

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月18日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700913

研究課題名（和文） 日本酒ペプチドの腸炎改善成分に関する研究

研究課題名（英文） Japanese rice wine (Sake)-derived components has anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis in mice

研究代表者

和田 小依里 (WADA SAYORI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：60420709

研究成果の概要（和文）：近年、炎症性腸疾患患者数が増加しており、食生活の変化がその要因の一つとも言われている。発酵食品の摂取量は減少しているが、一方で発酵食品中の因子が腸炎改善作用を有する可能性を示唆するエピソードが存在する。我々はデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発大腸炎モデルマウスを用いて、発酵食品の一つである日本酒中のいくつかのペプチドが、数mg/kg/日以下の微量の経口投与で大腸炎抑制作用を示すことを見出した。

研究成果の概要（英文）：The number of Inflammatory bowel disease (IBD) patients is increasing and the change in eating habit is one of the factor of these increasing. It has been reported that several fermented foods have improving effect of IBD. We determined the anti-inflammatory effect of Japanese rice wine-derived peptide on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis in mice. Some peptide derived from Japanese rice wine showed the colitis improving effect at the concentration of few mg/kg/day. This result indicates that Japanese sake-derived components have a potent of therapeutic agent on IBD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学、食生活学

キーワード：特殊栄養食品、炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症性腸疾患患者数が著しく増加しているが、その背景には食生活の変化が関与していると考えられている。日本での炎症性腸疾患患者数の増加は、食生活のいわゆる欧米化が一因であるとされている。農林水産省の食糧需給表によると、醤油や味噌などの発酵食品や米の摂取量減少が報告されており、こうした伝統食品の摂取量減少が関与しているという報告もある。日本酒や小麦加水分解物には難消化性ペプチドであるピログルタミン酸 pyroGlu-Leu を多く含有することを見いだしている。先行実験で

pyroGlu-Leu は肝炎抑制や TACE 阻害を示すことを確認している。そこで、近年増加が著しい炎症性腸疾患に対し、pyroGlu-Leu やそのほかの日本酒由来のペプチドを経口投与し、生体内で腸炎抑制活性を有するかを評価することとした。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患は自己免疫疾患と考えられていたが、近年では腸内細菌が発症に関与していることが明らかとなっている。発酵食品は腸内細菌叢を改善するという報告もあるため、発酵食品でありかつ百薬の長として食経

験も長い日本酒から、pyroGlu-Leuをはじめとした機能性を有するペプチドを同定することを目的として、以下の項目を明らかにするために研究を行った。

- (1) pyroGlu-Leu の生体内での腸炎抑制効果を評価する
- (2) 新規の腸炎抑制作用を有する日本酒画分の検索をする
- (3) 腸炎抑制効果を有する日本酒含有ペプチドを同定する
- (4) pyroGlu-Leu の腸内分布の測定をすることにより、経口摂取による生体内での取り込みを評価する

3. 研究の方法

(1) pyroGlu-Leu および日本酒含有ペプチドの調整

既知の炎症抑制ペプチド、pyroGlu-Leu は固相法により合成した。日本酒含有ペプチドについては以下の調整法を用いた。エバポレーターによって揮発成分を除いた日本酒濃縮物サンプルを我々のグループが開発した Autofocusing 法 (ペプチド自体を両性単体として使用しペプチドの等電点の差を利用して分画する方法; 図 1) を用いて、Fr. 1 から Fr. 10 の 10 画分に分画した。その後、腸炎改善効果が確認された画分を HPLC で分画した。さらに、生体内で腸炎抑制活性を示した画分中のペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等で同定した。同定したペプチドを上記と同様の方法で合成した。

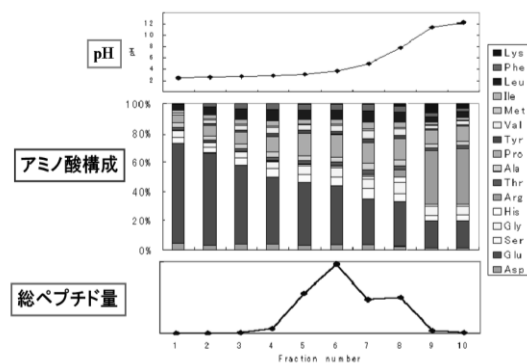


図 1. Autofocusing 法を用いた食品水溶液中のペプチドの分画

(2) ペプチドの腸炎抑制効果の評価

7 週齢の C57BL/6 雄性マウスを使用し、健常群は通常飲水、腸炎群は 2.5% または 3.0% DSS 水の自由飲水によって腸炎を誘発させた。各群にはペプチドまたは日本酒分画物を 7 日間毎日強制的にゾンデで経口投与した。実験開始から day 7 に解剖を行い、腸炎を評価し

た。腸炎の評価は体重変化率、腸管長および disease activity index (DAI) により行った。DAI スコアは 3 項目の平均点とし、体重変動率 (0: 変化なしまたは増加, 1: 0~5% 減少, 2: 5~10% 減少, 3: 10~20% 減少, 4: 20% 以上減少), 血便の程度 (0: 正常便, 2: 線状血便, 4: 全周性赤色血便), 下痢の程度 (0: 正常便, 2: 軟便, 4: 下痢) で評価した

(3) pyroGlu-Leu 腸内取り込みの分析

マウスに 0.1 mg/kg pyroGlu-Leu を経口投与し、0、0.5、1、3、6、24 時間後に犠牲死させ、小腸および大腸を摘出した。小腸内および大腸内内容物を十分洗浄し、重量を測定後、小腸および大腸組織内の pyroGlu-Leu 濃度を LC/MS-MS により測定した。

4. 研究成果

(1) pyroGlu-Leu の腸炎抑制効果

0.1 mg/kg/day の pyroGlu-Leu の連日投与により、腸炎誘発群と比較して有意に体重変化率や DAI が改善した。また、組織染色により粘膜下への炎症細胞の浸潤が抑制されていることを確認した。しかしながら、その作用は容量依存的な効果ではなく、体重変化率は逆 J-カーブ、DAI は J-カーブを示し、至適容量があることが示唆された。

(2) 腸炎抑制作用を有する日本酒画分の検索

Autofocusing 法により、Fr. 8 画分が最も腸炎抑制作用を有することを確認した。そこでその Fr. 8 画分を中圧分取液体クロマトグラフィーで分画し、アミノ酸分析の結果から Fr. 8-1、8-2、8-3、8-4 の 4 画分に分画した (図 2)。

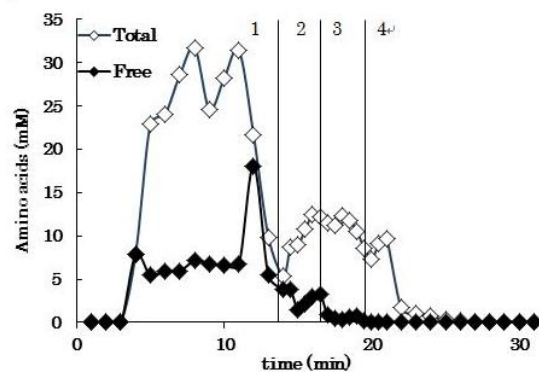


図 2. 日本酒 Autofocusing 分画 Fr. 8 中圧分取液体クロマトグラフィー アミノ酸分析結果

それらのサンプルを 200 μ L/day にて投与したところ、Fr. 8-3 のみ体重減少率と DAI で有

意な改善効果を認めた。この画分には pyroGlu-Leu 含有量はわずかであるため、それ以外のペプチドの効果であることが示唆された。

(3) 腸炎抑制効果を有する日本酒含有ペプチドの同定

上記で得られた Fr. 8-3 中に含まれるペプチドから、含有量の多いペプチドを3種類同定した。

(4) pyroGlu-Leu の腸内分布の測定

小腸および大腸組織内の pyroGlu-Leu 濃度は、ベースラインと比較すると、ともに24時間後に有意に上昇を示した。また、その際の小腸組織内濃度は大腸の約20倍であった。

以上の結果より、日本古来の食品である日本酒には腸炎改善効果を示すペプチドを有することが明らかとなった。これらのペプチドは薬剤のような劇的な効果を示すわけではない。しかし、pyroGlu-Leu は0.1 mg/kg/day の低用量で効果を示し、また、経口投与により体内に吸収され、小腸や大腸組織内に取り込まれることも明らかとなった。炎症抑制効果がJ-カーブを示したことから、大量摂取時の毒性や副作用についてさらなる研究が必要である。しかしながら、先行報告での腸炎抑制効果を示すアミノ酸、ペプチドと比較すると、この pyroGlu-Leu は低用量で生体内活性を示しており、実際のヒトへの応用の実用性があると考えられる。また、pyroGlu-Leu 以外のペプチドも Fr. 8-3 画分での含有量から低用量で効果を示すと考えられ、その同定と作用メカニズムの解明により炎症性腸疾患を改善する食品成分の実用化が期待できる。今回の結果から、pyroGlu-Leu の経口投与は、大腸と比較して小腸細胞内での取り込みが著明に増加していた。これらの結果から pyroGlu-Leu の作用部位は象徴である可能性が高い。今後、腸内細菌叢や炎症細胞に及ぼす影響を精査し、作用メカニズムを明らかにしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Wada S, Colorectal cancer preventive effects of food components, In Georgakilas A. G, (ed.) Cancer Prevention - From Mechanisms to Translational Benefits, pp. 205-230, (2012) INTECH, Croatia, 査読あり

[学会発表] (計6件)

① Wada S, Bou Y, Fukunaga S, Wada E,

Kiyono T, Takagi T, Sato K, Naito Y, Yoshikawa T, Japanese rice wine (Sake)-derived components has anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis in mice, Hawaii, USA, International Conference on Food Factor, December 2-6 (Dec 5), 2012

② Kiyono T, Bou Y, Fukunaga S, Wada S, Takagi T, Naito Y, Yoshikawa Y, Park E. Y., Nakamura Y, Sato K, Absorption of food-derived anti-inflammatory peptide, pGlu-Leu, from gastric intestinal tracts, Hawaii, USA, International Conference on Food Factor, December 2-6 (Dec 4), 2012

③ 清野珠美, 和田小依里, 高木智久, 内藤裕二, 朴恩榮, 中村考志, 佐藤健司, 抗炎症性ペプチド pGlu-Leu のデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎に対する効果と体内取込, 2012年8月29日から31日, 日本食品科学工学会 第59回大会, 札幌, 北海道

④ Wada S, Wada E, Ohta R, Kiyono T, Horie R, Takagi T, Sato K, Naito Y, Yoshikawa T, Japanese rice wine (Sake)-derived components has anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis, Taipei, Taiwan, International Conference on Food Factor, November 20-23 (Nov 21), 2011, p. 184.

⑤ Wada S, Ohta R, Kiyono T, Horie R, Takagi T, Sato K, Naito Y, Yoshikawa T, pyroGlu-Leu has anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis, Sapporo, Japan, November 14-17 (Nov 16), 2011, p. 83.

⑥ Wada S, Ohta R, Kiyono T, Horie R, Takagi T, Sato K, Naito Y, Yoshikawa T, Japanese rice wine (sake)-derived components have anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis, 10th world congress on inflammation, Paris, France, Abstract p. S243, June 25-29 (June 26), 2011.

[図書] (計1件)

① Wada S, Naito Y, : Chapter 7 Mechanism of Delta-Tocotrienol on Colorectal Cancer, In Tan B, Watson R. R, Preedy V. R, (eds.) Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols, Second Edition, pp. 89-100, (2012) CRC Press, New York

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 小依里 (WADA SAYORI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究
科・講師

研究者番号：60420709