

食塩感受性高血圧におけるトランスフェリン受容体 1 の役割

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、慢性的な鉄過剰状態は酸化ストレス、動脈硬化の原因となる。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及び 5/6 腎臓摘出慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) モデル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、特に高血圧性障害臓器における鉄取り込み受容体 トランスフェリン受容体 1 (Transferrin Receptor 1: TfR1) の関与を明らかにしてきた。本研究は食塩感受性高血圧の病態形成における TfR1 の役割をさらに検討する。

【方法および結果】

- ① TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた血圧と高血圧性臓器障害の検討: TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いて CKD モデルを作成し、血圧、腎機能の変化を評価した。CKD モデル作成後、血圧は著明な変化を認めなかったが、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスは、野生型マウスに比べ腎機能障害が抑制された。
- ② ヒト培養血管平滑筋細胞を用いた TfR1 の役割の検討: ヒト培養血管平滑筋細胞を用いて TfR1 の役割を解析した。具体的には、small interfering RNA (siRNA) を用いて TfR1 発現を抑制し、細胞増殖能・遊走能について検討した。platelet-derived growth factor-BB 刺激による細胞遊走能・増殖能を解析したところ、細胞遊走能は変化なかったが、細胞増殖能は TfR1 siRNA にて抑制された。
- ③ 高血圧患者における血管 TfR1 発現の検討: 大動脈瘤などの高血圧患者を対象に大動脈手術標本における TfR1 発現を解析した。ヒト腹部大動脈瘤の大動脈組織において TfR1 発現が亢進していた。

【結論】高血圧性障害臓器における TfR1 の関与が示された。これらの研究結果は、TfR1 が高血圧性障害臓器に対する新規治療標的となりうることを示唆する。

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、慢性的な鉄過剰状態は酸化ストレス、動脈硬化の原因となる。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及び 5/6 腎臓摘出慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) モデル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、特に高血圧性障害臓器における鉄取り込み受容体 トランスフェリン受容体 1 (Transferrin Receptor 1: TfR1) の関与を

明らかにしてきた⁽¹⁻³⁾。

本研究は食塩感受性高血圧の病態形成における TfR1 の役割を基礎および臨床研究よりさらに検討し、食塩感受性高血圧に対する新規予防・治療戦略の確立を目指す。

2. 研究方法

食塩感受性高血圧の病態形成における TfR1 の関与を、ノックアウトマウスを用いた基礎研究より検討する。さらに、高血圧患者手術標本における大動脈 TfR1 発現について臨床研究を行う。具体的な実験プロトコールを示す。

2. 1 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた血圧と高血圧性臓器障害の検討

TfR1 遺伝子ホモノックアウトマウスは胎生期に貧血と中枢神経の異常のために胎生致死であるが、今回検討する TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスは生存可能である。この TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いて CKD モデルを作成する。CKD モデルは、10 週齢雄性野生型および TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスの左腎を摘出し、その 1 週間後右腎 2/3 を摘出し作成した。TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスの対照として、野生型 (wild-type: WT) マウスを用いた。CKD モデルは、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 モデルを使用した。この CKD モデルを術後 4 週間観察し、血圧、腎機能の変化を評価した (Figure 1)。

2. 2 ヒト培養血管平滑筋細胞を用いた TfR1 の役割の検討

ヒト培養血管平滑筋細胞を用いて TfR1 の役割の解析を行う。具体的には、small interfering RNA (siRNA) を用いて TfR1 発現を抑制することにより、細胞遊走能・増殖能などの変化について検討する (Figure 2)。Figure 2 に示す通り、ヒト培養肺動脈血管平滑筋細胞 (Lonza) を control siRNA あるいは TfR1 siRNA に感染させ、その 24 時間後

に platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB; 20 ng/mL) で刺激する。PDGF-BB 刺激 48 時間後に細胞遊走能及び増殖能の変化について検討した。細胞遊走能は CyteSelect™ 24 Well Cell Migration Assay (Cell BioLabs. Inc), 細胞増殖能は cell counting kit 8 (Dojindo) を用いて評価した。

2. 3 高血圧患者における血管 TfR1 発現と血圧との関連

臨床研究においては、インフォームドコンセントにより同意の得られた大動脈瘤などの高血圧患者を対象に大動脈手術標本における TfR1 発現を解析する。

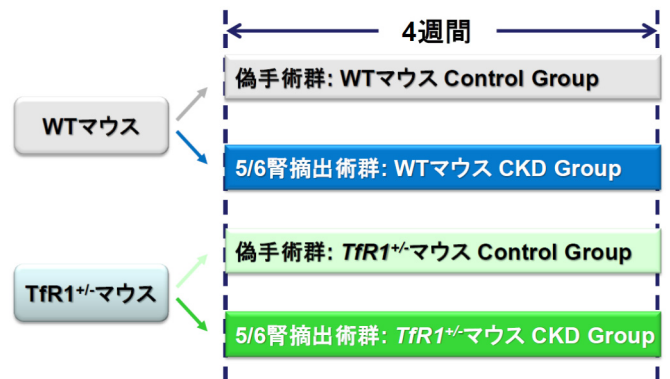


Figure 1. Experimental protocol 1

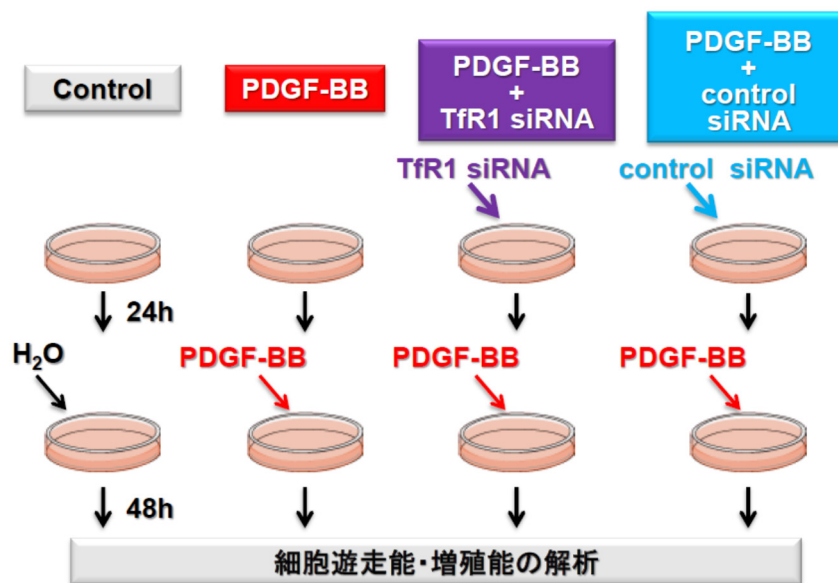


Figure 2. Experimental protocol 2

3. 研究結果

3.1 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた血圧と高血圧性臓器障害の検討

CKD モデルは 5/6 腎臓摘出後 4 週間で血圧は上昇傾向にあったが、4 群間で有意な差を認めなかった (Figure 3)。一方、CKD 群では一日尿中アルブミン排泄量が増加したが、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスでは、その増加が抑制された。(Figure 4)。

4 群間における血清 BUN, クレアチニン濃度を検討したところ、CKD 群では血清 BUN 濃度、及び血清クレアチニン濃度はともに上昇していたが、TfR1 遺伝子ヘテロノ

ックアウトマウスでは、その程度は減弱していた。(Figure 5)。

次に、腎組織を Periodic acid-Schiff(PAS)染色, マッソン・トリクローム(MT)染色で観察したところ、WT CKD 群では糸球体硬化, 腎臓間質線維化所見を認めるのに対し、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスCKD 群ではそれらが抑制されていた (Figure 6)。

また、WT マウスCKD 群における亢進した腎臓 collagen I, collagen III 遺伝子発現は、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウス CKD 群で減弱していた (Figure 7)。

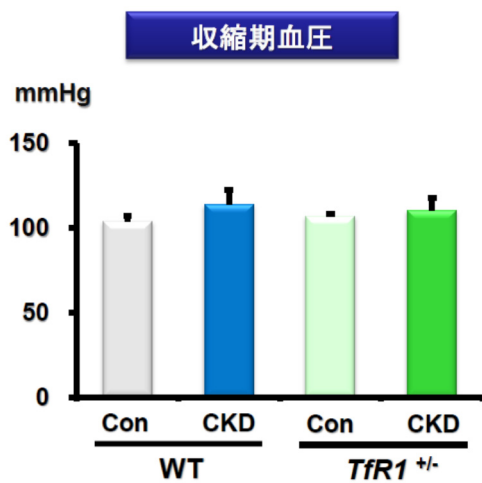


Figure 3. Systolic blood pressure in TfR1^{+/-} mice after 5/6 nephrectomy

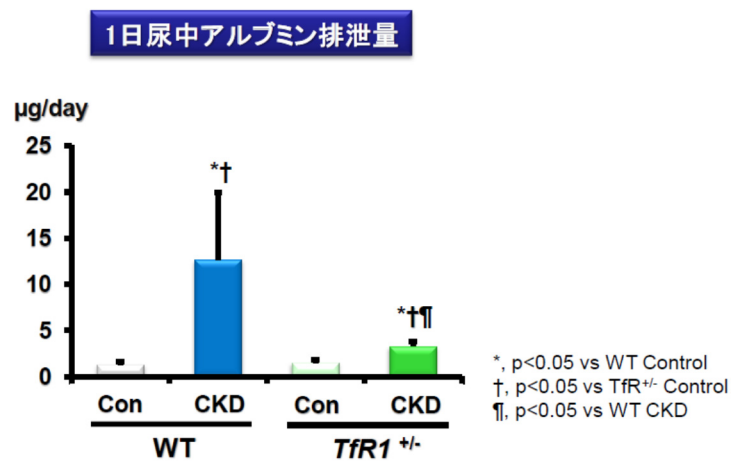


Figure 4. Urinary albumin excretion in TfR1^{+/-} mice after 5/6 nephrectomy

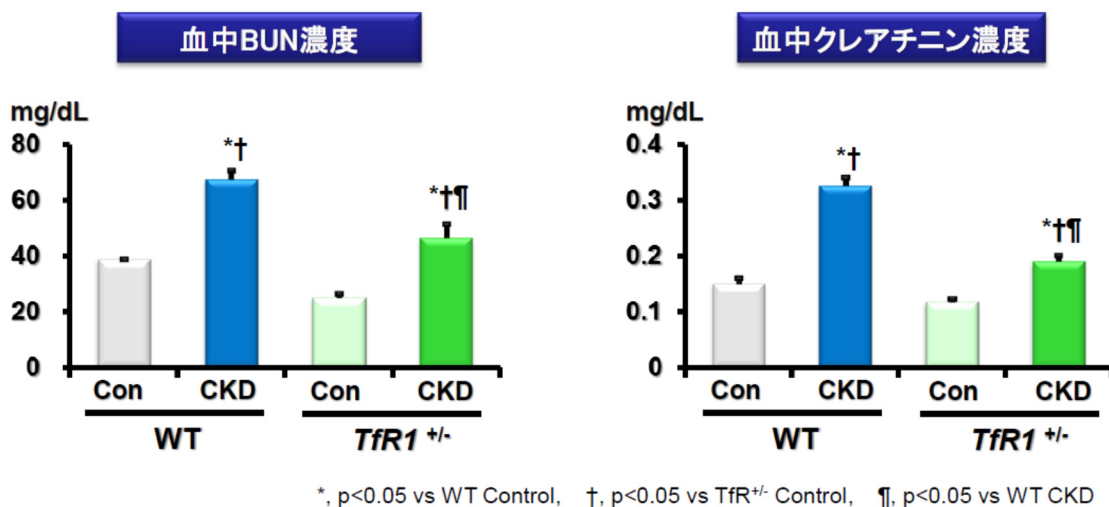


Figure 5. Serum BUN and creatinine levels in TfR^{+/-} mice after 5/6 nephrectomy

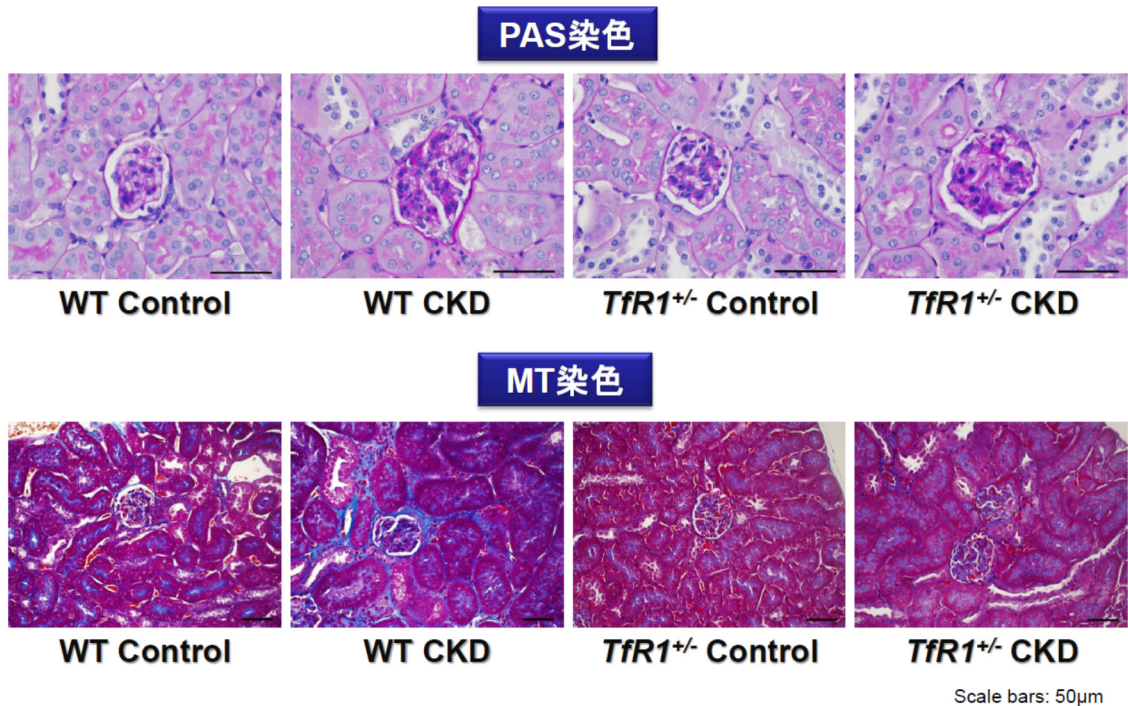


Figure 6. Renal structural change in *TfR1*^{+/-} mice after 5/6 nephrectomy

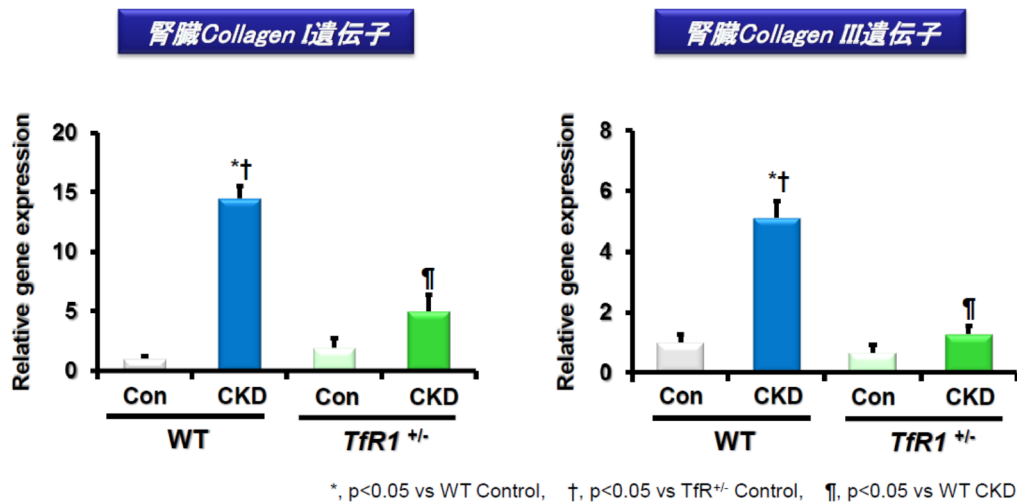


Figure 7. Renal gene expression in *TfR1*^{+/-} mice after 5/6 nephrectomy

3. 2 ヒト培養血管平滑筋細胞を用いた *TfR1* の役割の検討

次に、ヒト培養血管平滑筋細胞を用いて *TfR1* の役割を検討した。まず、ウェスタンブロッド法にて siRNA の効果を確認したところ、*TfR1* siRNA にて *TfR1* 蛋白質発現は減弱していることが確認された (**Figure 8A**)。次に、PDGF-BB 刺激による細胞遊走能・増殖能を解析した。細胞遊走能は PDGF-BB 刺激にて誘導されたが、*TfR1*

siRNA にて変化を示さなかった。一方、細胞増殖能は *TfR1* siRNA にて抑制された (**Figure 8B, C**)。

3. 3 高血圧患者における血管 *TfR1* 発現と血圧との関連

最後に、腹部大動脈瘤患者 (19 例) と非大動脈瘤患者 (大動脈弁閉鎖不全症または大動脈弁狭窄症: 34 例) を対象に大動脈手術標本における *TfR1* 発現を解析した。ウェスタンブロッド法にて *TfR1* タンパク質発現を解析した

ところ、腹部大動脈瘤患者における Tfr1 タンパク質発現は、非大動脈瘤患者に比べ亢進していることがわかった (Figure 9)。

また、免疫組織学的検討においても、腹部大動脈瘤患者における Tfr1 タンパク質発現は、非大動脈瘤患者に比べ亢進していることが確認された (Figure 10)。

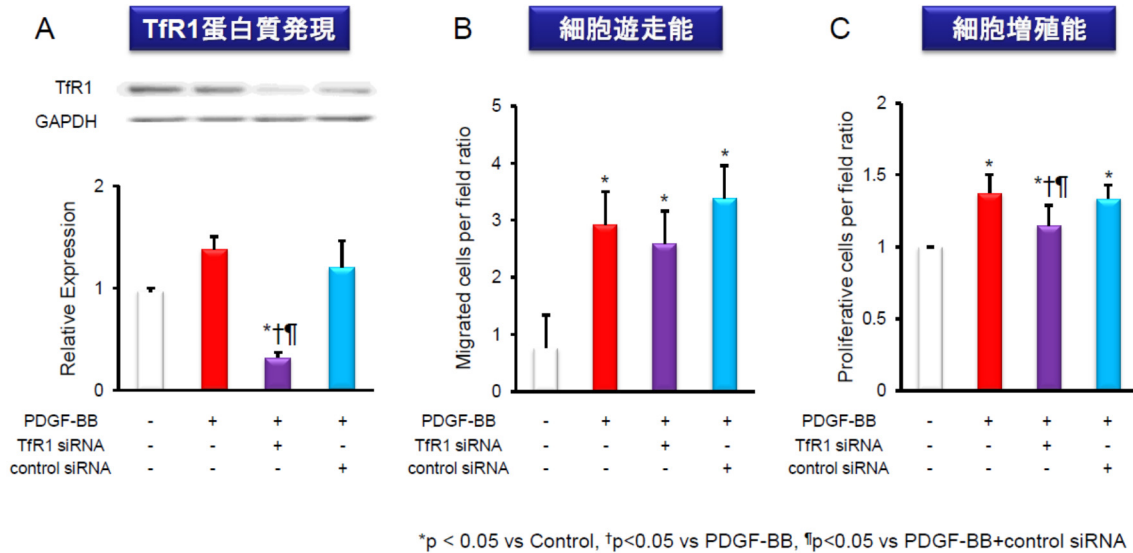


Figure 8. Tfr1 in the proliferation of human artery smooth muscle cells *in vitro*

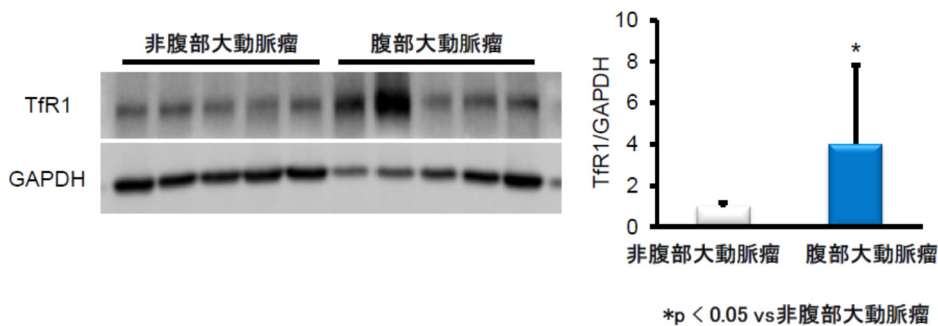


Figure 9. Tfr1 expression in human abdominal aortic aneurysm walls

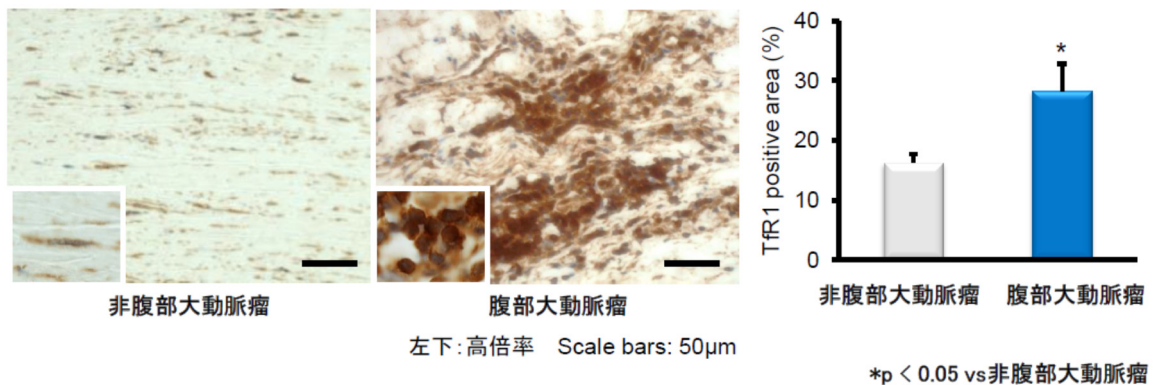


Figure 10. Tfr1 expression in human abdominal aortic aneurysm walls

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 TfR1 の役割を基礎および臨床研究より検討した。我々は、これまでに食塩感受性高血圧モデル動物である Dahl 食塩感受性高血圧ラット及び 5/6 腎臓摘出慢性腎臓病 (CKD) モデルラットを用いた基礎研究にて高血圧性圧負荷により障害された大動脈・腎臓における TfR1 遺伝子及び蛋白質発現が亢進していること、これら臓器に鉄が沈着していることを報告している⁽¹⁻³⁾。細胞が鉄を取り込む主な経路は、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 発現が亢進し、細胞内に鉄が取り込まれる。逆に、細胞内が鉄過剰状態になると TfR1 発現は減弱する。つまり、食塩感受性高血圧モデル動物である Dahl 食塩感受性高血圧ラット及び CKD モデルラット大動脈・腎臓においては、人工的に鉄不足状態にしていなくてもかかわらず TfR1 発現が異常亢進していることを見出している。本研究では、ヒト腹部大動脈瘤の大動脈組織においても TfR1 発現が亢進していることを見出した。また、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験やヒト血管平滑筋細胞を用いた *in vitro* 実験の結果より、食塩感受性高血圧の病態形成、特に高血圧性障害臓器の形成過程における TfR1 の関与が示唆された。これらの研究結果は、TfR1 が高血圧性障害臓器に対する新規治療標的となりうることを示唆す

る。

5. 今後の課題

TfR1 は赤血球膜にも存在し、完全に抑制すると貧血を生じる。今後、どのように TfR1 を抑制するのか、その方法と程度について検討する必要がある。

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。

6. 文 献

1. 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.
2. Naito Y, Fujii A, Sawada H, Hirotsani S, Iwasaku T, Eguchi A, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Effect of iron restriction on renal damage and mineralocorticoid receptor signaling in a rat model of chronic kidney disease. *J Hypertens*. 30: 2192-2201, 2012.
3. Naito Y, Fujii A, Sawada H, Hirotsani S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Dietary iron restriction prevents further deterioration of renal damage in a chronic kidney disease rat model. *J Hypertens*. 31: 1203-1213, 2013.

Role of Transferrin Receptor 1 in Salt Sensitive Hypertension

Yoshiro Naito, Tohru Masuyama

Hyogo College of Medicine

Summary

Background: Cellular iron transport protein, transferrin receptor 1 (TfR1) is required for the uptake of transferrin-bound iron into the cells. Previous reports have shown that iron accumulation is associated with the pathophysiology of cardiovascular disease; however, the role of TfR1 in the pathophysiology of hypertension remains unknown.

Methods and Results: First, to investigate the functional importance of TfR1 in the pathophysiology of hypertension, we subjected to 5/6 nephrectomy in TfR1 hetero knockout mice. Of interest, urinary albumin excretion, serum BUN levels, and serum creatinine levels were increased to a lesser extent in TfR1 hetero knockout mice compared with wild-type (WT) mice. Second, we assessed the functional role of TfR1 in human artery smooth muscle cells *in vitro*. The depletion of TfR1 by RNA interference attenuated human artery smooth muscle cells proliferation induced by platelet-derived growth factor-BB. Finally, we assessed aortic TfR1 expression in human abdominal aortic aneurysm (AAA) walls. Both Western blot and immunohistochemical analyses revealed that TfR1 expression is increased in human AAA walls compared with non-AAA walls.

Conclusions: These results indicate that TfR1 plays a role in the pathophysiology of hypertensive organ damage. Understanding the role of TfR1 in the pathophysiology of hypertensive organ damage may lead to a novel therapeutic approach for hypertensive organ damage.