

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：34519
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590959
 研究課題名（和文） メタボリックシンドロームにおける鉄代謝異常の機序とそれに基づく新規治療法の開発
 研究課題名（英文） Mechanisms of abnormal iron metabolism in metabolic syndrome and its implications for new therapeutic strategies.
 研究代表者 辻野 健（TSUJINO TAKESHI）
 兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
 研究者番号：90283887

研究成果の概要（和文）：

肥満者にはしばしば多血症や貯蔵鉄の増加がみられる。鉄は遷移金属でありその過剰状態はフリーラジカルの産生を促進する。酸化ストレスは糖尿病性腎症の発症に重要な役割を果たしている。我々は鉄制限が2型糖尿病モデルラットである Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rat (OLETF) の糖尿病性腎症発症に及ぼす影響を検討した。高食塩高脂肪食を与えられた OLETF において、鉄制限は血圧を低下させ、尿蛋白を減少させ、糸球体障害を軽減させた。その機序としては、腎臓における酸化ストレスを軽減することにより腎の低酸素状態を改善させること、腎臓内レニン・アンジオテンシン系を抑制することが考えられた。鉄制限は糖尿病性腎症予防の新たな手法となるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：

High body iron levels are found in type 2 diabetes mellitus (DM). Iron excess leads to tissue injury through free radical formation. We investigated the effect of iron restriction on diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, a model of type 2 DM. In OLETF given high salt-high fat diet, iron restriction reduced systolic blood pressure, urinary excretion of protein and renal glomerular injury. Iron restriction suppressed oxidative stress and renin-angiotensin system in the kidney and attenuated renal hypoxia in the HFS+IR group compared to the HFS group. Iron restriction may be beneficial in prevention of nephropathy in type 2 DM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：メタボリックシンドローム、鉄代謝、多血症、インスリン抵抗性、高血圧

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪蓄積により耐糖能異常、高脂血症、高血圧などの多数のリスクファクターを合

併するメタボリックシンドローム (MetS) が動脈硬化疾患の基盤として重要であることが広く認識され、2005 年には診断基準が策定

された。その基準を満たすものは中高年の男性の2人に1人、女性の5人に1人といわれ、日本全国では1000万人を超えるといわれている。その対策として2008年度より特定健康診査・特定保健指導が導入された。MetSの原因は摂取カロリーが消費カロリーを上回ることによる内臓脂肪の蓄積であるから、食事指導と運動療法はその予防と治療において王道と呼ぶべきものであり、その効果が期待される。しかし、生活指導の改善は必ずしも容易ではなく、特定健康診査・特定保健指導にかかるコストに見合う効果が得られるかどうか危惧される部分もある。とはいえ、MetSの構成因子である軽度の耐糖能異常、高脂血症、境界域高血圧に幅広く薬物療法を施行することにより心血管系合併症が予防できるかどうかについてはエビデンスがなく、なおかつ膨大な患者群に長期間投薬することになり医療費の高騰を招くので良策とはいえない。低コストでなおかつ有効率の高い治療法が求められている。

一方、近年鉄代謝異常とMetSの関係が注目されている。そのきっかけとなったのは非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) から得られた知見である。MetS患者には高頻度に脂肪肝が合併する。脂肪肝は良性的肝疾患であると考えられてきたが、その約10%は肝臓の炎症を伴い、肝硬変から肝臓に進展することが明らかとなり、NASHと呼ばれるようになった。NASHの治療法に確立されたものはないが、その約3分の1の患者において鉄貯蔵量の指標となる血清フェリチンが高値であり、それらの患者には瀉血が有効であることが判明した (Valenti L et al. Am J Gastroenterol 2007; 102: 1251-1258)。鉄は遷移金属として生体内の酸化還元反応に深くかかわっており、その過剰は酸化ストレスの原因となる。酸化ストレスはMetSの基本病態であるインスリン抵抗性を惹起し、耐糖能異常の原因になる (Houstis N et al. Nature 2006; 440: 944-948)のみならず、高血圧や動脈硬化の原因になる。体内に鉄が貯留しておこるヘモクロマトーシスにおいては脾臓のβ細胞の障害によるインスリン分泌の低下だけではなく末梢のインスリン抵抗性が25-60%の患者で見られる。またインスリンが鉄の取り込みを促進しフェリチンの合成を増加させることも知られている。MetS患者には多血症が珍しくなく、肥満の動物モデルにおいても鉄の吸収亢進と多血症が報告されている。頻回の献血や瀉血がインスリン抵抗性を改善することも報告されている。閉経前の女性では動脈硬化性疾患の罹患率が少ないことも、月経により定期的に体内から鉄を排泄していることによる、という仮説がある。

以上のように鉄の過剰はMetSの病態に深

くかかわっている可能性があるが、その機序はいまだに不明な点が多い。もちろん鉄は生体にとって必須の微量元素であり、その不足が様々な健康障害をもたらすことは明らかである。我々はMetSにおける鉄代謝異常の機序を解明することにより、新しい治療のターゲットを見つきたいと考える。さらに、瀉血/献血によって利益を受ける患者の同定ができれば、安価な方法でMetSの病態を改善しつつ、不足しがちな血液製剤の供給を増加させる、という一石二鳥の副次的効果が得られることも期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は鉄制限がMets, 高血圧、糖尿病に合併する腎障害、心機能障害、血管障害にどのような影響をおよぼすのか検討することである。我々は主に2型糖尿病モデルであるOtsuka-Long Evans Tokushima Fatty Rat (OLETF)とその正常コントロールであるLong Evans Tokushima Rat (LETO)を用いて、鉄欠乏がMetSに及ぼす影響を検討することにした。OLETFは肥満に続発する2型糖尿病とそれによる腎症を呈するのみならず、食塩感受性高血圧と心臓の拡張機能障害も呈する。さらにOLETFではLETOと比べると多血症を呈している。鉄欠乏にした場合の、血圧やインスリン抵抗性、心臓の拡張能低下も改善するのかどうか検討することにした。

3. 研究の方法

肥満糖尿病高血圧モデル(OLETF)では加齢に従い食塩感受性高血圧、2型糖尿病、腎障害、左室拡張能異常が出現する。OLETFに鉄制限が及ぼす影響の検討をまず検討した。ラットの飼料はベースとなる糖質・脂質・タンパク質・繊維分にミネラルMixを追加することにより作製される。ミネラルMixには $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7/5\text{H}_2\text{O}$ が0.6%含まれており、それを抜くことにより鉄欠乏食を作製することができる。

OLETFラットとLETOラットを4週齢で入荷させ、8週齢で体重測定、血圧測定、蓄尿、採血を行った。10週齢から以下の各群に分け、特別食を開始した。

- (1) OLETF 高食塩高脂肪群 (OLETF HFS 群) : 8%NaCl 添加 HFD32 (オリエンタル酵母)
- (2) OLETF 高食塩高脂肪低鉄食群 (OLETF HFS-IR 群) : 8%NaCl 添加 HFD32(低 Fe)
- (3) OLETF 高食塩高脂肪ヒドララジン群 (OLETF HFS-Hyd 群) : 8%NaCl 添加 HFD32+ヒドララジン(3mg/kg/日)

LETO : 通常食(CE-2, 日本クレア)

その後4週間おきに体重測定、血圧測定、蓄尿、採血を行った。蓄尿ではNa, K, Cl, Cr, 蛋白定量、80HdGを測定した。血液では血糖値、インスリン、CBC、鉄、フェリチンを

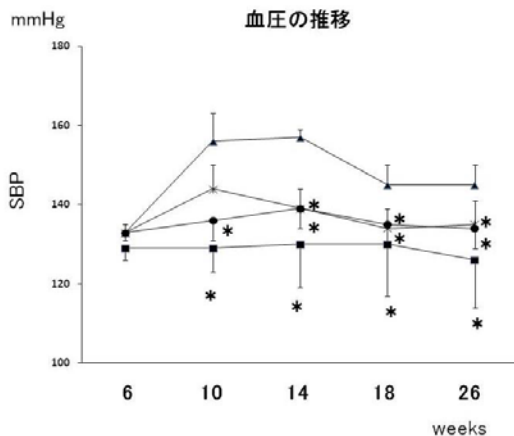
測定した。

25 週齢で心エコー検査を行い、26 週齢でペントバルビタール麻酔下に全採血し、臓器サンプルを得た。Western blot 法にて各種蛋白の定量を行った。低酸素誘導因子である HIF-1 α 、HIF-2 α を検出するために腎臓から核抽出液を調整した。Total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて各種 mRNA を定量した。各組織を HE・マッソントリクローム・PAS 染色によってその障害を評価するとともに、糸球体の障害をデスミンに対する免疫染色で評価した。さらに各群 n=3 ずつ、安楽死の 1 時間前に低酸素部位を検出するためにピモニダゾール（低酸素状態で蛋白と共有結合する物質）を 60 mg/kg 腹腔内に投与し、抗ピモニダゾール抗体で免疫染色することにより、低酸素部位を検出した。

4. 研究成果

OLETF の 3 群間に体重の差はなかった。収縮期血圧は OLETF HFS-IR 群と OLETF HFS-Hyd 群で OLETF HFS 群よりも低値であった (図 1)。

[図 1]



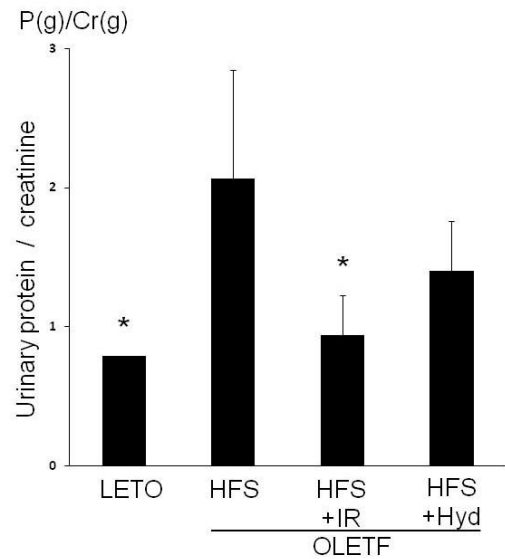
OLETF HFS群(▲), HFS+IR群(●), HFS+Hyd群(○), LETO群(■). 平均±SD. *P<0.05 vs. OLETF HFS群

心エコー検査の収縮能の指標 (%FS)、拡張能の指標 (E/A, Dct) において各群間に有意差が認められず、心重量でも差がみられなかった。26 週齢でのタンパク尿が OLETF HFS-IR 群で OLETF HFS 群よりも減少したため腎臓を中心に検討を行った (図 2)。

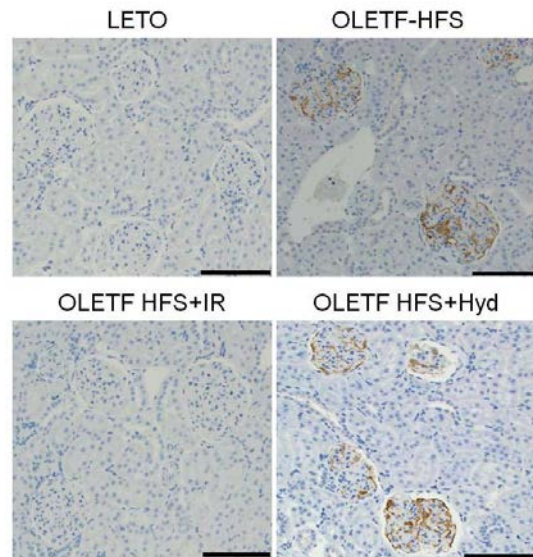
デスミンは障害された糸球体に発現する蛋白である。OLETF HFS-IR 群では OLETF HFS 群よりもデスミン染色陽性の糸球体が減少しており、糸球体障害の程度が改善していることが明らかになった (図 3)。ヒドララジン投与によって血圧は鉄制限と同程度に低下したが、尿蛋白の量やデスミン染色では鉄制限と同程度には改善しておらず、鉄制限による改善は血圧低下によるもののみではない

ことが示唆された。

[図 2] 尿中蛋白/クレアチニン比



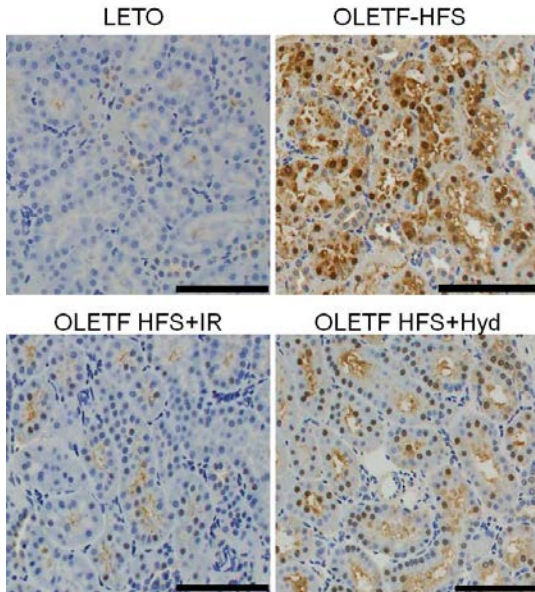
[図 3] デスミン免疫染色



腎糸球体のデスミン染色 (bar=100 μ m)。鉄制限により糸球体障害が著しく改善しているのがわかる。

さらに OLETF HFS-IR 群では OLETF HFS 群よりもヘモグロビン値が低かったにもかかわらず、腎臓の低酸素の指標であるピモニダゾール染色は低下していた。(図 4)。

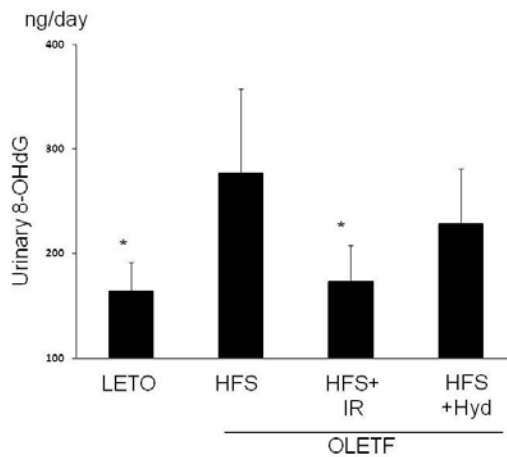
[図4]ピモニダゾール免疫染色



腎皮質のピモニダゾール染色 (bar=100μm)。鉄制限により腎の低酸素状態が著しく改善しているのがわかる。

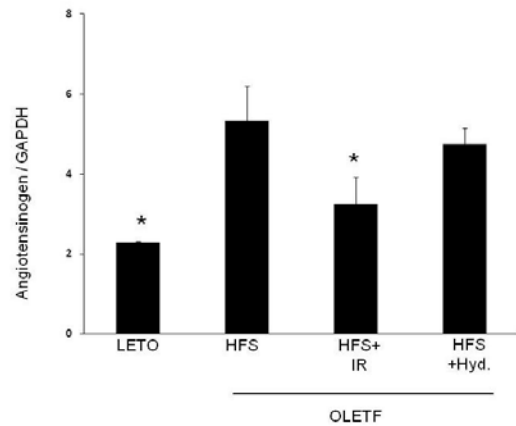
その機序としては酸化ストレスマーカーである 8OHdG の尿中排泄が減弱していたことから、鉄制限による酸化ストレスの低下が腎血流の改善につながったのではないかと考えられた。(図5)。

[図5]尿中 8OHdG 排泄



またアンジオテンシノーゲン mRNA 発現が低下していたことから腎組織内のレニン・アンジオテンシン系も抑制されたこともその一因であると考えられた。(図6)。

[図6]腎アンジオテンシノーゲン発現



以上の結果より、鉄制限は OLETf における高血圧、糖尿病性腎症を予防することが明らかとなった。その機序としては腎内の酸化ストレスやレニン・アンジオテンシン系の過剰な活性化を軽減し、腎臓の低酸素を改善することが考えられた。

今後、多血症を伴う肥満者において、鉄制限は腎障害予防に役立つ可能性があり、更なる検討を要すると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Naito Y, Tsujino T, Fujimori Y, Sawada H, Akahori H, Hirotani S, Ohyanagi M, Masuyama T. Impaired expression of duodenal iron transporters in Dahl salt-sensitive heart failure rats. *J Hypertens.* 2011 Apr;29(4):741-8. (査読あり)
- ② Naito Y, Hirotani S, Sawada H, Akahori H, Tsujino T, Masuyama T. Dietary iron restriction prevents hypertensive cardiovascular remodeling in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension.* 2011 Mar;57(3):497-504. Epub 2011 Jan 24. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 竹内志織、佐々木尚子、岡田侑磨、前田有貴、石田拓巳、松本実佳、増山理、辻野健 鉄制限は 2 型糖尿病ラットの早期腎症を予防する 日本薬学会第 132 回年会 2012. 3. 29、札幌
- ② 藤井 彩、内藤由朗、澤田 悠、辻野 健,

佐々木尚子, 赤堀宏州, 大柳光正, 増山理. 慢性腎臓病モデルにおける鉄の関与. 第34回日本高血圧学会総会, 2011. 10. 20-22, 栃木.

- ③ 佐々木尚子, 松本実佳, 内藤由朗, 赤堀宏州, 増山理, 辻野健. 鉄制限は2型糖尿病モデルラットの早期腎症発症を予防する. 第33回日本高血圧学会総会, 2010. 10. 15-17, 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻野 健 (TSUJINO TAKESHI)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 90283887

(2) 研究分担者

増山 理 (MASUYAMA TOHRU)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70273670

川端 正明 (KAWABATA MASAOKI)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 70411999

内藤 由朗 (NAITO YOSHIRO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10446049