室機能（LVEF）を LVG で評価し、鉄代謝関連マーカーとの相関を調べた。
- (2) EPO/AMI-1 臨床研究（急性心筋梗塞患者に EPO 12,000IU または Placebo を単回静注し心機能を観察）で得られた保存血清でも同様の検討を行った。
- (3) 自己免疫性心筋炎ラットおよび心筋梗塞ラットで心筋・マクロファージ・T 細胞・線維芽細胞を純化精製し、鉄代謝関連マーカーの mRNA Profiling を行った。

＜結果＞

- (1) 心筋梗塞患者では図 1 に示すとおり sFe の低下、IL-6 の上昇、Ferritin の上昇が見られた。急性期の LVEF と Ferritin には相関がなく、6 ヶ月後の LVEF と急性期の Ferritin に逆相関が見られ、その差分（心機能の改善・悪化）は Ferritin と逆相関した。一般に心筋梗塞では 6 ヶ月間に心機能が少し自然回復する傾向にあるが、急性期の Ferritin の高い症例は 6 ヶ月間で心不全が悪化する傾向にあることが分かった。
- (2) EPO/AMI-1 では EPO 投与群で有意に 6 ヶ月後の心機能が改善していたが、Placebo 群でみられた急性期の IL-6・Hepcidin・Ferritin の上昇が EPO 投与群で消失していた。
- (3) 炎症および虚血のラット心では、主に線維芽細胞で発現する IL-6 に応答して心筋での Hepcidin 合成が観察された。またフェロポルチンは心筋・マクロファージおよび線維芽細胞に発現していた。また炎症応答性の IL-1 に比例して、心筋細胞および線維芽細胞での NGAL の発現が増強した。

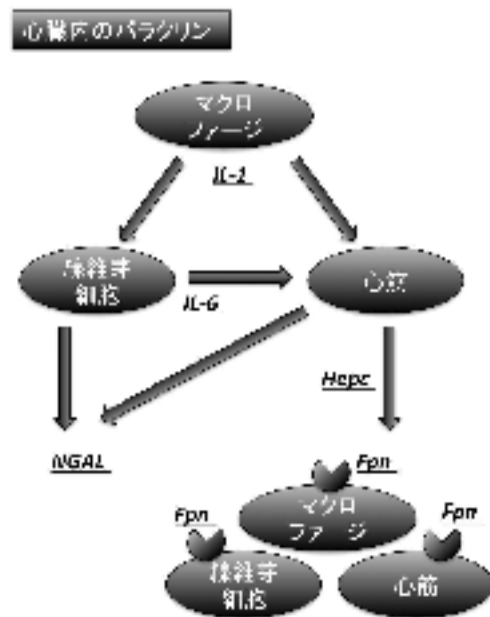
図 1



＜まとめ＞

心筋梗塞急性期には血清鉄の低下とフェリチンの上昇が速やかに観察されることから、何らかの機序により鉄の貯蔵へのシフトが起こることが従来から知られていた。ラットのモデル実験の結果から、炎症や虚血の際に心臓内で完結する IL-6/Hepcidin/Ferritin のパラクリンシステム（図 2）が存在することが分かった。心筋梗塞患者の急性期に血中 IL-6 の軽度の上昇と Hepcidin の肺炎患者なみの上昇が見られることから、心臓から血中へ逸脱した IL-6 および Hepcidin が血流を介して肝臓に作用し、全身の鉄が貯蔵へ移動したものと考えられる。心筋虚血の急性期に心筋から逸脱したミオグロビン・チトロームなどの含鉄分子に由来する一過性鉄過剰において、心内因性の IL-6/Hepcidin システムによって鉄がマクロファージおよび衰弱心筋に取り込まれることは理にかなっているように思われる。

図 2.



＜文献一覧＞

1. Suzuki H, Toba K, Kato K, Ozawa T, Tomosugi N, Saitoh H, et al. Serum hepcidin-20 is elevated during the acute phase of myocardial infarction. Tohoku J Exp Med. 2009; 218(2): 93-8.
2. Ozawa T, Toba K, Kato K, et al. Single-dose intravenous administration of recombinant human erythropoietin is a promising treatment for patients with acute myocardial infarction - randomized controlled pilot trial of EPO/AMI-1 study -. Circ J. 2010; 74(7): 1415-23.
3. Yoshimura N, Toba K, Ozawa T, et al. A novel program to accurately quantify infarction volume by (99m)Tc MIBI SPECT, and its application for re-analyzing the effect of erythropoietin administration in patients with acute myocardial infarction. Circ J. 2010; 74(12): 2741-3.
4. Isoda M, Hanawa H, Toba K, Kato K, et al. Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. J Nutr Biochem. 2010; 21(8): 749-56.
5. Ding L, Hanawa H, Toba K, et al. Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. Circ J. 2010; 74(3): 523-30.
6. Oda M, Toba K, Ozawa T, Kato K, Hanawa H, et al. Establishment of culturing system for ex-vivo expansion of angiogenic immature erythroid cells, and its application for treatment of patients with chronic severe lower limb ischemia. J Mol Cell Cardiol. 2010; 49(3):

347-53.

7. Toba K, Kato K, Ozawa T, Aizawa Y. Clinical study from Japan and its reflections: evaluation of the prospective observation of erythropoietin--administration for the treatment of acute myocardial infarction (EPO/AMI-1) study. Nihon Naika Gakkai Zasshi. 2011; 100(7): 2008-14.
8. Hao K, Hanawa H, Toba K, et al. Free heme is a danger signal inducing expression of proinflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. Mol Immunol. 2011; 48(9-10): 1191-202.
9. Oda M, Toba K, Kato K, Ozawa T, Hanawa H, et al. Hypocellularity and insufficient expression of angiogenic factors in implanted autologous bone marrow in patients with chronic critical limb ischemia. Heart Vessels. 2012; 27(1): 38-45.
10. Ikarashi N, Toba K, Kato K, Ozawa T, Hanawa H, Saito H, et al. Erythropoietin, but Not Asialoerythropoietin or Carbamyl-Erythropoietin, Attenuates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. Clin Exp Hypertens. 2012, in press.
11. Moriyama M, Toba K, Hanawa H, Kato K, Ozawa T, Saito H, et al. A novel synthetic derivative of human erythropoietin designed to bind to glycosaminoglycans. Drug Deliv. 2012; 19(4): 202-7.

「血清アルブミンのレドックス特性と酸化ストレスマーカーとしての有用性」

熊本大学薬学部 医療薬剤学分野教授

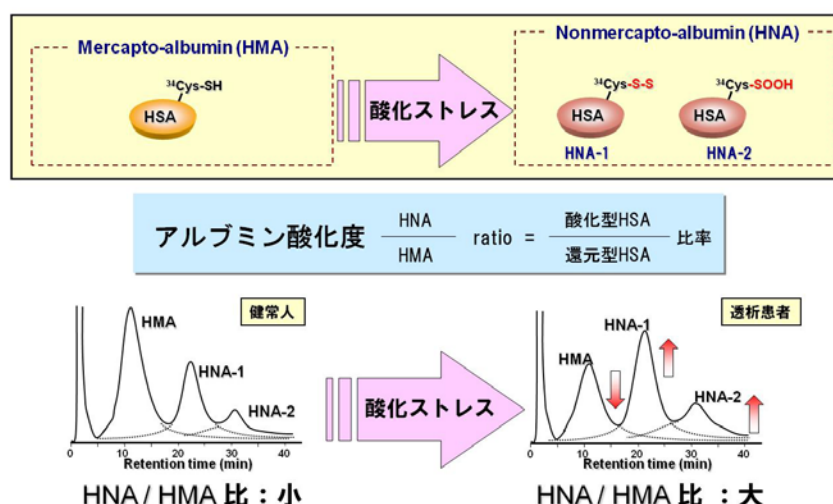
丸山 徹

近年、疾患の進展と酸化ストレスの密接な関連性が明らかにされ、新規な抗酸化剤の開発が活発化している。そのため、酸化ストレス疾病の病態や抗酸化剤の治療効果を評価するための、迅速、簡便かつ高感度なバイオマーカーの確立が切望されている。我々は、血漿中チオール基の約 80%を占めるヒト血清アルブミン（HSA）の Cys34 に着目し、このレドックス状態の解析が全身循環系の酸化ストレスマーカーとして応用できることを明らかにしてきた。本会議では、腎疾患を酸化ストレス疾患として取り上げ、1) Cys34 のレドックス解析方法の確立、2) HSA が anti-oxidant あるいは prooxidant として機能する可能性について事例をあげながら紹介する。

腎性貧血の治療において静注鉄が汎用されている。静注鉄の場合、Fenton 反応により、ヒドロキシラジカルの産生を促進することから、過剰な遊離鉄は酸化ストレスを亢進する危険性が指摘されるようになってきた。例えば、“透析患者に対して、6 ヶ月間で鉄剤を 1000mg 以上投与すると、入院頻度、死亡率ともに上昇する”、“鉄剤の静脈内投与は *in vivo* でも酸素ラジカルストレスや内皮細胞障害を誘起する”、さらには“血中の貯蔵鉄と蛋白質の酸化産物との間に高い相関が見られ、血中鉄含量により酸化亢進が引き起こされる”、ことが報告されている。そこで我々も HSA の Cys34 のレドックス状態に基づいた“アルブミン酸化度”を指標として、静注鉄を投与されている透析患者について検討したところ、静注鉄投与群では、非投与群に比べて、アルブミン酸化度が有意に上昇していることを見出した。興味深いことに、この変化は血清のフェリチン値と関連していた。これらの結果から、透析患者に対する静注鉄の投与は血中の酸化ストレスを亢進すること、またアルブミン酸化度が鉄剤による酸化ストレスを評価する上での有用なマーカーであることが判明した。

2004 年に日本透析学会からだされた「慢性血液透析患者における腎性貧血治療のガイドライン」では、鉄剤の投与について、“1 回 40mg の鉄剤を、①週 3 回 1 ヶ月間、あるいは②週 1 回 3 ヶ月間静脈内投与する。”と記載されている。しかしながら、①と②の投与方法のいずれが、有効性及び安全性の観点から優れているのかに関するエビデンスは報告されていなかった。そこで次に、静注鉄の 2 つの投与方法がアルブミン酸化度に及ぼす影響について検討した。その結果、有効性に関しては、①と②のいずれの投与方法においても有意な違いは認められなかったものの、アルブミン酸化度を比較したところ、①では顕著な増加が観察されたのに対して、②の方法では変化が認められなかった。したがって、酸化ストレスの観点からは、週 1 回 3 ヶ月間投与の方が、週 3 回 1 ヶ月間投与よりも優れていることを明らかにすることができた。近年、寺脇らのグループによる基礎及び臨床研究から、Cys34 が還元状態の HSA（還元型 A

図 1 HSA の³⁴Cys のレドックスは全身循環の酸化ストレスマーカー



ルブミン) が血管内の恒常性維持において重要な役割を果たしており、還元型アルブミン濃度の低下は血管内皮機能を低下させることを報告している。したがって、上述した静注鉄の投与方法の違いによる還元型アルブミン濃度の減少は、透析患者における血管内皮機能の低下、ひいては心血管疾患の発症にも関与することが推察される。

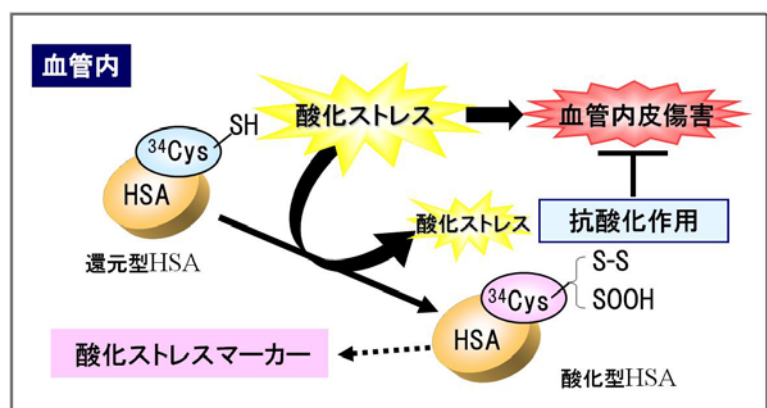
これまでの数多くの報告により、HSA が血清中の主たる抗酸化剤として機能していることが実証されてきた。HSA の構成アミノ酸残基から推測すると、Cys、Met といった含硫アミノ酸残基の寄与が予想されるものの、どのアミノ酸残基が抗酸化作用を担っているのかについては明らかにされてこなかった。我々は、この点を検証すべく、Cys34 のみ、6 個の Met 残基、Cys34 と 6 個の Met を同時にアラニンに置換した、三種類の変異体を部位特異的変異法により作成し、それらの抗酸化活性と血管内皮細胞の生存率に及ぼす影響を検討した。その結果、種々の活性酸素種に対する HSA のラジカル消去活性には、Cys34 が中心的な役割を果たしていることや、この抗酸化作用が血管内皮保護効果と相関することを実験的に証明した。

通常、HSA は単量体で存在するが、過度に酸化されると、AOPP (Advanced Oxidized Protein Products) と呼ばれる酸化凝集体を形成する。近年、この酸化凝集体が血中、腎臓あるいは動脈硬化部位に蓄積し、病態形成に関与することや、酸化ストレスマーカーとして有用であることが報告されるようになってきた。HSA は糸球体ろ過を受けた後、尿細管に局在するメガリン・キュブリンにより再吸収される。そこで我々は、AOPP が同じ経路で再吸収されるのか否か、その際に pro-oxidant として機能していないか否かについて、ヒト近位尿細管細胞 (HK-2 細胞) を用いて検討した。その結果、AOPP はメガリン・キュブリンではなく、スカベンジャー受容体の一種である CD34 により細胞内に取り込まれること、その際、活性酸素の産生を誘導し、これが引き金となって腎線維化因子である TGF- β の産生を亢進することを明らかにした。これらの結果から、酸化された HSA は pro-oxidant になることで、新たな腎不全増悪因子になる可能性を見出した。

以上、本会議では、HSA が循環血中における酸化ストレスマーカーとして有用であるだけでなく、HSA が anti-oxidant あるいは pro-oxidant として機能することにより、病態形成にも関与する可能性を我々の研究結果に基づき紹介した。残念ながら、市販のアルブミン製剤では Cys34 が酸化されている割合が高いため、血漿増量剤としての効果は期待できるものの、抗酸化剤としての役割はあまり期待できないと思われる。

したがって、血管内の恒常性を維持するためには、HSA の Cys34 を還元型に保てるような治療法が有用であろう。アンジオテンシン受容体拮抗薬をはじめとしていくつかの薬剤では、投与によりアルブミン酸化度が改善することから、今後はより多くの薬剤についてもアルブミン酸化度に及ぼす影響を検討するとともに、それらを組み合わせた治療法の有用性を実証していく必要があると思われる。

図2 HSAのCys34のレドックス特性の生理的意義



HSAのCys34 ⇒ 酸化ストレスマーカー? + 抗酸化防御因子

「プロテアーゼの基質と阻害剤で病気に迫るお話」

九州工業大学名誉教授

西野 憲和

＜はじめに＞

プロテアーゼは、核酸と同様に生命現象あるところ必ず存在するタンパク質であり、消化酵素、血液凝固関連酵素、ペプチドホルモンプロセッシング酵素、或いは微生物産生酵素等々として、多年にわたり多様な研究の対象となってきた。著者は、亜鉛イオンを含有するメタロプロテアーゼの阻害剤開発の機会を得て、これをヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の分子設計に展開し、医薬品開発を試みて現在に至っている。

＜方法＞

プロテアーゼは、それがペプチド結合を加水分解するための反応機構によって、4 種類に分類される。阻害剤の分子設計に当っては、これを念頭に置くことが望ましい。特定のプロテアーゼがペプチド結合を加水分解する際には、あたかもアミノ酸の種類を認識するかのような基質特異性を示すことがある。リシン、アルギニンのようなカチオン性側鎖や芳香環を有する側鎖が認識を受けることが多い。またペプチド鎖長も少なからず影響する。医薬品を目指す阻害剤の分子設計では、特異性を高める認識部位の最適化と反応機構に介入する有機化学的官能基の配置の両面に神のご加護が必要である。

＜結果＞

コラゲナーゼが関与する疾患対応のためにメタロプロテアーゼの阻害剤開発に取り組んだ結果、ヒドロキサム酸(-CONHOH)を鍵官能基として発見した。モデルとしたサーモライシンは疎水性アミノ酸側鎖のアミノ基側のペプチド結合を加水分解することが判っていたので、ペプチドの N-端側にベンジルマロン酸を結合し、ヒドロキサム酸を装置した(図 1)。ヒストン脱アセチル化酵素はプロテアーゼではないが、メタロプロテアーゼの反応機構を持つと仮説して天然の環状テトラペプチドのヒドロキサム酸アナログを提案した

(図 2)。ヒドロキサム酸以外の、チオール基、分子内ジスルフィド、またはメトキシメチルケトンを導入した環状ペプチドも高活性を示した。

＜まとめ＞

良い阻害剤開発に必要な基質特異性の精密化を図るため、プロテアーゼ活性を検出するのに高感度である、蛍光性の Peptidyl-MCA の focused library についても言及した。また、これらを用いてプロテアーゼが関与する疾患の診断に役立て得る安価簡便な蛍光測定装置の開発について紹介した(図 3)。診断薬と医薬品で腎症治療に役立てるといふ夢を見ている

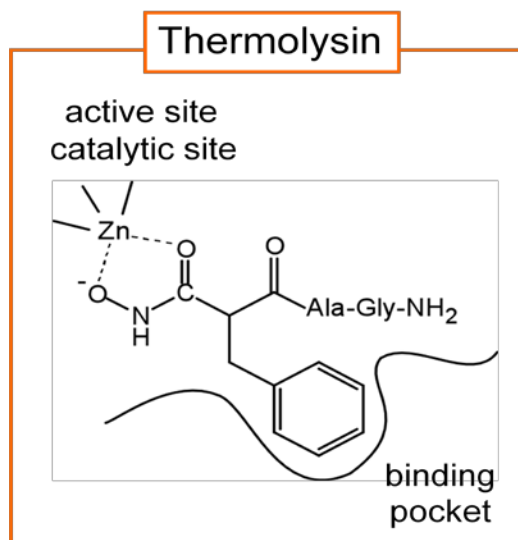


図 1. ペプチド鎖末端にヒドロキサム酸を有するサーモライシン阻害剤

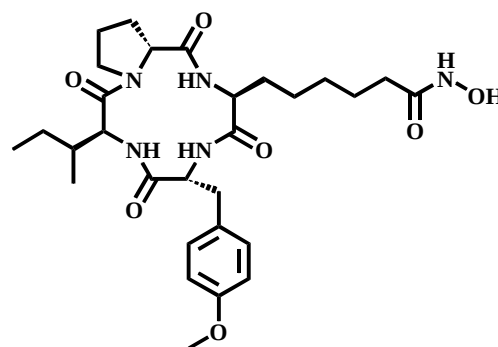


図 2. 天然物 Cyl-1 のヒドロキサム酸アナログ CHAP31

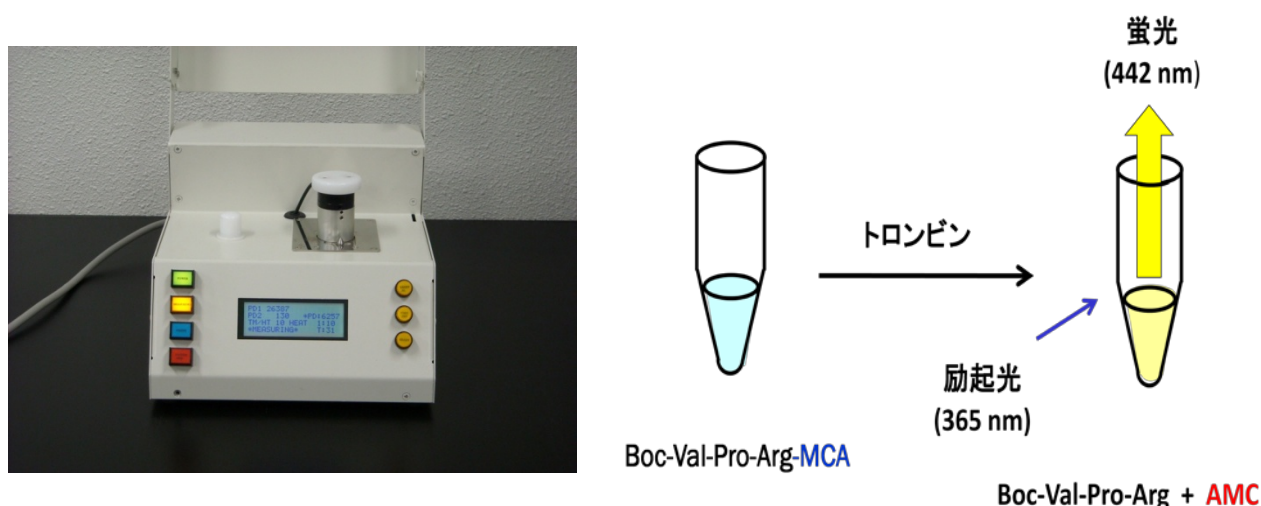


図3. マイクロチューブを反応容器とする簡便型蛍光測定装置(右) と原理(左)

<文献一覧>

1. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin, R. Furumai, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, M. Yoshida, and S. Horinouchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 87-92 (2001).
2. Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity, Y. Komatsu, K. Tomizaki, M. Tsukamoto, T. Kato, N. Nishino, S. Sato, T. Yamori, T. Tsuruo, R. Furumai, M. Yoshida, S. Horinouchi and H. Hayashi, *Cancer Research*, **61**, 4459-4466 (2001).
3. Cyclic tetrapeptides bearing a sulfhydryl group potently inhibit histone deacetylases, N. Nishino, B. Jose, S. Okamura, S. Ebisusaki, T. Kato, Y. Sumida, M. Yoshida, *Org. Lett.*, **5**, 5079-5082 (2003).
4. Chlamydocin analogs bearing carbonyl group as possible ligand toward zinc atom in histone deacetylases, M. P. I. Bhuiyan, T. Kato, T. Okauchi, N. Nishino, S. Maeda, T. G. Nishino and M. Yoshida, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 3438-3446 (2006).
5. Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells, K. Sasaki, T. Ito, N. Nishino, S. Khochbin, and M. Yoshida, *PNAS*, **22**, 16257-16262 (2009).
6. Bicyclic peptides as potent inhibitors of histone deacetylases: Optimization of alkyl loop length, N. M. Islam, T. Kato, N. Nishino, H.-J. Kim, A. Ito, M. Yoshida, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 997-999 (2010).
7. The role of class I histone deacetylase (HDAC) on gluconeogenesis in liver, H. Oiso, N. Furukawa, M. Suefuji, S. Shimoda, A. Ito, R. Furumai, J. Nakagawa, M. Yoshida, N. Nishino, E. Araki, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **404**, 166-172 (2011).
8. Cyclic tetrapeptides with thioacetate tails or intramolecular disulfide bridge as potent inhibitors of histone deacetylases, Md. Ashraful Hoque, Toru Arai, Norikazu Nishino, Hyun-Jung Kim, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**, 6770-6772 (2012).

「リボソームタンパク質S19のリボソーム外機能特異的不全マウスと創薬への応用」

熊本大学生命科学研究部 分子病理学分野教授

山本 哲郎

＜はじめに＞

S19 リボソームタンパク質(RP S19)は 145 アミノ酸残基から成り、リボソームの構成成分であるとともに血漿タンパク質でもある。前者はアポトーシスの過程で、また後者は血液凝固の過程で、トランスグルタミナーゼの作用を受けて

Lys122とGln137の間に分子間イソペプチド結合がかかり、多量体化される。この多量体は、C5a 受容体に結合することで、単球／マクロファージ選択的な走化作用、アポトーシス促進作用および赤芽球成熟促進作用を発揮する。

＜方法＞

上記の RP S19 多量体のリボソーム外機能の持つ生理的並びに病理的役割を in vivo で詳細に検討する目的で、Lys122-Gln137 間にイソペプチド結合を形成できない

Gln137Glu-RP S19 ノック・イン・マウスを作製した。多核球のアポトーシスとマクロファージによる貪食処理不全による急性炎症の遷



延化を、0.5%カラゲニン水溶液 5 ml/g 体重を胸腔に接種して急性胸膜炎を発症させて観察した。フェニルヒドラジン(60 mg/kg マウス体重 2 日間)を投与して溶血性貧血を起こし、ストレス反応性造血の不全を 10 日間観察した。更に、ノック・イン・マウス凝血塊のマクロファージによる貪食吸収遅延を、末梢血 0.2 ml で凝血塊を作成し、野生型マウスの腹腔中に挿入

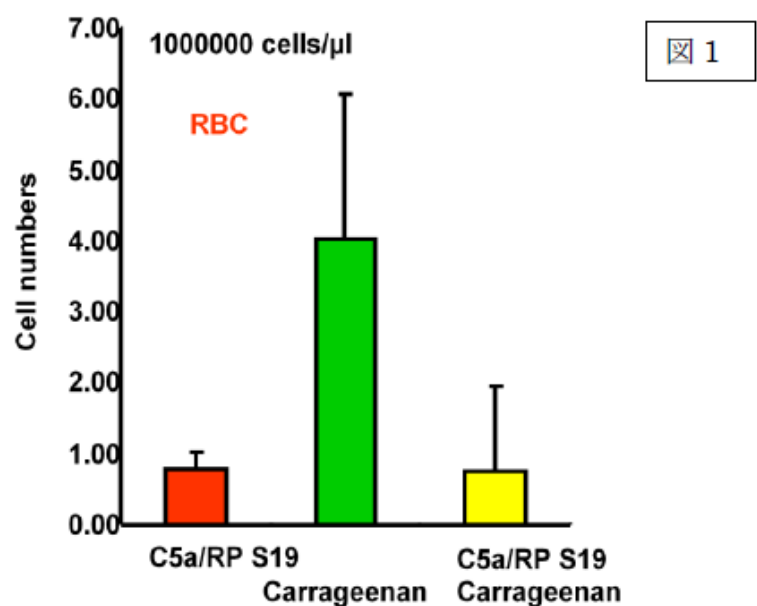


図 2-1

延化を、0.5%カラゲニン水溶液 5 ml/g 体重を胸腔に接種して急性胸膜炎を発症させて観察した。フェニルヒドラジン(60 mg/kg マウス体重 2 日間)を投与して溶血性貧血を起こし、ストレス反応性造血の不全を 10 日間観察した。更に、ノック・イン・マウス凝血塊のマクロファージによる貪食吸収遅延を、末梢血 0.2 ml で凝血塊を作成し、野生型マウスの腹腔中に挿入

＜結果＞Gln137Glu-RP S19

ノック・イン・マウスは稔性で、成長も正常だった。カラゲニン胸膜炎では強い出血性胸水（図 1）と、肺実質の血管周囲性白血球浸潤（図 2）の持続が特徴的だった。全身性反応として脾臓の著しい腫脹が認められた。これらの所見は C5a/RP S19 の胸腔内投与により明らかに改善した。ストレス反応性造血の低下が2日目から8日

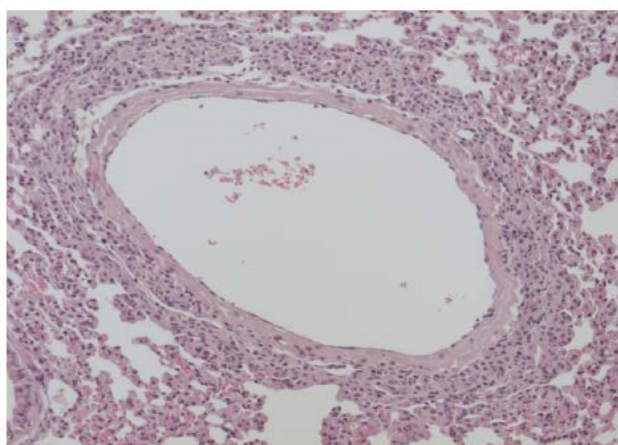


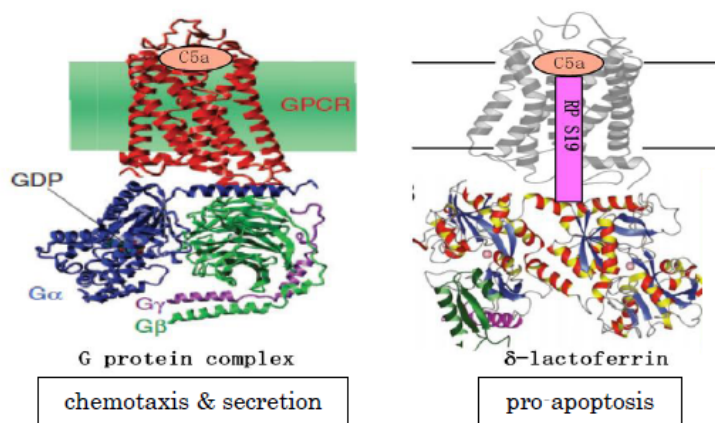
図 2-2

目に亘って骨髓において認められた。特に、好塩基性赤芽球の形成が低下していた。野生型マウス腹腔内での凝血塊の吸収も、ノック・イン・マウス由来凝血塊において明らかな遅延が認められた。一方 in vitro の実験で、C5a 受容体に結合した C5a/RP S19 の C 末端部が多核球のデルタ・ラクトフェリンに結合することでアンタゴニスト効果が発現することが見出された。

＜まとめ＞

RP S19 のリボソーム外機能が選択的に障害されたノック・イン・マウスを制作した。このマウスを用いて様々な病態モデルを作り出すことが可能になるとともに、それらの病態モデルマウスを治療薬開発の評価にも用いることが期待される。その際、C5a 受容体の深部に侵入してデルタ・ラクトフェリンと結合する能力を持つ分子形を組換えタンパク質や合成ペプチドあるいは類似分子でデザインする必要があることが示唆された（図 3）。

図 3



編集：一般社団法人 バイオマーカー研究会

〒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

医療法人社団前田記念会 前田記念腎研究所

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