

平成30年 6月15日現在

機関番号：82718

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05346

研究課題名(和文)鉄摂取の過不足が生体内遺伝子発現に及ぼす影響とその制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the effects of dietary iron deficiency and excess on the gene expression profiles

研究代表者

亀井 飛鳥(Kamei, Asuka)

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・食品機能性評価グループ・研究員(任期無)

研究者番号：40514112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：鉄は、私たちが生命活動を維持するのに不可欠の栄養素のひとつであり、鉄欠乏は世界で最も多くみられる栄養不良である。体内の鉄が不足すると貧血のない鉄欠乏(貧血予備群)を経てやがて貧血に至る。一方、鉄には過剰摂取のリスクも指摘されており、例えば臓器への蓄積に伴う酸化傷害の惹起が報告されている。本研究では、マウスを対象とした実験により、鉄摂取量の不足あるいは過剰時に臓器の鉄貯蔵量が減増することを確認し、それに応答して発現変動する遺伝子について肝臓や血液を対象に網羅的に解析し、鉄の過不足に対する生体の応答制御機序の一端と、体内鉄量を反映する指標としての可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Iron is an essential mineral for the body and its deficient is the problem in the world. Iron is also the risk factor of oxidative stress when accumulated in the organs excessively. In this study, the global analysis of gene expression in the liver or whole blood showed that patterns of gene expression profiles were changed according to the amount of iron storage in the organs. In the liver, a variety of metabolic processes and immune responses tended to change. In the whole blood, we focused on the genes of which expression patterns were correlated significantly with iron storage in the organs as candidates to evaluate the iron status in the body.

研究分野：ニュートリゲノミクス

キーワード：鉄 トランスクリプトーム 過剰 不足

1. 研究開始当初の背景

長寿でかつ健康に過ごすためには、親から受け継いだ遺伝子以外に環境や栄養状態が重要だと言われている。食品や栄養素が生体に与える複雑多岐に亘る作用を評価するには、個別的・部分的な研究対象を深く解析する従来の手法とともに、遺伝子レベルで網羅的・包括的に解析する新しい手法を用いて評価対象を幅広く展開する研究が不可欠である。ニュートリゲノミクスは、食の条件によって変化する生命現象について事象全体をまず網でくくり、続いて個々の事象の深層解析へと歩を進めるための最適手法であり、栄養事象の本質を根源的に解明する手法でもある。また、ニュートリゲノミクスは生体が応答した結果から食品や栄養素の作用を事前予知するものであるが、近年ではその作用に至る制御機構を明らかにするための手法を導入し、より詳細かつ包括的にその作用を探る研究へ発展させることが求められている。

ニュートリゲノミクス

ニュートリゲノミクス、とりわけトランスクリプトーム解析によって、様々な機能性食品が生体に対して示す総合的効果の原因を迅速に解析することができる。この手法により、著者らはメープルシロップの肝臓機能保護作用(*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011)、フラクトオリゴ糖の抗肥満作用(*J. Agric. Food Chem.*, 2010)、ピフィズ菌の抗メタボリックシンドローム効果(*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010、*Beneficial Microbes*, 2013)、植物成分であるサラシアの免疫機能賦活作用(*Biofactors*, 2011)、桑葉の抗肥満作用(*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010)を明らかにした。さらにこのような食品の影響についての研究は、エピジェネティクスにまで及ぶ可能性があるものの、栄養素の不適正摂取で生じ得る問題を遺伝子レベルで解析した例は少ない。

鉄の不足および過剰のリスク

鉄欠乏は、世界で最も多くみられる栄養障がいである。世界保健機関 (WHO) の調査によると、世界人口の約 25%にあたる 16.2 億人が貧血である。日本においては、女性の約 10%が鉄欠乏性貧血、20~40%が貧血のない鉄欠乏、すなわち貧血予備群であるといわれており、深刻な問題である。鉄欠乏の原因には、摂取不足や月経、胃潰瘍などの出血による鉄の喪失などが挙げられ、これを補うためには鉄剤の服用、食事や栄養補助食品からの鉄の摂取が必要となる。一方、鉄の過剰摂取が臓器の酸化傷害を引き起こすリスクも指摘されている (図 1)。

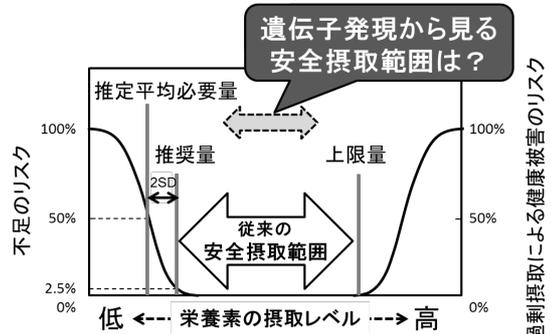


図1 栄養素の統計的安全摂取基準  
2SD: 標準偏差の2倍

2. 研究の目的

鉄欠乏時の肝臓のトランスクリプトーム解析

著者らは、鉄欠乏食摂取開始 17 日目という重度の貧血ラットの肝臓において、様々な栄養素代謝、細胞機能の変化が引き起こされていることを、トランスクリプトーム解析により見出した(*Physiol. Genomics*, 2010)。また貧血のない鉄欠乏ラット肝臓においても遺伝子発現レベルにおいて劇的な変化が起こること、またそれには貧血時の応答とも異なる点があることを明らかにした(*PLoS ONE*, 2013)。これらは、鉄欠乏の程度に違いによって生体応答が異なることをニュートリゲノミクスによって示した初例である (図 2)。

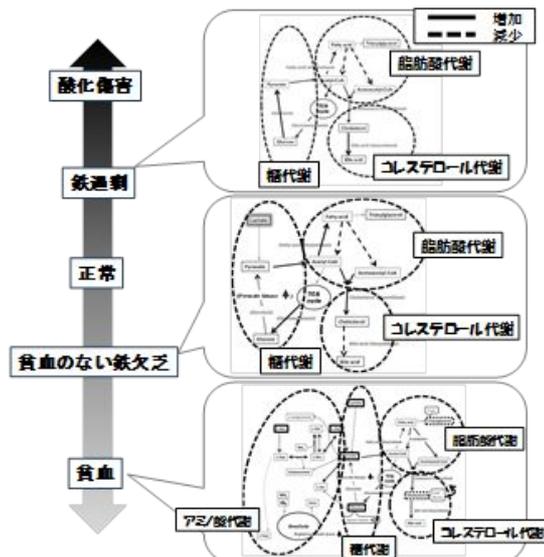


図2 鉄量の違いに応答して遺伝子発現変化する肝臓の栄養素代謝系

鉄過剰摂取が肝臓に及ぼす影響

鉄は臓器に過剰に蓄積することで、Fenton 反応を介して臓器に傷害を与える。貧血時に処方される鉄剤の過剰摂取や、日常的な高鉄含有食品の過剰摂取により、生体内が鉄過多になる可能性は無視できないにも関わらず、鉄過剰摂取に関する研究の多くが通常食の

数百倍という非日常的な鉄添加量で実施されており、日常的に摂取可能な量の過剰摂取の安全性評価の研究例はほとんどない。一方、我々は鉄量が通常食の約 10 倍の鉄過剰食をラットに与え、肝臓の遺伝子発現が変動することを見出した。すなわち日常的に起こる鉄過剰摂取においても、生体が応答し、健康リスクが生じる可能性を強く示した(図 2)。

鉄栄養状態により変化する遺伝子発現の制御機構の解明

鉄欠乏時の血中成分の変化に着目すると、貧血のない鉄欠乏の延長線上に貧血が存在する。そのため、肝臓の遺伝子発現パターンについても、貧血のない鉄欠乏で変動する遺伝子は貧血のデータの一部に内包されると予測していた。しかし、両者で一致する変動遺伝子は全体の一部に過ぎず、それぞれ独立した変化であることが明らかになった。そこで遺伝子発現の違いの鍵となる転写因子の探索を行ったが、説明しうる分子は見出されなかった。遺伝子の発現制御に関わる因子として、micro RNA (miRNA) が挙げられる。本研究では、鉄量変化への応答制御因子としてどのような miRNA が変化し、どのように遺伝子発現を制御しているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

<貧血への生体応答のメカニズム解明>

貧血は、血中のヘモグロビンやヘマトクリット値に有意な差が生じ、末梢への酸素運搬が低下した状態である。申請者は、ラットを対象にした実験から、鉄欠乏食摂取 17 日目には重度の貧血であり、肝臓の遺伝子発現パターンが大きく変動することを見出した。一方、miRNA のデータベースはラットに比べてマウスで充実していることを考慮し、本研究はマウスにて実施した。ラットで実施した方法をマウスに応用するが、これまでの予備実験により、ラットに比べてマウスにおいて鉄欠乏食摂取によるヘモグロビン低下効率が低いことがわかっているため、貧血に至るまでの鉄欠乏食摂取期間の検討も行った。

試験方法

- ・ 雄性 C57BL/6J マウス、3 週齢
  - ・ 飼料の鉄含量； 48 (標準) 3 ppm
- 貧血を呈した時点のマウスにて解析を実施した。
- ・ 解析対象； 肝臓のトランスクリプトーム  
血液のトランスクリプトーム  
生化学パラメータ(血液、肝臓)

<鉄過剰摂取の生体応答のメカニズム解明>

鉄は、臓器中に過剰に蓄積されることで臓器に傷害を与える。著者らは、鉄過剰食摂取ラットの肝臓では遺伝子発現パターンが変化することを見出した。

試験方法 マウスの鉄過剰摂取実験

- ・ 雄性 C57BL/6J マウス、3 週齢
- ・ 飼料の鉄含量； 48 (標準) 500 ppm
- ・ 解析対象； 肝臓のトランスクリプトーム  
生化学パラメータ(血液、肝臓)

### 4. 研究成果

マウスを予備飼育後、通常食群および鉄欠乏食群に分けて飼育を行った。その結果、鉄欠乏食群においてヘモグロビン濃度が有意に低下し、貧血を呈していることが示唆された。そこで、その時点での解剖を行い、他の血液成分や肝臓中の鉄量の測定を行った。その結果、鉄欠乏食マウスにおいて貯蔵鉄量が顕著に減少しており(図 3) 鉄欠乏性貧血を呈していることが示された。この鉄欠乏性貧血マウスの肝臓の網羅的な遺伝子発現解析を行い、鉄を補欠分子族とする因子の変動や、糖、脂質、アミノ酸などの代謝の変動を見出した。これらは、ラットの研究結果と一部一致しているものの、異なる点も多く見られた。これは、生物種による鉄不足への応答の違いを反映しているものと考えられた。

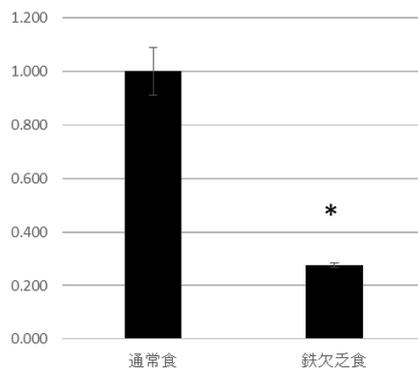


図 3 鉄欠乏食摂取時のマウス肝臓中鉄量  
通常食を1とする。

\* ;  $p < 0.05$ , Student's *t*-test

ラットを用いた以前の研究では、肝臓を対象とした網羅的な遺伝子発現解析から鉄不足の影響を明らかにしたが、それに加えて血液の網羅的な遺伝子発現解析も行った。これは、体内の鉄量の変化に応答する新規マーカーとして血液の mRNA を応用し、将来的にはヒトにおいても応用・展開することを想定している。既存の鉄欠乏マーカーには、血液中のヘモグロビン、フェリチン、TIBC (トランスフェリン総鉄結合能) 等が挙げられるが、それらに比してより早期に変動する mRNA を活用することで、体内鉄量の変化を早期に発見するという狙いがある。肝臓を対象とした研究では、生物種による鉄欠乏への応答の違いが見られた。このことから、鉄指標の新規マーカーとしての血液の遺伝子発現についても、ラットだけでなくマウスにおける検討を行うことで生物種を超えた共通性を見出

すことができ、ヒト試験に向けてマーカー候補の精度を上げることができると考えた。そこで、鉄欠乏性貧血マウスの血液を対象とした網羅的な遺伝子発現解析を行い、通常食群と鉄欠乏食群とで有意な発現変動の観察された遺伝子を抽出した。その上でラットの実験にて見出したマーカー候補と比較を行い、両者で共通の変動を示す遺伝子に絞り込み、より精度の高いマーカー候補と定義した。鉄欠乏に対する生物種による応答の違いが見出されたこと、動物試験の結果をヒト試験に応用・展開することを急ぎ目指すこと、を背景に、当初の予定である貧血のない鉄欠乏マウスの肝臓トランスクリプトーム解析から変更し、優先的に鉄欠乏性貧血マウスの血液トランスクリプトーム解析を実施した。これにより、鉄欠乏が生体に及ぼす影響について、ヒト試験での検証を行うための基盤を構築するに至った。

続いて鉄過剰のリスクについての検証を行った。鉄は臓器に過剰に蓄積することで、Fenton 反応を介して臓器に傷害を与える。貧血時に処方される鉄剤の過剰摂取や、日常的な高铁含有食品の過剰摂取により、生体内が鉄過多になる可能性は無視できないにも関わらず、鉄過剰摂取に関する研究の多くが通常食の数百倍という非日常的な鉄添加量で実施されており、日常的に摂取可能な量の過剰摂取の安全性評価の研究例はほとんどない。これまでに鉄過剰食をラットに与え、肝臓の遺伝子発現が変動することを見出し、日常的に起こる鉄過剰摂取においても、生体が応答し、健康リスクが生じる可能性を強く示した。一方、トランスクリプトームレベルにおける鉄不足への応答についてラットとマウスで異なる点が見出されており、鉄過剰摂取への応答も生物種により異なる可能性が考えられたため、マウスを対象とした鉄過剰食摂取実験を実施した。マウス肝臓中鉄量は、ラット同様に鉄過剰食群で有意に高く、食餌からの鉄過剰摂取においても肝臓における鉄蓄積量増加を引き起こすことが確認された(図4)。

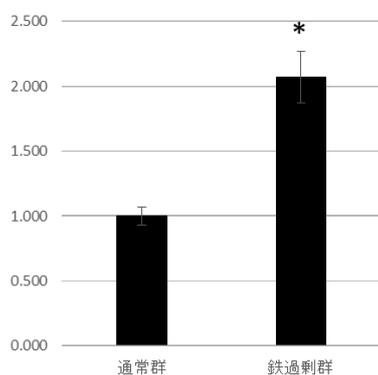


図4 鉄過剰摂取時のマウス肝臓中鉄量  
通常食を1とする。  
\*:  $p < 0.05$ , Student's *t*-test

肝臓のトランスクリプトーム解析において顕著に変動する遺伝子に着目したところ、その機能は栄養素代謝、免疫応答等、多岐に亘ることが明らかになったが、個々の変動遺伝子についてはラットと相違点があった。これまでに実施した鉄不足の結果と総合的に解釈すると、食餌性鉄不足あるいは過剰における表現型は同様であっても、体内鉄量の違いへの応答には生物種による差がある可能性があると考えられた。また、本研究においては microRNA の変化にも着目したが、これまでに鉄量の違い(不足や過剰)に応答することの報告のない microRNA の前駆体の変動が示唆される等、新規の知見も得られた。

#### 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 5 件)

1. Kamei, A., Watanabe, Y., Shinozaki, F., Yasuoka, A., Shimada, K., Kondo, K., Ishijima, T., Toyoda, T., Arai, S., Kondo, T., Abe, K. Quantitative deviating effects of maple syrup extract supplementation on the hepatic gene expression of mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res.* 61. (2017) 査読あり
2. 亀井飛鳥、阿部啓子、食品の機能性評価研究とその展望、細胞、2017年11月号、(2017) 査読なし
3. 亀井飛鳥、食品機能性の新規マーカーの探索、ILSI Japan 機関誌「イルシー」、132号、(2017) 査読なし
4. 亀井飛鳥、食品とその機能性、アグリバイオ、2017年8月臨時増刊号、特集「アグリ・フードの未来像」、(2017) 査読なし
5. 亀井飛鳥、阿部啓子、新規食品の機能性評価 桑葉を例にして、生物工学会誌、特集 95巻6号、(2017) 査読なし

〔学会発表〕(計 19 件)

1. Asuka Kamei, Yuki Watanabe, Fumika Shinozaki, Soichi Arai, Keiko Abe., Effects of dietary iron status on the gene expression profile in rat liver., 12th Asian Congress of Nutrition (2015)
2. 安岡顕人、嶋田耕育、亀井飛鳥、篠崎文夏、近藤香、近藤隆、三坂巧、岡田晋治、阿部啓子、機能性食品とエビジェネティ

- クス、日本分子生物学会 2015 年大会
3. 篠崎文夏、阿部岳、亀井飛鳥、渡部由貴、安岡顕人、嶋田耕育、近藤香、荒井綜一、熊谷弘太、近藤隆、阿部啓子、疑似スズメバチ幼虫由来アミノ酸混合溶液投与による肝臓および脂肪組織におけるトランスクリプトームの協調調節、日本農芸化学会 2016 年度大会
  4. 亀井飛鳥、渡部由貴、篠崎文夏、安岡顕人、近藤香、嶋田耕育、阿部啓子、近藤隆、高脂肪食摂取に対する応答性のマウス系統差 網羅的遺伝子発現解析より、第 70 回日本栄養・食糧学会大会 (2016)
  5. 亀井飛鳥、食品機能性の新規マーカーの探索、ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」III 期研究成果シンポジウム、2016 年 (招待講演)
  6. 篠崎文夏、山下治之、亀井飛鳥、渡部由貴、安岡顕人、嶋田耕育、近藤香、荒井綜一、近藤隆、阿部啓子、自然薯ムカゴ抽出物の生理的機能性について、日本農芸化学会 2017 年度大会
  7. 亀井飛鳥、「未病マーカー探索の試み—桑葉の機能性評価を例に」、独立行政法人 日本学術振興会 「食による生体恒常性維持の指標となる未病マーカーの探索戦略」に関する先導的研究開発委員会 第 1 回委員会、2017 年(招待講演)
  8. 亀井飛鳥、「食品機能性評価のための新規マーカーの探索」、NPO 法人近畿バイオインダストリー振興会議 第 4 回 生活習慣病予防のための機能性食品開発に関する研究会、2017 年 (招待講演)
  9. Yasuoka A., Kamei A., Shinozaki A., Kondo K., Shimada K., Kondo T., Abe K., Transgenerational effect of ethanol induced metabolic stress and its alleviation by dietary polyphenol Latsis Symposium 2017
  10. 亀井飛鳥、食品の機能性評価 ヒト試験への展開、平成 29 年度 神奈川県ものづくり技術交流会
  11. Kiyomi Ohmori, Asuka Kamei, Yuki Watanabe, Keiko Abe, Non-genotoxic carcinogen-induced changes in gene expression over time on Bhas 42 cell transformation assay, World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: WC10 (2017)
  12. 大森清美、亀井飛鳥、渡部由貴、阿部啓子、Bhas42 細胞形質転換試験法における非遺伝毒性発がん物質による網羅的遺伝子発現変動解析、日本動物実験代替法学会 (2017)
  13. 亀井飛鳥、篠崎文夏、安岡顕人、嶋田耕育、荒井綜一、阿部啓子、体内鉄量の変化に应答する血液遺伝子の発現変化の解析、日本農芸化学会 2018 年度大会
  14. 本田瑞希、亀井飛鳥、相田美緒、薩 秀夫、抗炎症作用を有するクワ葉成分の探索および解析 日本農芸化学会 2018 年度大会
  15. 篠崎文夏、亀井飛鳥、嶋田耕育、安岡顕人、荒井綜一、阿部啓子、高脂肪負荷マウスへの自然薯ムカゴ投与が回腸遺伝子発現に及ぼす効果、日本農芸化学会 2018 年度大会
  16. 野原正勝、安岡顕人、嶋田耕育、亀井飛鳥、篠崎文夏、豊田集、飯尾将太、阿部啓子、血球トランスクリプトーム解析の高精度化にむけた血液処理方法の検討、日本農芸化学会 2018 年度大会
  17. 嶋田耕育、安岡顕人、亀井飛鳥、篠崎文夏、野原正勝、豊田集、飯尾将太、阿部啓子、孤立飼育がマウスの脳及びその他臓器のトランスクリプトームに与える影響、日本農芸化学会 2018 年度大会
  18. 安岡顕人、亀井飛鳥、篠崎文夏、嶋田耕育、野原正勝、飯尾将太、近藤香、岡田晋治、近藤隆、阿部啓子、エタノール誘導代謝ストレスの次世代への影響と食品ポリフェノールによるその緩和、日本農芸化学会 2018 年度大会
  19. 豊田集、石島智子、亀井飛鳥、阿部啓子、岡田晋治、メープルシロップ抽出物が 2 型糖尿病モデルマウスのコレステロール代謝に与える影響、日本農芸化学会 2018 年度大会
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 0 件)
- 名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6．研究組織

(1)研究代表者

亀井 飛鳥（ KAMEI, Asuka ）

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・食品機能性評価グループ・研究員

研究者番号：40514112

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

無し