

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：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860590

研究課題名(和文) 腹部大動脈瘤における鉄の関与と治療戦略の探索

研究課題名(英文) Aortic iron overload in abdominal aortic aneurysm

研究代表者

澤田 悠 (Sawada, Hisashi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00594764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：腹部大動脈瘤の病態生理を、大動脈内鉄代謝の観点より検討した。ヒトおよびマウス大動脈組織を検討したところ、AAA組織では鉄含有量の増加および鉄沈着の亢進を認めた。そこで、AAAモデルマウスに対し食事性鉄制限を行ったところ、鉄制限によりAAA発生率が有意に低下することを見出した。一方で、大動脈鉄沈着の分子機構として細胞内鉄取り込み受容体であるトランスフェリンレセプター-1を検討したところ、AAA組織での発現亢進を認めた。これらの結果より、TfR1を介した大動脈内鉄代謝は、AAAに対する新規治療標的になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether iron is involved in AAA formation using human AAA tissues and murine AAA models. Iron was accumulated in human and murine AAA tissues compared with non-AAA tissues, and iron accumulated area was closed to oxidative stress marker positive area and macrophage infiltrated area. We next investigated the effects of dietary iron restriction on AAA formation in mice. Iron restriction reduced the incidence of AAA formation with attenuation of oxidative stress and inflammation in AAA mice. Aortic expression of TfR1, intracellular iron transport protein, was increased in human and murine AAA tissues. Iron is involved in AAA formation, and aortic iron metabolism may be a new therapeutic target for AAA formation.

研究分野：血管生物学

キーワード：腹部大動脈瘤 鉄 酸化ストレス 炎症

1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤 (Abdominal Aortic Aneurysm; AAA) は破裂すると高率で死に至る疾患であるが、現在のところ外科的療法以外に破裂を確実に予防する治療法はなく、非外科的療法確立のために、さらなる病態解明が迫られている。

一方、鉄は生体にとって必要不可欠な元素であるが、過剰な鉄は酸化ストレスや炎症を惹起することが報告されている。酸化ストレスや炎症は、AAA の病態生理においても重要な役割を担っているが、AAA における鉄の関与を検討した報告はない。

2. 研究の目的

AAA の病態形成における鉄の役割を明らかにし、鉄を治療標的とした AAA の新規治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、(1) ヒト AAA サンプルを用いた検討、(2) AAA 動物モデルを用いた検討、(3) ヒト単球系細胞株を用いた検討の3つに実験系を組み立て、AAA 病態生理における鉄の関与を検討した。

(1) ヒト AAA サンプルを用いた検討

兵庫医科大学病院にて心臓血管外科手術が施行された 53 例 (非 AAA; n=34, AAA; n=19) を対象に検討した。大動脈鉄含有量は原子吸光法、組織鉄沈着はベルリン青染色を用いて評価した。抗 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体および抗 CD68 抗体を用いた免疫組織染色にて、酸化ストレスおよび炎症を評価し、鉄沈着との関係を検討した。

(2) AAA モデル動物を用いた検討

より詳細なメカニズム検討のため、アポリポ蛋白 E 欠損 (ApoE^{-/-}) マウスにアンジオテンシン II (AngII) を投与する AAA モデルマウスを用い、検討を行った。ApoE^{-/-} マウスを、Vehicle を投与する Control 群、AngII を投与する AngII 群、AngII 投与に加え食事性鉄制限を行う AngII-IR 群の3群に分け検討した。

(3) ヒト単球系細胞株を用いた検討

マクロファージにおける鉄代謝のメカニズムを検討するため、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞を用いた細胞実験を行った。THP-1 細胞を AngII にて刺激し、c-Jun N-terminal Kinase (JNK) および Matrix Metalloproteinase (MMP) 活性について検討した。加えて、デフェロキサミンにて培地中の鉄をキレートし、AngII 刺激に対する鉄の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト大動脈壁組織を用いた検討

大動脈鉄含有量は、ヒト AAA 組織で増加しており、AAA 組織では鉄沈着の亢進も認められた。8-OHdG ならびに CD68 発現も AAA 組織で有意に増加し、これらの発現部位は鉄沈着領域と近接して存在していた。また 8-OHdG および CD68 陽性面積は、鉄沈着面積と正相関を呈しており、これらの結果より、AAA の病態生理における酸化ストレスおよび炎症への鉄の関与が示唆された。

(2) AAA 動物モデルを用いた検討

ヒトサンプルの結果と同様に、AAA が誘導される AngII 群マウスで大動脈鉄含有量の増加を認められた。また大動脈鉄沈着に関しても、AngII 群マウスの大動脈組織で亢進しており、8-OHdG および F4/80 発現もまた AngII マウス大動脈にて亢進していた。AAA 発生率は、AngII 群で 67%であったのに対し、AngII-IR 群では 6%と抑制されていた。また AngII-IR 群マウスの大動脈組織では、鉄含有量の増加および鉄沈着亢進は認めず、8-OHdG や F4/80 発現も抑制されていた。AAA 形成に重要な役割を担う MMP および MMP 制御タンパクの一つである JNK について検討したところ、AngII 群マウス大動脈組織にて JNK および MMP 活性の亢進を認められたが、AngII-IR 群マウスではそれらの活性は抑制されていた。

一方、大動脈鉄沈着のメカニズムを検討するため、細胞内鉄取り込みタンパクであるトランスフェリンレセプター1 (TfR1) をウエスタンブロット法および免疫化学染色にて評価したところ、TfR1 発現は AAA 組織にて亢進し、F4/80 と共発現していた。また TfR1 陽性領域は鉄沈着領域と近接して存在していた。

以上のことより、JNK および MMP を介した AAA 形成に鉄が関与し、大動脈鉄沈着はマクロファージにおける TfR1 発現亢進を介して生じている可能性が示された。

(3) 単球系細胞株を用いた細胞実験

マクロファージにおける鉄代謝のメカニズムをより詳細に検討するため、THP-1 細胞を用いた細胞実験を行った。THP-1 細胞における JNK および MMP 活性は、AngII 刺激により亢進したが、これらの反応はデフェロキサミン処理により抑制された。TfR1 発現は、デフェロキサミン処理の有無にかかわらず、AngII 刺激により亢進することが確認された。すなわち、鉄はマクロファージにおける JNK および MMP 活性の調節因子の一つと考えられ、鉄過剰は TfR1 発現亢進より生じていると考えられた。

以上の結果より、酸化ストレスおよび炎症を介した AAA 病態生理への鉄の関与が示された。大動脈内鉄沈着の分子機構として、マクロファージにおける TfR1 発現亢進が考えられた。本研究により、大動脈内鉄代謝は AAA に対する新規治療標的になりえることが示された。

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 2 件)

1. Sawada H, Hao H, Naito Y, Oboshi M, Hirotani S, Mitusno M, Miyamoto Y, Hirota S, Masuyama T. Aortic iron overload with oxidative stress and inflammation in human and murine abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 35; 1507-14; 2015. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305586. 査読有
2. Sawada H, Naito Y, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotani S, Masuyama T. Iron restriction inhibits renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive mice. *Hypertens Res.* 38; 317-22; 2015. doi: 10.1038/hr.2015.13. 査読有

[学会発表](計 15 件)

1. Sawada H, Naito Y, Oboshi M, Nishimura K, Eguchi A, Okuhara Y, Morisawa D, Iwasaku T, Hirotani S, Mano T, Ishihara M, Masuyama T. Transferrin receptor1 is involved in the mechanism of human vascular remodeling in atherosclerotic lesions. ACC Scientific Session 2015, San Diego, USA, 2015
2. 澤田悠、内藤由朗、大星真貴子、岩破俊博、奥原祥貴、森澤大祐、安藤友孝、江口明世、西村晃一、廣谷信一、真野敏昭、増山理・Aortic iron overload in human and

murine abdominal aortic aneurysm・日本循環器学会総会・大阪国際会議場(大阪、大阪)・2015年

3. 澤田悠、内藤由朗、大星真貴子、西村晃一、江口明世、奥原祥貴、森澤大祐、岩破俊博、廣谷信一、真野敏昭、石原正治、増山理・ヒト動脈硬化病変におけるトランスフェリンレセプター1発現について・日本心臓病学会総会・パシフィコ横浜(神奈川、横浜)・2015年
4. Sawada H, Naito Y, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Nishimura K, Hirotani S, Masuyama T. Effects of iron restriction on hypertension and renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive mice. *Hypertension* 2014, Athene, Greece, 2014
5. Sawada H, Naito Y, Hao H, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotani S, Hirota S, Miyamoto Y, Ohyanagi M, Masuyama T. Iron involvement of human abdominal aortic aneurysm. International Vascular Biology Meeting 2014, Kyoto, Japan, 2014
6. Sawada H, Naito Y, Hao H, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotani S, Hirota S, Miyamoto Y, Masuyama T. Involvement of iron accumulation in human abdominal aortic aneurysm. ACC Scientific Session 2014, Washington DC, USA, 2014
7. 澤田悠、内藤由朗、羽尾裕之、廣谷信一、岩破俊博、奥原祥貴、江口明世、宮本裕治、廣田誠一、増山理・腹部大動脈瘤における鉄沈着の意義・日本内科学会総

- 会・東京国際フォーラム（東京、千代田）・2014年
8. 澤田悠、内藤由朗、岩破俊博、奥原祥貴、江口明世、大星真貴子、廣谷信一、大柳光正、増山理・Iron Restriction Attenuates Renal Injury in Aldosterone/Salt-Induced Hypertensive Mice・日本循環器学会総会・東京国際フォーラム（東京、千代田）・2014年
 9. 澤田悠、内藤由朗、羽尾裕之、岩破俊博、奥原祥貴、江口明世、大星真貴子、廣谷信一、宮本裕治、廣田誠一、増山理・Iron Restriction Inhibits Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Apolipoprotein E Knockout Mice・日本循環器学会総会・東京国際フォーラム（東京、千代田）・2014年
 10. Sawada H, Naito Y, Hao H, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotani S, Hirota S, Miyamoto Y, Ohyanagi M, Masuyama T. Iron accumulation in human abdominal aortic aneurysm. AHA Scientific Session 2013, Dallas, USA, 2013
 11. Sawada H, Naito Y, Hao H, Oboshi M, Hirotani S, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirota S, Ohyanagi M, Masuyama T. Iron restriction reduces abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E deficient mice. AHA Scientific Session 2013, Dallas, USA, 2013
 12. Sawada H, Naito Y, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotani S, Tsujino T, Ohyanagi M, Masuyama T. Dietary iron restriction attenuates hypertension and renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive mice. AHA Scientific Session 2013, Dallas, USA, 2013
 13. 澤田悠、内藤由朗、羽尾裕之、廣谷信一、岩破俊博、奥原祥貴、江口明世、大星真貴子、宮本裕治、廣田誠一、増山理・腹部大動脈瘤の病態形成における鉄について・日本血管生物医学会総会・千里阪急ホテル（大阪、豊中）・2013年
 14. 澤田悠、内藤由朗、羽尾裕之、廣谷信一、岩破俊博、奥原祥貴、江口明世、大星真貴子、光野正孝、宮本裕治、廣田誠一、増山理・腹部大動脈瘤の病態生理における鉄の関与・日本心臓病学会総会・ホテル日航熊本（熊本、熊本）・2013年
 15. 澤田悠、内藤由朗、羽尾裕之、廣谷信一、岩破俊博、奥原祥貴、江口明世、宮本裕治、廣田誠一、増山理・腹部大動脈瘤における鉄の関与・日本循環器学会近畿地方会・国立京都国際会館（京都、京都）・2013年
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
- 澤田 悠（SAWADA, HISASHI）
 兵庫医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00594764