

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780139

研究課題名(和文)鉄摂取の過不足が肝臓・血液の遺伝子発現に及ぼす影響および安全摂取基準の提唱

研究課題名(英文)Proposal of safety levels of iron intake from the gene expression analysis of the liver and blood of rats fed the iron excess or deficient diet

研究代表者

亀井 飛鳥(KAMEI, Asuka)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・「健康・アンチエイジング」プロジェクト・研究員

研究者番号：40514112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：鉄欠乏は、世界で最も多くみられる栄養障害である。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。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、ラットを用いた鉄欠乏食摂取実験により、貧血に至らずとも肝臓は生体内の鉄量の変化に遺伝子発現レベルで機敏に応答し、様々な代謝系を変化させること、また、鉄過剰食摂取によっても肝臓や血球細胞の遺伝子発現パターンが変化することを初めて明らかにした。

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. In Japan, about 10% of women suffer from iron-deficient anemia, and 20-40% from non-anemic iron deficiency. Iron is also the risk factor of oxidative stress when accumulated in the organs excessively. In this study, by the global analysis of gene expression, a variety of metabolic processes tended to change in the liver of non-anemic iron deficient rats. Also, it was revealed that gene expression patterns in the liver and the blood cells, were changed in rats fed iron-excess diet.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：DNAマイクロアレイ 鉄欠乏 貧血のない鉄欠乏 鉄過剰 肝臓 血液

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も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わた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い解析へと歩を進めるための最適手法であり、物事の本質を根源的に明らかにする手法でもある。

鉄欠乏は、世界で最も多くみられる栄養障害である。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。

本研究は、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を基盤とし、多様な統計的解析法を駆使しつつ、食品としての鉄の機能性、安全性評価を目的として実施するもので、これを通じて、鉄摂取量の総合的な理解が深まるものと考えられる。

2. 研究の目的

鉄は必須栄養素であるが、日本人女性において、摂取不足による栄養障害リスクの高まりが問題となっている。申請者は、DNA マイクロアレイ法を駆使した網羅的トランスクリプトーム解析により、重度の鉄欠乏の肝臓では、様々な栄養素代謝や細胞機能が多岐に渡って変化することを遺伝子発現レベルから明らかにし、報告した (Physiol Genomics, 2010)。一方、鉄は、その過剰摂取が臓器における酸化傷害を引き起こすリスクも指摘されていて、最適摂取領域の根源的探索の必要性が国際的に強く求められている。こうした背景を踏まえ、本研究では、欠乏・過剰の両面から、鉄の安全摂取基準の提示に向けたトランスクリプトーム解析を世界に先駆けて実施した。

3. 研究の方法

(1) 食餌鉄含量を低減する鉄欠乏実験

3 週齢の雄性 SD ラットを予備飼育後、鉄含量 48 ppm の標準飼料摂取 (正常) 群と、3 ppm の低鉄飼料摂取群とに分け、それぞれ

の飼料を与えて飼育した。低鉄飼料摂取群は、正常群に比べて摂取量が低下するため、両群間のエネルギー摂取量および鉄を除く栄養素摂取量を揃える目的で、正常群の摂取量を低鉄飼料摂取群の摂取量に揃えた。これらの飼料を与えて 3 日目に解剖を行い、血液および肝臓を採取した。血液からは血漿および血清を分離し、血漿フェリチン、TIBC (総鉄結合能)、血清鉄を測定した。また、肝臓の鉄含有量を測定した。続いて肝臓から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array, Affymetrix) に供し、トランスクリプトーム解析を実施した。得られた CEL データを RMA (Robust Multiarray Average) 法にて正規化し、Rank Products 法にて 2 群間比較を行い、FDR < 0.05 と判定されたプローブセットを顕著な発現変動と定義し、抽出した。この中にどのような機能を持つ遺伝子が濃縮されているかを明らかにするため、DAVID Bioinformatics Resources を用い、Gene Ontology に基づく解析を行った。

(2) 鉄過剰摂取実験

雄性 SD ラットを予備飼育後、正常群と、通常食の約 10 倍の鉄過剰飼料摂取群とに分け、それぞれの飼料を与えて飼育した。飼育期間中、7 日毎に尾より採血し、ヘモグロビンおよび血漿フェリチン量を測定した。解剖時には血液および肝臓を採取した。血液からは血清を分離し、TIBC (総鉄結合能)、血清鉄を測定した。また、肝臓の鉄含有量を測定した。さらに肝臓および血球細胞から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array, Affymetrix) に供し、トランスクリプトーム解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 食餌鉄含量を低減する鉄欠乏実験

貧血のない鉄欠乏の定義は、ヘモグロビンに変化がなく、血中フェリチン低下、TIBC (総鉄結合能) 増加が認められることにある。低鉄飼料摂取 3 日目には、ヘモグロビンに変化がなく、血中フェリチンの有意な低下、TIBC の有意な増加、血清鉄の有意な低下が認められ、ラットが貧血のない鉄欠乏であることが明らかになった。また、肝臓中の鉄量は有意に低下しており、体内の貯蔵鉄量が大きく減少していることが示された。肝臓の網羅的な遺伝子発現解析の結果、顕著な発現変動を示した遺伝子には糖代謝、脂質代謝、有機酸・細胞内ケトン代謝、薬物応答、細胞外刺激応答、酸化還元、酸素運搬に関する因子が濃縮されており、貧血に至らずとも肝臓は生体内の鉄量の変化に遺伝子発現レベルで機敏に応答することが明らかになった (図 1)。

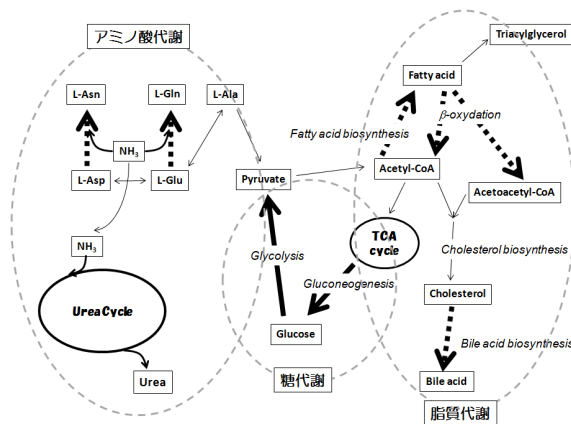


図1 貧血のない鉄欠乏ラット肝臓における栄養素代謝関連遺伝子群の変動
太い実線矢印：亢進
太い破線矢印：抑制

また、過去に実施した貧血ラットの肝臓遺伝子発現解析データとの比較を実施したところ、貧血のない鉄欠乏ラット肝臓で変動したプローブセットの36%が貧血のない鉄欠乏・貧血間で共通、45%が貧血のない鉄欠乏のみ、19%が貧血のない鉄欠乏・貧血間で逆転したことが明らかになった(表1)。ここから、貧血のない鉄欠乏で引き起こされる生体内の変化は、貧血で起こる現象の一部と一致しているだけでなく、固有の応答も示し、またその割合は変動プローブセット全体の半分以上であることが示された(PLoS ONE, 2013)。

表1 貧血のない鉄欠乏ラット肝臓発現変動probe set と貧血ラット肝臓発現変動probe set の比較

	貧血のない鉄欠乏	貧血	Probe set 数
共通 (36.46%)	↑	↑	36
	↓	↓	65
貧血のない鉄欠乏のみ (44.77%)	↑	→	36
	↓	→	88
逆転 (18.77%)	↑	↓	19
	↓	↑	33

()内は貧血のない鉄欠乏ラット肝臓発現変動probe set 総数に対して占める割合を示す

冒頭にも記載したように、日本人女性の20~40%が貧血のない鉄欠乏であるとも言われており、そこにどのような問題があるか明

らかにすることは重要である。本研究は、貧血のない鉄欠乏に焦点を当て、肝臓の遺伝子発現解析から生体に及ぼす影響を初めて明らかにしたものであり、貧血に至らなくとも生体が応答し、鉄代謝関連因子のみならず様々な代謝系が変化することを示したものである。

(2) 鉄過剰摂取実験

鉄過剰食摂取群で有意な血中フェリチン量増加が認められた。血中フェリチンは体内貯蔵鉄量に正の相関を示すため、鉄過剰食摂取により体内の貯蔵鉄が有意に増加することが示唆された。そこで肝臓中の鉄量を測定したところ、鉄過剰食摂取群で有意に増加しており、体内の貯蔵鉄量が増加したことが確認された。続いて肝臓の遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した結果、顕著な発現変動を示した遺伝子にはモノカルボン酸代謝、糖代謝、脂質代謝、酸化還元、刺激応答に関する因子が濃縮されていた。

血球細胞の遺伝子発現を解析した結果、タンパク質の合成、分解といったタンパク質の量的変化に関わる因子が顕著に変動していることが明らかになった。これらの結果より、鉄過剰摂取によって肝臓および血球細胞の遺伝子発現が変動し、様々な代謝の変動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 1件)

Kamei A, Watanabe Y, Kondo K, Okada S, Shinozaki F, Ishijima T, Nakai Y, Kondo T, Arai S, Abe K. Influence of a short-term iron-deficient diet on hepatic gene expression profiles in rats. **PLoS One**. 査読有, 8, 2013, e65732. doi: 10.1371/journal.pone.0065732.

〔学会発表〕(計 1件)

亀井 飛鳥、渡部 由貴、篠崎 文夏、荒井 綜一、阿部 啓子、鉄過剰食摂取ラットの血球細胞の遺伝子発現プロファイル解析、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月26日、宮城

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀井 飛鳥 (KAMEIASUKA)
公益財団法人神奈川科学技術アカデミ
ー・「健康・アンチエイジング」プロジェ
クト・研究員
研究者番号：40514112

(2)研究分担者

(3)連携研究者