

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23700928

研究課題名(和文) 亜鉛代謝異常による難治性造血障害および高血圧発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of refractory anemia and hypertension by zinc metabolic disorder

研究代表者

許斐 亜紀 (KONOMI, Aki)

帝京平成大学・健康メディカル学部・講師

研究者番号：40529658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに中等度亜鉛欠乏下での血中エリスロポエチン濃度の変化および腎臓中エリスロポエチン濃度の変化を報告してきた。本研究では対照群(Control)、中等度亜鉛欠乏群(ZD)、pair-fed群(PF)の3群を設定し、腎臓の皮質および髄質のtotalRNA、housekeeping-geneおよびエリスロポエチン発現量をRT-RT-PCRにより測定した。データはFisherのPLSDで統計処理を行い、有意水準は5%とした。結果は、腎臓のエリスロポエチンの発現は亜鉛欠乏によって減少することを示唆していた。また、total RNAの減少に関しては亜鉛欠乏よりも食餌制限の影響が大きいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Kidney cortex and medulla erythropoietin mRNA levels were significantly different between ZD and PF. And we have examined whether zinc deficiency and diet restriction affect total RNA concentration and expression of Actb and Gapdh in kidney. Total RNA concentrations in the medulla of ZD and PF were significantly decreased compared with Control. Total RNA concentrations in the cortex of PF was significantly decreased compared with Control. The Gapdh/total RNA ratio in the cortex were increased in PF compared with Control. The Actb/total RNA ratio in the cortex of PF was significantly increased compared with Control, and the Actb/total RNA ratio in the medulla of ZD and PF were significantly increased compared with Control. These results suggest that kidney erythropoietin expression is decreased by zinc deficiency, and both zinc deficiency and diet restriction affect total RNA concentration and expression of Gapdh and Actb in kidney.

研究分野：微量元素

キーワード：亜鉛 エリスロポエチン 造血障害

1. 研究開始当初の背景

鉄と亜鉛はその化学的性質が類似している事から同時に欠乏しやすいことが明らかになっている。これら微量元素の欠乏は、先進国・後進国を問わず世界中で蔓延している健康、公衆衛生問題であり、WHO や UNICEF などの国際機関により予防策・改善策に関する研究が世界中で推進されている。

これら疾患の鑑別を行うためには、単独欠乏と同時欠乏の間にある病態生理上の差異について基礎的な知見を蓄積する必要があるが、実験モデルを作製することに技術的な困難があり解明が遅れていた。

申請者は、実験モデル動物の作製に成功し、亜鉛欠乏が血中 EPO 濃度の低下を招き造血能が低下することを世界で初めて報告し、亜鉛欠乏により発生する高血圧の発生原因はレニン-アンジオテンシン系の異常ではない事を明らかにした。

2. 研究の目的

亜鉛代謝異常による造血障害および高血圧は発生メカニズムが不明であるために治療はなく、難治性障害の一つとなっている。申請者は世界で初めて、亜鉛欠乏により血中エリスロポエチン (EPO) 濃度が低下すること、高血圧の発生メカニズムの端緒を明らかにした。

本研究では、遺伝子レベルでの亜鉛の作用を精査し、亜鉛代謝異常により発生する「難治性造血障害」および「亜鉛欠乏性高血圧」の新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

ラットは3週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用し、各群 10 匹ずつになるように、AIN-93G 飼料を与えた対照群 (Control: AIN-93G)、中等度亜鉛欠乏飼料 (4.5 mg Zn/kg) を与えた亜鉛欠乏群 (ZD)、AIN-93G 飼料を前日の ZD 群が摂取した量を与えた pair-fed 群 (PF) に群別し、4 週間飼育した。解剖時に採取した腎臓を皮質と髓質に分け測定サンプルとした。

各種栄養素欠乏が身体にどのような影響を与えるかを検討するうえで mRNA 発現量の分析が近年広く行われているが、亜鉛欠乏はタンパク質の合成自体を低下させることが知られている。

そこで、初めに亜鉛欠乏が mRNA 発現量解析の基礎となる total-RNA 量および housekeeping-gene (Gapdh および Actb) の

発現量にどのように影響を与えているかを検討した。これらの結果を得たのち、腎臓中のエリスロポエチンの mRNA 発現量を測定した。

分析はいずれも Bio-Rad 社製の Quantitative real time RT-PCR (リアルタイム定量 PCR システム) および Taq-Man probe で測定した。各群間の比較は Fisher の PLSD で検定し、危険率は 5% とした。

4. 研究成果

【結果】

腎臓髓質中の total RNA 発現量は PF 群と ZD 群が Control 群に比べて有意に低値を示した (ともに $P < 0.01$)。

腎臓皮質の total RNA 発現量は PF 群が Control 群に比べて有意に低値を示した ($P < 0.05$)。髓質および皮質のいずれでも ZD 群と PF 群の間には差は見られなかった。

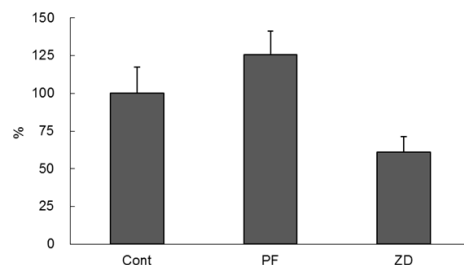
髓質の Gapdh 発現量は Control 群に比べて、ZD 群と PF 群が有意に減少していた (それぞれ、 $P < 0.05$)。髓質の Actb 発現量には 3 群間に有意な差は見られなかった。

髓質の Actb 発現量は Control 群に比べて、ZD 群と PF 群で有意に減少していた (それぞれ、 $P < 0.05$)。皮質の Actb 発現量も 3 群間に有意な差は見られなかった。

Total RNA において亜鉛欠乏および食摂取の制限の影響がみられたので、比率で再検討した結果、髓質の Gapdh/ total RNA 比および Actb/ total RNA 比には差は見られなかった。

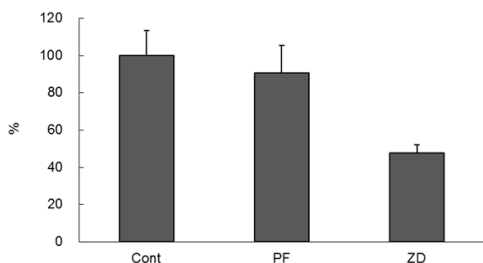
皮質の Gapdh/ total RNA 比には差は見られなかったが、Actb/ total RNA 比は PF 群が Control 群に比べて有意に上昇した ($P < 0.05$)。

髓質におけるエリスロポエチン発現量は、ZD 群が PF 群に対して有意に減少していた ($P < 0.01$)。また、Control 群と比較すると減少の傾向にあった ($P = 0.07$)。



皮質におけるエリスロポエチン発現量は

ZD群がControl群に比較し有意に減少し($P < 0.01$)、PF群に比較しても有意に減少していた($P < 0.05$)。



【考察】

本研究の結果、亜鉛欠乏と食餌量の制限によって total RNA が有意に減少することが明らかになった。特に皮質では亜鉛欠乏の影響は見られず、食餌量の制限のみが影響していた。

このことから、total RNA 発現量の減少に関しては、亜鉛欠乏よりも食餌量の制限の影響が大きいと考えられた。

Housekeeping-gene の Actb と Gapdh は、髄質での発現量が亜鉛欠乏および食餌摂取量の制限の両方で有意な減少を見た。しかし、皮質での発現量には差がみられず、臓器中の部位によって異なることが明らかになった。

エリスロポエチン mRNA 発現量は、髄質および皮質において亜鉛欠乏によって有意に減少することが明らかになった。

これらの結果は、これまで明らかにしてきた、血液中のエリスロポエチン濃度および腎臓のエリスロポエチン濃度が低下していたことと合致する結果であった。

血液中エリスロポエチン濃度は食餌摂取量の制限でも低下する傾向にあったが、腎臓中エリスロポエチン mRNA 発現は亜鉛欠乏によってのみ減少した。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

許斐 亜紀、横井 克彦.

鉄・亜鉛の単独もしくは同時欠乏が血中脂質およびタンパク質検査値に与える影響. *Biomedical Research on Trace Elements* 24(1), 7-12. 2013.

澤田 孝子、許斐 亜紀、横井 克彦.
成年女子の“貧血のない鉄欠乏症”における亜鉛値の一考察. *微量栄養素研究 (Trace Nutrients Research)* 28: 84-88. 2011.

〔学会発表〕(計 4 件)

Aki Konomi, Katsuhiko Yokoi.

Effect of iron and zinc deficiencies on blood pressure in rats. Xth Conference of the ISTERH. Tokyo, Japan. *J Trace Elem Med Biol*, 27 S1, 35. (2013.11.20.)

Aki Konomi, Katsuhiko Yokoi.

Both zinc deficiency and diet restriction decreased kidney total RNA concentration in rats. Experimental Biology, USA. Boston. *FASEB J*, 27:860.7 (2013.4.29.)

Aki Konomi, Katsuhiko Yokoi.

Effect of zinc deficiency and diet restriction on liver and spleen non-heme iron concentrations in rats. Experimental Biology, USA. San Diego. *FASEB J*, 26: 641.15. (2012. 4.22.)

Aki Konomi, Katsuhiko Yokoi.

Kidney erythropoietin expression is decreased by zinc deficiency in rats. IXth Conference of the ISTERH. Antalya, Turkey. *J Trace Elem Med Biol*. Vol. 26S1: 22. (2011. 10.20.)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

許斐 亜紀 (KONOMI Aki)
帝京平成大学・健康メディカル学部・講師
研究者番号：40529658

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携分担者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者
横井 克彦 (YOKOI Katsuhiko)
聖徳大学・人間栄養学部・教授
研究者番号： 10200883