

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461047

研究課題名(和文) ヘプシジンを介した心不全における貧血と鉄欠乏の機序の解明と新たな治療の検証

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of anemia and iron deficiency in heart failure via hepcidin

研究代表者

埴 晴雄 (Hanawa, Haruo)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40282983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心不全の症例は、貧血や鉄欠乏になることが知られている。しかし、その機序はよくわかっていない。一方、最近ヘプシジンという肝臓から分泌されるホルモンが鉄の代謝に対して重要な役割を持つことがわかってきた。心不全になると、肝臓ではうっ血が起こる。我々は心不全で肝うっ血がおこり、このためにヘプシジンの分泌に影響がおよび、鉄欠乏、貧血をきたすのではないかと推測した。そこでラットで肝うっ血をきたすモデルを作成し、ヘプシジンの産生、貧血、鉄欠乏について調べたところ、ヘプシジンの不適切な過剰分泌が生じて、貧血、鉄欠乏に関係することが示され、一部のヒトの貧血をもつ心不全症例でもその機序が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anemia and iron deficiency are prevalent in patients with heart failure. The etiology of anemia and iron deficiency in heart failure patients is unclear. Hepcidin is known to be a main regulator of iron metabolism. The most frequent histopathologic finding in the liver of heart failure patients is congestion. Therefore, we speculated that liver congestion may induce the expression of hepcidin and result in exacerbated anemia. We prepared animal models with liver congestion and analyze mechanism of anemia and iron deficiency in heart failure via hepcidin. Our data indicated that liver congestion contributes to relative iron deficiency and anemia, and it does so via inappropriate expression of hepcidin. Moreover, our data in some patients with heart failure showed that the mechanism appeared.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 貧血 鉄欠乏 ヘプシジン 肝うっ血

### 1. 研究開始当初の背景

心不全では貧血、鉄欠乏が高頻度に合併し、それらが心不全の予後に大きく関わる事が報告されている。さらに鉄の静脈注射療法が、貧血や鉄欠乏を伴う心不全の治療として、Quality of life を改善することが報告され、新たな治療として注目されている。心臓、腎臓、貧血あるいは鉄欠乏は、相互に関係し合っており、cardiorenal-anemia syndrome あるいは cardiorenal-iron deficiency syndrome という概念も提唱されている。

一方、鉄代謝の主要なホルモンとして、ヘプシジンが重要な役割を演じることがわかってきた。ヘプシジンの上昇は、細胞からの鉄の放出に関わるフェロポルチンという分子を阻害することによって、消化管からの鉄吸収を抑制し、また網内系細胞からの鉄の放出も制限する。したがって、血清鉄を低下させ、貧血、鉄欠乏を生じさせる。逆に、ヘプシジンの低下は、鉄の吸収を促進し、網内系細胞からの鉄の放出を促し、鉄過剰によるヘモクロマトーシスを引き起こす。このように、ヘプシジンは鉄代謝の中心的役割を演じることが明らかになっている。

心不全の貧血、鉄欠乏でも、肝臓から分泌されるヘプシジンによって影響を受けることが推測されるが、ヘプシジンと心不全の貧血、鉄欠乏との関係を検討した研究は少ない。さらに、ヘプシジンの産生臓器である肝臓は、心不全によって肝うっ血を来することが古くから知られているが、肝うっ血によってヘプシジンの産生が変化し、それによって貧血、鉄欠乏にどのような影響が生じるかは全く検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、心不全時の肝うっ血によってヘプシジンの分泌が影響を受け、鉄欠乏、貧血に関与する可能性を検証することである。動物モデルを作成してこれを検証すると共に、当病院に入院した臨床例でもこれを検討する。さらに肝うっ血によってヘプシジンの産生が変化するのであれば、その機序を明らかにすることも本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

肝静脈を狭窄させた肝うっ血ラットモデル、モノクロタリン肺高血圧右心不全ラットモデルを作成し、出血、溶血モデルと比較し、ヘプシジンの発現および鉄動態と貧血の経過を検討した。この際、ヘプシジンの発現の機序を検討するために、TLR4 ノックアウトマウスと正常ラットの腹腔内マクロファージを用いて比較検討した。また、貧血を有する心不全の臨床例を、肝うっ血のある群とない群で比較し、ヘプシジンの発現および貧血と鉄動態について検討した。

### 4. 研究成果

(1)肝静脈狭窄肝うっ血ラットモデルの検討

出血、溶血による貧血モデルでは、急性期には貧血が生じたが、2週目には貧血は改善し、血清鉄、トランスフェリン飽和度を指標とする鉄欠乏は経過中みられなかった。出血、溶血による貧血モデルでは、貧血が重症になるにつれてヘプシジンはより強く発現が抑制されていた。肝臓でのヘプシジン発現が、出血、溶血の急性期に貧血の重症度によって急激に低下し、これによって鉄の吸収、網内系細胞からの鉄の放出が速やかにおこるため、貧血がすぐに改善するものと考えられた。一方、肝静脈狭窄による肝うっ血モデルは、急性期には同様に貧血が生じたが、その後も貧血の改善は軽度で、慢性期(84日後まで)になっても貧血は完全には回復しなかった。血清鉄の低下、トランスフェリン飽和度の低下は持続し、慢性期には小球性低色素性貧血となった。肝静脈狭窄肝うっ血モデルでは、出血、溶血による貧血モデルとは異なり、貧血になってもヘプシジン発現はそれほど低下せず、不適切な過剰発現がみられた。このことが、上記の小球性低色素性貧血、鉄欠乏の継続に関与したものと考えられた。次に、肝うっ血モデルのヘプシジンの不適切な発現の機序について検討した。ヘプシジンの発現に関わる因子については、いくつか考えられているが、鉄濃度の上昇による BMP-6 の上昇、IL-6 の上昇により発現が亢進することが知られている。肝うっ血の肝臓で BMP-6 と IL-6 の発現を調べたところ、両者とも亢進が認められた。肝静脈狭窄による肝うっ血によって肝細胞内の鉄濃度の上昇もみられ、BMP-6 はこれによって発現が亢進したものと考えられた。また、IL-6 は炎症による発現の亢進が示唆された。フリーのヘムはデンジャーシグナルとして働き、強力な炎症を引き起こすことが以前の我々の検討などから知られていた。(Hao K, Hanawa H, *Mol Immunol.* 48:1191 2011) そこで、その機序を調べるために、TLR4 ノックアウトマウスの腹腔マクロファージと正常マウスの腹腔マクロファージを培養し、フリーのヘムおよびヘモグロビンを添加し検討した。その結果、正常の腹腔マクロファージに比べて TLR4 ノックアウトマウスのマクロファージでは、ヘム、ヘモグロビンを添加しても IL-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が著明に抑制されていた。このことから、肝うっ血によって細胞外に放出されたヘムやヘモグロビンが、TLR4 を介して炎症を引き起こし、IL-6 を上昇させ、ヘプシジンを誘導する機序も考えられた。これらの結果から、上記の機序によって肝臓の BMP-6、IL-6 の上昇が生じ、肝うっ血では貧血であるにもかかわらず不適切なヘプシジンの産生が継続し、心不全における貧血、鉄欠乏の要因になりうるものと考えられた。

(2)モノクロタリン肺高血圧右心不全ラットモデルの検討

モノクロタリン肺高血圧右心不全ラット

モデルでも、注射後 4 週から 5 週にかけて肝うっ血、貧血がみられ、ヘプシジンの不適切な発現がみられた。肝うっ血によるヘプシジンの不適切な発現が、このモデルでも貧血の原因になりうると思われた。しかし、このモデルでは、同時に低酸素血症の進行がみられ、6 週には重症な低酸素血症となった。肝臓のヘプシジンの発現は、低酸素では低下することが知られており、これによって 6 週にはヘプシジンの産生低下が引き起こされると推測された。肝うっ血だけではない心不全では、いくつかの要因によってヘプシジン発現が影響されることが考えられ、今後の検討が必要と思われた。

### (3)心不全臨床例での検討

我々の心不全の臨床例でも、心不全に貧血を合併する頻度は約 40%と高頻度に見られ、以前の他の報告と同様な結果であった。炎症や癌のない貧血を伴う心不全症例を検討したところ、肝うっ血のある例で、血中のヘプシジンが有意に高値であった。したがって、心不全症例に伴う一部の貧血は、肝うっ血によりヘプシジンが不適切に産生される機序も関係があることが示唆された。

### (4)心臓でのマクロファージの検討

心臓でも心筋炎や心筋梗塞になるとヘプシジンの発現が亢進することが以前の我々の検討で明らかになっている。(Isoda M, Hanawa H, *J Nutr Biochem.* 21;749 2010) この発現は、肝臓のヘプシジンの発現に比べるとそれほど高くはないため、貧血や全身の鉄欠乏に及ぼす影響は少ないと考えられる。しかしながら、心臓局所の鉄動態では重要な役割を演じている可能性があると思われ、我々は考えている。今回の肝静脈狭窄肝うっ血ラットやモノクローリン肺高血圧右心不全ラットの肝臓では、主にマクロファージに鉄を含有するヘモジデリンが存在した。よって、心臓においても心臓内のマクロファージが鉄動態に深く関わっている可能性が高い。そこで我々は心臓内のマクロファージマーカーを様々な心疾患症例で検討した。心臓の CD68、CD163 などのマクロファージマーカーは、ファブリー病、アミロイドーシス、ミトコンドリア心筋症、不整脈源性右室心筋症など、治療抵抗性心疾患で増加していた。これらの疾患は、ヘムなど、様々な DAMPS (damage-associated molecular pattern) に反応している可能性がある。活性酸素の産生に関わる鉄過剰、それによる心筋傷害という点からも、興味深い疾患群と思われた。

## 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 3 件)

(1)Hayashi Y, Hanawa H, Jiao S, Hasegawa

G, Ohno Y, Yoshida K, Suzuki T, Kashimura T, Obata H, Tanaka K, Watanabe T, Minamino T

Elevated Endomyocardial Biopsy Macrophage-Related Markers in Intractable Myocardial Diseases.

*Inflammation* 38; 2015, 2288-2299 (査読有り)

(2)Ohno Y, Hanawa H, Jiao S, Hayashi Y, Yoshida K, Suzuki T, Kashimura T, Obata H, Tanaka K, Watanabe T, Minamino T

Liver Congestion in Heart Failure Contributes to Inappropriate Increased Serum Hepsidin Despite Anemia

*Tohoku J Exp Med* 235; 2015, 69-79 (査読有り)

(3)Suzuki T, Hanawa H, Jiao S, Ohno Y, Hayashi Y, Yoshida K, Kashimura T, Obata H, Minamino T

Inappropriate Expression of Hepsidin by Liver Congestion Contributes to Anemia and Relative Iron Deficiency

*J Card Fail* 20; 2014, 268-277 (査読有り)

[学会発表](計 4 件)

(1)Shuang Jiao, Ipppei Shimizu, Yohko Yoshida, Masayoshi Suda, Yuka Hayashi, Goro Katsuum, Hiromi Kayamori, Yukako Ohno, Haruo Hanawa, Tohru Minamino  
第 80 回日本循環器学会学術集会 2016 年 3 月 18 日 ~ 2016 年 3 月 20 日 仙台国際センター (宮城県, 仙台市)

(2)Yukako Ohno, Haruo Hanawa, Shuang Jiao, Yuka Hayashi, Tomoyasu Suzuki, Tohru Watanabe, Hiroaki Obata, Takeshi Kashimura, Tohru Minamino

Influence of Liver Congestion and Hypoxemia in Heart Failure on Hematological and Iron Status via Hepsidin

第 18 回日本心全学会学術集会 2014 年 10 月 10 日 ~ 2014 年 10 月 12 日 大阪国際会議場 (大阪府, 大阪市)

(3)Yukako Ohno, Haruo Hanawa, Shuang Jiao, Yuka Hayashi, Tomoyasu Suzuki, Tohru Watanabe, Hiroaki Obata, Takeshi Kashimura, Tohru Minamino

Inappropriate Hepsidin Expression and Anemia in Heart Failure with Liver Congestion

第 78 回日本循環器学会学術集会 2014 年 03 月 21 日 ~ 2014 年 03 月 23 日 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区)

(4)Yukako Ohno Haruo Hanawa, Shuang Jiao, Yuka Hayashi, Tomoyasu Suzuki, Hiroaki Obata, Takeshi Kashimura, Tohru Minamino

Mechanism of Iron Deficiency via Inappropriate Hepcidin Expression in Pulmonary Artery Hypertension with Liver Congestion

第 17 回日本心不全学会学術集会 2013 年 11 月 28 日 ~ 2013 年 11 月 30 日 大宮ソニックシティ (埼玉県, 大宮市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

WorldBiomedicalFrontiers

<http://biomedfrontiers.org/anemia-2014-12-1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

埴 晴雄

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40282983

### (2) 研究分担者

柏村 健

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：70419290

小澤 拓也

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70467075

### (3) 連携研究者

なし