

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590907

研究課題名(和文)心腎貧血連関ネットワークの解析と新規治療戦略の開発

研究課題名(英文)Role of Duodenal Iron Transporters in Cardio-Renal Anemia Syndrome

研究代表者

増山 理 (Masuyama, Tohru)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70273670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：心不全・腎不全・貧血連関の分子機構について、鉄代謝調節機構に着目し、基礎および臨床研究より検討した。心不全モデル及び慢性腎臓病モデル動物を用いた検討より、十二指腸鉄吸収蛋白の発現異常が明らかとなり、これが心不全・腎不全・貧血連関の増悪因子の一つであることを示された。また、臨床研究より心不全患者には貧血や鉄欠乏合併例が多く、心不全患者の鉄吸収能は貧血合併例で低下傾向にあることも明らかになり、十二指腸における鉄吸収能を改善することが心腎貧血連関ネットワークの新たな治療標的になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found the impaired expression of duodenal iron transporters in heart failure (HF) and chronic kidney disease (CKD) model rats. Duodenal expression of crucial iron transporters, such as duodenal cytochrome b and divalent metal transporter 1 was not increased in both HF and CKD model rats despite being under iron-deficient conditions. As a result, our data suggests that impaired intestinal iron absorption may be a novel therapeutic target in cardio-renal anemia syndrome.

研究分野：医歯薬学

キーワード：循環器 心不全 腎不全 貧血 鉄代謝調節機構 鉄 エリスロポエチン 心腎貧血連関

## 1. 研究開始当初の背景

心不全患者は、貧血を高率に合併することが報告される。しかし、心不全患者に合併する貧血の成因については、様々な因子が関与しており、その分子機構は不明のままである。我々は、生体内鉄代謝調節機構に着目し、心不全に合併する貧血の分子機序として、十二指腸における鉄吸収蛋白の発現異常の関与を明らかにしている (Naito Y, Masuyama T, et al. *J Hypertens.* 29: 741-748, 2011)。

心不全と腎不全をつなぐ因子としても、貧血の存在が報告されている。心不全・腎不全・貧血は互いに増悪しあうという概念から、cardio-renal anemia syndrome (CRA 症候群) といわれている。CRA 症候群における貧血治療については、エリスロポエチン製剤・赤血球造血刺激因子製剤 (erythropoiesis stimulating agent: ESA) や鉄剤が用いられているが、その治療効果、特に予後改善効果については一定の見解がなく、新たな治療戦略の開発が必要とされている。

## 2. 研究の目的

本研究は、CRA 症候群の分子機構について、鉄吸収蛋白の発現異常が心不全だけでなく、慢性腎臓病 (CKD) に合併する貧血憎悪にも関係するのか、などの未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、CRA 症候群患者に貢献するための研究基盤の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究は、CRA 症候群の分子機構について、十二指腸における鉄吸収蛋白の発現異常が CKD に合併する貧血憎悪に関係するのか、などを CKD モデル動物を用いた実験より検討する。また、心不全患者における鉄吸収能と貧

血の関連について臨床研究を行う。さらに、心臓・腎臓における内在性エリスロポエチン-エリスロポエチン受容体を介したシグナル伝達系がこれらの臓器保護に作用するのか、などをノックアウトマウスを用いた実験より検討する。

### (1) CKD モデル動物を用いた検討

CKD モデルは、CKD モデルとして確立されているラット 5/6 腎臓摘出モデルを作成し検討する。5/6 腎臓摘出ラットは、機能ネフロン低下による水・Na 貯留やレニン・アンジオテンシン系亢進を示し、ヒト CKD の病態に近似する。この CKD モデル動物を用い、貧血と鉄代謝調節機構の関与を検討する。具体的には、6 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットの左腎を摘出、翌週に右腎の 2/3 を摘出し CKD モデルを作成。血圧、尿中蛋白、ナトリウム、カリウム排泄量などの腎機能の経時的変化、病態形成の術後 24 週に各種臓器を採取し、肝臓におけるヘプシジン、十二指腸における鉄吸収・輸送に関与する duodenal cytochrome b (Dcyt-b)、divalent metal transporter 1 (DMT-1)、フェロポルチンなどの鉄代謝調節機構の構成蛋白の発現と全血球計算、血中鉄、エリスロポエチン濃度の関連を解析する。偽手術群をコントロール群とし、これら 2 群にて比較検討する。

### (2) 心不全患者における鉄吸収能と貧血に関する検討

インフォームドコンセントにより同意の得られた心不全患者を対象に、全血球計算、血中鉄濃度、鉄吸収能を解析する。

### (3) エリスロポエチン受容体ノックアウトマウスを用いた検討

エリスロポエチン（EPO）は赤芽球系細胞の分化と誘導を担う腎臓で産生されるサイトカインであるが、最近 EPO 受容体が、赤芽球系の細胞のみならず心臓など多くの臓器に発現していることが確認されている。赤芽球系の EPO 受容体遺伝子ノックアウトマウスは胎生致死であるが、今回検討する EPO 受容体ノックアウト（EPORKO）マウスは、赤芽球系以外の組織（例えば心臓）における EPO 受容体遺伝子を欠損させたマウスで生存可能である。このマウスに鉄欠乏飼料を与え、貧血、特に鉄欠乏性貧血に伴う心機能の生理的変化・心臓におけるミトコンドリア機能を解析し、貧血合併心不全における心臓の内在性 EPO-EPO 受容体の役割を検討する。

#### 4．研究成果

##### （1）CKD モデル動物を用いた検討

CKD モデルラットはヒト CKD 患者同様、正球性正色素性貧血を呈し、さらにモデル作成後慢性期には血中鉄濃度が低下した。そこで、この CKD モデルラットの鉄代謝調節機構の発現を検討したところ、肝臓におけるヘプシジン発現は正常ラットと同程度であったが、十二指腸における Dcyt-b、DMT-1 発現は低下していた。つまり、先に報告した心不全モデル動物（Naito Y, Masuyama T, et al. *J Hypertens.* 29: 741-748, 2011）と同様に、CKD モデル動物においても十二指腸鉄吸収蛋白に発現異常があり、これが CRA 症候群の増悪因子の一つであることを示された。さらに、これらモデル動物を用いた検討より、生体内鉄代謝調節機構の中心的役割を担うヘプシジンが心肥大に関与することが明らかにされた。

##### （2）心不全患者における鉄吸収能と貧血に関する検討

インフォームドコンセントにより同意の得られた心不全患者 32 例で検討したところ、全登録患者の 55%に貧血を合併すること、70%に鉄欠乏を合併することが明らかとなった。さらに、鉄吸収能は貧血合併例で低下傾向にあることも明らかになり、十二指腸における鉄吸収能を改善することが心不全に合併する貧血の新たな治療標的になることが示された。

##### （3）EPO 受容体ノックアウト（EPORO）マウスを用いた検討

EPORKO マウスに鉄欠乏飼料を与えたところ、WT マウスと同様に鉄欠乏性貧血を認めたが、その程度に有意差は認められなかった。マウスに鉄欠乏飼料を長期間与えると高心拍出性心肥大を呈するが、その程度は WT マウスに比べ EPORKO マウスで増大しており、心機能の低下も観察された。その機序として、心臓におけるミトコンドリア機能異常の関与が示唆された。以上より、鉄欠乏性貧血に伴う心機能の変化において、内在性 EPO-EPO 受容体を介したシグナル伝達系の関与が示された。

#### 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7件)

1. Naito Y, Sawada H, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotsu S, Mano T, Tsujino T, Masuyama T. Cardiac remodeling in response to chronic iron deficiency: role of the erythropoietin receptor. *J Hypertens.* 33: 1267-1275, 2015. 査読有
2. Naito Y, Hosokawa M, Sawada H, Oboshi

- M, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotsani S, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Hecpidin is increased in the hypertrophied heart of Dahl salt-sensitive rats. *Int J Cardiol*. 172: e45-e47, 2014. 査読有
3. Naito Y, Fujii A, Sawada H, Hirotsani S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Dietary iron restriction prevents further deterioration of renal damage in a chronic kidney disease rat model. *J Hypertens*. 31: 1203-1213, 2013. 査読有
  4. Naito Y, Hosokawa M, Hao H, Sawada H, Hirotsani S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Hirota S, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Impact of dietary iron restriction on the development of monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular failure in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 436: 145-151, 2013. 査読有
  5. Naito Y, Sawada H, Oboshi M, Fujii A, Hirotsani S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Morisawa D, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Increased Renal Iron Accumulation in Hypertensive Nephropathy of Salt-Loaded Hypertensive Rats. *PLoS One*. 8: e75906, 2013. 査読有
  6. Naito Y, Sawada H, Hirotsani S, Iwasaku T, Okuhara Y, Eguchi A, Miki K, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Angiotensin II type 1a receptor signaling is implicated in erythropoietin production in response to iron deficiency in mice. *Int J Cardiol*. 168: 1607-1608, 2013. 査読有
  7. Naito Y, Fujii A, Sawada H, Hirotsani S, Iwasaku T, Eguchi A, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Effect of iron restriction on renal damage and mineralocorticoid receptor signaling in a rat model of chronic kidney disease. *J Hypertens*. 30: 2192-2201, 2012. 査読有
- [学会発表](計8件)
1. 内藤由朗, 澤田 悠, 大星真貴子, 増山理. Possible Role of Duodenal Iron Transporters in the Development of Cardiorenal Anemia Syndrome. 第79回日本循環器学会総会・学術集会(招待講演), 大阪国際会議場, 大阪, 2015.4.24-27.
  2. 細川愛実, 内藤由朗, 澤田 悠, 大星真貴子, 岩破俊博, 奥原祥貴, 森澤大祐, 江口明世, 廣谷信一, 真野敏昭, 辻野健, 増山理. 高血圧性肥大心における鉄代謝調節因子ヘプシジン発現. 第37回日本高血圧学会総会, パシフィコ横浜, 横浜, 2014.10.16-18.
  3. Hosokawa M, Naito Y, Sawada H, Oboshi M, Fujii A, Iwasaku T, Okuhara Y, Morisawa D, Eguchi A, Hirotsani S, Ohyanagi M, Tsujino T, Masuyama T. Hecpidin, a key regulator of iron metabolism in the hypertrophied heart.

- 第78回日本循環器学会総会・学術集会，東京国際フォーラム，東京，2014.3.21-23.
4. 澤田 悠，内藤由朗，岩破俊博，奥原祥貴，森澤大祐，安藤友孝，江口明世，西村晃一，大星真貴子，廣谷信一，増山理．心不全患者における血清鉄濃度低下について．第116回日本循環器学会近畿地方会，大阪国際交流センター，大阪，2013.11.30.
  5. Naito Y，Sawada H，Oboshi M，Iwasaku T，Okuhara Y，Morisawa D，Eguchi A，Hirotsani S，Tsuji no T，Masuyama T．Iron in the Development of Hypertensive Nephropathy．Joint meeting European Society Hypertension/International Society Hypertension-Hypertension 2014，Athens，Greece，2014.6.13-16.
  6. Naito Y，Sawada H，Oboshi M，Iwasaku T，Okuhara Y，Morisawa D，Eguchi A，Hirotsani S，Tsuji no T，Masuyama T．Iron，Hypertension，and Renal Injury in a Rat Model of Chronic Kidney Disease．Joint meeting European Society Hypertension/International Society Hypertension-Hypertension 2014，Athens，Greece，2014. 6.13-16.
  7. Naito Y，Hosokawa M，Hao H，Sawada H，Oboshi M，Iwasaku T，Okuhara Y，Morisawa D，Eguchi A，Hirotsani S，Tsuji no T，Masuyama T．Effects of Iron Restriction on Monocrotaline-Induced Pulmonary Vascular Remodeling．American College of Cardiology 63rd Annual Scientific Session 2014，Washington DC，USA，2014.3.29-31.
  8. Fujii A，Naito Y，Sawada H，Hirotsani S，Iwasaku T，Eguchi A，Okuhara Y，Miki K，Ohyanagi M，Tsuji no T，Masuyama T．Dietary iron restriction prevents and rescues renal injury in a rat model of chronic kidney disease．American Heart Association Scientific Sessions 2012，Los Angeles，USA，2012.11.3-7.
  9. 藤井 彩，内藤由朗，澤田 悠，辻野健，佐々木尚子，大柳光正，増山理．慢性腎臓病モデルにおける鉄制限の効果．第35回日本高血圧学会総会，ウェスティンナゴヤキャッスル，名古屋，2012.9.20-22．
- 〔図書〕(計2件)
1. 内藤 由朗，増山 理．心腎貧血症候群．Heart View：メディカルレビュー社、東京：57-65，2014.
  2. 内藤 由朗、増山 理．心不全における鉄代謝調節機構．医学のあゆみ：医歯薬出版株式会社、東京：333-334，2014.
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 増山 理 (MASUYAMA, Tohru)  
 兵庫医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：70273670
- (2) 研究分担者  
 内藤 由朗 (NAITO, Yoshiro)  
 兵庫医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：10446049