

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11608

研究課題名（和文）ビタミンA栄養状態が脂質の吸収・代謝機能に及ぼす影響とその機序に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the Effects and Mechanisms of Vitamin A Nutritional Status on the Absorption and Metabolic Functions of Lipids.

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） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：ビタミンAはラットのNAFLDの発症・進展に抑制効果を示さなかったが、 β -カロテンは炎症や肝線維化促進因子の遺伝子発現を抑制し、NAFLDの進展を抑制する効果が認められた。またNAFLDのラットでは、肝臓のビタミンA貯蔵能の低下および肝臓から他の組織へのビタミンA動員能の低下の両方が起こっていることが明らかとなった。

肝臓や空腸のPPAR α およびLXRの各標的遺伝子発現量は、ビタミンA欠乏状態においても各アゴニスト投与により増大を示した。このことから、PPAR α およびLXRの機能発現においてはRXRのリガンドとしてビタミンA由来の代謝産物以外の物質の存在が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の研究ではビタミンAの潜在的な不足が種々の脂質代謝異常の発症や進展に関与する可能性が報告されている。本研究結果ではNAFLDモデルラットにおいてビタミンAの投与がNAFLDの発症・進展に対して予防効果を示さなかったが、顕著な肝臓ビタミンA貯蔵能の低下および肝外へのビタミンA動員機能の低下が認められた。また、脂質代謝調節に関する核内受容体PPAR α やLXRの機能発現に対してもビタミンA栄養状態は影響しない可能性が示された。これらの結果は、これまで報告されている脂質代謝調節におけるビタミンAの関連性について一部再検討する必要性を提示するものである。

研究成果の概要（英文）：Vitamin A showed no inhibitory effect on the onset and progression of NAFLD in rats, but β -carotene suppressed the gene expressions related to hepatic inflammation and fibrosis, thereby inhibiting the progression of NAFLD. In addition, it was found that rats with NAFLD had both a decreased vitamin A storage capacity in the liver as well as a decreased ability to mobilize vitamin A from the liver to other tissues.

The expression levels of PPAR α and LXR target genes in the liver and jejunum showed that the expression levels of each target gene increased with each agonist administration, even in vitamin A-deficient conditions. These results suggest the presence of substances other than vitamin A-derived metabolites as ligands for RXR in the functional expression of PPAR α and LXR.

研究分野：栄養生理学

キーワード：ビタミンA 脂質代謝 NAFLD PPAR α LXR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、潜在的なビタミン A の不足が NASH の発症や進展に關与する可能性も報告されている。また、NASH やアルコール性肝障害では肝臓のビタミン A 貯蔵量が著しく低下する。このことから、これらの肝障害の発症や進展はビタミン A 栄養状態によって影響を受け、反対にビタミン A 栄養状態を維持することで抑制されるのではないかと考えられた。さらに、種々のビタミン A の生理作用の多くは、レチノイン酸による核内受容体特に RXR は他種の核内受容体とヘテロ二量体を形成して多くの代謝調節に關わる遺伝子発現調節に關与している。中でも RXR とヘテロ二量体を形成する PPAR や LXR は多くの脂質代謝経路の遺伝子発現を調節しているが、RXR の機能的意義についての検討はこれまで殆どなされていなかった。RXR はビタミン A(9-*cis* レチノイン酸)をリガンドとすると考えられていることから、生体内のビタミン A 栄養状態の違いによっても RXR のパートナーとなる核内受容体の機能性が影響を受けるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ビタミン A 栄養状態の違いが脂質代謝変動やその異常の発症・進展に対してどのように影響するのかについて明らかにする目的で、2つの観点から検討を行った。研究1では非アルコール性脂肪性肝障害(NAFLD)に対する影響について検討するために、ビタミン A 栄養状態の異なる(欠乏,不足,充足,過剰)ラットの肝障害の発症・進展の相違について、肝臓の脂質代謝変動や炎症・酸化ストレス変動の面から解析を行った。研究2および3では、ビタミン A をリガンドとする核内受容体 RXR とヘテロ二量体を形成する核内受容体 PPAR および LXR の機能がビタミン A 栄養状態の違いによりどのような影響を受けるかについて、これらの脂質代謝関連標的遺伝子の発現変動に対する影響の面から検討を行った。

3. 研究の方法

研究1 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の発症・進展に及ぼすビタミン A 栄養状態の影響

3週齢のSD系雄性ラットを前飼育期間である10週齢までは4群に分け、それぞれコントロール食、ビタミン A 添加食、 α -カロテン添加食、ビタミン A 欠乏食を自由摂食させた。10週齢以降の本飼育期間は、前飼育期間にコントロール食を与えたラットをさらに2群に分け前飼育と同じコントロール食(C群)を与えた群とHFC食(脂肪55.3エネルギー-%、2.0%コレステロール、0.5%コル酸含有)を与えた群(HFC群)とした。また、前飼育期間にビタミン A 添加食(基準の10倍量)、 α -カロテン添加食(基準の10倍量)、ビタミン A 欠乏食を与えたラットはそれぞれ、同量のビタミン A や α -カロテンを含むHFC食、またはビタミン A を欠乏させたHFC食(それぞれHFCA+群、HFCA-群、HFCB+群、HFCB-群)を19週齢時まで自由摂食させた。おもな測定項目は、血清の脂質、ALT、AST、TBARS、IL-1、TNF および肝臓脂質量、血清および肝臓レチノール量を測定し、さらには、肝臓の炎症・線維化・酸化ストレスおよびビタミン A 代謝関連遺伝子の発現量を測定した。

研究2 核内受容体 PPAR の機能に及ぼすビタミン A 栄養状態の影響

3週齢のC57BL/6N系雄性マウスを離乳後から16週間ビタミン A 欠乏食を自由摂取させ、予めビタミン A 欠乏状態にした。その後19週齢時に同マウスを5群に分け、AIN93Gまたは93M組成のコントロール食(C)、基準量の10倍のビタミン A(レチニルアセテート)を添加した高脂肪食(A+)、PPAR α アゴニスト(フェノフィブレート;FF)を含むA+食(FA+)、ビタミン A を欠乏させた高脂肪食(A-)、FFを含むA-食(FA-)をそれぞれ19日間摂取させた。なお、C群は自由摂取下で、その他の群はFA-食群の平均摂取量に合わせたpair-feedingを行った。また、ビタミン A 栄養状態の確認のため、離乳後から標準固形飼料(MF)を自由摂取させたマウスをリファレンス群(Chow)として飼育した。主な測定項目は、血清及び肝臓のトリグリセリド及び総コレステロール量および肝臓及び空腸のPPAR 標的遺伝子発現量について解析した。

研究3 核内受容体 LXR の機能に及ぼすビタミン A 栄養状態の影響

基本的な飼育の流れは上記研究2と同様であるが、19週齢時以降はLXRのアゴニストにT0901317(以下T0)を用い、マウスを5群に分け、AIN93Gまたは93M組成のコントロール食(C)、基準量の10倍のビタミン A(レチニルアセテート)添加した高コレステロール食(A+)、LXRアゴニスト(T0901317、以下T0)を含むA+食(TA+)、ビタミン A 欠乏させた高コレステロール食(A-)、T0を含むA-食(TA-)をそれぞれ1週間自由摂食させた。主な測定項目は、肝臓及び空腸のLXR標的遺伝子発現量について解析した。

4. 研究成果

研究1 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の発症・進展に及ぼすビタミン A 栄養状態の影響

本研究で用いたラットは、いずれの群も肝臓重量はC群に比べ他の群で顕著に大きく、肝臓が肥大化を呈していたが、HFC食中のビタミン A 含量による差はみられなかった。また、肝臓のトリグリセリド量および総コレステロール量もHFC群で有意な増大を示していたが、HFC食中のビ

タミン A 含有量の違いによる差はみられず、肝臓重量の結果と同じであった。肝臓組織切片の HE 染色の結果より、HFC 群、HFCA + 群、HFCA - 群で肝細胞内に小さい脂肪滴があり、いずれも 5%以上の脂肪の蓄積があることから脂肪肝であると考えられる(図 1)。特に HFC 群、HFCA + 群では炎症細胞の浸潤もみられたことから、Matteoni の分類より Type2 の NAFLD(炎症を伴う脂肪肝)であると考えられ、一方 HFCA - 群では炎症細胞の浸潤は殆どみられなかったことから Type1 の NAFLD(単純性脂肪肝)と考えられる。

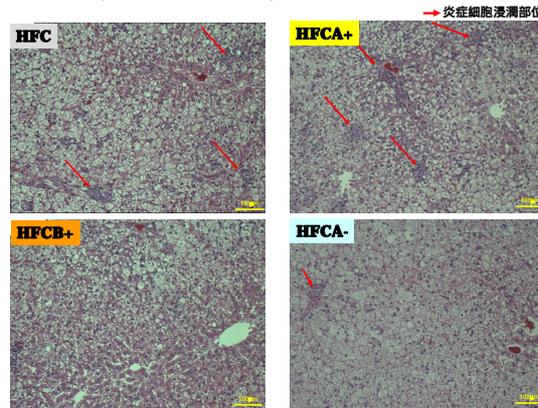


図 1 肝臓の HE 染色像

しかしながら、肝臓の炎症細胞の浸潤が確認された HFC 群および HFCA + 群では血清 ALT、AST、TNF 濃度は高値を示し(図 2)、肝臓における炎症惹起因子(*Il1b*, *Tnfa*, *Ccl2*)や線維化促進因子(*Tgfb*, *Acta2*, *Col1a1*, *Timp1*)の遺伝子発現量の増大や抗酸化酵素(*Gpx1*)の遺伝子発現量の低下(図 3, 4)がみられたことから肝線維化への進展も示唆された。一方、HFCA + 群および HFCA - 群では血清 ALT、AST、IL-1、TNF 濃度が HFC 群や HFCA + 群に比べ低く(図 2)、肝臓における炎症惹起因子(*Il1b*, *Tnfa*, *Ccl2*)や線維化促進因子(*Tgfb*, *Col1a1*)の遺伝子発現量も低い傾向(図 4, 5)にあったことから肝臓組織画像の結果と同様 HFCA + 群や HFCA - 群で肝障害の進展が抑制されている可能性が示された。

本研究の当初の仮説では、NAFLD の発症やその進展はビタミン A や β -カロテンを十分量摂取することで抑制され、反対にビタミン A 欠乏状態では促進すると考えていたが、 β -カロテン摂取以外の群ではその仮説とは異なる結果が示された。特に生体内のレチノイン酸により発現が誘導される肝臓の *Cyp26a1* 遺伝子発現量が、HFCA + 群では顕著に増大し、HFCA - 群では減少していたことから(図 4)、生体内のレチノイン酸量も HFCA + 群では増大、HFCA - 群では減少していたと考えられた。これらのことから、HFCA + 群ではレチノイン酸による NAFLD 進展の抑制作用を阻害する何らかの因子が関与している可能性が考えられ、一方 HFCA - 群では、レチノイン酸の作用を介さない機序で NAFLD 進展を抑制している可能性が考えられた。

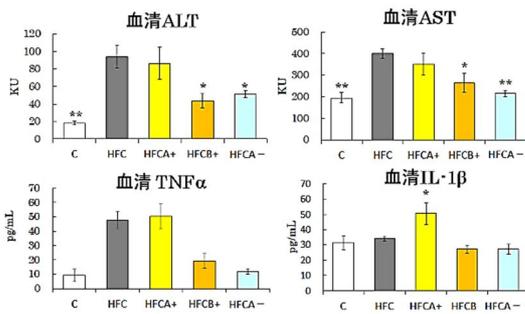


図 2 血清 ALT, AST, TNF, IL - 1b 濃度

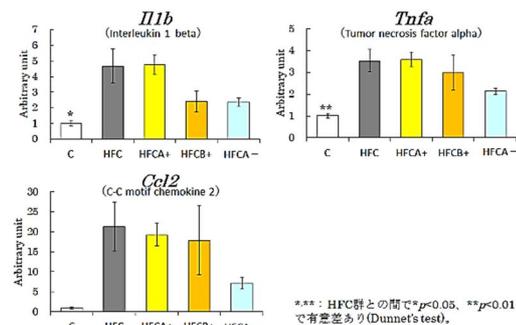


図 3 肝臓の炎症惹起関連遺伝子発現量

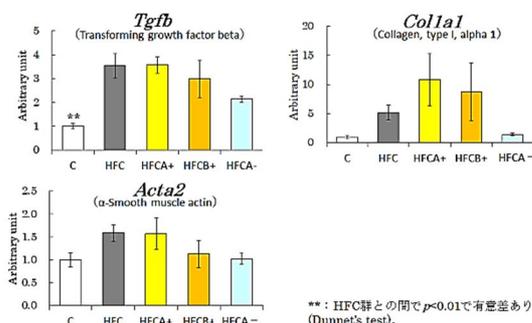


図 4 肝臓の線維化促進因子関連遺伝子発現量

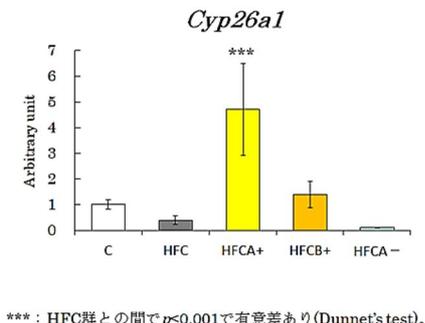
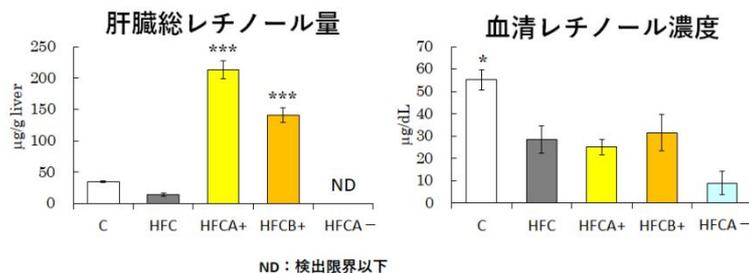


図 5 肝臓の *Cyp26a1* 遺伝子の発現量

HFC 群では血清レチノール濃度と肝臓総レチノール量の減少がみられ、HFCA - 群ではそれらの減少がさらに顕著であった(図 6)。一方、HFCA + 群および HFCB + 群では肝臓ビタミン A 量の顕著な増大はみられたが、血清のビタミン A 濃度には反映されなかった。この結果より本研究で用いた NAFLD モデルラットでは、肝臓のビタミン A 貯蔵量の減少だけでなく、ビタミン A や β -カロテン摂取時には肝臓から他の組織への動員能の低下も起きている可能性が考えられた。



ND: 検出限界以下
 ***: HFC群との間で*p<0.05, ***p<0.001で有意差あり(Dunnett's test).

図 6 肝臓、血清のレチノール量

以上の研究 1 の結果から、ビタミン A の摂取は HFC 食誘導性の NAFLD の発症・進展に抑制効果を示さなかったが、 β -カロテンの摂取は炎症惹起因子と肝線維化促進因子の遺伝子発現を抑制し NAFLD の進展を抑制する作用が認められた。また、同様にビタミン A 欠乏食摂取下でも NAFLD の進展を抑制した。この結果については当初の仮説と異なるものがあり、さらに詳細なメカニズムの検討が必要である。また HFC 食誘導性の NAFLD モデルラットでは、肝臓のビタミン A 貯蔵能の低下だけでなく、肝臓から他の組織へのビタミン A 動員能の低下の両方が起こっており、ビタミン A 代謝異常を起していることが明らかとなった。

研究 2 核内受容体 PPAR の機能に及ぼすビタミン A 栄養状態の影響

肝臓の脂肪酸代謝やエネルギー代謝に関与する PPAR 標的遺伝子(*Acox1*, *Acs*, *Scd1*, *Fabp1*, *Ucp2*)はビタミン A 摂取の有無にかかわらず FF 摂取により有意に増大またはその傾向を示しており、両群間(FA+ 群、FA- 群)でも大きな差はほとんど見られなかった(図 7)。一方、空腸の PPAR 標的遺伝子では、FF 摂取による遺伝子発現量は、*Fabp1* 遺伝子では増大は見られなかったが、その他の遺伝子(*Cd36*, *Angptl4*, *Ehhadh*, *Cyp4a10*)ではいずれも FA- 群でのみ有意に増大を示しており、FA+ 群では増大が見られなかった。この結果は FA+ 群でも発現量の増大が見られた肝臓の PPAR 標的遺伝子とは異なるものであったが、ビタミン A 欠乏状態ではいずれの組織においても PPAR 標的遺伝子の発現量は FF 摂取により増大を示した(図 8)。

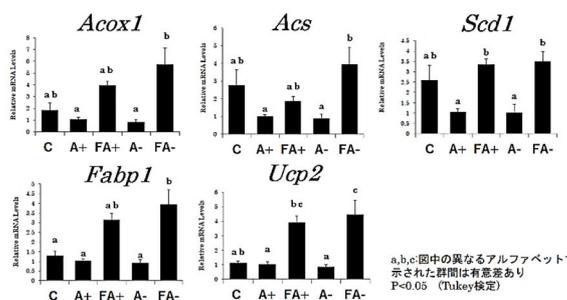


図 7 肝臓の PPAR 標的遺伝子発現量

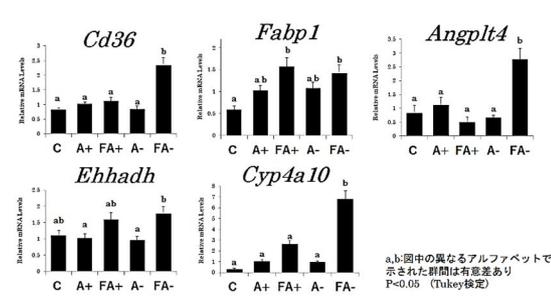


図 8 空腸の PPAR 標的遺伝子発現量

以上の研究 2 の結果から、ビタミン A 欠乏群でも PPAR アゴニスト FF 摂取により肝臓や空腸の PPAR 標的遺伝子発現量の増大が見られたことから、PPAR 標的遺伝子発現調節には RXR リガンドとしてビタミン A(9cRA)は必要ないか、またはビタミン A 以外の内因性 RXR リガンドが作用している可能性も考えられた。

研究 3 核内受容体 LXR の機能に及ぼすビタミン A 栄養状態の影響

ビタミン A 摂取の有無にかかわらず LXR アゴニスト T0901317(T0)の摂取により TA+ 群と TA- 群の肝臓トリグリセリド量および肝臓相対重量の有意な増大が確認されたが、その値は TA- 群に比べ TA+ 群の方が有意に大きかった。このことから、LXR 標的遺伝子である脂肪酸合成系遺伝子の発現量増大には、RXR のリガンドとしてのビタミン A も必要であると考えられた。しかしながら、肝臓の脂肪酸合成系の LXR 標的遺伝子のうち *Srebp1* 遺伝子を除く 4 つの LXR 標的遺伝

子(*Cd36*, *Fasn*, *Acc1*, *Scd1*)の発現量は、ビタミンA摂取の有無にかかわらずTA+、TA-群ともT0摂取により有意に増大を示しており、また両群間の差も見られなかった(図9)。

本研究ではC群を除く試験食にコレステロールを添加したが、肝臓や血清の総コレステロール量は増大を示さず、さらにT0摂取による低下も見られなかった。この原因については明らかではないが、コレステロールを含む試験食の摂取期間(1週間)が短かったこと、長期間のビタミンA欠乏食摂取による食餌コレステロール吸収能が障害されていたことなどが考えられる。一方、肝臓のコレステロール排泄・胆汁酸合成に関わるLXR標的遺伝子の発現量(*Abcg1*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Cyp7a1*)は、いずれもTA+群では増大が見られず、TA-群でのみ有意な増大が見られ(図10)この結果は空腸のコレステロール排泄関連遺伝子(*Abcg1*, *Abcg5*, *Abcg8*)の発現量に対してほぼ同様であった(図11)。

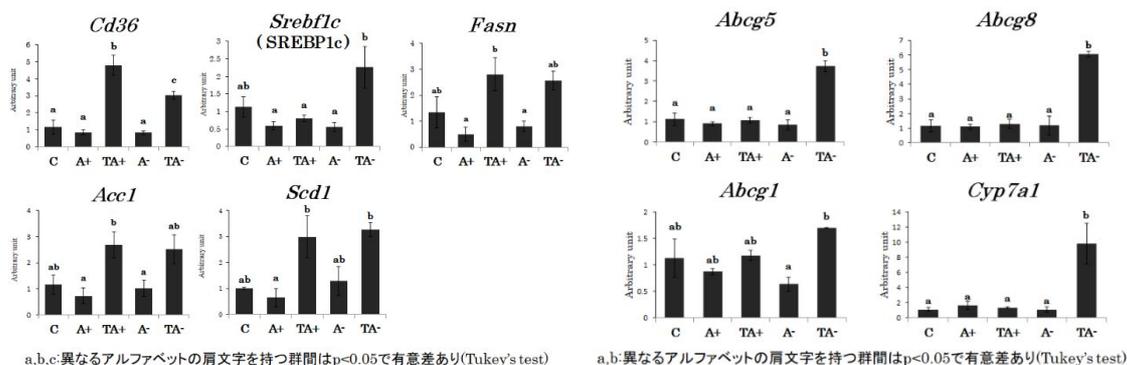


図9 肝臓のLXR標的遺伝子(脂肪酸代謝関連) 図10 肝臓のLXR標的遺伝子(コレステロール代謝関連)

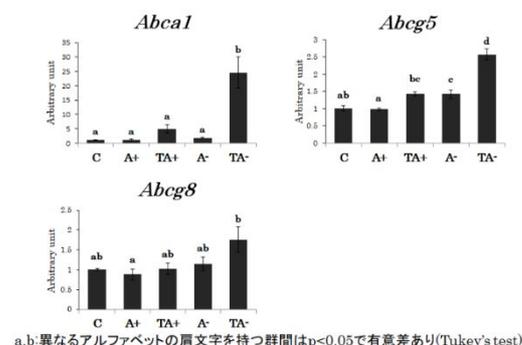


図11 空腸のLXR標的遺伝子(コレステロール代謝関連)

以上の研究3の結果から、ビタミンA欠乏群(TA-)でもLXRアゴニストT0摂取により肝臓や空腸のLXR標的遺伝子発現量の増大が見られたことから、前述の研究2のPPARにおける結果同様、LXR標的遺伝子発現調節においてもRXRリガンドとしてのビタミンA(9-*cis* Retinoic acid)は必要ないか、もしくはビタミンA以外の内因性RXRリガンドが作用している可能性も考えられる。近年9cRA以外のRXRリガンド活性物質として長鎖飽和脂肪酸(ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸)や一般的なビタミンA(all-*trans* レチノールやall-*trans* レチノイン酸)からは生合成されないと考えられている新規のレチノイド9-*cis* 13,14-dihydro-retinoic acidなども報告されており、今後これらの関与についての検討も必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katsuhisa Omagari, Mayu Yamasaki, Linh Chi Thi Ngo, Chiaki Koba, Asuka Nagata, Ayumi Fukuda, Kazuhito Suruga, Mayuko Ichimura-Shimizu, Koichi Tsuneyama	4. 巻 65(1)
2. 論文標題 Influence of age in weeks on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis in a diet-induced Sprague-Dawley rat model. ACTA Medica Nagasakiensia,	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Medica Nagasakiensia	6. 最初と最後の頁 7-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11343/amn.65.7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Katsuhisa OMAGARI, Miku UCHIDA, Yumeno TAGAWA, Mizuki YOGO, Kae INAGAKI, Ryoko HONGO, Shouhei TAKEUCHI, Kazuhito SURUGA, Kazunori Koba, Mayuko ICHIMURA-SHIMIZU, Koichi TSUNEYAMA	4. 巻 68(5)
2. 論文標題 Influence of Fasting Time on Serum and Hepatic Lipid Profiles in a Sprague-Dawley Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 409-419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.68.409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------