

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750057

研究課題名(和文) ミネラル欠乏が老化を伴う炎症性疾患に及ぼす影響と防御機構の解明

研究課題名(英文) Effects of mineral deficiency diet on between aging-disease and reactive oxygen signal

研究代表者

井上 博文 (Inoue, Hirofumi)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：10639305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：鉄欠乏状態が老化と炎症に対する生体内防御機構に与える影響について検討を行った。(1) 老化および若齢マウスに鉄欠乏食投与はタンパク質の酸化を亢進したが、抗酸化分子のmRNA発現量の増加やオートファジーを活性化した。(2) NIH3T3細胞に鉄キレート剤deferoxamine(DFO)処理を行った結果、ROS産生関連酵素の遺伝子発現の増大によりROSが増加した。さらにDFO処理は老化関連分子群のタンパク質発現を増加した。以上より、鉄欠乏は酸化ストレスを亢進する一方で、生体防御機構を活性化することが、慢性的な防御機構の活性化は結果として、細胞老化を引き起こす可能性を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effects of iron deficiency diet on inflammation and senescence in vivo and in vitro. (1) We investigated the effects of dietary iron deficiency on the redox system in young or old mice. Dietary iron deficiency increased accumulation of carbonylated proteins and expression levels of an antioxidant enzymes and an autophagic marker compared to control diet. (2) Iron-specific chelator induce protein aggregation by increasing gene expression of p47phox. In addition, DFO treatment upregulated the expression of the autophagic genes during autophagy and anti-oxidant enzymes. Furthermore, DFO treatment also increased senescence-related molecules. These results suggested that anti-oxidant systems and autophagy in iron deficient condition protects from oxidative stress.

研究分野：食生活

キーワード：鉄欠乏 オートファジー 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

鉄は必須微量元素であり、生体内レドックス反応において重要な役割を担っている。また、鉄過剰は酸化ストレス増加を招くことで、様々な疾患リスクが上昇することが知られている。一般的に、鉄欠乏状態は貧血のみならず、スポーツ心臓に代表されるような心肥大に関与することが疫学調査からも明らかにされている。また先行研究において、ラットへの鉄欠乏食投与は血清中活性型ビタミンD濃度を低下させ、骨形成の低下を引き起こすことに加え、鉄欠乏は血中および肝臓中の過酸化脂質量を増大させることを見出し、鉄過剰のみならず、鉄欠乏時にも酸化ストレスが亢進することが示唆される。しかしながら、なぜ鉄欠乏時に酸化ストレスが亢進するのかに関しての詳細な作用機序については未だ不透明な点が多く残されている。そこで本研究では、鉄欠乏状態と酸化ストレスに着目し、炎症と生体防御機構との関連から解明することを目的とした。また、ミネラル不足が懸念されている若年層のみならず、超高齢社会となったことから「鉄摂取不足による老化と炎症」といった鉄欠乏状態と老化との関連についても明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究課題では、現代食生活において摂取不足が懸念されているミネラルと超高齢社会である2点に着目した。特に、食生活の変化により若年層ではミネラル摂取不足が問題となっており、将来、老化を伴った疾患へ増悪も懸念される。そこで本研究では、ミネラルの中でも鉄に焦点をあて、鉄欠乏状態が老化および炎症発症に及ぼす影響について分子栄養学的手法を用いて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、若齢マウスおよび老化促進モデルマウスを用い、鉄欠乏食を投与する実験を行った。また、動物実験を扱うにあたり、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、東京農業大学実験動物委員会の承認を受けて動物実験を行った。

(1) 老化促進モデルマウスを用いた鉄欠乏食投与と大腸炎への影響

本研究では、老化促進マウスを用い、鉄欠乏食投与への影響と炎症性疾患の関連について検討を行った。被験動物として、20週齢老化促進モデルマウス(SAMP6)に正常食と鉄欠乏食、鉄欠乏に対して3%デキストラン硫酸塩(DSS)を飲水投与した大腸炎群の系3群に分け、12週間の飼育観察を行った。飼料はAIN-93M飼料組成に基づき作成した。解剖時に血清を採取し、解剖後は臓器重量を測定した。また大腸粘膜からtotal RNAを抽出後、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)についてSYBR

Greenを用いたReal-time PCR法により解析を行った。また鉄欠乏食投与により変動する新規タンパク質の同定を行うために、二次元電気泳動後、ルビー染色法を行い、スポットを抽出、LC-MS/MSを用いた解析を行った。

(2) 若齢マウスを用いた鉄欠乏食投与と酸化ストレスへの影響

被験動物として4週齢の雄性BALBマウスを用い、正常食(CTL)、鉄欠乏群(ID)の計2群に分け、5週間の飼育観察を行った。飼育期間終了後、臓器重量を測定した。また血液を採取し、血中ヘモグロビン値と心臓における生体防御分子群(Nrf2, HO-1, MnSOD, Cu/ZnSOD)、ミネラルトランスポーター(Zip14:zinc transporter 14, CTR1:copper transporter 1, DMT1:divalent metal transporter 1)をSYBR Greenを用いたReal-time PCR法、生体防御機構としてオートファジー関連分子(LC3-II)をWestern blot法にて解析した。

(3) NIH3T3細胞を用いた鉄キレート状態が酸化ストレスにおよぼす影響

培養細胞実験として鉄欠乏モデルには、鉄キレート剤(メシル酸デフェロキサシン:DFO)を用い作成することができる。そこで、NIH3T3細胞を用い、DFO処理後、total RNAを抽出後、酸化ストレスマーカー(HO-1:heme oxygenase 1, MnSOD, Cu/Zn-SOD)についてSYBR Greenを用いたReal-time PCR法により解析を行った。またタンパク質の酸化については、カルボニル化を指標にWestern blot法により解析した。

(4) NIH3T3細胞を用いた鉄キレート状態が細胞老化におよぼす影響

これまでに幼若期の鉄欠乏状態は銅の蓄積を介した肝中脂質過酸化量や心臓中酸化タンパク質の増大させることから、鉄欠乏状態による酸化ストレスの増大が細胞老化を誘発する要因であることを示唆している。そこで本研究では、『鉄欠乏状態による酸化ストレスの増大が老化を促進するのか?』に着目し、鉄欠乏による活性酸素種(ROS)の産生メカニズムと細胞老化との関連を解明することを目的とした。鉄欠乏モデルには鉄キレート剤(DFO)を用い、オートファジー実行分子群(*Beclin-1*, *Atg14L*, *UVRAG*, *Vps34*, *p62*)についてSYBR Greenを用いたReal-time PCR法、細胞老化マーカーである β -ガラクトシダーゼ活性および老化関連分子群(p53, p16)のタンパク質発現量についてはWestern blot法にて解析した。

4. 研究成果

(1) 老化促進モデルマウスを用いた鉄欠乏食投与と大腸炎への影響

生存率および大腸炎発症リスクについて解析した結果、正常食群、鉄欠乏食投与群と

比較して、DSS 併用群では著しい生存率の低下と出血が認められた。また DSS 併用群の生存率が 70%となったため、飼育期間を 4 週間に変更した。血中ヘモグロビン値は正常群に対し、鉄欠乏食を投与した群で有意な低下を示し、DSS 併用群も同様に低値を示した。大腸粘膜における炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 の遺伝子発現量は、鉄欠乏食投与群に対し、DSS 併用群において著しい発現の増加が認められた。また LC-MS/MS 法を用い、鉄欠乏と炎症で変動するタンパク質の同定を行った結果、鉄欠乏食投与群に対し、DSS 併用群では、脳で Peroxiredoxin-1、脾臓で α -actinin-1、腎臓で Endoplasmic reticulum chaperone 1 の発現が特異的に増大することを明らかにした。これら同定したタンパク質を Western blot 法にて確認したところ、正常モデルマウス(SAMR1)と比し、SAMP6 マウスにおいて、その発現が高いことを明らかにした。このことから炎症性サイトカインや酸化タンパク質の発現量が増加することで老化期の生体防御機構を維持していることが示唆された。

(2)若齢マウスを用いた鉄欠乏食投与と酸化ストレスへの影響

CTL 群と比較して摂餌量、体重増加量は ID 群有意に減少した。血中ヘモグロビン値は CTL 群に対して ID 群で有意に減少し、心臓重量は CTL 群に対して ID 群で有意な増加を示した。生体防御分子群に関して、Nrf2 の核移行が認められ、HO-1, NQO1, MnSOD は ID 群で、その発現が増加した。すべてのミネラルトランスポーター分子(Zip14, CTR1, DMT1)は CTL 群に比し、ID 群で優位に増加していた。タンパク質代謝関連分子において、CTL 群に対して ID 群でタンパク質のカルボニル化ならびに LC3-II の発現上昇が認められた。以上のことから、鉄欠乏時にタンパク質の酸化が亢進され、これに対する生体防御機構として、オートファジーが活性化することを明らかにした。

(3)NIH3T3 細胞を用いた鉄キレート状態が酸化ストレスにおよぼす影響

マウス繊維芽細胞である NIH3T3 細胞に鉄キレート剤である deferoxamine(DFO)処理を行った結果、DCFDA および MitoSox 染色法により ROS がコントロール(CTL)に比し顕著に増加し、作用機序として、ROS 産生酵素 $p47^{phox}$ および $p67^{phox}$ の遺伝子発現の増大と抗酸化酵素 *catalase* の遺伝子発現の低下によることを明らかにした。さらに鉄欠乏による ROS 産生が $p47^{phox}$ 依存的吗どうかを明らかにするために $p47^{phox}$ のノックダウン(KD)を行った。その結果、DFO 単独処理に比し、 $p47^{phox}$ KD 群で ROS 産生量および酸化タンパク質量が有意に低下した。加えて、DFO 処理により増加した酸化タンパク質がどのような作用機序で制御されているのかを明らかにするために、

24h の DFO 処理後(0h)、通常の培地に戻し、6h, 9h, 24h と時間依存的な酸化タンパク質の変動を解析した。その結果、24h の DFO 処理後(0h)に比し、DFO 除去時間依存的に酸化タンパク質量が減少することを見出した。また、オートファジー阻害剤である 3-Methyladenine(3-MA)と DFO の併用処理を行った。その結果、DFO 単独処理と比較して、3-MA 併用処理した群において、カルボニル化タンパク質が著しく増強することを明らかにした。さらに DFO 処理下において、タンパク質凝集体と不溶性タンパク質量は CTL 群と比較して増加することを確認した。以上のことから、鉄欠乏状態は活性酸素シグナルを増大させることで酸化ストレスを惹起することが示唆された。

(4)NIH3T3 細胞を用いた鉄キレート状態が細胞老化におよぼす影響

タンパク質分解機構であるオートファジーの活性化が示唆されたことから、オートファジーマーカー分子 LC3-II のタンパク質発現レベルおよびオートファジー関連分子群 *Beclin-1*, *Atg14L*, *UVRAG*, *Vps34*, *p62* の遺伝子発現についての解析を行った。その結果、DFO 処理により LC3-II の発現および全てのオートファジー関連分子の遺伝子発現が上昇した。続いて、オートファジー関連分子である LC3-II とアダプター分子である *p62/SQSTM1* のタンパク質発現レベルについて解析した結果、DFO 処理により LC3-II および *p62/SQSTM1* 発現が上昇した。さらに *p62/SQSTM1* ノックダウン(KD)と DFO の併用処理を行った結果、*p62/SQSTM1* KD 細胞において、酸化タンパク質が著しく増強した。以上から、鉄欠乏状態による異常タンパク質の増大が細胞老化を誘導するのではないかと推察した。そこで、続いて老化マーカーである β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、CTL に比し、DFO 処理により β -ガラクトシダーゼ活性は有意に増加した。さらに CTL 群に対し、DFO 処理群において、細胞老化関連分子である *p53*, *p16* のタンパク質発現およびエネルギーセンサー分子である AMPK のリン酸化は増加したが、オートファジー抑制分子である mTOR のリン酸化は減少した。以上のことから、鉄欠乏時には、LC3-II と *p62/SQSTM1* を介したオートファジーによるタンパク質分解機構を活性化することで、ROS による異常タンパク質の蓄積を除去し、細胞内恒常性を維持するが、慢性的な ROS 蓄積に伴うタンパク質の凝集により細胞老化が亢進することが示唆された。

以上のことから、鉄欠乏状態が酸化ストレスを亢進することを動物試験および培養細胞試験からも明らかにすることができ、鉄過剰とは異なる機構で鉄欠乏状態も酸化ストレスを惹起するメカニズムがあることを初めて提唱することができた。また、作用機序として、鉄欠乏状態が *Nox2*($p47^{phox}$, $p67^{phox}$)

の発現を正に制御することで活性酸素シグナルの増大であることを明らかにした。その一方で、活性酸素種増大に伴うタンパク質の酸化に対し、タンパク質分解機構であるオートファジーも誘導することで生体内恒常性を維持することが示唆された。しかしながら、慢性的なオートファジーは細胞老化を誘導することが報告されており、本研究課題においても、鉄欠乏状態は細胞老化を誘導することを見出した。これまでに鉄欠乏食投与が老加齢疾患のひとつである骨粗鬆症発症リスクを上昇させることも今後、鉄欠乏と酸化ストレスとの関連を明らかにする必要があるものと考えらる。

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)

1: Hirofumi Inoue, Ken-Ichi Kobayashi, Moussa Ndong, Yuji Yamamoto, Sin-Ichi Katsumata, Kazuharu Suzuki, Mariko Uehara, Activation of Nrf2/Keap1 Signaling and Autophagy Induction against Oxidative Stress in iron deficiency. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 査読有り 2015; 79(8):1366-8

〔学会発表〕(計9件)

(国内学会)

1: 井上博文、塙信彰、勝間田真一、高橋信之、上原万里子、鉄欠乏によるオートファジー誘導と生体防御機構、第19回日本フードファクター学会学術大会(2014年11月8日~11月30日、鹿児島)

2: 井上博文、勝間田真一、高橋信之、上原万里子、鉄欠乏時では活性酸素シグナルセンサーとオートファジーを活性化することで細胞内恒常性を維持する、日本農芸化学会2015年度大会(2015年3月27日~3月30日、札幌)

3: 井上博文、塙信彰、勝間田真一、坪井理恵、高橋信之、上原万里子、鉄欠乏状態における異常タンパク質分解システム活性化機構に関する研究、日本食生活学会第50回記念大会(2015年5月30日、東京)

4: 井上博文、小林謙一、鈴木司、山本祐司、勝間田(坪井)理恵、勝間田真一、高橋信之、上原万里子、鉄欠乏状態が活性酸素シグナルとタンパク質品質機構に及ぼす影響、第96回日本栄養・食糧学会関東支部大会(2015年9月5日~9月6日、新潟)

5: 井上博文、小林謙一、鈴木司、山本祐司、勝間田真一、勝間田(坪井)理恵、高橋信之、上原万里子、鉄欠乏状態が細胞老化と細胞内浄化機構オートファジーに及ぼす影響、日本農芸化学会2016年度大会(2016年3月27日~3月30日、札幌)

(招待講演:ワークショップ指名講演)

1: 井上博文、勝間田(坪井)理恵、高橋信之、上原万里子、鉄欠乏状態が加齢疾患リスクと活性酸素シグナルに与える影響、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会)(2015年12月1日~12月4日、神戸)

(国際学会)

1: Hirofumi Inoue, Shin-Ichi Katsumata, Ken-Ichi Kobayashi, Yuji Yamamoto, Kazuharu Suzuki, Mariko Uehara, Dietary iron deficiency induces expression of metal-ion transporters and anti-oxidant enzymes in mouse heart, The 8th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition, APCCN 2013 (2013年6月11日~6月13日)

2: Hirofumi Inoue, Nobuaki Hanawa, Nobuyuki Takahashi, Mariko Uehara, Iron deficiency regulates oxidative stress via inducing anti-oxidant enzymes and activating autophagy, 12th Asian Congress of Nutrition (2015年5月14日~5月17日、横浜)

3: Hirofumi Inoue, Ken-Ichi Kobayashi, Tsukasa Suzuki, Yuji Yamamoto, Sin-Ichi Katsumata, Rie Katsumata-Tsuboi, Nobuyuki Takahashi, Mariko Uehara, Iron deficiency induces autophagy through activation of Nrf2/Keap1 system and phosphorylation of p62 (Thr351) against oxidative stress, The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF 2015) (2015年11月21日~11月25日、ソウル)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
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

東京農業大学・応用生物科学部・助教

井上 博文 (Inoue Hirofumi)

研究者番号：10639305

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：