

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500990

研究課題名(和文) 妊娠・授乳期の栄養状態による栄養素の吸収・代謝機能への影響と作用機序に関する研究

研究課題名(英文) Study of effects of maternal nutritional status during pregnancy and lactation period on nutrient absorption and metabolism function.

研究代表者

駿河 和仁 (SURUGA, KAZUHITO)

長崎県立大学・看護栄養学部・准教授

研究者番号：70315852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：授乳期中等度の食餌制限を受けた母親ラットの仔は、脂質負荷後の血清トリグリセリド濃度上昇の抑制がみられ、肝臓では脂肪酸の燃焼亢進と合成抑制によるトリグリセリド量の低下がみられた。授乳期中等度の食餌制限や高脂肪食を摂取した母親ラットの仔は、小腸や肝臓のビタミンA吸収・代謝機能が亢進し、肝臓総レチノール量が増加を示した。これらの結果から、妊娠期や授乳期の栄養状態は、脂質のみならずビタミンAの吸収・代謝機能へも影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The offspring from dams fed a moderate caloric restricted diet in lactation period showed lower postprandial serum triglycerides levels and hepatic triglyceride levels. The offspring from dams fed a high-fat diet or caloric restricted diet in pregnancy and lactation period accelerated small intestinal vitamin A absorptive function and its hepatic storage function. These results suggested that nutritional status in pregnancy and/or lactation period influenced not only lipid but also vitamin A absorption and metabolism.

研究分野：栄養生理学

キーワード：妊娠期 授乳期 脂質代謝 ビタミンA吸収・代謝 小腸

1. 研究開始当初の背景

近年日本では、若年女性のやせ傾向が問題視されており、妊娠前・中または授乳期間の栄養摂取などの生活習慣のあり方が、生まれてくる児の将来の生活習慣病の発症リスクにも関連することが、ヒトを対象とした疫学的研究や実験動物を用いた基礎研究から明らかにされつつある。特に胎生期に慢性的な低栄養状態または過栄養状態にさらされた児は、生活習慣病の遺伝素因が後天的に形成され(エピジェネティック)、その後食生活を中心とした不適切な生活習慣が負されると(Catch up growth)、肥満や脂質異常症などの脂質代謝異常や耐糖能の低下などの糖質代謝異常をきたしやすくなる。これらの現象は、DOHaD(Developmental origin of health and disease)として認識され始めており、医学・薬学分野のみならず栄養学分野においても注目されている。これまで、これらの現象については、エネルギー・栄養代謝の中心組織である肝臓や筋肉、脂肪組織などにおける脂質や糖質の代謝機能の変動、すなわち栄養素が体に入って利用される段階での影響や内分泌機能の変動に関する基礎的研究が多く報告されている。しかしながら、食事として摂取された栄養素が最初に処理される小腸での栄養素の消化・吸収機能に対する影響については殆ど報告されていない。また、ビタミンAは、成長発達や免疫機能、代謝機能など多くの生命現象の維持において必須の栄養素であり、他の栄養素の代謝調節にも関与しているが、胎生期や授乳期の栄養状態の違いが成長後のビタミンAの吸収や代謝に対してどのような影響を及ぼすかも報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠期および授乳期における母親ラットの栄養状態の違いが、成長後の仔ラット(雄性)の栄養素(ビタミンA、脂肪酸、糖質)の消化・吸収および代謝機能に及ぼす影響とその分子メカニズムについて検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)研究1 授乳期の栄養条件が仔ラット糖質・脂質およびビタミンA吸収・代謝に及ぼす影響

妊娠19日目のSD(Sprague Dawley)系ラット7匹を2-3匹ずつ3群に分け、出産直前よりコントロール食(C群)、C群の摂取量の60%給餌量のコントロール食(R群)、コントロール食に40%kcal脂肪(ラード)を添加した高脂肪食(H群)をそれぞれ出産後21日目(授乳期間中)まで摂取させた(CおよびH群は自由摂食)。出産後の仔ラット(それぞれCC,RC,HC群)は出生21日目に強制離乳させ、母親ラットから別離後、ステンレスケージにて個別に飼育した。これらの仔ラットは5週齢時まで標準固形飼料(MF)を自由摂食させ

た。その後、AIN93食を19週齢時まで自由摂食させた。飼育期間中の17週および18週齢時に、それぞれ脂肪負荷試験および経口糖負荷試験を行った。経口脂肪負荷試験では、仔ラットに大豆油を体重1kgあたり2mLを胃内に経口投与し、経口糖負荷試験では、仔ラットに体重1kgあたり2gグルコースを胃内に経口投与した。いずれも経口投与後、尾静脈より血液を採取し、血清を調製した。飼育終了後、断頭屠殺し、血清、空腸中央部、肝臓、副睾丸脂肪組織、腎周囲脂肪組織などを採取した。血清グルコース濃度、血清インスリン濃度、および血清トリグリセリド濃度は、市販の測定キットにて測定した。肝臓のトリグリセリド量は、肝臓をホモジナイズ後、メタノール・クロロホルム抽出を行い、血清トリグリセリド同様に測定した。血清および各組織のレチノール量はヘキサソール抽出後、HPLC法にて定量解析した。血清レチノール結合タンパク質(RBP)濃度はELISA法により定量した。さらに空腸中央部、および肝臓から総RNAを抽出後、Realtime RT-PCR法により各種mRNA発現量を測定した。

(2)研究2 妊娠・授乳期の栄養状態がラットの脂質吸収・代謝機能に及ぼす影響

妊娠2日目のSD系雌性ラット9匹を3匹ずつコントロール食自由摂食群(C群)、C群の摂取量の70%給餌量のコントロール食群(R群)、高脂肪食自由摂食群(H群)の3群に分け、それぞれ出産後21日目(授乳期間中)まで摂取させた。出産後の各群の雄性仔ラットを出生21日目に強制離乳後、5週齢時まで標準粉末または固型飼料(MF)を自由摂食させ、5週齢時にさらに2群ずつに分け、AIN-93組成コントロール食(Cc, Rc, Hc群)または高脂肪食(60%kcal脂肪量; Ch群, Rh群, Hh群)を21週齢まで自由摂食させた。飼育期間中の18週齢時に研究1と同様に経口脂肪負荷試験を行った。飼育終了後、断頭屠殺し、血清、空腸、肝臓、精巣、腸間膜脂肪組織、副睾丸脂肪組織および腎周囲脂肪組織などを採取した。各種血清および肝臓の脂質量は研究1と同様の方法で測定を行った。また、空腸および肝臓から総RNAを抽出後、Realtime RT-PCR法により脂質吸収・代謝関連のmRNA発現量を測定した。

4. 研究成果

(1)研究1 授乳期の栄養条件が仔ラット糖質・脂質およびビタミンA吸収・代謝に及ぼす影響

脂質・糖質吸収代謝に及ぼす影響

5週齢から19週齢時にかけての仔ラットの総食餌摂取カロリーおよび体重増加量はCC群に比べRC群で有意に低かったが、HC群では差がみられなかった。また、単位体重あたりの内臓脂肪重量は3群間で有意差はみられなかったが、RC群で低い傾向を示した。脂肪の吸収機能を検討するため、経口脂肪負

荷を行ったところ、負荷後の RC 群の血清トリグリセリド濃度は CC 群に比べ常に低い状態で推移した(図 1)。この要因について小腸の脂質の吸収・代謝とその後の脂肪組織の脂肪の取込みに関わる遺伝子発現量の面から検討を行った。小腸の脂肪酸吸収担体である CD36 と FATP4 mRNA 量は、RC 群と CC 群間でほとんど差は見られなかった。また、小腸における脂肪の再合成(DGAT1)、輸送(MTP)およびβ-酸化(AOX、CPT-1)に関わる遺伝子発現量はいずれも RC 群と CC 群間で差はみられなかった。さらに脂肪負荷後のキロミクロン中の脂肪の分解と脂肪組織への取込みに関与する脂肪組織の LPL と CD36 の mRNA 量も有意な差はみられず、CD36 mRNA 量においてはむしろ CC 群で低い傾向がみられた。これらの結果から、RC 群で見られた脂肪負荷後の血清トリグリセリド濃度の上昇抑制作用は、小腸の脂肪酸の吸収・代謝関連遺伝子および脂肪組織の脂肪取込み関連遺伝子のレベルでは説明ができない。これらの脂質吸収・代謝関連の因子についてさらに筋肉組織も含めたタンパク質レベルでの変動について検討する必要がある。そのほかの検討課題としては、膵リパーゼ活性や分泌量、糞便中の脂肪量測定など脂肪の消化能の面からの検討も必要もある。

次に、肝臓における脂質代謝機能について検討を行ったところ、肝臓のトリグリセリド量は、CC 群に比べ RC 群および HC 群で低い傾向を示した(図 2)。この結果について、肝臓における脂肪酸のβ-酸化および脂肪(酸)合成に関わる遺伝子の発現変動の面から検討した。その結果、肝臓の AOX とその転写調節因子である核内受容体 PPARα の各 mRNA 量は、CC 群に比べ RC 群および HC 群で高い傾向を示した(図 2)。また、脂肪酸およびトリグリセリド合成酵素(FAS および Gpam) およびこれらの転写因子である SREBP-1c の各 mRNA 量は CC 群に比べ RC 群および HC 群で低い傾向を示した(図 3)。これらの結果から、CC 群に比べ RC 群および HC 群の肝臓では、脂肪酸の燃焼系の亢進と合成系の抑制により、肝臓トリグリセリド量が低い傾向を示したと考えられる。しかしながら授乳期におけるこれらの相反する栄養条件(食餌制限および高脂肪食負荷)が肝臓のトリグリセリド量を同じように低下させたことについて、それぞれどのような生理的意味を持つのかは今後の検討課題である。

さらに、糖代謝機能について検討した。CC 群に比べ RC 群の絶食時血清グルコース濃度に差は見られなかったが、絶食時のインスリン濃度が低かったことから、インスリン抵抗性指数(HOMA-IR)も低い傾向を示した(図 4)。さらに、糖負荷後の血清グルコース濃度の変動や空腹の糖質の消化・吸収関連の遺伝子発現量は RC 群で CC 群とほとんど変わらなかったが、血清インスリン濃度の変動は CC 群に比べ RC 群で低い傾向を示した。これらの

結果から、RC 群では標的組織におけるインスリン感受性が高いものと考えられた。

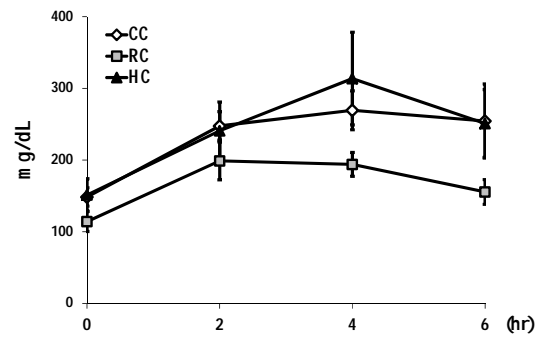


図 1 経口脂質負荷後の血清トリグリセリド濃度

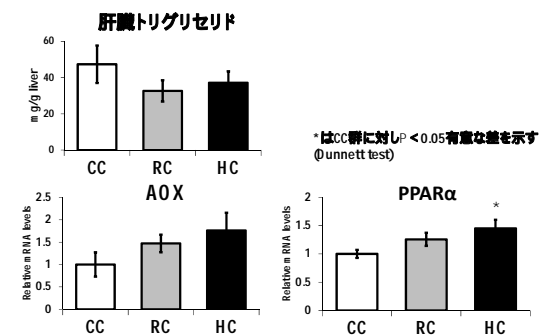


図 2 肝臓トリグリセリド量、肝臓脂肪酸β-酸化関連遺伝子

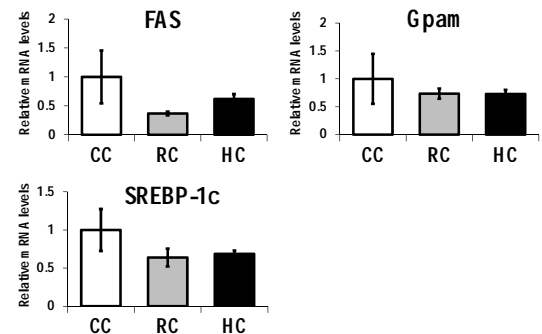


図 3 肝臓脂肪酸合成関連遺伝子

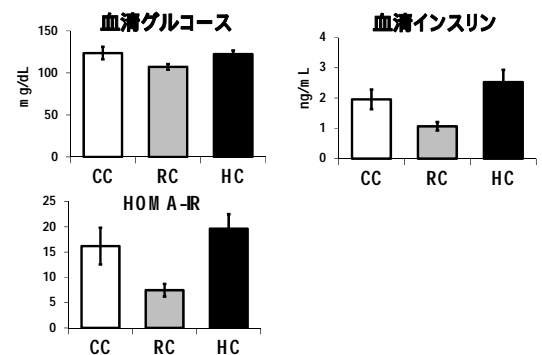


図 4 血清グルコース、インスリン濃度、HOMA-IR

ビタミン A 吸収・代謝に及ぼす影響

19 週齢時の血清レチノール濃度は、各群間で有意な差はなかったが、RC 群でわずかに低い傾向がみられた(図 5)。一方、血中レチノールの輸送にかかわる RBP 濃度も、各群間で有意な差はみられなかったが、RC 群でわずかに低い傾向がみられた(図 5)。血中へのレチノールの分泌が低下したことに伴い、肝臓の遊離レチノール量は RC 群で高い傾向を示した(図 5)。このことから授乳期に母親が食餌制限をした仔ラットでは、成長後、肝臓から末梢組織へのビタミン A の供給能が低下しているものと考えられた。しかしながら、RC 群の肺の総レチノール量は CC 群と差はみられず、精巣では CC 群に比べ RC 群で低い傾向がみられたことから(図 6)、組織による影響の差異があるものと推察される。一方、HC 群では、成長後の血清レチノール濃度、RBP 濃度および肝臓遊離レチノール量が CC 群と比べ差がみられなかった(図 5)。

肝臓総レチノール量は、おもに貯蔵型のレチニルエステル量を反映しているが、RC 群および HC 群の 19 週齢時における肝臓 1 g あたりの総レチノール量は、CC 群に比べ RC 群で有意に高値を示し、HC 群でも高い傾向がみられた(図 5)。この要因について、ビタミン A の腸管吸収および肝臓における代謝に關与する遺伝子の発現量の面から検討した。その結果、RC 群および HC 群の空腸細胞性レチノール結合タンパク質タイプ II(CRBPII) mRNA 量が CC 群に比べわずかながら高い傾向を示した(図 7)。さらに肝臓においては、カイロミクロン由来のビタミン A(レチニルエステル)をレチノールに加水分解する ES4 および ES10 mRNA 量では、肝臓の ES4 mRNA 量は、CC 群に比べて RC 群で有意に高い傾向がみられた(図 8)。また、肝臓の ES10 mRNA 量は、CC 群に比べ RC 群で有意に高値を示し、HC 群でも高い傾向を示したことから(図 8)、レチニルエステルをレチノールに加水分解しやすい状況であるものと考えられる。また、加水分解されたレチノールを星細胞に貯蔵するための再エステル化に關与するレシチン：レチノールアシル転移酵素(LRAT) mRNA 量は、RC 群および HC 群で高い傾向がみられた(図 8)。

以上のことから、RC 群および HC 群の肝臓総レチノール量の増大には、腸管でのビタミン A 吸収・代謝能および肝臓でのビタミン A の再エステル化能がともに遺伝子レベルで亢進していることが関連しているものと考えられた(図 9)。今後は離乳後の仔ラットの食餌条件を変えて、授乳期の栄養条件の違いによるビタミン A 吸収・代謝機能の影響の検討を行っていく必要がある。

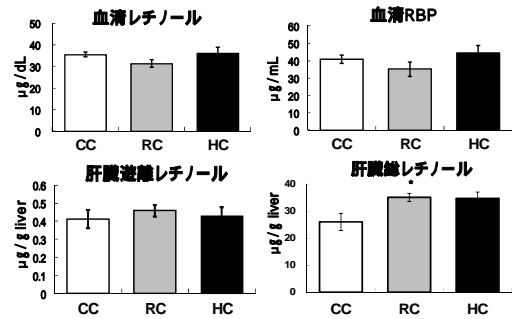


図 5 血清レチノール濃度、血清 RBP 濃度、肝臓遊離・総レチノール量

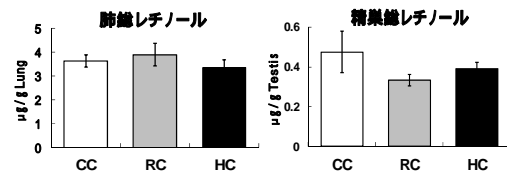


図 6 肺および精巣総レチノール量

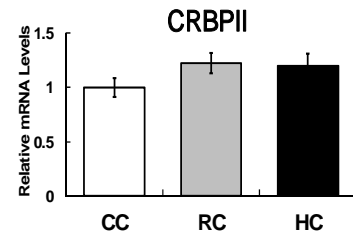


図 7 小腸 CRBP mRNA 発現量

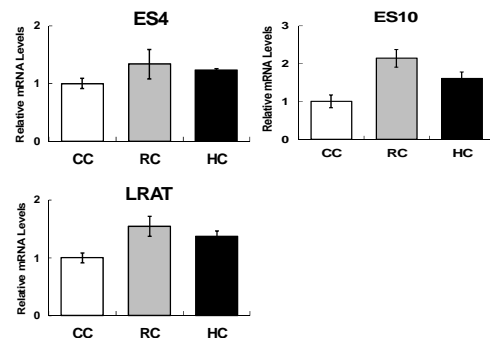


図 8 肝臓 ES4、ES10、LRAT mRNA 発現量

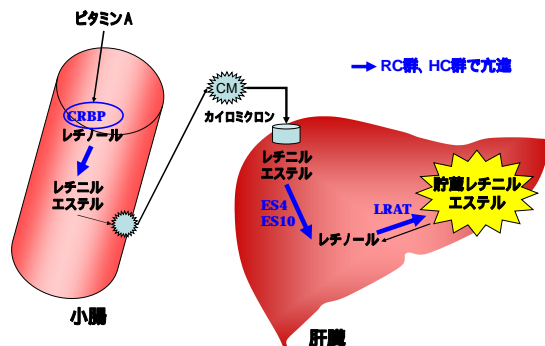


図 9 本研究結果の要約

(2)研究2 妊娠・授乳期の栄養状態がラットの脂質吸収・代謝機能に及ぼす影響

離乳期以降(23日齢以降)150日齢時までの仔ラットの体重は、コントロール食摂取群内ではCc群に対してRc群で低く、Hc群で高いレベルで推移した。高脂肪食摂取群内でも同様であった。一方、同じ期間の食餌摂取量は、一日平均摂取エネルギー量、食餌総摂取エネルギー量とも同一食餌群内およびコントロール食群と高脂肪食群間でも有意な差はみられなかった。150日齢時の各仔ラットの内臓脂肪率(Fig.10; 体重100gあたりの腸間膜、腎周囲および副睾丸脂肪組織の総重量)は、離乳後のコントロール食摂取群内では、Cc群に比べてHc群で有意に高い値を示した。これは研究1-で行った授乳期のみ高脂肪食を摂取させた条件下ではみられなかった現象であったことから、特に妊娠期の母親が高脂肪栄養状態であった場合、その仔ラットは成長後に内臓脂肪を蓄積しやすくなるものと考えられた。しかしながら、離乳後の高脂肪食摂取群内では、内臓脂肪率はCh群とHh群間で有意な差がみられなかった。このことから、妊娠・授乳期に母親が高脂肪食条件下にあった場合の仔ラット(Hc, Hh群)は、離乳後の高脂肪食摂取(Hh群)によるさらなる体脂肪の蓄積が起こりにくい可能性が示唆された。これらの内臓脂肪量の変動の要因について、次に血清中の関連指標の変動から検討を行った。離乳後からコントロール食を摂取した場合、Hc群の空腹時血清トリグリセリド濃度、遊離脂肪酸濃度およびレプチン濃度がCc群よりも有意に高い値を示した(Fig.11)。加えて経口脂肪負荷後の血清トリグリセリド濃度もHc群が常に高い値で推移しており(Fig.12)、これらの結果がHc群の内臓脂肪率の増大に関連しているものと考えられた。一方、離乳後から高脂肪食を摂取した場合、Hh群の血清トリグリセリドおよび遊離脂肪酸、さらに経口脂肪負荷後の血清トリグリセリド濃度の変動はいずれもCh群と差がみられなかったことから、これら結果がCh群とHh群間の内臓脂肪率に差がみられなかった要因と考えられた。

肝臓のトリグリセリド量(Fig.13)は、離乳後からコントロール食を摂取した場合Cc群に対しHc群で差はみられなかったが、高脂肪食群内では、Ch群に対してHh群で有意に高値を示した。この結果から、離乳後に仔ラットが高脂肪食摂取した場合の肝臓トリグリセリド量の蓄積量は、妊娠期から授乳期の母親ラットの脂肪摂取状況によって影響を受ける可能性が示唆された。

本研究から、妊娠・授乳期の栄養状態、特に高脂肪食の摂取状況は成長後の仔ラットの体脂肪や肝臓トリグリセリド量の蓄積量に影響を与えることが示された。

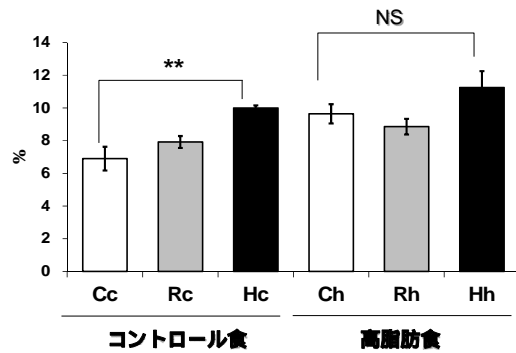


図10 150日齢仔ラットの内臓脂肪率

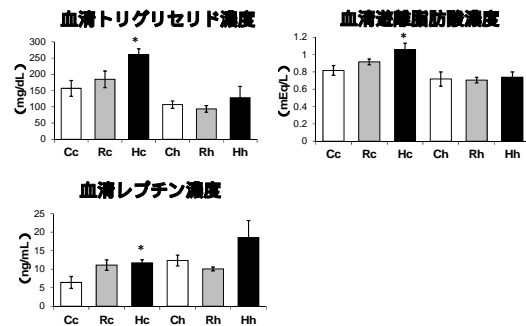


図11 150日齢仔ラットの血清脂質、レプチン濃度

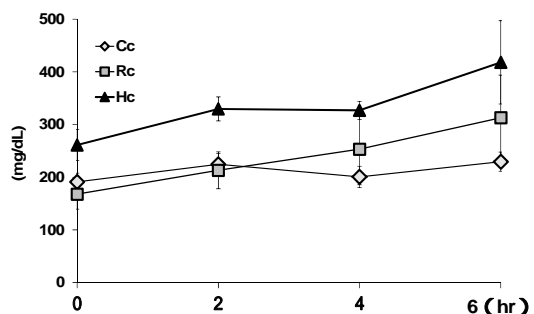


図12 経口脂肪負荷後の血清トリグリセリド濃度(132日齢)

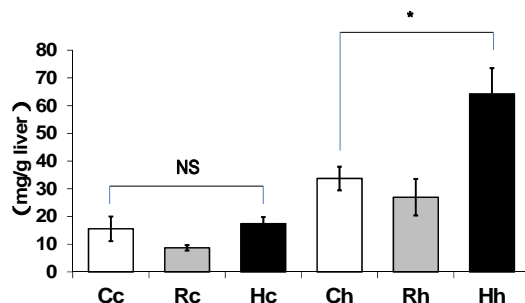


図13 150日齢仔ラットの内臓トリグリセリド量

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7件)

Yamaguchi N, Sunto A, Goda T, Suruga K.: Competitive regulation of human intestinal β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1) gene expression by hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 α and HNF-4 α . *Life Sci.*(査読あり), 119(1-2):34-39,2014.(doi: 10.1016/j.lfs.2014.10.009.)

高瀬幸子、駿河和仁、寺島健彦、清水正則.: プロビタミン A からビタミン A への転換と β -carotene 15,15' monooxygenase の遺伝子多型. *ビタミン*(査読なし),87(10), 557-563, 2013.

Mochizuki H, Mochizuki K, Suruga K. Igarashi M, Takase S, Goda T.: Induction of the BCMO1 gene during the suckling-weaning transition in rats is associated with histone H3 K4 methylation and subsequent coactivator binding and histone H3 acetylation to the gene. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo),(査読あり).58(5):319-326, 2012.
(https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv/58/5/58_319/article)

〔学会発表〕(計8件)

駿河和仁、東坂美奈子、山下あすか、安倍絵里、山口範晃: 授乳期の食餌制限が仔ラットのビタミン A 代謝機能に及ぼす影響. 第68回日本栄養・食糧学会大会(北海道)、2014年、6月1日.

駿河和仁: β -カロテン開裂酵素の発現調節に関する研究. 第341回脂溶性ビタミン総合研究委員会(奈良)紹介講演、2013年、12月6日.

駿河和仁、隅亜梨紗、野口紗知子、山口範晃: メタボリック症候群モデル OLETF ラットにおけるビタミン A 代謝の変動. 第66回日本栄養食糧学会大会(仙台)、2012年、5月19日.

〔その他〕

ホームページ等

http://sun.ac.jp/research/researcher/researcher_detail/?uid=suruga

6. 研究組織

(1)研究代表者

駿河 和仁 (SURUGA KAZUHITO)
長崎県立大学・看護栄養学部・准教授
研究者番号：70315852

(2)研究分担者

山口 範晃 (YAMAGUCHI NORIAKI)
長崎県立大学・看護栄養学部・助教