

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500954

研究課題名(和文)葉酸摂取と脂質代謝の関連性に関する基礎研究

研究課題名(英文)Study on the relation of folate intake and lipid metabolism

研究代表者

中田 理恵子(NAKATA, Rieko)

奈良女子大学・生活環境科学系・講師

研究者番号：90198119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高脂肪食摂取時に葉酸が欠乏した場合の脂質代謝の変動を検討した。その結果、肝重量の増加と白色脂肪組織重量の減少が認められた。同時にコリンが欠乏すると、さらに肝トリグリセリド量の増加が認められ、脂肪滴の蓄積が観察された。脂肪酸の合成と輸送に関わる遺伝子の肝臓での発現が、葉酸・コリン欠乏群で減少していた。また、肝臓から末梢組織へ脂質を分配する働きを持つVLDL中のトリグリセリド量も減少していた。以上より、高脂肪摂取時に葉酸が欠乏すると、肝臓からの脂質輸送が低下して、肝臓への脂肪蓄積が誘導されること、コリンの欠乏によってこの障害がさらに増悪化する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of folate and choline deficiency on lipid metabolism in high fat intake. Folate deficiency induced increase of liver weight, and decrease of white adipose weights. Triglyceride and lipid droplets were accumulated in liver by folate and choline deficiency. Moreover, folate and choline deficiency caused impairment of fatty acid synthesis, oxidation and transport, and decrease of triglyceride concentration in VLDL. These results suggest that folate deficiency affect on lipid metabolism in liver, and that the influence aggravate it more by folate and choline deficiency.

研究分野：栄養学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：葉酸 脂質代謝 高脂肪食 コリン

1. 研究開始当初の背景

葉酸は、ヌクレオチド、アミノ酸、たんぱく質などの生体にとって重要な物質の合成に関与しており、DNA 合成や細胞増殖に必須なビタミンである。その欠乏によって貧血を呈することが古くから知られているが、最近ではメチオニンの脱メチル化反応によって生じるホモシステインの上昇を引き起こし、動脈硬化症、認知症、骨粗しょう症、うつ病、糖尿病などの発症と関係していることが注目されている。

私たちはこれまで、葉酸の生体内機能を再評価するための研究を展開している。その中で、葉酸欠乏によりホモシステインが上昇した組織において、酸化ストレスが亢進していること、血管でも酸化が亢進するとともに、血管の弛緩に関与する一酸化窒素（NO）合成酵素の発現や血液中の NO 量が減少することを明らかにしてきた。さらに、葉酸欠乏によって誘導されるホモシステインの上昇は、ホモシステイン代謝に関わる酵素の遺伝子発現レベルで調節されていることも明らかにしているが、その研究の過程で葉酸欠乏ラットの肝臓の各種遺伝子発現を網羅的に解析したところ、脂質代謝に関わる遺伝子の発現が変動していることを見出し、葉酸と脂質代謝の関連性に注目した本研究の着想点となった。

一方、脂質代謝異常は様々な生活習慣病の原因となることは広く知られているところである。脂質代謝異常症の1つである脂肪肝は、肝機能障害の主要原因であるが、飲酒を原因とするアルコール性脂肪肝についての研究が多くなされてきた。近年では飲酒に起因しない非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）が注目されている。肝臓は各種物質の代謝が行われる場であることから、肝疾患では様々な代謝障害が生じると考えられるが、その詳細は明らかではない。最近、高脂肪負荷による NAFLD モ

デル動物において、ホモシステイン濃度の上昇やその代謝も含めた含硫アミノ酸代謝が変動することが報告されている。ホモシステインおよび含硫アミノ酸代謝の代謝には葉酸が必須であることから考えると、葉酸の不足が NAFLD の重症化を招く可能性も考えられる。そこで、葉酸と脂質代謝の関連性を明らかにするとともに、脂肪肝等の肝疾患の進展に対する葉酸の影響を明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

私たちは、葉酸欠乏過程の肝臓において、様々な遺伝子の発現変動がおこることを見出すとともに、その中で脂質代謝に関連した遺伝子発現が多く変動することを網羅的な解析から見出している。そこで、本研究では葉酸と脂質代謝の関連性をより明らかにするため、葉酸欠乏状態において脂質代謝がどのように変動しているのかを、脂質代謝酵素の遺伝子発現変動の解析をするとともに、高脂肪負荷した場合に、葉酸の欠乏が脂質代謝にどのような影響を与えるのかを検討し、葉酸が脂質代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。さらに、脂質代謝異常症の1つのモデルとしてコリン欠乏を取り上げ、その進展過程における葉酸代謝の変動や葉酸摂取の影響を検討する。本研究成果から、葉酸代謝と脂質代謝の接点を明らかにすることによって、葉酸の新しい機能を提唱したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) SD系雄性ラット(3週齢)を4群に分け、葉酸欠乏食とその対照食(葉酸8mg/kg 食餌)、20%ラードを添加した高脂肪食、高脂肪食を葉酸欠乏にした食餌のいずれかを摂取させた。8週間後に、血液、肝臓、各脂肪組織を採取した。肝臓の葉酸量とホモシステイン量、血漿と肝臓の脂質

量を測定した。酸化ストレスの評価として、肝臓のTBARS量とビタミンC量を測定した。さらに、肝臓および脂肪組織からRNAを抽出し、脂質代謝に関連する遺伝子の発現変動を検討した。

(2) 葉酸欠乏によって、肝臓中のトリグリセリドが有意に増加すること、脂質代謝に関わる遺伝子発現が変動することを明らかにし、葉酸欠乏が脂質代謝に影響を与える可能性を見出した。次に、脂質代謝に関与すると言われているコリンに注目した。葉酸代謝とコリン代謝は、相互に関係しており、コリンが欠乏すると、動脈硬化や脂肪肝のリスクが上昇することが報告されている。そこで、葉酸・コリン欠乏モデルを用いて脂質代謝の変動について検討した。SD系雄性ラット(3週齢)を用い、20%ラードを添加した高脂肪食に、葉酸とコリンを含むコントロールのC群、葉酸を欠乏させたF群、コリンを欠乏させたCD群、葉酸とコリンを欠乏させたFCD群の4群に分け、それぞれの餌を水とともに自由摂取させた。実験食開始後、8週目に麻酔下で開腹し、血液、肝臓、各脂肪組織を採取した。(1)と同様、肝臓の葉酸量とホモシステイン量、血漿と肝臓の脂質量を測定した。さらに、肝臓からRNAを抽出し、脂質代謝に関連する遺伝子の発現変動を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝臓の主要な誘導体である、テトラヒドロ葉酸、5-メチルテトラヒドロ葉酸、5-ホルミルテトラヒドロ葉酸は、葉酸欠乏(F)群では対照(C)群の50%と有意に減少した。高脂肪食(HF)群はC群とほぼ同程度であったが、高脂肪食を葉酸欠乏にした(HF-F)群では、C群、F群に対して有意に減少しており、高脂肪食を同時に摂取した場合のほうが、葉酸量を大きく減少

させる可能性が考えられた。

体重100gあたりの肝臓重量は、葉酸の欠乏により有意に増加し、その程度は高脂肪負荷時のほうが大きかった。肝臓トリグリセリド量は、F群でC群の2倍、HF-F群ではF群の約10倍、HF群の1.5倍と増加し、葉酸欠乏による肝重量の増大と、肝臓へのトリグリセリドの蓄積が見られた。一方、白色脂肪である腹腔内脂肪、腎周囲脂肪、腸間膜脂肪の体重100gあたりの各重量は、葉酸の欠乏により有意に減少した。肝臓のホモシステイン量は、F群でC群の約4倍、HF-F群ではさらに増加してC群の約16倍、F群の約5倍と有意に増加した。また、葉酸を欠乏させていないHF群においてもホモシステインが有意に上昇し、高脂肪摂取の影響が見られた。

過酸化物質であるTBARSは、血漿では差は認められなかったが、肝臓ではHF-F群で大きく増加した。一方、抗酸化系で作用するビタミンCは、HF-F群で有意に減少していた。以上のように、高脂肪食摂取時に葉酸を欠乏させると、肝臓へのトリグリセリドの蓄積により肝臓重量が増加する一方で、白色脂肪組織重量が減少すること、ホモシステインの上昇によって肝臓の過酸化が亢進し、酸化ストレスを与えている可能性が示唆された。

肝臓重量の増大と、脂肪組織重量の減少は、脂肪酸の取り込みや輸送が障害されているのではないかと考えられた。そこで肝臓および各脂肪組織の脂質代謝に関連する遺伝子の発現変動を検討した。脂肪酸の酸化に関与するカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1(CPT1)は、HF-F群の肝臓と腎周囲白色脂肪では、有意に減少していた。また、腹腔内白色脂肪と褐色脂肪において、葉酸欠乏により有意に上昇していた。脂肪酸合成の律速酵素であるアセチルCoAカルボキシラーゼ(ACC)は、HF-F群の肝臓で減少傾向を示した。また、

腎周囲白色脂肪および褐色脂肪では、葉酸欠乏により有意に上昇していた。脂肪酸の合成に関与しているリンゴ酸酵素(ME)は、HF-F 群の肝臓および腎周囲白色脂肪において有意に減少していた。同様に、脂肪酸の合成に関わる脂肪酸合成酵素(FAS)は、肝臓において HF-F 群で減少する傾向を示した。その他の脂肪組織での遺伝子の発現は、差は認められなかった。脂肪酸の細胞内への取り込みに関与する脂肪酸輸送タンパク質(FATP)、脂肪酸の輸送に関与する脂肪酸結合タンパク質(FABP)は、肝臓および腎周囲白色脂肪では、HF-F 群でそれぞれ有意に減少していた。また褐色脂肪では、HF-F 群で有意に発現が上昇していた。

以上の結果から、葉酸欠乏によって脂肪酸の分解、合成、輸送、取り込みに関わる遺伝子発現が肝臓で減少し、肝臓重量の増加と白色脂肪組織重量の減少を誘導すると考えられた。さらに、この葉酸欠乏に誘導される脂質代謝の変動は、高脂肪食負荷によって増悪する可能性が示唆された。

(2) 肝臓の葉酸量は、葉酸を欠乏させた FD 群、FCD 群では C 群に対して有意に減少していた。一方、コリンだけを欠乏させた CD 群では減少が見られなかった。肝臓中のホモシステイン量は、FD 群、FCD 群で C 群の約 15 倍と有意に上昇した。コリン欠乏によるホモシステイン濃度の有意な変化は見られなかった。血漿中のホモシステイン濃度も同様に变化した。以上より、ホモシステイン濃度の上昇は主に葉酸の欠乏によって起こると考えられた。体重 100g あたりの肝臓重量は、F 群で C 群の約 1.3 倍に、FCD 群で C 群の約 2 倍と有意に増加した。一方、脂肪組織では、腹腔内、腎周囲、腸間膜の各白色脂肪は、F 群、FCD 群で、C 群に対しそれぞれ有意に低い値を示した。

体重 100g あたりの肝臓中のトリグリセリド量は、FD 群、CD 群では変化が認められなかったが、肝臓重量が大きく増加した FCD 群では有意に上昇した。肝臓切片の Oil red O 染色と H&E 染色の結果においても、FCD 群で脂肪の蓄積が観察され、脂肪肝が誘導されていることが分かった。一方、血漿トリグリセリド量は肝臓とは反対に、FCD 群では有意に減少していた。以上の結果から、肝臓から他の組織へトリグリセリドの輸送が障害されるため、肝臓に脂肪が蓄積しているのではないかと考えられた。そこで、肝臓から末梢組織へ脂質を分配する VLDL 中のトリグリセリド量を測定したところ、FCD 群で有意に減少していた。

肝臓での脂質代謝関連遺伝子の発現変動を解析したところ、F 群では脂肪酸合成に関与する ACC, ME, FAS と脂肪酸輸送に関わる FABP の発現が減少していた。FCD 群では、F 群での発現変動に加えて、脂肪酸参加に関与する CPT1 と脂肪酸の取り込みに関わる FATP が減少していた。

以上のように、高脂肪食摂取時に葉酸のみを欠乏させると、肝臓重量が増加すること、脂肪組織重量が減少することが明らかとなった。さらに、葉酸とともにコリンを欠乏させると、血漿中のトリグリセリドが減少する一方で、肝臓へのトリグリセリドの蓄積がおこり、肝臓重量が増大する一方で、脂肪組織重量は減少していた。また、脂肪酸分解、合成、輸送に関わる遺伝子の発現の減少と、VLDL 中のトリグリセリド量の減少が認められた。したがって、葉酸・コリン欠乏によって誘導される肝臓への脂肪蓄積(脂肪肝の誘導)は、肝臓内でも脂肪酸合成の増加ではなく、肝臓からの VLDL を介した脂肪輸送の低下による可能性と、高脂肪食摂取時の葉酸欠乏による脂質代謝の変動は、コリンを同時に欠乏させることによって増悪化する可能性が

示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Sugiyama A, Awaji H, Horie K, Kim M, Nakata R. The beneficial effect of folate-enriched egg on the folate and homocysteine levels in rats fed a folate- and choline-deficient diet. Journal of Food Science, 77, H268-H272 (2012) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

中田理恵子, 松元茜, 川端めぐみ, 井上裕康 「葉酸。コリン欠乏による肝脂肪蓄積の誘導」日本ビタミン学会第 66 回大会, 2014 年 6 月 13 日, 姫路商工会議所 (兵庫県)

中田理恵子, 川端めぐみ, 井上裕康 「葉酸欠乏による脂質代謝変動とコリンの影響」日本家政学会第 66 回大会, 2014 年 5 月 24 日, 北九州国際会議場 (福岡県)

松元茜, 井上裕康, 中田理恵子 「葉酸欠乏によって誘導される脂質代謝の変動」第 52 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会, 2013 年 10 月 26 日, 滋賀県立大学 (兵庫県)

松元茜, 高芝沙千子, 井上裕康, 中田理恵子 「葉酸・コリン欠乏での高脂肪負荷が脂質代謝に及ぼす影響」第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013 年 5 月 25 日, 名古屋大学 (愛知県)

中田理恵子, 松元茜, 井上裕康 「高脂肪摂取時の葉酸欠乏が脂質代謝に及ぼす影響」日本家政学会第 65 回大会, 2013 年 5 月 18 日, 昭和女子大学 (東京都)
中田理恵子, 松元茜, 井上裕康 「葉酸、コリン欠乏時における脂質代謝の変動」日本ビタミン学会第 65 回大会, 2013 年 5 月 17 日, 一橋講堂 (東京都)

松元茜, 高芝沙千子, 井上裕康, 中田理恵子 「葉酸とコリンの欠乏が高脂肪食摂取時の脂質代謝に及ぼす影響」2012 年 12 月 6 日, マリンメッセ福岡(福岡)
中田理恵子, 高芝沙千子, 松元茜, 井上裕康 「葉酸欠乏における脂質代謝の変化 高脂肪負荷の影響」日本ビタミン学会第 65 回大会, 2012 年 6 月 23 日, 長良川国際会議場 (岐阜県)

中田理恵子, 井上裕康 「葉酸代謝酵素 -グルタミルヒドロラーゼの臓器局在の検討」第 64 回日本家政学会大会, 2012 年 5 月 13 日, 大阪市立大学 (大阪府)
高芝沙千子, 鈴木麻理, 朝日麻衣, 井上裕康, 中田理恵子 「葉酸欠乏ラットに対する高脂肪摂取の影響」第 65 回日本栄養・食糧学会大会, 2011 年 5 月 14 日, お茶の水女子大学 (東京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 理恵子 (NAKATA RIEKO)

奈良女子大学・生活環境科学系・講師

研究者番号: 90198119

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし