

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19533

研究課題名（和文）鉄代謝制御・変容と心臓生理機能・病態の連関解明とその分子基盤解明に挑む

研究課題名（英文）Challenges in elucidating the linkage between iron metabolism regulation/transformation and cardiac physiology/pathophysiology and its molecular mechanisms

研究代表者

尾池 雄一（Oike, Yuichi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授

研究者番号：90312321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：加齢変化による心筋細胞の鉄代謝とその変容の意義についてマウスを用いて解析を行った。加齢マウスの心臓における2価鉄は若齢マウスに比べ明らかな減少を認めた。加齢心臓における2価鉄の減少に注目し、心筋細胞において2価鉄の増加した加齢遺伝子改変マウスを用いて心機能解析を行い、左室駆出率の増加、心壁肥厚を認め、左室拡張機能障害は認めなかった。さらに酸化ストレスの増加、心不全マーカーの増加を認めるものの、抗酸化物質の増加や生存解析に差異を認めなかった。心筋細胞内2価鉄の持続的な増加は心機能を亢進させるが、心不全病態進行への関与の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢マウスにおいて心臓で減少する2価鉄を増加させることにより心機能亢進を認めたと、心不全マーカーの上昇を認め、心不全の前段階の可能性が考えられた。しかし、運動耐容能や生存解析には差異を認めなかったことより、心筋細胞における2価鉄増加は加齢による心不全病態発症の新規予防法・治療開発への可能性が示唆される。今後、2価鉄増加による心収縮亢進のメカニズムも含め、さらなる検討が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The significance of iron metabolism and its alteration in cardiomyocytes due to aging changes was investigated in a mouse model. The level of ferrous iron in the heart tissue of aged mice showed significant decrease compared with young mice. The present study focused on the reduction of ferrous iron in aged hearts. Cardiac function analysis was performed using aged transgenic mice with elevated ferrous iron levels in cardiomyocytes. The results demonstrated a significant increase in left ventricular ejection fraction and heart wall, but no significance of left ventricular diastolic dysfunction. Furthermore, although there was an increase in oxidative stress and heart failure markers, no differences were found in antioxidant increases or survival analysis. A sustained increase in myocardial ferrous iron enhances cardiac function, but might also contribute to the pathological progression of heart failure.

研究分野：循環器内科

キーワード：鉄代謝制御 加齢

## 1. 研究開始当初の背景

鉄は地球上に重量比で最も多く存在する元素であり、真核生物や古細菌の共通祖先である Last Universal Common Ancestor (LUCA、全生物最終共通先祖)は、地球に酸素がない時代に、二酸化炭素、窒素、水素、硫黄、および鉄を利用し嫌氣的代謝を行っており、地球上の生命はその起源から鉄を利用した代謝活動により生命を維持してきた (Weiss MC *et al*, *Nat Microbiol* 2016)。従来、生命機能の主体を担うのはタンパク質などの酵素であり、鉄は多くの酵素の補因子として働くため、その機能は広範な生命機能に必須だが補助的なものと捉えられてきた。しかし最近の研究より鉄自体が ferroptosis 細胞死やミトコンドリア機能の制御など様々な細胞機能調節を通して多彩な生命機能を発揮することが示されており、生命科学における鉄の概念は大きな変革期を迎えている。

申請者はこれまでの成果として『加齢や心不全等の心病態における心機能低下の共通基盤病態として、エネルギー代謝の鍵となるミトコンドリア機能の恒常性維持機構の変容が重要である』ことを見出した (*Nat Commun* 2016, *Nat Commun* 2021)。また、その過程においてミトコンドリア機能制御に細胞内の鉄が重要である可能性を見出し、論文的検索を行った結果、加齢に伴い様々な臓器で鉄の蓄積量が増加し、鉄関連細胞死等により臓器の機能障害がもたらされると考えられていること、一方、鉄の不足でも細胞/臓器の機能変容が生じ、鉄の補充により機能の改善が報告されている。これらは鉄代謝は非常に精密に制御されていることを示すものだが、その詳細はほとんど解明されていない。加齢に伴い脳や心臓など様々な臓器に鉄が蓄積することが報告されている (Fairweather-Tait SJ *et al*, *Mech Ageing Dev* 2013)。近年、健康人の加齢脳の萎縮部位と鉄の蓄積部位が一致すること (Steiger TK *et al*, *J Neurosci* 2016)、低鉄食飼育線虫において寿命が 18% 延伸すること (Schiavi A *et al*, *Curr Biol* 2015)、鉄代謝関連ゲノム変異、血中鉄濃度、ヒト寿命が連関すること (Paul RHJ *et al*, *Nat Commun* 2020) など、加齢による鉄代謝の変容と加齢関連疾患や、鉄代謝と寿命との関連性が示唆され注目されている。しかし、加齢に伴い鉄代謝がどのように変容するか、またその変容と加齢関連疾患発症の因果関係、さらにそれらの分子機構はほとんど明らかになっていない。哺乳類の生命機能における鉄代謝の役割を解明するためには、鉄動態の観点からのアプローチが重要である。鉄は 3 価 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) の状態で細胞内に運ばれ、2 価 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) に還元され反応性に富んだ遊離鉄となる。遊離鉄はミトコンドリアへと運ばれ、ヘムや鉄硫黄クラスターなどの鉄補欠分子族へと代謝されるが、過剰な遊離鉄は酸化傷害などの細胞毒性を生じるため、3 価に変換されて貯蔵される。過去の鉄研究では、鉄が鉄補欠分子族への代謝制御や 2 価 $\rightleftharpoons$ 3 価という酸化還元制御を受け、生体内の鉄恒常性が維持される仕組みが明らかにされてきた。しかし、細胞内の鉄動態を操作する研究手法がないという技術的制約から、鉄代謝の変容と生命機能への影響の因果関係が不明のまま時間が過ぎ、鉄代謝が担う生命機能の解明は進んでこなかった。近年の鉄研究のブレイクスルーとして鉄と直接結合することで細胞内の鉄センサーとして働くユビキチンリガーゼ F-box and leucine rich repeat protein 5 (FBXL5) が、RNA 結合タンパク質 iron regulatory protein (IRP) 1/2 を鉄濃度に応じて分解することで生体内における鉄動態を制御し、鉄代謝の恒常性が維持される (Moroishi T *et al*, *Cell Metab* 2011) ことが明らかとなり、発生工学的手法によりこれらの分子を標的とした“細胞内の遊離鉄が増加する FBXL5 KO マウス”と“遊離鉄が減少する IRP2 KO マウス”をうまく利用することにより生体内における鉄動態の制御が可能となり、鉄代謝が担う生命機能研究がようやく個体レベルで可能となった。以上の理由から「鉄代謝/動態の変容と心機能の連関解明」をテーマに、準備研究を開始した。その成果として肝臓など他臓器での先行研究同様に心筋細胞内に  $\text{Fe}^{2+}$  増加をもたらす致死性の心機能障害が生じることを予想したが、本マウスは心臓発生、心機能に異常は認めず、むしろ心機能は良好で心不全病態に対しては拮抗作用を認めた。近年、鉄過剰による細胞死が注目されているが、準備研究結果は新たな過剰鉄の細胞機能の存在を示している。

## 2. 研究の目的

加齢に伴い様々な臓器で増加する「鉄」蓄積と臓器機能低下との関連が示唆されているが、加齢に伴う鉄代謝の変容と加齢関連疾患発症の因果関係の分子機構は明らかになっていない。本研究では、上記の鉄センサーとしての FBXL5 による鉄動態制御原理を利用して加齢変化を含めた心生理機能、心不全などの心病態を対象に、未解明の心筋細胞における鉄代謝とその変容の意義について、高齢マウス及び遺伝子改変マウスを用いることにより生体の心筋細胞の鉄動態制御の分子基盤解析を行う。ミトコンドリア機能およびその変容、心機能・病理およびその変容と連関させ、生体の心筋細胞の鉄動態制御の連関の分子基盤を含め解明する。

### 3. 研究の方法 および 4. 研究成果

(1) 心臓生理機能及びその加齢性変化、心不全病態における鉄代謝の変化とその制御機構の解明：野生型マウス 3 ヶ月齢（若齢）と 24 ヶ月齢（加齢）の心組織を用いて心臓における鉄量測定を行い、加齢マウスは若齢マウスに比べ鉄量の明らかな増加を認めた。次に心組織の鉄動態解析を行い、加齢マウスの心臓の 3 価鉄は若齢マウスに比べ、明らかな増加を認め、2 価鉄の明らかな減少を認めた。このことよりマウス心臓の加齢変化における鉄増加は 3 価鉄の増加が主体であることが明らかとなった。次に加齢マウスの心臓における 2 価鉄減少の意義を検討するため心筋細胞特異的に 2 価鉄の増加した遺伝子改変マウス (*Fbx15<sup>flox/flox</sup>; αMHC-Cre Tg* (CKO)) を用いて、24 ヶ月齢における心機能を解析した。加齢 CKO は加齢コントロールマウス (*Fbx15<sup>flox/flox</sup>*) と比較し、心臓において若齢と同様に 2 価鉄の明らかな上昇を認めた。心エコーによる心機能解析では加齢 CKO は加齢コントロールに比べ、左室駆出率の明らかな増加を認め、左室拡張機能障害は認めなかった。また、体重当たりの心重量の明らかな増加と HE 染色にて心壁肥厚を認め、さらに WGA 染色にて心筋細胞の肥大と毛細血管の明らかな増加を認めた。qRT-PCR による発現解析では fibrosis のマーカーに差異を認めなかった。また、心不全マーカーである ANP、BNP の明らかな発現増加、酸化ストレスマーカーである 4HNE の増加、抗酸化物 GPX4 の増加を認めた。トレッドミル運動負荷試験による運動耐容能、生存解析を行ったが、加齢コントロールと比べ、明らかな差を認めなかった。

CKO マウスを用いたランゲンドルフ単離心筋細胞においてコントロールに比べ、細胞収縮率の亢進を認めたが、Ca ハンドリングの差異は認めなかった。Ca チャンネルである NCX1 発現の明らかな上昇と SERCA2a の明らかな低下を認めた。心筋細胞収縮率の亢進を認めることより電子顕微鏡解析を行い、心筋細胞骨格の明らかな形態の変化を認めなかった。加齢の状態で一過性に 2 価鉄を増加させることによる心機能への影響を検討するため、薬剤誘導により心筋細胞において *Fbx15* を欠損させる薬剤誘導性心筋細胞特異的 *Fbx15* 欠損 (*Fbx15<sup>flox/flox</sup>; αMHC-Mer-Cre-Mer Tg*) マウスを作製し、そのマウスの 24 ヶ月齢において薬剤誘導を行った。心臓における *Fbx15* の明らかな発現低下を認めた。それらのマウスを用いて薬剤投与終了後 2 週間後に心臓における鉄測定、心エコーによる解析を行ったが、2 価鉄の増加を認めず、心機能についても差異を認めなかった。また、トレッドミル運動負荷試験による運動耐容能を行ったが差異を認めなかった。

(2) 心筋細胞内鉄代謝変容とミトコンドリア機能の連関解明：CKO マウスの心組織を用いて qRT-PCR によるミトコンドリア関連遺伝子発現解析ではコントロールに比べ明らかな差異を認めず、また ATP、ミトコンドリア数についても明らかな差異を認めなかった。また、フラックスアナライザーによるミトコンドリア呼吸機能解析ではコントロールに比べ低下を認めた。電子顕微鏡によるミトコンドリアの形態解析を行い、明らかな変化を認めなかった。

(3) 鉄代謝変化に依存する心機能制御に重要な新たな経路、因子の網羅的探索：CKO

マウスとコントロールの心臓サンプルを用いた RNA シークエンス解析、プロテオーム解析より複数の候補遺伝子、候補タンパクを同定した。それらの網羅的解析より、既存の報告から心機能亢進に關与する転写因子や心保護作用を有する遺伝子、タンパクを複数認めており、今後解析を進めていく。

マウス心臓において加齢変化で減少する 2 価鉄を増加させることにより心機能亢進を認めたが、心不全マーカーの上昇を認め、心不全の前段階の可能性が考えられた。しかし、運動耐容能や生存解析では明らかな差異を認めなかったことより、心筋細胞における 2 価鉄増加は加齢によるヒト心不全病態発症の新規予防法・治療開発の可能性が考えられる。今後、2 価鉄増加による心収縮亢進のメカニズムも含め、さらなる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okadome Yusuke, Morinaga Jun, Yamanouchi Yoshinori, Oike Yuichi et al.	4. 巻 27
2. 論文標題 Increased numbers of pre-operative circulating monocytes predict risk of developing cardiac surgery-associated acute kidney injury in conditions requiring cardio pulmonary bypass	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 329 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-022-02313-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horiguchi Haruki, Kadomatsu Tsuyoshi, Yumoto Shinsei, Masuda Takeshi, Miyata Keishi, Yamamura Shuji, Sato Michio, Morinaga Jun, Ohtsuki Sumio, Baba Hideo, Moroishi Toshiro, Oike Yuichi	4. 巻 41
2. 論文標題 Tumor cell-derived ANGPTL2 promotes $\beta$ -catenin-driven intestinal tumorigenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4028 ~ 4041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02405-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhao Wenjing, Morinaga Jun, Ukawa Shigekazu, Endo Motoyoshi, Yamada Hiroya, Kawamura Takashi, Wakai Kenji, Tsushita Kazuyo, Ando Masahiko, Suzuki Koji, Oike Yuichi, Tamakoshi Akiko	4. 巻 77
2. 論文標題 Plasma Angiopoietin-Like Protein 2 Levels and Mortality Risk Among Younger-Old Japanese People: A Population-Based Case-Cohort Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journals of Gerontology: Series A	6. 最初と最後の頁 1150 ~ 1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/gerona/glac017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cui Guangwei, Shimba Akihiro, Jin Jianshi, Oike Yuichi, Ikuta Koichi et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 A circulating subset of iNKT cells mediates antitumor and antiviral immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 8760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abj8760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshizawa Tatsuya, Sato Yoshifumi, Sobuz Shihab U., Mizumoto Tomoya, Tsuyama Tomonori, Karim Md. Fazlul, Miyata Keishi, Tasaki Masayoshi, Yamazaki Masaya, Kariba Yuichi, Araki Norie, Araki Eiichi, Kajimura Shingo, Oike Yuichi, Braun Thomas, Bober Eva, Auwerx Johan, Yamagata Kazuya	4. 巻 13
2. 論文標題 SIRT7 suppresses energy expenditure and thermogenesis by regulating brown adipose tissue functions in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35219-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mizumoto Tomoya, Yoshizawa Tatsuya, Sato Yoshifumi, Ito Takaaki, Tsuyama Tomonori, Satoh Akiko, Araki Satoshi, Tsujita Kenichi, Tamura Masaru, Oike Yuichi, Yamagata Kazuya	4. 巻 11
2. 論文標題 SIRT7 Deficiency Protects against Aging-Associated Glucose Intolerance and Extends Lifespan in Male Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3609 ~ 3609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11223609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funasaki Shintaro, Mehanna Sally, Ma Wenjuan, Nishizawa Hidekazu, Kamikubo Yasuhiko, Sugiyama Hiroshi, Ikeda Shuji, Motoshima Takanobu, Hasumi Hisashi, Linehan W. Marston, Schmidt Laura S., Ricketts Chris, Suda Toshio, Oike Yuichi, Kamba Tomomi, Baba Masaya	4. 巻 113
2. 論文標題 Targeting chemoresistance in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma using a novel polyamide?chlorambucil conjugate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2352 ~ 2367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Virginia Tech			