

サトウ シン  
佐藤 伸

共同研究者

向井友花

(青森県立保健大学 健康科学部 栄養学科・助教)

#### 略 歴

1996年 北海道大学 大学院環境科学研究科博士課程修了・博士(環境科学)  
1996年 日本シエーリング株式会社 研究開発部(研究員)  
2000年 函館短期大学 食物栄養学科(助教授)  
2002年 青森県立保健大学 健康科学部(准教授)  
2006年 英国・グラスゴー大学 心血管研究センター(客員研究員)  
(文科省・大学教育の国際化推進プログラムによる助成)  
2008年 青森県立保健大学 健康科学部 栄養学科(教授)  
現在に至る

### 胎生期低栄養に起因する血圧上昇およびエネルギー代謝に及ぼす 植物ポリフェノールの影響に関する研究

#### Effects of maternal plant polyphenols supplementation during lactation period on blood pressure and hepatic energy metabolism in offspring exposed to maternal protein restriction during rat gestation

Maternal protein restriction during pregnancy is known to lead to elevated blood pressure and obesity in the offspring. We investigated the effect of maternal plant polyphenols (quercetin) supplementation on blood pressure and hepatic energy metabolism in offspring from rat dam exposed to protein restriction. Pregnant rats were randomly allocated to feed *ad libitum* on a diet containing either 20% (control group: C) or 8% (low-protein group: LP) casein diet during gestation. After delivery, the male pups were received a control (20% casein) diet or 0.2% quercetin-containing 20% casein diet during lactation period as follows: control-on-control (CC), control-on-restricted (LPC), and 0.2% quercetin-containing 20% casein diet-on restricted (LPQ). The weaning pups were fed a standard commercial laboratory diet *ad libitum*. The body weight and systolic blood pressure (SBP) were measured during treatment. At postnatal weeks 23, superoxide ( $O_2^-$ ) production, urinary 24-h nitrate/nitrite (NOx) contents, protein levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and AMP-activated protein kinase (AMPK) were examined. The body weights of the LPC group remained significantly lighter than those of the CC and LPQ groups. There was no significant difference among CC, LPC, and LPQ in the SBP levels and  $O_2^-$  production in the aorta. The urinary NOx contents, eNOS phosphorylation in the liver of LPQ increased, compared with LPC, indicating that maternal quercetin supplementation during lactation period affected eNOS activity in the liver of offspring from dam exposed to protein restriction. Moreover, phosphorylation of AMPK increased in the liver of LPQ, compared with CC and LPC. In conclusion, our findings suggest that maternal quercetin supplementation during lactation

period modulated NO metabolism via eNOS activity and energy metabolism via AMPK pathway in the liver of offspring from rat dam exposed to protein restriction during gestation.

## はじめに

高血圧、肥満およびインスリン抵抗性などは、心疾患や脳卒中などの生活習慣病の危険因子としてよく知られている。生活習慣病の発症には、遺伝素因に加えて、過栄養や運動不足などのような環境因子が深く関与している。一方、近年、胎児期から授乳期における栄養環境が成長後の生活習慣病の発症に関わることが明らかになりつつある。たとえば、低栄養の子宮内環境で発育した児は、成長後の高血圧、肥満や糖・脂質代謝異常などを高率に発症することがわかってきた<sup>1,2)</sup>。それゆえ、胎児期から授乳期の母体の低栄養環境と成人期の高血圧、肥満やインスリン抵抗性などの発症に関するメカニズムの解明は重要である。加えて、「成人期に生活習慣病になりにくい体質」に資する食品成分の探索や食品成分による予防や改善の確立も望まれている。

これまで、生活習慣に起因する成人期の高血圧や肥満の予防に資する食品成分の開発が活発に行われている。たとえば、植物ポリフェノールの一種であるケルセチンは、タマネギ、リンゴ、紅茶のような食品に含まれる成分であり、抗酸化作用や血圧上昇抑制作用を有することが報告されている<sup>3)</sup>。私たちも、実験的に植物（小豆）由来のポリフェノールが血圧上昇抑制作用を有し、心臓や腎臓において活性酸素産生酵素であるNADPHオキシダーゼから産生されるスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 量を減少させること、血管弛緩作用をもつ一酸化窒素 (NO) 量を増加させることを報告してきた<sup>4,5)</sup>。しかし、低栄養状態の母体から生まれる児の成長後に高率に生じる高血圧、肥満や糖・脂質代謝異常などに及ぼす植物ポリフェノールの影響に関する知見はほとんどない。

本研究では、胎児期低栄養に起因する血圧上昇やエネルギー代謝異常に対す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、妊娠期に低蛋白餌を摂取した母ラットに授乳期を通して離乳までケルセチン含有餌を摂取させ、成長後の仔ラットの①血圧に及ぼすケルセチンの影響、②肝臓のエネルギー代謝調節機構に及ぼすケルセチンの影響について検討した。

## 実験方法

### 1. 実験動物

実験動物には7週齢の雄雌Wistar系ラット（日本チャールズ・リバー）を使用した。飼育環境は室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 7\%$ 、明期と暗期はそれぞれ12時間サイクルとした。なお、本研究は青森県立保健大学動物実験委員会の承認を受け、「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。

### 2. 実験スケジュールおよび群分け

実験スケジュールを図1に示した。交配では、膣インピーダンス・チェッカ（室町機械）を用いて膣粘膜上皮のインピーダンスを測定し、交配適期と判定されたラットを同週齢の雄性ラットと一晚同居させ、翌朝、膣口に付着した、または脱落したプラグ（膣栓）の有無を調べた。プラグが確認された日を「妊娠0日」とした。

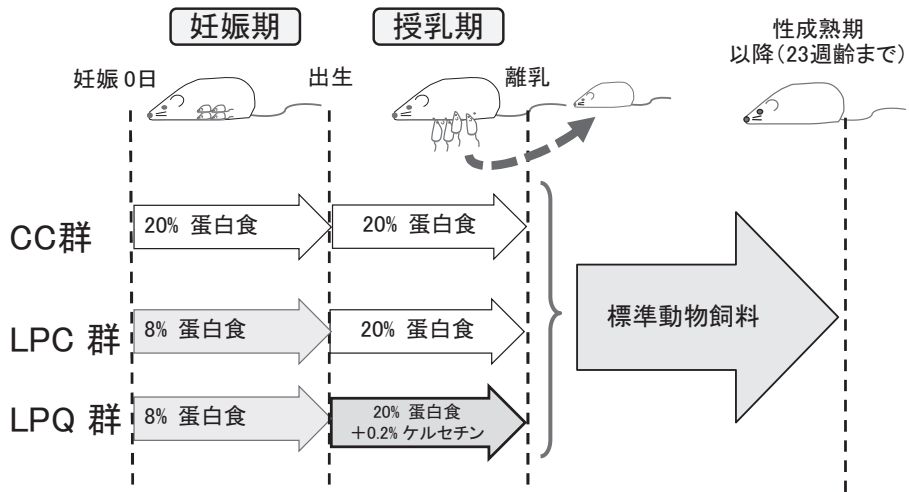


図1 実験スケジュール

表1 飼料の組成

	20%蛋白質餌	8%蛋白質餌	0.2%ケルセチン添加 20%蛋白質餌
	%	%	%
カゼイン	20.00	8.00	20.00
L-シスチン	0.300	0.123	0.300
コーンスターチ	39.74	48.82	39.74
α化コーンスターチ	13.20	16.30	13.20
シュークロース	10.00	10.00	10.00
大豆油	7.00	7.00	7.00
セルロース	5.00	5.00	4.80
ケルセチン粉末	0.00	0.00	0.20
AIN-93Gミネラル混合	3.50	3.50	3.50
AIN-93Gビタミン混合	1.00	1.00	1.00
重酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014
合計	100.00	100.00	100.00

雌雄ラットの妊娠期に20% (C群)あるいは8%蛋白質餌 (LP群)を摂取させた(表1)。LP群を2群にわけ、出産後から授乳期を通して離乳まで20%蛋白質餌 (LPC群)あるいは0.2%ケルセチン含有20%蛋白質餌(LPQ群)を与えた。C群には20%蛋白質餌を与えた(CC群)。なお、ケルセチンは、ケルセチン二水和物(和光純薬)を使用した。図2にケルセチンの化学構造式を示す。

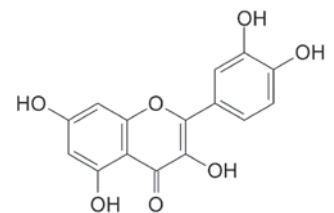


図2 ケルセチンの化学構造式

生後21±1日目に仔ラットを離乳させ、離乳時から23週齢まで標準

動物飼料 (MF飼料、オリエンタル酵母) および蒸留水を自由摂取させた。23週齢までの飼育期間中、体重および血圧を測定した。なお、血圧測定にはラット用非観血式血圧計(室町機械)を使用した。

終了時には深麻酔下で採血して、屠殺し、肝臓および大動脈を摘出した。試料は測定に供するまで $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

### 3.血液生化学検査

採血後、遠心分離 (3000 rpm、10分間、 $4^{\circ}\text{C}$ ) して血漿を採取した。血漿中のグルコース、トリグリセリド、総コレステロール、アルブミン、尿素窒素の各濃度についてドライケム生化学分析装置 (富士写真フィルム) を用いて測定した。

### 4.尿中の一酸化窒素代謝物および大動脈における $\text{O}_2^-$ 産生量の測定

試験終了前に代謝ケージを用いて24時間尿を採取し、NO代謝物 ( $\text{NO}_x$ ) をグリース法で測定した。大動脈のNADPHオキシダーゼ由来の $\text{O}_2^-$ 産生量は、本酵素の基質 (NADPH) を添加し、ルシゲニンを用いた化学発光法により測定した。

### 5.ウェスタンブロット法

肝臓をHEPES緩衝液中で破碎してホモジネートを調製し、遠心分離 ( $5000\times\text{g}$ 、45分間、 $4^{\circ}\text{C}$ ) 後の上清をタンパク質発現量の測定に供した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、一次抗体として内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) (BD Biosciences)、リン酸化eNOS、AMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK)、リン酸化AMPKの抗体 (Cell Signaling Technology) を用いたウェスタンブロット法により、タンパク質の発現量を測定した。抗原の検出にはECLウェスタンブロットティングシステム (GE Healthcare Life Sciences) を用い、化学発光のシグナルを画像解析した。各々のタンパク質の発現量は、内在性コントロールである $\beta$ -アクチン発現量で標準化した。

### 6.統計処理

各群間の平均値の有意差検定は、分散分析した後Tukey法を用いて行った。値は平均値 $\pm$ 標準誤差として示した。

## 結果および考察

### 1.体重、血圧および血液生化学検査値

仔ラットの飼育期間を通して、各群の体重は順調に増加したが、12週齢以降のLPQ群の体重は、LPC群に比べて増加した(図3)。

各群の血圧および23週齢の血液生化学検査値は、群間において著しい差は認められなかった(図4、表2)。

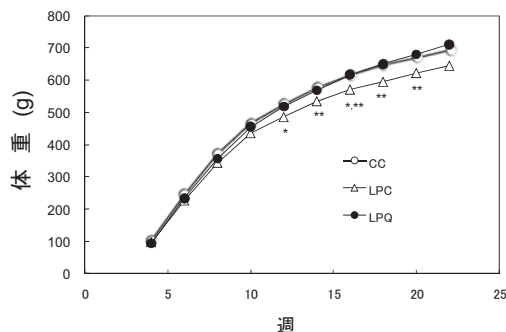


図3 離乳後の仔ラットの体重変化  
値は平均値±標準誤差 (n=8-13). \*p<0.05 vs CC, \*\*p<0.05 vs LPQ群

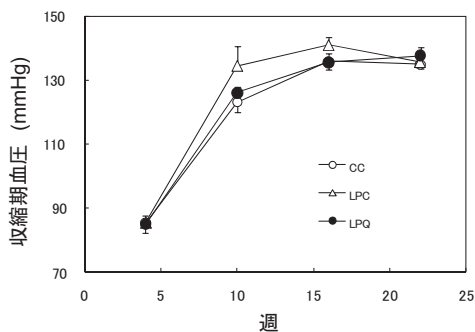


図4 収縮期血圧に及ぼす影響  
値は平均値±標準誤差 (n=7-13). \*p<0.05 vs CC, \*\*p<0.05 vs LPQ群

表2 血液生化学検査値

群	グルコース (mg/dl)	総コレステ ロール(mg/dl)	トリグリセリド (mg/dl)	尿素窒素 (mg/dl)	アルブミン (mg/dl)
CC	142.4 ± 4.1	68.2 ± 5.4	141.7 ± 22.6	13.8 ± 0.8	3.9 ± 0.1
LPC	148.2 ± 4.7	75.5 ± 5.6	146.3 ± 13.0	15.1 ± 0.6	3.9 ± 0.1
LPQ	149.8 ± 4.8	84.2 ± 10.0	200.6 ± 32.3	15.4 ± 0.7	3.9 ± 0.1

CC, 対照群。LPC, 妊娠期は8%蛋白質餌を与え、授乳期は20%蛋白質餌を与えた。LPQ群, 妊娠期は8%蛋白質餌を与え、授乳期は0.2%ケルセチンを添加した20%蛋白質餌を与えた。産まれた仔ラットは、23週齢まで標準動物飼料で飼育した。値は平均値±標準誤差 (n=7-13)。

## 2.大動脈中のスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)産生量に及ぼすケルセチンの影響

大動脈のNADPHオキシダーゼ由来のO<sub>2</sub><sup>-</sup>量を、本酵素の基質であるNADPHを添加し、測定した結果、CC群に比べてLP群でやや高値の傾向がみられたが、有意な差は認められなかった(図5)。

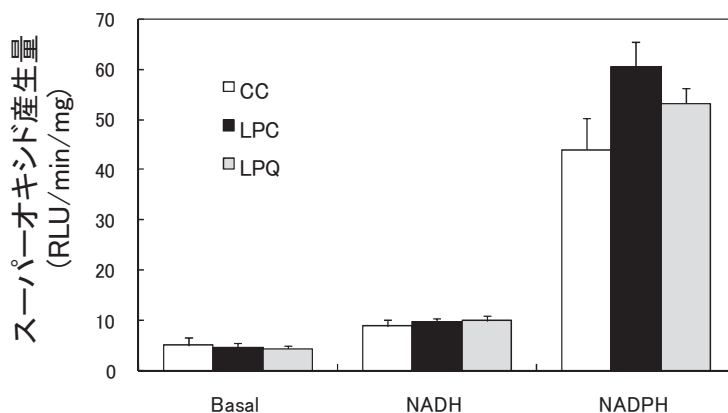


図5 大動脈のスーパーオキシド産生量に及ぼすケルセチンの影響  
値は平均値±標準誤差 (n=7-12)で示し、単位は、重量1 mgあたりのRelative light unit (RLU)/minで表した。本酵素の基質NADH (100μmol/l) あるいはNADPH (100μmol/l)を添加した。Basalは、無添加を示す。

### 3.24時間尿中のNO代謝物 (NOx)量に及ぼすケルセチンの影響

血圧上昇には、レニン-アンジオテンシン系が中心的に関与するが、活性酸素種、特に、O<sub>2</sub>を介した血管内皮機能異常も血圧上昇の重要な因子の一つである<sup>6)</sup>。さらに、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) により産生される一酸化窒素 (NO) は、血管拡張作用を有する。O<sub>2</sub>の増加やNOの低下は、血管内皮機能異常を引き起こし、血管平滑筋層の増殖や肥厚、炎症、血栓の形成、リモデリングなどを起こすと考えられている。

タマネギ、リンゴ、紅茶のような食品に含まれているケルセチンは、抗酸化作用や抗血圧上昇作用を有していることが知られている<sup>7)</sup>。本研究では、母ラットに授乳期を通して離乳までにケルセチンを投与したLPQ群では血圧上昇の抑制はみられなかったが、血管弛緩作用をもつNOの代謝物である尿中NOx濃度は、LPC群に比べてLPQ群で高値であった(図6)。またNOを産生する酵素の一つであるeNOSの総発現量およびリン酸化したeNOS量は、LPC群に比べてLPQ群で増加していた(図7)。このことから、妊娠期に低蛋白質状態とした母ラットに授乳期を通して離乳時まで与えたケルセチンは、仔ラットの成長後のNO代謝や肝臓中のeNOS活性に影響を及ぼすことが考えられた。

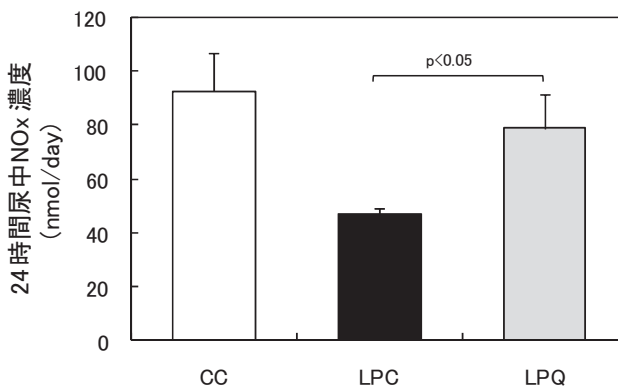


図6 24時間尿中のNOx濃度に及ぼすケルセチン影響  
値は平均値±標準誤差(n=8-12)\* $p < 0.05$  vs CC, \*\* $p < 0.05$  vs LPQ群

### 4.肝臓中のAMPキナーゼ発現量に及ぼすケルセチンの影響

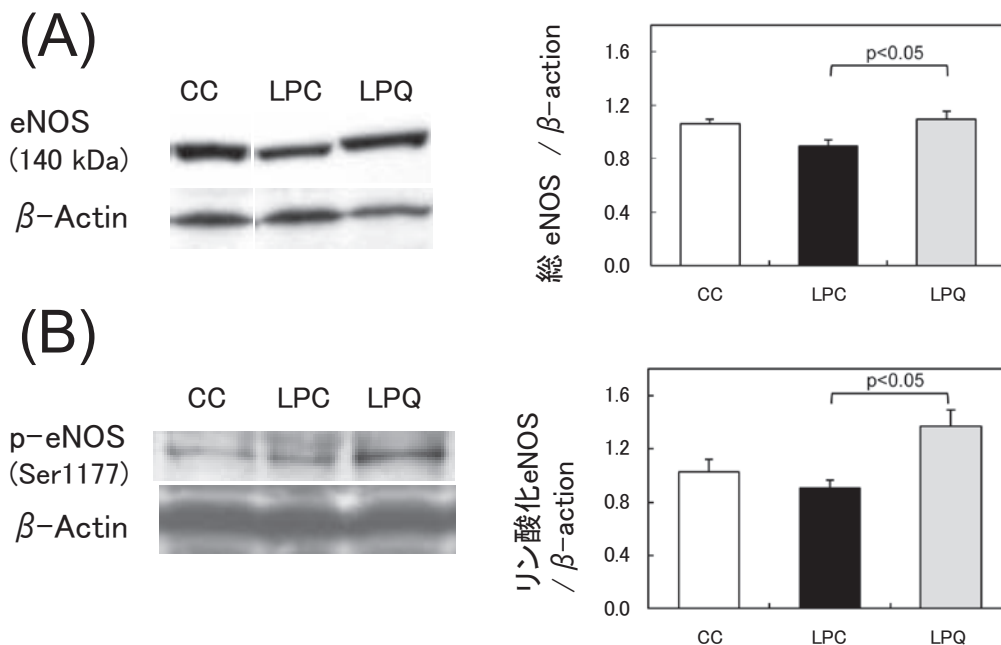


図7 肝臓中の内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現量に及ぼすケルセチンの影響  
値は、平均値±標準誤差(n=8-11)

AMPキナーゼ (AMPK)は、細胞内のエネルギーレベルの低下、すなわちAMP/ATP比の上昇によって活性化する酵素であり、生体のエネルギー代謝の調節に重要な役割を果たすことが知られている。

本研究では、妊娠期に8%蛋白質餌を母ラットに与え、その後、授乳期を通して離乳までケルセチン含有20%蛋白質餌を与えて、成長した仔ラットの肝臓のエネルギー代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、総AMPK発現量は、各群間に差はみられなかったが、リン酸化したAMPK量は、CC群やLPC群に比べてLPQ群で有意に増加していた (図8)。また、LPC群のリン酸化AMPK量はCC群に比べて、やや増加していた。ケルセチンを腫瘍細胞や脂肪細胞に添加すると、リン酸化AMPK量は増加し、活性化することが報告されている<sup>8,9)</sup>。本研究の結果から、授乳期から離乳時まで母ラットに投与したケルセチンは、成長した仔ラットの肝臓において、AMPKのリン酸化を増強することが示唆された。

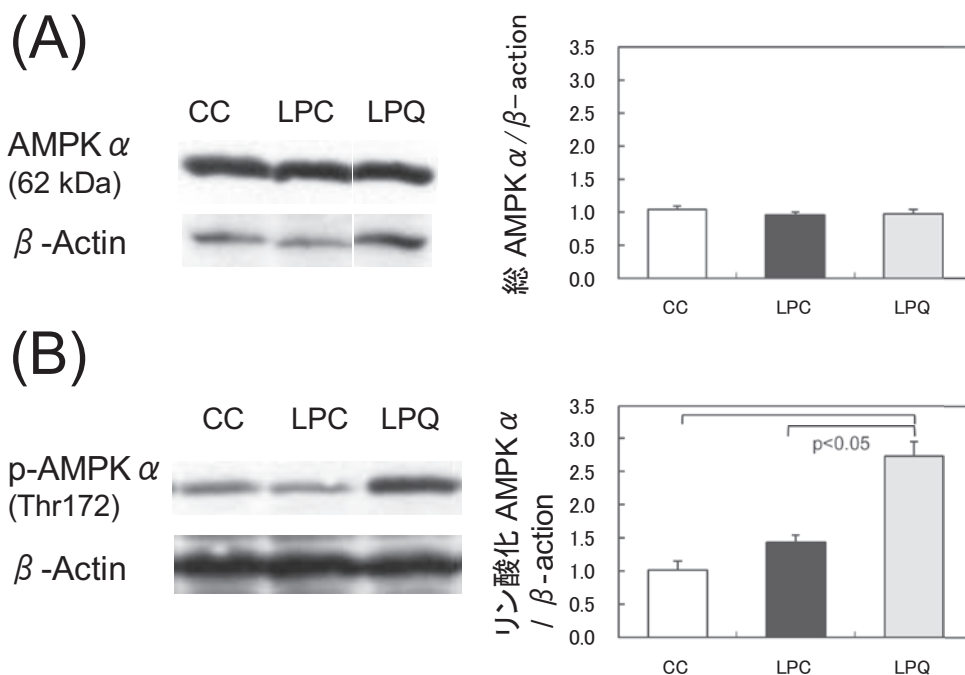


図8 肝臓中のAMPキナーゼ発現量に及ぼすケルセチンの影響  
値は、平均値±標準誤差 (n=8-11)

これらの結果から、メカニズムは明らかではないが、胎児期に低栄養に曝された母ラットに授乳期から離乳時まで投与したケルセチンは、成長後の仔ラットの肝臓中のAMPKを活性化させる可能性が示唆された。

## まとめ

胎児期低栄養に起因する高血圧、肥満、糖・脂質代謝異常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、妊娠期に低栄養 (低蛋白) に曝された母ラットに授乳期から離乳時までケルセチン含有餌を摂取させ、成長後の仔ラットの血圧およびエネルギー調節機構に及ぼす影響を検討した。その結果、飼育期間を通して、体重は順調に増加したが、12週齢以降のLPQ群の



体重は、LPC群に比べて増加した。各群の血圧には、有意な差はみられなかったが、血管弛緩作用を有するNOの尿中代謝物濃度は、LPC群に比べてLPQ群は高値を示した。加えて、血管内皮のNO産生酵素であるeNOSがLPQ群の肝臓で活性化していた。一方、LPQ群の肝臓では、リン酸化AMPK量がCC群やLPC群に比べて増加した。

これらの結果から、胎児期低栄養ラットのモデルにおいて、LPQ群の体重はLPC群に比べて増加したものの、授乳期の母ラットのケルセチン摂取は、成長後仔ラットのNO代謝やAMPKのシグナル経路を亢進させる可能性が示唆された。しかしながら、本研究で見出された現象のメカニズムの解明は、今後の研究課題であり、加えて、他の植物ポリフェノールにおいてもこのような現象が生じるかを検討することは重要であると思われる。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました財団法人アサヒビール学術振興財団に深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Barker DJ, et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341, 938-941,1993.
- 2) Nuyt AM and Alexander BT. Developmental programming and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 18, 144-152, 2009.
- 3) Duarte J, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 133, 117-124, 2001
- 4) Sato S, et al. Effect of polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35, 43-49, 2008.
- 5) Mukai Y and Sato S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19, 491-497, 2009.
- 6) Schnackenberg CG, et al. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension.* 32, 59-64, 1998
- 7) Perez-Vizcaino F, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep.* 61, 67-75, 2009.
- 8) Lee YK, et al. AMP kinase/cyclooxygenase-2 pathway regulates proliferation and apoptosis of cancer cells treated with quercetin. *Exp Mol Med.* 41, 201-207, 2009.
- 9) Ahn J, et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 373, 545-549, 2008.