

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08055

研究課題名（和文）慢性心不全における赤血球半減期短縮の機序に関する研究

研究課題名（英文）Mechanisms of reduced lifespan of erythrocytes in chronic heart failure

研究代表者

辻野 健（Tsuji, Takeshi）

兵庫医科大学・薬学部・教授

研究者番号：90283887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：慢性心不全患者において貧血の合併は予後不良の因子であるが、その機序は十分解明されたとはいえない。我々は慢性心不全の動物モデルであるDahl食塩感受性(DS)ラットに合併する貧血の原因を検討した。貧血の主要な原因は赤血球の血中半減期の短縮であり、それに酸化ストレスによるeryptosis（赤血球のapoptosis様プログラム細胞死）が関与することを明らかにした。さらに、抗酸化経路を活性化するNuclear factor-erythroid 2-related factor 2の活性化薬であるフマル酸ジメチルがDSラットの貧血、心障害、腎障害を予防し、生命予後を改善させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性心不全患者において、慢性腎不全と貧血が合併した病態は心腎貧血症候群として知られ、予後不良の因子であるが、その機序は十分解明されたとはいえず、治療法は確立されていない。我々は慢性心不全の動物モデルであるDahl食塩感受性(DS)ラットに合併する貧血と心臓・腎臓障害にフマル酸ジメチル(DMF)が有効であることを示した。DMFは多発性硬化症の治療薬としてすでに認可されており、drug repositioningにより、心腎貧血症候群の治療薬の候補となりうることを示された。確立された治療法のない心腎貧血症候群に対し有効な治療法が見つければ、その学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Anemia in patients with chronic heart failure (CHF) is a sign of poor prognosis. However, mechanisms of anemia in CHF are thought to be multifactorial and not well understood. We examined the mechanisms of anemia in Dahl salt-sensitive (DS) rat, a model of chronic heart failure. We found that reduced lifespan of erythrocytes is the major cause of anemia. Eryptosis is a programmed death of nucleus-free, iron-filled red blood cells. We found that eryptosis induced by oxidative stress was a cause of reduced lifespan of erythrocytes in DS rats. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a transcription factor that regulates the cellular defense against toxic and oxidative insults. We found that dimethyl fumarate, an activator of Nrf2, prevented anemia, cardiac and renal fibrosis and inflammation, and prolonged survival in DS rats.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 心腎貧血症候群 ダール食塩感受性ラット

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全における貧血が注目されるようになったのは2000年ころからである。疫学上貧血を合併すると慢性心不全患者の予後が不良となることは多くの調査で明らかであり、それに対する対策は、心不全に合併する腎障害によるエリスロポエチン不足と、未だに原因が十分に明らかにされていない鉄欠乏の2つの観点から検討されてきた。しかし、最も期待されたエリスロポエチン製剤ダルベポエチンを用いた大規模臨床試験 RED-HF では、ダルベポエチンによる貧血治療は一次エンドポイントである総死亡+心不全入院を全く減少させることが出来なかった (New Eng J Med 2013; 368: 1210-9)。また、慢性心不全患者は貧血の有無に係わらず鉄欠乏を有することがあるが、鉄補充は QOL を改善するものの、予後を改善することは示せていない (New Eng J Med 2009; 361: 2436-48, Eur Heart J. 2015;36:657-68)。このように現在の治療法では十分な効果が得られず、新しい治療法が模索されている。我々の研究室は、現在の行き詰まった状況を打開するために、心不全における貧血や鉄代謝の異常の機序について検討してきた。その中で、高血圧性慢性心不全のモデル動物であるダール食塩感受性高血圧 (DS) ラットは心不全が進行すると貧血を呈し、それは慢性心不全患者の貧血と極めて類似していることを明らかにした。すなわち、(1) 鉄欠乏状態にあるにも係わらず小球性低色素性貧血を呈さない (2) 血中エリスロポエチン濃度は高値を示す (3) 鉄補充をしても貧血は改善せず、鉄の利用障害がある (4) ヘプシジンは鉄吸収を抑制するペプチドホルモンであり、慢性炎症に伴う鉄利用障害の主役であると考えられているが、心不全でヘプシジンは低値を示すので、ヘプシジン高値が鉄利用障害の主因ではない などである (J Hypertens. 2011;29:741-8.など)。そして、DS ラットにおいて、貧血の主因は赤血球寿命の短縮であることに気付いた。そこで研究開始当初、慢性心不全モデルである DS ラットにおける赤血球寿命短縮の機序を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) 赤血球寿命短縮の原因についての検討

まず、赤血球寿命の短縮の原因を明らかにしようとした。赤血球側の要因として、我々が考えていたのは eryptosis であった。Eryptosis とは、核もミトコンドリアも持たない赤血球の apoptosis 様プログラム細胞死のことであり、apoptosis と同様に phosphatidylserine (PS) が細胞表面に露出してくる (Cell Physiol Biochem 2016; 39: 1977-2000)。その誘引として、赤血球内 Ca^{2+} の上昇、赤血球内グルタチオンの枯渇、酸化ストレス、脂質過酸化、セラミドの蓄積等が報告されていた。予備的検討では、PS に結合する Annexin-V FITC で eryptosis をきたしている赤血球の比率を測定したところ、食塩負荷により心不全をきたした DS ラットでは、食塩負荷されていない DS ラットよりも増加していた。そこで、DS ラットで以下の項目について検討し、eryptosis をきたす要因として、以下の因子を検討することを目的とした。

- 1) 赤血球内 Ca^{2+}
- 2) 赤血球内グルタチオン
- 3) 赤血球内酸化ストレス

(2) フマル酸ジメチルの効果の検証

Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (KEAP1-Nrf2) システムは酸化ストレスに対する防御システムとして重要な役割を担っている。フマル酸ジメチル (DMF) は抗酸化効果・抗炎症効果を有し、国内では多発性硬化症の治療に使用されている。DMF の主要な作用機序は Nrf2 を活性化することにあると考えられている。我々は食塩負荷した DS ラットにおいて赤血球内グルタチオンの減少と酸化ストレスの上昇を見出したため、抗酸化効果を有する DMF が DS ラットにおける貧血、心障害、腎障害にどのような影響を及ぼすのかを検討することにした。

3. 研究の方法

雄性 DS ラットを 5 週齢で購入し、6 週齢から以下の 3 群に分けた。

コントロール群 (常食を摂取)

HS 群 (高食塩 (8%NaCl) を摂取)

HS+DMF 群 (高食塩+DMF (90mg/kg) 経口投与)

(1) 10 週齢、12 週齢、14 週齢で血圧と体重を測定し、15 週齢で安楽死させ採材し、以下の項目を検討した。

(2) 血液検査

1) Complete Blood Count

多項目自動血球計算装置 XT-2000iV (Sysmex, Kobe, Japan) で測定した。

2) 血清クレアチニン

3) Eryptosis に関連した項目

フローサイトメーター BD FACS Aria™ II Instrument (BD Biosciences, San Diego, CA) を用いて、赤血球内 Ca^{2+} (Fluo3)、赤血球内グルタチオン (mercury orange 1)、赤血球内酸化ストレス (DCFDA) を測定した。

(3) 臓器障害に関連した項目

1) 組織学的検討

10%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋し、切片を作成した。

心臓: HE 染色、マッソン・トリクローム染色

腎臓: PAS 染色、マッソン・トリクローム染色

尿細管障害のスコアは PAS 染色で評価した: 0, normal tubules; 1, rare single atrophic tubule; 2, several clusters of atrophic tubules; and 3, massive atrophy (Lu et al., 2018)

マッソン・トリクローム染色における線維化の範囲は ImageJ 1.53a software (NIH, Bethesda, MD, U.S.A.) を用いて定量化した。

2) mRNA 発現

GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を用いて、Real-time polymerase chain reaction 法で定量した。

心臓: IL1、Ccl2、ICAM1、Nox4、TGF- β 1

腎臓: IL1、Ccl2、ICAM1、Nox4、PDGF β 、TGF- β 1

(3) 生存率

一部のラットは生存率を検討するため、自然死するまで飼育を続けた。

4. 研究成果

(1) 血圧の推移

HS 群ではコントロール群よりも収縮期血圧が上昇し、DMF の投与により血圧は低下する傾向であった。10 週齢、12 週齢では HS+DMF 群の収縮期血圧は HS 群よりも有意に低かったが、14 週齢では有意差はなかった。

(2) 血液検査

HS 群は著明な貧血を示したが、DMF はそれを改善させた (表 1)。HS 群における網状赤血球の増加も DMF は改善させた。HS 群における血清クレアチニンの増加も DMF は改善させた。

表 1

	コントロール群	HS 群	HS+DMF 群
赤血球 ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	851.6 \pm 230.0	471.1 \pm 132.3*	750.4 \pm 236.5 #
ヘモグロビン (g/dL)	15.1 \pm 4.1	9.1 \pm 2.5*	13.9 \pm 4.2 #
ヘマトクリット (%)	43.6 \pm 10.4	33.3 \pm 8.2*	43.1 \pm 9.7 #
網状赤血球 ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	27.9 \pm 9.9	183.2 \pm 60.7*	85.9 \pm 61.2 #
クレアチニン (mg/dL)	0.73 \pm 0.21	1.05 \pm 0.38*	0.71 \pm 0.17 #
心重量 (g)	1.27 \pm 0.13	1.54 \pm 0.12*	1.28 \pm 0.23 #
腎重量 (g)	1.45 \pm 0.11	1.62 \pm 0.34	1.54 \pm 0.20

*p<0.05 vs. コントロール群、#p<0.05 vs. HS 群、

Eryptosis 関連の検査では、赤血球内のグルタチオンが減少傾向にあり、HS+DMF 群ではそれを改善する傾向にあった。酸化ストレスは、コントロール群に比べ HS 群で増加傾向にあり、HS+DMF 群では HS 群と比較して改善傾向がみられた。

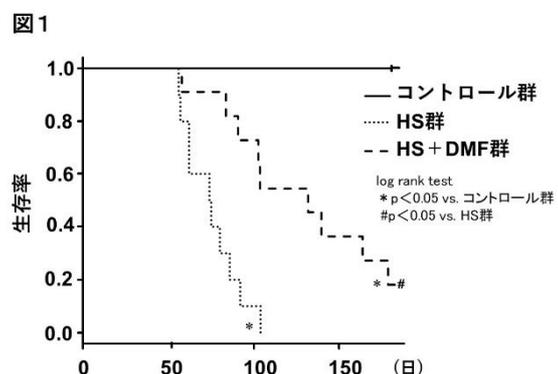
(3) 臓器障害

心臓に関しては、HS 群では心重量の増加がみられ、HS+DMF 群では心重量は正常化した。心臓での遺伝子発現では、炎症に関係する IL-1、Cc12、ICAM、酸化ストレスに関する Nox4、線維化に関する TGF- β 1 が HS 群では増加し、DMF 投与はそれを低下させた。組織学的にも、HS 群で見られた心筋の線維化は DMF 投与により改善した。

腎臓に関しては、血清クレアチニンは HS 群では増加し、DMF 投与はそれを低下させた。

腎臓の遺伝子発現では、炎症に関係する IL-1、Cc12、ICAM、PDGFb、酸化ストレスに関する Nox4、線維化に関する TGF- β 1 が HS 群では増加し、DMF 投与はそれを低下させた。組織学的にも、HS 群で見られた腎臓の線維化と尿細管障害は DMF 投与により改善した。

生存率は、HS 群では短縮したが、HS+DMF 群では改善した (図 1)。



以上のように我々は、DS ラットにおいて、赤血球寿命短縮の原因として、eryptosis があり、

その誘因の一つとして酸化ストレスが疑われることを見出した。それに対して抗酸化薬・抗炎症薬である DMF が酸化ストレスを軽減すると、貧血が改善されたことは、赤血球寿命短縮の原因が酸化ストレス・慢性炎症であることを裏付けた。さらに DMF は、心筋障害、腎障害、高血圧に対しても効果があり、生存率も改善することを見出した。このことから、心腎貧血症候群の根本的な原因として慢性的な酸化ストレスや炎症があることが示唆された。DMF は、Nrf2 活性化薬であるが、同じ作用機序を有するバルドキシロンメチルが糖尿病性腎症の治療薬として開発中である。DMF は、現在多発性硬化症の治療薬としてのみ臨床応用されているが、drug repositioning により心腎貧血症候群の治療薬として応用される可能性がある。今後さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ito S, Manabe E, Dai Y, Ishihara M, Tsujino T.	4. 巻 148
2. 論文標題 Juzentaihoto improves adenine-induced chronic renal failure in BALB/c mice via suppression of renal fibrosis and inflammation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci .	6. 最初と最後の頁 172-178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2021.10.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Manabe E, Ito S, Ohno Y, Tanaka T, Naito Y, Sasaki N, Asakura M, Masuyama T, Ishihara M, Tsujino T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Reduced lifespan of erythrocytes in Dahl/Salt sensitive rats is the cause of the renal proximal tubule damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79146-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 辻野 健	4. 巻 36
2. 論文標題 心腎貧血症候群モデルラットにおける貧血の機序	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 237-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito S, Ohno Y, Tanaka T, Kobuchi S, Ayajiki K, Manabe E, Masuyama T, Jun-Ichi S, Tsujino T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Neutrophil/lymphocyte ratio elevation in renal dysfunction is caused by distortion of leukocyte hematopoiesis in bone marrow.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Renal Failure	6. 最初と最後の頁 284-293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/0886022X.2019.1597736.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Naito Y, Sawada H, Yasumura S, Horimatsu T, Okuno K, Tahara S, Nishimura K, Asakura M, Tsujino T, Masuyama T, Ishihara M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Iron deficiency induces heart failure with ectopic cardiac calcification in mice with metabolic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation Heart Failure	6. 最初と最後の頁 721-723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.121.009034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naito Y, Tsujino T, Masuyama T, Ishihara M.	4. 巻 29
2. 論文標題 Crosstalk between iron and arteriosclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 308-314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.RV17060.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小海 龍矢、伊藤 都裕、真鍋 恵理、石原 正治、辻野 健
2. 発表標題 Dahl食塩感受性高血圧ラットに合併する貧血に対するエリスロポエチン製剤と鉄製剤の治療効果
3. 学会等名 第8回 臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳原 俊、伊藤 都裕、戴 毅、辻野 健
2. 発表標題 慢性腎臓病に対する十全大補湯の効果
3. 学会等名 第8回 臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳生 未来介、伊藤 都裕、辻野 健
2. 発表標題 アデニン誘導性腎障害モデルマウスにおけるNLR上昇の機序の検討
3. 学会等名 第8回 臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 都裕、真鍋 恵理、増山 理、辻野 健
2. 発表標題 慢性腎不全における好中球/リンパ球比(N/L比)上昇の機序の検討
3. 学会等名 第7回 臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山谷 冬華、伊藤 都裕、新井 優里、辻野 健
2. 発表標題 フマル酸ジメチルは心臓におけるTGF- 1及びICAM-1発現を抑制 し、Dahl食塩感受性ラットにおける全生存率を改善する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	内藤 由朗 (Naito Yoshiro) (10446049)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	増山 理 (Masuyama Tohru) (70273670)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	伊藤 都裕 (Ito Satoyasu) (20767363)	兵庫医科大学・薬学部・講師 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関