

高血圧性臓器障害における鉄取り込み受容体の関与と治療への応用

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 (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。また、これら高血圧モデル動物を用いて、食事性鉄制限による病態抑制効果も示してきた。しかし、食事性鉄制限を行うと、貧血や体重低下をもたらす、必ずしも良い効果のみを示さない。本研究では、高血圧性障害臓器における TfR1 の役割および食事性鉄制限の効果をさらに検討する。

【方法および結果】 ①TfR1 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高血圧モデルを作成し、血圧、心肥大の変化を評価した。昇圧因子アンジオテンシンIIを投与後、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収縮期血圧は上昇したが、両群間で著明な差は認めなかった。一方、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスは、野生型マウスに比し高血圧に伴う左室肥大の程度が抑制された。

②CKD モデルラットを用いた食事性鉄制限ペアフィーディング実験の検討: CKD モデルラットを用いて食事性鉄制限ペアフィーディング実験を行い、血圧や腎機能の変化を評価した。その結果、食事性鉄制限ペアフィーディングにより、CKD モデルラットの血圧上昇、腎障害が抑制されることがわかった。

【結論】 高血圧性障害臓器、特に心肥大の形成過程における TfR1 の関与が示された。また、食塩感受性高血圧に対する食事性鉄制限の有用性が示唆された。

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⁾。また、これら高血圧モデル動物を用いて、食事性鉄制限による病態抑制効果も示してきた⁽¹⁻³⁾。しかし、食事性鉄制限を行うと貧血や体重低下をもたらす、必ずしも良い効果のみを示さない。

本研究は、高血圧性障害臓器における TfR1 の役割および食事性鉄制限の効果をさらに検討する。

2. 研究方法

高血圧性障害臓器における 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。また、高血圧に対する食事性鉄制限の効果について、ラットを用いた基礎研究より検討する。以下に、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、昇圧因子アンジオテンシンIIを投与し、高血圧モデルを作成した。アンジオテンシンIIは、浸透圧ポンプを皮下に植え込み 1.44 mg/kg/day の割合で2週間投与した。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、アンジオテンシンIIの対照として生理食塩水を用いた。この高血圧モデルマウスにおける血圧、心機能の変化を評価した (Figure 1)。

2. 2 CKD モデルラットを用いた食事性鉄制限ペアフィーディング実験の検討

まず、6 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD)ラットを用い、食事性鉄制限による食事摂取量や体重の変化量を検討

し、次のペアフィーディング実験に用いる食事摂取量を算出した (Figure 2)。

次に、6 週齢雄性 SD ラットを用いて、CKD モデルを作成し、実験プロトコル 2 の結果より算出した食事量を与え、ペアフィーディング実験を行い、高血圧・腎障害に対する食事性鉄制限の効果を検討した。

CKD ラットは、7 週齢雄性 SD 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 ラットを術後 1 週より 2 群に分け、通常飼料または鉄制限飼料を 16 週間与え、血圧や腎機能の変化を評価した。また、16 週間後各種臓器を採取

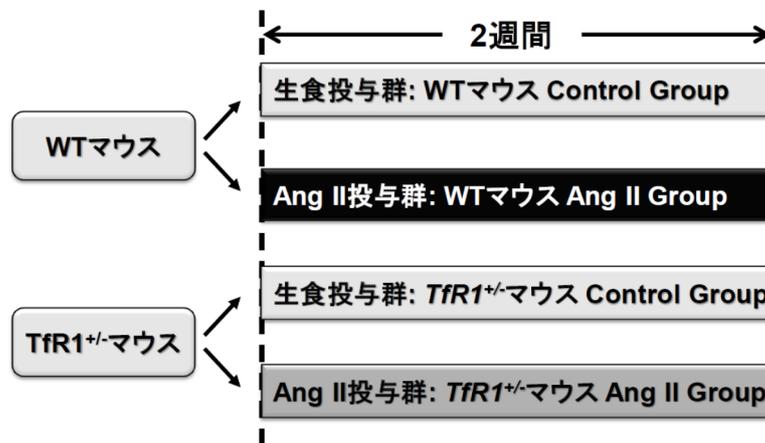


Figure 1
Experimental protocol 1

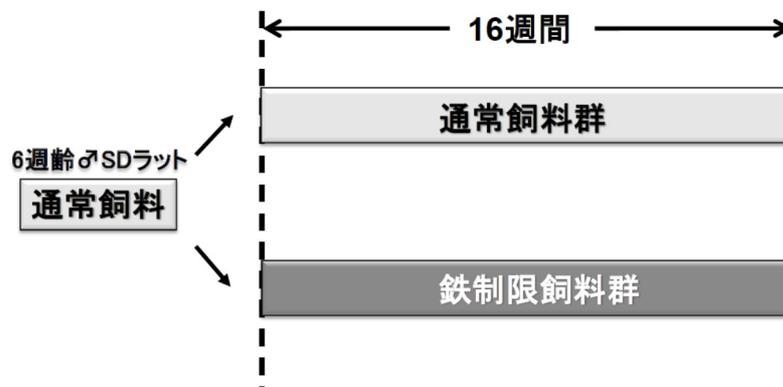


Figure 2
Experimental protocol 2

し、分子機構を検討した。偽手術群を Control 群として、3 群間にて比較検討した (Figure 3)。

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高血圧性臓器障害の検討

昇圧因子アンジオテンシンIIを投与後、WT マウス、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、両群間で著明な差は認めなかった (Figure 4)。

一方、左室肥大の指標である左心室重量/脛骨長比は、WT マウス、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスともに上昇したが、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ていた (Figure 5)。

次に、左心室組織をヘマトキシリン・エオジン染色にて観察したところ、WT マウス、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスともに高血圧性心肥大を認めたが、その程度はWT マウスに比し 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)。

3.2 CKD モデルラットを用いた食事性鉄制限ペアーディング実験の検討

まず、6 週齢雄性 SD ラットを用い、食事性鉄制限による食事摂取量や体重の変化を 16 週間観察した。観察開始 2 週間後より、食事摂取量は、通常飼料群に比べ、鉄制限飼料群で低下した (平均食事量; 通常飼料群 25 g/日, 鉄制限飼料群 20 g/日)。また、体重は両群ともに増加したが、その程度は通常飼料群に比べ、鉄制限飼料群で低下した (Figure 7)。

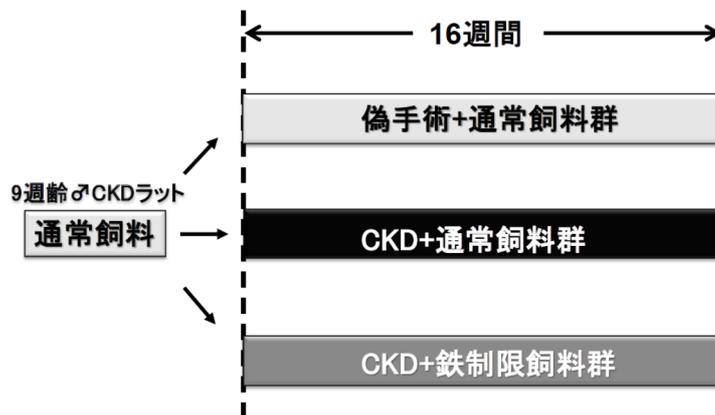


Figure 3
Experimental protocol 3

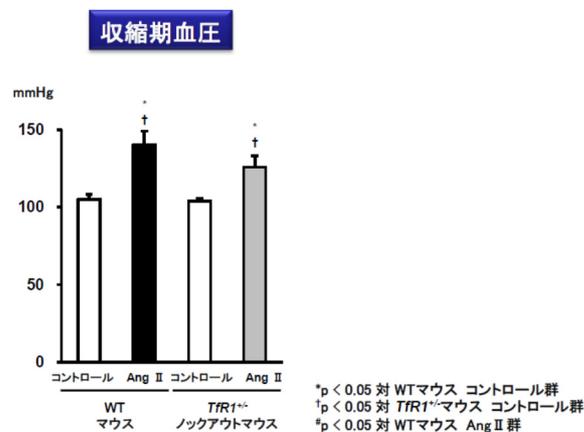


Figure 4
Systolic blood pressure in TfR1^{+/-} mice after Ang II infusion

次に、本実験結果を基に、通常飼料、鉄制限飼料ともに20 g/日の給餌によるCKDモデルラットに対する食事性鉄制限ペアフィーディング実験を行った。食事性鉄制限ペアフィーディングにより、体重減少は認められないものの蛋白尿増加、糸球体硬化、尿細管間質線維化増大といったCKDモデルラットに観察される腎障害が抑制された(Figure 8)。

さらに、食事性鉄制限ペアフィーディングにより、CKDモデルラットの血圧上昇が抑制されることがわかった(Figure 9)。一方、血中ヘマトクリット値は、コントロール+

通常飼料群、CKD+通常飼料群、CKD+鉄制限飼料群で、 40.3 ± 0.6 , 39.0 ± 0.8 , $35.1 \pm 2.1\%$ と3群間に有意差は認められないものの著明な差は認めなかった。

最後に、食事性鉄制限による腎障害抑制および降圧効果の機序を検討したところ、腎臓における腎鉱質コルチコイド受容体(mineralocorticoid receptor: MR)活性が、鉄制限群では減弱することを見出した。さらに、MRシグナルの下流にあるSGK1遺伝子発現が、食事性鉄制限により抑制されることを確認した(Figure 10)。

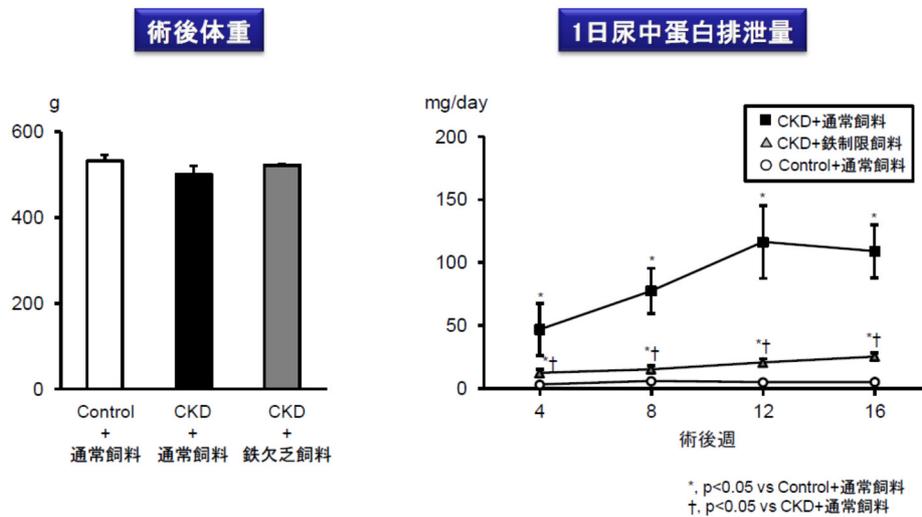


Figure 8
Effect of iron-restricted pair-feeding on body weight and proteinuria in CKD Rats

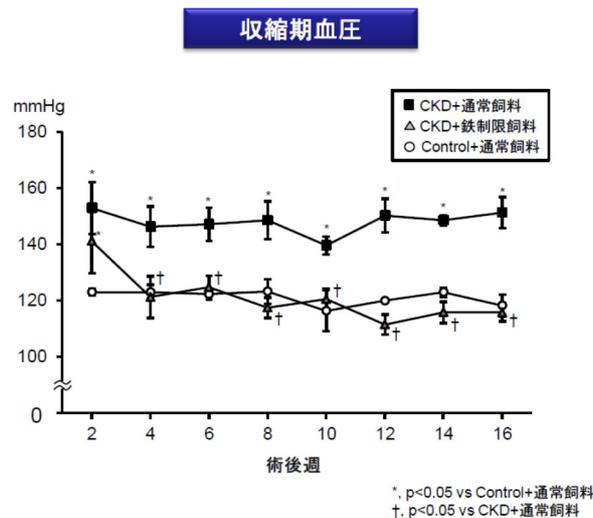


Figure 9
Effect of iron-restricted pair-feeding on systolic blood pressure in CKD Rats

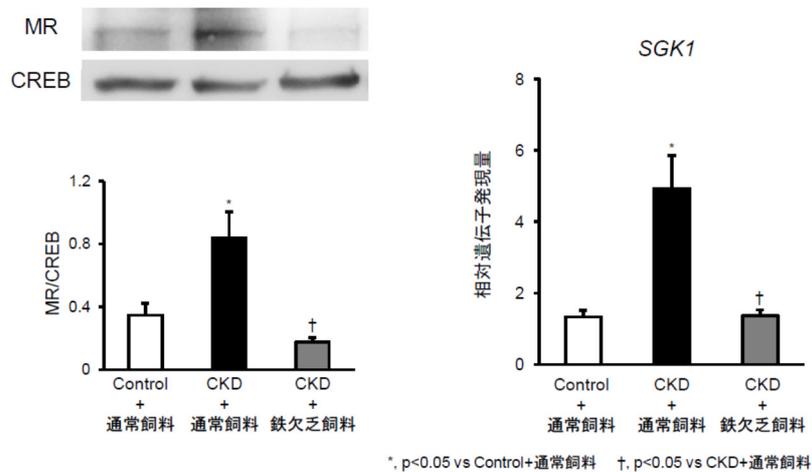


Figure 10

Effects of iron restriction on renal mineralocorticoid receptor signaling in CKD rats

4. 考察

本研究では、高血圧性臓器障害における Tfr1 の役割を基礎研究より検討した。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 によって各細胞内へ取り込まれる。今回、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、高血圧性臓器障害、特に左室肥大の形成過程における Tfr1 の関与が示された。これらの研究結果は、Tfr1 が高血圧性心肥大に対する新規治療標的となりうることを示唆する。

一方、Tfr1 を介した過剰な鉄取り込みに着目すれば、食事性鉄制限を行うことで、その取り込みを抑制することは可能である。しかし、食事性鉄制限を行うと、貧血や体重減少などを併発する。今回ペアフィーディング実験を行い、鉄制限の有用性を見出し⁽⁴⁾、鉄が食塩感受性高血圧に対する治療標的になりうる可能性が示された。

5. 今後の課題

Tfr1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いたさらなる *in vivo* 実験や *in vitro* 実験を行い、高血圧性心肥大における Tfr1 の役割、制御機構について、さらに検討する必要がある。一方、食事性鉄制限の程度についても、今後評価する必要がある。鉄、特に Tfr1 に着目した高血圧性臓

器障害の研究は本研究が世界初であり、今後のさらなる展開が期待される。

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

- 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.
- 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.
- 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.
- Naito Y, Senchi A, Sawada H, Oboshi M, Horimatsu T,

Okuno K, Yasumura S, Ishihara M, Masuyama T.
Iron-restricted pair-feeding affects renal damage in rats

with chronic kidney disease. *PLoS One*. 12: e0172157,
2017.

A Cellular Iron Receptor in Hypertensive Cardiovascular Remodeling

Yoshiro Naito, Tohru Masuyama

Hyogo College of Medicine

Summary

Background: We have previously reported that dietary iron restriction prevents the development of hypertensive cardiovascular remodeling in rat models of hypertension. In addition, we have shown that a cellular iron transport protein, **transferrin receptor 1 (TfR1)** is highly expressed in cardiovascular tissues of hypertensive rats; however, the role of TfR1 in the pathophysiology of hypertension remains obscure. In this study, we investigate the role of TfR1 in cardiovascular tissues of hypertension and the effect of pair-feeding dietary iron restriction in rat models of hypertension.

Methods and Results: First, we infused angiotensin II via an osmotic minipump at the rate of 1.44 mg/kg/day for 2 weeks in wild-type (WT) and TfR1 hetero knockout mice. Systolic blood pressure was elevated in both WT and TfR1 hetero knockout mice after angiotensin II infusion; however, left ventricular hypertrophy was increased to a lesser extent in TfR1 hetero knockout mice compared with WT mice. Second, we assessed the effect of pair-feeding iron restriction in 5/6 nephrectomized rats. Pair-feeding iron restriction attenuated the development of renal damage and hypertension in 5/6 nephrectomized rats. Of interest, pair-feeding iron restriction attenuated renal expression of nuclear mineralocorticoid receptor in 5/6 nephrectomized rats.

Conclusions: These results indicate that TfR1 plays a role in the pathophysiology of hypertensive cardiac hypertrophy and iron might be possible therapeutic targets for hypertension.