

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：21102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11649

研究課題名(和文) 次世代の骨格筋萎縮に及ぼす発育初期のポリフェノールの影響評価とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Maternal quercetin or curcumin intake during lactation affects to inflammation and autophagy of skeletal muscles of high fat-fed rat 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

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)：発育初期に摂取する植物ポリフェノール(PP)の生理機能を明らかにするために、妊娠期・授乳期に低栄養に曝された母ラットの授乳期にPPを与え、離乳後に高脂肪食を負荷した仔の骨格筋に及ぼす影響を検討した。授乳期にケルセチンを摂取し、離乳後に高脂肪食を負荷した仔の腓腹筋ではマクロファージ(M $\phi$ )数や線維化関連サイトカインの発現量は増加した。オートファジー(ATG)の指標は減少した。一方、授乳期にクルクミンを摂取した仔の腓腹筋ではM $\phi$ 数や線維化面積率は減少した。ATG指標は増加し、亢進することが示された。以上から、発育初期に摂取するPPの違いにより、骨格筋における生理機能は異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、妊娠期・授乳期に低栄養に曝された母ラットの授乳期に植物ポリフェノール(PP)を摂取させると、離乳後に高脂肪食負荷した仔ラットの骨格筋に及ぼす影響がPPの種類によって異なる可能性があることを示した点にある。例えば、乳児期にクルクミンを摂取した仔の腓腹筋では、成長後の高脂肪食負荷により生じる骨格筋における炎症や線維化を、オートファジーを介して軽減することを示した。本研究の結果は、発育初期に摂取するPPの種類によっては早期医療・早期介入とする「先制医療」を見据えた予防策に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Maternal undernutrition is associated with the impairment of the development of skeletal muscles in offspring. We investigated the effects of plant delivered polyphenols such as quercetin and curcumin intake during lactation on inflammation and autophagy in the gastrocnemius muscles (GMs) of high-fat diet (HFD)-fed offspring programmed by maternal protein restriction. Quercetin intake during lactation enhanced the increased macrophage number and fibrosis-related cytokine level and the decreased autophagy markers in the GMs of adult offspring. When given curcumin during lactation, the macrophage number and fibrosis area ratio decreased in the GMs. The autophagy markers were increased. Taken together, quercetin and curcumin intakes during lactation may have different function in the GMs of HFD-fed adult offspring programmed by maternal protein restriction.

研究分野：栄養生化学

キーワード：胎生期低栄養 植物ポリフェノール 骨格筋 慢性炎症 オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは、加齢、低栄養や不活動などによる筋萎縮や筋肉の機能低下とされている。一方、近年、胎生期や乳児期の低栄養が成長後の児の肥満や糖尿病などの発症リスクを高めることがわかってきた。加えて、妊娠中に低蛋白食を摂取した母ラットから産まれた仔ラットの骨格筋では、筋線維束や神経筋接合部の発達の障害や慢性炎症や酸化ストレスの亢進が報告された。

ケルセチン(フラボノイドの一種)あるいはクルクミン(フラボノイド以外のポリフェノール)をはじめとする植物ポリフェノールは、抗酸化作用や抗炎症作用などのほか、エピジェネティックな働きを制御するという。しかしながら、発育初期に摂取する植物ポリフェノールは、生涯にわたっての児の骨格筋の代謝に影響を及ぼすかについては不明な点が多い。そこで、発育初期に摂取するある種の植物ポリフェノールは、成長後の児の骨格筋の代謝に関わっているのではないかと考えた。

本研究では、授乳期の母ラットに化学構造が異なる2つの植物ポリフェノール、すなわちケルセチンまたはクルクミンを摂取させ、骨格筋の慢性炎症を抑制するのかを検討した。さらに、骨格筋の障害は、腎臓の不全と関連することが知られているので、発育初期に摂取する植物ポリフェノール(クルクミン)の腎臓に及ぼす影響について調べた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、妊娠中に低栄養に曝された母ラットの授乳期にケルセチンまたはクルクミンを与え、離乳後、高脂肪食あるいは過剰の果糖液を負荷し、骨格筋あるいは腎臓に及ぼす影響を調べ、慢性炎症を基盤とした分子機構を解明することである。以下の3つ課題について検討した。

課題1: 胎生期及び乳児期に低栄養に曝された雄性仔ラットの離乳後の高脂肪食負荷による骨格筋組織に及ぼすケルセチンの影響

課題2: 胎生期及び乳児期に低栄養に曝された雄性仔ラットの離乳後の高脂肪食負荷による骨格筋組織に及ぼすクルクミンの影響

課題3: 胎生期及び乳児期に低栄養に曝された雌性仔ラットの果糖負荷による腎臓の慢性炎症や酸化ストレスに及ぼすクルクミンの影響

### 3. 研究の方法

課題1: Wistar系妊娠ラットに20%カゼイン食(NP群)あるいは8%食(LP群)を出産まで与えた。出産日にNP群あるいはLP群の母ラットをそれぞれ2群に分け、授乳期間を通して離乳時までケルセチンを投与した。すなわち、NP群では20%カゼイン食(NP/NP群)と0.2%ケルセチン含有20%カゼイン食(NP/NPQ群)である。LP群では8%カゼイン食(LP/LP群)と0.2%ケルセチン含有8%カゼイン食(LP/LPQ群)である。離乳日にNP/NP群あるいはLP/LP群の雄性仔をそれぞれ2群に分け、離乳後から42週齢まで、通常食(NF)または高脂肪食(HF)を与えた。すなわち、NP群ではNP/NP/NF群、NP/NP/HF群及びNP/NPQ/HF群の3群である(実験1)。LP群ではLP/LP/NF群、LP/LP/HF群及びLP/LPQ/HF群の3群である(実験2)。HFを投与した最終週に血漿及び腓腹筋を採取した。血漿を用いて血液生化学検査を行った。また、腓腹筋を化学固定して病理組織標本作製し、コラーゲン線維を染めるシリウスレッド染色を施し、1視野あたりの線維化面積率を計測した。また、CD68抗体を用いてマクロファージの免疫染色し、1視野あたりの陽性数を計測した。Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1のタンパク質量やオートファジーの関連指標であるMicrotubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)、Sequestosome 1/p62

(p62)のタンパク質発現量をウエスタンブロット法により解析した。

課題2： Wistar系妊娠ラットに20%カゼイン食(NP群)あるいは8%カゼイン食(LP群)を与えた。出産日にLP群を3つに分け、0%(LP/LP群)、0.25%(LP/0.25Cur群)並びに0.5%(LP/0.5Cur群)のクルクミン(Cur、高吸収クルクミン)含有8%カゼイン食を授乳期に与えた。NP群には20%カゼイン食を与えた(NP/NP群)。離乳後、雄性仔ラットに通常食(NF)または高脂肪食(HF)を与えた。すなわち、NP/NP/NF、LP/LP/NF、LP/LP/HF、LP/LP0.25Cur/HF並びにLP/LP0.5Cur/HF群の5群である。52週齢時に血漿及び腓腹筋を採取し、血液生化学検査を行い、血漿中グルコース(Glc)及びトリグリセリド(TG)濃度を測定した。また、腓腹筋中のTG濃度を測定した。腓腹筋の一部から病理組織標本を作製した。腓腹筋ではシリウスレッド染色を施し、1視野あたりの線維化面積率を計測した。また、マクロファージの免疫染色し、1視野あたりの陽性数を計測した。また、オートファジー関連指標のタンパク質発現量をウエスタンブロット法により解析した。

課題3： Wistar系妊娠ラットに20%カゼイン食(NP群)あるいは8%カゼイン食(LP群)を与えた。出産日にLP群を3つに分け、0%(LP/LP群)あるいは0.25%(LP/Cur群)のクルクミン(Cur、高吸収クルクミン)含有8%カゼイン食を授乳期にのみ与えた。NP群には20%カゼイン食を与えた(NP/NP群)。離乳後、雌性仔ラットに蒸留水(W)又は10%果糖(Fr)液を与えた。群はNP/NP/W、LP/LP/W、LP/LP/Fr及びLP/LPCur/Frの4群である。13週齢時に血漿及び腎臓を採取した。血漿を用いて血液生化学的検査を行い、血漿中のマロンジアルデヒド(MDA)濃度を測定した。腎臓では1視野あたりのマクロファージ数、線維化面積率、グルタチオン(GSH)量及びグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)活性を測定した。また、Nrf2及びヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)をウエスタンブロット法により解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 課題1の成果

本研究では、発育初期に摂取するケルセチンの仔ラットの腓腹筋における生理機能を明らかにするために、妊娠期に低タンパク質食を、授乳期にケルセチン含有低タンパク質食を摂取した母ラットから産まれた雄性仔ラットの離乳後に、45週齢まで高脂肪食を負荷した。その結果、実験2においてはLP/LPQ/HF群の腓腹筋中の1視野あたりのマクロファージ陽性数、TGF-βのタンパク質発現量は、LP/LP/HF群に比べて増加した。また、LP/LPQ/HF群のLC3B-II量は、LP/LP/HF群に比べて減少した。LP/LPQ/HF群のp62発現量は増加した。これらの結果から、授乳期にケルセチンを摂取した母ラットから産まれた雄性仔の腓腹筋では、炎症は促進し、オートファジーは抑制される可能性が示唆された。

##### (2) 課題2の成果

本研究では、発育初期に摂取するクルクミン(フラボノイド以外のポリフェノール)の仔ラットの骨格筋における生理機能を明らかにするために、妊娠期に低タンパク質食を、授乳期にクルクミンを摂取した母ラットから産まれた雄性仔の離乳後に、50週齢まで高脂肪食を負荷した。その結果、授乳期にクルクミンを摂取した母ラットから産まれた雄性仔ラットの中では、LP/LP0.5Cur/HF群の腓腹筋中TG濃度は、LP/LP/HF群に比べて減少した。LP/LP0.5Cur/HF群の血漿TG濃度は、LP/LP/HF群に比べて減少したが、有意な差は認められなかった。

LP/LP0.25Cur/HF群の1視野あたりのマクロファージ陽性数は、LP/LP/HF群に比べて減少した ( $p < 0.05$ )。また、LP/LP0.5Cur/HF群の陽性数は、LP/LP/HF群に比べて減少傾向を示した ( $p = 0.073$ )。一方、LP/LP0.25Cur/HF群及びLP/LP0.5Cur/HF群の1視野あたりの線維化面積率は、LP/LP/HF群に比べて有意に減少した。これらのことから、授乳期に摂取したクルクミンは、離乳後、高脂肪食を負荷した雄性仔の腓腹筋の炎症や線維化を抑制する可能性が示唆された。LP/LP0.5Cur/HF群のLC3B-II/LC3B-I比は、LP/LP/HF群に比べて有意に増加した。また、LP/LP0.5Cur/HF群のp62タンパク質の発現量は、LP/LP/HF群に比べて減少傾向であった。これらの結果から、授乳期にクルクミン摂取した母ラットから産まれた雄性仔の腓腹筋ではオートファジーは亢進する可能性が示唆された。

### (3) 課題3の成果

LP/Cur/Fr 群の Glc 及び Tg 濃度は、LP/LP/Fr 群に比べて有意に減少した。このことから、クルクミンは果糖負荷した雌性仔ラットの糖代謝や脂質代謝に影響を及ぼすことが考えられた。LP/LP/Fr 群のマクロファージ陽性数及び線維化面積率は、LP/LP/W 群に比べて増加傾向にあった。これに対して、LP/LPCur/Fr 群のマクロファージ陽性数及び線維化面積率は、LP/LP/Fr 群に比べて有意に減少した。これらのことから、クルクミンは Fr の負荷による腎障害の軽減に関与することが考えられた。LP/LPCur/Fr 群の血漿 MDA 濃度は、LP/LP/Fr 群に比べて有意に減少した(Fig.1)。また、LP/LPCur/Fr 群の GSH 量及び GPx 活性は、LP/LP/Fr 群に比べて有意に増加した(Fig.2)。LP/LPCur/Fr 群の Nrf2 及びその標的となる HO-1 のタンパク質発現量は、LP/LP/Fr 群に比べて有意に増加した。

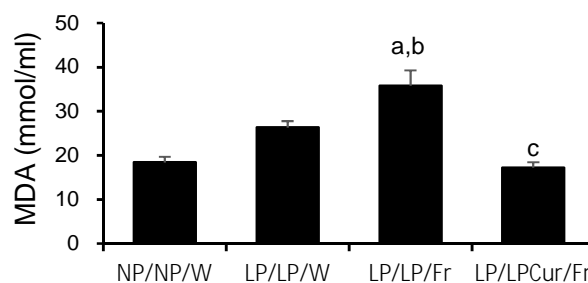


Fig. 1. 授乳期に摂取したクルクミンの雌性仔の血漿マロンジアルデヒド(MDA)濃度に及ぼす影響。平均値±標準誤差(n = 6-12)。<sup>a</sup> $p < 0.05$  compared to NP/NP/W. <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs LP/LP/W. <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs LP/LP/Fr.

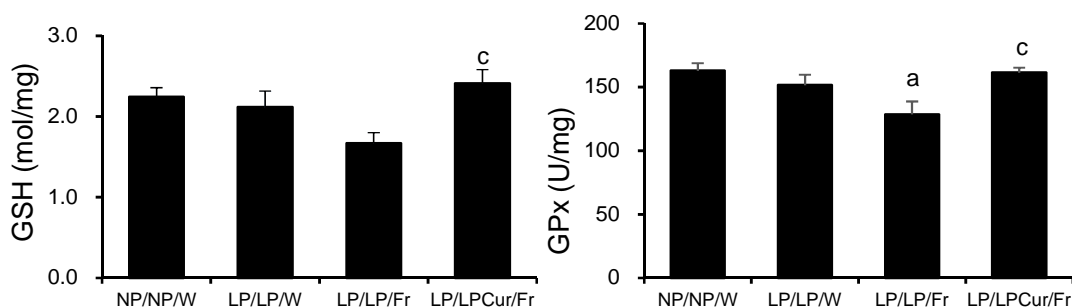


Fig. 2. 授乳期に摂取したクルクミンの雌性仔の腎臓中グルタチオン(GSH)濃度(右)及びグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)活性(左)に及ぼす影響。平均値±標準誤差(n = 6-12)。<sup>a</sup> $p < 0.05$  vs NP/NP/W. <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs LP/LP/W. <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs LP/LP/Fr.

以上のことから、課題1及び2では、胎生期や乳児期にタンパク質制限を受けた母ラットから生まれ、離乳後に高脂肪食を負荷した場合、仔ラットの腓腹筋において、乳児期に摂取するポリフェノールの種類あるいは化学構造によって、腓腹筋に及ぼすポリフェノールの影響は異なる可能性が示唆された。今後、詳細な作用機序を明らかにする必要がある。課題3においては、乳

児期に摂取するクルクミンは、離乳後に果糖負荷された雌性仔の腎臓における Nrf2 発現量の増加を介して、Nrf2 の標的である HO-1 発現量を増加し、また GPx 活性を高めて、腎臓の酸化ストレスを抑制することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato S, Takahashi N, Mukai Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Bangle (Zingiber purpureum) Extract Attenuates Insulin Resistance and Inflammation in the Skeletal Muscle of High Fat Diet-fed Young SAMP8 Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Food and Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 434-441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12691/jfnr-9-8-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato S, Mukai Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Modulation of chronic inflammation by quercetin: the beneficial effects on obesity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Inflamm Res	6. 最初と最後の頁 421-431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JIR.S228361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaoka S, Sasaki K, Sato S	4. 巻 115
2. 論文標題 Curcumin intake during lactation suppresses oxidative stress through upregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the kidneys of fructose-loaded female rat offspring exposed to maternal protein restriction.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Birth Defects Res.	6. 最初と最後の頁 674-686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bdr2.2158.	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 向井友花、高橋なごみ、佐藤伸
2. 発表標題 ジャワシヨウガ抽出物は高脂肪食摂取若齢SAMP8マウス骨格筋のインスリン抵抗性と炎症を軽減する
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岡伸、佐々木琴美、佐藤伸
2. 発表標題 胎児期・乳児期に低栄養に曝された仔ラットの果糖負荷による腎臓のNrf2/HO-1経路に及ぼすクルクミンの影響
3. 学会等名 第68回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤伸、乗鞍敏夫、向井友花、山岡伸、三亀啓吾
2. 発表標題 高脂肪食誘発肥満マウスの腎臓における炎症細胞や線維化に及ぼすリグニン由来低分子リグノフェノールの影響
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤李香、佐々木琴美、西田朱里、山岡伸、向井友花、佐藤伸
2. 発表標題 発育初期に低蛋白食に曝された仔ラットの離乳後の過剰果糖摂取による骨格筋の炎症に及ぼすクルクミンの影響
3. 学会等名 第67回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木琴美、佐藤李香、西田朱里、山岡伸、向井友花、佐藤伸
2. 発表標題 胎生期・乳児期に低栄養に曝された仔ラットの果糖負荷による腎障害に及ぼすクルクミンの影響
3. 学会等名 第67回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西基喜、佐藤伸、角濱春美、吉池信男、上泉和子
2. 発表標題 青森県立保健大学のヘルスリテラシー向上推進活動
3. 学会等名 第79回日本公衆衛生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shin Sato, Toshio Norikura, Yuuka Mukai
2. 発表標題 Effect of maternal quercetin intake during lactation on renal inflammation in high fructose-fed female rat offspring exposed to maternal malnutrition
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition in Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin Yamaoka, Kotomi Sasaki, and Shin Sato
2. 発表標題 Infant curcumin intake enhances antioxidant by upregulating Nrf2 in the kidneys of fructose-loaded female pups exposed to undernutrition during fetal and infancy
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition in Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究 分担者	向井 友花  (Mukai Yuuka)  (60331211)	神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・教授    (22702)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	山岡 伸  (Yamaoka Shin)  (40830823)	青森県立保健大学・健康科学部・実験・実習助手    (21102)	

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