

<平成 22 年度助成>

脳機能に対する食事由来の脂質量増加の影響および その予防に関する検討

海野 けい子

(静岡県立大学薬学部 生物薬品化学分野)

【要約】

脂質摂取量の増大は、肥満や糖尿病等の生活習慣病のリスク要因であるが、加齢および脳機能への影響については十分な検討が行われていない。本研究では、脂質摂取量の増加による加齢および脳機能への影響およびその予防について検討した。食生活の変化に伴うヒトでの脂質摂取量の増加と同様に、通常の餌の約3倍に脂質量を増加した餌(高脂肪食、HFD)をマウスに摂取させ、体重増加、膵臓および脳機能への影響を検討した。また緑茶カテキンやカフェインには脳老化や肥満を抑制する効果があることが報告されていることから、市販の緑茶飲料と同濃度のカテキンおよびカフェインをマウスに飲水として摂取させ、HFD摂取に対する予防効果を検討した。その結果 HFD 摂取により体重は増加し、成熟期に相当する頃から膵臓β細胞の肥大および脳海馬における遺伝子発現の変化が認められ、老齢期に相当するマウスにおいて脳機能低下が認められるようになった。一方HFDと一緒に緑茶カテキン・カフェインを摂取していたマウスでは、体重増加は抑制傾向がみられ、膵β細胞の肥大および脳内遺伝子発現変化は抑制され、老齢期における脳機能の低下も抑制された。これらのことから、長期にわたる食事由来の脂質量増加が脳機能低下を引き起こすことが示唆されるとともに、緑茶摂取がHFD摂取による影響を予防する効果があることが明らかとなった。

1. はじめに

食生活の変化により、日本人の脂質摂取量は50年前の約3倍となっている。脂質摂取量の増大は肥満や糖尿病等の生活習慣病のリスク要因であるが、近年、脳機能低下を引き起こす一因となっていることが報告されている^{1,2)}。われわれも、高脂肪の食餌がマウスにおいて加齢時に脳機能低下をもたらすことを明らかにするとともに、その予防手段として緑茶カテキンとカフェインの同時摂取が、脳機能低下を抑制できることを見いだしている³⁾。また、糖尿病患者数は近年増加の一途を辿っているが、糖尿病患者において認知症やアルツハイマー病のリスクが高まっていることが、疫学調査から報告されている^{4,5)}。そこで本研究では膵臓機能と脳機能との関連に着目し、脂質摂取量の増大による脳機能への影響、および緑茶カテキン・カフェインの予防効果についてそのメカ

ニズム解明をめざすとともに、食品が有する生体における機能の一端を科学的に明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 実験方法

2-1 実験動物および高脂肪食の投与

C57BL/6 マウスは日本エスエルシー(株)より4週齢の雄性マウスを購入した。またトランスジェニックマウス(MIP-GFP)は、京都大学 豊田健太郎博士よりご分与いただき、本学実験動物施設で飼育繁殖し実験に使用した。MIP-GFP マウスは膵β細胞特異的に蛍光タンパク質(GFP)を発現していることから⁶⁾、膵臓での変化を観察するために使用した。マウスは12時間の明暗サイクル、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ および湿度 $55 \pm 1\%$ の環境下で飼育した。

飼料は高脂肪食(HFD)群には Quick Fat(日本クレア(株))、対照群には通常の飼料(CE-2, 日本

クレア(株))を自由摂取させた。Quick Fat 中の総脂質量は13.6%であり、CE-2(4.8%)の約3倍の脂質量を含む。マウスの体重は月に1回測定した。

2-2 緑茶(カテキンおよびカフェイン)の投与

緑茶カテキン(Sunphenon BG, 太陽化学(株))は0.5mg/mlの濃度で、カフェイン(和光純薬(株))は0.08mg/mlの濃度で水に溶解し、マウスに自由摂取させた。これらカテキンおよびカフェインの濃度は、ペットボトルの緑茶に相当する濃度である。カテキンおよびカフェインの溶液は週に2回交換し、摂取量を毎回測定した。

2-3 学習能の測定

マウスの自由な探索行動において、新しい場所を探索しようとする性質を利用し、Y字迷路におけるマウスの自発的交替行動を調べることで、海馬依存性の脳機能である空間作業記憶能を比較した。

3. 実験結果

3-1 高脂肪食摂取および緑茶摂取による体重への影響

HFD投与開始2ヶ月目頃より対照群に比べHFD群で体重が顕著に増加した。一方、HFDを摂取しながら緑茶成分(カテキンおよびカフェイン)を摂取していたマウスでは、体重増加が抑制される傾向にあった(図1)。

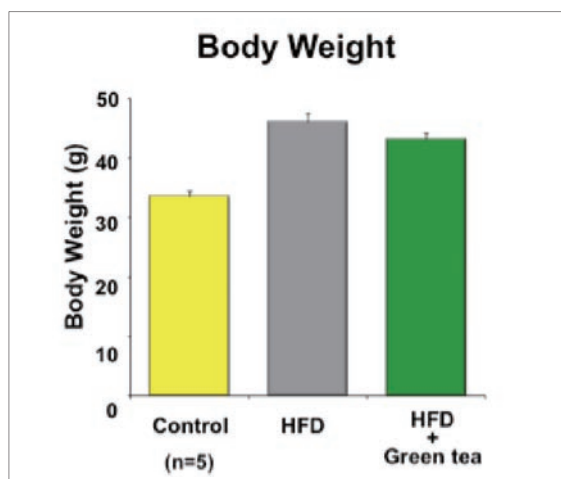


図1 高脂肪食および緑茶成分摂取による体重変化

3-2 高脂肪食摂取および緑茶摂取による膵臓への影響

HFD投与により膵臓では7月齢の時点で、単離したランゲルハンス氏島(ラ氏島)からのインスリン分泌能が亢進していることが見いだされた(図2)。ラ氏島の形態的变化を、 β 細胞特異的に蛍光タンパク質(GFP)を発現するトランスジェニックマウス(MIP-GFP)を用い観察した。その結果、HFD群では全膵臓中の β 細胞が占める面積が有意に増加したが、HFDと同時に緑茶成分を摂取していた群では、 β 細胞の増加が有意に抑制されていることが明らかとなった(図2)。

3-3 高脂肪食摂取および緑茶摂取による脳機能への影響

HFD投与開始後21月齢になったマウスについて、迷路を用いて空間作業記憶能を測定した。その結果、HFD摂取により空間作業記憶能が低下し、一方HFDと同時に緑茶成分を摂取していた群では、それが抑制されることが見いだされた(図3)。解剖し脳湿重量を比較した結果、HFD群のマウスでは脳湿重量が低下し、一方、HFDと同時に緑茶成分を摂取していた群では脳湿重量の低下が抑制された(図3)。脳湿重量の低下により、脳神経細胞の脱落や神経可塑性の低下が生じていることが考えられたことから、シナプス後膜のマーカとなるタンパク質であるPSD95の発現量を比較した。その結果、HFD摂取群ではPSD95の発現量が低下し、緑茶成分摂取により増加することが見いだされた(図3)。

3-4 高脂肪食摂取による脳内遺伝子発現の変化

HFD摂取により高齢になると脳の形態的および機能的変化が生じることが明らかとなったことから、次に脳内の遺伝子発現がどのように変化しているか検討した。

HFDを5ヶ月間摂取した7月齢のマウスについて、コントロール群、HFD群、HFD + Green tea群について3匹のマウス脳海馬よりRNAを抽出

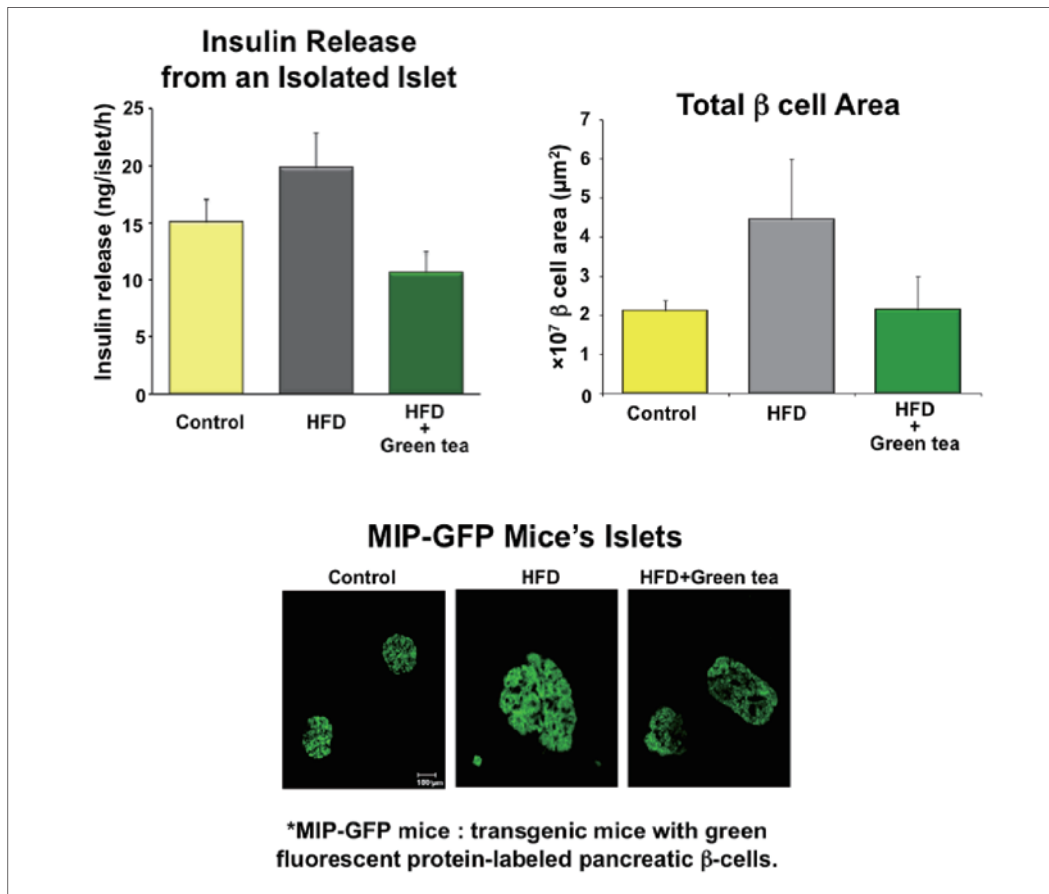


図 2 高脂肪食および緑茶成分摂取による膵臓の変化

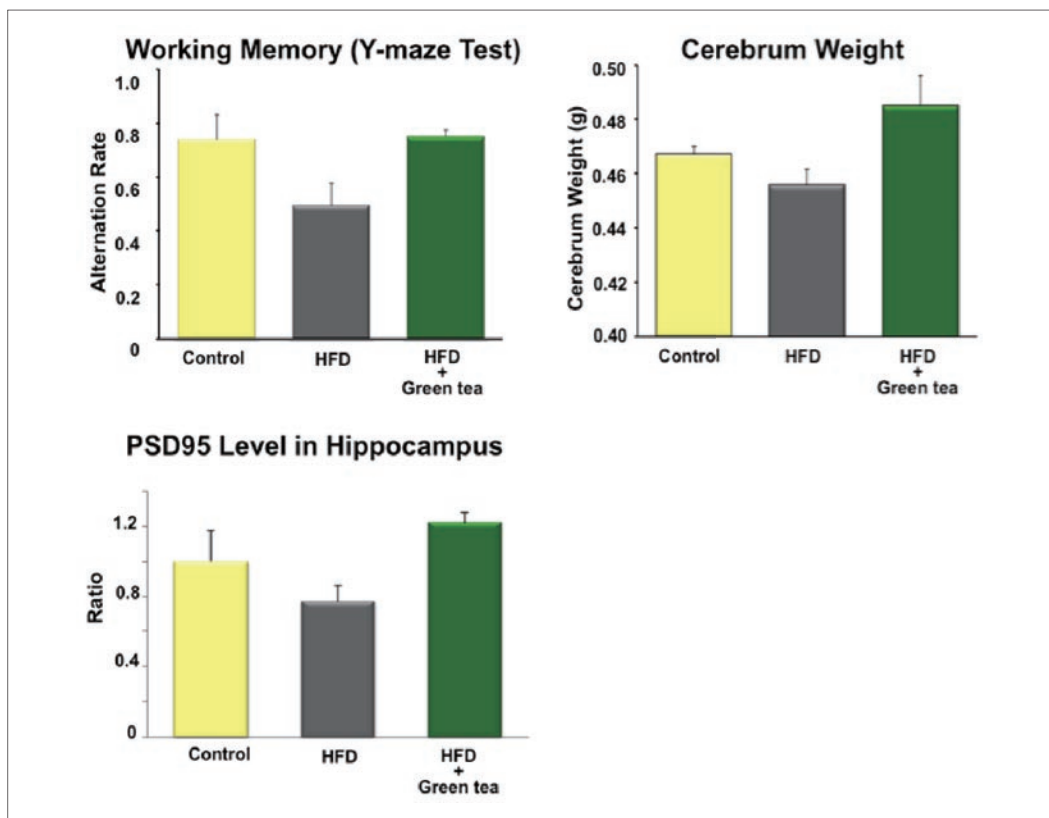


図 3 高脂肪食および緑茶成分摂取による脳機能の変化

しDNAマイクロアレイ分析を行った。得られたデータの中からHFD摂取により有意に変化が認められる遺伝子を選別し、それらの遺伝子について主成分分析により解析を行った。各個体の遺伝子発現の変化について、コントロール群を中心とし、HFD群およびHFD + Green tea群における発現の変化の程度を示した(図4)。HFD摂取の影響は、図4においてPC2方向(縦軸)への変化として認められた。HFD + Green tea群ではPC2方向にはほとんど変化せず、PC1方向(横軸)への変化として認められた。このことから、HFD摂取により生じたPC2方向への変化は緑茶成分摂取によりほぼ打ち消され、さらに緑茶成分摂取による変化がPC1方向に現れていると考えられた。

次に、どのようなカテゴリーの遺伝子が多く変化しているか調べたところ、HFD摂取により翻訳の段階に関与しているものが数多く発現が減少しており、一方、転写に関わる遺伝子はむ

しろ発現が増加していることが見いだされた(表1)。更に翻訳の段階に関わる遺伝子について、キーワード別に発現変化の様子を調べたところ、Ribosomal protein や Mitochondrial ribosomal protein というキーワードで分類される遺伝子では、そのほとんどがHFD摂取により発現が低下していることが示された。一方 Cell-cell signaling や Insulin-like growth factor というキーワードで分類される遺伝子はHFD摂取により発現が増加していることが示された。

4. 考 察

わが国においては近年食生活が大きく変化し、食事に占める脂質摂取の割合が50年前の約3倍に増加している。その増加の程度と同様に、通常食の約3倍に脂質量を増加させた餌(HFD)をマウスに摂取させたところ、体重の増加とともに、成熟期に相当する時期に臓腑の形態的および機能的変化が生じていることが確認された。更に高齢

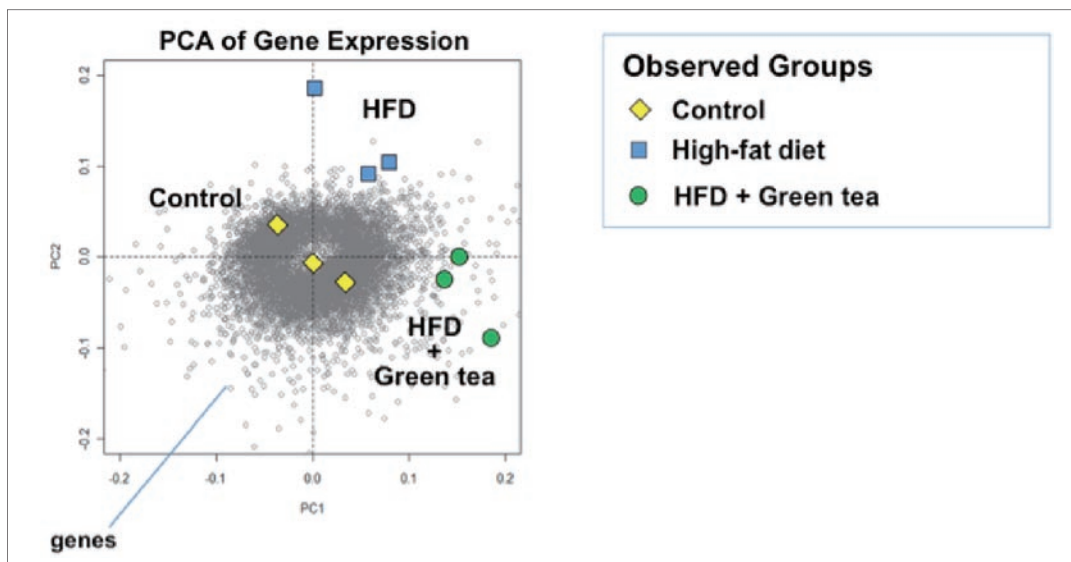


図4 高脂肪食および緑茶成分摂取による海馬における遺伝子発現の変化

表1 高脂肪食および緑茶成分摂取による海馬における遺伝子発現の変化

Down-regulation	Up-regulation
translation	regulation of transcription
ribosomal protein	multicellular organismal development
RNA processing	cell-cell signaling
electron transport chain	calcium channel
TCA cycle	growth factor

になると空間作業記憶と呼ばれる海馬依存性の短期記憶能が低下することが見いだされた。これらのことより脂質摂取量の増加は、肥満や糖尿病を引き起こすだけでなく、加齢に伴う脳機能の低下を促進していることが明らかとなった。

一方、高脂肪食を摂取していても同時に緑茶成分(カテキンおよびカフェイン)を摂取していた場合は、体重の増加抑制作用は顕著ではないが、脳および膵臓における機能的および形態的变化が有意に抑制されることが明らかとなった。本研究でマウスに用いたカテキンおよびカフェインの濃度は、市販されている緑茶飲料と同程度濃度であることから、緑茶成分の濃度としてヒトでの適用が十分可能である。これらのことから、脂質摂取量が増加した現代の食生活において、脳の老化を予防し脳機能を維持する上で、緑茶摂取の有用性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団ならびに関係各位に心から感謝申し上げます。また共同研究者としてご尽力いただきました秋田県立大学小西智一博士、シカゴ大学 原 真奈美博士に深く感謝いたします。

〔論文(プロシーディング)〕

1. Ken-ichi Maeda, Keiko Unno, Hiroyuki Yamamoto, Kazuaki Iguchi, Minoru Hoshino : Intake of green tea catechin and

caffeine improves brain function in mice chronically fed a high-fat diet

Proceedings of The 4th International Congress on O-Cha (Tea) Culture and Science (Shizuoka), HB-P-9, Oct 27, 2010

2. Hideaki Miyazaki, Keiko Unno, Hiroyuki Yamamoto, Manami Hara, Kazutoshi Sayama, Minoru Hoshino : Suppressive effect of green tea components on overactive β -cells induced by high-fat diet consumption
Proceedings of The 4th International Congress on O-Cha (Tea) Culture and Science (Shizuoka), HB-P-10, Oct 27, 2010

文 献

- 1) Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diet: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 2007; 15: 798-808.
- 2) Woods SC, D'Alessio DA, Tso P, Rushing PA, Clegg DJ, Benoit SC, *et al.* Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. *Physiol Behav* 2004; 83: 573-578.
- 3) Unno K, Yamamoto H, Maeda K, Takabayashi F, Yoshida H, Kikunaga N, Takamori N, Asahina S, Iguchi K, Sayama K, Hoshino M. Protection of brain and pancreas from high-fat diet: effects of catechin and caffeine. *Physiol Behav.* 2009; 96(2): 262-269.
- 4) Wang KC, Woung LC, Tsai MT, Liu CC, Su YH, Li CY. Risk of Alzheimer's disease in relation to diabetes: a population-based cohort study. *Neuroepidemiology.* 2012; 38(4): 237-244.
- 5) Domínguez RO, Marschoff ER, González SE, Repetto MG, Serra JA. Type 2 diabetes and/or its treatment leads to less cognitive impairment in Alzheimer's disease patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012; 98(1): 68-74.
- 6) Hara M, Dizon RF, Glick BS, Lee CS, Kaestner KH, Piston DW, Bindokas VP. Imaging pancreatic beta-cells in the intact pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 290(5): E1041-1047.

Preventive effect of green tea components, catechin and caffeine, against brain dysfunction caused by high-fat diet feeding in mice

Keiko Unno

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences
University of Shizuoka*

Increased consumption of fat in diet is an important risk factor for not only obesity and diabetes but also aging and brain dysfunction. We investigated the effect of chronic consumption of a high-fat diet (HFD) on both pancreas and brain functions. Moreover, as green tea catechin has been reported to improve brain atrophy, brain dysfunction and obesity, the effect of catechin and caffeine on brain and pancreas in mice fed HFD was investigated.

Mice (C57BL/6, male) had free access to HFD (Clea) or normal diet (CE-2) from 2 to 7 or 21 months. At the same time, mice drank water containing green tea catechin (0.5mg/ml) and caffeine (0.08mg/ml), of which concentrations were as similar as those in available green tea. Working memory was measured using Y-maze. The levels of synaptophysin, PSD95 in cerebral cortex and hippocampus were measured by western blotting. The effect of HFD feeding and the ingestion of catechin and caffeine on hippocampus were investigated using DNA microarray analysis. A transgenic mouse with green fluorescent protein-labeled pancreatic β -cell, MIP-GFP, was used for observation of morphological change in pancreas by HFD feeding.

Obesity was observed in mice fed HFD. The body weight tended to be lower in mice fed HFD with catechin and caffeine than in mice fed HFD. Insulin release was significantly higher in mice fed HFD than control and mice fed HFD with catechin and caffeine at 7 month-old. The area of β -cells in the pancreas was significantly higher in MIP-GFP mice fed HFD, though the area in mice fed HFD with catechin and caffeine was similar to that in control mice at 12-month-old. The cerebral weight, working memory and the levels of synapse marker, synaptophysin and PSD95, were lower in mice fed HFD than control and mice fed HFD with catechin and caffeine at 21 month-old. These results indicated that pancreas was altered in adult (7 and 12 months) mice by HFD feeding and brain function was lowered in aged (21 months) mice fed HFD. The alterations in pancreas and brain were suppressed by the ingestion of catechin and caffeine.

On the other hand, the gene expression in hippocampus was significantly altered in 7- months mice fed HFD. The principal component (PC) analysis of microarray data indicated that the effect of HFD feeding was clearly appeared and the ingestion of catechin and caffeine restored it to control level. The microarray data showed that the effect of HFD feeding on brain was already observed in adult (7-months) mice. Additionally, the ingestion of green tea catechin and caffeine essentially reduced the effect of HFD feeding on gene expression in hippocampus. These results suggest that brain dysfunction is accelerated by chronic HFD feeding and is prevented by the ingestion of green tea catechin and caffeine.