



教授
望月 和樹

- ・ 経歴
2005年9月 静岡県立大学食品栄養科学部
助手(2007年4月から助教)
2012年4月 山梨大学 生命環境科学部
准教授(2016年9月から教授)

妊娠期の母の食事の PFC 比が出生後の子の代謝 に及ぼす影響

目的

日本人の食事摂取基準によると、1歳以上の日本人が健康的な生活を営むための3大栄養素の比率の目標量は、タンパク質は13~20%エネルギー(%E)、脂質は20~30%E、炭水化物は50~65%Eである。食事摂取基準の根拠は、横断研究や縦断研究などによる観察研究の成果によるものである。しかしながら、近年、若い女性の過剰なダイエット志向が、3大栄養素の摂取比率を乱す結果に繋がっている。具体的には、肉や魚を敬遠し野菜・果物を多く摂取するような食事(低タンパク質食)や糖質を敬遠するような食事(糖質制限食)によるダイエットを行う女性が増加している。これらの過剰なダイエットは、本人自身の疾病の発症リスクを増大させるとともに、妊娠前および妊娠中に行った場合には、出生児の生活習慣病の発症リスクを高める可能性がある。

このように、発育期(胎生期、授乳期、幼児期等)の栄養環境による児の生活習慣病の発症を促進するというDOHaD(発育期成人病起源)学説が提唱されている。これまでに、全体的なエネルギー不足や、微量栄養成分であるビタミン(葉酸、ビタミンB12など)・ミネラル(鉄など)の妊娠期の母体の摂取

不足による児の生活習慣病の発症リスクについて、ヒトにおける観察研究および動物モデルにおけるメカニズムの検証が行われてきた。これまでに動物実験では、妊娠期の低タンパク質（5-10%E）食の摂取によって肥満・高血圧・インスリン抵抗性の発症が増大することが報告されている。しかしながら、妊娠期の異なるタンパク質・脂質・炭水化物比（PFC比）の食事による出生児の生活習慣病発症リスクは近年の新しい栄養問題であり、いまだ明らかとなっていない。

そこで本研究では、母獣（マウス）の食餌の PFC 比と出生後の仔の耐糖能異常および代謝異常との関連を検証することを目的とした。

方法

妊娠 1 日の ICR マウス 20 匹を搬入後、1 ケージにつき 1 匹で、異なる PFC 比の食餌、C64/P20 食〔通常食（AIN-93G 食）、PFC=P20%E、F16%E、C64%E〕、C34/P32 食（軽度糖質制限食、PFC=P32%E、F34%E、C34%E）、C24/P32 食（重度糖質制限食、PFC=P32%E、F44%E、C24%E）、C74/P10 食（軽度タンパク質制限食、PFC=P10%E、F16%E、C74%E）、C79/P5 食（重度タンパク質制限食、PFC=P5%E、F16%E、C79%E）を与えた。飼料および水道水を自由摂取させ、飼育をした。出産後は、すべての群で AIN-93G 食を自由摂取とした。仔獣は、1 母獣 10 匹に揃え、28 日齢まで母獣と飼育した。C79/P5 食摂取群に関しては、出産数がオス 5 匹であったため、母獣 1 匹に対して仔 5 匹とした。28 日齢以降は、雌雄に分け、AIN-93G 食をおよび水道水を自由摂取させ飼育した。今回は雄のみを解析対象とした。39 日齢において、7 時間絶食下において採血を実施し、血糖値、中性脂肪濃度、インスリン濃度を測定した。46 日齢において非絶食下で解剖を行い、肝臓、すい臓、腸間膜脂肪を採取した。飼育期間中は、室温 23°C、湿度 50%、12 時間明暗サイクル（明期 6-18 時、暗期 18-6 時）を一定に保ち、体重測定、摂食量、餌交換、ケージ交換を週 1-2 度行った。肝臓、すい臓から総 RNA 抽出はグアニジンチオシアネート法に従い抽出し、リアルタイム RT-PCR によって標的遺伝子の mRNA 発現量を測定した。目的とする遺伝子の mRNA 発現量と対応する内部標準である 18S rRNA 発現量値の比を計算し、発現量の相対値を求めた。肝臓においては、組織 1g

当たりの中性脂肪量を測定した。実験データは平均値±標準誤差(SEM)で表した。一元配置分析（下位検定は Fisher 検定）を行い、 $P<0.05$ の場合を統計学的に有意な差と判断した。

結果と考察

これまでに、妊娠期および授乳期に低タンパク質食を与えた母獣の産仔のうち、雄ラットは 15 か月齢で耐糖能異常、17 ヶ月齢で 2 型糖尿病をきたすことが明らかとなっている。この報告では、活性酸素種の産生の亢進や膵 B 細胞の減少が認められている[1]。さらに、子宮内胎児発育遅延 (IUGR) マウスの出生後成体期の膵臓では、インスリンの分泌に関与する転写因子 *Pdx1* 遺伝子の発現量の低下が観察されるとともに、インスリン分泌量が低下することが明らかとなっている[2]。これらの研究成果は、発育期の低栄養は、インスリン分泌を低下させ、生活習慣病発症の発症を促進する可能性を示している。しかしながら、妊娠期の様々な PFC 比がインスリン分泌能や肝臓における代謝に与える影響は明らかではない。

本研究では、まず妊娠期のマウスに様々な PFC 比の食餌を与えて、仔の成長や糖脂質関連パラメーターとの関連を調べた。その結果、糖質制限食を摂取した母獣から生まれた仔の体重は、通常食 (C64/P20) 群と比較して、有意な差は得られなかった。しかしながら、空腹時の中性脂肪濃度が重度糖質制限食 (C24/P32) 群で増大し、肝臓中の中性脂肪濃度が軽度糖質制限食 (C34/P32) 群で増大することが示唆された。そのため、軽度糖質制限食 (C34/P32) では、脂肪肝の発症リスクが増大し、重度糖質制限 (C24/P32) では、脂質異常症の発症リスクが高まることが考えられた。これらの結果は、糖質制限食を母獣が摂取した場合において、糖質比率の違いによって、異なるメカニズムで生活習慣病が発症する可能性が考えられた。一方で、母獣がタンパク質制限食を摂取した場合では、重度タンパク質制限食 (C79/P5) 食を摂取した母獣から生まれた仔の体重が顕著に低下いととも、体重あたりの肝臓重量が増大する傾向があることが明らかとなった (表 1)。さらに、空腹時の血中の中性脂肪濃度がタンパク質制限食群で有意に増大したことや、解剖時の肝臓中の中性脂肪濃度が重度タ

ンパク質制限食群で増大する傾向を示したことから、母獣のタンパク質制限の程度が重度になるのに従って、仔において脂質異常症や脂肪肝のリスクが増大する可能性が示唆された。

表1. 子獣の体重、摂食量、血中パラメーター

食餌	C64/P20	C34/P32	C24/P32	C74/P10	C79/P5
動物数	10	11	11	10	5
39日齢(7時間絶食時)					
体重(g)	38.2 ± 0.87 ^B	38.4 ± 0.57	38.6 ± 0.65	38.0 ± 0.81 ^B	30.1 ± 0.49 ^A
空腹時血糖値(mg/dL)	166.0 ± 25.5 ^b	145.6 ± 19.3 ^a	143.0 ± 17.8 ^a	160.3 ± 28.4	158.4 ± 5.80
空腹時インスリン(μU/mL)	0.03 ± 0.004	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.003
空腹時中性脂肪(mg/dL)	43.6 ± 7.88 ^{aA}	37.0 ± 6.28 ^a	63.6 ± 6.28 ^b	67.9 ± 7.38 ^B	73.1 ± 10.9 ^B
46日齢(非絶食時)					
体重(g)	44.2 ± 1.35 ^B	43.1 ± 0.72	43.2 ± 0.88	44.0 ± 1.19 ^B	34.6 ± 5.46 ^A
摂食量(g/day)	5.06 ± 0.15 ^B	5.42 ± 0.56	6.72 ± 2.15	5.90 ± 0.82 ^B	3.27 ^A
体重あたりの肝臓重量(%)	4.79 ± 0.18 ^{AB}	4.56 ± 0.10	4.70 ± 0.14	4.60 ± 0.07 ^A	5.16 ± 0.81 ^B
体重あたりの膵臓重量(%)	0.81 ± 0.02 ^A	0.90 ± 0.04	0.86 ± 0.03	0.88 ± 0.04 ^{AB}	0.93 ± 0.14 ^B
体重あたりの腸間膜脂肪(%)	1.38 ± 0.10 ^{BB}	1.21 ± 0.05 ^{ab}	1.06 ± 0.09 ^a	1.28 ± 0.08 ^A	1.18 ± 0.17 ^B
血性中性脂肪量(mg/dL)	204.7 ± 64.9 ^b	108.9 ± 11.9 ^{ab}	72.6 ± 10.3 ^a	142.9 ± 31.3	77.2 ± 7.93
肝臓中性脂肪量(mg/g組織)	73.5 ± 9.85 ^a	108.2 ± 10.3 ^b	77.2 ± 12.1 ^a	95.3 ± 12.9	116.2 ± 27.6

平均値 ± SEM

a-b, A-B: 異なるアルファベットは $P < 0.05$ で有意な差を示す (Fisher's test).

次に、母獣の食餌の糖質比率、タンパク質比率の変化による代謝の変化のメカニズムを検証するために、すい臓のインスリンやインスリン分泌に関与する転写因子の mRNA 発現量を調べた。その結果、母獣の食餌中のタンパク質量の低下に従って、インスリンの分泌に関与する遺伝子 (*Hnf1b*, *Hnf4a*, *Glis3*, *Islet-1*, *NeuroD*) やインスリン遺伝子 (*Insulin-1*, *Insulin-2*) の発現が低下することが分かった。糖質制限食においても、タンパク質制限食ほど顕著ではないが、母獣の食餌中の糖質の量が低下するにしたがって、インスリンの分泌に関与する遺伝子 (*Glis3*, *NeuroD*) やインスリン遺伝子 (*Insulin-1*, *Insulin-2*) の発現が低下することが分かった。さらに、非絶食下の血液中のインスリン濃度が、妊娠期の食餌のタンパク質の濃度に従って低下した (図 1)。上記の研究成果は、母獣のタンパク質制限による血中インスリン分泌の低下は、インスリン遺伝子の発現を増大させる転写因子の低下によるものである可能性が高いことを示唆している。一方で、母獣の糖質制限食の摂取は、インスリン遺伝子の発現を低下させたが、血液中のインスリン濃度は低下させなかった。これまでの研究によって母獣の糖質制限 (高脂肪食の摂取) は、仔においてインスリン抵抗性やレプチン抵抗性を誘導することが報告されている [3, 4]。それゆえ、

母獣の糖質制限は、インスリン分泌低下をもたらすが、インスリン抵抗性を誘導することによって代償的なインスリン分泌の増大が起こり、血液中のインスリン濃度は変化しなかった可能性がある。今後、母獣のタンパク質制限や糖質制限が、仔においてインスリン抵抗性を誘導するかを明らかにするために、インスリン負荷試験を行う必要があると考えられる。また、母獣のタンパク質制限や糖質制限が、仔において耐糖能異常を誘導するかを調べるために、経口糖負荷試験を行う必要があると考えられる。

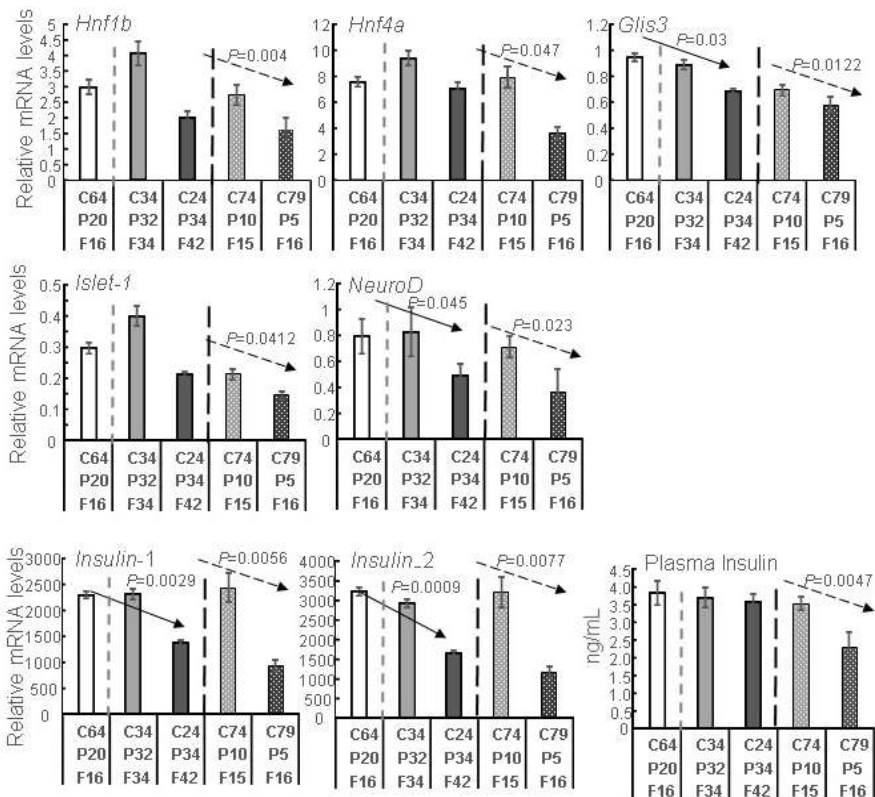


図1 仔獣の膵臓における遺伝子発現変化

次に肝臓における代謝関連遺伝子の発現を調べた。その結果、軽度糖質制限食を摂取した母獣から生まれた46日齢の仔獣では、解糖系の律速酵素 *Pfkf* 遺伝子、糖新生に関わる *Fbp2* 遺伝子、ペントースリン酸経路で脂肪酸合成に必要な補酵素 NADPH の合成に関わる *G6pdx* 遺伝子、脂肪合成

に関与する遺伝子 *Acaca* の発現が増大もしくは増大傾向が、通常食 (C64/P20) 摂取群と比較して観察された。重度糖質制限食を摂取した母獣から生まれた仔獣では、肝臓におけるこのような代謝関連遺伝子発現の変化は見られなかった。また、タンパク質制限食を摂取した母獣から生まれた仔の肝臓では、糖新生の律速酵素 (*Fbp2*) やペントースリン酸経路の律速酵素 (*G6pdx*) の発現が増大することが明らかとなった (図2)。それゆえ、母獣への軽度糖質制限は、仔の肝臓において、TCA 回路の回転不足による糖代謝の低下が、脂肪酸によるエネルギー代謝経路、ペントースリン酸経路、脂肪合成経路や糖新生経路の活性化をもたらすと考えられた。軽度タンパク質制限食を摂取した母獣から生まれた仔の肝臓では、糖新生やペントースリン酸経路が促進され、耐糖能異常や高尿酸血症のリスクが増大している可能性が示唆された。一方で、重度タンパク質制限食では、軽度タンパク質制限食ほどの変化は観察されなかった。そのため、重度タンパク質制限食を摂取した母獣から生まれた仔の肝臓の中性脂肪の蓄積は、軽度タンパク質制限食群とは、異なるメカニズムで中性脂肪が肝臓に蓄積している可能性が考えられた。

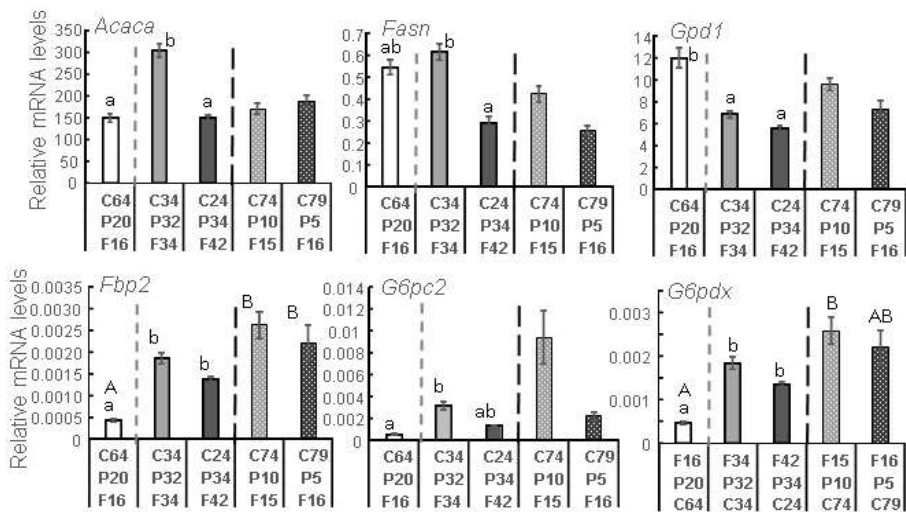


図2 肝臓における仔の遺伝子発現変化

以上をまとめると、母獣への糖質比やタンパク質比の低下は、仔獣の成長後のインスリン分泌の低下やインスリン抵抗性の増大を誘導し、肝臓の代謝を攪乱し生活習慣病のリスクを増大させる可能性が示唆された。

謝辞

本研究に対して援助をしていただいたサッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。本研究は、山梨大学 生命環境学部 地域食物科学科 食品栄養学部門の研究室の所属学生の協力のもとに行われたものです。ここに感謝します。

引用文献

1. Theys N, Bouckenoghe T, Ahn MT, Remacle C, Reusens B: **Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009, **297**:R1516-1525.
2. Pinney SE, Simmons RA: **Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes.** *Trends Endocrinol Metab* 2010, **21**:223-229.
3. Ferezou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, Gertler A, Delplanque B, Djiane J, Riottot M, Taouis M: **Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, **293**:R1056-1062.
4. Liang X, Yang Q, Zhang L, Maricelli JW, Rodgers BD, Zhu MJ, Du M: **Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice.** *Sci Rep* 2016, **6**:34345.