

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：22604
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23650485
 研究課題名（和文） 鉄欠乏で惹起される小腸粘膜のフェリチン非依存的抗酸化メカニズムの
 解明
 研究課題名（英文） The ferritin independent antioxidant mechanism in intestinal mucosa
 of iron deficient rats.
 研究代表者
 篠田 粧子（SHINODA SHOKO）
 首都大学東京 人間健康科学研究科・教授
 研究者番号：40132055

研究成果の概要（和文）：

貧血ラット小腸では、グルタチオン濃度が鉄充足群に比べて高く維持され、脂質の過酸化を抑制するフェリチン非依存的な抗酸化メカニズムが働くことを見いだした。結紮した腸管に鉄を投与すると、細胞内の遊離鉄は貧血群で高くなった。鉄充足群、貧血群ともに、鉄の投与によって還元型 GSH の割合は減少したが、その減少率は通常群に比べて貧血群で有意に大きかった。GSH の合成阻害剤を投与し、小腸粘膜細胞の総 GSH を低下させたラットに鉄を投与すると、鉄充足群、貧血群ともに脂質の酸化が促進した。

研究成果の概要（英文）：

In the small intestine of iron deficient rats, glutathione (GSH) concentrations were maintained highly as compared with iron sufficient rats. We found that the ferritin independent-antioxidant mechanism might inhibit adipose hyperoxidation in iron deficient rats. When iron was given to the ligated intestinal tract, labile iron pool in mucosal cells was rose in iron deficient group. GSH concentration was decreased by iron administration in both iron sufficient and deficient rats, but the rate of decline was bigger in iron deficient group. When total GSH concentration of intestinal mucosa was reduced by synthetic inhibitor of the GSH, adipose oxidation by iron was accelerated both in the iron deficient and sufficient groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と栄養

1. 研究開始当初の背景

日本女性における鉄欠乏性貧血の頻度は 5 人に 1 人であり、小麦粉などへ鉄添加を実施している諸先進国に比べて極めて高い。その予防・改善は重要な栄養課題であり、栄養機能食品やサプリメントは手軽な鉄の補給源といえる。

一方で、過剰鉄による弊害も報告されている。貧血治療で生体内の不安定鉄が増加し活性酸素が産生される例が認められ (Kohgo et al., *Int.J.Hematol.*88,2008)、生体内鉄蓄積量とガンのリスクを対象とした無作為抽出研究では、定期的に瀉血をして貯蔵鉄を減少させた末梢動脈疾患患者でガン罹患率が低下すると報告 (Zacharski et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 2008) されている。

このような背景から、欧米では食品への鉄添加を見直す動きがある。日本においてもサプリメント等の消費が増大しているため、筆者は食品レベルの鉄過剰で誘発される小腸の酸化ストレスに関する研究の必要性を強く感じているが、貧血状態の小腸粘膜の鉄誘発酸化ストレスへの応答に関する詳細な報告は見あたらない。

2. 研究の目的

過剰な鉄に対する消化管の応答としては、粘膜の鉄輸送体 mRNA 発現の抑制と鉄輸送タンパク質翻訳の阻害を介して数日にわたって消化管からの鉄吸収低下をまねく“粘膜ブロック”という現象が知られる。この現象は鉄欠乏性貧血で鉄輸送体発現が亢進している時に顕著であり、鉄欠乏に適応してフェリチン発現量が極めて低い貧血細胞内部を酸化ストレスから守ろうとする応答反応であると考えることが出来る。一方、“粘膜ブロック”機能の発現には最低でも 6 時間程度の時間を有するため、“粘膜ブロック”機能発現まで貧血粘膜細胞は鉄の酸化ストレスに

曝されることになる。

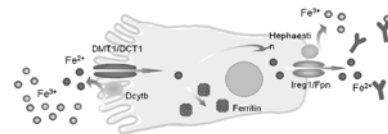
そこで、貧血状態の小腸に鉄を投与すると通常群に比べて酸化ストレスが増悪するのではないかと考え、粘膜細胞の酸化ストレス関連因子を測定したところ、貧血群では細胞内抗酸化物質であるグルタチオンが高いことを見いだした。

鉄は Fenton 反応を介してヒドロキシラジカルを発生するが、通常は細胞内のフェリチンと結合することで反応が抑制されている。しかし、鉄欠乏状態では鉄吸収が亢進し、同時にフェリチン発現量が低下するため、小腸粘膜細胞内で遊離鉄が増加し、酸化ストレスが発生する可能性がある。また、鉄投与から数時間ではフェリチン発現量は変化しないため、貧血ラットの腸には通常群とは異なるグルタチオンを中心とした抗酸化メカニズムが働くと推察した。

本研究では、貧血時の小腸で過剰な鉄に応答する抗酸化メカニズムを明らかにするために、鉄投与時の小腸粘膜細胞における還元型 (GSH) および酸化型 (GSSG) グルタチオンの変動と細胞内の脂質の酸化について研究を進めた。

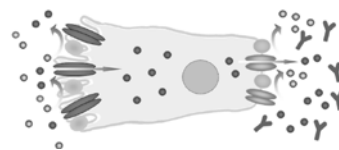
通常時の小腸粘膜細胞

鉄輸送体発現は低く、鉄吸収は低く抑えられている。細胞内に存在するフェリチンが取り込まれた鉄を補足し、不安定鉄の発生を抑制している。



鉄欠乏貧血時の小腸粘膜細胞

鉄輸送体発現が亢進し、鉄吸収は高く保たれる。細胞内鉄濃度は上昇するが、細胞内フェリチン発現は極めて低いため、取り込まれた鉄の挙動は不明である。



3. 研究の方法

Fenton 反応で生成されたヒドロキシラジカルを消去する代表的な抗酸化物質であるグルタチオンは細胞内濃度が高く、酸化還元状態を維持するために最も重要な細胞性抗酸化物質とされている。

フェリチン発現が極めて低い貧血状態の小腸では通常群とは異なりグルタチオンを中心とした抗酸化メカニズムが働くと考え、以下の実験を行った。

- (1) ラットの鉄欠乏状態と小腸粘膜細胞のGSH/GSSG発現量と比率
- (2) 貧血および通常ラットへ鉄を投与した際のGSH/GSSGの変動と脂質の酸化(TBARS)
- (3) 貧血ラットへGSH枯渇剤を投与し、TBARS等の測定によって小腸粘膜細胞内酸化ストレスがグルタチオンの枯渇によって通常群以上に増悪するか否かの検討

動物実験

- (1) 4週齢のWistar系雄ラットをAIN-93G飼料または鉄無添加飼料で3週間飼育した。増体重、飼料摂取量を調べて、飼料効率を求め、鉄の栄養状態は、血清鉄、総鉄結合能、不飽和鉄結合能、ヘマトクリット等で評価した。ラットは解剖前に絶食させ、麻酔下で小腸を結紮して、硫酸鉄溶液を投与した。一定時間後に結紮した小腸を摘出し、上皮粘膜を採取した。細胞内の遊離鉄 (labile iron pool:LIP)、脂質の過酸化の指標としてマロンジアルデヒド (MDA) を測定した。小腸粘膜の総グルタチオン (tGSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) を定量し、tGSH と GSSG の差から還元型 GSH を求めた。
- (2) 4週齢のWistar系雄ラットを3週間飼育し、通常および貧血ラットを作成した。これらのラットにグルタチオン合成阻害剤を単回投与し、小腸粘膜細胞内のGSH濃度を低下させた。実験(1)と同様にラットの小腸を結紮し、鉄投与実験を行った。小腸における

GSH濃度の低下が脂質の過酸化に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

小腸粘膜細胞内のGSH量は、貧血群で通常群に比べて有意に高くなることを確認した。通常群、貧血群共に、絶食後のtGSHに占める還元型GSHの割合(GSH/tGSH)は99%以上であった。結紮腸管に鉄を投与すると、LIPは通常群に比べて貧血群で有意に増加した。また、還元型GSHの割合は通常・貧血両群で減少したが、その減少率は貧血群で有意に大きかった。

一方、食品レベルの過剰鉄投与による脂質の過酸化は、通常群に比べて貧血群で有意に抑制された。GSH合成阻害剤によってGSH濃度を低下させると、FeS群、FeD群共にMDA生成量が増加したが、FeD群の方がFeS群よりも低く保たれていた。したがって、FeD群ではグルタチオン濃度の上昇に加え、他の抗酸化物質も関与するフェリチン非依存的な抗酸化システムが働いていることが示唆された。

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)

[学会発表] (計3件)

- ① Shinoda S and Chen F, Effect of Shimotsuto (Si-Wu-Tang; Chinese herbal medicine traditionally used in Japan) with/without iron administration on iron deficient rats. 20th International Congress of Nutrition, 2013. 9. 16-20, Granada, Spain
- ② 篠田粧子、鉄の腸管吸収調節—鉄摂取の最適濃度を探る—、日本栄養食糧学会—関東支部大会シンポジウム、2013. 2. 16、東京大学
- ③ 山本真智子、篠田卓弥、団未那美、篠田粧子、貧血ラット十二指腸におけるフェリチン非依存的抗酸化メカニズム、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012. 3. 25、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 粧子 (SHINODA SHOKO)

首都大学東京 人間健康科学研究科・教授

研究者番号：40132055