

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08522

研究課題名(和文)鉄欠乏に対する心筋ミトコンドリア応答性の低下が心不全に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Effects of impaired response to myocardial mitochondrial iron depletion on the development of heart failure

研究代表者

佐藤 達也 (SATO, TATSUYA)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40592473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：全身性の鉄欠乏は心腎血管疾患の予後不良因子であるが、その機序は不明である。本研究課題では全身性の鉄欠乏を伴う不全心モデルである腎下垂摘ラット(SNx)を用いて、心筋ミトコンドリアの鉄代謝異常の役割に着目した。全身の鉄欠乏とは対照的に、心筋ミトコンドリアのヘム鉄の量はSNxでむしろ増加し、酸化ストレスが亢進していた。この機序として、低酸素刺激で活性化されるミトコンドリアのヘム合成経路の律速酵素ALAS2の発現増加およびFenton反応による活性酸素種の産生増加が示唆された。以上より、不全心では鉄欠乏に対する心筋ミトコンドリア応答性が障害され、細胞死や心機能障害と関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、不全心では鉄欠乏にも関わらず心筋ミトコンドリアではむしろヘム鉄が増加する可能性が示唆された。全身性特に血清の鉄欠乏は必ずしも心筋ミトコンドリア鉄欠乏を反映しない可能性があることから、鉄補充の際には組織鉄過剰に注意が必要であること、またミトコンドリア鉄代謝異常は心不全の新規治療標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Systemic iron deficiency exacerbates the prognosis of cardiovascular disease, but its mechanisms are unknown. In this study, we focused on the role of impaired response to iron deficiency in the myocardial mitochondria in the subtotal nephrectomized rat (SNx), which is a model of the failing heart with systemic iron deficiency. Contrary to decreased serum iron levels, the amount of heme iron in myocardial mitochondria was increased and oxidative stress was enhanced in SNx. Increased expression of ALAS2, a rate-limiting enzyme in the mitochondrial heme synthesis pathway and the increased production of reactive oxygen species by the Fenton reaction were suggested as mechanisms for the phenotypes. These findings indicate that impaired response to iron deficiency in the myocardial mitochondria in the failing hearts is associated with cellular death and cardiac dysfunction. Impaired mitochondrial iron response may be a novel therapeutic target for heart failure.

研究分野：ミトコンドリアを含めた代謝機能解析

キーワード：鉄代謝 ミトコンドリア 心筋症 慢性腎不全

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鉄は必須微量元素であり細胞における様々な反応系にとって重要である一方、過剰な鉄は Fenton 反応や Haber-Weiss 反応を介し、細胞障害性のある活性酸素種 (ROS) の産生を触媒する。従って、鉄の恒常性は細胞内で厳格に維持される必要がある。特に、心筋はエネルギー需要量が高く、ミトコンドリア電子伝達系において鉄含有分子は電子授受の中心的役割を果たすなど、鉄の適切な制御が心筋の機能維持にとっても重要であると考えられる。このように、ミトコンドリアは細胞内での鉄代謝の中心の場であり、心筋の鉄恒常性維持にとってミトコンドリアにおける鉄代謝の役割が重要である。

また近年の高齢化の影響、肥満・糖尿病・慢性腎疾患などの併存症の増加により、心不全の発症頻度が急速に増加しており、心不全パンデミックと形容されるようになってきている。心不全の発症予防と予後の改善は、国内外において早急の課題である。個体レベルでの全身性鉄欠乏は、貧血とは独立して慢性心不全患者の予後不良因子であることは既に知られているが、その機序については不明な点が多い。また、鉄補充療法については、欧州心臓病学会 (ESC) では静脈注射による鉄補充を支持するガイドラインを発表しているが、アメリカ心臓協会 (AHA) では鉄補充は支持されておらず、結論は出ていない。国内においても、日本循環器学会/日本心不全学会合同ガイドライン 2017 では鉄欠乏に対する治療について、エビデンスレベルが高い治療法の言及がなく、貧血補正に対する輸血療法や鉄補充療法の有効性すら、未だに確立していないのが現状である。

以上より、ミトコンドリアにおける鉄代謝が心機能維持にとって重要であるにも関わらず、心不全を合併した全身性鉄欠乏において、ミトコンドリア鉄代謝の役割は明らかになっておらず、鉄欠乏合併時の有効な治療戦略も確立されていない点が大きな問題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、全身性鉄欠乏を合併する心不全モデルとして、5/6 腎摘を施術したラット (subtotal nephrectomy: SNx) を使用し、血清の鉄欠乏と心筋の細胞質分画およびミトコンドリア分画における非ヘム鉄とヘム鉄の含有量を評価する。またミトコンドリア鉄代謝異常が観察された場合は、その関連分子の模索および、虚血再灌流障害における心筋細胞死について評価する。これらの実験により、不全心筋のミトコンドリアにおける鉄代謝異常が心機能および細胞死に及ぼす影響を探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

鉄欠乏を伴う基質的心疾患モデル (心不全診療ガイドラインのステージ B 相当) として、8 週齢の SD ラットに 5/6 腎摘を施術した腎全摘モデルラット (subtotal nephrectomy: SNx) を作成する。コントロールラット (Sham) は SNx と同じ手術時間、で被膜切除術のみを施術した。

実験 : 施術後 5 週後に麻酔下で、血清中の鉄、不飽和鉄結合能、腎機能、血行動態を評価し、安楽死させた後に心臓を摘出し、心重量を測定した後心筋を液体窒素で保存し、-80 度で保存し、生化学的な解析を行った。

実験 : 施術 5 週後に麻酔下で開胸し、左室前下行枝を 20 分虚血-2 時間再灌流することにより心筋梗塞を作成し、Sham と SNx の心筋梗塞サイズを評価した。

### 4. 研究成果

SNx は Sham に比して、約 3 倍血清クレアチニン値が上昇し、血圧が高く、心重量が大きく、ヘモグロビン濃度、血清鉄、総鉄結合能の低下を示した。SNx が臨床における腎機能低下、高血圧、心肥大、貧血、全身性鉄欠乏を呈しているモデル (鉄欠乏と慢性腎疾患を合併した不全心モデル) であることを確認した。

心筋の細胞質分画では SNx は Sham に比して非ヘム鉄の含有量が有意に低かった。実際、細胞質における鉄欠乏時に活性化される iron regulatory protein (IRP) により制御される心筋フェリチン発現量は、Sham に比して SNx で有意に低下しており、IRP を介した反応系は SNx で正常に機能していることが示唆された。一方、同じく鉄欠乏時に活性化し、ミトコンドリア鉄利用を最適化することが報告されている tristetraprolin (TTP) の発現量は Sham に比して SNx で有意に低下していた。SNx では TTP を介した鉄欠乏に対する適応が低下していることが示唆された。また、心筋のミトコンドリア分画では、全身の鉄欠乏に反して、SNx では Sham に比して、ヘム鉄の含有量がむしろ増加していた。この機序として、低酸素刺激あるいはエリスロポエチンにより誘導されることが報告されているミトコンドリアのヘム合成経路の律速酵素である aminolevulinic acid synthase 2 (ALAS2) の発現増加を伴っていた。更に SNx の心筋単離ミトコンドリアでは、酸化ストレスを反映する蛋白カルボニル化が Sham に比して有意に増加しており、

ヘム鉄増加による Fenton 反応を介した酸化ストレスの亢進が示唆された。

最後に、Sham と SNx で虚血再灌流障害に対する心筋梗塞サイズを評価することで細胞死を評価した。20 分虚血-2 時間再灌流を施行した心筋虚血再灌流モデルにおいて、心筋梗塞サイズは Sham に比して SNx で大きく、SNx で虚血耐性の低下が示唆された。更に、我々の先行研究で、赤血球造血刺激因子製剤 (ESA) の一種である、エポエチンベータペゴル (0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ ) の 4 週間の前投与は SNx の心筋梗塞サイズ増大を抑制することを既に報告していたため、vehicle、low-dose (0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ )、high-dose (1,2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ ) の投与により、心筋ミトコンドリアの鉄含有量および心筋梗塞サイズを評価した。SNx の心筋梗塞サイズの増大は low-dose のエポエチンベータペゴルによって改善したが、high-dose では改善しなかった。一方、high-dose のエポエチンベータペゴルは ALAS2 の発現量を増加させ、心筋ミトコンドリアのヘム鉄の含有量と酸化ストレスを有意に増加させた。以上より、心筋ミトコンドリアヘム鉄の増加はエポエチンベータペゴルによる心筋保護効果をキャンセルさせる可能性が示唆された。

以上より、不全心筋においては、血清鉄の低下は必ずしも心筋ミトコンドリアの鉄の低下を反映しないことが示唆された。全身性鉄欠乏合併の心不全では、鉄補充療法の際には骨髄における鉄利用のみならず、組織とくに心筋ミトコンドリア鉄過剰が起こっている可能性を考える必要性が示唆された。また、臨床研究で鉄欠乏合併の心不全に対する ESA 製剤の心保護効果が得られていない機序の 1 つとして、ALAS2 の発現促進による心筋ミトコンドリアのヘム鉄増加を介した酸化ストレスの増大が関与している可能性が示された。このように、本研究では、不全心筋においては鉄欠乏に対するミトコンドリア心筋鉄代謝異常のため、鉄補充や ESA 治療に抵抗性を示している可能性が示された。今後、心筋ミトコンドリア鉄代謝異常を標的とした更なる治療法の確立が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miura Tetsuji, Sato Tatsuya, Yano Toshiyuki, Takaguri Akira, Miki Takayuki, Tohse Noritsugu, Nishizawa Keitaro	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of Erythropoiesis-Stimulating Agents in Cardiovascular Protection in CKD Patients: Reappraisal of Their Impact and Mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovascular Drugs and Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10557-022-07321-3	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Igaki Yusuke, Tanno Masaya, Sato Tatsuya, Kouzu Hidemichi, Ogawa Toshifumi, Osanami Arata, Yano Toshiyuki, Kuno Atsushi, Miki Takayuki, Nakamura Takashi, Miura Tetsuji	4. 巻 154
2. 論文標題 Xanthine oxidoreductase-mediated injury is amplified by upregulated AMP deaminase in type 2 diabetic rat hearts under the condition of pressure overload	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 21～31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2021.01.002	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tatsuya Sato, Toshiyuki Yano, Keitaro Nishizawa, Yukishige Kimura, Takayuki Miki, Masaya Tanno, Atsushi Kuno, Michinori Hirata, Ryohei Kawasaki, Tetsuji Miura.
2. 発表標題 Protective effect of chronic treatment with a continuous erythropoietin receptor activator on CKD-induced myocardial intolerance to ischemia/reperfusion injury is lost by use of its excessive dose.
3. 学会等名 2019 XXIII ISHR World Congress.（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuya Sato, Nobutoshi Ichise, Takeshi Kobayashi, Hiroya Yamazaki, Yoshinori Terashima, Noritsugu Tohse
2. 発表標題 Increased glucose oxidation is associated with increased ATP demand in rat fetal hearts just after initiation of the heartbeat through increased glycolytic gene expressions and activated mitochondrial respiration capacity.
3. 学会等名 Biophysical Society Annual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuya Sato, Tatsuya Kikuchi, Toshiyuki Yano, Takayuki Miki, Masaya Tanno, Tetsuji Miura
2. 発表標題 Accumulation of free iron, but not protein-bound iron, in mitochondria may contribute to development of doxorubicin-induced cardiomyopathy
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2020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	矢野 俊之  (Yano Toshiyuki)  (40444913)	札幌医科大学・医学部・講師    (20101)	

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
---------	---------