

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K02372

研究課題名(和文)健康寿命に寄与する葉酸の機能解析と食生活への応用 - 生涯を通じた葉酸摂取の重要性 -

研究課題名(英文)Functional analysis of folate contributed to healthy life expectancy and application to eating habits

研究代表者

中田 理恵子(Nakata, Rieko)

奈良女子大学・生活環境科学系・准教授

研究者番号：90198119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト動脈硬化症モデルのApoE欠損マウスにホモシステイン水を与え動脈硬化病変形成への影響を検討した。血中ホモシステイン濃度の上昇に伴い大動脈への脂肪沈着が増加したが、血中コレステロール濃度に変化はなかった。また、コレステロール食と共にホモシステイン水を与えた場合でも同様であった。

一方で、母親の栄養状態と児の疾患罹患との関連が注目されている。そこで母マウスの葉酸欠乏の影響を解析した。母が葉酸欠乏であった仔では、成獣期までの高脂肪食負荷により肝臓脂質の蓄積が亢進した。さらに普通食の場合でも肝臓脂質量が増加した。以上より、母親の葉酸欠乏が仔の成獣期の脂質代謝にまで影響を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉酸は、胎児の正常な発育に必要な栄養素として認知されている。一方、動脈硬化症は、食生活等の生活習慣や加齢によって経年的に進行し、高齢期の生活の質に大きく影響すると考えられる。この変化を葉酸の摂取によって予防あるいは遅延できる可能性を本研究で示すことができた。さらに、妊娠前からの葉酸摂取は、母体自身の健康や胎児・新生児の発育に関係するだけでなく、児の将来の健康にも影響を与える可能性を示すことができた。これらの研究成果は、胎児から高齢者までヒトの生涯を通しての葉酸摂取の重要性を提言し、現代社会において最大の健康問題である各種疾患の予防のための望ましい食生活の設計に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated increases of plasma homocysteine concentration effect on lipid accumulation in aorta by feeding piceid in apolipoprotein E knockout mice. Intake of water containing homocysteine induced plasma homocysteine and lipid accumulation in aorta, but not plasma total and non-HDL cholesterol. These results indicate that increases of plasma homocysteine are a risk factor of arteriosclerosis, independent of cholesterol.

On the other hand, folate deficiency is also reported that maternal malnutrition increases the risk of lifestyle related diseases in adulthood. In this study, we investigated the effect of maternal folate deficiency on lipid metabolism in the offspring. Maternal folate deficiency induced accumulation of triglyceride in liver of the offspring which intake not only high-fat but also normal diet after weaning. These results suggest that maternal folate deficiency affect on lipid metabolism in the offspring.

研究分野：栄養学

キーワード：葉酸 ホモシステイン 動脈硬化 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

生命維持にとって必要不可欠であるビタミンは、近年の健康志向とあいまって、新しい機能が注目されている。本研究で注目する葉酸は、ビタミン B 群に属する水溶性ビタミンで、ヌクレオチド、アミノ酸、タンパク質など生体にとって重要な物質の合成に関与しており、DNA 合成や細胞増殖に必須の栄養素である。その欠乏によって貧血を呈することが古くから知られ、葉酸は抗貧血因子として認知されている。また、妊娠中に葉酸が欠乏すると、新生児の神経管閉鎖障害のリスクが高まることが報告され、妊娠前からの葉酸の摂取が推奨されている。

一方で、葉酸の欠乏によって血漿中のホモシステイン濃度が上昇することが明らかになっている。ホモシステインはメチオニンサイクルの中間代謝物で、5-メチルテトラヒドロ葉酸のメチル基が、ビタミン B₁₂ を補酵素としてホモシステインに転移されて、メチオニンを生成するという代謝回転を繰り返している。近年、ホモシステインの上昇と、脳心血管疾患、骨粗鬆症、認知機能障害などの発症との関連が注目されるようになってきた。これまでに、血中ホモシステイン濃度が 5 μ M 上昇すると冠動脈疾患の発症リスクが 1.6 倍になるという報告、早発性冠動脈疾患・末梢血管疾患患者の約 40% が高ホモシステイン血症を呈しているという報告、血中のホモシステイン濃度の上昇が骨折のリスクを高めるといった報告などが次々となされている。そのため、葉酸の摂取がこれら疾患の予防につながると考えられるようになってきた。しかしながら、これらは主に疫学調査を根拠としている場合が多く、十分な実験的検証がなされているとは言い難い。

私たちは長年、葉酸欠乏モデル動物を用いて、葉酸の生体内での機能を明らかにする研究を続けている。その中で、葉酸欠乏過程の早い段階から血中のホモシステイン濃度が上昇すること、それに伴い各組織で酸化ストレスが亢進すること、ホモシステイン代謝に関わる酵素の遺伝子発現を葉酸が調節していることを明らかにし、葉酸がホモシステイン代謝の重要な調節因子であることを示した。これらの研究成果を踏まえて、高齢期の生活の質に大きく影響をおよぼす脳心血管疾患や骨粗鬆症の発症リスクの軽減や予防に、日々の葉酸摂取が寄与するのかを明らかにすることが重要であると考えに至った。

2. 研究の目的

葉酸は、その欠乏によって貧血を呈することが古くから知られ、葉酸は抗貧血因子として認知されている。また、妊娠中に葉酸が欠乏すると、新生児の神経管閉鎖障害のリスクが高まることが報告され、妊娠前からの葉酸の摂取が推奨されている。一方で、心血管疾患、脳血管疾患、骨粗鬆症、認知症の発症リスクと葉酸摂取との関係が注目されるようになった。葉酸の欠乏によって上昇する血中ホモシステイン濃度が、そのリスク因子になると考えられている。加齢に伴って発症頻度が高まるこれらの疾患は、いずれも高齢期の生活の質に大きく影響を与える。現在のところ、葉酸は妊娠に必要なビタミンと広く認知されているが、誕生から老齢までヒトの一生を通して積極的に摂取すべき栄養素の1つである。しかしながら、そのような認識は未だ十分に広がっていない。そこで、ホモシステイン濃度の上昇が疾患の発症にどのように関与しているのか、その分子メカニズムを解明し、葉酸の新規機能の実験的エビデンスを基に明らかにすることを本研究の目的とした。

葉酸は、上述したように、妊娠期間中の胎児の正常な発育に必要な栄養素であり、妊娠前からの葉酸摂取が推奨されている。一方で現在、母親の栄養状態は妊娠の維持や出生児の健康に影響を及ぼすだけでなく、胎児に何らかの形で記憶され、児の成長後の代謝に影響を与え、成人期以降の疾患へのかかりやすさに関連するという考えが注目されている。この記憶の仕組みとして、DNA メチル化等のエピジェネティクス制御の関与が考えられている。葉酸がメチル基供与体の合成に必須であることから、エピジェネティクスにおいて葉酸は重要な栄養素であると考えられる。そこで当初の目的に加えて、母体が摂取する葉酸の減少、すなわち胎児期・新生児期にさらされる葉酸欠乏が、出生後の成長のみならずその後の代謝反応性にどのような影響を与えるのか、そして肥満や生活習慣病などの代謝性疾患の罹患感受性に影響を与えるのか、特に脂質代謝の変化に注目して検討した。

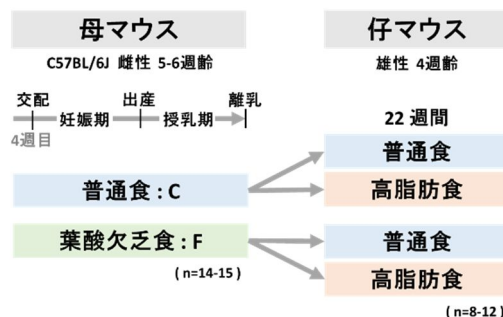
3. 研究の方法

1) 血中ホモシステイン濃度の上昇が動脈硬化病変形成に及ぼす影響について検討した。ヒト動脈硬化症モデルの apolipoprotein E (apoE) 欠損マウス (雄性、7~9 週齢) に、ホモシステイン水 (3 mM, 5 mM) を与えて 16 週間飼育し、血液を採取し血漿脂質マーカーを測定した。さらに、4% パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行った後に大動脈を採取した。採取した血管は、Oil red O 溶液にて染色を行った。外膜を剥離したのち、血管を切り開き内部を観察し、脂肪沈着面積の変化を解析した。

2) 動脈硬化症の発症リスクファクターであるコレステロールとホモシステインとの相互作用について検討した。apoE 欠損マウス (雄性、7~9 週齢) にホモシステイン水を摂取させるとともに、コレステロール添加食 (1%または0.1%) を与え、1) と同様の実験を行った。

3) 母の葉酸欠乏が仔の成獣期の脂質代謝へ及ぼす影響について検討した。雌性マウス (C57BL/6J, 5~6 週齢) を 2 群に分け、普通食、または葉酸欠乏食を自由摂取させた。4 週間後、雄性マウスと交配し妊娠を確認した。

妊娠から授乳終了時まで、母マウスは妊娠前と同じ餌を給餌した。出産から 4 週間後に母マウスを解剖し解析を行った。採取した。各群の雄性仔は離乳後に各々さらに 2 群に分け、普通食または高脂肪食を摂取させた。22 週間後に血液、肝臓、脂肪組織等を採取し、各種解析に用いた。

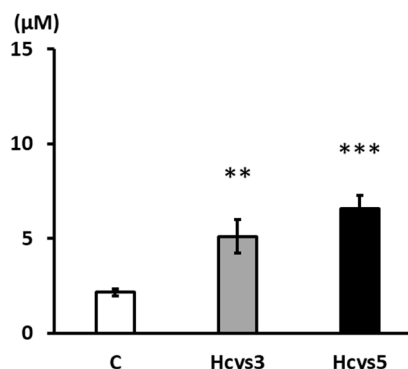


4. 研究成果

1) 血漿ホモシステイン濃度上昇が血管に及ぼす影響を検討した。5 mM ホモシステイン水を摂取させ 16 週間飼育した。その結果、体重、総摂餌量、血漿コレステロールおよびトリグリセリド濃度に対するホモシステイン摂取の影響は見られなかった。血漿ホモシステイン濃度は、ホモシステイン水を摂取した群で有意に増大した。このホモシステイン濃度は、葉酸欠乏で得られるものと同程度であった。大動脈における脂肪沈着面積は、大動脈弓部、腹部および全体いずれにおいてもホモシステイン群で増加したが、有意差は得られなかった。以上より、葉酸欠乏で誘導される血漿ホモシステイン濃度上昇と同程度のホモシステイン負荷によって、大動脈への脂肪沈着が促進することが示唆された。

さらに、ホモシステイン水の濃度を 3 mM にした場合でも、血漿ホモシステイン濃度が上昇し、大動脈全体、弓部への脂肪沈着が増加したが、5 mM の場合に比べて低値であった。

血漿ホモシステイン濃度の上昇は、動脈硬化のリスクファクターである血漿コレステロールの値を変化させることなく、大動脈への脂肪沈着を増加させることから、ホモシステインはコレステロールとは独立して、動脈硬化発症のリスク因子になる可能性が明らかとなった。



血漿ホモシステイン濃度 (3mM, 5mM ホモシステイン (Hcys) 添加)
 ** : $p < 0.01$ *** : $p < 0.001$ vs C
 by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's test

2) コレステロールをホモシステインと同時に負荷した場合の変化を検討した。5 mM ホモシステイン水および 1% コレステロール食を摂取させたところ、解剖時体重、血漿 HDL-コレステロールは、コレステロール負荷により有意に減少した。また、血漿トリグリセリドと non HDL-コレステロール、大動脈への脂肪沈着面積は、コレステロール負荷により有意に増加したが、ホモシステイン摂取による影響は見られなかった。次に、添加するコレステロールを 0.1% にし、5mM ホモシステイン水とともに摂取させたところ、血漿 HDL-コレステロールは、コレステロール負荷により有意に減少し、血漿トリグリセリド、non HDL-コレステロール、大動脈への脂肪沈着面積は、コレステロール負荷により有意に増加したが、いずれもホモシステイン摂取による影響は見られなかった。以上のように、0.1%コレステロール負荷においても、1%コレステロールの場合と同様に、ホモシステインによる影響が見られなかった。また、コレステロール食群同士を比較すると、ホモシステイン水摂取の有無に関係なく、有意な差が見られなかったことから、血漿ホモシステイン濃度上昇の影響はコレステロール負荷で増強することなく、それぞれが独立して動脈への脂肪沈着に關与する可能性が示唆された。

3) 母マウスの葉酸欠乏が出生仔の成獣期における母マウスでは、葉酸欠乏によりメチル基供与体 S-アデノシルメチオニンが減少していたが、出産率、離乳率、母の一腹あたりの産仔数、仔の離乳時体重において、葉酸欠乏による有意差は見られなかった。したがって、母が葉酸欠乏状態にあっても妊娠は維持され、出産や授乳中の仔の成長に影響を与えないことと考えられた。仔の離乳後の体重変化では、母マウスの葉酸欠乏状態に関係なく、高脂肪食摂取した仔で有意な体重増加が見られた。肝臓重量、各脂肪組織重量においては、母の葉酸欠乏による影響は見られ

なかった。また、仔マウスの血漿トリグリセリド、コレステロール、リン脂質においても、母マウスの葉酸欠乏の影響は見られなかった。一方、肝臓のトリグリセリド、コレステロール、リン脂質では、母が葉酸欠乏であった仔において普通食摂取により有意に増加していた。また、肝臓トリグリセリドでは、高脂肪食負荷によっても蓄積する傾向が見られた。以上の結果から、葉酸欠乏の母から生まれた仔では、肝臓脂質が普通食を与えた場合でも、高脂肪食を与えた場合と同程度まで増加し、肝臓への脂質の蓄積が亢進すること、母親の葉酸欠乏が、仔の成獣期における脂質代謝反応にまで影響を及ぼし、脂質代謝の変動に起因する各種疾患の罹患性に影響を与える可能性が考えられた。

研究期間中の研究結果から、葉酸欠乏によって誘導されるホモシステイン濃度の上昇は血管への脂肪蓄積を誘導すること、妊娠前からの葉酸摂取は次世代の健康に影響を与えることが明らかとなり、胎児から高齢者までヒトの生涯を通して葉酸摂取をする重要性の一部を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井藤瑞貴、稲岡ほの、今井美穂、井上裕康、中田理恵子
2. 発表標題 レスベラトロール配糖体ピセイドによる脂質代謝改善効果
3. 学会等名 日本家政学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中澤梨乃、桑山ほのか、井上裕康、中田理恵子
2. 発表標題 葉酸欠乏により誘導される脂質代謝変動の解析
3. 学会等名 日本家政学会第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲岡ほの、井藤瑞貴、中澤梨乃、井上裕康、中田理恵子
2. 発表標題 レスベラトロール配糖体による脂質代謝改善効果と作用機構の検討
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武島奈つ乃、井沼瞳、桑山ほのか、井上裕康、中田理恵子
2. 発表標題 妊娠および授乳期の葉酸欠乏が出生子の脂質代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家政学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井藤瑞貴、中田理恵子、川上結衣、桑山ほのか、井上裕康
2. 発表標題 レスベラトロール配糖体ピセイドによるPPAR を介した脂質代謝改善効果の検討
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山上小百合・堀徳江・本郷翔子・井上裕康・中田理恵子
2. 発表標題 心血管系機能に対するレスベラトロール摂取の効果
3. 学会等名 日本家政学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武島奈つ乃・井沼瞳・三宅芽生・井上裕康・中田理恵子
2. 発表標題 妊娠・授乳期の葉酸欠乏が出生仔の脂質代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武島奈つ乃・井沼瞳・三宅芽生・井上裕康・中田理恵子
2. 発表標題 妊娠・授乳期の葉酸欠乏が仔の脂質代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------