

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750044

研究課題名(和文) 高血圧症における生体内鉄代謝機構変化の分子機序解明と治療法への応用

研究課題名(英文) Application to the clarification and treatment of molecular mechanism of iron metabolic disorders in hypertension

研究代表者

田島 壮一郎(Tajima, Soichiro)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：10579460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アンジオテンシンII(Ang II)によって引き起こされる十二指腸における鉄代謝関連蛋白質の発現変化、肝臓におけるヘプシジン産生および生体内鉄量への影響について検討した。Ang II投与により、血清hepcidin-25濃度は低下しており、十二指腸におけるDMT1ならびにFPNの発現は増加を認めた。また、腎臓とマクロファージにおける鉄濃度はAng II投与群において増加を認めた。Ang IIは、ヘプシジンを介した十二指腸鉄輸送体制御に関与し、生体内鉄分布を変化させることで生体内鉄代謝に関与することが明らかとなった。Ang II阻害は、生体内鉄代謝異常の是正に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of Ang II on duodenal iron transporters, hepatic hepcidin, and body iron storage. Serum hepcidin-25 concentration was lower in Ang II-infused mice compared to vehicle-treated mice, and this decrease was ameliorated by angiotensin II type 1 receptor antagonist administration. Protein expression of FPN and DMT1 was increased in the duodenum of Ang II-treated mice. Iron content was elevated in kidney and peritoneal macrophage from Ang II-treated mice. These results suggest that Ang II involves in body iron metabolism through the regulation of duodenal iron transporters via hepatic hepcidin and the alteration of body iron distribution. Inhibition of Ang II has a beneficial effect on correction of abnormal iron metabolism induced by Ang II.

研究分野：臨床薬理学, 医療薬学

キーワード：鉄代謝 高血圧症 angiotensin II ヘプシジン 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1)鉄は、すべての生物にとって生命維持に必須の微量元素である。しかし、過剰の鉄は Fenton / Harber-Weiss 反応を介して生体に有害なヒドロキシルラジカルを産生して酸化ストレスの産生源となり、蛋白質、脂質、リポ蛋白、核酸などの種々の細胞成分の酸化による細胞死を引き起こす。

(2)近年、鉄蓄積疾患ではない C 型肝炎、アルツハイマー病、悪性腫瘍などにおいても、鉄による酸化ストレスが病態に関与していることが示されている。我々は、糖尿病モデルマウスにおいて鉄キレート剤投与が酸化ストレスを軽減し脂肪肥大進展を抑制することを明らかにした(Tajima S, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2012)。また、食餌による鉄制限が、ヒドロキシルラジカル産生を低下させて糖尿病性腎症の増悪を抑制することを見出している(Ikeda Y, et al. Am J Physiol Renal Physiol 2013)。

2. 研究の目的

(1)高血圧症の発症・進展の原因の一つとして、レニン・アンジオテンシン系(RA系)の活性化が関与しており、RA系を抑制する医薬品が高血圧症の治療薬として世界中で多数使用されている。RA系の中心であるアンジオテンシン II (ANG II)は、強力な昇圧作用に加えて脳心腎血管臓器リモデリングによって臓器障害を引き起こす。従来、このリモデリングには主に ANG II の NADPH oxidase 活性化による酸化ストレス増加が関与すると考えられているが、鉄との関連性について報告されている。ANG II 投与高血圧ラットの心筋繊維化と動脈硬化病変が、鉄除去剤投与によって改善されることが報告されている(Ishizaka N, et al. Circulation 2002、Ishizaka N, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005)。我々も腎系球体血管内皮細胞において、ANG II が鉄代謝関連蛋白質の発現を変化させて、細胞内鉄量を増加し、鉄を介して酸化ストレスが増強することを明らかにしている(Tajima S, et al. Hypertens Res 2010)。これらの報告から、ANG II による高血圧に伴う臓器障害には、鉄が一部関与していることが示唆される。

(2)臨床においても高血圧症患者では生体内鉄量のマーカーである血清フェリチン値が高値であること(Piperno A, et al. J Hypertens. 2002)が報告されている。しかし、高血圧において、どのようなメカニズムで生体内鉄量が増加するかは明らかにされておらず、十二指腸での鉄吸収量の変化や肝臓における鉄制御分泌ホルモンであるヘプシジンについても不明である。本研究では、高血圧と消化管鉄吸収機構の連関に着目して、高血圧における鉄量増加のメカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

6週齢の C57BL/6J マウスを用いて、浸透圧ポンプにより ANG II を 2.0mg/kg/min で 4週間持続投与して高血圧モデルマウスを作成した(ANG II 群)。また ANG II 投与群については 8週齢から vehicle もしくはオルメサルタン 3.0mg/kg を 2週間経口投与した(ANG II + Olm)。3群(対照(CTR)群、ANG II 群、ANG II + Olm 群)間で比較検討した。

(1)生体内鉄量評価

血清鉄、臓器鉄濃度は Nitroso-PSAP 法を用いて測定を行い、血清フェリチン値は ELISA 法で測定した。

(2)ヘプシジンの評価

肝臓におけるヘプシジンの遺伝子発現は定量 RT-PCR 法にて検討し、血清ヘプシジンは LC/MS 法を用いて測定した。

(3)各種鉄代謝関連蛋白質の発現評価

鉄代謝関連蛋白質(transferrin receptor (TfR), divalent metal transporter 1(DMT1), ferroportin (FPN), Hypoxia Inducible Factor-2 α (HIF-2 α))の発現は、ウエスタンブロット法ならびに定量 RT-PCR 法にて検討した。

(4) BMP6-C/EBP- α および炎症性サイトカインの評価

Bone morphogenetic protein 6 (BMP6) , CCAAT/enhancer-binding protein- α (C/EBP- α) および炎症性サイトカインの遺伝子発現は定量 RT-PCR 法にて検討した。

(5)IRP/IRE の結合活性評価

IRP (iron-regulatory protein)/ IRE (iron responsive element)の結合活性は、ゲルシフトアッセイにより検討した。

(6)統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。2群間の比較には Student ' s t-test を、多重の比較には一元配置分散分析または二元配置分散分析を用い、Tukey-Kramer test により有意差評価を行った。有意水準は 5%とした。

4. 研究成果

(1)体重、心拍数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値は、3群間で有意な差は認められなかった。血圧においては、ANG II 群で上昇を認め、ANG II + Olm 群では、この血圧の増加は抑制された(表 1)。一方、血清鉄は ANG II 群で有意に低下しており、血清フェリチン値は高値であった(表 1)。

(2)十二指腸における鉄代謝関連蛋白質 DMT1 および FPN の発現は、ANG II 群で有意な増加を認めた。オルメサルタンの投与により、ANG II による DMT1 および FPN の発現増加は、抑制された。また、DMT1 および FPN

の発現を転写レベルで調節している HIF-2 α の mRNA および蛋白質発現は、ANG II 群において有意な増加を認めた (図 1)。

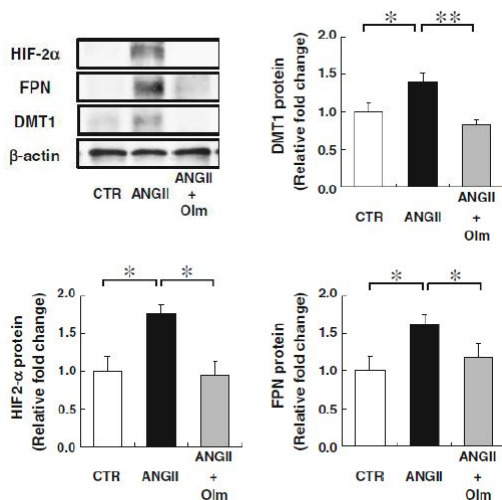
(表 1) 体重、血圧、心拍数、血清鉄濃度

	CTR	ANG II	ANG II + Olm
Body weight (g)	26.1 \pm 0.5	24.4 \pm 0.8	25.0 \pm 0.7
Systolic blood pressure (mmHg)	104.8 \pm 2.1	132.4 \pm 4.2**	100.9 \pm 2.6 ^{††}
Diastolic blood pressure (mmHg)	69.1 \pm 3.3	85.8 \pm 4.2**	71.4 \pm 2.5 ^{††}
Heart rate (beats/min)	637 \pm 17	629 \pm 25	653 \pm 16
Hemoglobin (g/dL)	12.7 \pm 0.6	13.7 \pm 0.8	13.7 \pm 0.4
Hematocrit (%)	38.7 \pm 2.2	43.4 \pm 0.8	42.4 \pm 1.8
Serum iron concentration (μ g/dL)	98.2 \pm 7.3	69.6 \pm 6.9**	112.3 \pm 9.8 ^{††}
Serum ferritin concentration (ng/mL)	551.3 \pm 52.4	827.0 \pm 113.0**	613.4 \pm 51.9 [†]

Values are expressed as means \pm SEM

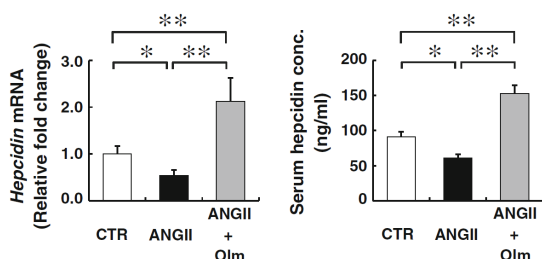
CTR, vehicle-infused mice; ANG II, ANG II-infused mice, ANG II+Olm, ANG II-infused mice with olmesartan administration

** $P < 0.01$ versus CTR; [†] $P < 0.05$; ^{††} $P < 0.01$ versus ANG II $n = 8-12$ in each group



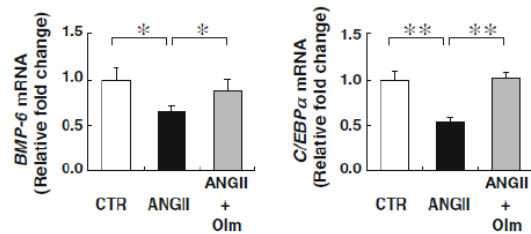
(図 1) DMT1、FPN、HIF-2 α の発現評価

(3) 肝臓で産生される鉄代謝調節ホルモンヘプシジンの遺伝子発現は、ANG II 群において有意に低下しており、また血清中のヘプシジン-25 濃度も ANG II 群において CTR 群よりも有意な減少を認めた (図 2)。



(図 2) ヘプシジンの発現評価

また、ヘプシジン産生を調節する BMP6 および C/EBP- α の遺伝子発現においても ANG II 群において有意な低下を認めた。一方、ANG II + Olm 群では、これらの変化は認められなかった (図 3)。



(図 3) BMP6、C/EBP- α の発現評価

(4) 肝臓および脾臓における鉄濃度は、3 群間で有意な差を認めなかった。一方、腹腔内マクロファージおよび腎臓における鉄濃度は、ANG II 群において CTR 群よりも有意に増加しており、ANG II + Olm 群と CTR 群では有意な差を認めなかった (表 2)。

(表 2) 各組織における鉄濃度

	CTR	ANG II	ANG II + Olm
Liver (μ g/g \times wet tissue weight)	16.8 \pm 1.9	16.7 \pm 1.2	16.3 \pm 2.0
Spleen (μ g/g \times wet tissue weight)	7.6 \pm 1.3	7.5 \pm 1.1	6.5 \pm 1.6
Peritoneal macrophage (μ g/g \times protein)	222.7 \pm 59.9	515.4 \pm 106.2*	186.8 \pm 21.3 [†]
Kidney (μ g/g \times wet tissue weight)	2.0 \pm 0.2	2.7 \pm 0.3*	2.1 \pm 0.1 [†]

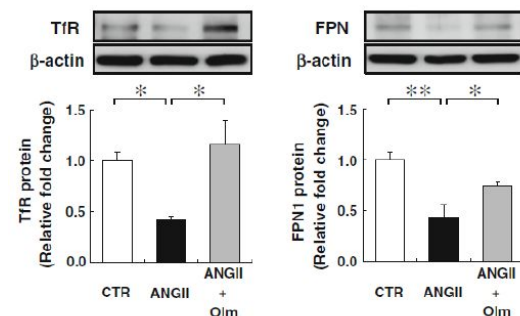
Values are expressed as means \pm SEM

CTR, vehicle-infused mice; ANG II, ANG II-infused mice; ANG II+Olm, ANG II-infused mice with olmesartan administration

* $P < 0.05$ versus CTR; [†] $P < 0.05$ versus ANG II $n = 8-12$ in each group

(5) 腹腔内マクロファージにおける TfR および FPN の発現は、ANG II 群において CTR 群よりも有意に低下した (図 4)。

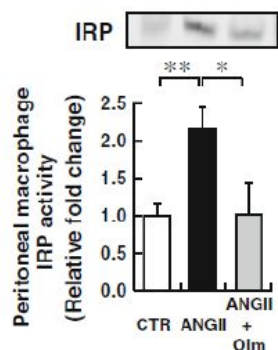
(図 4) 腹腔内マクロファージにおける TfR、



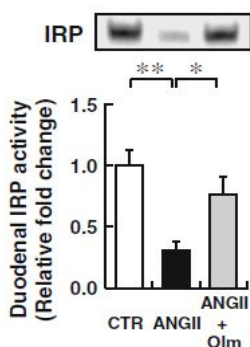
FPN の発現評価

一方、腹腔内マクロファージにおける IRP と IRE の結合活性は、ANG II 群において増加しており、ANG II + Olm 群と CTR 群では有意な差を認めなかった (図 5)。また、十二指腸における IRP と IRE の結合活性は、ANG II 群において低下しており、ANG II + Olm 群と

CTR 群では有意な差を認めなかった(図 6)。

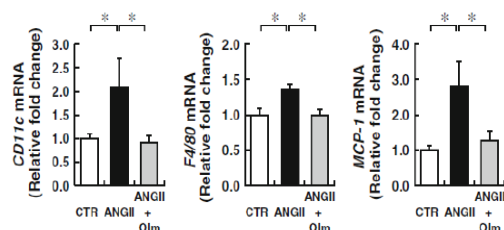


(図 5) 腹腔内マクロファージにおける IRP/IRE の結合活性評価



(図 6) 十二指腸における IRP/IRE の結合活性評価

さらに、炎症性 M1 マクロファージのマーカである CD11c , F4/80 , MCP-1 の遺伝子発現は、CTR 群と比べ ANG II 群において有意な増加を認めた (図 7)。



(図 7) M1 マクロファージの評価

5 . 考察

ANG II 負荷による高血圧モデルマウスにおいて、十二指腸の鉄代謝蛋白質 DMT1、FPN の発現が増加しており、その機序としては、肝臓でのヘプシジン産生低下が考えられた。また、ヘプシジン産生に関与する BMP6、C/EBP- α の発現も同様に減少を認めた。各臓器における鉄量に関しては、肝臓と脾臓において ANG II による影響は認められなかったが、腎臓とマクロファージにおいて、ANG II

は鉄量の有意な増加を引き起こした。これらの結果より、ANG II は肝臓でのヘプシジン産生を低下させ、十二指腸での DMT1、FPN 発現を増加することから、ANG II は生体内鉄代謝機構に関与することが示唆された。

一方、ANGII 刺激により、マクロファージにおける FPN 発現は低下し、マクロファージ内鉄量の増加を認めた。また ANG II は、マクロファージの極性を炎症性 (M1) に誘導することが報告されており、今回の実験においても、M1 マクロファージのマーカである CD11c , F4/80 , MCP-1 の発現は、有意に増加しており、オルメサルタンの投与によってこれらの変化は抑制された。マクロファージにおいて ANG II は、ANG II による肝臓ヘプシジン産生抑制とは独立して、TfR および FPN 発現を調節している可能性が示唆された。また、ANG II によって血清フェリチン値が有意に増加しており、オルメサルタンの投与によって抑制された。この理由としては、マクロファージにおける鉄量が増加したため、細胞内のフェリチンが血液中に放出されたと考えられる。さらにマクロファージにおける IRP の結合活性について検討した結果、細胞内鉄量の増加とは無関係に ANG II 投与によって結合活性の有意な増加を認めた。一方で、十二指腸では IRP 活性は ANG II によって抑制されていた。ANG II による全身の鉄代謝変化と各臓器の鉄代謝変化については、更なる検討が必要であると考えられる。

6 . 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 6 件)

Takumi Sakurada, Soji Kakiuchi, Soichiro Tajima, Yuya Horinouchi, K Konaka, Naoto Okada, Hirotaka Nishisako, Toshimi Nakamura, Kazuhiko Teraoka, Kazuyoshi Kawazoe, Hiroaki Yanagawa, Yasuhiko Nishioka, Keisuke Ishizawa: Pemetrexed-Induced rash may be prevented by supplementary corticosteroids, *Biol Pharm Bull*, 査読有 Vol.38, No.11, 2015, pp.1752-6, DOI:10.1248/bpb.b15-00435.

Soichiro Tajima, Yasumasa Ikeda, Hideaki Enomoto, Imao Mizuki, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Rihito Miyamoto, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki: Angiotensin II alters the expression of duodenal iron transporters, hepatic hepcidin, and body iron distribution in mice, *European Journal of Nutrition*, 査読有 Vol.54, No.5, 2015, pp.709-19, DOI: 10.1007/s00394-014-0749-1

Takumi Sakurada, Soji Kakiuchi, Soichiro Tajima, Yuya Horinouchi, Naoto Okada, Hiroataka Nishisako, Toshimi Nakamura, Kazuhiko Teraoka, Kazuyoshi Kawazoe, Hiroaki Yanagawa, Yasuhiko Nishioka, Kazuo Minakuchi, Keisuke Ishizawa: Characteristics of and risk factors for interstitial lung disease induced by chemotherapy for lung cancer, *The Annals Pharmacotherapy*, 査読有 Vol.49, No.4, 2015, pp.398-404, DOI:10.1177/1060028014566446.

Yasumasa Ikeda, Iori Ozono, Soichiro Tajima, Mizuki Imao, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Rihito Miyamoto, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki: Iron chelation by deferoxamine prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction, *PLoS ONE*, 査読有 Vol.9, No.2, 2014, p.e89355, DOI:10.1371/journal.pone.0089355

Yasumasa Ikeda, Soichiro Tajima, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Sumiko Yoshida, Ken-ichi Aihara, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki: Bovine milk-derived lactoferrin exerts proangiogenic effects via an Src-Akt-eNOS-dependent manner in response to ischemia, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 査読有 Vol.61, No.5, 2013, pp.423-9, DOI:10.1097/FJC.0b013e318287d526.

Yasumasa Ikeda, Hideaki Enomoto, Soichiro Tajima, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki: Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice, *Am J Physiol Renal Physiol*, 査読有 Vol.304, No.7, 2013, pp.F1028-36, DOI:10.1152/ajprenal.00473.2012.

〔学会発表〕(計4件)

池田康将, 田島壯一郎, 堀ノ内裕也, 石澤有紀, 木平孝高, 宮本理人, 石澤啓介, 土屋浩一郎, 玉置俊晃.
アンジオテンシン II は鉄吸収制御と生体内鉄分布変化に關与する
第 125 回日本薬理学会近畿部会
平成 26 年 6 月 20 日, 岡山市

田島壯一郎, 江頭伸昭, 増田智先.
高血圧症と鉄代謝異常.
第 87 回日本薬理学会年会
平成 26 年 3 月 19~21 日, 仙台市

池田康将, 田島壯一郎, 石澤有紀, 木平孝高, 石澤啓介, 土屋浩一郎, 玉置俊晃.
アンジオテンシン II は十二指腸鉄輸送体発現とマクロファージ鉄量を増加させる.
第 43 回日本心脈管作動物質学会
平成 26 年 2 月 15~16 日, 神戸市

池田康将, 今尾瑞季, 田島壯一郎, 堀ノ内裕也, 石澤有紀, 木平孝高, 石澤啓介, 土屋浩一郎, 玉置俊晃.
フェリチンの炎症惹起作用.
第 37 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
平成 25 年 9 月 7~9 日, 東京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

7. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 壯一郎 (TAJIMA SOICHIRO)
九州大学・大学病院・薬剤師
研究者番号: 10579460