

## 食塩感受性高血圧における血管平滑筋細胞トランスフェリン受容体 1 の関与

内藤 由朗, 石原 正治

兵庫医科大学循環器・腎透析内科学

### 概要

**【目的】** 細胞内への鉄取り込みは、細胞膜に存在す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) を介して行われる。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病変・血管リモデリングの形成過程における鉄の関与、特に TfR1 の関与を明らかにしてきた。しかし、いまだ不明な点が多い。本研究では、食塩感受性高血圧による血管リモデリングにおける 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】** 片腎摘出、酢酸デオキシコルチコステロン (DOCA)、0.9%生理食塩水負荷 (DOCA-salt) マウスを用いて、高血圧性血管リモデリングにおける鉄および TfR1 の関与を検討した。その結果、高血圧を示す DOCA-salt マウス大動脈では鉄沈着を認めること、さらに鉄取り込み受容体 TfR1 発現がコントロールマウスに比べ亢進していることを見出した。また、免疫組織学的検討により、血管リモデリングを示す DOCA-salt マウス大動脈においては、血管中膜に TfR1 発現が亢進することを見出した。

次に、タモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼを利用し、血管中膜の構成細胞である血管平滑筋細胞で Cre 蛋白を発現する Myh11-CreER<sup>T2</sup> マウスと TfR1<sup>Flox/Flox</sup> マウスを掛け合わせ、タモキシフェン誘導型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、血管平滑筋細胞における TfR1 の役割を検討した。その結果、血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスでは、片腎摘出、DOCA-salt 負荷後血圧上昇の程度はコントロールマウスと同等であるが、血管リモデリングの程度はコントロールマウスに比べ抑制されることが明らかになった。

**【結論】** 食塩感受性高血圧による血管病変・血管リモデリングの形成過程に、血管局所における TfR1、特に血管平滑筋細胞における TfR1 の関与が示された。

### 1. 研究目的

鉄は生体にとって必須の元素であるが、過剰な鉄は酸化ストレスを誘導し、様々な疾患の病態に関与する。最近、あまり関係がないとされていた循環器疾患の病態における鉄の関与も示されている<sup>1)</sup>。細胞内への鉄取り込みは、細胞膜に存在す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) を介して行われる。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病変・血管リモデリングにおける鉄の関与、特に細胞内への鉄取り込みを担う TfR1 の関与を明らかにしてきた<sup>2-4)</sup>。しかし、いまだ不明な点が多い。本研究では、『食塩感受性高血圧症による血管リモデリングに、血管局所における TfR1 が関与する』との仮説をたて、血管平滑筋細胞特異的 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 食塩感受性高血圧モデルマウスを用いた TfR1 と高血圧性血管リモデリングの病態解析

12週齢雄性 C57BL/6J マウスに片腎摘出, 酢酸デオキシコルチコステロン (DOCA), 0.9%生理食塩水負荷を行い, 高血圧性血管リモデリングにおける鉄および TfR1 の関与を検討した。DOCA は, 片腎摘出1週間後に, 50 mg の DOCA ペレット (innovation research of America 社 (Cat No. M-121)) を頸部皮下に埋め込み, 同時に 0.9%生理食塩水を3週間投与した。マウス血圧は, tail-cuff 法で測定した。

### 2.2 血管平滑筋細胞 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた TfR1 と高血圧性血管リモデリングの病態解析

タモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼを利用し, 血管中膜の構成細胞である血管平滑筋細胞で Cre 蛋白を発現する Myh11-CreER<sup>T2</sup> マウスと TfR1<sup>Flox/Flox</sup> マウスを掛け合わせ, タモキシフェン誘導型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, 血管平滑筋細胞における TfR1 の役割を検討した。次に, 12週齢雄性タモキシフェン誘導型血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスにタモキシフェンを5日間連続投与し, 血管平滑筋細胞における TfR1 遺伝子を欠損させた後に, 片腎摘出, DOCA, 0.9%生理食塩水負荷を行い, 血圧の変化, 血管構造変化を解析した。

## 3. 研究結果

### 3.1 食塩感受性高血圧モデルマウスを用いた TfR1 と高血圧性血管リモデリングの病態解析

C57BL/6J マウスに片腎摘出, DOCA, 0.9%生理食塩水負荷 (DOCA-salt) を行ったところ, 高血圧を示す DOCA-salt マウス大動脈では鉄沈着を認めること, さらに鉄取り込み受容体 TfR1 発現が Sham コントロールマウスに比べ亢進していることを見出した (Figure.1)。また, 免疫組織学的検討により, 血管リモデリングを示す DOCA-salt マウス大動脈においては, 血管中膜に TfR1 発現が亢進することを見出した (Figure.2)。

Figure.1

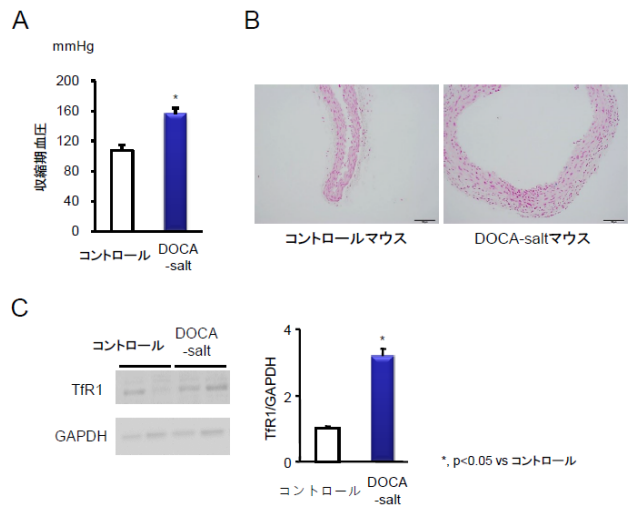
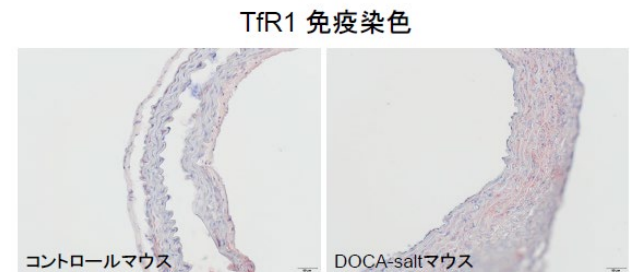


Figure.2



### 3.2 血管平滑筋細胞 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた TfR1 と高血圧性血管リモデリングの病態解析

タモキシフェン誘導型血管平滑筋細胞特異的 TfR1 遺伝子ノックアウトマウスの大動脈における TfR1 発現は, 同胞のコントロールマウスと比べ, 減弱していることが確認された (Figure.3A)。そこで, これらマウスの12週齢の収縮期血圧を観察したところ, 両群間で有意差を認めなかった (Figure.3B)。

Figure.3

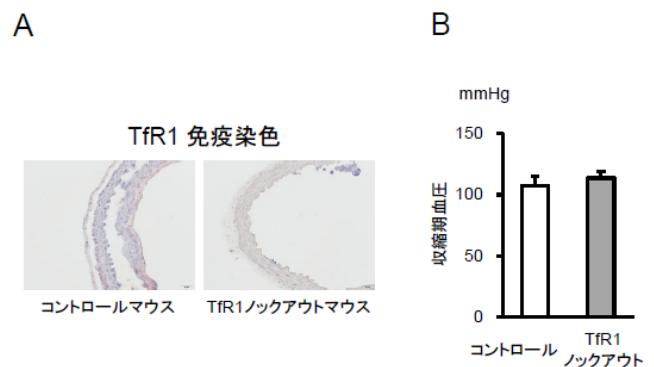
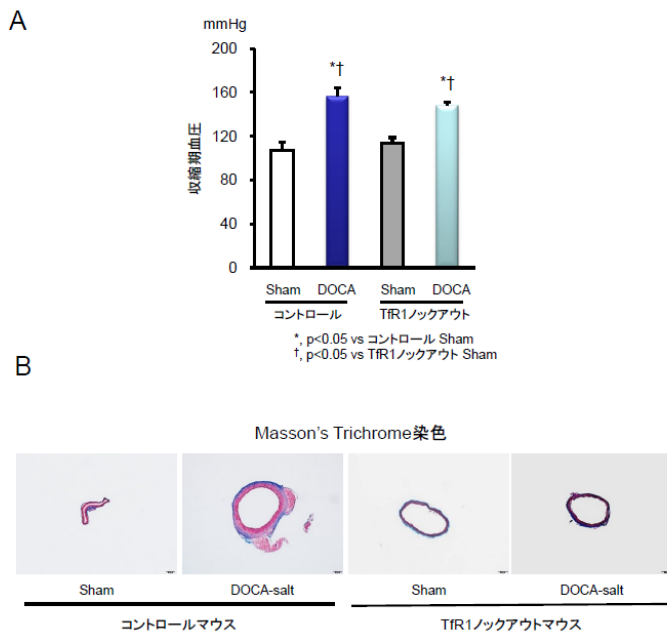


Figure.4



次に、12週齢雄性タモキシフェン誘導型血管平滑筋細胞特異的 Tfr1 遺伝子ノックアウトマウスにタモキシフェンを5日間連続投与し、血管平滑筋細胞における Tfr1 遺伝子を欠損させた後に、片腎摘出、DOCA、0.9%生理食塩水負荷 (DOCA-salt) を行い、血圧の変化、血管構造変化を解析した。DOCA-salt 負荷後、同胞コントロールマウス、タモキシフェン誘導型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 (Figure 4A)。一方、タモキシフェン誘導型血管平滑筋細胞特異的 Tfr1 遺伝子ノックアウトマウスは、同胞コントロールマウスに比べ、高血圧性血管リモデリングの程度が抑制された (Figure 4B)。

#### 4. 考察

本研究では、食塩感受性高血圧による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。細胞内への鉄取り込みは、細胞膜に存在する鉄取り込み受容体 Tfr1 を介して行われる。本研究では、タモキシフェン誘導型血管平滑筋細胞特異的 Tfr1 遺伝子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、血管局所における Tfr1、特に血管平滑筋細胞における Tfr1 が関与することを明ら

かにした。本研究結果は、Tfr1 が高血圧性血管リモデリングに対する新たな治療標的となりうることを示唆する。

#### 5. 今後の課題

タモキシフェン誘導型血管平滑筋細胞特異的 Tfr1 遺伝子ノックアウトマウスを用い、細胞内シグナル伝達などのさらなる解析を行い、高血圧性血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞 Tfr1 の役割を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 Tfr1 については、血管平滑筋細胞以外の血管構成細胞である血管内皮細胞や線維芽細胞における Tfr1 についても検討する必要がある。現在、血管内皮細胞や線維芽細胞特異的 Tfr1 遺伝子ノックアウトマウスについても作成し、検討している。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、食塩感受性高血圧の血管病変・血管リモデリングの予防・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, Masuyama T, Ishihara M. Iron and cardiovascular diseases. *J Cardiol*.77: 160-165, 2021.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

## Role of Vascular Smooth Muscle Cell Transferrin Receptor 1 in Salt Sensitive Hypertension

Yoshiro Naito, Masaharu Ishihara

Department of Cardiovascular and Renal Medicine, School of Medicine, Hyogo Medical University

### Summary

**Background:** We have shown that a cellular iron transport protein, transferrin receptor 1 (TfR1) is linked to hypertensive vascular remodeling in salt sensitive hypertensive rats. However, the role of TfR1 in the pathophysiology of hypertensive vascular remodeling remains obscure. In this study, we assessed the role of TfR1 in hypertensive vascular remodeling using vascular smooth muscle cells (VSMC) specific TfR1 knockout mice.

**Methods and Results:** To assess the role of TfR1 in VSMC in the pathophysiology of hypertensive vascular remodeling, we generated inducible VSMC specific TfR1 deleted mice. Inducible VSMC specific TfR1 deleted mice are generated by crossing mice expressing a fusion protein of Cre recombinase with the modified estrogen receptor ligand binding domain (CreER<sup>T2</sup>) under the control of the smooth muscle myosin heavy chain (Myh11-CreER<sup>T2</sup>) with TfR1<sup>Flox/Flox</sup> mice. The VSMC TfR1 deletion is induced by treating Myh11-CreER<sup>T2</sup>/TfR1<sup>Flox/Flox</sup> mice with the estrogen receptor antagonist tamoxifen. Systolic blood pressure and aortic morphology were not different between inducible VSMC specific TfR1 deleted mice and control mice. Then, deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension was induced in inducible VSMC specific TfR1 deleted mice and control mice by uninephrectomy and administration of DOCA and 0.9% NaCl in the drinking water. Systolic blood pressure was elevated similarly in both control and inducible VSMC specific TfR1 deleted mice after DOCA-salt administration; however, hypertensive vascular remodeling was increased to a lesser extent in inducible VSMC specific TfR1 deleted mice compared to control mice.

**Conclusions:** These results suggest that TfR1 in VSMC plays a role in the pathophysiology of hypertensive vascular remodeling in salt sensitive hypertension.