

生体不安定鉄の生成と毒性の発現機構

Formation and Toxicity of Labile Plasma Iron

金沢医科大学総合医学研究所 客員教授 西田 雄三
YUZO NISHIDA
Visiting Professor of Kanazawa Medical University

1. 慢性腎臓病 (CKD) と生体不安定鉄

近年、慢性腎臓病(CKD)という新しい病気概念が指摘され、世界中で注目されている¹⁾。慢性腎臓病では、ステージ4の段階にはいと透析導入となる。透析治療は、週3回は必要であり、しかも1回の透析に要する時間は4時間にもなり、患者のクオリティオブライフ(QOL)を損なうとともに、労働の機会を損失させている。そのため、ステージ3の段階で治療を行い、透析導入、心血管疾患合併を防ぐことができれば、1.2兆円超と言われている日本の多大な透析医療費の削減につながる。

この慢性腎臓病の発症因子については、いろいろ想定されている。その中でも一番危険視されているのは、生体内にある余剰鉄イオンであると考えられている。この余剰鉄イオンは、しばしば生体不安定鉄(labile plasma iron)ともNTBI(non-transferrin-bound iron)とも呼ばれている^{2,4)}。慢性腎臓病や各種生活習慣病の予防治療法として、生体不安定鉄を除去する治療法が有望視されているが、そのためには生体不安定鉄の実態を明らかにする必要がある。

2. アボトランスフェリンと鉄キレートとの相互作用

われわれは、いくつかの鉄キレートによる腎毒性・ガン発生の発現機構を、これまでに提起してきたが^{5,6)}、実際の生体不安定鉄の生成機構・構造に関しては、いまでも解明されていない。生体不安定鉄は、しばしばいろいろな臓器の表面に沈着という形で現れる。例えば、無セルロプラスミン血症患者の脳・肝臓・脾臓・心臓に鉄イオンの沈着

がみられ、それに相応して多彩な神経症状・網膜変性・糖尿病を発症するようになる⁷⁾。同様な鉄沈着は、鉄過剰症患者にも多く見られる²⁾。臓器に沈着しているのは、主として水酸化鉄(III)であり、これは水には溶けないので、これ自身は毒性を示すことはない。しかし、この水酸化鉄(III)は、いろいろなアミノ酸・ペプチド化合物と反応して溶解し、それが毒性を示す可能性が高い。

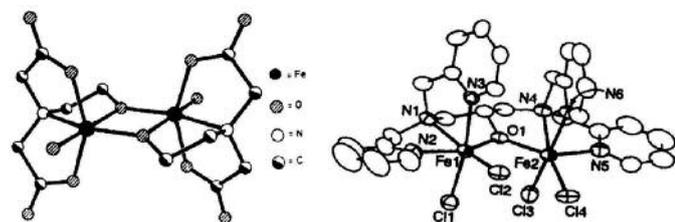
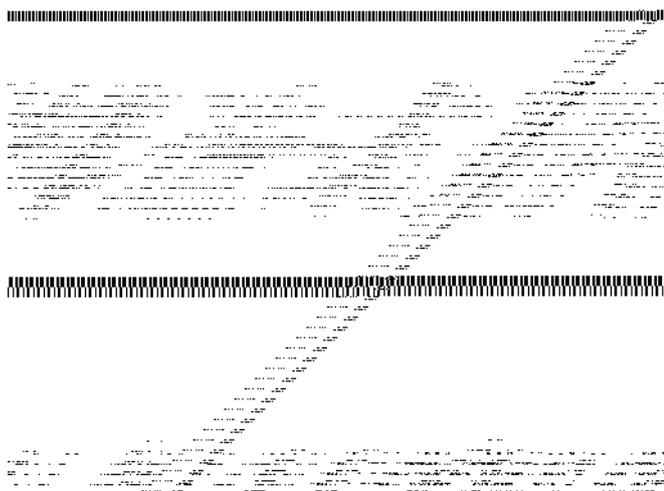
通常、血漿中の鉄イオンは、トランスフェリンと結合していて毒性はない。しかし、トランスフェリンとは結合せずに、毒性を示す鉄イオンが体内に確実に存在すると推測される^{2,4)}。その生体不安定鉄の生成機構を明らかにし、その除去法を早く確立することが「慢性腎臓病や各種生活習慣病の予防治療法」への近道となる。スキーム1に示したように、フェリチンから出た2価の鉄イオンは、セルロプラスミン(血中の主なフェロオキシダーゼ)で酸化されトランスフェリンへ移行する。われわれは、フェリチンから出てきた鉄イオンはペプチドを含むキレートであると考えているが、現状ではこの時のキレート構造に関して何ら情報はない。この鉄(II)キレートがセルロプラスミンで酸化され、鉄(III)キレートとなって、トランスフェリンにとり込まれるといわれているが、鉄(III)イオンがトランスフェリンへ移行する過程も全く解っていない。



スキーム1

そこでわれわれはまず、いろいろな鉄(III)キレートとアポトランスフェリンとの相互作用を検討し、鉄(III)イオンの取り込み過程を明らかにすることを目的に研究を始めた。鉄(III)イオンがアポトランスフェリンへ移行したかは、ESRスペクトル法⁸⁾に加えてキャピラリー電気泳動法(CE)も利用した⁵⁾。後者の方法では、鉄イオンの取り込みと同時に、CEにおけるピークの強度の増大が観測される。これは、鉄イオンの取り込みに伴うタンパク質のコンフォーメーション変化に由来すると指摘している⁹⁾。これらの手法を用いた結果から^{5,6)}、アポトランスフェリンは鉄キレートをきちんと識別していることが明らかになった。たとえば、 $H_3(hida)$ や $H(HPTP)$ のキレート剤(表1)は、鉄(III)イオンと反応して二核構造のキレート(図1)を形成するが、後者の鉄キレートの鉄(III)イオンのみが、トランスフェリンへ移行する^{5,6)}。

表1 キレート剤の構造

図1 左： $Fe_2(hida)_2(H_2O)_2$ の結晶構造と、右： $Fe_2(HPTP)Cl_4$ の結晶構造⁶⁾

二核 $Fe_2(hida)_2$ キレートの鉄イオンは、その立体的条件のため、2個の鉄イオンが同時にタンパク質表面とは相互作用できないが、 $Fe_2(HPTP)Cl_4$ 錯体では、水溶液中で4個の塩化物イオンが解離するので、2個の鉄(III)イオンは同時にタンパク質表面と結合できる点異なる(スキーム2)。



スキーム2

この事実と、多くの錯体に関する結果をもとにすると、二核錯体における2個の鉄(III)イオンが同時に相互作用できることが、アポトランスフェリンへの移行に必須な条件であることが解った^{5,6)}。二核 $Fe_2(hida)_2$ や単核 $Fe(edta)$ キレートに似た構造も持つ鉄キレートが(edta:表1)は、トランスフェリンには移行しないので、この種の鉄キレートは血漿中に存在できることが明らかになった。ただし、これらの鉄キレートには毒性がない⁸⁾。

3. タンパク質表面での金属キレートとの結合

スキーム2で、金属キレート中の金属イオンのタンパク質表面での相互作用の重要性を示した。この相互作用とは金属イオンがタンパク質表面のアミノ酸残基の主として酸素原子と結合することを意味するが、実際にこれを確認しておく必要がある。われわれは、いろいろなタンパク質と金属錯体(バナドセンジクロライドなど)との反応をESRスペクトルで調べた。バナドセンジクロライドは、シクロペンタジエニルアニオンを含むバナジウム(IV)錯体である。この錯体は、不対電子を1個持っているのでESRスペクトルの測定対象になる。これと同じ構造をもつ、チタンセンジクロライド(対応するチタン(IV)錯体)は、アポトランスフェリンと反応して、チタン(IV)イオンがトランスフェリンに移動する。この特性を用いて鉄イオンが過剰になるのを食い止めてガン発生を防ごうとする制ガン剤としての可能性が注目されている化合物である¹⁰⁾。

ウレアーゼにバナドセンジクロライドを加えた溶液のESRスペクトル(室温、水溶液)では、16本のシグナルが観測できるが、この事実はバナジウム(IV)イオンが、タンパク質表面と結合していることを明らかに示している¹¹⁾。同じ実験をアポトランスフェリンで行うと、最初16本のESRシグナルが観測されるが、時間とともに8本になる(図2)¹¹⁾。これは表面に結合したバナジウム(IV)イオンは酸化されて、ESRで検出されなくなるが、トランスフェリンに取り込まれたバナジウム

(IV) イオンは酸化されないため、8本のESRシグナルがずっと残ることになる。これらの事実から二核バナジウム(IV)錯体を利用した制ガン剤の開発を行っている¹¹⁾。



図2 アポトランスフェリンとバナドセンジクロライドとの混合溶液のESRスペクトル¹¹⁾(X-band、室温)
(A)混合直後、(B)混合後60分(↓印の8本は消失し、*印の8本はずっと残る。)

これをマンガン(III)キレートで行うと、興味深い。Mn(dpea)₂Cl₂錯体はマンガン(II)イオンを含む錯体で無色である(dpea:表1)。この水溶液は時間とともに徐々にマンガン(III)キレートが酸化されて薄い褐色になるが、ESRシグナルは観測できない。この溶液にアポトランスフェリンを加えるとESRスペクトルは一変し、オキソ架橋二核Mn(III)/Mn(IV)錯体に特有な16本のシグナルが観測される。これは、アポトランスフェリンとマンガン(III)イオンがアポトランスフェリン表面で相互作用・結合していることを示しており、その結果マンガンイオンの酸化反応を経て、マンガンイオンがトランスフェリンに取り込まれていくのである^{12,13)}。

4. 水酸化鉄(III)沈着の形成機構

さきは無セルロプラスミン血症患者および鉄過剰症患者のいろいろな臓器に水酸化鉄(III)イオンの沈着が観察されると述べたが、その過程を再現できるものであろうか。水酸化鉄(III)の沈殿は、たとえば塩化第二鉄(III)の水溶液に水酸化ナトリウム溶液を加えれば得ることが

できる。しかし、この過程は生体内ではありえない。現在、生体内での水酸化鉄(III)の生成モデルとしては、次の2例が知られている。

イミノ二酢酸のオキソ架橋二核鉄(III)錯体⁸⁾、Fe₂O(ida)₄の水溶液を35℃以上に温めると、水酸化鉄(III)の沈殿が生じてくる(ida:表1)。通常鉄(III)イオンはキレートを生成すれば安定化すると思われがちであるが、そうではない。これは、この構造でのFe-O-Fe骨格の弱さが原因で錯体が壊れて沈殿になるのである¹⁴⁾。これに反してFe₂O(ida)₂錯体は同じオキソ架橋二核錯体であるが、ずっと安定で、沈殿は生じない。ヘモジデリン(鉄過剰症患者に多く見られる)から水酸化鉄沈着が生じることは解っている^{15,16)}。そのときの水酸化鉄沈着生成は、水溶性のFe₂O(ida)₄錯体から水酸化鉄(III)の沈殿が生成するのと同じ機構で進行している可能性が高い。同様に無セルロプラスミン血症患者の鉄沈着もこの機構で生じていると考えられる。

もうひとつの例は、亜鉛イオンの効果である。たとえば、Fe₂O(edda)₂のオキソ架橋二核錯体⁵⁾の溶液を通常の方法で調製する(edda:表1)。この溶液はそのままでは安定で、これにアミロイド(1-40)やアルブミンを加えてもなんの変化も見られない。これに塩化亜鉛の水溶液を加えると、タンパク質の沈殿ができると同時に水酸化鉄(III)の沈殿が生じる¹⁷⁾。この沈殿生成の機構は今でも不明であるが、アミロイド斑には、鉄イオンと亜鉛イオンが多く含まれていることから¹⁸⁾、アミロイド斑形成モデル反応としても興味深い。

5. 生体不安定鉄の形成とその除去法

イミノ二酢酸のオキソ架橋二核鉄(III)錯体Fe₂O(ida)₂は、高い腎毒性を示す^{4,5)}。このタイプの錯体は、生体内では容易に形成される可能性がある。水酸化鉄(III)は、いろいろなアミノ酸・ペプチドと反応してキレートを生成して溶解する。また、ヘモジデリンからも同様な鉄キレートが遊離する可能性が高い。このような鉄キレートは、血漿中のpHが7.3程度であることを考えれば、その多くはオキソ架橋二核種Fe-O-Fe(または、それ以上の多核種)として存在すると考えられる。実際、オキソ架橋二核錯体Fe₂O(epy)₂Cl₂は、単核錯体Fe(epy)Cl₃(黄色結晶)をメタノール水溶液に溶かすだけで褐色の結晶として得られる¹⁹⁾

(ep:表1)。

このようなオキソ架橋二核鉄(Ⅲ)種は、そのままアポトランスフェリンと反応して鉄イオンがトランスフェリンに移行する場合もあるが、この種の錯体が過酸化水素や還元系酵素と反応すると、高い毒性を発揮することになる^{5,6)}。これが、生体不安定鉄による鉄毒性発現の本質であり、この種の鉄キレート鉄イオンを定期的に除くことが必要になろう。

現在、この生体不安定鉄を除去する治療法として、(1)瀉血療法、(2)鉄制限食法、(3)鉄キレート剤による薬物療法、などがある。瀉血療法は、患者のQOLの改善にはよいが、貧血や低たんぱく血症などの副作用があり、貧血の無い患者に対してのみ適用可能である。鉄制限食法は、栄養のアンバランスなどの副作用があり、一部の肝疾患のみ適用可能である。鉄キレート剤による薬物療法の効果は顕著であり、輸血後鉄過剰症の患者に対して主に利用されている。しかし、軽度の鉄過剰または鉄代謝異常による一部臓器での鉄関連障害では、オーバーキレートによる副作用の頻度が高いと言われている。ごく最近、海外で製造された経口投与できる除鉄剤が日本でも承認されて使用されているが、この除鉄剤の腎毒性も懸念されている⁶⁾。

われわれは、これまでの除鉄用キレート剤を見直し、毒性がなく、かつ、生体不安定鉄のみを捕捉できる除鉄剤を開発した²⁰⁾。この除鉄剤の特徴は、(1)ペプチドよりなる鉄キレートの鉄(Ⅲ)イオンを完全に捉えることができる、(2)トランスフェリンの鉄イオンとは相互作用しない、(3)除鉄剤と鉄イオンで生成した鉄(Ⅲ)キレートには毒性がないこと、である。現在、更に無毒化を進めた新規除鉄用キレート剤の合成にも成功している。

アルツハイマー病・パーキンソン氏病・プリオン病などへの生体不安定鉄イオンの関与が指摘されていることもあり^{6,9,18,21)}、今後、われわれが開発した高度に無毒化された新規生体不安定鉄除去剤が、慢性腎臓病などの各種生活習慣病や神経性疾患の予防・治療に大きく貢献できると期待している。

引用文献

- 1) 日本慢性腎臓病対策協議会: CKDについて, <http://j-ckdi.jp/ckd/index.html> (2010/8/12)
- 2) 岡田茂, 「鉄と人体の科学」悠飛社(2005)
- 3) B. Dresow, D. Peterson, R. Fischer & P. Nielsen, *Biometals*, **21**, 273-276 (2008)
- 4) D. Lane, J. R. & A. Lawen, *J. Biol. Chem.* **283**, 12701-12708 (2008)
- 5) Y. Nishida, Y. Ito & T. Satoh, *Z. Naturforsch.* **62C**, 608-612 (2007)
- 6) Y. Nishida, *TCI Mail*, **141**, 2-15 (2009)
- 7) K. Yoshida, K. Kaneko, H. Miyajima, T. Tokuda, A. Nakamura, M. Kato & S. Ikeda, *J. Neurol. Sci.* **175**, 91-95 (2000)
- 8) R. Mizuno, T. Kawabata, Y. Sutoh, Y. Nishida & S. Okada, *Biometals*, **19**, 675-683 (2006)
- 9) Y. Nishida, *TCI Mail*, **135**, 2-11 (2007)
- 10) A.D. Tinoco, E. V. Eames, & A. M. Valentine, *J. Amer. Chem. Soc.*, **130**, 2262-2270 (2008)
- 11) Y. Nishida, A. Niinuma & K. Abe, *Inorg. Chem. Communications*, **12**, 198-200 (2009)
- 12) Y. Nishida, *The Chemical Times*, **208**, 15-21 (2008)
- 13) K. Abe, Y. Chiba & Y. Nishida, *Z. Naturforsch.* **63c**, 154-156 (2008)
- 14) Y. Sutoh, Y. Okawamukai, S. Nishino & Y. Nishida, *Z. Naturforsch.* **61c**, 149-154 (2006)
- 15) P. M. Harrison, P. Arosio, *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 161 (1996)
- 16) N. D. Chasteen, P. M. Harrison, *J. Struct. Biology*, **126**, 182 (1999)
- 17) Y. Okawamukai, Y. Sutoh & Y. Nishida, *Synth. React. Inorg. Metal-org. Nano-Metal Chem.* **36**, 373-375 (2006)
- 18) A. I. Bush, *Trends Neuroscience*, **26**, 273-214 (2003)
- 19) S. Ito, T. Okuno, H. Itoh, S. Ohba, H. Matsushima, T. Tokii & Y. Nishida, *Z. Naturforsch.* **52b**, 719-727 (1997)
- 20) 西田雄三、高後裕、佐々木勝則、生田克哉、特願2008-243095 (2008)
- 21) A. Gaest, R. C. Hider, *Brit. J. Pharm.* **146**, 1041-1059 (2005)