

バイオマーカーによるマグネシウム摂取不足の評価システム構築

岡田 晋治

東京大学大学院農学生命科学研究科

概要

近年、食生活の変化、偏った食事や加工食品の利用、化学肥料の使用による土壌の変質などによって、微量栄養素であるミネラルの摂取不足が引き起こされている。日本では、カルシウム、マグネシウム、鉄(女性)、亜鉛などの平均摂取量は、日本人の食事摂取基準に定められた推定平均必要量や推奨量に達していない。世界各国でも同様に様々なミネラルの摂取不足である。ミネラル摂取不足は、例えば、カルシウム摂取不足が骨粗鬆症のリスクを高めるなど、健康やQOL維持の障害となる。一方、各個人がミネラル摂取不足を認知する機会は乏しい。例えば、健康診断における血液検査で調べるのはNa, K, Cl程度である。また、生体の恒常性維持機構によって、血液中のミネラルバランスは重度の欠乏・過剰でない限り変動しない。食による健康維持・QOL向上のために、ミネラル摂取不足を簡便かつ精度高く検出する検査方法の社会実装が必要である。

生体の状態を反映したバイオマーカーとして、近年、血液循環マイクロRNA(miRNA)が注目されている。ミネラル摂取不足に関して血液循環miRNAの研究事例はわずかに存在するが、未だ十分とは言えない。本申請研究では、ヒトにおける血液循環miRNAを指標としたミネラル摂取不足の評価システム構築を最終目的とし、まず、動物モデルにおいて軽度マグネシウム摂取不足に応答して変動する血液循環miRNAの同定を実施した。

本研究では、マウスに70% Mg充足食(7MD)を摂餌し、14日間の飼育を行うことで軽度Mg摂取不足モデルを作出した。対照群として、通常食(Ctl, 100% Mg充足)を摂餌したマウスを設定し、軽度Mg摂取不足が血中miRNA量に与える影響をしらべた。血中miRNAをmiRNA-seqに供し、解析を行った結果、全miRNA種の約25%が検出された。2回の繰り返し実験を行ったところ、それぞれCtl群と7MD群の群間比較で変動するmiRNA種として9種、7種が同定された。2回の繰り返し実験の再現性のある変化として、*mmu-miR-144-5p*の存在量の増加が検出された。血中*mmu-miR-144-5p*の存在量の増加は軽度Mg摂取不足のバイオマーカーとなる可能性が提示された。

今後、再現性のさらなる確認、頑強性のチェック、複数のmiRNAsの組み合わせによるバイオマーカー探索研究などを実施することで、軽度マグネシウム摂取不足のバイオマーカーとしてのmiRNAsの有用性が示されると期待される。

1. 研究目的

近年、食生活の変化、偏った食事や加工食品の利用、化学肥料による土壌の変質などによって、微量栄養素であるミネラルの摂取不足が起きていることが想定される。日本では、令和元年国民健康・栄養調査¹⁾によると、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)、鉄(Fe, 女性のみ)、亜鉛(Zn)などの平均摂取量が、日本人の食事摂取基準²⁾

に定められた推定平均必要量や推奨量に達していない。例えば日本人の平均Mg摂取量(20~29歳)は男性227 mg/日、女性192 mg/日であり、推奨量(18~29歳)である男性340 mg/日、女性270 mg/日を大きく下回っている。また日本人の平均Zn摂取量(20~29歳)は男性9.8 mg/日、女性7.3 mg/日であり、推奨量(18~29歳)である男性11 mg/日、女性8 mg/日をやはり下回っている。

ミネラル摂取不足は、例えば Ca 摂取不足による骨粗鬆症リスクの上昇や Zn 摂取不足による味覚障害の発生など、健康や QOL 維持の障害となる。

Mg は、タンパク質合成、筋肉や神経の機能、血糖コントロールや血圧調整など生体中の反応を制御する、300種類以上の酵素系の補助因子である³⁾⁻⁵⁾。エネルギー産生、酸化的リン酸化、解糖系にも必要であるほか、骨格系の発達に役立ち、DNA や RNA 抗酸化物質グルタチオンの合成にも必要である。また、神経インパルス伝導や筋収縮、カルシウムやカリウムイオンの細胞膜通過時の能動輸送の役割といった機能を持つ⁵⁾。

Mg は腎臓での排泄によって量が調節される。これは腸管吸収や骨の代謝に影響するホルモンの働きによるもので、PTH(副甲状腺ホルモン)は Mg に対して腸管吸収、骨からの再吸収、腎臓からの再吸収を増大させることで、血清 Mg を増加させる⁶⁾。長期の Mg 摂取不足が骨粗鬆症、心疾患、糖尿病といった生活習慣病のリスクを上昇させる可能性も示唆されている^{2,7)}。一方で、食事由来摂取量が少ない場合を除いて、健康な人では腎臓が Mg の尿中排泄を制限して体内量を調節するため、明らかな症状として Mg 欠乏が認められることはほとんどなく⁵⁾、疫学調査でも、現在の摂取不足状況において低 Mg 血症が起こらない事例が報告されている^{8,9)}。Mg 欠乏症の初期徴候には、食欲不振、悪心、嘔吐、疲労、脱力感があり、悪化すると、痺れ、刺痛、筋収縮、筋痙攣、発作痙攣、人格変化、不整脈、冠状動脈攣縮が生じる可能性がある^{3,4)}。

健康診断の検査項目に含まれないといった要因から、各個人がミネラル摂取不足を認知する機会は乏しい。血清/血漿中濃度は欠乏状態の指標としてよく使用されるが、生体の持つ恒常性維持機構によって、血清/血漿中濃度と実際の欠乏状態の間には乖離が見られることがある。たとえば、血清/血漿中 Zn 濃度が必ずしも細胞中の Zn の状態を反映せず、検査値に異常がなくても Zn 欠乏の臨床的影響が起こりうる事が報告されている¹²⁾。また、血清中 Mg 濃度と体内の総 Mg 量の間に関係がないという報告例もあり¹³⁾、新たな指標を併用することは診断の確実性を向上させうる。こうしたことから、食による健康維持・QOL 向上のために、ミネラル摂取不足を簡便かつ精度高く検出する検査方法の社会実装が必要である。

生体の状態を反映したバイオマーカーとして、血液循環マイクロ RNA(miRNA)が注目されている。例えば、Zn に対する miRNA のバイオマーカー機能に関して、成人男性に食事摂取基準の 3%程度の Zn を含む欠乏食を与えた後、十分な Zn を含む補充食を与えた場合の血液循環 miRNA の応答を調べた研究¹⁴⁾などがある。一方でミネラルやビタミンの摂取不足が血液循環 miRNA に及ぼす影響を調べた研究事例は未だ少ない。本研究は Mg の摂取状況の指標として望ましい miRNA を新規バイオマーカー候補として提示することで、より精度の高い摂取状況診断の可能性を探ることを目的とした。

日本人の平均 Mg 摂取状況に近い 70% Mg 充足飼料を用いたマウスの飼育を行い、血中 miRNA の量変動を解析し、バイオマーカー候補について探索した。

2. 研究方法

2.1 被験動物と飼育方法

AIN-93M ベースの Mg 除去飼料は Research Diets 社に調製を依頼した。これに、通常食(Ctl)は 100% Mg 充足となるよう、Mg 欠乏食(7MD)は 70% Mg 充足となるよう酸化 Mg を加えた。

被験動物として 10 週齢 C57BL/6N male マウス(オリエンタル酵母工業(株))18 匹を用いた。正常食で 1 週間の予備飼育後、平均体重が同程度となるように 2 群に分け(Ctl 群 9 匹, 7MD 群 9 匹)、一方に正常食、もう一方に Mg 欠乏食を 14 日間自由摂取させた。飲料水は Mili-Q を自由摂取させ、恒温恒湿度(室温 $22.8 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ ・湿度 $44 \pm 5\%$)で、明暗それぞれ 12 時間周期(明期 8:00-20:00, 暗期 20:00-8:00)の動物飼育室にて飼育を行った。同様の設定で飼育を 2 回行った。

本飼育開始後 14 日目に解剖を行い、血液(血清)の採取を行った。1 回目の飼育については、解剖直前に 7MD 群の個体が 1 匹死亡したため、C 群 9 匹, 7MD 群 8 匹のデータを用いた。

本実験は、東京大学動物実験委員会の承認を受け、東京大学動物実験実施規則に基づいて行った。

2.2 血液の採取

イソフルラン吸入麻酔下、血液凝固促進剤と分離ゲルの入った採血管を用いて心臓採血を行った。血液は常温で 30 分間程度静置後、氷上に移した。まず 4°C 、 $1900 \times \text{g}$ で 10 分間遠心分離し血清を得た後、 4°C 、 $16000 \times \text{g}$ で

10 分間遠心分離し、そこから上清を採取した。血清上清は-80°Cで保存した。

2. 3 miRNA 解析

2. 3. 1 血清からの miRNA 抽出

miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN 社) を用いて、血清上清 200 μ L から miRNA を含む total RNA として抽出した。得られたサンプルに対し、2. 3. 2, 2. 3. 3 の解析を行った。

2. 3. 2 吸光度測定による miRNA の定量

Quantus™ Fluorometer (Promega 社) を用いて、total RNA 中の miRNA 濃度を測定した。

2. 3. 3 バイオアナライザによる miRNA の品質確認

Agilent Small RNA キット・Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent 社) を用いて、miRNA の品質確認を行った。

2. 3. 4 miRNA-seq 解析

2. 3. 2, 2. 3. 3 で確認できた濃度・品質をもとに、1 回目の飼育については、各群 n=4, 計 8 個のサンプルを、2 回目の飼育については、各群 n=6, 計 12 個のサンプルを、それぞれ選び、DNA チップ研究所(株)に miRNA-seq 解析を依頼した。

出力データ(.fastq)は miRbase Release 22.1 をアノテーションとして、UMI リードカウントに変換した。UMI リードカウントに対し、プログラミング言語 R およびソフトウェア Bioconductor を用いて、解析処理を行った。正規化、群間比較には edgeR 法を用いた。 $P < 0.05$ を有意差ありとみなした。

3. 研究結果

3. 1 動物飼育の結果(飼育 1 回目)

マウスに通常食を給餌した Ctl 群と、70% Mg 充足食を給餌した 7MD 群を本飼育期間 14 日間飼育した。

本飼育 7 日目、14 日目における体重および本飼育期間の体重増加量は Ctl 群と 7MD 群の 2 群間に有意差は見られなかった (Fig. 1)。また、総飼料摂取量についても Ctl 群と 7MD 群の 2 群間に有意差は見られなかった (Fig. 2)。

3. 2 miRNA 解析(飼育 1 回目)

Ctl 群と 7MD 群のそれぞれから 4 個体を選抜し、最終日に取得した血液から抽出した miRNA 画分を miRNA-seq 解析に供した。

得られた miRNA-seq データにおいて、UMI リードカウントが Ctl 群 4 個体、7MD 群 4 個体のいずれかの個体で 2 以上となった miRNA 種、つまり、いずれかの個体で検出された miRNA 種は 538 種であった。

538 種の miRNA の UMI リードカウントを正規化し、主成分分析を行った。第一主成分と第二主成分を用いたプロットでは、Ctl 群と 7MD 群とでクラスターを形成することはなかった (Fig. 3)。

Ctl 群もしくは 7MD 群のどちらかの過半数 (3 個体) で UMI リードカウントが 2 以上となった miRNA 種 241 種について群間比較を行った。 $P < 0.05$ を満たす量変動 miRNA 種は 9 種であった。Ctl 群の平均よりも 7MD 群の平均が高い miRNA 種は、*mmu-miR-144-5p*, *mmu-miR-142a-3p* の 2 種、Ctl 群の平均よりも 7MD 群の平均が低い miRNA 種は、*mmu-miR-483-3p*, *mmu-miR-125b-5p*, *mmu-miR-133a-3p*, *mmu-miR-434-5p*, *mmu-miR-6240*, *mmu-miR-149-5p*, *mmu-miR-30b-5p* の 7 種であった。各個体での正規化後 UMI リードカウントをプロットすると (Fig. 4), *mmu-miR-483-3p* および *mmu-miR-30b-5p* は Ctl 群の分布と 7MD 群の分布が大きく異なっていた。

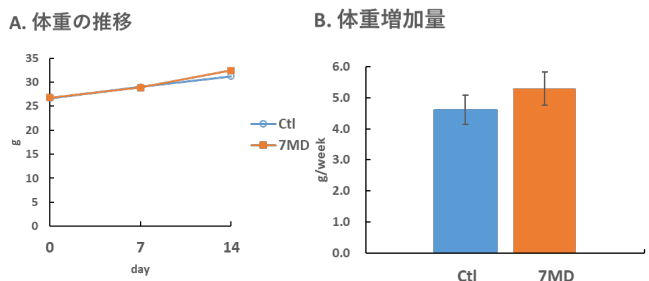


Fig. 1 1 回目の飼育の体重の推移 (A) および体重増加量 (B)

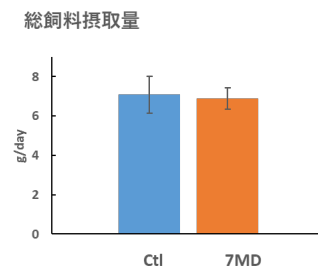


Fig. 2 1 回目の飼育の総飼料摂取量

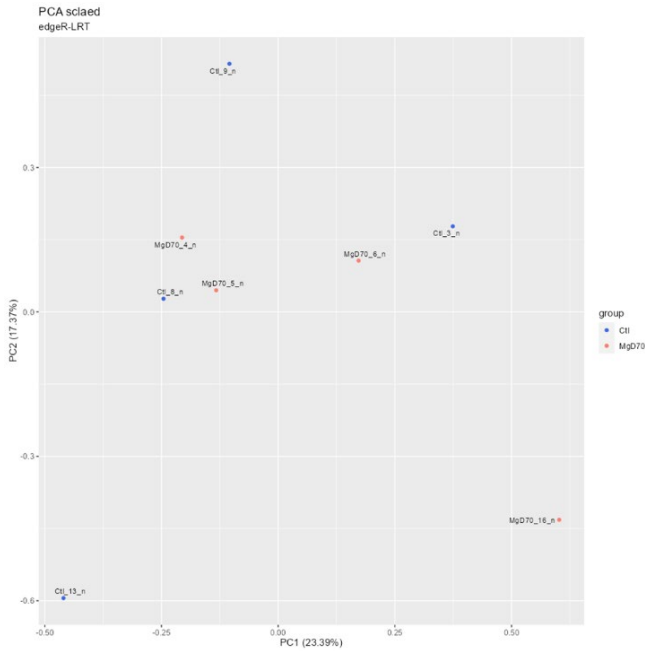


Fig. 3 1回目のmiRNA-seqデータの主成分分析

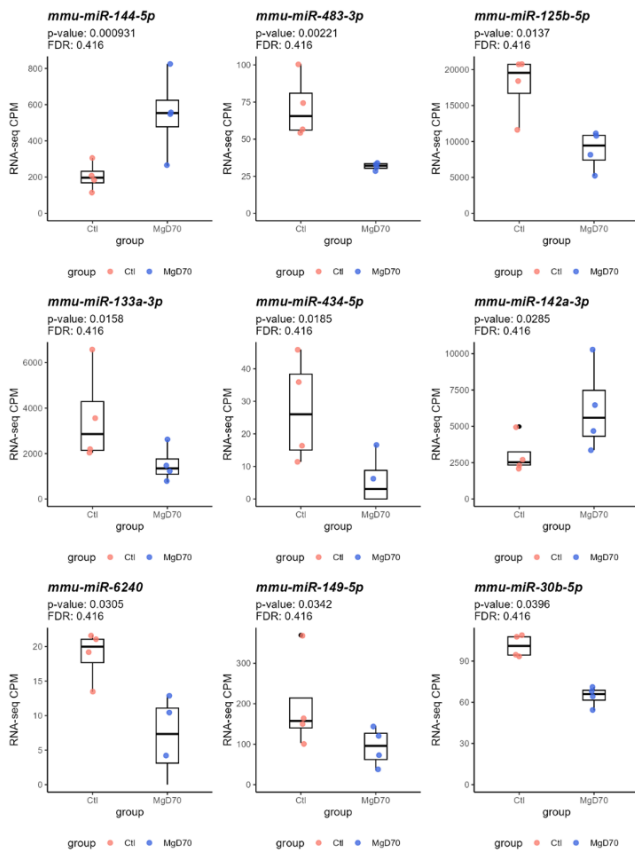


Fig. 4 1回目のmiRNA-seqデータにおいてCtl群と7MD群の群間比較で有意差が検出されたmiRNA種 ($p < 0.05$)

3.3 動物飼育の結果(飼育2回目)

実験の再現性を確認するため、2回目の飼育を行った。

マウスに通常食を給餌したCtl群と、70% Mg充足食を給餌した7MD群を本飼育期間14日間飼育した。本飼育7日目、14日目における体重および本飼育期間の体重増加量はCtl群と7MD群の2群間に有意差は見られなかった(Fig. 5)。また、総飼料摂取量についてもCtl群と7MD群の2群間に有意差は見られなかった(Fig. 6)。

3.4 miRNA解析(飼育2回目)

Ctl群と7MD群のそれぞれから6個体を選抜し、最終日に取得した血液から抽出したmiRNA画分をmiRNA-seq解析に供した。

miRNA-seqデータにおいて、UMIリードカウントがCtl群6個体、7MD群6個体のいずれかの個体で2以上となったmiRNA種、つまり、いずれかの個体で検出されたmiRNA種は467種であった。

467種のmiRNAのUMIリードカウントを正規化し、主成分分析を行った。第一主成分と第二主成分を用いたプロットでは、Ctl群と7MD群とでクラスターを形成することはなかった(Fig. 7)。

Ctl群もしくは7MD群のどちらかの過半数(4個体)でUMIリードカウントが2以上となったmiRNA種161種について群間比較を行った。 $P < 0.05$ を満たす量変動miRNA種は7種であった。Ctl群の平均よりも7MD群の平均が高いmiRNA種は、*mmu-miR-30e-3p*、*mmu-miR-144-5p*の2種、Ctl群の平均よりも7MD群の平均が低いmiRNA種は、*mmu-miR-486b-5p*、*mmu-miR-184-3p*、*mmu-miR-541-5p*、*mmu-miR-382-5p*、*mmu-miR-361-5p*の7種であった。各個体での正規化後UMIリードカウントをプロットすると(Fig. 8)、Ctl群の分布と7MD群の分布が大きく異なるmiRNA種はなかった。

3.5 miRNA解析(飼育1回目と2回目の統合)

2回の飼育で得られたmiRNA-seqデータを合わせ、各群 $n = 10$ のデータを用いて解析を行った。

UMIリードカウントがCtl群10個体、7MD群10個体のいずれかの個体で3以上となったmiRNA種、つまり、いずれかの個体で検出されたmiRNA種は597種であった。

597種のmiRNAのUMIリードカウントを正規化し、主成分分析を行った。第一主成分と第二主成分を用いたプロットでは、Ctl群と7MD群とでクラスターを形成すること

はなかった(**Fig. 9**)。一方、飼育1回目と飼育2回目のそれぞれがクラスターを形成しており、食餌の違い(Ctl 食と7MD 食の差)よりも飼育実験のロット差(1回目と2回目の差)の方が miRNA 量プロファイルへの影響が大きいことが示された。

Ctl 群もしくは7MD 群のどちらかの過半数(6 個体)で UMI リードカウントが3 以上となった miRNA 種 161 種について群間比較を行った。 $P < 0.05$ を満たす量変動 miRNA 種は8 種であった。Ctl 群の平均よりも7MD 群の平均が高い miRNA 種は、*mmu-miR-144-5p*, *mmu-let-7f-5p*, *mmu-miR-142a-3p* の3 種、Ctl 群の平均よりも7MD 群の平均が低い miRNA 種は、*mmu-miR-486b-5p*, *mmu-miR-184-3p*, *mmu-miR-382-5p*, *mmu-miR-541-5p*, *mmu-miR-379-5p* の5 種であった。各個体での正規化後 UMI リードカウントをプロットすると(**Fig. 10**), Ctl 群の分布と7MD 群の分布が大きく異なる miRNA 種はなかった。

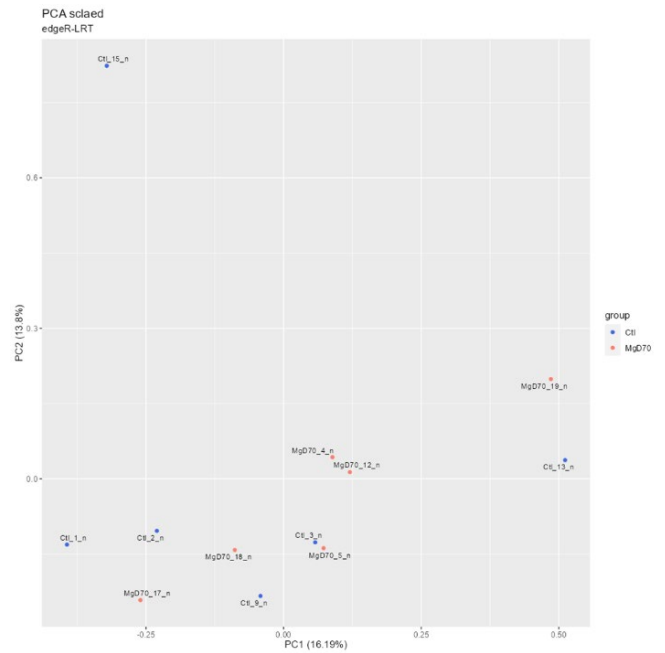


Fig. 7 2 回目の miRNA-seq データの主成分分析

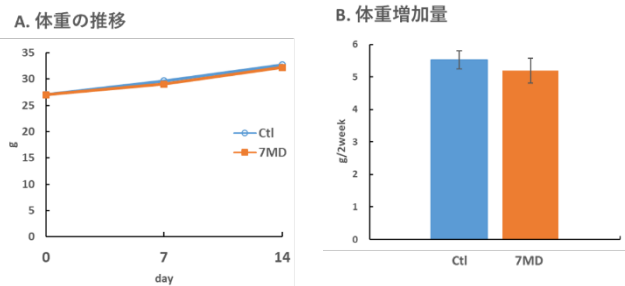


Fig. 5 2 回目の飼育の体重の推移(A)および体重増加量(B)

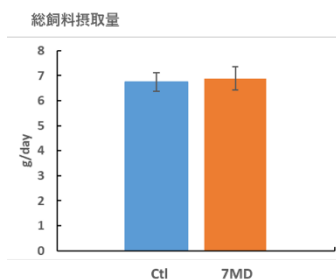


Fig. 6 2 回目の飼育の総飼料摂取量

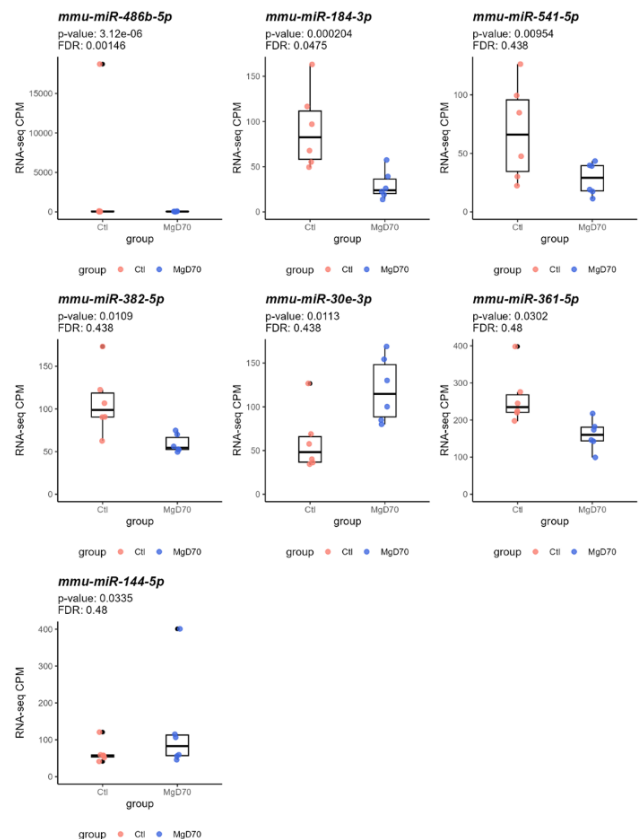


Fig. 8 2 回目の miRNA-seq データにおいて Ctl 群と7MD 群の群間比較で有意差が検出された miRNA 種 ($p < 0.05$)

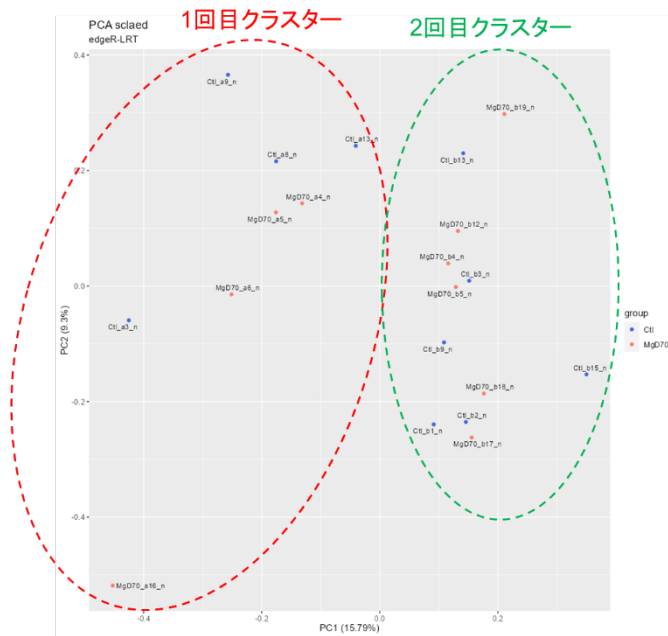


Fig. 9 1回目と2回目の miRNA-seq データ統合解析における主成分分析

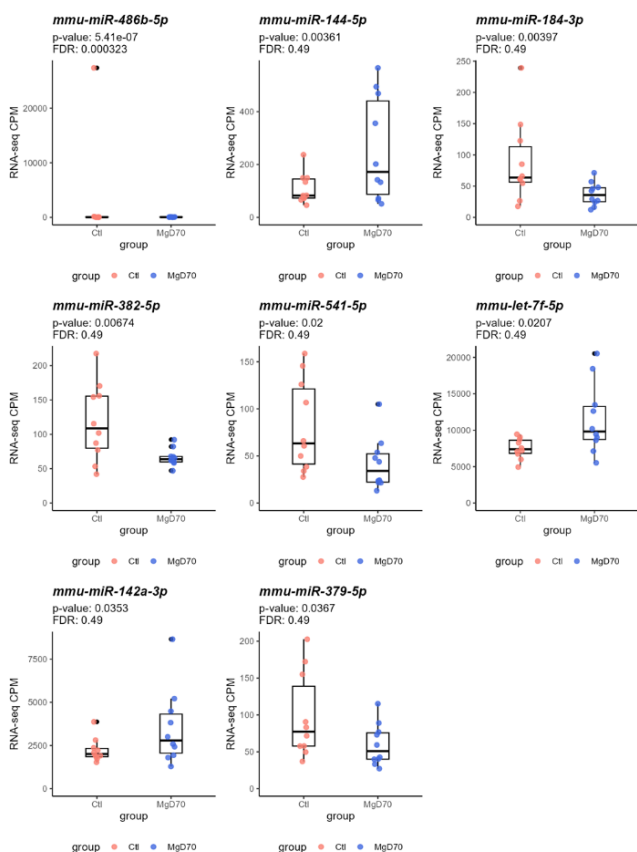


Fig. 10 1回目と2回目の miRNA-seq データ統合解析において Ctl 群と 7MD 群の群間比較で有意差が検出された miRNA 種 ($p < 0.05$)

4. 考察

本研究では、マウスに 70% Mg 充足食 (7MD) を摂餌し、14 日間の飼育を行うことで軽度 Mg 摂取不足モデルを作出した。対照群として、通常食 (Ctl, 100% Mg 充足) を摂餌したマウスを設定し、軽度 Mg 摂取不足が血中 miRNA 量に与える影響をしらべた。

70% Mg 充足は日本人の平均的な Mg 摂取状況を想定したものである^{1), 2)}。また、われわれの過去の研究から摂食行動に影響を与えないことが想定されたため、この充足率設定を行った。これまでに Mg 除去食 (0% Mg 充足) を摂餌した重度 Mg 欠乏動物を用いて、Mg 欠乏の影響を調査した報告が数多くなされている¹⁵⁾。このような Mg 除去食摂餌によってはラットの摂食行動が変化し、摂食量が大きく減少すること、そして、体重が減少することが知られている。一方、本研究で 70% Mg 充足食を摂餌した場合は、摂食量は変化せず、体重の推移および体重増加量も対照群と有意差はなかった。われわれは 80% Mg 充足食を SD ラットに摂餌した場合、摂食量は変化しないことを示している¹⁶⁾。摂食量や体重の変化は生体に大きな影響を与え、当然血中 miRNA プロファイルへの影響も想定される。本研究では、70% Mg 充足を設定することで、軽度 Mg 摂取不足と血中 miRNA プロファイルとの相関を解析するのに適した系を構築できた。

第 1 回飼育と第 2 回飼育のそれぞれで血液から miRNA を抽出し、miRNA-seq によって網羅的に miRNA プロファイルを解析した。検出された miRNA 種は 1 回目のサンプルでは 538 種、2 回目のサンプルでは 467 種であった。miRBase に登録されているマウス miRNA 種は 2045 種であるので、そのうち約 25% が検出された。検出される miRNA のバリエーションは個体ごとにわずかに異なり、多くの個体サンプルで検出限界以下となっているものも存在する。これらを解析対象として除くため、Ctl 群もしくは 7MD 群のどちらかの過半数で UMI リードカウントが 3 以上となった miRNA 種に絞った。その結果、解析対象となった miRNA 種は 1 回目のサンプルでは 241 種、2 回目のサンプルでは 161 種であった。これは全 miRNA 種の約 10% に相当する。Ctl 群と 7MD 群の群間比較の結果、 $p < 0.05$ の閾値で抽出された miRNA 種は、1 回目のサンプルでは 9 種、2 回目のサンプルでは 7 種であった。抽出された miRNA 種は解析対象とした miRNA 種の約

4%に相当した。本研究と同様にミネラル摂取不足と血液中 miRNA 存在量の相関を見た研究として、Ryuらの研究報告がある¹⁴⁾。Ryuらはヒトへの介入試験(n=9)によって、短期の Zn 欠乏(0%充足, 10 日間)で血中の存在量に変化する miRNA 種の同定を試みた。手法としてはマイクロアレイ法を用いており、85 種の miRNAs を検出し、20 種の miRNAs の存在量が増加したこと($p < 0.005$)を報告している¹⁴⁾。増加した miRNA 種は検出された miRNA 種の約 24%に相当した。まず、検出された miRNA 種の数と比較すると、本研究がずっと大きく、miRNA-seq 法を用いることで、マイクロアレイ法に比べて、検出感度が向上したと考えられる。一方、ミネラル摂取不足群で発現変動した miRNA 種は閾値が異なるにもかかわらず、ずっと少なかった。理由としては、Ryu らの研究では、同一個体で Zn 欠乏食の摂取前後の比較を行っているため、個体差の影響が排除できていること、解析手法・データ処理法の差異が存在すること、対象としているミネラルが異なること、また、重度(0%充足)の条件で行っていることなどが考えられる。本研究ははじめて軽度ミネラル摂取不足(70%充足)による血中 miRNA への影響をしらべた研究成果であり、わずかではあるが、存在量が増加する miRNA 種が抽出されたことは興味深い。

本研究では、2 回の実験を反復することで、再現性の検証を行った。動物飼育の結果は同様であったが、最終的に Ctl 群と 7MD 群との群間比較で抽出された miRNA 種はかなり異なっていた。miRNA 解析の結果が異なる原因を調べるため、1 回目のサンプルから取得した miRNA データと 2 回目のサンプルから取得した miRNA データを統合して解析を行った。その結果、主成分分析によって食餌の違い(Ctl 食と 7MD 食の差)よりも飼育実験のロット差(1 回目と 2 回目の差)の方が miRNA 量プロファイルへの影響が大きいことが示された。ロット差の原因としていくつか考えられる。まず、動物のロット差である。被験動物はオリエンタル酵母社から飼育ごとに購入している。このような場合、週齢をそろえるため、通常、同腹子が供給される。1 回の飼育で 18 匹を用いた本研究では、2 ペアの親由来の同腹子で構成されていたと考えられる。1 回目の飼育と 2 回目の飼育の親ペアの違いが血中 miRNA プロファイルに影響した可能性がある。また、供給元での飼育環境の違いが反映された可能性も考えられる。他に、動物飼

育室の環境変化も考えられる。異なる時期に飼育を行ったため、室温・湿度のわずかな違いや、他のケージで飼育されていた動物の影響(においや騒音など)が血中 miRNA プロファイルに影響した可能性がある。さらに、実験者の違いが反映された可能性も考えられる。

一方、2 回の繰り返し実験の再現性のある変化として、*mmu-miR-144-5p* の存在量の増加が検出された。血中 *mmu-miR-144-5p* の存在量の増加は軽度 Mg 摂取不足のバイオマーカーとなる可能性が提示された。

5. 今後の課題

本研究では、2 回の繰り返し実験で再現性を検証したが、より精度を高めるため、繰り返し実験を重ねる必要がある。

また、ヒトの Mg 摂取状況は各個人によって様々である。日本人の平均として 70%充足を設定したが、60%充足の人や 50%充足の人、また、ある期間は 100%近く充足しているが、長期間で見ると 70%充足の人など、様々なパターンが存在すると考えられる。このような様々なパターンをなるべく網羅できる頑強性を持ったバイオマーカーを設定するのが望ましい。そのため、例えば、70%充足食をもつと長期間与えた場合の miRNA 変化や、60%充足食を与えた場合の miRNA 変化を解析し、頑強性を兼ね備えたバイオマーカー探索を行う必要がある。

本研究では、バイオマーカー候補を探索するため、Ctl 群と 7MD 群の間で有意に存在量が増加する miRNA 種を抽出した。これは、Mg 摂取不足と各々の miRNA の存在量の関係を 1 対 1 で見ているに過ぎない。一方、Mg 摂取不足のシグナルが 1 つの miRNA にのみ作用することは考えにくい。複数の miRNAs の組み合わせをバイオマーカーすることによってより精度・感度の高い診断が可能になると考えられる。実際、複数の miRNAs の使用によって精度・感度の高いがんバイオマーカーとなること¹⁷⁾などが報告されている。多変量解析や機械学習によって、複数の miRNAs の組み合わせのバイオマーカー探索研究も必要と考える。

最終的には、ヒトのミネラル摂取不足のバイオマーカー開発を目指している。そのため、ヒトにおける研究が必要となる。Ryu らが実施したような短期のヒト介入試験¹⁴⁾や、食事摂取状況と血中 miRNAs 解析を組み合わせた長期のコホート研究などを実施することが必要となる。

ミネラルの摂取不足は軽度でも健康や QOL に悪影響をもたらしていると考えられ、改善が必要である。簡便で感度・精度が高く、網羅性の高いバイオマーカーとして血中 miRNAs は有力な候補である。動物や細胞を用いた基礎研究を経て、ヒトでの研究を行い、社会実装を目指したい。

6. 文献

1. 厚生労働省. 令和元年国民健康・栄養調査.
2. 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準(2020年版).
3. Institute of Medicine (IOM). Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride. Washington, DC: National Academy Press, 1997.
4. Rude R.K., Magnesium. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, Cragg GM, Levine M, Moss J, White JD, eds. Encyclopedia of Dietary Supplements. 2nd ed. New York, NY: Informa Healthcare; 527-537, 2010.
5. Rude R.K., Magnesium. In: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. Modern Nutrition in Health and Disease. 11th ed. Baltimore, Mass: Lippincott Williams & Wilkins; 159-175, 2012.
6. Kanbay M., Goldsmith D., Uyar M.E., Rurgut F., Covic A., Magnesium in chronic kidney disease: challenges and opportunities, *Blood Purification* 29 280-292, 2010.
7. Volpe S.L., Magnesium. In: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel H, eds. Present knowledge in nutrition 10th ed. ILSI Press, Washington D.C., 2012: 459-474.
8. Cahill F., Shahidi M., Shea J., Wadden D., Guilliver W., Randell E., Vasdev S. and Sun G., High dietary magnesium intake is associated with low insulin resistance in the Newfoundland population, *PLoS One* 8, e58278, 2013.
9. Akter S., Eguchi M., Nanri A., Kochi T., Kashino I., Kuwahara K., Hu H., Miki T., Kabe I. and Mizoue T., Association of dietary and serum magnesium with glucose metabolism markers: The Furukawa Nutrition and Health Study, *Clinical Nutrition ESPEN* 24, 71-77, 2018.
10. Yasui M., Yase Y. and Ota K., Distribution of calcium in central nervous system tissues and bones of rats maintained on calcium-deficient diets, *Journal of the Neurological Sciences* 105, 206-210, 1991.
11. Planells E., Aranda P., Lerma A. and Llopis J., Changes in bioavailability and tissue distribution of zinc caused by magnesium deficiency in rats. *British Journal of Nutrition* 72, 315-323, 1994.
12. Maret W. and Sandstead H.H., Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20, 3-18, 2006.
13. Gibson, R.S., Principles of Nutritional Assessment, 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press, 2005.
14. Ryu M.S., Langkamp-Henken B., Chang S.M., Shankar M.N. and Cousins R.J., Genomic analysis, cytokine expression, and microRNA profiling reveal biomarkers of human dietary zinc depletion and homeostasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 108, 20970-20975, 2011.
15. Nemoto T., Matsuzaki H., Uehara M. and Suzuki K., Magnesium-deficient diet-induced reduction in protein utilization in rats is reversed by dietary magnesium supplementation, *Magnesium Research* 19, 19-27, 2006.
16. 稲常, 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻修士論文, 2019.
17. Matsuzaki J., Kato K., Oono K., Tsuchiya N., Sudo K., Shimomura A., Tamura K., Shiino S., Kinoshita T., Daiko H., Wada T., Katai H., Ochiai H., Kanemitsu Y., Takamaru H., Abe S., Saito Y., Boku N., Kondo S., Ueno H., Okusaka T., Shimada K., Ohe Y., Asakura K., Yoshida Y., Watanabe S., Asano N., Kawai A., Ohno M., Narita Y., Ishikawa M., Kato T., Fujimoto H., Niida S., Sakamoto H., Takizawa S., Akiba T., Okanohara D., Shiraishi K., Kohno T., Takeshita F., Nakagama H., Ota N, and Ochiya T., Prediction of tissue-of-origin of early stage cancers using serum miRNomes, *JNCI Cancer Spectrum* 8, pkad096 2024.

Construction of an Evaluation System for Magnesium Intake Deficiency Using Biomarkers

Shinji Okada

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo

Summary

In recent years, dietary changes, unbalanced diets, use of processed foods, and soil alteration due to the use of chemical fertilizers have caused inadequate intake of micronutrients, namely minerals. In Japan, average intakes of calcium, magnesium, iron (women), zinc, and other minerals do not reach the estimated average requirement or recommended amounts specified in the Dietary Reference Intakes for Japanese. Similarly, countries around the world are also inadequate in their intake of various minerals. Insufficient mineral intake is an obstacle to maintaining good health and quality of life. On the other hand, there are few opportunities for individuals to recognize mineral deficiencies. For example, only Na, K, and Cl are examined in blood tests during physical examinations. The balance of minerals in the blood does not fluctuate unless there is a severe deficiency or excess due to the homeostatic mechanism of the body. In order to maintain health and improve QOL through food, it is necessary to implement a simple and accurate method of detecting mineral deficiency in society. Recently, blood circulating microRNAs (miRNAs) have attracted attention as biomarkers that reflect the state of the living body. In this study, we first identified circulating miRNAs that fluctuate in response to mild magnesium deficiency in an animal model.

In this study, mice were fed a 70% Mg-sufficient diet (7MD) for 14 days to create a model of mild Mg deficiency. As a control group, mice fed a normal diet (Ctl, 100% Mg-sufficient) were used to examine the effect of mild Mg deprivation on blood miRNA levels. The miRNAs in the blood were subjected to miRNA-seq and analyzed, and approximately 25% of all miRNA species were detected. Nine and 7 miRNA species were identified as variable in the Ctl and 7MD groups, respectively, in the two replicated experiments. An increase in the abundance of *mmu-miR-144-5p* was detected as a change. The increased abundance of *mmu-miR-144-5p* in blood was presented as a potential biomarker for mild Mg intake deficiency.

Further reproducibility checks, robustness checks, and biomarker discovery studies using combinations of miRNAs are expected to demonstrate the usefulness of miRNAs as a biomarker for mild magnesium deficiency.