

令和元年6月24日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16609

研究課題名(和文) 慢性的な鉄欠乏状態がビタミン類代謝産物の体内動態と加齢性疾患に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of iron deficiency on the vitamin metabolites and age-related diseases

研究代表者

井上 博文 (INOUE, Hirofumi)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：10639305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：鉄欠乏状態における酸化ストレス惹起が、どのような生体防御分子群の変動を介して誘導されているのかを明らかにする検討を行った。FAO細胞に鉄キレート剤deferoxamine(DFO)処理をし、DNAマイクロアレイを行った結果、ビタミンD代謝関連酵素、ビタミンC律速酵素やビタミンB12を補酵素とするメチオニン代謝に関わる遺伝子群が有意に減少していることを明らかにした。また、鉄欠乏状態におけるビタミンC律速酵素SMP30/regucalcinの減少は細胞老化を促進することを明らかにした。以上より、鉄欠乏はSMP30の発現低下を介して加齢性疾患を引き起こす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

本研究成果は、各年代における食生活の変化に伴うミネラル摂取過不足に関する研究、特に潜在的に欠乏状態とされている鉄に着目し、この鉄欠乏状態が及ぼす様々な疾患とビタミン代謝がリンクしていることを明らかにした。すなわち、本研究結果は、単一栄養素の欠乏に捉われないミネラルとビタミンをつなぐ新たな研究分野を開拓できたことが食生活の改善につながることから学術的・社会的に重要な点であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Iron is an essential trace element under normal physiological conditions. Although it is possible that iron depletion participates in inducing oxidative stress, few studies have examined the molecular mechanisms underlying the relationship between oxidative stress and aging-disorder under iron-deficient conditions. In this study, to determine the relationship between iron-deficient conditions and intracellular homeostasis, change in expression of genes in rat liver cell lines treated with an iron-specific chelator treatment as an iron depletion model was analyzed using a DNA microarray. Interestingly, we revealed that iron deficient decreased the various gene expressions including vitamin D and C-associated genes, and methionine-metabolism genes compared to non-treatment cells. We suggest that iron deficiency increase bone metabolisms via altering the vitamin metabolites.

研究分野：食品栄養学

キーワード：鉄欠乏 ビタミンC ビタミンD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

鉄は必須微量元素であり、生体内レドックス反応において重要な役割を担っている。これまでに我々の研究グループでは、鉄欠乏状態は貧血や心肥大のみならず、骨粗鬆症を誘発することを明らかにしている。また先行研究(共同研究)により、鉄欠乏に伴う骨形成の低下は活性型ビタミン D の減少に由来することを報告している。そこで本研究では、鉄欠乏状態がビタミン類の代謝を変動させることで骨粗鬆症をはじめとする加齢性疾患を誘発するのではないかと仮説をたて解析を行った。

#### 2. 研究の目的

本研究では、若年層が今後超高齢化に拍車をかける我が国において、幼若期および青年期における過度なダイエットや偏食による「鉄摂取不足が脂溶性ビタミンの体内動態を変化させることで加齢性疾患の発症状態を増悪する可能性」という次世代につながる未だ不透明なポイントを明らかにすることを目的とした。

#### 3. 研究の方法

本研究では、鉄キレート剤を用いた培養細胞実験に加え、鉄欠乏食を投与する動物実験を行った。また、動物実験を行うにあたり、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、東京農業大学動物実験委員会の承認を受けて動物実験を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 鉄欠乏状態におけるビタミン C 関連酵素 SMP30 への影響

ラット肝臓がん細胞由来の FAO 細胞に DFO で 24 時間処理後、DNA マイクロアレイに供した結果、無処理に対して DFO 処理で減少した遺伝子数は fold change 1.5 倍で 1,403 個であった。変動した多くの遺伝子は Nrf2/keap1 シグナルが制御する遺伝子群や、ヘム含有酵素であったが、その中でも、抗加齢タンパク質 senescence marker protein 30(SMP30)の遺伝子発現が減少していた。SMP30/regucalcin(以下、SMP30)はビタミン C 律速酵素であり、SMP30 ノックアウトマウスでは、骨密度の低下、コラーゲン形成不全に加え、壊血病様の症状を呈することが報告されている。そこで SMP30 について詳細な解析を行った。FAO 細胞を DFO 濃度依存的(0~100 $\mu$ M)に 24 時間処理後、定量的 PCR 法による遺伝子発現を解析した。DNA マイクロアレイの結果と同様に SMP30 遺伝子発現は無処理に対し、DFO 処理濃度依存的に減少した。また、SMP30 タンパク質発現も DFO 濃度依存的に減少した。続いて、老化マーカーである  $\beta$ -galactosidase(Gal)活性および老化要因の一つである ROS 産生量を測定した。その結果、Gal 活性、ROS 産生量ともに DFO 濃度依存的な上昇を示した。そこで DFO 処理により上昇した Gal 活性・ROS 産生量が SMP30 過剰発現により抑制するの否かについて検討を行った結果、無処理に対し Gal 活性、ROS 産生量は有意に低値を示した。また、鉄欠乏食投与を行ったラット肝臓も同様に SMP30 の遺伝子発現量を解析したところ、培養細胞と同様に鉄欠乏食投与により遺伝子発現量が減少していることを明らかにした。

##### (2) 鉄欠乏状態におけるビタミン B12-メチオニン代謝への影響

DNA マイクロアレイの結果から、DFO 処理細胞ではビタミン B12 を補酵素とするメチオニン代謝関連遺伝子群の発現も低下することを見出している。しかしながら、これまでに鉄欠乏状態とメチオニン代謝の関係については報告がない。そこで本研究では、ラット肝臓由来細胞である FAO 細胞を用いて、鉄欠乏状態とメチオニン代謝との関連を明らかにすることを目的とした。まず、FAO 細胞に 2 種類の鉄キレート剤 DFO および deferasirox (DFX)を濃度依存的(0~100 $\mu$ M)に 24 時間処理後、メチオニン代謝関連遺伝子群(*Mat1*, *Mat2*, *Bhmt1*, *Cbs*, *Cse*)について定量的 PCR 法を用いた解析を行った。その結果、DNA マイクロアレイ解析と同様に、鉄欠乏条件下で、いずれのメチオニン代謝関連遺伝子群も濃度依存的に減少した。一般的に、メチオニン代謝は DNA やタンパク質のメチル化制御に関与することから、続いて、鉄欠乏状態がメチル化転移酵素である PRMT1 発現および総メチル化タンパク質に対する影響について western blot による解析を行った。その結果、PRMT1 および総メチル化タンパク質の発現は、無処理群に比し DFO および DFX 処理により減少した。次に、これらの減少が鉄欠乏によるものか否かを明らかにするために、DFO または DFX 単独処理に対して holo-transferrin(10-50 $\mu$ M, 6 時間処理)を添加する鉄レスキュー実験を行った。その結果、holo-transferrin 添加は DFO および DFX 処理による PRMT1 および総メチル化タンパク質の減少を抑制した。

以上より、鉄欠乏状態はビタミン類の代謝変動を介して加齢性疾患を引き起こす可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Dietary magnesium deficiency impairs hippocampus-dependent memories without changes in the spine density and morphology of hippocampal neurons in mice. Serita T, Miyahara M, Tanimizu T, Takahashi S, Oishi S, Nagayoshi T, Tsuji R, Inoue H, Uehara M, Kida S. Brain Res Bull. 2019, 144:149-157. 査読あり

Down-regulation of senescence marker protein 30 by iron-specific chelator deferoxamine drives cell senescence. Inoue H, Hanawa N, Katsumata-Tsuboi R, Katsumata SI, Takahashi N, Uehara M. Biosci Biotechnol Biochem. 2018, 82(5):900-903. 査読あり

Iron deficiency induces autophagy and activates Nrf2 signal through modulating p62/SQSTM1. Inoue H, Hanawa N, Katsumata SI, Katsumata-Tsuboi R, Takahashi N, Uehara M. Biomed Res. 2017, 38(6):343-350. 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

(国内発表)

井上 博文、勝間田(坪井) 理恵、高橋 信之、上原 万里子「鉄欠乏状態における細胞老化と抗加齢タンパク質 SMP30 の役割」、第 57 回日本食生活学会 (2018 年 10 月 27 日、福岡県)

井上 博文、埜 信彰、勝間田 真一、勝間田(坪井) 理恵、高橋 信之、上原万里子 「DNA マイクロアレイ法を用いた鉄欠乏状態と酸化ストレスを結ぶ新規分子の探索」、第 10 回食香粧研究会 (2017 年 11 月 10 日、東京都)

井上 博文、勝間田 真一、勝間田(坪井) 理恵、高橋 信之、上原万里子、「鉄欠乏状態における活性酸素種と抗加齢タンパク質 SMP30 の生理的役割」、第 39 回日本臨床栄養学会総会・第 38 回日本臨床栄養協会総会 第 15 回大連合大会 (2017 年 10 月 13 日～2017 年 10 月 15 日、千葉県)

井上 博文、埜 信彰、勝間田 真一、勝間田(坪井) 理恵、高橋 信之、上原 万里子、「鉄欠乏状態は ERK1/2 を介して抗加齢タンパク質 SMP30 の発現を抑制する」、第 71 回日本栄養・食糧学会大会 (2017 年 5 月 19 日～2017 年 5 月 21 日、沖縄県)

井上 博文、高橋 信之、上原 万里子、「僕がこの研究をはじめた理由：必須微量元素とフードファクターを結ぶ」、フードサイエンスフォーラム第 22 回学術集会 (2016 年 09 月 08 日～2016 年 09 月 09 日、岡山県)

井上 博文、勝間田(坪井) 理恵、高橋 信之、上原 万里子、「鉄欠乏状態は活性酸素シグナルを介して細胞老化を促進する」、第 27 回日本微量元素学会学術集会 (2016 年 07 月 30 日～2016 年 07 月 31 日、京都府)

井上 博文、小林 謙一、鈴木 司、山本 祐司、勝間田 真一、勝間田(坪井) 理恵、高橋 信之、上原 万里子、「鉄欠乏状態は酸化ストレスを惹起することで細胞老化を誘導する」、第 70 回日本栄養食糧学会大会 (2016 年 05 月 13 日～2016 年 05 月 15 日、兵庫県)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。