

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700922

研究課題名（和文）いんげん豆類摂取による脂質・糖質代謝異常改善効果の検証

研究課題名（英文）Common bean extract intake improves lipid/carbohydrate metabolism disorder

研究代表者

瀬尾 誠 (SEO MAKOTO)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10406473

研究成果の概要（和文）：

いんげん豆抽出物を摂取したマウスでは、高脂肪食負荷による体重および肝臓・脂肪組織重量の増加が抑制され、血清中の脂質・糖質パラメーターやアディポサイトカイン量も正常マウスに近づくよう改善した。また、いんげん豆抽出物の摂取により、肝臓中の脂肪滴蓄積も減少した。これらの改善効果の作用機構として、複数の脂質・糖質代謝経路に関わる遺伝子群、さらにそれら上流の転写因子やシグナル伝達因子の活性化の調節を介したものであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

High fat-induced body weight gain, liver and adipose tissue weight gain were suppressed by ingestion of common bean extract, and serum fat/carbohydrate parameters and adipocytokines concentration were also improved near by normal mice. Moreover, lipid droplet accumulation in the liver was reduced by ingestion of common bean extract. It is suggested that the mechanisms of these improvement effects may be regulated the gene expression of lipid-carbohydrate metabolism pathways and also be regulated the activation of the multiple transcriptional factors and signaling factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

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：いんげん豆、脂肪肝、脂質代謝、糖質代謝、アディポサイトカイン

1. 研究開始当初の背景

近年、食事由来の過剰な脂質摂取による脂質代謝異常を起因とする肥満や動脈硬化症など生活習慣病発症率は、我が国のみならず欧米の先進諸国においても顕著に増加しており、それらの発症予防および改善方法の確立が急務となっている。

伝統的な日本食材の豆類は、良質なタンパク質、ミネラルや栄養素を豊富に含んでおり、ヘルシーで栄養価が高い食物である。数多くある食用豆の中でも、特に大豆に含まれる生理活性成分として注目されている難溶性ポリペプチドやポリフェノール類は、以前からよく研究対象となっており、抗腫瘍作用や抗酸化・抗炎症作用など数多くの生体機能調節

作用を有することが国内・国外で数多く報告されてきた。また近年、大豆（特にその難溶性ペプチドについて）は、血中コレステロールやトリグリセリド濃度の低下作用を有することが、動物実験のみならずヒトにおいても実証されている。

一方、大豆以外の食用豆が有する生体機能調節作用、特に脂質代謝調節作用に関する報告は、現在のところほとんどなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

これまで研究代表者は、ヒト初代培養肝細胞に高濃度の長鎖脂肪酸を負荷することにより、細胞内に脂肪滴蓄積をきたす *in vitro* 脂肪肝モデルを用い、大豆を含む十数種類の食用豆を対象として脂肪肝形成抑制効果を有するか否かのスクリーニングを行い、小豆やいんげん豆類には、肝細胞内の脂肪滴蓄積を抑制し、脂質ホメオスタシス改善効果を有する品種があることを明らかにしてきた。

しかし、上記の成果は、あくまで *in vitro* 実験系であり、脂質代謝の一部に限定された知見である。脂質代謝異常症の発症は、肝臓のみの代謝異常だけではなく、食事由来の脂肪の吸収・分布から排泄に至る非常に多彩な生体応答の破綻により引き起こされる。

本研究課題では、マウスに高脂肪食を負荷した際に脂質・糖質代謝異常をきたす *in vivo* 実験モデルにおいて、いんげん豆類の摂取による脂質・糖質代謝ホメオスタシス維持に対する総合的な効果の検証・評価を行い、その有用性を確立と作用機構の解明に迫る。

3. 研究の方法

(1) 動物実験およびサンプル採取

6週齢の C57BL/6J マウスにラード由来の低脂肪食 (10% kcal Diet, control 群) ま

たは高脂肪食 (60% kcal Diet, positive control 群) を自由摂取させた。また、各食餌群に対し、蒸留水またはうずら豆抽出物 (0.1% または 1% (v/v)) を添加した蒸留水をそれぞれ自由飲水させた。試験食摂取期間中には、毎週各群のマウスの体重測定と採血を行い、2週間毎に血中脂質・糖質パラメーターの変動をモニターし、10週間目に解剖を行った。

一晩絶食したマウスより全採血した後、肝臓、脂肪組織および腸管を採取し、各組織の一部を病理切片作製用サンプルとして 10% ホルマリン溶液にて固定し、残りの組織は、脂質抽出用 (肝臓のみ)、total RNA 抽出用、タンパク質抽出用のサンプルとして -80℃にて保存した。

(2) 血清および肝臓中脂質濃度の測定

試験期間終了日に採取した血清中の脂質濃度を市販のキットを用いて測定した。

また、各食餌群の肝臓より Folch 法にて脂質成分を抽出し、肝臓中脂質パラメーターとして、トリグリセリド、コレステロール、リン脂質および総胆汁酸濃度を同様に測定した。

(3) 病理組織学的評価

ホルマリン固定した各群の肝臓をパラフィン包埋後、薄切標本を作製して HE 染色を行い、病理組織学的変化の評価を行った。また、HE 染色標本と別に、OCT コンパウンド包埋後、凍結薄切標本を作製して脂肪染色 (oil red O 染色) を行い、脂肪滴蓄積の変化を評価した。

(4) 脂質・糖質代謝関連因子の遺伝子およびタンパク質発現変動の評価

各食餌群の肝臓より total RNA を抽出し

て、control 群をベースとした際の各群間との遺伝子発現変化を、脂質・糖質代謝経路特異的な各種 PCR アレイにより、パスウェイ特異的な遺伝子発現解析を行った。

さらに、これら PCR アレイの結果をもとに、いんげん豆類抽出物摂取により脂質・糖質代謝関連因子の遺伝子発現変動が正常化に向かったものを優先的に、リアルタイム PCR またはウェスタンブロット法を用いて、遺伝子およびタンパク質レベルでの発現変動を精査した。

(5) 血清中インスリンおよびアディポサイトカイン濃度の測定

いんげん豆類抽出物摂取により、血清中のインスリン濃度およびアディポサイトカインであるアディポネクチン、TNF- α およびレプチン濃度を ELISA 法にて測定した。

(6) 各種転写因子およびシグナル伝達因子の活性化の評価

高脂肪食による脂質・糖質代謝因子や炎症反応因子を含むアディポサイトカインの発現変化を制御する転写因子群およびシグナル伝達物質の活性化経路について、核内転写因子の核内移行およびリン酸化タンパク質に関してウェスタンブロット法を用いて評価し、いんげん豆類抽出物が、高脂肪食摂取による脂質・糖質代謝異常発症に対してどこを作用点として改善効果を示すのかを検証した。

4. 研究成果

(1) 体重、組織重量の変化

コントロール食群では、蒸留水飲水群といんげん豆抽出物飲水群間での体重と血清中脂質濃度に関しては、顕著な差は認められなかった。また、高脂肪食群では、コントロー

ル食群に比して、試験開始 2 週間目から体重が顕著に増加し、血中脂質濃度も顕著に増加した。一方で、高脂肪食摂取かつ 1% いんげん豆抽出物飲水群では、試験開始 10 週間目に有意な体重減少が認められた。

肝臓および脂肪組織の相対湿重量は、コントロール食群では、蒸留水飲水群といんげん豆抽出物飲水群間で差は認められなかった。また、高脂肪食群では、コントロール食群に比して、肝臓と脂肪組織の相対湿重量の増加と、肉眼所見で脂肪蓄積が観察された。一方、高脂肪食摂取かつ 1% いんげん豆抽出物飲水群では、肝臓の相対湿重量がコントロール食群と同レベルまで低下し、肉眼所見で脂肪蓄積も軽減していた。また、脂肪組織の相対湿重量も減少傾向にあった。

(2) 血清および肝臓中脂質濃度の変化

血清中の脂質・糖質パラメーター濃度は、コントロール食群に比して高脂肪食群では、いずれも 4 週間目より顕著に増加した。

一方で、高脂肪食摂取かつ 1% いんげん豆抽出物飲水群では、特にコレステロール濃度や空腹時血糖値の改善効果が認められた。

(3) 病理組織学的評価

肝臓のパラフィン包埋切片および凍結組織切片を作成し、HE 染色と脂肪染色を行い、いんげん豆抽出物摂取による病理組織学的な改善効果を検証したところ、高脂肪食摂取により肝臓への過剰な脂肪滴蓄積や個体によっては繊維化まで観察されたのであるが、いんげん豆抽出物摂取により、それらの顕著な改善効果が認められた。

(4) 脂質・糖質代謝関連因子の遺伝子およびタンパク質発現変動の評価

各食餌群の肝臓より抽出した total RNA を

用いて逆転写反応を行って合成した cDNA を鋳型として、PCR アレイを行ったところ、高脂肪食負荷により顕著な遺伝子発現変動が認められた因子のうち、いんげん豆類抽出物摂取により、正常状態にシフトするように改善効果が認められたカテゴリーの遺伝子を見出すことができた。以前の *in vitro* 実験の研究成果で得ていたトリグリセリド合成系酵素群、コレステロール代謝系酵素群に加えて、新たにリポタンパク質代謝関連のタンパク質や受容体が正常状態にシフトするように変動していることが確認できた。

PCR アレイの成績をもとに、リアルタイム PCR およびウェスタンブロッティングにより、発現変動が顕著であった因子について確認試験を行い、合致する成績を得た。

また、血清中のアディポサイトカイン分泌パターンに関しては、アディポネクチンは特に変化はなかったのであるが、高脂肪食負荷により血清中濃度が上昇した TNF- α やレプチン濃度に関しては、いんげん豆抽出物摂取により、正常状態へと改善傾向が認められた。

また血清中インスリン濃度に関しても、いんげん豆類抽出物摂取により、減少傾向が認められたことから、インスリン感受性の改善にも寄与する可能性が示唆された。

(5) 各種転写因子およびシグナル伝達因子の活性化の評価

いんげん豆類抽出物の摂取が、脂質・糖質代謝に関連する核内転写因子やシグナル伝達経路のどこに作用しているのかを検証したところ、核内転写因子では、peroxisome proliferator-activated receptor α/γ および liver X receptors の活性化、また、シグナル伝達因子に関しては、extracellular signal-regulated kinases、Jun-N-terminal kinases および

AMP-activated protein kinase のリン酸化に対して、いんげん豆類抽出物は正常状態に戻すように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0件)

[学会発表](計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾 誠 (SEO MAKOTO)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10406473