

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07800

研究課題名(和文) 経口摂取したサケグレリンの吸収評価と機能性食品としての安全性に関する研究

研究課題名(英文) Study on the evaluation of absorption of orally administered salmon ghrelin and its safety as a functional food

研究代表者

木原 稔(Kihara, Minoru)

東海大学・生物学部・教授

研究者番号：40405684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：廃棄サケ胃に含まれるグレリンの有効利用として、グレリン含有サケ胃抽出物(sSE)の機能性成分と摂取安全性、サケグレリンの心筋保護作用と消化吸収性を確認した。その結果、サケグレリンは*in vitro*でラットグレリン受容体に結合し、皮下および経口投与によりドキシソルビシン誘発心筋障害を緩和したことから、sSEの機能成分はサケグレリンであることが示唆された。一方、サケグレリンは経口摂取しても吸収されず、消化管に分布する迷走神経を介して作用している可能性が示唆された。また、sSE4%飼料(サケグレリン4.8 nmol/kg飼料)を8週間毎日摂取してもマウスに異常は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サケ胃抽出物(sSE)の機能本体がグレリンである可能性が高く、経口摂取可能な天然グレリンを多量に確保できることになる。sSEの経口摂取により、(1)天然物由来の機能性食品素材の提供、(2)心疾患患者の病状緩和、(3)高齢者の食欲回復や低栄養状態の改善などが期待できるだろう。また、(4)廃棄生物資源の有効利用、廃棄物の減量という持続可能な開発目標(SGDs)に合致した社会的課題の解決にも貢献できるだろう。臨床利用を想定すると、グレリンは連日の非経口投与を必要とするため臨床応用に限界がある。本研究は、注射薬としてのグレリンに経口という新たな利用可能性を創造する研究でもある。

研究成果の概要(英文)：As a potential application of ghrelin-containing salmon stomach extract (sSE), we confirmed the safety of sSE as a food and whether the functional component of sSE is salmon ghrelin, and assessed the cardioprotective effect and digestibility of salmon ghrelin. Our results showed that salmon ghrelin binds to rat ghrelin receptor *in vitro*, alleviates doxorubicin-induced myocardial damage when subcutaneously or orally administered, and has similar effects to those reported for mammalian ghrelin, suggesting that the functional component of sSE is salmon ghrelin. However, salmon ghrelin was not absorbed after oral intake, suggesting that it may act via the vagus nerve in the gastrointestinal tract. In addition, no abnormalities were observed in mice after daily consumption of 4% sSE diet (4.8 nmol salmon ghrelin/kg diet) for 8 weeks.

研究分野：農学

キーワード：迷走神経 吸収 心筋繊維化 経口

1. 研究開始当初の背景

グレリンは主として脊椎動物胃内の分泌細胞で産生されるペプチドホルモンであり、摂食亢進や体重増加、成長ホルモン分泌など、エネルギー代謝調節に重要な作用を持つ。グレリンが心臓血管系に直接作用すること、グレリンの投与が慢性心不全患者の左心室機能を改善すること、拡張型心筋症マウスにおいて生存延命効果があることなどから、グレリンを用いた循環器病治療の研究が活発に進められている。しかしこれらの研究は臨床目的であることから、合成グレリンやグレリン模倣薬による検討がなされており、天然物では検討されていない。またこれまでの検討は、治療目的であるがゆえの注射による侵襲的方法である。つまり、予防や長期的な病態改善においては、天然物の経口摂取による非侵襲的方法が一般に受け入れられ易いが、このような方法としてのグレリンの効果はこれまで調べられていない。その大きな理由に、研究や臨床に資する量の天然グレリンを確保する手段が確立されていないことが挙げられる。

グレリンは魚類の胃にも存在する。グレリンの活性中心となるN末端側アミノ酸7残基の配列は、ヒトと魚類でほぼ同じであることから(図

Salmon	GSSFLSPSQKPQVRQGGKGP
Human	GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
Rat	GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
Mouse	GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR

図1 サケ、ヒト、ラット、マウスの活性型グレリンのアミノ酸配列。
*は脂肪酸修飾されるN末端側から3番目のセリン残基。N末端の「GSS(脂肪酸)F」が活性に必要な「アクティブコア」領域である。

1)、魚類胃由来グレリンがヒトの体内でも効果を表す可能性を推察できる。そこで魚類の胃をグレリン供給原料と見

た場合、例えば北海道内でのサケの生産量は約15万tであるが、加工時に廃棄処分される胃は900t以上と見積もられる。また国内生産量15万tを超える養殖ブリ類や、大きな胃を持つ養殖クロマグロの胃も廃棄処分されている。つまり魚類の胃は天然グレリンの供給源として量的に優れた原料と言える。

本研究者はこれまでに、サケ胃の乾燥粉末中に生理効果を発揮するには十分量のグレリンが含まれることを明らかにした。さらに、酢酸で胃からグレリンを抽出して約7倍に濃縮できることも明らかにし、経口摂取物の調整・製造に有益な知見を得た。これらの予備研究をもとに、水産加工場で廃棄されるサケの胃からグレリンを効率よく抽出して濃度を高め、ヒト心疾患の予防や病態改善物質として経口的に利用する研究を着想し、グレリン含有サケ胃抽出物(salmon stomach extract, sSE)の経口摂取が心不全誘発マウスの心筋繊維化や心肥大、腹水貯留、血中心不全マーカー値、心電図波形などを改善し、心不全誘発マウスの生存率を高めることを明らかにした。

グレリンには脂肪酸修飾された活性型と脂肪酸の修飾がない非活性型の2つの分子形態が存在するが、本報告書では、特に断りのない限り「グレリン」はこの活性型を示す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、sSEの機能成分本体がサケグレリンであることを特定し、経口摂取後のサケグレリンが消化を免れ吸収されること、sSEを食品として摂取しても安全であることを明らかにすることである。

sSEは粗抽出物であるため、sSEの主要な機能成分がサケグレリンなのかどうかは特定できていない。そこで、サケグレリンがsSEの機能成分かどうかを確認することを目的に、合成したサケグレリンを用いてそのポテンシャル(サケグレリンが哺乳動物体内でグレリンとしての機能を表すのか)を評価した。

また、これまで活性型グレリン測定はグレリン分子のN末端側活性部位を中心とする共通抗原を利用した放射免疫測定系(N-RIA)であることにより、N末端側アミノ酸配列の相同性が高い動物種のグレリンを広範に測定できることを利用して活性型サケグレリンを測定している。しかしながらこの方法でラットへのサケグレリン吸収を確認すると、経口投与したサケグレリンが吸収されて血中に現れたものか、あるいは内因性の、つまりラットのグレリンなのか、双方が測定されてしまうため不明確である。そこでグレリン分子のC末端側アミノ酸配列が動物種によってバリエーションがあることを利用して、サケグレリンC末端側抗体を用いたサケグレリン特異的測定系(salmon C-RIA)を開発し、経口摂取したサケグレリンが吸収されたことを確認した。

3. 研究の方法

(1) sSE の機能成分

in vitro 実験 サケグレリンの哺乳動物体内での作用を明らかにするために、ラットグレリン受容体 GHS-R1a を発現する GHSR62-CHO 細胞を用いて、細胞内カルシウム動員アッセイを実施した。アッセイには活性型サケグレリン、非活性型サケグレリン、活性型ラットグレリンを用い、いずれも合成品を使用した。

皮下投与実験 SD 雄性ラット (体重 100-130g) を 5 区 (各 n=5) に分け、正常対照区、毒性対照区、活性型サケグレリン区、非活性型サケグレリン区、活性型ラットグレリン区とした。正常対照区、毒性対照区には生理食塩水を、それ以外の区には対応する合成グレリンを 1 日 2 回 100 μ g/kg 体重で皮下注射した。1 週間の注射後、正常対照区には生理食塩水、残り 4 区にはドキシソルピシンを 20 mg/kg 体重で腹腔内注射した。翌日解剖、採血し、心臓はパラフィン包埋処理したのち組織観察を行なった。

経口投与実験 SD 雄性ラット (体重約 127g) を 3 区に分け、正常対照区 (n=6)、毒性対照区 (n=6)、サケグレリン区 (n=7) とした。サケグレリンは 300 μ g/kg 体重を 1 日朝夕 2 回、動物用経口ゾンデを用いて 9 日間経口投与した。投与 8 日目に毒性対照区ならびにサケグレリン区にドキシソルピシンを 30mg/kg 体重で腹腔内注射した。9 日目を絶食とし、10 日目に採血および、心臓はパラフィン包埋処理したのち組織観察を行なった。

(2) グレリンの被消化性 (*in vitro* 人工消化実験) グレリンの活性部位側 (N 末端側) を検出する放射免疫測定 (N-RIA 法)、ならびにサケグレリン C 末端側を特異的に検出する salmon C-RIA 法を用い、サケグレリンペプチドがどのように消化されるのか、胃腸内消化を模した *in vitro* 消化でその被消化性を確認した。

【胃内消化】ブタ胃粘膜由来ペプシン溶液に合成サケグレリンあるいは sSE を添加した。39 に調整した恒温振盪水槽で 4 時間培養して消化した。消化開始から 0、30、60、120、180、240 分でサンプルを採集した。

【腸内消化】胃内消化終了後、0.2M Tris 溶液で胃内消化残液を pH 7.5 に調節し、パンクレアチン溶液を加え、39 に調整した恒温振盪水槽で 4 時間消化した。腸内消化開始から 0、60、120、180、240 分でサンプルを採集し、ただちに 10 分間煮沸し酵素を失活させ N-RIA 法および salmon C-RIA 法によりグレリン測定した。

(3) 経口サケグレリンの吸収 (*in vivo* 実験) ICR 雄性マウスに合成活性型サケグレリン 300 μ g/kg 体重を胃ゾンデで強制経口投与し、投与後 30、60、120 分で門脈血中のサケグレリンを測定した。また、肝臓の IGF-1 遺伝子発現も確認した。

(4) sSE の安全性

【sSE の調製】北海道内の水産加工場で廃棄されるサケ内臓から胃を採取した。胃は沸騰水中で 10 分間煮熟し乾燥・粉碎した。この胃粉末の酢酸抽出液を減圧蒸留し、凍結乾燥後粉碎して試験に使用した。

【給餌試験】ICR 雄性マウスを Control 区、sSE 1% 区、sSE 2% 区、sSE 4% 区の 4 区に分け (各 n=5)、Control 区用の AIN-93G を基礎配合として配合原料のミルクカゼインの一部を sSE で置き換えながら、sSE 1% 配合飼料 (活性型サケグレリン 1.2nmol/kg 飼料)、sSE 2% 配合飼料 (同 2.4nmol/kg 飼料)、sSE 4% 配合飼料 (同 4.8nmol/kg 飼料) の 3 つの飼料を作成して 8 週間与えた。飼料および飲料水は自由摂取とした。試験最終日に内臓脂肪量を測定し、太腿部筋肉ならびに肝臓を摘出して脂肪含有量を測定した。

4. 研究成果

(1) sSE の機能成分

in vitro 実験 合成活性型サケグレリンはラット GHS-R1a を用量依存的に活性化した。EC₅₀ 値は 6.7 nM で、活性型ラットグレリンと同等の親和性を示した (図 2)。このことは、活性型サケグレリンがラット GHS-R1a、すなわちラットグレリン受容体に結合できることを意味している。一方で、非活性型サケグレリンはラット GHS-R1a 発現細胞を活性化しなかった。

このように、活性型サケグレリンは活性型ラットグレリンと同じ活性コア領域に脂肪酸修飾があるため活性型サケグレリンもラット体内で機能すること、活性型サケグレリンと活性型ラットグレリンの C 末端構造の違いは受容体との結合には関係ないこと、非活性型サケグレリンは活性コア領域に脂肪酸修飾構造がないため、GHS-R1a に結合しないことがわかった。

皮下投与実験 活性型サケグレリン区及び活性型ラットグレリン区は正常対照区よりも有意に摂食が高く、左心室心筋のアポトーシスを示す TUNEL 陽性細胞が毒性対照区よりも有意に少なかった (図 3)。活性型サケグレリン区及び活性型ラットグレリン区は血液中の抗酸化活性が毒性対照区よりも有意に改善された。活性型サケグレリンの抗酸化作用がドキシソルピシン誘発性的心筋障害を抑制する可能性が判明した。

経口投与実験 ドキシソルピシン投与前のラット体重ならびに摂餌量に区間差はなかった。心臓重量は、毒性対照区は正常対照区よりも有意に小さく、サケグレリン区は正常対照区に近い重量だった。左右心室を合わせた筋組織面積あたりの TUNEL 陽性細胞は、サケグレリン区が毒性対照区よりも有意に少なかった。このことから の皮下投与実験と同様、経口投与においてもサケグレリンがドキシソルピシン誘発性心筋障害を緩和した。

サケグレリンは経口でも効果を表すことが明らかである。

以上 より、合成サケグレリンのラットへの投与は、これまで知られている哺乳動物グレリンと同様の効果をめしたことから、我々が以前確かめた sSE の経口摂取による心保護作用成分はサケグレリンの可能性が高く、sSE は天然由来物質として、抗がん剤による心筋への副作用を非侵襲的に緩和することや、摂食低下を改善することが期待された。

(2) サケグレリンの被消化性 (*in vitro* 人工消化実験)

【合成サケグレリン消化】N-RIA 法によるサケグレリン相対値は、胃内消化 240 分に初期値の 70%、salmon C-RIA 法では胃内消化中は初期値のほぼ 100%であり、胃内消化で N 末端側や C 末端側が消化されにくいことがわかった。しかしながら腸内消化開始後 60 分で N-RIA、salmon C-RIA 法ともに相対値が 0%となり、腸内で速やかにグレリンが消化されることがわかった。

【sSE の消化】N-RIA 法では胃内消化 240 分で初期値の 40%まで低下したが、その後の腸内消化では 30%程度までしか下がらなかった。salmon C-RIA 法では胃内消化中は初期値のほぼ 100%であったが、腸内消化開始後 60 分で相対値が 10%となった。

胃腸内消化を経た場合、合成サケグレリン単独では活性部位が残っていない可能性があるが、粗抽出物であり多種タンパク質を含む sSE の場合は、サケグレリンの C 末端側は消化されても、活性部位が分解されずに吸収される可能性が示唆された。

(3) 経口サケグレリンの吸収 (*in vivo* 実験) 活性型サケグレリンを経口投与したラット門脈血中の活性型グレリン量に経時変化はなかった (図 4 A)。サケグレリンに特異的な C 末端側構造も検出されなかったことから、経口グレリンは吸収されないと考えられた。その一方で、投与 60 分以降に肝臓中 IGF-1 遺伝子の高発現を認めた (図 4 B)。

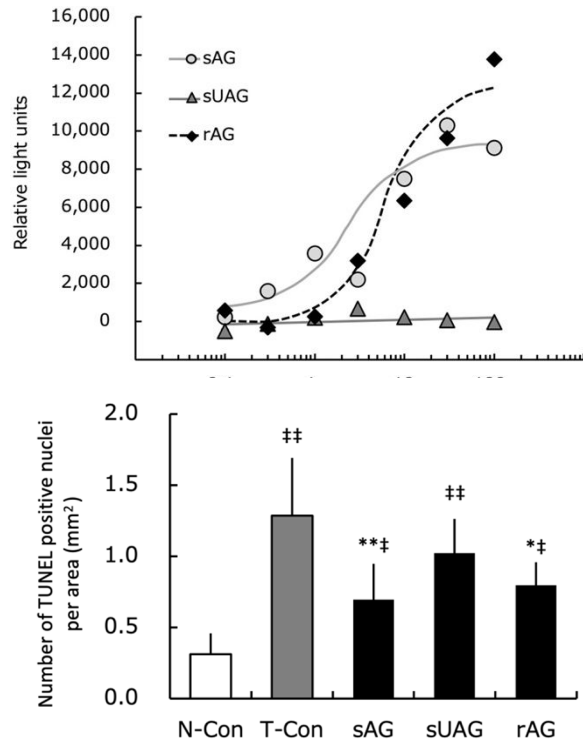


図 3 ラット左心室の心筋アポトーシスに対する皮下注射グレリンの作用 N-Con: 正常対照区、T-Con: 毒性対照区、sAG: 活性型サケグレリン区、sUAG: 非活性型サケグレリン区、rAG: 活性型ラットグレリン区
N-Con と比べて †: p<0.05, ††: p<0.01, T-Con と比べて * : p<0.05, ** : p<0.01。

経口サケグレリンは比較的速やかにマウス体内に影響しており、したがってその機序は迷走神経経路である可能性が示唆された。

(4) sSE の安全性 ノーマルマウスに sSE

1%、sSE 2%、sSE 4% 配合飼料を 8 週間与えたところ、死亡や行動の異常などは認められなかった。Control 区と比較して sSE 1% 区に摂餌量の差は見られなかったが、sSE 2% 区および sSE 4% 区では有意な摂餌量の増加が見られた。体重は、試験開始 1 週間後で sSE 配合飼料を与えた 3 区が Control 区よりも増加傾向にあり、2 週間後には sSE 2% 区および sSE 4% 区においてはその後有意な体重増加がみられた。内臓脂肪重量は Control 区より sSE 1% 区が有意に大きく、また有意な差は見られなかったが sSE 2% 区、sSE 4% 区の重量は Control 区よりも大きくなっていった。肝臓脂肪重量や大腿部筋肉脂肪重量は区間差がなかった。

体重増加や摂餌量は sSE 配合飼料を与えた 3 区が Control 区よりも高く、グレリンの生理作用である体重増加や摂餌量増加が認められたことから、sSE 中に含まれるグレリンが経口的に作用していることが強く示唆された。肝臓脂肪重量では Control 区より sSE 1% 区が有意に大きかったが、その他の区に差は見られず、筋肉脂肪重量では Control 区と他の区に差が見られなかったことから、経口グレリンの脂肪蓄積効果が肝臓脂肪および筋肉脂肪へ与える影響は小さいのではないかと考えられる。

sSE 4% 区において、摂餌量と体重から計算した日間摂餌量 (1 日当たり体重の何%量摂取したか) は 10% であった。したがって計算上は、sSE として 1 日約 4g/kg 体重、サケグレリンとして 1 日約 1.3 μ g/kg 体重を 8 週間毎日摂取してもマウスに顕著な異常は認められないことがわかった。

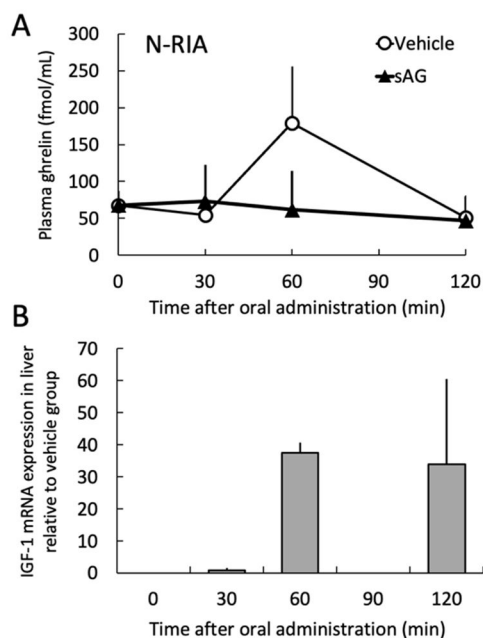


図4 合成サケグレリン経口投与後の N-RIA 測定による門脈血中グレリン (A) および肝臓中 IGF-1 mRNA 発現量 (B)

Vehicle: 生理食塩水投与、sAG: 活性型サケグレリン投与

Salmon C-RIA ではグレリンは検出されなかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kihara Minoru, Kaiya Hiroyuki, Hirai Yumi, Katayama Hidekazu, Terao Akira, Nishikawa Masazumi	4. 巻 137
2. 論文標題 Salmon acyl-ghrelin increases food intake and reduces doxorubicin-induced myocardial apoptosis in rats, likely by anti-oxidative activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170471 ~ 170471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2020.170471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木原 稔、海谷 啓之、片山 秀和、西川 正純	4. 巻 3
2. 論文標題 経口摂取可能な天然グレリンとしてのサケ胃由来グレリン含有物の作用本体の探索 Investigation of the active ingredients of ghrelin-containing salmon stomach extract as an orally available natural ghrelin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 49-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木原 稔、海谷 啓之、片山 秀和、西川 正純	4. 巻 39
2. 論文標題 経口投与したグレリン含有サケ胃抽出物の抗がん剤投与後の心毒性への影響 Effects of orally administered ghrelin-containing salmon stomach extract on cardiotoxicity after administration of an anti-cancer drug	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 83-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平井 優実、森本 紗羅、木原 稔
2. 発表標題 サケ由来グレリンの経口利用の可能性
3. 学会等名 東海大学マイクロ・ナノ啓発会 第 13 回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井 優実、木原 稔、海谷 啓之、片山 秀和、西川 正純
2. 発表標題 魚類グレリンの機能性食品化の可能性：サケグレリンによるドキシソルピシン誘発急性心不全ラットへの心臓保護効果
3. 学会等名 第18回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢崎湧紀、平井 優実、西川 正純、木原 稔、片山 秀和、海谷 啓之
2. 発表標題 摂食不振モデルマウスに対するサケグレリンの摂食亢進効果
3. 学会等名 第18回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Kaiya, Minoru Kihara, Hidekazu Katayama, Masazumi Nishikawa
2. 発表標題 Is salmon stomach a good remedy for heart failure prevention -Don't throw away and do eat salmon stomach-
3. 学会等名 ICoFF2019 (International Conference on Food Factors) 2019年 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木原 稔
2. 発表標題 健康的な生活に役立つものが捨てている内臓にあった?
3. 学会等名 東海大学マイクロ・ナノ啓発会 第 11 回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞々田基・西川正純・海谷啓之・木原稔
2. 発表標題 経口摂取によるグレリン含有シロサケ胃抽出物の生理作用
3. 学会等名 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木原稔
2. 発表標題 QOLの向上にむけた天然グレリン摂取物の開発 <効果 1> 経口摂取による心不全抑制効果
3. 学会等名 第8回 超異分野学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木原稔、海谷啓之、Zin Phyu Win、北島湧太、西川正純
2. 発表標題 経口投与したグレリン含有サケ胃抽出物のドキソルピシン誘発心不全マウスにおける心臓保護作用
3. 学会等名 日本栄養食糧学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 明里、山際 哲平、片山 秀和、木原 稔
2. 発表標題 コイを使ったサケグレリンの心筋障害緩和作用の確認
3. 学会等名 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第14回学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Minoru Kihara	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Science Impact	5. 総ページ数 72
3. 書名 Impact/Former food waste benefits human health	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>サケの廃棄内臓から抽出したグレリン含有物の心臓保護作用 https://exvivostomach-is-mine.jimdofree.com/welcome/ghrelin/</p>

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	海谷 啓之 (Kaiya Hiroyuki) (40300975)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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	西川 正純 (Nishikawa Masazumi) (90404839)	宮城大学・食産業学群・教授 (21301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関