

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591103

研究課題名(和文)慢性心不全における鉄代謝異常の検討

研究課題名(英文)Investigation of anemia and iron metabolism in chronic heart failure

研究代表者

辻野 健 (TSUJINO, Takeshi)

兵庫医療大学・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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性心不全患者に貧血と鉄欠乏が合併すると、それが予後不良と強く関連することから、その発症メカニズムと治療について、慢性心不全モデルであるダール食塩感受性(DS)ラットを用いて検討した。まず治療法として、造血と鉄吸収を司る低酸素応答性転写因子HIF-2を活性化するSirtuin 1の活性化薬レスベラトロールの効果を検討したが効果はなかった。葉酸や静注鉄の補充も効果はなかった。貧血に有効とされる漢方薬の十全大補湯は貧血を改善させた。次に貧血の発症機序として、赤血球半減期の低下が重要であることが明らかになった。これらの知見は慢性心不全の貧血に対する新たな治療法の開発につながるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Anemia and iron deficiency are associated with poor prognosis in patients with chronic heart failure (CHF). The aim of the study is to investigate the mechanism and treatment of them in CHF. We have previously reported that anemia and iron deficiency are induced by high salt diet in Dahl salt-sensitive hypertensive (DS) rats. Hypoxia inducible factor-2, a master regulator of erythropoiesis and iron metabolism, has been reported to be activated by Sirtuin 1, but oral supplementation of resveratrol, an activator of Sirtuin 1, failed to improve anemia in DS rats. Oral supplementation of folic acid and parenteral supplementation of iron also failed to improve anemia in DS rats. Orally administered Juzen-taiho-to, Chinese herbal medicine, ameliorates anemia in DS rats. As a mechanism of anemia, we found that reduced half-life of red blood cells is a major factor of anemia. These findings may facilitate the development of new strategy for treating anemia and iron deficiency in CHF.

研究分野：循環器内科学

キーワード：慢性心不全 貧血 心腎貧血症候群

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全患者において貧血は予後不良の重要な因子である。慢性心不全患者の約30-60%には貧血が合併しており、それが予後不良と強く関連する独立した因子であることから、貧血をいかに診断・治療すべきかが大きな課題となっている。心不全患者における貧血の成因は、体液貯留による循環血漿量の増加、炎症性サイトカインによる骨髓造血反応の低下、慢性腎臓病合併によるエリスロポエチン分泌の低下、鉄吸収・利用障害、食欲低下による摂取不足など様々な因子が関係するが、それぞれの機序がどのくらいの割合で関与しているのかは明らかではない。

慢性心不全患者は鉄欠乏状態にある。しかし貧血の原因はそれだけではない。我々は慢性心不全患者およびモデル動物において、貧血の機序を検討した。まず検討したのはヘプシジンである。ヘプシジンは腸管からの鉄の吸収とマクロファージからの鉄の放出を抑制するペプチドホルモンである。ヘプシジンは鉄欠乏状態で減少するが、慢性炎症においてIL-6などのサイトカインにより上昇し、関節リウマチなどの炎症性疾患において鉄利用障害の原因となる。故にヘプシジンの高値は鉄の利用障害の、低値は鉄欠乏のよい指標となる。慢性心不全においてはTNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカインが上昇していることから、ヘプシジンが高値でありそれが貧血の原因になっていることが予想された。しかし実際はヘプシジンが低値を示すものが約50%存在し、それらの患者はエリスロポエチン(Epo)が高値、フェリチンが低値という鉄欠乏性貧血のパターンを示していた(Matsumoto M et al. *Circ J* 2010; 74: 301-307)。また、心不全モデルとして汎用されるDahl食塩感受性高血圧(DS)ラットにおいても、心不全期になると貧血、血清鉄の減少、Epoの高値、肝臓のヘプシジン発現減少を認め、ヒトの慢性心不全患者ときわめて類似した鉄欠乏パターンを示した(Naito Y et al. *J Hypertens* 2011; 29: 741-748)。さらに、十二指腸粘膜において、鉄欠乏状態では増加するべき鉄吸収にかかわるトランスポーター(DMT-1, Ferroportin)や酵素(Dcyt-b)の発現が増加しておらず、これが鉄欠乏の機序であると考えられた。しかし、心不全における貧血は正球性であり、鉄補充による改善も軽度であるので、他の要因も関与していると考えられる。

最近慢性心不全患者に静注鉄製剤を投与するいくつかの臨床試験が行われ、貧血の改善の有無に係らず、自覚症状の改善に有効であることが報告されている。鉄欠乏状態であれば、それを補充することはきわめて理にかなった行為である一見思われるが、はたしてそうだろうか。静注鉄製剤による鉄補充は感染症を増やすことが知られている。なぜなら鉄はヒトにとって必須の元素だが、細菌にとっても増殖に必須の元素であるからであ

る。また鉄はFenton反応によって活性酸素(reactive oxygen species: ROS)の産生を促進する。心不全や動脈硬化などの循環器疾患の発症・進展にはROSが大きく関与することが明らかになっている。我々は鉄制限がDSラットの血圧上昇と臓器障害を予防することを示した(Naito Y et al. *Hypertens* 2011;57: 497-504)。心不全患者に鉄補充を行うことはROSを増やし、かえって悪化させる危険性を秘めている。鉄補充を安全に行うためには、慢性心不全患者における鉄代謝異常についてさらに詳細に機序し、鉄補充の際に起きる反応を詳しく解析する必要がある。そしてできれば鉄欠乏を起こさないようにし、鉄補充を不用にするような治療法の開発が望ましい。

2. 研究の目的

(1) DSラットに対するレスベラトロールの効果の検討

腸管粘膜の鉄吸収にかかわるトランスポーター(DMT-1, Ferroportin)や酵素(Dcyt-b)は低酸素応答性転写因子HIF-2によって転写調節を受けている。HIF-2はHIF-1と同じく常にその蛋白は合成され続けているが、正常酸素分圧下ではプロリンヒドロキシラーゼにより水酸化を受けて分解されてしまう。鉄はプロリンヒドロキシラーゼの必須のcofactorであり、鉄欠乏はプロリンヒドロキシラーゼの活性低下を通じてHIF-1/2を安定化する。さらに最近、HIF-2の活性が長寿遺伝子Sirtuin 1(Sirt1)により脱アセチル化をうけ活性化されることが明らかになってきた(Dioum EM et al. *Science* 2009 324 1289-1293)。SirtuinファミリーはNAD⁺依存性脱アセチル化酵素であり、カロリー制限による老化の抑制に最も重要な役割を果たす。老化の形質の1つに貧血があり、正球性貧血を呈し、軽度の炎症状態を伴うことが多く、しかもヘプシジンが増加していない、という慢性心不全における貧血と似たようなパターンを呈する。レスベラトロールは赤ワインに多く含まれるポリフェノールであり、Sirtuin 1の活性化因子である。慢性心不全における貧血にレスベラトロールが有効であるかどうかを検討することが、第一の目的である。

(2) 心不全モデルラットにおける貧血と筋萎縮に鉄補充が与える影響の検討

心不全患者においては病状が進行するとともに、これも老化と同じように、筋肉の萎縮(サルコペニア)が起こる。6分間歩行などの運動能力の指標は心不全患者の予後の強力な予測因子である。慢性心不全患者に対する鉄補充は、貧血を合併する患者では貧血を改善し、貧血のない患者においても6分間歩行能力を改善させるので、筋肉における鉄代謝障害が慢性心不全では生じている可能性がある。一般に加齢や免荷によるサルコペ

ニアの場合、筋肉内の非ヘム鉄は増加し、鉄の取り込みに必要なトランスフェリン受容体は減少し、酸化ストレスが増大している。もし同様の状態が心不全でも起こっていたら、鉄補充が筋萎縮を改善する可能性は乏しいように思える。そこで、

心不全において、鉄欠乏は貧血の原因の一部なのか。

心不全において、筋肉内の鉄は欠乏しているのか。鉄補充を行ったとき筋肉量は改善するのか。

以上の課題を DS ラットの心不全モデルを使用して解明することが第 2 の目的である。

(3) 心不全モデルラットにおける貧血に対する葉酸補充の効果

最近腎不全ラットでは葉酸(FA)トランスポーターの発現が低下していることが報告されたので、DS ラットの貧血における葉酸代謝異常の関与を検討することを第 3 の目的とした。

(4) 心不全モデルラットの貧血発症における赤血球寿命短縮の関与の検討

DS ラットの骨髄ではむしろ有核細胞数が増加していることから、赤芽球系のアポトーシスや、成熟赤血球の半減期の増加の関与が疑われる。骨髄における赤芽球系細胞のアポトーシスや赤血球半減期の短縮が関与するかどうかを検討すること、貧血に対する有効性が示唆されている漢方薬十全大補湯の効果を調べることを第 4 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) DS ラットに対するレスベラトロールの効果の検討

雄性 Dahl 食塩感受性ラットを 4 週齢で入荷し、7 週齢から以下の 3 群に分けた。

- 1) LS 群：ずっと通常食を与えた。
- 2) HS 群：7 週齢から 8% NaCl 食を与えた。
- 3) HS-Res 群：7 週齢から 8% NaCl 食を与えた。レスベラトロール(18 mg/kg/day)を混餌にて 17 週齢から経口投与した。

22 週齢で安楽死させ、臓器サンプルを採取した。

(2) DS ラットに対する鉄補充の効果の検討

雄性 Dahl 食塩感受性ラットを 4 週齢で入荷し、6 週齢から以下の 4 群に分けた。

- 1) LS 群：常食を続けた。
- 2) HS 群：6 週齢で 8%NaCl 食を開始する。10 週齢から生食水 1ml を尾静脈注射により週に 1 回投与した。
- 3) HS+鉄補充群：6 週齢で 8%NaCl 食を開始し、10 週齢から含糖酸化鉄注射液（フェジン®）0.2ml（鉄 4mg に相当）を尾静脈注射により週に 1 回投与した。

14 週齢で安楽死させ、臓器サンプルを採取した。

(3) 心不全モデルラットにおける貧血に対する葉酸補充の効果

- 1) LS 群：常食を続けた。
 - 2) HS 群：7 週齢で 8%NaCl 食を開始した。
 - 3) HS+FA 群 (n=20)：7 週齢で 8%NaCl 食を開始し、13 週齢で 8%NaCl+0.05%葉酸食を開始した。
- 22 週齢で安楽死させ、臓器サンプルを採取した。

(4) 心不全モデルラットの貧血発症における赤血球寿命短縮の関与の検討

雄性 Dahl 食塩感受性ラットを 4 週齢で入荷し、6 週齢から以下の 3 群に分けた。

- 1) LS 群：常食を続けた。
- 2) HS 群：6 週齢で 8%NaCl 食を開始した。
- 3) HS+十全群：6 週齢で 8%NaCl 食を開始し、10 週齢から十全大補湯 1.25g/kg/day を投与した。

12 週齢で赤血球を NHS ビオチンで標識し、3-4 日に 1 回採血し、アビジン-FITC で FACS 解析を行い、赤血球の半減期を検討した。

14 週齢で安楽死させ、臓器サンプルを採取した。

4. 研究成果

(1) DS ラットに対するレスベラトロールの効果の検討

レスベラトロールの投与は DS ラットの血圧、体重、左室肥大、肺重量に対する効果は有意ではなかったが、体重減少と左室肥大を軽減させ、肺うっ血を軽減させる傾向は認められた。有意な改善が見られたのは腎機能（血清クレアチニン値）であった。これまでレスベラトロールの心血管系合併症に対する効果は、早期からの予防の効果のみが報告されていたが、今回我々は 17 週齢という、かなり臓器障害が進行した段階でレスベラトロールの投与を開始しても有効であることを見出した。このことは心不全に対する予防のみならず治療にもレスベラトロールを使用できる可能性を示したものと見える。しかしながらレスベラトロールの投与は貧血を改善させなかった。このことは DS ラットの貧血がいわゆる腎性貧血ではないことを示しているといえる。また血清鉄濃度にも影響を与えなかった。この結果、レスベラトロール単独では HIF-2 の活性化障害を改善することができないことが明らかになった。

(2) DS ラットに対する鉄補充の効果の検討

HS 群では、貯蔵鉄（ベルリンブルー染色で評価）は脾臓では激減し、肝臓では微増していた。経静脈的に鉄補充を行った HS+鉄補充群において、脾臓や肝臓の貯蔵鉄は著増したにもかかわらず、血清鉄の上昇はわずかであり、貧血の改善は全く見られなかった。このことは、心不全モデルにおいて鉄欠乏は存在するものの、貧血の原因は鉄欠乏性ではなく、むしろ鉄利用障害がある可能性が考えられ

た。さらにDSラットの骨髄を検討したところ、有核細胞数は増加し、脂肪細胞がほぼ消失していた。このことから、DSラットの骨髄は、貧血によるエリスロポエチンの上昇に反応して造血を盛んに行っており、貧血の発症にはむしろ赤血球寿命の短縮が関与することが示唆された。

HS群では、前脛骨筋やヒラメ筋の重量と体重が低下しており、HS+鉄補充群による筋重量や体重の改善は見られなかった。このことから、骨格筋の萎縮に鉄欠乏の関与は低いことが示唆された。

(3) 心不全モデルラットにおける貧血に対する葉酸補充の効果

HS群で血中葉酸濃度LS群と比較して低下していなかった。葉酸補充にて血中葉酸濃度は2倍以上に増加したが、貧血は全く改善されず、葉酸不足はDSラットにおける貧血の発症機序に関与していないと考えられた。

(4) 心不全モデルラットの貧血発症における赤血球寿命短縮の関与の検討

HS群で赤血球半減期は短縮していた。赤血球の半減期はHbと相関しており、貧血の主要な原因であると考えられた。十全大補湯投与で貧血は改善したが、赤血球半減期の短縮は改善しなかった。

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9件)

Naito Y, Sawada H, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotsu S, Mano T, Tsujino T, Masuyama T. Cardiac remodeling in response to chronic iron deficiency: role of the erythropoietin receptor. *J Hypertens*. 2015;33(6):1267-1275. 査読有
doi:10.1097/HJH.0000000000000547.

Naito Y, Hosokawa M, Sawada H, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotsu S, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Hcpidin is increased in the hypertrophied heart of Dahl salt-sensitive rats. *Int J Cardiol*. 2014;172(1):e45-47. 査読有
doi:10.1016/j.ijcard.2013.12.067.

Akahori H, Tsujino T, Naito Y, Matsumoto M, Sasaki N, Iwasaku T, Eguchi A, Sawada H, Hirotsu S, Masuyama T. Atorvastatin ameliorates cardiac fibrosis and improves left ventricular diastolic function in hypertensive diastolic heart failure model rats. *J Hypertens*. 2014;32(7):1534-1541; discussion 1541.

査読有

doi:10.1097/HJH.0000000000000184.

Naito Y, Sawada H, Oboshi M, Fujii A, Hirotsu S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Morisawa D, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Increased renal iron accumulation in hypertensive nephropathy of salt-loaded hypertensive rats. *PLoS One*. 2013;8(10):e75906. 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0075906.

Matsumoto M, Sasaki N, Tsujino T, Akahori H, Naito Y, Masuyama T. Iron restriction prevents diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat. *Ren Fail*. 2013 Sep;35(8):1156-1162. 査読有
doi:10.3109/0886022X.2013.819729.

Naito Y, Hosokawa M, Hao H, Sawada H, Hirotsu S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Hirotsu S, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Impact of dietary iron restriction on the development of monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular failure in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;436(2):145-151. 査読有
doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.059.

Naito Y, Sawada H, Hirotsu S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Miki K, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Angiotensin II type 1a receptor signaling is implicated in erythropoietin production in response to iron deficiency in mice. *Int J Cardiol*. 2013;168(2):1607-1608. 査読有
doi:10.1016/j.ijcard.2013.01.034.

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*. 2012;30(11):2192-2201. 査読有
doi:10.1097/HJH.0b013e3283581a64.

辻野健、内藤由朗、増山理 . 特集 / 新しい心不全治療薬4 . 貧血治療薬、臨床薬理、2012; 43: 323-330. 査読無

[学会発表](計4件)

真鍋恵理、佐々木尚子、志方敏幸、増山理、辻野健 . The effect of the Chinese medicine Juzen-taiho-to on anemia in Dahl salt-sensitive rat. 第18回日本心不全学会学術集会、(2014.10.11)大阪国際会議場(大阪市)

佐々木尚子、真鍋恵理、志方敏幸、増山理、辻野健 . Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける鉄欠乏は貧血の原因か?、第 18 回日本心不全学会学術集会、(2014.10.10) 大阪国際会議場 (大阪市)

Sugahara M, Tsujino T, Akahori H, Naito Y, Sawada H, Fukui M, Ohyanagi M, Mitsuno M, Miyamoto Y, Masuyama T. Calcification of aortic valve involves Nuclear factor- B - hypoxia inducible factor 2 pathway. European Society of Cardiology, Aug 31-Sep 3, 2013, RAI convention center (Amsterdam, Holland)

Fujii A, Naito Y, Sawada H, Hirotani S, Iwasaku T, Eguchi A, Okuhara Y, Miki K, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Dietary iron restriction prevents and rescues renal injury in a rat model of chronic kidney disease. American Heart Association Scientific Sessions 2012, Nov. 3-7, 2012, Los Angeles Convention Center (Los Angeles, USA.)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

辻野 健 (TSUJINO, Takeshi)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号 : 90283887

(2)研究分担者

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

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