

機関番号：27301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700767

研究課題名(和文) 脂肪組織内の BCMO1 及び CRBP 発現の調節に関する研究

研究課題名(英文) The study of the regulation of BCMO1 and CRBP expression in adipose tissues.

研究代表者

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

研究成果の概要(和文): 肥満を発症する OLETF ラットの脂肪組織では、幾つかのビタミン A 代謝関連遺伝子が発現した。特に、レチノイン酸合成酵素 RALDH1 遺伝子発現および脂肪組織中のレチノイン酸含量が減少していたことから、肥満状態ではレチノイン酸合成能が低下する可能性が示唆された。また、マウスの脂肪細胞 3T3L-1 細胞を用いた実験では、βカロテンを添加して培養したところ、その細胞の分化・成熟が抑制された。その機序として、核内受容体 PPARβ/δ を介して誘導されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): Some vitamin A metabolism-related genes were changed in adipose tissues of OLETF rats. Especially RALDH1 gene expression and contents of retinoic acid were decreased in the adipose tissues, suggesting that ability of products of retinoic acid might be lower under obesity. Additionally, β-carotene might suppressed differentiation and maturity in 3T3L-1 cells by activating PPARβ/δ.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学

キーワード：食と栄養

1. 研究開始当初の背景

ビタミン A (レチノール、レチナール、レチノイン酸とその類縁化合物) はヒトの体内では合成できないので、食餌から摂取しなければならない栄養素である。ビタミン A の生理作用として、細胞の分化・増殖、形態形成、視覚作用、免疫系などにおいて重要な役割が挙げられる。最近の研究では、レチノイン酸やレチナールが、脂肪組織での脂肪合成を抑制することが報告され、肥満の予防や治療への多大な貢献が期待される (Ziouzenkova et al., Nat Med, 2007; Berry et al., Mol Cell Biol, 2009)。しかしながら、過度のビタミン A 摂取は中毒を発症する危険性もあり、どの程度

ビタミン A を摂取すれば有益な生理作用をもたらすか明確にされていない。そこで、申請者は、脂肪細胞でのビタミン A 代謝がどのような機序で調節されているかを追究する必要があると考えた。また、プロビタミン A であるβカロテンを過剰摂取してもビタミン A 中毒を発症しない点に着目し、βカロテンが肥満の予防および治療に寄与する可能性を考えたい。

2. 研究の目的

(1) βカロテンをビタミン A に転換する酵素 BCMO1 は、脂肪組織中の脂質代謝の調節に

関連することが報告されている (Hessel et al., J Biol Chem, 2007)。また、細胞性レチノール結合タンパク質 CRBP はレチノールやレチナールと複合体を形成し、ビタミン A 代謝の中枢を担っている。そこで本研究では、肥満発症の実験モデルとして、OLETF ラットを用いて、肥満状態における脂肪組織のビタミン A 代謝の変動について調べた。さらに、プロビタミン A であるβカロテンを OLETF ラットに摂取させたときの肥満抑制効果について検討した。

(2) (1)の動物実験に加え、脂肪細胞ではどのような機序でビタミン A やβカロテンの代謝およびその生理作用が発揮されているかを調べるために、マウス線維芽細胞 3T3L-1 細胞を脂肪細胞に分化させ、βカロテンおよびビタミン A を添加して培養したときの脂肪細胞への影響を検討した。また、レチノイン酸が核内受容体 PPARβ/δ を介して、血糖値の改善および脂肪組織重量の減少が示されたことが報告されていることから (Berry et al., Mol Cell Biol, 2009)、PPARβ/δ のアンタゴニストである GSK0660 を添加したときの 3T3L-1 細胞の分化・成熟への影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

14 週齢の雄 OLETF ラットおよびその対照となる LETO ラットに標準粉末試料 (オリエンタル酵母) またはβカロテン添加食 (72 mg/kg diet) を自由摂食させ、19 週齢まで飼育した。また別の実験条件として、5 週齢の OLETF ラットから標準粉末飼料 (コントロール食)、βカロテン添加食 (385 mg/kg diet) およびレチノイン酸添加食 (100 mg/kg diet) を LETO ラットと pair-feeding し、3 ヶ月間飼育した。各飼育条件における飼育期間中は、各群ラットの体重増減および食餌摂取量を記録した。血液検査として、1~2 週間に 1 回ずつ尾静脈から血液を採取し、空腹時血糖値および血清トリグリセリド濃度を測定した。飼育終了後に断頭屠殺し、各群のラットから脂肪組織を採取し、その重量を測定した。採取した脂肪組織は、リアルタイム RT-PCR 法によって、各種遺伝子発現量の変動を解析した。さらに、脂肪組織中のレチノールおよびレチノイン酸含量を HPLC により測定した。

(2) 細胞培養実験

脂肪細胞の分化誘導試薬を含む培地で 3T3L-1 脂肪前駆細胞を分化させ、各分化ステージ (未分化、分化誘導 3 日後および 7 日後) まで培養した。さらに、上記の分化誘導試薬

を含む培地にβカロテン、ビタミン A (レチノールまたはレチノイン酸) および GSK0660 を添加し、3T3L-1 細胞の分化誘導 7 日まで培養した。これらの細胞から総 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により各種遺伝子の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 肥満状態における脂肪組織のビタミン A 代謝の変動

自由摂食した OLETF ラットでは、CRBP、BCMO1 およびレチノール結合タンパク質 (RBP) の遺伝子発現量が LETO ラットに比べて増大した (図 1A-C)。その一方で、レチノイン酸を合成する酵素 (RALDH1) 遺伝子発現量は減少した (図 1D)。それに伴い、脂肪組織中のレチノイン酸含量も OLETF ラットで減少した (図 2)。

一方、LETO ラットと pair-feeding を行なった OLETF ラットでは、RALDH1 遺伝子発現量は LETO ラットとは差が無かった。この結果から、肥満状態では食餌摂取量の差によって脂肪組織のレチノイン酸代謝が変動する可能性が示唆された。

(2) レチノイン酸およびβカロテンによる OLETF ラットの肥満抑制効果の検討

OLETF ラットにβカロテンを含む食餌を自由摂食させた場合、飼育期間中の体重、脂肪組織重量、血糖値および血清トリグリセリド濃度は、コントロール食を摂食させた OLETF ラットと殆ど差が無かった。この結果を基に、βカロテン添加食の開始時期と摂食量を再検討し、肥満を発症する前 (5 週齢) からβカロテンおよびレチノイン酸を摂食させ、LETO ラットと pair-feeding を行うことで、肥満がどの程度抑制および予防できるかを検討した。結果として、これらの物質を摂食させても、血糖値、血清トリグリセリド濃度および脂肪組織重量は減少しなかった。

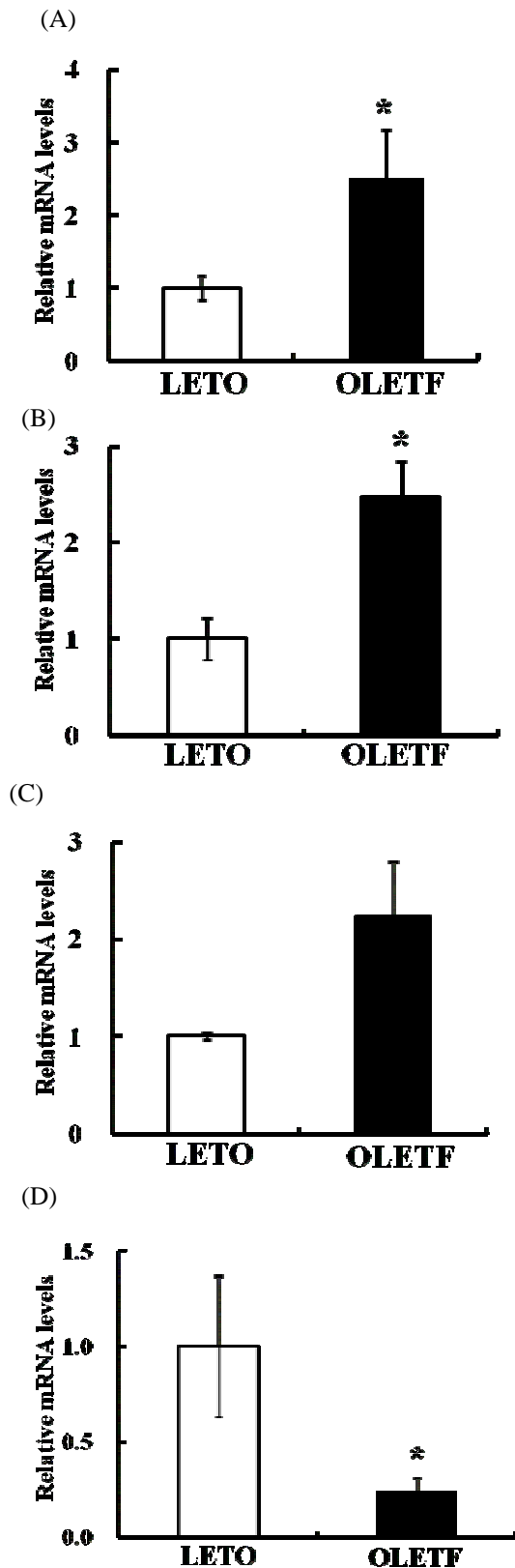


図 1. Changes in some vitamin A metabolism-related gene expression in adipose tissues of free-fed OLETF rats.

(A) RBP, (B) CRBPI, (C) BCMO1, (D) RALDH.

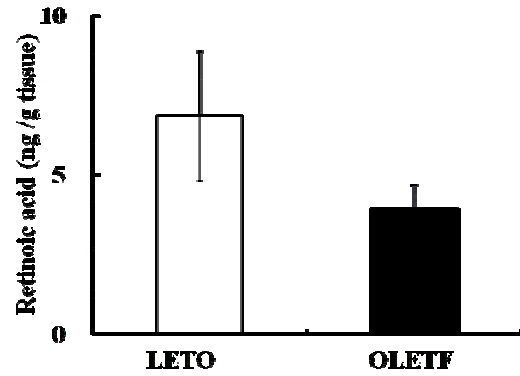


図 2. Contents of retinoic acid in adipose tissues of OLETF rats.

(3) 3T3L-1 細胞の分化・成熟におけるβカロテンおよびレチノイドの影響

脂肪細胞の分化のマーカーである脂肪酸結合タンパク質 (FABP4) および核内受容体 PPAR γ の mRNA 発現量は、レチノイドおよびβカロテンを添加して培養した場合、その発現量は減少した。また、中性脂肪の合成に必要な酵素であるグリセロール 3 リン酸脱水素酵素 (GPDH) も同様に発現量が減少した。一方、βカロテンと一緒に PPAR β/δ のアンタゴニストである GSK0660 を培地に添加して培養した場合、これらの遺伝子発現量の減少が抑制された (図 3)。一方、レチノイン酸の場合、今回の実験では GSK0660 を添加してもその抑制効果は観察されなかった。このことから、本研究において、βカロテンは PPAR β/δ を介して脂肪細胞の成熟化および脂肪蓄積の減少に作用している可能性が示唆された。

以上のように、本研究において、肥満状態ではビタミン A 代謝関連遺伝子の発現量が変動することが示された。特に、RALDH1 遺伝子発現量およびレチノイン酸含量が減少したことから、肥満状態では、レチノイン酸合成能が低下している可能性が示唆された。一方、本研究では、βカロテンおよびレチノイン酸による肥満抑制効果は確認できなかった。しかし、細胞培養実験では、脂肪細胞の成熟化および中性脂肪合成能が遺伝子発現レベルで低下した。したがって、*in vivo* と *in vitro* では脂肪細胞の代謝調節機序が異なる可能性がある。Berry らは、高脂肪食を摂食させて肥満を発症させたマウスにレチノイン酸を投与したところ、血糖値改善および脂肪組織重量の減少が観察され、その機序と

してレチノイン酸のPPAR β/δ を介した可能性を報告した (Mol Cell Biol, 2009)。今後の研究展開として、OLETF ラットの様な遺伝的な要因で肥満を発症するのではなく、高脂肪食などの食餌の偏食による食習慣の違いによって肥満を発症させたときの、ビタミンAと β カロテン代謝およびその生理作用について検討する必要がある。さらに、この調節因子としてPPAR β/δ がどの程度関わっているかを追究する必要がある。

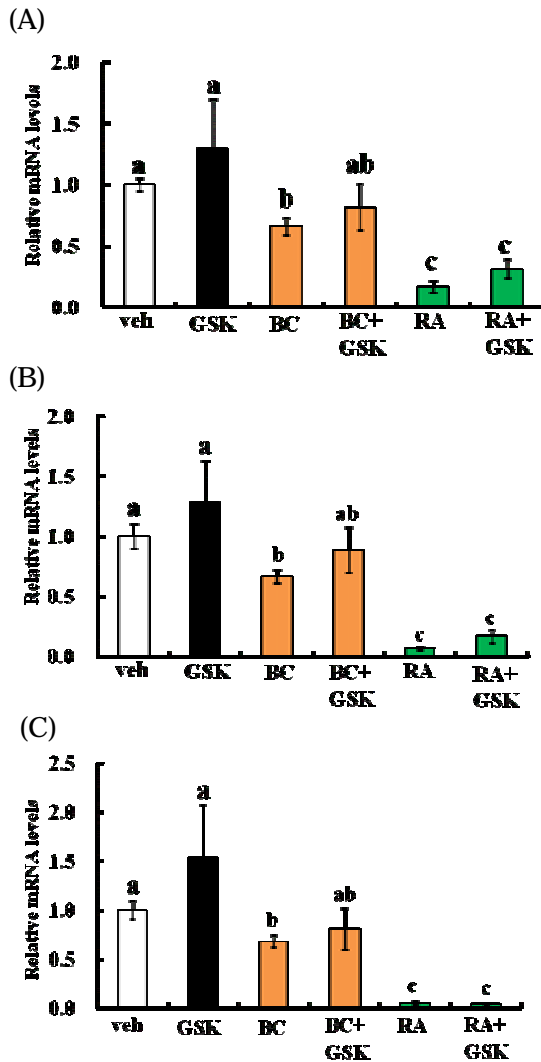


図 3. Effects of β -carotene, retinoic acid and PPAR β/δ antagonist GSK0660 on GPDH gene expression in 3T3L-1 cells. (A) PPAR γ , (B) FABP4, (C) GPDH. veh: vehicle, GSK: GSK0660, BC: β -carotene, RA: retinoic acid

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)

[学会発表](計2件)

山口範晃、駿河和仁: 肥満発症ラット OLETF 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。BMB2010、2010 年 12 月 7 日、神戸市。

山口範晃、野口沙知子、駿河和仁: OLETF ラット脂肪組織および 3T3L-1 前駆脂肪細胞のビタミン A 代謝関連遺伝子の発現変動に関する研究。日本栄養食糧学会、2011 年 5 月 15 日、東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 連携研究者

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