

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：22702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700836

研究課題名(和文)妊娠糖尿病の母児の予後と植物ポリフェノールによる保護効果

研究課題名(英文)Effect of plant polyphenols on the physiological consequences of gestational diabetes induced by excess fructose intake

研究代表者

向井 友花 (Mukai, Yuuka)

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：60331211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：フルクトース(Fru)過剰摂取により妊娠糖尿病様症状を呈した母ラットの授乳期にメリンジョ抽出物(MeE)を投与してサーチュインやAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)の発現や活性に及ぼす影響を検討した結果、Fru過剰摂取の母仔の肝でAMPKシグナル経路を介した糖代謝異常が生じたが、MeEは成長後の雌仔の肝AMPKを活性化した。妊娠期の肝臓をモデルとした培養肝細胞において、FruはAMPKの下流因子アセチルCoAカルボキシラーゼの活性を低下させて脂肪酸合成を抑制した。以上の結果から、妊娠糖尿病の児の糖代謝異常を植物ポリフェノールが肝AMPK活性化を介して改善する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Pregnant rats present with gestational diabetes-like symptoms induced by excess fructose intake were received melinjo extract (MeE) containing diet during lactation. Expression and/or phosphorylation of sirtuin and AMP-activated protein kinase (AMPK), which play a role in carbohydrate and lipid metabolism, were analyzed. Excessively high fructose intake induced hyperglycemia in the dams, fetuses and female offspring. Young female offspring from fructose-fed dams also showed the modulated hepatic and hypothalamic AMPK signaling pathways, while MeE administration modulated the hepatic AMPK activity. In in vitro study, fructose enhanced ACC phosphorylation in placental lactogen-stimulated human hepatoma cells, suggesting the reduced fatty acid synthesis by decreasing ACC activity, resulted in impairing lipid metabolism in the maternal liver. In conclusion, we found the beneficial effect of plant polyphenol on the glucose metabolism via hepatic AMPK in the offspring of gestational diabetes.

研究分野：複合領域(生活科学・食生活学)

 キーワード：妊娠糖尿病 フルクトース AMP活性化プロテインキナーゼ サーチュイン 植物ポリフェノール ラット  
HepG2 糖脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠糖尿病は、「妊娠中にはじめて発見または発症した糖尿病に至っていない糖代謝異常」をいう<sup>1)</sup>。加齢はインスリン作用障害を促進する糖代謝異常のリスクファクターであり、35歳以上の女性の場合、妊娠糖尿病の発症頻度は25歳未満の約8倍にもなる<sup>2)</sup>。近年、日本における晩産化は増加の一途をたどっており、今後さらに妊娠糖尿病が増加することは必至である。さらに妊娠糖尿病は、産後の女性の将来のみならず、その児の2型糖尿病の発症にもつながることが示されている<sup>2)</sup>。したがって、妊娠糖尿病の予防改善は次世代を見据えた健康管理の点からも重要な課題であるといえる。

長寿遺伝子として注目されているサーチュイン(Sirtuin)は、様々なタンパク質の脱アセチル化に関わる酵素ファミリーであり、インスリン標的臓器(肝臓、白色脂肪組織、骨格筋)におけるインスリンシグナル伝達系を制御して2型糖尿病から個体を保護する<sup>3)</sup>。また、レスベラトロール(赤ワインなどの成分)などいくつかの植物ポリフェノールはサーチュイン活性化物質として知られており、2型糖尿病予防改善に有効である<sup>3)</sup>。

AMP 活性化プロテインキナーゼ(AMP-activated protein kinase: AMPK)は、細胞内のエネルギーレベル(AMP/ATP比)の低下や様々なサイトカインにより活性化し、糖代謝や脂質代謝を調節する役割を持つ。例えばAMPKが活性化すると解糖系や脂肪酸酸化が促進し、一方で糖新生や脂肪合成が抑制されることが知られている<sup>4)</sup>。

しかしながら、これまで妊娠糖尿病の母体臓器におけるサーチュインやAMPKの役割はほとんど分かっていない。妊娠期は妊娠ホルモンの影響により生理的なインスリン抵抗性が惹起されているが、妊娠糖尿病においてはさらにインスリン抵抗性が亢進している<sup>5)</sup>。したがって、サーチュインやAMPKを中心としたインスリンシグナル伝達系を制御することは、妊娠糖尿病における糖代謝異常を改善し、ひいては児の将来の2型糖尿病発症を予防するのに役立つことが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、妊娠糖尿病の母児におけるサーチュインやAMPKの生理機能を解明し、植物ポリフェノールによる保護効果を見出すことを目的として、以下のことを行った。

1) 過剰なフルクトースの摂取はインスリン抵抗性を引き起こす<sup>5)</sup>ことが知られているため、妊娠ラットにフルクトースを過剰摂取させて妊娠糖尿病モデルラットを作製し、この母体、胎児および仔の肝臓のサーチュインファミリーのひとつである

Sirt1 および AMPK の発現や活性を解析した。

- 2) メリンジョ(*Gunetum Gneon.L*)は東南アジア、特にインドネシアで広く栽培され、その種子はポリフェノールを多く含み、抗酸化作用等を有することが報告されている植物である<sup>6)</sup>。そこで妊娠糖尿病モデルラットの授乳期にメリンジョ抽出物(MeE)を投与し、仔ラットの糖代謝に及ぼす影響を検討した。
- 3) 培養肝細胞に胎盤性ラクトゲン(PL)を添加して妊娠期の肝臓をモデルとした系を用いて、フルクトース過剰摂取がAMPKを中心とした脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 妊娠期フルクトース過剰摂取による妊娠糖尿病モデル動物を用いた検討

妊娠したWistar系ラットを2群に分け、妊娠を確認した日から出産まで対照群(C群、n=11)には蒸留水を、フルクトース群(F群、n=9)には10%(w/v)D-フルクトース溶液を自由摂取させた。飼料は標準動物飼料を与えた。妊娠21日目に一部の妊娠ラットから採血し、胎児および胎盤、臓器を摘出した。また、一腹あたり4匹ずつの胎児から採血と臓器摘出を行った。残りの妊娠ラットは自然出産及び母乳哺育させ、生後21日目(3週齢)に雌雄仔ラットから採血と臓器摘出を行った。授乳期は蒸留水を自由摂取させた。母ラット、胎児および3週齢雌雄仔ラットのそれぞれについて血液生化学検査を行った。肝臓および視床下部におけるSirt1およびAMPKタンパク質の発現とリン酸化をウェスタンブロット法により解析した。肝糖新生の律速酵素である肝グルコース-6-ホスファターゼの活性を定法に従い測定した。

(2) 妊娠糖尿病モデル母ラットから生まれた仔の授乳期メリンジョ抽出物摂取の影響

妊娠したWistar系ラットを2群に分け、妊娠を確認した日から出産まで対照群には蒸留水を、フルクトース群には10%(w/v)D-フルクトース溶液を自由摂取させた。飼料は標準動物飼料を与えた。自然出産した後の授乳期はフルクトース群をさらに2群に分け、離乳時まで通常食(FC群)または0.1%MeE含有食(FM群)を与えた。対照群には通常食を与えた(CC群)。離乳時(3週齢)に仔ラットの一部を解剖し、残りの仔ラットは通常食を与えて17週齢まで飼育して解剖した。解剖時には血漿および臓器を採取し、血液生化学検査を行った。肝臓に蓄積したトリグリセリドおよび総コレステロール量を定法に従い定量した。視床下部および肝臓における

AMPK タンパク質の発現とリン酸化をウェスタンブロット法により解析した。

### (3) 培養細胞を用いた妊娠期フルクトース過剰摂取の影響の検討

妊娠期の肝脂質代謝におけるフルクトース過剰摂取の影響を調べるため、ヒト肝癌由来細胞 (HepG2) を用いた検討を行った。前培養した HepG2 に 0-10.0 mM の D-フルクトースを添加して培養した。また、ヒト妊娠中期における平均血中濃度に調整した胎盤性ラクトゲン (PL) を同時添加し、同様に 0-10.0 mM の D-フルクトースを添加して培養した。培養 48 時間後の細胞を回収し、ウェスタンブロット法により AMPK、リン酸化 AMPK、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)、リン酸化 ACC、 $\alpha$ -アクチンのタンパク量を調べ、AMPK と ACC の発現及び活性を評価した。さらに細胞内トリグリセリド (TG) 量を定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 妊娠期フルクトース過剰摂取による妊娠糖尿病モデル動物を用いた検討

F 群におけるフルクトース由来のエネルギー摂取量は総エネルギー量の 16.2%であったが、F 群および C 群の母ラットの体重に有意差は認められなかった。妊娠 21 日目 (妊娠末期) の母ラットの血漿グルコースおよびインスリン値は、F 群は C 群より有意に高値であり、妊娠糖尿病様症状を呈した。この時、肝臓の Sirt1 タンパク質の発現量は有意に減少していた (図 1)。

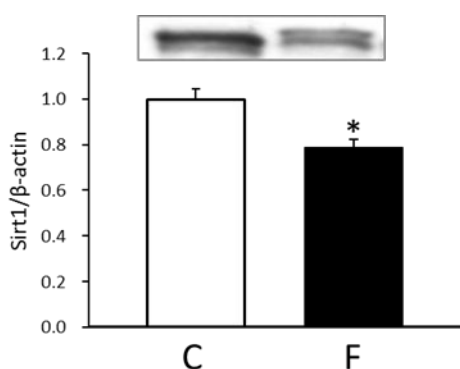


図 1 妊娠期にフルクトースを過剰摂取した母ラットの肝 Sirt1 発現

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6), \*p < 0.05 vs C 群, C: 対照群; F: フルクトース摂取群

妊娠 21 日目 (妊娠末期) の胎児については、胎児数、平均胎児重量、胎盤数および平均胎盤重量は両群間で有意な差は認められなかった。血漿インスリン値に有意な差は無

かったものの、F 群胎児の血漿グルコース値は、C 群と比較して有意に高値であった。母体の妊娠糖尿病は、胎児の血糖値にも影響を及ぼすことが示された。

出生した仔ラットについては、体重は雌雄とも母ラットのフルクトース摂取による増加は認められなかった。しかしながら、F 群の雌性仔ラットは 3 週齢時に血糖値およびインスリン値の上昇を示した。肝臓での Sirt1 発現量 (図 2) および AMPK のリン酸化 (図 3) は有意に減少していた。一方、視床下部での AMPK リン酸化は有意に増加していた (図 4)。肝糖新生の律速酵素である G6Pase の活性は有意に高く (図 5)、糖新生が亢進していることが示唆された。一方、雄性仔ラットにおいてはこれらの変化は認められなかった。

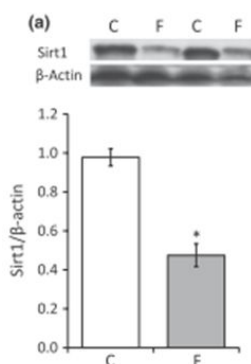


図 2 3 週齢雌性仔ラットの肝 Sirt1 発現<sup>7)</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n=8), \*p < 0.05 vs C 群, C: 対照群; F: フルクトース摂取群

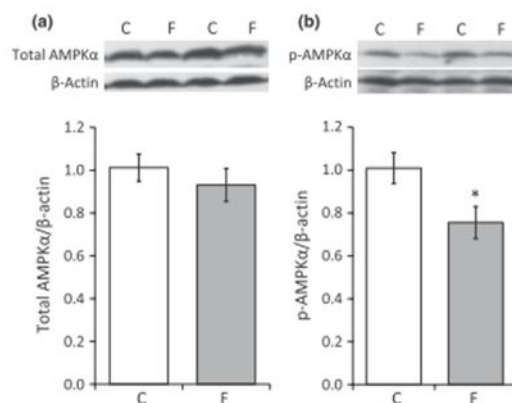


図 3 3 週齢雌性仔ラットの肝 AMPK(a)およびリン酸化 AMPK(b)<sup>7)</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n=8), \*p < 0.05 vs C 群, C: 対照群; F: フルクトース摂取群

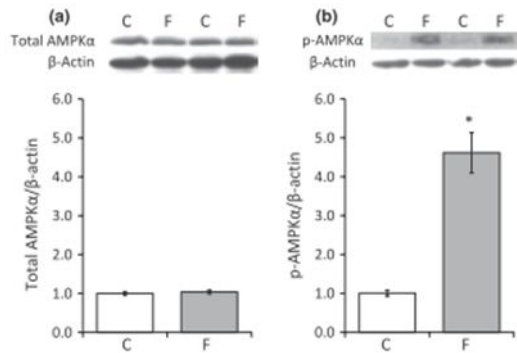


図4 3週齢雌性仔ラットの視床下部 AMPK(a)およびリン酸化 AMPK(b)<sup>7)</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n=8), \*p < 0.05 vs C 群, C: 対照群; F: フルクトース摂取群

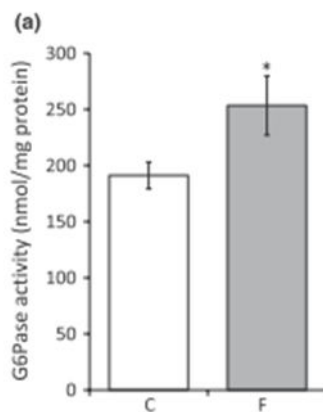


図5 3週齢雌性仔ラットの肝 G6Pase 活性<sup>7)</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n=8), \*p < 0.05 vs C 群, C: 対照群; F: フルクトース摂取群

以上の結果から、フルクトースを過剰摂取して妊娠糖尿病様症状を呈した母体は肝 Sirt1 発現が減少し、胎児の血糖値が上昇すること、また出生した雌性仔において、3週齢で肝 Sirt1-AMPK シグナル経路を介した糖代謝異常が生じることが示唆された。

## (2) 妊娠糖尿病モデル母ラットから生まれた仔の授乳期メリンジョ抽出物摂取の影響

出生仔の体重は、乳児期から離乳後 17 週齢までの期間を通して、雌雄とも 3 群間に有意な差は認められなかった。

3 週齢では、血漿グルコース値は雌雄とも全ての群に有意差はなかったが、FM 群の雄性仔ラットは FC 群と比較してやや減少傾向であった。また FM 群の雄性仔ラットの血漿トリグリセリドは FC 群と比較して高値傾向がみられた。肝臓中トリグリセリド量は、FM 群の雄性仔ラットが FC 群と比較して有意に高値であった。雌性仔ラットでも高値の傾向がみられた。肝臓中の総コレステロール量は雌雄とも全ての群に差は認められなかった。肝 AMPK のリン酸化は、雄性および雌性仔ラットの FM 群が、CC 群および FC 群と比較して有意に亢進していた。ある種のポリフ

ェノールは AMPK をリン酸化、すなわち活性化させることが知られている。よって、MeE を摂取した母ラットの母乳に含まれるポリフェノールが仔の肝 AMPK を活性化したことが推察された。

17 週齢では、FC 群の雌性仔ラットの血漿グルコースは CC 群より有意に高値であったが、FM 群は FC 群と比較して有意に低値であった。肝 AMPK のリン酸化は、FM 群が CC 群および FC 群と比較して有意に亢進していた。一方、雌性仔ラットにおいてはこれらの変化は認められなかった。

以上の結果から、フルクトースを過剰摂取して妊娠糖尿病様症状を呈し、授乳期に MeE を摂取した母ラットから出生した雌性仔ラットは、離乳直後から成長後にかけて、糖代謝の中心となる肝 AMPK 活性化を介して血糖上昇が抑制されることが示唆された。離乳から 17 週齢までは全ての群に通常食を与えたにも関わらず肝 AMPK 活性の亢進が維持された詳細な分子機構は今後さらに検討する必要があるが、少なくとも、授乳期に摂取するメリンジョ由来ポリフェノールは子の将来の糖代謝を改善する可能性が示された。

## (3) 培養細胞を用いた妊娠期フルクトース過剰摂取の影響の検討

HepG2 にフルクトースのみを 0-10.0 mM 添加した結果、すべての濃度において AMPK と ACC の発現およびリン酸化に変化は認められなかった。一方、PL を同時添加した場合、フルクトースにより AMPK の発現には変化がみられなかったものの、AMPK のリン酸化は 1.0 および 10.0 mM のフルクトースで刺激された細胞において亢進する傾向がみられた。ACC についても、発現に変化はみられなかったが、リン酸化は濃度依存的に亢進し、1.0 および 10.0 mM のフルクトースで刺激された細胞においては有意に高値を示した。細胞内 TG 量は有意に減少した。以上の結果から、PL 存在下では HepG2 のフルクトースに対する感受性が高まり、ACC のリン酸化が促進されて脂質合成が低下することが明らかになった。このことは、妊娠期のフルクトース過剰摂取は母体の肝脂質代謝に障害をもたらすことを示唆している。

また、高血糖状態において植物ポリフェノールが肝脂質代謝を改善する可能性を探るため、生理的濃度 (5.5 mM) あるいは高濃度 (30 mM) のグルコースを含有する培地で培養した HepG2 に 0-10 μg/ml の赤タマネギ由来ポリフェノールを同時添加して培養し同様に評価したところ、高グルコースにより低下した AMPK リン酸化を濃度依的に上昇させることが見出された。このポリフェノールが、妊娠期の母体肝の糖・脂質代謝異常を改善し得るか否かについては、さらなる検討が必要である。

以上の研究成果から、妊娠期のフルクトース過剰摂取は妊娠糖尿病様症状を誘導し、母体のみならず出生した子の肝におけるSirt1-AMPKシグナル経路を介した糖代謝異常を惹起すること、またある種の植物ポリフェノールは肝 AMPK を活性化して糖・脂質代謝を改善する可能性が示された。

<引用文献>

- 1) 妊娠糖尿病診断基準検討委員会 妊娠糖尿病診断基準変更に関する委員会報告 糖尿病と妊娠 10: 21, 2010.
- 2) 杉山隆ら . 妊娠糖尿病 . *Fetal Neonatal Med* 3(1): 24-29, 2011.
- 3) Imai S, *et al.* Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci* 31(5): 212-20, 2010.
- 4) 箕越靖彦 . AMPK と脳におけるエネルギー代謝調節 . 医学のあゆみ 237(6):677-682, 2011.
- 5) Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: Normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 71: 1256S-61S, 2000.
- 6) Chen, *et al.* Effects of resveratrol on the amelioration of insulin resistance in KKAY mice. *Can J Physiol Pharmacol* 90(2): 237-42, 2012.
- 7) Mukai Y, *et al.* Maternal fructose intake during pregnancy modulates hepatic and hypothalamic AMP-activated protein kinase signaling in gender-specific manner in offspring. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41: 331-337, 2014.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Mukai Y, Ozaki H, Serita Y, Sato S. (2014) Maternal fructose intake during pregnancy modulates hepatic and hypothalamic AMP-activated protein kinase signaling in gender-specific manner in offspring. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 41, 331-337. 査読有 DOI: 10.1111/1440-1681.12225

Mukai Y, Kumazawa M, Sato S. (2013) Fructose intake during pregnancy up-regulates the expression of maternal and fetal hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c in rats. *Endocrine* 44, 79-86. 査読有 DOI:

10.1007/s12020-012-9815-8

Mukai Y, Sun Y, Sato S. (2013) Azuki bean polyphenols intake during lactation up-regulate AMPK in male rat offspring exposed to fetal malnutrition. *Nutrition* 29, 291-297. 査読有 DOI: 10.1016/j.nut.2012.06.005

Sato S, Mukai Y, Hamaya M, Sun Y, Kurasaki M. (2013) Long-term effect of green tea extract during lactation on AMPK expression in rat offspring exposed to fetal malnutrition. *Nutrition* 29, 1152-1158. 査読有 DOI: 10.1016/j.nut.2013.03.021.

Sato S, Mukai Y, Saito T. (2013) Quercetin intake during lactation modulates the AMP-activated protein kinase pathway in the livers of adult male rat offspring programmed by maternal protein restriction. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24, 118-123. 査読有 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.03.07

Sun Y, Mukai Y, Sato S, Tanaka M, Saito T, Kurasaki M. (2013) Green tea extract increases mRNA expression of enzymes which influence epigenetic marks in newborn female offspring from undernourished pregnant mother. *PLOS ONE* 8, e74559. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0074559

Mukai Y, Sato S. (2012) 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. 査読有 DOI: 10.1016/j.preghyp.2011.10.002

Sato S, Mukai Y, Tokuoka Y, Mikame K, Funaoka M, Fujita S. (2012) Effect of lignin-derived lignophenols on hepatic lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34(2), 228-234. 査読有 DOI: 10.1016/j.etap.2012.04.005

[学会発表](計16件)

Mukai Y, Miyamoto Y, Sato S. Effect of fructose on the phosphorylation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase in HepG2 cells stimulated with placental lactogen.

12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, May 15, 2015, Yokohama (Japan)

Sato S, Kataoka S, Kurasaki M, Mukai Y. Effects of azuki bean (*Vigna angularis*) extract on AMP-activated protein kinase phosphorylation in HepG2 cells and liver of diabetic rats. 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, May 15, 2015, Yokohama (Japan)

Kataoka S, Takebayashi M, Kudo M, Mukai Y, Sato S. Intake of Melinjo (*Gnetum gnemon*) seed extract during lactation stimulates hepatic and hypothalamic AMPK in offspring of fructose-fed pregnant rats. 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, May 15, 2015, Yokohama (Japan)

片岡沙織, 向井友花, 竹林美穂子, 工藤恵, 佐藤伸. メリンジョ抽出物が妊娠期フルクトース過剰摂取ラットから産まれた仔の視床下部 AMPK の発現及び活性に及ぼす影響. 2014 年度青森県保健医療福祉研究発表会. 2014 年 12 月 20 日 (青森)

向井友花, 佐藤伸. 妊娠中の母体の栄養状態が児に及ぼす影響 ~ モデル動物を用いた検討 ~. 平成 26 年度神奈川県立保健福祉大学研究発表会. 2014 年 9 月 24 日 (神奈川・横須賀)

片岡沙織, 向井友花, 佐藤伸. 糖尿病モデルラット肝臓中の AMP 活性化プロテインキナーゼのリン酸化に及ぼす小豆ポリフェノールの影響. 第 61 回日本栄養改善学会学術総会. 2014 年 8 月 20 ~ 22 日 (神奈川・横浜)

片岡沙織, 竹林美穂子, 向井友花, 佐藤伸. 胎生期に過剰フルクトースに曝された仔ラットの視床下部および肝の AMPK 活性に及ぼすメリンジョ抽出物の影響. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会. 2014 年 5 月 30 日 ~ 6 月 1 日 (北海道・江別)

工藤恵, 片岡沙織, 向井友花, 佐藤伸. 胎生期に過剰なフルクトースに曝された仔ラットの成長後の血圧及び一酸化窒素合成酵素に及ぼすメリンジョ抽出物の影響. 青森県保健医療福祉研究発表会・日本ヒューマンケア科学学会第 6 回学術集会合同集会. 2013 年 12 月 21 日 (青森)

竹林美穂子, 片岡沙織, 向井友花, 佐藤伸. 胎生期フルクトース過剰摂取に曝された仔ラットの授乳期メリンジョ抽出物摂取による肝中 AMP 活性化プロテインキナーゼ活性への影響. 青森県保健医療福祉研

究発表会・日本ヒューマンケア科学学会第 6 回学術集会合同集会. 2013 年 12 月 21 日 (青森)

竹林美穂子, 工藤恵, 向井友花, 片岡沙織, 佐藤伸. 胎生期フルクトース過剰摂取に曝された仔ラットの授乳期メリンジョ抽出物摂取による糖・脂質代謝への影響. 第 60 回日本栄養改善学会学術総会. 2013 年 9 月 12 ~ 14 日 (兵庫・神戸)

向井友花, 尾崎遥, 芹田侑子, 佐藤伸. 妊娠期のフルクトース過剰摂取は雌性仔ラットの肝 AMPK 活性を抑制する. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会. 2013 年 5 月 24 ~ 26 日 (愛知・名古屋)

Sato S, Mukai Y, Kurasaki M. Impacts of treatment with polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats on vascular oxidative stress and inflammation in rats with hypertension. 13<sup>th</sup> International Conference of FFC. May 11, 2013, Kyoto (Japan).

向井友花, 熊澤麻耶, 佐藤伸. 妊娠期のフルクトース摂取が胎児肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響. 第 66 回日本栄養・食糧学会大会. 2012 年 5 月 19 日 (仙台)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向井友花 (MUKAI, Yuuka)

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・栄養学科・准教授

研究者番号: 60331211