

機関番号：21102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500710

研究課題名（和文）胎生期低栄養に起因する血圧上昇での活性酸素産生酵素の分子機構と食品成分による改善

研究課題名（英文）Expression and activation of NAD(P)H oxidase in adult offspring programmed by maternal protein restriction

研究代表者

佐藤 伸（SATO SHIN）青森県立保健大学・健康科学部・教授

研究者番号：40310099

研究成果の概要（和文）：

本研究において胎児・授乳期に低蛋白質状態に曝された仔ラットの血圧は上昇した。これには活性酸素産生酵素の活性化や血管を弛緩する一酸化窒素の合成酵素の活性低下が関係していた。また授乳期の母ラットがポリフェノール（PP）を摂取すると仔の血圧上昇抑制はみられなかったが、エネルギーバランスを制御する AMP 活性化プロテインキナーゼ活性は上昇した。この結果は PP がエネルギー代謝に影響を及ぼすことを示していた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, maternal protein restriction during gestation and lactation elevated the blood pressure of rat offspring with aging. This was associated with the down-regulated endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and the increased levels of mRNA of NAD(P)H oxidase subunits. When protein-restricted mothers during gestation were fed with polyphenol (PP) during lactation, the activity of AMP-activated protein kinase was up-regulated in adult offspring programmed by maternal protein restriction. Our results suggested that PP intake during lactation may affect energy metabolism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：胎児期低栄養、高血圧、エネルギー代謝、NAD(P)H オキシダーゼ、AMP 活性化プロテインキナーゼ、ポリフェノール、ラット

## 1. 研究開始当初の背景

低栄養状態の母体から出生した児は加齢

とともに高血圧、心血管障害、肥満などを高率に発症することがわかってきた。高血圧の

発症・進展には、さまざまな要因があるが、活性酸素の増大や血管弛緩作用をもつ一酸化窒素 (NO) の欠乏も深く関わっている。たとえば、血圧上昇とともに活性酸素の一種であるスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) の産生が増大する。これは、主たる活性酸素産生酵素である NAD(P)H オキシダーゼが  $O_2^-$  を過剰に産生するためである。一方、 $O_2^-$  は NO と結合し、NO 欠乏を生じ、最終的に血管内皮機能障害を招くと考えられている。

これまで、実験的に低栄養状態の母ラットから産まれた仔の生後に生じる血圧上昇では、NAD(P)H オキシダーゼは活性化しているという報告はあるが、その活性化の分子機構はよくわかっていない。加えて、NAD(P)H オキシダーゼの活性に及ぼす食品成分の影響に関する知見もほとんどなかった。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、胎生期あるいは授乳期に低蛋白栄養に曝されたラットを用いて、以下の二つの課題について検討した。

(1) 実験 I : 胎生期および授乳期に低蛋白栄養に曝された仔ラットに投与したフルクトースが血圧ならびに大動脈や腎臓中の NAD(P)H オキシダーゼおよび内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性に及ぼす影響

実験 I では、胎生期および授乳期に低蛋白質食が仔ラットの成長に伴う血圧、NAD(P)H オキシダーゼおよび eNOS の活性や発現にどのような影響を及ぼすかを明らかにし、さらに、血圧上昇を促進するフルクトースの投与により、血圧はさらに上昇するか、加えて NAD(P)H オキシダーゼの活性や発現はさらに増強するのかどうかを検討した。

(2) 実験 II : 胎生期低蛋白栄養に曝された仔ラットの成長後の血圧および AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 活性に及ぼすケルセチンの影響

胎児期・授乳期に低栄養に曝された出生児は、成長後、高血圧や肥満などを高率に発症する。一方、植物由来ポリフェノール類の一

種であるケルセチンは、血圧上昇抑制や抗肥満作用を有している。そこで、実験 II では、低栄養状態であった母体から生まれた子の生後に生じる生理機能を明らかにするために、妊娠期に低蛋白制限を受けた母ラットの授乳期にケルセチンを摂取させ、成長後の仔の血圧上昇およびエネルギー代謝に及ぼす影響を検討した。

## 3. 研究の方法

本研究は、青森県立保健大学動物実験委員会の承認を得て、すべて「青森県立保健大学動物実験に関する指針」に従って実施された。

### (1) 実験 I

妊娠した Wistar 系ラットを対照群 (C 群 : 20%カゼイン含有) と低栄養群 (LP 群 : 8%カゼイン含有) に分け、妊娠 0 日から離乳時まで投与した。離乳時に、C 群および LP 群から産まれた仔を 4 群に分け、各々に標準動物食 (CC 群と LPC 群) および 60%フルクトース食 (CF 群と LPF 群) を 11 週間与えた。投与期間に体重を、また収縮期血圧 (SBP) を尾部カフ法にて測定した。

投与後 10 週にすべての動物を代謝ケージに入れ、24 時間尿を採取し、NO 代謝物である NOx を測定した。屠殺時に血漿、大動脈および腎臓を採取した。大動脈および腎臓の一部はルシゲニン法により NAD(P)H オキシダーゼ由来の  $O_2^-$  量を測定した。残りは総 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により NAD(P)H オキシダーゼのサブユニット (Nox4 および p47phox) および eNOS の mRNA 発現量を測定した。また総 eNOS およびリン酸化 eNOS 量をウェスタンブロット法にて測定した。

### (2) 実験 II

妊娠した Wistar 系ラットに 20% (C 群) あるいは 8%カゼイン食 (LP 群) を出産まで摂取させた。LP 群を 2 群にわけ、出産後から離乳まで 20%カゼイン食 (LPC 群) または 0.2%ケルセチン (Q) 含有 20%カゼイン食 (LPQ 群) を摂取させた。C 群には 20%カゼイン食を与えた (CC 群)。生後 21±1 日目に雄性仔ラットを離乳させ、離乳時から 23 週齢まで標準動物飼料で飼育した。22 週齢にすべての動物を代謝ケージに入れ、24 時間

尿を採取し、NO の代謝物である NOx を測定した。23 週齢に屠殺し、血漿、大動脈および肝臓を採取した。大動脈の一部はルシゲン法により NAD(P)H オキシダーゼ由来の  $O_2^-$  量を測定した。また、血漿中の血糖値、総コレステロール、トリグリセリド、インスリンを測定した。肝臓中の AMPK、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) および eNOS の発現量をウェスタンブロット法により解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験 I の結果および考察

##### 1) 体重および血圧の変化

妊娠 21 日目の体重は、C 群 (389±3 g, n=5-6, 平均値±標準誤差) および LP 群 (391±5 g, n=5-7) の間には有意な差は見られなかった。離乳時の LP 群の体重は、C 群に比べて有意に小さかった。60%フルクトース投与期間(離乳後から 23 週齢まで)を通して、CC 群(対照)の体重に比べて、CF、LPC および LPF 群では有意に小さかった。

妊娠期から離乳時に低栄養群の親から産まれた仔ラットの成長に伴う SBP は、生後 97~101 日目では対照群の仔(CC 群; 124±1 mmHg, CF 群; 137±2 mmHg, LPC 群; 135±1 mmHg, LPF 群; 141±2 mmHg, 平均値±標準誤差) に比べて有意に高値であった(図 1)。また CC 群と CF 群の SBP を、LPC 群と LPF 群の SBP を比較するといずれもフルクトースの添加群で有意に高値であった。

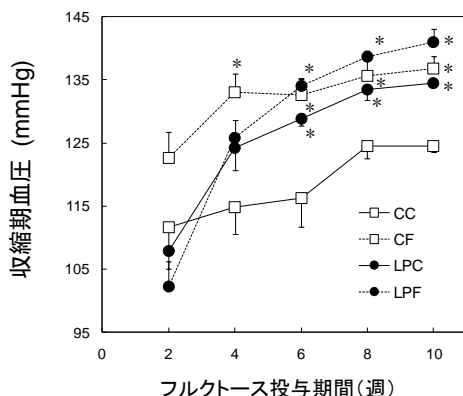


図 1. 離乳後の仔ラットの収縮期血圧の変化  
平均値±標準誤差(n=5-7). \*p<0.05 vs CC 群.

##### 2) 大動脈の $O_2^-$ 量および NAD(P)H オキシダーゼのサブユニットの mRNA 発現量の変化

大動脈中の  $O_2^-$  量は、CC 群に比べて、LPC 群で増加傾向がみられた。また、LPC 群の大動脈では、NAD(P)H オキシダーゼのサブユニットである p47phox の mRNA 発現量が CC 群に比べて増加した(図 2)。Nox4 の発現量は、群間において有意差は認められなかった。

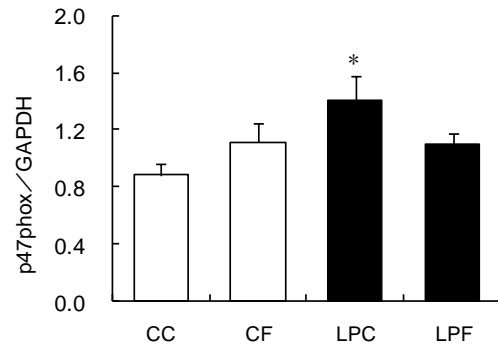


図 2 大動脈中の NAD(P)H オキシダーゼのサブユニット p47phox の mRNA 発現量. 平均値±標準誤差(n=5-7). \*p<0.05 vs CC 群.

##### 3) 24 時間尿中の NOx 量

血管弛緩作用を有する NO の体内量は、NO の代謝物である NOx 量に反映されることが知られているので、24 時間尿中の NOx 量を測定した。その結果、CC 群に比べて、CF 群および LPF 群の NOx 量は有意に低下していた。

##### 4) 大動脈および腎臓中の eNOS 蛋白質の発現量の変化

CF 群、LPC 群および LPF 群の大動脈のリン酸化 eNOS の発現量は、CC 群に比べて減少していた(図 3)。腎臓においても、大動脈と同様の結果が認められた(図 4)。これらの結果から、胎児期および授乳期に低蛋白質餌を摂取した仔ラットでは、成長とともに血圧が上昇し、生後 97~101 日目では尿中 NOx 量および大動脈や腎臓中の eNOS 活性が低下することが明らかになった。

今後、実験 I でみられた現象に関する分子シグナルの経路を、詳細に検討する必要があるが、本モデルでは離乳後のフルクトース摂取は、上述の酵素の活性や発現をさらに増悪させるものではないことを示唆していた。

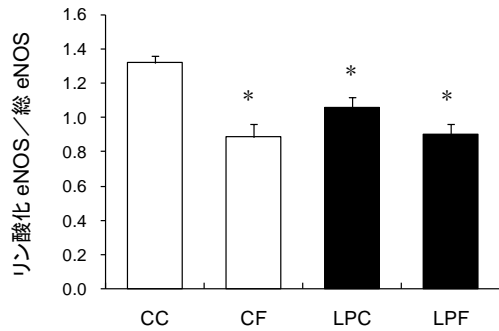


図3. 大動脈中の総 eNOS およびリン酸化 eNOS の蛋白質の比. 平均値±標準誤差 (n=5-7). \*p<0.05 vs CC 群.

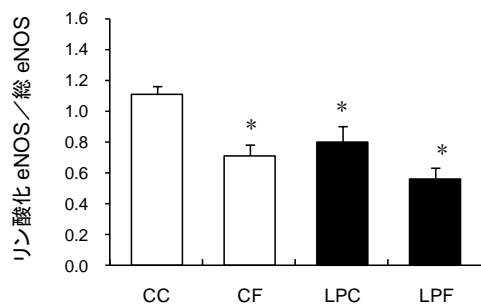


図4. 腎臓中の総 eNOS およびリン酸化 eNOS の蛋白質の比. 平均値±標準誤差 (n=5-7). \*p<0.05 vs CC 群.

## (2) 実験Ⅱの結果および考察

### 1) 体重、血圧および血液生化学的検査値の変化

離乳した後、12 週齢以降の LPQ 群の体重は、LPC 群と比較して有意に高値であったが、CC 群とは有意差は認められなかった。実験終了時の SBP は、各群間での差はみられなかった。血漿中の血糖値、総コレステロールおよびトリグリセリドの各値については群間の差は認められなかった。LPQ 群の血漿インスリン濃度は LPC 群に比べて有意に高値であった。

### 2) 大動脈の NAD(P)H オキシダーゼ由来 $O_2^-$ 量の変化

大動脈の  $O_2^-$  量は CC 群に比べて LP 群でやや高値の傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

### 3) 肝臓中の AMPK および ACC 蛋白質の発現

23 週齢の LPQ 群の肝臓では、リン酸化 AMPK の発現量は、CC 群や LPC 群に比べて有意に高値であった。AMPK は細胞内のエネルギーバランスを制御する重要なセンサーであり、このキナーゼの活性化は高血糖症や肥満の抑制に寄与すると考えられている。一方、リン酸化した AMPK は活性化し、ACC をリン酸化して ACC 活性を阻害することで脂肪酸酸化を亢進することが知られている。そこで、肝臓中のリン酸化 ACC の発現量をウェスタンブロット法で測定した。その結果、LPQ 群のリン酸化 ACC の発現量は、LPC 群に比べて増加していた。このことは、肝臓中のリン酸化した AMPK は ACC の活性を抑制していることが示している。

これらの結果から、本モデルにおいては授乳期の母ラットのケルセチン摂取は、成長後の仔の肝中 AMPK を活性化し、これを介して ACC の活性が抑制し、脂肪酸の代謝を制御している可能性が示唆された。

### 4) 肝臓中の eNOS 蛋白質の発現

AMPK の活性化は、eNOS のリン酸化に関連していることが知られているので、リン酸化 eNOS の発現量をウェスタンブロット法で測定した。その結果、23 週齢の LPQ 群の肝臓では、リン酸化 eNOS の発現量は LPC 群と比べて有意に高値であった。この結果から授乳期に摂取したケルセチンは、AMPK を活性化し、eNOS の活性化に影響を及ぼすことが示唆された。

以上の結果から、授乳期に摂取したケルセチンは、AMPK を介したエネルギー代謝を調節し、胎児期低蛋白栄養によって生じると考えられている肥満の発症に影響を及ぼす可能性が示唆された。

今後、妊娠期に蛋白質制限を受けた母ラットの授乳期に摂取したケルセチンにより、成長後の仔ラットの肝臓中の AMPK が活性化した作用機序あるいはシグナル経路については、詳細に検討する必要がある。

## 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 8 件）

- ① Sato S, Mukai Y, Norikura T. Maternal low-protein diet suppresses vascular and renal endothelial NO synthase phosphorylation in rat offspring independent of a postnatal fructose diet. *J Dev Orig Health Dis*. 査読有, Published online: 16 Mar 2011.
- ② Mukai Y, Norikura T, Fujita S, Mikame K, Funaoka M, Sato S. Effect of lignin-derived lignophenols on vascular oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 査読有, 2011; 348:117-24.
- ③ Mukai Y, Sato S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxidative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 査読有, 2011;22:16-21.
- ④ Norikura T, Mukai Y, Fujita S, Mikame K, Funaoka M, Sato S. Lignophenols decrease oleate-induced apolipoprotein-B secretion in HepG2 cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 査読有, 2010;107:813-7.
- ⑤ Mukai Y, Sato S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 査読有, 2009;19:491-497.
- ⑥ Sato S, Mukai Y, Yamate J, Norikura T, Morinaga Y, Mikame K, Funaoka M, Fujita S. Lignin-derived lignophenols attenuate oxidative and inflammatory damage to the kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Res*, 査読有, 2009; 43: 1205-1213.
- ⑦ Sato S, Mukai Y, Yamate J. Beneficial Effects of Azuki Bean (*Vigna angularis*) Extract: anti-oxidant, anti-hypertension, and treatment for renal damage. Review. *Current Nutrition & Food Science*. (総説), 査読有, 2009;5 217-22.
- ⑧ 駒田亜衣, 森永八江, 山田真司, 佐藤 伸, 井澤弘美, 嵯峨井勝. 基本健康診査データ

から計算した男性の心疾患リスクスコアと食事摂取量に関する研究. *Health Sciences*. 査読有, 2008; 24: 365-374.

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 向井 友花, 乗鞍 敏夫, 藤田 修三, 三亀 啓吾, 船岡 正光, 佐藤 伸. Lignophenols suppress vascular oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. 第 42 回動脈硬化学会学術集会, 2010 年 7 月, 岐阜市.
- ② 向井 友花, 乗鞍 敏夫, 藤田 修三, 佐藤 伸. リグノフェノールによる糖尿病ラットの血管内酸化ストレスの抑制効果. 第 64 回日本栄養・食糧学会大会, 2010 年 5 月, 徳島市.
- ③ 佐藤 伸, 向井 友花, 乗鞍 敏夫, 藤田 修三. 植物リグニン由来リグノフェノールの糖尿病モデルラットの血管障害に及ぼす影響. 第 81 回日本衛生学会, 2011 年 3 月, 東京 (東日本大震災のため中止).
- ④ 向井友花, 佐藤 伸. 胎生期低蛋白栄養に曝された仔ラットの成長後の AMP キナーゼ活性に及ぼすケルセチンの影響. 第 65 回日本栄養・食糧学会大会, 2011 年 5 月, 東京.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 伸 (SATO SHIN)  
青森県立保健大学・健康科学部・教授  
研究者番号：40310099

### (2)研究分担者

井澤 弘美 (IZAWA HIROMI)  
青森県立保健大学・健康科学部・講師  
研究者番号：20315534

研究分担者

向井 友花 (MUKAI YUUKA)  
青森県立保健大学・健康科学部・助教  
研究者番号：60331211

(3)連携研究者

蔵崎 正明 (KURASAKI MASAACKI)  
北海道大学・大学院地球環境科学研究科・  
助教  
研究者番号：80161727