

## 食塩感受性高血圧における鉄の関与と新規治療への応用

内藤 由朗, 増山 理

兵庫医科大学内科学循環器内科

**概要 【目的】** 鉄は生体にとって必須の微量元素であり、その不足は様々な健康障害をもたらす。しかし、鉄の過剰は酸化ストレスの原因となり、慢性的な鉄過剰状態は高血圧・動脈硬化の原因となる。本研究では、鉄過剰状態と高血圧という観点から、食塩感受性高血圧の病態形成における鉄の関与を検討した。

**【方法および結果】** 食塩感受性高血圧モデル動物である Dahl 食塩感受性高血圧 (DS) ラット、5/6 腎摘出慢性腎臓病モデル (CKD) ラットに通常食、高食塩食、鉄制限食を与え、血圧、心拍数、尿蛋白量などの変化を生理学的に検討し、大動脈における鉄代謝調節分子の発現を定量的 RT-PCR 法、Western blot 法、免疫組織染色法にて比較検討した。高食塩食を負荷した DS ラット大動脈組織中の鉄含有量は、正常食を与えたラットより多い傾向にあり、このラットに高食塩・鉄制限食を与えると、高食塩負荷にもかかわらず血圧上昇が抑制され生命予後が著明に改善された。高食塩食を負荷した DS ラット大動脈組織をマッソン・トリクローム染色で観察すると中膜肥厚・線維化、つまり、大動脈リモデリングを認めるのに対し、鉄制限食を与えた群では、それが抑制されていた。また、CKD ラットにおける検討でも同様に、鉄制限食を与えた群では血圧上昇が抑制され、CKD ラットにおける著明に増加した 1 日尿中蛋白量も、鉄制限食を与えた群では低下していた。腎組織では CKD ラットに認めた糸球体硬化、尿細管拡張所見が鉄制限食群では抑制されていた。そこで、食塩感受性高血圧における鉄の関与・分子機構を検討し、細胞内への鉄取り込みに重要な役割を担うトランスフェリン受容体 1 遺伝子及び蛋白質発現が、高血圧を示す DS ラットおよび CKD ラット大動脈において亢進していることを見出した。

**【結論】** 食塩感受性高血圧の病態形成における鉄の関与、及び食塩感受性高血圧に対する非薬物療法の一つとして、鉄制限療法の可能性を示した。

### 1. 研究目的

鉄は生体にとって必須の微量元素であり、その不足は様々な健康障害をもたらす。しかし、鉄の過剰は酸化ストレスの原因となり、慢性的な鉄過剰状態は高血圧・動脈硬化の原因となる。例えば、動脈硬化巣における鉄沈着やマウスを用いた基礎研究においては、鉄制限による動脈硬化巣の縮小効果が報告されている<sup>(1)</sup>。また、閉塞性動脈硬化症患者を対象に瀉血にて鉄を減少させた群とさせなかった群における予後を比較検討した臨床研究においては、鉄を減少させた群の死亡率減少が報告されている<sup>(2)</sup>。

一方、カロリー制限による寿命延長効果<sup>(3)</sup>や心血管保護効果が報告されている<sup>(4,5)</sup>。しかし、鉄制限のみによる

心血管保護効果、特に食塩感受性高血圧に対する効果は不明である。

本研究においては、鉄過剰と高血圧という観点から、食塩感受性高血圧の病態形成における鉄の関与及び、それに対する鉄制限の効果を検討した。

### 2. 研究方法

食塩感受性高血圧モデル動物である Dahl 食塩感受性高血圧 (DS) ラット、5/6 腎摘出慢性腎臓病モデル (CKD) ラットに通常食、高食塩食、鉄制限食を与え、血圧、心拍数、尿蛋白量などの変化を生理学的に検討し、大動脈における鉄代謝調節分子の発現を定量的 RT-PCR 法、Western blot 法、免疫組織染色法にて比較検討した。具

体的な実験プロトコルを示す。

## 2. 1 DS ラットを用いた検討

DS ラットは、高食塩負荷を行うと血圧が上昇し心不全や慢性腎臓病を発症する。本研究では、先天的食塩感受性高血圧モデル動物として DS ラットを用いた。6 週齢♂ DS ラットに 12 週間通常食、高食塩食、高食塩+鉄制限食を負荷し、生存率を評価した。また、負荷後各種臓器を採取し、血管の形態学的変化などを検討した (Figure 1)。

## 2. 2 CKD ラットを用いた検討

CKD ラットは、7 週齢♂Sprague-Dawley ラットの左腎を摘出し、その 1 週間後右腎 2/3 を摘出し作成した。CKD ラットは、残存機能ネフロン低下により腎性高血圧を示す。本研究では、後天的食塩感受性高血圧モデル動物として CKD ラットを使用した。この CKD ラットに 16 週間通常食、鉄制限食を負荷し、血圧、腎機能の変化を評価した。また、負荷後各種臓器を採取し、血管の形態学的変化などを検討した (Figure 2)。

## 3. 研究結果

### 3. 1 DS ラットを用いた検討

DS ラットに高食塩食を負荷すると、収縮期血圧は徐々に上昇したが、このラットに高食塩・鉄制限食を与えると、高食塩負荷にもかかわらず血圧上昇は抑制され、生命予後が著明に改善された (Figure 3)。

高食塩食を負荷した DS ラット大動脈組織をマッソン・トリクローム染色で観察すると中膜肥厚・線維化、つまり、大動脈リモデリングを認めるのに対し、鉄制限食を与えた群では、それが抑制されていた。また、亢進した大動脈における collagen III、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 遺伝子発現も、鉄制限食を与えた群では、それが減弱していた (Figure 4)。

そこで、食塩感受性高血圧における鉄の関与・分子機構を検討し、細胞内への鉄取り込みに重要な役割を担うトランスフェリン受容体 1 (TfR1) 遺伝子及び蛋白質発現が、高血圧を示す DS ラット大動脈において亢進していること、高食塩食を負荷した DS ラット大動脈組織中の鉄含有量が、正常食を与えたラットより多い傾向にあることを見出した (Figure 5)。

### 3. 2 CKD ラットを用いた検討

CKD ラットにおける検討でも同様に、鉄制限食を与えた群では血圧上昇が抑制され、大動脈における TfR1 発現が、CKD ラット大動脈においても亢進していることを突き止めた (Figure 6)。

CKD ラットにおける著明に増加した 1 日尿中蛋白量も、鉄制限食を与えた群では低下していた (Figure 7)。腎組織では CKD ラットに認めた糸球体硬化、尿管拡張所見が鉄制限食群では抑制されていた。

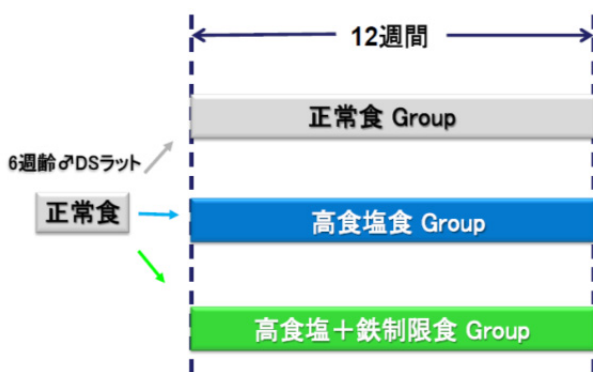


Figure 1. Experimental protocol 1

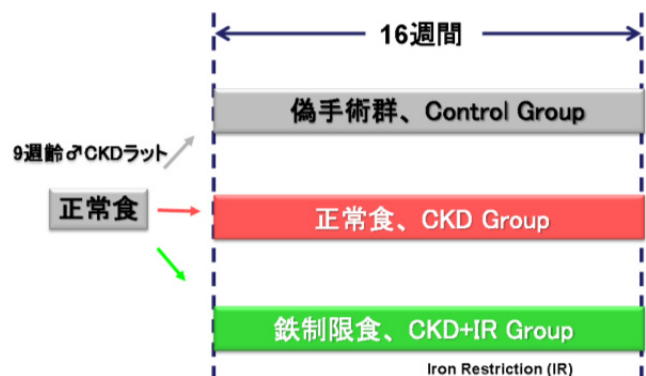


Figure 2. Experimental protocol 2

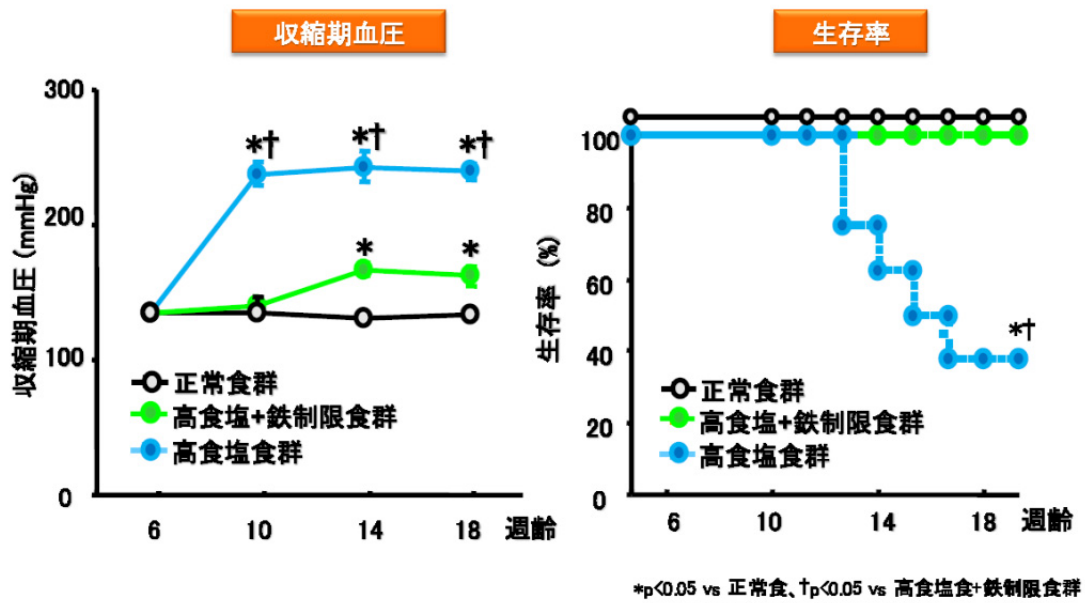


Figure 3. Effects of dietary iron restriction on systolic blood pressure and prognosis in Dahl salt-sensitive rats

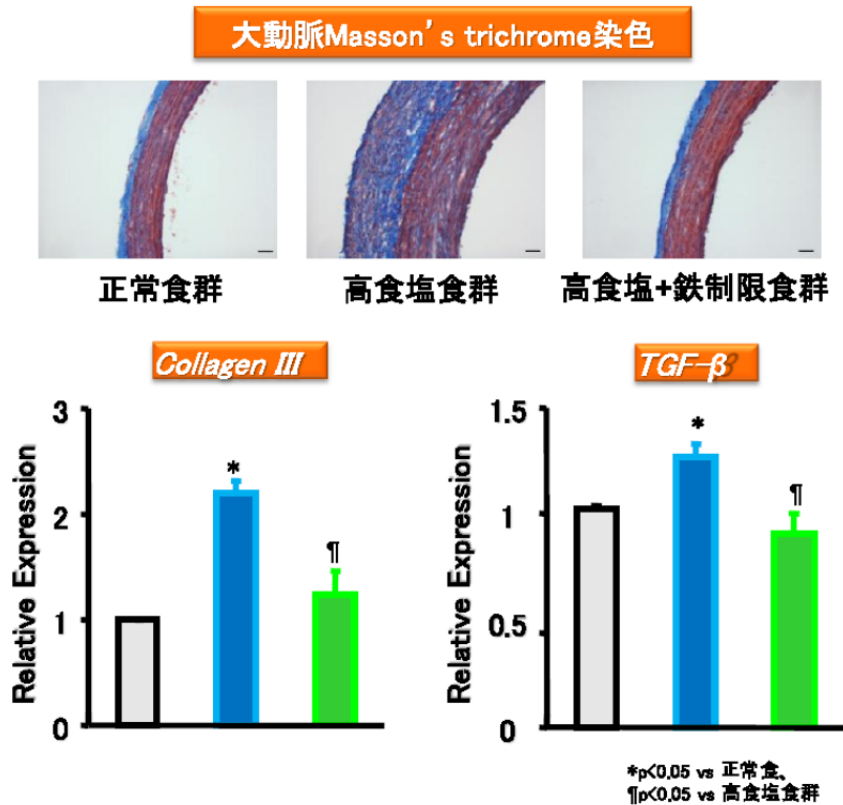


Figure 4. Effects of dietary iron restriction on vascular remodeling in Dahl salt-sensitive rats

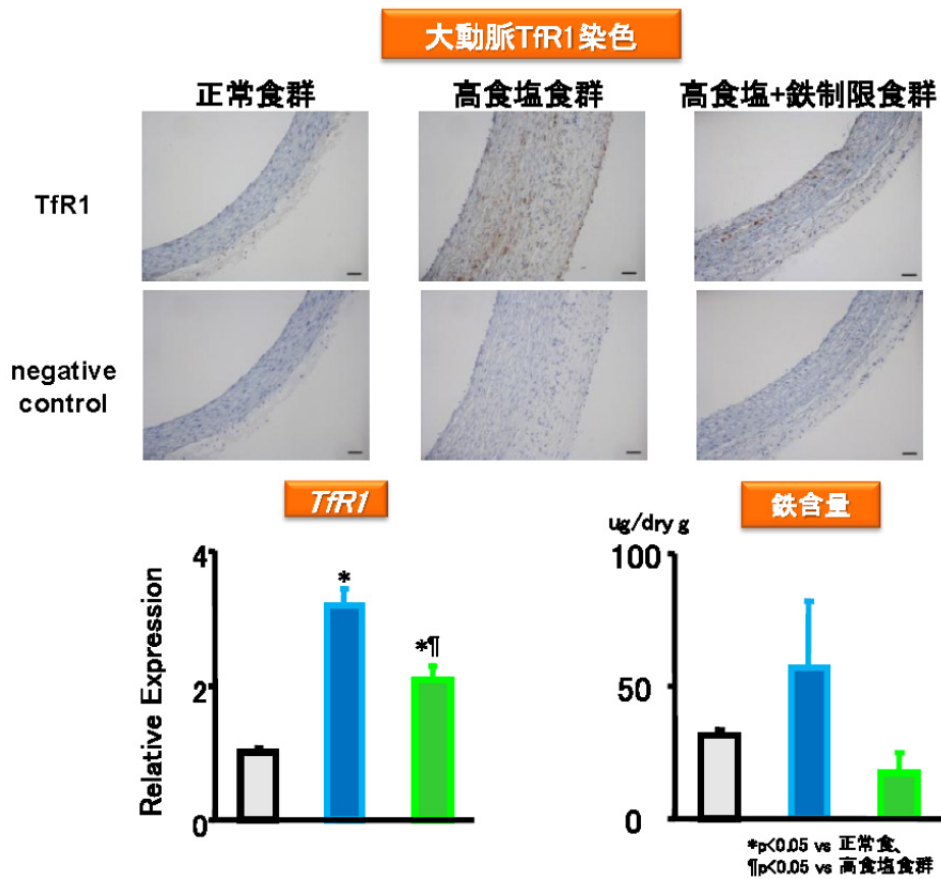


Figure 5. Aortic TfR1 expression and iron contents in Dahl salt-sensitive rats

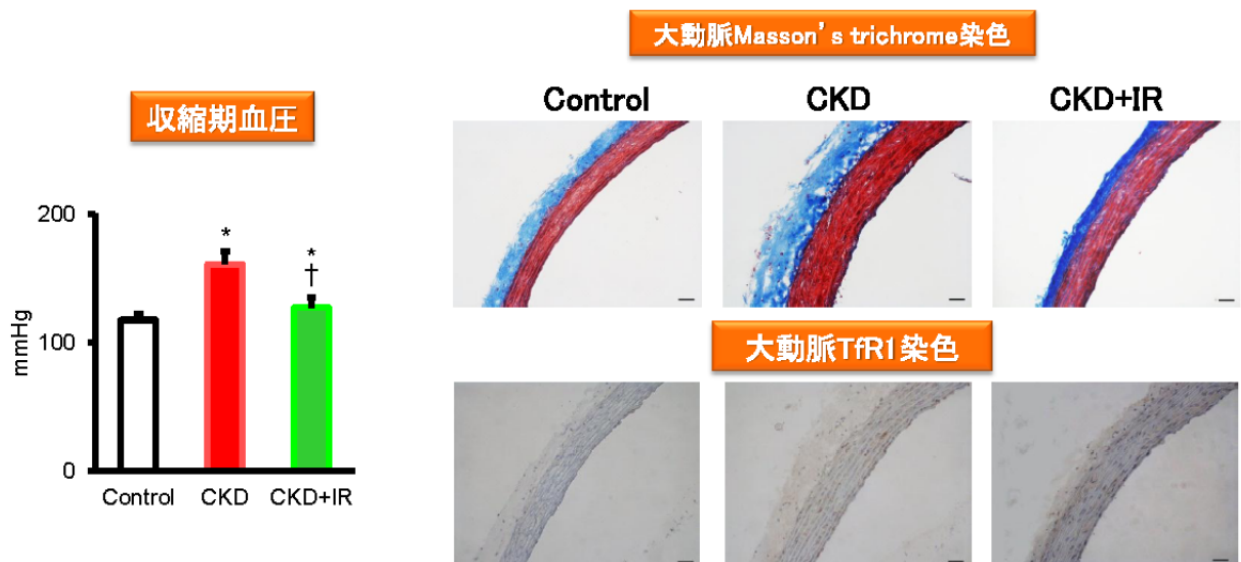


Figure 6. Systolic blood pressure, vascular remodeling, and aortic TfR1 expression in CKD rats

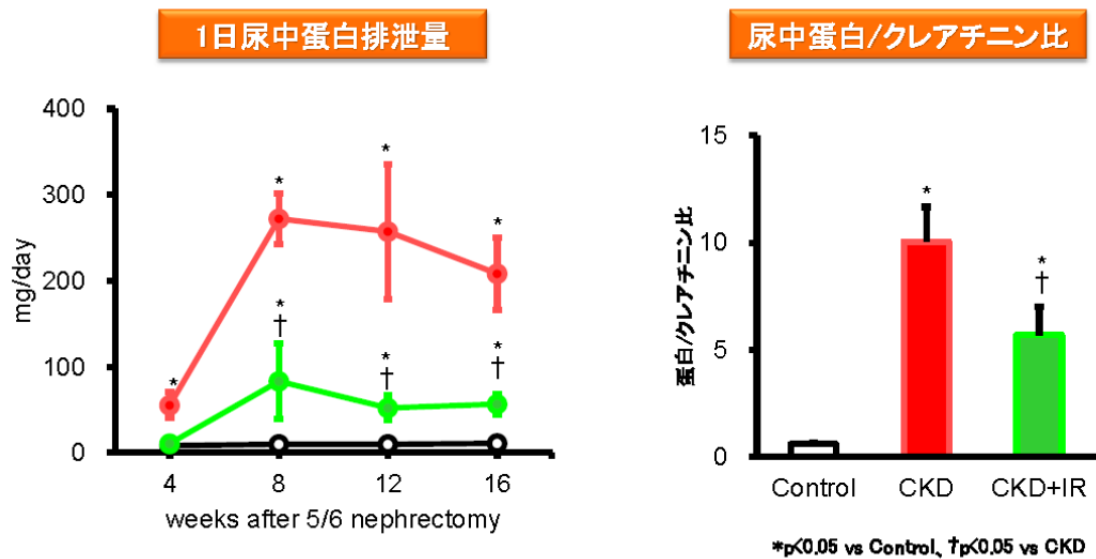


Figure 7. Effects of dietary iron restriction on proteinuria in CKD rats

#### 4. 考察

本研究では、食塩感受性高血圧の病態形成における鉄の関与を示した。また、食塩感受性高血圧に対する非薬物療法の一つとして、鉄制限療法の可能性を先天性および後天性食塩感受性高血圧モデル動物を用いて明らかにした。

細胞が鉄を取り込む主な経路は、トランスフェリン受容体 1 (TfR1) を介する。すなわち、血清中の鉄はトランスフェリンに結合して運搬され、TfR1 によって各細胞に取り込まれる。例えば、細胞に鉄が不足すると TfR1 発現が増加し、細胞内へ鉄が取り込まれる。逆に、細胞内が鉄過剰状態になると TfR1 発現は低下する。本研究では、血管リモデリングにおける鉄の関与・分子機構を検討し、細胞内への鉄取り込みに重要な役割を担う TfR1 遺伝子及び蛋白質発現が、血管リモデリングを示す Dahl 食塩感受性高血圧ラットおよび CKD ラット大動脈において亢進していることを見出した。すなわち、鉄制限食を与えた群では、細胞内の鉄が不足するために大動脈 TfR1 発現は増加していたが、高血圧を示す高食塩食を与えた Dahl 食塩感受性高血圧ラットおよび CKD ラット大動脈においても TfR1 発現が亢進していることを見出したことは重要な知見である。

つまり、食塩感受性高血圧ラット大動脈においては、TfR1 発現が亢進し、細胞内への鉄取り込みが亢進→鉄含有量が増加→酸化ストレス亢進→血管リモデリング・高

血圧が発症していることが示唆された。そして、このラットに鉄制限食を与えると、大動脈 TfR1 発現が亢進しているにも関わらず、細胞内への鉄取り込みがなされず、鉄含有量減少→酸化ストレス低下→血管リモデリング抑制→血圧上昇の抑制、との機序が考えられた。

#### 5. 今後の課題

本研究は、食塩感受性高血圧モデルラットを用いた検討結果であり、ヒトにおいても同様の機序が存在するのかを検討する必要がある。血管 TfR1 に着目した食塩感受性高血圧の研究は本研究が世界初であり、今後さらなる展開が期待される。

#### 文献

1. Lee TS, Shiao MS, Pan CC, Chau LY. Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Circulation*. 99: 1222-1229, 1999.
2. Zacharski LR, Chow BK, Howes PS, Shamayeva G, Baron JA, Dalman RL, Malenka DJ, Ozaki CK, Lavori PW. Decreased cancer risk after iron reduction in patients with peripheral arterial disease: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 100: 996-1002, 2008.
3. Kenyon C. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell*. 120: 449-460, 2005.

4. Seymour EM, Parikh RV, Singer AA, Bolling SF. Moderate calorie restriction improves cardiac remodeling and diastolic dysfunction in the Dahl-SS rat. *J Mol Cell Cardiol.* 41: 661-668, 2006.
5. Shinmura K, Tamaki K, Saito K, Nakano Y, Tobe T, Bolli R. Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase. *Circulation.* 116: 2809-2817, 2007.

## The Role of Iron in Salt Sensitive Hypertension

Yoshiro Naito, Tohru Masuyama

Cardiovascular Division, Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine

### Summary

**Background:** Iron is associated with the pathogenesis of cardiovascular and renal diseases. Here, we investigated whether iron participates in the mechanism of salt sensitive hypertension and the effects of dietary iron restriction on salt sensitive hypertension.

**Methods and Results:** We used Dahl salt-sensitive rats and chronic kidney disease (CKD) rats as a salt sensitive hypertension model. CKD was induced by 5/6 nephrectomy in Sprague-Dawley rats. Dahl salt-sensitive rats were provided either a normal or high-salt diet. A further subset of Dahl salt-sensitive rats fed a high-salt with iron-restricted diet for 11 weeks. Dahl salt-sensitive rats given a high-salt diet developed hypertension, heart failure, and decreased a survival rate after 11 weeks diet. In contrast, iron restriction attenuated the development of hypertension and heart failure, thereby improved a survival rate. Dietary iron restriction suppressed cardiovascular hypertrophy, fibrosis, and inflammation in Dahl salt-sensitive rats given a high-salt diet. In addition, CKD rats exhibited hypertension and vascular remodeling. In contrast, iron restriction attenuated the development of hypertension and vascular remodeling. CKD rats also developed proteinuria, glomerulosclerosis, and tubulointerstitial damage, whereas those changes were suppressed by iron restriction. Importantly, aortic expression of cellular iron import protein, transferrin receptor 1 was upregulated in both Dahl salt-sensitive rats fed a high-salt diet and CKD rats.

**Conclusions:** Taken together, these data suggest a causal role for iron in the pathogenesis of salt sensitive hypertension. Iron restriction could be an effective strategy for prevention of high salt-induced organ damage in salt-sensitive hypertensive patients.