

平成 25 年度 博士前期課程学位論文要旨

学位論文題名 (注: 学位論文題名が欧文の場合は和訳をつけること)

継代培養細胞 (IEC-6) 単層膜を用いた鉄欠乏時鉄吸収モデルの検討

学位の種類: 修士 (健康科学)

人間健康科学研究科 博士前期課程 人間健康科学専攻 ヘルスプロモーションナインズ学域

学修番号 12899602

氏名: 大塚 紗恵

(指導教員名: 篠田 粧子)

【背景・目的】

小腸管腔内の非ヘム鉄は 3 価から 2 価に変換され、小腸粘膜上皮に存在する DMT1 によって粘膜細胞内へ取り込まれる。そして生体内の鉄栄養状態に応じて粘膜細胞内の Ferritin (Ft) に貯蔵されるか、基底膜に存在する Ferroportin (FPN) によって血液へと輸送される。DMT1 発現は生体の鉄栄養状態に応答するとされ、鉄欠乏ラットの小腸では DMT1 発現の亢進と共に鉄吸収が増加する。

鉄欠乏時に特有な過剰鉄の吸収抑制を詳細に検討するため、培養細胞による鉄欠乏時鉄吸収モデルの確立が本研究の目的である。これまでに、栄養素吸収研究に広く用いられる Caco-2 細胞 (ヒト大腸癌細胞) の mRNA 発現を調べたが、鉄欠乏条件下での明らかな変動を認めなかった。そこで、Caco-2 細胞に比べタイトジャンクションの形成が弱い DMT1 発現が高いとされる IEC-6 細胞 (正常ラット小腸細胞) を用いて、鉄吸収関連タンパク質 mRNA 発現の鉄欠乏への応答について検討した。また、生体内の鉄欠乏の情報が小腸粘膜細胞へ伝達されるメカニズムは明らかになっていない。そこで Transwell insert 上に培養細胞単層膜を形成し、基底膜側から DMT1 発現に影響する因子についても検討した。

【方法】

IEC-6 細胞の鉄吸収関連タンパク質 mRNA 発現と鉄欠乏への応答: IEC-6 細胞を培養プレートまたは Transwell insert (CORNING) 上に播種し、通常培地で 15 日間培養して単層膜を形成した。その後、2 群に分けて通常培地または低鉄培地 (-Fe) で 9 日間培養した。タイトジャンクションの形成は、1 日おきに TEER 値を測定して評価した。細胞を採取し、Realtime PCR にて鉄吸収関連タンパク質 mRNA 発現を解析した。

基底膜からの鉄欠乏情報伝達に関する検討: IEC-6 細胞を Transwell insert に播種し、通常培地で 15 日間培養した後、基底膜側に Apo-transferrin (SIGMA-ALDRICH) または鉄欠乏ラットの血清を添加し、9 日後に細胞を採取して DMT1 mRNA 発現を解析した。

【結果・考察】

低鉄培地で培養した IEC-6 細胞では、DMT1 mRNA 発現が通常培地の約 2 倍となり、鉄欠乏は IEC-6 細胞の DMT1 mRNA 発現を亢進させた。Ft mRNA 発現は有意ではないが低下傾向を示し、これらの結果は鉄欠乏ラットにおける遺伝子発現の変動と一致した。鉄欠乏ラット小腸の DMT1 mRNA 発現は約 4-6 倍高くなるが、IEC-6 で約 2 倍に留まったのは、鉄栄養条件が動物と培養細胞では異なることが一因であろう。また鉄欠乏ラットの腸で見られる FPN mRNA 発現の増加が IEC-6 細胞で認められなかったのは、肝臓の Hpcidin 産生など、基底膜側の情報が鉄欠乏ラットと異なっていたためと考えられる。

DMT1 mRNA 発現は管腔側の鉄欠乏条件に最も影響を受け、Ft mRNA 発現は管腔側と基底膜側の鉄欠乏条件が合わさると影響が大きく、FPN mRNA 発現では基底膜側からの影響が大きくなった。これらの結果から、細胞で鉄欠乏時鉄吸収モデルを再現するために、管腔側および基底膜側の栄養条件の調節が必要である。鉄欠乏時には血中の Apo-transferrin 濃度の上昇など、多くの血中成分が変動する。そこで、Apo-transferrin およ

び鉄欠乏ラット血清を基底膜側へ添加して DMT1 mRNA 発現を調べたが、影響は認められなかった。したがって DMT1 mRNA 発現は基底膜側からの情報ではなく、管腔側の鉄欠乏の影響を強く受けている可能性がある。