

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07808

研究課題名(和文)フラボノイドの生理作用発現と迷走神経の関連性の解析

研究課題名(英文) Estimation of involvement of vagus nerve in physiological activity of flavonoids

研究代表者

橋本 直人 (Hashimoto, Naoto)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：20414758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラットにおいて、フラボノイドが豊富に含まれる黒大豆種皮抽出物(BE)の摂取により、迷走神経の肝分枝(HBVN)を介して、摂食量当たりの体重増加量が有意に低下した。これには、脂肪燃焼を促進する脱共役タンパク質の褐色脂肪組織での発現量が関係している可能性がある。また、非アルコール性脂肪肝症(NAFLD)を誘導すると考えられる高果糖食の長期摂取により誘導されたラットでは、血中のレプチンやアディポネクチンが有意に低下し、それにはHBVNが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農作物に多く含まれるフラボノイドの肥満抑制作用とその作用機構を明らかにすることにより、農作物摂取の促進を通じた健康増進が期待できる。また、フラボノイドの生理作用発現において神経系の関与を明らかにしたことにより、フラボノイドの血中濃度に左右されずに健康機能性を発現できることが考えられる。このことは、フラボノイドの生理作用の研究を加速させ、さらに健康増進に貢献する。また、非アルコール性脂肪肝症(NAFLD)は様々な生活習慣病の発症に関与していると考えられていることから、NAFLD発症のメカニズムや生活習慣病の相互作用メカニズムを明らかにすることで、国民の健康増進に貢献する。

研究成果の概要(英文)：In rats fed a high fat diet with black soybean extract, containing abundant flavonoids, the ratio of body weight gains to total food intake was lowered in comparison with those fed a high fat diet, and expression of uncoupling protein-1 that promotes expenditure of fatty acids tended to be reduced in brown adipose tissue, in which hepatic branch of vagus nerve (HBVN) may be involved.

In rats fed a high fructose diet that possibly induces non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), blood levels of leptin and adiponectin were lowered, which was cancelled in hepatic vagotomy rats. These results indicate that HBVN was also involved in regulation of blood adipokine levels.

研究分野：食品生理学

キーワード：迷走神経 肥満 非アルコール性脂肪肝症 アディポネクチン レプチン 脱共役タンパク質-1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

フラボノイドの生理作用が様々報告されているが、体循環血中のフラボノイド濃度は  $1 \mu\text{mol/L}$  以下と非常に低く、さらに、中枢神経においては脳血液関門 (BBB) があることから、高濃度のフラボノイドが存在できる消化器官以外の組織に対して、血中のフラボノイドが直接作用することは難しいという指摘がある。そのため、フラボノイドの生理作用が発現する場合、それを伝達する間接的経路が存在することが予想されるが、その経路は明らかになっていない。これに対して、中枢神経系の疾患や神経細胞への酸化ストレスに対しフラボノイド類が保護作用を示すという報告や、肝臓の栄養状態が迷走神経を介して膵臓や白色脂肪組織、褐色脂肪組織の代謝を調節するという報告がある。また、以前の研究で、フラボノイド類が胆汁中に数十  $\mu\text{mol/L}$  という比較的高濃度に存在することを明らかにしている。以上の結果から、フラボノイド類が肝臓を刺激して、その情報が迷走神経を介して中枢神経、さらに内在する臓器に伝達され、生理作用が発現するという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

(1) 糖尿病は、膵臓から分泌されるインスリンが減少することで引き起こされ、空腹時血糖値の上昇などを特徴としている。また、肥満はエネルギーの過剰摂取により引き起こされ、糖尿病の危険因子として考えられている。そこで、フラボノイドの生理作用発現における迷走神経役割を評価する目的で、カテキン、プロシアニジン類およびアントシアニンを中心としたフラボノイドを豊富に含む黒大豆種皮抽出物を用いて、糖尿病モデル動物および肥満モデル動物を用いて糖代謝・エネルギー代謝に及ぼす影響と、迷走神経の肝分枝 (肝臓と中枢神経を繋いでいる神経) の関連性を評価する。

(2) フラボノイドの生理作用を評価するための実験系を確立する目的で、非アルコール性脂肪肝症 (NAFLD) モデル動物の作成を試みる。通常、NAFLD の誘導には高脂肪食などが用いられるが、高脂肪食は肝臓だけではなく、白色脂肪組織への脂肪蓄積など、全身的に代謝変動が引き起こされるため、肝臓に特異的に脂肪を蓄積させると考えられている高果糖食を用いて、肝臓および白色脂肪組織に及ぼす影響を評価する。併せて、迷走神経の肝分枝を切断した動物も用いることで、高果糖食による NAFLD 誘導とその時の迷走神経の役割について検討・評価する。

通常の食餌にコレステロールとコール酸を添加した胆石形成飼料を摂取したマウスでは、胆のうにおけるコレステロールの結晶 (胆石) が確認できると同時に、肝臓への脂質蓄積が見られる。また、胆汁酸が NAFLD 発症に関与しているという報告もあることから、胆石形成飼料に関しては、食餌中のコール酸が NAFLD 発症に寄与する可能性が考えられた。そこで、新たな NAFLD 誘発物質として胆汁酸に着目し、培養細胞を用いて胆汁酸による NAFLD モデルの作成を試みる。

### 3. 研究の方法

(1) 迷走神経の肝分枝を手術により切断 (Vx) または開腹のみ (Sham) を行ったラットを作成した。1 週間程度の回復期間ののち、手術をしたすべての動物に  $65 \text{ mg/kg}$  体重となるようにストレプトゾトシンを腹腔内投与し、糖尿病を発症させた。その後、空腹時血糖値に差が出ないように群分けを行い、それぞれの手術群に対し、1 日  $20 \text{ mg}$  の黒大豆種皮抽出物または溶媒 (生理食塩水) を 2 週間投与した。2 週目に一晚絶食させ、耐糖能試験を行い、血糖値および血中インスリン濃度の経時的変化を測定した。

(1) 迷走神経の肝分枝を手術により切断 (Vx) または開腹のみ (Sham) を行ったラットを作成した。1 週間程度の回復期間ののち、それぞれの手術動物に高脂肪食 (脂質のエネルギー比率:  $45\%$ 、HF) または高脂肪食に黒大豆種皮抽出物が  $0.5\%$  となるように調製した飼料 (BE) を与え、12 週間の飼育後、解剖した。肩甲骨周囲の褐色脂肪組織および肝臓を採取し、脱共役タンパク質 (UCP) の発現量 (褐色脂肪組織) または mRNA 量 (肝臓) をウェスタンブロット法またはリアルタイム PCR 法により測定した。

(2) 迷走神経の肝分枝を手術により切断 (Vx) または開腹のみ (Sham) を行ったラットを作成した。1 週間程度の回復期間ののち、それぞれの手術動物に AIN-93G に準拠した正常食 (CT) および正常食の糖質を全て果糖に置き換えた高果糖食 (HFr) を与え、6 週間飼育した。6 週目に一晚絶食させ、耐糖能試験を行い、血糖値および血中インスリン濃度を経時的に測定した。耐糖能試験の翌日以降に解剖を行った。解剖時に採取した血液 (血漿) については ELISA 法により血中のアディポネクチンおよびレプチンの量を測定した。

(2) ヒト由来の株化肝細胞モデルである HepG2 細胞を主要な胆汁酸であるコール酸 (CA)、デオキシコール酸 (DC)、ケノデオキシコール酸 (CD)、リトコール酸 (LC)、またはウルソデオキシコール酸 (UD) を  $10 \mu\text{mol/L}$  含んだ培地で 5 日間刺激を与え、培地中および細胞内の TG 濃度を測定した。細胞内の TG 濃度はタンパク質含量で補正した。なお、細胞での TG 合成を促進させるために、試験培地には  $100 \mu\text{mol/L}$  のパルミチン酸を添加しており、一方で、過増殖を抑制するために、牛胎児血清は添加しなかった。培地は 2 日目に一度交換していることが

ら、培地中の成分は、3~5日目の3日間の代謝を反映している。

#### 4. 研究成果

(1) 0週目から2週目にかけての空腹時血糖値の推移を比較したところ、Shamラットにおいて、生理食塩水投与群と比較して、黒大豆種皮抽出物投与群で有意に低値となった。しかし、Vxラットでは、これらの差は見られなかった(図1)。

このことから、糖尿病ラットで見られる空腹時血糖値の上昇は、黒大豆色素投与により迷走神経を介して抑制された可能性がある。

しかし、耐糖能試験において、血糖値およびインスリン濃度に群間の有意差は見られなかったことから、黒大豆種皮抽出物の糖尿病に対する明確な改善作用を示すことは出来なかった。

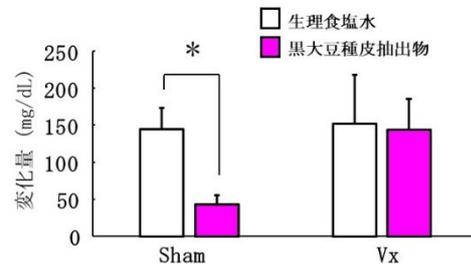


図1 糖尿病ラットにおける血糖値上昇の変化  
数値は平均値±標準誤差 (n = 6) \*p < 0.05

(1) 体重増加量および摂食量に群間の差は見られなかったが、摂食量当たりの体重増加量で表される食餌効率(FER)について、Shamラットでは、BE食群でHF食群よりも有意に低かったのに対し、Vxラットではその差は見られなかった(図2a)。

$$\text{FER (Food Efficacy Ratio)} = \frac{\text{体重増加量 (g)}}{\text{摂食量 (g)}}$$

脂肪の消費を促進させるタンパク質であるUCPについて、褐色脂肪組織において、ShamラットではHF食群と比較してBE群でUCP1発現量が増加する傾向が見られた(p < 0.08)のに対し、Vxラットではそのような傾向は見られなかった(図2b)。褐色脂肪組織のUCP1量とFERには弱い負の相関が見られた(r = -0.402, p < 0.052)。

また、肝臓において、Ucp2 mRNA量に差は見られなかったが、Shamラットにおいて、HF群と比較してBE群でUcp1 mRNA量が増加する傾向、Ucp3 mRNA量で有意な増加が見られた(図2c-e)。一方、Vxラットでは、HF群とBE群の間に肝臓におけるUcp1およびUcp3のmRNA発現量に差は見られなかった。また、HF群間の比較では、Shamラットと比較してVxラットで肝臓におけるUcp1およびUcp3のmRNA発現量が有意に増加した。

この研究では、高脂肪食による肥満が、BE摂取により迷走神経の肝分枝を介して抑制される

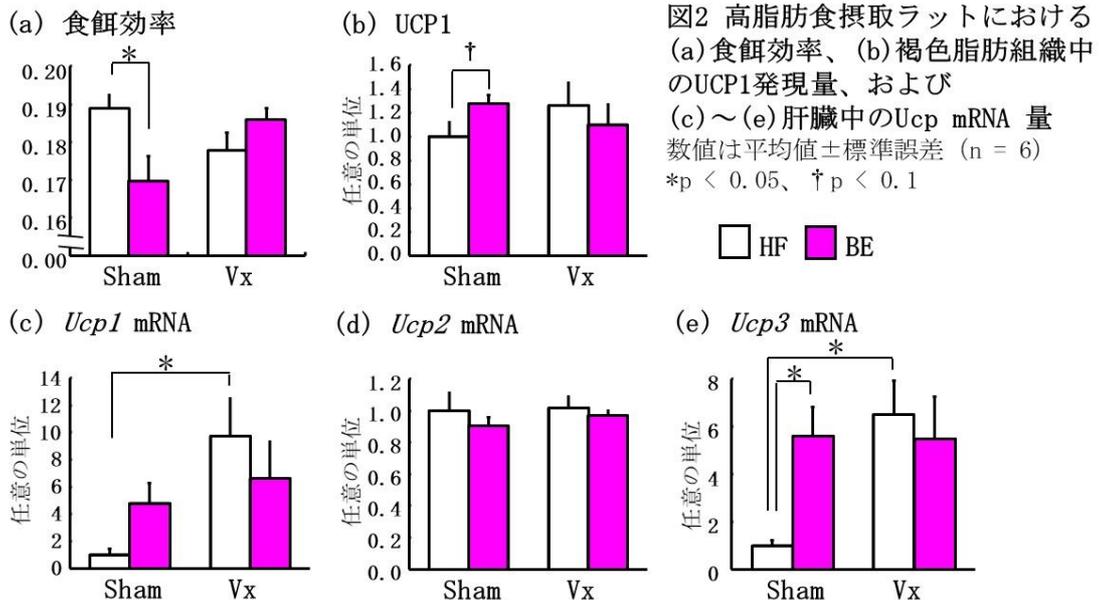


図2 高脂肪食摂取ラットにおける  
(a)食餌効率、(b)褐色脂肪組織中のUCP1発現量、および  
(c)~(e)肝臓中のUcp mRNA量  
数値は平均値±標準誤差 (n = 6)  
\*p < 0.05、†p < 0.1

可能性が示唆された。FERは食餌成分が体重増加に回される割合を表すものであるが、それには単純に摂取エネルギー量だけでなく、消費エネルギー量なども考慮する必要がある。肥満の原因物質の一つである脂肪について、その消費に関連するタンパク質にUCPがあるが、組織によりその発現量は異なる。褐色脂肪組織においてはUCP1の発現量が多く、肝臓ではUCP2の発現量が多い。また、FERと褐色脂肪組織のUCP1量の間でのみ弱い負の相関が見られたことから、今回の結果では、褐色脂肪組織のUCP1量がある程度の影響を与えた可能性は考えられるが、肝臓におけるUcp1とUcp3 mRNA発現量の違いはそれほどFERに影響を及ぼしていなかったのかも知れない。しかし、褐色脂肪組織のUCP1量については、Shamラットでは黒大豆種皮抽出物の摂取により増加傾向が見られ、Vxラットではその差は消失したものの、統計的な有意差が見られなかったことから、フラボノイドの迷走神経を介した生理作用と断定することはできない。

以上、(1)、(1)の結果をまとめると、フラボノイドを豊富に含む黒大豆種皮抽出物の摂取

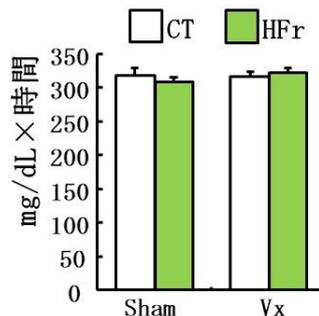
により、糖尿病における糖代謝や肥満におけるエネルギー代謝が改善する可能性があり、それには肝臓から伸びている迷走神経の肝分枝を介して行われるのかもしれない。しかし、これらの生理作用は明確なものではなく、これらの結果をサポートする結果も得られていないことから、迷走神経を介したフラボノイドの生理作用発現を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

(2) 食餌性の脂肪肝を作成する目的でラットに HFr 食を摂取させたが、肝臓重量、脂肪重量および肝臓中の総脂質量に群間の差は見られなかった。耐糖能試験において、グルコース投与後 0-120 分間で血中グルコース濃度およびインスリン濃度に群間の差は見られなかったが、この時の濃度曲線について曲線下面積 (AUC) を求めたところ、血中グルコースの AUC は群間の差は見られなかったが、インスリンの AUC において、2 元配置の分散分析 (2-way ANOVA) により手術の影響が検出された (図 3)。すなわち、Vx により、血糖値を維持するためのインスリン要求量が増加したことが示唆された。

血中のレプチンおよびアディポネクチン濃度において、Sham ラットにおいては、HFr 群で有意な低下が見られたが、Vx 動物では食餌の違いによる差は見られなかった (図 4)。また、HFr 群の血中レプチン濃度において Sham ラットと比較し、Vx ラットで有意に高値となった。この時、2-way ANOVA により、レプチン、アディポネクチン濃度において、食餌の影響が見られ、血中レプチン濃度においては手術の影響も検出された。レプチンやアディポネクチンは、白色脂肪組織から分泌されることから、まとめてアディポカインと呼ばれる。これまでも、これらのアディポカインの分泌は食餌やほかのホルモンによる影響を受けることが示唆されていたが、今回の結果では、食餌によるアディポカイン分泌には、迷走神経の肝分枝が関与していることが示唆された。

さらに血中のレプチンとアディポネクチンの比 (L/A 比) を求めたところ、群間の差は見られなかつ

### グルコース AUC



### インスリン AUC

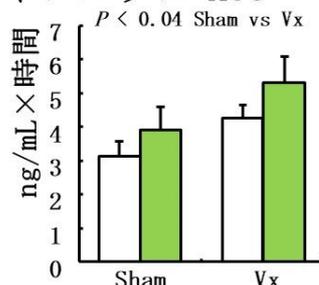
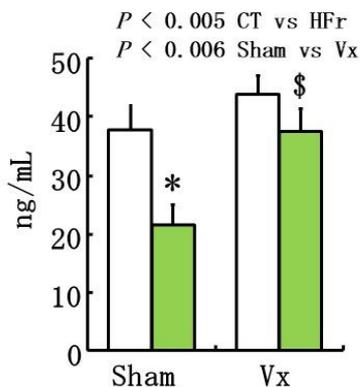
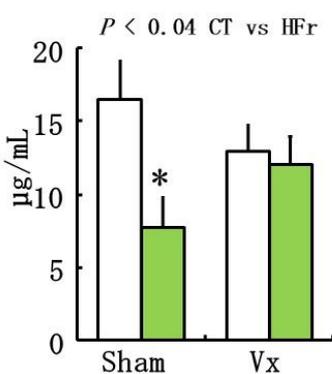


図3 正常食 (CT) および高果糖食 (HFr) 摂取ラットの耐糖能試験における血中グルコースおよびインスリン濃度の曲線下面積値 (AUC) 数値は平均値 ± 標準誤差 (n = 7-8)

### レプチン



### アディポネクチン



### L/A 比

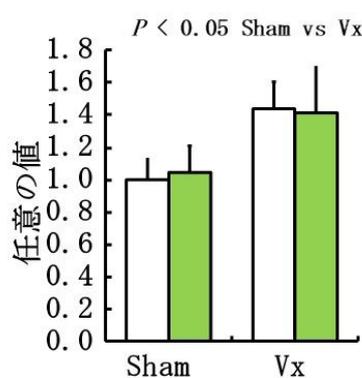


図4 正常食 (CT) および高果糖食 (HFr) 摂取ラットにおける血中レプチン、アディポネクチン濃度およびレプチン/アディポネクチン比 (L/A 比)

数値は平均値 ± 標準誤差 (n = 7-8)

\*p < 0.05 (同一手術動物におけるCT群に対して)

\$p < 0.05 (同一食餌群におけるSham動物に対して)

P-値は2-way ANOVAによるもの

たが、手術の影響が検出された。一方、血中インスリン濃度の AUC との相関関係を比較したところ、血中のレプチン濃度 ( $r = 0.492, p < 0.01$ ) および L/A 比 ( $r = 0.398, p < 0.05$ ) で有意な正の相関が見られた。果糖の長期過剰摂取により実験的な NAFLD やインスリン抵抗性、血中レプチン濃度の上昇が惹起されることが報告されている。血中レプチンと L/A 比はイ

ンスリン抵抗性に関連があるという報告がある。さらにこれらの三指標においては手術の影響が検出されていることから、今回の結果で見られた HFr 食摂取によるインスリンの要求量の増加には、肝臓における果糖代謝の情報が迷走神経の肝分枝を介して血中レプチン濃度あるいは L/A 比の上昇に反映されたことが関係している可能性がある。

(2) 胆汁酸の刺激により、HepG2 細胞内の TG 濃度に変化が見られた (図 5a)。DC、CD、LC 群は CT 群よりも TG 濃度が高かった。また、DC 群は CA 群よりも、LC 群は CD 群よりも TG 濃度が高かった。一方、培地中の TG 濃度については (図 5b) CT 群と比較して、CA、CD、UD 群で有意に高く、LC 群では低かった。また、DC 群、LC 群はそれぞれ CA 群、CD 群よりも低値となった。また、細胞内 TG 濃度と培地中の TG 濃度の間に、有意な負の相関が見られた ( $r = -0.677$ ,  $p < 0.01$ )。以上の結果から、胆汁酸で HepG2 細胞を刺激することにより、培地への TG 放出が抑制され、その結果、細胞内への TG の蓄積が亢進することが示唆された。特に、DC や LC はそれぞれ CA および CD を原料に腸内細菌により生成されることから、胆汁酸の肝細胞内脂肪蓄積作用は腸内発酵により増強される可能性がある。一方、UD も腸内発酵により CD から生成されるが、CD で見られた細胞内の TG 蓄積を抑制する作用があるのかもしれない。いずれにしても、 $10 \mu\text{mol/L}$  という生理的な濃度で、十分な細胞内への TG 蓄積が見られたことから、今回開発した細胞培養系は NAFLD 成因の機構解析に貢献する可能性がある。

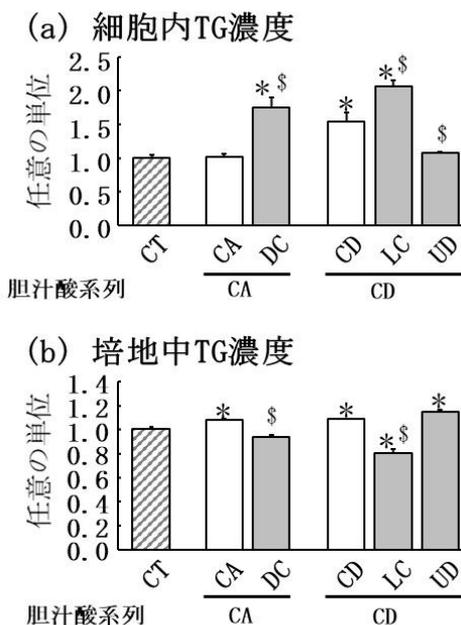


図5 (a)HepG2細胞内および(b)培地中の中性脂肪 (TG) 濃度

数値は平均値±標準誤差 (n = 6)

\* $p < 0.05$  (胆汁酸無添加 (CT)と比較して)

\$ $p < 0.05$  (同一胆汁酸系列の対照 (□)に対して)

CT: 胆汁酸なし、CA: コール酸、DC: デオキシコール酸、

CD: ケノデオキシコール酸、LC: リトコール酸、

UD: ウルソデオキシコール酸

以上の結果をまとめると、フラボノイド摂取で見られる生理作用発現が少なくとも部分的には迷走神経の肝分枝を介することが示唆された。

また、高果糖食による NAFLD が迷走神経の肝分枝を介して白色脂肪組織からのレプチンおよびアディポネクチン分泌を抑制し、特にレプチンおよび L/A 比は、インスリンの感受性の低下に関係している可能性がある。

さらに、幾つかの胆汁酸には肝細胞への脂肪蓄積作用があり、特に 2 次胆汁酸でその作用が強くなることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Naoto, Wakagi Manabu, Ippoushi Katsunari, Takano-Ishikawa Yuko	4. 巻 71
2. 論文標題 Involvement of the hepatic branch of the vagus nerve in the regulation of plasma adipokine levels in rats fed a high-fructose diet	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 90 ~ 97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.06.003">https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.06.003</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoto Hashimoto, Manabu Wakagi, Katsunari Ippoushi, Yuko Takano-Ishikawa
2. 発表標題 Neural regulation of plasma adipokine levels in rats fed excessive fructose
3. 学会等名 The 7th International Conference of Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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