

(西暦) 2019 年度 博士前期課程学位論文要旨

学位論文題名 (注: 学位論文題名が英語の場合は和訳をつけること)

鉄欠乏がラット小腸の抗酸化システムに及ぼす影響

学位の種類: 修士 (健康科学)

首都大学東京大学院

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サイエンス学域

学修番号 17899603

氏名: 小泉真緩

(指導教員名: 篠田粧子)

【背景・目的】

鉄は、生体にとって不可欠な微量元素であるが、過剰に取り込まれると酸化ストレスの発生に関与する。鉄欠乏時の小腸では鉄吸収が亢進するが、鉄貯蔵体(フェリチン)発現が低下するため、酸化ストレス源である Labile iron pool (LIP) が増加する環境にある。そのため、鉄欠乏の生体は酸化ストレスに弱いと考えられている。一方、これまでの研究で、鉄欠乏時の十二指腸に鉄を投与すると LIP が増加するにも関わらず、脂質過酸化の指標 MDA 生成量が低く保たれることを見出している。この時、鉄欠乏の十二指腸では抗酸化物質であるグルタチオン(GSH)の濃度が著しく上昇し、通常群とは異なるフェリチン非依存的抗酸化メカニズムが働くことが示唆された。本研究の目的は、鉄欠乏のラット小腸に特有なフェリチン非依存的抗酸化システムについて明らかにすることである。実験 1 では、鉄欠乏時の小腸における抗酸化メカニズムが複数の抗酸化物質を統一的に誘導する因子によって制御される可能性について検討した。まず、非ヘム鉄の吸収部位である十二指腸の抗酸化システムを網羅的に把握するため、酸化ストレス関連遺伝子の発現を小腸の他の部位(空腸、回腸)と比較した。その結果、十二指腸では酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 の制御下にある遺伝子発現が高く、また Nrf2 タンパク質の発現自体も高いことが明らかとなった。鉄欠乏が十二指腸の遺伝子発現に及ぼす影響は、Nrf2 制御下の遺伝子に変動は見られず、H₂O₂ 濃度を低下させる遺伝子発現の亢進を確認した。そこで、実験 2 では、異なる鉄欠乏レベルのラットを作製して十二指腸における H₂O₂ 濃度の変動を調べ、H₂O₂ 濃度が鉄投与時の酸化ストレス抑制に及ぼす影響について検討した。

【方法】

実験 1: 小腸における酸化ストレス関連遺伝子の発現プロファイリングと Nrf2 の発現及び局在の検討

4 週齢の Wistar 系雄ラット 14 匹を 2 群に分け、鉄充足飼料または鉄欠乏飼料を 3 週間与えて通常群 FeS (n=7)、鉄欠乏群 FeD (n=7) とした。FeS および FeD ラットの小腸を摘出し、3 等分(上部、中部、下部)した。上部のうち幽門直下から Treitz 靱帯までを十二指腸、その他を上部 2 とした。小腸各部位から粘膜を採取して total RNA を抽出し、cDNA を合成した。RT2 Profiler PCR array (Rat oxidative stress, Qiagen, Hilden, Germany) に供し、酸化ストレスに関連する 84 遺伝子について発現プロファイルを解析した。十二指腸および小腸中部の凍結ブロックを作製し、5 μ m に薄切した切片を固定後、0.1 % Triton-X 溶液で膜の透過処理を行った。一次抗体 (Anti-Nrf2, Abcam, Cambridge, UK, 200 倍) を添加後、2 次抗体 (Alexa Fluor 647, Thermo Fisher, MA, USA, 100 倍) と Cellstain-DAPI solution (Dojindo, Kumamoto, Japan) を加え、反応させた。標本は封入後、Array Scan (Thermo Fisher, MA, USA) を用いて Nrf2 の発現および局在を調べた。

実験 2: 鉄欠乏レベルの異なるラット十二指腸における H₂O₂ および GSH 濃度の変動と脂質過酸化 (MDA 生成量) の抑制

4 週齢の Wistar 系雄ラット 48 匹を 6 群に分け、4 週齢から 3 週間(③群)、5 週齢から 2

週間(②群)、6週齢から1週間(①群)、鉄充足飼料または鉄欠乏飼料を与えて、FeS-③、FeS-②、FeS-①、FeD-③、FeD-②、FeD-①の6群(各n=8)とした。精製飼料を投与するまで実用飼料(CE-2)を投与した。各群8匹のうち5匹のラットは、麻酔下で十二指腸を結紮して1mgの鉄を含むFeSO₄溶液を投与し、15分後に消化管内容物と粘膜を回収した。3匹は鉄無投与のコントロール群とした。十二指腸粘膜はホモジナイズし、フェリチンタンパク質(Rat Ferritin ELISA, Immunology Consultant Laboratory, OR, USA)、H₂O₂濃度(Hydrogen peroxide colorimetric detection kit, Enzo Life Sciences, NY, USA)、グルタチオン量(GSSG/GSH Quantification Kit, Dojindo, Kumamoto, Japan)、脂質の過酸化(TBARS Assay kit, Cayman Chemical, MI, USA)を測定した。鉄取り込み量は、原子吸光分光光度計(SHIMAZU AA-670, Kyoto, Japan)を用いて消化管内容物の鉄含有量を測定し、鉄投与液の鉄含有量との差を求めた。

【結果・考察】

実験1: 十二指腸と小腸中部・小腸下部の酸化ストレス関連遺伝子の発現プロファイリングを比較したところ、十二指腸では小腸の他の部位と異なる抗酸化システムが存在することが示された。十二指腸で小腸中部に比べ発現が亢進した遺伝子のうち、Nrf2の制御下にある遺伝子の割合は、約62% (FeS) - 65% (FeD)、小腸下部と比べて発現が亢進した遺伝子の約79% (FeS) - 69% (FeD)と高かった。免疫染色の結果、十二指腸のNrf2発現は小腸中部に比べ亢進していたことから、十二指腸における抗酸化システムはNrf2により転写調節されている可能性が高いと考えられる。非ヘム鉄の吸収部位である十二指腸では、鉄欠乏でperoxiredoxin6 (Prdx6), sulfiredoxin 1 homolog (*S. cerevisiae*) (Srxn1), lactoperoxidase (Lpo)の発現が亢進した。Fold regulationが2以下ではあるものの、Catalase (Cat), Superoxide dismutase 1 (Sod1)の発現低下、Glutathione peroxidase 2 (Gpx2)の発現亢進も認められた。これらの発現変動は、何れもH₂O₂濃度を低下させる働きを有する。一方、Nrf2制御下に遺伝子の発現には変動が認められなかった。したがって、十二指腸において鉄欠乏で亢進する抗酸化活性はNrf2の転写調節を介さず、H₂O₂濃度を低く保つ働きによってFenton反応を抑制するためと推測された。

実験2: 鉄欠乏飼料投与1週間後のFeD-①ではフェリチンが低下し、潜在性鉄欠乏となった。鉄欠乏飼料投与2及び3週間後では、血中ヘモグロビンの低下が認められ、鉄欠乏性貧血の状態であった。実験飼料投与期間1~3週のラットをまとめてFeS, FeDとすると、FeDでH₂O₂濃度の低下、GSH濃度の上昇を認めたが、投与期間の違いによる経時的影響は認められなかった。FeDではフェリチンタンパク質発現が低下して酸化ストレスが発生しやすい環境にあったが、鉄投与時のMDA生成量にはFeSと比べて有意差は認められなかった。H₂O₂濃度とMDA生成量、GSH濃度とMDA生成量の相関を検討したところ、H₂O₂濃度とMDA生成量には正の相関(FeD-②: 0.65, FeD-③: 0.71)が、GSH濃度とMDA生成量には負の相関(FeS: -0.67, FeD: -0.73)が認められた。したがって鉄欠乏時の小腸では、H₂O₂濃度が低下し、グルタチオン濃度が上昇することにより、酸化ストレスを抑制する働きがあると考えられる。

【まとめ】

十二指腸粘膜では小腸の他の部位に比べてNrf2発現が高く、抗酸化システムがNrf2で制御されている可能性が高いことが分かった。一方、鉄欠乏の十二指腸粘膜で働くフェリチン非依存的抗酸化システムはNrf2の調節を介さず、Prdx6, Lpo, Srxn1, Gpx2の発現亢進とSod1の発現低下によるH₂O₂濃度の低下、GSH量の増加がFenton反応を抑制するためと考えられる。