

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870565

研究課題名(和文)肥満マウスを用いた高分子ポリフェノール摂取による肥満改善効果の検討

研究課題名(英文)Effect of highly polymeric polyphenol on obesity in the diet-induced obesity mice.

研究代表者

升本 早枝子(MASUMOTO, SAEKO)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門 生産・流通利用研究領域・研究員

研究者番号：30596052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、ポリフェノールは肥満やメタボリックシンドロームの予防に寄与することが報告されている。生体利用性は、ポリフェノールの肥満抑制やエネルギーの恒常性のメカニズムを示す上で大変重要であり、低分子のポリフェノールについては生体利用性が比較的高く、生体内における作用機序も明らかになっている。しかし、高分子プロシアニジンの役割や生物学的機能性は、明らかになっていない。本研究で、我々は、食餌性誘発肥満マウスにおいて12週間の0.5%のPP摂取が肥満を改善し、脂質代謝に関連した遺伝子の発現に変化を及ぼしたことを明らかにした。またPP摂取は、肥満による炎症や腸管バリア機能を改善することを示した。

研究成果の概要(英文)：Several studies have suggested that polyphenols are associated with a reduced risk of developing obesity and metabolic syndrome. The bioavailability is very important in the mechanisms through which polyphenols inhibit obesity and correct energy homeostasis. The role of highly polymeric procyanidins (PP), which are major non-absorbable flavonoids, in the biological effects, is not completely understood. Here, we show that 0.5% PP administration for 12 weeks improved obesity and regulate expression of genes related to lipid metabolism in the diet-induced obesity mice. PP-treatment improved inflammation and the gut permeability. Additionally, microbial 16S rRNA gene sequencing of the cecum demonstrated that PP administration decreased the Firmicutes/Bacteroidetes ratio and increased the proportion of Akkermansia. These data suggest that PPs influence the gut microbiota and the intestinal metabolome to produce beneficial effects on metabolic homeostasis.

研究分野：食品機能学

キーワード：ポリフェノール プロシアニジン 肥満 腸内細菌 DIOマウス

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省「平成23年度国民健康・栄養調査結果の概要」によると、20歳以上の日本人におけるBMI25以上の「肥満者」は増加を続けており、特に男性では3人に1人が「肥満者」に該当している。肥満はメタリックシンドローム、さらには糖尿病や動脈硬化症などの生活習慣病発症の最大の要因であり、肥満の改善は多くの疾病発症リスクの軽減に繋がる。肥満の改善には、生活習慣、特に食生活の改善が最も有効であり、加えて食品成分による第三次機能（生体調節機能）が重要な役割を果たしていると考えられている。「フィトケミカル」は生体恒常性の維持、正常化に關与する食品成分の総称である。果実などの農産物や果汁や酒類に広く含まれている成分であり、その有効活用に対する期待は大きい。代表的な「フィトケミカル」としてポリフェノールが挙げられる。カテキン類やケルセチン配糖体などのポリフェノールは、分子量が約500程度の低分子であり、体内へ吸収代謝後、脂質代謝の亢進、肥満予防・改善などの多くの機能性に関与していることが報告されている。一方、果実などに含まれるプロシアニジン類やウーロン茶やワインなどの発酵過程で生成するタンニン類などの高分子ポリフェノールは、分子量が1000以上と大きく、また、研究には共存する低分子ポリフェノールと分ける高い分離技術が必要であり、入手が困難であったことから、これらの生理機能の詳細な作用機序についての報告は殆ど無い。高分子ポリフェノールは腸管からの吸収が殆どなされず、生体利用性が非常に低いことが知られおり、吸収が直接関与せずに生体調節作用を示す可能性が考えられる。高分子ポリフェノールの生体調節作用の作用機序として、腸管におけるリパーゼ阻害活性等による脂質吸収阻害や腸内細菌叢の変化、腸管におけるGLP-1などのインクレチン産生促進やDPP4阻害活性およびSGLTやGLUTによる糖代謝改善、さらに腸内細菌等により分解され吸収された高分子ポリフェノールの分解物・代謝物による肝臓組織や脂肪組織での影響が予測される。

2. 研究の目的

本研究では、肥満が増加している昨今の現状を考慮し、従来の「予防」という視点ではなく「改善」効果に着目して研究を行う。体重多、高血糖、高脂血症および脂肪肝を示す「肥満マウス」を用い、リンゴやブドウなどの果実およびウーロン茶やワインなどの食品中の高分子ポリフェノールによる、肝臓および脂肪組織の脂質代謝改善効果や脂肪蓄積改善効果の検討を行うことを目的とした。すなわち、C57BL/6Jマウスに高脂肪・高シヨ糖食を長期間摂取させた「肥満マウス」モ

デルを用いた動物実験により、肝臓および脂肪組織における脂質代謝および腸管における脂質吸収阻害による改善効果について生化学的な検討を行うとともに、遺伝子発現解析による作用メカニズムの解明を行い、高分子ポリフェノールによる肥満改善効果およびその作用機序を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 高分子ポリフェノールの調製

Shoji¹⁾らの方法を用いて、セパピース SP-850[®]樹脂（三菱化学）を用いてリンゴ果汁からリンゴポリフェノールを吸着、分画した。次に、ダイヤイオン HP-20ss[®]樹脂（三菱化学）を用いて、プロシアニジン類と他のポリフェノール類を分離した。さらに、得られたプロシアニジン画分を順相クロマトグラフィーにより生体利用性の高い単量体から4量体までの低分子プロシアニジン画分（OP）と生体利用性の低い5量体以上の高分子プロシアニジン画分（PP）に分画した（図1）。

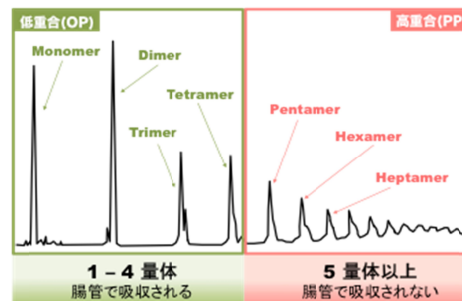


図1 順相クロマトグラフィによるリンゴ由来プロシアニジンの重合度別分画

(2) 食餌性肥満 (DIO) モデルマウスの作製

C57BL/6Jマウス、雄4週齢（日本チャールスリパー）を1週間馴化させた後、高脂肪高シヨ糖食（脂質45%、シヨ糖35%：D12451, Research DIET）を12週間摂取させ、同週齢の普通食摂取マウスと比較して7g以上の体重増加を呈した個体をDIOモデルマウスとした。

(3) DIOマウスへの高分子プロシアニジン画分の投与

DIOマウスを高脂肪高シヨ糖食群（脂質45%、シヨ糖35%）(HH)、高脂肪高シヨ糖食+OP群（H0）、高脂肪高シヨ糖食+PP群（HP）の3群に分けた。H0群およびHP群には、0.5%濃度になるよう水道水に各プロシアニジン画分を溶解し、自由飲水でマウスに摂取させた。明暗12時間（7:00-19:00）、湿度55 ± 5%の条件下で12週間飼育後、チオペンタール麻酔下で解剖、採血を行い、各種臓器の摘出および盲腸内容物を採取し、-80℃で保存した。

(4) 血清中脂質およびグルコース濃度

ドライケム 7000(富士フィルム)を用いて、血清中グルコース濃度、トリグリセリド濃度および総コレステロール濃度を測定した。

(5) 肝臓組織中トリグリセリドの測定

D10 マウスを 12 週間飼育後、摘出した肝臓組織から FOLCH 法により脂質を抽出し、ラボアッセイ®トリグリセリド(和光純薬)を用いてトリグリセリド濃度を測定した。

(6) 肝臓組織および大腸組織の染色

摘出した肝臓組織をホルマリン固定およびパラフィン包埋後、薄切し HE 染色を行った。大腸組織は、カルノア液で固定後、エタノールに置換し、パラフィン包埋した後に薄切しアルシアンブルー染色を行った(ジェノスタッフ)。

(7) 小腸組織および肝臓組織における遺伝子発現解析

解剖し摘出した小腸および肝臓組織を RNA Later (Ambion)に浸潤させた。これを RNeasy mini kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。さらに、Transcriptor Universal cDNA Master (Roche)を用いて cDNA 合成を行った。得られた cDNA を、SYBR Green 用いた定量リアルタイム PCR に供し、各組織における遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 体重および臓器重量

D10 マウスの飼育 12 週間経過後、各群の総摂餌量および飲水量に差は認められなかった。いずれの群においても体重増加が認められたが、HO 群および HP 群は HH 群と比較して緩やかな体重増加を示した。特に HP 群では 10 週目以降から HH 群と比較して有意な体重増加抑制が認められた。また、肝臓重量も、HP 群では HH 群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$, 図.2)。さらに、内臓脂肪、腎周囲、皮下脂肪および総脂肪組織重量において、HP 群は HH 群と比較して有意な増加抑制を示した(図.3)。

(2) 肝臓組織中トリグリセリドおよび肝臓組織への脂肪蓄積

肝臓中のトリグリセリド量は、HH 群と比較して HO 群および HP 群いずれにおいても有意な減少が認められた(図.4A)。各群のマウスから摘出した肝臓組織について HE 染色を行ったところ、HH 群では、肝臓組織への脂肪蓄積により細胞内に肥大した脂肪滴が HE 染色後、白い空胞(脂肪空胞)として確認された。一方、HO 群では空胞の面積が減少しており、さらに HP 群では、脂肪空胞の数も少なく、大きさも減少していることが確認された(図.4B)。

食餌性肥満は、脂肪組織を増大させるだけでなく、肝臓へ脂質が蓄積することによって

重量が増加する。また肥満の進行に伴い、炎症や脂質代謝異常が引き起こされ、さらなる肥満の悪化が進む。高分子プロシアニジンを摂取した HP 群では HH 群と比較して体重、肝臓重量、各脂肪組織において有意に低値を示した。すなわち、高分子プロシアニジンは高脂肪高シヨ糖食による各種臓器への脂肪の蓄積を抑制し、食餌性肥満の予防・改善に寄与することが示唆された。

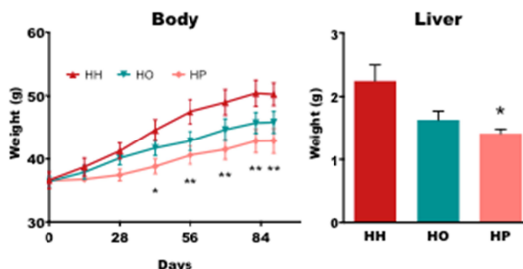


図 2 体重変化と肝臓重量

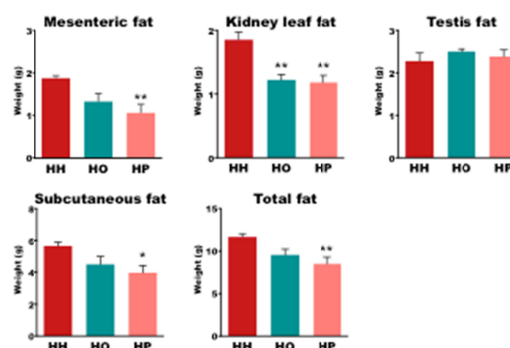


図 3 脂肪組織重量

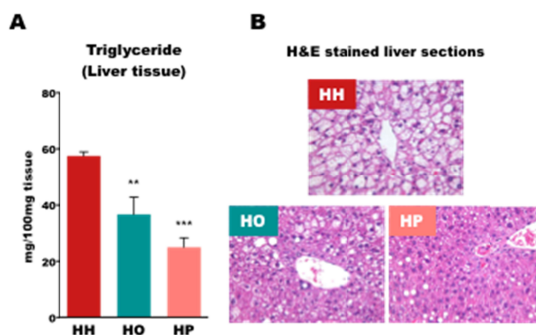


図 4 肝臓組織中のトリグリセリド含量(A)と肝臓組織の HE 染色画像

(3) 血清中グルコースおよび脂質濃度

血清中のグルコースおよびトリグリセリド濃度は、各群に有意な差は認められなかった。一方、血清中の総コレステロール濃度は、HH 群と比較して HP 群が有意に低値を示した ($p < 0.01$, 図.5)。D10 マウスでは、肥満の進行により肝臓への脂肪蓄積が進み、肝臓における糖・脂質代謝に異常をきたし、血中の脂質や糖の濃度が増大している。高分子プロシアニジン摂取により総コレステロールが減少したことから食餌性肥満による脂質代謝異常が改善したことが示唆された。

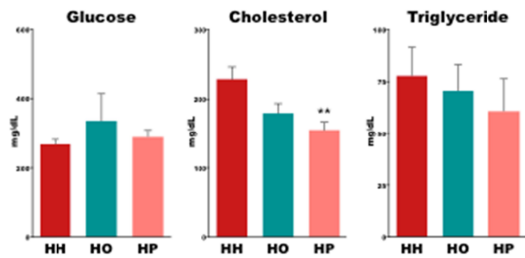


図 5 血中グルコースおよび脂質含量

(5)小腸組織および肝臓組織における遺伝子発現解析

小腸組織では、HP 群において炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 の発現が HH 群と比較して有意な減少を示した。また腸管のタイトジャンクションの制御因子である Occludin および ZO-1 は、HP 群において有意な増加が認められた (図.6)。高分子プロシアニジン摂取によって、小腸組織における炎症性サイトカインの TNF- α および IL-6 の発現量が減少したことから、腸管の炎症が抑制されたことが示唆された。また、腸内細菌由来の内毒素であるリポポリサッカライド (LPS) は、肥満の進行に伴う腸内細菌叢の変化により産生量が増加するだけでなく、肥満に伴う炎症によりバリア機能が低下した腸管膜から血中へ取り込まれ、肝臓を始めとする各臓器に運ばれる。タイトジャンクションを制御する Occludin および ZO-1 の発現が増加したことから、腸管のバリア機能低下を抑制し、LPS の流出を減少させたと考えられる。また、最近の研究では腸内細菌叢が腸管バリア機能に関与する事が報告されている。さらに、我々は、最近高分子プロシアニジンの摂取が *Akkermansia muciniphila* を増加させる事を報告している²⁾。*Akkermansia muciniphila* は、Occludin および ZO-1 の発現を増加させることが報告されており、高分子プロシアニジン摂取による *Akkermansia muciniphila* の増加が寄与したと推察された。

肝臓組織では、LPS の受容体である TLR4 および CD14 が、HH 群と比較して HP 群で有意な減少が認められた。また、小腸組織と同様に TNF- α および IL-6 は、HH 群と比較して HP 群で有意に減少していた (図.7)。TLR4 や CD14 は血中の LPS 濃度の増加に伴って発現量が増加し、炎症性サイトカインの分泌を増大させ、その結果インスリン抵抗性や脂質代謝異常を誘発する。高分子プロシアニジン摂取によって肝臓組織での TLR 4、CD14 および TNF- α 、IL-6 の発現量がいずれも有意に減少したことから、腸管バリア機能の向上により、LPS の流出が減少し肝臓における LPS 受容体の発現や炎症性サイトカインの発現が減少したと考えられた。

大腸組織の腸管上皮のムチンの状態を観察すると、HH 群と比較して HP 群では顕著に青色に染色されたムチンが増加しているこ

とが確認された (図.8)。腸管は、タイトジャンクションによるバリア機能に加えて、腸管上皮の杯細胞から分泌されるムチンにより、粘膜面にムチン層が形成されることで、様々な要因から生体を防御している。ムチン分泌には摂取した食品や腸内細菌叢が関与していることが報告されており、腸内バリア機能の指標として注目されている³⁾。また、*Akkermansia muciniphila* がムチン分泌を促進することも報告されており、高分子プロシアニジン摂取による *Akkermansia muciniphila* の増加が寄与したと推察された¹⁰⁾。

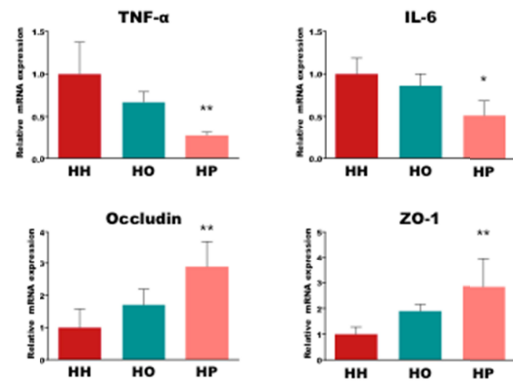


図 6 小腸組織における遺伝子発現

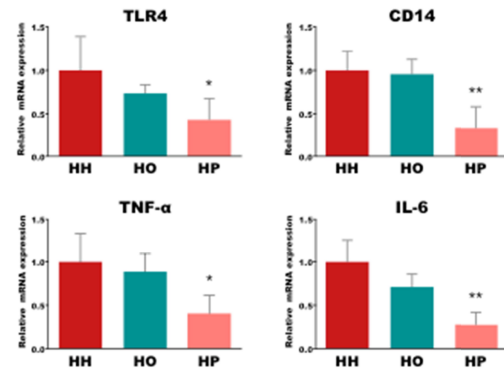


図 7 肝臓組織における遺伝子発現

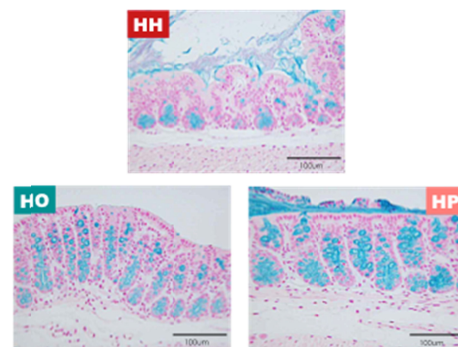


図 8 アルシアンブルー染色による大腸組織のムチンの比較

これまでの食品成分の生体調節機能は、腸管で吸収され生体利用性が高いことが重要であると考えられており、生体利用性の低い成分は生体応答に関与しないとされていた。しかし、今回 D10 マウスにおいて、肝臓の脂肪蓄積の減少、腸管バリア機能の向上、慢性

炎症の予防・改善など肥満に伴う症状を顕著に改善することを初めて明らかにした。食生活の欧米化が進み、肥満者およびその予備軍が増加している現在、肥満改善の視点からのアプローチは大変重要であると考えている。プロシアニジン類に限らず、生体利用性の低い高分子ポリフェノールは、果実やワイン、お茶類など様々な食品に含まれており、これらの食品の生体調節機能に腸内細菌が関与している可能性が考えられ、我々の最近の研究でも高分子プロシアニジンによる *Akkermansia muciniphilia* の増加効果を明らかにしている。本実験の結果も、*Akkermansia muciniphilia* の寄与が推測されることから、今後、腸内細菌叢の解析や腸管での作用機序の解明などを進めることにより、高分子ポリフェノールの肥満改善効果における役割について詳細に明らかにしていきたいと考えている。

<引用文献>

- 1) Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, Kanda T, and Ohtake Y, *J Chromatogr A*, 1102, 206-13 (2006).
- 2) Masumoto S, Terao A, Yamamoto Y, Tomisato M, Shoji T, *Sci Rep.*, 6:31208. (2016)
- 3) Utama Z, Okazaki Y, Tomotake H, and Kato N, *Plant Foods Hum Nutr*, **68**, 177-83 (2013).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

升本早枝子、青木詩織、山口晃平、廣瀬彰人、小田貴之、東善行、向井孝夫、庄司俊彦
高分子プロシアニジン摂取が食事誘発性肥満マウスの脂肪蓄積に及ぼす影響。
食品科学工学会 第 63 回大会。
2016.8.26 名城大学(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

升本 早枝子 (MASUMOTO, Saeko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門 生産・流通利用研究領域・研究員

研究者番号：30596052