

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K02302

研究課題名(和文) 鉄欠乏状態によるビタミンB12代謝を介した骨特異的エピジェネティクス変動の解明

研究課題名(英文) Bone-Specific Epigenetic Changes via Vitamin B 12 Metabolism under Iron Deficiency Conditions

研究代表者

井上 博文 (Inoue, Hirofumi)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：10639305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鉄欠乏状態における骨脆弱化のメカニズムとしてビタミンB12をはじめとしたビタミン類が補酵素とするメチオニン代謝異常が組織ならびに骨中メチル化レベルに影響を及ぼすのかについて検討を行った。その結果、通常食投与したマウスに比し、鉄欠乏食投与したマウスの肝臓において、メチル基転移酵素PRMT1ならびにPRMT3の発現低下および総メチル化タンパク質量が低下することを明らかにした。一方、骨中メチル化については2群間に有意な差を認めなかった。以上より、鉄欠乏状態における骨粗鬆症誘発メカニズムとして、骨中メチル化ではなく、各組織中ビタミン類の代謝変動が主である可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、鉄摂取不足に伴う骨脆弱化のみではなく、鉄欠乏状態とエピジェネティクスな変化の根底にビタミン類の代謝変動があったことを明らかにすることができた。すなわち、本研究結果は鉄欠乏性貧血という単一症状または組織のみに捉われない生体全体でミネラルとビタミンがクロストークしていることを見出したものである。本成果は食生活の改善において栄養素の重要性を改めて還元できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether abnormal methionine metabolism via changing of vitamin B12, affects methylation levels in tissues and bones on iron deficient conditions.

As a result, we found that the total methylated protein and methyltransferases (PRMT1 and PRMT3) decreased in the livers of mice fed an iron-deficient diet compared with mice fed a normal diet. In contrast, methylation status in bone showed no significant difference between the two groups. We suggest that bone fragility in the iron deficiency was not caused by the methylation status but mainly by the changing metabolized vitamin D3.

研究分野：健康科学分野

キーワード：鉄欠乏 ビタミンD3 メチル化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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。また先行研究により、鉄欠乏に伴う骨形成の低下は CYP27B1 活性低下を介した活性型ビタミン D<sub>3</sub> の産生抑制であることを報告している。さらに昨年度までに、鉄欠乏状態の肝臓において、ビタミン C 律速酵素である SMP30 発現が低下すること、メチル化関連分子群の発現も著しく低下することを見出している。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に加え、エピジェネティクスな影響を介すること、骨粗鬆症の誘発を促進してい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

これまでに申請者らは、幼若期(被験動物)における鉄欠乏状態および鉄キレート剤を用いた鉄枯渇条件が骨脆弱化を招く、諸臓器においてタンパク質の酸化を亢進させる、ビタミン D 水酸化酵素の活性を低下させる、ビタミン B12 およびビタミン C 代謝関連酵素群の発現を抑制するといった結果を得ている。そこで本申請課題では、鉄欠乏状態との関係が未解明なビタミン B12 代謝に着目し、鉄欠乏状態におけるビタミン B12 代謝産物の変化が与えるタンパク質のメチル化と骨脆弱化の関係性を肝臓 骨組織間ネットワークの観点から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肝臓および骨特異的ビタミン B12-メチオニン代謝への影響

これまでに DNA マイクロアレイの結果と合わせ、肝臓由来 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、動物を用いた試験での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、3 週齢 ICR 雄マウスを用い、4 週間の飼育観察後、肝臓ならびに骨中のメチル化状態について明らかにすることを目的とした。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。

その結果、培養細胞での結果と同様に、通常食摂取群に比し、鉄欠乏食を投与したマウス肝臓において、メチル化転移酵素である PRMT1 ならびに PRMT3 遺伝子ならびにタンパク質発現は有意に低値を示した。一方、骨中のメチル化状態はバイサルシークエンス法による骨中の DNA メチル化領域の特定を行ったが、実験条件が安定しないのか再現性よく検出することが出来なかった。そこで骨吸収(破骨細胞の分化)に関わるリガンドとして機能する RANKL のメチル化状態についてリアルタイム PCR 法を用いて解析を行った。その結果、通常群と鉄欠乏食投与群における骨特異的 RANKL のメチル化に差異を認めなかった。これまでに、骨特異的に PRMT1 をノックダウンすることで RANKL のメチル化が解除され、骨粗鬆症発症を抑制することが報告されていたが、本実験のように鉄欠乏状態では RANKL のメチル化に影響を及ぼさず、腎臓中の CYP27B1 活性低下に伴う活性型ビタミン D<sub>3</sub> の産生抑制を介して骨粗鬆症が誘発されることを明らかにした。以上より、鉄欠乏状態における骨粗鬆症誘発メカニズムとして、肝臓 骨組織間ネットワークが主ではなく、各組織におけるビタミン類の代謝変動を介して引き起こす可能性が示唆された。

#### (2) 鉄欠乏状態における肝臓中ミネラル変動とトランスポーター発現制御

これまでにマウスを用いた鉄欠乏食投与試験において肝臓中で亜鉛が蓄積することで見出している。そこで本研究では、鉄欠乏時になぜ肝臓中に亜鉛が蓄積するのかについて明らかにすることを目的とした。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。

その結果、通常食投与に比し、鉄欠乏食投与群の肝臓ならびに血液中亜鉛濃度が有意に増加することを明らかにした。また、亜鉛吸収に関与する亜鉛(Zip)トランスポーター 14 種類について解析した結果、Zip1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 において有意な増加を示した。そこで、この亜鉛トランスポーターの発現増加が鉄依存的か明らかにするために、鉄欠乏食を投与後、1 週間のリカバリー食(通常食)を投与し、上昇した Zip 遺伝子発現が変動するのかについて検討をおこなった。その結果、鉄欠乏食投与で増加した Zip4 のみが鉄リカバリー食投与で発現が抑制され

た。しかしながら個体差が激しく、今後、再現をとることが必須であると考え。以上より、鉄欠乏状態はトランスポーターの発現を制御することで、体内の亜鉛レベルを制御し、鉄欠乏による生体内ホメオスタシス破綻を維持する機構を有している可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 H. Inoue, N. Hanawa, S.I. Katsumata, Y. Aizawa, R.Katsumata-Tsuboi, M. Tanaka, N. Takahashi, M. Uehara	4. 巻 10
2. 論文標題 Iron deficiency negatively regulates protein methylation via the downregulation of protein arginine methyltransferase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e05059.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 R. Tsuji, H. Inoue, M. Uehara, S. Kida	4. 巻 -
2. 論文標題 Dietary magnesium deficiency induces the expression of neuroinflammation-related genes in mouse brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上 博文、埴 信彰、勝間田 真一、勝間田(坪井) 理恵、高橋 信之、上原 万里子
2. 発表標題 鉄欠乏状態はPRMT1発現の減少を介してタンパク質メチル化修飾を減弱させる
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 博文、勝間田(坪井) 理恵、田中 未央里、高橋 信之、上原 万里子
2. 発表標題 鉄欠乏状態がタンパク質のメチル化修飾に及ぼす影響
3. 学会等名 第58回日本食生活学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 博文、勝間田(坪井) 理恵、田中 未央里、高橋 信之、上原 万里子
2. 発表標題 鉄欠乏状態はタンパク質メチル化修飾を負に制御する
3. 学会等名 第30回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirofumi Inoue, Shin-Ichi Katsumata, Rie Katsumata-Tsuboi, Miori Tanaka, Nobuyuki Takahashi, Mariko Uehara
2. 発表標題 Effects of iron deficiency on reactive oxygen species and intracellular homeostasis
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上博文、勝間田真一、斎藤 彰宏、勝間田(坪井)理恵、田中未央里、高橋信之、上原万里子
2. 発表標題 鉄欠乏状態による骨脆弱化とビタミン類の体内変動
3. 学会等名 レドックス・ライフイノベーション第170委員会 20周年記念若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上博文
2. 発表標題 鉄欠乏状態における活性酸素シグナルとビタミン類代謝の変動
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------