

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12344

研究課題名(和文)十二指腸粘膜で鉄吸収を抑制する鉄濃度感知システムの解明

研究課題名(英文)Iron sensing and suppression of iron absorption in the duodenal mucosa.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：即時的粘膜ブロックが、低濃度、短時間で見られ、サプリメントでも誘発される可能性を報告した。この現象は鉄欠乏によって鉄吸収能が亢進した細胞でのみ認められ、鉄吸収が抑制に転ずるために小腸内の鉄濃度がモニターされる必要がある。本研究で、十二指腸凍結切片におけるDMT1異性体発現と細胞内局在、鉄投与にตอบสนองする発現や局在の変化について定量的に解析するプログラムを作成した。小腸は他の組織に比べて極めて細胞の分解が早く、定量解析の品質で免疫染色が可能な切片の制作に苦労した。鉄欠乏が各異性体発現に及ぼす影響と鉄投与が局在に及ぼす影響を解析し、鉄投与開始から15～30分でDMT1の細胞質への移動を確認した。

研究成果の概要(英文)：We reported the possibility that "short acting mucosal block" can be seen at low concentrations and in a short time and induced even with supplement intake. This phenomenon is observed only in iron deficient mucosa with increased iron absorption and the iron concentration in the duodenum needs to be monitored because iron absorption turns to suppression. In this study, we developed a program to quantitatively analyze DMT1 isomer expression and intracellular localization in duodenum frozen section, and examined in expression and localization in response to iron administration. The small intestine was much more rapidly degraded than other tissues, and it was difficult to produce sections usable for immunostaining and quantitative analysis. The effect of iron deficiency on each isomer expressions and the effect of iron administration on their localization were analyzed. The internalization of DMT1 to cytoplasm was observed in a short time of 15 to 30 minutes after iron administration.

研究分野：食生活学(分子代謝学)

キーワード：即時的粘膜ブロック 鉄欠乏 鉄吸収 DMT1 異性体 細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

日本では女性や高齢者の貧血頻度が他の先進国に類を見ないほど高い。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の使用も推奨されている。一方、米国女性を対象とした the Iowa women's health study (Mursu et.al., Arch Intern Med. 171, 2011) では、サプリメントからの鉄摂取量が高く、摂取期間が長いほど死亡リスクハザード比が高くなることが報告されている。これまで、鉄は吸収率が低く、また腸管における吸収コントロールが働いて過剰症になりにくいとされてきたが、近年、鉄過剰の問題は世界的に注目され、新たな研究成果の蓄積が求められている。

小腸管腔の鉄は粘膜上皮に局在する divalent metal transporter 1 (DMT1) によって細胞内へ取り込まれ、ferroportin 1 (FPN1) によって血管に放出される。消化管内の鉄濃度に応答する吸収抑制は鉄欠乏の粘膜細胞でのみ認められるため、鉄の栄養状態によって DMT1 の働きが異なることが推測される。DMT1 には N 末端、C 末端の異なる 4 種類の異性体 (DMT1A-IRE、DMT1A+IRE、DMT1B-IRE、DMT1B+IRE) が知られており、鉄欠乏では DMT1+IRE 発現が亢進する。しかし、DMT1+IRE のみが細胞内に取り込まれた鉄濃度に応答するか定かではない。そこで、十二指腸凍結切片で DMT1 異性体発現と細胞内局在、鉄への応答について検討する。C 末端の-IRE と+IRE の抗体は入手しているため、N 末端のアミノ酸配列に対する抗体を作成し、4 種類の DMT1 異性体と鉄栄養状態による発現の変化、細胞内の局在を明らかにする。粘膜細胞における DMT1 の挙動は Caco-2 細胞などへの Dmt1 遺伝子導入により試みられているが、各異性体を個別に導入して比較検討した結果はない。また、これまでに大腸菌への Dmt1 遺伝子導入を試みたが膜上に DMT1 タンパク質を発現させることは出来なかった。そこで無細胞膜タンパク質発現システムを用いて DMT1 異性体発現を試みる。成功すれば、DMT1 異性体の鉄濃度への応答を in vitro で詳細に調べることが可能となる。

2. 研究の目的

過剰鉄の摂取により鉄吸収が抑制される“粘膜ブロック”が、これまでの報告より極めて低濃度、短時間で見られ、サプリメント摂取でも誘発される可能性を報告した (Am. J. Physiol, 307: G89-97, 2014)。この現象は鉄欠乏によって鉄吸収能が亢進した細胞でのみ認められ、反応の早さから粘膜上の鉄輸送体 DMT1 の構造変化によると考えられる。DMT1 には 4 種類の異性体が知られており、粘膜での安定性に差があると推察されているが、鉄吸収が促進から抑制に転ずるために小腸内の鉄濃度がモニターされる必要がある。本研究では、DMT1 異性体の挙動を詳細

に調べて“十二指腸粘膜細胞が鉄濃度をモニターする仕組み”の解明を目指す。研究の成果は、効率的で安全な鉄摂取量の提案のみならず、DMT1 が輸送する 2 価陽イオンの吸収調節解明にも寄与することができる。

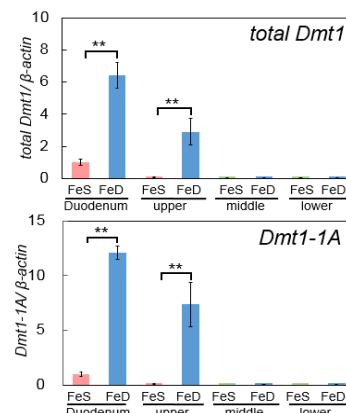
3. 研究の方法

DMT1 には 4 種類の異性体 (DMT1A-IRE、DMT1A+IRE、DMT1B-IRE、DMT1B+IRE) が存在し、-IRE と+IRE では C 末端のアミノ酸配列が異なる。また、DMT1B は DMT1A の N 末端のアミノ酸 31 残基が欠損している。鉄欠乏では DMT1+IRE 発現が亢進するが、DMT1+IRE のみに鉄濃度をモニターする機能があるか否か定かではない。まず、小腸各部位の Dmt1 スプライシング異性体 mRNA 発現を real-time PCR により解析した。その後、鉄栄養状態の異なるラットや濃度の異なる鉄を投与したラット十二指腸の凍結切片を作成し、DMT1 異性体発現と細胞内局在、鉄投与に応答する発現や局在の変化について細胞イメージングアナライザーの解析ソフトで定量的に解析するプログラムを作成した。無細胞膜タンパク質発現システムで DMT1 タンパク質を細胞膜様の支持体に発現させることを計画したが、細胞膜を横切る応答を細胞イメージングアナライザーで解析することが困難であった。

4. 研究成果

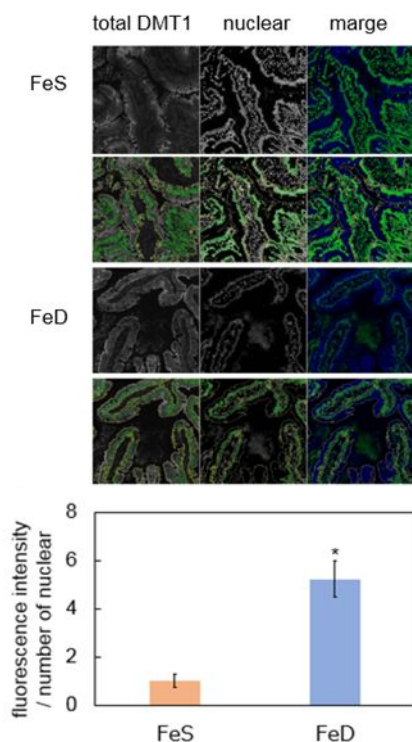
“十二指腸粘膜細胞が鉄濃度をモニターする仕組み”の解明を目的として、鉄の栄養状態と DMT1 異性体の挙動を調べた。

DMT1 異性体発現: 通常および鉄欠乏ラットを作成し、小腸各部位の Dmt1 スプライシング異性体 mRNA 発現を real-time PCR により解析した。Dmt1-1A、Dmt1-IRE、Dmt1-nonIRE mRNA 発現量は十二指腸で最も高く、ついで小腸上部で高い発現を示したが、中部、下部での発現量は極めて低かった。さらに、十二指腸と小腸上部の Dmt1-1A、Dmt1-IRE、Dmt1-non-IRE mRNA 発現量は、鉄欠乏に応答して発現が亢進し、特に十二指腸 Dmt1-1A (12.1 倍)、Dmt1-IRE (10.8 倍) で顕著であった。



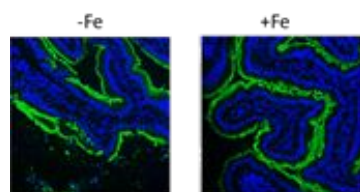
DMT1 異性体の細胞内局在、鉄への応答：

鉄欠乏が小腸各部位の Dmt1 スプライシング異性体 mRNA 発現に及ぼす影響から、小腸上部（特に十二指腸）を研究のターゲットとすることを決定した。各異性体の細胞内局在を明らかにするため、DMT1 発現量を細胞イメージングアナライザーで定量的に解析するプログラムを作成した。小腸の凍結切片は微絨毛を縦に切断しているため、粘膜細胞以外の細胞の核も染色される。粘膜上の輸送体に結合した蛍光強度を核の数で除して定量化するため、粘膜細胞層を選択的に識別する必要がある。



十二指腸の DMT1 タンパク質発現

通常および鉄欠乏のラット十二指腸に異なる濃度の鉄を投与し、作成した十二指腸の凍結切片で DMT1 タンパク質の細胞内局在の変化について検討を進めている。



鉄投与 15 分後の DMT1

各異性体発現の鉄への応答を解析し、即時的粘膜ブロックに關与する異性体の候補を絞り込む予定である。今後、鉄濃度に強く応答する DMT1 異性体を、無細胞膜タンパク質発現システムを用いて発現させ、鉄濃度を変化させた場合の膜における安定性について評価したい。

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 1 件)

Shoko Shinoda, Machiko Yamamoto and Anna Arita, Short-acting mucosal block and ferritin-independent antioxidative system works in the iron-deficient rats duodenum. *Ann. Nutr. Metab.* 71 (supple 2), 2017, 421, DOI: 10.1159/000480486

[学会発表](計 7 件)

小泉真緩, 芋岡祐理奈, 篠田粧子, 鉄欠乏がラット小腸の抗酸化システムに及ぼす影響. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018. 3.15-18, 名古屋

Shoko Shinoda and Yuki Azuma, Heme iron absorption and gene expression of proteins related to heme iron absorption in rat small intestine. 21st International Congress of Nutrition. Buenos Aires, Oct. 14-22, 2017

Shoko Shinoda, Machiko Yamamoto and Anna Arita, Short-acting mucosal block and ferritin-independent antioxidative system works in the iron-deficient rats duodenum. Seventh Congress of the International BioIron Society. UCLA, May 7-11, 2017

東雄貴、陳風霞、篠田粧子、鉄欠乏がラット小腸各部位の Hcp1/Pcft、HO-1、Fpn1 mRNA 発現に及ぼす影響, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016. 3.27-30, 札幌

有田安那、篠田粧子、小腸各部位の Dmt1 スプライシング異性体 mRNA 発現に及ぼす鉄欠乏の影響, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016. 3.27-30, 札幌

大塚紗恵、篠田粧子、ラット小腸培養細胞 (IEC-6) 単層膜を用いた鉄欠乏時鉄吸収モデルの検討, 第 28 回日本動物細胞工学会 2015 年度大会 (JAAC2015), 2015. 7.9-10, 仙台

Shoko Shinoda, Machiko Yamamoto, Yurina Imooka, Effect of iron deficiency on antioxidative system in rat duodenum. 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015), Yokohama, Japan, 14-18 May, 2015.

[図書](計 1 件)

栄養素の欠乏・過剰と疾病, 日本予防医学会編 『日本予防医学会認定 予防医学指導士』テキスト, 同文館出版株式会社, 2015 年

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