

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：21102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12358

研究課題名(和文) 発育初期に摂取する食成分による次世代の肥満抑制効果の評価とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Effects of green tea extract intake during lactation on the obesity-related metabolism in adult rat offspring predisposed by maternal nutritional status

研究代表者

片岡 沙織 (KATAOKA, Saori)

青森県立保健大学・健康科学部・助手

研究者番号：30712343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：茶カテキン類は脂質異常症を改善することが知られている。本研究では授乳期に摂取する緑茶抽出物(GTE)の生理的役割を明らかにするために、妊娠期及び授乳期に高脂肪食を与えた母ラットの授乳期にGTEを摂取させ、離乳後も高脂肪食で飼育した雌性仔ラットの脂肪組織と腎臓に及ぼす影響を検討した。授乳期に摂取したGTEは、成長後、高脂肪食を負荷した雌性仔ラットの腎臓の線維化ならびに脂肪組織や腎臓のマクロファージの浸潤を軽減する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The fetal and neonatal environments are known to be associated with the subsequent development of diseases as adults. We investigated whether green tea extract (GTE) intake during lactation affects inflammation in adipose tissue and kidneys of the high-fat diet-fed adult offspring from dams fed a high fat diet during pregnancy and lactation. GTE intake during lactation attenuated the expanded tubulointerstitial fibrosis in the kidneys and suppressed macrophage infiltration in the kidneys and adipose tissue of high-fat diet-fed adult offspring programmed by maternal intake high fat diet.

研究分野：食生活学

キーワード：妊娠期・授乳期過栄養 肥満 脂質代謝 腎障害 緑茶抽出物

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠母体の肥満は、成長後の児の肥満発症のリスクを増加させることがわかってきた。胎児や新生児の臓器が、過栄養に対してエピジェネティックな反応を介して適応し、その適応が生涯にわたって影響するためという。しかし、その予防改善に関する知見はほとんどない。私たちは、胎生期に過剰の果糖に曝された仔ラットの乳児期のみ、ある種のポリフェノールを与えると、成長後においても糖・脂質代謝を制御する AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性が上昇していることを見出し、ある種の食成分は、生涯にわたって脂質代謝に影響を及ぼすのではないかと推測した。

本研究では、過栄養に曝された仔ラットの乳児期にポリフェノールを与え、成長後の仔ラットの肥満発症や進行に及ぼす影響を検討することとした。

### 2. 研究の目的

私たちは、乳児期に摂取するポリフェノールが、成長後の肥満発症を制御するならば、肥満予防の新しいアプローチになるのではないかと考え、本研究を企画した。本研究では、授乳期に摂取する緑茶抽出物 (Green tea extract; GTE) の生理的役割を明らかにするために、妊娠期及び授乳期に高脂肪食を与えた母ラットの授乳期に GTE を摂取させ、離乳後も高脂肪食で飼育した雌性仔ラットを用いて脂肪組織と腎臓に及ぼす影響を検討した。

妊娠期や授乳期において過栄養に曝されると、成長後に肥満が高率に発症することが知られている。また、肥満の脂肪組織では炎症細胞が浸潤して炎症性のアディポサイトカイン産生が亢進するという。一般に、茶カテキン類は抗肥満作用を有するという報告があるが、胎生期・乳児期に過栄養に曝された仔の成長後の脂肪組織に及ぼす茶カテキン類の影響に関する知見は少ない。

また肥満や脂質異常症は慢性腎臓病の危険リスクの一つといわれている。一般に、茶カテキン類は脂質異常症を改善するというが、胎生期・乳児期に過栄養に曝され、さらに離乳後に高脂肪食を摂取した子の腎障害に及ぼす茶カテキン類の影響に関する知見は少ない。

妊娠期・授乳期に高脂肪食を負荷した母ラットの授乳期に緑茶抽出物 (GTE) を摂取させ、さらに離乳後、高脂肪食を負荷した雌性仔ラットの脂肪組織での炎症細胞の浸潤及び腎障害に及ぼす GTE の影響を検討した。

### 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。

Wistar 系雌性ラットの妊娠期に、通常食 (標準動物飼料) (C 群) あるいは 45% 脂肪食 (F 群) を与えた。出産日に F 群を 4 つに分け、

0% (FF 群) 及び 0.24% (FG 群) の GTE 含有 45%F 食を授乳期のみ摂取させた。さらに離乳後 12 週齢までに通常食あるいは 45%F 食を与えた。すなわち、FF-C、FG-C、FF-F 及び FG-F 群の 4 群である。C 群には、授乳期及び屠殺時の 12 週齢まで通常食を与えた (CC-C 群)。試験期間中に体重及び摂餌量を測定した。12 週齢に腎周囲脂肪組織重量及び生殖器周囲脂肪組織重量を測定し、血漿中のグルコースやトリグリセリド濃度を測定した。脂肪組織の一部を化学固定し、薄切し、免疫染色を施して炎症細胞の一つである CD68/ED1 陽性マクロファージ数を計測した。

また腎臓も採取し、血漿中のグルコース、クレアチニン及び尿素窒素濃度を測定した。腎臓の一部を化学固定して薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色及びコラーゲン線維を染めるシリウスレッド染色を施し、画像解析ソフトを用いて線維化面積率を算出した。さらに免疫染色を施して炎症細胞の一つである CD68/ED1 陽性マクロファージ数を計測した。また、一部をホモジネイトして、炎症の指標の一つであるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) タンパク質の発現量をウエスタンブロット法にて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 妊娠期及び授乳期の体重の変化

妊娠期の母ラットの体重は、C 群と F 群の間に有意な差は認められなかった。乳児期ならびに離乳後 12 週齢時の雌性仔ラットの体重は、各群間に有意な差は認められなかった。

#### (2) 離乳後の体重の変化

体重は離乳後に 45%F 食を与えた FF-F 群及び FG-F 群で高い傾向を示したが、いずれの群においても有意な差はみられなかった。

#### (3) 脂肪組織についての結果及び考察

雌性仔ラットの相対腎周囲脂肪組織重量及び生殖器周囲脂肪組織重量に及ぼす GTE の影響

FG-C 群の相対腎周囲脂肪組織重量は FF-C 群に比べて有意に減少したが、FF-F 群と FG-F 群では有意な差が見られなかった。

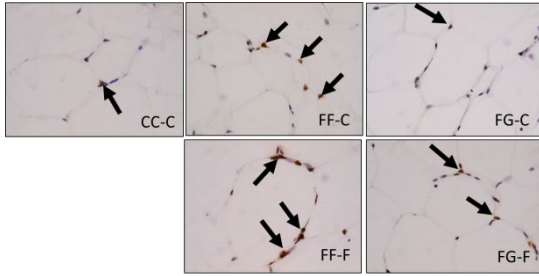
#### 血液生化学検査値

血漿中グルコース濃度および TG は、各群間に有意な差は認められなかった。

生殖器脂肪組織中のマクロファージ数に及ぼす GTE の影響

FG-C 群の生殖器周囲脂肪組織重量中のマクロファージ数は FF-C 群と比べて有意に減少したが、FF-F 群と FG-F 群では有意な差は見られなかった。授乳期に摂取した GTE は、少なくとも、相対脂肪組織重量の増加や脂肪組織中のマクロファージの浸潤を抑制するが、離乳後に高脂肪食を負荷した群では抑制しない可能性が示唆された。

(A)



(B)

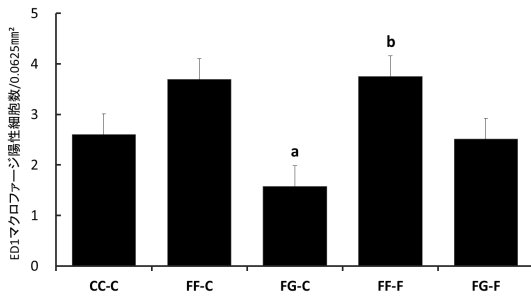


図 1. 授乳期に摂食した緑茶抽出物 (GTE) の 12 週齢の雌性ラットの脂肪組織中のマクロファージ浸潤に及ぼす影響。(A): 各群における脂肪組織。矢印は、CD68/ED1 陽性マクロファージを示す。(B): 単位面積当たりの CD68/ED1 陽性マクロファージ数の比較。値は平均値±標準誤差 ( $n=8-11$ )。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs FF-C 群, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs FG-C 群。

#### (4) 腎臓における結果及び考察

##### 腎重量

腎重量は、離乳後に 45%脂肪食を摂取した FF-F 群及び FG-F 群では、CC-C 群と比べて有意に低値を示した。

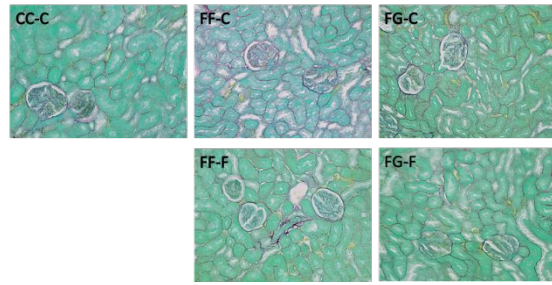
##### 血液生化学検査値

血漿中クレアチニン及び尿素窒素濃度は、離乳後に 45%脂肪食を摂取した群では、摂取しなかった群と比べて有意に低値を示したが、FF-C 群と FG-C 群との間、FF-F 群と FG-F 群との間には、それぞれ有意な差は認められなかった。

##### 間質における線維化面積率に及ぼす GTE の影響

シリウスレッド染色による組織像においては、授乳期に GTE を摂取しなかった FF-C 群及び FF-F 群では線維化領域の増加が見られたが、授乳期に GTE を摂取した FG-C 群及び FG-F 群ではその減少が見られた。この結果を受けて、定量的に線維化面積率を算出したところ、シリウスレッド染色による病理組織像と同様に、FG-C 群は FF-C 群と、FG-F 群は FF-F 群と比べて間質における線維化面積率が有意に減少していた。このことから、母ラットが授乳期に摂取した GTE が、間質における線維化を軽減することが示唆された。

(A)



(B)

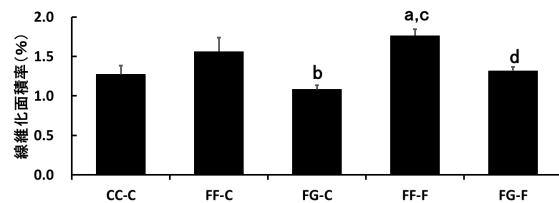


図 2. 授乳期に摂食した緑茶抽出物 (GTE) の 12 週齢の雌性仔ラットの腎臓中の線維化領域に及ぼす影響。(A): 各群における腎臓組織。赤色は線維化領域を示す。(B): 線維化面積率。値は平均値±標準誤差 ( $n=8-12$ )。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs FF-C 群, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs FG-C 群, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs FG-C 群 <sup>d</sup> $P < 0.05$  vs FF-F 群。

##### 腎臓のマクロファージの浸潤に及ぼす GTE の影響

間質における CD68/ED-1 陽性マクロファージ細胞数は、FG-F 群では FF-F 群と比べて有意に減少した。また、FG-C 群では FF-C 群と比べて減少傾向が見られた。このことから、母ラットが授乳期に摂取した GTE は、雌性仔ラットの腎臓の間質へのマクロファージ浸潤を抑制する可能性が示唆された。

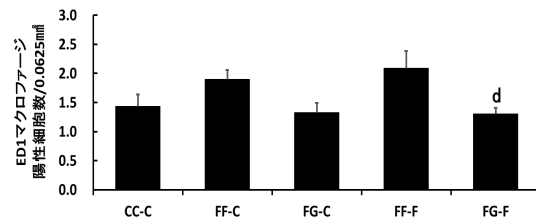


図 3. 授乳期に摂食した緑茶抽出物 (GTE) の 12 週齢の雌性仔ラットの腎臓中のマクロファージ浸潤に及ぼす影響。値は平均値±標準誤差 ( $n=8-11$ )。<sup>d</sup> $P < 0.05$  vs FF-F 群。

##### 腎臓の COX-2 発現量に及ぼす GTE の影響

COX-2 発現量は、授乳期に GTE を摂取した FG-F 群では、授乳期に GTE を摂取しなかった FF-F 群と比べて有意に減少した。この結果から、授乳期に GTE を摂取した FG-F 群では、少なくとも、腎臓の炎症が軽減した可能性が示唆された。

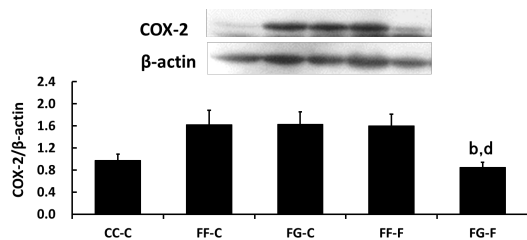


図 4 . 授乳期に摂食した緑茶抽出物 (GTE) の 12 週齢の雌性仔ラットの腎臓中の COX-2 発現に及ぼす影響 . 値は平均値±標準誤差 (n=8-11) . <sup>b</sup>P < 0.05 vs FF-C 群, <sup>d</sup>P < 0.05 vs FF-F 群 .

本研究の結果から、授乳期に摂取した GTE は、成長後、高脂肪食を負荷した雌性仔ラットの脂肪組織や腎臓のマクロファージの浸潤や腎臓の線維化を軽減す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 4 件)

Matsumoto E, Kataoka S, Mukai Y, Sato M, Sato S. Green tea extract intake during lactation modified cardiac macrophage infiltration and AMP-activated protein kinase phosphorylation in weanling rats from undernourished mother during gestation and lactation. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 査読有, 2017 ;8:178-187.

DOI:

<https://doi.org/10.1017/S2040174416000647>

Sato S, Kataoka S, Kimura A, Mukai Y. Azuki bean (*Vigna angularis*) extract reduces oxidative stress and stimulates autophagy in the kidneys of streptozotocin-induced early diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 査読有, 2016;94:1298-1303. DOI:10.1139/cjpp-2015-0540

Kataoka S, Mukai Y, Takebayashi M, Kudo M, Acuram UR, Kurasaki M, Sato S. Melinjo (*Gnetum gnemon*) extract intake during lactation stimulates hepatic AMP-activated protein kinase in offspring of excessive fructose-fed pregnant rats. *Reproductive Biology*, 査読有, 2016; 16:165-73.

DOI: 10.1016/j.repbio.2016.01.002

Sato S, Mukai Y, Kataoka S, Kurasaki M. Azuki bean (*Vigna angularis*) extract stimulates the phosphorylation of AMP-activated protein kinase in HepG2 cells and diabetic rat liver. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 査読有, 2016;96: 2312-8.

DOI: 10.1002/jsfa.7346

[学会発表](計 11 件)

片岡沙織, 向井友花, 佐藤 伸. 糖尿病ラットの腎臓における酸化ストレスおよびオートファジーに及ぼす小豆ポリフェノールの影響. 第 63 回日本栄養改善学会学術総会, 2016 年 9 月, 青森市.

松本恵実, 向井友花, 片岡沙織, 佐藤 伸. 妊娠期・授乳期に低蛋白食に曝された仔ラットの心臓中のマクロファージ浸潤に及ぼす緑茶抽出物の影響. 第 63 回日本栄養改善学会学術総会, 2016 年 9 月, 青森市.

佐々木ひなた, 片岡沙織, 齋藤 楓, 佐藤 伸. 胎生期・乳児期に高脂肪食に曝された仔ラットの成長後の腎臓に及ぼす茶カテキン類の影響. 第 63 回日本栄養改善学会学術総会, 2016 年 9 月, 青森市.

齋藤 楓, 片岡沙織, 佐々木ひなた, 佐藤 伸. 茶カテキン類は胎生期・乳児期に高脂肪食に曝された仔ラットの脂肪組織中のマクロファージ浸潤を抑制する. 第 63 回日本栄養改善学会学術総会, 2016 年 9 月, 青森市.

片岡沙織, 伊澤茉美, 佐藤 伸. 胎生期授乳期に低栄養に曝された雄性仔ラットの高脂肪食負荷による腎臓に及ぼす緑茶抽出物の影響. 第 70 回日本栄養・食糧学会, 2016 年 5 月, 西宮市 .

片岡沙織, 佐藤真由, 伊澤茉美, 佐藤 伸. 胎生期授乳期に低栄養に曝された仔ラットの授乳期における緑茶抽出物摂取が成長後の腎臓中 mTOR 活性に及ぼす影響. 第 2 回日本栄養改善学会, 東北支部学術総会, 2015 年 11 月, 仙台市.

片岡沙織, 佐藤 伸. メリンジョ抽出物は糖尿病モデルラットの肝臓中 AMP 活性化プロテインキナーゼ活性を増加する. 第 62 回日本栄養改善学会学術総会, 2015 年 09 月, 福岡市.

松本恵実, 向井友花, 片岡沙織, 佐藤 伸. 授乳期に摂取する緑茶抽出物は胎生期授乳期に低蛋白食に曝された雌性仔ラット心臓の AMPK を活性化する. 第 62 回日本栄養改善学会学術総会, 2015 年 9 月, 福岡市.

伊澤茉美, 片岡沙織, 下田佳澄, 佐藤 伸. 胎生期授乳期に低蛋白食に曝された仔ラットの成長後の高脂肪食負荷による腎臓に及ぼす緑茶抽出物の影響. 第 62 回日本栄養改善学会学術総会, 2015 年 09 月, 福岡市.

Saori Kataoka, Mihoko Takebayashi, Megumi Kudo, Yuuka Mukai, Shin Sato. Intake of Melinjo (*Gnetum gnemon*) seed extract during lactation stimulates hepatic and hypothalamic

AMPK in offspring of fructose-fed pregnant rats.  
ACN2015 12th Asian Congress of Nutrition. 14 -  
18 May, 2015, Yokohama, Japan.

Shin Sato, Saori Kataoka, Masaaki Kurasaki,  
Yuuka Mukai. Effects of azuki bean (*Vigna  
angularis*) extract on AMP-activated protein  
kinase phosphorylation in HepG2 cells and liver  
of diabetic rats. ACN2015 12th Asian Congress  
of Nutrition. 14 - 18 May, 2015, Yokohama,  
Japan.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 沙織 (KATAOKA, Saori)  
青森県立保健大学・健康科学部・助手  
研究者番号：30712343

### (2) 研究分担者

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