

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：21102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700760

研究課題名（和文） 妊娠高血圧症候群の病態に対する植物性ポリフェノールの有効性と作用機序

研究課題名（英文） Effect of plant polyphenols on oxidative stress and lipid metabolism in pregnancy-induced hypertension rat models

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：妊娠高血圧症候群の病態の軽減に対する植物性ポリフェノールの有効性を見いだすため、妊娠ラットに一酸化窒素（NO）合成酵素阻害剤を投与あるいはフルクトース（果糖）を過剰摂取させ、アズキポリフェノール摂取が血圧、酸化ストレス、糖・脂質代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、アズキポリフェノール摂取は NO 欠乏妊娠ラットに顕著な血圧上昇抑制効果は示さなかったが、腎臓の Mn-SOD 発現を増加させた。またフルクトース摂取妊娠ラットに認められた肝臓の脂質合成転写因子の発現上昇を一部抑制した。

研究成果の概要（英文）：In order to examine the effect of plant polyphenols on maternal blood pressure, oxidative stress, and glucose and lipid metabolism in pregnancy-induced hypertension rat models, pregnant rats were treated by nitric oxide (NO) synthase inhibitor or excess intake of fructose. In NO-deficient pregnant rats, azuki bean polyphenols up-regulated significantly renal expression of Mn-superoxide dismutase, although significant decrease in maternal blood pressure was not observed. In fructose-fed pregnant rats, azuki bean polyphenols partly diminished hepatic expression of lipogenic transcription factor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：栄養生化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：妊娠高血圧症候群・アズキポリフェノール・酸化ストレス・血液凝固線溶系・胎盤・胎児・フルクトース・脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群の発症率は全妊婦の 7~10%を占めており、妊娠分娩経過に著しい障害を及ぼす。また、胎児の子宮内死亡や子宮内発育遅延をもたらす、低出生体重児のリスクが増加する。近年の日本では、出生率の低下、初産年齢の高齢化が緊急の課題となっており、妊娠期の母体の健康管理は重要な問題であると言える。これまで、妊娠高血圧症候群やその合併症の病態解明や治療法の検討は主に産婦人科学領域で研究されており、妊娠高血圧症候群改善のための栄養学的アプローチはまだ多くない。妊娠初期に食物繊維を豊富に摂取していた妊婦は子癩前症（重度の妊娠高血圧）になるリスクが低いという疫学的調査報告はあるものの、食品成分による妊娠高血圧症候群の軽減やその分子機構を検討している研究はほとんどない。

妊娠時には、胎児および胎盤が形成されることにより、母体では心血管および腎臓を中心とした循環系、および糖や脂質の代謝に様々な生理的变化が生じる。近年、特に胎盤における酸化ストレスの亢進が母体の血管内皮機能に影響を及ぼし、妊娠高血圧症候群の病態に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。妊娠高血圧症候群において胎盤および血管内皮で活性化された NAD(P)H オキシダーゼやキサンチンオキシダーゼが産生するスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) は、血管内皮依存性弛緩因子である一酸化窒素 (NO) と結合してその働きを抑制する。よって、 $O_2^-$  の過剰産生を抑制することは、NO の生理活性を維持し、妊娠期における血管内皮機能を正常に保つのに有効と考えられる。

研究代表者はこれまで、高血圧に対する植物性ポリフェノールの有効性について高血圧モデルラットを用いて検討してきた。その結果、アズキポリフェノール投与による心血管系の NAD(P)H オキシダーゼ由来  $O_2^-$  量の低下、NO 合成酵素の過剰発現の発現調節、NO の産生増加が認められ、アズキポリフェノールが生体内酸化ストレスの軽減に有効である可能性を見いだした。

一方、フルクトース（果糖）の過剰摂取は、ヒトや動物において糖・脂質代謝異常を引き起こす。また腎肥大や血管壁の肥厚、血管弛緩作用の低下といった血管内皮機能障害を誘導し、高血圧の発症要因となることが知られている。しかしながら、妊娠期のフルクトース過剰摂取と妊娠高血圧症候群との関連についてはほとんど知見がない。

## 2. 研究の目的

本研究では、妊娠高血圧症候群における血液凝固系に及ぼす NO 欠乏の影響、ならびに

妊娠高血圧症候群の病態の軽減に対する植物性ポリフェノールの有効性を見いだすため、以下のことを検討した。

(1) 妊娠高血圧症候群の病態には、血管内皮機能障害に加え血液凝固の亢進も関与することが知られている。そこで、妊娠期の NO 欠乏が母体と胎児の血管における血液凝固線溶系因子の発現に及ぼす影響を検討した。

(2) 妊娠期の NO 生理活性の低下に起因する血管内皮機能障害は、妊娠高血圧症候群の主因である。そこで、妊娠期 NO 欠乏ラットを作製しアズキポリフェノールの投与により血圧上昇が抑制されるか、酸化ストレスを軽減するかを検討した。

(3) 妊娠期のフルクトース過剰摂取が母体の血圧や脂質代謝および胎児の発育に及ぼす影響を検討し、フルクトース過剰摂取に起因する妊娠期の代謝異常をアズキポリフェノールにより軽減できるかを検討した。

## 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) 妊娠期の NO 欠乏が母体と胎児の血管凝固線溶系因子の発現に及ぼす影響

10 週齢、雌性の Wistar 系ラットを 2 群に分け、NO 合成酵素 (NOS) の阻害剤である  $N^G$ -nitro-L-arginine methylester (L-NAME) を妊娠 20 日目まで投与 (0.5g/L、飲水として) した (L-NAME 群)。対照群 (C 群) には蒸留水のみを与えた。妊娠 20 日目に解剖し大動脈、臍帯血管および胎盤を採取した。各組織における組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA)、組織因子 (TF)、TF 経路インヒビター (TFPI) の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR により定量した。胎盤のパラフィン切片を作製して HE 染色により病理観察を行い、抗 PAI-1 抗体を用いた免疫組織化学的染色により組織中の PAI-1 発現の程度および分布を観察した。

### (2) 妊娠期 NO 欠乏ラットの酸化ストレスに対するアズキポリフェノールの影響

10 週齢、雌性の Wistar 系ラットを 2 群に分け、北海道産のアズキ (エリモショウズ; *Vigna angularis*) より採取したポリフェノールを多く含む種皮 (ABSC; Azuki Beans Seed Coat) を 0 または 1% の濃度で混餌投与した。雄性ラットと交配し妊娠が確認された各群ラットをさらに 2 群ずつに分け、NOS 阻害剤

L-NAME を妊娠 20 日目まで投与 (0.5g/L、飲水として) した (妊娠高血圧(PIH)+0%群または 1%ABSC 群)。正常血圧群 (NP+0%群または 1%ABSC 群) には蒸留水のみを与えた。妊娠期間中、血圧および体重を測定し、妊娠 20 日目に胎児、胎盤および腎臓を採取した。腎皮質ホモジネートの NADPH オキシダーゼ由来  $O_2^-$  産生量をルシゲニンを用いた化学発光法により測定し、腎皮質におけるマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) 発現量をウェスタンブロット法により定量した。

### (3) 妊娠期のフルクトース過剰摂取とアズキポリフェノールが母体の血圧や糖・脂質代謝および胎児の発育に及ぼす影響

11 週齢、雌雄の Wistar 系ラットを交配させ、得られた妊娠ラットを 2 群に分け、10%(w/v)D-フルクトース溶液を妊娠 20 日目まで自由摂取させた (フルクトース群)。対照群には蒸留水のみを与えた。フルクトース群はさらに 2 群に分け、0 または 1%の濃度で ABSC を混餌投与した。妊娠期間中、体重および血圧を測定し、妊娠 20 日目に採血した後、胎児および胎盤、母体および胎児の肝臓を摘出した。血漿を採取し血液生化学検査を行った。母体および胎児肝臓について、脂質代謝に関与する転写因子や酵素の発現を、リアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロット法により定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 妊娠期の NO 欠乏が母体と胎児の血管凝固線溶系因子の発現に及ぼす影響

L-NAME 群は、組織学的に、胎盤の基底脱着膜の菲薄化や浮腫状に変性した胎盤絨毛が迷路層の一部に認められた。また臍帯血管と胎盤において、線溶系因子である組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) mRNA の発現が有意に減少し、変性した胎盤絨毛部位に免疫組織化学的に強い PA 阻害因子 (PAI-1) の発現が認められた (図 1A および B)。凝固系因子である組織因子 (TF) と TF 経路阻害因子 (TFPI) の発現には変化はなかった。これらのことから臍帯血管および胎盤では相対的に血液凝固系が亢進していることが推察された。一方母体大動脈においては、tPA 発現は増加し (図 1C)、TFPI の発現は減少した。

以上の結果から、妊娠期の NO 欠乏は、母体循環だけでなく胎児胎盤循環においても血液凝固線溶系バランスの変動を惹起し、妊娠高血圧の進展および胎児発育不全に関与する可能性が示唆された。

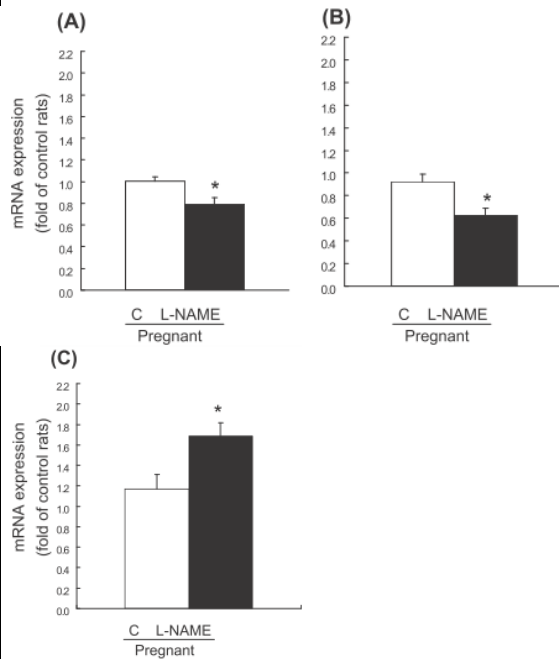


図 1 妊娠期の NO 欠乏が臍帯血管 (A)、胎盤 (B) および母体大動脈 (C) における組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) mRNA 発現に及ぼす影響  
平均値±標準偏差 (n=7)。\*p<0.05 vs C 群。  
C 群, 対照群; L-NAME, L-NAME 投与群。

### (2) 妊娠期 NO 欠乏ラットの酸化ストレスに対するアズキポリフェノールの影響

L-NAME を投与した PIH+0%ABSC 群では血圧の顕著な上昇および蛋白尿の亢進が認められ、妊娠高血圧症候群の症状を呈した。PIH+1%ABSC 群の血圧はやや低値であったが顕著な低下は認められなかった。PIH+0%ABSC 群には胎児死亡や発育不全が認められ、胎盤重量は有意に低値であったが、PIH+1%ABSC 群の胎盤重量は NP+0%および 1%ABSC 群と同程度であった (表 1)。

表 1 妊娠高血圧ラットの胎児および胎盤に及ぼす ABSC の影響

小豆種皮 (ABSC)	正常血圧 (NP) 群		妊娠高血圧 (PIH) 群	
	0%	1%	0%	1%
着床数	15.0±1.3	15.0±1.0	14.5±2.1	15.8±1.4
生存胎仔数	15.0±1.3	15.0±1.0	11.4±4.0	10.9±2.5 <sup>ab</sup>
平均胎仔重量 (g)	3.4±0.2	3.5±0.2	2.8±0.4 <sup>ab</sup>	2.9±0.3 <sup>ab</sup>
平均胎盤重量 (g)	0.54±0.03	0.59±0.05	0.50±0.04 <sup>b</sup>	0.56±0.04 <sup>c</sup>

平均値±標準偏差 (n=6-7)。<sup>a</sup>p<0.05 vs NP+0%ABSC 群。<sup>b</sup>p<0.05 vs NP+1%ABSC 群。

NP, 正常血圧; PIH, 妊娠高血圧; ABSC, 小豆種皮。

腎皮質における NADPH オキシダーゼ由来  $O_2^-$  産生量は、PIH+0%ABSC で有意に増加しており PIH+1%ABSC 群で低下は認められなかった (図 2)。しかし、 $O_2^-$  消去酵素の一つである Mn-SOD の腎皮質におけるタンパク質発現量は PIH+1%ABSC 群で増加した (図

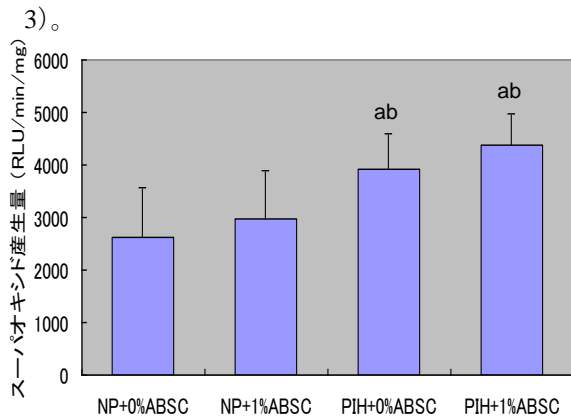


図 2 腎皮質における NADPH オキシダーゼ由来の O<sub>2</sub> 産生に及ぼす ABSC の影響  
 平均値±標準偏差 (n=6-7)。\*p<0.05 vs NP+0%ABSC 群。\*p<0.05 vs NP+1%ABSC 群。  
 NP, 正常血圧; PIH, 妊娠高血圧; ABSC, 小豆種皮。

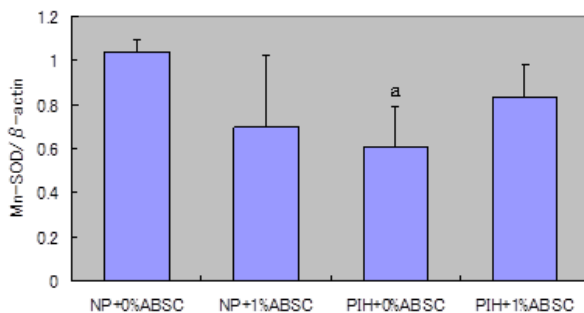


図 3 腎皮質における Mn-SOD タンパク質発現に及ぼす ABSC の影響 (ウエスタンブロット法)  
 平均値±標準偏差 (n=5-7)。\*p<0.05 vs NP+0%ABSC 群。  
 NP, 正常血圧; PIH, 妊娠高血圧; ABSC, 小豆種皮。

以上の結果から、妊娠期の NO 欠乏は胎児および胎盤の発育不全と腎臓の酸化ストレスを亢進させた。ポリフェノールを含むアズキ種皮の投与は、顕著な血圧上昇抑制効果は認められなかったものの、腎臓での Mn-SOD 発現を調節し、妊娠高血圧症候群における酸化ストレスの軽減に関わっている可能性が示された。

### (3) 妊娠期のフルクトース過剰摂取とアズキポリフェノールが母体の血圧や糖・脂質代謝および胎児の発育に及ぼす影響

対照群と比較してフルクトース群の収縮期血圧や体重に増加は認められなかったが、妊娠 20 日目の母体の肝臓重量は有意に増加した。母体の血漿では、フルクトース群で血糖値、インスリンおよびレプチン濃度が有意に高値であった。胎児および胎盤の数や重量には影響を及ぼさなかった。脂質代謝に関連する因子の発現は、母体肝臓および胎児肝臓のいずれにおいても転写因子 SREBP-1c の mRNA およびタンパク質発現量がフルクト

ース群で顕著に増加した。

母体の肝臓においてはさらに脂肪酸合成酵素 (FAS) mRNA 発現の上昇とアシル CoA オキシダーゼ (ACO) mRNA 発現の低下が認められた。フルクトース群に 1%ABSC を混餌投与した群では、母体の血糖値や血中脂質に顕著な変化は現れなかったものの、肝臓中の SREBP-1c および FAS の mRNA 発現量に低下傾向が認められた。

以上の結果より、妊娠期のフルクトース摂取は、母体に対し血圧上昇は誘導しなかった。しかしながら、高血糖や肝臓の脂質合成遺伝子発現の上昇、β 酸化遺伝子発現の低下といった妊娠期の糖・脂質代謝異常を誘導する可能性が示唆された。

さらに胎児の肝臓での脂質合成転写因子の発現を上昇させたことから、仔の出生後の脂質代謝にも影響を及ぼすことが推察された。

またアズキポリフェノールは妊娠期の糖・脂質代謝異常に対し顕著な代謝改善作用は示さなかったものの、母体肝臓中の脂質合成関連因子の発現を一部抑制し、脂質代謝制御に一部関与している可能性が示唆された。

### 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 5 件)

- ① Mukai Y, Sato S. Effect of nitric oxide deficiency on tissue-type plasminogen activator expression in the umbilical cord in a pregnancy-induced hypertension rat model. *Pregnancy Hypertension* 2, 53-58, 2012. 査読有.  
DOI: 10.1016/j.preghy.2011.10.002
- 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. *Molecular and Cellular Biochemistry* 348, 117-124, 2011. 査読有.  
DOI:10.1007/s11010-010-0645-9
- ③ Mukai Y, Sato S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxidative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 16-21, 2011. 査読有.  
DOI:10.1016/j.jnutbio.2009.11.004
- ④ 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. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2, 168-175, 2011. 査読有.  
DOI: 10.1017/S2040174411000110

- 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. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 19, 491-497, 2009. 査読有.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475308001919>

〔学会発表〕(計9件)

- ① 孫 永琨, 佐藤 伸, 向井友花, 細川敏幸, 齋藤 健, 蔵崎正明. 妊娠期緑茶投与の出産仔のエピゲネティック因子に及ぼす影響. 第82回日本衛生学会学術総会, 2012年3月24-26日, 京都.
- ② 徳岡友佳里, 向井友花, 佐藤 伸. 高脂肪食誘発肥満モデルラットの脂質代謝に及ぼすリグノフェノールの影響. 2011年度 青森県保健医療福祉研究発表会, 2012年2月18日, 青森.
- ③ 濱谷 舞, 向井友花, 佐藤 伸. 妊娠期低栄養母ラットの授乳期におけるカテキン類摂取が仔ラットの成長後の血圧上昇および一酸化窒素合成酵素の発現に及ぼす影響. 2011年度 青森県保健医療福祉研究発表会, 2012年2月18日, 青森.
- 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13-15日, 東京.
- ⑤ 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).
- ⑥ 向井友花, 佐藤 伸. 妊娠期の一酸化窒素欠乏が臍帯血管における血液線溶系因子 tPA の発現に及ぼす影響. 2010年度青森県保健医療福祉研究発表会, 2011年2月22日, 青森.
- ⑦ 向井友花, 佐藤 伸. 高血圧モデルラットの酸化ストレスおよび炎症におけるアズキ(*Vigna angularis*)ポリフェノールの生理的役割. 日本ヒューマンケア科学学

会第3回学術集会, 2010年10月23日, 青森.

- ⑧ 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.
- ⑨ 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.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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