

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380070

研究課題名(和文)食品由来GLP-1分泌刺激ペプチドの抗メタボ作用を、糖質の消化抵抗性で増強する

研究課題名(英文)Enhancement of dietary peptide-induced GLP-1 secretion by indigestible saccharides

研究代表者

原博(Hara, Hiroshi)

北海道大学・(連合)農学研究科(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) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：消化管ホルモンの一つであるGLP-1は、肥満や糖尿病の改善作用を有する。GLP-1の合成と分泌は、腸管腔内の食品成分による調節を受けることから、食品成分を利用して内因性GLP-1の合成・分泌を高めることが肥満や糖尿病の予防、病態改善に有効と考えられた。

培養細胞、実験動物(ラット)を用いた試験により、トウモロコシペプチドの経口投与がGLP-1分泌を促進して血糖上昇を抑制すること、このものは糖尿病モデル動物でも有効であることが明らかとなった。

また消化抵抗性糖質に、GLP-1分泌を直接刺激できる作用、ならびにトウモロコシペプチドに対するGLP-1分泌応答を増強する作用があることが見いだされた。

研究成果の概要(英文)：GLP-1 is one of gastrointestinal hormones, and it has potent anti-obese and anti-diabetic effects. In the present project, we investigated whether indigestible peptides or indigestible saccharides are effective to increase GLP-1 secretion in a cell culture model and animal models. We also examined combined effects of indigestible saccharides and a dietary peptide.

We demonstrated that oral administration of a dietary peptide (corn peptide) potently stimulated GLP-1 secretion and it resulted in reduced glycemic response in normal and diabetic rats.

Luminal and oral administration of an indigestible saccharide (resistant maltodextrin, RMD) stimulated GLP-1 secretion in rats, and continuous ingestion of RMD also enhanced basal GLP-1 secretion. Furthermore, rats continuously having RMD showed increased GLP-1 secretory response to oral administration the corn peptide. These results revealed potential and combined effects of indigestible saccharides and dietary peptide in vivo.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：GLP-1 消化抵抗性糖質 食品ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

GLP-1(グルカゴン様ペプチド-1)は、インスリン分泌増強に加え、膵細胞の保護・増殖促進、食欲抑制作用を持つ消化管ホルモンであり、その作用増強は膵細胞の疲弊を伴う2型糖尿病や肥満の予防治療に有効である。しかし、GLP-1は血中でペプチダーゼDPP-IV(Dipeptidyl peptidase-IV)により速やかに分解されるため、DPP-IV耐性アナログやDPP-IV阻害剤が2型糖尿病治療薬として応用され始めている。耐糖能異常を含むメタボリックシンドロームは、長い間に進行する慢性疾患であり、また先進諸国で爆発的に増加している。このような慢性疾患において、膨大な患者に対する予防や治療には、薬剤では限界があり、食品による新しいアプローチが緊急に望まれる。上述のGLP-1の合成と分泌は、腸管腔内の食品成分による調節を受けることから、食品によるGLP-1の作用増強の有効性が期待でき、その戦略として第1に、食品成分を利用して内因性GLP-1の合成・分泌を高めることが考えられる。

申請者は、これまで不明であった、食品ペプチドによるGLP-1分泌作用について研究に着手し、トウモロコシたんぱく質Zein由来の難消化性ペプチド(ZeinH)が培養細胞およびラット腸管において強力なGLP-1分泌促進作用を有することを見出した。一方、消化抵抗性糖質(低消化性)は、GLP-1産生細胞が豊富に存在する下部消化管まで到達し、直接ないし遊離した単糖(グルコース)によるエネルギー供給など間接的に、ペプチドとは異なる機構によりGLP-1の合成と分泌を誘導することが考えられる。さらに消化抵抗性の強い糖質(非消化性)の場合は、大腸まで到達して発酵を受け、生じた短鎖脂肪酸が、GLP-1合成・分泌を促進するとされるが、どの短鎖脂肪酸が、どのようにGLP-1産生細胞に認識され、これらを促進するかについては未だ不明である。このような背景は、食品ペプチドと消化性の異なる種々の糖質を組み合わせることにより、小腸下部と大腸それぞれで、GLP-1分泌促進に加え、GLP-1の合成(プール)を増やすことで、内因性GLP-1の分泌量を大幅に高められる可能性を示している。

第2のGLP-1作用増強戦略として、血中DPP-IV阻害を介したGLP-1の分解抑制による作用増幅が考えられる。申請者は、上述のZeinHが、GLP-1分泌促進に加え、血中で活性型GLP-1の分解を抑えることで血糖上昇を抑制するという世界的に例のない、全く新しい作用をもつことを見出した。即ち、ZeinH経腸投与により、血中のDPP-IVが阻害される可能性が示されたが、その本体は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、申請者のこれまでの研究をさらに発展させ、難消化性ペプチドと消化抵

抗性糖質の、GLP-1分泌・合成促進、分解抑制機構を明らかにすることを基礎面での目的とし、さらにこれらの食品成分の短期、長期的組み合わせにより、腸管でのGLP-1の分泌や合成、さらに血中での作用を飛躍的に増強させることで、メタボリックシンドロームの予防と治療への基盤構築を目指した。

## 3. 研究の方法

- (1) 難消化性ペプチドの経口投与による、GLP-1分泌、血糖への影響を調べるため、GLP-1分泌促進作用を持つトウモロコシペプチド(ZeinH)溶液をラットに経口投与し、耐糖能試験(腹腔内糖負荷試験)を行った。頸静脈に留置したカテーテルより無麻酔下で経時的に採血を行い、血漿中GLP-1濃度をELISA法にて測定し、同サンプル中の血糖値を測定した。
- (2) GLP-1の分泌を強く促進する消化抵抗性糖質を、マウス大腸由来のGLP-1産生細胞株GLUTagを用いてスクリーニングした。48ウェルプレート上に培養したGLUTag細胞を、試料を含む溶液に1時間暴露し、上清中に放出されたGLP-1をELISA法により測定した。
- (3) 動物個体でのGLP-1分泌促進作用を検討するため、まず麻酔下ラットの腸管内に消化抵抗性糖質溶液を直接投与した。門脈に留置したカテーテルより経時的に採血し、血漿中のGLP-1濃度をELISA法により測定した。また、消化抵抗性糖質を覚醒ラットに経口投与し、頸静脈より経時的に採血し、血漿中GLP-1濃度を測定した。
- (4) 消化抵抗性糖質の連日摂取によるGLP-1分泌への影響を検討するため、ラットに消化抵抗性糖質を含む試験飼料を7週間与えた。試験期間中にトウモロコシペプチドの経口投与に対するGLP-1分泌応答を観察する試験を実施し、これらの組み合わせの効果も検討した。

## 4. 研究成果

(1) トウモロコシペプチドZeinHの経口投与下での血糖上昇抑制効果の検討

ZeinHをラット回腸に投与することで、GLP-1分泌促進を介した血糖上昇抑制が見られていたが、より生理的な条件として、ZeinH経口投与でも血糖上昇抑制の作用が発現することが確かめられた。市販の肉ペプトンでは血糖上昇抑制はみられないことから、ZeinHは生理的条件下でも強い血糖上昇抑制作用を持つことが明らかとなった。

(2) トウモロコシペプチドの経口投与下でのGLP-1分泌促進作用の検討

回腸に直接投与することでGLP-1分泌を促進するトウモロコシペプチドを、ラットに単回経口投与し、頸静脈より経時的に採血する試験により、GLP-1の分泌促進作用が確認された(図1)。さらに、もう一つのインクレ

チンである GIP の分泌も促進されることが明らかとなった。

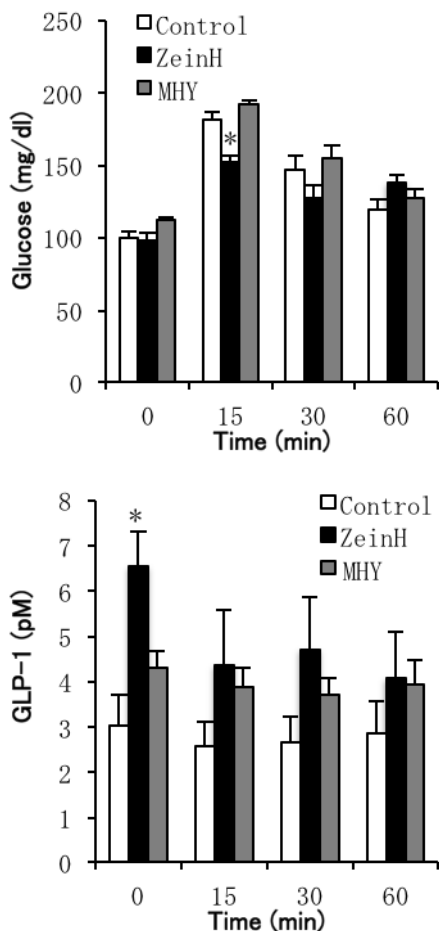


図1. トウモロコシペプチド経口投与による GLP-1 分泌促進と血糖上昇抑制

腹腔内グルコース負荷 (1 g/kg) の 15 分前にトウモロコシペプチド (ZeinH)、肉ペプトン (MHY) 各 2 g/kg、または水 (Control) を経口投与した。腹腔内グルコース負荷を 0 分とし、頸静脈カテーテルより経時的に採血し、血漿中のグルコース、GLP-1 濃度を測定した。\* は同時間においてコントロール群と有意差があることを示す。( \* : P < 0.05、vs Control, Tukey ' s test )

### (3) 糖尿病モデル動物でのトウモロコシペプチドの作用の検討

非肥満型 2 型糖尿病モデルとして知られる Goto-Kakizaki ラットを用いて、トウモロコシペプチド経口投与下で耐糖能試験を行ったところ、この病態モデル動物においても GLP-1 分泌を促進し、血糖上昇を抑制することが示された。

### (4) ZeinH の GLP-1 分泌促進機構の解析

種々の分画手法 (クロマトグラフィー等) により ZeinH を分画し、各画分の GLP-1 分泌活性を調べたところ、その分子量、疎水性などに依存せず、活性が分散する結果となった。このことより、異なる性質をもつペプチドの相加的作用により活性が発揮されることが

考えられた。また、食品ペプチド刺激に対して、消化管内分泌細胞の細胞内 Ca シグナルが惹起されることが確認された。

### (5) 消化抵抗性糖質の GLP-1 分泌促進作用の検討

種々の消化抵抗性糖質 (非・難・低消化性オリゴ糖、食物繊維) の GLP-1 分泌活性を、in vitro (GLP-1 産生細胞株 GLUTag) にてスクリーニングした。その結果、低分子のオリゴ糖では明確な GLP-1 分泌促進作用は見られなかったが、高分子の消化抵抗性糖質 (難消化性デキストリン) に作用が見られた (図 2)。これらと Zein 共存下での、GLP-1 分泌を観察したところ、相加的な分泌促進作用が見られた。

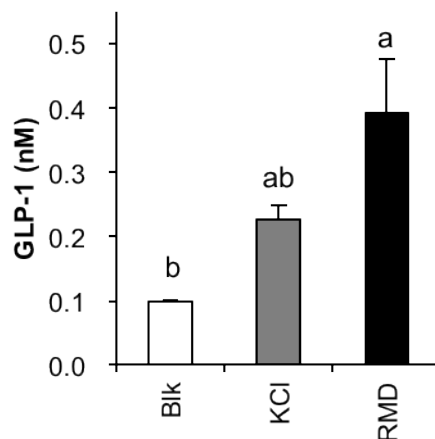


図2. GLUTag 細胞における難消化性デキストリンによる GLP-1 分泌促進作用

48 ウェルプレートに培養した GLUTag 細胞を 20 mM 難消化性デキストリン (RMD) を含むバッファーに 1 時間暴露し、回収した上清中の GLP-1 濃度を測定した。BIK はバッファーのみで処理した陰性対照、KCI (40 mM) は脱分極刺激を誘導する陽性対照。異なるアルファベットを付したバー間には有意差有り。( P < 0.05、vs Control, Tukey ' s test )

### (6) 消化抵抗性糖質のラット腸管における GLP-1 分泌作用の検討

消化管内分泌細胞株において GLP-1 分泌促進作用を示した消化抵抗性糖質を、麻酔下においてラット腸管内に直接投与し、門脈に留置したカテーテルより経時的に採血し、GLP-1 濃度を測定したところ、投与直後ならびに遅延性の血中 GLP-1 濃度上昇が観察され、消化抵抗性糖質が腸管内で直接的に GLP-1 分泌を促進する作用を持つことが示唆された。

### (7) 消化抵抗性糖質の経口投与に対する GLP-1 分泌応答の検討

上述の消化抵抗性糖質をラットに経口投与し、頸静脈に留置したカテーテルより無麻酔下で経時的に採血したところ、血中 GLP-1 濃度は遅延性の上昇を示した。同用量の可消化性糖質 (デキストリン) では血中 GLP-1 濃度

の上昇は見られず、この消化抵抗性糖質が単回の経口投与でも GLP-1 分泌を促進することが明らかとなった。

(8) 消化抵抗性糖質長期摂取による GLP-1 分泌、産生への影響

標準飼料の消化抵抗性糖質(セルロース)を水溶性の消化抵抗性糖質{難消化性デキストリン(RMD)、フルクトオリゴ糖(FOS)}に置換して、これを7週間ラットに摂取させたところ、絶食時の血中 GLP-1 濃度の上昇が観察され、耐糖能も改善することが見いだされた。

さらに、RMD、FOS 摂取群ではトウモロコシペプチド経口投与に対する GLP-1 分泌応答が高まることが明らかとなり、これら消化抵抗性糖質がトウモロコシペプチドの作用を高めることが示された。

#### 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 12 件)

Phuwamongkolwiwat P, Hira T, Hara H (2014) A nondigestible saccharide, fructooligosaccharide, increases the promotive effect of a flavonoid, -glucosyl-isoquercitrin, on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) secretion in rat intestine and enteroendocrine cells. *Mol Nutr Food Res.* (in press) DOI: 10.1002/mnfr.201300871. 査読有り

Nakajima S, Hira T, Yahagi A, Nishiyama C, Yamashita T, Imagi J, Hara H (2014) Unsaturated aldehydes induce CCK secretion via TRPA1 in STC-1 cells. *Mol Nutr Food Res.* 58(5):1042-51. doi: 10.1002/mnfr.201300412. 査読有り

Phuwamongkolwiwat P, Suzuki T, Hira T, Hara H (2014) Fructooligosaccharide augments benefits of quercetin-3-O- $\beta$ -glucoside on insulin sensitivity and plasma total cholesterol with promotion of flavonoid absorption in sucrose-fed rats. *Eur J Nutr.* Mar;53(2):457-68. doi:10.1007/s00394-013-0546-2. 査読有り

Higuchi N, Hira T, Yamada N, Hara H (2013) Oral administration of corn Zein hydrolysate stimulates GLP-1 and GIP secretion and improves glucose tolerance in male normal rats and Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology.* 154(9):3089-98. doi: 10.1210/en.2012-2275. 査読有り

比良 徹(2012)「腸管での栄養素認識と消化管ホルモン分泌に関する研究(平成 24 年度日本栄養・食糧学会奨励賞受賞)」日

本栄養・食糧学会誌、65(5): 215-220、査読無し

Nakajima S, Hira T, Tsubata M, Takagaki K, Hara H (2011) Potato extract (Potein®) suppresses food intake in rats through inhibition of luminal trypsin activity and a direct stimulation of cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 59(17):9491-9496. doi: 10.1021/jf200988f. 査読有り

Hira T, Mori N, Nakamori T, Furuta H, Asano K, Chiba H, Hara H (2011) Acute effect of soybean beta-conglycinin hydrolysate ingestion on appetite sensations in healthy humans. *Appetite,* 57(3):765-8. doi:10.1016/j.appet.2011.07.014. 査読有り

Sufian KN, Hira T, Nakamori T, Furuta H, Asano K, Hara H (2011) Soybean -Conglycinin Bromelain Hydrolysate Stimulates Cholecystokinin Secretion by Enteroendocrine STC-1 Cells to Suppress the Appetite of Rats under Meal-Feeding Conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,* 75(5):848-53. 査読有り

Hira T, Muramatsu M, Okuno M, Hara H (2011) GLP-1 secretion in response to oral and luminal palatinose (isomaltulose) in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology,* 57(1): 30-35. 査読有り

原 博、中島 進吾、比良 徹(2011)「消化管ホルモンを介して食欲をコントロールする食品由来ペプチド 臨床化学(特集)(日本臨床化学会), 40(2), 119-12、査読無し

比良 徹(2011)「インクレチン分泌を刺激する食品ペプチド、アミノ酸~消化管内分泌細胞による栄養素認識、Nutrient sensing の解明と応用に期待」化学と生物、今日の話(日本農芸化学会) 48, No. 1, 11-13、査読無し

比良 徹、持田 泰佑、原 博(2010)「ラットにおけるトウモロコシ Zein 加水分解物による GLP-1 分泌を介した血糖上昇抑制」アミノ酸研究、4(2)、163-66、査読無し

[学会発表](計 22 件)

Tohru Hira, Asuka Ikee, Yuka Kishimoto, Sumiko Kanahori, Hiroshi Hara. Effects of resistant maltodextrin and fructooligosaccharides on fasting GLP-1 levels and glucose tolerance in rats. 10th Vahouny Dietary Fiber Symposium, The American Society for Nutrition and NutraSource, Inc.

2014/3/28, Marriott Bethesda North, Bethesda, USA  
池江 明日香、比良 徹、岸本 由香、原博「難消化性糖質摂取ラットにおける食品ペプチド経口投与に対する GLP-1 分泌」日本食物繊維学会 18 回学術集会、  
2013/11/24、仁愛大学（福井県越前市）  
比良 徹「食品ペプチドの消化管での作用を介した血糖制御に関する研究」2013 年度日本アミノ酸学会 科学・技術賞受賞講演、日本アミノ酸学会、2013/11/2、熊本市医師会館（熊本市）  
池江 明日香、比良 徹、岸本 由香、原博「難消化性デキストリン摂取は、ラット血中 GLP-1 濃度を高め、耐糖能を改善する」第 34 回日本肥満学会、2013/10/11、東京フォーラム（東京）  
Hara H; Nakajima S; Hira T,  
PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF SOYBEAN PEPTIDES, Diversity of physiological functions of amino acids and peptide, 20th International Congress of Nutrition (ICN2013), 2013/9/16, Granada Congress, Granada, Spain  
池江 明日香、比良 徹、岸本 由香、原博「ラットにおいて難消化性デキストリンの長期摂取は血中 GLP-1 濃度を高める」第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013/5/25、名古屋大学（名古屋市）  
比良 徹、樋口 謹行、原博「ラットにおいてトウモロコシペプチドの経口投与が、インクレチン分泌促進を介して血糖上昇を抑制する」第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013/5/16、テトリア熊本ビル（熊本市）  
P. Phuwamongkolwivat, T. Hira and H. Hara. Fructooligosaccharides augments the effect of a flavonoid, a-glucosyl-isoquercitrin, on glucagon-like peptide 1 secretion. Experimental Biology 2013, 2013/4/21, Boston Convention & Exhibition Center, Boston, USA  
池江 明日香、比良 徹、岸本 由香、原博「難消化性デキストリンの単回及び長期摂取はラットの GLP-1 分泌を促進する」日本食物繊維学会 17 回学術集会、2012/11/23、中村学園大学（福岡市）  
池江 明日香、比良 徹、岸本 由香、原博「難消化性デキストリンのラット腸管における GLP-1 分泌作用の検討」第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012/5/19 東北大学（仙台市）  
樋口 謹行、比良 徹、原博「トウモロコシ Zein 加水分解物の経口投与はインクレチン分泌を介して血糖上昇を抑制する」第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012/5/19、東北大学（仙台市）  
P. Phuwamongkolwivat, T. Suzuki, T. Hira and H. Hara, Fructooligosaccharides

enhance beneficial effects of a flavonoid, quercetin-3-glucoside, on insulin sensitivity in rats fed high sucrose diet. Experimental Biology 2012, 2012/4/23, San Diego Convention Center, San Diego, USA

樋口 謹行、比良 徹、原博「トウモロコシたんぱく質 Zein の加水分解物による血糖上昇抑制への GLP-1 の関与」日本食物繊維学会 16 回学術集会。2011/11/26。独立行政法人国立健康・栄養研究所（東京都）

池江明日香、比良 徹、岸本由香、原博「難消化性デキストリンは消化管内分泌細胞に直接作用して GLP-1 分泌を促進する」日本食物繊維学会 16 回学術集会、2011/11/26。独立行政法人国立健康・栄養研究所（東京都）

池江 明日香、比良 徹、岸本 由香、原博「難消化性デキストリンの GLP-1 分泌作用の検討」第 41 回 日本栄養・食糧学会北海道支部会、2011/10/23、天使大学（札幌市）

樋口 謹行、比良 徹、原博「トウモロコシ Zein 加水分解物はラットへの経口投与によりインクレチン分泌を介して血糖上昇を抑制する」第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011/5/15、お茶の水女子大学（東京都）

樋口 謹行、比良 徹、原博「ラットにおけるトウモロコシたんぱく加水分解物の経口投与による血糖上昇抑制」第 8 回日本栄養改善学会北海道支部学術総会、2010.12.4、天使大学（札幌）

樋口 謹行、比良 徹、原博「トウモロコシ Zein 加水分解物はラットへの経口投与により血糖上昇を抑制する」第 40 回 日本栄養・食糧学会北海道支部会、2010.10.24、天使大学（札幌）

比良 徹、村松 茉耶、奥野 雅浩、原博「パラチノースによる GLP-1 分泌促進機構の解析」第 31 回日本肥満学会、2010.10.2、前橋テルサ（群馬県）

比良 徹、持田 泰輔、原博「ラットにおけるトウモロコシ Zein 加水分解物による GLP-1 分泌を介した血糖上昇抑制」日本アミノ酸学会第 4 回学術大会、2010.9.17、ホテルサンシャイン鬼怒川（栃木県）

21 T. Hira, T. Mochida, H. Hara, Corn protein hydrolysate stimulates GLP-1 secretion and attenuates hyperglycaemia in rats, The 18th International Symposium on Regulatory Peptides, 2010/9/5-8、Europa Hotel Belfast (Belfast, UK)

22 比良 徹「食品ペプチドによる消化管ホルモン分泌について～消化管の栄養素受容機構」Hindgut Club サテライトミーティング（第 64 回日本栄養・食糧学会関連学術集会）（招待講演）2010.5.22、アス

ティ徳島（徳島県）

〔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