

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09742

研究課題名（和文）腎性貧血治療における鉄剤投与法と血管石灰化の関係

研究課題名（英文）Association of the modality of iron administration and vascular calcification in renal anemia treatment

研究代表者

中西 健（Nakanishi, Takeshi）

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70217769

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病において、血管石灰化は循環器系合併症の重要な促進因子であり、高リン血症だけでなく多因子が関与しているため、未だその治療法は確立されていない。我々は培養細胞を用いた研究において、鉄の過剰が石灰化を亢進させることを見出し、鉄が酸化ストレスの重要な促進因子であることから、鉄が石灰化に影響を与える可能性について腎不全ラットを用いた研究を行った。大動脈において鉄とカルシウムの含量が有意に相関しており、鉄が石灰化を促進する可能性を解明したが、同時にNrf2などの酸化ストレスを抑制する因子の亢進が認められ、鉄による石灰化促進と酸化ストレスの抑制による石灰化調節が同時に起こっていることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病の有病率は成人の約1/8とされているが、腎機能低下に伴い心血管系事象も増加する。血管石灰化は循環器系合併症の重要な促進因子であり、リンの排泄低下に伴い血管石灰化が促進することが報告されているが、他の多くの因子も石灰化に影響するため適切な予防法がない。慢性腎臓病の進行に伴い貧血および慢性炎症が進行し、それに伴い鉄利用が減少しさらに鉄代謝障害が発生するが、鉄自体が酸化ストレスを促進するため石灰化への影響を検討した。今回の研究から、鉄代謝と石灰化の関連性が示唆され、貧血の管理や鉄剤投与の適正化とともに炎症状態を鎮静化する必要性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In chronic kidney disease (CKD), vascular calcification (VC) is one of the major factors accelerating cardiovascular events. Although hyperphosphatemia has been established to be the major determinant of VC, we cannot prevent the progression of VC due to several modulators of VC including oxidative stress. In the present study, we tested the effect of iron, the promoter of the oxidative stress, on the VC of aorta from CKD rats, as we previously demonstrated that iron overload accelerated the calcification of cultured vascular cells and iron. We could demonstrate the close relation between iron and calcium content in aorta of these animals. In addition, factor attenuating oxidative stress, ferritin H, was also increased. Thus, iron could accelerate the vascular calcification while it also could attenuate oxidative stress. From these observations, we suspected these conflicting interactions of iron on VC might cause the complicated results.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：血管石灰化 慢性腎臓病 鉄 リン 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1.研究開始当初の背景

- (1) 慢性腎臓病 (CKD)において、血管石灰化は高リン (Pi) 血症のために高頻度で合併するが、心血管系合併症の重大な危険因子である。一方、腎性貧血も高頻度で合併し、その治療のために必須の微量金属である鉄が投与されることになるが、鉄と血管石灰化の関係は明らかではない。
- (2) 鉄過剰状態では遊離鉄が骨芽細胞の分化を抑制する一方、それによる酸化ストレスが血管平滑筋細胞での石灰化を促進すること、すなわち iron paradox の概念が提唱されている[1]。
- (3) ヒト平滑筋培養細胞を用いた研究において 培養液にヘムを加えた条件では石灰化が抑制されるが、ヘムの投与では細胞内のフェリチン発現が増加しており、抗酸化作用を有する H-ferritin により石灰化が抑制されるのではないかと推定している[2]。
- (4) アデニン投与による腎不全ラットにおいて、鉄剤を餌に混ぜるとともに毎週腹腔内に投与することにより血管石灰化が抑制されることが報告されている[3]。
- (5) 我々はヒト平滑筋培養細胞を用いた研究において、高リン酸濃度の培養細胞液で細胞石灰化を検討したところ、鉄を添加した条件で石灰化が亢進することを報告した[4]。

2.研究の目的

- (1) 鉄が血管石灰化に影響を与えるかどうかの検討する研究では、主に培養細胞系での細胞内カルシウム (Ca) 濃度で評価されていることが多いが、生体内では鉄を調節するホルモン(ヘプシジン)や鉄を輸送・貯蔵する蛋白が働いており、鉄代謝の血管石灰化へ影響を明確にするために動物を用いた in vivo の系で検討することにした。
- (2) 鉄投与を経口および非経口で行なった場合、両者には直接血液中から血管へ影響するかどうか、門脈系を介するかどうか、ヘプシジンによる消化管での吸収調節を受けるかどうかなどの相違があり、経口投与および腹腔内投与を別々に in vivo で評価することにした。

3.研究の方法

- (1) 鉄による石灰化への影響を明確に検出できる条件を解明するため、雄性 SD ラットに最初の 14 日間アデニンおよび 1.2%リン酸を含有する餌を与え、さらにその後 42 日まで鉄剤を投与し、採血・大動脈・肝臓の採取を行った。腎不全の程度を調節するため 0.3%および 0.75%のアデニン濃度を調整して検討を行った。鉄の投与は、経口では餌の中に硫酸第一鉄 (1000mg/Kg) を添加、非経口では含糖酸化鉄 (40mg) を毎週腹腔内に投与した。以上により 1) コントロール群 (C 群)、2) 腎不全群 (CKD 群)、3) 経口的鉄投与群 (Oral 群)、4) 腹腔内鉄投与群 (IP 群) と称する。
- (2) 6~8 週間のアデニン投与により CKD モデルを作成の過程の中で、鉄を含んだ餌に変更、または毎週腹腔内に鉄剤を投与する条件で飼育する。
- (3) 週後に採血および大動脈・肝臓を採取した。大動脈は von Kossa 染色で石灰化を確認 Berlin-blue 染色による鉄の同定、大動脈サンプルを ICPMS 法でサンプル内の乾燥重量当たりの Ca, Pi, Fe 濃度を測定した。またそのサンプル内での抗酸化に働く Nrf2 ferritin-H の発現および血管石灰化に関連する Runx2 発現を RT-PCR 法で検討した。鉄投与による全身の鉄代謝への影響を検討するために、肝臓の

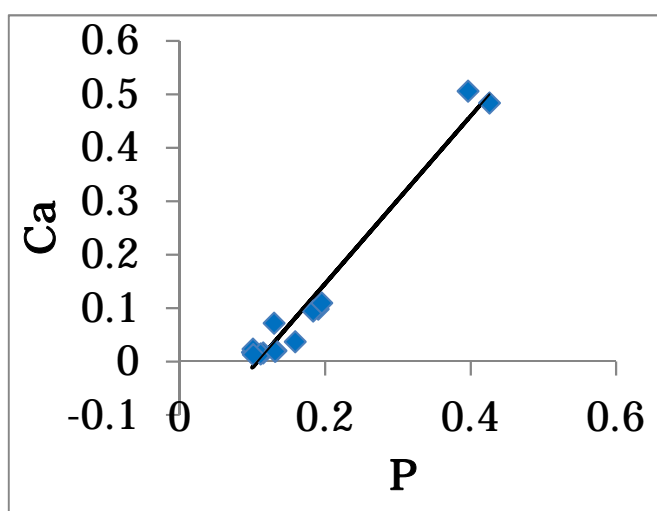
ヘプシジン発現を RT-PCR 法測定するとともに、Berlin-blue 染色による肝臓の鉄染色を行った。

4. 研究成果

(1) 0.75%アデニン投与および 0.3%アデニン投与の条件で CKD を誘導し比較したところ、0.3%アデニン投与群では貧血の進行をほとんど認めず、Creatinine, BUN でみた腎障害の程度もごく軽微で、鉄剤の経口・腹腔内鉄投与によってもほとんど影響を受けていない結果であった。0.75%アデニン投与および 0.3%アデニン投与の条件で投与期間などの変更を加えながら複数回予備検討を実施した、最終的に 0.75%アデニン投与 42 日間の条件を用いて石灰化の検討を行うことにした。

(2) 0.75%アデニン投与および 0.3%アデニン投与のいずれにおいても von Kossa 染色で検出される血管石灰化は大動脈全体に均一に起こっておらず、また一部の個体にのみ認めるといった個体差も大きいので石灰化を正確に評価することは難しいと考えられた。そこで von Kossa 染色による石灰化の評価は補助的にとどめて、大動脈の乾燥重量当たりの Ca 含量により石灰化を評価する必要があると判断した。

(3) 鉄投与による全身の鉄代謝への影響の検討では、肝臓の Berlin blue 染色において CKD 群・Oral 群・IP 群での染色強度の増加が認められた。特に IP 群の染色では C 群に比して著明な増加を認めたと、Oral 群と CKD 群の増加は有意ではなかった。ヘプシジン発現では CKD 群・IP 群での C 群に比して有意な上昇が認められたが、Oral 群の上昇は軽微で CKD 群との有意な差は認められなかった。これは経口投与においては、腸管内で鉄剤が餌中のリンと結合して吸収が妨げられる可能性が示唆された。



(4) 大動脈の Ca 含量・Pi 含量は、IP 群で C 群に比してのみ有意に高値であったが、CKD 群 IP 群の上昇は有意ではなかった。全サンプルで検討すると Ca 含量と Pi 含量に有意な相関関係が認められた。また Fe 含量と Ca 含量にも有意な相関関係を認めた。Fe 含量と Pi 含量には有意ではないが相関の傾向を認めた。今回の検討からは Fe が石灰化を誘導するかどうかは解明できないが、その両者には関係があることが示唆された。

従来考えられてきた、CKD 状態での高リン血症は血管内への Pi の取り込みを亢進すること[5、6] が解明されており、リンは Ca だけでなく鉄とも親和性を示すことから、リンだけではなく鉄が Ca 沈着を誘導する可能性については今後のさらなる検討が必要である。

(5) 大動脈における抗酸化に関連する因子である Nrf2 および ferritin H の発現を検討したところ、Nrf2 発現は IP 群でのみ C 群に比し有意な増加が認められたが、ferritin-H の発現の変化は有意ではなかった。鉄との関係では、大動脈鉄含量とフェリチン H には有意ではないが相関傾向が、Nrf2 との相関関係は認められなかった。大動脈での Nrf2 および ferritin H の発現には有意な相関関係が認められた。これらのことから、IP 群では大動脈における抗酸化作用が働いている可能性が高く、血管石灰化に抑

制的に働く可能性が示唆された。今回の検討では、鉄が直接これらの抗酸化因子を活性化するかどうかは明らかにできなかった。

(6) 大動脈における石灰化に関連する因子である Runx2 の発現を検討したが、各郡間で有意な相違は認めなかった。

(7) 従来の我々の検討では、培養液中への鉄の添加により血管平滑筋細胞では IL-24 を介して石灰化を亢進することを解明したが、in vivo の系を用いた本検討では、全身的な鉄代謝の影響・酸化ストレスに対する防御系の作用・経口投与におけるリンと鉄の競合が働き複雑な像を呈する可能性が示唆された。

<引用文献>

1 Neven E, De Schutter TM, Behets GJ, Gupta A, D'Haese PC. Iron and vascular calcification. Is there a link? *Nephrol Dial Transplant*. 26 巻 2011 1137-45

2 Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Antal-Szalmás P, Agarwal A, Balla G, Balla J. Ferritin prevents calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol*. 20 巻 2009:1254-63

3 Seto T, Hamada C, Tomino Y. Suppressive effects of iron overloading on vascular calcification in uremic rats. *J Nephrol*. 27 巻 2014:135-42.

4 Kawada S, Nagasawa Y, Kawabe M, Ohyama H, Kida A, Kato-Kogoe N, Nanami M, Hasuike Y, Kuragano T, Kishimoto H, Nakasho K, Nakanishi T. Iron-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells through interleukin-24 (IL-24), with/without TNF-alpha. *Sci Rep*. 8 巻 2018:658.

5 Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. 8 7 巻 *Circ Res*. 2000:E10-7.

6 Villa-Bellosta R, Bogaert YE, Levi M, Sorribas V. Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27 巻 2007 1030-6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	長澤 康行 (Nagasawa Yasuyuki) (10379167)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	倉賀野 隆裕 (Kuragano Takahiro) (60411998)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

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