

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500716

研究課題名(和文) アルコール摂取による脂溶性栄養素の代謝への影響とその作用機序に関する研究

研究課題名(英文) Study of effects of alcohol intake on fat-soluble nutrients metabolisms and their mechanisms.

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

研究成果の概要(和文):

アルコールの慢性摂取によるラットの脂肪肝の発症には、肝臓の脂肪合成の亢進や分解の低下だけでなく、肝臓からの脂質分泌に関連する遺伝子発現の低下も関連していることを明らかにした。また、アルコールの慢性摂取は、ラット小腸におけるβ-カロテンのビタミンAの転換に関与する遺伝子の発現が顕著に抑制されたことから、生体のビタミンA栄養状態の低下の一要因であると考えられた。

研究成果の概要(英文):

As well as increased hepatic lipogenesis and decreased hepatic lipid oxidation, decreased level of hepatic lipid secretion-related gene expression may involve in the onset of chronic alcohol intake-induced hepatic steatosis in rats. In addition, the gene expression level involved in the conversion of beta-carotene into vitamin A in the small intestine decreased in the rats fed alcohol chronically, which may explain the alcohol-induced hypovitaminosis A.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子栄養学、栄養生理学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：アルコール、脂溶性栄養素、ビタミンA、β-カロテン、肝障害、炎症性サイトカイン、機能性食品成分

1. 研究開始当初の背景

アルコールの長期過剰摂取は、肝臓において脂肪肝をはじめとして、肝炎、肝硬変、肝がんなど様々な肝障害を引き起こすことが知られている。アルコール性脂肪肝の発症要因として、肝臓における脂肪合成能の亢進や分解能の低下についての研究が多くなされてきたが、肝臓からの脂肪の分泌能の低下に関する研究は殆どなかった。また、アルコール性肝障害の予防面からの研究として、多く

の機能性食品成分摂取による予防効果が報告されてきたが、それらのメカニズムについての検討は殆どなかった。

さらにアルコールの長期摂取は、肝臓におけるビタミンA貯蔵量の減少やビタミンA代謝の変動を引き起こすことが知られている。また、アルコール長期摂取下でビタミンA前駆体であるβ-カロテン(BC)を過剰摂取すると、肝臓や血中のBC含量が顕著に増加し、アルコール性肝臓障害を悪化させることが

報告されている。このような背景から、アルコール摂取がビタミン A や BC の吸収や代謝に大きく影響を及ぼすことが明らかにされてきたが、そのメカニズムについてはこれまでほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、アルコール摂取による脂溶性栄養素(脂肪酸およびビタミン A/β-カロテン(BC))の吸収・代謝変動の影響とその分子制御機構について動物実験系および培養細胞実験系により明らかにすることを目的とした。研究1では、アルコールによる肝臓での脂肪(酸)の代謝の変動による脂肪肝発症との関わりについて、特に肝臓からの脂肪分泌に関わるマイクロソームトリグリセリド輸送タンパク質(MTP)の発現変動への影響とその調節機序について検討した。また、機能性食品成分によるアルコール性肝障害に対する抑制効果とそのメカニズムについて検討を行った。研究2では、アルコール摂取による小腸および肝臓におけるビタミン A や BC の吸収・代謝変動に及ぼす影響およびそのメカニズムについて検討を行い、アルコール摂取によるビタミン A 栄養状態の低下との関わりについて考察を行った。また、研究1同様、機能性食品成分摂取によるアルコール性肝障害予防効果が、ビタミン A や BC 代謝の変動に対しても効果が見られるか検討を行った。

3. 研究の方法

(1)研究1 肝臓の脂質代謝および肝障害に関する研究

アルコール摂取による、脂肪肝発症の機序の解明: 7週齢のSD系雄ラットに5%エタノールを含む液体飼料を4週間摂取させ、肝臓のトリグリセリド量およびMTP mRNA量の変動をリアルタイムRT-PCRで調べた。さらに、細胞レベルでアルコールによるMTP遺伝子発現変動のメカニズムを調べるために、ラット肝臓由来細胞H4 EC3細胞を用い、培地へのエタノールやアルコール誘導性のサイトカイン(TNFα, IL-1βなど)によるMTPの遺伝子発現変動について調べ、ルシフェラーゼレポーターアッセイによりラットMTP遺伝子の転写活性の変動についても検討した。

アルコール摂取による肝障害に対する機能性食品成分の影響: 5週齢のSD系雄ラットを5群に分け、エタノール水溶液(5g/kg体重)および機能性食品成分であるシリピニン、ベルベリンまたはベタインを毎日経口投与し、肝臓の脂質代謝、活性酸素生成系および炎症性サイトカイン産生に関わる遺伝子のmRNA量を測定し、血清中のTNFα、一酸化窒素(NO)量を調べた。さらに、肝臓クッパー細胞様株

RAW264.7を用いて、エンドトキシン(LPS)によって誘引されるTNFαやNOの生成に対するシリピニンまたはベルベリンの影響を検討するため、RAW264.7細胞株をLPSおよび各機能性食品成分を含む培地で10時間培養し、炎症性サイトカイン産生に関わる遺伝子のmRNA量を測定し、培地中のTNFα、NO産生量を調べた。

(2)研究2 ビタミンAおよびβ-カロテンの吸収・代謝変動に関する研究

アルコール摂取によるビタミンAおよびβ-カロテン吸収・代謝に及ぼす影響とその機序: 6週齢SD系雄ラットを、β-カロテン(BC)を含むコントロール液体飼料または5%エタノールを含むエタノール液体飼料で4週間飼育した。また、BCの腸管吸収率を調べるため、屠殺前に48時間の出納実験を行った。血清および各組織中のBC量およびレチノール量はHPLCにより定量分析した。さらに、リアルタイムRT-PCR法により空腸および肝臓のβ-カロテン開裂酵素(BCMO1)mRNA量やその他のビタミンA吸収・代謝関連のmRNA量の定量解析を行った。さらに、ヒト小腸様細胞株Caco-2BBE細胞を用い、エタノールやアセトアルデヒド、炎症性サイトカインを培地に添加し、BCMO1 mRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法で調べた。

アルコール摂取による小腸および肝臓のビタミンAおよびβ-カロテン吸収・代謝に対する機能性食品成分の影響

研究1-のラットを共用し、血清および肝臓のレチノール量をHPLCにより定量分析し、さらに、リアルタイムRT-PCR法により空腸および肝臓のビタミンAやβ-カロテン(BC)吸収・代謝関連のmRNA量の定量解析を行った。さらに、アルコールと同時に摂取する脂肪の種類の違いが、ビタミンAおよびBC吸収・代謝や肝臓の脂質代謝の変動にどのように影響を及ぼすか検討するために、7週齢のSD系雄ラットを長鎖脂肪(LCT)または中鎖脂肪(MCT)を含むエタノール液体飼料を4週間摂取させた。血清および肝臓のレチノール量をHPLCにより定量分析し、小腸および肝臓のビタミンAやBCの吸収・代謝関連遺伝子の変動について定量解析を行った。

4. 研究成果

(1)研究1 肝臓の脂質代謝および肝障害に関する研究

アルコール摂取による、脂肪肝発症の機序の解明:

4週間のエタノール摂取によりラット肝臓のMTP mRNA発現量は低下し、トリグリセリド量は有意に増加した。さらに、そのメカニズムについてラット肝臓由来の培養細胞

H4 EC3 を用いて検討を行った結果、エタノールの単独の処理では、H4 EC3 細胞の MTP mRNA 量は変動を示さなかったが、生体内でエタノールにより誘因される炎症性サイトカイン（おもに TNF α ）の処理により MTP mRNA 量は減少した（図 1 左）。またルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、ラット MTP 遺伝子のプロモーターコア領域（+54 ~ -216）に TNF α の作用に関連する転写抑制領域が存在することが明らかとなった（図 1 右）。これまで、アルコール性脂肪肝の発症機序に関しては、アルコールによる肝臓内の脂肪（酸）合成の亢進や脂肪酸分解の抑制が主な要因として報告されてきたが、本研究からそれらの要因以外にも TNF α などの炎症性サイトカインによる MTP 遺伝子の転写レベルでの発現抑制に伴う肝臓からの脂肪の分泌機能の低下も関連している可能性が見出された。今後はさらに TNF α による MTP 遺伝子の転写抑制領域の特定とその領域に作用する転写因子の同定を行うことが課題である。

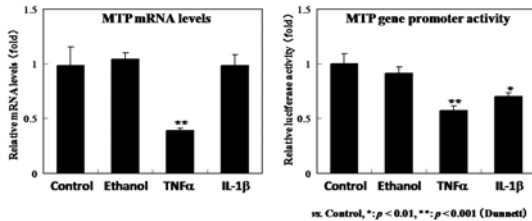


図1 エタノールおよび炎症性サイトカインによるH4 II EC3細胞の MTP mRNA量と転写活性への影響

アルコール摂取による肝障害に対する機能性食品成分の影響

ラットにエタノールを5週間摂取させたところ、肝臓の脂肪蓄積（図 2）、肝障害指標（ALT, AST）および血中 TNF α （図 3 左）、NO（図 3 右）濃度の上昇が見られたが、アルコールによる肝臓障害抑制作用を持つ種々の機能性食品成分（シリビニン、ベルベリン、ペタイン）の同時摂取させた群では、それらの上昇はいずれも抑制された。また、肝クッパー細胞様モデル細胞株である RAW264.7 を用い、リポポリサッカライド（LPS）刺激し誘導される TNF α （図 4 左）や NO 産生量（図 4 右）の上昇が、クルクミン、シリビニン、ベルベリンおよびレスベラトロールの処理により抑制された。これらの結果から、本研究に用いた機能性食品成分はアルコール誘因性の肝障害抑制作用を示し、その作用には肝臓の炎症性サイトカインの産生抑制による酸化ストレスの減少が関与していることが明らかとなった。今後さらに個々の機能性食品成分の効果についてその詳細なメカニズムや複数の機能性食品成分の相加・相乗効果などについての検討も必要である。

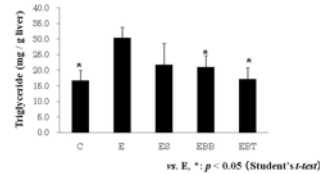


図2 エタノール摂取によるラット肝臓のトリグリセリドの増大に対する機能性食品成分摂取の影響

C: コントロール群、E: エタノール群、ES: エタノール+シリビニン群、EBB: エタノール+ベルベリン群、EBT: エタノール+ペタイン群

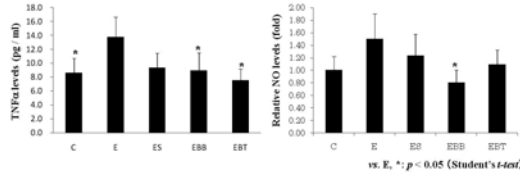


図3 エタノール摂取によるラット血清中のTNF α およびNO濃度の増大に対する機能性食品成分摂取の影響

C: コントロール群、E: エタノール群、ES: エタノール+シリビニン群、EBB: エタノール+ベルベリン群、EBT: エタノール+ペタイン群

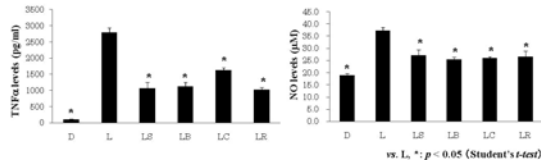


図4 リポポリサッカライドによるRAW264.7細胞のTNF α およびNO産生量の増大に対する機能性食品成分摂取の影響

C: コントロール、L: リポポリサッカライド（LPS）処理、LS: LPS+シリビニン処理、LB: LPS+ベルベリン群、LC: LPS+クルクミン処理、LR: LPS+レスベラトロール処理

(2) 研究2 ビタミンAおよび β -カロテンの吸収・代謝変動に関する研究

アルコール摂取によるビタミンAおよび β -カロテン吸収・代謝に及ぼす影響とその機序

4週間のエタノールの摂取によりラット空腸の BCMO1 mRNA 量（図5左）および酵素活性（図5右）は有意に低下したが、小腸の細胞性レチノール結合タンパク質タイプ（CRBP）やレチノールエステル化酵素（LRAT）mRNA量は増大した。また48時間のBCの出納実験の結果、腸管のBC吸収率は両群間で有意な差は見られなかったものの、血清のBC濃度、肺および精巣のBC量はエタノール摂取群で高値を示し、肝臓のBC量は低値を示した（表1）。一方、血清遊離レチノール濃度はエタノール摂取により増大する傾向を示し、肺の総レチノール量も有意に高値を示したが、肝臓の総レチノール量は有意に低値を示した（表2）。これらの結果から、慢性的なアルコール摂取下では、小腸におけるBCのビタミンAへの転換効率が低下し、BCはそのままの形で吸収され、さらに小腸の低下は、肝ビタミンA量の低下に関連していることが示唆された。また慢性的なアルコール摂取下では、吸収されたBCはビタミンAと同様に肝臓において貯蔵されにくく、肺や精巣などの肝

臓以外の組織に移行するものと考えられた。さらにエタノール摂取によるBCMO1遺伝子の発現抑制のメカニズムについて検討するためにヒトBCMO1遺伝子を内因的に発現するヒト小腸様細胞株Caco-2BBE細胞を用い、エタノールやその代謝物であるアセトアルデヒドを添加した培地で培養したが、BCMO1 mRNA量の変動は見られなかった。また、慢性エタノール投与により血中濃度の増大するエンドトキシン(LPS)や炎症性サイトカイン(TNF α , IL-1 β)を培地に添加したがBCMO1 mRNA量は変動を示さず、TNF α の処理では、むしろBCMO1 mRNA量は増大した。ラットにおいて観察されたエタノール摂取による小腸のBCMO1 mRNA量の減少は、ヒト小腸培養細胞においては再現されなかった。研究代表者らは、ラットとヒトのBCMO1遺伝子の転写調節機構の一部が異なることを見出していることから(論文作成中)、今後はこれらのことも考慮して検討する必要がある。

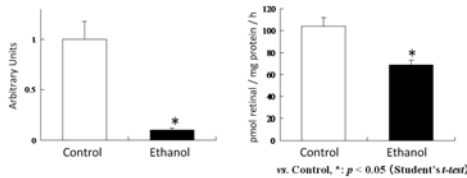


図5 エタノール摂取によるラット空腸のBCMO1 mRNA量および酵素活性の変動

表1 エタノール摂取によるラット血清および各組織の β -カロテン量に対する影響

	Control	Ethanol
Serum β -carotene (ng / dL)	59.2 \pm 33.2	209.2 \pm 58.1
Liver β -carotene (ng / tissue)	1930 \pm 129	512 \pm 114*
Lung β -carotene (ng / tissue)	0.81 \pm 0.59	3.32 \pm 1.44
Testes β -carotene (ng / tissue)	3.83 \pm 0.41	6.46 \pm 1.48

vs. Control, *: $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

表2 エタノール摂取によるラット血清および各組織のレチノール量に対する影響

	Control	Ethanol
Serum retinol (mg / dL)	41.6 \pm 1.1	47 \pm 2.7
Liver total retinol (mg / tissue)	4075 \pm 115	2846 \pm 139*
Lung total retinol (mg / tissue)	48.5 \pm 6.0	96.5 \pm 5.8*

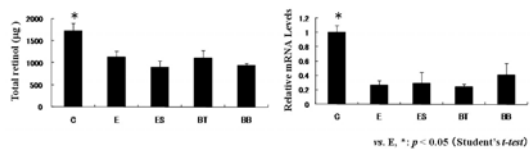
vs. Control, *: $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

アルコール摂取による小腸および肝臓のビタミンAおよび β -カロテン吸収・代謝に対する機能性食品成分の影響

エタノールの長期投与により、エタノール投与によるラット空腸のBCMO1遺伝子の発現量の低下(図6右)や、肝臓貯蔵ビタミンAの低下傾向(図6左)が見られたが、これらの変動に対するシリピニン、ベルベリン、ペタイン摂取による改善効果は、いずれも認められなかった。一方、研究1-の結果に記載したとおり、エタノール摂取による肝臓のトリグ

リセリド量増大に対するこれらの機能性食品成分の抑制効果は見られたことから(図2)、エタノール摂取による肝臓のレチノール量の減少とトリグリセリドの増大は、それぞれ異なるメカニズムが関与しているものと考えられた。

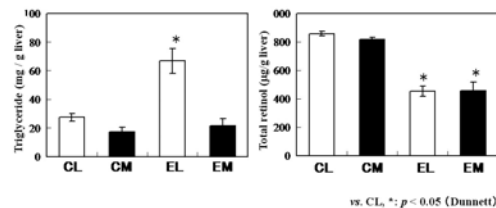
一方、中鎖脂肪(MCT)摂取は、アルコール性肝障害(トリグリセリドの蓄積(図7左)や炎症性サイトカイン TNF mRNA量の増大、ALT・ASTの増大など)に対し抑制効果が認められたが、小腸のBC吸収・代謝関連遺伝子発現量(BCMO1、SR-BI mRNA量)の減少や肝臓のレチノール貯蔵量の減少(図7右)に対しては抑制効果が見られなかった。しかしながら、アルコール摂取による肝臓のレチノイン酸の異化亢進(CYP26A1 mRNA量の増大)の可能性が認められた(図8)。このことは、多数の遺伝子発現制御に関連しているレチノイン酸量が慢性アルコール摂取により減少し、様々な障害を引き起こすことに関連するものと考えられるが、MCTはアルコール摂取によるCYP26A1 mRNA量の増大を抑制したことから(図8)、アルコール摂取によるレチノイン酸量減少を抑制する可能性が示唆された。今後は、肝臓のレチノイン酸量の解析や肝機能改善との関連、さらにMCT摂取によるレチノイン酸の異化抑制機構などについての検討がさらに行っていく予定である。



vs. E, *: $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

図6 エタノール摂取によるラット肝臓の総レチノール量および空腸のBCMO1 mRNA量の減少に対する機能性食品成分摂取の影響

C:コントロール群、E:エタノール群、ES:エタノール+シリピニン群、EB:エタノール+ベルベリン群、EBT:エタノール+ペタイン群



vs. CL, *: $p < 0.05$ (Dunnnett)

図7 エタノール摂取によるラット肝臓のトリグリセリド量の増大および総レチノール量の減少に対する長鎖脂肪(LCT)、中鎖脂肪(MCT)摂取の影響

CL:LCT-コントロール群、CM:MCT-コントロール群、EL:LCT-エタノール群、EM:MCT-エタノール群

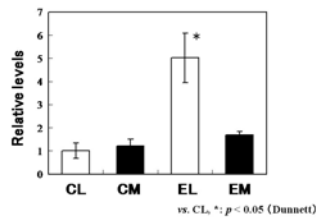


図8 エタノール摂取によるラット肝臓のCYP26A1 mRNA量の増大に対する長鎖脂肪(LCT)および中鎖脂肪(MCT)摂取の影響
CL: LCT-コントロール群, CM: MCT-コントロール群, EL: LCT-エタノール群, EM: MCT-エタノール群

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1件)

Yamaguchi, N., Miyamoto, S., Goda, T. and Suruga, K.: Hepatocyte nuclear factor-4 α regulates human cellular retinol-binding protein type II gene expression in intestinal cells. *Am. J. Physiol. Gastroenterol. Liver Physiol.*, G524-G533, 2009. (査読有)

[学会発表](計6件)

山口範晃, 駿河和仁: 肥満発症ラット OLET の脂肪組織および 3T3L-1 脂肪細胞におけるビタミン A 代謝関連遺伝子の変動、第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学会 合同大会、2010 年 12 月 9 日、神戸市

駿河和仁, 李翔, 山田みな穂, 山口範晃: スナネズミの β -カロテン開裂酵素の遺伝子発現と食餌条件による影響、第 64 回日本栄養食糧学会大会、2010 年 5 月 22 日、徳島市

山口範晃, 駿河和仁: ヒト小腸の β -カロテン開裂酵素の遺伝子発現に及ぼす HNF-1 α と HNF-4 α の影響、第 63 回日本栄養食糧学会大会、2009 年 5 月 21 日、長崎市

山口範晃, 駿河和仁: ヒト小腸様細胞株 C2BBE1 細胞の CRBP II と BCMO1 遺伝子発現に及ぼす HNF-4 α の影響、第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会 合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸市

山口範晃, 駿河和仁: ヒト小腸様細胞株 C2BBE1 細胞の CRBP II 遺伝子発現に及ぼす HNF-4 α の影響、第 62 回日本栄養食糧学会大会、2008 年 5 月 3 日、埼玉県和光市

駿河和仁, 青野由美, 福井翔吾, 山口範晃: アルコール摂取によるラットの β -カロテン吸収・代謝に及ぼす影響、第 62 回日本栄養食糧学会大会、2008 年 5 月 3 日、埼玉県和光市

[図書](計1件)

加藤 滋子、駿河 和仁、宗 正敏(分担執筆)、建帛社、「医科栄養学」ビタミン A、2010 年、p113-115

[その他]

ホームページ等

<http://sun.ac.jp/research/researcher/pdf/suruga.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駿河 和仁 (SURUGA KAZUHIITO)

長崎県立大学・看護栄養学部・准教授

研究者番号: 70315852

(2) 連携研究者

山口 範晃 (YAMAGUCHI NORIAKI)

長崎県立大学・看護栄養学部・助教

研究者番号: 80516295