

(様式 3-1)

平成 29 年度 プロジェクト研究費研究実績報告書

平成 30 年 5 月 10 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～十二指腸 DMT1 タンパク質の局在変動を中心に～
研究期間	平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 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が、過剰時・欠乏時にそれぞれ生体への有害作用を示し、健康な生活において鉄恒常性の維持は重要である。鉄代謝系は積極的な排泄系を持たないため、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ている。</p> <p>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) (Shinoda ら、2014)。この現象は、通常の食事やサプリメントの服用などでも、容易に誘導される可能性が高く、鉄欠乏の予防・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。そこで本プロジェクトでは、食事時の非ヘム鉄吸収に必須である divalent metal transporter 1 (DMT1)局在を調べ、SAMB の鉄吸収抑制に関与する可能性を中心に検証した。</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。コントロール溶液は 0.5% PEG/10mM 塩酸とした。投与 5、15、30 分後に、速やかに門脈および動脈血から採血した。さらに十二指腸を摘出・洗浄後、速やかに OCT コンパウンドを用いてドライアイス/ヘキサン上で包埋した。凍結切片の作製は外部委託(株式会社ジェノスタッフ)とし、得られた切片について免疫組織化学的染色を施し、DMT1 タンパク質の細胞内局在の変動および細胞内小器官との共局在の有無を調べた。染色像の蛍光強度は、ハイコンテンツアナリシスにより客観的に数値化し、解析した。解析用ソフトウェアおよび電動蛍光顕微鏡 (Array Scan, Thermo Scientific)は、本学にはない設備であるため、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、血清鉄、UIBC、TIBC) ・ 免疫組織化学 (DMT1-IRE、DMT1-nonIRE、LAMP1、EEA1、DAPI) ・ 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、5、15、30 分後の鉄吸収量と DMT1 異性体タンパク質の発現を併せて解析した。鉄充足群と比較して、鉄欠乏群の鉄吸収率は鉄投与からわずか 5 分後においても抑制傾向を示し、15 分後に最も強く抑制された。十二指腸 DMT1-IRE タンパク質は、鉄欠乏時に腸子縁膜上に沿って強く発現した。鉄欠乏群への鉄投与 15 分、30 分後において、DMT1-IRE タンパク質は細胞質内に斑点状の染色として確認された。しかし、鉄吸収が強く抑制される鉄投与 15 分後よりも 30 分後の方がより多くの DMT1-IRE タンパク質が細胞質内へと内在化していた。このことから、SAMB の鉄吸収抑制は DMT1 タンパク質の内在化に加えて、他の要因が関与する可能性が示唆された。

さらに、内在化 DMT1-IRE のその後の挙動を調べるため、細胞内小器官マーカー（リソソーム（LAMP1）および早期エンドソーム（EEA1））を用いて DMT1-IRE との共染色を試みた。しかし、使用した細胞内小器官のマーカーの抗原特異性に問題があり、共染色することができなかった。

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。①～②についてはこれまでに検証が完了している。今後は③と④の可能性についても、順次検討を進める予定である。

3. 研究成果の公表実績・予定（年月日、方法）

【予定】

・本研究費で得られた成果に加えて十分なデータが揃い次第、英文学術雑誌に原著論文として発表する予定である。（平成 31 年以降）