

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00835

研究課題名(和文) ビタミンA・ β -カロテンの代謝調節機序とその栄養状態による生体調節に関する研究

研究課題名(英文) Studies on mechanism of metabolic regulation of vitamin A and beta-carotene and their nutritional status-related biological regulation.

研究代表者

駿河 和仁 (SURUGA, KAZUHITO)

長崎県立大学・看護栄養学部・准教授

研究者番号：70315852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アルコールや高脂肪食の摂取は、転写調節因子ISXおよびPPAR δ の発現変動によりラット小腸の β -カロテンからビタミンAへの転換を低下させることが示された。妊娠・授乳期のビタミンA栄養状態は、離乳前後の仔ラットのレチノイン酸の合成・異化機能や β -カロテンの吸収・代謝機能に影響を及ぼすことが示された。ビタミンAや β -カロテンの十分な摂取は、耐糖能異常や脂質代謝異常の改善効果をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Intake of alcohol and high-fat diet led to suppress the oxidative cleavage conversion of beta-carotene into vitamin A via alteration of expression level of two transcription factors, ISX and PPAR-delta, in rat small intestine. Vitamin A-nutritional status during pregnancy/lactation affected the synthesis and catabolism of retinoic acid and the absorption and metabolic function of β -carotene in rat pups during the peri-weaning period. Sufficient ingestion of dietary vitamin A and β -carotene resulted in improving impaired glucose tolerance and abnormal lipid metabolism.

研究分野：栄養生理学

キーワード：ビタミンA、 β -カロテン、アルコール、高脂肪食、妊娠・授乳期、耐糖能異常、ロコモティブシンドローム

1. 研究開始当初の背景

ビタミンAは、視覚、生殖、上皮組織機能、免疫細胞の分化などに多種多様な生理作用の調節に関与することから、ビタミンAの栄養状態は、不足・過剰に関わらず生体調節機能に影響をもたらす。ヒトのビタミンAの供給源の70%を占めるβ-カロテンは、生体内で必要に応じてビタミンAに転換されるが、この転換がどのような食事や栄養条件で調節されているか、さらにその機序に関しても十分に検討されていなかった。また我々は、これまで授乳期の食餌制限が成長後の仔ラットのビタミンA吸収能や肝臓の総ビタミンA貯蔵能を亢進させることを報告した^①が、妊娠・授乳期にかけてのビタミンAの栄養状態の違いが、成長後の仔ラットのビタミンAおよびβ-カロテン吸収・代謝機能に及ぼす影響については検討していなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ビタミンAおよびその前駆体のひとつであるβ-カロテンの吸収・代謝機能に及ぼす影響とそのメカニズムについて、各年度ごとに以下の内容について検討を行った。H27年度は、β-カロテンからビタミンAへの転換効率の調節機序に関する検討を目的とし、その転換に重要なβ-カロテンオキシゲナーゼ(BCO)1遺伝子について、食事条件(高脂肪食、アルコール摂取)の違いによる発現調節とそれらの転写制御機構について動物実験系および細胞実験系により検討した(研究1,2)。H28年度は、動物実験系により、妊娠・授乳期のビタミンAやβ-カロテン栄養状態の違いが成長後のビタミンA、β-カロテン代謝に及ぼす影響について検討した(研究3)。H29年度は、2型糖尿病モデルマウスおよび骨粗鬆症・下肢筋萎縮(ロコモティブシンドローム)モデルラットを用い、ビタミンAやβ-カロテン栄養状態の違いが、それらの疾患・障害の発症や予防に対してどのような影響を示すかについて検討を行った(研究4,5)。

3. 研究の方法

【動物飼育】

研究1 高脂肪食摂取によるラット小腸のβ-カロテン吸収・代謝調節に関する検討

6週齢のSD系雄ラットを1週間の順化後、AIN-76組成を基準とした低脂肪食(脂肪7.3%E;LF群)または高脂肪食(脂肪74%E;HF群)、およびそれぞれの食餌にβ-カロテンを添加(7.2 mg/kg diet)した食餌(LFBC群、HFBC群)を自由摂食させ、2週間飼育した。

研究2 アルコール摂取によるラット小腸のβ-カロテン吸収・代謝調節に関する検討

7週齢のSD系雄ラットを1週間の順化後、コントロール群(以下C群)およびエタノール群(以下E群)2群に分け、Lieber-DeCarli組成の液体飼料(コントロールまたは5%エ

タノール液体飼料)をpair-feedingにて4週間摂取させた。

研究3 妊娠・授乳期のビタミンA栄養状態が仔ラットのビタミンA吸収・代謝機能に及ぼす影響

6週齢SD系雌性ラットを、①AIN93Gコントロール食(C)群、②ビタミンA欠乏食(A-)群、③50倍ビタミンA添加食(50A)群(60 mg レチニルアセテート/kg diet)、④50倍β-カロテン添加食(50B)群(360 mg β-カロテン/kg diet)の4群(各群5匹)に分け、妊娠前から妊娠・授乳期を通じて各食餌①~④を自由摂取させ、出産22日後まで飼育した。各群の母親ラットから出生した仔ラットを20日齢(C群、VA-群、50A群、50B群)、30日齢(C群、VA-群、50A群、50B群)、14週齢(CC群、A-C群、50AC群、50BC群)まで飼育した。各群の仔ラットを、離乳期の20日齢時、離乳後の30日齢時および14週齢時にそれぞれ解剖を行った。なお21日齢時に強制離乳後30日齢まで飼育した仔ラットには、離乳直後から母親と同じ組成の食餌を与え、14週齢まで飼育した仔ラットには、離乳直後からすべての群にコントロール食を与えた(図1)。

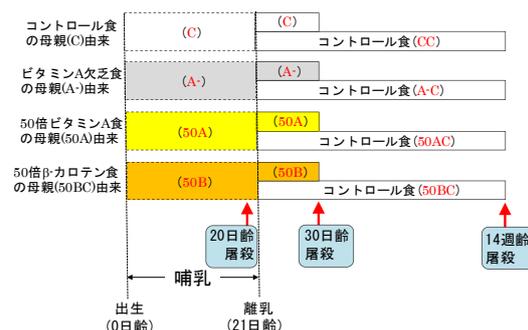


図1 研究3 仔ラットの飼育スケジュール

研究4 「糖尿病症候モデル動物の糖質・脂質代謝異常発症に及ぼすビタミンA栄養状態の影響」

4週齢のNSY (Nagoya Shibata Yasuda) マウス(24匹)を7日間粉末飼料(CRF-1)にて馴化後、以下の4群(各群6匹ずつ)に分け、各飼料を15週齢まで自由摂取させた。①CRF-1飼料群(C)、②CRF-1飼料+30%スクロース投与群(S)、③レチニルアセテート(ビタミンA)を100mg/kg diet含むCRF-1飼料+30%スクロース投与群(A)、④β-カロテンを600mg/kg diet含むCRF-1飼料+30%スクロース投与群(B)。②~④の群のスクロース投与では、耐糖能異常の早期発症促進を目的として、蒸留水の代わりに30%スクロース溶液を自由に与えた。14週齢時には、20%グルコース腹腔内負荷試験(ipGTT)を行い、尾静脈より経時的に採血し血糖値(0, 30, 60, 90, 120分)およびインスリン濃度(0, 30分)を測定した。血清インスリン濃度は、市販ELISAキットにて測定した。

研究5 「ロコモティブシンドロームモデル動物に対するビタミンA 栄養状態の影響」

卵巣摘出および片足坐骨神経切断(OD: ovariectomy/denervation)を施した8週齢の骨粗鬆症・下肢筋萎縮モデル雌性ラットを3群(各群6匹、計24匹)に分け、①AIN93Mコントロール食(ODC)、②50倍ビタミンA添加食(ODA)群(60mgレチニルアセテート/kg diet)、③50倍β-カロテン添加食(ODB)群(360mgβ-カロテン/kg diet)とした。さらに同週齢で疑似手術(Sham群、6匹)を行った群にはコントロール食(SC)を与えた。以上各群のラットに各試験食を3ヶ月間自由摂取させた。骨解析においては、小動物用CT解析装置を用い、飼育終了1週間前に腰椎骨密度を、さらに屠殺後に摘出した大腿骨の骨密度をそれぞれ測定した。また、血清の骨代謝マーカー量は、市販ELISAキットにて測定した。

【共通の実験方法】

各組織の遺伝子発現量は、リアルタイムPCR法を用いた。血清および組織のビタミンA量(総レチノールまたは遊離レチノール)およびβ-カロテン量は、試料よりヘキサソ抽出後、逆相HPLC法にて定量解析を行った。血清および肝臓の脂質量および血糖値の測定については、市販測定キットを用いた。

4. 研究成果

研究1 「高脂肪食摂取によるラット小腸のβ-カロテン吸収・代謝調節に関する検討」

2週間の高脂肪食の摂取により、ラット小腸のBCO1酵素活性およびmRNA量が有意に低下し、さらに高脂肪食摂取下では、同時に摂取したβ-カロテンの肝臓での蓄積量が多かったことから小腸でのβ-カロテンからビタミンAへの転換効率が抑制されることが明らかとなった。また、高脂肪食摂取によるラット小腸BCO1遺伝子の発現抑制には、転写抑制因子であるISXの発現増大と転写促進因子であるPPARδの発現減少の双方が関連している可能性が示唆された(図2)。



図2 高脂肪食摂取によるラット小腸BCO1遺伝子発現の抑制機序(仮説)

研究2 「アルコール摂取によるラット小腸のβ-カロテン吸収・代謝調節に関する検討」

4週間のアルコール摂取により肝臓レチノール量は減少を示し、この変動にレチノールの同時補充は改善傾向を示したが、β-カロテ

ンの同時補充では効果を示さないことが明らかとなった。その要因として、アルコール摂取により空腸BCO1や肝臓のBCO1およびBCO2の各遺伝子発現量が減少することによるβ-カロテンからビタミンAへの転換効率の低下が考えられた。特に空腸BCO1遺伝子発現量の低下には、空腸のレチノイン酸合成量亢進によってBCO1遺伝子の転写抑制因子である空腸のISX発現量の増大することが関与していることと同時に、転写促進因子である空腸のPPARδ遺伝子発現量の減少の双方が関与しているものと考えられた(図3)。

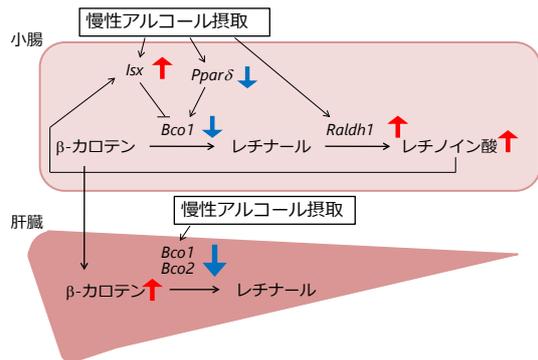


図3 アルコール摂取によるラット小腸BCO1遺伝子発現の抑制機序(仮説)

研究3 「妊娠・授乳期のビタミンA 栄養状態が仔ラットのビタミンA 吸収・代謝機能に及ぼす影響」

50A群および50B群の20日齢仔ラットは生体内のレチノール量の増加に伴い、レチノイン酸量の増加も考えられ、レチノイン酸合成に関与する空腸および肝臓のRALDH1 mRNA量は減少し、レチノイン酸異化に関与する空腸および肝臓のCYP26A1 mRNA量が増大した。一方、A群の20日齢仔ラットでは生体内のレチノール量の減少に伴い、レチノイン酸量も少なくなっていることが考えられたが空腸および肝臓のRALDH1およびCYP26A1 mRNA量には変化がなかった。このことから離乳前ではレチノイン酸量が増えすぎないように調節する機構は十分に機能しているが、レチノイン酸を増やすように働く機構はまだ十分に機能していないことが考えられた。一方、離乳後の30日齢では50A群および50B群の仔ラットでは空腸および肝臓のCYP26A1 mRNA量は高値を示したが、空腸および肝臓のRALDH1 mRNA量は20日齢ほど低値を示さなかったこと、反対にA群では空腸および肝臓のCYP26A1 mRNA量が低値を示していることから、離乳後はレチノイン酸の異化にはCYP26A1が関与しているが、レチノイン酸の合成系にはRALDH1ではない別の遺伝子が関与している可能性が示唆された(図4)。離乳後からコントロール食を与えた14週齢の仔ラットにおいては検討したいずれのビ

タミン A 代謝関連遺伝子の発現量も各群間で有意差はみられなかったため、母親や離乳前のビタミン A 栄養状態は、離乳後のビタミン A 栄養状態によって改善できることが示唆された。

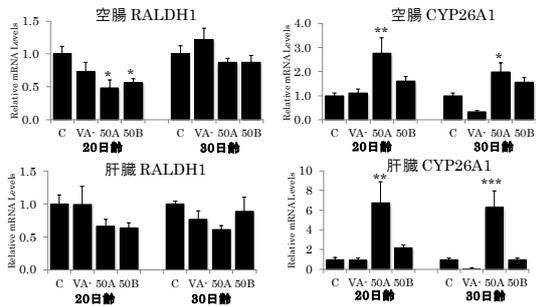


図4 20日齢(離乳前)、30日齢(離乳後)のRALDH1、CYP26A1 mRNA 発現量

研究4 「糖尿病モデル動物の糖・脂質代謝異常発症に及ぼすビタミン A 栄養状態の影響」

14 週齢時に行った腹腔内グルコース投与試験では投与2時間までの血糖上昇曲線下面積は、C群に比べS群で大きい傾向を示したが、A群およびB群ではその上昇が抑制された(図5)。15 週齢時の肝臓トリグリセリド量および総コレステロール量はいずれもC群に比べS群で高かったが、肝臓トリグリセリド量はA群で低値を示し、肝臓総コレステロール量はA群およびB群で低値を示した。以上の結果から、2型糖尿病モデル NSY マウスに対しては、ビタミン A やβ-カロテンの投与により食後の血糖値の低減効果が見られ、さらにビタミン A の投与は脂質代謝異常改善効果も示すことが明らかとなった。

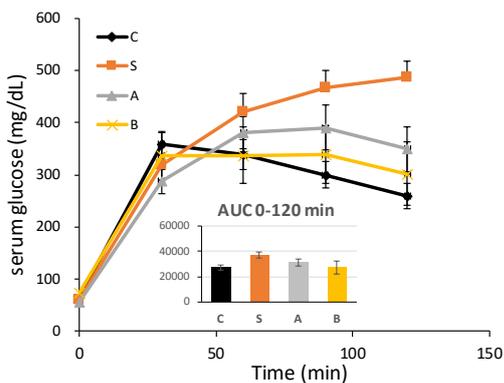


図5 腹腔内グルコース負荷後の血糖値の変化および血糖上昇曲線下面積 (AUC)

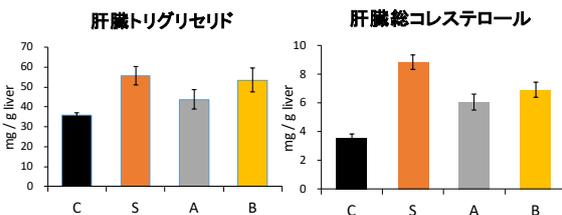


図6 肝臓トリグリセリドおよび総コレステロール量

研究5 「ロコモティブシンドロームモデル動物に対するビタミン A 栄養状態の影響」

飼育終了時の下肢骨格筋量は、坐骨神経切断を行っていない右肢ではSC群に比べ、低い傾向を示し、坐骨神経切断を行った左肢ではODC群で顕著な低下を示した。しかしながら、ODA群およびODB群では筋委縮に対する抑制効果はみられなかった。一方、大腿骨および腰椎骨密度は、いずれもSC群に比べ、ODC群で有意に低値を示したが、ODA群およびODB群では両骨密度低下に対する抑制効果はみられなかった(図7A,B)。肝臓トリグリセリド量は、SC群に比べODC群で有意に高値を示したが、ODA群およびODB群ではその増大が抑制される傾向を示した(図7C)。以上の結果から、ビタミン A やβ-カロテンの摂取は骨量減少や筋委縮に対して明確な抑制効果を示さないが、卵巣摘出に伴う肝臓脂肪蓄積に対しては抑制効果が認められた。

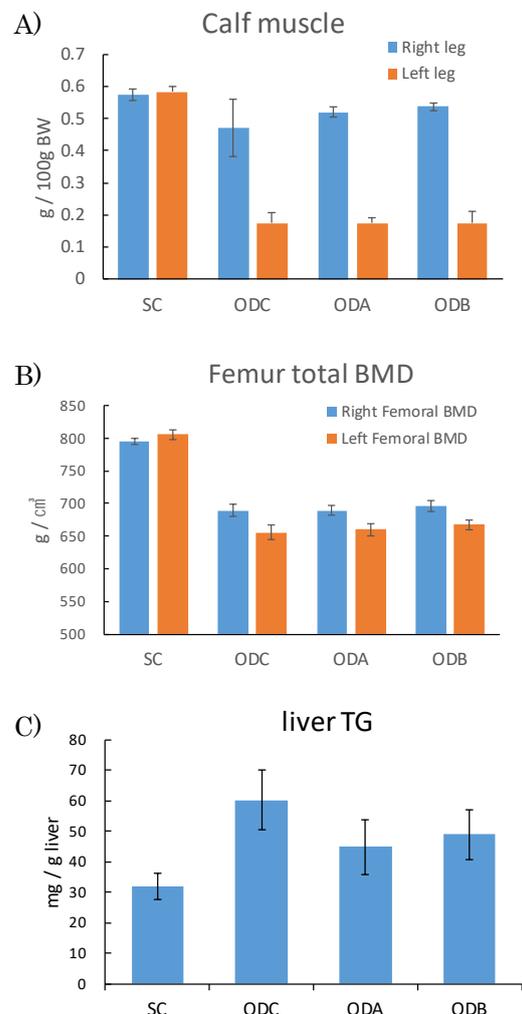


図6 22 週齢時の A) 下肢骨格筋量(ヒラメ筋+腓腹筋)、B) 大腿骨骨密度および C) 肝臓トリグリセリド量

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

① 山口範晃、駿河和仁，ビタミン A 過剰摂取は高脂肪食摂取マウスの体脂肪を減少させ過剰症を伴う。第 69 回日本ビタミン学会大会，横浜市，2017 年 6 月

② 西村玲泉、山口範晃、駿河和仁，アルコール摂取がラットのビタミン A およびβ-カロテンの代謝変動に及ぼす影響。日本栄養・食糧学会第 70 回大会，西宮市，2016 年 5 月

③ 山口範晃、駿河和仁，ビタミン A 過剰摂取はマウスのエネルギー消費量を上昇させ体脂肪を減少させる。日本栄養・食糧学会第 70 回大会，西宮市，2016 年 5 月

④ Miki Igarashi，Kazuhito Suruga，Noriaki Yamaguchi，Toshinao Goda，Sachiko Takase，Effects of high fat feeding on enzymatic and genetic expression of β-carotene cleavage enzymes in rat small intestine. International conference on retinoids, Gifu, Japan, 2015 年 10 月

⑤ 高瀬幸子、五十嵐美樹、山口範晃、駿河和仁：空腸 β-カロテン開裂酵素(BCMO1)発現誘導の高脂肪食摂取による低下とその要因，日本ビタミン学会第 67 回大会，奈良市，2015 年 6 月

⑥ Sachiko Takase，Miki Igarashi，Noriaki Yamaguchi，Toshinao Goda，Kazuhito Suruga：Effects of dietary high-fat feeding on gene expression of beta-carotene and retinoids metabolism-related enzymes in small intestine and liver, 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, 2015 年 5 月

⑦ Noriaki Yamaguchi，Eri Abe，Kazuhito Suruga：The excess intake of vitamin A increases energy expenditure, and decreases fat mat of high-fat diet induced-obese mice, 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, 2015 年 5 月

⑧ Masanori Shimizu，Takehiko Terashima，Kazuhito Suruga，Sachiko Takase：Effects of dietary protein on gene expression of enzymes related to beta-carotene metabolism in vitamin A deficient rats, 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, 2015 年 5 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://sun.ac.jp/research/researcher/researcher_detail/?uid=suruga

6. 研究組織

(1)研究代表者

駿河 和仁 (KAZUHITO, Suruga)

長崎県立大学・看護栄養学部・准教授

研究者番号：70315852

(2)研究分担者

山口 範晃 (NORIAKI, Yamaguchi)

長崎県立大学・看護栄養学部・助教

研究者番号：80516295