

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450175

研究課題名(和文) 経口で腸炎抑制効果を有する日本酒ペプチドの同定と作用機序解明

研究課題名(英文) Japanese rice wine-derived peptides have anti-inflammation effects

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(系)・講師

研究者番号：60420709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本食の発酵食品中に抗炎症効果を有する複数のピログルタミルペプチドが含まれていることを明らかにした。これらのペプチドは発酵の過程で生成されていると考えられるが、大腸炎誘発モデルマウスにおいて、微量で腸炎改善効果を示すことを示した。また、ピログルタミルペプチドは腸内細菌叢を正常化させることや抗酸化作用を有することも明らかとなった。一定の発酵条件下でこれらのペプチドを高濃度に含有する米発酵物サンプルを作成することができ、ヒト試験でも腸内細菌叢改善作用を示す可能性が示唆された。これらの結果から日本の伝統的な発酵食品の健康増進作用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Japanese rice wine (Sake)-derived pyroglutamyl peptides have anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis in mice. We found out the optimal fermented condition according as amazake, a traditional sweet, low- or non-alcohol Japanese drink made from fermented rice. Amazake like sample showed greater anti-inflammatory effect than individual pyroglutamyl peptides. Pyroglutamyl peptides also improved microbiota in this model. In human trial, oral administration of amazake like sample did not show any adverse reaction, and improved fecal microbiota in irritable bowel syndrome. This result indicates that pyroglutamyl peptides might be one of health-promoting component in Japanese traditional fermented foods.

研究分野：食品因子の健康増進作用

キーワード：発酵食品 抗炎症 腸内細菌 ペプチド 腸炎

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症を腸粘膜に生じる炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎ならびにクローン病）は難病に指定されており、有効な治療薬、治療方法の開発が求められている。

発酵食品には抗炎症効果を示す成分が含まれることを示唆するエピソードが存在する（日本内科学会雑誌、2009）が、報告者らはその中で日本酒に注目した。日本人成人男性を約13年間追跡した研究では、1日25g未満のエタノール飲酒者の全死亡の危険率は非飲酒者と比較して0.51倍であった。さらに、毎日飲酒する人の中でも日本酒飲酒者の全死亡危険率は0.45倍であり、ビールや焼酎よりも低い危険率を示した(Miyazaki, M. et al., 2001, Journal of Epidemiology)。Life threatening disease は過剰の炎症が病態の進行に關与していることが知られている。そのため、日本酒にはヒトの過剰な炎症を抑制する成分を含むと考え本研究に着手した。

報告者らのグループは日本酒中の主要なペプチドをHPLCにより分離し、抗炎症性が報告されているピログルタミルロイシン(pyroGlu-Leu) (Sato, K., CRC Press, 2011; Suzuki, Y. et al., Biomed. Res., 2012) の存在を明らかにした。pyroGlu-Leu は難消化性ペプチドであるが、DSS 誘発大腸炎マウスの症状を改善させることを明らかにした。さらに、独自に開発した Autofocusing 法（分取型等電電気泳動）(図1) を用いて日本酒を分画し、DSS 誘発大腸炎マウスの症状を改善する画分を同定した。同画分には pyroGlu-Leu は含まれず新規の大腸炎改善

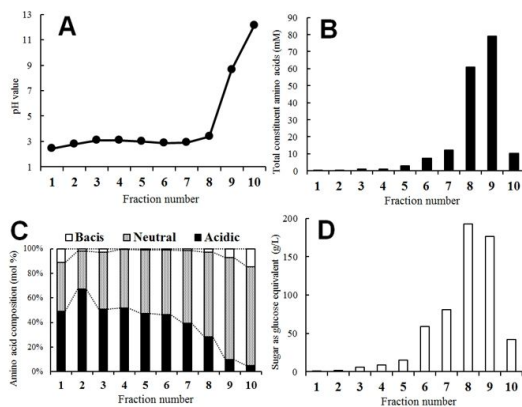


図1 Autofocusing 法 (A) pH、(B) アミノ酸量、(C) アミノ酸組成（酸性、中性、アルカリ性）、(D) グルコース等量

ペプチドの存在が示された。Autofocusing 法は溶媒として水のみを用いてペプチド自身の等電点を利用し分画する手法であり、食品成分の大量分画が可能である(Hashimoto, K. et al., J. Agric. Food Chem., 2005)り、食品成分の生産にも応用可能な手法である。この手法を用いてアルコールを除去した日本酒中に含まれる抗炎症作用を有する成分の同定を行い、ヒト試験に用いることが出来る有

効サンプル作成を目標に研究をすすめることとした。

2. 研究の目的

先行研究により、日本酒中に pyroGlu-Leu とそれ以外の大腸炎抑制活性を示すペプチドが認められた。そこで以下のことを目的に研究を開始した。日本酒分画物中の大腸炎抑制活性を示す他のピログルタミルペプチドを同定し、それを化学合成し、DSS 誘発大腸炎モデルマウスを用い効果の再現性を確認する。次に、pyroGlu-Leu および同定された活性ペプチドをマウスに経口摂取させ、血清、肝臓、小腸、大腸内の濃度を測定し、体内動態を確認する。さらに、マウス大腸内容物の腸内細菌分析を行い作用機序解明を行う。また、マクロファージの培養を用い、分子レベルでの抗炎症効果の作用機序を解明する。続いて、活性ペプチドを含有する食品グレードの米発酵物サンプルを作成し、ヒトでの炎症抑制作用を確認するとともに、活性ペプチドの血中濃度測定し、体内動態を明らかにする。

3. 研究の方法

サンプル合成

1) 日本酒に含有されているピログルタミルペプチドの合成

Autofocusing 法で分画し、有効性が認められた画分中のピログルタミルペプチドを複数個同定した。島津研究所 PSS-8 を使用し、これらの日本酒由来ピログルタミルペプチド(ピログルタミルペプチド A、B、C) を合成した。

2) 米発酵物サンプルの生成

米発酵物サンプルは、麴の精米歩合および発酵温度の条件を変えて4サンプル作成した。それぞれのサンプルは、上清を蒸留水で希釈して動物実験およびヒト試験の経口投与サンプルとして使用した。

3) 米発酵物サンプルの分離

最も有効性を示した米発酵物の有効成分を特定するため、調整用逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。カラムには Diaion HP 20SS を用いた。カラム素通り画分（親水性）と吸着画分（疎水性）に分画し蒸留水を加えて調製し、動物実験の投与サンプルとした。

動物実験（日本酒由来ピログルタミルペプチドの腸炎改善効果の検証）

7 週齢の C57BL/6 雄性マウスを購入し、実験に用いた。全ての群に7日間一日一回、投与サンプルを 0.2 ml ずつゾンデで経口投与した。また、健常群には水道水を自由飲水させた。その他の群には 2.5 または 3.0% DSS 水を自由飲水させ腸炎を誘発した。腸炎の罹り具合を一定にするため、DSS 水の濃度を調整した。Day 0、3、5、7 に体重測定、Day 3、5、7 に便性状観察を行った。Day 7 に解剖を

行い、腸炎を評価するため大腸を摘出し、腸管長を測定した(図2)。炎症の指標には、Disease Activity Index (DAI) スコアを用いた。DAI スコアは、Day 0 と Day 7 での体重変化率(0:変化なしまたは増加、1:1~5%減少、2:10~20%減少、4:20%以上減少)、Day 7 での血便の程度(0:なし、2:線状血便、4:全周性血便)、Day 7 での下痢の程度(0:なし、2:軟便、4:下痢)の3項目を表2に示してある通りに点数化し、その平均で評価した。また、小腸および大腸内のピログルタミルペプチド濃度を測定した。

細胞実験

マウスマクロファージ細胞株化細胞(RAW264.7細胞)を用いて、ピログルタミルペプチドの一酸化窒素(NO)産生抑制作用の確認を行った。細胞に pyroGlu-Leu およびピログルタミルペプチド A、B を添加して培養した。1 時間後、Lipopolysaccharide (LPS) を添加した。一日後、培養上清を 100 μl ずつ回収し、NO 産生量の測定に供した。NO 量はグリース試薬にて測定した。

ヒト試験

動物実験で最も有効性が認められた発酵条件のサンプルを用いてヒト試験を行った。健常ボランティアおよび Roma III 分類により過敏性腸症候群と診断されたそれぞれ3名に対し同意を得た上で米発酵物サンプルの連日摂取を依頼した。米発酵物サンプルは一日一回 50 mL を 14 日間摂取した。便性状、睡眠時間、QOL などについて記録するよう依頼した。また、研究の前後で血液・便の採取を行った。

4. 研究成果

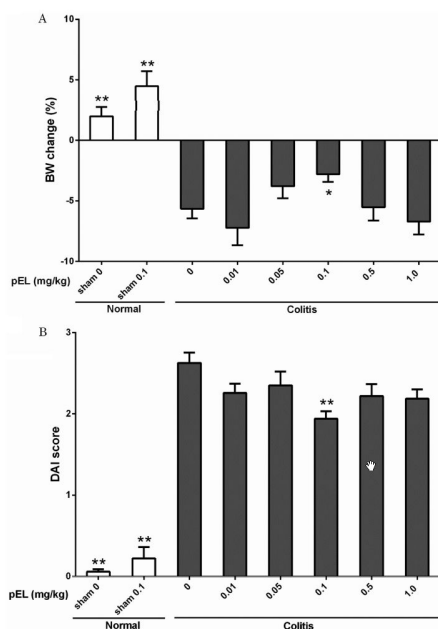


図2 DSS 誘発大腸炎モデルでの合成ピログルタミルペプチドの作用の検証

ピログルタミルペプチドのマウスにおける腸炎抑制作用

1) pyroGlu-Leu の腸炎抑制作用の評価および至適濃度の決定

pyroGlu-Leu は 0.1 mg/kg/day の投与で有意な抑制作用を示すことが明らかとなった(図2)。それ以上の濃度では有意な抑制作用を示さないJカーブ効果を認めた。

2) 活性画分中に含まれる大腸炎抑制ペプチドの同定

上記と同様にDSSにより腸炎を誘発し、Autofocusing法で有効性が示された画分中のピログルタミルペプチド(ペプチドA、B、C)の効果を検証した。ペプチドA、Bは有意な腸炎抑制効果を示したが、ペプチドCはその効果を認めなかった。

3) pyroGlu-Leu の体内分布

健常マウスに pyroGlu-Leu を経口投与し、経時的に小腸および大腸中の pyroGlu-Leu 濃度を測定したところ、24 時間後に有意な上昇をみとめた。一方、DSS 腸炎モデルで解剖時の小腸および大腸内 pyroGlu-Leu 濃度の群間比較を行ったところ、pyroGlu-Leu 群で有意な上昇は認めなかった(図3)。

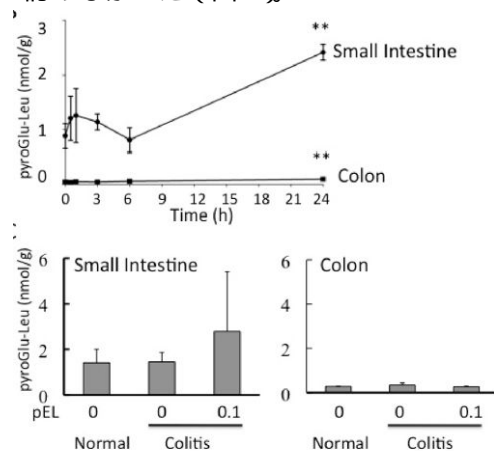


図3 pyroGlu-Leu 摂取後の小腸および大腸内濃度

4) ピログルタミルペプチドの腸内細菌叢改善作用

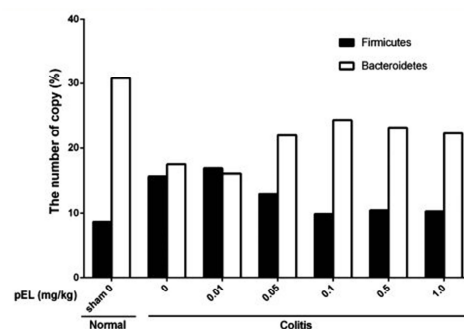


図4 pyroGlu-Leu の腸内細菌叢改善作用

ピログルタミンペプチドを経口投与した DSS 腸炎誘発マウスより大腸内容物を回収し、腸内細菌叢を解析したところ、pyroGlu-Leu およびペプチド B で腸内細菌叢改善作用を認めたと、ペプチド A ではその作用は認めなかった(図 4)。

5) 米発酵物サンプルの生成

ヒトが摂取できる腸炎抑制サンプルを作成するために食品製造の手法で米発酵物サンプルを作成した。麴の精米歩合および発酵温度の条件を変えて 4 サンプル作成し、DSS 腸炎モデルにそれぞれ投与した。ここでもっとも腸炎を改善させたサンプルを用いて、その有効成分を同定するため調製用逆相クロマトグラフィーにて素通り画分、吸着画分に分離したが、素通り画分、吸着画分ともに腸炎改善作用を認めなかった。発酵が進みすぎ下痢を増悪させる有機酸が増加した可能性等が考えられた。そのため今後は腸炎抑制ペプチドとその他の増悪因子を同定し、分離する必要がある。

合成ピログルタミンペプチドのマクロファージ由来 NO 産生抑制効果の検証

先行研究でマクロファージが産生する NO は腸炎に関与することが報告されている。そこで、NO 産生量を測定し、pyroGlu-Leu およびピログルタミンペプチド A、B の炎症抑制効果を検証した。いずれのペプチドも NO 産生作用を示したが、pyroGlu-Leu が最も強い抑制作用を示し、ペプチド B が最も弱い作用を示した。

ヒト試験での米発酵物サンプルが腸内細菌叢に及ぼす影響

ヒト試験で米発酵物サンプルを毎日 50 mL 摂取したが、健常ボランティア、過敏性腸症候群患者ともに自覚症状、血液データに有害事象は認めなかった。過敏性腸症候群と診断されたもので、サンプルの摂取の有無により便の性状や過敏性腸症候群の自覚症状に有意な差を認めなかった。腸内細菌叢の解析では、健常ボランティアではサンプルの摂取による変化は認めなかったが、過敏性腸症候群患者では摂取後に 3 名ともに腸内細菌叢の変化をみとめた。

これらの結果から、米発酵物サンプル中には複数の抗炎症作用を有するピログルタミンペプチドが含まれることが明らかとなった。また、その腸炎抑制作用には抗酸化作用や腸内細菌叢改善作用が関与していることがマウス、およびヒト試験で明らかとなった。

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 3 件)

和田 小依里、佐藤 健司 脳腸相関と食品：発酵食品 臨床栄養 2016;128(6):814-819 査読なし

Wada S, Matsushita Y, Tazawa H, Aoi W, Naito Y, Higashi A, Ohshima H, Yoshikawa T. Loss of p53 in stromal fibroblasts enhances tumor cell proliferation through nitric-oxide-mediated cyclooxygenase 2 activation. *Free Radic Res* 2015;49(3):269-78. 査読あり

Wada S, Sato K, Ohta R, Wada E, Bou Y, Fujiwara M, Kiyono T, Park EY, Aoi W, Takagi T and others. Ingestion of low dose pyroglutamyl leucine improves dextran sulfate sodium-induced colitis and intestinal microbiota in mice. *J Agric Food Chem* 2013;61(37):8807-13. 査読あり

[学会発表](計 1 件)

和田 小依里 発酵食品含有ピログルタミンロイシンと腸内細菌改善作用 第 12 回日本機能性食品医用学会総会 2014 年 12 月 13 日-14 日 (発表 14 日) (京都府、京都市)

6 . 研究組織

(1)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・講師
研究者番号：60420709

(2)研究分担者

佐藤 健司 (Sato, Kenji)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：00202094