

平成 30 年度 プロジェクト研究費研究実績報告書

令和元年 5 月 16 日

代表者 有田 安那

研究課題名	short-acting mucosal block の鉄吸収抑制メカニズムの解析-誘導因子としての酸化ストレスの検証-
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日
共同研究者	
1. 今年度の研究概要	
<p>鉄欠乏は世界的な栄養問題である。鉄は必須微量元素である一方、過剰時や欠乏時に生体に害をおよぼす。鉄代謝系には積極的な排泄系がなく、生体の鉄量は小腸での鉄吸収調節により厳密に制御される。近年、鉄欠乏ラットの十二指腸に 0.5~1mg 程度の鉄を投与することで即時かつ一過性に鉄吸収が抑制される現象が明らかになった (short-acting mucosal block; SAMB) (Shinodara, 2014)。この現象は、通常の食事でも誘導される可能性が高く、鉄欠乏の改善をめざした効率的な鉄補給法の確立のために SAMB の鉄吸収抑制メカニズムの解明が急がれる。</p> <p>本プロジェクトでは、SAMB の鉄吸収抑制機構を解明するため、SAMB 誘導時に鉄由来の酸化ストレスが鉄輸送体の内在化を誘発する可能性を検証する予定であったが、研究経費の圧縮にともない内容を変更し、SAMB 誘導時の鉄輸送体 Divalent metal transporter 1 (DMT1) および Ferroportin (FPN) の局在変動と鉄吸収抑制の関係性について検証した。</p> <p>【実施内容】</p> <p>4 週齢の Wistar 系雄性ラットを 2 群に分け、AIN-93G または鉄無添加食を与えて 3 週間飼育した。各群をさらに 3 群に分け、十二指腸を麻酔下で結紮し、1mg の鉄を含む FeSO₄/0.5% PEG/10mM 塩酸溶液を投与した。投与 15、60 分後に、速やかに門脈および動脈血から採血した。また、mucosal block (MB) を誘導するために、10 mg の鉄を含む FeSO₄/0.5% PEG/10mM 塩酸溶液を胃内投与し 3 時間静置した条件も作製した。十二指腸を摘出・洗浄後、速やかに OCT コンパウンドを用いてドライアイス/ヘキサン中で包埋した。凍結切片の作製は外部委託(株式会社ジェノスタッフ)し、得られた切片について免疫組織化学的染色を施し、DMT1 および FPN タンパク質の細胞内局在の変動の有無を調べた。本プロジェクトでは、本学にない施設や機器を使用するため、動物実験および電動蛍光顕微鏡(Array Scan, Thermo Scientific)による解析は、首都大学東京の篠田教授の協力を得て実施した。</p> <p>【測定項目】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 体重、摂食量、臓器重量 ・ 血液生化学検査(ヘモグロビン、ヘマトクリット) ・ 免疫組織化学 (DMT1-IRE、FPN) ・ 鉄吸収率 	

2. 研究の成果

鉄欠乏ラットの十二指腸に 1mg の鉄を含む 10mM 塩酸溶液を投与し、15、30 分後の鉄吸収量と DMT1 および FPN タンパク質の局在変動について解析した。鉄充足群と比較して、鉄欠乏群の鉄吸収率は鉄投与 15 分後に抑制され、SAMB の誘導を確認した。十二指腸 DMT1-IRE タンパク質は、鉄欠乏時に冊子縁膜上に沿って強く発現し、鉄投与 15 分、60 分後においては細胞質内にも斑点状の弱い染色が確認された。比較対象として、鉄剤の服用により数日にわたって鉄吸収が抑制される MB を誘導するために、鉄欠乏ラットに 10mg の鉄を経口投与した結果、十二指腸 DMT1-IRE タンパク質は冊子縁膜上に発現するとともに SAMB 誘導時よりも強い斑点状の染色が観察された。一方、FPN タンパク質は十二指腸吸収上皮細胞の基底膜側に染色され、SAMB 誘導条件においては局在変動を示さなかった。以上より、DMT1-IRE タンパク質の内在化は、SAMB における吸収抑制の一端を担う可能性が示唆された。一方、FPN タンパク質は SAMB の鉄吸収抑制には関与しない可能性が示唆された。

SAMB の鉄吸収抑制メカニズムの可能性として、①DMT1 の分解、②DMT1 の内在化、③DMT1 の構造変化、④取り込んだ鉄を管腔側へ汲みだす仕組みの存在などが挙げられる。これまでに①、②については検証済であるため、今後は③の構造変化の可能性を中心に検証する予定である。

3. 研究成果の公表実績・予定（年月日、方法）

【予定】

2019 年度中に英文学術雑誌に原著論文として発表するために、現在論文を執筆中である。