

ビタミンD制限や高脂肪食が肝臓の *Cyp2r1* 遺伝子発現 に及ぼす影響について

Effects of Vitamin D Restriction and/or a High-fat Diet on *Cyp2r1* Gene Expression in the Liver

奥 裕 乃* 野 田 聖 子** 山 田 麻 子**
Yuno OKU Seiko NODA Asako YAMADA

中 岡 加奈絵*** 五 関-曾 根 正江**
Kanae NAKAOKA Masae GOSEKI-SONE

要 約 ビタミン D₃ は、初めに肝臓で 25 位が水酸化されて 25-ヒドロキシビタミン D₃ [25(OH)D₃] となる。さらに、腎臓で 1 α 位が水酸化されて活性型ビタミン D である 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ [1 α ,25(OH)₂D₃] に変換される。通常、体内のビタミン D 栄養状態は血中 25(OH)D₃ 濃度により評価される。最近の研究では、肥満者における肝臓のビタミン D 25 位水酸化酵素である CYP2R1 活性の低下が報告されている。そこで本研究では、ビタミン D 制限や高脂肪食が、肝臓中の *Cyp2r1* 遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。11 週齢 Sprague-Dawley 系の雄ラット 28 匹を基準食 (Cont.) 群、ビタミン D 制限食 (DR) 群、高脂肪食 (F) 群、高脂肪ビタミン D 制限食 (FDR) 群の計 4 群に分けて飼育した。28 日間の実験食投与後、肝臓の *Cyp2r1* の mRNA 発現量は 4 群間で有意な差は認められなかった。

キーワード : 高脂肪食, ビタミン D, ビタミン D 水酸化酵素, シトクロム P450 (CYP)

Abstract Vitamin D₃ is first 25-hydroxylated in the liver to form 25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃], which is then 1 α -hydroxylated in the kidney and converted into the active form of vitamin D, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1 α ,25(OH)₂D₃]. The level of vitamin D in the body is usually evaluated by serum 25(OH)D₃ levels. Recent studies have reported a decrease in CYP2R1 activity, which is a vitamin D 25-hydroxylase in the liver, in obese individuals. We investigated the effects of vitamin D restriction and a high-fat diet on *Cyp2r1* gene expression in the liver of 28 male Sprague-Dawley rats aged 11 weeks. Twenty-eight rats were divided into four groups: a reference diet (Cont.) group, a vitamin D-restricted diet (DR) group, a high-fat diet (F) group, and a high-fat vitamin D-restricted diet (FDR) group. After 28 days of treatment with the experimental diet, there were no significant differences in the expression of *Cyp2r1* mRNA in the liver among the four groups.

Key words : High-fat diet, Vitamin D, Vitamin D hydroxylase, Cytochrome P450 (CYP)

* 日本女子大学大学院 人間生活学研究科 人間発達学専攻
Graduate School of Human Life Science, Division of
Human Development, Japan Women's University

** 日本女子大学 家政学部 食物学科
Department of Food and Nutrition, Faculty of Human
Sciences and Design, Japan Women's University

*** 十文字学園女子大学 人間生活学部 食物栄養学科
Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life,
Jumonji University, Saitama, Japan

I. 緒言

ビタミン D は、骨代謝やミネラル代謝と深く関わっている。食事から摂取あるいは皮膚で合成されたビタミン D₃ は、大部分が肝臓の 25 位水酸化酵素により代謝されて 25-ヒドロキシビタミン D₃ [25-hydroxyvitamin D₃ : 25(OH)D₃] に変換される。

25(OH)D₃はビタミンD結合タンパク質 (Vitamin D binding protein: DBP) と結合して血中を循環し、腎臓で1 α 位水酸化酵素により活性型ビタミンDである1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃ [1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃: 1 α ,25(OH)₂D₃]に代謝され、標的細胞の核内に存在するビタミンD受容体との結合を介して生理作用を発揮する¹⁾。

シトクロム P450 (CYP) は生物界に広く存在するヘム酵素であり、生理活性脂質の代謝や薬物などの生体異物の解毒代謝に重要な役割を果たしている。CYPには小胞体膜に存在するミクロソーム型とミトコンドリア型が存在する²⁾。腎臓における1 α 位水酸化酵素としては、CYP27B1の一種のみが報告されているが^{3),4)}、肝臓における25位水酸化酵素については、現在までにCYP2R1やCYP27A1, CYP2C11, CYP2D25, CYP2J3, CYP3A4の少なくとも6種が報告されており⁵⁾、これらはいずれもCYPスーパーファミリーのメンバーである。これら6種の25位水酸化酵素のうち、ビタミンD₂とビタミンD₃系を基質とするCYP2R1 (cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1) が生理的に重要であると考えられている。CYP2R1のアミノ酸配列は多くの種で保存されており、CYP27A1とは異なる、ミトコンドリア型P450に特徴的な配列を持たないミクロソーム型P450であり、肝臓や精巣で多く発現している⁵⁾。

ビタミンDの活性型である1 α ,25(OH)₂D₃はカルシウム代謝を調節するホルモンであり、血中での指標となるのは25(OH)D₃である^{6),7)}。ビタミンDの不足は、通常は食事からの摂取不足や皮膚での合成減少などにより生じ、血清25(OH)D₃濃度の低下により特徴づけられる。血清25(OH)D₃濃度低下の主要な要因の一つとしてCYP2R1遺伝子の変異が関連していることが、先行研究で示されている⁸⁾。さらに、肥満者は非肥満者と比べて血清25(OH)D₃濃度が低いことが報告されており^{9),10)}、肥満者ではCYP2R1酵素の発現が低下している可能性が示唆されている^{11),12)}。

これまでに、高脂肪食投与マウスで肝臓のCYP2R1酵素の発現を調べた研究はあるが、現代の日本人の食生活の課題として、ビタミンD不足や高脂肪食の組み合わせとCYP2R1酵素の関連について研究した報告は、筆者が調べた限り見当たらない。そこで、本研究ではビタミンD制限や高脂肪食が雄

ラットの肝臓 *Cyp2r1* の遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。

II. 方法

1. 実験動物および飼育条件

本研究は、実験動物の適切な使用に関する日本の政府の法律のガイドラインに従って実施した。本研究のプロトコールは、日本女子大学の動物実験委員会で承認された (承認番号: II 07-03)。

実験動物には体重 380~430 g の 11 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラットを計 28 匹使用した。飼料組成は、米国国立栄養研究所により発表された、げっ歯類の実験動物用飼料のスタンダードである、AIN-93M 組成を基準とした¹³⁾。7 日間の予備飼育の後、AIN-93M を与える基準食 (Cont.) 群、基準食の Vitamin Mix からビタミン D を除去した食餌を与える DR 群、基準食のコーンスターチの一部をラードに置き換え (160 g/kg diet)、脂肪エネルギー比率を約 40% に調整した高脂肪食 (F) 群、高脂肪食に基準食の Vitamin Mix からビタミン D を除去した食餌を与える FDR 群の計 4 群とした (Table 1) (n=7)。カルシウムとリンの含有量は、4 群ともそれぞれ 0.5% と 0.3% (重量/湿潤重量%) であった。

すべての動物は、12 時間の明暗サイクル、一定の温度 (23 \pm 1 $^{\circ}$ C)、一定の湿度のもとで飼育し、飼料、脱イオン水は自由摂取させた。飼育期間中は、飼料摂取量および体重を測定した。実験食開始から 28 日後、動物を一晩絶食させた後、麻醉下で腹部大動脈より採血して解剖を行った。採血後のラットから肝臓と腎臓を採取し、生理食塩水で洗浄後に新鮮重量を測定した。その後、肝臓全体をはさみで刻み、アルミホイルに包んで液体窒素で凍らせ、解析まで-80 $^{\circ}$ Cで保管した。

2. 血清生化学検査

採取した血液を遠心分離 (1,000 \times g, 10 min) し、上清を血清サンプルとした。カルシウムは、*o*-クレゾール-フタレイン顔色発色法¹⁴⁾を用いて測定し、無機リンは、*p*-メチルアミノフェノール還元法¹⁵⁾を用いて測定した。ビタミンD制限による影響を確認するために、各群 1 匹ずつ血清 25(OH)D₃濃度を測定した。血清 25(OH)D₃濃度はラジオイムノアッセイ法 (25-hydroxyvitamin D ¹²⁵I RIA Kit, DiaSorin, Stillwater, MN, USA) により測定した¹⁶⁾。

Table 1 Composition of the experimental diets

Variable	Cont. (AIN-93M)	DR	F	FDR
Ingredient (g/kg)				
Corn starch	465	465	305	305
Gelatinized corn starch	155	155	155	155
Sucrose	100	100	100	100
Cellulose powder	50	50	50	50
Vitamin free casein	140	140	140	140
Soybean oil	40	40	40	40
Lard	0	0	160	160
AIN-93-mineral mix	35	35	35	35
AIN-93-vitamin mix	10	0	10	0
AIN-93-vitamin mix without V.D ₃	0	10	0	10
L-cystine	2	2	2	2
Choline bitartrate	3	3	3	3
Tertiary butylhydro quinine	0.008	0.008	0.008	0.008
Chemical composition				
Fat (g/kg)	40.3	40.3	200.3	200.3
Vitamin D ₃ (IU/kg)	1000	0	1000	0
Energy (kcal/kg)	3724	3724	4524	4524

Cont.: control diet. DR: vitamin D-restricted diet. F: high-fat diet. FDR: vitamin D-restricted and high-fat diet.

3. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 分析

肝臓から、Isogen-II (NIPPON-GENE, Tokyo, Japan) を用いて、total RNA を抽出した。cDNA 合成キット (PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis Kit, タカラバイオ(株), 滋賀) を用いて 2 µg の total RNA から相補的な DNA (complementary DNA ; cDNA) を作製した。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のプライマーは、ラットのビタミン D25 位水酸化酵素をコードする遺伝子である、*Cyp2r1* (forward: 5'- CTT GGA GGC ATA TCA ACT GTG-3', reverse: 5'- ATC CAT CCT CTG CCA TAT CTG-3') を用いた¹⁷⁾。PCR は SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) で実施し、PCR 産物について 5.25%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、解析を行った。染色したゲルを UV ライト下で撮影し、画像解析ソフト (CS Analyzer 3 for Windows, アトー(株), 東京) を用いて、泳動バンド

の濃度測定を行い、mRNA 発現量を比較した。なお、全ての測定値は、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) で標準化した。

4. 統計解析

値は平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。有意差検定は、ビタミン D 制限と高脂肪食を因子とした二元配置分散分析 (ANOVA) 検定により行った。統計解析には、統計ソフト IBM SPSS Statistics 22 (日本アイ・ビー・エム株式会社) を使用し、有意水準は両側検定で 5% とした。

Ⅲ. 結果

1. 飼料効率

実験食開始 28 日目の最終体重 (g), 体重増加量 (g/日), エネルギー摂取量 (kcal/日), エネルギー効率 (体重増加量/エネルギー摂取量) を **Table 2** に示した。最終体重, 体重増加量, エネルギー摂取量,

Table 2 Final body weight, weight gain, energy intake, and energy efficiency

	Groups			
	Cont.	DR	F	FDR
Final body weight (g)	501.4 ± 11.9	485.0 ± 11.3	517.4 ± 5.3	519.3 ± 9.8
Body weight gain (g/day)	3.7 ± 0.3	3.2 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.2
Energy intake (kcal/day)	96.5 ± 4.0	90.3 ± 2.8	103.0 ± 1.5	102.9 ± 2.9
Energy efficiency (Body weight gain/energy intake)	0.038 ± 0.002	0.035 ± 0.002	0.040 ± 0.001	0.042 ± 0.001

	Main effect		Two-way interaction
	V.D-res	high-fat	V.D-res × high-fat
Final body weight (g)	N.S.	$p < 0.05$	N.S.
Body weight gain (g/day)	N.S.	$p < 0.01$	N.S.
Energy intake (kcal/day)	N.S.	$p < 0.01$	N.S.
Energy efficiency (Body weight gain/energy intake)	N.S.	$p < 0.05$	N.S.

Each value represents the means ± S.E. of 7 animals.

Cont.: control diet group, DR: vitamin D-restricted diet group, F: high-fat diet group, FDR: vitamin D-restricted and high-fat diet group.

V.D-res: vitamin D restriction, high-fat: high-fat diet.

For comparisons among groups, two-way analysis of variance (ANOVA) was used to examine the effects of vitamin D restriction and the high-fat diet.

The final body weight was measured on the 28th day after starting the experimental diets.

N.S.: nonsignificant

エネルギー効率は高脂肪食群 (F 群, FDR 群) が普通脂肪食群 (Cont.群, DR 群) に比べて有意に高かった (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$ および $p < 0.05$)。

2. 血清生化学検査

血清カルシウム値は, Cont.群, DR 群, F 群, FDR 群で, それぞれ 10.1 ± 0.1 , 9.9 ± 0.1 , 9.6 ± 0.1 , 9.3 ± 0.2 mg/dL であった。血清リン濃度は, Cont.群, DR 群, F 群, FDR 群で, それぞれ 6.7 ± 0.4 , 7.1 ± 0.3 , 6.4 ± 0.2 , 5.9 ± 0.2 mg/dL であった。Cont.群と DR 群間および F 群と FDR 群間に有意な差は認められなかった。血清 25(OH)D₃濃度は, Cont.群, DR 群, F 群, FDR 群で, それぞれ 40, 7, 23, 9 ng/mL であった (各群とも n=1)。

3. 臓器重量

体重 100g あたりの肝臓および腎臓の重量を Table 3 に示した。いずれも, 交互作用や主効果は認められなかった。

4. RT-PCR 分析

実験食開始 28 日後, ラットの肝臓におけるビタミン D25 位水酸化酵素である *Cyp2r1* の mRNA 発現量を比較するため, 特異的なプライマーを用いて PCR 分析を行った。電気泳動像のバンドをデンストメーターにより解析した結果を Fig. 1 に示した。各群間で有意な差は認められなかった。

IV. 考察

本研究では, ビタミン D 制限や高脂肪食が雄ラットの肝臓の *Cyp2r1* 遺伝子発現に及ぼす影響について

Table 3 Weight of the liver and kidneys (g/100 g body weight)

	Groups			
	Cont.	DR	F	FDR
Liver	2.54 ± 0.01	2.51 ± 0.08	2.44 ± 0.17	2.29 ± 0.06
Kidney	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01

	Main effect		Two-way interaction
	V.D-res	high-fat	V.D-res × high-fat
Liver	N.S.	N.S.	N.S.
Kidney	N.S.	N.S.	N.S.

Each value represents the means ± S.E. of 7 animals.

Cont.: control diet group, DR: vitamin D-restricted diet group, F: high-fat diet group, FDR: vitamin D-restricted and high-fat diet group.

V.D-res: vitamin D restriction, high-fat: high-fat diet.

For comparisons among groups, two-way analysis of variance (ANOVA) was used to examine the effects of vitamin D restriction and the high-fat diet.

N.S.: nonsignificant

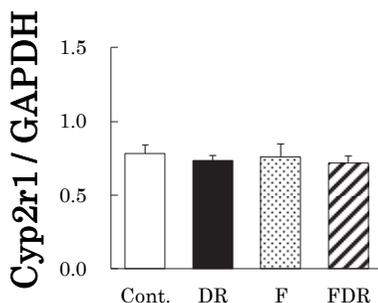


Fig.1 Relative levels of expression of *Cyp2r1* mRNA

Cont.: control diet group, DR: vitamin D-restricted diet group, F: high-fat diet group, FDR: vitamin D-restricted and high-fat diet group.

て検討を行った。

実験食開始から 28 日後、最終体重、エネルギー摂取量、エネルギー効率、高脂肪食群が普通脂肪食群に比べて高値を示した。以前に、我々は、ラットにおける長期の高脂肪食投与がひきおこす肥満において、体組成・骨強度への食餌性ラクトースの影響を報告した¹⁸⁾。

体重補正した肝臓重量および腎臓重量は、各群間で有意な差は認められなかった。先行研究において、3 週齢 SD 系雄ラットに脂肪エネルギー比率

43%の高脂肪食を 9 週間与えたところ、AIN-93G を与えた基準食群に比べて、体重補正した肝臓重量が高値を示したことが報告されている¹⁹⁾。高脂肪食摂取による肝臓の脂肪蓄積や炎症は、CYP の発現量や酵素活性に影響を及ぼすことが報告されている²⁰⁾。本研究においては、最終体重およびエネルギー摂取量は高脂肪食群が普通脂肪食群に比べて高値を示したが、体重補正後の肝臓重量では差が認められなかった。

先行研究において、CYP2R1 ノックアウトマウスでは血清 25(OH)D₃ 濃度が野生型に比べ 50%以上減少するが、1α,25(OH)₂D₃ 濃度は変化しないことが報告されている²¹⁾。またヒトの遺伝子多型の研究では、ビタミン D 欠乏症の要因として *CYP2R1* 遺伝子の突然変異が示されており^{3), 8), 22)}、ビタミン D 恒常性における CYP2R1 酵素の重要性が示唆されている。別の先行研究において、肥満者は CYP2R1 酵素の発現が低下することや、非肥満者に比べて血清 25(OH)D₃ 濃度が低いことが報告されている⁹⁾⁻¹²⁾。3 週齢の雌マウスに脂肪エネルギー比率 60%の高脂肪食を与え 21 週間飼育した研究および 5-6 週齢の雌雄マウスを高脂肪食で 16 週間飼育した研究では、肝臓の *Cyp2r1* 遺伝子および CYP2R1 タンパク質発

現が低下したことが報告されている^{11), 12)}。本研究においては、肝臓の *Cyp2r1* mRNA 発現量は各群間で有意差が認められなかった。

本研究において、高脂肪食条件下のビタミンD制限が、肝臓の *Cyp2r1* 遺伝子発現に及ぼす影響は示されなかった。しかしながら、本研究で得られた結果は、11週齢のラットにビタミンD制限食や高脂肪食を28日間投与した条件に限られたものであり、さらに長期間飼育するなど条件を変えることで高脂肪食条件下でのビタミンD制限食の影響が示される可能性も考えられる。今後はさらに飼育期間や他のビタミンD関連遺伝子発現なども含めた詳細な検討を進めることにより、ビタミンD代謝に関する新たな知見が得られることが期待されよう。

文献

- 1) 厚生労働省：日本人の食事摂取基準 2020年版, <https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000586553.pdf> [2020.9.24]
- 2) 榊利之他：ビタミン, 87, 519-24 (2013)
- 3) Thacher TD, et al. : *J Clin Endocrinol Metab*, 100, E1005-13 (2015)
- 4) Cheng JB, et al. : *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7711-5 (2004)
- 5) Jones G, et al. : *J Lipid Res*, 55, 13-31 (2014)
- 6) Holick MF: *Rev Endocr Metab Disord*, 18, 153-65 (2017)
- 7) Holick MF: *Ann Epidemiol*, 19, 73-8 (2009)
- 8) Wang TJ, et al. : *Meta-Analysis Lancet*, 376, 180-8 (2010)
- 9) Shinkov A, et al. : *Eur J Clin Nutr*, 69, 355-60 (2015)
- 10) Orces C, et al. : *Cureus*, 11, e5721 (2019)
- 11) Roizen JD, et al. : *J Bone Miner Res*, 34, 1068-73 (2019)
- 12) Elkhwanky MS, et al. : *JBMR Plus*, 26, e10397 (2020)
- 13) Reeves PG, et al. : *J Nutr*, 123, 1939-51 (1993)
- 14) Gitelman HJ : *Anal Biochem*, 18, 521-31 (1967)
- 15) Drewes PA : *Clin Chim Acta*, 39, 81-8 (1972)
- 16) Chesney RW : *Clin Orthop Relat Res*, 161, 285-314 (1981)
- 17) Yamasaki T, et al. : *J Biol Chem*, 279, 22848-56 (2004)
- 18) Goseki-Sone M, et al. : *Obesity (Silver Spring)*, 15, 2605-13 (2007)
- 19) 中嶋洋子他：日本栄養・食糧学会誌, 58, 59-64 (2005)
- 20) 鈴木祥菜他：YAKUGAKU ZASSHI, 136, 1297-305 (2016)
- 21) Zhu JG, et al. : *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 15650-5 (2013)
- 22) Al Mutair AN, et al. : *J Clin Endocrinol Metab*, 97, E2022-5 (2012)