

宮崎大学大学院

博士学位論文

脂質代謝調節に関する食品機能学的研究

2023年3月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科

生物機能応用科学専攻

田中航

目次

略語	4
序論	5
第 1 章 黒大豆 (<i>Glycine max</i> L.) 種皮ポリフェノールの日常的な摂取はアポリポタンパク質 E 欠損マウスにおける脂質異常症を軽減させる。	6
1. 1. 背景	7
1. 2. 方法	8
1. 2. 1. 材料	8
1. 2. 2. 研究計画書の機関承認	8
1. 2. 3. 動物飼育, 飼料, 実験	8
1. 2. 4. 血液生化学指標およびアディポカインの測定	9
1. 2. 5. 肝臓中の脂質量の測定	10
1. 2. 6. RNA 抽出	10
1. 2. 7. mRNA 発現量の測定	10
1. 2. 8. 脂質吸収阻害試験	11
1. 2. 9. 統計解析	11
1. 3. 結果	12
1. 3. 1. 成長パラメーターおよび臓器重量	12
1. 3. 2. 血液生化学指標	13
1. 3. 3. 肝臓中の脂質量	14
1. 3. 4. 肝臓中の脂質代謝系酵素の遺伝子発現量	15
1. 3. 5. 血清代謝ホルモン値の測定	16
1. 3. 6. 脂質吸収阻害試験	17
1. 4. 考察	18
第 2 章 妊娠母体マウスのケルセチン摂取が次世代のコレステロール代謝へ与える影響	20
2. 1. 背景	21
2. 2. 方法	22
2. 2. 1. 試薬	22
2. 2. 2. 動物実験	22
2. 2. 2. 1. 研究計画書の機関承認	22
2. 2. 2. 2. 動物	22
2. 2. 2. 3. 繁殖	23
2. 2. 2. 4. 実験計画	23
2. 2. 2. 5. 試料採取	24
2. 2. 3. 生化学指標	25

2.2.3.1. 血液生化学指標およびアディポカインの測定	25
2.2.3.2. 肝臓中の脂質量の測定	25
2.2.4. 統計解析	25
2.3. 結果	26
2.3.1. 母親のケルセチン摂取が新生児の生物学的および血液パラメーターに与える影 響	26
2.3.2. 母親のケルセチン摂取が HF 食を摂取した子供の生物学的パラメーターに与え る影響	27
2.3.2.1. 摂食量, 体重, 臓器重量への影響	27
2.3.2.2. 血液生化学パラメーターに対する影響	29
2.3.2.3. 血中代謝ホルモンおよびマイオカインに対する影響	30
2.3.2.4. 肝臓脂質量に対する影響	30
2.4. 考察	31
第3章 ω-3系多価不飽和脂肪酸合成関連因子の発現リズムが体内脂肪酸組成に与える影 響	34
3.1. 背景	35
3.2. 方法	36
3.2.1. 試薬	36
3.2.2. 研究計画書の機関承認	36
3.2.3. 動物飼育, 飼料, 実験計画	36
3.2.4. 肝臓脂質分析	38
3.2.5. 血液・肝臓脂肪酸分析	39
3.2.6. RNA 抽出	39
3.2.7. mRNA 発現量の測定	39
3.2.8. 統計解析	40
3.3. 結果	41
3.3.1. 脂肪酸単回摂取時の血中脂肪酸組成	41
3.3.2. 油脂単回摂取時の血中脂肪酸組成	42
3.3.3. 継続的な摂取が体内脂肪酸組成に与える影響	43
3.3.4. 脂肪酸合成酵素に与える油脂の継続的な摂取の影響	44
3.4. 考察	45
総括	47
参考文献	48
本発表に関して公表された学術論文	57
謝辞	58

略語

α -LA	:	α -Linolenic acid
ApoE ^{-/-}	:	Apolipoprotein E-deficient
BE	:	Black soybean seed coat extract
BMI	:	Body mass index
C-C	:	Progeny of mothers fed the C-diet that were also fed the C-diet
C-diet	:	AIN-93G (control) diet
C-HF	:	Progeny of mothers fed the C-diet that were fed the HF diet
CN	:	AIN-93M based control diet used in this study
<i>Cyp7a1</i>	:	Cholesterol 7 α -hydroxylase
DHA	:	Docosahexaenoic acid
DOHaD	:	Developmental Origins of Health and Disease
<i>Elovl</i>	:	Elongase
EPA	:	Eicosapentaenoic acid
<i>Fads</i>	:	Fatty acid desaturase
<i>Fasn</i>	:	Fatty acid synthase
GIP	:	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide
HDL	:	High density lipoprotein
HF	:	30% High-fat
<i>Hmgcoar</i>	:	3-Hydroxy-3-methyl glutamyl coenzyme A reductase
MCP-1	:	Monocyte chemotactic protein-1
OFD	:	30% Olive oil diet
PFD	:	30% Perilla oil diet
<i>Ppara</i>	:	Peroxisome proliferator-activated receptor α
PUFA	:	Polyunsaturated fatty acid
Q-diet	:	AIN-93G diet containing 1.0% quercetin diet
Q-HF	:	Progeny of mothers fed the Q-diet that were fed the HF die
WHO	:	The World Health Organization

序論

近年、脂質の摂取量が増加した食生活、いわゆる食の欧米化に伴う肥満症や脂質異常症などの生活習慣病の罹患率上昇が問題視されている。肥満は過剰な脂肪の蓄積、特に腹部脂肪組織で蓄積した状態を指し、世界保健機関 (World Health Organization, WHO) は BMI (Body mass index) 値で肥満の状態を、肥満状態 ($\text{BMI} \geq 25.0 \text{ kg/m}^2$) および高度肥満 ($\text{BMI} \geq 30.0 \text{ kg/m}^2$) に分類分けしている[1]。高度肥満状態は 2 型糖尿病や心血管疾患などの症状のリスクを上昇させる可能性がある[2]。世界中の肥満有病率は 2025 年までに男性で 18%、女性で 21% を超え、先進国では重度の肥満が男性で 6%、女性で 9% を超えると推定されている[3]。肥満関連疾患の経済的負担は 2030 年までに米国で年間 500 億\$, 英国で年間 19-20 億£ と推定されている[4]。従って、肥満や肥満に由来する症状の予防策を見出すことは喫緊の課題である。

脂質代謝に異常が発生すると脂質異常症 (高脂血症) などの疾患につながる可能性が高くなる。脂質異常症とは血中脂質濃度が異常値を示す疾患をいい、具体的には、(1) トリグリセリド濃度が 150 mg/dL 以上、(2) LDL-コレステロール濃度が 140 mg/dL 以上、(3) HDL-コレステロール 40 mg/dL 未満のうち、一つでも該当した場合に脂質異常症と診断される[5]。また、脂質異常症は心血管疾患の主要な危険因子であると言われている[6]。故に、生体内で生じる脂質代謝系の攪乱を未然に防ぐことは、脂質異常症などの疾患や体重増加を予防するための重要な課題である。

近年の研究では脂質代謝系と食品成分の關係に着目した研究が広く行われており、食品成分が脂質の吸収や蓄積を阻害したり、エネルギーの燃焼を促進したりすることで肥満を予防する可能性があることが報告されている。例えば、緑茶カテキンやカカオオリゴマープロシアニジン、グルコマンナンは脂質吸収を低下させることが報告されている[7-10]。また、果実に存在する天然のポリフェノール化合物であるレスベラトロールはゼブラフィッシュの AMP-activated protein kinase α (AMPK α), Sirtuin 1 (Sirt1), Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) を介して脂質代謝を調整することが示されている[11]。さらに、唐辛子のカプサイシンは Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) チャンネルを活性化し、褐色脂肪を活性化することでエネルギー消費を増強させることが報告されている[12]。このように日常的に摂取する食品や食品成分には、過剰な体重の増加予防に寄与する可能性がある。

そこで本学位論文では、脂質代謝系を調節できる食品や食品成分の機能を探究することを目的とし、脂質異常症 (第 1 章)、次世代の健康 (第 2 章)、体内脂肪酸組成 (第 3 章) に与える影響について評価した。

第 1 章

黒大豆 (*Glycine max* L.) 種皮ポリフェノールの
日常的な摂取はアポリポタンパク質 E 欠損
マウスにおける脂質異常症を軽減させる。

This chapter is based mainly on:

Tanaka W., Matsuyama H., Yokoyama D., Yamashita Y., Ashida H., Sakono S., Sakakibara H.
“Daily consumption of black soybean (*Glycine max* L.) seed coat polyphenols attenuates
dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice” *Journal of Functional Foods*. 72:104054, 2020

1. 1. 背景

ここ数十年の間で、特に先進国では食生活のパターンが、欧米型の食事に変化している。そのような食事は脂質・精製糖の割合が高く、複合炭水化物と食物繊維量が比較的少なく、果物や野菜の摂取量も少ない[13]。このような食事の日常的な摂取は脂質異常症を引き起こし、動脈硬化や脂肪肝、糖尿病などの変性疾患の主要因子となり得る[14-17]。従って、これらの変性疾患を予防するためには脂質異常症の予防策を確立することが重要である。

大豆(*Glycine max* L.)は東アジア原産のマメ科植物であり、食用豆として広く栽培されている。大豆の種皮の色は主に緑色と黒色の 2 種類に大別される[18]。黒大豆の種皮はアントシアニン色素によって強い紫色を呈しており、さらに(+)-カテキンや(-)-エピカテキン、プロシアニジン B2, プロシアニジン C1, シンナムタンニン A2 などのフラバン 3-オール(Figure 1-1)などのポリフェノールが多様かつ豊富に含まれている[19-21]。これらのポリフェノールは抗酸化活性などの有益な効果を発揮する機能性物質である[22, 23]。黒大豆種皮およびその抽出物の摂取は動物モデルにて有益な効能と関連しており、例えばベンゾ[a]ピレンや酸化から誘発された DNA 損傷に対する保護、抗糖尿病効果、高血糖、インスリン感受性の改善、血管機能の改善効果が報告されている[22, 24-27]。また、クスノキらは黒大豆抽出物がフェノフィブラート処理した 2 型糖尿病マウスの脂質プロファイルを改善することを見出した[28]。しかし、黒大豆の脂質異常症に対する *in vivo* での機能はほとんど報告されていない。

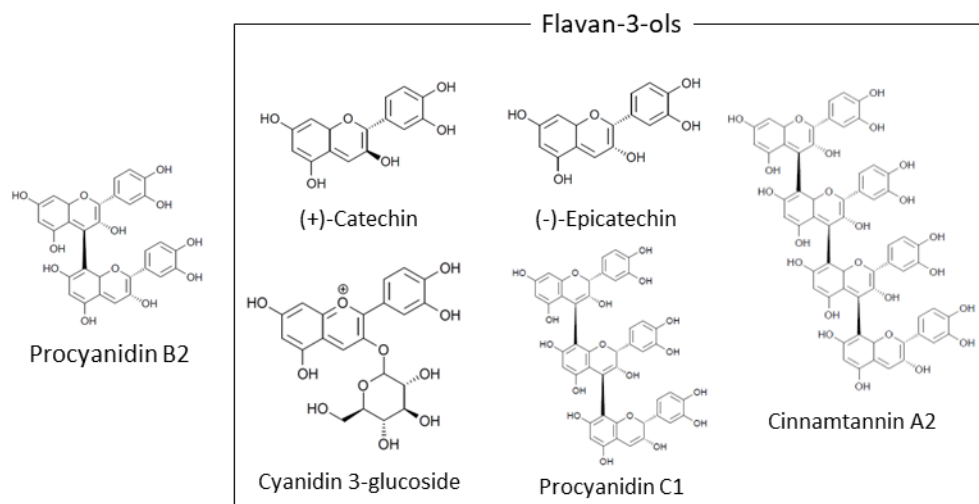


Figure 1-1. Chemical structures of major polyphenols in the black soybean seed coat extract. (Based on [29])

そこで本章では、高脂肪食を与えたアポリポタンパク質 E 欠損(ApoE^{-/-})マウスの動脈硬化モデルにおいて、黒大豆種皮ポリフェノールが血中および肝臓中の脂質レベルを改善するかどうかを検討し、そのメカニズムを調査した。

1.2. 方法

1.2.1. 材料

黒大豆種皮抽出物(BE)はフジッコ株式会社(兵庫)から入手した。BEは、黒大豆の種皮を酢酸溶液とエタノール溶液で抽出し、得られた抽出物を精製した後に噴霧乾燥して粉末化したものを使用した[30]。HPLCで測定した既報によると、BEにはエピカテキン 6.2%、プロシアニジン 39.7% (二量体 6.1%, 三量体 3.4%, 四量体 0.5%), シアニジン-3-グルコシド 9.2%が含まれていた[31]。BEの主要なポリフェノールの構造式は Figure 1-1 に示す。セルロース, α -コーンスターチ, β -コーンスターチ, シュークロースはオリエンタル酵母工業株式会社(東京)から購入した。カゼイン, 大豆油, L-シスチン, *t*-ブチルヒドロキノンは富士フィルム和光純薬株式会社(大阪)から購入した。ビタミン MIX (AIN-93-VX), ミネラル MIX (AIN-93M-MX) およびラードは MP Biomedicals, LLC (CA, 米国)より購入した。他の試薬は全て特級を使用した。

1.2.2. 研究計画書の機関承認

全ての動物実験は宮崎大学の施設動物管理使用委員会の承認を得た(承認番号 2018-008)。本章は「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)に基づき, 3R (Replacement, Reduction, Refinement)に従って実施した。

1.2.3. 動物飼育, 飼料, 実験

7 週齢の雄性 BALB/c.KOR/StmSlc-Apoesh1 ($ApoE^{-/-}$) マウスおよびその野生型マウス (BALB/c[$ApoE^{+/+}$]) マウスを日本エスエルシー(静岡)から入手し, 室温 $23 \pm 2^{\circ}C$, 湿度 $55 \pm 5\%$ の動物飼育屋で 1 ケージ(幅 235×奥行 165×高さ 125 mm)あたり 3 匹で飼育した。明期開始を午前 9 時, 暗期開始を午後 9 時とし, 脱イオン水および粉末の AIN-93M 食 (Table 1-1)を自由摂取させた。

Table 1-1. Composition of the AIN-93M based high-fat diet (%).

Constituents (%)	AIN-93M	Experimental diet	
		CN	CN + BE
β -Cornstarch	46.57	30.57	29.57
α -Cornstarch	15.5	15.5	15.5
Casein	14.0	14.0	14.0
Soybean oil	4.0	4.0	4.0
Lard	–	16.0	16.0
Sucrose	10.0	10.0	10.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture (AIN-93-VX)	1.0	1.0	1.0
Mineral mixture (AIN-93M-MX)	3.5	3.5	3.5
L-Cysteine	0.18	0.18	0.18
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.0008	0.0008	0.0008
Black soybean seed coat extract (BE)	–	–	1.0

1 週間馴化後, ApoE^{-/-}および野生型マウスを Hoang らが報告した改変方法に従って 2 群に分けた[32]。一つ目の群には Table 1-1 に示した 20%の脂肪を含有した AIN-93M 改変対照食 (CN) を, もう一つの群には BE を 1.0%含む CN 食 (CN+BE) を与えた。8 週間後, 絶食せずに 1.5%のイソフルラン麻酔下で腹部大静脈から採血し, 血清キャピジェクトチューブ (Terumo Medical Corporation, NJ, 米国) に回収した。室温で 30 分後, 3500×g, 90 秒の遠心分離で血清を分離し, 分析まで-80°Cで保存した。肝臓, 腎臓, 脾臓, 副睾丸脂肪, 腎臓周囲脂肪の重量を測定した。肝臓の一部を液体窒素中で急速凍結した後, 脂質分析のために-80°Cで保存した。さらに別の肝臓の一部を約 3 mm 角に切り出し, RNALater® (Ambion Inc., TX, 米国) 中に 4°Cで1晩浸した後, RNA 抽出するために-20°Cで保存した。

1. 2. 4. 血液生化学指標およびアディポカインの測定

血液生化学指標 (トリグリセリド, 総コレステロール, グルコース, 総タンパク質) は, Dri-Chem 4000v 化学分析装置 (富士フィルム株式会社, 東京) をそれぞれのカートリッジを用いて測定した。インスリン, レプチン, レジスチン, C-ペプチド 2, グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) は, マルチプレックスアッセイシステム (MAGPIX® System, Luminex Co., TX, 米国) と, 各因子のビーズを含んだマウス代謝ホルモンパネル (MMHMAG-44, Millipore, MO, 米国) を用いて測定した。

1. 2. 5. 肝臓中の脂質量の測定

肝臓片からの脂質は先行研究に基づいて測定した[33]。具体的には、凍結保存した肝臓(200 mg)をサンプルチューブ(TM-626S;株式会社トミー精工, 東京)に秤量し, 氷冷した 50 mM 酢酸ナトリウム水溶液(1 mL)と 5 mm のビーズ(株式会社ニッカトー, 大阪)を 1 個加えたのち, ビーズ破砕器(Micro Smash™ MS-100;株式会社トミー精工, 東京)を用いて破砕した(3000 rpm, 90 秒)。その後, 6 mL のクロロホルム-メタノール(2:1 [vol/vol])を加えて40°Cで30分間インキュベートした。10 分間遠心分離(3000 rpm, テーブルトップ冷却遠心機 2800;久保田商事株式会社, 東京)した後, 500 μ L のクロロホルム相を回収し, 遠心濃縮機(CC-105;株式会社トミー精工, 東京)を用いて乾固した。次に, 10 % Triton X-100 含有イソプロピルアルコール溶液(200 μ L)に再溶解した後, トリグリセリド, 総コレステロール, リン脂質の濃度を和光純薬工業株式会社の測定キットを用いて測定した。

1. 2. 6. RNA 抽出

RNAlater に浸漬した肝臓試料から, QuickGene RNA tissue kit SII (RT-S2) および QuickGene-Mini80 (倉敷紡績株式会社, 大阪)を用いて RNA を抽出した。RNA 濃度は Qubit® RNA 測定キットと Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, MA, 米国)を用いて測定した。抽出した RNA は PrimeScript® RT reagent kit (RR037; タカラバイオ株式会社, 滋賀)を用いて, 最終濃度(400 ng/mL)となるように以下の条件で cDNA に逆転写した:37°C15 分で逆転写反応, 85°C5 秒で逆転写酵素を熱失活, 4°Cで保持した。

1. 2. 7. mRNA 発現量の測定

逆転写した cDNA を中の遺伝子発現量を, AriaMx real-time PCR system (Agilent Technologies, Inc., CA, 米国)を用いて定量した。試験に用いたプライマー配列を Table 1-2 に示す (Eurofins Genomics Ltd., 東京)。具体的には, 5 μ L の Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green Mater Mix (Agilent Technologies Inc.), DNase/RNase-free water (3.5 μ L), および各プライマー溶液(0.5 μ L)を含む 9.5 μ L の PCR 混合液に cDNA 溶液(0.5 μ L)を添加し, 以下の条件で解析に供した:50°C 2 分間, 95°C 10 分間で初期活性化, 95°C 30 秒間で変性, 65°C 30 秒間でアニーリング, 72°C 30 秒間で伸長のサイクルを 45 回繰り返した。それぞれの遺伝子発現量は, ハウスキーピング遺伝子 (*Gapdh*)に対する相対発現量($\Delta\Delta C_t$ 法)として算出した。

Table 1-2. The primers used for quantitative reverse transcription (RT)-PCR reaction.

Primer		Sequences (5'→3')
<i>Cyp7a1</i>	Forward	GCTGTGGTAGTGAGCTGTTG
	Reverse	AGGAGGTTACCTACTTTCCTT
<i>Hmgcoar</i>	Forward	AGCTTGCCCGAATTGTATGTG
	Reverse	TCTGTTGTGAACCATGTGACTTC
<i>Ppara</i>	Forward	AGAGCCCATCTGTCCTCTC
	Reverse	ACTGGTAGTCTGCAAACCAAA
<i>Fasn</i>	Forward	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT
	Reverse	TGGGTAATCCATAGAGCCAG
<i>Gapdh</i>	Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTG
	Reverse	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1. 2. 8. 脂質吸収阻害試験

雄性 Sprague-Dawley ラット(8 週齢)を日本エスエルシー(静岡)から購入したのち、上述の動物飼育室にて 1 週間馴化した後に 12 時間絶食し、以下の 4 つの投与群に分けた。

- (1) 油未投与(イオン交換水)群
- (2) 溶媒(0.5 % カルボキシメチルセルローズ[CMC])群
- (3) ポジティブコントロール(腓リパーゼ阻害剤; Orlistat(東京化成工業株式会社, 東京) 60 mg/10 mL)群
- (4) 黒大豆種皮抽出物(500 mg/10 mL)群

12 時間絶食後に各試料を経口投与(5 mL/kg BW)した 30 分後にコーン油を経口投与(5 mL/kg BW)した。コーン油投与直後(0), 2, 4, 6 時間後にイソフルラン麻酔下(2.0%)で尾静脈から採血し、遠心分離(3500×g, 90 秒)により血清画分を得た。血清画分中のトリグリセリド濃度を上述の Dri-Chem 4000v 化学分析装置(富士フィルム株式会社, 東京)を用いて分析した

1. 2. 9. 統計解析

データは平均値±標準誤差(SEM)で示した。統計解析は StatView for Windows (version 5.0, SAS Institute, NC, 米国)を用いて二元配置分散分析(ANOVA)を行った後、Tukey-Kramer 法を用いて解析し、有意水準 5%未満の場合は統計学的に有意差ありと判定した($p < 0.05$)。

1.3. 結果

1.3.1. 成長パラメーターおよび臓器重量

体重増加量と摂食量は CN 食を摂取した野生型マウスと ApoE^{-/-}マウスで同程度であった (Table 1-3)。BE 含有食を摂取しても体重を減少させる効果はなかった。CN 食を摂取した ApoE^{-/-}マウスでは肝臓重量が有意に増加したが、BE 含有食摂取群では有意に抑制された (Table 1-3)。副睾丸脂肪および腎臓周囲脂肪重量も BE 含有食摂取群では減少傾向を示した。腎臓および脾臓重量は全ての群で変化はなかった。

Table 1-3. Effects of BE consumption on growth parameters and organ weights.

	Wild type		ApoE ^{-/-}	
	CN	CN+BE	CN	CN+BE
Growth parameters				
Body weight (g; week 0)	23.9 ± 0.4 ^a	23.7 ± 0.5 ^a	23.5 ± 0.5 ^a	23.1 ± 0.6 ^a
Body weight (g; week 8)	29.3 ± 0.5 ^a	28.1 ± 0.7 ^a	28.0 ± 0.8 ^a	26.5 ± 0.9 ^a
Body weight gain (g)	5.4 ± 0.4 ^a	4.4 ± 0.7 ^a	4.5 ± 0.8 ^a	3.4 ± 0.7 ^a
Food intake (g/day)	2.7 ± 0.1 ^a	2.6 ± 0.1 ^a	2.8 ± 0.1 ^a	2.7 ± 0.1 ^a
Organ weights (g/100 g body weight)				
Liver	3.80 ± 0.10 ^{ab}	3.45 ± 0.05 ^a	4.72 ± 0.20 ^c	4.09 ± 0.12 ^b
Kidney	1.46 ± 0.04 ^a	1.34 ± 0.05 ^a	1.44 ± 0.04 ^a	1.37 ± 0.03 ^a
Spleen	0.43 ± 0.03 ^a	0.45 ± 0.02 ^a	0.46 ± 0.01 ^a	0.40 ± 0.01 ^a
Epididymal fat	1.21 ± 0.11 ^a	0.94 ± 0.13 ^a	1.47 ± 0.13 ^a	1.24 ± 0.19 ^a
Perirenal fat	0.13 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.03 ^a	0.64 ± 0.06 ^b	0.56 ± 0.09 ^b

CN, AIN-93M based control diet used in this study; BE, black soybean seed coat extract. Data indicate mean ± SEM (n = 9). Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey–Kramer test).

1.3.2. 血液生化学指標

8 週間の摂食によって、血清総コレステロール値は CN 食を摂取した野生型マウスに比べて ApoE^{-/-}マウスで有意に高値を示した (Figure 1-2 A)。BE 含有食を摂取した ApoE^{-/-}マウスでは、血清総コレステロールが有意に低下し、血清トリグリセリドは低下傾向を示した (Figure 1-2 B)。血清グルコース値および血清総タンパク質値は全群で差が無かった (Figure 1-2 C, D)。

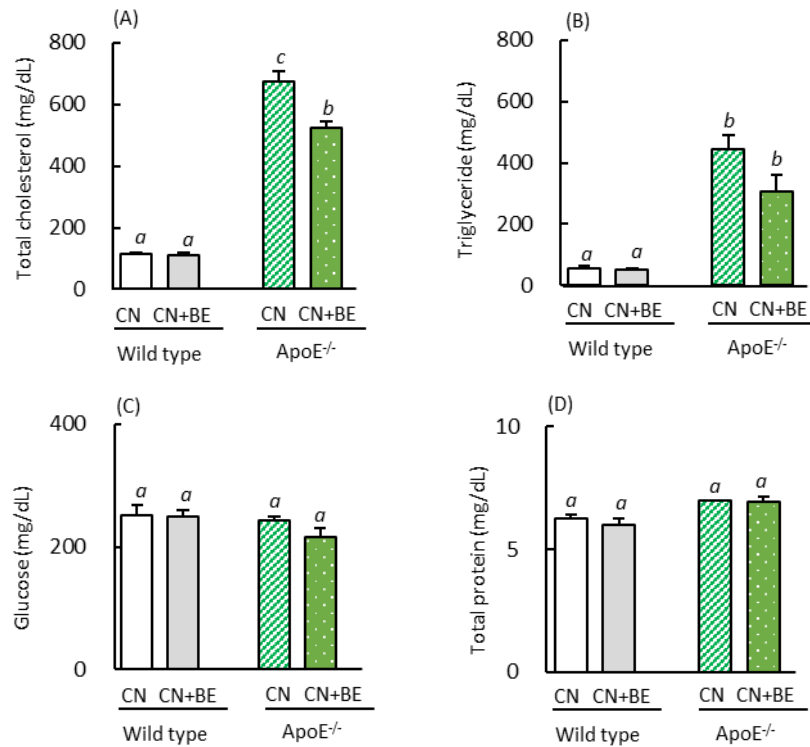


Figure 1-2. Effects of the black soybean seed coat extract (BE) on serum biochemical parameters in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice.

AIN-93 M based control diet (CN) and CN containing 1% BE diet (CN + BE). Data indicate serum biological parameters (means \pm SEM, n = 9). (A) Total cholesterol, (B) triglyceride, (C) glucose, and (D) total protein. Different alphabetical superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test).

1.3.3. 肝臓中の脂質量

主要な肝臓脂質であるトリグリセリド、総コレステロール、リン脂質の含量を Figure 1-3 に示す。CN 食を摂取した野生型マウスと ApoE^{-/-}マウス間で有意な差は確認されなかった (Figure 1-3 A-C)。一方、BE 含有食の摂取により、野生型マウスでは総コレステロールやトリグリセリド値が有意に減少した。

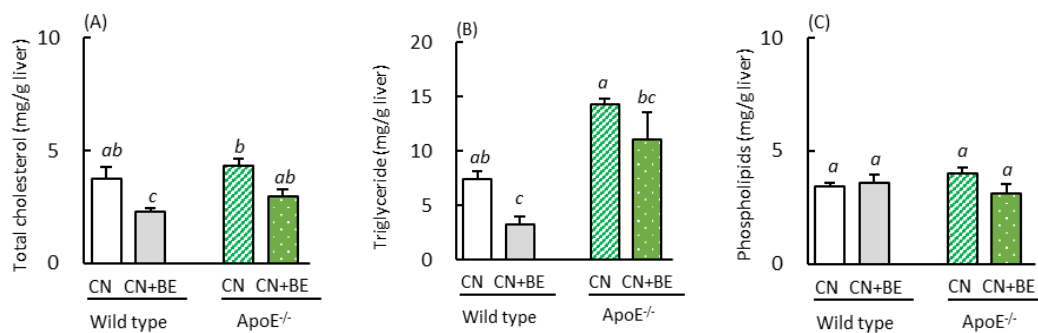


Figure 1-3. Effects of the black soybean seed coat extract (BE) on hepatic lipid levels in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice.

AIN-93 M based control diet (CN) and CN containing 1% BE diet (CN + BE). Data indicate hepatic lipid levels (means \pm SEM, n = 9). (A) Total cholesterol, (B) triglyceride, and (C) phospholipids. Different alphabetical superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test).

1.3.4. 肝臓中の脂質代謝系酵素の遺伝子発現量

肝臓中の脂質代謝系酵素の mRNA 発現量を Figure 1.4 に示す。主要なコレステロール代謝系酵素である *Cyp7a1* および *Hmgcoar* の mRNA 発現量は BE 食を摂取した *ApoE*^{-/-} マウスで CN 群と比較して有意に増加した (Figure 1-4 A, B)。脂肪酸および中性脂肪代謝に関連する遺伝子の発現量に関しては、BE 含有食を摂取した *ApoE*^{-/-} マウスは CN 食群に比べて、*Ppara* の mRNA 発現量が有意に高く、*Fasn* は増加する傾向が見られた (Figure 1-4 C, D)。

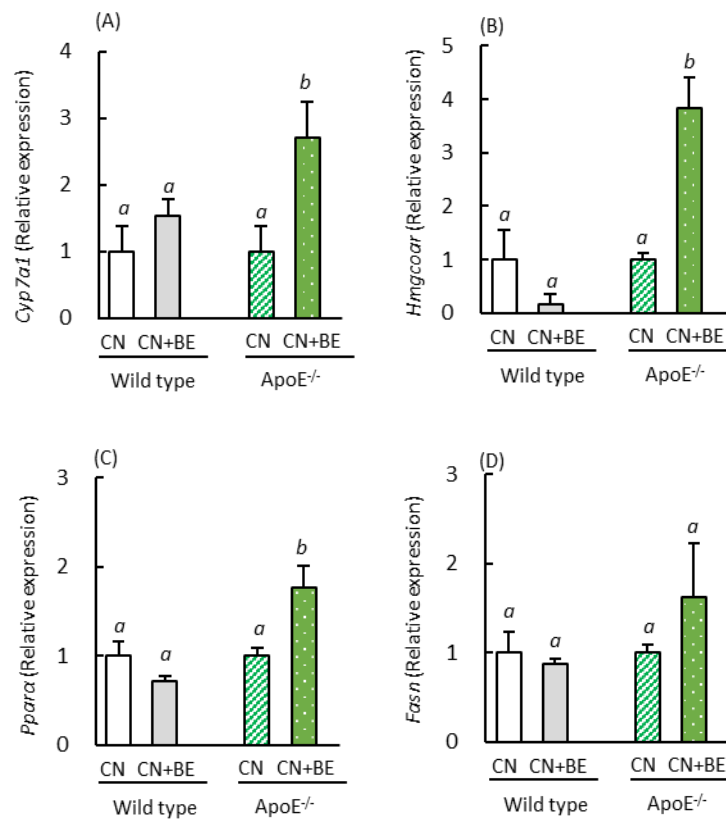


Figure 1-4. Effects of the black soybean seed coat extract (BE) on lipid metabolism related gene expression in apolipoprotein E-deficient (*ApoE*^{-/-}) mice.

AIN-93 M based control diet (CN) and CN containing 1% BE diet (CN + BE). Data indicate fold-change of the *Gapdh* control (means \pm SEM, n = 9). (A) *Cyp7a1*, (B) *Hmgcoar*, (C) *Ppara*, and (D) *Fasn*. Different alphabetical superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test).

1.3.5. 血清代謝ホルモン値の測定

ApoE^{-/-}マウス群でのインスリン、レプチン、レジスチン、C-ペプチド 2, GIP の血清レベルを測定した。これらのパラメーターは BE 含有食を摂取しても変化を与えなかった (Figure 1-5)。

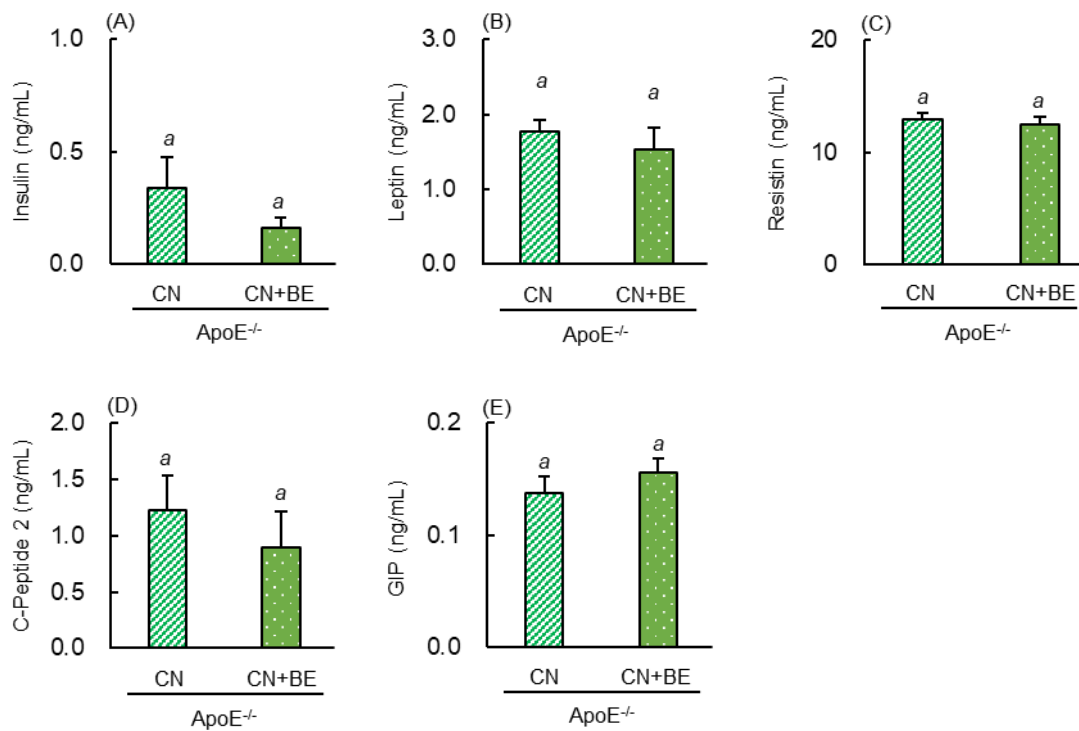


Figure 1-5. Effects of the black soybean seed coat extract (BE) on serum adipokine levels in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice.

AIN-93 M based control diet (CN) and CN containing 1% BE diet (CN + BE). Data indicate serum adipokine levels (means \pm SEM, n = 9). (A) Insulin, (B) leptin, (C) resistin, (D) C-peptide 2, and (E) glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). Different alphabetical superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test).

1.3.6. 脂質吸収阻害試験

Sprague-Dawley ラットを用いて BE の脂質吸収阻害試験を行った。コーン油を投与する 30 分前にポジティブコントロールであるオルリスタットを投与した群は、油未投与群と同様の値を示したことから、脂質の吸収を阻害することが示された。一方、BE を投与した群では有意な阻害効果を確認することはできなかった (Figure 1-6)。

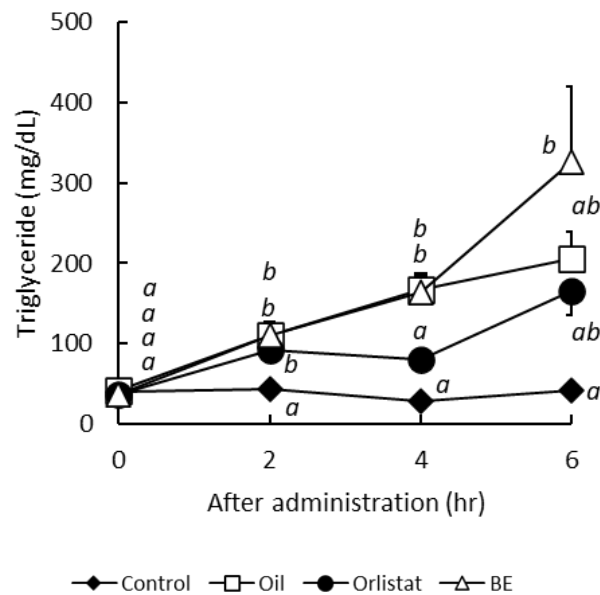


Figure 1-6. Effects of black soybean seed coat extract (BE) on lipid absorption in rats. Data indicate serum triglyceride levels (means \pm SEM, $n = 5$). Different alphabetical superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test).

1.4. 考察

黒大豆種皮抽出物の脂質異常症に対する予防効果を評価することを目的とした本章では BALB/c マウスを遺伝的背景に持った ApoE 欠損 (ApoE^{-/-}) マウスを使用した。ApoE^{-/-}マウスは ApoE 遺伝子を欠損しているが[34], 野生型マウスと同程度の体重を推移し, 健康状態も良好であることが報告されている[35]。本章で得た結果は野生型と ApoE^{-/-}マウスの体重増加は同程度であったので, 先行研究と一致する (Figure 1-3)。一方, ApoE^{-/-}マウスの血漿コレステロール値は野生型マウスと比較して著しく増加することが知られており[35], 本章で得られた結果も同様であった (ApoE^{-/-}, > 600 mg/dL; 野生型マウス, 100 mg/dL, Figure 1-2 A)。血清トリグリセリドについても同様のパターンを示した (Figure 1-2 B)。これらの結果は, ApoE^{-/-}マウスが野生型と同じ食餌を摂取した場合, 体重等には変化を与えることなく特異的に脂質異常症を発症したことを示している。

1.0%の BE 含有食を 8 週間摂取したところ, ApoE^{-/-}マウスの血清総コレステロールは有意に低下し, 血清トリグリセリドも低下する傾向を示した。この作用は, 野生型では見られなかった (Figure 1-2 A, B)。一方, BE 含有食を摂取した野生型マウスでは, 肝臓の総コレステロールおよびトリグリセリドレベルが低下した (Figure 1-3 A, B)。この効果は ApoE^{-/-}マウスでも確認されたが, その差は有意ではなかった。また, 栄養状態の指標として用いられる摂餌量 (Table 1-3) や血清総タンパク量 (Figure 1-2 D) には顕著な差は見られなかったことから, これらの作用は栄養失調に起因するものではない[36]。従って, これらの結果は, BE の日常的な摂取が脂質異常症に対する予防効果を発揮することを示している。

最近の研究により, 脂質異常症の予防には肝臓脂質代謝系の調節が重要であることが示されている。例えば, 0.06%のシアニジン-3-グルコシド含有食を ApoE^{-/-}に与えると, 肝臓 Cyp7a1 遺伝子発現が上昇し, 血中および肝臓中の総コレステロール値が減少することが報告されている[37]。本章でも同様の結果を確認した (Figure 1-2 A, 1-3 A, 1-4 A)。また, 本章で用いた BE には 9.2%のシアニジン-3-グルコシドが含まれており, 1% BE 添加飼料中の割合は 0.09% と算出されたことから, シアニジン-3-グルコシドは BE の有効成分の一つであると考えられる[31]。

3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase の阻害剤であるスタチンは強力なコレステロール低下作用を示すため[38], BE のコレステロール低下効果も同様の機序である可能性がある。しかしながら, 本章では BE 摂取により *Hmgcoar* の発現が増加した (Figure 1-4 B)。この理由は不明であるが, Huang らは (-)-エピガロカテキン-3-ガレート (EGCG) を摂取すると肝臓中の *Cyp7a1* の発現量が増加することを報告している[39]。CYP7A1 は胆汁酸合成の律速酵素であり, 肝臓内のコレステロールが過剰になると発現量が増加し, 肝臓への胆汁酸取り込みが増加すると発現量が低下することで, 胆汁酸合成量を調整している。胆汁酸の合成が促進されると, 基質としてより多くのコレステロールが使用され, 肝臓コレステロールレベルが低下するため, 本章で *Hmgcoar* の発現が BE によって刺激された理由を説明することができる。また, Huang らは EGCG 摂取後に肝臓の *Ppara* の発現が増加し, 肝臓のトリグリセリド濃度が低下することを報告しており, これは我々の知見と類似して

いる[39]。また、先行研究で、乳清タンパク質加水分解ペプチド摂取後にコレステロールやトリグリセリドの生合成およびその酵素活性に関連する肝臓遺伝子の発現低下を確認していることから[40]、本章で BE 摂取により遺伝子発現が調節されて CYP7A1 などの酵素の活性に変化が生じることが示唆された。さらに、BE の日常的な摂取が 2 型糖尿病マウスにおいて AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化を介して高血糖およびインスリン感受性を改善することが報告されている[25]。AMPK は脂肪分解や脂肪酸酸化、ケトジェネシスを促進し、コレステロール、脂肪酸、トリグリセリドの合成を弱まらせる栄養・エネルギーセンサーである[41]。従って、BE が AMPK へ与える作用は、本章における ApoE^{-/-}マウスのコレステロールを減少させるさらなるメカニズムの一部である可能性がある。

ApoE^{-/-}マウスに BE を摂取させた場合の効果についてより深く理解するために、脂質およびグルコースのホメオスタシスの調節因子であるアディポカインについてもいくつか検討した。レプチンは脂肪細胞から排泄されるホルモンであり、その発現は肥満と正の相関があるとされている[42]。

レジスチンは脂肪細胞から分泌され、血中レジスチンの上昇は動脈硬化や 2 型糖尿病のリスク上昇と関連している[43]。しかし、BE 含有食を摂取した ApoE^{-/-}マウスにおいてこれらのアディポカインの血中濃度に影響を与えなかった (Figure 1-5)。

BE の脂質異常症予防効果として推定される機序の一つに、脂質吸収抑制効果がある[42]。ApoE^{-/-}マウスでは、非絶食下で血清トリグリセリドが野生型マウスに比べ有意に増加していたが、BE を毎日摂取することによりその値は減少する効果を示した (Figure 1-2 B)。一方、ラットにコーン油を経口投与した時、BE は脂質吸収阻害作用を示さなかったことから、BE による抗高脂血症の機構は脂質吸収阻害作用とは無関係であることが示唆された (Figure 1-6)。

以上の結果より、BE の日常的な摂取は ApoE^{-/-}マウスの血中および肝臓中のコレステロールおよびトリグリセリド濃度に影響を与え、その結果、脂質異常症を予防できる可能性があると考えた。この作用は、正常状態よりもむしろ脂質異常状態で顕著に発揮される。主な有効成分としては、シアニジン-3-グルコシドやカテキン等のポリフェノールが考えられ、これらが肝臓の *Cyp7a1* および *Ppara* mRNA の発現を上昇させることにより効果を発揮することが推定される。この結果は、食事添加物としての黒大豆種皮が脂質異常症、ひいては動脈硬化を予防する可能性があることを示唆している。

第2章

妊娠母体マウスのケルセチン摂取が次世代の コレステロール代謝へ与える影響

This chapter is based mainly on:

Takashima M., Tanaka W. (equal contribution), Matsuyama H., Tajiri H., Sakakibara H. “Maternal quercetin consumption during pregnancy may help regulate total cholesterol/HDL-cholesterol ratio without effect on cholesterol levels in male progeny consuming high-fat diet” *Nutrients*, 13(4):1242, 2021.

2. 1. 背景

近年の食の欧米化に伴い、肥満者の割合が世界的に増加の一途をたどっている[44]。世界保健機構(WHO)の基準によると、ボディマス指数(BMI, 体重/身長², kg/m²)が 18.5~24.9 を正常、25.0~29.9 を過体重、 ≥ 30.0 を肥満と定められている[1, 45]。BMI 値は年齢を問わず、また男女とも同じ値を用いるが、体格の違いにより BMI が肥満に適さない可能性が示唆されているため、注意が必要である[1]。例えば、ポリネシア人は同じ BMI の白人のオーストラリア人より脂肪率は低い傾向にある[46]。生命保険データの結果は、肥満は二型糖尿病などに与えるリスクが非常に高いため死亡率の上昇と関連していることを示唆しており[2, 47]、肥満関連疾患の経済的負担は 2030 年までに米国で年間 500 億\$, 英国で年間 19-20 億£と推定している[4]。従って、より健康的な体重を維持するために効果的な政策を実施することは社会経済に利益をもたらす可能性がある。

肥満は身体のエネルギー収支がプラスである場合、つまり、摂取エネルギー量が消費エネルギー量を上回っている場合に生じる[48]。また、近年、食生活の変化による高脂肪食の日常的な摂取が脂質異常症や肥満に繋がることが報告されている[49]。そのため、BMI を正常域に維持するには日々の食事量を管理することが重要である。加えて、近年、摂取する食品には脂質の吸収や体内への蓄積を抑制することで肥満を予防できる可能性を秘めた成分が含まれていることが報告されている。その代表的な成分の一つであるケルセチンおよびその配糖体は、マウスモデルを用いた試験系で抗肥満活性を発揮すること、脂質代謝系を調節することが報告されており、抗肥満成分の候補と考えられている[50-52]。例えば、ケルセチンの配糖体であるモノグルコシルルチンが胃抑制ポリペプチド(GIP)の分泌を調節することにより食事誘発性肥満を抑制することを、マウスを用いた系により先行研究で見出している[33]。また臨床的にも、ケルセチンを多く含む玉ねぎの日常的な摂取が、肥満予防に有益であることが報告されている[53]。

近年、「将来の健康や特定の病気へのかかりやすさは、胎児期や生後早期の環境の影響を強く受けて決定される」という DOHaD 仮説が登場した[54-56]。例えば、食生活の観点では妊娠期の母親の高脂肪食摂取は出生前の子供の腸内環境に影響を及ぼすことで肥満感受性が高まり、その後の人生における身体活動やエネルギー燃焼消費量を減少させる可能性がある[57, 58]。また、母親が低タンパク質食を摂取すると、産まれてくる子供の血漿アスパラギン酸やグルタミン酸、ヒスチジン、シスタチオニンが増加し、また血漿リジンが減少することが報告されている[59]。妊娠初期の母親の葉酸不足は DNA メチル化の調節を介して子供の腫瘍の進行を促進する[60]。母親の高フルクトース食摂取は、離乳後の高脂肪食誘発性高血圧への脆弱性を増加させる[61]。このように、発育・発達の重要な時期に必須栄養素を母体から摂取することの影響、すなわち栄養学的に DOHaD 仮説を裏付ける報告は多数あるが、ケルセチンなどの非必須栄養素に関する知見はまだ不十分である。Wu らは、肥満状態な母親の妊娠中および授乳期にケルセチンを摂取させると、子供の出生時体重や出生後の体重増加を減少させることを報告している[62]。そこで本章では抗肥満効果を有するケルセチンに着目し、妊娠中の母親のケルセチン摂取が高脂肪食誘発性肥満から子孫を守ることができるのか、すなわちケルセチンの次世代健康影響について評価した。

2.2. 方法

2.2.1. 試薬

ケルセチン(≧95%)はSigma-Aldrich Co. LLC(MO, 米国)より購入した。セルロース, α -コーンスターチ, β -コーンスターチ, スクロースはオリエンタル酵母工業株式会社(東京)より購入した。カゼイン, 大豆油, L-シスチン, *t*-ブチルヒドロキノンは和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。ビタミン MIX(AIN-93-VX), ミネラル MIX(AIN-93G-Mix), ラードはMP Biomedicals, LLC(CA, 米国)より購入した。その他の試薬は全て特級を使用した。

2.2.2. 動物実験

2.2.2.1. 研究計画書の機関承認

全ての動物実験は宮崎大学の施設動物管理使用委員会の承認を得た(承認番号 2018-008)。本章は「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)に基づき, 3R (Replacement, Reduction, Refinement)に従って実施した。

2.2.2.2. 動物

8 週齢の ICR マウス(雄, $n = 16$; 雌, $n = 48$)を日本エスエルシー(静岡)から入手し, 室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ の動物飼育屋で 1 ケージ(幅 $235 \times$ 奥行 $165 \times$ 高さ 125 mm)あたり 3 匹で飼育した。明期開始を午前 9 時, 暗期開始を午後 9 時とし, 脱イオン水および粉末の AIN-93M 食(Control 食; C-diet, Table 2-1)を自由摂取させた。

Table 2-1. Composition of the AIN-93G-based experimental diets.

%	Normal-Fat Diet		High-Fat Diet
	– (C-diet)	Quercetin (Q-diet)	(HF-diet)
β-Corn starch	39.75	38.75	16.75
Casein	20.0	20.0	20.0
α-Corn starch	13.2	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0	10.0
Soy oil	7.0	7.0	7.0
Lard	–	–	23.0
Sucrose	5.0	5.0	5.0
Mineral mix (AIN-93G-MX)	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix (AIN-93-VX)	1.0	1.0	1.0
L-Cystine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
Quercetin	–	1.0	–
kcal/g	3.948	3.908	5.098

2. 2. 2. 3. 繁殖

繁殖は既報に基づいて改良ハーレム法で行った[63, 64]。具体的には、1 週間の馴化後、雌性マウスの半数を C-diet からケルセチン 1.0%含有 AIN-93G 食(Q-diet; Table 2-1)へ切り替えた。飼料に含まれているケルセチンの量はマウスに自由摂取させた場合に体重に影響を与えないことを示した先行研究の結果に基づいて設定した[65]。Q-diet 摂取 3 日後、3 匹の雌性マウスが入った飼育ケージに雄性マウスを 1 匹入れた(各群 8 匹)。膣プラグが確認された日を妊娠 0 日目とした。プラグがある雌性マウスを紙製床敷(Alpha-dri Certified, EPS エキシン株式会社, 東京)および床敷(Envero-dri, EPS エキシン株式会社, 東京)が入った個別ケージ(W235 mm × L165 mm × H125 mm)に移動させた。一方、全ての雄性マウスはイソフルラン(2.0%)を用いた麻酔下で放血により安楽死させた。妊娠したマウスは妊娠 19 日目以降 1 日 2 回新生児の有無を目視にて観察した。新生児を確認した日を生後 0 日とした。C-diet と Q-diet ではそれぞれ 19 頭と 18 頭の雌性マウスが生まれた。

2. 2. 2. 4. 実験計画

研究スキームを Figure 2-1 に示す。具体的には、C-diet の母親(n = 5)とその新生児(n = 60)、および Q-diet の母親(n = 6)とその新生児(n = 60)からなる第 1 グループは生後 3 日目に解剖に処した。残りの雄性の新生児は生後 4 週目に離乳した。C-diet の母親から産まれた子供 20 匹と Q-diet の母親から産まれた子供 10 匹からなる第 2 グループは体重測定後、異なる母親から産まれた子供のグループになるよう 1 ケージ(W335 mm × L225 mm × H135 mm) 5 匹に分けた。1 週間馴化後、C-diet を与えた母親の子供に C-diet を与えた群(C-C)、C-diet を与えた母親の子供に 30%の

高脂肪 (HF) 食を与えた群 (C-HF), Q-diet の母親の子供に HF 食を与えた群 (Q-HF) に分類した。雌性マウスと残った雄性マウスはイソフルラン麻酔下 (2.0 %) で放血により安楽死させた。実験群は 13 週間脱イオン水と C-diet または HF-diet のいずれかを自由摂取させた。実験期間中, 体重と摂食量を週 3 回測定した。

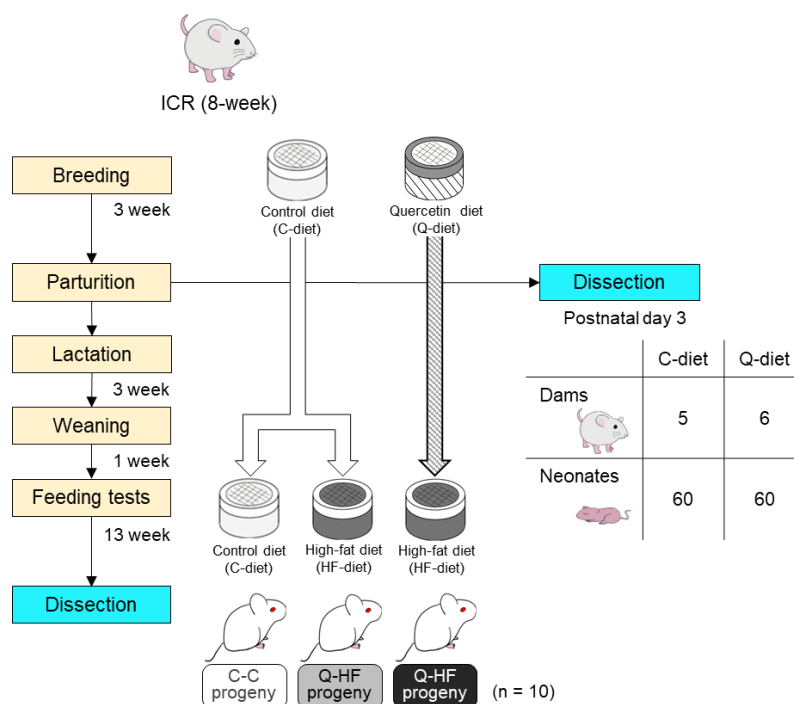


Figure 2-1. Schematic of the experimental design.

After acclimatization on the control diet (C-diet), the quercetin groups were switched to a diet containing 1.0% quercetin (Q-diet). Breeding was carried out after 3 days on the Q-diet. The C-diet dams and their neonates, as well as the Q-diet dams and their neonates, were sacrificed on postnatal day 3 (first group). Furthermore, 20 male progeny born to C-diet dams and 10 male progeny born to Q-diet dams were divided into three groups: male progeny of dams fed the C-diet that were also fed the C-diet (C-C), progeny of dams fed the C-diet that were fed a 30% high-fat (HF) diet (C-HF), and progeny of dams fed Q-diet that were fed a HF-diet (Q-HF). The animals were permitted free access C-diet or HF-diet for 13 weeks.

2. 2. 2. 5. 試料採取

第 1 グループの母親と子供は生後 3 日目に 6 時間絶食させた。母親はイソフルラン麻酔下 (1.5 %) で腹部大静脈から採血し, EDTA 含有チューブ (Microtainer Tube with EDTA and Microgard Closure, BD, NJ, 米国) にて採取した。次に, 新生児はイソフルラン麻酔下 (1.5 %) で断頭血を得た。同じ母親から産まれた新生児の血液を 1 本の EDTA 含有チューブに採取した。その後血液サンプルを 2000×g, 90 秒, 15°C で遠心分離し, 血漿画分を -80°C で保存した。

C-diet または HF-diet を 13 週間摂食した第 2 グループは 6 時間絶食後, イソフルラン麻酔下 (1.5 %) で腹部大静脈から採血し, EDTA 含有チューブに採取した。遠心分離 (2000×g, 90 秒,

15°C)し、回収した血漿画分を-80°Cで保存した。肝臓、腎臓、脾臓、内臓脂肪(副睾丸脂肪+腎臓周囲脂肪)、心臓、肺の重量を測定した。肝臓の1片を液体窒素にて瞬間凍結し、脂質分析するまで-80°Cで保存した。

2.2.3. 生化学指標

2.2.3.1. 血液生化学指標およびアディポカインの測定

血液生化学指標(総コレステロール, 高密度リポタンパク質[HDL]コレステロール, トリグリセリド, 総タンパク質, グルコース)は Dri-Chem 4000v 化学分析装置(富士フィルム株式会社, 東京)をそれぞれのカートリッジを用いて測定した。Non-HDL-コレステロール量は以下の式で算出した。

$$\text{Non-HDL-cholesterol} = \text{total cholesterol} - \text{HDL-cholesterol}$$

第2グループにおける血漿レプチン, グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド(GIP), 単球走化性タンパク質-1(MCP-1)は, マルチプレックスアッセイ(MAGPIX® System, Luminex Co., TX, 米国)と, 各因子のビーズを含んだマウス代謝ホルモンパネル(MMHMAG-44K, Millipore, MO, 米国)を用いて測定した。

2.2.3.2. 肝臓中の脂質量の測定

第2グループの肝臓片からの脂質は先行研究に基づいて測定した[33]。具体的には, 凍結保存した肝臓(200 mg)をサンプルチューブ(TM-626S;株式会社トミー精工, 東京)に秤量し, 氷冷した50 mM 酢酸ナトリウム水溶液(1 mL)と5 mmのビーズ(株式会社ニッカトー, 大阪)を1個加えたのち, ビーズ破砕器(Micro Smash™ MS-100;株式会社トミー精工, 東京)を用いて破砕した(3000 rpm, 90 秒)。その後, 6 mLのクロロホルム-メタノール(2:1 [vol/vol])を加えて40°Cで30分間インキュベートした。10分間遠心分離(3000 rpm, テーブルトップ冷却遠心機 2800;久保田商事株式会社, 東京)した後, 500 µLのクロロホルム相を回収し, 遠心濃縮機(CC-105;株式会社トミー精工, 東京)を用いて乾固した。次に, 10% Triton X-100 含有イソプロピルアルコール溶液(200 µL)に再溶解した後, トリグリセリド, 総コレステロール, リン脂質の濃度を和光純薬工業株式会社の測定キットを用いて測定した。

2.2.4. 統計解析

データは平均値±標準偏差(SD)で示した。統計解析は StatView for Windows (version 5.0, SAS Institute, NC, 米国)を用いて二元配置分散分析(ANOVA)を行った後, Tukey-Kramer 法を用いて解析し, 有意水準5%未満の場合は統計学的に有意差ありと判定した($p < 0.05$)。

2.3. 結果

2.3.1. 母親のケルセチン摂取が新生児の生物学的および血液パラメーターに与える影響

繁殖期間中、母親の C-diet または Q-diet の摂食量は同程度であった (Table 2-2)。Q-diet を摂食させた母親のケルセチン摂取量は 77 ± 24 mg/mice/day であった。Q-diet を与えた母親の新生児と C-diet を与えた母親の新生児の体重に差はなかった (Table 2-2)。

Table 2-2. Effects of quercetin consumption on food intake and body weight (first group).

	Dams		Neonates	
	C-diet	Q-diet	C-diet	Q-diet
Body weight (g)	42.1 ± 4.1	41.4 ± 4.1	3.1 ± 1.0	3.3 ± 0.3
Number of animals per dam	5	6	12 ± 3	10 ± 3
Food intake (g/mice/day)	7.2 ± 1.1	7.7 ± 2.4	–	–
Quercetin intake (mg/mice/day)	–	77 ± 24	–	–

Data are shown as the mean \pm SD. There were no significant differences between the C-diet and Q-diet groups.

妊娠中の母親のケルセチン摂取は血漿パラメーターに影響を与えなかった (Figure 2-2)。また、C-diet を摂食した母親から産まれた新生児と Q-diet を摂食した母親から産まれた新生児の間も差はなかった。しかし、総コレステロール、総タンパク質、グルコースレベルは新生児が母親よりも有意に低い値を示した。さらに、トリグリセリドレベルは新生児が母親よりも有意に高い値を示した。

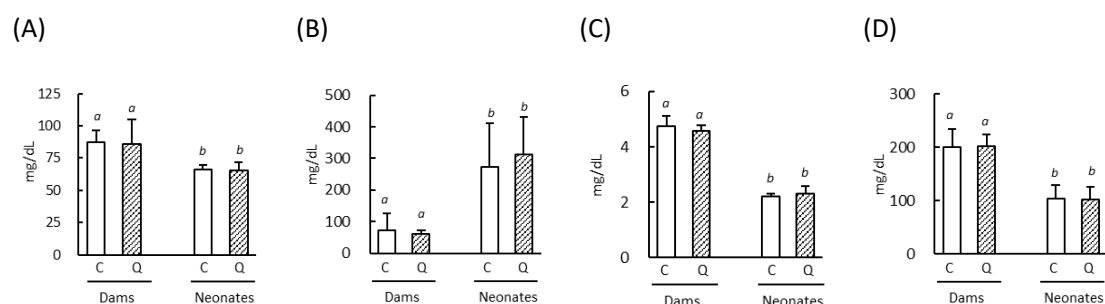


Figure 2-2. Effects of maternal quercetin consumption during pregnancy on plasma parameters in dams and neonates.

(A) total cholesterol; (B) triglycerides; (C) total protein; (D) glucose. Data are shown as the mean \pm SD. Different superscripts (a, b) indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.3.2. 母親のケルセチン摂取が HF 食を摂取した子供の生物学的パラメーターに与える影響

2.3.2.1. 摂食量, 体重, 臓器重量への影響

6週間後, C-HF 群は C-C 群に比べて体重増加が大きくなり, その差は 12 週目で有意になった (Figure 2-3)。Q-HF 群の体重は C-C 群よりも 3 週目で高くなり, 5 週目で有意になった。13 週間後の C-HF 群および Q-HF 群の体重は C-C 群よりもそれぞれ 16.1%, 30.6% 大きい値を示した (Table 2-3)。実験期間中 C-C 群, C-HF 群, Q-HF 群の摂取エネルギー量は同程度であった (それぞれ 20.1, 20.4, 20.9 kcal/mice/day)。内臓脂肪重量は C-HF 群と Q-HF 群で有意に増加したがこれら 2 群間で差はなかった。肝臓重量は Q-HF 群で有意に増加したが, C-HF 群では増加しなかった。腎臓, 脾臓, 心臓, 肺の重量は全群で差はなかった。

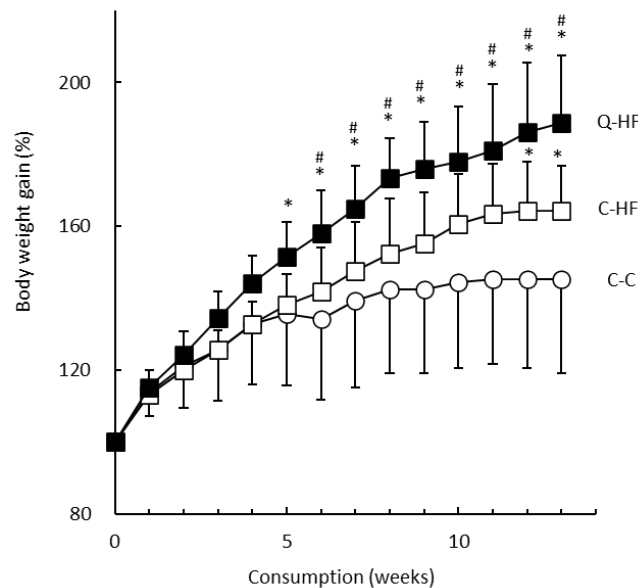


Figure 2-3. Effects of maternal quercetin consumption on body weight gain in progeny fed a HF diet. Progeny of dams fed the C-diet that were also fed the C diet (C-C, ○), progeny of dams fed the C-diet that were fed a 30% high-fat (HF) diet (C-HF, □), and progeny of dams fed Q-diet were fed an HF diet (Q-HF, ■). Data are shown as the mean \pm SD ($n = 10$). Two-way ANOVA analysis were performed, and Fisher's PLSD *post hoc* test was applied if ANOVA p values were less than 0.05. * vs. the C-C group, # vs. the C-HF group ($p < 0.05$).

Table 2-3. Effects of maternal quercetin consumption on growth parameters and absolute organ weights.

	C-C	C-HF	Q-HF	ANOVA p values	
				Maternal diet	Progeny diet
Body weight					
Initial (g)	37.8 ± 2.9 ^a	38.7 ± 2.1 ^a	37.7 ± 2.9 ^a	0.582	0.747
Final (g)	54.6 ± 6.2 ^a	63.4 ± 4.5 ^b	71.3 ± 12.2 ^c	0.001	<0.001
Food consumption					
(g/mouse/day)	5.1	4.0	4.1	–	–
(kcal/mouse/day)	20.1	20.4	20.9	–	–
Absolute organ weight (g)					
Liver	2.18 ± 0.29 ^a	2.45 ± 0.36 ^a	3.56 ± 1.53 ^b	0.003	0.041
Kidney	0.85 ± 0.06 ^a	0.79 ± 0.08 ^a	0.77 ± 0.15 ^a	0.186	0.111
Spleen	0.21 ± 0.05 ^a	0.22 ± 0.07 ^a	0.20 ± 0.05 ^a	0.514	0.827
Heart	0.27 ± 0.03 ^a	0.27 ± 0.02 ^a	0.26 ± 0.03 ^a	0.221	0.411
Lung	0.25 ± 0.03 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.04 ^a	0.588	1.000
Visceral fat*	2.70 ± 1.21 ^a	4.23 ± 0.79 ^b	4.74 ± 1.37 ^b	0.012	<0.001

Data are shown as the mean ± SD (n = 10). *Epididymal fat + perirenal fat weights. Different superscripts (*a*, *b*, *c*) indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.3.2.2. 血液生化学パラメーターに対する影響

血漿中の総コレステロール値および Non-HDL-コレステロール値は C-HF 群および Q-HF 群共に C-C 群より有意に高い値を示した (Figure 2-4 A, B)。血漿中 HDL-コレステロール値は Q-HF 群で有意に上昇したが, C-HF 群では上昇しなかった (Figure 2-4 C)。総コレステロール/HDL-コレステロール比は C-HF 群で有意に増加したが Q-HF 群では増加しなかった (Figure 2-4 D)。血漿トリグリセリド, 総タンパク質, グルコース値に群間差は無かった (Figure 2-4 E-G)。

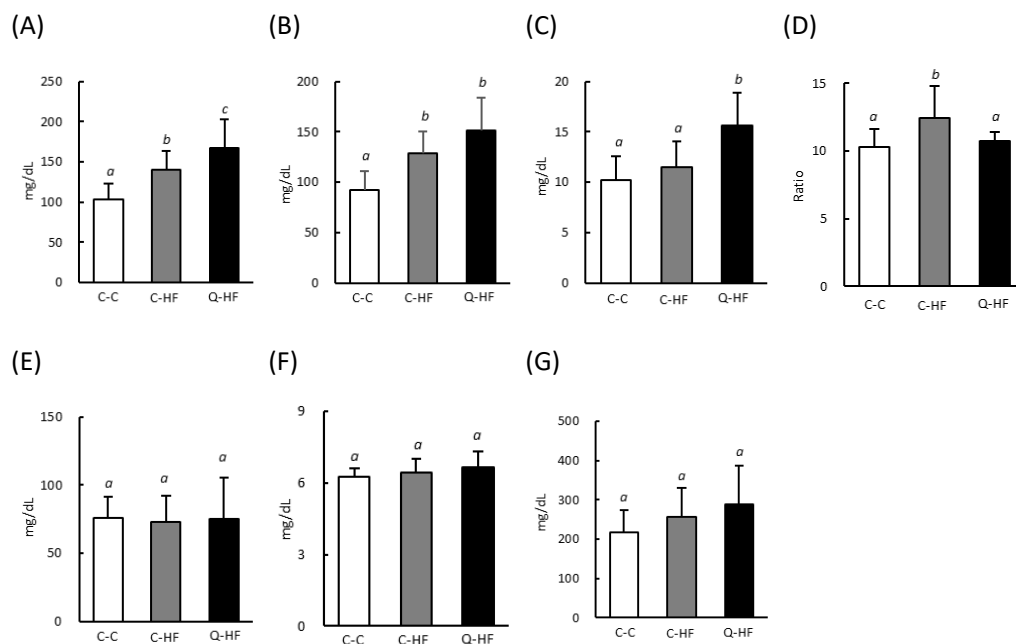


Figure 2-4. Effects of maternal quercetin consumption on blood biochemical parameters.

(A) total cholesterol; (B) Non-HDL-cholesterol; (C) HDL-cholesterol; (D) total cholesterol/HDL-cholesterol ratio; (E) triglycerides; (F) total protein; (G) glucose. Data are shown as the mean \pm SD ($n = 10$). Two-way ANOVA analysis were performed, and Fisher's PLSD *post hoc* test was applied if ANOVA p values were less than 0.05. Different superscripts (*a*, *b*, *c*) indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.3.2.3. 血中代謝ホルモンおよびマイオカインに対する影響

血漿レプチン値は C-C 群より C-HF 群と Q-HF 群共に有意高い値を示した (Figure 2-5 A)。血漿 GIP 値は C-C 群より C-HF 群で顕著に上昇したが、Q-HF 群では C-C 群と同程度であった (Figure 2-5 B)。血漿 MCP-1 値に群間差は無かった (Figure 2-5 C)。

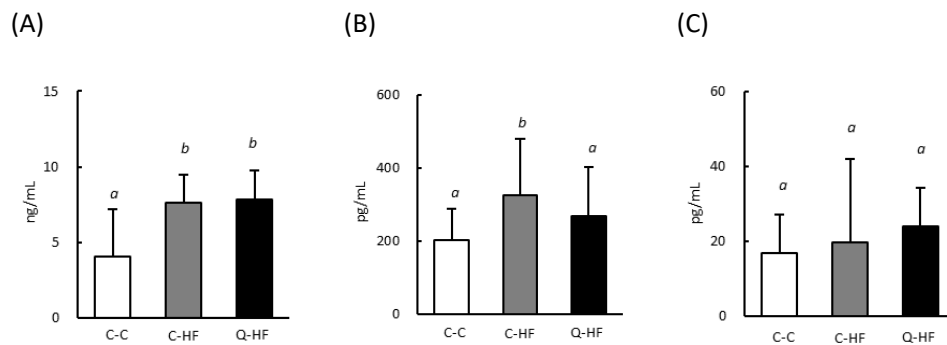


Figure 2-5 Effects of maternal quercetin consumption on blood metabolic hormones and myokines. (A) leptin; (B) gastric inhibitory polypeptide (GIP); (C) monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1). Data are shown as the mean \pm SD ($n = 10$). Different superscripts (*a*, *b*) indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.3.2.4. 肝臓脂質量に対する影響

肝臓中の総コレステロール値は C-C 群に比べて C-HF 群、Q-HF 群共に有意に高かった (Figure 2-6 A)。しかし、トリグリセリド値に群間差は無かった (Figure 2-6 B)。

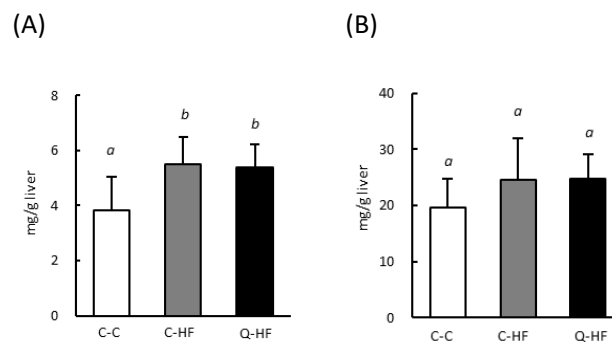


Figure 2-6. Effects of maternal quercetin consumption on hepatic total cholesterol and triglycerides. (A) total cholesterol; (B) triglycerides. Data are shown as the mean \pm SD ($n = 10$). Different superscripts (*a*, *b*) indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.4. 考察

肥満は世界的に、特に先進国において重要な問題となっている。本章では、HF 食を与えた雄性の子供に対して妊娠中の母体のケルセチン摂取が肥満に関連するパラメーターに及ぼす影響について評価した。妊娠期間中の母親のケルセチン摂取は体重や血漿総コレステロール、トリグリセリド、総タンパク質、グルコース値に影響を与えなかった (Table 2-2, Figure 2-2)。これらの結果は、0.5 %のケルセチン配糖体含有飼料を雄性マウスに与えた先行研究と同様の結果である[33]。また、母親がケルセチンを摂取しても新生児の体重に影響を与えなかった。

母親がケルセチンを摂取しても新生児の血液生化学パラメーターに影響を与えなかった。一方、本章の主な発見の一つではないが、血中トリグリセリド値は新生児の方が母親よりも有意に高い値を示した (Figure 2-2 B)。

McMullin らは母乳中のトリグリセリド濃度は母体の血清濃度より 100 倍高く、母乳中の親油性物質の蓄積に望ましいことを報告している[66]。本章では、母親とその新生児を 6 時間絶食させた後に血液サンプルを回収した。母体分離ストレスを与えないために新生児を母親から隔離しなかったため、新生児は絶食期間中であっても母乳から栄養を摂取できたと考えられる[67]。従って母親とその新生児の結果を比較することは難しいが、本章では新生児が母乳を介して成長に重要な段階で高レベルのトリグリセリドに晒されていることを示唆する結果が得られた。血中タンパク質値は新生児が母親よりも有意に低かった (Figure 2-2 C)。これらの結果は McMullin らの結果と同様であり[66]、新生児の血中タンパク質濃度は生後 20 日目までに成人と同等のレベルになる可能性が示唆された。総コレステロール値も新生児が有意に低下した。血中コレステロール値と血中タンパク質値には正の相関があることが報告されている[68]。従って、新生児で見られた総コレステロール値の低下は血中タンパク質値の低下と相関した可能性がある。

雄性マウスは雌性マウスと比較して肥満になりやすいこと、雌性マウスの肥満保護機能は卵巣摘出により消失することはすでに知られており、雌雄間で代謝に差があることが示されている[69]。しかしながら、筆者らを含む多くの研究グループは雄性マウスを使用してケルセチンの機能性を評価している[33, 50, 52]。そこでまず雄性の新生児に着目し、妊娠中の母親のケルセチン摂取が高脂肪食誘発性肥満に及ぼす影響について評価した。HF-diet を日常的に摂取すると、C-C 群に比べて C-HF 群で有意な体重増加が確認された (Figure 2-3)。摂食量に関しては、グラム当たりの摂取量は C-C 群に比べて C-HF 群が少なかったがエネルギー摂取量は同程度であった (Table 2-3)。同様の高脂肪食誘発性肥満は既に報告されている[52, 70]。母親がケルセチン摂取したマウス (Q-HF 群) は C-HF 群と比較して、摂食量は同程度であったが体重増加が促進された。高脂肪食を与えた両群の内臓脂肪重量は C-C 群より高かったため肥満が示唆された。興味深いことに、Q-HF 群では C-C 群や C-HF 群と比較して肝臓重量が有意に増加した (Table 2-3)。Yamaki と Takahashi らは雄性 C57BL/6J マウスに 0.01-1.0 %のケルセチン含有飼料を 4 週間与えた研究にて、対照群や他のケルセチン群と比較して体重に大きな変化が無いにもかかわらず、ケルセチン 1.0 %飼料を与

えたマウスでのみ肝臓重量が有意に増加すること報告している[65]。本実験期間中、ケルセチンは摂取していないが Q-HF 群では肝臓重量が増加したことを確認した。この結果は母親が 1.0 % という多量のケルセチンを摂取したことで次世代の肝機能に影響を与える可能性を示唆している。高脂肪食の摂取によって引き起こされる肝臓重量の増加は、一般的に肝脂肪の沈着によって起こる[71]。しかし、本章の肝脂質量(総コレステロール値, トリグリセリド値)に C-HF 群と Q-HF 群の間に差はなかった(Figure 2-6)。従って母親のケルセチン摂取が高脂肪食を摂取する子供の病的な肝重量増加を促進するかどうかは不明である。これらの結果は、Q-HF 群(第 1 世代)で観察されたような生物学的促進作用が Q-HF 群の次の世代(第 2 世代)でもより増強するかもしれない、という仮説を示唆している。これは今後の課題である。

血中総コレステロールおよび Non-HDL-コレステロール濃度は C-C 群に比べて C-HF 群で有意に上昇した(Figure 2-4 A, B)。Q-HF 群でも同様に、総コレステロール値が C-C 群と比較して高く、また、C-HF 群よりも有意に高い値を示した。これらの変化は、摂取量(Table 2-3)および栄養状態の指標として用いられている血漿総タンパク質値(Figure 2-4 F)に差が無かったことから、栄養状態に起因する変化ではない[72]。血中 LDL-コレステロール値の増加は肥満を含む代謝性疾患の指標として用いられている[73]。従って、Q-HF 群で見られた総コレステロール値と Non-HDL-コレステロール値の増加は異常であると判断した。しかし、有益とされている HDL-コレステロール値は C-C 群と C-HF 群が同程度であったのに対して Q-HF 群では有意に高い値を示した(Figure 2-4 C)。近年、血中総コレステロール/HDL-コレステロール比が肥満マーカーであることが報告されている[74]。実際に、高脂肪食によって肥満状態となった ICR マウスでは、この比率がコントロールに比べて有意に高いことが報告されている[75]。これは、C-HF 群では総コレステロール/HDL-コレステロール比が C-C 群より有意に高いが Q-HF 群と C-C 群の間では同程度であるという本章の結果と一致し(Figure 2-4 D)、先行研究の値と同等であった[76, 77]。これらの結果は、母体のケルセチン摂取が総コレステロール値自体は増加してもコレステロール代謝から次世代を保護している可能性を示唆している。一方、他の先行研究では対照食を摂取したマウスの総コレステロール/HDL-コレステロール比が本章の C-C 群で確認された結果(約 10.3)よりも低い値、例えば Yu らは約 1.8 であったという報告をしている[78]。彼らの血中総コレステロール値の結果(118 mg/dL)は本章の結果(103 mg/dL)と同程度であったが、HDL-コレステロール値が彼らの結果(66.3 mg/dL)と本章での結果(10.2 mg/dL)は著しく異なる値であった。このような結果となった理由は不明であるが、いくつかの可能性が考えられる。Miller らは、8 種類の市販のキットで測定したところ、HDL-コレステロール値で 15%以上の差が出たことを報告している[79]。さらに、絶食期間や血液の採取時期、麻酔などの取り扱い方法が総コレステロール値や HDL-コレステロール値などの血液生化学パラメーターに影響を与えている可能性がある[80]。従って、今後マウスの血中 HDL-コレステロール値で観察されたこれらの要因を明確にする研究が推奨される。

高脂肪食の摂取は血中レプチン濃度を上昇させ、食事の摂取とエネルギー消費を制御する視床下部の中樞を刺激して体脂肪の蓄積を促進する[81]。本章では、血中レプチン濃度は C-C 群と

比較して C-HF 群で有意に上昇し、母体のケルセチン摂取はこの変動を緩和しなかった。高脂肪食の摂取は血中 GIP 濃度を上昇させることも報告されている[82]。本章でも同様の結果が観測され、母体のケルセチン摂取が高脂肪食摂取による血中 GIP 濃度の上昇を保護することが分かった (Figure 2-5 B)。GIP は脂肪やグルコースなどの栄養素による刺激により十二指腸内分泌 K 細胞から分泌され[83]、脂質代謝に直接生理作用をすると考えられている[84]。筆者らは先行研究にて、ケルセチン配糖体の日常的な摂取が GIP の血中濃度を低下させることを報告している[33]。従って、母親のケルセチン摂取が次世代のコレステロール代謝を調節するというメカニズムの一つは、母親から次世代への GIP 分泌調節能である可能性がある。

肥満などのメタボリックシンドロームの研究に動物(マウス)モデルを用いる利点は、人では実施困難なメタボリックシンドロームの機能的・生化学的変化を観察できることにある[85]。しかし、動物に対する用量を、体重に基づいた単純な換算でヒトの用量に外挿すべきではない。ヒトの等価用量は mg/m^2 で表されることが多く、これに K_m 係数(成人のヒトでは 37, マウスでは 3)をかけることで換算する方法が提案されている[86]。例えば、マウスで使用された用量を表面積に基づいて人の用量に換算するには、体重 41.4g あたり 1 日 77mg のケルセチン (Table 2-2) (約 1.8 g/kg) にマウスの K_m 係数である 3 をかけ、ヒトの成人の K_m 係数である 37 で割った値となる。この計算から、ケルセチンのヒト等価用量は 0.15 g/kg となり、60kg の人が 1 日に摂取するケルセチンは約 9 g に相当する。ケルセチン 9 g は玉ねぎのようなケルセチンを多く含む野菜約 15 kg に含まれると計算されるため、この量を日々の食事から摂取することは難しいかもしれない[87]。母親が摂取するケルセチン量を少なくしてさらに研究を行う必要がある。

以上の結果から、母親のケルセチン摂取は高脂肪食による血中や肝臓中の高コレステロール値や体重過多から次世代を保護することはできないが、総コレステロール/HDL-コレステロール比を調節する機能を有する可能性があることが示された。

第3章

ω -3系多価不飽和脂肪酸合成関連因子の
発現リズムが体内脂肪酸組成に与える影響

3. 1. 背景

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの ω -3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は肥満や糖尿病, 心血管疾患等に対して有益な効果があることが報告されている[88]。また, ヒトやマウスの生体内では脂肪酸伸長酵素 (ELOVL) や脂肪酸デサチュラーゼ (FADS) などが作用することで, α -リノレン酸 (α -LA) から EPA や DHA に変換される (Figure 3-1) [89]。一方, ヒトやマウスなどの哺乳類はパルミチン酸から α -LA を合成するために必要な酵素を有していないため [90], 日常的に ω -3 系 PUFA を摂取する必要がある[91]。この時, EPA や DHA を豊富に含む脂質を摂取することが重要であるが, それらは魚類に多く含まれている。我が国の魚類の摂取量が年々減少していること, さらに魚類を食べる習慣のない人にとって, その前駆体である α -LA を効率的に EPA や DHA に変換できる食べ方を確立することも重要と考えられる。しかしながら, EPA への変換効率の視点から α -LA を豊富に含んだ油脂を摂取した時の体内動態については詳しく追跡した報告はない。そこで本章では, α -LA をターゲットにし, EPA への変換効率を動的因子と捉え, いつ摂取することが効果的であるかについて体内動態の観点から評価した。

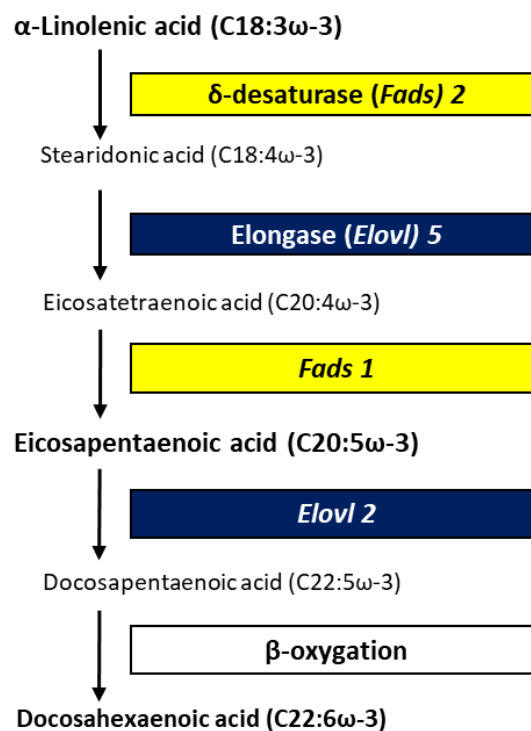


Figure 3-1. Synthesis of ω -3 poly-unsaturated fatty acids (PUFAs). (Based on [89])

3.2. 方法

3.2.1. 試薬

EPA は Combi-Blocks, Inc. (CA, 米国)より購入した。 α -LA, カゼイン, 大豆油, L-シスチン, *t*-ブチルヒドロキノン は和光純薬工業株式会社 (大阪)より購入した。セルロース, α -コーンスターチ, β -コーンスターチ, スクロース はオリエンタル酵母工業株式会社 (東京)より購入した。ビタミン MIX (AIN-93-VX), ミネラル MIX (AIN-93G-Mix) は MP Biomedicals, LLC (CA, 米国)より購入した。その他の試薬は全て特級を使用した。

3.2.2. 研究計画書の機関承認

全ての動物実験は宮崎大学の施設動物管理使用委員会の承認を得た(承認番号 2020-011-3)。本章は「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)に基づき, 3R (Replacement, Reduction, Refinement)に従って実施した。

3.2.3. 動物飼育, 飼料, 実験計画

雄性 ICR マウスを日本エスエルシー (静岡)より購入した。マウスを室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ の動物飼育屋で, 明期開始を午前 9 時, 暗期開始を午後 9 時とし, 脱イオン水および粉末の AIN-93G 食を自由摂取させた。馴化期間終了後, マウスを 3 群に分け以下の実験を行った。

実験 1: 13 匹のマウスを α -LA 投与群 (3 g/kg 体重), EPA 投与群 (3 g/kg 体重), 水投与群のランダムに 3 群に分け, 6 時間絶食後に試料をそれぞれ経口投与した。試料投与後, 0, 6, 10, 14, 18 時間後にイソフルラン麻酔下 (2.0%) で尾静脈採血をした。採取した血液は脂肪酸を測定するためヘマトクリットキャピラリーチューブ (EM MYSTAR Hematocrit Capillary Heparin Treatment, AZ ONE, 大阪) でヘパリン処理し, BHT 処理した濾紙に吸着させた。投与 18 時間後 (午後 3 時) に腹部静脈から採血し, 血漿キャピリジェクトチューブ (Terumo Medical Corporation, NJ, 米国) に回収した。室温で 30 分後, $3500 \times g$, 90 秒の遠心分離で血清を分離し, 分析まで -80°C で保存した。肝臓の一部を液体窒素中で急速凍結した後, 脂質分析まで -80°C で保存した。さらに別の肝臓の一部を約 3 mm 角に切り出し, RNALater® (Ambion Inc., TX, 米国) 中に 4°C で 1 晩浸した後, RNA 抽出するまで -20°C で保存した。

実験 2: 10 匹のマウスをエゴマ油 (ω -3 系 PUFA 豊富油) 投与群 (10 g/kg 体重) とオリーブ油 (ω -9 系 PUFA 豊富油) 投与群 (10 g/kg 体重) のランダムに 2 群に分けた。今回使用した試料の脂肪酸組成は Figure 3-2 に示す。6 時間絶食後に試料をそれぞれ経口投与した。試料投与後, 0, 6,

10, 14, 18 時間後にイソフルラン麻酔下(2.0%)で尾静脈採血をした。採取した血液は脂肪酸を測定するためにヘマトクリットキャピラリーチューブ (EM MYSTAR Hematocrit Capillary Heparin Treatment) でヘパリン処理し, BHT 処理した濾紙に吸着させた。投与 18 時間後(午後 3 時)に腹部静脈から採血し, 血漿キャピプロジェクトチューブ (Terumo Medical Corporation, NJ, 米国)に回収した。室温で 30 分後, 3500×g, 90 秒の遠心分離で血清を分離し, 分析まで-80°Cで保存した。

実験 3: 10 匹のマウスをエゴマ油含有食摂食群 (PFD) とオリーブ油含有食摂食群 (OFD) の 2 群にランダムに分けた (Table 3-1)。1 週間の摂食試験後, 午後 3 時に絶食をかけずにイソフルラン麻酔下(2.0%)で腹部静脈から採血し, 血漿キャピプロジェクトチューブ (Terumo Medical Corporation) に回収した。室温で 30 分静置後, 3500×g, 90 秒の遠心分離で血清を分離し, 分析まで-80°Cで保存した。肝臓の一部を液体窒素中で急速凍結した後, 脂質分析まで-80°Cで保存した。さらに別の肝臓の一部を約 3 mm 角に切り出し, RNALater® (Ambion Inc.) 中に 4°Cで一晩浸した後, RNA を抽出するまで-20°Cで保存した。

Table 3-1. Composition of the AIN-93G-based experimental diets.

Composition (%)	30% perilla oil diet (PFD)	30% olive oil diet (OFD)
β -Corn starch	16.75	16.75
Casein	20.0	20.0
α -Corn starch	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0
Cellulose	5.0	5.0
Perilla oil	30.0	–
Olive oil	–	30.0
Mineral mix (AIN-93G-MX)	3.5	3.5
Vitamin mix (AIN-93-VX)	1.0	1.0
L-Cystine	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.0014	0.0014

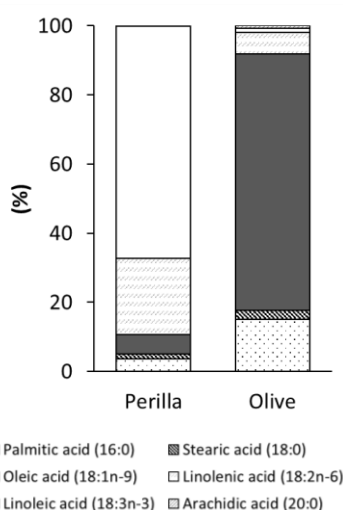


Figure 3-2. Fatty acid composition of oils (%).

3. 2. 4. 肝臓脂質分析

肝臓片からの脂質は先行研究に基づいて測定した[33]。具体的には、凍結保存した肝臓(200 mg)をサンプルチューブ(TM-626S;株式会社トミー精工, 東京)に秤量し、氷冷した 50 mM 酢酸ナトリウム水溶液(1 mL)と 5 mm のビーズ(株式会社ニッカトー, 大阪)を 1 個加えたのち、ビーズ破砕器(Micro Smash™ MS-100;株式会社トミー精工, 東京)を用いて破砕した(3000 rpm, 90 秒)。その後、6 mL のクロロホルム-メタノール(2:1 [vol/vol])を加えて40°Cで30分間インキュベートした。10 分間遠心分離(3000 rpm, テーブルトップ冷却遠心機 2800;久保田商事株式会社, 東京)した後、500 μ L のクロロホルム相を回収し、遠心濃縮機(CC-105;株式会社トミー精工, 東京)を用いて乾固した。次に、10 % Triton X-100 含有イソプロピルアルコール溶液(200 μ L)に再溶解した後、トリグリセリド、総コレステロール、リン脂質の濃度を和光純薬工業株式会社の測定キットを用いて測定した。

3. 2. 5. 血液・肝臓脂肪酸分析

BHT 処理した血液中の脂肪酸組成は脂肪酸メチル化キット(ナカライテスク株式会社, 京都)を用い, 製造者のプロトコルに従って分析した。血清画分は先行研究を改変した方法で行った[92]。具体的には, 25 μL の血清に対して全脂肪酸を抽出し, メチルエステル化を行った。メチルエステル化した脂肪酸にヘキサンを 200 μL 添加して再溶解したものを分析に供した。

肝臓脂肪酸組成を分析するため, 肝臓サンプル(200 mg)に対して 50 mM 酢酸ナトリウム水溶液を 1 mL 添加, ホモジナイズして上記のクロロホルム:メタノール溶液を用いて抽出した。その後, 抽出画分(肝臓 20 mg 相当)をメチルエステル化し, ヘキサンを 200 μL 添加して再溶解したものを分析に供した。

再溶解した溶液は, ガスクロマトグラフ(GC-2014, 株式会社島津製作所, 京都)を用いて分析した。脂肪酸の分離には SUPELCOWAXTM 10 キャピラリーカラム(長さ 30 m \times 内径 0.32 mm \times 膜厚 0.25 μm ; Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, 米国)を用いた。カラムオープン温度は 170 $^{\circ}\text{C}$ から 225 $^{\circ}\text{C}$ に昇温し, 分離した脂肪酸メチルエステルの検出には水素炎イオン化検出器を用いた。メチルエステル脂肪酸の標準品(Supelco 37 Component FAME Mix)は Sigma-Aldrich Co. LLC(MO, 米国)から購入した。

3. 2. 6. RNA 抽出

RNAlater に浸漬した肝臓試料から, QuickGene RNA tissue kit SII (RT-S2) および QuickGene-Mini80 (倉敷紡績株式会社, 大阪)を用いて RNA を抽出した。RNA 濃度は Qubit[®] RNA 測定キットと Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, MA, 米国)を用いて測定した。抽出した RNA は PrimeScript[®] RT reagent kit (RR037; タカラバイオ株式会社, 滋賀)を用いて, 最終濃度(400 ng/mL)となるように以下の条件で cDNA に逆転写した:37 $^{\circ}\text{C}$ 15 分で逆転写反応, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 秒で逆転写酵素を熱失活, 4 $^{\circ}\text{C}$ で保持した。

3. 2. 7. mRNA 発現量の測定

逆転写した cDNA を中の遺伝子発現量を, AriaMx real-time PCR system (Agilent Technologies, Inc., CA, 米国)を用いて定量した。試験に用いたプライマー配列を Table 1-2 に示す (Eurofins Genomics Ltd., 東京)。具体的には, 5 μL の Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green Mater Mix (Agilent Technologies Inc.), DNase/RNase-free water (3.5 μL), および各プライマー溶液(0.5 μL)を含む 9.5 μL の PCR 混合液に cDNA 溶液(0.5 μL)を添加し, 以下の条件で解析に供した:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 分間, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 分間で初期活性化, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間で変性, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間でアニーリング, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間で伸長のサイクルを 45 回繰り返した。それぞれの遺伝子発現量は, ハウスキーピング遺伝子(β -actin)に対する相対発現量($\Delta\Delta\text{Ct}$ 法)として算出した。

Table 3-2. The primers used for quantitative reverse transcription (RT)-PCR reaction.

Primer		Sequences (5'→3')
<i>Fads1</i>	Forward	CATCAGCCACTACGCGGGTC
	Reverse	CGGAGCCAGCTCTCCAATCA
<i>Fads2</i>	Forward	CAATGACTGGTTCAGCGGGC
	Reverse	TCAGCAACGGCTTCTCCTGG
<i>Elovl2</i>	Forward	GAGAAGGTGATGTCCGGGTAG
	Reverse	ACATGGACGCGTGGTGATAG
<i>Elovl5</i>	Forward	TTCCTCTTGCATCGCGGCT
	Reverse	CCATCCTTTGACTCTTGTATCTCGG
<i>β-actin</i>	Forward	GTGGGAATGGGTCAGAAGG
	Reverse	GGTCATCTTTTCACGGTTGG

3. 2. 8. 統計解析

データは平均値±標準偏差(SD)で示した。統計解析は StatView for Windows (version 5.0, SAS Institute, NC, 米国)を用いて二元配置分散分析(ANOVA)を行った後, Tukey-Kramer 法を用いて解析し, 有意水準 5%未満の場合は統計学的に有意差ありと判定した($p < 0.05$)。

3.3. 結果

3.3.1. 脂肪酸単回摂取時の血中脂肪酸組成

α -LA もしくは EPA を単回経口投与した時の血中脂肪酸濃度の経時変化を Figure 3-3 に示す。 α -LA を投与したマウスの α -LA 濃度は投与 6 時間後にピークに達し、その後は減少し、投与 18 時間後に定常状態に戻った。この時、 α -LA から EPA への有意な変換は確認されなかった (Figure 3-3 A, B)。EPA を単回経口投与した場合、EPA 濃度は投与 6 時間後にピークに達し、その後 18 時間後まで維持された。一方、EPA 投与による α -LA 量の変化は認められなかった。

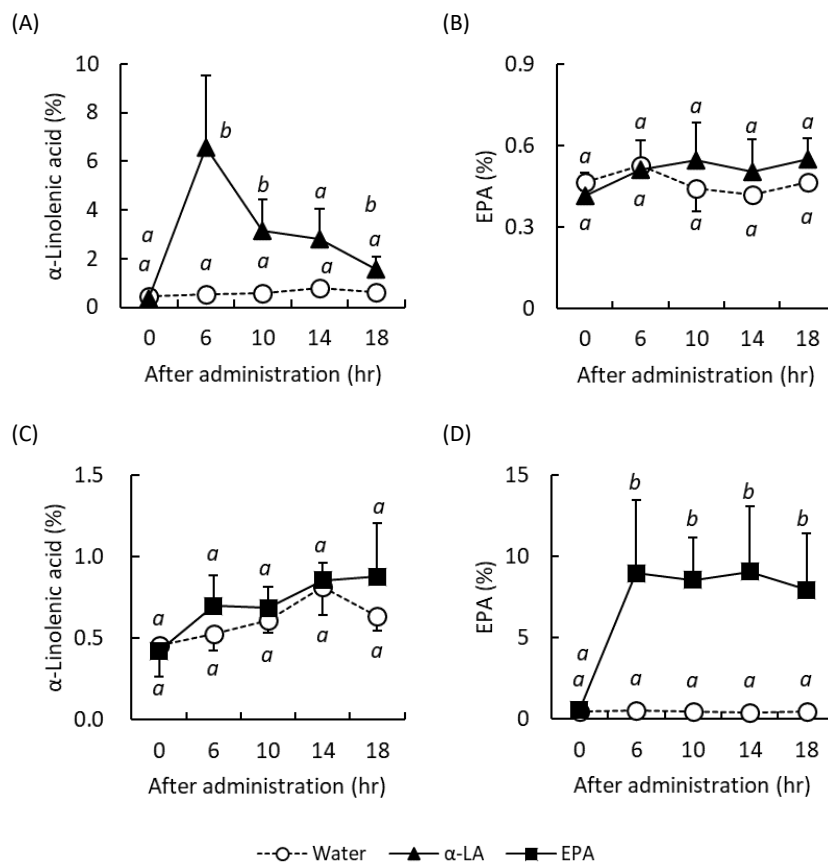


Figure 3-3. Effects of α -linolenic acid (α -LA) or eicosapentaenoic acid (EPA) administration on blood fatty acid concentrations.

Concentration of (A) α -LA and (B) EPA in the blood after administration of α -LA. Concentration of (C) α -LA and (D) EPA in the blood after administration of EPA. Data are shown as the mean \pm SD (Water, $n = 3$; α -LA & EPA, $n = 5$). Different superscripts (a, b) indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.3.2. 油脂単回摂取時の血中脂肪酸組成

α -LA を豊富に含むエゴマ油もしくはオレイン酸を豊富に含むオリーブ油を単回経口投与した後の血中脂肪酸組成の経時変化を Figure 3-4 に示す。オリーブ油投与群ではオレイン酸が、エゴマ油投与群では α -LA が投与後 6 時間で有意に高い値を示し、その後減少した。一方、EPA 濃度の変化はどちらの群でも見られなかった。

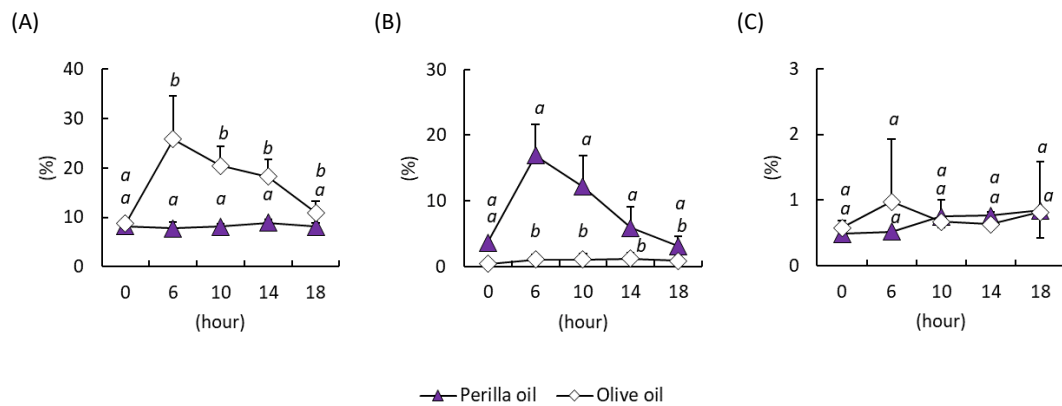


Figure 3-4. Effects of perilla oil or olive oil administration on blood fatty acid concentrations. Concentration of (A) oleic acid, (B) α -LA, and (C) EPA in the blood after administration of perilla oil or olive oil. Data are shown as the mean \pm SD ($n = 5$). Different superscripts (a, b) indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.3.3. 継続的な摂取が体内脂肪酸組成に与える影響

エゴマ油もしくはオリーブ油を含有した食餌を 1 週間摂取させた時の血中脂肪酸組成を Figure 3-5 に示す。オレイン酸は OFD 群で、 α -LA と EPA は PFD 群で有意に高値を示した。この結果は、肝臓中の脂肪酸組成でも同様の結果であった (Figure 3-6)。

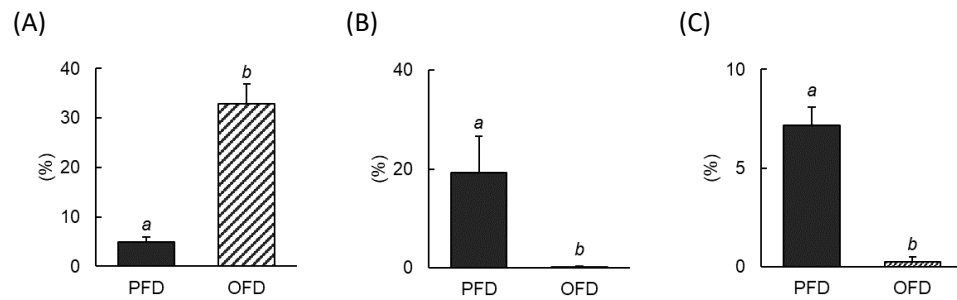


Figure 3-5. Effects on blood fatty acid composition after one week of consumption of 30% perilla oil diet (PFD) or 30% olive oil diet (OFD).

Concentration of (A) oleic acid, (B) α -LA, and (C) EPA in the blood after one week consumption of PFD or OFD. Data are shown as the mean \pm SD (n = 5). Different superscripts (a, b) indicate significant differences ($p < 0.05$).

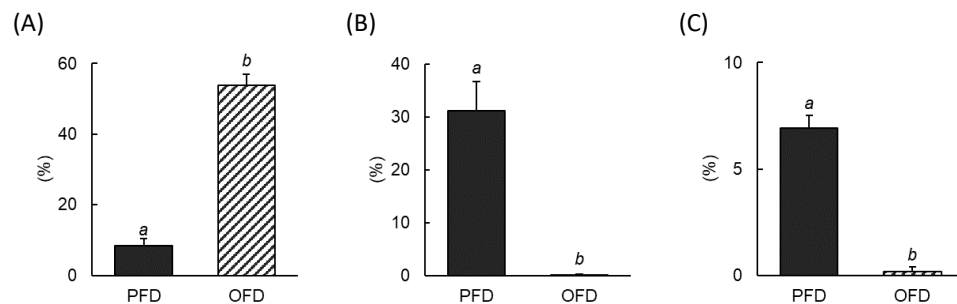


Figure 3-6. Effects on hepatic fatty acid composition after one week of consumption of 30% perilla oil diet (PFD) or 30% olive oil diet (OFD).

Concentration of (A) oleic acid, (B) α -LA, and (C) EPA in the liver after one week of consumption of PFD or OFD. Data are shown as the mean \pm SD (n = 5). Different superscripts (a, b) indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.3.4. 脂肪酸合成酵素に与える油脂の継続的な摂取の影響

肝臓での脂肪酸合成に関連する因子の mRNA 発現量を Figure 3-7 に示す。本研究で測定した4つの関連遺伝子 (ELOVL 2, ELOVL 5, FADS 1, FADS 2) は、いずれも PFD 群と OFD 群間で顕著な変化は確認されなかった。

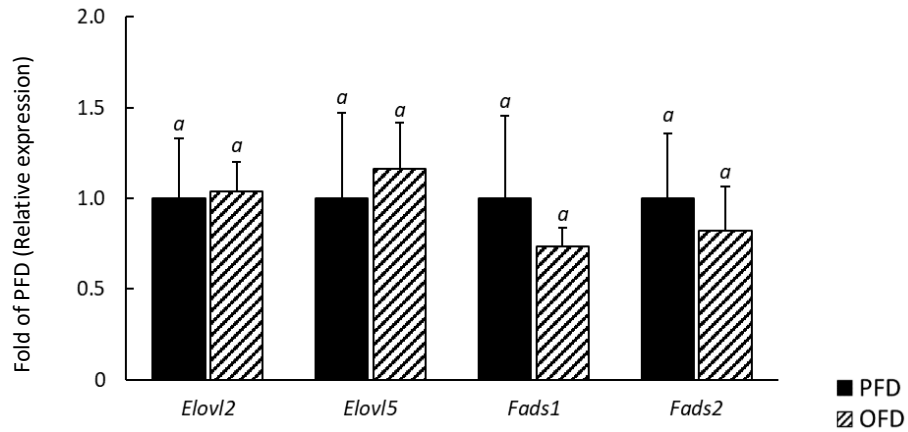


Figure 3-7. Effects on composition of 30% perilla oil diet (PFD) or 30% olive oil diet (OFD) on fatty acid synthesis related gene expression.

Data indicate fold-change of the β -actin control (mean \pm SD, n = 5). Different superscripts (a, b) indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.4. 考察

ω -3 PUFA は肥満や糖尿病, 心血管疾患等の症状に有益な効果をもたらすが, 生体内で合成することができないため摂取する必要がある。しかし, ω -3 PUFA を摂取した時の体内動態は詳しく分かっていない。そこで本章では, ω -3 PUFA である α -LA, EPA や α -LA を豊富に含む油脂(エゴマ油)を単回摂取する, もしくは継続的に摂取することで, 体内脂肪酸組成や遺伝子発現量にどのような影響が与えられるのかを検証した。

α -LA もしくは EPA をマウスに単回経口投与すると, 投与した脂肪酸の血液中濃度はいずれも投与 6 時間後に高い値を示した (Figure 3-3 A)。血中 α -LA 量はその後, 急速に減少し, 投与 18 時間後には定常状態に戻ったが, EPA 量は投与 6 時間後も高値を維持した (Figure 3-3 D)。このような EPA 濃度が維持される現象は, EPA を豊富に含むオキアミ油を単回経口投与した時にみられることが報告されているが[93-95], その詳細なメカニズムは不明である。今後, 血中の EPA 濃度が維持される理由, 例えば排出されるまでに要する時間やその経路に対する作用についての検討が必要である。

脂肪酸の状態ではなく油脂の状態で摂取した時の体内動態を調査するため, α -LA を豊富に含む油脂であるエゴマ油もしくは含まない油脂であるオリーブ油をマウスに経口投与し, 血液中の脂肪酸組成の経時的変化を分析した。その結果, それぞれの油脂の主要な脂肪酸である α -LA およびオレイン酸が投与 6 時間後に最も高い値を示した (Figure 3-4 A, B)。この実験とは別に, エゴマ油もしくはオリーブ油をマウスに経口投与し, 投与 0~6 時間後の血液中脂肪酸濃度を測定した実験も行ったが, 投与 6 時間後に最も高い値を示すという同様の結果が得られた (data not shown)。油脂を経口投与した時の血中トリグリセリド濃度は 120~180 分で最も高い値を示すという先行研究があるため, 本実験結果とは異なっている[96]。脂肪酸がトリグリセリドに結合する位置の違いによって代謝速度に違いがあることが報告されているが[97], 詳細な機序は解明されていないため, 今後解明していく必要がある。

油脂の単回摂取ではなく, 継続的に摂取した時の体内動態を調査するため, エゴマ油もしくはオリーブ油を 30%含有した飼料 (PFD もしくは OFD) をマウスに 1 週間摂食させた。その結果, 血液中および肝臓中の脂肪酸組成が, PFD 群は α -LA 濃度, OFD 群はオレイン酸濃度が血液中および肝臓中で有意に高い値を示した (Figure 3-5 A, B; Figure 3-6 A, B)。一方, 単回投与では濃度に変化が無かった EPA が, 血液中および肝臓中両方とも PFD 群で有意に高い値を示した (Figure 3-5 C; Figure 3-6 C)。Wang らは, α -LA を含んだ食餌を 7 週間摂食させると, 血液中 EPA 量が高い状態で維持されることを報告しており[93], 本章で得られた結果と同様であったが, 脂肪酸合成系に関与する因子である *Fads* や *Elovl* の発現量は本章で得られた結果と異なっていた (Figure 3-7)。この発現量の違いには摂食期間の違いの他の要因として, 時間の影響がある。本章ではマウスにとって休眠期の最中にあたる午後 3 時に解剖を行った。しかし, 生体内には概日時計と呼ばれる約 24 時間周期の体内時計を有しており, 時計遺伝子と呼ばれる遺伝子の相互関係によってリ

リズムが形成されている[98]。体内時計によって制御されているリズムは、脂質代謝や機能性食品成分の吸収や代謝にも影響をおよぼすことが報告されており[99-101]、また、 ω -3 PUFA を豊富に含む魚油含有食を好んで摂食する時間帯が存在する可能性があることも報告されている[92]。故に、脂肪酸合成系も概日時計の影響を受けている可能性が考えられるため、今後明らかにしていく必要がある。

以上の結果より、 ω -3 PUFA を継続的に摂取することで生体内の ω -3 PUFA 量を増加させることが可能であることが示された。この結果は、脂質を摂取することで脂質代謝系を調節し、その結果として抗肥満効果を発揮していることを示唆している。今後、より詳細な機序、特に脂肪酸の排出系や、摂食時刻や解剖時刻などの時間を考慮に入れた実験を展開していく必要がある。

総括

近年、脂質摂取量が増加した食生活、いわゆる食の欧米化に伴う肥満症や脂質異常症などの生活習慣病の罹患率上昇している。故に、生活習慣病の一次予防や重症化予防策を見出すことは喫緊の課題である。本学位論文では、脂質代謝系を調節できる食品や食品成分の機能を探求することを目的とし、脂質異常症(第1章)、次世代の健康(第2章)、体内脂肪酸組成(第3章)に与える影響について評価した。

第1章:高脂血症モデルマウス(ApoE^{-/-}マウス)にアントシアニンなどのポリフェノールを豊富に含んだ黒大豆種皮抽出物を1%添加した食餌を8週間与えたところ、血清および肝臓の総コレステロールと肝臓トリグリセリドの異常な高値が有意に低下した。また、この作用機序には、肝臓中の脂質代謝系遺伝子(*Cyp7A1* および *Ppara*)の調節効果が関与していることを見出した。

第2章:抗肥満効果を有するポリフェノールの機能が母体を介して次世代の子供へ伝承する可能性を見出した。代表的なポリフェノール的一种であるケルセチンを被検成分として選定し、妊娠中の母マウスに1%のケルセチン含有食を与えたところ、母体のケルセチン摂取による次世代に生じる食事誘発性肥満や高脂血症に対する予防効果は期待できないが、総コレステロール/HDL-コレステロール比の調節には役立つ可能性が示された。

第3章:高脂肪食を摂取すると肥満になるが、近年、その作用が脂肪を構成する脂肪酸の種類によって異なる事が報告されている。特に、魚油に豊富に含まれているエイコサペンタエン酸(EPA)などの ω -3系の多価不飽和脂肪酸(PUFA)には肥満を予防できる可能性が示されているが、その体内動態は十分に解明されていない。そこで、 α -リノレン酸に富んだエゴマ油(EPAは不含有)をマウスに1週間与えたところ、血中からEPAを検出できた。一方、エゴマ油を単回経口投与した場合は、検出されなかった。つまり、魚油に加えて、 α -リノレン酸を豊富に含む脂質を日常的に摂取することで、体内のEPA量を高いレベルで維持することができ、それ故に、脂質摂取による抗肥満の可能性を見出した。

以上より、本学位論文では、食品(黒大豆種皮抽出物)や食品成分(ケルセチンやPUFA)を日常的に摂取することで、肥満症や脂質異常症などの生活習慣病の一次予防や重症化予防ができる可能性を明らかにした。

参考文献

- [1] Organization W.H., *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. 2000.
- [2] Vecchié A., Dallegri F., Carbone F., Bonaventura A., Liberale L., Portincasa P., Frühbeck G., and Montecucco F., Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. *Eur. J. Intern. Med.*, **48**, 6-17, 2018.
- [3] (NCD-RisC) N.R.F.C., Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*, **387**(10026), 1377-1396, 2016.
- [4] Wang Y.C., McPherson K., Marsh T., Gortmaker S.L., and Brown M., Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet*, **378**(9793), 815-825, 2011.
- [5] 山下静也, 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017 年版. *日本内科学会雑誌*, **107**(1), 73-80, 2018.
- [6] Enkhmaa B., Surampudi P., Anuurad E., and Berglund L., *Lifestyle changes: effect of diet, exercise, functional food, and obesity treatment on lipids and lipoproteins*, in *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J.M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
- [7] Koo S.I. and Noh S.K., Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *J. Nutr. Biochem.*, **18**(3), 179-183, 2007.
- [8] Yasuda A., Natsume M., Sasaki K., Baba S., Nakamura Y., Kanegae M., and Nagaoka S., Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet. *Biofactors*, **33**(3), 211-223, 2008.
- [9] Gallaher C.M., Munion J., Hesslink R., Jr., Wise J., and Gallaher D.D., Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J. Nutr.*, **130**(11), 2753-2759, 2000.
- [10] Mineo S., Noguchi A., Nagakura Y., Kobori K., Ohta T., Sakaguchi E., and Ichihyanagi T., Boysenberry polyphenols suppressed elevation of plasma triglyceride levels in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **61**(4), 306-312, 2015.
- [11] Ran G., Ying L., Li L., Yan Q., Yi W., Ying C., Wu H., and Ye X., Resveratrol ameliorates diet-induced dysregulation of lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*, **12**(7), e0180865, 2017.
- [12] Varghese S., Kubatka P., Rodrigo L., Gazdikova K., Caprnda M., Fedotova J., Zulli A., Kruzliak P., and Büsselberg D., Chili pepper as a body weight-loss food. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **68**(4), 392-401, 2017.

- [13] Nuthikattu S., Milenkovic D., Rutledge J., and Villablanca A., The western diet regulates hippocampal microvascular gene expression: an integrated genomic analyses in female mice. *Sci. Rep.*, **9**(1), 19058, 2019.
- [14] Bedogni G., Gastaldelli A., and Foschi F.G., Fatty liver, cardiometabolic disease and mortality. *Curr. Opin. Lipidol.*, **31**(1), 27-31, 2020.
- [15] Blazina I. and Selph S., Diabetes drugs for nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Syst Rev*, **8**(1), 295, 2019.
- [16] Lin C.-F., Chang Y.-H., Chien S.-C., Lin Y.-H., and Yeh H.-Y., Epidemiology of dyslipidemia in the asia pacific region. *Int J Gerontol*, **12**(1), 2-6, 2018.
- [17] Sfyri P. and Matsakas A., Crossroads between peripheral atherosclerosis, western-type diet and skeletal muscle pathophysiology: emphasis on apolipoprotein E deficiency and peripheral arterial disease. *J. Biomed. Sci.*, **24**(1), 42, 2017.
- [18] Williams L.F., The inheritance of certain black and brown pigments in the soybean. *Genetics*, **37**(2), 208-215, 1952.
- [19] Choung M.-G., Baek I.-Y., Kang S.-T., Han W.-Y., Shin D.-C., Moon H.-P., and Kang K.-H., Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Agric. Food Chem.*, **49**(12), 5848-5851, 2001.
- [20] Peng H., Li W., Li H., Deng Z., and Zhang B., Extractable and non-extractable bound phenolic compositions and their antioxidant properties in seed coat and cotyledon of black soybean (*Glycinemax* (L.) merr). *J Funct*, **32**, 296-312, 2017.
- [21] Todd J.J. and Vodkin L.O., Pigmented soybean (*Glycine max*) seed coats accumulate proanthocyanidins during development. *Plant Physiol.*, **102**(2), 663-670, 1993.
- [22] Chen G.-L., Zhang X., Chen S.-G., Han M.-D., and Gao Y.-Q., Antioxidant activities and contents of free, esterified and insoluble-bound phenolics in 14 subtropical fruit leaves collected from the south of China. *J Funct*, **30**, 290-302, 2017.
- [23] Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., and Kanazawa K., Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.*, **51**(3), 571-581, 2003.
- [24] Domae C., Nanba F., Maruo T., Suzuki T., Ashida H., and Yamashita Y., Black soybean seed coat polyphenols promote nitric oxide production in the aorta through glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal cells. *Food Funct.*, **10**(12), 7875-7882, 2019.
- [25] Kurimoto Y., Shibayama Y., Inoue S., Soga M., Takikawa M., Ito C., Nanba F., Yoshida T., Yamashita Y., Ashida H., et al., Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Agric. Food Chem.*, **61**(23), 5558-5564, 2013.
- [26] Yoshioka Y., Li X., Zhang T., Mitani T., Yasuda M., Nanba F., Toda T., Yamashita Y., and

- Ashida H., Cyanidin-3-glucoside derived from black soybeans ameliorate type 2 diabetes through the induction of differentiation of preadipocytes into smaller and insulin-sensitive adipocytes. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **60**(2), 108-114, 2017.
- [27] Zhang T., Jiang S., He C., Kimura Y., Yamashita Y., and Ashida H., Black soybean seed coat polyphenols prevent B(a)P-induced DNA damage through modulating drug-metabolizing enzymes in HepG2 cells and ICR mice. *Mutat. Res.*, **752**(1-2), 34-41, 2013.
- [28] Kusunoki M., Sato D., Tsutsumi K., Tsutsui H., Nakamura T., and Oshida Y., Black soybean extract improves lipid profiles in fenofibrate-treated type 2 diabetics with postprandial hyperlipidemia. *J. Med. Food*, **18**(6), 615-618, 2015.
- [29] Yoshioka Y., Li X., Zhang T., Mitani T., Yasuda M., Nanba F., Toda T., Yamashita Y., and Ashida H., Black soybean seed coat polyphenols prevent AAPH-induced oxidative DNA-damage in HepG2 cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **60**(2), 108-114, 2017.
- [30] Kanamoto Y., Yamashita Y., Nanba F., Yoshida T., Tsuda T., Fukuda I., Nakamura-Tsuruta S., and Ashida H., A black soybean seed coat extract prevents obesity and glucose intolerance by up-regulating uncoupling proteins and down-regulating inflammatory cytokines in high-fat diet-fed mice. *J. Agric. Food Chem.*, **59**(16), 8985-8993, 2011.
- [31] Kim J.-M., Kim J.-S., Yoo H., Choung M.-G., and Sung M.-K., Effects of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed coats and its anthocyanidins on colonic inflammation and cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.*, **56**(18), 8427-8433, 2008.
- [32] Hoang M.H., Jia Y., Mok B., Jun H.J., Hwang K.Y., and Lee S.J., Kaempferol ameliorates symptoms of metabolic syndrome by regulating activities of liver X receptor-beta. *J. Nutr. Biochem.*, **26**(8), 868-875, 2015.
- [33] Yokoyama D., Tanaka W., Hashizume Y., Tandia M., Sakono M., Shimoi K., and Sakakibara H., Daily consumption of monoglucosyl-rutin prevents high-fat diet-induced obesity by suppressing gastric inhibitory polypeptide secretion in mice. *FFHD*, **8**(7), 2018.
- [34] Ide T. and Origuchi I., Physiological effects of an oil rich in γ -linolenic acid on hepatic fatty acid oxidation and serum lipid levels in genetically hyperlipidemic mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **64**(2), 148-157, 2018.
- [35] Emini Veseli B., Perrotta P., De Meyer G.R.A., Roth L., Van der Donckt C., Martinet W., and De Meyer G.R.Y., Animal models of atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.*, **816**, 3-13, 2017.
- [36] Keller U., Nutritional laboratory markers in malnutrition. *J Clin Med*, **8**(6), 775, 2019.
- [37] Wang D., Xia M., Gao S., Li D., Zhang Y., Jin T., and Ling W., Cyanidin-3-O- β -glucoside upregulates hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase expression and reduces hypercholesterolemia in mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, **56**(4), 610-621, 2012.
- [38] Kajinami K., Takekoshi N., and Saito Y., Pitavastatin: efficacy and safety profiles of a novel

- synthetic HMG-CoA reductase inhibitor. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **21**(3), 199-215, 2003.
- [39] Huang J., Feng S., Liu A., Dai Z., Wang H., Reuhl K., Lu W., and Yang C.S., Green tea polyphenol EGCG alleviates metabolic abnormality and fatty liver by decreasing bile acid and lipid absorption in mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, **62**(4), 1700696, 2017.
- [40] Yokoyama D., Sakakibara H., Fukuno H., Kimura K., Hori A., Nara T., Kato K., and Sakono M., Whey protein-hydrolyzed peptides diminish hepatic lipid levels in rats consuming high-sucrose diets. *Food Sci. Technol. Res.*, **22**(5), 631-638, 2016.
- [41] Hardie D.G., Ross F.A., and Hawley S.A., AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**(4), 251-262, 2012.
- [42] Yamashita K., Yatsuya H., Muramatsu T., Toyoshima H., Murohara T., and Tamakoshi K., Association of coffee consumption with serum adiponectin, leptin, inflammation and metabolic markers in Japanese workers: a cross-sectional study. *Nutr. Diabetes*, **2**(4), e33, 2012.
- [43] Cao H., Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J. Endocrinol.*, **220**(2), T47-59, 2014.
- [44] Collaborators G.B.D.O., Afshin A., Forouzanfar M.H., Reitsma M.B., Sur P., Estep K., Lee A., Marczak L., Mokdad A.H., Moradi-Lakeh M., et al., Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N. Engl. J. Med.*, **377**(1), 13-27, 2017.
- [45] Caballero B., Humans against obesity: Who will win?, *Adv. Nutr.*, **10**(suppl_1), S4-s9, 2019.
- [46] Craig P., Halavatau V., Comino E., and Caterson I., Differences in body composition between Tongans and Australians: time to rethink the healthy weight ranges?, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **25**(12), 1806-1814, 2001.
- [47] Elagizi A., Kachur S., Lavie C.J., Carbone S., Pandey A., Ortega F.B., and Milani R.V., An overview and update on obesity and the obesity paradox in cardiovascular diseases. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **61**(2), 142-150, 2018.
- [48] Hill J.O., Wyatt H.R., and Peters J.C., The importance of energy balance. *European Endocrinology*, **9**(2), 111-115, 2013.
- [49] Carrera-Bastos P., Fontes, O'Keefe, Lindeberg, and Cordain, The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *Research Reports in Clinical Cardiology*, 2011.
- [50] Jiang H., Horiuchi Y., Hironao K.Y., Kitakaze T., Yamashita Y., and Ashida H., Prevention effect of quercetin and its glycosides on obesity and hyperglycemia through activating AMPK α in high-fat diet-fed ICR mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **67**(1), 74-83, 2020.
- [51] Shabbir U., Rubab M., Daliri E.B.-M., Chelliah R., Javed A., and Oh D.-H., Curcumin, quercetin, catechins and metabolic diseases: the role of gut microbiota. *Nutrients*, **13**(1), 206, 2021.

- [52] Yang J., Lee J., and Kim Y., Effect of deglycosylated rutin by acid hydrolysis on obesity and hyperlipidemia in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients*, **12**(5), 2020.
- [53] Nishimura M., Muro T., Kobori M., and Nishihira J., Effect of daily ingestion of quercetin-rich onion powder for 12 weeks on visceral fat: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Nutrients*, **12**(1), 2019.
- [54] Gluckman P.D., Hanson M.A., and Buklijas T., A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. *J. Dev. Orig. Health Dis.*, **1**(1), 6-18, 2010.
- [55] Barker D.J.P., The origins of the developmental origins theory. *J Intern*, **261**(5), 412-427, 2007.
- [56] Mandy M. and Nyirenda M., Developmental origins of health and disease: the relevance to developing nations. *Int Health*, **10**(2), 66-70, 2018.
- [57] Johnson S.A., Javurek A.B., Painter M.S., Murphy C.R., Conard C.M., Gant K.L., Howald E.C., Eilersieck M.R., Wiedmeyer C.E., Vieira-Potter V.J., et al., Effects of a maternal high-fat diet on offspring behavioral and metabolic parameters in a rodent model. *J. Dev. Orig. Health Dis.*, **8**(1), 75-88, 2017.
- [58] Hsu C.-N., Hou C.-Y., Lee C.-T., Chan J.Y.H., and Tain Y.-L., The interplay between maternal and post-weaning high-fat diet and gut microbiota in the developmental programming of hypertension. *Nutrients*, **11**(9), 1982, 2019.
- [59] Akyol A., Cetin A.K., Gulec A., Dasgin H., Ayaz A., and Onbasilar I., Maternal low-quality protein diet exerts sex-specific effects on plasma amino acid profile and alters hepatic expression of methyltransferases in adult rat offspring. *J. Dev. Orig. Health Dis.*, **9**(4), 409-416, 2018.
- [60] Kawakubo-Yasukochi T., Morioka M., Ohe K., Yasukochi A., Ozaki Y., Hazekawa M., Nishinakagawa T., Ono K., Nakamura S., and Nakashima M., Maternal folic acid depletion during early pregnancy increases sensitivity to squamous tumor formation in the offspring in mice. *J. Dev. Orig. Health Dis.*, **10**(6), 683-691, 2019.
- [61] Tain Y.-L., Lee W.-C., Wu K.L.H., Leu S., and Chan J.Y.H., Maternal high fructose intake increases the vulnerability to post-weaning high-fat diet-induced programmed hypertension in male offspring. *Nutrients*, **10**(1), 56, 2018.
- [62] Wu Z., Zhao J., Xu H., Lyv Y., Feng X., Fang Y., and Xu Y., Maternal quercetin administration during gestation and lactation decrease endoplasmic reticulum stress and related inflammation in the adult offspring of obese female rats. *Eur. J. Nutr.*, **53**(8), 1669-1683, 2014.
- [63] Braden G.C., Rasmussen S., Monette S., and Tolwani R.J., Effects of breeding configuration on maternal and weanling behavior in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, **56**(4), 369-376, 2017.

- [64] Zhang M., Liu W., Zhou Y., Li Y., Qin Y., and Xu Y., Neurodevelopmental toxicity induced by maternal PM2.5 exposure and protective effects of quercetin and Vitamin C. *Chemosphere*, **213**, 182-196, 2018.
- [65] Yamaki K. and Takahashi Y., Additive beneficial effect of epigallocatechin gallate and quercetin on the arteriosclerosis index in mice. *Food Sci. Technol. Res.*, **23**(2), 355-361, 2017.
- [66] McMullin T.S., Lowe E.R., Bartels M.J., and Marty M.S., Dynamic changes in lipids and proteins of maternal, fetal, and pup blood and milk during perinatal development in CD and Wistar rats. *Toxicol. Sci.*, **105**(2), 260-274, 2008.
- [67] Vetulani J., Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol. Rep.*, **65**(6), 1451-1461, 2013.
- [68] Md A.H., Deb K.P., Hossain M.A., Mannan K.A., Mostafa G., and Hossain M.M., Correlation between serum cholesterol and serum albumin level in childhood nephrotic syndrome., *Urology & Nephrology Open Access Journal*, **3**, 115-118, 2016.
- [69] Hong J., Stubbins R.E., Smith R.R., Harvey A.E., and Núñez N.P., Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutr. J.*, **8**, 11, 2009.
- [70] Lee H.S., Lim S.-M., Jung J.I., Kim S.M., Lee J.K., Kim Y.H., Cha K.M., Oh T.K., Moon J.M., Kim T.Y., et al., Gynostemma pentaphyllum extract ameliorates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6N mice by upregulating SIRT1. *Nutrients*, **11**(10), 2475, 2019.
- [71] Song J., Kim J., Park H.J., and Kim H., Anti-obesity effects of a prunus persica and nelumbo nucifera mixture in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*, **12**(11), 2020.
- [72] Keller U., Nutritional Laboratory Markers in Malnutrition. *J Clin Med*, **8**(6), 2019.
- [73] Laclaustra M., Lopez-Garcia E., Civeira F., Garcia-Esquinas E., Graciani A., Guallar-Castillon P., Banegas J.R., and Rodriguez-Artalejo F., LDL cholesterol rises with BMI only in lean individuals: cross-sectional U.S. and Spanish representative data. *Diabetes Care*, **41**(10), 2195-2201, 2018.
- [74] Zhou Q., Wu J., Tang J., Wang J.-J., Lu C.-H., and Wang P.-X., Beneficial effect of higher dietary fiber intake on plasma HDL-C and TC/HDL-C ratio among Chinese rural-to-urban migrant workers. *IJERPH*, **12**(5), 4726-4738, 2015.
- [75] Li J., Wu H., Liu Y., and Yang L., High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Exp. Anim.*, **69**(3), 326-335, 2020.
- [76] Xu Z.R., Li J.Y., Dong X.W., Tan Z.J., Wu W.Z., Xie Q.M., and Yang Y.M., Apple polyphenols decrease atherosclerosis and hepatic steatosis in ApoE^{-/-} mice through the ROS/MAPK/NF- κ B pathway. *Nutrients*, **7**(8), 7085-7105, 2015.
- [77] Rivas-Urbina A., Rull A., Aldana-Ramos J., Santos D., Puig N., Farre-Cabrerizo N.,

- Benitez S., Perez A., de Gonzalo-Calvo D., Escola-Gil J.C., et al., Subcutaneous administration of apolipoprotein J-derived mimetic peptide d-[113–122]apoJ improves LDL and HDL function and prevents atherosclerosis in LDLR-KO mice. *Biomolecules*, **10**(6), 829, 2020.
- [78] Yu Y., Luo T., Liu S., Song G., Han J., Wang Y., Yao S., Feng L., and Qin S., Chitosan oligosaccharides attenuate atherosclerosis and decrease non-HDL in ApoE^{-/-} mice. *J Atheroscler Thromb*, **22**(9), 926-941, 2015.
- [79] Miller W.G., Myers G.L., Sakurabayashi I., Bachmann L.M., Caudill S.P., Dziekonski A., Edwards S., Kimberly M.M., Korzun W.J., Leary E.T., et al., Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clin. Chem.*, **56**(6), 977-986, 2010.
- [80] Champy M.F., Selloum M., Piard L., Zeitler V., Caradec C., Chambon P., and Auwerx J., Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mamm. Genome*, **15**(10), 768-783, 2004.
- [81] Lin X., Chavez M.R., Bruch R.C., Kilroy G.E., Simmons L.A., Lin L., Braymer H.D., Bray G.A., and York D.A., The effects of a high fat diet on leptin mRNA, serum leptin and the response to leptin are not altered in a rat strain susceptible to high fat diet-induced obesity. *J. Nutr.*, **128**(10), 1606-1613, 1998.
- [82] Maekawa R., Ogata H., Murase M., Harada N., Suzuki K., Joo E., Sankoda A., Iida A., Izumoto T., Tsunekawa S., et al., Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is required for moderate high-fat diet- but not high-carbohydrate diet-induced weight gain. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **314**(6), E572-e583, 2018.
- [83] Yabe D. and Seino Y., Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and β cell preservation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **107**(2), 248-256, 2011.
- [84] Nasteska D., Harada N., Suzuki K., Yamane S., Hamasaki A., Joo E., Iwasaki K., Shibue K., Harada T., and Inagaki N., Chronic reduction of GIP secretion alleviates obesity and insulin resistance under high-fat diet conditions. *Diabetes*, **63**(7), 2332-2343, 2014.
- [85] Wong S.K., Chin K.Y., Suhaimi F.H., Fairus A., and Ima-Nirwana S., Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr. Metab. (Lond.)*, **13**, 65, 2016.
- [86] Reagan-Shaw S., Nihal M., and Ahmad N., Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.*, **22**(3), 659-661, 2008.
- [87] Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., and Kanazawa K., Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.*, **51**(3), 571-581, 2003.
- [88] Schwab U., Lauritzen L., Tholstrup T., Haldorssoni T., Riserus U., Uusitupa M., and

- Becker W., Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food Nutr. Res.*, **58**, 2014.
- [89] Cormier H., Rudkowska I., Lemieux S., Couture P., Julien P., and Vohl M.C., Effects of FADS and ELOVL polymorphisms on indexes of desaturase and elongase activities: results from a pre-post fish oil supplementation. *Genes Nutr.*, **9**(6), 437, 2014.
- [90] Wallis J.G., Watts J.L., and Browse J., Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?, *Trends Biochem. Sci.*, **27**(9), 467, 2002.
- [91] Nguyen Q.V., Malau-Aduli B.S., Cavalieri J., Nichols P.D., and Malau-Aduli A.E.O., Enhancing omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content of dairy-derived foods for human consumption. *Nutrients*, **11**(4), 743, 2019.
- [92] Matsuzaka H., Matsuyama H., Tanaka W., Tajiri H., and Sakakibara H., Selective consumption of fish oil at end of the day increases the physiological fatty acid compositions of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in mice. *Molecules*, **27**(4), 2022.
- [93] Wang S.-h., Pan Y., Li J., Chen H.-q., Zhang H., Chen W., Gu Z.-n., and Chen Y.Q., Endogenous omega-3 long-chain fatty acid biosynthesis from alpha-linolenic acid is affected by substrate levels, gene expression, and product inhibition. *RSC Advances*, **7**(65), 40946-40951, 2017.
- [94] Yurko-Mauro K., Kralovec J., Bailey-Hall E., Smeberg V., Stark J.G., and Salem N., Jr., Similar eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid plasma levels achieved with fish oil or krill oil in a randomized double-blind four-week bioavailability study. *Lipids Health Dis.*, **14**, 99, 2015.
- [95] Ahn S.H., Lim S.J., Ryu Y.M., Park H.R., Suh H.J., and Han S.H., Absorption rate of krill oil and fish oil in blood and brain of rats. *Lipids Health Dis.*, **17**(1), 162, 2018.
- [96] Ochiai M., Evaluating the appropriate oral lipid tolerance test model for investigating plasma triglyceride elevation in mice. *PLoS One*, **15**(10), e0235875, 2020.
- [97] Suzuki H. and Wada S., Metabolism and function of icosapentaenoic and docosahexaenoic acids (in Japanese). *J Oleo Sci*, **37**(10), 781-787, 1988.
- [98] Canaple L., Rambaud J., Dkhissi-Benyahya O., Rayet B., Tan N.S., Michalik L., Delaunay F., Wahli W., and Laudet V., Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol. Endocrinol.*, **20**(8), 1715-1727, 2006.
- [99] Nohara C., Yokoyama D., Tanaka W., Sogon T., Sakono M., and Sakakibara H., Daily consumption of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extracts increases the absorption rate of anthocyanins in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **66**(30), 7958-7964, 2018.

- [100] Tsurusaki T., Sakakibara H., Aoshima Y., Yamazaki S., Sakono M., and Shimoi K., Diurnal rhythmicity in biological processes involved in bioavailability of functional food factors. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **52**(3), 208-214, 2013.
- [101] Gooley J.J., Circadian regulation of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.*, **75**(4), 440-450, 2016.

本発表に関して公表された学術論文

主 学術論文

- (1) Takashima M., Tanaka W. (equal contribution), Matsuyama H., Tajiri H., Sakakibara H., Maternal quercetin consumption during pregnancy may help regulate total cholesterol/HDL-cholesterol ratio without effect on cholesterol levels in male progeny consuming high-fat diet. *Nutrients*, **13**(4), 1242, 2021.
- (2) Tanaka W., Matsuyama H., Yokoyama D., Yamashita Y., Ashida H., Sakono S., Sakakibara H., Daily consumption of black soybean (*Glycine max* L.) seed coat polyphenols attenuates dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Functional Foods*, **72**, 104054, 2020.

副 学術論文

- (1) Tanaka W., Yokoyama D., Matsuura Y., Nozaki M., Hirozawa N., Kunitake H., Sakono M., Sakakibara H. Subchronic Toxicity Evaluation of Leaves from Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium virgatum* Aiton) in Rats. *Toxicology Reports*, **6**, 272-278, 2019.
- (2) Shibazaki N., Tanaka W., Suzuki Y., Matsuyama H., Kubota H., Ogawa K., Yokoyama D., Sakakibara H., “Maltose consumption exacerbates high-fat diet-induced overweight and related parameters in mice”, *Functional Foods in Health and Disease*, **12**, 680-691, 2022.
- (3) Matsuzaka H., Matsuyama H., Tanaka W., Tajiri H., Sakakibara H. “Selective consumption of fish oil at end of the day increases the physiological fatty acid compositions of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in mice”, *Molecules*, **27**(4), 1271, 2022.
- (4) Tajiri H., Tanaka W., Matsuyama H., Sugita T., Hidaka K., Yokoyama D., Sakakibara H., “Beneficial effects of the consumption of hot-water extracts of thinned immature mangos (*Mangifera indica* "Irwin") on the hypertriglyceridemia of apolipoprotein E-deficient mice”, *Metabolites*, **12**(2), 116, 2022.
- (5) Matsuyama H., Tanaka W., Miyoshi N., Miyazaki T., Michimoto H., Sakakibara H., “Beneficial effects of the consumption of sun-dried radishes (*Raphanus sativus* cv. YR-Hyuga-Risou) on dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice”, *Journal of Food Biochemistry*, **45**(5), e13727, 2021.
- (6) Tajiri H., Tanaka W., Takashima M., Matsuyama H., Sugita T., Hidaka K., Sakakibara H., “Subchronic safety evaluation of hot-water extract from thinned immature mangos (*Mangifera indica* ‘Irwin’): 90-days oral toxicity study in rats” *Toxicology Reports*, **8**, 1046-1053, 2021.
- (7) Matsuyama H., Tanaka W., Yokoyama D., Matsumoto S., Sano T., Yamashita T., Nishimura S., Sakono M., Sakakibara H., “Suitability of a 10% fat diet for use in time-restricted feeding experiments with C57BL/6 mice”, *Bioactive Compounds in Health and Disease*, **3**(3), 55-65, 2020.
- (8) Yokoyama D., Tanaka W., Hashizume Y., Tandia M., Sakono M., Shimoi K., Sakakibara H., Daily consumption of monoglucosyl-rutin prevents high-fat-diet-induced obesity by suppressing gastric inhibitory polypeptide secretion in mice, *Functional Foods in Health & Disease*, **8**(7), 353-371, 2018.
- (9) Nohara C., Yokoyama D., Tanaka W., Sogon T., Sakono M., Sakakibara H., Daily Consumption of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extracts Increases the Absorption Rate of Anthocyanins in Rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**(30), 7958-7964, 2018.

謝辞

本論文は筆者が宮崎大学大学院農学工学総合研究科博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。本研究を遂行するにあたり、全面的なご指導を賜った榊原啓之教授，故・窄野昌信名誉教授，また河原聡教授，山崎正夫教授，西山和夫准教授，並びに菅本和寛准教授は副指導教員として本研究実施の機会を与えていただき，引間順一教授，小川健二郎テニユアトラック助教にはその遂行にあたって終始ご指導を頂きましたことを深謝いたします。そして，第 1 章の実験では，神戸大学農学研究科生命機能科学専攻の芦田均教授，山下陽子准教授に黒大豆種皮抽出物を提供していただくとともに有益なご助言をいただきましたこと，第 2 章の実験および第 3 章の実験では，静岡県立大学環境科学研究所の下位香代子教授に有益なご助言をいただきましたこと深く御礼申し上げます。最後に，実験にご協力いただいた横山大悟助教，松山弘希氏，柴崎菜々香氏，渡部沙織氏，田尻隼斗氏，高島正勝氏並びに栄養化学研究室の学生諸君に感謝申し上げます。