

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16603

研究課題名(和文)慢性腎不全における鉄代謝異常とサルコペニア発症の分子メカニズム解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism elucidation of iron metabolism abnormality and sarcopenia onset in chronic renal failure

研究代表者

堀ノ内 裕也 (HORINOCHI, Yuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：30716593

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)：慢性腎不全(CRF)関連骨格筋萎縮における鉄の影響について検討した。C57BL/6Jマウスにアデニンを投与しCRFモデルマウス(Adenine-CRF群)を作製し、Control群と比較した。Adenine-CRF群の骨格筋における鉄量の増加、トランスフェリン受容体とフェロポルチン発現の低下、フェリチン発現の増加を確認した。さらに、Adenine-CRF群の骨格筋において酸化ストレスが増大していた。以上の成果から、CRFにおいて鉄代謝異常による骨格筋への鉄蓄積が酸化ストレスを介して骨格筋萎縮を引き起こしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of iron on Chronic Renal Failure(CRF)-related skeletal muscle atrophy. In this study, C57BL/6J mice were divided into 2 groups: Control group and Adenine-CRF group. Adenine-CRF mice showed an increase in the iron content of the skeletal muscle. The expression of transferrin receptor, an iron import receptor, and ferroportin, an iron export transporter, were downregulated in the skeletal muscle from Adenine-CRF mice. The expression of ferritin was upregulated in the skeletal muscle from Adenine-CRF mice. Adenine-CRF mice showed increased oxidative stress in the skeletal muscles. These results suggest that iron accumulation-mediated oxidative stress has the potential to accelerate skeletal muscle atrophy in CRF.

研究分野：医療薬学

キーワード：慢性腎不全 サルコペニア 鉄 鉄代謝異常 加齢・老化

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の日本で、要介護者数を減少・抑制するために高齢者の健康長寿を維持・延伸させることは非常に重要である。要介護状態に至る主な原因疾患の1つとして、転倒・骨折がある。近年、骨格筋萎縮(筋肉量減少)すなわちサルコペニアが高齢者の転倒・骨折と深く関わっており、注目されている。特に、慢性腎不全(Chronic Renal Failure: CRF)におけるサルコペニアは、患者の生活の質を著しく低下させるのみならず、予後不良に直結する。そのため、CRF 関連サルコペニアの疾患病態の解明と治療法の開発は喫緊の課題であるが、未だ不明な点が多い。

CRF の進行に伴い、腎性貧血は必発する。原因として、エリスロポエチン産生低下に加えて、鉄の利用障害も指摘されている。その成因として、CRF 患者においては

体内鉄量と鉄取り込み輸送体であるトランスフェリン受容体の発現増加 (Otaki Y, et al. *Am J Kidney Dis.*, 2004)

網内系細胞から鉄の放出を促すフェロポルチンの発現低下

(Otaki Y, et al. *Am J Kidney Dis.*, 2004)

フェロポルチンの作用を抑制する鉄制御ホルモン(ヘプシジン)の発現増加

(Peters HPE, et al. *Nephrol Dial Transplant.*, 2010)

などがあり、網内系細胞や末梢臓器への鉄蓄積により、鉄を有効利用できない状態にある。一方、蓄積した鉄は Fenton/Haber-Weiss 反応を触媒し、ヒドロキシルラジカルの産生を促進して酸化ストレスによる動脈硬化などの臓器障害の一因となりうる (Nakanishi T, et al. *Am J Nephrol.*, 2010)。従って、鉄代謝異常の是正が、CRF における貧血や臓器障害を改善する鍵になる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CRF における鉄代謝異常とそれに伴う骨格筋への鉄蓄積による筋萎縮のメカニズムを解明し、CRF に関連するサルコペニアの治療法につながる基礎的な基盤を確立することである。

3. 研究の方法

雄性 C57BL/6J マウスにアデニンを投与し CRF モデルマウス(Adenine-CRF 群)を作製し

た。Control 群と比較した。

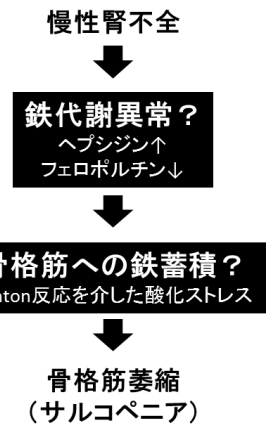
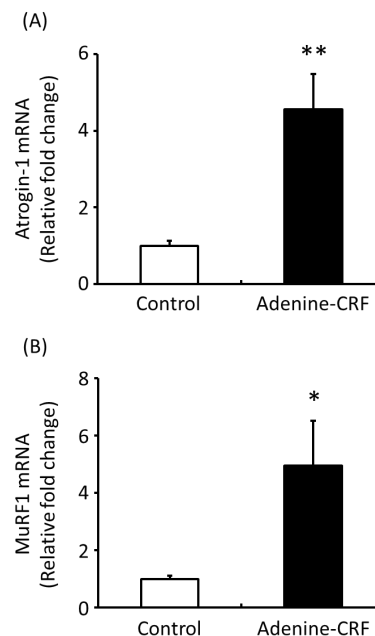
- (1) 骨格筋萎縮評価
腓腹筋の重量を測定した。また、筋萎縮関連遺伝子である MAFbx/atrogen-1 と MuRF-1(muscle ring finger-1) の遺伝子発現を RT-PCR で測定した。
- (2) 骨格筋における鉄量の測定
メタロアッセイキット (Metallogenics) を用いて、骨格筋中の鉄濃度を測定した。
- (3) 骨格筋における鉄代謝関連輸送体の発現の検討
鉄取り込みタンパク質トランスフェリン受容体、Divalent Metal Transporter-1(DMT-1)、鉄排出輸送体フェロポルチンの発現をウエスタンブロットで検討した。また、鉄貯蔵タンパク質フェリチン重鎖と軽鎖の発現をウエスタンブロットで検討した。
- (4) 酸化ストレスの評価
Hydroxyphenyl Fluorescein 染色と Dihydroethidium 染色を用いて検討した。

4. 研究成果

Adenine-CRF 群では Control 群と比較して、有意に血清クレアチニン値・インドキシル硫酸濃度の増加が認められ、腎機能障害と尿毒症を確認した。また、CRF 群では体重の低下・貧血が認められ、CRF モデルマウスを確立できた。

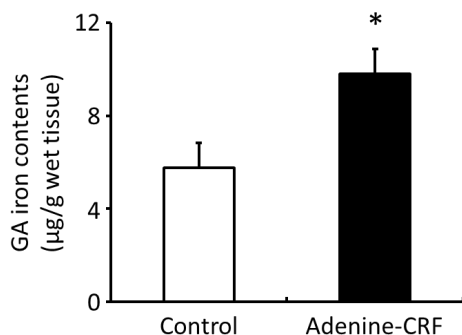
- (1) CRF 群では骨格筋重量の低下とともに MAFbx/atrogen-1 と MuRF-1 mRNA の発現が Control 群と比較して、有意に増加していた。骨格筋萎縮が引き起こされていることを確認した(図1)。

図1 筋萎縮関連遺伝子の発現



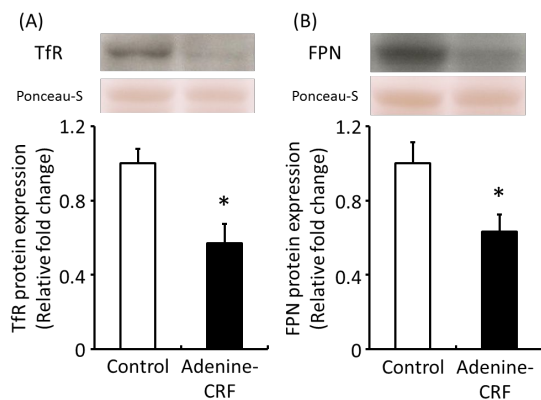
- (2) Adenine-CRF 群では、Control 群と比較して有意に腓腹筋(GA)における鉄量の増加を認め、組織内鉄量の増加を確認することができた(図2)。

図2 骨格筋中の鉄量



- (3) Adenine-CRF 群の骨格筋においてトランスフェリン受容体とフェロポルチンの発現が、Control 群と比較して、有意に低下していた(図3)。一方、DMT-1 の発現については変化が認められなかった。また、フェリチン重鎖と軽鎖の発現も Control 群と比較して Adenine-CRF 群で有意に増加していた(p<0.01)。これらの結果より、CRF における骨格筋において鉄代謝異常が引き起こされ、鉄が蓄積されていることが示唆された。

図3 鉄代謝関連輸送体の発現



- (4) 鉄はFenton/Haber-Weiss 反応を触媒して、ヒドロキシルラジカルを生成し酸化ストレス障害を引き起こす。従って、Hydroxyphenyl Fluorescein 染色と Dihydroethidium 染色を用いて、酸化ストレスについて検討を行ったところ、Adenine-CRF 群の骨格筋において、ヒドロキシルラジカルとスーパーオキシドの産生が Control 群と比較して有意に増加していた(p<0.05)。

以上の成果から、CRF において鉄代謝異常による骨格筋への鉄蓄積が酸化ストレスを介して骨格筋萎縮を引き起こしている可能性が示唆された。鉄代謝異常が CRF 関連サル

コペニアの治療標的になる可能性が期待される。

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5件)

- Hirofumi Hamano, Yasumasa Ikeda, Hiroaki Watanabe, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Masaki Imanishi, Yoshito Zamami, Kenshi Takechi, Licht Miyamoto, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
The uremic toxin indoxyl sulfate interferes with iron metabolism by regulating hepcidin in chronic kidney disease
Nephrology Dialysis Transplantation, 33, 2018年, 586~597, 査読有
doi: 10.1093/ndt/gfx252.
- Takahiro Niimura, Yoshito Zamami, Toshihiro Koyama, Yuki Izawa-Ishizawa, Masashi Miyake, Tadashi Koga, Keisaku Harada, Ayako Ohshima, Toru Imai, Yutaka Kondo, Masaki Imanishi, Kenshi Takechi, Keijo Fukushima, Yuya Horinouchi, Yasumasa Ikeda, Hiromichi Fujino, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki, Shiro Hinotsu, Mitsunobu R. Kano, Keisuke Ishizawa
Hydrocortisone administration was associated with improved survival in Japanese patients with cardiac arrest
Scientific Reports, 7, 2017年, 17919, 査読有
doi: 10.1038/s41598-017-17686-3.
- Yasumasa Ikeda, Yuya Horinouchi, Hirofumi Hamano, Tasuku Hirayama, Seiji Kishi, Yuki Izawa-Ishizawa, Masaki Imanishi, Yoshito Zamami, Kenshi Takechi, Licht Miyamoto, Keisuke Ishizawa, Ken-ichi Aihara, Hideko Nagasawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice
Scientific Reports, 7, 2017年, 10621, 査読有
doi: 10.1038/s41598-017-11089-0.
- Keisuke Oshima, Yasumasa Ikeda, Yuya Horinouchi, Hiroaki Watanabe, Hirofumi Hamano, Yoshitaka Kihira, Seiji Kishi, Yuki Izawa-Ishizawa, Licht Miyamoto, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
Iron suppresses erythropoietin expression via oxidative

stress-dependent hypoxia-inducible factor-2 alpha inactivation.

Laboratory Investigation, 2017, 査読有

doi: 10.1038/labinvest.2017.11.

5. Yutaka Fukunaga, Yuki Izawa, Ishizawa, Yuya Horinouchi, Eriko Sairyu, Yasumasa Ikeda, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Yoshiro Abe, Ichiro Hashimoto, Toshiaki Tamaki
Topical Application of Nitrosonifedipine, a Novel Radical Scavenger, Ameliorates Ischemic Skin Flap Necrosis in a Mouse Model.
Wound Repair and Regeneration, 2017, 査読有
doi: 10.1111/wrr.12510.

[学会発表](計 25 件)

1. 堀ノ内 裕也、池田 康将、福島 圭穰、今西 正樹、石澤 有紀、座間味 義人、藤野 裕道、石澤 啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
第 Xa 因子阻害剤の腎保護効果
第 47 回日本心脈管作動物質学会、2018 年
2. Yuya Horinouchi, Yasumasa Ikeda, Hirofumi Hamano, Masaki Imanishi, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshito Zamami, Kenshi Takechi, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
The effect of iron on skeletal muscle atrophy in chronic kidney disease
The Society for Redox Biology and Medicine's 24th Annual Meeting (国際学会) 2017 年
3. 渡邊 大晃、池田 康将、濱野 裕章、堀ノ内 裕也、石澤 有紀、今西 正樹、座間味 義人、武智 研志、宮本 理人、土屋 浩一郎、玉置 俊晃、石澤 啓介
肥満・糖尿病におけるマクロファージ鉄制御機構の検討
第 132 回日本薬理学会近畿部会、2017 年
4. 渡邊 大晃、池田 康将、濱野 裕章、堀ノ内 裕也、石澤 有紀、今西 正樹、座間味 義人、武智 研志、宮本 理人、土屋 浩一郎、玉置 俊晃、石澤 啓介
肥満・糖尿病におけるマクロファージ鉄の役割の検討
第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2017 年
5. 池田 康将、堀ノ内 裕也、濱野 裕章、平山 祐、岸 誠司、石澤 有紀、今西 正樹、座間味 義人、武智 研志、宮本 理人、石澤 啓介、栗飯原 賢一、永澤 秀子、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
鉄摂取制限による尿細管間質障害の抑制効果の検討
第 41 回日本鉄バイオサイエンス学会学

術集会、2017 年

6. 濱野 裕章、池田 康将、渡邊 大晃、堀ノ内 裕也、石澤 有紀、今西 正樹、座間味 義人、武智 研志、石澤 啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
慢性腎臓病における尿毒素蓄積によるヘプシジン制御と鉄代謝破綻のメカニズムの解明
第 41 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、2017 年
7. Yuya Horinouchi, Yasumasa Ikeda, Masaki Imanishi, Yoshito Zamami, Yuki Izawa-Ishizawa, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
Direct activated factor X inhibitor attenuates renal fibrosis on unilateral ureteral obstruction-induced nephrotoxicity
53rd Congress of the European Societies of Toxicology (国際学会) 2017 年
8. 堀ノ内 裕也、池田 康将、今西 正樹、座間味 義人、石澤 有紀、石澤 啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
経口 FXa 阻害剤の腎線維化抑制効果
医療薬学フォーラム 2017 第 25 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2017 年
9. 堀ノ内 裕也、池田 康将、石澤 有紀、今西 正樹、座間味 義人、武智 研志、石澤 啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
第 Xa 因子阻害剤は腎間質線維化を抑制する
第 131 回日本薬理学会近畿部会、2017 年
10. 濱野 裕章、池田 康将、渡邊 大晃、堀ノ内 裕也、石澤 有紀、今西 正樹、座間味 義人、武智 研志、石澤 啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
インドキシル硫酸蓄積はヘプシジン制御を介して鉄代謝恒常性破綻に關与する
第 131 回日本薬理学会近畿部会、2017 年
11. Yuya Horinouchi, Yasumasa Ikeda, Masaki Imanishi, Yoshito Zamami, Yuki Izawa-Ishizawa, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
Factor Xa inhibitor attenuates renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction
The 13th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (国際学会) 2017 年
12. Yasumasa Ikeda, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Toshiaki Tamaki
Direct factor Xa inhibitor prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction
54th ERA-EDTA Congress(国際学会) 2017 年
13. Yasumasa Ikeda, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Toshiaki Tamaki

- Iron restriction prevents renal tubulointerstitial injury induced by albumin overload in mice
54th ERA-EDTA Congress(国際学会), 2017年
14. 池田 康将、堀ノ内 裕也、石澤 有紀、玉置 俊晃
鉄摂取制限はタンパク過剰負荷による尿細管間質障害を抑制する
第60回日本腎臓学会学術総会、2017年
 15. 濱野 裕章、池田 康将、渡邊 大晃、堀ノ内 裕也、石澤 有紀、石澤 啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
インドキシル硫酸はヘプシジンを介した鉄代謝異常に關与する
第60回日本腎臓学会学術総会、2017年
 16. 堀ノ内 裕也、池田 康将、石澤 有紀、石澤 啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
FXa 阻害剤は腎間質線維化を抑制する
第60回日本腎臓学会学術総会、2017年
 17. Hirofumi Hamano, Yasumasa Ikeda, Hiroaki Watanabe, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
Indoxyl sulfate involves abnormality of iron metabolism through hepcidin regulation
Experimental Biology 2017(国際学会), 2017年
 18. 土屋 浩一郎、池田 康将、堀ノ内 裕也、石澤 有紀、宮本 理人、玉置 俊晃
新しい創薬標的としての鉄イオン
日本薬学会第137年会、2017年
 19. 堀ノ内 裕也、池田 康将、石澤 有紀、石澤 啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
FXa 阻害剤の片側尿管結紮モデルマウスにおける腎間質線維化抑制作用
日本薬学会第137年会、2017年
 20. Yuya Horinouchi, Yasumasa Ikeda, Yuki Izawa-Ishizawa, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
Factor Xa inhibitor attenuates renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction
第90回日本薬理学会年会、2017年
 21. 濱野 裕章、池田 康将、渡邊 大晃、堀ノ内 裕也、佐藤 明穂、大島啓亮、石澤 有紀、石澤 啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
慢性腎不全における尿毒素蓄積が生体内鉄代謝に与える影響の検討
第46回日本心脈管作動物質学会年会、2017年
 22. 佐藤 明穂、池田 康将、濱野 裕章、堀ノ内 裕也、今尾 瑞季、渡邊大晃、石澤 有紀、宮本 理人、石澤 啓介、玉置 俊晃、土屋 浩一郎
鉄欠乏が骨格筋に与える作用の検討
第55回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2017年
 23. 池田 康将、佐藤 明穂、堀ノ内 裕也、石澤 有紀、宮本 理人、石澤啓介、土屋 浩一郎、玉置 俊晃
骨格筋分化における鉄の役割
第129回日本薬理学会近畿部会、2016年
 24. Yasumasa Ikeda, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Toshiaki Tamaki
The new insight of iron on tissue damage in metabolic disorders
The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide/The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan(国際学会), 2016年
 25. Yasumasa Ikeda, Oshima Keisuke, Horinouchi Yuya, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
The Involvement of Iron Supplementation on Erythropoietin Expression
Experimental Biology 2016(国際学会), 2016年
- 〔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
<http://www.tuyakuri.umin.jp/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
堀ノ内 裕也(HORINOUCHI, Yuya)
徳島大学・大学院医歯薬学研究所(医学系)・助教
研究者番号: 30716593