

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00866

研究課題名(和文)発酵食品含有機能性ペプチドの腸内細菌叢改善作用

研究課題名(英文)The effect of pyroglutamyl peptide on gut microbiota

研究代表者

和田 小依里(Wada, Sayori)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：60420709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢と食事、疾患は密接な関係にあり、様々な疾患に腸内細菌叢が関与していることが報告されている。我々は、日本の伝統的発酵食品の中に、腸炎抑制効果を持つピログルタミルペプチドを見出した。細胞実験では、単独でなく複数のピログルタミルペプチドの組み合わせが一酸化窒素産生を抑制した。また、ヒトが経口摂取可能なピログルタミルペプチド高含有低温発酵物飲料を開発した。飲料の経口摂取が、マウスにおいて腸炎を有意に改善し、ヒト研究では、ベースラインで特定のパターンの腸内細菌叢を持つ者の腸内細菌叢を変化させた。発酵食品等から多種類のペプチドを摂取することが健康増進に好ましいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

和食は2013年にユネスコの無形文化遺産に登録され、一汁三菜のバランスの取れた食事が健康増進、長寿に寄与していると考えられているが科学的に十分に実証されているとはいえない。今回の研究では和食・日本食に使用される伝統的発酵食品・調味料に特異的に含まれるピログルタミルペプチドに注目し、抗炎症作用や腸内細菌叢改善作用を示した。これらの結果は、和食・日本食の機能的な側面を一部解明している。近年、食のいわゆる欧米化が進んでいるとされるが、和食・日本食の良さを見直し、食料自給率の上昇を促進したり、消費量が低下している味噌や醤油の発酵食品の消費量を回復したりするきっかけとなればよいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Pyroglutamyl peptides, which are abundant in Japanese traditional fermented foods, have anti-inflammatory effects. The combination of 3 or more different type of pyroglutamyl peptides but not single peptide suppressed the production of nitric oxide (NO) in RAW264.7 macrophage cells. Then we developed pyroglutamyl peptides-rich fermented rice drink. Oral administration of this rice drink improved colitis and gut microbiota in DSS-induced colitis model mice. For human study, the healthy participants were randomly distributed in a crossover, double-blind comparative manner. Thought there was no significant change in microbiota before and after intake of fermented rice drink in the group, only the subjects, who showed particular pattern of microbiota, demonstrated apparent change after peptide rich-drink intake. Taking several pyroglutamyl peptides derived from foods including Japanese traditional fermented foods, might be beneficial to health.

研究分野：機能性食品

キーワード：伝統的発酵食品 ピログルタミルペプチド 腸内細菌叢 一酸化窒素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

食事で腸内細菌叢の構成が変化するという多くのエビデンスが示され、コンセンサスが得られつつある (Walker AW et al, 2012)。和食、地中海食などの伝統食の健康増進作用が報告されているが、伝統食には多彩な発酵食品が含まれていることから、発酵食品の有益な作用について注目されている (Selhub EM et al., 2014)。

発酵食品は世界各地に存在し、伝統食の 1/3 を占めるとされている (Selhub EM et al, 2014)。日本は米を主食とした食文化であることから発酵調味料 (味噌・醤油・鰹節) や植物原料由来の食品 (納豆・漬物) が多いとされている (河野ら、2010)。日本で味噌、醤油の年間消費量はそれぞれ 7 kg、10 L と報告されて (Selhub EM et al., 2014) 現在でも食生活に発酵食品が占める割合は大きいと考えられる。

日本の発酵食品である味噌や酒にはニホンコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) が利用されているが、申請者グループはこのニホンコウジカビが発酵の過程で米タンパク質を分解することにより機能性ペプチドであるピログルタミルロイシン (pyroGlu-Leu) を生成することを見出した (Kiyono T et al., 2013)。

我々のグループは先行研究において、マウスのデキストラン硫酸ナトリウム誘導性腸炎モデルを用いた実験で、この機能性ペプチド、pyroGlu-Leu を経口投与すると 0.1 mg/kg という低容量で腸炎を有意に改善することを示した。腸炎を誘発したマウスの腸内細菌叢は正常マウスと比較して Firmicutes 門の割合が高く、Bacteroidetes 門の割合が低かった。一方、pyroGlu-Leu 投与群ではその割合が正常近くまで改善していた (Wada et al. 2013)。また、日本の伝統的発酵食品に含有される他のピログルタミルペプチドにも同様の作用があることも明らかにしている。

2 型糖尿病や非アルコール性脂肪性肝疾患には肥満を介したインスリン抵抗性が関与しているとされている。一方、腸内細菌叢は肥満を介したインスリン抵抗性の改善に作用するという報告がある。2 型糖尿病患者では対照者と比較して腸内フローラの乱れが認められ、エンドトキシンの血中への逸脱が 6 倍以上多いことがわかっている (Everand A, et al., 2013)。2 型糖尿病および非アルコール性脂肪性肝疾患の日本での発病率は 11.2% および 29.7% と報告されており、これらの患者で発酵食品の有用性を示すことが出来れば、患者の利益になる。また、日本の伝統的発酵食品のおいしさだけでなく、付加価値として健康増進作用が示されれば、消費が高まることが期待できる。

## 2. 研究の目的

日本の伝統的発酵食品の健康増進作用を示すために、以下の方法をとった。

### (1) 機能性ピログルタミルペプチドを豊富に含む低温発酵物飲料の作成方法を確立する。

現在甘酒の製造に準じた手法で低温発酵物飲料を作成しているが、発酵食品は微生物の作用が占める割合が多く、画一化した製品を生産することは難しい。低温発酵物飲料に含まれる各種ペプチドの複合作用解明や摂取による有害事象の確認を行い、食品ベースで安定した作用を有する低温発酵物飲料の作成方法を確立する。

### (2) 低温発酵物飲料摂取と腸内細菌叢改善の関連を明らかにする。

すでに機能性ペプチド、ピログルタミルロイシンで腸内細菌叢改善作用を報告している。しかしながら合成ペプチドは薬品扱いとなり、ヒト投与へのハードルは高い。一方、ピログルタミルペプチドを多く含む伝統的発酵食品の有用性に注目している。(1) で確立した飲料は日本の発酵食品の製造法に準じており、この低温発酵物飲料摂取による腸内細菌叢の改善をマウスおよびヒトで確認することにより、日本の伝統的発酵食品が健康増進に寄与する可能性を示す。

### (3) 食習慣が糖尿病およびメタボリックシンドロームの発症リスクに及ぼす影響を評価する。

発酵食品による 2 型糖尿病およびメタボリックシンドローム改善効果の臨床研究を実施することは出来ないが、患者と健常者の発酵食品摂取頻度および腸内細菌叢を調査することにより、発酵食品に含まれる機能性ペプチドが腸内細菌叢に作用し、健康増進作用を示すという仮説を疫学的に検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 機能性ピログルタミルペプチドを豊富に含む低温発酵物飲料の作成方法の確立

甘酒の製法に準じ、低温で発酵させることによってピログルタミルペプチドを多く含む低温発酵物飲料を製造した。

次に、ピログルタミルペプチドの複合作用をみるために、味噌中に多く含まれる 4 種類のピログルタミルペプチド、ピログルタミルロイシン (pEL)、イソロイシン (pEI)、バリリン (pEV)、プロリン (pEP) をマクロファージ RAW264.7 細胞に投与し、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 産生抑制効果について検証した。

さらに、動物実験で腸炎抑制効果および腸内細菌叢改善効果をみるために、動物実験を行

った。マウスを、腸炎を誘発しない健常群、デキストラン硫酸ナトリウムによる腸炎誘発群、低温発酵物群（腸炎誘発・低温発酵物を投与）、甘酒投与群（腸炎誘発・甘酒を投与）、日本酒 A 群（腸炎誘発・速醸酏の日本酒を投与）、日本酒 B 群（腸炎誘発・生酏の日本酒を投与）の 6 群に分けて実験を行った。日本酒はいずれもエバポレーターでアルコールを除去したものを用いた。腸炎の評価は体重便化率、腸管長、Disease activity index (DAI)にて行った。また、腸内容物を回収し、腸内細菌 Firmicutes/Bacteroidetes 比の解析を行った。

(2) ヒトにおけるピログルタミルペプチド高含有低温発酵物飲料経口摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響

健康な大学生 20 名を対象に、健康人における低温発酵物の腸内細菌叢への影響についてのクロスオーバー二重盲検試験を行った。試験期間は 2017 年 9 月から 12 月である。試験飲料は全量 90 ml で 1 日 1 本 4 週間摂取した。低温発酵物を飲みやすい濃度に希釈、味付けした低温発酵物飲料と、水にそれと同じ味付けをしたプラセボ飲料を用いた。腸内細菌叢試験は各飲料の摂取前後、計 4 回行った。腸内細菌叢検査は外部委託し、16S rRNA 解析を行った。その後、主成分分析、多様性の検討を行った

(3) 食習慣が糖尿病およびメタボリックシンドロームの発症リスクに及ぼす影響の評価

人間ドック受診者のデータを用いたコホート研究を行い、糖尿病発症およびメタボリックシンドローム発症に関連する食習慣の検討をおこなうための予備試験をおこなった。Cox 比例ハザードモデルを用いて、ハザード比 (hazard ratio: HR) および 95% 信頼区間 (95% Confidence interval: 95% CI) を算出し、食習慣がメタボリックシンドロームに及ぼす影響を求めた。対象者の平均年齢が 54.7 歳であったため、煮物、炒め物に日本の伝統的発酵調味料である醤油、味噌、酒、味醂等が多く使用されていると考え、「煮物をよく食べる」「炒め物をよく食べる」食習慣について評価した。

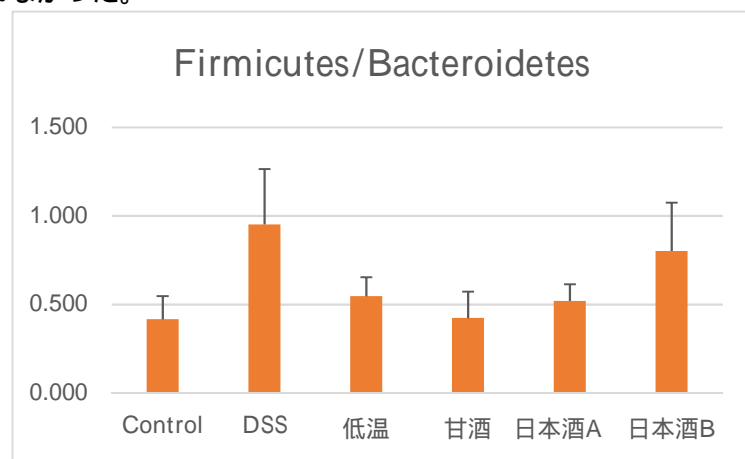
#### 4. 研究成果

(1) 機能性ピログルタミルペプチドを豊富に含む低温発酵物飲料の作成方法の確立

発酵食品由来の機能性ピログルタミルペプチドを添加したマクロファージ細胞実験で、ペプチドを同じ割合で、総ペプチド量が同濃度となるよう添加した場合、3 種類および 4 種類の組み合わせにおいて、有意に NO 産生を抑制した。一方、1 種類、2 種類の添加では有意な NO 産生抑制効果は認められなかった。

低温発酵物を経口投与したマウスに、他群と比較して明らかな有害事象は認められなかった。腸炎群と比較して低温発酵物群では腸管長、DAI スコアで有意に改善を示した。この効果は甘酒群や日本酒群では観察されなかった。体重変化率は腸炎群と低温発酵物群で有意差は見られなかった。

Firmicutes/Bacteroidetes 比は健常群と比較して、腸炎群で高値を示した。一方で低温発酵物群、甘酒群、日本酒 A 群では腸炎群と比較して低値を示した。



(2) ヒトにおけるピログルタミルペプチド高含有低温発酵物飲料経口摂取と腸内細菌叢改善の関連の解析

すべての低温発酵物群飲料摂取者で明らかな有害事象は認めなかった。

主成分分析では、ベースライン時に、集団の分布から大きく外れ他と比較して特異的な腸内細菌叢を示すものが 20 人中 4 人いた。以下、特定パターンの者とし、4 人以外の者はそれ以外の者とした。それ以外の者は低温発酵物飲料摂取前後で腸内細菌叢の大きな変化は認められなかった。一方、特定パターンの者は、低温発酵物摂取前後で構成が大きく変化し (4 人中 4 人) それ以外の者の特性に近づく傾向がみられた。特定パターンの者において、低温発酵物飲料、プラセボの順に摂取した者は、プラセボ摂取前の腸内細菌叢が低温発酵物飲料摂取前の位置まで戻りきっていないものがいた (3 人中 2 人)。

菌種の多様性評価では、その以外の者は、Chao1 指数 (菌種の多さ)、shannon 指数 (菌種の均等度) とともに、低温発酵物飲料摂取前後に、有意な差は認められなかった。しかし、特定パターンの 4 人中 3 人が低温発酵物飲料摂取前後で shannon 指数が増加した。

(3) 食習慣が糖尿病およびメタボリックシンドロームの発症リスクに及ぼす影響の評価

Cox 比例ハザードモデルを用いた分析では、糖尿病発症リスクにおいて、「煮物をよく食べる」者は、無調整の場合、煮物を食べる群が食べない群と比較して糖尿病のハザード比に有意差を認めなかったが、性・年齢で調整する有意傾向を示した。「炒め物をよく食べる」者は、全体では、無調整の場合、炒め物を食べる群が食べない群と比較して糖尿病のハザード比は有意傾向を示し、性・年齢を調整すると、有意に低値を示した。

メタボリックシンドローム発症リスクにおいて、「煮物をよく食べる」者は、無調整の場合、煮物を食べる群が食べない群と比較してメタボリックシンドロームのハザード比が有意に低値を示したが、性・年齢で調整すると有意差はなくなり、有意傾向を示した。「炒め物をよく食べる」者は、全体では、無調整の場合、炒め物を食べる群が食べない群と比較してメタボリックシンドロームのハザード比は有意に低値を示したが、性・年齢を調整すると、煮物と同様有意差はなくなり、有意傾向のみを示した。

今回は糖尿病、メタボリックシンドローム患者の腸内細菌叢の解析までは至らなかった。

#### (4) 総括

多種類のピログルタミルペプチドを投与すると NO 産生抑制効果が見られたことから、薬剤ではなく食品として摂取するのが抗炎症において好ましいと示唆された。また、グルタミルペプチド高含有低温発酵物はマウスにおいて、抗炎症作用、腸内細菌叢改善作用を示すことが、明らかとなった。ヒト試験では低温発酵物の安全性は確認できたが、腸内細菌叢に与える影響は十分に解明できなかった。しかし、特定の集団からはずれたパターンを示す者の腸内細菌叢を変化させる可能性は示唆された。疫学的調査でも日本の伝統的発酵食品・調味料を使った食事が健康増進作用に寄与する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Wada S, Kiyono T, Fukunaga S, Aoi W, Naito Y, Sato K, Higashi A
2. 発表標題 Japanese rice wine (Sake)-derived pyroglutamyl peptides have anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis in mice
3. 学会等名 The 19th biennial meeting for the Society for Free Radical Research International (SFRRRI) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wada S, Kasuno T, Kiyono T, Aoi W, Naito Y, Sato K, Higashi A
2. 発表標題 Colitis improvement effect of pyroglutamyl peptides-rich fermented rice drink in mice
3. 学会等名 21th International Congress of Nutrition (ICN) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 内藤裕二	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 178
3. 書名 脳腸相関 各種メディエーター, 腸内フローラから食品の機能性まで	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 健司  (Sato Kenji)  (00202094)	京都大学・農学研究科・教授   (14301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	内藤 裕二  (Naito Yuji)  (00305575)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授     (24303)	