

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09420

研究課題名(和文)心疾患における局所鉄代謝変化の解析と臨床応用への検証

研究課題名(英文)Study of local iron metabolism for clinical application in heart disease

研究代表者

埴 晴雄 (HANAWA, HARUO)

新潟医療福祉大学・健康科学部・教授

研究者番号：40282983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓や心臓で鉄沈着が見られる鉄過剰モデルでは、鉄代謝主要ホルモンであるヘプシジンは肝臓のみで発現が亢進した。人工心肺モデルでは肝臓、心臓伴に炎症マーカーが発現亢進していたが、ヘプシジンや鉄関連蛋白であるNGALは心臓のみで発現が亢進していた。重症心臓病による筋萎縮ではヘプシジンの抑制因子であるマイオネクチンが萎縮した骨格筋で発現が低下し、運動療法で骨格筋のマイオネクチンの発現が亢進していた。心臓でのヘプシジンなどの鉄関連蛋白は炎症に伴って発現が亢進することが多く、重症心臓病で萎縮した骨格筋や運動した骨格筋ではマイオネクチンの発現変化がみられ、鉄代謝を介した運動療法の可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含む生物の生存において鉄の恒常性を維持する機序は重要である。心疾患においても鉄代謝が変化し、疾患の病態形成、治癒機転に関係していることが想定されている。今回の検討で、鉄過剰モデル、心疾患で用いられる人工心肺装置において、鉄代謝の主要ホルモンであるヘプシジンの心臓局所の発現は炎症によってしばしば増強すると考えられ、重症心臓病でよく見られる萎縮した骨格筋や運動による骨格筋で、ヘプシジンの抑制因子であるマイオネクチンは変化していた。これらの結果は、心臓病における鉄代謝を介した運動療法の可能性を示唆する所見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In iron overload model, gene expression of hepcidin, a key regulator of iron metabolism, increased only in liver, and not in heart. In cardiopulmonary bypass model, gene expression of some proinflammatory molecules increased in liver and heart, but those of hepcidin and NGAL, an iron related molecule, increased only in heart. Gene expression of myonectin, a negative regulator of hepcidin, decreased in atrophic skeletal muscle by severe heart disease and exercise induced expression of myonectin in skeletal muscle. Increase of iron related molecules like hepcidin and NGAL is related to that of proinflammatory in heart. In atrophic skeletal muscle and muscle under the influence of exercise, expression of myonectin are changed. This finding raises the possibility of exercise therapy in heart disease via iron metabolism.

研究分野：循環器内科

キーワード：心筋疾患 鉄代謝 ヘプシジン 人工心肺 運動 筋萎縮 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞にとって鉄はエネルギー産生に不可欠である一方、過剰鉄は活性酸素を生成し有害となる。したがって、鉄の恒常性を維持する巧妙な仕組みが生体には存在すると考えられている。肝臓で主に発現するヘプシジンの発見により、全身における鉄代謝の仕組みの解明は、近年大きく進展した。ヘプシジンは血中に放出する鉄輸送膜蛋白であるフェロポルチンを抑制することにより、腸管からの鉄の吸収、マクロファージからの鉄の放出を抑制する蛋白である。

また、腎臓、脳、肝臓の臓器傷害においても、鉄代謝は大きな影響を与えていることが近年報告されてきた。腎傷害では、古くから知られているトランスフェリンやフェリチンと共に、新しく発見されたヘプシジンや鉄代謝蛋白の一つである NGAL/リポカリン-2 が傷害に関わり、臨床上有用なバイオマーカーになると考えられるようになってきた。脳では、脳出血において、ヘモグロビン、鉄による脳傷害が推定され、NGAL/リポカリン-2 ノックアウトマウスでは、脳出血病変の縮小を認めたとの報告もなされた。また脳の変性疾患でも、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病などで脳での鉄の分布や蓄積が変化し、MRI (核磁気共鳴撮像法) によってそれを診断する方法や鉄キレート剤での治療が試みられていた。脳の炎症性疾患でも、多発性硬化症における鉄傷害が研究され、脳に鉄が沈着し、MRI でそれを診断することができるとの報告もなされた。肝臓では、鉄代謝の障害が、慢性肝臓病に関わっていると考えられてきた。特に C 型肝炎において、過剰鉄が肝傷害の進行、肝癌発症にも関係し、瀉血の効果が報告されており、この時、肝臓でヘプシジンがこの病態に深く関わっていることが示唆されていた。

2. 研究の目的

このような背景の中で、我々は網羅的な DNA マイクロアレイの検討で、心筋炎や心筋梗塞においても鉄関連蛋白であるヘプシジンや NGAL/リポカリン-2、ヘムオキシゲナーゼなどの発現が心臓で著明に亢進することを見いだした。ヘプシジンや NGAL/リポカリン-2 は心筋細胞で発現が大きく変化しており、心筋傷害で放出されるミオグロビンやヘムにより、心臓培養細胞で炎症性サイトカインやケモカインが誘導されることも見いだした。しかし、局所の鉄代謝に注目したヒトの心疾患における診断や治療への応用は、これまでにほとんど研究がなされていなかった。

今回我々は、鉄代謝に関連した心疾患での臨床応用の可能性をさぐり、心臓に影響を与える他の様々な疾患での検討、また新しく見いだされた鉄関連蛋白の心臓での影響を検討しようと研究を計画した。

3. 研究の方法

鉄 (ヘモジデリン沈着) 分布の差によって、近年行われている肝臓の磁気共鳴画像 (MRI) 診断が、種々の心疾患の診断にも有用になるのではないかと仮説に基づき、心臓での基礎的検討を行った。まず、鉄の造影剤を使用せずに、右室負荷モノクロタリンラットモデルおよび巨細胞性劇症型心筋炎ラットモデルで、心臓に存在するマクロファージのヘモジデリン沈着を検討した。同様に、ヒトの様々な心疾患の心内膜生検標本を用いて、心臓に存在するマクロファージなどにおけるヘモジデリンの沈着を検討した。次に、ヒト肝疾患で既に使われている超常磁性酸化鉄 (リゾピスト) 造影剤を用い、ラットの心疾患モデルでの造影剤によるヘモジデリンの沈着を検討した。また、ヘプシジン、NGAL/リポカリン-2、炎症性サイトカインについても、ラット心疾患モデルなどで心臓内の発現を検討した。

近年、ヘプシジンの発現抑制に関わるエリスロフェロン/マイオネクチンが同定され、心臓と同じ横紋筋である骨格筋で発現することが明らかになってきた。そこで、心不全などでサルコペニアが生じることがあるため、心筋炎心不全ラットモデルを用いて、サルコペニアを生じている骨格筋でのエリスロフェロン/マイオネクチンの発現を検討した。またサルコペニアの治療としての運動による骨格筋内でのエリスロフェロン/マイオネクチンの発現変化も検討した。

4. 研究成果

超常磁性酸化鉄 (リゾピスト) を投与しなくとも、右室負荷モノクロタリンラットモデルおよび巨細胞性心筋炎ラットモデルでは急性期から慢性期にかけて、心臓に存在するマクロファージと思われる細胞にヘモジデリンの沈着が所々散見された。しかし、心筋疾患が疑われ心内膜生検が行われた 22 例 (急性心筋炎 3 例、拡張型心筋症 10 例、肥大型心筋症 2 例、拘束型心筋症 1 例、虚血性心筋症 1 例、心サルコイドーシス 1 例、心臓弁膜症 1 例、筋ジストロフィーに伴う心筋疾患 1 例、産褥心筋症 1 例、高血圧性心筋症 1 例) でヘモジデリンの沈着を検討したところ、いずれも沈着は見られなかった。これらの結果から、造影剤を使わない MRI で鉄をマーカーとして心疾患を画像としてとらえるのは、困難ではないかと思われた。そこで、超常磁性酸化鉄の投与によって、正常心と病的心の差異を、より明確に描出する方法を検討するため、鉄の投与量を検討した。鉄含量として、400 mg/kg の投与では、正常の心臓でもヘモジデリンの沈着がみられたが、12 mg/kg の投与では正常の心臓では沈着が見られなかった。また、臨床で使用されている鉄含有 MRI 造影剤を 1 回静注し、鉄染色陽性細胞の変化を検討した。一般に行われている MRI 造影剤 1 回静注では、正常肝臓では多数の鉄染色陽性細胞がみられたが、正常心臓では陽性細胞はみられず、心筋炎心臓でも造影剤未使用と比較し、鉄染色陽性細胞の増加ははっきりしなかった。以上の結果から、肝疾患では、造影剤を使用することにより、疾患の診断として MRI

画像を用いる有用性は推測されたが、心疾患については急性心筋梗塞の検討はしなかったものの、鉄をマーカーとした MRI 画像で心筋症や心筋炎をとらえるのは困難ではないかと考えられた。

次に我々は、心筋細胞の鉄関連蛋白の遺伝子改変マウスの作成に取りかかっていたが、Lakhal-Littletonらは、心筋細胞のフェロポルチンの発現を消失させたマウスモデルで心筋細胞内に過剰な鉄沈着を引き起こし、また心筋細胞のヘプシジンの発現を消失させたマウスモデルで心筋細胞内の鉄欠乏が生じ、いずれも心不全を引き起こすことを報告し、心臓内の鉄関連蛋白の異常が重症な心不全を引き起こすことを示した。そこで、我々は方針を変更し、心疾患や心臓に影響を与える様々な疾患で、心臓内の鉄代謝関連蛋白の変化を検討することとした。鉄過剰投与ラットでは、肝臓、心臓ともに多数の鉄染色陽性細胞が出現したが、ヘプシジンの発現は心臓では変化せず、肝臓のみ増加していた。一方、ラットに人工心肺を装着した2時間後の心臓のヘプシジン、NGAL/リポカリン-2は有意に発現が上昇し(図1, 2)、ラット敗血症モデルとしてLPSを投与した2時間後の心臓内NGAL/リポカリン-2は有意に発現が上昇していた(図3)。心臓には、いずれのモデルも大きな組織学的な変化がみられなかったが、炎症性サイトカインの発現は上昇しており、心臓での鉄関連蛋白の発現は、全身の鉄過剰の影響よりも心臓内での炎症マーカーと関係することが考えられた。また、重症心筋炎心不全ラットは、下肢骨格筋のサルコペニアを呈していたが、ヘプシジンを抑制する作用のある骨格筋内のエリスロフェロン/マイオネクチンの発現は低下していた。さらにサルコペニアの治療として確立している運動を負荷したラットでは、エリスロフェロン/マイオネクチンの発現は増加した。

以上から、心疾患に対して、現存の鉄造影剤を用いたMRI診断の有用性は証明できず、異なる方法が必要である事が推測されたが、心臓内の鉄関連蛋白の発現は心疾患や全身の病的状態で敏感に変化しており、心臓内での鉄代謝調節障害によって心不全を引き起こす可能性が、我々その他のグループからの研究で示された。また、骨格筋内のエリスロフェロン/マイオネクチンの発現は、心不全におけるサルコペニアや運動で発現が変化し、心疾患にも影響する可能性が考えられた。

図 1

人工心肺2時間後における心臓内Lcn2 / NGALの遺伝子発現

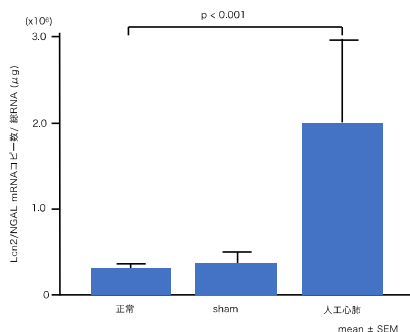


図 2

人工心肺2時間後における心臓のヘプシジンの遺伝子発現

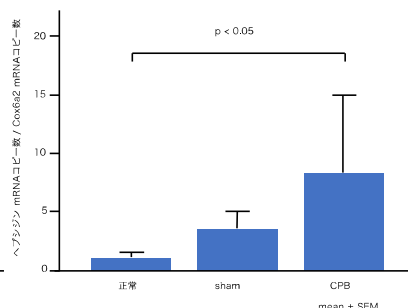
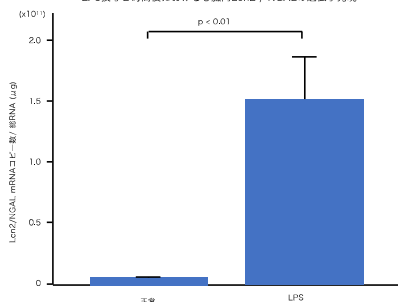


図 3

LPS投与2時間後における心臓内Lcn2 / NGALの遺伝子発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 焦 爽	4. 巻 13
2. 論文標題 心疾患におけるtitin, CaMKII およびZASP/Cypher mRNAの選択的スプライシングの調節	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 新潟医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 160-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 埴晴雄, 藤井豊
2. 発表標題 人工心肺装着時に心臓局所のヘプシジン発現は炎症マーカーと伴に亢進する
3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部優花, 埴晴雄, 大嶋啓真, 坂井結太, 長井穂菜美, 野口真莉那, 藤本航喜, 諸星南々美, 藤井豊
2. 発表標題 体外循環により主要臓器の炎症性サイトカイン発現は上昇する リアルタイムPCR法によるラット体外循環モデルの検討
3. 学会等名 第18回新潟医療福祉学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長井穂菜美, 埴晴雄, 阿部優花, 大嶋啓真, 坂井結太, 野口真莉那, 藤本航喜, 諸星南々海, 渡邊博昭, 藤井豊
2. 発表標題 体外循環起因の主要臓器における炎症反応を捉える ラット体外循環モデルおよびリアルタイムPCR法を用いた検討
3. 学会等名 第92回新潟県臨床検査学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井豊, 埴晴雄
2. 発表標題 Expression change of cytokine in principal organ during cardiopulmonary bypass
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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	柏村 健 (KASHIMURA TAKESHI) (70419290)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (13101)	
研究分担者	南野 徹 (MINAMINO TOHRU) (90328063)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	