

令和元年6月17日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00873

研究課題名(和文) 鉄欠乏時の骨代謝変動に及ぼす因子の検索とメカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on effects of dietary iron deficiency on bone metabolism

研究代表者

勝間田 真一 (KATSUMATA, Shinichi)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：10424681

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)：本研究の目的は、鉄欠乏時の骨量減少の要因を検索し、骨量減少メカニズムを解明することである。ラットへの鉄欠乏食投与は、骨形成および骨吸収関連遺伝子の発現を低下させた。鉄欠乏食投与は活性型ビタミンD濃度を低下させるが、カルシウム吸収に関わる遺伝子発現を低下させた。以上より、鉄欠乏は骨形成と骨吸収を低下させ、カルシウム吸収にも影響することで、骨量減少を引き起こすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨の健康維持はQOLにとって重要である。骨代謝に鉄が関与するという最近の研究に対して、骨量減少に係る要因を検索し、詳細な機構を検討することにより、骨の健康に対して新たな知見を加えることができた。また、近年、栄養素間の生体内相互作用についての研究が進んでいるが、骨代謝における鉄とタンパク質もしくは脂質についても、新たな生体内相互作用の解明の一助になったと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the effects of dietary iron deficiency on bone metabolism in rats. Dietary iron deficiency decreased bone formation and bone resorption-related gene expression in the femur. Furthermore, dietary iron deficiency decreased calcium absorption-related gene expression in duodenum. These results suggested that iron deficiency affect bone formation, bone resorption, and calcium absorption, leading to a decreased BMD in rats.

研究分野：栄養生理学

キーワード：鉄欠乏 骨形成 骨吸収 骨密度 カルシウム

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

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症をはじめとする骨疾患は生活の質(QOL)を維持するために、その予防や治療は重要課題である。骨疾患に影響を与える要因として、遺伝、栄養、運動などが知られているが、栄養の面からはカルシウムやタンパク質などの適切な栄養素摂取の重要性が認識されている。カルシウムやタンパク質の摂取不足が骨代謝に及ぼす影響についての知見は多くみられるが (Kato S et al., 2002, *Metabolism*, 51, 1230-1234; Takeda S et al., 2012, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 58, 240-246) 実際の骨代謝はカルシウムやタンパク質だけでなくその他の栄養素の摂取状況も密接に関わっている。これまでに、リン、マグネシウム、亜鉛、鉄と骨代謝の関係について検討しており (Katsumata S et al., 2005, *Br. J. Nutr.*, 94, 666-674; Katsumata S et al., 2006, *Magnes. Res.*, 19, 12-18; Suzuki T et al., 2016, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 122-129; Katsumata S et al., 2006, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2547-2550; Matsumoto N et al., 2008, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43 (Suppl. 1), 582-585; Katsumata S et al., 2009, *J. Nutr.*, 139, 238-243) これらミネラルの過不足によっても骨代謝に悪影響を及ぼすことを観察してきた。

鉄はヘモグロビンの構成成分であるため、その欠乏は貧血を引き起こす。同時に、生体内における種々の酵素の補欠分子族であることから、生体の様々な代謝に関わる重要な栄養素である。鉄欠乏性貧血の発症率は世界的に高く、発展途上国だけでなく先進国においても、大きな栄養問題として考えられている。近年、いくつかの研究グループにより、鉄の摂取量と骨代謝の関係についての研究が報告されている。ヒトにおいて、鉄摂取量は閉経後女性における骨密度と正の相関があることが報告されている (Harris MM et al., 2003, *J. Nutr.*, 133, 3598-3602; Maurer J et al., 2005, *J. Nutr.*, 135, 863-869)。また、私達の研究グループにおいても、ラットへの鉄欠乏食投与は骨形成と骨吸収を低下させ、骨密度や骨強度を低下させることを報告している (Katsumata S et al., 2006, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2547-2550; Matsumoto N et al., 2008, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43 (Suppl. 1), 582-585; Katsumata S et al., 2009, *J. Nutr.*, 139, 238-243)。

鉄欠乏による骨代謝変動の詳細な機構についてはまだ不明な点が多いが、これまでの研究により、活性型ビタミンD合成能の低下が一要因であることを報告している (Katsumata S et al., 2009, *J. Nutr.*, 139, 238-243)。ビタミンDは通常、肝臓と腎臓における二つの水酸化反応により活性型ビタミンDに変換され、生体内でその作用を示すが、ビタミンDの水酸化反応に関わる酵素の活性化には鉄が補因子として必要であることが知られている (DeLuca HF, 1976, *Am. J. Clin. Nutr.*, 29, 1258-1270)。私達のグループは、鉄欠乏ラットの腎臓におけるビタミンD水酸化酵素の活性が低下 (Katsumata et al., 2016, *BMC Nutr.*, 2, 33) することにより、血清中活性型ビタミンD濃度が低下し、その結果として、鉄欠乏時には骨形成が低下したものと報告している (Katsumata S et al., 2009, *J. Nutr.*, 139, 238-243)。また、骨形成を司る骨芽細胞の分化には転写因子であるRunx2が必須であるが、鉄欠乏によりRunx2の遺伝子発現が低下していることも観察され、Runx2の低下が鉄欠乏による骨形成低下の一因であることも推察された (Katsumata S et al., 2016, *BMC Nutr.*, 2, 33)。

これまでに、骨代謝に影響を及ぼす様々な因子の検索がなされており、タンパク質・脂質代謝の変動や酸化ストレスの増加も骨代謝に悪影響を及ぼす因子として考えられている。私達のこれまでの報告より、鉄欠乏ラットにおいて血中総タンパク質やアルブミン濃度の低下が観察された (Katsumata S et al., 2009, *J. Nutr.*, 139, 238-243)。また、骨に多く存在するタンパク質の一つである型コラーゲンは骨が石灰化するための基質として重要な役割を果たしているが、鉄欠乏により骨中型コラーゲン量が減少することが示唆された (Matsumoto N et al., 2008, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43 (Suppl. 1), 582-585)。したがって、鉄欠乏におけるタンパク質代謝の変化も骨量減少の一要因であることが考えられる。また、骨形成に関わる骨芽細胞と脂肪細胞の前駆細胞は同じ間葉系幹細胞であるが、異なる転写因子により、それぞれの細胞に分化することが知られている。近年、骨・脂質代謝の相互連関が報告されているが、鉄欠乏ラットは脂質代謝異常を引き起こすことが知られており、骨芽細胞分化に関わる転写因子であるRunx2の発現が減少することから、鉄欠乏時の脂質代謝変動も骨代謝に影響を及ぼしている可能性が推察される。さらに、鉄欠乏ラットの様々な組織において過酸化脂質量が増加し、心臓において酸化ストレスが増加していることを報告している (Inoue H et al., 2015, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79, 1366-1368)。酸化ストレスは骨代謝に悪影響を及ぼすため、これまでに報告は存在しないが、骨組織においても酸化ストレスが増加し、鉄欠乏時の骨代謝に影響している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

上記のように、タンパク質・脂質代謝の変動が鉄欠乏による骨量減少に関与している可能性は考えられるが、その詳細な機構については不明な点が多い。また、鉄欠乏による骨吸収低下の機構についての報告はない。そこで本研究課題においては、鉄欠乏時の骨代謝変動に及ぼす要因について、分子栄養学的手法を用いてさらなる検索を行い、鉄欠乏による骨量減少の機構を検討するために、以下の目的を設定した。

- (1) 鉄欠乏時の骨形成・骨吸収低下に関わる因子について検索する。
- (2) タンパク質代謝の変動と鉄欠乏時の骨量減少との関係について検討する。

(3) 鉄欠乏時の脂質代謝変動と骨形成低下との関係について検討する。

3. 研究の方法

(1) 鉄欠乏時の骨形成・骨吸収低下に関わる因子についての検索

これまでのラットを用いた研究において、鉄欠乏食投与は骨形成を低下させ、骨密度や骨強度を低下させることを報告しており (Katsumata S et al., 2006, Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 2547-2550; Matsumoto N et al., 2008, J. Clin. Biochem. Nutr., 43 (Suppl. 1), 582-585; Katsumata S et al., 2009, J. Nutr., 139, 238-243) その原因としてビタミンDの活性化に障害が引き起こされていることが考えられた。また、骨形成を司る骨芽細胞の分化に必須な転写因子である Runx2 の遺伝子発現は鉄欠乏により低下していることも観察され、Runx2 の低下が鉄欠乏による骨形成低下の一因であることも推察された。骨代謝は骨形成だけでなく骨吸収によっても調節されているが、鉄欠乏により骨組織の破骨細胞数や骨吸収マーカーの低下から、鉄欠乏ラットの骨吸収は低下していることが示されている (Katsumata S et al., 2009, J. Nutr., 139, 238-243) しかし、鉄欠乏による骨吸収低下の機構についての報告はない。そこで、骨吸収関連遺伝子の発現観察を行い、鉄欠乏ラットの骨吸収変動について検討した。さらに、骨形成低下の詳細についても更なる検討を行った。

4 週間の鉄欠乏食投与が骨代謝関連遺伝子に及ぼす影響

被験動物として3週齢 Wistar 系雄ラットを用い、飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき正常食と鉄欠乏食を作成した。鉄欠乏食は鉄給源を除いたミネラル混合を用いて作成した。3 日間の予備飼育の後、正常食群、鉄欠乏食群、制限給餌群の3群に分け、4 週間の飼育観察を行った。解剖前 24 時間の尿を採取し、骨吸収マーカーの測定に用いた。解剖時は麻酔下にて血液を採取して、ヘモグロビン濃度を測定し、血清は骨形成マーカーの測定に用いた。また、左大腿骨は骨塩量と骨密度の測定に用い、右大腿骨は遺伝子発現観察に用いた。遺伝子の発現観察は Real-time PCR 法により行い、骨形成と骨吸収に関わる遺伝子について検討した。

鉄欠乏ラットへの鉄正常食投与の影響

被験動物として3週齢 Wistar 系雄ラットを用い、飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき正常食と鉄欠乏食を作成した。3 日間の予備飼育の後、正常食群、鉄欠乏食群の2群に分けた。4 週間の飼育観察を行った後、鉄欠乏ラットに2 週間の鉄正常食を投与した。解剖前 24 時間の尿を採取し、骨吸収マーカーの測定に用いた。解剖時は麻酔下にて血液を採取して、ヘモグロビン濃度を測定し、血清は活性型ビタミンD濃度、骨形成マーカー、総タンパク質濃度の測定に用いた。また、左大腿骨は骨塩量と骨密度の測定に用い、右大腿骨は遺伝子発現観察に用い、骨形成に関わる遺伝子について検討した。

(2) タンパク質代謝の変動と鉄欠乏時の骨量減少との関係

タンパク質摂取量の不足も骨密度の低下を引き起こすことが知られている (Takeda S et al., 2012, J. Nutr. Sci. Vitaminol., 58, 240-246) そこで、鉄欠乏時の骨量減少に及ぼすタンパク質摂取量の影響について検討した。

被験動物として3週齢 Wistar 系雄ラットを用い、飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき作成し、鉄欠乏と同時にタンパク質含有量の異なる飼料を投与し、4 週間の飼育観察を行った。幼若ラットへの低タンパク質摂取が骨密度を低下させるという報告 (Takeda S et al., 2012, J. Nutr. Sci. Vitaminol., 58, 240-246) から、飼料中タンパク質含有量は、低タンパク質食 (10%) と正常タンパク質食 (20%) の2段階に調整した。検討項目については、大腿骨の骨評価試験、Real-time PCR 法による骨形成関連遺伝子の発現観察を行った。同時に、カルシウム代謝に関わる因子についても検討するために、十二指腸を摘出し、鉄欠乏時のカルシウム吸収関連遺伝子の発現観察を行った。

(3) 鉄欠乏時の脂質代謝変動と骨形成低下との関係

近年、骨・脂質代謝の相互連関が報告されている。骨形成に関わる骨芽細胞と脂肪細胞の前駆細胞は同じ間葉系幹細胞であるが、骨芽細胞への分化には runt-related transcription factor 2 (Runx2) が、脂肪細胞への分化には peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) が関与することが知られている。鉄欠乏ラットは脂質代謝異常を引き起こすことが報告 (Sherman AR, 1979, Lipids, 14, 888-892; Ndong M et al., 2007, Biosci Biotechnol Biochem., 71, 1826-1833) されており、骨芽細胞分化に関わる転写因子である Runx2 の発現が減少することから、鉄欠乏時の脂質代謝変動も骨代謝に影響を及ぼしている可能性が推察される。そこで、鉄欠乏時の脂質代謝変動と骨形成低下との関係について検討した。

被験動物として3週齢 Wistar 系雄ラットを用い、飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき正常食と鉄欠乏食を作成した。3 日間の予備飼育の後、正常食群、鉄欠乏食群、制限給餌群の3群に分け、4 週間の飼育観察を行った。通常、脂質代謝研究を行う時には、解剖前にラットを絶食にさせることから、今回は絶食の有無による影響も検討した。解剖時は麻酔下にて血液を採取してヘモグロビン濃度を測定し、血清は脂質 (中性脂肪、コレステロール) 濃度の測定に用いた。また、肝臓中脂質濃度についても測定し、脂質代謝関連遺伝子の発現観察を行った。前年度と同様に骨代謝評価を行い、骨中の骨形成関連遺伝子及び脂質代謝関連遺伝子の発現観察を行った。

4. 研究成果

(1) 鉄欠乏時の骨形成・骨吸収低下に関わる因子についての検索

4 週間の鉄欠乏食投与が骨代謝関連遺伝子に及ぼす影響

鉄欠乏食投与により、明らかな貧血症状を示し、大腿骨の骨塩量・骨密度は有意に低下した。血清中の骨形成マーカーの結果より、鉄欠乏食投与により骨形成の低下が引き起こされていることが推察された。また、骨形成関連遺伝子 (Runx2、Osterix、OPN、OCN、Col1a1) の鉄欠乏食投与による発現低下が観察され、同時に、大腿骨中 IGF- β と BMP2 の遺伝子発現の低下もみられた。これらのことから、鉄欠乏食投与による骨形成の低下は IGF- β と BMP2 の遺伝子発現の低下により、骨形成関連遺伝子の低下が引き起こされた結果であることが示唆された。一方、尿中の骨吸収マーカーの結果から、鉄欠乏時の骨吸収の低下が観察されたが、大腿骨中の骨吸収関連遺伝子である TRAP の発現低下が観察されたことから、鉄欠乏時には破骨細胞の活性が低下することが示唆された。

鉄欠乏ラットへの鉄正常食投与の影響

鉄欠乏ラットへの 2 週間の鉄正常食投与を行ったところ、貧血症状は完全には改善されなかった。しかし、活性型ビタミン D、骨形成マーカー、骨吸収マーカーは回復し、大腿骨骨密度も回復傾向がみられた。大腿骨中 OCN、Col1a1、IGF- β 、BMP2 の遺伝子発現観察を行ったところ、これら遺伝子発現の回復もみられたため、鉄欠乏状態が完全に回復していなくても、骨代謝の改善がみられることが示唆された。また、鉄欠乏により低下した血清中総タンパク質濃度の改善もみられたことから、鉄欠乏がタンパク代謝にも影響を及ぼしていることが示唆された。

(2) タンパク質代謝の変動と鉄欠乏時の骨量減少との関係

鉄欠乏食投与により明らかな貧血症状を示したが、鉄欠乏低タンパク質食投与による影響は観察されなかった。鉄欠乏食投与により、いくつかの骨形成関連遺伝子の発現は低下したが、鉄欠乏低タンパク質食投与による明らかな影響はみられなかった。これまでの研究において、鉄欠乏食投与により、タンパク質代謝に影響を及ぼすことが示唆されているが、今回の研究において、鉄欠乏時に低たんぱく状態にしても骨代謝については更なる悪影響はみられなかったことから、飼料中タンパク質濃度の設定にもよるが、本実験で設定したタンパク質濃度においては、骨代謝に対しては鉄欠乏食投与の影響が強いことが示唆された。

また、鉄欠乏食投与ラットにおけるカルシウム代謝に関わる因子の遺伝子発現についても検討を行った。鉄欠乏食投与ラットにおいて、十二指腸におけるカルシウム吸収に関わる遺伝子発現の低下が観察された。これまでに鉄欠乏ラットにおいて血清中の活性型ビタミン D 濃度の低下が引き起こされることを報告しており、そのことが、今回の結果の一因であることが推察された。現在、さらなる検討を行っているところである。

(3) 鉄欠乏時の脂質代謝変動と骨形成低下との関係

鉄欠乏食投与により貧血症状を示したが、絶食の有無による影響は観察されなかった。血清中脂質成分については、鉄欠乏食投与より高値を示した。また、絶食により、血清中脂質濃度は低下した。肝臓中脂質代謝関連遺伝子は鉄欠乏食投与による変動と絶食による変化がみられた。鉄欠乏食投与により、大腿骨の骨塩量・骨密度は低下したが、絶食の有無による影響はみられなかった。鉄欠乏により、いくつかの骨形成関連遺伝子の発現は低下したが、絶食による影響がみられたものもあった。大腿骨中脂質代謝関連遺伝子については明らかな影響は観察されなかった。骨の細胞は骨髄細胞から分化する。したがって、今後は、骨髄中の骨・脂質代謝関連遺伝子の発現を検討する必要があると思われる。

鉄欠乏食摂取時の骨量減少は、主に骨形成関連遺伝子の低下による影響が強いことが示唆された。また、絶食の有無により、肝臓中脂質代謝関連遺伝子だけでなく、骨中の骨・脂質代謝関連遺伝子の変動もみられたことから、遺伝子発現を検討する際には絶食をすることによる影響も考慮する必要があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 64 回日本栄養改善学会学術総会「鉄欠乏ラットにおける骨代謝関連遺伝子の変動」勝間田真一、松崎広志、2017 年 9 月 (徳島)

〔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〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

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。