

## 血管内皮細胞における鉄取り込み受容体と食塩感受性高血圧の関連

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が, 慢性的な鉄過剰状態は酸化ストレスの原因となる。我々はこれまでに食塩感受性高血圧モデル動物を用いた検討において, 食塩感受性高血圧による血管リモデリングの形成過程における鉄の関与, および細胞内への鉄取り込みを担う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。また, 高血圧性腎障害における TfR1 の関与も示してきた。本研究では, これら高血圧性障害臓器における TfR1 の役割について, TfR1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた基礎研究より検討する。

【方法および結果】 ① **TfR1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた血圧と高血圧性血管リモデリングの病態解析:** TfR1<sup>Flox/Flox</sup> マウスと平滑筋細胞で Cre 蛋白を発現する SM22-Cre マウスを交配させ, 血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスを作成した。血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスは, 同胞対象マウスと比し, 血圧, 血管構造の変化を認めなかった。次に, これらマウスに昇圧因子アンジオテンシンIIを投与したところ, 同胞対象マウス, 血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスともに収縮期血圧は上昇したが, 両群間で有意差を認めなかった。一方, 血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスは, 野生型マウスに比べ高血圧性血管リモデリングの程度が抑制された。

② **TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた血圧と腎障害の病態解析:** TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いて 5/6 腎臓摘出慢性腎臓病, 片側尿管結紮水腎症モデルを作成し, 血圧, 腎病変の変化を検討した。両モデル作成後, 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間質線維化が抑制された。

【結論】 高血圧性血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞における TfR1 の関与が示された。また, 腎病変, 特に腎間質線維化における TfR1 の関与が示唆された。

### 1. 研究目的

鉄は生体にとって必須の微量元素であるが, 慢性的な鉄過剰状態は酸化ストレスの原因となる。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や 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, 食塩感受性高血圧による血管リモデリングにおける鉄の関与, および細胞内への鉄取り込みを担う鉄取り込み受容体トランスフェリン受容体 1 の関与を明らかにしてきた<sup>(1-3)</sup>。また, 高血圧性腎障害における TfR1 の関与も示してきた<sup>(4)</sup>。

本研究では, これら高血圧性障害臓器における TfR1 の役割について, TfR1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた基礎研究より検討する。

### 2. 研究方法

#### 2. 1 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた血圧と高血圧性血管リモデリングの病態解析

TfR1<sup>Flox/Flox</sup> マウスと平滑筋細胞で Cre 蛋白を発現する SM22-Cre マウスを交配させ, 血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを作成し, 血圧, 血管構造の変化を解析した。また, 昇圧因子アンジオテンシ

ンII (Ang II) 負荷による血圧の変化, 血管構造変化を解析した。Ang IIは, 浸透圧ポンプを皮下に植え込み 1,000ng/kg/min の割合で 4 週間投与した。Cre 蛋白発現のない同胞マウスを野生型 (Wild-type: WT) マウスとし, Ang IIの対照として生理食塩水を用いた (Figure 1)。マウス血圧は, tail-cuff 法で測定した。

## 2. 2 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた血圧と腎障害の病態解析

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, 腎病変の変化を検討した。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 (WT) マウスを, 5/6 腎臓摘出術の対照として偽手術を行った (Figure 2)。CKD モデルは, 10 週齢雄性マウスの左腎を摘出し, その 1 週間後に右腎 2/3 を摘出し, 作成した。

次に, TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いて, 片側尿管結紮水腎症 (UUO) モデルを作成し, 血圧, 腎

病変の変化を検討した。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 (WT) マウスを, 片側尿管結紮術の対照として偽手術を行った (Figure 3)。UUO モデルは, 10 週齢雄性マウスの左尿管を 2 箇所結紮し, 作成した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 血管平滑筋細胞特異的 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血管リモデリングの病態解析

血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスの大動脈における TfR1 発現は, Cre 蛋白発現のない同胞マウスの WT マウスと比べ, 減弱していることが確認された。そこで, これらマウスの生後 12 週齢の収縮期血圧, 血管構造を観察したところ, 両群間で有意差を認めなかった (Figure 4)。

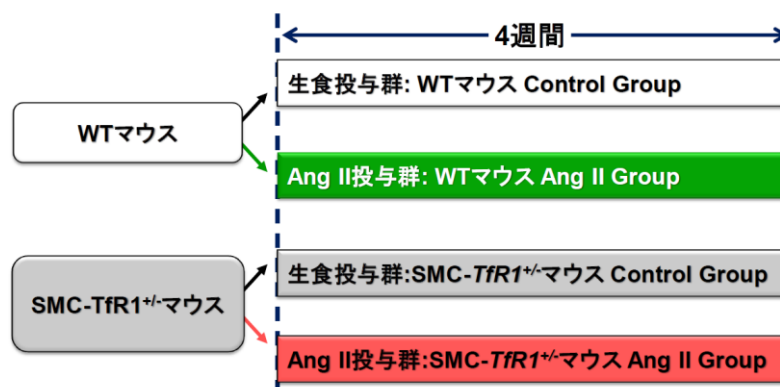


Figure 1  
Experimental protocol 1

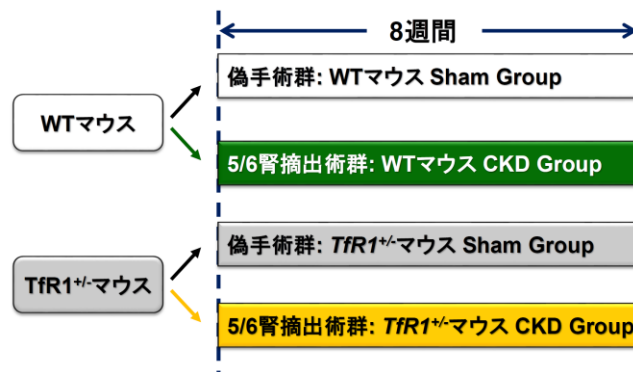


Figure 2  
Experimental protocol 2

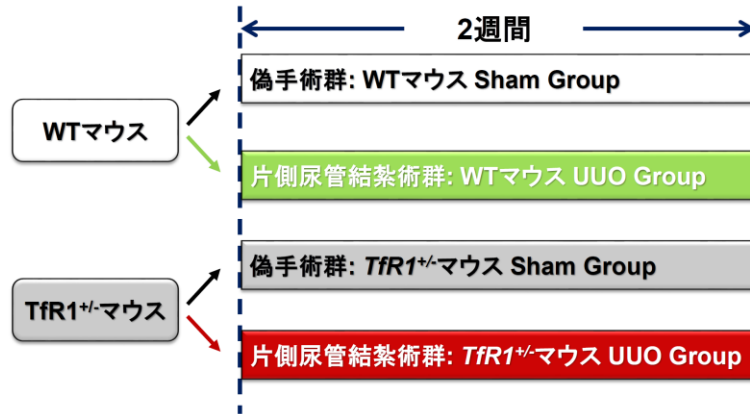


Figure 3  
Experimental protocol 3

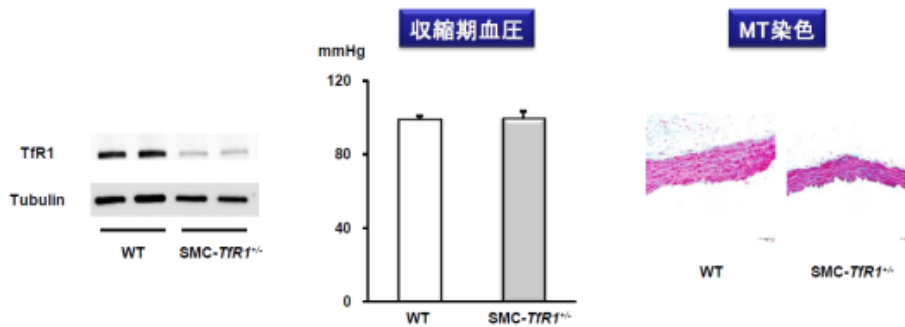


Figure 4  
Systolic blood pressure in SMC-TfR1<sup>+/+</sup> mice

次に、これらマウスに昇圧因子 Ang II 負荷を行い、血圧の変化、血管構造変化を解析した。Ang II 負荷後、WT マウス、血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスともに収縮期血圧は上昇したが、両群間で有意差を認めなかった。一方、血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスは、WT マウスに比べ、高血圧性血管リモデリングの程度が抑制された (Figure 5)。

### 3. 2 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた血圧と腎障害の病態解析

5/6 腎臓摘出後 8 週間で、収縮期血圧は上昇傾向にあったが、WT マウス、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウス間で有意差は認めなかった (Figure 6)。一方、5/6 腎臓摘出後観察される腎臓間質線維化は、WT マウスに比べ、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスで減弱していた (Figure 6)。

次に、CKD 病態形成における鉄の関与を検討するた

めに、腎臓における鉄沈着、フェリチン発現を調べたところ、5/6 腎臓摘出後腎臓において鉄沈着やフェリチン発現増大が確認されたが、その程度は WT マウスに比べ、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスで減弱していることがわかった (Figure 7)。

片側尿管結紮水腎症モデルにおいても検討したところ、片側尿管結紮 2 週間後、血圧は野生型マウス、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスともに著明な変化を示さなかったが、腎臓間質線維化は、WT マウスに比べ、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスで抑制されることが確認された (Figure 8)。

さらに、片側尿管結紮後においても、腎臓における鉄沈着やフェリチン発現増大が確認されたが、その程度は WT マウスに比べ TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスで抑制されることが確認された (Figure 9)。

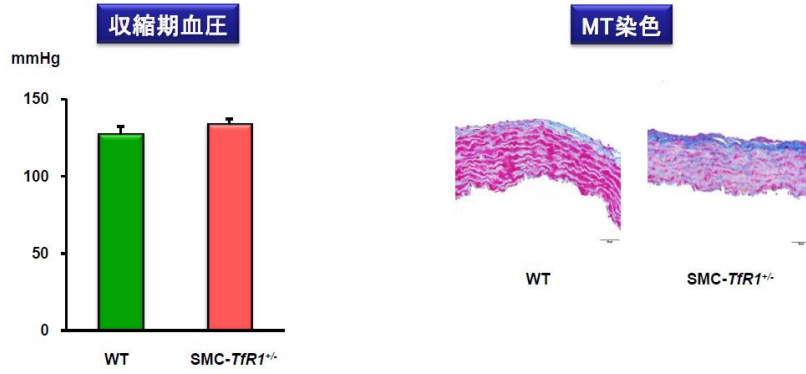


Figure 5  
Ang II-induced hypertension and vascular remodeling in SMC-*Tfr1*<sup>+/-</sup> mice

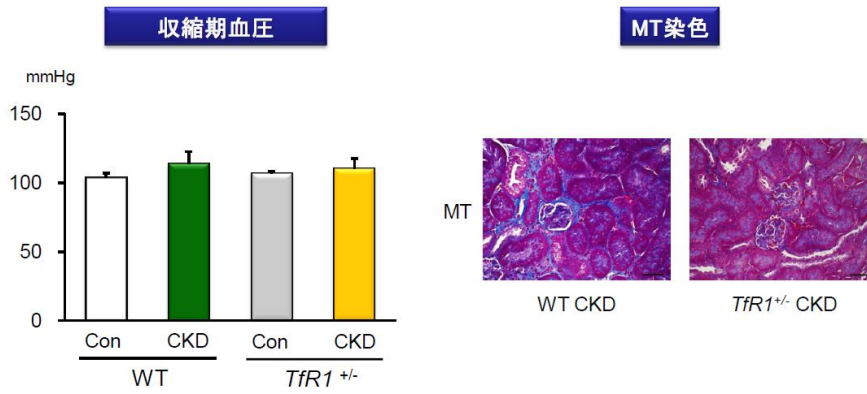


Figure 6  
Systolic blood pressure and renal fibrosis in *Tfr1*<sup>+/-</sup> mice after 5/6 nephrectomy

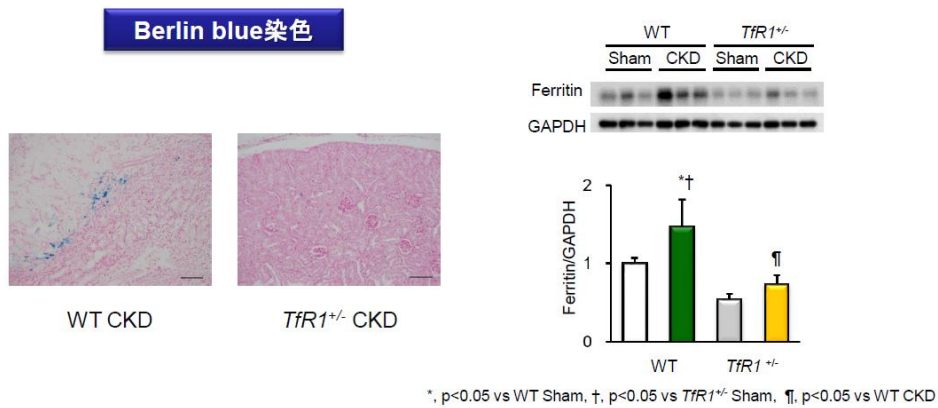
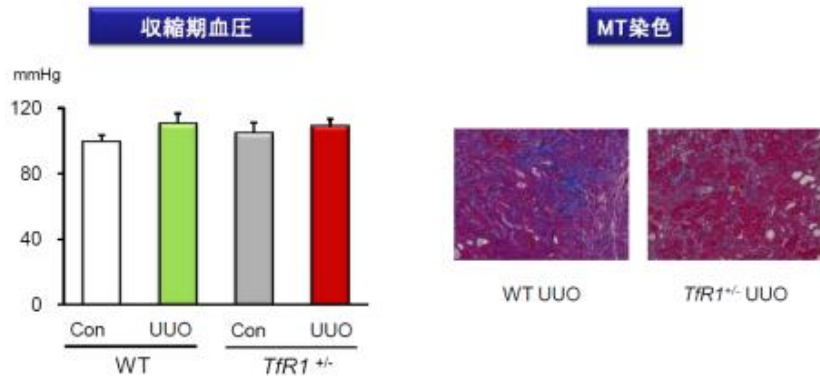
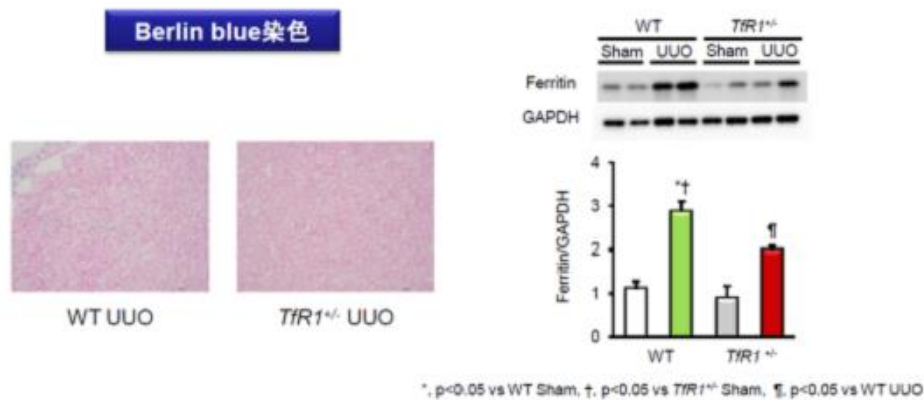


Figure 7  
Renal iron accumulation and ferritin expression in mice after 5/6 nephrectomy



**Figure 8**  
Systolic blood pressure and renal fibrosis in TfR1<sup>+/-</sup> mice after UUO



**Figure 9**  
Renal iron accumulation and ferritin expression in mice after UUO

#### 4. 考 察

本研究では、高血圧性血管リモデリングにおける TfR1 の役割を、遺伝子ノックアウトマウスを用いて検討した。細胞が鉄を取り込む主な経路は、TfR1 を介する。血清中の鉄はトランスフェリンに結合して運搬され、TfR1 によって各細胞内へ取り込まれる。今回、血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた実験結果より、高血圧性血管リモデリングの形成過程における血管平滑筋細胞における TfR1 の関与が示された。また、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた実験結果より、腎障害、特に腎臓間質線維化における TfR1 の関与が示された。これらの研究結果は、TfR1 が高血圧性臓器障害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

血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験のさらなる解析や *in vitro* 実験を行い、高血圧性血管リモデリングにおける TfR1 の役割について、さらに検討する必要がある。一方、高血圧性血管リモデリングにおける血管内皮細胞における TfR1 についても検討する必要がある。現在血管内皮細胞特異的 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスも作成している。今後、高血圧性血管リモデリングにおける TfR1 の役割について、血管構成細胞ごとの検討を行い、食塩感受性高血圧、高血圧性臓器障害の予防、治療に貢献していく予定である。

最後に、本研究にご支援賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に深謝致します。

## 6. 文献

1. Naito Y, Hirotsu 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, Hirotsu 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, Hirotsu 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.
4. Naito Y, Sawada H, Oboshi M, Fujii A, Hirotsu S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Morisawa D, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Increased Renal Iron Accumulation in Hypertensive Nephropathy of Salt-Loaded Hypertensive Rats. *PLoS One*. 8: e75906, 2013.

## A Cellular Iron Receptor in Vascular Cells and Salt Sensitive Hypertension

Yoshiro Naito, Tohru Masuyama

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

### Summary

**Background:** We have previously reported that iron and a cellular iron transport protein, transferrin receptor 1 (TfR1) is associated with hypertensive vascular remodeling in salt sensitive hypertensive rats. In addition, we have shown increased renal TfR1 expression in salt sensitive hypertensive rats. However, the role of TfR1 in the pathophysiology of hypertensive vascular remodeling and renal dysfunction remains completely unknown. In this study, we investigated the role of TfR1 in hypertensive vascular remodeling and renal dysfunction using genetic TfR1 knockout mice.

**Methods and Results:** First, to assess the role of TfR1 in vascular smooth muscle cells in the pathophysiology of hypertension, we generated vascular smooth muscle cells specific TfR1 heterozygous deleted (SMC-TfR1<sup>+/-</sup>) mice. To create SMC-TfR1<sup>+/-</sup> mice, TfR1<sup>lox/+</sup> mice were crossbred with congenic C57BL6 mice that express Cre recombinase under the control of the endogenous SM22 promoter (SM22-Cre mice). Systolic blood pressure and aortic morphology were not different between SMC-TfR1<sup>+/-</sup> mice and control mice. Then, angiotensin II was administered for 28 days in SMC-TfR1<sup>+/-</sup> and control mice. Systolic blood pressure was elevated in both control and SMC-TfR1<sup>+/-</sup> mice after angiotensin II infusion; however, hypertensive aortic remodeling was increased to a lesser extent in SMC-TfR1<sup>+/-</sup> mice compared to control mice.

Second, we assessed blood pressure and renal morphology in TfR1 heterozygous deleted (TfR1<sup>+/-</sup>) mice after 5/6 nephrectomy or unilateral ureteral obstruction. Systolic blood pressure did not differ significantly between control and TfR1<sup>+/-</sup> mice, while the extent of renal fibrosis was less in TfR1<sup>+/-</sup> mice than control mice after both 5/6 nephrectomy or unilateral ureteral obstruction.

**Conclusions:** These results indicate that TfR1 in SMC plays a role in the pathophysiology of hypertensive vascular remodeling. In addition, TfR1 is associated with the mechanism of hypertensive renal dysfunction, particularly renal fibrosis.