

令和元年6月3日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09273

研究課題名(和文)トランスフェリン受容体1を介した心血管病の病態発症機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Transferrin receptor1 and cardiovascular disease

研究代表者

内藤 由朗 (NAITO, Yoshiro)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10446049

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)：鉄はDNA合成や修復、ミトコンドリアでのエネルギー産生等に関わるが、鉄過剰状態は酸化ストレスの原因となる。本研究では、心血管病の病態形成における鉄の関与と細胞内鉄取り込み受容体トランスフェリン受容体1(Transferrin Receptor 1: TfR1)の役割について、基礎研究より検討した。主に、TfR1遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いて検討したところ、高血圧性心肥大、腎臓間質線維化、大動脈瘤形成における鉄、TfR1の関与が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧は、現在国民の1/3が罹患している最も多い生活習慣病である。高血圧は自覚症状が少ないが、自覚症状が出現した時には脳卒中や心筋梗塞など生命に関わる疾患が進行していることが多く、国民の生命予後に大きく影響している。

本研究では、高血圧の病態を鉄過剰という新たな観点から検討し、心血管病の病態形成における鉄及び細胞内鉄取り込み受容体トランスフェリン受容体1(Transferrin Receptor 1: TfR1)の関与を基礎研究より明らかにした。本研究結果は高血圧、心血管病の新規予防及び治療法開発に寄与するため、学術的意義、社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Iron is an essential mineral in the body, while excessive iron increases the oxidative stress. Intracellular iron metabolism is regulated by transferrin receptor 1 (TfR1). We investigated the role of iron and TfR1 on the development of cardiovascular diseases by experimental studies. As results, we found iron deposition in hypertensive hypertrophied heart, hypertensive kidney, and aortic aneurysm in mouse. In addition, TfR1 heterozygous deleted mice exhibited attenuated the extent of hypertrophied heart, renal fibrosis, and aortic aneurysm, along with reduced iron deposition and oxidative stress as compared to wild-type mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：循環器 トランスフェリン受容体 慢性腎臓病 鉄 内科学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

鉄は DNA 合成や修復、ミトコンドリアでのエネルギー産生等に関わるが、鉄過剰状態は酸化ストレスの原因となる。私達は、これまで、心血管病の病態を鉄過剰状態の観点から検討している。特に、本研究課題に関する先行研究においては、高血圧の病態を鉄過剰状態という新たな視点から検討し、高血圧性臓器障害の形成過程における鉄の関与、特に TfR1 の関与を明らかにしてきた (Naito Y, et al. *Hypertension*. 2011、Naito Y, et al. *Journal of Hypertension*. 2012、Naito Y, et al. *Journal of Hypertension*. 2013、Sawada H, Naito Y, et al. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015)。本研究では、心血管病の病態形成における鉄の関与と細胞内鉄取り込み受容体トランスフェリン受容体 1 (Transferrin Receptor 1: TfR1) の役割について解明を進める。

## 2. 研究の目的

私は研究を進めている中で、高血圧性臓器障害の形成過程における鉄の関与、すなわち細胞内への鉄取り込みを担う鉄取り込み受容体 TfR1 発現が大動脈や腎臓などの障害臓器において亢進することを見出した。そこで、高血圧性障害臓器における TfR1 発現亢進に着目し、TfR1 を標的とし鉄の供給を断つことで高血圧性臓器障害が抑制できるのではないかと考え、研究を続けている。本研究では、心血管病における TfR1 の役割を基礎研究よりさらに検討し、TfR1 を介した鉄輸送を標的とする心血管病に対する新規治療戦略の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究は、心血管病の病態形成における TfR1 の役割について、ノックアウトマウスを用いた基礎研究より検討する。

### (1) TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた高血圧性心肥大の検討

まず、高血圧症モデルとして昇圧因子アンジオテンシン を TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスに投与し、高血圧性臓器障害における TfR1 の役割を検討する。TfR1 遺伝子ホモノックアウトマウスは胎生期に貧血と中枢神経の異常のために死亡するが、今回検討する TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスは生存可能である。この TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスに、アンジオテンシン を浸透圧ポンプにて持続的に投与し、血圧、高血圧性心肥大の変化を中心に解析する。

### (2) TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた高血圧、腎障害の検討

次に、後天的な食塩感受性高血圧症モデルとして 5/6 腎臓摘出慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) モデルを作製し、高血圧性臓器障害における TfR1 の役割を検討する。本研究では、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いて 5/6 腎臓摘出 CKD モデルを作製し、血圧、腎病変の変化を中心に解析する。

### (3) TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた大動脈瘤の検討

私達はこれまでにヒト及びマウス組織を用いた研究より、腹部大動脈瘤組織においても TfR1 発現が亢進し、鉄が沈着していることを報告している (Sawada H, Naito Y, et al. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2015)。そこで、TfR1 遺伝子ヘテロノ

ックアウトマウスと動脈硬化モデル動物であるアポリポ蛋白 E ノックアウトマウスを掛け合わせ、ダブルノックアウトマウスを作製し研究を行う。このダブルノックアウトマウスを用いてアンジオテンシ 負荷による腹部大動脈瘤モデルを作製し、大動脈瘤形成の変化を中心に解析する。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた高血圧性心肥大の検討

マウスへ昇圧因子アンジオテンシン を浸透圧ポンプにて持続的に投与すると、マウス血圧は上昇し、高血圧性心肥大が誘導される。本研究では、アンジオテンシン 投与 14 日後、マウス収縮期血圧上昇が確認されたが、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウス、同胞対照野生型マウスの間には著明な差は認めなかった。一方、高血圧性心肥大の指標である左心室重量/脛骨長比は、同胞対照野生型マウス、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスともに上昇したが、その程度は同胞対照野生型マウスに比べ、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスで抑制されることがわかった。さらに、左心室組織をヘマトキシリン・エオジン染色にて観察したところ、高血圧性心肥大の程度は同胞対照野生型マウスに比し、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスで減弱していることが確認された。

高血圧性心肥大における鉄、TfR1 の関与を検討するために、アンジオテンシン 投与 14 日後、心臓における鉄沈着を検討したところ、高血圧性肥大心にて、鉄沈着、酸化ストレスの増大が確認された。興味深いことに、その程度は同胞対照野生型マウスに比べ、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスで減弱していることがわかった。

##### ( 2 ) TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた高血圧、腎障害の検討

5/6 腎臓摘出 8 週間後、マウス収縮期血圧は上昇傾向にあったが、同胞対照野生型マウス、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウス間で有意差は認めなかった。一方、5/6 腎臓摘出後観察される腎臓間質線維化は、同胞対照野生型マウスに比べ、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスで減弱していることがわかった。

さらに、CKD 腎における鉄、TfR1 の関与を検討するために、5/6 腎臓摘出 8 週間後、腎臓における鉄沈着を検討したところ、CKD 腎における鉄沈着や酸化ストレスの増大が確認された。その程度は同胞対照野生型マウスに比べ、TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスで減弱しているとの結果を得た。

##### ( 3 ) TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた大動脈瘤の検討

動脈硬化モデル動物であるアポリポ蛋白 E ノックアウトマウスへ昇圧因子アンジオテンシン を浸透圧ポンプにて持続的に投与すると、マウス血圧は上昇し、大動脈瘤形成が誘導される。本研究では、アンジオテンシン 投与 28 日後、マウス収縮期血圧上昇が確認されたが、アポリポ蛋白 E ノックアウトマウス、ダブルノックアウトマウスの間には著明な差は認められなかった。一方、アンジオテンシ 負荷にて誘導される大動脈瘤形成は、アポリポ蛋白 E ノックアウトマウスに比べ、ダブルノックアウトマウスで抑制されることが明らかとなった。

また、鉄沈着や酸化ストレスの増大がマウス大動脈瘤で確認されたが、その程度は同アポリポ蛋白 E ノックアウトマウスに比べ、ダブルノックアウトマウスで抑制されることが確認された。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

1. Okuno K, Naito Y, Yasumura S, Sawada H, Oboshi M, Nishimura K, Asakura M, Ishihara M, Masuyama T. Influence of dietary iron intake restriction on the development of hypertension in weanling prehypertensive rats. *Heart Vessels*. 33: 820-825, 2018. DOI: 10.1007/s00380-018-1134-4. 査読有
2. Naito Y, Senchi A, Sawada H, Oboshi M, Horimatsu T, Okuno K, Yasumura S, Ishihara M, Masuyama T. Iron-restricted pair-feeding affects renal damage in rats with chronic kidney disease. *PLoS One*. 12: e0172157, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0172157. 査読有
3. Naito Y, Sawada H, Oboshi M, Okuno K, Yasumura S, Okuhara Y, Eguchi A, Nishimura K, Soyama Y, Asakura M, Ishihara M, Tsujino T, Masuyama T. Altered expression of intestinal duodenal cytochrome b and divalent metal transporter 1 might be associated with cardio-renal anemia syndrome. *Heart Vessels*. 32: 1410-1414, 2017. DOI: 10.1007/s00380-017-1013-4. 査読有
4. Oboshi M, Naito Y, Sawada H, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Hirotsu S, Mano T, Tsujino T, Masuyama T. Attenuation of hypertension and renal damage in renovascular hypertensive rats by iron restriction. *Hypertens Res*. 39: 832-839, 2016. DOI: 10.1038/hr.2016.93. 査読有

### 〔学会発表〕(計16件)

1. Yasumura S, Naito Y, Okuno K, Asakura M, Ishihara M, Masuyama T. Renal fibrosis is attenuated in transferrin receptor 1 heterozygous deleted mice via suppression of oxidative stress. 第83回日本循環器学会学術集会, パシフィコ横浜国際会議場, 神奈川県, 横浜市, 2019.3.29-31.
2. 内藤由朗. 心血管疾患における鉄の意義. (シンポジウム) 第48回日本心臓血管作動物質学会, 富山国際会議場, 富山県, 富山市, 2019. 2.7-8.
3. 内藤由朗. 高血圧性臓器障害と鉄. (シンポジウム) 第54回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, KKR 熊本ホテル熊本, 熊本県, 熊本市, 2018.12.6-7.
4. Okuno K, Naito Y, Asakura M, Sugahara M, Ando T, Nagai T, Saito Y, Yoshikawa T, Masuyama T, Anzai T. Effective Hemoglobin Level for the Prevention of All-cause Mortality is Different between Male and Female Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. American Heart Association Scientific Sessions 2018, Chicago, USA, 2018.11.10-12.

5. 内藤由朗, 増山 理. 循環器疾患と鉄. (トピック) 第 66 回日本心臓病学会学術集会, 大阪国際会議場, 大阪府, 大阪市, 2018.9.7-9.
6. 内藤由朗, 増山 理. 心不全における鉄代謝調節機構. (ワークショップ) 第 63 回日本透析医学会学術集会・総会, 神戸国際会議場, 兵庫県, 神戸市, 2018.6.29-7.1.
7. Okuno K, Naito Y, Yasumura S, Sawada H, Nishimura K, Asakura M, Ishihara M, Masuyama T. Heterozygous Deletion of Transferrin Receptor 1 Suppresses Angiogenesis in a Mouse Model of Hind Limb Ischemia. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology/Peripheral Vascular Disease (ATVB/PVD) 2018, Sanfrancisco, USA, 2018.5.10-12.
8. 康村誠希, 内藤由朗, 奥野圭佑, 朝倉正紀, 石原正治, 増山 理. Cellular iron transport in renal fibrosis. 第 82 回日本循環器学会学術集会, 大阪国際会議場, 大阪府, 大阪市, 2018.3.23-25.
9. 内藤由朗, 奥野圭佑, 康村誠希, 朝倉正紀, 増山 理. 高齢者心不全と貧血. (シンポジウム) 第 21 回日本心不全学会学術集会, 秋田キャッスルホテル, 秋田県, 秋田市, 2017.10.12-14.
10. 康村誠希, 内藤由朗, 大星真貴子, 奥野圭佑, 奥原祥貴, 安藤友孝, 西村晃一, 織原良行, 朝倉正紀, 増山 理. 心腎貧血連関における十二指腸鉄吸収蛋白の関与. 第 21 回日本心不全学会学術集会, 秋田キャッスルホテル, 秋田県, 秋田市, 2017.10.12-14.
11. Okuno K, Naito Y, Asakura M, Sugahara M, Ando T, Nagai T, Saito Y, Yoshikawa T, Masuyama T, Anzai T. Differential prognostic impact of anemia in male and female patients with heart failure with preserved ejection fraction: analysis of Japanese Heart Failure Syndrome with Preserved Ejection Fraction(JASPER) study, European Society of Cardiology Congress 2017, Belcerona, Spain, 2017.8.26-30.
12. Naito Y, Oboshi M, Sawada H, Okuno K, Yasumura S, Okuhara Y, Eguchi A, Nishimura K, Soyama Y, Ishihara M, Masuyama T. Iron and Renal Fibrosis in Experimental Renal Injury. 第 81 回日本循環器学会学術集会, 石川県立音楽堂他, 石川県, 金沢市, 2017.3.17-19.
13. 内藤由朗, 大星 真貴子, 澤田 悠, 辻野 健, 増山 理. 本態性高血圧に対する食事性鉄制限の試み. 第 39 回日本高血圧学会総会, 仙台国際センター, 宮城県, 仙台市, 2016.9.30-10.2.
14. 内藤由朗, 澤田 悠, 大星真貴子, 石原正治, 増山 理. 心不全における鉄吸収システム(シンポジウム) 第 64 回日本心臓病学会学術集会, 東京国際フォーラム東京, 東京都, 2016.9.23-25.

15. 内藤由朗, 増山 理. ラットを用いた血管病変の検討 (シンポジウム) 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 京王プラザホテル, 東京都, 2016.7.14-15.
16. 内藤由朗, 大星 真貴子, 澤田 悠, 安藤友孝, 廣谷 信一, 真野 敏昭, 石原 正治, 増山 理. 高血圧患者における食事性鉄制限の有用性の検討. 第 113 回日本内科学会講演会, 東京国際フォーラム, 愛媛県, 松山市, 2016.4.15-17.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：増山 理

ローマ字氏名：MASUYAMA, Tohru

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：70273670

(2016 年度～2018 年 9 月 30 日まで参画)

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。