

平成 26 年 5 月 10 日現在

機関番号：21102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500960

研究課題名(和文)胎生期低栄養に起因する肥満のポリフェノールによる代謝制御とその分子機構の解明

研究課題名(英文)Effects of plant polyphenols intake during lactation on glucose and lipid metabolism in offspring exposed with maternal protein restriction

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期のタンパク制限などの低栄養状態は、成長後の子の肥満や耐糖能異常を高率に発症することがわかってきた。本研究では、妊娠中にタンパク制限に曝された母ラットの授乳期における植物ポリフェノール摂取が成長後の子の糖・脂質代謝及びAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)活性に及ぼす影響を検討した。授乳期に摂取した植物ポリフェノールは、仔ラットの肝臓中AMPKのリン酸化量を増加させた。この結果から、植物ポリフェノールによるAMPK活性の上昇により、少なくとも、成長後の子の糖・脂質代謝に関わる因子に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dietary protein restriction during pregnancy is thought to lead to the development of obesity and glucose intolerance in later life. This study was investigated the effects of maternal plant polyphenols intake during lactation affects AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation in the liver of young and adult offspring exposed to fetal malnutrition. Maternal plant polyphenols (azuki bean polyphenols and resveratrol) intake during lactation increased AMPK phosphorylation in the liver of offspring. The results suggest that plant polyphenols intake during lactation activate hepatic AMPK and may affect the glucose and lipid metabolism in adult offspring exposed with maternal protein restriction.

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：胎生期低栄養 肥満 糖尿病 AMP活性化プロテインキナーゼ エネルギー代謝 植物ポリフェノール

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は、糖尿病や高血圧等の危険因子としてよく知られている。今日、肥満予防に資する機能性食品成分の開発は活発に行われている。たとえば、肥満モデル動物を用いてカテキンなどの植物ポリフェノールによる抗肥満作用が示されている。私たちも、小豆ポリフェノールが肥満に関連する糖尿病の予防に効果があることを報告した。

近年、胎生期や授乳期に低栄養に曝された子は、加齢とともに肥満、耐糖能異常、糖尿病あるいは高血圧を高率に発症することがわかってきた。しかし、どのような食品成分が胎生期や授乳期の低栄養に起因する肥満を抑制するのか、また、もし、抑制するならば、エネルギー代謝等をどのように制御するかよくわかっていない。

### 2. 研究の目的

そこで、私たちは、発育初期での植物ポリフェノールの摂取によって、胎生期低栄養に起因する子の肥満のエネルギー代謝調節機構を制御できるのではないかと考え、その分子機構を解明し、成長後の肥満の予防・改善の方策を見出そうとして本研究を企画した。本研究では、胎生期に低蛋白栄養に曝されたラットを用いて、以下の二つの課題を検討した。

(1) 実験 : 妊娠低栄養母ラットの授乳期における小豆ポリフェノール (小豆 PP) 摂取が雄性仔ラットの成長後の肝臓中の AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 発現および活性に及ぼす影響

AMPK は、エネルギー代謝調節で重要な役割を果たす酵素である。肥満においては脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現を制御する脂質合成転写因子-1c (SREBP-1c) 活性が亢進し、AMPK 活性に深く関与するという。しかし、胎生期低栄養に起因する肥満の発症で、植物ポリフェノールが脂肪酸合成を中心とした代謝制御機構に及ぼす影響はよくわかっていない。

実験 では、胎生期に蛋白制限に曝された児の成長に伴う AMPK の発現や活性および脂質代謝における植物ポリフェノールの生理的役割を明らかにするために、妊娠中に低蛋白食を摂取した母ラットの授乳期に小豆 PP を摂取させ、成長後の仔ラットの AMPK 活性および脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

(2) 実験 : 胎生期低栄養に曝された仔ラットの成長後の脂質代謝に及ぼすレスベラトロールの影響

レスベラトロール (RSV) は、赤ワイン等に多く含まれる植物ポリフェノールであり、

抗がん作用、抗酸化作用、抗炎症作用を有し、グルコースの取り込み増加によるエネルギー代謝に關与するほか、脂質異常症を改善するといわれている。

そこで、胎生期に低栄養環境に曝された子の脂質代謝におけるレスベラトロール (RSV) の生理的役割を明らかにするために、妊娠低栄養母ラットの授乳期に RSV を経口投与し、成長後の雌雄仔ラットの脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

### 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。

#### (1) 実験

妊娠 Wistar 系ラットを 3 群に分けた。すなわち、妊娠・授乳期全期間を通じて 20% カゼイン含有食群 (CC 群)、妊娠 8% カゼイン含有食 + 授乳 20% カゼイン含有食群 (LPC 群) および妊娠 8% カゼイン含有食 + 授乳 1.0% 小豆 PP を添加した 20% カゼイン食摂取群 (LPAP 群) である

離乳時 (3 週齢) に、雄性仔ラットから血漿および肝臓を採取した。残りの雄性仔ラットには、標準動物飼料 (MF 飼料、オリエンタル酵母) を摂取させ、投与期間を通して体重を測定した。23 週齢に採血し、血漿および肝臓を採取した。

グルコース、トリグリセリド、総コレステロールおよびアディポネクチン濃度を測定した。AMPK および脂肪酸の合成や酸化を調節する酵素であるアセチル-CoA カルボキシルラーゼ (ACC) の発現および活性をウェスタンブロット法で解析した。また、肝臓からの総 RNA を抽出し、SREBP-1c の mRNA 量をリアルタイム PCR 法により測定した。

#### (2) 実験

妊娠した Wistar 系ラットを、妊娠中に 20% カゼイン含有飼料を与えた群 (C 群) および、8% カゼイン含有飼料を与えた群 (LP 群) の 2 群に分けた。授乳期では C 群および LP 群の母ラットに RSV (20 mg/kg 体重) あるいは vehicle である 0.5% カルボキシメチルセルロース (CMC) を 1 日 1 回、胃内強制投与し、C 群に CMC を投与した群 (CC 群、対照群)、C 群に RSV を投与した群 (CCR 群)、LP 群に CMC を投与した群 (LPC 群) および LP 群に RSV を投与した群 (LPR 群) とした。なお、授乳期には全群に 20% カゼイン含有飼料を与えた。離乳時 (3 週齢) に仔ラットを解剖し、血液、肝臓、腎臓および心臓を採取した。残りの仔ラットは標準動物飼料を摂取させ、体重を測定した。36 週齢時に解剖し、3 週齢時と同様に、血漿および肝臓を採取した。血漿中のグルコース、トリグリセリドおよび総コレステロールを測定した。肝臓中の AMPK および ACC の活性はウェスタンブロット

ット法により解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験の結果および考察

###### 1) 体重の変化

離乳後の雄性仔ラットの体重は、3群ともに順調に増加した。14週齢以降では、LPAP群の体重は、LPC群に比べて低値を示した。

###### 2) 仔ラットの血液生化学検査値

23週齢の仔ラットの血漿中のトリグリセリドおよび総コレステロール濃度では3群間に有意な差はみられなかった。LPAP群のグルコース濃度は、LPC群に比べてやや減少している傾向がみられた。LPAP群の血漿中のアディポネクチン濃度は、LPC群に比べて有意に高値を示した。

###### 3) 仔ラットの肝臓の AMPK および ACC の活性に及ぼす影響

3週齢の仔ラットの肝臓中総 AMPK の発現量では3群ともに差は見られなかった。一方、LPAP群の AMPK のリン酸化量はLPC群に比べて有意に高値を示した。23週齢の肝臓も同様に、総 AMPK 発現量は3群ともに差は見られなかったが、LPAP群のリン酸化した AMPK は、LPC群に比べて高値であった(図1)。この結果は、授乳期の小豆 PP 摂取は、仔ラットの肝臓中の AMPK を活性化することを示していた。AMPK が活性化すると、ACC はリン酸化され、活性が抑制されることが知られている。そこで、肝臓中の ACC リン酸化量を検討した。その結果、23週齢の LPAP群の ACC のリン酸化量は、LPC群に比べて差はほとんど認められなかった。

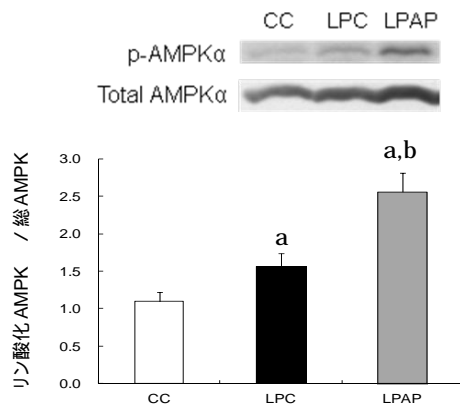


図1 授乳期の小豆 PP 摂取が成長後の仔ラット(23週齢)の肝臓中 AMPK のリン酸化量に及ぼす影響。値は平均値±標準誤差(n=5-11)。<sup>a</sup>p<0.05 vs CC群。 <sup>b</sup>p<0.05 vs LPC群。

###### 4) 仔ラットの肝臓の SREBP-1c の mRNA 発現に及ぼす影響

SREBP-1c は、肝臓や脂肪組織などにおいて ACC や脂肪酸合成酵素などの脂質合成に関連した酵素の遺伝子発現を促進する転写

因子である。23週齢の仔ラット肝臓中の SREBP-1c の mRNA 発現量を比較すると、LPC群に比べて LPAP群の発現量は有意に低下していた(図2)。この結果は、授乳期の小豆 PP 摂取が仔ラット肝臓中の SREBP-1c の mRNA 発現を抑制することを示唆していた。

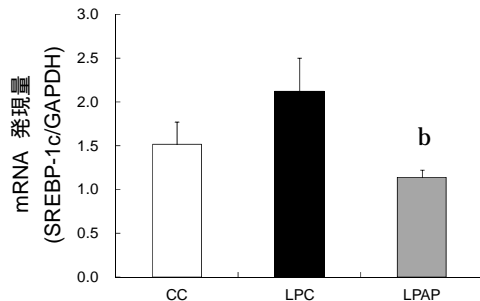


図2 授乳期の小豆 PP 摂取が仔ラット(23週齢)の肝臓中 SREBP-1c の mRNA 発現に及ぼす影響。値は平均値±標準誤差(n=5-11)。 <sup>b</sup>p<0.05 vs LPC群。

今後、AMPK に関与するシグナル伝達経路を詳細に検討する必要があるが、得られた結果から、妊娠中に低栄養状態であっても授乳期に小豆 PP を摂取することによって、少なくとも、成長後の児のエネルギー代謝、糖・脂質代謝に関わる因子に影響を及ぼす可能性が示唆された。

##### (2) 実験の結果および考察

###### 1) 体重および血液生化学検査値

3週齢雄性仔ラットの解剖時の体重は、CC群と比較しLPC群とLPR群が低値であった。また、雌性仔ラットでは解剖時の体重で、CC群と比較しLPC群が低値であった。3週齢以降の雄性仔ラットの体重は、4から14および18週齢から20週齢でCC群に比べてCCR群が有意に減少した。雌性仔ラットの体重は4群間に差がみられなかった。36週齢解剖時における肝臓、腎臓、心臓の各相対臓器重量では各群雌雄ともに差がみられなかった。

3週齢、36週齢で雌雄仔ラットともに血漿中のグルコース、トリグリセリドならびに総コレステロール値に有意差は認められなかった。

###### 2) 肝臓中の AMPK および ACC の活性に及ぼす影響

3週齢の雌性仔ラットにおける肝臓中の AMPK のリン酸化量はCC群やLPC群に比べてLPR群で増加していた(図3)。このことは、妊娠中に蛋白制限を受けた母ラットが授乳期に摂取したRSVは、雌性仔ラットの肝臓中の AMPK を活性化させることを示していた。36週齢の雌性仔ラットにおける AMPK のリン酸化量は、LPC群と比較してLPR群で、またCC群と比較してCCR群で、それぞれ増加傾向がみられた。一方、雄性仔ラットでは、3および36週齢ともに AMPK のリン酸化量

には有意な差は認められなかった。3 週齢雌性仔ラットにおける ACC のリン酸化量は、LPC 群に比べて LPR 群で増加傾向を示した。

以上の結果から、胎生期に蛋白制限に曝された仔ラットが授乳期に RSV を摂取した母ラットに哺育された場合、発育初期段階の雌性仔ラットの肝臓中 AMPK が活性化することが明らかになった。

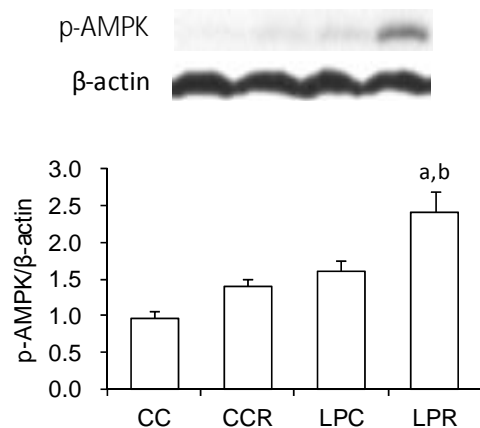


図 3. 雌性仔ラット (3 週齢) 肝臓中の AMPK のリン酸化量に及ぼす授乳期レスベラトロール摂取の影響。値は平均値 ± 標準誤差 (n=6-11) を示す。<sup>a</sup>p<0.05 vs CC 群、<sup>b</sup>p<0.05 vs LPC 群。

本研究課題の二つの実験結果から、授乳期に摂取した小豆ポリフェノールやレスベラトロールは、AMPK を介したエネルギー代謝を調節し、胎生期低蛋白栄養によって生じる肥満の発症に影響を及ぼす可能性が示唆された。

肥満の発症では、DNA の塩基配列に依存せずに遺伝子発現調節 (エピジェネティクス) が関与しているという。それゆえ、今後、妊娠中に低栄養に曝された仔ラットに生じる肥満や糖尿病において植物ポリフェノールがエピジェネティックな機構に及ぼす影響を、DNA メチル化を触媒する DNA メチル基転移酵素活性等を測定して、明らかにする必要がある。

#### 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 6 件)

Sato S, Mukai Y, Hamaya M, Sun Y, Kurasaki M. Long-term effect of green tea extract during lactation on AMPK expression in rat offspring exposed to fetal malnutrition. *Nutrition*. 査読有, 2013;29:1152-8.

Sato S, Mukai Y, Saito T. Quercetin intake during lactation modulates the AMP-activated

protein kinase pathway in the livers of adult male rat offspring programmed by maternal protein restriction. *J Nutr Biochem*. 2013;24:118-23.

Sun Y, Mukai Y, Tanaka M, Saito T, Sato S, Kurasaki M. Green tea extract increases mRNA expression of enzymes which influence epigenetic marks in newborn female offspring from undernourished pregnant mother. *PLoS One*. 2013;8:e74559.

Mukai Y, Sun Y, Sato S. Azuki bean polyphenols intake during lactation upregulate AMPK in male rat offspring exposed to fetal malnutrition. *Nutrition*. 査読有, 2013;29:291-7.

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

Sato S, Mukai Y, Tokuoka Y, Mikame K, Funaoka M, Fujita S. Effect of lignin-derived lignophenols on hepatic lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012;34:228-34.

〔学会発表〕(計 7 件)

木村亜香子、向井友花、片岡沙織、佐藤 伸. 糖尿病モデルラットの腎障害に及ぼす小豆ポリフェノール抽出液の影響。第 60 回日本栄養改善学会学術総会、2013 年 9 月、神戸市。

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、神戸市。

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、名古屋市。

Sato S, Mukai Y. Effect of quercetin intake during lactation on the AMP-activated protein kinase activity in the livers of adult male rat offspring programmed by maternal protein restriction. The 6th International Niigata Symposium on Diet and Health. 2012 年 10 月、新潟市。

尾崎 遥、芹田侑子、佐藤 伸. ラット妊娠期のフルクトース過剰摂取が仔の血糖値及び血中脂質に及ぼす影響。第 59 回日本栄

養改善学会学術総会、2012年9月、名古屋市。

小泉綾美、玉山咲紀、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レスベラトロールの影響。第59回日本栄養改善学会学術総会、2012年9月、名古屋市。

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、仙台市。

〔図書〕(計1件)

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. In: *Functional and Medical Foods with Bioactive Compounds: Science and Practical Application* (H Nishino, T Yoshikawa, and D Martirosyan, ed.) Food Science Publisher, pp158-159, 2013 (ISBN 9781483983394)

〔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

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

### (2)研究分担者

向井 友花 (MUKAI YUUKA)  
青森県立保健大学・健康科学部・助教  
(現 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

蔵崎 正明 (KURASAKI MASA AKI)  
北海道大学・大学院地球環境科学院・助教  
研究者番号：80161727