

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：33403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700850

研究課題名(和文)鉄欠乏により誘導されるアディポサイトカインの変動および耐糖能低下機構の検討

研究課題名(英文)The effect of dietary beta-carotene on glucose intolerance in the iron-deficient GK rats.

研究代表者

池田 涼子 (IKEDA, RYOUKO)

仁愛大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：80352805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 型糖尿病モデルラット(GKラット)では、鉄欠乏食投与により血糖値ならびに炎症性サイトカインが上昇する。本研究では、これらの現象が鉄欠乏ラットの生体内脂質過酸化に起因すると推測し、 $\beta$ -カロテンの経口摂取による脂質過酸化の抑制が炎症性サイトカインの減少および耐糖能の改善に關与する可能性について検討した。

$\beta$ -カロテンの経口投与により、血清中アディポネクチン濃度の上昇や血清中レジスチン濃度の低下がみられたが、これらの事象の再現性は期間中に観察されなかった。本研究を通して  $\beta$ -カロテンがアディポサイトカインの発現に影響を与える可能性が示唆されたがその機構は複雑であり、精査が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Increase of blood sugar and inflammatory cytokine was observed in the iron-deficient GK rats, model animal of type 2 diabetes mellitus. It was supposed that these phenomena were caused by the lipid peroxidation in the iron-deficiency. In this study, we examined the effect of dietary  $\beta$ -carotene on suppression of inflammatory cytokine and improvement of the glucose tolerance in the iron-deficient GK rats.

In the first experiment, serum adiponectin increased, and in the second experiment, serum resistin was decreased by dietary  $\beta$ -carotene administration. However, it was very difficult to confirm plasticity about the alteration of these adipocytokine. These results suggested that the change of beta-carotene dose participated in serum insulin-resistant factor complicatedly. To inflammatory cytokine and blood sugar, the effect of dietary  $\beta$ -carotene was not observed, and it was guessed that a factor except peoxidation derived impaired glucose tolerance in the iron-deficient GK rats.

研究分野：基礎栄養学、栄養生化学

キーワード：鉄欠乏性貧血 耐糖能異常  $\beta$ -カロテン

## 1. 研究開始当初の背景

本研究に先行する採択課題「鉄欠乏性貧血における耐糖能低下とその機構に関する研究(課題番号 21700777)」において、食餌誘導性鉄欠乏ラットの血糖値上昇とアディポサイトカイン群の変動が観察された。鉄欠乏ラットにおける血糖値上昇は、高インスリン血症を伴わないことが特徴であり、耐糖能異常の機序が一般的なインスリン抵抗性の機序とは異なる可能性が示唆される。また、アディポサイトカイン濃度については鉄欠乏食投与によりラット血清中の腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ )の増加ならびにインスリン抵抗性因子として知られる脂肪細胞由来のレチノール結合タンパク質 type 4 (retinol binding protein 4: RBP4)の減少が観察されたが、その詳細な機構解明まで至らなかった。

RBP4 は脂肪細胞で合成・分泌されるレチノール結合タンパク質であり、糖新生酵素のひとつであるホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ (PEPCK)の発現を促進し、インスリンのセカンドメッセンジャー活性の低下を介してインスリン抵抗性因子であり、 $\beta$ 型糖尿病患者では、レチノールと結合しないまま血中を循環する apo-RBP4 が増加することが知られており<sup>1,2)</sup>、ビタミン A 代謝の変動が  $\beta$ 型糖尿病の病態に関与するものと認識される。鉄欠乏では肝臓から血清へのレチノール放出が低下し、肝臓中貯蔵型レチノールの蓄積亢進に加えて血清中レチノールおよび RBP が減少することが報告されている<sup>3,4)</sup>。末梢組織において代謝性のビタミン A 欠乏を呈する鉄欠乏状態では、通常の肝臓由来の RBP と同様に RBP4 も低値を示したものと推察される。

TNF- $\alpha$  はマクロファージ由来のサイトカインであり、インスリン抵抗性因子の一つであるほか、インスリン依存性グルコース輸送体(glucose transporter type 4: GLUT4)の発現を抑制することが知られている<sup>5)</sup>。最近ではフェリチンの mRNA 転写を促進することも明らかとなり<sup>6)</sup>、先行研究で確認された鉄欠乏ラットにおける血清中 TNF- $\alpha$  濃度の上昇は、鉄栄養の変動による生体応答の一種と考えられるが、本研究の開始当初にはそのような知見は得られておらず、鉄欠乏状態により亢進する脂質過酸化が<sup>7)</sup>、炎症性サイトカインの増加と耐糖能異常に関与する可能性が考察された。

以上より、鉄欠乏ラットの耐糖能低下について、鉄栄養の変動およびビタミン A 利用の低下の二つの要因が仮定されたことから、本課題では、鉄欠乏により誘導される生体内の代謝変動がインスリン抵抗性に及ぼす影響について、微量栄養素間の過不足による生体内相互作用を背景とした細胞内代謝調節および酸化ストレスの見地から検討を行うことを目的とした。

## 2. 研究の目的

糖質の摂取による食後の一時的な高血糖状態では、抗酸化ビタミンであるビタミン E の血中濃度の低下や、TNF- $\alpha$  の発現誘導が促進されるという報告があり、血糖値の上昇と酸化ストレスには、密接な関係が指摘されている。一方で、鉄欠乏では生体内脂質過酸化が亢進することが知られており、鉄の栄養状態が糖尿病の発症や病態進行に関与する可能性が示唆される。また、前述のように鉄欠乏によるビタミン A の生体内利用不全が耐糖能に影響を及ぼす可能性も推察される。

本課題では、鉄欠乏により誘導されるビタミン A 代謝不全および生体内脂質過酸化が血清中アディポサイトカイン濃度の変動および耐糖能低下に及ぼす影響を解明することを目的として、抗酸化カロテノイドかつプロビタミン A として一般的な食品に広く含まれる  $\beta$ -カロテンに着目し、その経口投与による鉄欠乏ラットの生体内脂質過酸化抑制と炎症性サイトカインの変動が耐糖能に及ぼす影響について検討した。

## 3. 研究の方法

### 実験 1

鉄欠乏ラットの耐糖能異常が、鉄欠乏により誘導される生体内脂質過酸化により誘導されるとの仮説に基づき、過去の実験で生体内脂質過酸化の抑制に有効であると示された  $\beta$ -カロテンの経口投与量 (7.2mg/Kg diet)<sup>3)</sup>を採用して検討を行った。

被験動物として Wistar 系より作出された  $\beta$ 型糖尿病モデルラットとして一般的な GK ラット(系統名 GK/Jcl)を使用し、生後 3 週間の幼若 GK ラット 18 匹を 3 日間予備飼育した後、各群の平均体重が近似となるよう 3 群(各群 n=6)に分け、それぞれ正常食群(A 群)、鉄欠乏食群(B 群)、鉄欠乏食  $\beta$ -カロテン添加群(C 群)として、35 日間(5 週間)の飼育観察を行った。

各群の飼料は AIN-93G 組成に基づき調製し、A 群には理想配合食、B 群および C 群には飼料配合中のミネラル混合から鉄が除去された鉄欠乏食を投与した。また、C 群はビタミン混合からビタミン A を除去し、飼料組成中の大豆油に  $\beta$ -カロテンが 7.2mg/ Kg diet となるよう添加した (Table 1)。

全てのラットは仁愛大学動物実験委員会の承認にもとづき、恒温 (18 ~ 25  $^{\circ}$ C)、恒湿 (40 ~ 60%)、直射日光を避けた 12 時間の昼夜交替照明の静かな環境で丁寧に飼育した。

飼育終了後は血清を採取し、 $-40^{\circ}$ C で凍結保存の後、インスリン濃度、各アディポサイトカイン濃度を測定した。各項目の測定には市販の ELISA 法キットを用いた。また、飼育期間中は飼料を毎日 17:30 に給餌し、翌日 8:30 に回収した。本飼育開始より 7 日毎に資料回収から 2 時間後の午前 10:30 から尾採血による血糖値の測定を実施した。給水は自由とし

た。

	A	B	C
コーンスターチ	529.5	529.5	529.5
ミルクセイン	200	200	200
スクロス	100	100	100
大豆油	70	70	70
セルロース	50	50	50
ミネラル混合*	35	35**	35**
ビタミン混合*	10	10	10***
-カロテン			0.0072
L-シスチン	3	3	3
酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5
BHQ	0.014	0.014	0.014
Total	1000.01	1000.01	1000.09

Table 1 実験1 飼料組成 (g/kg)

\*AIN-93 組成, \*\*鉄除去, \*\*\*ビタミン A 除去

-カロテンは吸収率・ビタミン A 転換率を加味し、過去の検討から十分な酸化能が得られることが明らかとなっている量を飼料中大豆油に混合した。また、カゼインは全群でビタミン A 除去カゼインに統一した。

#### 実験 2

実験 1 の結果を受けて、カロテンの経口摂取がインスリン感受性因子の分泌および耐糖能の改善に及ぼす影響について再現性を確認する目的で、カロテン投与量は変更せず、飼育期間のみ延長して実験を行った。

本実験では 4 週齢の幼若 GK ラット 24 匹を 3 日間予備飼育した後、各群の平均体重が近似となるよう 4 群(各群 n=6)に分け、それぞれ正常食群(A 群)、鉄欠乏食群(B 群)、正常食 -カロテン添加群(C 群)鉄欠乏食 -カロテン添加群(D 群)として、42 日間(6 週間)の飼育観察を行った。飼料組成および飼育条件については、実験 1 に準じた(Table 2)。

	A	B	C	D
コーンスターチ	529.5	529.5	529.5	529.5
ミルクセイン	200	200	200	200
スクロス	100	100	100	100
大豆油	70	70	70	70
セルロース	50	50	50	50
ミネラル混合*	35	35**	35	35**
ビタミン混合*	10	10	10***	10***
-カロテン			0.0072	0.0072
L-シスチン	3	3	3	3
酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5
BHQ	0.014	0.014	0.014	0.014
Total	1000.01	1000.01	1000.09	1000.09

Table 1 実験1 飼料組成 (g/kg)

\*AIN-93 組成, \*\*鉄除去, \*\*\*ビタミン A 除去

#### 実験 3

実験 1、実験 2 を通して カロテンの経口摂取が耐糖能に關与するアディポサイトカイン群の分泌に何らかの影響を及ぼすことが示唆されたが、その再現性がみとめられないことが当初の計画に基づいた本研究の遂行を難しいものとしている。

実験 3 では、-カロテンが鉄欠乏ラットの耐糖能異常に關与する可能性を明確にするため、投与量を見直し、再度の実験を試みた。なお、被験動物である GK ラット自体のカロテノイド吸収やビタミン A 転換に關する報告がないため、本実験では、GK ラットが Wistar 系ラットより選抜交配された起源を持つことから、Wistar 系ラットの -カロテン吸収率について検討した文献値<sup>8)</sup>を採用し、吸収率 15%、-カロテンからビタミン A への転換率 10%として、体内で転換されるビタミン A 量が正常食群の飼料中レチノール量(8mg/Kg diet)と同等になるよう調整し、533mg/Kg diet の -カロテンを添加食群の飼料中大豆油に混合した。

被験動物は 4 週齢の幼若 GK ラット 24 匹とし、本飼育開始に伴い 4 群(各群 n=6)に分け、それぞれ正常食群(A 群)、鉄欠乏食群(B 群)、正常食 -カロテン添加群(C 群)鉄欠乏食 -カロテン添加群(D 群)の 4 群に分け、42 日間(6 週間)の飼育観察を行った。その他の飼育条件、飼育環境、測定項目等については実験 2 に準じて実施した。

#### 4. 研究成果

##### 実験 1

飼育期間中、鉄欠乏ラットにおける飼料回収 2 時間後の血糖値は、-カロテン投与により低値を示し、概ね正常食投与群と同等の値で推移した。ただし、飼育終了となる第 6 週目には C 群の血糖値が急激に上昇し、B 群との有意差がみられなかった。血清中インスリン濃度は全群で有意差が認められなかった。血清中各種アディポサイトカイン濃度では、TNF- $\alpha$  について、鉄欠乏および -カロテンの経口摂取による影響はみられなかった。これより、鉄欠乏ラットの生体内脂質過酸化が耐糖能異常に關与する可能性については再考の余地があるものと考えられた。

また、インスリン感受性因子である血清中アディポネクチン濃度は、正常食群に比し鉄欠乏食群で有意に低値を示し、-カロテン投与により正常食群と同等の値を示した(Table 4)。

以上より、-カロテンの酸化効果による鉄欠乏ラットの耐能異常の抑制についてはその影響が観察されなかったが、経口摂取された -カロテンもしくはその代謝産物がインスリン感受性因子の分泌に何らかの役割を持つ可能性が示された。

	A	B	C
TNF- (pg/dL)	31.9 ±5.2	28.1 ±3.0	35.4 ±9.3
RBP4 (ng/mL)	2.22 ±0.3	1.55 ±0.4	2.00 ±0.8
レジスチン (ng/mL)	10.0 ±0.4	10.4 ±0.3	10.1 ±0.3
レプチン (μg/mL)	0.9 ±0.05	0.7 ±0.2	0.9 ±0.1
アディポネクチン (μg/mL)	54.1 ±10.0	37.4 ±6.1*	49.2 ±4.3

Table 3 血清中アディポサイトカイン濃度 (実験 1)

A 群: 正常食群, B 群: 鉄欠乏食群, C 群: 鉄欠乏 - カロテン添加食群

( Values are means ± SEM of six rats, \* < .05, )

### 実験 2

飼料回収 2 時間後の血糖値は鉄欠乏食投与のより有意に低値を示したが、前回の結果に反し、 - カロテン投与による変動は認められなかった (Fig.1)。

血清中インスリン濃度は全群間で有意差はみられなかったが、鉄欠乏食群間で B 群に比し D 群で低値傾向を示した。また、インスリン活性化の指標となる c-ペプチドは鉄欠乏食群間で、 - カロテン投与により有意に低値を示した。

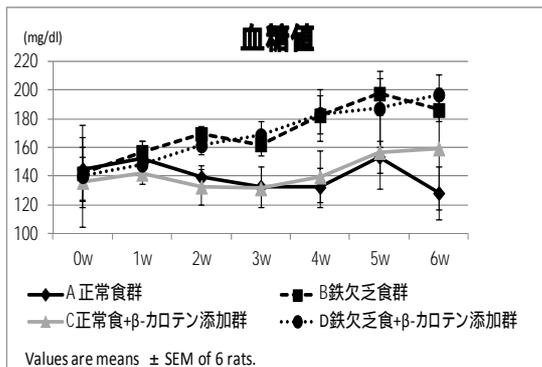


Fig.1 型糖尿病ラットにおける鉄欠乏食および - カロテン投与の影響 (実験 2)

各種アディポサイトカイン濃度については、血清中レジスチン濃度が - カロテン摂取群で有意に低値を示したが、その他のアディポサイトカインでは各群間の有意差は観察されなかった。前回の実験では有意差がみられなかったレジスチンで - カロテン投与による影響が観察されたのは、飼育期間を延長し、解剖時の週齢が上がっていることによる、 - カロテンの体内蓄積量の増加が要因の一つと考えられた。即ち、脂肪組織に移行した - カロテンもしくはその代謝産物がレ

ジスチンの分泌に影響を及ぼす可能性が示唆された。

	A	B	C	D
RBP4 (ng/mL)	1.58 ±0.05	1.54 ±0.08	1.54 ±0.1	1.41 ±0.2
レジスチン (ng/mL)	7.7 ±0.7	8.0 ±0.8	5.6 ±0.3*	5.9 ±0.6*
レプチン (μg/mL)	1.3 ±0.5	1.0 ±0.3	1.1 ±0.5	0.7 ±0.4
アディポネクチン (μg/mL)	29.1 ±7.0	23.4 ±5.1	19.2 ±3.3	23.2 ±10.1

Table 3 血清中アディポサイトカイン濃度 (実験 2)

A 群: 正常食群, B 群: 鉄欠乏食群, C 群: 正常食 - カロテン添加群 D 群: 鉄欠乏食 - カロテン添加群

( Values are means ± SEM of six rats, \* < .05, )

### 実験 3

血糖値は、全群間で有意差は認められなかったが、 - カロテン添加により A 群に比し C 群で、B 群に比し D 群でそれぞれ低値傾向がみられた (Fig.2)。

血清中インスリン濃度、c-ペプチド濃度は全群間で有意差がみられなかった。

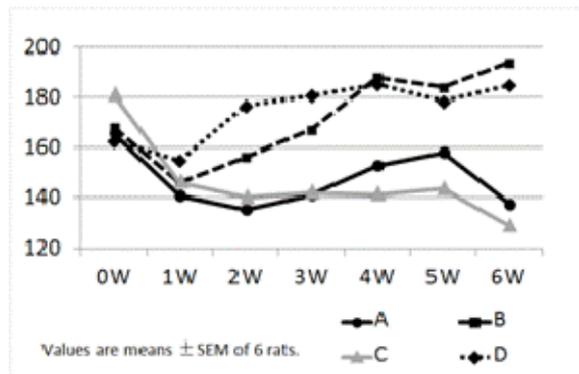


Fig.2 型糖尿病ラットにおける鉄欠乏食および - カロテン投与の影響 (実験 3)

	A	B	C	D
RBP4 (ng/mL)	1.05 ±0.00	1.05 ±0.00	1.05 ±0.00	1.04 ±0.00
レジスチン (ng/mL)	8.0 ±0.06	7.0 ±0.06	7.4 ±0.04	6.7 ±0.07
レプチン (μg/mL)	1.02 ±0.13	0.70 ±0.08*	1.13 ±0.27	0.73 ±1.6*
アディポネクチン (μg/mL)	10.2 ±1.3	7.0 ±0.8	11.3 ±2.7	7.3 ±1.6

Table 4 血清中アディポサイトカイン濃度  
(実験3)

A群:正常食群, B群:鉄欠乏食群, C群:正常食-カロ  
テン添加群 D群:鉄欠乏食-カロテン添加群  
(Values are means± SEM of six rats, \* < .05, )

血清中レプチン濃度は鉄欠乏食群間で  
カロテン投与により有意に低値を示し、正常  
食群間でも同様の傾向が認められた。その他  
のアディポサイトカイン群については鉄欠  
乏および-カロテン投与による有意差は観  
察されなかった(Table.4)。

実験1~2に用いた-カロテン投与量はも  
ともとヒトの-カロテン吸収率、転換率を  
もとに算出された値であり、実験3の投与量  
と比較しても、本来のラットに必要なカロ  
テン量よりも少なかったことがレジスチン濃  
度の低下に影響を与えたと推察される。実験  
3では、よりラットの代謝を考慮して投与さ  
れた-カロテンが血清中レジスチン濃度や  
耐糖能改善に及ぼす効果がより明確に証明  
されることが期待されたが、今回の投与量が  
耐糖能の改善に対し有効な量ではないと判  
断される結果となった。さらには、-カロ  
テン摂取群で血清中レプチン濃度が有意に  
低下するという耐糖能改善や生活習慣病予  
防の観点からは非常にネガティブな結果が  
得られ、当初の目的に対する実績としては極  
めて結論が難しいものとなった。GKラットに  
おける-カロテンの経口摂取と耐糖能異常  
の関係については、その作用点が非常に複雑  
であり、生体内の-カロテン濃度に敏感に  
応答するものと考えられた。

以上より、本課題を通して-カロテンが  
アディポサイトカインの分泌に何らかの影  
響を及ぼすことは示唆されたが、その結果は  
安定せず、一層の究明が必要と考えられた。  
また、鉄欠乏により誘導される耐糖能異常は、  
酸化ストレスとは別の機構に依存する可能  
性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) Yang Q et al., Nature, 2005; 436 (7049) :  
356-362.
- 2) Takebayashi K et al., J Clin Endocrinol  
Metab. 2007; 92 (7): 2712-2719.
- 3) IKEDA R et al., Int J Vitam Nutr Res.  
2002 72 (5): 321-328
- 4) Rosals FJ et al., J Nutr. 1999; 129 (6):  
1223-1228.
- 5) Stephens JM et al., J Biol Chem. 1997  
10; 272 (2): 971-976.
- 6) Yang H et al., J Alzheimers Dis. 2015;  
45 (3) : 797-811
- 7) 千葉大成 他, 日本栄養・食糧学会誌 1998  
51 (4) : 201-206
- 8) 清水史子 他, 昭和女子大学研究紀要:  
學苑 794, 2006, 1-6

#### 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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

池田 涼子 (IKEDA RYOUKO)  
仁愛大学・人間生活学部・準教授  
研究者番号: 80352805

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: