

公募助成「腎不全病態研究助成」研究サマリー

研究名	透析患者の血中エリスロフェロンとその干渉物質の鉄代謝系への影響
所属機関	医療法人翠悠会 翠悠会診療所
氏名	田中 賢治
<p>目的：Western blotting 法で患者血清中の ERFE タンパクの存在を確認後、ERFE 抗原抗体反応を阻害する干渉物質の存在する透析患者血清が鉄代謝系に及ぼす影響について HepG2 肝細胞培養系で検討した。</p> <p>方法：1) Western blotting 法による健常コントロールと透析患者の血清中の ERFE タンパクの確認；一次抗体に anti-myonectin/CTRP15(Human)Purified IgG, 二次抗体に anti-rabbit IgG-HRP を用い, 健常コントロール血清, 患者透析前血清, 患者透析後血清をそれぞれ 100 倍に希釈して Western blotting 法を行った。</p> <p>2) 血清添加による HepG2 細胞の鉄代謝関連因子の発現の変化；① 健常コントロール血清, ② 透析例の透析前血清, ③ 透析例の透析後血清をそれぞれ 0.1%, 1%, 10% に調製し, HepG2 細胞に添加し 4 時間, 24 時間後の Hhepcidin, Ferroportin, ERFE の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法により測定した. PCR の内在性コントロールとして 18S rRNA, β-actin, GAPDH を使用した。</p> <p>結果:1) Western blotting 法: 健常コントロール, 患者血清ともに ERFE standard protein と同様に 56kD 付近にバンドが認められ, 2.5~5.0ng/mL 以上のタンパク量が認められ, 健常コントロールと患者血清間に明らかな差は認められず, 透析例においても血清中の ERFE タンパクの存在を確認した。</p> <p>2) HepG2 細胞において Hhepcidin, Ferroportin, ERFE の mRNA がそれぞれ発現していることを確認した. 0.1% の血清添加では Hhepcidin, Ferroportin, ERFE のいずれにおいてもコントロールと患者血清とで差がなかった. しかし, 1% 以上の濃度の血清添加では透析前血清で Hhepcidin mRNA の有意な上昇が認められ, 濃度依存的, 時間依存的な上昇が認められ, 10% 24 時間刺激で 10 倍以上の発現上昇が認められた. 透析後血清でも, 透析前血清と同様の傾向であった. 24 時間後では健常コントロールの血清添加においても, 透析血清よりも低いものの発現上昇が確認された. Ferroportin mRNA では血清間, 濃度, および刺激時間による明らかな違いはなく, 10% 24 時間刺激で 3 種類の血清ともに, やや発現が低下していた. また, ERFE mRNA は HepG2 細胞で発現しており 10% 24 時間刺激で 3 種類の血清ともやや発現が増加していた. 患者血清中には Hhepcidin の産生を惹起する因子が存在するが, Ferroportin にはほとんど影響しないことが示唆された。</p>	