

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26252016

研究課題名(和文) 消化管内分泌系と脳神経系および生殖機能系との相互作用による疾病予防・改善食の提案

研究課題名(英文) Study on enteroendocrine, nervous and reproductive systems related to diet for preventing metabolic diseases.

研究代表者

原 博 (Hara, Hiroshi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：70198894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,600,000円

研究成果の概要(和文)：食欲や血糖値など多様な生理現象を調節する消化管ホルモンの分泌は、摂取した食品成分により調節される。本研究課題では、消化管ホルモン分泌を強く促進する食品成分を含む「食事」を摂取した際の、各種消化管ホルモン分泌応答を、門脈カニキュレーションラット、マルチプレックスなどの手技を用いて実験動物(ラット)にて検討した。その結果、タンパク質の組成を変えることで消化管ホルモン分泌が大きく異なること、それには共存する炭水化物の種類も影響することが明らかとなった。また、消化管ホルモンGLP-1の分泌を強く促進する難消化性糖質の添加により、肥満誘導食の摂取量を抑制できることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we investigated gut hormone secretory responses to 'meal' in the conscious animal model equipped with portal cannula. We have found that gut hormone responses (such as GLP-1, GIP, PYY, Ghrelin) are modified by changing the source of dietary proteins. Furthermore, the effect of dietary protein was modified by the source of carbohydrates in the meal. Feeding the diet supplemented with resistant maltodextrin which has GLP-1-releasing activity prevented excess energy intake induced by high fat high sucrose diet. Our results suggest that postprandial gut hormone responses can be desirably manipulated by changing the composition of a meal.

研究分野：食品栄養学

キーワード：消化管内分泌系 食事組成 GLP-1

1. 研究開始当初の背景

コレシストキニン (CCK)やグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1)などの消化管ホルモンは、粘膜上皮に散在する消化管内分泌細胞により分泌される。消化管内分泌細胞は、食事として摂取された栄養素のセンサーとして機能し、消化吸収などの機能だけでなく、体全体の代謝制御に重要な役割を果たしている。脳には、消化管ホルモンと同じ遺伝子より作られる多数の脳腸ホルモンが存在しており、消化管をはじめとした末梢組織と自律神経などを介して相互作用するが、未だ不明な点が多い。近年、消化管内分泌細胞において、グルコースやアミノ酸、ペプチド、脂肪酸といった消化産物を感知する受容体や輸送体が次々と見いだされ、食品成分の情報分子としての実体が少しずつ明らかになってきたが、消化管内分泌細胞による食品成分認識の全体像を把握するには、未だほど遠い状態である。

申請者は、消化管内分泌細胞が食品たんぱく質由来ペプチドを直接認識することを明らかにし、大豆 コングリシニンより、CCK 分泌作用を担うペプチド構造の1つを世界に先駆けて見いだした。その受容体としてカルシウム感知受容体 (CaSR)を同定した。他にも多くの活性ペプチドを含む食品たんぱく質を見いだしてきたが、一方で、非消化性油脂や難消化性オリゴ糖、フラボノイド類にも、消化管ホルモン分泌刺激作用を見いだしており、栄養素以外の食品成分も感知され、消化管ホルモン分泌を担うことを明らかにした。

CCK は、消化吸収機能調節と同時に満腹感を引き起こし、この作用は性ホルモンであるエストロゲンと相互作用している。GLP-1 は、インスリン分泌や膵島 細胞保護、食欲抑制作用を有する消化管ホルモンであるが、申請者は GLP-1 産生細胞に女性ホルモンのプロゲステロン受容体関連タンパク質が強く発現していることを見だし、2012 年には他のグループから、プロゲステロンに GLP-1 分泌刺激作用があると報告された。さらには、脳内 CCK がゴナドトロピン(性腺刺激ホルモン)放出ホルモン(GnRH)分泌に関与することが報告された。GnRH は、下垂体 LH と FSH 分泌を介して男女生殖機能を統御する脳ホルモンで、視床下部弓状核より分泌される。弓状核はレプチンが受容され、腸から分泌された CCK や GLP-1 情報と統合される食欲中枢である。また、GnRH は腸でも見いだされ GLP-1 分泌を刺激することから、GnRH も脳腸ホルモンと推定される。このように、栄養素は消化管内分泌細胞への情報入力を介して、脳と情報のやりとりを行いながら食欲や耐糖能を制御しているが、申請者はこれまでほとんど研究されていない生殖機能調節系との相互作用も大きいと推定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食品中の各栄養素がどのように協働して消化管内分泌細胞を刺激し、分泌されたホルモンが脳・神経系や生殖系とどのように相互作用して生理機能を発揮するかを明らかにすべく、以下の項目について検討する。

- ・消化管ホルモン(CCK, GLP-1, GIP, PYY)が、食事成分の単独刺激および複合刺激によりどのような「食事」でより強く分泌されるかを明らかにする。
- ・消化管内分泌細胞の栄養素受容機構において、食品成分の相互作用がどのように発揮されるかを明らかにする。
- ・消化管ホルモンと脳・神経系および生殖機能調節系との相互作用を明らかにする。
- ・食品成分の消化管ホルモンを介した、食欲、耐糖能、生殖機能の調節機構を明らかにする。

申請者ら研究の特色は、生理的状态を反映しつつ詳細な生体反応を捉えられる血管、膵管などのカニキュレーション技術と、常に生体と対照しつつ進める培養細胞技術を用いることにある(国内で最初に CCK および GLP-1 を産生分泌する消化管分泌細胞株を導入)。これらの技術により、定量性を持って各機能を解析し、さらに分子メカニズムを探ることが可能となる。

3. 研究の方法

- ・門脈カニキュレーションラットを用いた各種、消化管ホルモン分泌を最も強く刺激する食事組成を見いだす。

これまで個別に検討してきた栄養素において、強い消化管ホルモン分泌刺激がみられたたんぱく質・ペプチド(大豆 コングリシニン由来、小豆由来、フジ豆由来、トウモロコシ由来及び乳たんぱく質カゼイン)と代表的な油脂(大豆油、ラード、魚油)、リン脂質、さらに難消化性糖質(食物繊維、オリゴ糖)を組み合わせた食事を作成してラットに摂取させ、各消化管ホルモン分泌を、門脈カニキュレーションラットを用いて経時的に解析する。これに際して、複数種の消化管ホルモン濃度を1検体より測定するために、マルチプレックスシステムを用いる。

- ・消化管内分泌細胞上の栄養素受容装置における、栄養素の相互作用を解明する。

保有する消化管内分泌細胞株 STC-1 細胞と GLUTag 細胞を用い、各種細胞内シグナル伝達因子の阻害剤や細胞内情報伝達因子のリン酸化などの解析により、上記において相加、相乗ないし減弱作用が見られた食事組成の組み合わせによる、栄養素シグナルの細胞内クロストークを解明する。

- ・食事摂取による消化管ホルモン分泌と、食欲、耐糖能、生殖機能との関連を明らかに

する。

消化管ホルモン分泌刺激活性の高い食事摂取後の、視床下部や延髄神経核を中心に脳内各部位の神経活動を、c-fos 発現や脳内神経各部位の特異マーカーの免疫染色により解析する。これにより、食事成分による消化管ホルモン分泌と脳内神経活動との関係を解析する。

消化管ホルモン分泌活性の見られた食品成分を含む食事を長期摂取させ、肥満や耐糖能、食欲への影響を評価する。

4. 研究成果

食事摂取後の消化管ホルモン分泌動態を調べるため、まず普通食の自由摂取下での試験を行った。一夜絶食させたラットに、普通食 (AIN-93G) を自由摂取させ、飼料摂取前および摂取後 120 分まで経時的に採血を行い、血漿中の total GLP-1 濃度を ELISA キットにて測定した。その結果、体重 250 グラムのラットは、一夜絶食後の再給餌で、最初の 15 分間に約 4 g の飼料を摂取した。その後、120 分までで合計 7 g 強の飼料を摂取した。血中の GLP-1 濃度は摂取 15 分後から 0 分値に比べて有意に上昇し、60 分をピークに 120 分まで高値 (基礎分泌の 2~3 倍) を維持した。

自由摂取後の GLP-1 分泌応答が解析可能であることを確認した上で、門脈カニューレレーションラットを用いた同様の食事負荷試験において採取した門脈血漿を用いて、マルチプレックスにて他のホルモン、サイトカインを一斉分析した。その結果、消化管ホルモンのうち、GLP-1、GIP、PYY の血中濃度が食後に上昇すること、食欲を亢進するグレリンは低下することが観察された。インスリン分泌の上昇も確認され、マルチプレックスを用いた本試験系にて食後ホルモン分泌応答を一斉にモニタリングできることが確認された。

次に、食事負荷試験の際に、乳カゼインをたんぱく源としたコントロール食と、トウモロコシ Zein をたんぱく源とした Zein 食を用い、食事負荷後の門脈血を採取した。その結果、食後 15 分において Zein 食群がコントロール食群に比べて高い血中 GLP-1 濃度を示した。このことから、Zein を飼料に混合して摂取させることで、それまでに Zein 加水分解物 (ペプチド) 単回経口投与で見られたように、GLP-1 分泌が強く促進されることが示唆された。

また、マルチプレックスでの測定により、GLP-1 と同じく消化管内分泌細胞 L cell より分泌される peptide-YY (PYY) の分泌も Zein 食で高まった。一方、上部消化管で産生される glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) は、Zein 食で早期に低下し、胃で産生されるグレリンは、Zein 食摂取によりコントロール食摂取よりもさらに低下した。GLP-1、PYY は食欲抑制、グレリンは食欲亢進作用があることから、Zein 食はその

後の食欲を抑制することが考えられた。

タンパク源を大豆、米などに変更して同様の試験を行ったが、Zein ほどの作用は見られなかった。従って、ここで見られた GLP-1、PYY 分泌促進、グレリン分泌抑制は、Zein 食に特有の作用と考えられた。上記の作用は、炭水化物源をシヨとした食事 (スクロース食) で観察されたが、炭水化物源をデンプン (スターチ食) にした場合には観察されなかった。

これらの結果より、タンパク源を変えるだけでなく、共存する炭水化物源によっても、食後消化管ホルモン分泌応答は影響を受けることが明らかとなった。しかしながら、どのような組み合わせが食後消化管ホルモン分泌応答に強い影響を与えるかについてはさらなる検討が必要と考えられた。

食後の消化管ホルモン分泌応答を、覚醒下にて測定したところ、タンパク質源を変えることで、GLP-1、PYY、グレリンの分泌応答に影響が見られた。これら消化管ホルモンは迷走神経への作用を介して、食欲中枢である視床下部に働きかける。そこで、タンパク質源の異なる食事摂取直後の視床下部神経活動の指標となる c-fos の mRNA 発現を定量 PCR により測定した。その結果、食後 15 分、30 分において時間依存的な c-fos mRNA 発現の増加が見られたが、食事のタンパク質源の違いによる明確な差異は見られなかった。同様に視床下部にて、食欲調節に関連する POMC、AGRP ならびに生殖に関連する GnRH の mRNA 発現を測定したが、処理間の差異は見られなかった。これらより、消化管ホルモンの分泌の違いの見られた時間では、視床下部でのこれら摂食、生殖関連ホルモンの mRNA 発現には違いが見られず、異なるタイミングでの解析が必要と考えられた。

一方で、覚醒下ラットでの回腸部腸間膜静脈からの経時的採血を可能とするカニューレレーション手術に着手した。門脈と回腸部腸間膜静脈の血中パラメーターを比較することで、小腸上部、下部での消化管ホルモン分泌、栄養吸収を解析することが可能となる。門脈または回腸部腸間膜静脈にカニューレを留置したラットにおいて、食後の血糖、消化管ホルモン濃度を調べたところ、グルコース濃度および上部消化管で主に産生される消化管ホルモン濃度は、門脈血で高値を示し、主に下部消化管で産生される消化管ホルモン濃度は、回腸部腸間膜静脈血で高値を示した。これにより、グルコースは上部小腸で多く吸収されることが確かめられたとともに、本モデルは消化管部位別のホルモン分泌や栄養素吸収の解析に有用であると考えられた。

また、GLP-1 分泌促進作用を持つ難消化性糖質 (難消化性デキストリン RMD) を、高脂肪高シヨ糖食に添加し、これを用いて長期飼

育試験を実施した。その結果、RMD を添加することで、高脂肪高シヨ糖食による耐糖能異常が緩和されること、過剰なエネルギー摂取が早い段階で抑制されることなどが見出された。それにはRMD 摂取による早期での消化管ホルモン GLP-1 の産生増加ならびに分泌促進が関与することが示唆された。

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2件)

Tohru Hira, Ryoya Suto, Yuka Kishimoto, Sumiko Kanahori, Hiroshi Hara, Resistant maltodextrin or fructooligosaccharides promotes GLP-1 production in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet, and partially reduces energy intake and adiposity, EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION, 査読無、2017年、印刷中
DOI: 10.1007/s00394-017-1381-7)

原 博, 吸収されてもされなくても 食品ペプチドの生理作用、査読無、実験医学 2017年4月号 食欲と食嗜好のサイエンス、35巻、2017年、1015~1018ページ

[学会発表](計9件)

Tohru Hira, Daisuke Inoue, Toshiki Koga, Yuki Ishikawa, Mikio Fujii, Hiroshi Hara, Globulin in the rice endoseprm has potent GLP-1 releasing activity and glucose- lowering effect in rats、The 3rd International Conference on Rice Bran Oil (ICRBO 2016)(国際学会)、2016年10月24日~2016年10月25日、東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)

関下 まどか、比良 徹、原 博、トウモロコシたんぱく質 Zein を含む食事が与える消化管ホルモン分泌応答への影響、日本アミノ酸学会 10 周年記念大会、2016年09月11日~2016年09月13日、東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)

比良 徹、食品成分による消化管ホルモン分泌調節、第18回日本神経消化器病学会、第6回IBS研究会、第84回消化器心身医学研究会、第10回機能性ディスプレイ研究会 合同学術集会2016(招待講演)、2016年09月10日~2016年09月11日、北海道大学医学部(北海道・札幌市)

関下 まどか、比良 徹、原 博、たんぱく源の異なる食事による食後ホルモン分泌

への影響、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年05月13日~2016年05月15日、武庫川女子大学(兵庫県・西宮市)

Hiroshi Hara, Yuki Ishikawa, Motoni Kadowaki, Tohru Hira, Peptides derived from rice proteins stimulate GLP-1 secretion and suppress blood glucose elevation、107th AOCs Annual Meeting(国際学会)、2016年5月1日~2016年5月4日、ソルトレーク(米国)

比良 徹、原 博、血糖調節ペプチド、日本農芸化学会 2015 年度大会(招待講演)、2016年03月28日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

比良 徹、原 博、食品成分による消化管ホルモン分泌の制御と作用機構、第93回日本生理学会大会(招待講演)、2016年03月23日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

井上 大輔、比良 徹、原 博、トウモロコシ由来ペプチドにおけるGLP-1分泌促進機構の解析、平成27年度日本農芸化学会北海道支部第2回講演会、2015年11月14日、北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

関下 まどか、比良 徹、原 博、トウモロコシたんぱく質 Zein を含む食事の摂取による食後GLP-1分泌への影響、日本栄養・食糧学会東北支部会(第49回大会)、北海道支部会(第45回大会)合同支部会、2015年10月25日、東北大学農学部(雨宮キャンパス)(宮城県・仙台市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/shokuei/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原 博(HARA, Hiroshi)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 70198894

(2)研究分担者

比良 徹(HIRA, Tohru)

北海道大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号: 10396301