

食塩感受性高血圧に対する鉄制限の効果とその分子機序の解明

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る。一方、鉄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動脈硬化の原因となる。我々はこれまでに Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用いた検討において、鉄制限による降圧効果を報告してきた。本研究では、食塩感受性高血圧に対する鉄制限の効果とその分子機序をさらに検討する。

【方法および結果】 本研究では、食塩感受性高血圧モデル動物として 5/6 腎摘出慢性腎臓病モデル (CKD) ラットを用いた。《予防効果の検討》術後 1 週より 2 群に分け、通常食または鉄制限食を与えた。《治療効果の検討》術後 8 週 (CKD 病変確立後) より 2 群に分け、通常食または鉄制限食を与えた。両検討において 16 週間後に各種臓器を採取し、偽手術群を Control 群として、3 群間にて比較検討した。血圧、一日尿中蛋白排泄量などの変化を継続的に評価し、腎臓における鉄代謝調節分子の発現などを定量的 RT-PCR 法、Western blot 法、免疫組織染色法にて比較検討した。《予防効果の検討》手術 16 週間後 CKD 群は高血圧を呈したが、鉄制限群では血圧上昇が抑制された。また、CKD 群では一日尿中蛋白排泄量が増加したが鉄制限群ではその増加が抑制された。《治療効果の検討》CKD 群で認めた高血圧に対する抑制効果は示されなかったが、一日尿中蛋白排泄量の増加は、鉄制限により抑制された。両検討において、鉄制限により一日尿中 Na 排泄量は増加し、K 排泄量は減少した。腎臓における腎鉍質コルチコイド受容体 (MR) 活性を解析したところ、CKD ラットでは亢進し、鉄制限群では低下していた。また、MR 制御因子の一つである低分子量 GTPase Rac1 活性も鉄制限群にて低下していた。

【結論】 CKD モデルを用いて食塩感受性高血圧に対する鉄制限の効果を示した。その機序として、鉄制限による腎臓 Rac1-MR 活性抑制経路が示唆された。

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。興味深いことにマウス・ヒト動脈硬化巣への鉄沈着が報告されている^{1,2)}。我々はこれまでに食塩感受性高血圧モデル動物であるダール食塩感受性高血圧ラットを用いた検討において食塩感受性高血圧の病態形成における鉄の関与および鉄制限の効果を報告してきた³⁾。

本研究は食塩感受性高血圧における鉄の関与および鉄制限の効果についてその分子機構をさらに解明し、食塩感受性高血圧の予防・治療に貢献するための研究基

盤を確立することが目的である。

2. 研究方法

ダール食塩感受性高血圧ラットは遺伝的な食塩感受性高血圧モデルとし、本研究では、後天的な食塩感受性高血圧モデルとして 5/6 腎摘出慢性腎臓病モデル (CKD) ラットを用いた。CKD ラットに通常食、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、腎臓における鉄代謝調節分子などの発現を定量的 RT-PCR 法、Western blot 法、免疫組織染色法などにて比較検討した。具体的な実験プロトコールを示す。

2. 1 CKD ラットを用いた鉄制限による予防効果の検討

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ラットに術後1週より2群に分け、通常食または鉄制限食16週間を与え、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、分子機構を検討した。偽手術群をControl群として、3群間に比較検討した(Figure 1)。

2.2 CKDラットを用いた鉄制限による治療効果の検討

CKDラット術後8週(CKD病変確立後)より2群に分け、通常食または鉄制限食を与え、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、分子機構を検討した(Figure 2)。

3. 研究結果

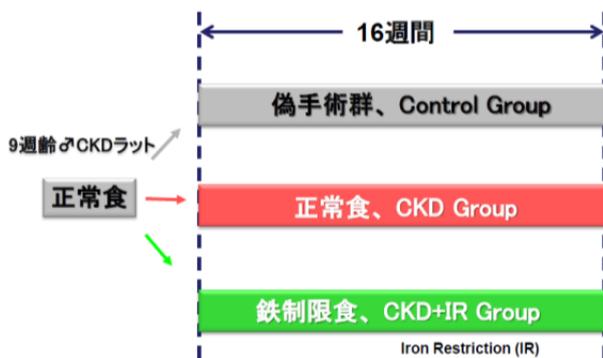


Figure 1. Experimental protocol 1

3.1 CKDラットを用いた鉄制限による予防効果の検討

術後CKDラットは徐々に血圧上昇を認め高血圧を呈したが、鉄制限群では血圧上昇が抑制された(Figure 3)。また、CKD群では一日尿中蛋白排泄量が増加したが、鉄制限群ではその増加が抑制された。(Figure 4)。

CKDラット腎組織をPeriodic acid-Schiff(PAS)染色、マッソン・トリクローム(MT)染色、CD68免疫染色で観察すると、糸球体硬化、尿細管拡張、間質線維化、CD68陽性マクロファージ浸潤所見を認めるのに対し、鉄制限群ではそれらが抑制されていた。また、CKD群における亢進した腎臓collagen III、CD68遺伝子発現も、鉄制限群では減弱していた(Figure 5)。

CKDラットにおける鉄制限の効果の分子機構を検討していくなかで、鉄制限により一日尿中Na排泄量が増加し、K排泄量は減少することを見出した(Figure 6)。

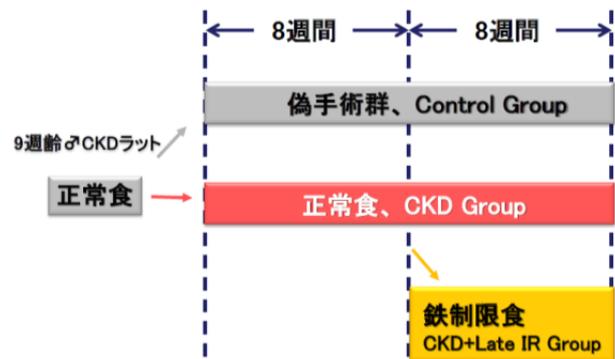


Figure 2. Experimental protocol 2

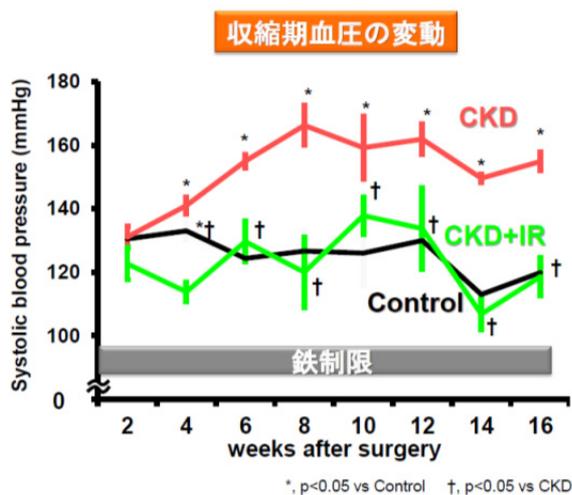


Figure 3. Effects of iron restriction on systolic blood pressure in CKD rats

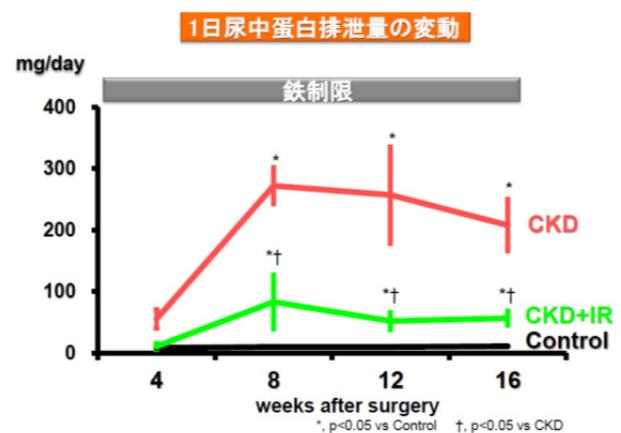


Figure 4. Effects of iron restriction on proteinuria in CKD rats

腎組織・遺伝子発現の変化

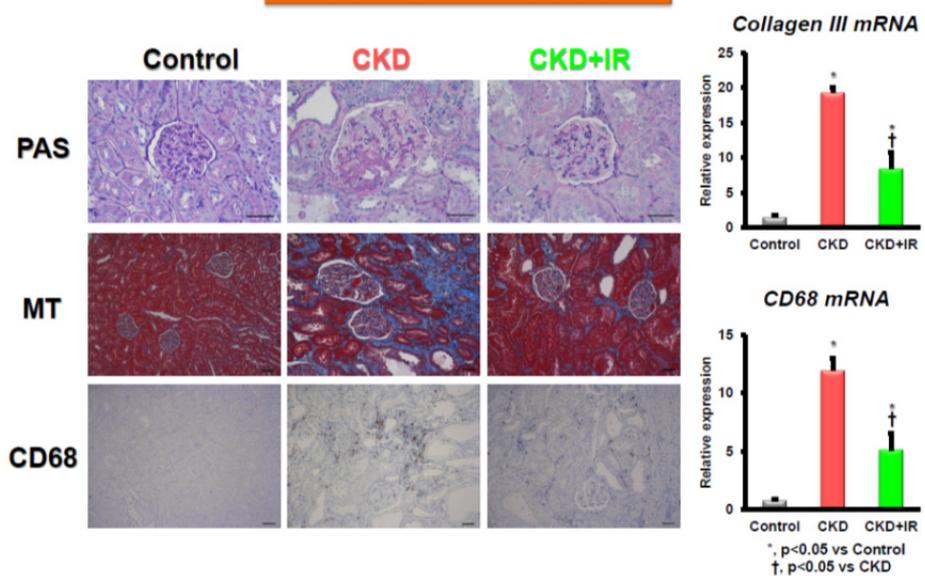


Figure 5. Effects of iron restriction on renal structural change in CKD rats

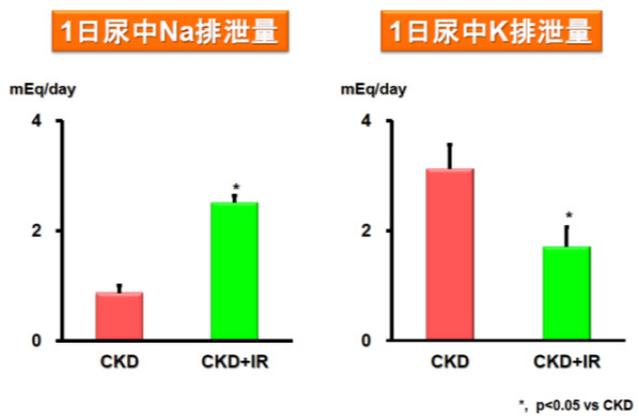


Figure 6. Effects of iron restriction on urinary sodium and potassium excretions in CKD rats

次に、腎臓における腎鉍質コルチコイド受容体(MR)活性を解析したところ、CKD ラットでは亢進し、鉄制限群では低下することを見出した。さらに、MR 制御因子の一つである低分子量 GTPase Rac1 活性も CKD ラットでは亢進し、鉄制限群では低下すること、MR シグナルの下流にある SGK1 遺伝子発現が鉄制限により減弱することを見出した(Figure 7)。

また、CKD ラット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)および divalent metal transporter 1(DMT1)発現が、CKD ラット腎尿細管において亢進していること、そしてベルリンブルー染色に

てCKDラット腎尿細管における鉄沈着を見出した(Figure 8)。

3. 2 CKD ラットを用いた鉄制限による治療効果の検討

次に、CKD 病態形成後の鉄制限の効果を検討した。CKD 群で認めた高血圧に対する抑制効果は示されなかったが(Figure 9)、一日尿中蛋白排泄量の増加は、鉄制限により抑制された(Figure 10)。

興味深いことに、CKD 病態形成後の鉄制限においても、鉄制限により一日尿中 Na 排泄量は増加し、K 排泄量は減少した(Figure 11)。さらに、腎臓における Rac1・MR 活性はCKDラットで亢進し、鉄制限群で低下することを見出した(Figure 12)。

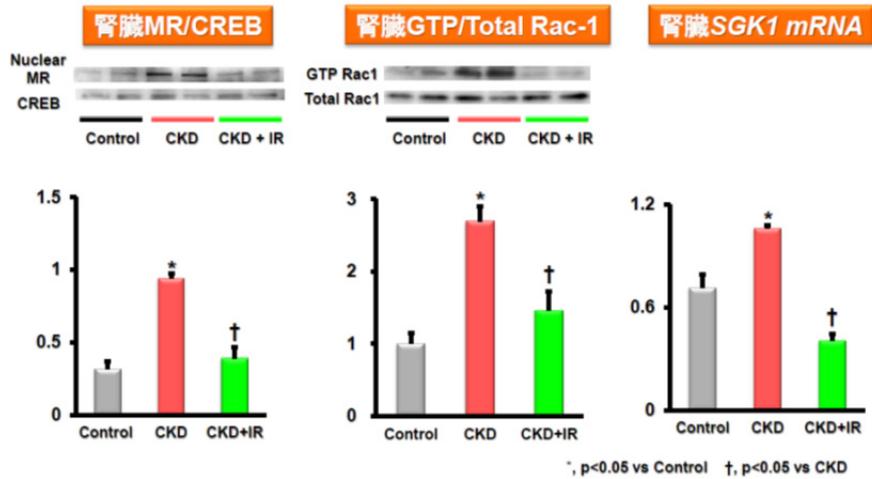


Figure 7. Effects of iron restriction on renal mineralocorticoid receptor and Rac1 activity in CKD rats

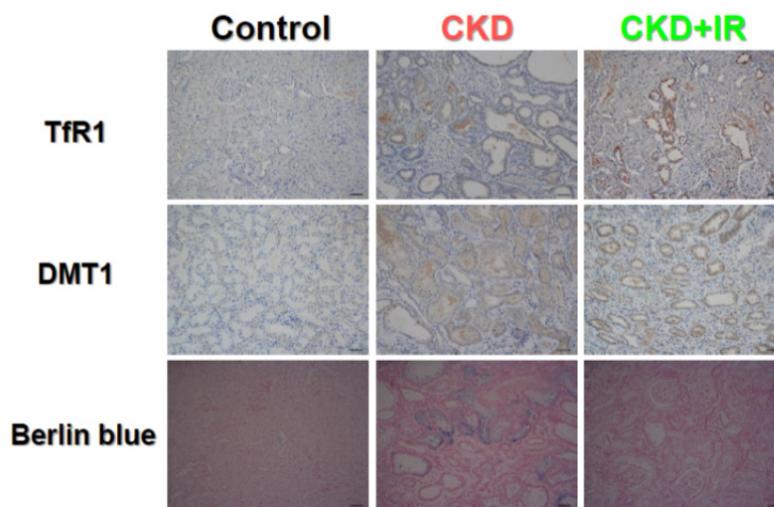


Figure 8. Expression of intracellular iron transport proteins in the kidney of CKD rats

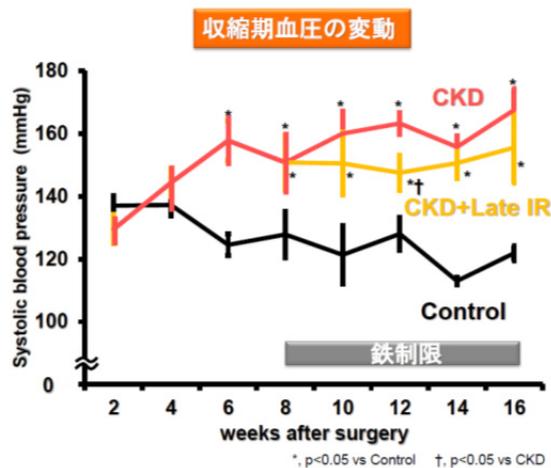


Figure 9. Effects of late intervention with iron restriction on systolic blood pressure in CKD rats

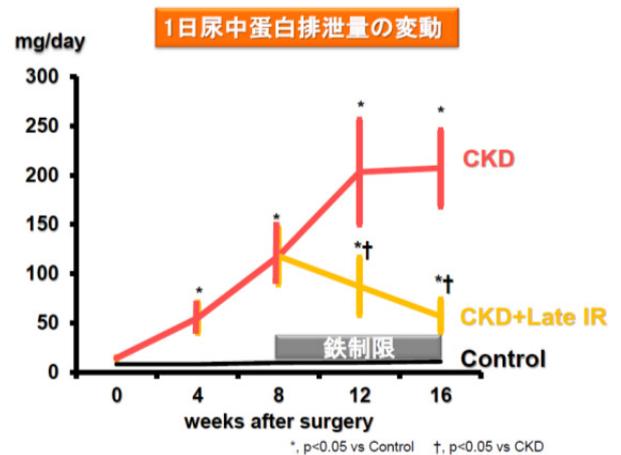


Figure 10. Effects of late intervention with iron restriction on proteinuria in CKD rats

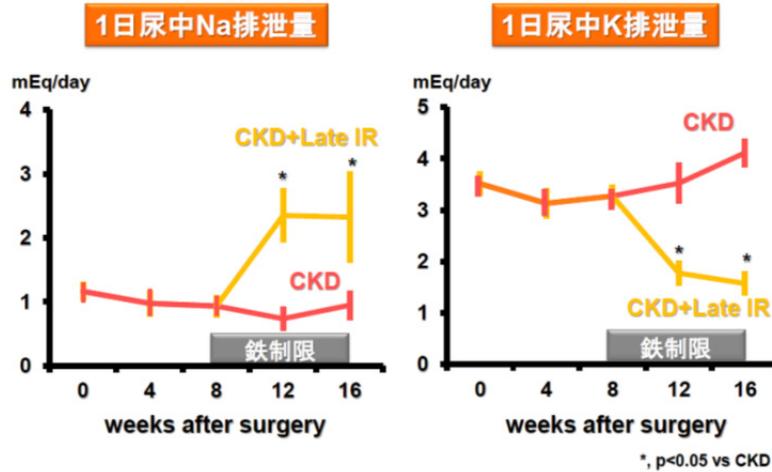


Figure 11. Effects of late intervention with iron restriction on urinary sodium and potassium excretions in CKD rats

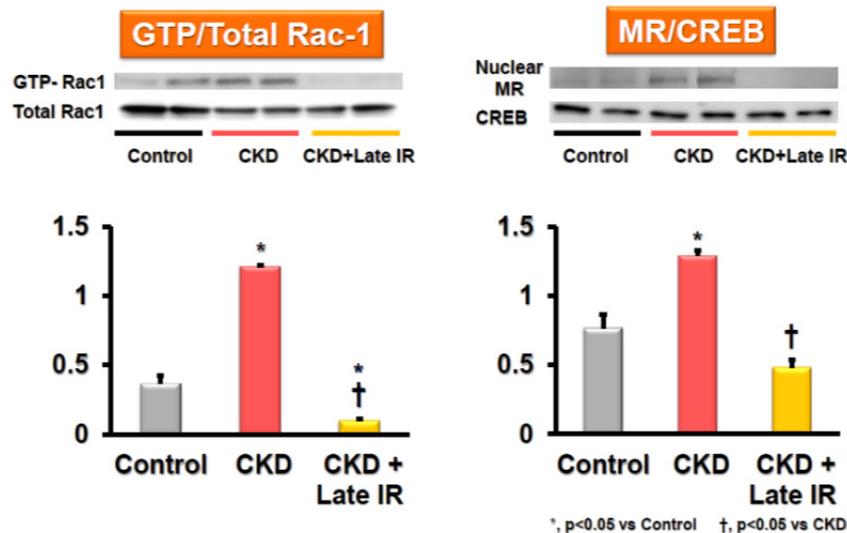


Figure 12. Effects of late intervention with iron restriction on renal mineralocorticoid receptor and Rac1 activity in CKD rats

4. 考察

本研究では、食塩感受性高血圧に対する鉄制限の効果とその分子機構を検討した。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、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 TfR1 発現が、CKD ラット腎臓において亢進していることを見出した。すなわち、鉄制限群では、細胞内の鉄が不足するために腎臓 TfR1 発現は増加していたが、

高血圧を示す CKD ラット腎臓においては、人工的に鉄制限していないにも関わらず TfR1 発現が亢進していること、さらに異常鉄取り込みにより CKD ラット尿細管に鉄沈着していることを示唆したことは重要な知見である。また、鉄制限による腎臓 Rac1-MR 活性抑制経路を見出し、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。

5. 今後の課題

我々の既報のダール食塩感受性高血圧ラットを用いた研究³⁾および本研究結果は、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。鉄制限による腎臓

MR シグナル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) Yunoki K, Naruko T, Komatsu R, Ehara S, Shirai N, Sugioka K, Nakagawa M, Kitabayashi C, Ikura Y, Itoh A, Kusano K, Ohe T, Haze K, Becker AE, Ueda M. Enhanced expression of haemoglobin scavenger receptor in accumulated macrophages of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 30: 1844-1852, 2009.
- 3) Naito Y, Hirotsani S, Sawada H, Akahori H, Tsujino T, Masuyama T. Dietary iron restriction prevents hypertensive cardiovascular remodeling in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 57: 497-504, 2011.

Effects of Iron Restriction on Salt Sensitive Hypertension

Yoshiro Naito, Tohru Masuyama

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

Summary

Background: Iron accumulation is associated with the pathogenesis of cardiovascular disease and chronic kidney disease (CKD). Here, we investigated the effects of dietary iron restriction on salt sensitive hypertension in a rat model of CKD.

Methods and Results: CKD was induced by 5/6 nephrectomy in Sprague-Dawley rats. After operation, 5/6 nephrectomized rats were given iron-restricted diet from 1 day to 16 week for prevention protocol or from 8 week to 16 week for rescue protocol. Other CKD rats were given a normal diet. Sham-operative rats given a normal diet were served as a control. At 16 weeks after surgery, CKD rats developed hypertension, proteinuria, glomerulosclerosis, podocyte injury, and tubular dilatation. In contrast, dietary iron restriction prevented the development of hypertension and renal damage. Importantly, expression of cellular iron transport proteins, transferrin receptor 1 and divalent metal transporter 1 was increased in the CKD renal tubules, along with increased iron accumulation. On the other hand, late intervention with iron restriction did not remarkably ameliorate preexisting hypertension, while late intervention with iron restriction prevented further progression of preexisting renal damage in CKD rats. Of Interest, iron restriction led to increased urinary sodium and decreased urinary potassium excretions in CKD rats. Moreover, iron restriction attenuated renal expression of nuclear mineralocorticoid receptor (MR) and Rac1 activity in CKD rats.

Conclusions: Dietary iron restriction prevents the development of hypertension and renal damage, and further deterioration of preexisting renal damage. These beneficial effects of iron restriction seem to be associated with inhibition of renal MR signaling. Iron restriction could be an effective strategy for prevention of high salt-induced organ damage in salt-sensitive hypertensive patients.