

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590704

研究課題名（和文）：食事脂質が脂肪酸代謝異常ヘテロ接合体マウスに与える影響について

研究課題名（英文）：Effects of fat in diets on heterozygous mutants of carnitine-deficient mice

研究代表者：堀内 正久 (Horiuchi Masahisa)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：50264403

研究成果の概要（和文）：

脂肪酸代謝異常マウス（カルニチン輸送体欠損マウス）は、オスヘテロマウスが高脂肪食時のみ、肥満傾向を示した。中枢性のレプチン抵抗性が関与している可能性を考え、視床下部摂食関連ペプチド mRNA を定量し、ヘテロマウスにも中枢（視床下部）のレプチン抵抗性が存在することが示唆された。末梢からのカルニチン投与が有効でなかったことから、脳内カルニチンが低いことが、病態に関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

JVS mice, an animal model for systemic carnitine deficiency, were examined in effects of high-fat diets on weight. Male heterozygous JVS mice showed higher body weight due to higher food intake, in association with higher leptin in blood, compared with wild type of mice. Additionally, male heterozygous JVS mice showed higher AGRP and lower POMC mRNAs in the hypothalamus, indicating that heterozygotes may have leptin resistant state in central nervous system. The low carnitine levels in brain may be involved in the central leptin resistance, because carnitine ingestion from periphery was not effective.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：カルニチン、ヘテロ接合体、脂肪酸代謝異常、肥満、レプチン抵抗性、高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

「食事脂質含量と疾患発症」の関連として、「コレステロール摂取と動脈硬化病変」はその良い例であり、健康・栄養を考える上で、食事のコレステロール摂取に対する注意がなされるようになっていく。疾患発

症の分子レベルでの解析とともに、どのような病態が「食事脂質」と関連があるのかを明らかにすることは重要なテーマである。申請者は、以前から、細胞膜カルニチン輸送体欠損マウス [juvenile visceral steatosis (JVS) マウス] に脂肪肝、心肥大、

行動異常が起こることを見出し、その病態解析を行ってきた。カルニチンは長鎖脂肪酸がミトコンドリアに輸送される時に必須の因子であり、ビタミン様物質として知られている。ヒトにおいてもカルニチンの欠損症が知られており、脂肪肝や心肥大を発症する。しかし、自発行動の異常や不安行動が起こるかどうかについては不明な点が多い。私たちは、JVSマウスを絶食にすることで自発行動量の低下や脳波異常が起こること、また視床下部オレキシン神経活動低下が関連することを報告した。最近、睡眠障害（ナルコレプシー）のヒト遺伝子解析で、脂肪酸・カルニチン代謝に関与する *carnitine palmitoyltransferase-1* 遺伝子多型との間に連鎖のあることが報告され、その論文に私たちの研究は引用されている。昨今の精神的な疾病の顕在化（うつ病患者や自殺率の増加）は、単純な理由では説明されないと思われるが、食事（脂肪摂取増加）との関係についての研究も必要と考える。申請者が報告してきた病態「脂肪肝、心肥大、行動異常」はホモ接合体マウスを用いた研究であった。ヒト集団での「食事脂質含量と疾患発症の関連」を考える上で、脂肪酸代謝異常ヘテロ接合体についての解析は意義があると考ええる。

2. 研究の目的

西欧型の食生活となり、食事からの脂質摂取量が増加している生活習慣（健康日本 21、社会保険健康事業財団）を考えると、「食事脂質含量と疾患発症」の関連を探索することは、一次予防の観点から重要である。本研究では、申請者が確立したカルニチン欠乏脂肪酸代謝異常モデルマウスを用い、食事中脂質と精神・身体異常（肥満、脂肪肝、心肥大、行動異常）との関連を明らかにしたい。特に、完全欠損でなく一般集団にある比率（～1%）で存在すると考えられるヘテロ接合体に症状が起こりうるかどうかを、本疾患マウスのヘテロ接合体を用いて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

実験には、申請者が確立した脂肪酸代謝異常マウス（JVS マウス）を用いる。常染色体劣性疾患であり、遺伝子診断法は確立している。野生型オスマウスとヘテロ接合体メスマウスを交配し、野生型マウスとヘテロ接合体マウスを得る。3 週令で離乳し、12%（エネルギー比）と 45%（エネルギー比）脂肪食（テストダイエット、SLC）で、それぞれ飼育する（飼料のカルニチン含量を測定し、カルニチン含量の低いことを確認する）。① 3 ヶ月令 ② 1 年の時点でそれぞれ評価を行う。体重、摂食量は、1 週間ごとに測定を行う。

Xiaofei らの先行研究で、普通食で飼育したヘテロ接合体マウスに 1 年程度で心臓に組織学的な変化が観察されたと報告されている。従って、1 年程度の高脂肪食での飼育は必要（3 ヶ月令の時点でいずれも評価が陰性の場合）。カルニチンレベルは経時的に低下することが知られている。

4. 研究成果

野生型オスマウスとヘテロ接合体メスマウスを交配し、野生型マウスとヘテロ接合体マウスを得、遺伝子診断にて区別を行った。3 週令で離乳し、普通食と脂肪食で、それぞれ飼育した。用いた飼料のカルニチン含量を測定した。用いた特殊食のカルニチン含量は、通常食である CE2 食よりも低く、極めて低いレベルであることを確認した。3 ヶ月間の飼育を行った。週ごとに体重の測定を行い、成長曲線を書いた。3 ヶ月令の成獣期に、ネンブタール麻酔後、心臓、肝臓、内臓脂肪（特に精巢上体周囲脂肪組織）を採取し、重量の測定を行った。オス野生型マウスとヘテロ接合体マウスともに、脂肪食で体重の増加、内臓脂肪の増加を認めた。野生型マウスとヘテロ接合体マウスともに、普通食に比べて、脂肪食の方が体重は重く、摂食量（カロリーベース）が多かった。普通食では、野生型マウスとヘテロ接合体マウスの間に、体重、摂食量の有意な差はなかった。一方脂肪食では、ヘテロ接合体マウスは野生型マウスに比べて、体重が重く、摂食量が多い傾向を示した。メスヘテロ接合体マウスは、脂肪食でも野生型マウスに比べて、体重も内臓脂肪量も有意な差はなかった。一方、オスマウスについては、血液生化学的な解析を加えた。血糖、インスリンレベルがヘテロ接合体マウスの普通食と脂肪食群の間に有意な差を認めた。これはむしろ、摂食量の違いを反映している可能性が考えられた。レプチンレベルは、ヘテロ接合体脂肪食群で高く、ヘテロ接合体マウスはレプチン抵抗性が存在することが示唆された。カルニチンの投与は、効果を認めないことから、投与量が不十分な可能性も考えられた。また、投与カルニチンは脳には取り込まれないことから、ヘテロ接合体マウスに認められたレプチン抵抗性は、中枢性のレプチン抵抗性の可能性が示唆された。

オスヘテロ接合体マウスが高脂肪食時のみ、肥満傾向を示したことから、その機序についての解析を行った。高脂肪食摂取ヘテロ接合体マウスは、普通食摂取時に比べて、摂食促進ペプチドの AGRP が高い値を示し、摂食抑制ペプチドの POMC が低い値を示した。また、NPY, CART, orexin には差を認めなかった。この結果は、ホモ疾患マウスと同様の結果であった。また、カルニチンの投与効果も認めなかった。これらの結果は、ヘテロ接

合体マウスにも中枢（視床下部）性のレプチン抵抗性が存在する可能性が示唆された。

日本では、この 60 年間で脂質摂取量が 4 倍増加している。今回得られた知見は、「食事脂質含量、遺伝的背景と疾患発症」の関連を考える上で貴重なものになるだろう。

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 13 件）

① Arimura E, Horiuchi M, Kawaguchi H, Miyoshi N, Aoyama K, Takeuchi T: Low-protein diet improves blood and urinary glucose levels and renal manifestations of diabetes in C57BLKS-*db/db* mice. *Eur J Nutr, in press* 2012（査読あり）

② Takeishi K-I, Horiuchi M, Kawaguchi H, Deguchi Y, Izumi H, Arimura E, Kuchiiwa S, Tanimoto A, Takeuchi T: Acupuncture improves sleep conditions of minipigs representing diurnal animals through an anatomically similar point to the acupoint (GV20) effective for humans. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012: 472982, 2012（査読あり）

③ Nishikawa T, Miyahara E, Horiuchi M, Izumo K, Okamoto Y, Kawai Y, Kawano Y, Takeuchi T: Benzene metabolite, 1,2,4-benzenetriol, induced halogenated DNA and tyrosine representing halogenative stress in human myeloid cell line HL-60. *Environ Health Perspect*, 120: 62-67, 2012（査読あり）

④ Takeshita H, Horiuchi M, Izumo K, Kawaguchi H, Arimura E, Aoyama K, Takeuchi T: Long-term voluntary exercise, representing habitual exercise, lowers visceral fat and alters plasma amino acid levels in mice. *Environ Health Prev Med*, 2011 Nov 4. [Epub ahead of print]（査読あり）

⑤ Chaolu H, Asakawa H, Ushikai M, Li YX, Cheng KC, Li JB, Zoshiki T, Terashi M, Tanaka C, Atsuchi K, Sakoguchi T, Tsai M, Amitani H, Horiuchi M, Takeuchi T, Inui A: Effect of exercise and high-fat diet on plasma adiponectin and nesfatin levels in mice. *Exp Ther Med*, 2: 369-373, 2011（査読あり）

⑥ Kato T, Kawaguchi H, Miyoshi N, Aoyama K, Komatsu M, Horiuchi M, Yoshida H, Takeuchi T: Effect of habitual exercise on renal carcinogenesis by ferric nitrilotriacetate. *Environ Health Prev Med*, 16: 232-238, 2011（査読あり）

⑦ Nishikawa T, Izumo K, Miyahara E, Horiuchi M, Okamoto Y, Kawano Y, Takeuchi T: Benzene induces cytotoxicity without metabolic activation. *J Occup Health*, 53: 84-92, 2011（査読あり）

⑧ Miyahara E, Nishie M, Takumi S, Miyahara H, Nishi J, Yoshiie K, Oda H, Takeuchi M, Komatsu M, Aoyama K, Horiuchi M, Takeuchi T: Environmental mutagens may be implicated in the emergence of drug-resistant microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 317: 109-116, 2011（査読あり）

⑨ Ushikai M, Horiuchi M, Kobayashi K, Matuda S, Inui A, Takeuchi T, Saheki T: Induction of PDK4 in the heart muscle of JVS mice, an animal model of systemic carnitine deficiency, does not appear to reduce glucose utilization by the heart. *Mol Genet Metab*, 102: 349-355, 2011（査読あり）

⑩ Miyoshi N, Horiuchi M, Inokuchi Y, Miyamoto Y, Miura N, Tokunaga S, Fujiki M, Izumi Y, Miyajima H, Nagata R, Misumi K, Takeuchi T, Tanimoto A, Yasuda N, Yoshida H, Kawaguchi H: Novel microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan. *in vivo*, 24: 671-680, 2010（査読あり）

⑪ Ishida T, Hiroma T, Hashikura Y, Horiuchi M, Kobayashi K, Nakamura T: Early neonatal onset carbamoyl-phosphate synthase 1 deficiency treated with continuous hemodiafiltration and early living-related liver transplantation. *Pediatr Int*, 51: 409-410, 2009（査読あり）

⑫ Sakoguchi T, Horiuchi M, Asakawa A, Ushikai M, Yoshida G, Fujimiya M, Kato I, Nakazato M, Takeuchi T, Saheki T, Inui A: Failure of the feeding response to fasting in carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (JVS) mice: involvement of defective acyl-ghrelin secretion and enhanced corticotropin-releasing factor signaling in the hypothalamus. *Biochim Biophys Acta (Molecular Basis of Disease)*, 1792: 1087-1093, 2009（査読あり）

⑬ Izumo K, Horiuchi M, Komatsu M, Aoyama K, Bandow K, Matsuguchi T, Takeuchi M, Takeuchi T: Dehydroepiandrosterone increased oxidative stress in a human cell line during differentiation. *Free Radic Res*, 43: 922-931, 2009（査読あり）

〔学会発表〕（計 6 件）

①堀内正久：世界最小ミニブタの産業医学研究への展開、日本産業衛生学会九州地方会（平成 23 年 7 月 1 日、佐賀市）

②堀内正久、川口博明：世界最小ミニブタの栄養学実験への応用、日本病態栄養学会（平成 23 年 1 月 16 日、横浜市）

③堀内正久、出雲公子、竹下温子、川口博明、青山公治、竹内亨：習慣的な自発運動の肺炎予防効果に関する実験的研究：日の遺伝子発現変化からの考察、第 7 回日本予防医学会学術総会（平成 21 年 12 月 12 日、千葉市）

④堀内正久：大学における労働衛生管理の現状、日本産業衛生学会九州地方会（平成 21 年 6 月 27 日、那覇市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 正久 (Horiuchi Masahisa)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：50264403

(2) 研究分担者

竹内 亨 (Takeuchi Toru)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00188161

研究分担者

浅川 明弘 (Asakawa Akihiro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10452947