

# 大麦焼酎粕を原料として精製および生産される生理機能成分に関する研究

上原, 絵理子

<https://hdl.handle.net/2324/7157411>

---

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (農学), 論文博士  
バージョン :  
権利関係 :

大麦焼酎粕を原料として  
精製および生産される  
生理機能成分に関する研究

上 原 絵 理 子

2023

## 目次

	Page
第 1 章 序論	1
第 2 章 FBE に含まれる抗ロコモ成分の抽出および同定	7
2.1 緒言	7
2.2 実験方法	8
2.2.1 材料	8
2.2.2 HPLC による分取	8
2.2.3 細胞培養	8
2.2.4 リアルタイム PCR	10
2.2.5 LC-MS による同定	10
2.2.6 統計解析	11
2.3 実験結果	13
2.3.1 MMP-13 mRNA 発現抑制成分を含む画分の特定	13
2.3.2 FBE-P40-5 に含まれる抗ロコモ成分の同定	13
2.4 考察	18
2.5 小括	18
第 3 章 pEPYP の抗ロコモ効果－細胞実験－	19
3.1 緒言	19
3.2 実験方法	19
3.2.1 材料	19
3.2.2 細胞培養	19
3.2.3 増殖試験	21
3.2.4 リアルタイム PCR	21
3.2.5 ウェスタンブロッティング	21
3.2.6 統計解析	22

3.3	実験結果	22
3.3.1	pEPYP が OUMS-27 細胞の増殖および MMP-13 mRNA、タンパク質の発現に与える影響	22
3.3.2	pEPYP が TALL-1 細胞の増殖および IL-10 mRNA、タンパク質の発現に与える影響	27
3.4	考察	31
3.5	小括	31
第 4 章 pEPYP の抗ロコモ効果－動物実験－		32
4.1	緒言	32
4.2	実験方法	32
4.2.1	動物	32
4.2.2	被験物質および投与	32
4.2.3	関節炎評価	32
4.2.4	統計解析	33
4.3	実験結果	34
4.3.1	関節炎スコアおよび後足の観察	34
4.3.2	抗 II 型コラーゲン IgG 抗体量	34
4.3.3	病理組織学的検査	36
4.4	考察	40
4.5	小括	41
第 5 章 pEPYP の抗ロコモ効果－ヒト二重盲検試験－		42
5.1	緒言	42
5.2	試験方法	42
5.2.1	被験者	42
5.2.2	試験食品	44
5.2.3	試験デザイン	44

5.2.4	評価項目	44
5.2.4.1	JKOM (VAS 含む)	45
5.2.4.2	JOA	45
5.2.4.3	ROM	46
5.2.4.4	高感度 CRP	46
5.2.5	安全性評価項目	46
5.2.6	研究スケジュールおよび検査内容	47
5.2.7	統計解析	47
5.3	試験結果	47
5.3.1	解析対象者	47
5.3.2	有効性の評価	50
5.3.2.1	JKOM(VAS 含む)	50
5.3.2.2	JOA	50
5.3.2.3	ROM	50
5.3.2.4	高感度 CRP	50
5.3.3	有効性追加解析	52
5.3.4	安全性の評価	56
5.4	考察	56
5.5	小括	58
第 6 章 FBE に含まれる尿酸排出促進成分 pEP の抽出および同定		59
6.1	緒言	59
6.2	実験方法	60
6.2.1	材料	60
6.2.2	HPLC による分取	60
6.2.3	細胞培養	60
6.2.4	リアルタイム PCR	62
6.2.5	LC-MS による同定	62

6.2.6	NMR による同定	62
6.2.7	LC-MS/MS による pEP 濃度定量	62
6.2.8	統計解析	63
6.3	実験結果	66
6.3.1	ABCG2 mRNA 発現促進成分を含む画分の特定	66
6.3.2	ABCG2 mRNA 発現促進成分の分子量および構造決定	71
6.3.3	FBE-P 粉末に含まれる pEP 濃度	71
6.4	考察	82
6.5	小括	83
第 7 章 pEP の尿酸排出促進効果－細胞実験－		84
7.1	緒言	84
7.2	実験方法	84
7.2.1	材料	84
7.2.2	細胞培養	84
7.2.3	細胞増殖試験	85
7.2.4	リアルタイム PCR	85
7.2.5	ウェスタンブロッティング	85
7.2.6	免疫蛍光染色	85
7.2.7	統計解析	86
7.3	実験結果	86
7.3.1	pEP が Caco-2 細胞の増殖に与える影響	86
7.3.2	pEP が Caco-2 細胞における ABCG2 mRNA 発現に与える影響	86
7.3.3	pEP が Caco-2 細胞における ABCG2 タンパク質発現に与える影響 (ウェスタンブロッティング)	89
7.3.4	pEP が Caco-2 細胞における ABCG2 タンパク質発現に与える影響 (免疫蛍光染色)	89
7.4	考察	92

7.5 小括	93
第 8 章 GABA が線維芽細胞における I 型コラーゲンおよび MMP-1 mRNA 発現に与える影響	94
8.1 緒言	94
8.2 実験方法	95
8.2.1 材料	95
8.2.2 細胞培養	96
8.2.3 細胞増殖試験	96
8.2.4 リアルタイム PCR	96
8.2.5 統計解析	96
8.3 実験結果	99
8.3.1 栄養成分分析	99
8.3.2 GABA が NHDF 細胞の増殖に与える影響	99
8.3.3 GABA が COL1A1 および COL1A2、MMP-1 mRNA 発現に与える影響	99
8.4 考察	104
8.5 小括	105
第 9 章 GABA が NHDF 細胞におけるエラスチン関連 mRNA およびタンパク質の発現に与える影響	106
9.1 緒言	106
9.2 実験方法	106
9.2.1 材料	106
9.2.2 細胞培養	107
9.2.3 細胞増殖試験	107
9.2.4 リアルタイム PCR	107
9.2.5 免疫蛍光染色	109

9.2.6	統計解析	109
9.3	実験結果	109
9.3.1	chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA が NHDF 細胞の増殖に与える影響	109
9.3.2	chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA が NHDF 細胞における ELN、FBN-1、FBN-2、LOX、FBLN-5、LTBP-4 mRNA 発現に与える影響	109
9.3.3	chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA がエラスチンタンパク質の発現に与える影響	118
9.4	考察	121
9.5	小括	122
第 10 章	GABA が筋芽細胞における筋肉量調節関連 mRNA およびタンパク質の発現に与える影響	124
10.1	緒言	124
10.2	実験方法	125
10.2.1	材料	125
10.2.2	細胞培養	125
10.2.3	細胞増殖試験	126
10.2.4	リアルタイム PCR	126
10.2.5	ウェスタンブロッティング	128
10.2.6	統計解析	128
10.3	実験結果	128
10.3.1	GABA が C2C12 細胞の増殖に与える影響	128
10.3.2	GABA が C2C12 細胞における MyoD および PGC-1 $\alpha$ の mRNA およびタンパク質発現に与える影響	128
10.3.3	GABA が C2C12 細胞における myostatin mRNA およびタンパク質の発現に与える影響	134



10.4 考察	137
10.5 小括	138
第 11 章 総括	140
引用文献	144
謝辞	156
要約 (英文)	157

## 第1章 序論

焼酎は日本の伝統的な蒸留酒であるが、主に九州および沖縄地方で生産されている。蒸留酒は酒税法上、蒸留の方法によって「連続式蒸留焼酎」と「単式蒸留焼酎」に分類される。一般的に「本格焼酎」と呼ばれるものは単式蒸留焼酎に該当し、原料によって米焼酎、麦焼酎、芋（甘藷）焼酎、そば焼酎といった種類がある。アルコール発酵したもろみを蒸留した後に残った液体は一般的に「焼酎粕」と呼ばれ、副産物として大量に発生する。通常、本格焼酎を製造する場合、原料1tあたり1.5-2.5tの焼酎粕が発生する。九州全体の年間焼酎粕発生量は2001年で48万tであったが、2021年には70万tに増加した。なお、1990年頃まで、焼酎粕は海洋投入によって処理を行っていた。

一方、1996年11月にロンドンで「1972年の廃棄物その他の物の投棄による海洋汚染の防止に関する条約の1996年の議定書」（通称：ロンドン議定書）が採択され、2006年3月に発効し、日本は2007年10月に該議定書を締結した。該議定書は廃棄物等の海洋投棄および洋上焼却を原則禁止した。

焼酎粕の海洋投入の原則禁止を見越して、1990年頃から、焼酎製造業界では海洋投入に代わる焼酎粕の処理方法の開発に着手した。焼酎粕には豊富な栄養素が含まれている。米焼酎粕、大麦焼酎粕、芋焼酎粕の栄養成分分析値をTable 1<sup>1)</sup>に示す。米焼酎粕と大麦焼酎粕は比較的高タンパク質であり、芋焼酎粕は高繊維質である。いずれの焼酎粕もタンパク質や炭水化物が多く含まれていることから、当初から飼料や肥料の原料として、またメタン発酵などに利用された。主に大麦焼酎を製造する三和酒類株式会社では、2000年8月に、年間約5万t発生していた大麦焼酎粕の海洋投入処分の全面停止を実現した。しかし当時、約60%が飼料および肥料として有効利用されたが、残りの40%は陸上で産業廃棄物として処分された（Figure 1）。他社での利用用途別の割合は不明であるが、全ての焼酎粕を有効に利用することは現実的には不可能であったと推測される。その理由として、処理に多額の費用がかかり、売値が見合わないことが挙げられた。Table 1<sup>1)</sup>に示す通り、焼酎粕のほとんどは水分であり、

Table 1. Example of component analysis of shochu distillation by-products for each material. Data from Hayashi K, Warm Regional Society of Animal Science, Japan, 55, 101–107 (2012)

		Rice shochu	Barley shochu	Sweet potato shochu	
Moisture		wet	92.40	91.90	95.20
Protein		wet	3.21	3.56	1.42
		dry matter	42.20	44.00	29.60
Carbohydrate		wet	0.80	1.64	0.72
		dry matter	10.50	20.20	15.00
Fat	content rate %	wet	0.07	0.26	0.07
		dry matter	0.90	3.50	1.50
Fiber		wet	0.60	0.57	1.33
		dry matter	7.90	7.00	27.80
Ash		wet	2.92	2.05	1.26
		dry matter	38.50	25.30	26.10

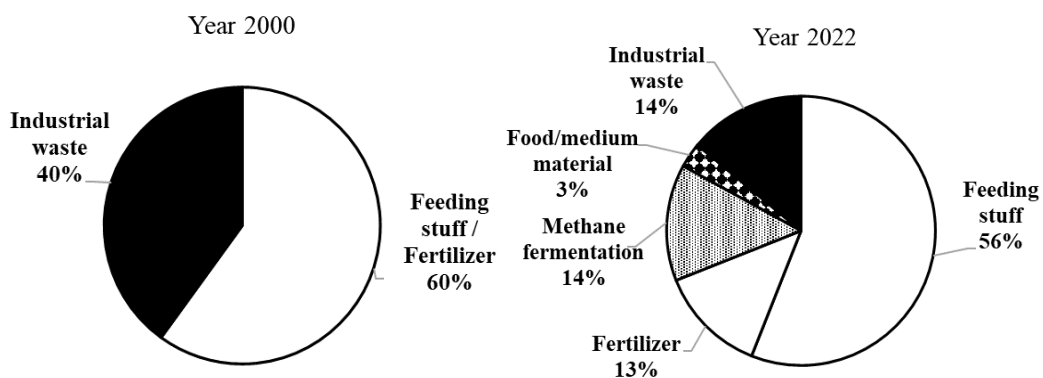


Figure 1. Changes of treatment of shochu distillation by-products in Sanwa Shurui Co., Ltd.

In 2000, 50,000 tons of shochu distillation by-products were generated and used only as feeding stuff and fertilizer, with 40 % disposed of as industrial waste.

In 2022, the amount of shochu distillation by-products generated increased to 72,000 tons. They are increasingly used as feeding stuff and fertilizer, as well as for methane fermentation and as food and medium material. The volume of industrial waste disposal decreased to 14 %.

米焼酎粕で約 92 %、麦焼酎粕で約 92 %、芋焼酎粕で約 95 %を占める。栄養素は豊富であることから減圧濃縮や乾燥して水分を除去すればタンパク含量が高くなり、飼料や肥料として有用な原料となる。しかし、水分除去にコストや手間がかかる。また、水分含量が高いまま利用先に出荷すると体積が大きいいため、利用先への莫大な輸送費用がかかる。さらに水分含量が高いまま出荷した場合、腐敗しやすく、飼料や肥料として利用できなくなる。各焼酎メーカーは処理コストの削減を目的として、試行錯誤を重ねた。鹿児島の焼酎メーカー6社は芋焼酎粕や麦焼酎粕を原料として、飼料化やエタノール抽出を行う共同の処理施設を立ち上げ、2003年3月に運転を開始した<sup>2)</sup>。イニシャルコストは10億円（農林水産省補助金：4億円、全国酒造連合会補助金：3億円、自己資金：3億円）、ランニングコストは1万円/tという<sup>2)</sup>。また、飼料の売値を上げるために、焼酎粕を原料として高付加価値飼料を製造する企業もあった。2019年、鹿児島県の株式会社栄電社は経済産業省の補助を受け、芋焼酎粕を乳酸発酵させた液を飼料化する取組を開始した<sup>3)</sup>。芋焼酎粕を培地として乳酸菌を培養することにより、焼酎粕を原料とした培養液は保存性が高まる上、家畜の嗜好性向上、体質改善・免疫力の向上が期待できる<sup>3)</sup>という。

一方、有効利用できない焼酎メーカーは、受託企業に陸上で産業廃棄物（産廃）として処理してもらう他ない。産廃処理にもまた高いコストがかかる。産廃処理の委託費用は1tあたり6000-7000円程度であり、焼酎メーカーの収益圧迫の一つとなっている<sup>4)</sup>。中堅の焼酎メーカーの場合、1日30-50tの焼酎粕が発生するため、年間処理費用は4000万円を超えるという<sup>4)</sup>。

最先端の技術を用い、新たなエネルギー資源として焼酎粕を有効利用する取組も行われている。2018年、崇城大の大学院生らは球磨焼酎の米焼酎粕を使って光合成細菌を安価に培養する技術を開発し、培養キットを製造販売するベンチャー企業を設立した<sup>5)</sup>。光から化学エネルギーを生み出す光合成細菌は、農業や水産業への応用が期待される<sup>5)</sup>。薩摩酒造株式会社は福岡工業大学などと共同で、焼酎粕を電池の電極材に変換する「環境・エネルギーミックスマジネスモデル」事業の「焼酎粕の新エコシステム構築プロジェクト」を発足させた

6)。宮崎大学は建設業・不動産業を主な事業とするあなぶきグループとの共同研究を2014年より行い、焼酎粕をエタノール燃料と固形ペレット燃料に変換して処理する「焼酎バイオエナジー宮崎日南工場」を2021年4月に開設し、実証運転を開始した<sup>7)</sup>。

エネルギー資源としてではなく、食品素材としてより高いレベルで有効利用することを目指して、焼酎粕が持つ健康機能性に関する研究が行われている。米焼酎粕および大麦焼酎粕、芋焼酎粕からそれぞれ製造した醸造酢は抗ラジカル活性や抗腫瘍活性などの生理活性を有することが報告された<sup>8)</sup>。芋焼酎粕を原料とした飲料には脂質代謝改善および高血糖抑制効果があるという<sup>9)</sup>。泡盛焼酎粕が有する抗酸化活性<sup>10)</sup>や大麦焼酎粕水溶性画分が有する抗アレルギー効果<sup>11)</sup>、大麦焼酎粕による美白作用<sup>12)</sup>が報告されている。焼酎粕を培地原料として有用物質の生産も試みられた。芋焼酎粕およびそば焼酎粕を培地として *Absidia astrospora* および *Gongronella butleri* を培養し、キトサンを発酵生産すること<sup>13)</sup>や芋焼酎粕を培地として *Aspergillus luchuensis* を培養し、ラジカル消去能を有するフェノール化合物を生産すること<sup>14)</sup>が行われた。

三和酒類株式会社では2000年以降、焼酎粕の処理コストそのものの低減に関する取組や、飼料化および肥料化以外の用途開発を続けた。その結果、2022年、焼酎粕の発生量は年間7.2万tに増加したものの、飼料として56%、肥料として13%、合計69%を有効利用することができた(2000年から9%の増加、Figure 1)。新たな利用用途として、調味料といった食品素材や微生物用培地素材の製造(3%)と、メタン発酵への利用(14%)を可能にした(Figure 1)。産廃処理の割合は14%に減少させることができた(Figure 1)。先述の通り、大麦焼酎粕の約90%が水分であることから、食品や培地素材化の際にも非常に腐敗しやすいことが課題であった。また、大麦焼酎粕には原料である大麦由来の繊維物や、アルコール発酵のために植菌された酵母が大量に含まれている。大麦焼酎粕をそのまま食品素材および培地素材として利用することは、腐敗の懸念やハンドリングの悪さから困難であると容易に推測された。そこで、大麦焼酎粕をデカンタに供し、固形物を取り除いた。さらに得られた液体を独

自技術により精製したものが「発酵大麦エキス (Fermented Barley Extract、以下 FBE)」である。FBE には麹菌の酵素によって分解された大麦由来のオリゴ糖、多糖、アミノ酸、ペプチド、ポリフェノール、さらに麹菌が生成したクエン酸、自己消化によって発生した酵母エキスなど、豊富な栄養素が含まれている<sup>15)</sup>。FBE は食材の臭みをマスキングする調味料として販売されている。また、FBE は特に乳酸菌の増殖を促進する<sup>16)</sup>ことが報告された。さらに、これまでの研究開発により、FBE が有する生理機能性として、*in vivo* 試験では、オロチン酸誘発脂肪肝の抑制効果<sup>17)</sup>、抗酸化効果<sup>18)</sup>、血圧上昇抑制効果<sup>19)</sup>、アレルギー性皮膚炎改善効果<sup>20)</sup>、尿酸値低減効果<sup>21)</sup> が報告されている。ヒトにおいては肝機能改善効果<sup>15)</sup>、尿酸値低減効果<sup>22)</sup> を有することが報告されている。

本研究ではこれまでに報告された上記の機能性のうち、抗酸化効果<sup>18)</sup>から推測された抗炎症効果について、さらに深掘して抗ロコモティブシンドローム (抗ロコモ) をもたらす機能性成分の精製および同定と、細胞および動物 (ラット)、ヒトでの有効性の検討を行った (第 2 章、第 3 章、第 4 章、第 5 章)。また、尿酸値低減効果<sup>21), 22)</sup> をもたらす機能性成分の精製および同定と、細胞での有効性の検討を行った (第 6 章、第 7 章)。

一方、FBE は培地素材として利用されており、FBE を培地として乳酸菌を培養し、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (以下、GABA) が生産されている。ヒトでの二重盲検試験において、GABA は肌の弾力を維持する効果が報告されている<sup>23)</sup>。本研究では GABA が肌の弾力を維持する作用機序を、ヒト真皮正常線維芽細胞を用いて検討した (第 8 章、第 9 章)。さらに GABA は除脂肪体重、即ち、筋肉量を維持することが報告されている<sup>24)</sup>。そこで、GABA が筋肉量を維持する作用機序を、細胞を用いて検討した (第 10 章)。

## 第2章 FBEに含まれる抗ロコモ成分の抽出および同定

### 2.1 緒言

「健康寿命」とは WHO が提唱した新しい指標で、平均寿命から寝たきりや認知症など介護状態の期間を差し引いた期間のことであり、人が自立して生活でき、介護を必要としない状態での平均寿命を示している<sup>25)</sup>。内閣官房長官主宰の「新健康フロンティア戦略賢人会議」（平成19年4月18日）において、「新健康フロンティア戦略」が取りまとめられた<sup>26)</sup>。本戦略の中に介護予防対策の一層の推進を目的として、骨・関節・脊椎の痛みによる身体活動低下、閉じこもりの防止等の項目がある<sup>26)</sup>。同年、日本整形外科学会は運動器の障害によって日常生活に制限をきたした状態をロコモティブシンドローム

(locomotive syndrome、略してロコモ)と提唱した<sup>27)</sup>。厚生労働省の「平成25年国民生活基礎調査」によると、要支援・要介護状態となった原因は「ロコモ」が25.0%で最多となった<sup>28)</sup>。ロコモは予備軍も含めた推計で4,700万人に達すると試算されている<sup>29)</sup>。健康寿命延伸のためにはロコモ予防が重要となる。

ロコモはいわゆる「未病」の状態であるが、進行すれば関節リウマチ (Rheumatoid arthritis、RA) や変形性関節症 (Osteoarthritis、OA) など運動器自体の疾患に至る。ロコモの原因としてはRAおよびOAといった疾患の前触れとなる炎症と、加齢によって引き起こされる炎症に大別される<sup>30)</sup>。つまり、いずれの場合でも、ロコモ状態となる大元の原因は生体内での過剰な炎症反応であることが知られている<sup>31、32)</sup>。生体内の炎症反応には免疫細胞が生成、放出する様々な細胞間伝達物質サイトカインが関与している。Lipopolysaccharide

(LPS) 誘発性炎症モデルラットに対し、大麦焼酎蒸留残液を固液分離した上清であるFBEを10日間投与した際、血清中の炎症性サイトカインであるインターロイキン (Interleukin、IL) -1 $\beta$  および IL-6、TNF (tumor necrosis factor) - $\alpha$  が低下した<sup>33)</sup>。これらの炎症性サイトカインは軟骨細胞に作用し、分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase、MMP) を放出させる



34)。この MMP により軟骨が破壊され、ロコモの状態に陥る。骨破壊が起こった状態では運動機能が著しく低下するため、MMP の生成（発現）を抑制する必要がある。ヒトの体内には少なくとも 24 種類の MMP が存在することが分かっている<sup>35)</sup>。中でも MMP-13 は RA および OA 両疾患の悪化に関与している<sup>36, 37)</sup>。そこで本研究では FBE について、軟骨細胞における MMP-13 の発現を抑制する物質を探索した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 材料

大麦焼酎製造の蒸留工程で得られた大麦焼酎粕（三和酒類株式会社、大分）1 000 L をステンレススチールメッシュネット（1 mm）でろ過した後、さらにセラミックフィルター（0.2  $\mu\text{m}$ ）を使用してろ過した。600 L のろ過液（FBE）を合成吸着剤ダイヤイオン HP20（三菱ケミカル株式会社、東京）48 L に接触させた後、360 L の水を通液させて洗浄した。その後、20、40、60 %（v/v）エタノール溶液各 120 L で溶出させて得た液体をそれぞれ FBE-P20、40、60 とした。各溶出液を濃縮後、凍結乾燥し、FBE-P20：9651 g、FBE-P40：4224 g、FBE-P60：495 g の粉末を得た。

### 2.2.2 HPLC による分取

1 g の FBE-P40 を 5 mL の 50 %メタノールに溶解させ、高速液体クロマトグラフィー（HPLC、Prominence システム、株式会社島津製作所、京都）に供し、UV-VIS 検出器（SPD-20A、島津製作所）にて検出させた。詳細な分析条件を Table 2-1 に示す。

### 2.2.3 細胞培養

ヒト軟骨肉腫細胞（以下、OUMS-27 細胞）は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所（大阪府）から購入した。

継代の際は非働化させた 10 %ウシ胎児血清（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）および 1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100 $\times$ 、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium

Table 2-1. Analysis conditions of HPLC.

Column	Phenomenex Synergy 4 $\mu$ m Hydro-RP 80A(ODS) 250 $\times$ 21.2 mm; Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA
Mobile phase	A : Water B : Acetonitrile
Gradient	0.0-10.0 min. B conc:7.5 % 10.5-15.5 min. B conc:10.0 % 16.0-21.0 min. B conc:15.0 % 21.5-26.5 min. B conc:16.0 % 27.0-32.0 min. B conc:17.0 % 32.5-37.5 min. B conc:18.0 % 43.0-53.0 min. B conc:60.0 %
Flow rate	10 mL/min
Detection	210 nm

(DMEM、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) を培地とし、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。なお、本論文において記載する血清は全て非働化済のものを用いた。

OUMS 細胞は mRNA 分析用に  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で、24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1 mL ずつ播種した。細胞がコンフルエントに達した後、増殖用培地を吸引除去し、1 %ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) 、1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific)を添加した DMEM (Sigma-Aldrich) を滴下した (評価用培地)。なお、評価サンプルの作用をよりクリアに発現させる目的で、血清添加濃度を 1 %に減らして、細胞を若干飢餓状態にした。同様の目的で、本論文における評価用培地に添加する血清は全て 1 %もしくは 0.5 %とした。FBE-P20、40、60 は 100 µg/mL、HPLC 分画物は 30–50 µg/mL (いずれも終濃度) となるように評価用培地に添加した。なお、評価サンプルは PBS (–) に溶解させて用い、培地中の PBS (–) の濃度は 10 %とした。その後、即座に IL-1β Human Recombinant (以下、IL-1β、PeproTech、Cranbury、NJ、USA) 溶液を 5.5 ng/well となるよう添加して細胞を刺激した。

#### 2.2.4 リアルタイム PCR

IL-1β による刺激から 24 時間後、製造元の指示に従って、TRIzol Plus RNA Purification キット (Thermo Fisher Scientific) によって細胞から総 RNA を抽出した。SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase Enzyme (Thermo Fisher Scientific) を使用して cDNA を合成した。FastStart Essential DNA Green Master (Roche、Basel、Switzerland)にて調製したサンプルを、LightCycler® 96 System (Roche) を使用してリアルタイム PCR を行った。サーマルサイクラーの条件は 95 °Cで 10 分間反応させた後、1 サイクルを 95 °Cで 10 秒間、60 °Cで 10 秒間、72 °Cで 10 秒間とし、45 サイクル反応させた。内部標準は GAPDH とし、MMP-13 mRNA の発現量は GAPDH mRNA 発現量に対する割合として求めた。プライマーの配列を以下に示す。GAPDH Fw : 5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CGG A-3'、GAPDH Rv : 5'-GAG GGA TCT CGC TCC TGG AAG A-3'、

MMP-13 Fw : 5'- CCA GTC TCC GAG GAG AAA CA-3', MMP-13 Rv : 5'-AAA AAC AGC TCC GCA TCA AC-3'とした。

#### 2.2.5 LC-MS による同定

FBE-P40-5 (MMP-13 発現抑制成分) を LC-MS (ACQUITY UPLC システム、Waters Corporation、Milford、MA、USA) に供し、同定を行った。MMP-13 発現抑制成分 (1 mg) を 300 mL の超純水に溶解させた。質量分析装置には Synapt G2-S (Waters Corporation) を用い、エレクトロスプレーイオン化法を用いた。LC-MS の分析条件を Table 2-2 に示す。

#### 2.2.6 統計解析

各実験のデータは平均値±標準偏差で示した。

統計処理は Shapiro-Wilk test にて正規性を検討した。正規分布ではないと言えなかったものについては Bartlett test にて等分散であるかを検討し、等分散性が認められたものについては Tukey-kramer 法にて有意差検定を実施した。正規分布ではなかったものについては Steel-Dwass 多重検定にて有意差検定を実施した。検定の有意水準は 5% とし、全ての検定は R v4.2.1 (R Development Core Team、New Zealand)<sup>38)</sup> によって行った。

Table 2-2. Analysis conditions of LC-MS.

<LC>	
Column	Imtakt Unison UK-C18 UP (2 mm×100 mm, Kyoto, Japan)
Solvent	A; 0.05 % formic acid-H <sub>2</sub> O B; 0.05 % formic acid-CH <sub>3</sub> CN
Gradient	B: 5 % (0-1 min.) → 40 % (10 min.) → 95 % (12-15 min.)
Flow rate	0.4 ml/min
Column temperature	40 °C
<MS>	
Ionization Method	ESI
Measurement mode	Positive / Negative

## 2.3 実験結果

### 2.3.1. MMP-13 mRNA 発現抑制成分を含む画分の特定

OUMS-27 細胞における MMP-13 遺伝子の発現に影響を与える FBE-P 画分を特定するため、OUMS-27 細胞に 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の FBE-P20、40、60 を添加し、リアルタイム PCR によって GAPDH に対する相対発現量を求めた。その結果、IL-1 $\beta$  を添加した control 区およびその他の試験区と比べ、FBE-P40 添加区において MMP-13 mRNA 相対発現量が有意に低値を示した (Figure 2-1)。

次に、FBE-P40 を HPLC に供し、検出されたピークを Figure 2-2 (A) で示す通りに 9 つの画分に分けて分取し、FBE-P40-1、2、3、4、5、6、7、8、9 を得た。OUMS-27 細胞に上記 9 つのサンプル 30–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加し (画分ごとに固形分濃度が異なることから添加量に幅がある)、リアルタイム PCR によって、GAPDH に対する MMP-13 mRNA 相対発現量を求めた。その結果、IL-1 $\beta$  を添加した control 区およびその他の試験区と比べ、FBE-P40-5 添加区において MMP-13 mRNA 相対発現量が有意に低値を示した [Figure 2-2 (B)]。

なお、FBE-P40-5 を同様に HPLC に供した結果、single peak のみ検出されたことから単一成分のみを含み、夾雑物は存在しなかった。

### 2.3.2. FBE-P40-5 に含まれる抗ロコモ成分の同定

FBE-P40-5 に含まれる単一成分について、LC-MS による分析を行った。その結果、分子量は 486、分子式は  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7$  の化合物であることが推定された (Figure 2-3、Figure 2-4)。

FBE に含まれる分子量 486、分子式  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7$  の化合物は、pyro-Glu-Pro-Tyr-Pro (以下、pEPYP) で表されるアミノ酸配列からなるピログルタミルテトラペプチドであることが報告されている<sup>20)</sup>。そこで、本研究で分取した化合物と、化学合成された pEPYP を LC-MS/MS 分析にて比較検討した結果、プロダクトイオンスペクトルが一致した。よって本研究にて分取された分子量 486 の化合物は、既報の pEPYP で表されるアミノ酸配列からなるピログルタミルテトラペプチドと推定された。

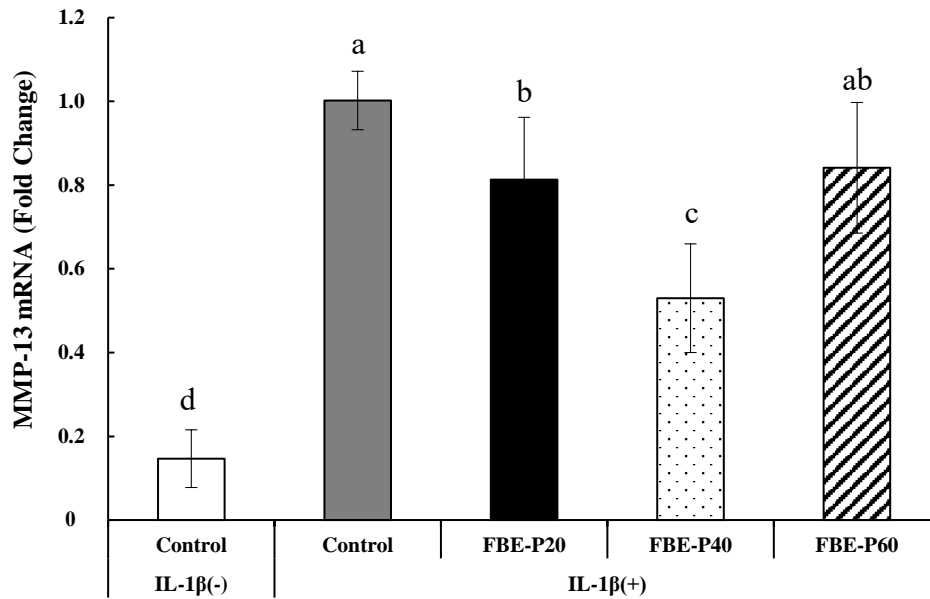
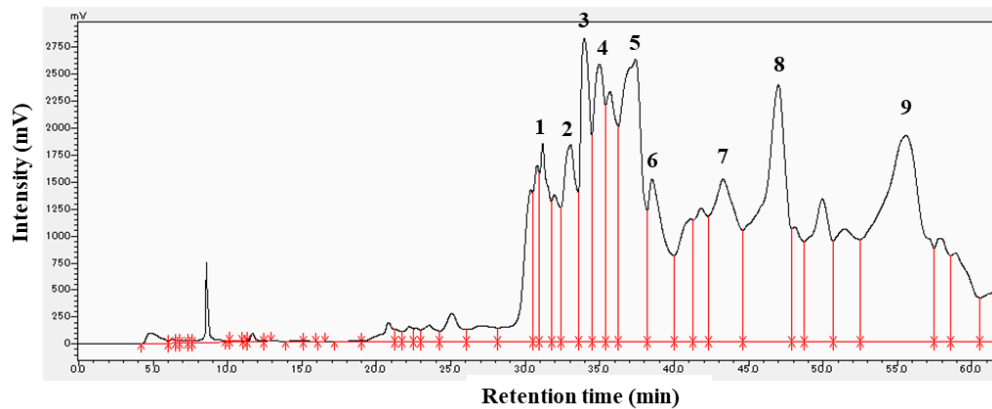


Figure 2-1. Effects of FBE-P20, 40, 60 on matrix metalloproteinase (MMP)-13 mRNA expression in OUMS-27 cells.

Cells were cultured for 24 h with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of FBE-P20, 40, 60. The expression level of MMP-13 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, c, or d) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

(A)



(B)

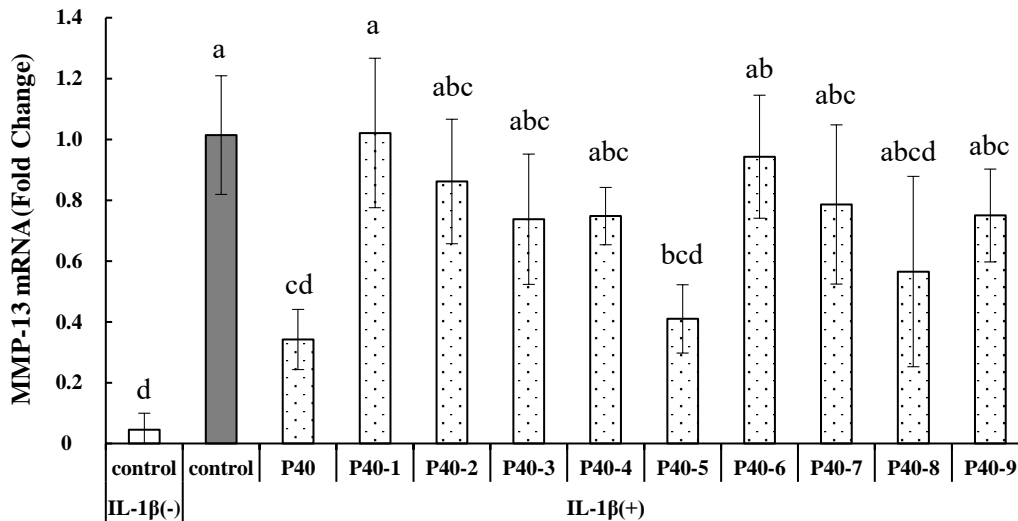


Figure 2-2.

(A) HPLC chromatogram of FBE-P40.

(B) Effects of FBE-P40, 40-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9 on matrix metalloproteinase (MMP)-13 mRNA expression in OUMS-27 cells.

Cells were cultured for 24 h with 30–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FBE-P40, 40-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9. The expression level of MMP-13 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, c, or d) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



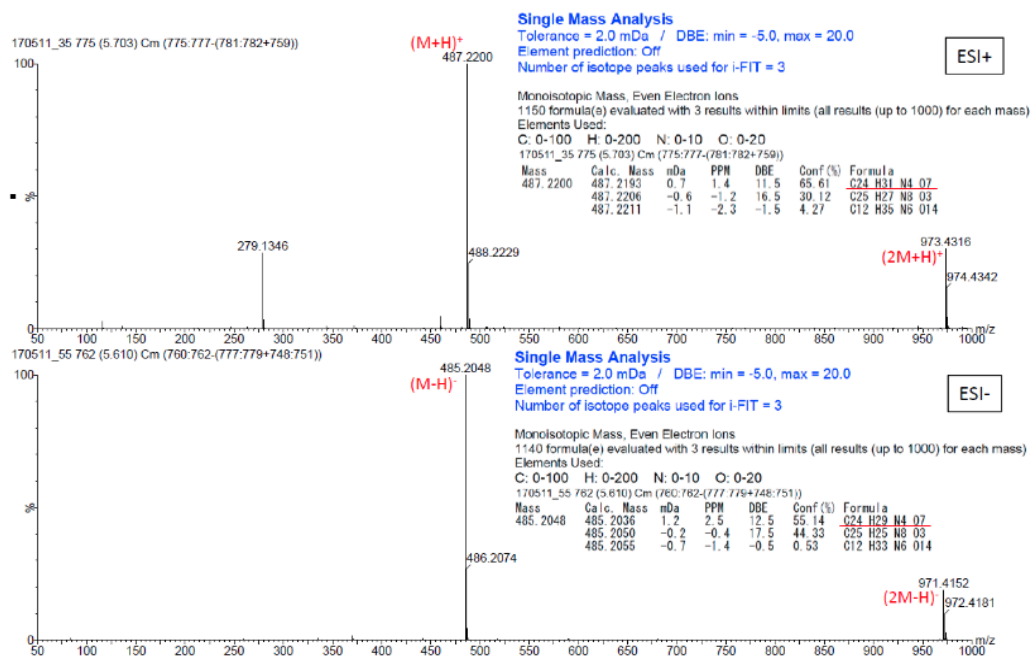


Figure 2-3. LC/MS spectrum and precision quality of FBE-P40-5.

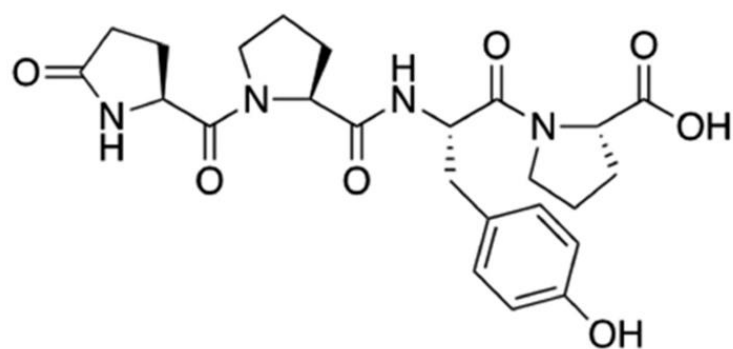


Figure 2-4. Structure of pEPYP

## 2.4 考察

pEPYP は三和酒類株式会社にて世界で初めて発見されたペプチドであり、抗皮膚炎効果が報告されている<sup>20)</sup>。また、同じく FBE から発見されたピログルタミンペンタペプチド pEQPFP は、大麦の主要な胚乳貯蔵タンパク質であるホルデインが白麹菌由来プロテアーゼによって分解されて QQPFP (Gln-Gln-Pro-Phe-Pro) が生成し、焼酎製造過程の蒸留における加熱によりピログルタミン化されて生成されたものであることを、三和酒類株式会社 丸岡らは推測した<sup>20)</sup>。従って、pEPYP も同様に、ホルデインが白麹菌由来プロテアーゼによって分解されて QPYP (Gln-Pro-Tyr-Pro) が生成し、加熱後に pEPYP が生成されると推測した。実際にホルデインには QPYP の配列が存在する。ただし、詳細な生成メカニズムについては更なる研究が必要である。

## 2.5 小括

OUMS-27 細胞における MMP-13 発現抑制効果を指標として有効成分の探索を行った結果、FBE-P40-5 に含まれるピログルタミンテトラペプチド pEPYP (pyro-Glu-Pro-Tyr-Pro、分子量 486、分子式  $C_{24}H_{30}N_4O_7$ ) であることが判明した。つまり、pEPYP は MMP-13 の発現を低下させることから抗ロコモ効果を有する可能性が示唆された。

## 第3章 pEPYP の抗ロコモ効果－細胞実験－

### 3.1 緒言

FBE-P40-5 に含まれるピログルタミルペプチド pEPYP (pyro-Glu-Pro-Tyr-Pro、分子量 486、分子式  $C_{24}H_{30}N_4O_7$ ) が MMP-13 mRNA の発現を抑制することが判明した。次に改めて、化学合成された pEPYP が OUMS-27 細胞における MMP-13 mRNA およびタンパク質の発現に与える影響について検討した。

一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 は免疫細胞である T 細胞、B 細胞、マクロファージなどの細胞で生成され、IL-1 $\beta$  および IL-6、TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインの過剰発現を鎮静化する機能を有する<sup>39)</sup>。前章緒言で記載した通り、LPS 誘発性炎症モデルラットに対し、FBE を 10 日間投与した際、炎症性サイトカインが低下した<sup>33)</sup>。そこで、炎症性サイトカインが低下した作用機序は pEPYP が T 細胞における抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生増加が関与しているのではないかと推測した。

本章では化学合成された pEPYP が OUMS-27 細胞における MMP-13 発現に与える影響と、T 細胞における IL-10 発現に与える影響とを、遺伝子およびタンパク質レベルで検討した。

### 3.2 実験方法

#### 3.2.1 材料

化学合成された pEPYP 粉末 (GenScript Corp.、江蘇、中国)を PBS (-) に溶解させ、培地に添加した。PBS (-) の培地中の濃度は 10 %とした。なお、pEPYP 粉末に含まれる pEPYP 濃度は一般財団法人 日本食品分析センターにて定量 NMR 法による純度測定を行い、90 %であることが判明した。

#### 3.2.2 細胞培養

第2章と同様、OUMS-27 細胞 (国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所) を使用して評価した。OUMS-27 細胞の継代の際は 10 %ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) および 1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100 $\times$ 、Thermo Fisher

Scientific) を含む DMEM (Sigma-Aldrich) を増殖用培地とし、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。細胞増殖試験用に 1.5 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の密度で 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 0.1 mL ずつ播種した。mRNA 分析用とウェスタンブロットティング用に 2 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の密度で 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1 mL ずつ播種した。37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、細胞がコンフルエントに達した後、増殖用培地を吸引除去し、評価サンプルおよび 1 % ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) 、1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific) を添加した DMEM (Sigma-Aldrich) を滴下して培地交換を行った (評価試験用培地)。その後、即座に IL-1β、Human、Recombinant (以下、IL-1β、PeproTech、Cranbury、NJ、USA) 溶液を 5.5 ng/well となるよう添加して刺激した。細胞増殖試験用および mRNA 分析用の細胞はサンプルおよび刺激剤添加後 1 日培養した。ウェスタンブロットティング用細胞は 2 日間おきに、新しい評価試験用培地 (評価サンプルおよび刺激剤を含む) と交換しながら 5 日間培養した。

急性 T リンパ芽球性細胞 (以下、T 細胞または TALL-1 細胞、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所) を評価試験に用いた。TALL-1 細胞の継代の際は 10 % ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) および 1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific) を含む RPMI-1640 培地 (以下、RPMI、Sigma-Aldrich) を増殖用培地とし、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。OUMS-27 細胞と同様に、細胞増殖試験用に 1.5 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の密度で 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 0.1 mL ずつ播種した。mRNA 分析用とウェスタンブロットティング用に 2 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の密度で 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1 mL ずつ播種した。37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、細胞がコンフルエントに達した後、評価サンプルおよび 1 % ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich)、1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific) を含む RPMI 培地 (Sigma-Aldrich、評価試験用培地) と培地交換を行った。即座に IL-6、Human、Recombinant、expressed in E. coli sigma SRP3096 (以下、IL-6、Sigma-Aldrich) 溶液を 50 ng/well となるよう添加して刺激した。細胞増殖試験用およ

び mRNA 分析用の細胞はサンプルおよび刺激剤添加後 1 日培養した。ウェスタンブロットティング用細胞は 2 日間おきに、新しい評価試験用培地（評価サンプルおよび刺激剤を含む）と交換しながら 5 日間培養した。

### 3.2.3 増殖試験

細胞増殖試験は Cell Counting Kit-8 (Dojindo、熊本) を用い、製造元の指示に従って行った。2300 EnSpire Multilabel Plate Reader (PerkinElmer、Waltham、MA、USA) によって、各ウェルの 450 nm の吸光度を測定した。control 区の測定値で正規化し、相対的な割合として求めた。

### 3.2.4 リアルタイム PCR

第 2 章 2.2.4 リアルタイム PCR の項に記載の方法と同様に実施した。内部標準は GAPDH とし、標的 mRNA の相対発現量を求めた。各プライマーの配列を以下に示す。GAPDH Fw : 5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CGG A-3'、GAPDH Rv : 5'-GAG GGA TCT CGC TCC TGG AAG A-3'、MMP-13 Fw : 5'- CCA GTC TCC GAG GAG AAA CA-3'、MMP-13 Rv : 5'-AAA AAC AGC TCC GCA TCA AC-3'、IL-10 Fw : 5'-GCC TAA CAT GCT TCG AGA TC-3'、IL-10 Rv : 5'-TGA TGT CTG GGT CTT GGT TC-3'とした。

### 3.2.5 ウェスタンブロットティング

各試薬は製造元の指示に従って使用した。OUMS-27 細胞の場合は、細胞培養液上清を除去し、Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X、Thermo Fisher Scientific) を添加した M-PER Reagent (Thermo Fisher Scientific) を滴下することによりタンパク質を抽出した。TALL-1 細胞の場合は細胞培養液を吸引回収し、高速遠心機にかける (270 G、5 min) ことにより、細胞ペレットを得た。得られた細胞ペレットに、Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X、Thermo Fisher Scientific) を添加した M-PER Reagent (Thermo Fisher Scientific) を滴下することによりタンパク質を抽出した。抽出物中に含まれるタンパク質濃度を Bradford assay (Thermo Fisher Scientific) によって測定した。タンパク質量が 1 ウェルあたり 20  $\mu$ g となるようにサンプル添加量を決定した。

Bolt LDL Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) と Reducing Agent (Thermo

Fisher Scientific)を加えた後、タンパク質抽出物を 70 °Cで 10 分間加熱した。

Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Mini Protein Gel (Thermo Fisher Scientific)にタンパク質抽出物を滴下し、Bolt MES SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) を使用して電気泳動を行った(200 V、22 分)。

ゲルを polyvinylidene fluoride membrane (PVDF、iBlot2 drive-rotating system、Thermo Fisher Scientific) に転写した。

iBind Western System (Thermo Fisher Scientific) を使用し、GAPDH および MMP-13、IL-10 タンパク質の抗原抗体反応を行った。一次抗体は rabbit polyclonal GAPDH Antibody (Thermo Fisher Scientific)および mouse monoclonal MMP-13 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.、Dallas、TX、USA)、IL-10 Polyclonal Antibody bs-0698R (Bioss Inc.、Boston、MA、USA)を、二次抗体は Goat anti-Rabbit および anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP] (Thermo Fisher Scientific)を用いた。各抗体の濃度は製造元の指示に従った。

脱イオン水で洗浄した後、メンブレンを SuperSignal West Dura kit (Thermo Fisher Scientific) の 2 つの試薬と 5 分間反応させた。メンブレンを ChemiDoc XRS+ system for imaging (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) に挿入し、検出されたバンドを Image Lab™ 5.0 software (Bio-Rad Laboratories)を使用して検出されたバンドの濃度を数値化した。MMP-13 および IL-10 タンパク質の発現量は GAPDH タンパク質の発現量に対する割合として求めた。

### 3.2.6 統計解析

第 2 章 2.2.6 統計解析の項に記載の方法と同様に行った。

## 3.3 実験結果

### 3.3.1 pEPYP が OUMS-27 細胞の増殖および MMP-13 mRNA、タンパク質の発現に与える影響

pEPYP が OUMS-27 細胞の増殖に与える影響について検討した。OUMS-27 細胞に 0.01–10 µg/mL の pEPYP を添加して培養した後、キットを用いて 450 nm の吸光度を測定した。control 区の数値で正規化し、細胞増殖率を求めた。その

結果、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の pEPYP は control 区および 0.01–1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pEPYP と比べ、細胞増殖率を有意に増加させた (Figure 3-1)。

次に、OUMS-27 細胞に 0.01–1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の pEPYP を添加して培養した後、リアルタイム PCR によって、GAPDH mRNA に対する MMP-13 mRNA の相対発現量を求めた。その結果、IL-1 $\beta$  で刺激した control 区に対して、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の pEPYP を添加した試験区では MMP-13 mRNA 相対発現量が有意に低値を示した (Figure 3-2)。

さらに、OUMS-27 細胞に 0.01–1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の pEPYP を添加して培養した後、ウェスタンブロッティングによって、GAPDH タンパク質に対する MMP-13 タンパク質の相対発現量を求めた。その結果、IL-1 $\beta$  で刺激した control 区に対して、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の pEPYP を添加した試験区では MMP-13 タンパク質相対発現量が有意に低値を示した (Figure 3-3)。



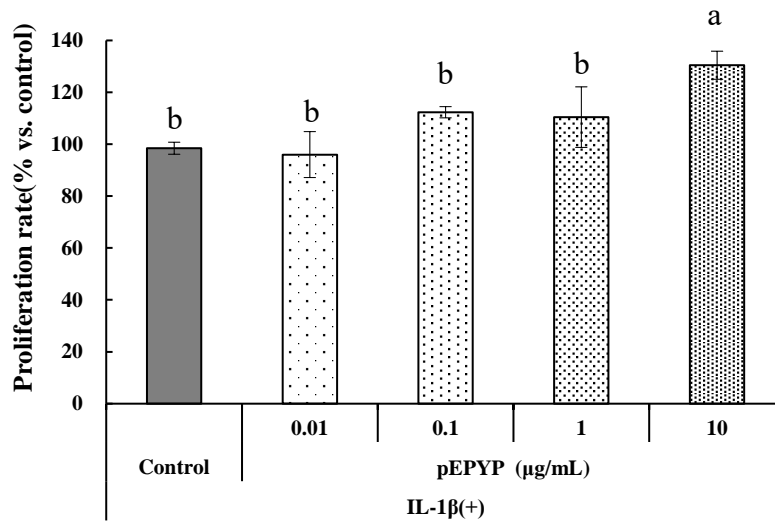


Figure 3-1. Effects of pEPYP on cell proliferation in OUMS-27 cells.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–10 µg/mL pEPYP. Absorbance at 450 nm was measured using a commercial kit, normalized to the control and quantified. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Different letters (a or b) above the columns indicate significance ( $p < 0.05$ ).

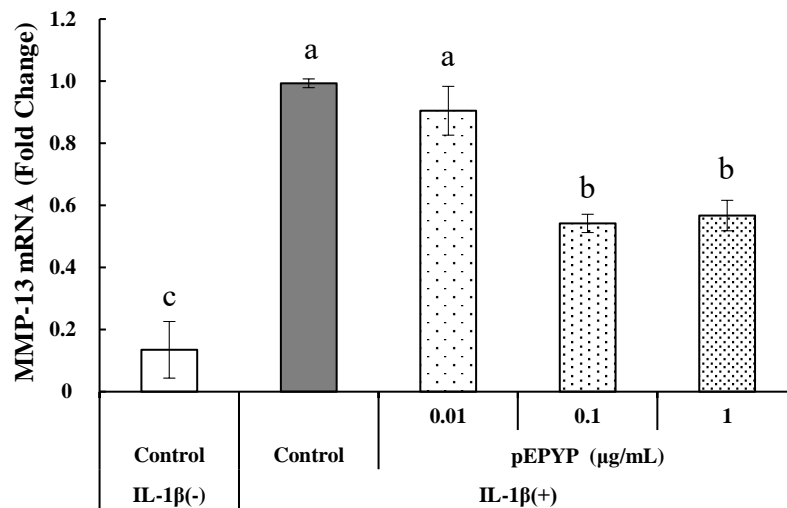


Figure 3-2. Effects of pEPYP on matrix metalloproteinase (MMP)-13 mRNA expression in OUMS-27 cells.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–1  $\mu\text{g/mL}$  of pEPYP. The expression level of MMP-13 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

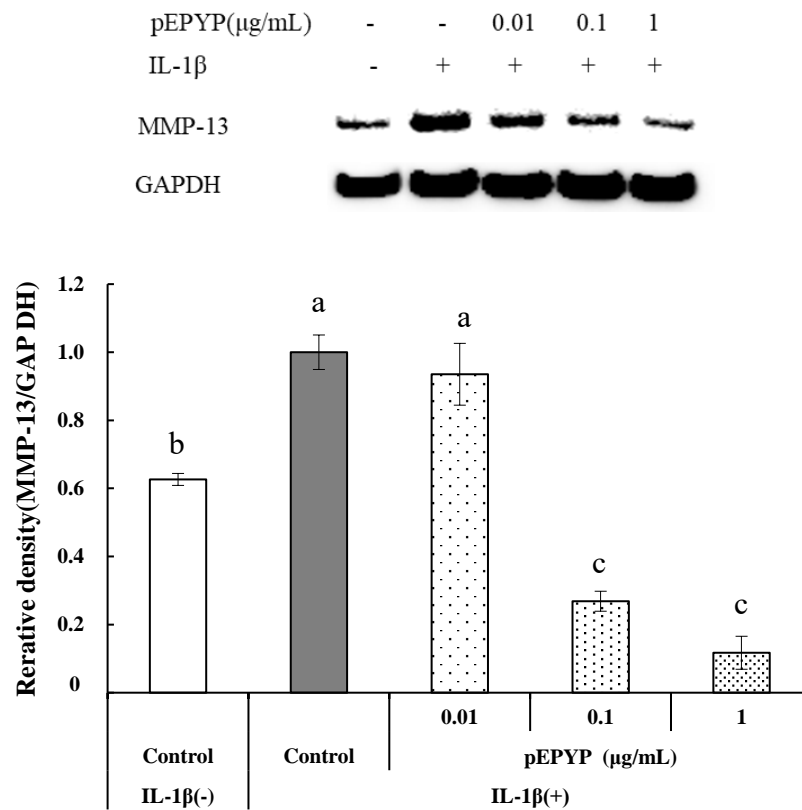


Figure 3-3. Effects of pEPYP on matrix metalloproteinase (MMP)-13 protein expression in OUMS-27 cells.

Cells were cultured for 5 days with 0.01–1  $\mu\text{g/mL}$  of pEPYP, changing the medium every 2 days. MMP-13 protein levels in OUMS-27 cells were analyzed by Western blotting. The relative protein expression levels were normalized to the GAPDH protein. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.2 pEPYP が TALL-1 細胞の増殖および IL-10 mRNA、タンパク質の発現に与える影響

pEPYP が TALL-1 細胞の増殖に与える影響を検討した。TALL-1 細胞に 0.01–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の pEPYP を添加して培養した後、キットを用いて 450 nm 吸光度を測定した。control 区の数値で正規化し、細胞増殖率を求めた (Figure 3-4)。その結果、pEPYP 0.01–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  は IL-6 で刺激した control 区と同等の細胞増殖率となり、細胞増殖に影響を与えなかった。

次に、TALL-1 細胞に 0.03–3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の pEPYP を添加して培養した後、リアルタイム PCR によって、GAPDH mRNA に対する IL-10 mRNA の相対発現量を求めた。その結果、IL-6 で刺激した control 区に対して、0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の pEPYP を添加した試験区では IL-10 mRNA の相対発現量が有意に高値を示した (Figure 3-5)。

さらに、TALL-1 細胞に 0.03–3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の pEPYP を添加して培養した後、ウェスタンブロッティングによって、GAPDH タンパク質に対する IL-10 タンパク質の相対発現量を求めた。その結果、IL-6 で刺激した control 区に対して、0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の pEPYP を添加した試験区では IL-10 タンパク質の相対発現量が有意に高値を示した (Figure 3-6)。

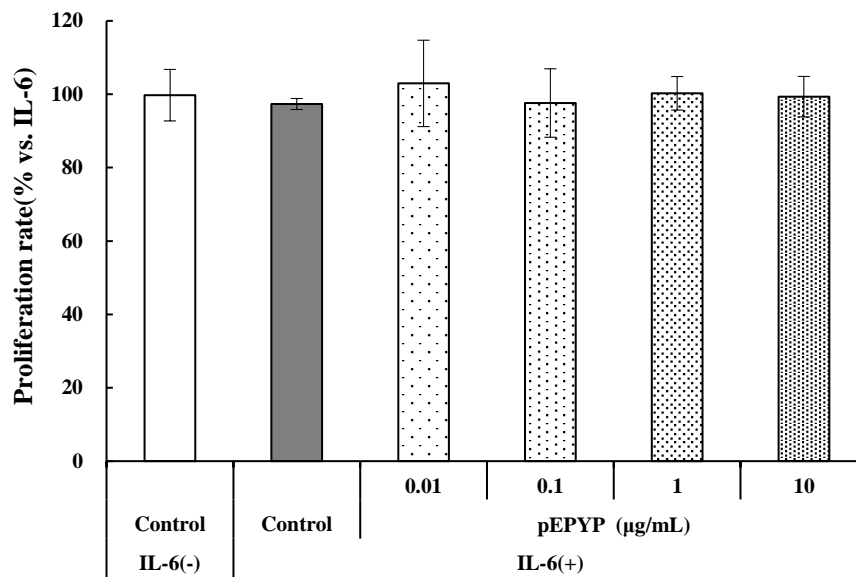


Figure 3-4. Effects of pEPYP on cell proliferation in TALL-1 cells.

Cells were cultured for 24 hours with 0.01–10 µg/mL pEPYP. Absorbance at 450 nm was measured using a commercial kit, normalized to the control and quantified. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments.

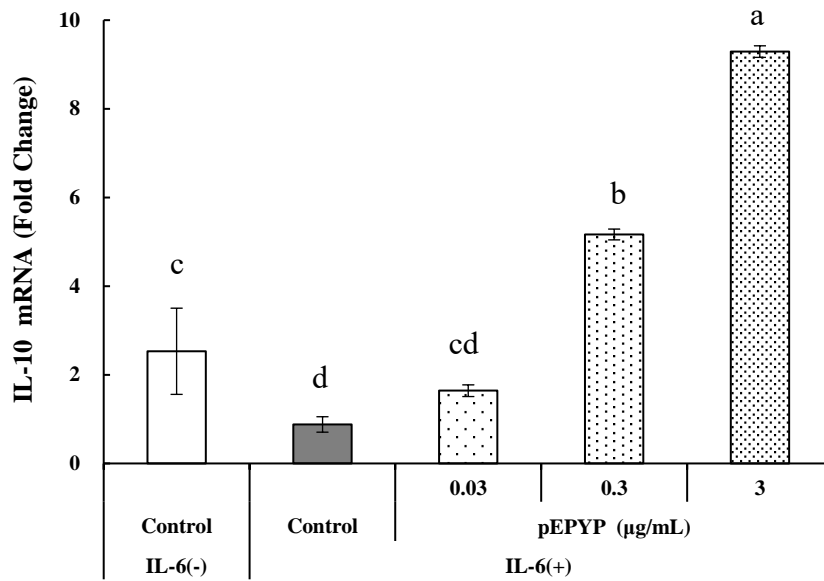


Figure 3-5. Effects of pEPYP on Interleukin (IL)-10 mRNA expression in TALL-1.

Cells were cultured for 24 h with 0.03–3 µg/mL of pEPYP. The expression level of IL-10 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, c or d) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

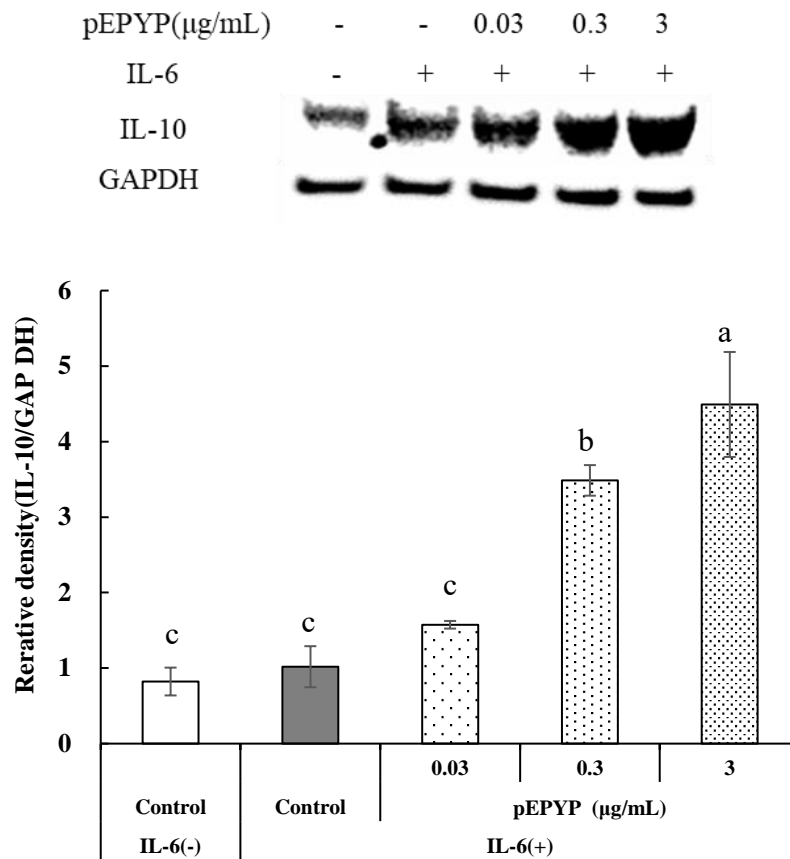


Figure 3-6. Effects of pEPYP on Interleukin (IL)-10 protein expression in TALL-1 cells.

Cells were cultured for 5 days with 0.03–3  $\mu\text{g/mL}$  of pEPYP, changing the medium every 2 days. IL-10 protein levels in TALL-1 cells were analyzed by Western blotting. The relative protein expression levels were normalized to the GAPDH protein. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.4 考察

pEPYP が OUMS-27 細胞および TALL-1 細胞の増殖に影響を与えない濃度にて、標的遺伝子およびタンパク質の発現に与える影響を検討した。pEPYP は軟骨細胞による軟骨分解酵素 MMP-13 産生抑制作用に加え、T 細胞による抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生促進作用を有することが示唆された。免疫細胞から放出された炎症性サイトカインは軟骨細胞を刺激し、MMP-13 を放出させる。また、免疫細胞による炎症性サイトカインの放出によって炎症が起こり、ロコモを引き起こす。つまり、pEPYP は IL-10 を増加させることによってロコモ初期段階における炎症を抑制し、かつ MMP-13 の産生を直接的に抑制することにより炎症後期の反応である軟骨分解をも抑制する作用が示唆された。

### 3.5 小括

pEPYP は MMP-13 の発現を抑制し、IL-10 の発現を促進することが遺伝子およびタンパク質レベルで示唆された。pEPYP を摂取することにより、軟骨分解酵素の生成を抑制し、抗炎症性サイトカインの産生を促進する可能性が考えられた。従って、pEPYP が抗ロコモ効果を有することが示唆された。次のステップとして、リウマチモデルラットにおける当該効果を検討する試験を行ったため、第 4 章にて報告する。



## 第4章 pEPYP の抗ロコモ効果－動物実験－

### 4.1 緒言

第2および3章での研究により、pEPYP が抗ロコモ効果を有することが示唆された。本章では pEPYP が関節炎に与える影響を検討する目的で、pEPYP 含有サンプルをリウマチ (CIA) モデルラットに投与し、浮腫スコアおよび血清中の抗 II 型コラーゲン IgG 抗体量の測定、病理学的検査を行った。

### 4.2 実験方法

本実験は株式会社ケー・エー・シーに委託して実施した。株式会社ケー・エー・シー内で開催された倫理委員会において、試験名「ラットを用いたコラーゲン誘発関節炎モデルに対する被験物質の薬効評価試験-2」は同社動物実験規程に適合することを確認し、本実験の実施が承認された (承認番号: 15-1111)。

#### 4.2.1 動物

8 週齢 SPF グレードの DA/Slc ラット (8 週齢、雌、日本エスエルシー株式会社、静岡) 32 匹を購入した。馴化期間は入荷日を含めて 6 日間とした。

#### 4.2.2 被験物質および投与

9 週齢 DA/Slc ラット 6 匹×4 群に対し、普通飼料を自由摂取させながら、各試験サンプルを 5 mL/kg 体重/day ずつ、30 日間、強制経口投与を行った。control 群には蒸留水を、試験群には pEPYP 含有サンプル (三和酒類株式会社) 10、20、40 mg/kg 体重/day を投与した。

#### 4.2.3 関節炎評価

投与 14 日目にウシ軟骨由来 II 型コラーゲン (CL-22、京都和光純薬株式会社、京都) 3 mg/mL 濃度溶液を尾根部の左右に対し 0.05 mL ずつ注射し、関節炎を惹起した。関節炎評価日は惹起から 11-14 日目とした。

浮腫スコアは以下の評価基準に従ってスコア化した。スコア 0: 無症状、スコア 1: 指など小関節 1 本の軽度腫脹、スコア 2: 小関節 2 本以上あるいは大きな関節の腫脹、スコア 3: 1 肢の腫脹、スコア 4: 1 肢の全体が最大限に腫脹とし

た。

また、惹起 14 日目に全個体の後足を撮影した。

さらに試験終了後に採血を行い、Rat anti-Type-I and Type-II Collagen IgE Assay Kit (和研薬株式会社、京都) を用い、血清中抗 II 型コラーゲン IgG 抗体量を測定した。

安楽死後のラットの左右両後肢を採取し、10 %ホルマリン緩衝液 (富士フィルム和光純薬工業株式会社、大阪府) に浸漬して固定した後、常法に従ってパラフィンブロックを作製し、ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin Stain、HE) 染色を施して病理組織標本を作製した。標本における病理組織学的検査を行い、以下の項目について炎症の程度を評価した。また、各所見の程度を数値化した (正常 : 0、極軽度 : 0.5、軽度 : 1、中等度 : 2、重度 : 3)。

- ・炎症性細胞浸潤

好中球を主体とする多形核白血球と比較的少数のリンパ球及びマクロファージ等の単核細胞の全ての炎症性細胞の浸潤の程度を総合的に評価した。

- ・水腫/フィブリン様物質析出

水腫とフィブリン様物質が析出している像を評価した。ただし、HE 染色標本上では、フィブリンと確定することは出来ない。

- ・滑膜/骨膜増殖

足根関節における滑膜と長管骨 (脛骨及び中足骨) の骨膜の増殖性変化を合わせて評価した。

- ・関節軟骨及び骨組織の破壊

足根構成骨 (脛骨及び中足骨を含む) の関節軟骨表面の破壊像と滑膜と骨膜による骨組織への侵襲像を合わせて評価した。

- ・線維性結合組織増殖

間葉系組織のうち、線維性結合組織の増殖性変化の程度を評価した。

#### 4.2.4 統計解析

第 2 章 2.2.6 統計解析の項に記載の方法と同様に行った。

## 4.3 実験結果

### 4.3.1 関節炎スコアおよび後足の観察

リウマチ誘発ラットに pEPYP を投与した際の抗ロコモ効果を検討するため、関節炎スコアおよび後足の症状に与える作用を評価した。惹起から 11–14 日目に関節炎の評価を行った。惹起 14 日目に control 群に比べ、pEPYP 20 および 40 mg/kg 体重/day 投与群では浮腫スコア平均値が低値を示したが、有意差は認められなかった (Figure 4-1)。また、惹起 14 日目の各群における浮腫スコア平均値と近いスコアを示した個体における後足の画像を Figure 4-2 に示す。20 および 40 mg/kg 体重/day 投与群では control 群および 10 mg/kg 体重/day 投与群と比べ、発赤および腫脹が少ない個体が見られた。

### 4.3.2 抗 II 型コラーゲン IgG 抗体量

リウマチ誘発ラットに pEPYP を投与した際、関節炎発症時に増加する抗 II 型コラーゲン IgG 抗体量に対する作用を検討した。試験終了時に採血を行い、抗体量を測定した。その結果、control 群に比べ、pEPYP 20 および 40 mg/kg 体重/day 投与群では抗 II 型コラーゲン IgG 抗体量が低値を示したが、有意差は認められなかった (Figure 4-3)。

### 4.3.3 病理組織学的検査

安楽死後のラットの左右両後肢を採取し、作製された病理組織標本における病理学的検査を行い、炎症の程度を検証した。採取した足根部の HE 染色標本の病理学的検査の結果を Figure 4-4 に示す。各所見の程度を数値化した結果を Figure 4-5 に示す。control 群における病変の程度は強かったが、pEPYP を投与したいずれの群においても個体間の程度差が大きかった。そのため、数値化データにおいて有意な差は見られず、control 群との明らかな差異を論じることは出来なかった。

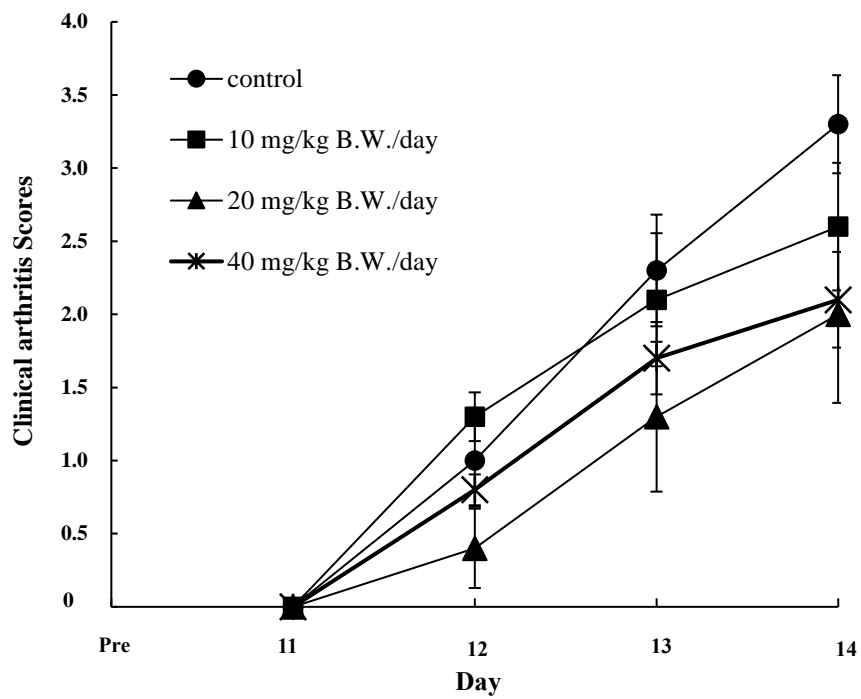


Figure 4-1. Effects of pEPYP on CIA model rats (n=6).

The horizontal axis indicates day after induction of inflammation, and the vertical axis indicates clinical arthritis scores.

**Control score 3.5**



**10 mg/kg B.W./day score 3.0**



**20 mg/kg B.W./day score 2.0**



**40 mg/kg B.W./day score 2.0**



Figure 4-2. Effects of pEPYP on CIA model rats (n=6).

Representative clinical arthritis features on the hind paws of rats on day 14 after induction of inflammation.

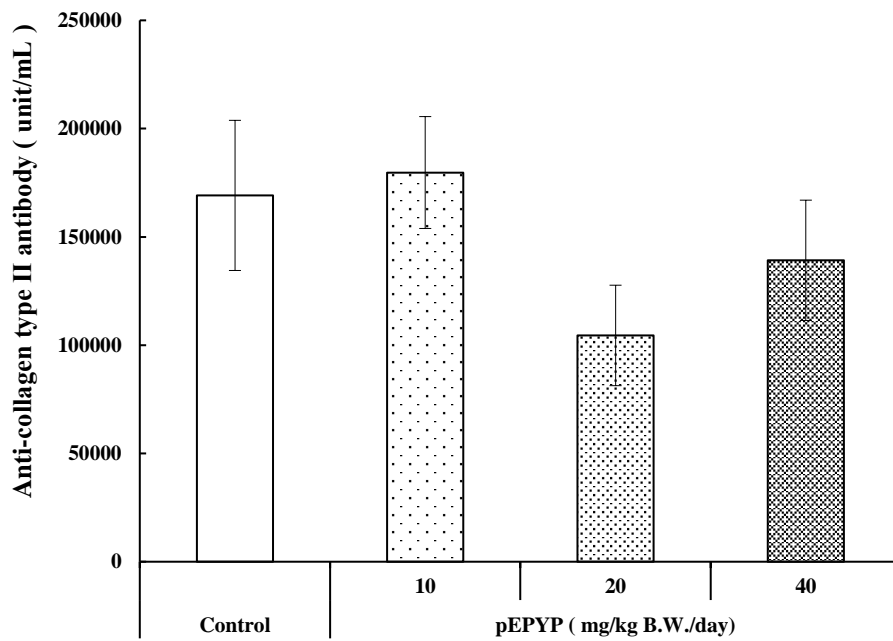
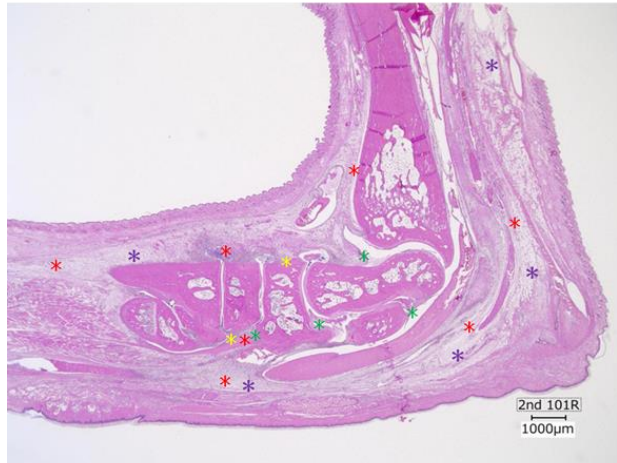
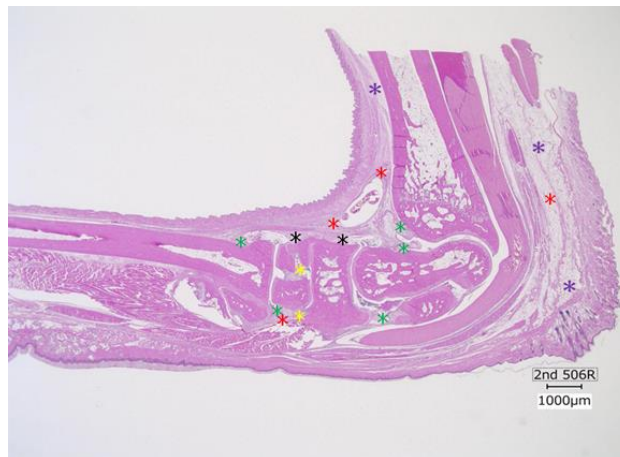


Figure 4-3. Anti-collagen II antibody levels in serum on CIA model rats (n=6) on day 14 after induction of inflammation.



**Control**



**pEPYP 40 mg/kg B.W./day**

Figure 4-4. Histopathology of tarsal joints on day 14.

- \* : Inflammatory cell infiltration site
- \* : Edema/fibrin-like substance deposition
- \* : Synovial/periosteal proliferation
- \* : Articular cartilage/bone destruction
- \* : fibrous connective tissue proliferation

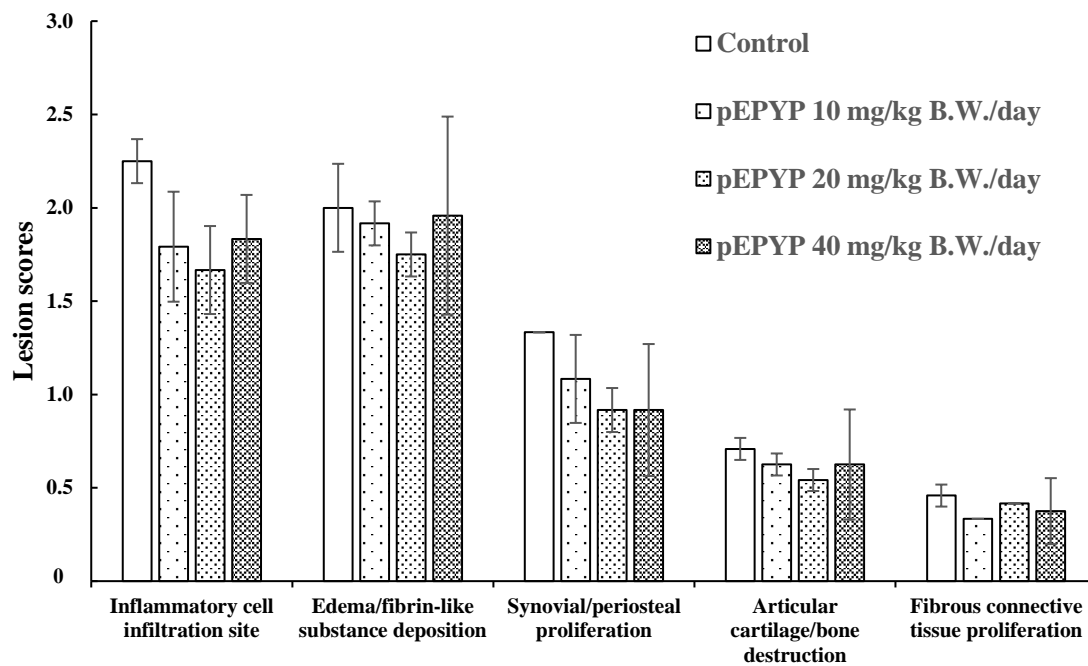


Figure 4-5. Scoring of each lesion on histopathological examination.

The extent in each lesion was quantified. Normal: 0, very mild: 0.5, mild: 1, moderate: 2, severe: 3.



#### 4.4 考察

pEPYP を CIA モデルラットに経口投与した結果、有意差はなかったものの、pEPYP 投与群は control 群と比べ、浮腫スコアが低値に抑えられた。MMP-13 産生抑制剤を CIA モデルラットに経口投与した結果、浮腫スコアが低値に抑えられたことが報告されている<sup>40)</sup>。第3章にて pEPYP は軟骨細胞からの MMP-13 産生を抑制する効果を示した。つまり、pEPYP 投与によって MMP-13 の産生が抑制され、CIA モデルラットの浮腫スコアを低値に抑えられた可能性がある。また、CIA モデルラットにおいて、浮腫スコアの悪化は炎症性サイトカインの発現増加と相関性があることが報告されている<sup>41)</sup>。さらに、エピカテキン-3-O- $\beta$ -D-アロピラノシドは脾臓細胞の IL-10 産生を増加させ、CIA モデルマウスの浮腫を抑制した<sup>42)</sup>。第3章にて、pEPYP は T 細胞における IL-10 の産生を促進する効果が示唆されたことから、pEPYP の投与によって、IL-10 産生が促進されたことにより、CIA モデルラットの浮腫スコアが低下した可能性がある。

pEPYP を CIA モデルラットに経口投与した結果、有意差はなかったものの、pEPYP 20 mg/kg B.W./day 投与群は control 群と比べ、抗II型コラーゲン抗体が低値に抑えられた。慢性関節リウマチにおける抗 II 型コラーゲン抗体は骨破壊によって増加するが、再発性多発性軟骨炎では抗 II 型コラーゲン抗体そのものが発症に直接関与することが報告されている<sup>43)</sup>。インドキシル 3-硫酸は IL-10 発現を促進し、樹状細胞上の CD80/CD86 発現を減少させることによって、抗炎症および寛容化効果を示す<sup>44)</sup>。さらに、RA 治療薬アバタセプトは CD80/CD86 発現減少によって、血清中の IgG 抗体を減少させる<sup>45)</sup>。従って、pEPYP が T 細胞における IL-10 の産生を促進したことによって、抗原提示細胞における CD80/CD86 の発現が減少し、血清中の IgG 抗体産生が低下した可能性が考えられた。

病理学的検査では、pEPYP 40 mg/kg B.W./day 投与群は control 群と比べ、有意差はないものの炎症性細胞浸潤箇所が少ない結果が得られた。炎症性細胞浸潤とは MMP によって遊走が促進された炎症性細胞が、血管内などから病巣に

向かって集中的に遊走することである<sup>46)</sup>。遊走した炎症性細胞からは炎症性サイトカインが盛んに放出され、浮腫が発生する<sup>47)</sup>。ジヒドロアルテミシニン誘導体は MMP-13mRNA の発現をダウンレギュレートし、変形性膝関節症ラットの浮腫および炎症細胞の浸潤を有意に軽減することが報告されている<sup>48)</sup>。つまり、pEPYP は MMP-13 産生抑制作用により、炎症性細胞の浸潤および浮腫を抑制したと考えられた。

#### 4.5 小括

CIA モデルラットに pEPYP 含有飼料を強制経口投与し、抗ロコモ効果の検討を行った。その結果、有意差はないものの、control 群と比べ、リウマチの初期症状である浮腫スコアおよび抗 II 型コラーゲン IgG 抗体量が低値に抑えられた。また、発赤や腫脹の程度を低くし、炎症性細胞浸潤を抑制する可能性が考えられた。従って、pEPYP を摂取することによってロコモの予防、改善に効果を示す可能性が示唆された。さらに次のステップとして、膝関節に違和感のあるヒトに pEPYP 含有食品を摂取させ、抗ロコモ効果を検討したため、第 5 章で報告する。

## 第5章 pEPYP の抗ロコモ効果－ヒト二重盲検試験－

### 5.1 緒言

pEPYP は MMP-13 の発現の抑制作用および IL-10 産生促進作用を有することを細胞実験で明らかにした。さらに、CIA モデルラット試験では pEPYP 投与によりリウマチの初期症状である浮腫および抗Ⅱ型コラーゲン抗体量の低減、炎症性細胞の浸潤を抑制する可能性が示唆された。

そこで次に、pEPYP 食摂取によるロコモに対する作用を検証した。ロコモの原因は変形性関節症、関節リウマチによる関節破壊など運動器自体の疾患と、加齢による運動機能低下に大別される<sup>30)</sup>。変形性関節症は日本語版変形性膝関節症患者機能評価尺度(Japanese Knee Osteoarthritis Measure、JKOM)<sup>49)</sup>や日本整形外科学会変形性膝関節疾患治療成績判定基準(Japanese Orthopaedic Association、JOA)<sup>50)</sup>によって診断される。本試験では、JKOM および JOA をもとに、膝関節に痛みや違和感があるが関節にかかわる疾病に罹患しておらず、ただちに治療の必要はないと試験責任医師に判断された健常者を対象とした、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。また、pEPYP 食の安全性評価とあわせて検討した成績を示す。

### 5.2 試験方法

#### 5.2.1 被験者

##### (1) 登録基準

年齢 40 歳以上 69 歳以下（同意取得時）の健常男女で、膝関節に痛みや違和感がある者を参加登録の条件とした。ゴニオメーターを用いた膝関節可動域検査で評価が悪い者を選定した。しかし病者は除くため、JKOM が低値（原則 45 点以下）、かつ JOA が高値（70 点以上、但し 100 点を除く）の者を被験者として組み入れた。

##### (2) 除外基準

試験参加にあたり次の条件を除外基準とした。

①過度な喫煙や飲酒の習慣がある者、②アルコールまたは薬物依存症の者、③過去に膝の手術を施行した者、④膝関節痛で通院、治療を必要とする者、⑤医療機関での治療（マッサージや電気治療）を過去2週間以内に受けており、試験終了まで受ける予定がある者、⑥膝関節痛に対して一般市販外用剤や膝サポーター、テーピング、湿布等を習慣的に使用している者、⑦疾患治療のために薬物服用中、あるいは注射剤、坐薬等を使用している者、⑧肝・胆道・消化器系・循環器・呼吸器系・腎・泌尿器系・精神・神経系・血液系の慢性疾患あるいは障害を有する者、⑨不整脈および高度の貧血のある者、⑩試験期間中に生活習慣が大きく変わる可能性がある者（海外旅行も含む）、⑪妊娠中または妊娠している可能性のある者、および授乳中の者、⑫同意取得前1ヶ月以内に他の臨床試験に参加していた者または現在他の臨床試験に参加している者、⑬試験責任医師または試験分担医師の判断で、試験実施により研究対象者への危険性が増すか、あるいは十分なデータが得られない可能性があるかと判断される者

### (3) 倫理的配慮

試験の実施に先立ち、試験実施計画書、症例報告書、同意説明文書・同意書等の記載内容および本試験の実施の適否について、試験（治験）審査委員会（名称：医療法人社団 札幌百合の会病院 治験審査委員会）により2018年10月17日に審議され、承認された。

試験はヘルシンキ宣言、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省告示、2014年12月22日）に則して実施された。試験責任医師（医療法人社団 札幌百合の会病院 稲場守）は研究対象者の選定にあたって、人権保護の観点および試験実施計画書の選択基準、除外基準に基づき、研究対象者の健康状態、年齢、性別、同意取得能力、試験責任医師との依存関係、他の試験の有無等を考慮し、試験に参加を求めることの適否について慎重に検討した。

また、試験開始前にUMIN登録（ID：UMIN000035610）を行った。

### (4) 同意の取得

試験実施医療機関は被験者が試験に参加する前（スクリーニング検査前）

に、試験実施医療機関の治験審査委員会で承認された説明文書・同意書を被験者に手渡した上で十分な説明を行い、試験への参加について自由意思による同意を文書で得た。

#### (5) 被験者の割付

被験者は試験に直接関係しない割付担当者によって、乱数表に基づき無作為に被験食品群とプラセボ食品群に分けられた。

#### 5.2.2 試験食品

本試験では豚ゼラチンおよびダークカラメル(着色料)を含むサイズ1号、全長19.4 mmのハードカプセルを試験食品とした。pEPYP食(被験食品)は1日摂取量3粒あたりにpEPYP 15 mgを配合した。プラセボ食品はpEPYPの代わりにデキストリンを配合した同一形状のハードカプセルを用いた。なお、外観や匂いから被験食品とプラセボ食品を識別できないことを確認し試験に用いた。

#### 5.2.3 試験デザイン

本試験はランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験で実施した。

試験期間中は毎日、割り付けられた食品の摂取状況、有害事象、服薬した場合には医薬品名と使用量を試験日誌に記録するように指示した。また、試験以前の食事、飲酒、運動などの生活習慣を可能な限り変えないよう指示した。

試験食品の摂取期間は12週間とし、割り付けられた食品を1日1回3粒、夕食後30分以内にコップ1杯の水またはぬるま湯とともに摂取するよう指示した。

所定の研究スケジュールおよび検査内容をすべて終了した被験者のうち、以下の基準に該当する被験者を有効性解析対象者から除外した。①試験食品の摂取率が80%を下回った者、②組入れ後、除外基準に該当する事案が発生した者、③研究期間中、生活環境等に大きな変化があったと判断された者、④その他、除外することが適当と考えられる明らかな理由があった者

#### 5.2.4 評価項目

以下の項目について、試験食品摂取前(0週)および摂取期間6、12週目に

評価を行った。

#### 5.2.4.1 JKOM (VAS 含む)

日本整形外科学会および日本運動器リハビリテーション学会が作成したもので、変形性膝関節症患者機能評価尺度として使用されている。「I 膝の痛みの程度」は 100 mm スケールの VAS 法が用いられている。横直線の左端に「痛みなし」、右端に「これまでに経験した最も激しい痛み」と設定し、それに×印を入れることで現在の主観的な膝の痛みの程度を表すものであり、左端から×印までの距離を mm 単位で測定した。下位スコアである「II 膝の痛み・こわばり (8 個)」、「III 日常生活の状態 (10 個)」、「IV ふだんの活動など (5 個)」、「V 健康状態について (2 個)」は合計 25 個の質問からなり、被験者が主観で各質問に対し、最も軽症の選択肢には 0 点、最も重症の選択肢には 4 点、中間の選択肢には症状の重症度に応じてそれぞれ 1、2、3 点のスコアを与えた。つまり、合計スコアは 0 から 100 点で表され、スコアが高い程、膝関節の痛みやこわばりが強く、生活の質 (QOL) が低いと判断した。なお、病者は 46 点以上とされている。VAS および合計スコアに加え、質問 1-8 の合計スコアを痛みスコア、質問 9-25 の合計スコアを QOL スコアとして評価した。

さらに 各群における 6 週目と 12 週目における変化量を、摂取前 (0 週) の値から算出したスコアによって評価した。厚生労働省が平成 21 年 3 月に発行した「運動器の機能向上マニュアル (改訂版)」において、運動器の機能向上に関するプログラムの効果の判定には JKOM を用い、プログラム前後でスコアが 1 点以上減少したことを以て改善したと見なすことを、暫定的な評価方法とした<sup>51)</sup>。本指針に基づき、VAS を含む JKOM は摂取前から各時点までのスコア変化量を評価項目とした。

#### 5.2.4.2 JOA

日本整形外科学会が膝疾患治療成績判定基準 (JOA) として提唱したものである。特に変形性膝関節症患者における機能評価として広く使用されてきた。JKOM は被験者の主観的な評価であるのに対し、JOA は試験責任医師の問診によって評価されるもので、下位スコアである「I 疼痛・歩行能力 (0~30

点)」、「II 疼痛・階段昇降能力 (0~25 点)」、「III 屈曲角度および強直・高度拘縮 (0~35 点)」、「IV 腫脹 (0~10 点)」の項目から成る。合計スコア (0~100 点) が低い程、膝関節機能が低いと判断され、病者は 70 点未満となる。合計スコアに加え、I-IVの各下位スコアを評価した。

#### 5.2.4.3 ROM

ROM (range of motion) はゴニオメーターを用い、膝関節の屈曲角度および伸展角度を測定する評価方法である。膝関節に傷害などが起こらず、生理的に運動することができる範囲 (角度) のことを示す。計測は 5 度刻みで行った。代表的な関節運動の可動域は膝の屈曲で 0-130 度、伸展は 0 度である。

#### 5.2.4.4 高感度 CRP

血中の炎症性成分であり、体内で何らかの炎症が起きている場合に上昇する。通常の血中 CRP (C-reactive protein) 検査では 0.3 mg/dL を下限として検出されるが、高感度 CRP 検査では正常値である 0.01-1.0 mg/dL の範囲を測定することができ、軽微な炎症も客観的に把握することができる。

高感度 CRP を除く各評価では介入前の時点で、評価の悪い方の膝を対象膝とした。

#### 5.2.5 安全性評価項目

試験食品の安全性と被験者の健康状態を把握するため、来院検査の試験の際に血液検査、尿検査、身体検査を実施した。

血液検査では白血球数、赤血球数、Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC、血小板数、HbA1c、総蛋白、アルブミン、A/G 比、AST、ALT、LDH、ALP、 $\gamma$ GTP、総ビリルビン、クレアチニン、尿素窒素、尿酸、CPK、総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、中性脂肪、リン脂質、Na、K、Cl、Fe、空腹時血糖を測定した。尿検査においては蛋白、糖、ウロビリノーゲン、潜血 (いずれも定性) と比重、pH (いずれも定量) を測定した。身体検査は身長 (組入れ時のみ)、体重、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧、脈拍数を測定した。

## 5.2.6 研究スケジュールおよび検査内容

研究スケジュールを Table 5-1 に示す。

医師による診察および検査はスクリーニング時、試験食品摂取開始時（0 週）、試験食品摂取 6 週、試験食品摂取終了時（12 週）の合計 4 回行った。なお、来院時検査が医療機関・被験者等の都合により所定の検査日に行えない場合、試験責任医師の判断により所定の検査日から前後 3 日間の範囲で検査日を変更した。検査日が遅れる場合は検査前日まで試験食品を摂取させた。

## 5.2.7 統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。男女比については $\chi^2$ 二乗検定を行った。各検査値および VAS、JKOM 合計スコア、JKOM 下位スコアにおける変化量については Shapiro-Wilk test によって正規性を検討した。正規分布ではないとは言えないものについては F 検定により等分散性を検討した。等分散性が仮定されたものについて、Student's t-test を使用して群間比較を行った。一方、正規分布でなかったものについては Mann-Whitney U Test を使用して群間比較を行った。なお、検定の有意水準は 5% とし、欠測値の補完は行わなかった。

## 5.3 試験結果

### 5.3.1 解析対象者

被験者背景を Table 5-2 に示す。

被験者として男性 14 名、女性 28 名、合計 42 名を選択した。

有効性解析対象者数は除外基準に抵触した 4 名を除いた 38 名とした。除外理由は大腿骨頸部骨折による同意撤回（1 名）、定期的な鎮痛剤服用（2 名）、生活習慣の変更（1 名）である。その他、個人的な都合により 12 週の来院が不可となった 1 名については除外しないものの、介入前および 6 週のデータのみを解析対象とした。

安全性解析対象症例数は骨折を理由とした同意撤回（1 名）を除く、41 名とした。





Table 5-2. Subject Background.

	<b>pEPYP (n=19)</b>	<b>Placebo (n=19)</b>	<i>p</i>
<b>Gender Male/Female</b>	<b>8/11</b>	<b>5/14</b>	<b>0.31</b>
<b>Age</b>	<b>52.8 ± 6.6</b>	<b>51.8 ± 5.7</b>	<b>0.64</b>
<b>Body weight [kg]</b>	<b>68.0 ± 14.2</b>	<b>64.0 ± 10.5</b>	<b>0.33</b>

### 5.3.2 有効性の評価

Table 5-3 に有効性解析対象者の評価スコアを示した。

解析対象者は0週、6週においてpEPYP群19名、プラセボ群19名、12週においてpEPYP群18名、プラセボ群19名とした。

#### 5.3.2.1 JKOM(VAS含む)

VASおよび合計スコア、下位スコアにおいて、有意な群間差は認められなかった。

膝の痛みスコア変化量において、pEPYP群はプラセボ群と比べて有意に低値を示した(12週： $p=0.048$ )。

#### 5.3.2.2 JOA

合計スコアにおいて有意な群間差は認められなかった。

III 屈曲角度および強直・高度拘縮スコアにおいて、プラセボ群はpEPYP群と比べて有意に高値を示した(6週： $p=0.005$ 、12週： $p=0.040$ )。

#### 5.3.2.3 ROM

屈曲度において、プラセボ群はpEPYP群と比べて有意に高値を示した(6週： $p=0.045$ )。進展度において、有意な群間差は認められなかった。

#### 5.3.2.4 高感度CRP

有意な群間差は認められなかった。

Table 5-3. Evaluation score of efficacy analysis subjects.

		Test result			Changes in test values at each time point from pre-ingestion values		
		pEPYP group 0-6w : n=19 6-12w : n=18	Placebo group n=19	<i>p</i>	pEPYP group 0-6w : n=19 6-12w : n=18	Placebo group n=19	<i>p</i>
VAS(mm) I Degree of knee pain	0w	44.8 ± 15.5	45.5 ± 15.6	0.83	-		
	6w	24.8 ± 16.8	18.3 ± 10.0	0.29	-20.1 ± 17.9	-28.6 ± 15.7	0.18
	12w	12.9 ± 8.7	15.5 ± 10.9	0.47	-30.8 ± 19.1	-30.0 ± 19.2	0.90
JKOM( II - V ) Total score (points)	0w	27.4 ± 12.2	24.5 ± 10.0	0.43	-		
	6w	18.5 ± 13.3	17.7 ± 8.6	0.92	-9.0 ± 9.1	-7.1 ± 5.3	0.46
	12w	14.3 ± 12.9	14.8 ± 9.1	0.28	-13.2 ± 10.0	-9.7 ± 7.2	0.22
JKOM Lower score (points) Total pain score II Question 1-8 Knee pain/stiffness	0w	8.6 ± 4.2	7.3 ± 2.6	0.58	-		
	6w	6.0 ± 4.6	5.4 ± 2.8	0.67	-2.7 ± 3.7	-1.9 ± 1.8	0.38
	12w	4.1 ± 4.1	4.7 ± 3.0	0.28	-4.6 ± 3.4	-2.6 ± 2.3	0.048
JKOM lower score (points) Total QOL score III Question 9-18 Conditions of daily life IV Questions 19-23 Daily activities, etc. V Question 24,25 Health status	0w	18.8 ± 8.3	17.2 ± 7.8	0.51	-		
	6w	12.5 ± 8.9	12.3 ± 6.0	0.64	-6.3 ± 5.5	-5.0 ± 4.5	0.43
	12w	10.2 ± 9.1	10.2 ± 6.4	0.68	-8.7 ± 6.9	-7.1 ± 5.7	0.44
JOA total score (points)	0w	84.2 ± 6.9	86.3 ± 8.1	0.31			
	6w	85.5 ± 6.4	88.9 ± 5.9	0.068			
	12w	88.9 ± 7.2	90.5 ± 6.9	0.34			
JOA subordinate score (points) I Pain/Walkability	0w	26.3 ± 2.8	27.9 ± 2.5	0.086			
	6w	26.8 ± 3.0	27.9 ± 2.5	0.28			
	12w	27.5 ± 3.1	28.4 ± 2.4	0.37			
JOA subordinate score (points) II Pain/Ability to climb stairs	0w	17.6 ± 4.5	17.4 ± 4.5	0.77			
	6w	18.4 ± 3.7	17.6 ± 4.2	0.57			
	12w	19.7 ± 2.7	18.4 ± 3.8	0.33			
JOA subordinate score (points) III Flexion angle and ankylosis/severe contracture	0w	30.3 ± 3.5	31.6 ± 2.9	0.22			
	6w	30.3 ± 3.5	33.4 ± 2.4	0.005			
	12w	31.7 ± 3.4	33.7 ± 2.8	0.040			
JOA subordinate score (points) IV Swelling	0w	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	1.0			
	6w	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	1.0			
	12w	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	1.0			
ROM : bending degree (degree)	0w	127.6 ± 7.7	130.0 ± 9.6	0.16			
	6w	132.6 ± 8.9	137.6 ± 7.5	0.045			
	12w	135.0 ± 9.1	137.1 ± 7.5	0.49			
ROM : extensibility (degrees)	0w	-5.3 ± 6.6	-2.9 ± 4.2	0.23			
	6w	-2.6 ± 3.9	-2.1 ± 3.0	0.75			
	12w	-1.4 ± 2.9	-0.8 ± 1.9	0.58			
High-sensitivity CRP (mg/dL)	0w	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.22			
	6w	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.3	0.77			
	12w	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.19			

### 5.3.3 有効性追加解析

JKOM；痛みスコア変化量において、pEPYP 群はプラセボ群と比べて有意に低値を示した。そこで、試験食品摂取開始前の痛み・こわばりや QOL 状況の違いによる膝関節状態への影響の違いを検討するために、0 週時の JKOM 合計スコアの平均値 26 点をもとに 2 層に分け、層別解析を実施した。

#### [層別解析]

JKOM 合計スコア 26 点未満の集団の解析対象者は pEPYP 群 10 名、プラセボ群 10 名とした。JKOM 合計スコア 26 点以上の集団の解析対象者は pEPYP 群 8 名、プラセボ群 9 名とした。なお、Figure 5-1、2、3 は 95 %信頼区間をバーで示しており、重なり具合を視覚的に示すことで各群の効果の違いを検討することができる。図の見方を説明する。① JKOM 合計スコア 26 点未満の集団は比較的痛みが弱かった者（各図上段）、26 以上の集団は比較的痛みが強かった者（各図下段）とした。② 縦の 0 のラインよりも左にバーが分布する程、改善効果があることを示す。③ バーの重なる部分が長い程、pEPYP 摂取の効果がないことを表している。

Figure 5-1 に JKOM 合計スコアの変化量における 95 %信頼区間を示す。JKOM 合計スコア 26 点未満の集団の合計スコアの変化量において、pEPYP 群はプラセボ群と比べて有意に低値を示した。

Figure 5-2 に JKOM 痛みスコア変化量における 95 %信頼区間を示す。JKOM 合計スコア 26 点未満の集団の痛みスコア変化量において、pEPYP 群はプラセボ群と比べて有意に低値を示した。

Figure 5-3 に JKOM QOL スコア変化量における 95 %信頼区間を示す。JKOM 合計スコア 26 点未満の集団の QOL スコア変化量において、pEPYP 群はプラセボ群と比べて有意に低値を示した。

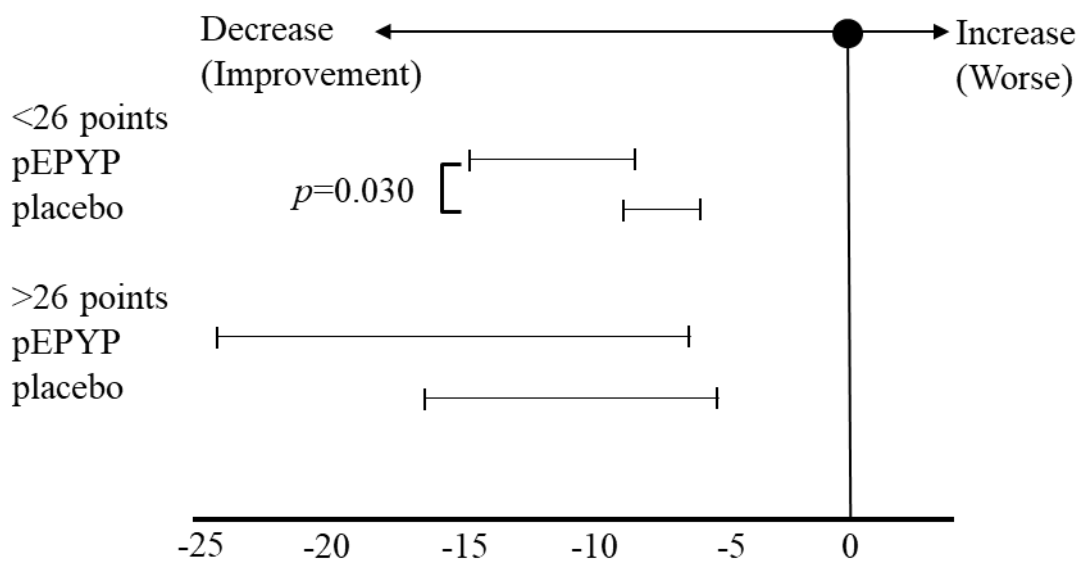


Figure 5-1. 95% confidence interval of JKOM total score change in stratified analysis (12 w).

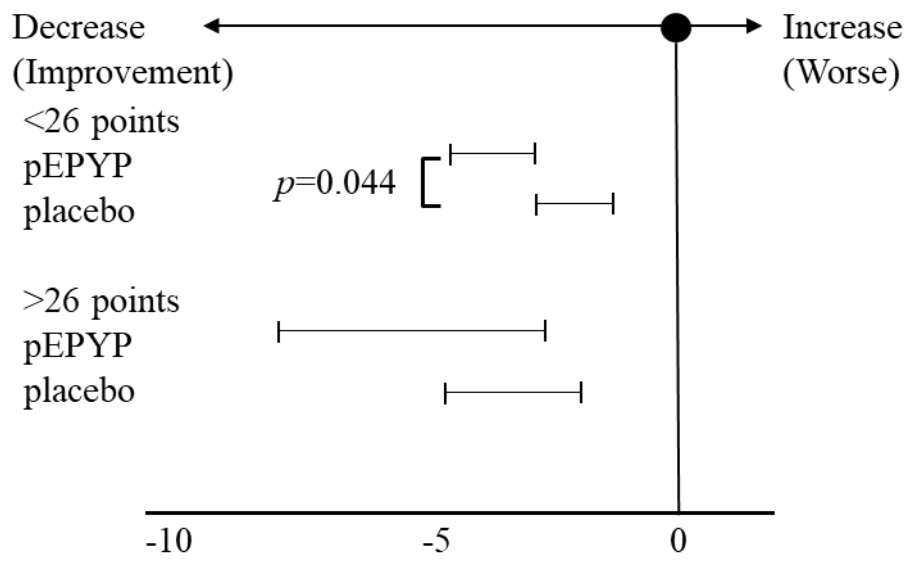


Figure 5-2. 95% confidence interval of JKOM pain score change in stratified analysis (12 w).

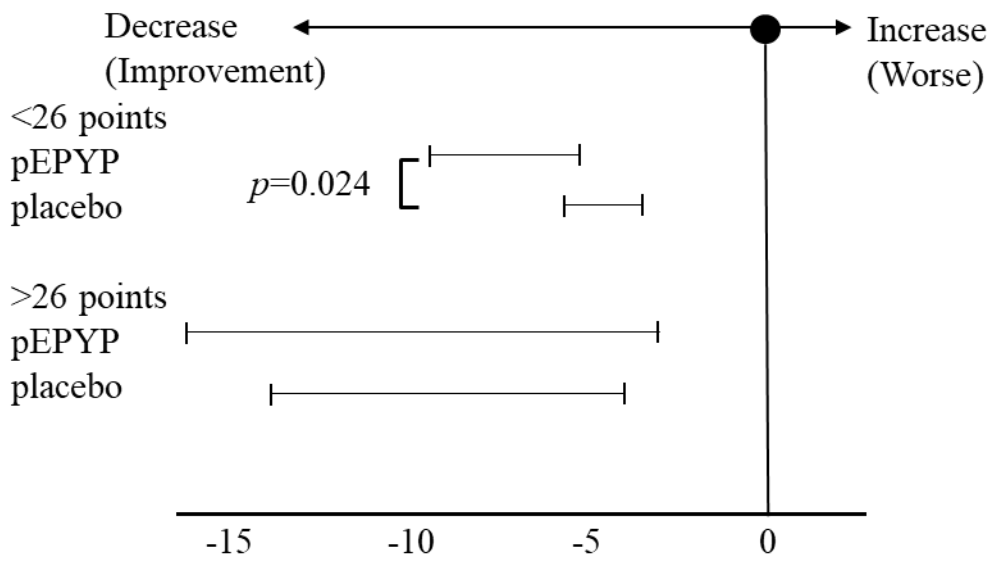


Figure 5-3. 95% confidence interval of JKOM QOL score change in stratified analysis (12 w).



#### 5.3.4 安全性の評価

研究期間中の自覚症状の訴えや他覚所見によって観察された有害事象は pEPYP 群（20 名）に 4 名で 16 件、プラセボ群（21 名）に 4 名で 9 件だった（発生頻度はそれぞれ 20% および 19%）。なお、有害事象とは胃部不快感、急性腰痛症、歯周病、湿疹、生理痛、頭痛などであった。いずれの有害事象も一過性の軽症であり、試験食品とは全て無関係であると試験責任医師によって判定された。また、血液検査、尿検査ならびに身体検査において臨床上問題となる変化は認められなかった。

#### 5.4 考察

膝関節に痛みや違和感のある 40 歳から 69 歳の健常な男女に、pEPYP 食を 12 週間連続摂取させた際の VAS を含む JKOM および JOA、ROM、高感度 CRP に対する影響について、プラセボを control として比較検討した。その結果、JKOM の痛み・こわばりに関するスコアにおいて、pEPYP 群はプラセボ群と比べて有意に改善した。さらに層別解析では本試験の被験者の中で痛み・こわばりの程度が軽い被験者層において、pEPYP 群はプラセボ群と比べて JKOM の合計スコアおよび痛み・こわばりスコア、QOL スコアが有意に改善した。

JKOM は重症度に応じて有意に高値を示すことから、変形性膝関節症重症度を反映する臨床的に有用な尺度となる可能性が報告されている<sup>52)</sup>。従って、pEPYP は変形性関節症に関連して起こる膝関節の痛み・こわばりを軽減させる効果を有する可能性が示唆された。特に健常人の中でも痛み・こわばりを感じながらも程度が比較的軽い人に対して、より高い効果が得られることが示された。

膝関節に関するトラブルは炎症が引き金となっている<sup>53)</sup>。また、ヒトの体内では常に骨の合成と分解が行われており、バランスが崩れた時に浮腫や痛みが発生する<sup>54)</sup>。何らかのきっかけで膝関節が炎症状態となって炎症性サイトカインが多く生成された場合に、軟骨分解酵素の生成も盛んになる。第 3 章で述べた通り、pEPYP は細胞実験において、軟骨分解抑制作用および抗炎症作用を有

することが示唆された。また第4章で述べた通り、CIAモデルラットにおいてpEPYP投与はリウマチの初期症状である浮腫を抑制する可能性が示唆された。従って、これらの機能が本試験での膝関節における痛み・こわばり軽減の作用機序の1つとなっていると考えられた。

痛み・こわばりの原因物質はプロスタグランジン E2 (Prostaglandin E2、PGE2) などの生理活性物質である。PGE2 は以下のようにして生成される。様々な免疫細胞より放出される炎症性サイトカインはマクロファージを刺激し、マクロファージがシクロオキシゲナーゼ2 (Cyclooxygenase、COX2) を放出する。体内のアラキドン酸は COX2 によって分解され、PGE2 が生成される。つまり、COX2 の生成および放出が抑制されることによって痛み・こわばりが軽減される<sup>55, 56)</sup>。抗炎症性サイトカインである IL-10 はマクロファージの活性化を抑制して COX2 の生成および放出を抑制する<sup>57)</sup>。従って、第3章で述べた通り、pEPYP は IL-10 の産生を促進することでマクロファージの COX2 生成および放出を抑制し、PGE2 の発現が減少したことが膝関節の痛み・こわばりの軽減に寄与したと考えられた。

一方、JOA 屈曲角度スコアにおいて、プラセボ群は pEPYP 群に比べて有意に高値を示した (6、12 週目および層別解析における 6 週目)。JOA 屈曲角度スコアは、正座およびあぐらといった座位を基本とした膝の屈曲角度に重点を置いた尺度である。本試験では主観的指標である JKOM による評価と、客観的指標である JOA による評価に整合性がなかった。JOA スコアは医師が問診を行い評価するもので評価される側の主観は排除されることから、医師が点数を付けることによる正確性の問題が挙げられている<sup>58)</sup>。また、JOA スコアは移動能力や膝関節可動域に重点を置いた尺度で、QOL および心理社会的評価を反映していない点、さらには各評価項目に割り当てられた点数の妥当性が検証されていない点が問題視されている<sup>58)</sup>。以上のことから、本試験においても同様の事象が問題として発現したと考えられた。

また、ROM 屈曲角度においてプラセボ群は pEPYP 群に比べて有意に高値を示した (6 週目)。ゴニオメーターを用いて計測する際は測定誤差が大きいこと

から、データの解釈には注意が必要であることが一般的に知られている。例えば、ゴニオメーターの計測値をリハビリ等の効果に関する判断材料とする際、有意差があると判断できる最小角度は 10 度であることが報告されている<sup>59)</sup>。ROM 屈曲角度において、統計学的な有意差が認められたものの、試験食品摂取前後の ROM の変化量は 10 度未満となったことから、ゴニオメーターの測定誤差範囲内であると考えられた。

pEPYP を摂取することにより膝関節の痛み・こわばりを軽減する作用機序について考察する。テトラペプチドである  $\beta$  ラクトリンをラットに経口投与した際、血中に移行し、脳に到達したことが報告されている<sup>60)</sup>。従って、テトラペプチドである pEPYP が経口摂取された場合においても、血中に入り、軟骨組織（細胞）に到達する可能性がある。つまり、第 2 章および第 3 章の研究結果から、経口摂取した pEPYP が血中に入り、軟骨細胞における MMP-13 の発現を抑制することが考えられる。また同様に、経口摂取した pEPYP は血中に存在する T 細胞に作用し、IL-10 の発現を促進することが考えられる。

## 5.5 小括

膝関節に痛みや違和感のある 40 歳から 69 歳の健常男女を対象とした無作為化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験の結果、pEPYP 含有食品摂取により、膝関節の痛み・こわばりを軽減させる効果が示唆された。また、膝関節の痛み・こわばりが軽度の被験者においては痛み・こわばりの軽減に加え、QOL の改善効果が示唆された。なお、本試験条件下では pEPYP 含有食品の安全性に問題はなかった。

以上の結果から、pEPYP を摂取することにより、日常生活における膝関節の痛みやこわばりの発生を予防あるいは改善させる効果が示唆された。

## 第6章 FBEに含まれる尿酸排出促進成分 pEP の抽出および同定

### 6.1 緒言

血清尿酸 (Uric Acid、UA) 溶解度の理論的境界値は 6.8 mg/dL である<sup>61)</sup>。血清 UA 値が 7.0 mg/dL を超えた場合、高尿酸血症と診断される<sup>62)</sup>。UA はプリン体の代謝産物である。肉や魚介類には高レベルのプリン体が含まれており、過剰に摂取すると高尿酸血症を引き起こす可能性がある<sup>63)</sup>。高尿酸血症が悪化し、不溶性の UA が血中に結晶化して (尿酸結晶)、関節に沈着して激しい痛みを引き起こすのが痛風である<sup>64)</sup>。

高尿酸血症の原因は UA 産生の増加、UA 排泄の減少、および2つの組み合わせの3つのタイプに分類できる<sup>65)</sup>。排泄される UA のうち、70%は腎臓から、残りの30%は腸管から排泄される<sup>66)</sup>。腎臓の主要な尿酸トランスポーターは urate transporter (URAT) 1、腸管の主要な尿酸トランスポーターは ATP binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2、BCRP)である<sup>67)</sup>。なお、ABCG2は腎臓でも発現している。痛風治療漢方薬である *Smilax glabra* Roxb.を UA 腎症のラットに投与すると、ABCG2 の発現が増加し、UA の排泄が促進されることが報告されている<sup>68)</sup>。

FBE-P は FBE を XAD 樹脂に吸着させ、1%水酸化ナトリウムで溶出させた後、脱塩処理して得られる。FBE-P を高尿酸血症モデルラットに投与すると UA の排泄が促進され、血清 UA 値が低下した<sup>21)</sup>。また、血清 UA 値 6.0–7.9 mg/dL のヒトに1日2gのFBE-Pを含む飲料を摂取させた結果、12週間後に試験群の血清 UA 値は  $0.21 \pm 0.56$  mg/dL 低下し、 $0.02 \pm 0.54$  mg/dL 増加したプラセボ群と比較して、有意な減少を示した<sup>22)</sup>。そこで、FBE-P に含まれる UA 排泄促進成分の探索を行い、特定することとした。

ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2 細胞) は腸管における ABCG2 の機能を研究するために広く使用されている<sup>69)</sup>。本章では Caco-2 細胞における ABCG2 遺伝子およびタンパク質発現に対する FBE-P 精製画分および化合物の作用を評価した。

## 6.2 実験方法

### 6.2.1 材料

第2章 2.2.1 材料で示した方法と同様に FBE-P20、40、60 を作製した。

GenScript Corp. に化学合成を依頼し、ジペプチドであるピログルタミルプロリン (pEP) の化学合成品を得た。なお、一般財団法人 日本食品分析センターにて NMR による純度測定を行った結果、pEP 純度は 99.2 % であることが判明した。

10 L の FBE を Amberlite FPX66TM カラムにアプライした後、吸着物質を 1 % (w/v) 水酸化ナトリウムで溶出させた<sup>20)</sup>。溶出画分を Amberlite IRC76 TM 水素型カラムにアプライし、溶出画分を FBE-P とした<sup>20)</sup>。FBE-P を真空ドラムドライヤーで乾燥して、粉末化した (FBE-P 粉末)。

### 6.2.2 HPLC による分取

1 g の FBE-P60 を 5 mL の超純水に溶解させて、HPLC Prominence システム (株式会社島津製作所) に供し、UV-VIS 検出器 (SPD-20A、島津製作所) にて検出させた。詳細な分析条件は Table 6-1 に示す。

さらに 50 mg の FBE-P60-4 を HPLC に供した。なお、上記の分析方法 (Table 6-1) と同様の条件で行ったが、Gradient 条件のみ、0–40 min. B conc : 10–15 % に変更して実施した。

各画分を減圧下で蒸発させて移動相を除去し、乾燥させた。HPLC に供する場合は乾燥物を超純水 1 mL によって再溶解させて、試験に使用した。

### 6.2.3 細胞培養

Caco-2 細胞は株式会社ケー・エー・シー (京都) から購入した。Caco-2 細胞は 10 % ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) および 1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific) を添加した DMEM (Sigma-Aldrich) によって培養した (37 °C、5 % CO<sub>2</sub>、増殖培地)。Caco-2 細胞は  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1 mL を播種した。細胞がコンフルエントに達した後、増殖用培地を吸引除去し、評価サンプルおよび 0.5 % ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) 、1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100×、

Table 6-1. Analysis conditions of HPLC.

---

Column	Phenomenex Synergy 4 $\mu$ m Hydro-RP 80A(ODS) 250 $\times$ 21.2 mm; Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA
Mobile phase	A : Water    B : Acetonitrile
Gradient	0-60 min. B conc:10-30 %
Flow rate	10 mL/min
Detection	210 nm

---

Thermo Fisher Scientific) を添加した DMEM (Sigma-Aldrich、評価試験用培地) を滴下した (培地交換)。細胞実験に使用するサンプルは全て PBS (-) に溶解させ、培地に添加した。培地中の PBS (-) の濃度は 10 %とした。FBE-P20、40、60 は培地中の終濃度が 2000 µg/mL、FBE-P60-1、2、3、4、5、6、7 は 100 µg/mL、FBE-P60-4-1、2、3、4、5、6 は 0.5 µg/mL となるように培地に添加した。培地は 24 時間ごとに新しい培地 (評価サンプルを含む) と交換しながら、5 日間培養した。

#### 6.2.4 リアルタイム PCR

第 2 章 2.2.4 リアルタイム PCR の項に記載の方法と同様に行った。内部標準は GAPDH とし、ABCG2 mRNA の相対発現量を求めた。使用したプライマーの配列を以下に示す。GAPDH Fw : 5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CGG A-3'、GAPDH Rv : 5'-GAG GGA TCT CGC TCC TGG AAG A-3'、ABCG2 Fw : 5'-CAG GTG GAG GCA AAT CTT CGT-3'、ABCG2 Rv : 5'-ACC CTG TT A ATC CGT TCG TTT T-3'とした。

#### 6.2.5 LC-MS による同定

ABCG2 発現促進物質 1 mg を 300 µL の超純水に溶解して調製し、LC-MS/MS (ACQUITY UPLC システム、Waters Corporation) 分析に供した。詳細な分析条件は Table 6-2 に示す。

#### 6.2.6 NMR による同定

ABCG2 発現促進物質 1 mg を 700 µL の Deuterium oxide (99.8 %、フジフィルム和光純薬工業(株)、大阪)に溶解して調製し、AVANCE NEO 600 型 (ブルカージャパン株式会社、神奈川) を用い、NMR 分析に供した。詳細な分析条件は Table 6-2 に示す。

同様に、化学合成された pEP (純度 93 %、GenScript Corp.) も NMR 分析を行った。

#### 6.2.7 LC-MS/MS による pEP 濃度定量

化学合成された pEP (純度 93 %、GenScript Corp.) を標準品として使用した。10 mg の pEP 標準品を正確に量り、水に溶解し、100 mL (100 mg/L) に希

積した。標準原液 1 mL を採取し、水で 100 mL (1 mg/L) に希釈し、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625 mg/L の測定用標準溶液を調製した。

FBE-P 粉末 0.15 g を正確に量り、50 mL メスフラスコに入れた。25 mL の水を加え、5 分間超音波処理して粉末を溶解させた。水で 50 mL に定容し、0.2 μm のフィルターでろ過し、希釈して試験液とした。

LC-MS 分析装置 LCMS-8050 (島津製作所) に標準液および試験液を供した。詳細な分析条件を Table 6-3 に示す。

標準液中の pEP の保持時間に対応する試験液中のピークを pEP とし、サンプル中の pEP 濃度(g/100 g)を求めた。

#### 6.2.8 統計解析

第 2 章 2.2.6 統計解析の項に記載の方法と同様に行った。



Table 6-2. Analysis conditions of LC-MS/MS and NMR.

【LC/MS】	
LC	
Eequipment	ACQUITY UPLC (Waters)
Column	Unison UK-C18 UP (2 mm×100 mm, Imtakt)
Solvent	A; 0.05 % formic acid-H <sub>2</sub> O B; 0.05 % formic acid-CH <sub>3</sub> CN
Gradient	B: 5 % (0 min) → 12.5 % (5 min) → 100 % (6-12 min)
Flow rate	0.4 ml/min
Column temperature	40 °C
MS	
Eequipment	Waters Synapt G2-S
Ionization Method	ESI
Measurement mode	Positive
【NMR】	
Eequipment	Liquid-phase cryoporometry NMR system (AVANCE NEO 600, Bruker Corporation, Billerica, MA, USA)
Measurement nucleus	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C
Measurement solvent	Heavy water
External reference	Trimethylsilylpropanoic acid (0 ppm)

Table 6-3. Analysis conditions of LC-MS.

<LC>	
Column	TSKgel ODS-100V, $\phi 2.0 \times 150$ mm, 3 $\mu$ m (TOSOH Corporation, Tokyo, Japan)
Solvent	A; 0.1 % formic acid-H <sub>2</sub> O B; 0.05 % formic acid-CH <sub>3</sub> CN
Gradient	B: 5 % (0 min.) $\rightarrow$ 10 % (5 -7 min.) $\rightarrow$ 95 % (7.5-12 min.)
Flow rate	0.25 mL/min
Column temperature	40 °C
<MS>	
Ionization Method	ESI
Scan mode	Multiple Reaction Monitoring
Measurement mode	Positive

## 6.3 実験結果

### 6.3.1 ABCG2 mRNA 発現促進成分を含む画分の特定

ABCG2 mRNA の発現促進成分を含む画分を特定するため、まずは Caco-2 細胞に FBE-P20、40、60 を添加し、リアルタイム PCR によって GAPDH mRNA に対する ABCG2 mRNA の相対発現量を求めた。その結果、FBE-P60 区では control 区および FBE-P20、40 区に比べ、ABCG2 mRNA 相対発現量が約 1.6 倍高く、有意に高値を示した [ $p < 0.05$ 、Figure 6-1 (A)]。

次に FBE-P60 を HPLC に供し、7つの画分 (FBE-P60-1、2、3、4、5、6、7) を分取した (Figure 6-2)。Caco-2 細胞にこれら 7つの分画物を添加し、リアルタイム PCR によって GAPDH mRNA に対する ABCG2 mRNA の相対発現量を求めた。その結果、FBE-P60-4 区は control 区およびその他の画分の試験区に比べ、ABCG2 mRNA の相対発現量が約 1.3 倍高く、有意に高値を示した [ $p < 0.05$ 、Figure 6-1 (B)]。

FBE-P60-4 を HPLC に供し、6つの画分 (FBE-P60-4-1、2、3、4、5、6) を分取した (Figure 6-3)。Caco-2 細胞にこれら 6つの分画物を添加し、リアルタイム PCR によって GAPDH mRNA に対する ABCG2 mRNA の相対発現量を求めた。その結果、FBE-P60-4-6 は control 区およびその他の画分の試験区に比べ、ABCG2 mRNA の相対発現量が約 1.1 倍高く、有意に高値を示した [ $p < 0.05$ 、Figure 6-1 (C)]。

FBE-P60-4-6 を再度 HPLC に供した結果、1つのピークのみ検出され、夾雑物は含まれなかった。以上の結果から、FBEP-60-4-6 は ABCG2 mRNA 発現促進成分であることが判明した。

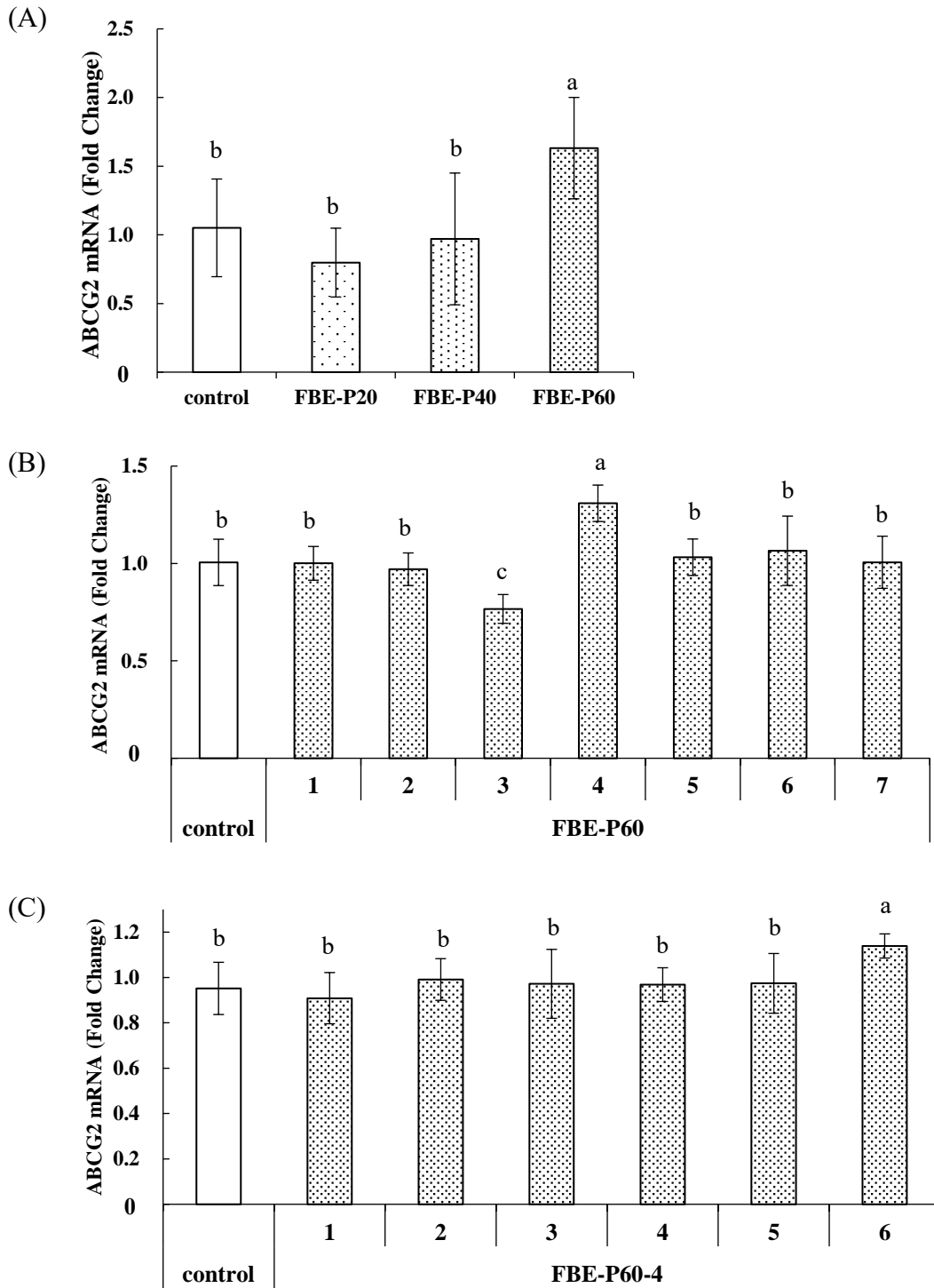


Figure 6-1. Results of ATP binding cassette subfamily G member (ABCG)-2 mRNA expression in Caco-2 cells.

The fraction (A), (B), and (C) dissolved in PBS (-) were added to the medium at final concentrations of 2 mg/mL, 100 µg/mL, and 0.5 µg/mL, and the final concentration of

PBS (-) in the medium was 10 % (v/v). Cells were cultured for 5 days, changing the medium every 24 h. The expression level of ABCG2 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. (A) shows the results of FBEP20, 40 and 60. (B) shows the results of FBEP60-1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7. (C) shows the results of FBEP60-4-1, 2, 3, 4, 5 and 6. Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) in each experiment.

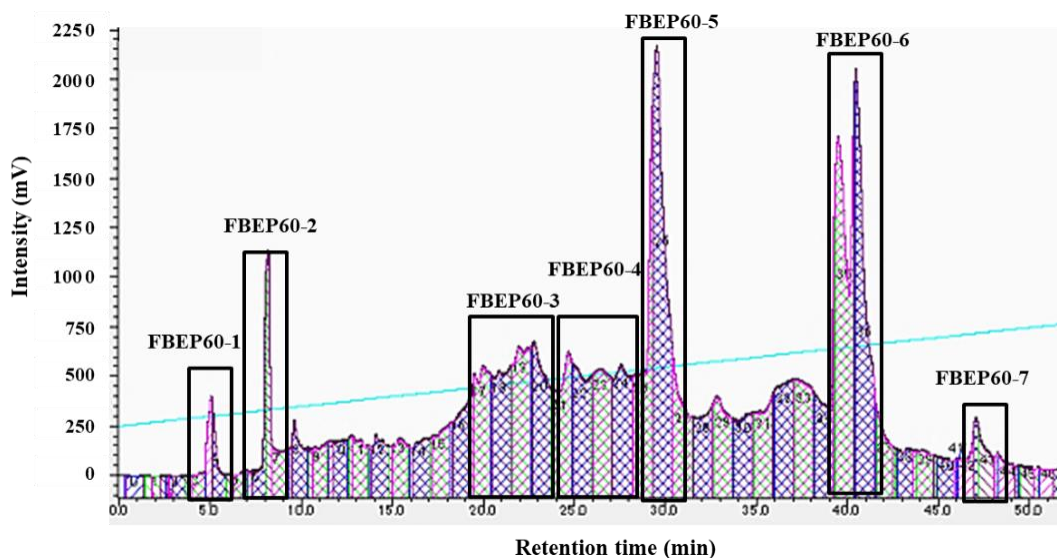


Figure 6-2. High-performance liquid chromatography (HPLC) chromatogram of FBE-P60.

FBE-P60 was subjected to HPLC. The mobile phase consisted of 0.1 % trifluoroacetic acid (A) and acetonitrile (B). Gradient elution was achieved with 10 % B, increasing to 30 % by 60 min. The flow rate was 10 mL/min and 1 g of FBE-P60 was injected. Purification was performed by UV absorbance detection at 210 nm. Seven fractions (FBEP60-1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7) were collected, as indicated by boxes.

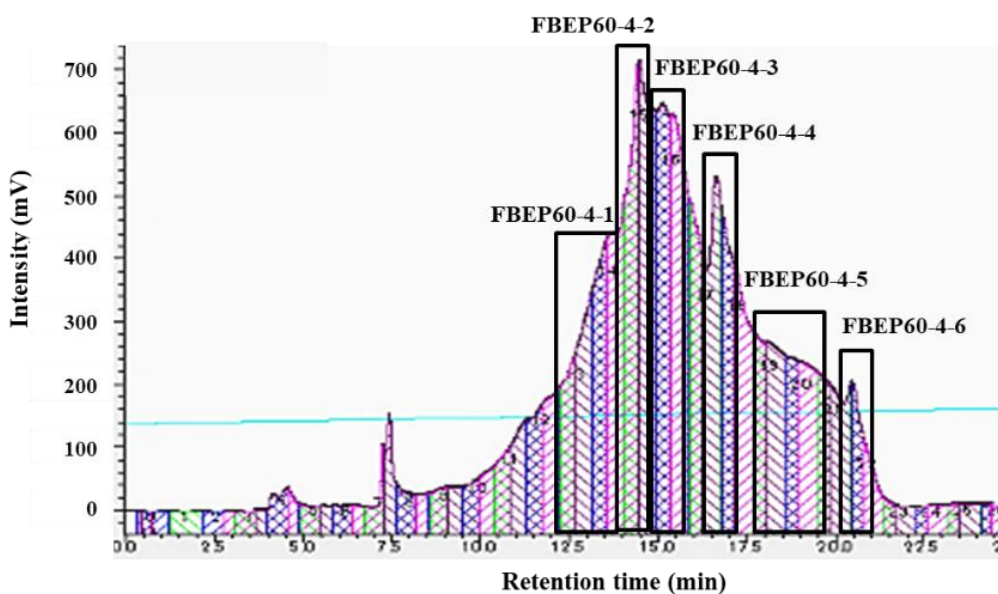


Figure 6-3. High-performance liquid chromatography (HPLC) chromatogram of FBEP60-4.

FBEP60-4 was subjected to HPLC. The mobile phase consisted of 0.1 % trifluoroacetic acid (A) and acetonitrile (B). Gradient elution was achieved with 10 % B, increasing to 15 % by 40 min. The flow rate was 10 mL/min and 50 mg of FBEP60-4 dissolved in 1 mL of ultrapure water was injected. Purification was performed by UV absorbance detection at 210 nm. Six fractions (FBEP60-4-1, 2, 3, 4, 5, and 6) were collected, as indicated by boxes.

### 6.3.2 ABCG2 mRNA 発現促進成分の分子量および構造決定

FBE-P60-4-6、つまり ABCG2 発現促進成分を LC-MS で分析した結果、質量スペクトルにより、 $(M+H)^+$  および  $(2M+H)^+$  値がそれぞれ 227.1037 および 453.1987 であることが明らかとなった (Figure 6-4)。プロダクトイオンスペクトル (Figure 6-5) から、プレカーサーイオンは 227.1032 であることが分かった。精密質量による組成推定を行った結果、分子量 226、組成式は  $C_{10}H_{14}N_2O_4$  で表されるピログルタミルプロリン (pEP、pyro-Glu-Pro) と考えて矛盾はないと考えられた。

次に LC-MS/MS によるプロダクトイオンスペクトルにあてはめて開裂を解析した結果についても、pEP と考えて矛盾はなかった。

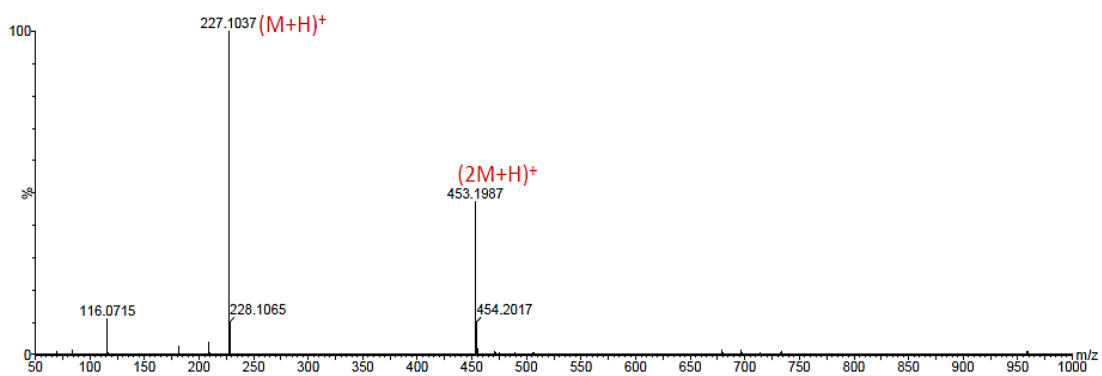
さらに推定した組成式をもとに、NMR 手法を用いて構造解析を行った結果、精製された ABCG2 発現促進成分は pEP と推定された。以下、 $^1H$  および  $^{13}C$  NMR スペクトルを Figure 6-6、6-7 に、COSY スペクトルを Figure 6-8 に、HSQC スペクトルを Figure 6-9 に、HMBC スペクトルを Figure 6-10 に示す。精製 ABCG2 発現促進単一化合物の推定構造を Figure 6-11 に示す。

化学合成品 pEP の NMR シグナル ( $^1H$  : Figure 6-12、 $^{13}C$  : Figure 6-13) を精製 pEP のシグナルと比較した結果、同様のシグナルであったことから、FBE-P に含まれる ABCG2 発現促進成分は pEP であると結論付けた。

### 6.3.3 FBE-P 粉末に含まれる pEP 濃度

食品素材として商品開発を行う際、素材に機能性関与成分の含有濃度は重要となる。食品素材として流通性が高い FBE-P 粉末に含まれる pEP 濃度を把握するため、分析を行った。FBE-P 粉末中の pEP の濃度を LC-MS/MS で分析した結果、0.6 g/100 g となった。





Tolerance = 2.0 mDa / DBE: min = -3.0, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

120 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-20 H: 0-20 N: 0-5 O: 0-10

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Conf (%)	Formula
227.1037	227.1032	0.5	2.2	4.5	n/a	<u>C10 H15 N2 O4</u>

Figure 6-4. Mass spectrum and composition result estimated by accurate mass of purified ATP binding cassette subfamily G member 2 expression-promoting single compound.

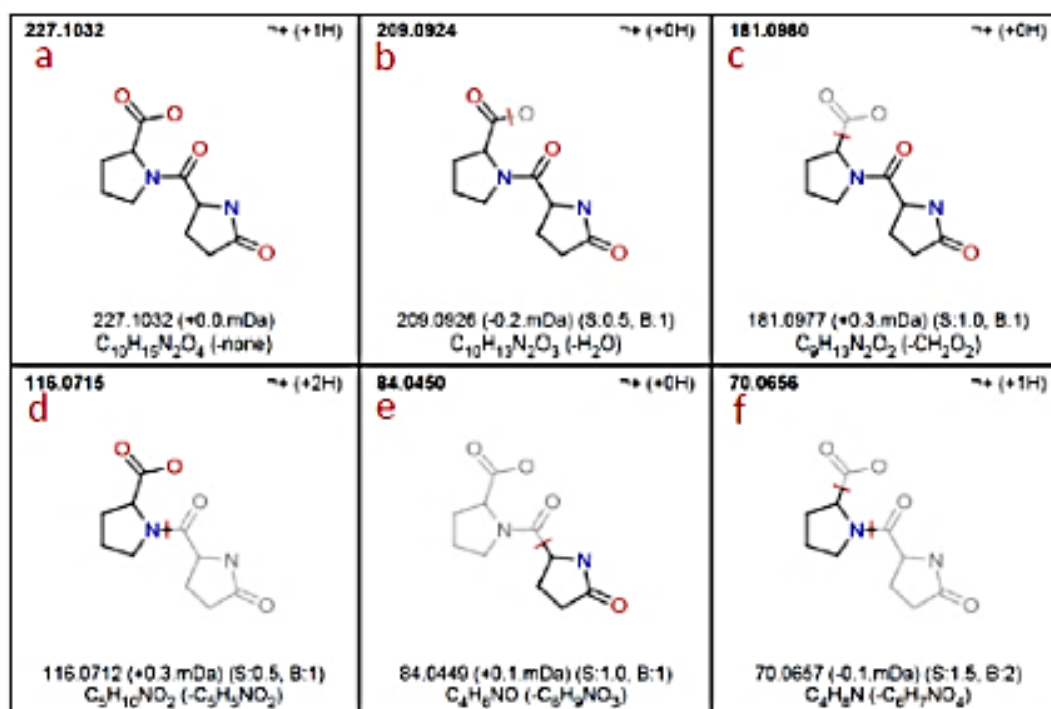
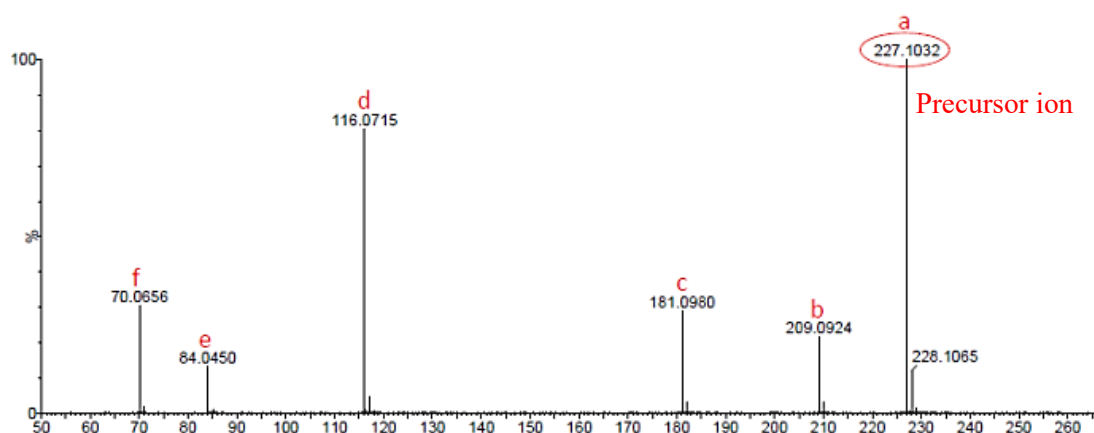
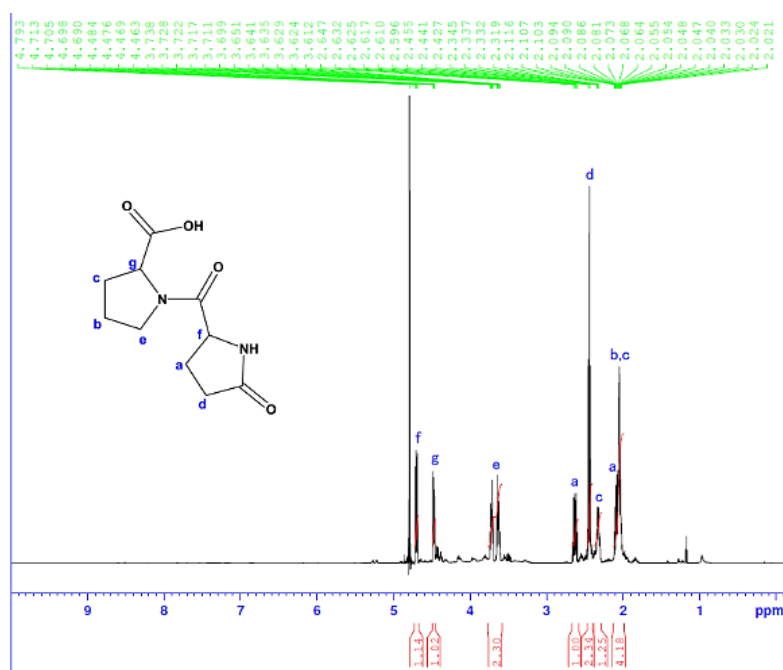


Figure 6-5. Product ion spectrum and putative cleavage of purified ATP binding cassette subfamily G member 2 expression-promoting single compound.

(A)



(B)

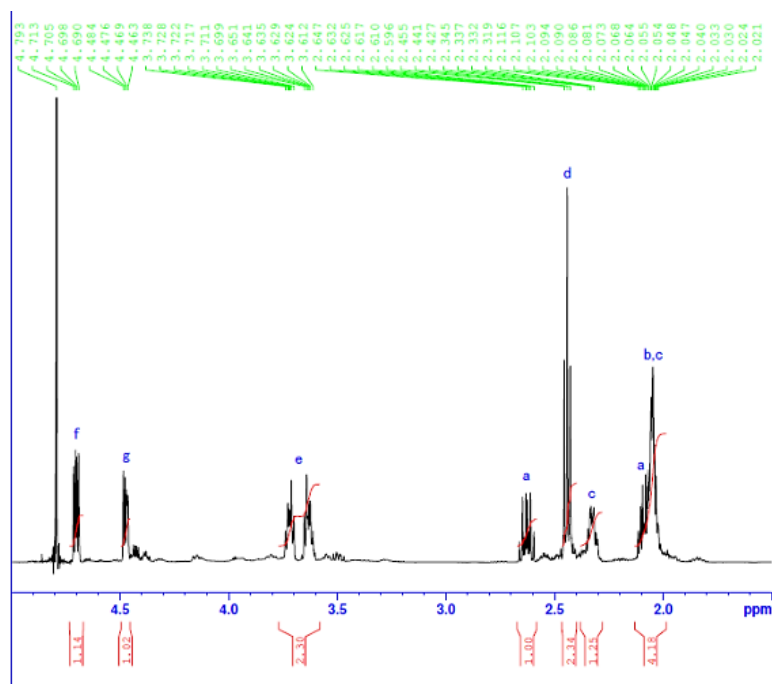


Figure 6-6. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of purified ATP binding cassette subfamily G member 2 expression-promoting single compound (A) and its enlarged view (B).

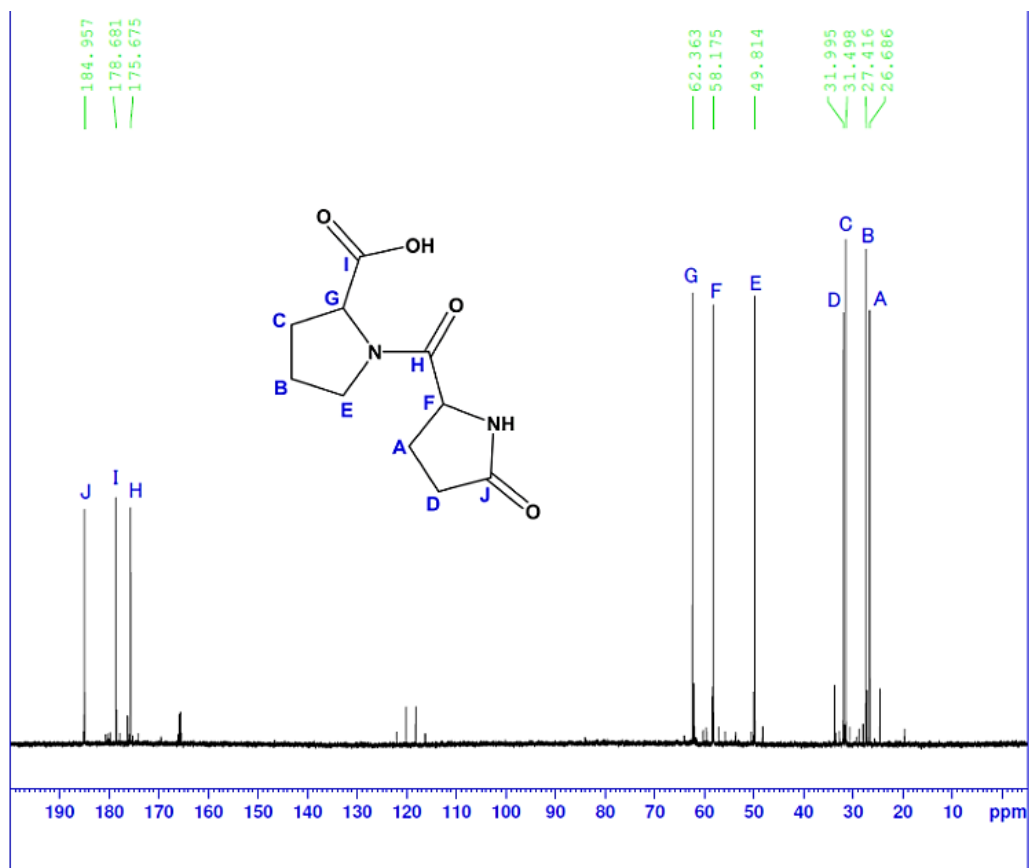


Figure 6-7. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of purified ATP binding cassette subfamily G member 2 expression-promoting single compound.

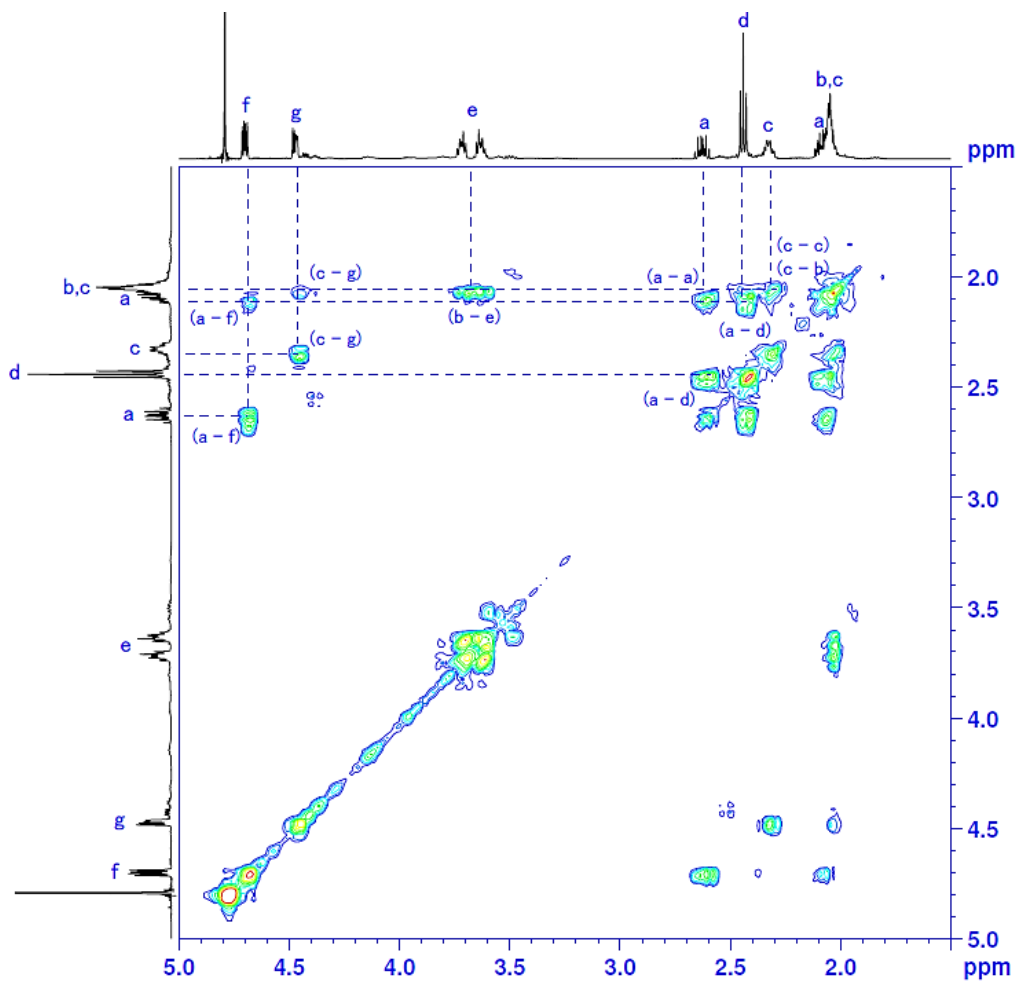
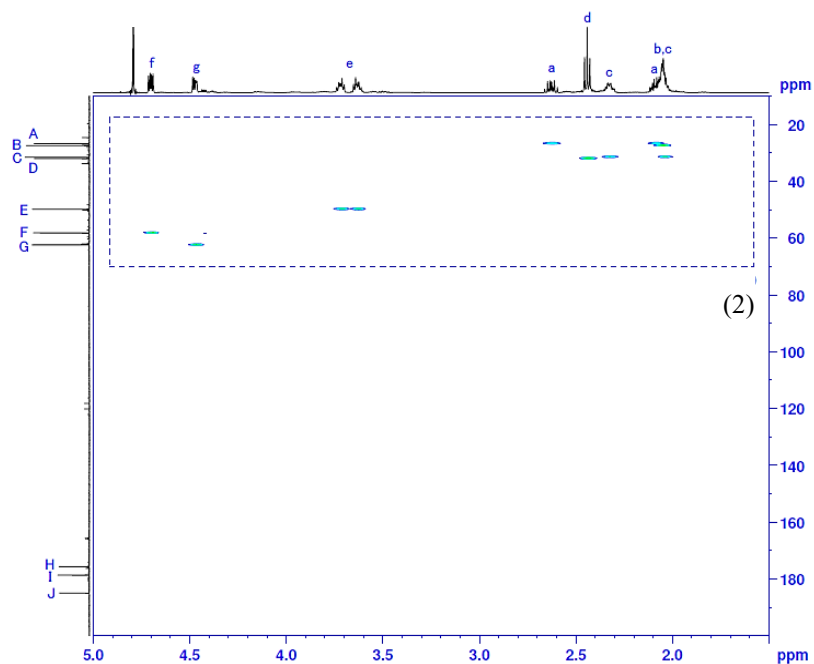


Figure 6-8. Cosy spectrum of purified ATP binding cassette subfamily G member 2 expression-promoting single compound.

(1)



(2)

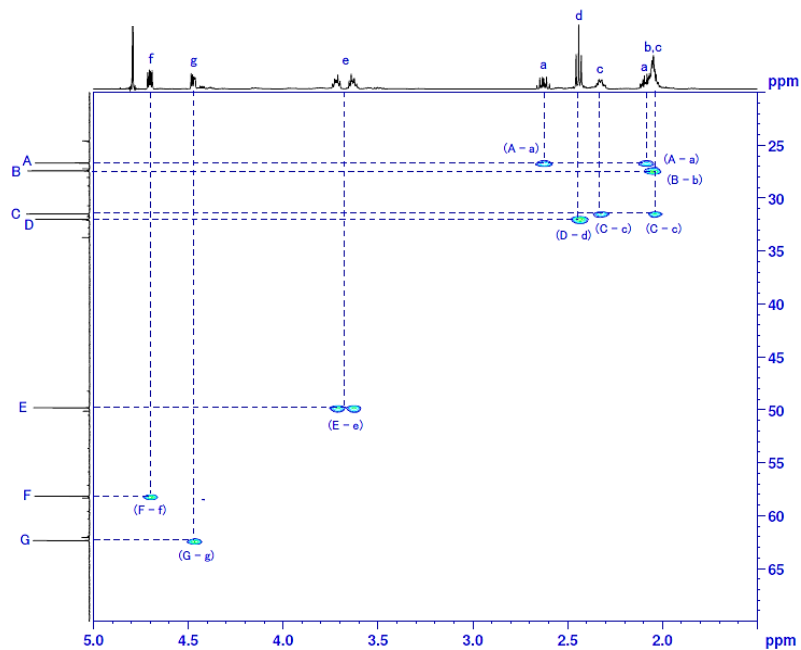


Figure 6-9. HSQC spectrum of purified ATP binding cassette subfamily G member 2 expression-promoting single compound (1) and enlarged view of (1) A–G (2).

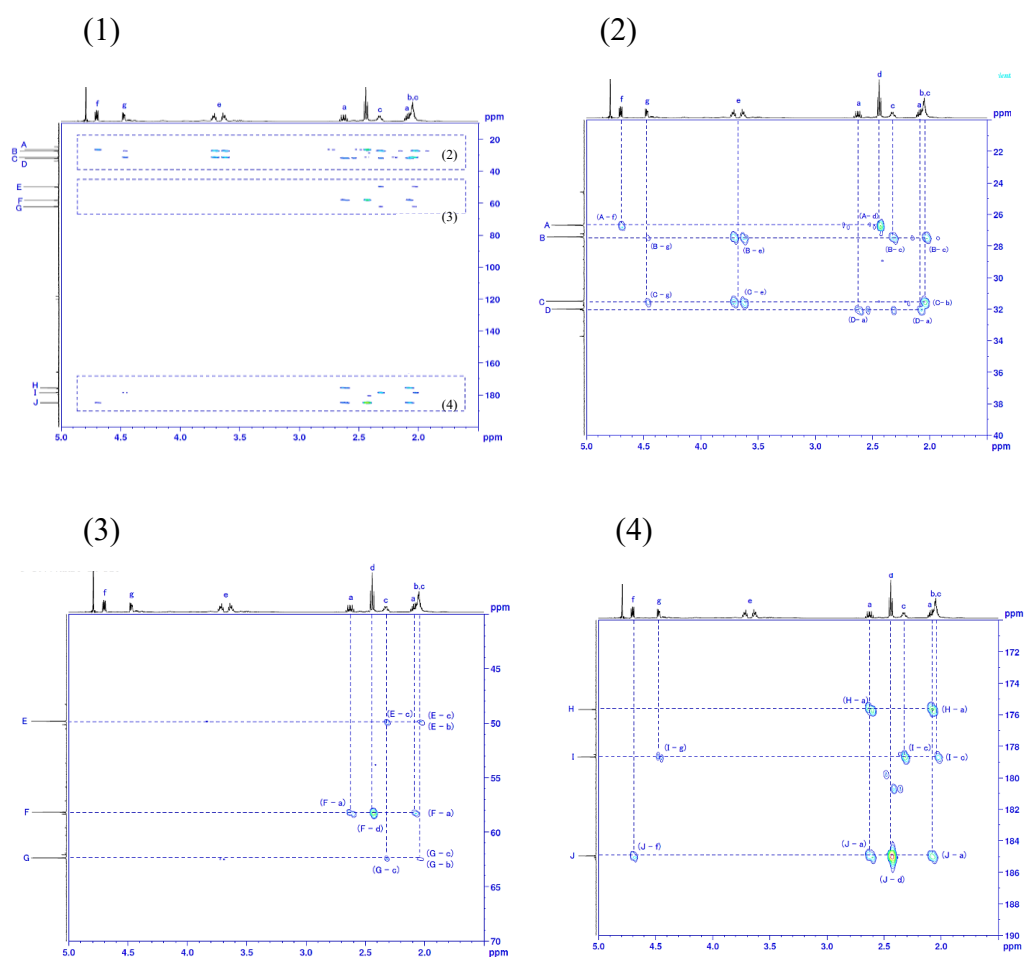


Figure 6-10. HMBC spectrum of purified ATP binding cassette subfamily G member 2 expression promoting single compound (1) and enlarged view of each site (2)–(4).

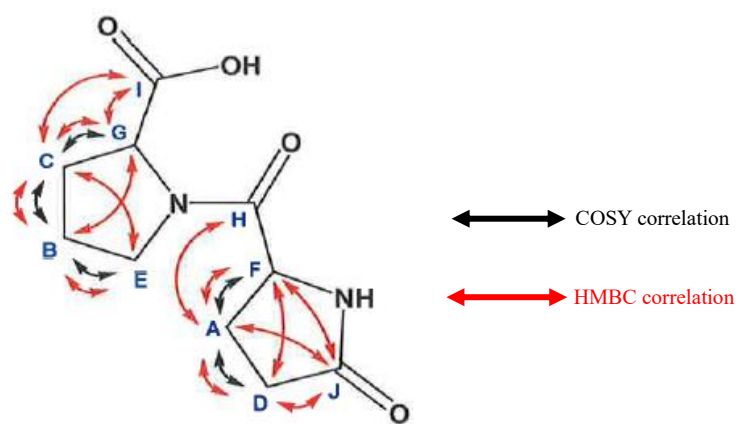
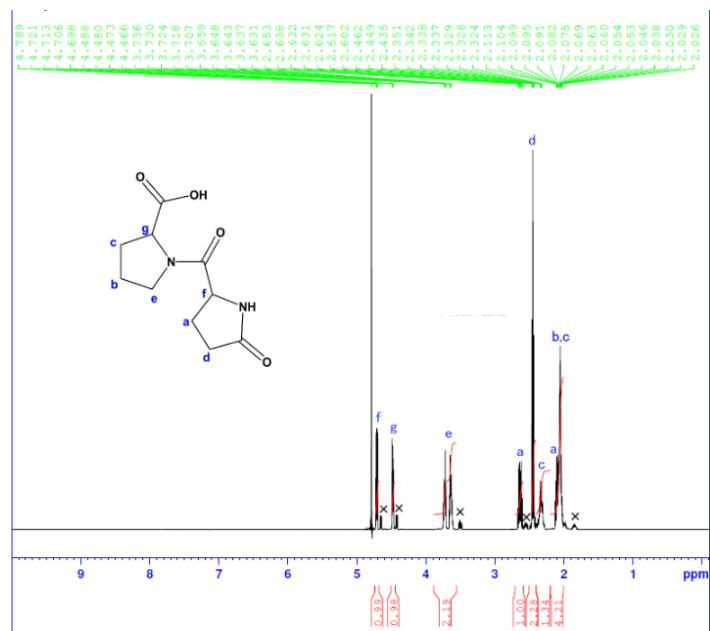


Figure 6-11. Putative structure of the purified ABCG2 expression-promoting single compound identified by nuclear magnetic resonance analysis.



(A)



(B)

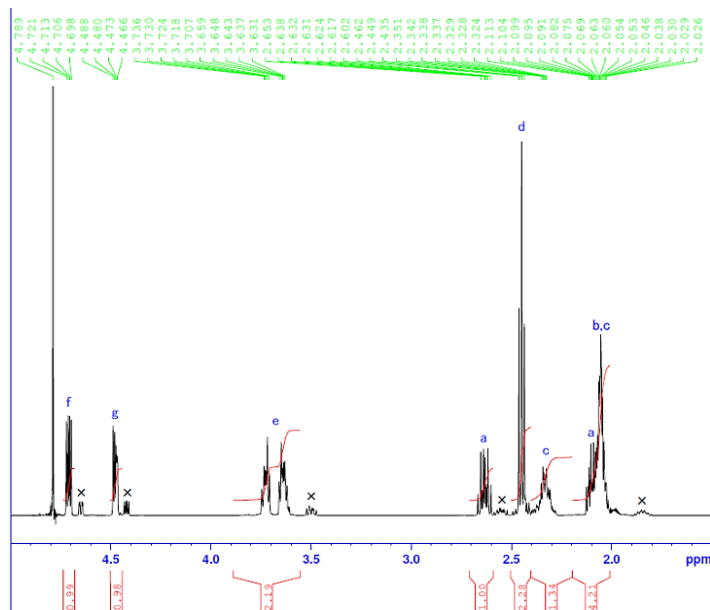


Figure 6-12. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of chemically synthesized pyroglutamylproline [pEP, (A)] and its enlarged view (B).

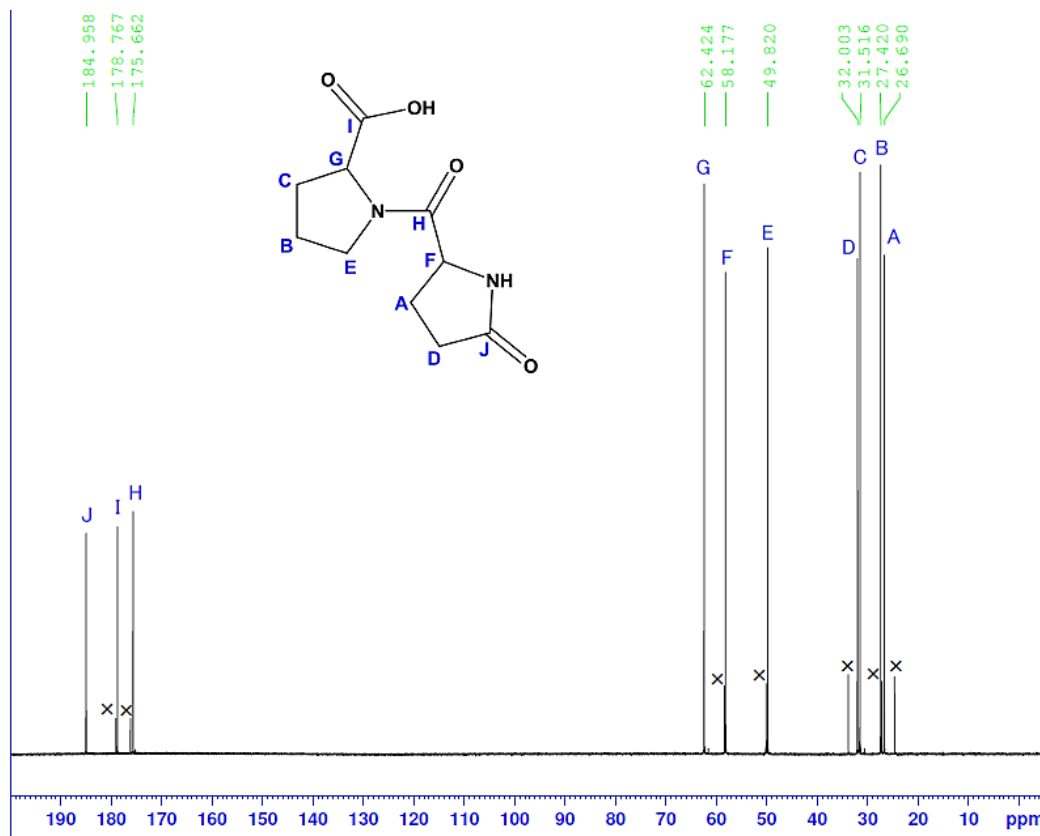


Figure 6-13.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of chemically synthesized pyroglutamylproline (pEP).

#### 6.4 考察

ABCG2 の発現を促進する画分を確定させるための細胞実験において、ABCG2 mRNA の相対発現量は(A) FBEP60; 1.631、(B) FBEP60-4; 1.309、(C) FBEP60-4-6; 1.139 であった。つまり、ABCG2 の発現促進効果は、分画が(A)から(B)、(B)から(C)に進むにつれて減少した。一方、細胞培養液に添加した(A) FBEP20、40、60、(B)および(C) HPLC 分画粉末の終濃度は(A) 2000  $\mu\text{g/mL}$ 、(B) 100  $\mu\text{g/mL}$ 、(C) 0.5  $\mu\text{g/mL}$  であった。つまり、精製度が増加するにつれて、細胞培養液に添加される各画分の量は減少した。その結果、精製度が高くなるほど、画分に含まれる ABCG2 発現促進成分の量が減少し、ABCG2 発現促進効果が低下したことが推測された。

FBE-P 摂取が血清 UA レベルを低下させることが報告されている<sup>22)</sup>。そこで本章では、UA の排泄機構の一つである ABCG2 の発現に与える影響を評価指標として、FBE-P に含まれる尿酸排泄促進物質のスクリーニングを行った。その結果、FBE-P 中の ABCG2 発現促進成分は pEP であり、FBE-P 粉末には 0.6% (w/w) の pEP が含まれていることが明らかとなった。pEP はピーナッツペプチドにおけるメイラード反応によって生成される化合物であり、強力な旨味を呈すことや旨味増強作用を有することが報告されている<sup>70)</sup>。また、pEP はマッシュルームタンパク質を加水分解した際に生成され、塩味を増強することも報告されている<sup>71)</sup>。しかし、pEP の生理学的機能に関する報告はない。

発酵食品に含まれるピログルタミルロイシン (pEL) を摂取した際、腸内で抗菌ペプチドを増加させることによって腸内環境を改善する<sup>72)</sup>。また、清酒において、19 種類のピログルタミルペプチドが発見および同定されており、特に pEL とピログルタミルグルタミン (pEQ) が豊富に含まれているという<sup>73)</sup>。酵母を接種したもろみでは pEL は生成されなかったが、蒸米を *Aspergillus oryzae* 由来プロテアーゼで消化させると、pEL 含有量が増加した<sup>73)</sup>。一方、本研究で使用した FBE-P は *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* 由来プロテアーゼによって消化された大麦焼酎粕の精製物である。つまり、pEP は pEL と同様に、大麦が麹菌プロテアーゼによって消化された際に生成される化合物である可能性が

ある。さらに第2章2.4 考察で述べた通り、pEPYPは大麦タンパク質であるホルデインが白麹菌由来プロテアーゼによって分解、加熱されて生成されると推測した。同様に考え、pEPのピログルタミル化する前の化合物QPの配列がホルデインに含まれているかを検討したところ、数多くのQP配列箇所が見られた。従って、pEPは大麦タンパク質であるホルデインが白麹菌由来プロテアーゼによって分解され、加熱されて生成されると推測するが、pEP生成メカニズムは今後の研究で調査する必要がある。

## 6.5 小括

FBE-Pの摂取により、血清尿酸値が低下することが報告されている<sup>22)</sup>。尿酸排泄機構の一つであるABCG2の発現量を評価指標として、FBE-P中の尿酸排泄促進物質を探索した。その結果、FBE-P中のABCG2発現促進成分はピログルタミルプロリンpEP (pyro-Glu-Pro、分子量226、分子式 $C_{10}H_{14}N_2O_4$ )であり、FBE-P粉末には0.6% (w/w)含まれていることが明らかとなった。

## 第7章 pEPの尿酸排出促進効果－細胞実験－

### 7.1 緒言

第6章にてFBE-Pに含まれる尿酸排泄促進成分はpEPであることが判明した。本章では、化学合成されたpEPがCaco-2細胞におけるABCG2 mRNAおよびタンパク質の発現に与える影響を検討した。なお、タンパク質の発現はウェスタンブロッティングおよび免疫蛍光染色法によって検討した。

### 7.2 実験方法

#### 7.2.1 材料

化学合成されたpEP(純度99.2%、GenScript Corp.)をPBS(-)に溶解させて、培地に添加した。培地中のPBS(-)濃度は10%とした。なお、pEP純度はNMRによって分析された結果である(詳細は第6章に記載)。

#### 7.2.2 細胞培養

Caco-2細胞(株式会社ケー・エー・シー)細胞は10%ウシ胎児血清(Sigma-Aldrich)および1% penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific)を添加したDMEM(Sigma-Aldrich、増殖用培地)によって培養した(37℃、5% CO<sub>2</sub>)。Caco-2細胞は細胞増殖試験用に $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の密度で96ウェルプレートに1ウェルあたり0.1 mLずつ播種した。mRNA分析とウェスタンブロッティング用に $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の密度で24ウェルプレートに1ウェルあたり1 mLずつ播種した。免疫蛍光染色用に $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の密度でLabtech II チャンバー スライド システム 154534JP(Thermo Fisher Scientific)に1ウェルあたり0.2 mLずつ播種した。細胞がコンフルエントに達した後、増殖用培地を吸引除去し、評価サンプルおよび0.5%ウシ胎児血清(Sigma-Aldrich)、1% penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific)を添加したDMEM(Sigma-Aldrich、評価試験用培地)を滴下した(培地交換)。培地交換は24時間ごとに行った。細胞増殖試験用およびmRNA分析用細胞は、毎日培地交換しながら5日間培養した後、評価した。ウェスタンブロッテ

イング用および免疫蛍光染色用細胞は、毎日培地交換しながら7日間培養した後、評価を行った。

### 7.2.3 細胞増殖試験

第3章 3.2.3 増殖試験の項に記載の方法と同様に行った。

### 7.2.4 リアルタイム PCR

第6章 6.2.4 リアルタイム PCR の項に記載の方法と同様に行った。

### 7.2.5 ウェスタンブロッティング

第3章 3.2.5 ウェスタンブロッティングの項に記載の方法と同様に実施した。

一次抗体は GAPDH polyclonal antibody 10494-1-AP (Proteintech Group Inc., Rosemont, IL, USA) と ABCG2 antibody (B-1): sc-377176 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を用いた。

ABCG2 タンパク質の発現量は GAPDH タンパク質の発現量に対する割合として求めた。

### 7.2.6 免疫蛍光染色

Labtech II チャンバー スライド システム 154534JP (Thermo Fisher Scientific) 上の Caco-2 細胞を 1% (v/v) ホルマリン液 [PBS (-)] で固定した (室温、10 分間)。PBS (-) で洗浄後、Blocking One Histo (ナカライテスク、大阪) でブロッキングした (室温、5 分間)。PBS (-) で洗浄した後、細胞を 0.5% Triton X-100 で透過処理した (室温、3 分間)。0.5% Triton X-100 を除去した後、ABCG2 一次抗体(B-1): sc-377176 (Santa Cruz Biotechnology) を 0.2 mL/well ずつ滴下し、室温で1時間反応させた。一次および二次抗体の濃度は製造元の指示に従った。Negative control は ABCG2 一次抗体の代わりに Blocking One Histo (ナカライテスク) と共にインキュベートした。PBS (-) で洗浄した後、全てのウェルに 0.2 mL/well となるよう、goat anti-mouse IgG (H + L) cross-adsorbed secondary antibody (Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific) を滴下してインキュベートした (室温、30 分間)。PBS (-) で洗浄した後、ガasket を除去し、細胞核の対比染色のために 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む

ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) で細胞をマウントした。細胞をカバーガラスで覆って一晩放置した後、蛍光顕微鏡 BX-53 (EVIDENT CORP.、東京) と imaging software Lumina Vision Ver.3.7.4.2 (MITANI CORP.、東京) によって、細胞を観察および撮影した。なお、蛍光観察時の光源は水銀ランプ OLUMPUS U-RFL-T、接眼レンズ WHN 10×-H/22、対物レンズ UPlanSApo 20×/0.75 を使用した。また、核を観察する際は励起フィルター BP360–370、吸収フィルターBA420–460、ABCG2 タンパク質を観察する際は励起フィルターBP470–495、吸収フィルターBA510–550 を使用した。

### 7.2.7 統計解析

第2章 2.2.6 統計解析の項に記載の方法と同様に行った。

## 7.3 実験結果

### 7.3.1 pEP が Caco-2 細胞の増殖に与える影響

Caco-2 細胞に 0.1–100 µg/mL の pEP を添加して培養した後、キットを用いて 450 nm の吸光度を測定した。control 区の数値で正規化し、細胞増殖率を求めた。その結果、0.1–100 µg/mL の pEP は control 区と同等の細胞増殖率となり、Caco-2 細胞の増殖に影響を与えなかった(Figure 7-1)。

### 7.3.2 pEP が Caco-2 細胞における ABCG2 mRNA 発現に与える影響

Caco-2 細胞に 0.1–10 µg/mL の pEP を添加して培養した後、リアルタイム PCR によって GAPDH mRNA に対する ABCG2 mRNA の相対発現量を求めた。その結果、1 µg/mL 以上の pEP は ABCG2 mRNA 相対発現量を有意に増加させた ( $p < 0.05$ 、Figure 7-2)。

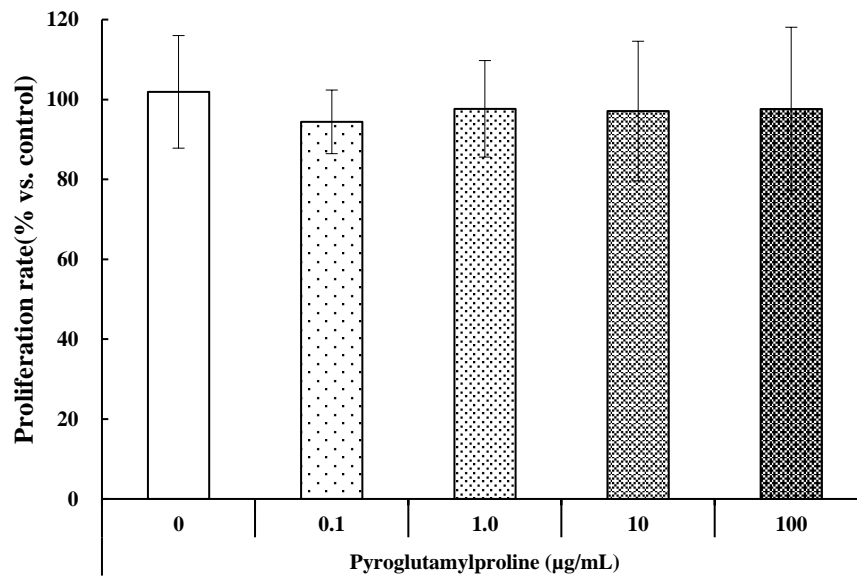


Figure 7-1. Effects of pyroglutamylproline (pEP) on Caco-2 cell proliferation.

Cells were cultured for 5 days with 0.1–100 µg/mL pEP, changing the medium every 24 h. Absorbance at 450 nm was measured using a commercial kit, normalized to the control and quantified. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments.



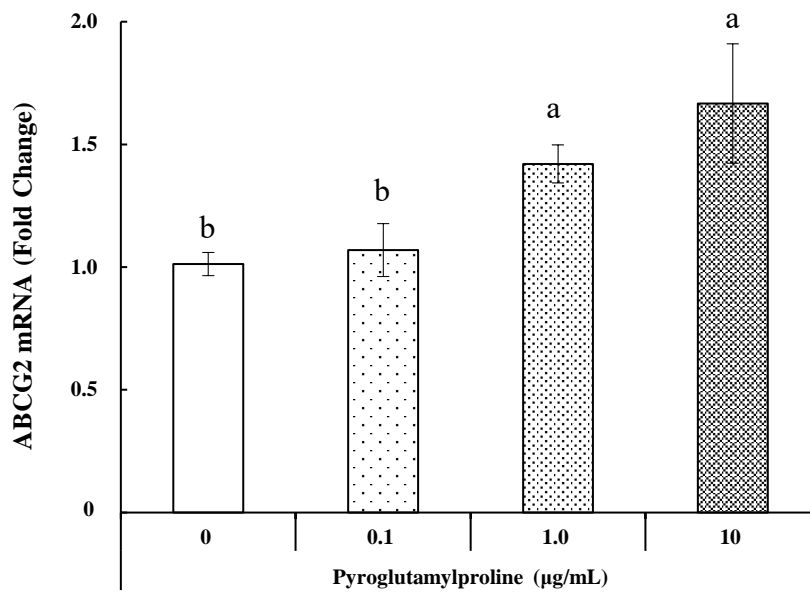


Figure 7-2. Effects of pyroglutamylproline (pEP) on ATP binding cassette subfamily G member (ABCG) 2 mRNA expression in Caco-2 cells.

Cells were cultured for 5 days with 0.1–10 µg/mL of pEP, changing the medium every 24 h. The expression level of ABCG2 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Different letters (a or b) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.3 pEP が Caco-2 細胞における ABCG2 タンパク質発現に与える影響（ウェスタンブロッティング）

Caco-2 細胞に 0.1–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の pEP を添加して培養した後、ウェスタンブロッティングによって GAPDH タンパク質に対する ABCG2 タンパク質の相対発現量を求めた。その結果、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の pEP は ABCG2 タンパク質の相対発現量を有意に高めた ( $p < 0.05$ 、Figure 7-3)。

### 7.3.4 pEP が Caco-2 細胞における ABCG2 タンパク質発現に与える影響（免疫蛍光染色）

Caco-2 細胞に 0.1–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の pEP を添加して培養した後、免疫蛍光染色を行って蛍光顕微鏡にて観察した。Figure7-4 DAPI の画像で示す通り、核が染色されていることから、確かに細胞が存在することが分かった。Figure7-4 ABCG2 の画像では刺激剤を一切添加していない自然な状態の Caco-2 細胞において、ABCG2 タンパク質が発現することを視覚的に明らかにした。Figure7-4 合成画像では ABCG2 が核上や核外のいずれにも発現したことから、ABCG2 タンパク質が細胞膜に発現および存在することが示唆された。なお、ABCG2 タンパク質の局在がはっきりしない理由は、観察面の表側にピントが合っており、ピントを合わせていない観察面の裏側にも ABCG2 タンパク質が発現していることが原因であると推測した。negative control 区では核のみが検出され、ABCG2 は検出されなかった。このことから、二次抗体は細胞成分の非特異的な結合をしていないこと、つまり擬陽性は起こっていないことを証明することができた。

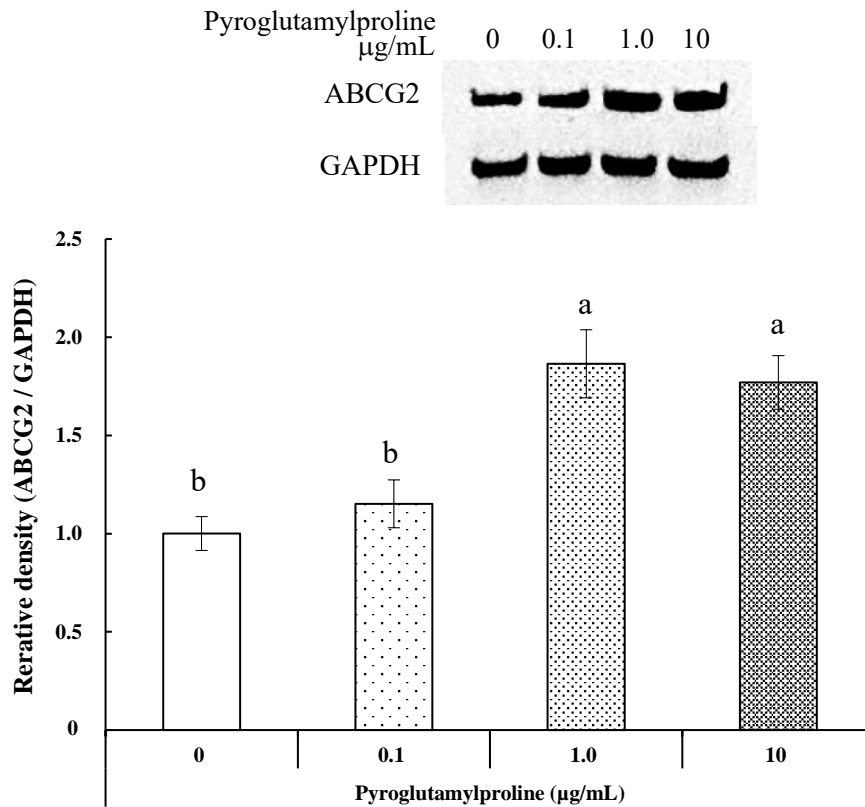


Figure 7-3. Effects of pyroglutamyproline (pEP) on ATP binding cassette subfamily G member (ABCG) 2 protein expression in Caco-2 cells by Western blotting.

Cells were cultured for 7 days with 0.1–10 µg/mL of pEP, changing the medium every 24 h. ABCG2 protein levels in Caco-2 cells were analyzed by Western blotting. The relative protein expression levels were normalized to the GAPDH protein. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a or b) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

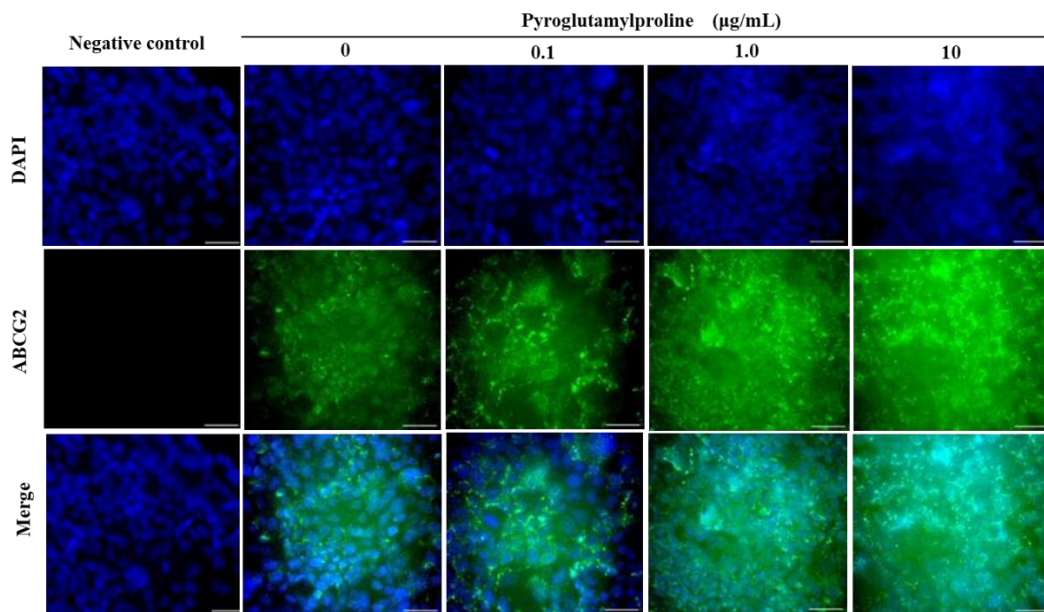


Figure 7-4. Effects of pyroglutamylproline (pEP) on ATP binding cassette subfamily G member (ABCG) 2 protein expression in Caco-2 cells by immunohistochemical analysis.

Cells were cultured for 7 days with 0.1–10  $\mu\text{g/mL}$  of pEP, changing the medium every 24 h. Cells were immunostained and observed by fluorescence microscopy. The negative control was determined using only the secondary antibody. Cells were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear counterstaining, with anti-ABCG2 antibody (ABCG2), and merged (merge). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ .

#### 7.4 考察

本研究では Caco-2 細胞の増殖に影響を与えない 0.1–10 µg/mL の pEP において、ABCG2 の発現に与える評価を検討した。1–10 µg/mL の pEP は ABCG2 の mRNA およびタンパク質を有意に増加させた。何ら刺激を与えられていない Caco-2 細胞において、ABCG2 が発現していることが報告されている<sup>74)</sup>。5/6 腎摘出ラットモデルでは尿中尿酸値は減少したものの、血清尿酸値は増加しなかった<sup>75)</sup>。引用文献 75 の著者らは、腎臓からの尿酸排泄減少にも関わらず、血清尿酸値が増加しなかったという事実は非腎排泄経路、すなわち腸に発現する ABCG2 による尿酸排泄の増加によるものであると結論付けた<sup>75)</sup>。同様に本研究においても、pEP が腸管 ABCG2 の発現を増加させ、尿酸排泄を促進し、血清尿酸値の上昇を抑制、あるいは低下させることが示唆された。

また、本研究における免疫蛍光染色によって、ABCG2 タンパク質が Caco-2 細胞の原形質膜で発現していることを視覚的に明らかにした。ヒト ABCG2 が尿酸排泄に関与する重要な原形質膜トランスポーターであることが報告されている<sup>76)</sup>。一方、経口摂取したペプチドが吸収されるには腸上皮細胞のトランスポーターを透過する必要がある<sup>77)</sup>。しかし先述の通り、ABCG2 は腸上皮細胞の原形質膜に存在するトランスポーターであることから、pEP のトランスポーターに対する透過性に関係なく、ABCG2 の発現を促進する可能性がある。

経口摂取した pEP が腸上皮細胞に直接的に作用するかについて考察する。ジペプチドである pEL をラットに経口投与した 30–60 分後に、高濃度の pEL が血中で検出されたことから、経口摂取した pEL は血中へ取り込まれると考えられた<sup>78)</sup>。同様に、経口摂取した pEP は胃で分解されず、腸上皮に到達する可能性がある。第 6 章および第 7 章の研究結果から、経口摂取した pEP が腸上皮細胞に直接的に作用して ABCG2 の発現を増加させることで、尿酸の排出を促進し、血清尿酸値を低下させることが示唆された。

## 7.5 小括

第6章では FBE-P に含まれる血清尿酸値低減物質が pEP であることを明らかにした。第7章では化学合成された pEP が ABCG2 の発現に与える影響を検討するため、Caco-2 細胞に添加し、リアルタイム PCR およびウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色を実施した。本研究の結果、化学合成された pEP は ABCG2 の発現を増加させることを遺伝子およびタンパク質レベルで明らかにした。さらに、ABCG2 は腸上皮細胞の形質膜に存在することから、摂取した pEP が膜透過性の有無に関係なく、ダイレクトに効果を発揮する可能性が考えられた。

しかし、ヒトにおける pEP の経口摂取の効果を検討するためには、pEP を摂取させる二重盲検試験が必要である。

## 第 8 章 GABA が線維芽細胞における I 型コラーゲンおよび MMP-1 mRNA 発現に与える影響

### 8.1 緒言

長年の研究により、大麦焼酎粕を精製した発酵大麦エキス (FBE) を培地として乳酸菌を培養した際、一般的に用いられる酵母エキスおよびポリペプトン等といった N 源と比べ、菌体の増殖率が高くなることが報告されている<sup>79)</sup>。三和酒類株式会社は発酵食品から  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を高生産する乳酸菌株の釣菌に成功し、FBE を培地として GABA 粉末を大量生産し、食品素材「大麦乳酸発酵液ギャバ 90%」として長年販売している<sup>80)</sup>。

GABA は植物、微生物、動物に広く分布するアミノ酸であり、グルタミン酸の脱炭酸によって合成される。哺乳動物では GABA は中枢神経系の主要な抑制性神経伝達物質として機能する<sup>81)</sup>。GABA の投与が Th1/Th2 バランスを調整することにより、NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎様皮膚病変を改善したことが報告された<sup>82)</sup>。さらに、GABA は抑制性の神経伝達物質として働くことから抗ストレスやリラックス効果<sup>83)</sup>、睡眠の質改善効果<sup>84)</sup> が報告されている。精神的・身体的ストレスは肌の状態を左右する<sup>85), 86), 87)</sup>。睡眠障害が皮膚疾患治療に重大な影響を及ぼすことも報告されている<sup>88)</sup>。つまり、GABA の摂取により、ストレスを軽減させることができれば、肌荒れを防ぐことができると推測した。そこで、ストレスに起因する肌荒れを自覚する 30 歳代後半–50 歳代の女性 15 名を対象に、大麦乳酸発酵液ギャバ 90 % を 180 mg/day、8 週間連続摂取させ、肌荒れに与える影響を検討した (非盲検試験のため詳細な結果は示さない)。その結果、摂取前と比べ、肌弾力評価項目 R0 値が有意に増加し、R2、R7 値が改善する傾向が見られた。また、画像解析による紫外線シミの測定において、シミの有意な減少が認められた。VAS 法を用いたアンケートにおいて、乾燥やハリなどの肌状態に関する質問項目が有意に改善した。非盲検試験の結果から、大麦乳酸発酵液ギャバ 90 % は肌状態の改善に有効な食品素材である可能性が推測された。

非盲検試験の試験結果を受け、次に疲労や睡眠の不調、肌荒れを自覚する成人女性を対象に二重盲検並行群間試験を実施した<sup>23)</sup>。その結果、GABA 摂取群において頬の皮膚弾力性指標がプラセボ摂取群と比較して有意に改善した<sup>23)</sup>。

皮膚は人体で最大の器官であり、熱および紫外線照射、細菌感染、機械的・化学的ストレスなどの環境に対する保護バリアとなる<sup>89)</sup>。皮膚は表皮と真皮の2層から成り、各層が生理機能を発揮する<sup>89)</sup>。真皮ではヒト皮膚線維芽細胞がI型コラーゲンを生成し、線維芽細胞が生成するコラーゲナーゼ（マトリックスメタロプロテアーゼ、MMP）の作用によって酵素分解を受ける<sup>90)</sup>。コラーゲンは膠原線維と呼ばれ、皮膚に機械的強度を与える<sup>91)</sup>。

先述の非盲検および二重盲検試験における作用機序は、GABAによるストレス軽減や睡眠の質改善といった作用、つまりGABAの間接的作用に起因すると推測し実施した。しかし、GABAが真皮線維芽細胞に直接的な影響を与えるかについては検討されていない。そこで本研究では、GABAが正常ヒト真皮線維芽細胞（NHDF細胞）に与える影響を細胞実験にて検討した。本章ではGABAがI型コラーゲンを構成する $\alpha 1$ 鎖（COL1A1）、 $\alpha 2$ 鎖（COL1A2）のmRNAの発現に与える影響を検討した。一方、MMP-1はI型コラーゲン等を切断し、肌の弾力を低下させる酵素である。MMP-1の発現を抑制することができれば、肌の弾力低下を抑えることが可能となる。従って、GABAがMMP-1 mRNAの発現に与える影響も検討した。

## 8.2 実験方法

### 8.2.1 材料

GABAを含むサンプルとして、大麦乳酸発酵液ギャバ90%（三和酒類株式会社、本章ではGABA）を用いた。また、結果で示すGABA濃度は大麦乳酸発酵液ギャバ90%としての濃度ではなく、GABAとしての濃度を示す。

栄養成分分析は一般財団法人日本食品分析センターにて実施した。

GABA含有濃度は高速アミノ酸分析装置L-8800（日立ハイテクノロジーズ株式会社、東京）を用いて測定した。分析条件等は日立テクニカルシート



LC060016-01 GABA 短縮分析法に記載の通り、実施した。なお、当該分析条件は日立ハイテクノロジーズ株式会社が開発したものであり、一般公開されていない。

大麦乳酸発酵液ギャバ 90 %を PBS (-) に溶解して用い、PBS (-) の濃度は 10 %とした。

### 8.2.2 細胞培養

NHDF 細胞は Kurabo Industries Ltd. (大阪) から購入した。NHDF 細胞は 10 % ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) および 1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific) を添加した DMEM (Sigma-Aldrich、増殖用培地)によって培養した (37 °C、5 % CO<sub>2</sub>)。NHDF 細胞は細胞増殖試験用に 1.5 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の密度で 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 0.1 mL、mRNA 分析用に 2 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の密度で 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1 mL を播種した。細胞がコンフルエントに達した後、増殖用培地を吸引除去し、評価サンプルおよび 0.5 %ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich)、1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific)を添加した DMEM (Sigma-Aldrich、評価試験用培地) を滴下した。サンプル添加から 24 時間培養後に各評価試験を行った。

### 8.2.3 細胞増殖試験

第 3 章 3.2.3 増殖試験の項に記載の方法と同様に行った。

### 8.2.4 リアルタイム PCR

第 2 章 2.2.4 リアルタイム PCR の項に記載の方法と同様に行った。内部標準は GAPDH とし、COL1A1、COL1A2、MMP-1 mRNA の相対発現量を求めた。プライマーの配列を Table 8-1 に示す。

### 8.2.5 統計解析

第 2 章 2.2.6 統計解析の項に記載の方法と同様に行った。

Table 8-1. Primer sequences.

Primer	Direction	Sequence
GAPDH	Forward	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT- 3'
	Reverse	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC- 3'
COL1A1	Forward	5'-AGG ACA AGA GGC ATG TCT GGT T- 3'
	Reverse	5'-TTG CAG TGG TAG GTG ATG TTC TG- 3'
COL1A2	Forward	5'-GTT GCT GCT TGC AGT AAC CTT- 3'
	Reverse	5'-AGG GCC AAG TCC AAC TCC TT- 3'
MMP-1	Forward	5'-ATT CTA CTG ATA TCG GGG CTT TGA- 3'
	Reverse	5'-ATG TCC TTG GGG TAT CCG TGT AG- 3'

Table 8-2. The constituents of the biosynthesized GABA.

	content rate (%)
Protein*	95.5
Carbohydrate	2.8
Fat	0.1
Ash	0.7
Moisture	0.9
GABA	92.0

\* Notes: The nitrogen content was 13.1 %. The GABA content was 92 %. The protein content was calculated using a nitrogen-protein conversion factor. The nitrogen-protein conversion factor was 7.36 for GABA and 5.83 in the absence of GABA. Total protein represents the sum of GABA and non-GABA protein content.

## 8.3 実験結果

### 8.3.1 栄養成分分析

大麦乳酸発酵液ギャバ 90 %における栄養成分分析結果を Table 8-2 に示す。GABA は 92.0 %となり、約 3 %が炭水化物、約 1 %は水分であることが分かった。

### 8.3.2 GABA が NHDF 細胞の増殖に与える影響

NHDF 細胞に 0.01–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA を添加して培養した後、キットを用いて 450 nm の吸光度を測定した。control 区の数値で正規化し、細胞増殖率を求めた。その結果、control 区および全ての試験区で細胞増殖率に有意な差は認められなかった (Figure 8-1)。つまり、GABA は NHDF 細胞の増殖に影響を与えなかった。

### 8.3.3 GABA が COL1A1 および COL1A2、MMP-1 mRNA 発現に与える影響

NHDF 細胞に 0.01–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA を添加して培養した後、リアルタイム PCR によって GAPDH mRNA に対する COL1A1 および COL1A2、MMP-1 mRNA の相対発現量を求めた。その結果、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA 区は control 区および 0.1、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA 区と比較して、COL1A1 mRNA の相対発現量を有意に増加させた (Figure 8-2)。一方、COL1A2 mRNA の発現に対して GABA は影響を与えなかった (Figure 8-3)。また、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の GABA は control 区およびその他の試験区と比較して、MMP-1 mRNA の相対発現量を有意に低下させた (Figure 8-4)。

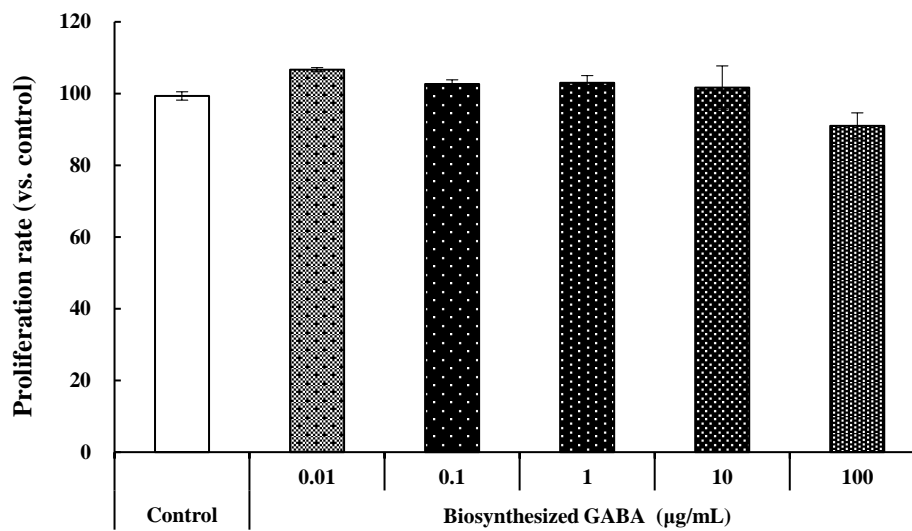


Figure 8-1. Effects of biosynthesized GABA on NHDFs proliferation.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–100 µg/mL biosynthesized GABA. Absorbance at 450 nm was measured using a commercial kit, normalized with control and quantified. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

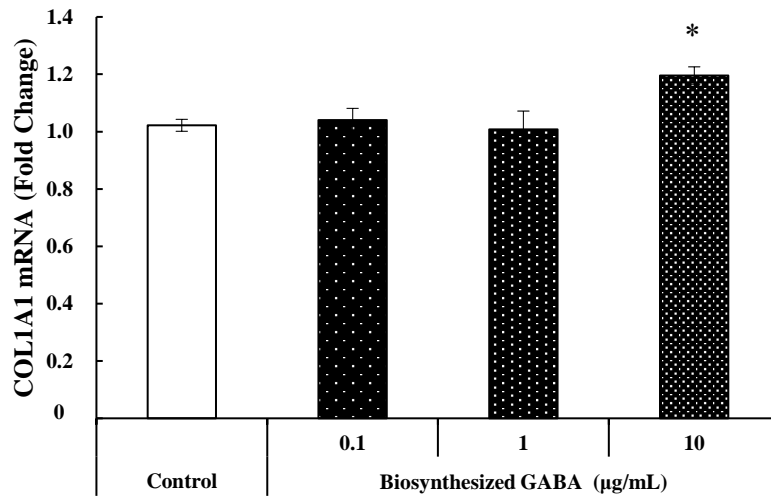


Figure 8-2. Effects of biosynthesized GABA on COL1A1 mRNA expression in NHDFs.

Cells were cultured for 24 h with 0.1–10 µg/mL of biosynthesized GABA. The expression level of COL1A1 transcripts were analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Results are compared to control, and significant difference is indicated by an asterisk ( $*p < 0.05$ ).

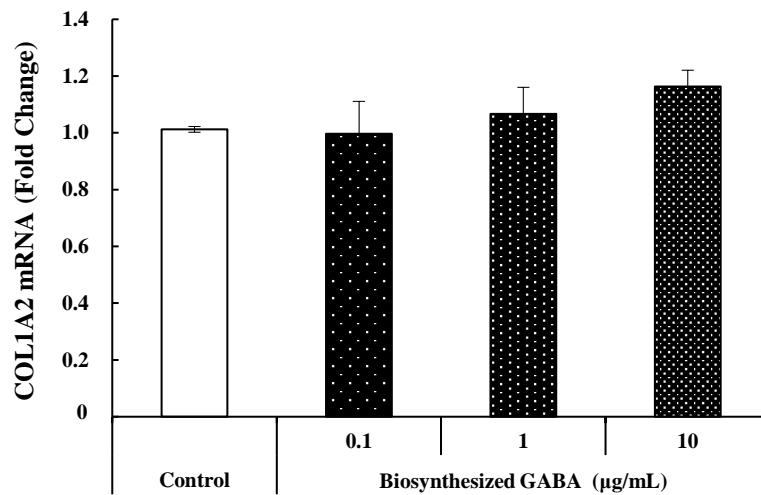


Figure 8-3. Effects of biosynthesized GABA on COL1A2mRNA expression in NHDFs.

Cells were cultured for 24 h with 0.1–10 µg/mL of biosynthesized GABA. The expression level of COL1A2 transcripts were analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

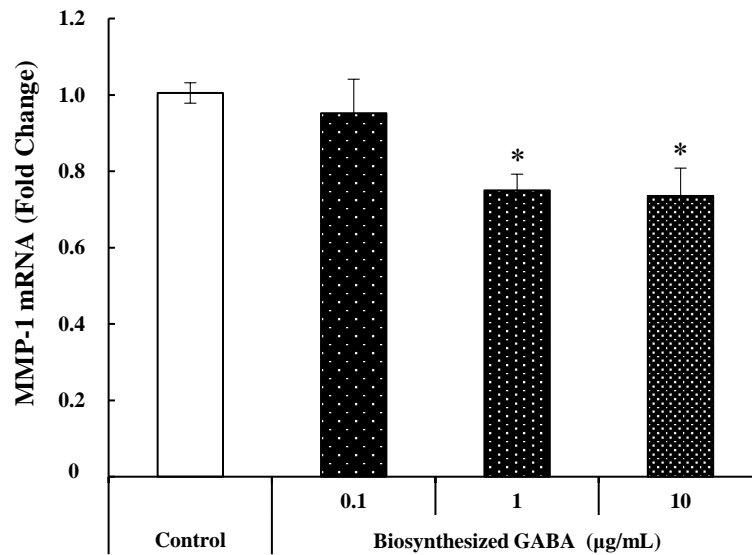


Figure 8-4. Effects of biosynthesized GABA on matrix metalloproteinase (MMP)-1 mRNA expression in NHDFs.

Cells were cultured for 24 h with 0.1–10 µg/mL of biosynthesized GABA. The expression level of MMP-13 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Results are compared to control, and significant difference is indicated by an asterisk (\* $p < 0.05$ ).



#### 8.4 考察

コラーゲンは主に真皮で線維層を形成しており、真皮の線維成分の 90 %以上を占める<sup>92)</sup>。創傷により欠損した組織はコラーゲン線維によって修復される<sup>92)</sup>。また、コラーゲンは皮膚に張りや弾力性を与える<sup>93)</sup>。ヒトの皮膚には 9 種類のコラーゲンが存在するが、I型コラーゲンは皮膚コラーゲンの 80–90 %を占めるため、皮膚に及ぼす影響は大きい<sup>94)</sup>。I 型コラーゲンは  $\alpha 1(I)$ 鎖  $\alpha 2(I)$ 鎖で構成されており、これらはそれぞれ COL1A1 および COL1A2 mRNA によってコードされている<sup>95)</sup>。本研究では、NHDF 細胞の増殖に影響を与えない 0.1–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA を用いて評価を行った。NHDF 細胞の COL1A1 および COL1A2 mRNA 発現に対する GABA の影響を検討した結果、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA は NHDF 細胞における COL1A1 mRNA の発現を有意に増加させた。本試験の結果は GABA が NHDF 細胞の I 型コラーゲンの発現を部分的にアップレギュレートすることを示唆した。

コラーゲン等を分解する酵素である MMP-1<sup>96)</sup> mRNA の発現を 1、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA は有意に低下させた。MMP-1 は紫外線照射<sup>96)</sup>や HDF 細胞の老化<sup>97)</sup>によって発現が増加し、真皮のコラーゲン量を劇的に減少させ、シワの形成や皮膚の弾力性の喪失をもたらす<sup>98)</sup>。従って、GABA を摂取することにより、紫外線および老化による皮膚の弾力低下を抑制する可能性が示唆された。

GABA は経口摂取により、腸管から速やかに吸収され血中に移行することが知られており、血中の GABA は摂取から 1 時間後をピークに急速に減少することが報告されている<sup>99)</sup>。血中に存在する GABA は血流により、各組織（細胞）に運ばれる。また、GABA と GABA 受容体は内分泌系および平滑筋や雌性生殖器などといった非神経組織を含む様々な末梢組織中に存在する<sup>100)</sup>。従って、GABA を経口摂取した際、GABA が血中に移行し皮膚組織に運ばれ、受容体と結合することが考えられる。受容体と結合した GABA は COL1A1 遺伝子の発現を増加させ、MMP-1 の発現を抑制し、皮膚の弾力低下を抑制する可能性が考えられた。ただし、I 型コラーゲンおよび MMP-1 遺伝子発現の調節メカニズムを理解するには、NHDF 細胞で発現する主要な GABA 受容体を特定する必

要がある。

## 8.5 小括

大麦焼酎粕を培地とし、乳酸菌により発酵生産された GABA を、日頃から疲労や睡眠の不調を感じ、肌荒れの自覚がある成人女性に摂取させる二重盲検試験を行った結果、頬の粘弾性の低下を抑制することが報告された<sup>23)</sup>。

そこで、NHDF に GABA を添加し、皮膚の強さや弾力の元となる I 型コラーゲンと、コラーゲン分解酵素である MMP-1 の各 mRNA 発現に与える影響を検討した。その結果、GABA は COL1A1 mRNA の発現レベルを有意に増加させる上、MMP-1 mRNA の発現を有意に抑制することを明らかにした。

従って、GABA の摂取が I 型コラーゲンの合成と分解のバランスを制御することにより、皮膚の弾力性を改善する可能性が示唆された。つまり、GABA は成長ホルモンの分泌促進や睡眠の質向上といった間接的な肌弾力への効果だけではなく、直接的な効果によって肌の弾力を維持し、弾力の低下を抑制すると考えられた。

## 第9章 GABAがNHDF細胞におけるエラスチン関連 mRNA およびタンパク質の発現に与える影響

### 9.1 緒言

前章にて GABA は NHDF 細胞による COL1A1 の産生を部分的に促進する効果と、MMP-1 の産生を抑制する効果を示すことが示唆された。

一方、NHDF 細胞は膠原線維であるコラーゲンだけでなく、弾性線維であるエラスチンとマイクロフィブリルの 2 つの形態学的に異なる成分を産生することが知られている<sup>101)</sup>。エラスチンはリシルオキシダーゼ (LOX) で架橋されたトロポエラスチン (ELN) タンパク質で構成される<sup>102)</sup>。マイクロフィブリルはフィブリリン-1 (FBN-1) およびフィブリリン-2 (FBN-2) から成る。架橋されたエラスチン分子はエラスチンと別途に合成されたマイクロフィブリルと会合し、弾性線維を形成する<sup>103)</sup>、<sup>104)</sup>。弾性線維は弾性発現の主役の機能を果たす<sup>105)</sup>。そこで本章では大麦乳酸発酵液ギャバ 90 % (本章では biosynthesized GABA と示す) および化学合成された市販の GABA 試薬 (本章では chemosynthesized GABA と示す) を用い、NHDF 細胞における弾性線維形成に対する GABA の作用を検討した。評価項目はエラスチンの前駆物質である ELN、マイクロフィブリルである FBN-1 および FBN-2、ELN の架橋に必要な酵素である LOX、エラスチンをマイクロフィブリル上に沈着させるフィブリリン-5 (FBLN-5)<sup>104)</sup>、エラスチンの沈着を助ける latent TGFβ binding protein 4 (LTBP-4) とした<sup>104)</sup>。

### 9.2 実験方法

#### 9.2.1 材料

サンプルは chemosynthesized GABA (純度 99 %、Sigma-Aldrich) および biosynthesized GABA (大麦乳酸発酵液ギャバ 90 %、純度 92 %、三和酒類株式会社) を用いた。結果で示す GABA 濃度 (μg/mL) は試薬およびサンプルの濃度ではなく、GABA としての濃度を示す。サンプルは全て PBS (-) に溶解さ

せて用い、PBS（－）の濃度は10%とした。

### 9.2.2 細胞培養

NHDF細胞は10%ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) および1% penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific) を添加した DMEM (Sigma-Aldrich、増殖用培地) によって培養した (37 °C、5 % CO<sub>2</sub>)。NHDF細胞は以下の通り播種した。細胞増殖試験用として  $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で96ウェルプレートに0.1 mL/well、mRNA分析用として  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で24ウェルプレートに1 mL/well、免疫蛍光染色用として  $2 \times 10^4$  cells /cm<sup>2</sup> の密度で Labtech II チャンバー スライド システム 154534JP (Thermo Fisher Scientific) に0.2 mL/wellとした。細胞がコンフルエントに達した後、増殖用培地を吸引除去し、評価サンプルおよび0.5%ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich)、1% penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific)を添加した DMEM (Sigma-Aldrich、評価試験用培地) を滴下した (培地交換)。細胞増殖試験用および mRNA 分析用の細胞はサンプル添加後1日培養した。免疫蛍光染色用細胞の培地は24時間ごとに新しい培地 (所定濃度の GABA を含む) と交換しながら7日間培養した。

### 9.2.3 細胞増殖試験

第3章 3.2.3 増殖試験の項に記載の方法と同様に行った。

### 9.2.4 リアルタイム PCR

第2章 2.2.4 リアルタイム PCR の項に記載の方法と同様に行った。内部標準は GAPDH とし、各 mRNA の相対発現量を求めた。使用したプライマーの配列を Table 9 に示す。

Table 9. Primer sequences.

Primer	Direction	Sequence
GAPDH	Forward	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT- 3'
	Reverse	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC- 3'
ELN	Forward	5'-GGT ATC CCA TCA AGG CCC C- 3'
	Reverse	5'-TTT CCC TGT GGT GTA GGG CA- 3'
FBN-1	Forward	5'-AGC ACA CTC ACG CGG ACA- 3'
	Reverse	5'-AGA TCC GGC CAT TCT GTA AAC A- 3'
FBN-2	Forward	5'-TCG CCC GGC AGC AAA CTC AG- 3'
	Reverse	5'-TCA CAC CGC TCA CAG GGG CT- 3'
LOX	Forward	5'-CCT ACT ACA TCC AGG CGT CCA- 3'
	Reverse	5'-CAT AAT CTC TGA CAT CTG CCC CTG T- 3'
FBLN-5	Forward	5'-CTC ACT GTT ACC ATT CTG GCT C- 3'
	Reverse	5'-GAC TGG CGA TCC AGG TCA AAG- 3'
LTBP-4	Forward	5'-CGC TGC GTC TCC AAC GA- 3'
	Reverse	5'-CCC ACT TCC TGC CAG CAC- 3'

### 9.2.5 免疫蛍光染色

第7章 7.2.6 免疫蛍光染色の項に記載の方法と同様に行った。なお、GABA濃度はいずれも 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加して培養した。

エラスチン一次抗体として polyclonal rabbit anti-human alpha-elastin (#4060-1060、Bio-Rad Laboratories)を用いた。また、エラスチンタンパク質を観察する際は励起フィルターBP470–495、吸収フィルターBA510–550を使用した。

さらに、imaging software Lumina Vision Ver.3.7.4.2 (MITANI CORP.)によって、ABCG2 タンパク質の染色エリアを抽出して得られた面積値を、control 区的面積値で正規化し、相対的な割合として求めた。

### 9.2.6 統計解析

第2章 2.2.6 統計解析の項に記載の方法と同様に行った。

## 9.3 実験結果

### 9.3.1 chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA が NHDF 細胞の増殖に与える影響

chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA が NHDF 細胞の増殖に与える影響を検討した。NHDF 細胞に 0.01–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA を添加して培養した後、キットを用いて 450 nm の吸光度を測定した。control 区の数値で正規化し、細胞増殖率を求めた。その結果、いずれの GABA も 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度では control 区を含めたその他の試験区と比べ、細胞増殖率は有意に低値を示した(Figure 9-1)。

### 9.3.2 chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA が NHDF 細胞における ELN、FBN-1、FBN-2、LOX、FBLN-5、LTBP-4 mRNA 発現に与える影響

NHDF 細胞に 0.01–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の各サンプルを添加して培養した後、リアルタイム PCR によって GAPDH mRNA に対する標的 mRNA の相対発現量を求めた。その結果、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の chemosynthesized GABA および 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の biosynthesized GABA は control 区および他の試験区と比べ、ELN mRNA の相対発現量が有意に高値を示した (Figure 9-2)。

また、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の chemosynthesized GABA および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の biosynthesized GABA では control 区および他の試験区と比べ、FBN-1 mRNA の相対発現量が有意に高値を示した(Figure 9-3)。

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の chemosynthesized GABA および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の biosynthesized GABA では control 区および他の試験区と比べ、FBN-2 mRNA の相対発現量が有意に高値を示した(Figure 9-4)。

0.01–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA では、LOX mRNA および LTBP-4 mRNA の発現に影響を与えなかった(Figure 9-5、9-7)。

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の chemosynthesized GABA および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の biosynthesized GABA では control 区および他の試験区と比べ、FBLN-5 mRNA の相対発現量が有意に高値を示した(Figure 9-6)。

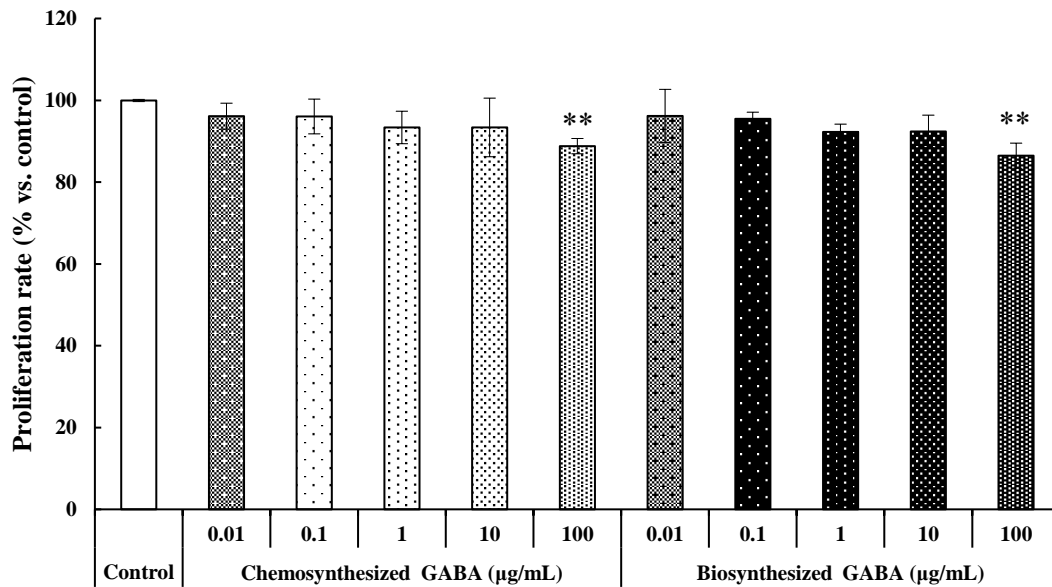


Figure 9-1. Effect of GABA on NHDFs proliferation.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–100 µg/mL GABA. Absorbance at 450 nm was measured using the kit, normalized with control and quantified. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Results are compared to control, and significant difference is indicated by an asterisk (\*\* $p < 0.01$ ).



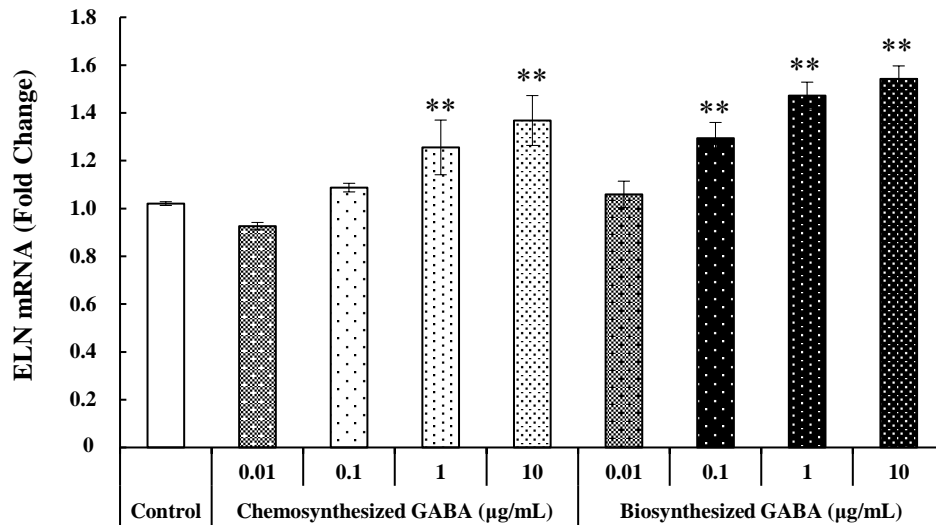


Figure 9-2. Effects of GABA on tropoelastin (ELN) mRNA expression in NHDFs.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–10 µg/mL of GABA. The expression level of ELN transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Results are compared to control, and significant difference is indicated by an asterisk (\*\* $p < 0.01$ ).

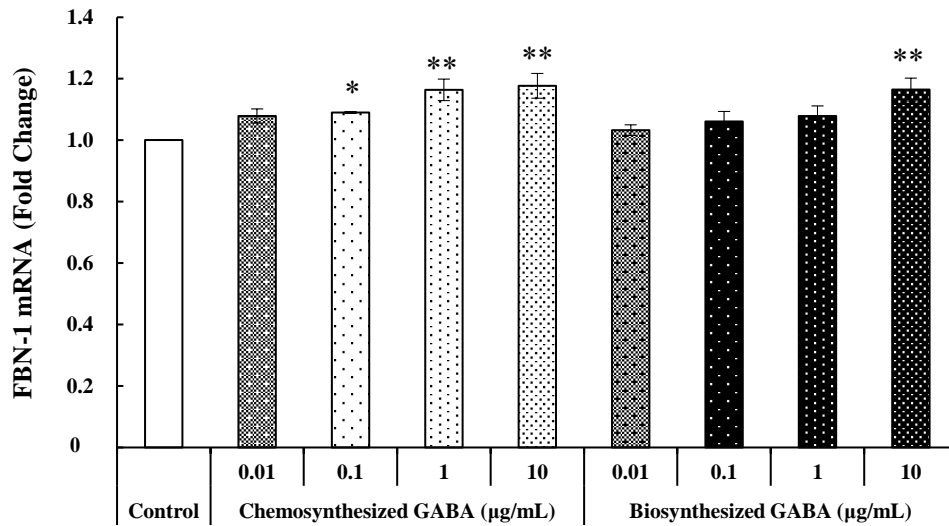


Figure 9-3. Effects of GABA on fibrillin-1 (FBN-1) mRNA expression in NDFs.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–10 µg/mL of GABA. The expression level of FBN-1 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Results are compared to control, and significant difference is indicated by an asterisk (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

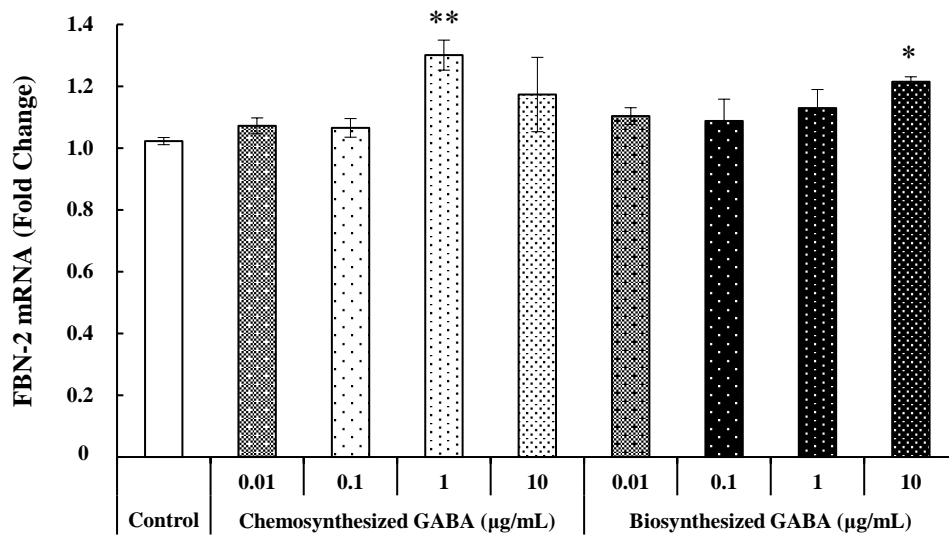


Figure 9-4. Effects of GABA on fibrillin-2 (FBN-2) mRNA expression in NHDFs.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–10 µg/mL of GABA. The expression level of FBN-2 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Results are compared to control, and significant difference is indicated by an asterisk (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

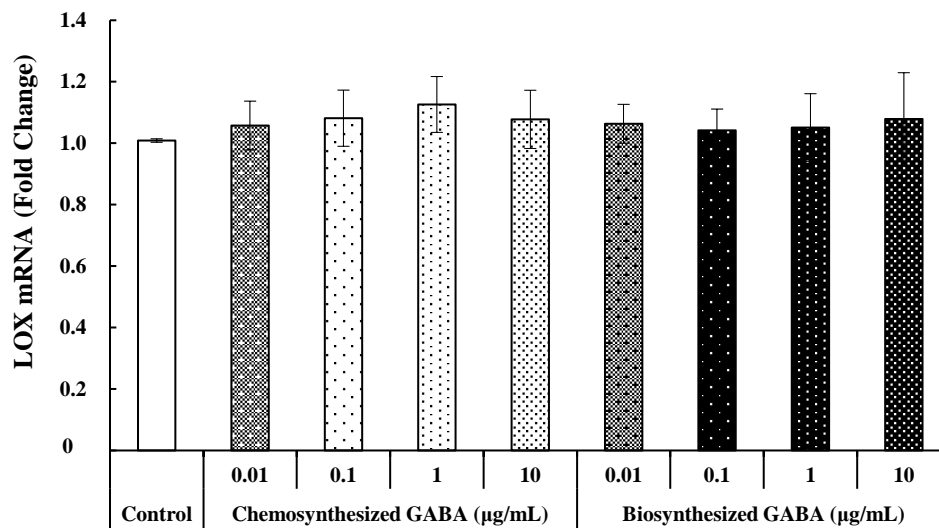


Figure 9-5. Effects of GABA on lysyl oxidase (LOX) mRNA expression in NHDFs.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–10 µg/mL of GABA. The expression level of LOX transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments.

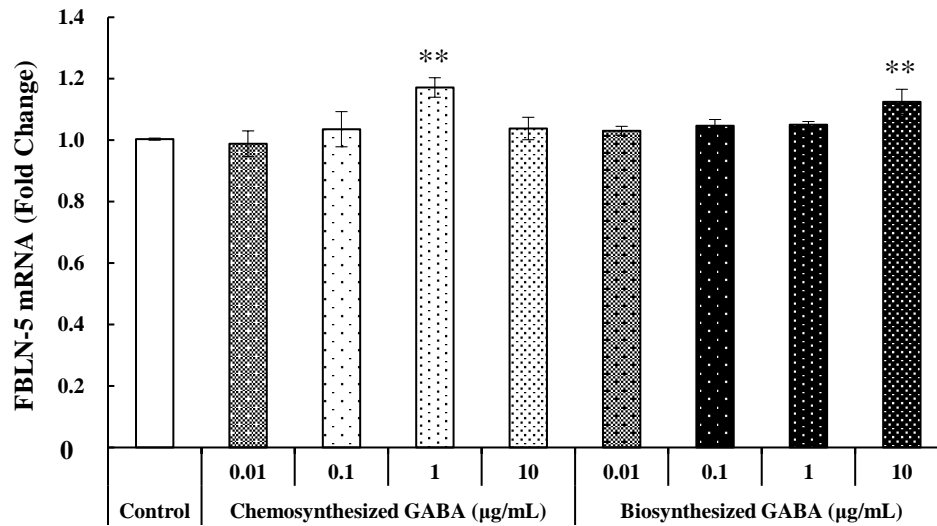


Figure 9-6. Effects of GABA on fibulin-5 (FBLN-5) mRNA expression in NHDFs.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–10 µg/mL of GABA. The expression level of FBLN-5 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Results are compared to control, and significant difference is indicated by an asterisk (\*\* $p < 0.01$ ).

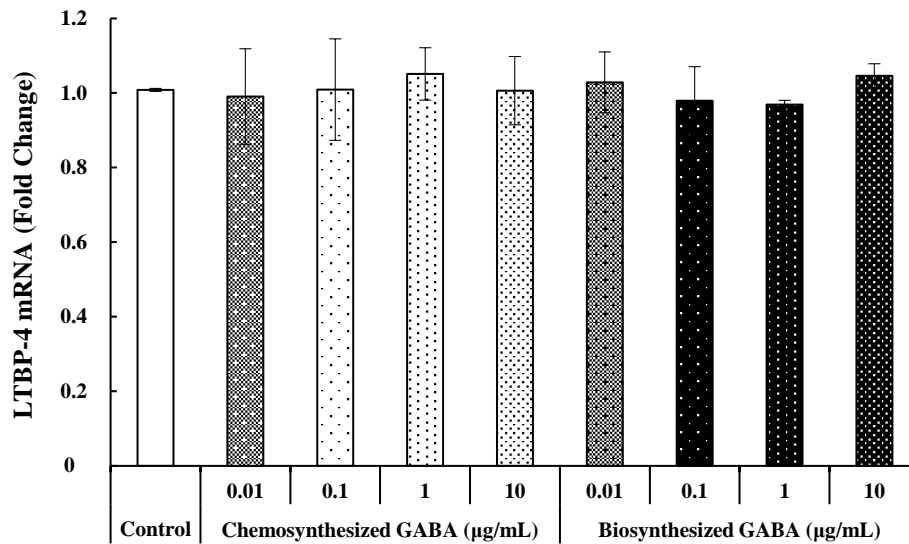


Figure 9-7. Effects of GABA on latent TGF $\beta$  binding protein (LTBP)-4 mRNA expression in NHDFs.

Cells were cultured for 24 h with 0.01–10  $\mu\text{g/mL}$  of GABA. The expression level of LTBP-4 transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

### 9.3.3 chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA がエラスチンタンパク質の発現に与える影響

chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA がエラスチンタンパク質の発現に与える影響を視覚的に明らかにするため、NHDF 細胞に 10 µg/mL の両サンプルを添加して培養した後、免疫染色し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。その結果、10 µg/mL の chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA ではエラスチン線維を太くし、線維数を増加させることが観察された (Figure 9-8)。

一方、negative control 区では核のみが検出され、ABCG2 イメージングでは何も検出されなかった。このことから、二次抗体の非特異的結合が生じていないことを証明することができた。

また、画像解析の結果、エラスチンタンパク質の相対面積率はいずれの GABA においても control 区と比べ、有意に高値を示した (Figure 9-9)。

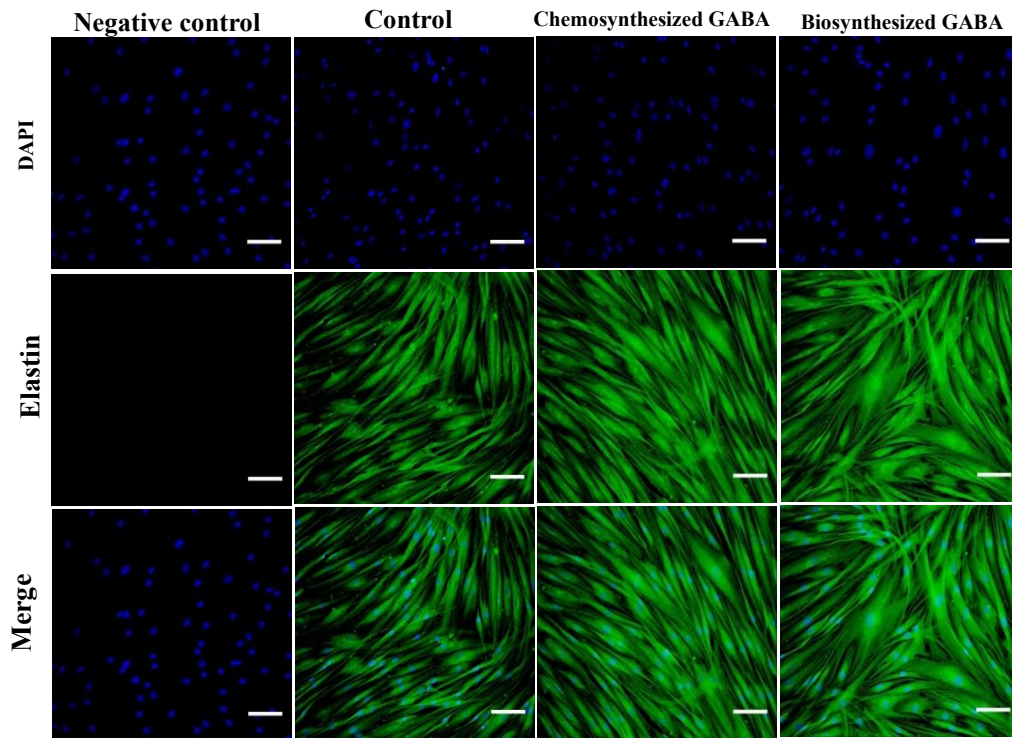


Figure 9-8. Effects of GABA on the elastic fiber formation in NHDFs.

Cells were cultured for 7 days 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chemosynthesized and biosynthesized GABA, changing the medium every day. The negative control was determined using only the secondary antibody. Cells were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear counterstaining, with anti-elastin antibody (elastin), and merged (merged). Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .



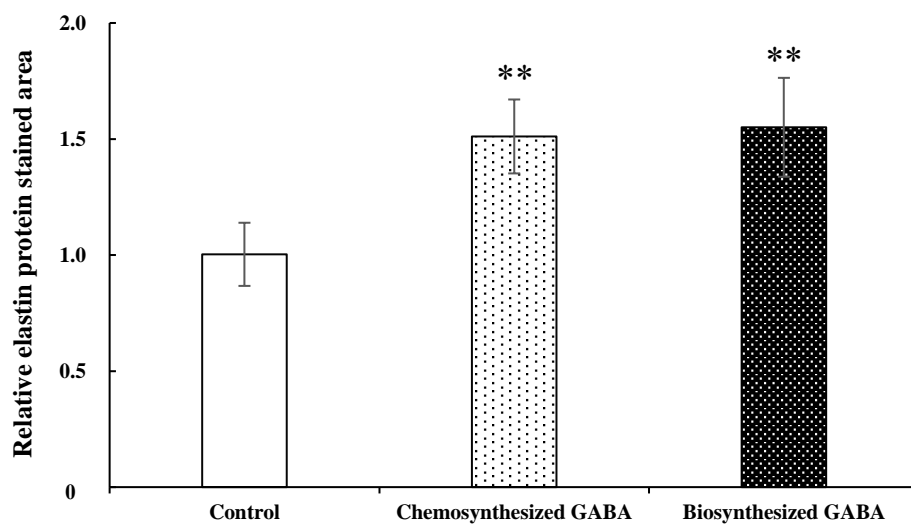


Figure 9-9. Relative elastin protein stained area.

The images in FIGS. 9-8 were analyzed using imaging software Lumina Vision Ver.3.7.4.2 (MITANI CORP., Tokyo). Each data point represents the mean  $\pm$  SD. Results are compared to control, and significant difference is indicated by an asterisk (\*\* $p < 0.01$ ).

#### 9.4 考察

弾性線維の主成分であるエラスチンは微量成分であり、皮膚の弾力性を与える重要な機能があり、細胞外マトリックスの2-4%を占める<sup>105)</sup>。老化に伴い、HDF細胞によるコラーゲンおよびエラスチンの合成量が減少し、膠原線維および弾性線維の量が減少する<sup>106)</sup>。つまり、老化に伴う皮膚の弾力性維持にはHDF細胞によるコラーゲンおよびエラスチンの生産量を減少させないことが重要である。

一方、皮膚の弾力性に影響を与える食品としてビタミンやポリフェノールなどが報告されている<sup>107)、108)</sup>。これらは抗酸化作用や抗炎症作用を通じて、コラーゲンやMMP、エラスチン量を調整し、皮膚の弾力低下を抑制する<sup>107)、108)</sup>。また、本研究で検討を行ったGABAは、多くの食品、特に発酵食品に含まれている<sup>109)</sup>。

本研究では、まず chemosynthesized GABA および biosynthesized GABA が NHDF 細胞の増殖に与える影響を検討した。その結果、いずれの GABA も 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では細胞増殖を抑制したため、細胞の増殖を阻害しない濃度、つまり 0.01-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度範囲で以降の各評価試験を行った。

次に GABA が NHDF 細胞の弾性線維形成に与える影響を検討した。肌の弾力や柔軟性を保つためには弾性線維の構成要素であるエラスチンおよびマイクロフィブリル (FBN) の発現が必要である。例えば紫外線照射された皮膚では、エラスチンと FBN の発現が低下し、シワが誘発され、弾力性が失われる<sup>97)</sup>。FBN は異なる mRNA によってコードされる 3 つの分子、FBN-1、FBN-2、FBN-3 が存在する。FBN-1 と FBN-2 は重複する発現パターンを持っており、弾性線維形成において特に重要である可能性がある<sup>110)、111)</sup>。対照的に FBN-3 はヒトにおいて、妊娠6週から12週まで、つまり一時的に多組織にて発現することが報告されている<sup>112)</sup> ことから、本試験では評価項目に入れなかった。FBLN-5 (DANCE と呼ばれる) はエラスチンがマイクロフィブリル上に沈着するために必要なことから、弾性線維形成に必須であることがわかった<sup>104)</sup>。本研究において、ELN および FBN-1、FBN-2、FBLN-5 の mRNA の発現量が有意

に増加したことによって、GABA が弾性線維の主要な構造要素を増加させる可能性が示唆された。

細胞を回収し、細胞の形態が壊れた状態で標的タンパク質を検出させるウェスタンブロットティングとは対照的に、免疫染色法では自然な状態の細胞で発現するエラスチンタンパク質の発現を視覚的に明らかにすることができる。また、エラスチンタンパク質、即ち弾性線維の発現には、トロポエラスチンおよびマイクロフィブリルといった材料の他、それらを結合させる接着剤の役割をする FBLN-5 が必要となる。本研究における免疫蛍光染色によって、GABA が NHDF 細胞による弾性線維形成を促進することを視覚的に明らかにすることができた。

第 8 章 考察で述べた通り、GABA は経口摂取により、腸管から速やかに吸収され血中に移行することが知られており、血中の GABA は摂取から 1 時間後をピークに急速に減少することが報告されている<sup>99)</sup>。また、GABA と GABA 受容体は様々な末梢組織中に存在する<sup>100)</sup>。従って、GABA を経口摂取した際、GABA が血中に移行し皮膚組織に運ばれ、受容体と結合することでエラスチン関連遺伝子およびタンパク質の発現を増加させ、皮膚の弾力低下を抑制する可能性が考えられた。ただし、その調節メカニズムを理解するには、NHDF 細胞で発現する主要な GABA 受容体を特定する必要がある。

## 9.5 小括

本研究によって GABA は NHDF 細胞による弾性線維形成を促進することが示唆された。

前章でも述べた通り、成人女性に GABA を摂取させた結果、頬の粘弾性の低下を抑制することが報告された<sup>23)</sup>。健常被験者では GABA を経口摂取した 1 時間後に血漿中のピーク濃度に達したことが報告されており<sup>113)</sup>、GABA 経口摂取から 1 時間以上経過した後、皮膚といった末端組織に GABA が到達する可能性が考えられる。第 8 章および本章では GABA 経口摂取による皮膚の粘弾性の低下を抑制した作用機序を明らかにした。本研究以前は、GABA による成長

ホルモンの分泌促進や睡眠の質向上といった間接的な肌弾力への効果であると考えられていたが、本研究の結果により、弾性線維形成促進という直接的な効果によって肌の弾力を維持し、弾力の低下を抑制することを明らかにした。

また本研究では、化学合成された GABA と生合成された GABA の両方を使用した。いずれの GABA も遺伝子およびタンパク質レベルで同様の効果を示したことから、本効果をもたらす成分は GABA であり、GABA 以外の乳酸菌発酵生産物ではないことが判明した。

## 第 10 章 GABA が筋芽細胞における筋肉量調節関連 mRNA およびタンパク質の発現に与える影響

### 10.1 緒言

日本人は世界で最も平均寿命が長い<sup>114)</sup>。2016 年の日本人の平均寿命は男性が 80.98 歳、女性が 87.14 歳であった<sup>115)</sup>。平均寿命に対し、健康寿命とは人が自立して元気に生活できる期間のことであり、介護を必要としない状態での平均寿命を示している<sup>115)</sup>。2016 年の健康寿命は日本人男性が 72.14 歳、女性が 74.79 歳であった<sup>115)</sup>。つまり、日本人男性は約 8 年間、日本人女性は 12 年間、何らかの介助を必要とすることを意味する。介護が必要になる原因の 1 つは加齢に伴う筋肉量と筋肉機能の低下であるサルコペニア<sup>116), 117)</sup>である。サルコペニアは 40 歳頃から始まり、年齢とともにその有病率は増加する<sup>117)</sup>。65 歳以上の日本人男性の 11.5 %、日本人女性の 16.7 %がサルコペニアを患っており<sup>118)</sup>、10 年ごとに筋肉量の 8 %ずつを失い、何らかの機能障害が発生する<sup>117)</sup>。従って、サルコペニアの予防は人の健康寿命延伸のために重要である。

GABA は植物や脊椎動物に含まれるアミノ酸であり、これまでに述べた通り、抗ストレスやリラックス効果<sup>83)</sup>、睡眠の質改善効果<sup>84)</sup>、血圧上昇の抑制<sup>119)</sup> など、さまざまな生理機能を有することが報告されている。また、第 8 章および第 9 章で述べた通り、GABA を NHDF 細胞に添加することにより、コラーゲンやエラスチンなどといった膠原線維や弾性線維の発現が増加する。さらに、GABA の摂取は筋肉タンパクを増加させる成長ホルモンの分泌を促進する<sup>120)</sup>。ラットの研究において、circulating insulin-like growth factor I (IGF-1) はラパマイシン経路のホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/AKT/哺乳類の標的を刺激し、筋肉の同化作用とタンパク質合成を促進することが分かった<sup>121)</sup>。定期的な運動を控えた女性が  $54.5 \pm 0.071$  mg の GABA を含む食品を 8 週間摂取した研究では除脂肪体重が増加した<sup>24)</sup>。引用文献 24 の著者は作用機序について、GABA が IGF-1 と成長ホルモンの分泌を促進することによるものと結論付けた<sup>24)</sup>。しかし、GABA が筋肉細胞において、筋肉量の増減に関わる因子に与

える直接的な影響に関する報告はない。

また、筋肉の元となる筋芽細胞を過酸化水素に添加することにより酸化ストレスを与えた研究では、control 区に比べ、GABA 添加区の細胞生存率が約 90%増加し、細胞保護作用を示した<sup>122)</sup>。ただし、非ストレス条件下での筋芽細胞に対する GABA の直接的な影響に関する報告はない。

C2C12 細胞はサテライト細胞に由来するマウス筋芽細胞株である<sup>123)</sup>。適切な刺激により分化して筋線維に移行する能力があるため、筋肉再生の *in vitro* モデルとして一般的に使用される<sup>123)</sup>。

そこで、GABA が非ストレス条件下の C2C12 細胞の増殖および筋肉量調節因子に対し、直接的に与える影響について検討を行った。評価指標は細胞増殖率と、myogenic determination gene number 1 (MyoD) および peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 $\alpha$ )、myostatin (growth differentiation factor 8、GDF8) の mRNA とタンパク質の相対発現量とした。MyoD は収縮性タンパク質の合成を指示する骨格筋形成の重要な調節因子である<sup>124)</sup>。PGC-1 $\alpha$  は骨格筋量とエネルギー代謝の正の調節因子であり、タンパク質合成と筋管肥大を促進する<sup>125)</sup>。Myostatin はヒトおよび動物の筋肉量の負の調節因子である<sup>126)</sup>。

## 10.2 実験方法

### 10.2.1 材料

化学合成された GABA (純度 99%、Sigma-Aldrich) を PBS (–) に溶解させて、細胞培養実験に供した。培地中の PBS (–) 濃度は 10%とした。

### 10.2.2 細胞培養

C2C12 細胞 (株式会社 ケー・エー・シー) は 10%ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) および 1% penicillin-streptomycin-glutamine (100 $\times$ 、Thermo Fisher Scientific) を添加した DMEM (Sigma-Aldrich、増殖用培地) を培地とし、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。C2C12 細胞は以下の通りに播種した。細胞増殖試験用として 1.5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の密度で 96 ウェルプレートに 0.1 mL/well、

mRNA 分析用およびウェスタンブロッティング用として  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 24 ウェルプレートに 1 mL/well とした。コンフルエントに達した後、24 時間ごとに 2 %ウマ血清 (Sigma-Aldrich) および 1 % penicillin-streptomycin-glutamine (100×、Thermo Fisher Scientific) を添加した様々な濃度の GABA を含む DMEM (Sigma-Aldrich、評価試験用培地) と培地交換した。細胞増殖試験用および mRNA 分析用の細胞は GABA を含む上記の培地と培地交換しながら 4 日培養した。ウェスタンブロッティング用細胞は GABA を含む上記の培地と培地交換しながら 5 日間培養した。

### 10.2.3 細胞増殖試験

第 3 章 3.2.3 増殖試験の項に記載の方法と同様に行った。

### 10.2.4 リアルタイム PCR

第 2 章 2.2.4 リアルタイム PCR の項に記載の方法と同様に行った。内部標準は GAPDH とし、標的 mRNA の発現量は GAPDH mRNA 発現量に対する割合として求めた。各プライマーの配列を Table 10 に示す。

Table 10. Primer sequences.

Primer	Direction	Sequence(5'-3')
GAPDH	Forward	ATG GCC TTC CGT GTT CCT AC
	Reverse	TGC CTG CTT CAC CAC CTT C
MyoD	Forward	TCC GTG TTT CGA CTC ACC AG
	Reverse	AGA AGT GTG CGT GCT CTT CC
PGC-1 $\alpha$	Forward	GGG CCA AAC AGA GAG AGA GG
	Reverse	GTT TCG TTC GAC CTG CGT AA
Myostatin	Forward	AGT GGA TCT AAA TGA GGG CAG T
	Reverse	GGA GTA CCT CGT GTT TTG TCT C



### 10.2.5 ウェスタンブロッティング

第3章 3.2.5 ウェスタンブロッティングの項に記載の方法と同様に実施した。

一次抗体は GAPDH monoclonal antibody 60004-1-Ig (Proteintech)および MyoD polyclonal antibody bs-2442R (Bioss Inc.)、PGC1 alpha polyclonal antibody bs-1832R (Bioss Inc.)、GDF8/MSTN polyclonal antibody bs-1288R (Bioss Inc.)を用いた。

GAPDH タンパク質の発現量で正規化し、各標的タンパク質の相対発現量を求めた。

### 10.2.6 統計解析

第2章 2.2.6 統計解析の項に記載の方法と同様に行った。

## 10.3 実験結果

### 10.3.1 GABA が C2C12 細胞の増殖に与える影響

C2C12 細胞に 1–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA を添加して培養した後、キットを使用して 450 nm 吸光度を測定した。Control 区の数値で正規化し、細胞増殖率を求めた。その結果、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の GABA は control と比較して有意に増殖を促進した (Figure 10-1)。

### 10.3.2 GABA が C2C12 細胞における MyoD および PGC-1 $\alpha$ の mRNA およびタンパク質発現に与える影響

C2C12 細胞に 10–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA を添加して培養した後、リアルタイム PCR およびウェスタンブロッティングによって、GAPDH の発現量に対する標的因子の相対発現量を求めた。その結果、GABA は control と比較して、MyoD および PGC-1 $\alpha$  の mRNA (Figure 10-2、10-4) およびタンパク質 (Figure 10-3、10-5) の相対発現量を濃度依存的に有意に増加させた。

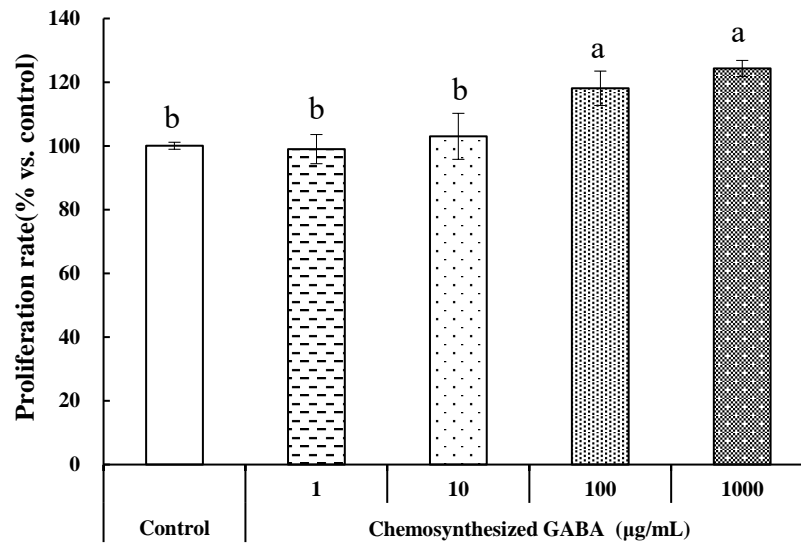


Figure 10-1. Effect of chemosynthesized GABA on C2C12 cell proliferation.

Cells were cultured for 4 days with 1–1000 µg/mL chemosynthesized GABA, changing the medium every day. Absorbance at 450 nm was measured using a commercial kit, normalized with control and quantified. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Different letters (a or b) above the columns indicate significance ( $p < 0.05$ ).

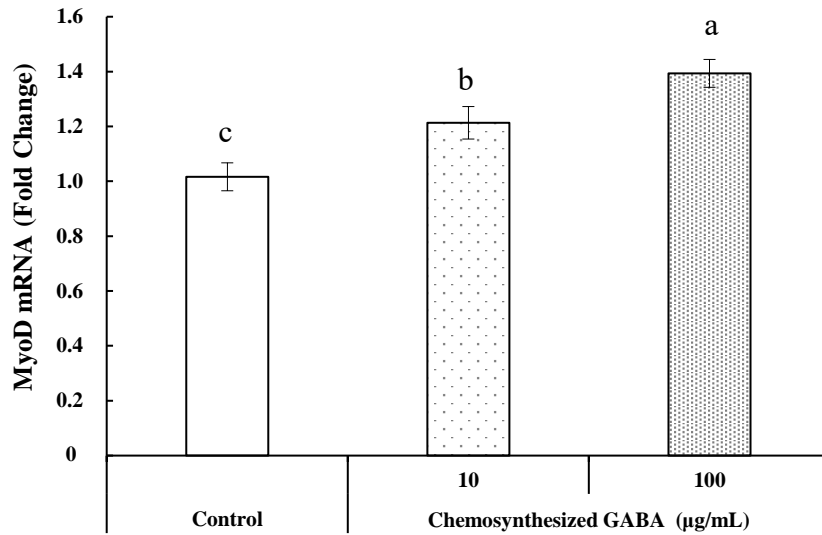


Figure 10-2. Effects of chemosynthesized GABA on myogenic determination gene number 1 (MyoD) mRNA expression in C2C12 myoblasts.

Cells were cultured for 4 days with 10–100 µg/mL of chemosynthesized GABA, changing the medium every day. The expression level of MyoD transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

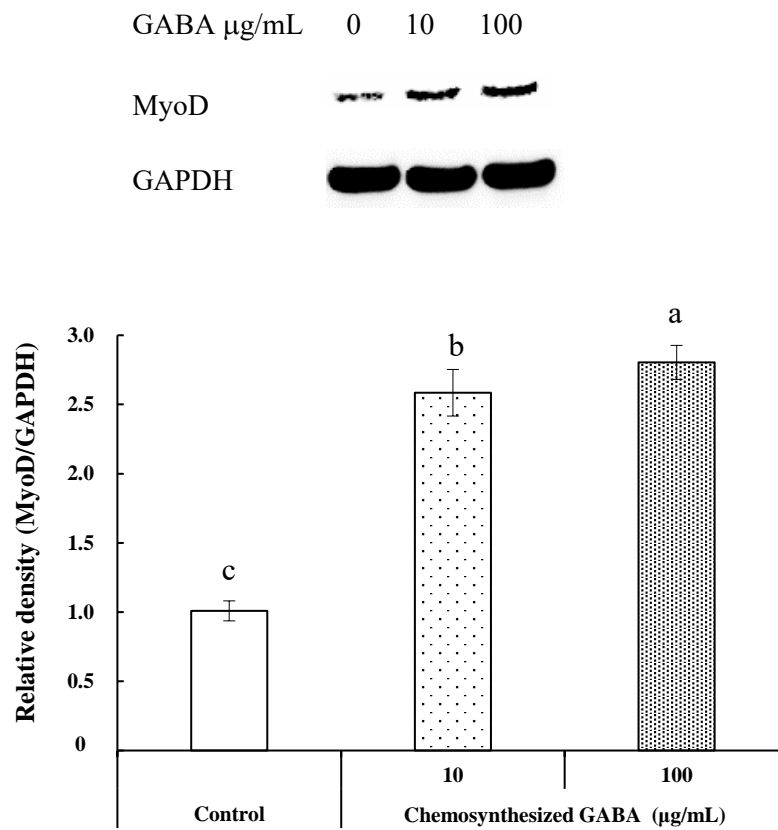


Figure 10-3. Effects of chemosynthesized GABA on myogenic determination gene number 1 (MyoD) protein expression in C2C12 myoblasts by Western blotting.

Cells were cultured for 5 days with 10–100 µg/mL of chemosynthesized GABA, changing the medium every day. MyoD protein levels in C2C12 myoblasts were analyzed by Western blotting. The relative protein expression levels were normalized to the GAPDH protein. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

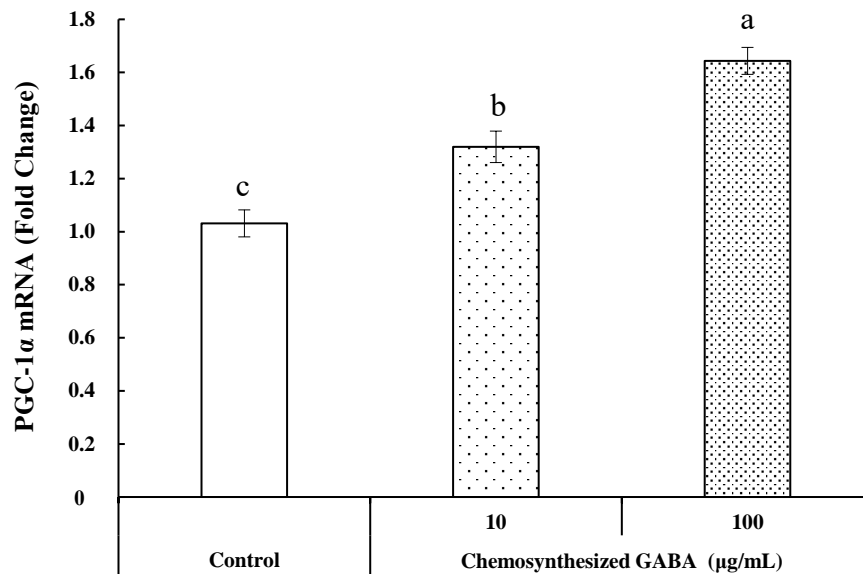


Figure 10-4. Effects of chemosynthesized GABA on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) mRNA expression in C2C12 myoblasts.

Cells were cultured for 4 days with 10–100  $\mu\text{g/mL}$  of chemosynthesized GABA, changing the medium every day. The expression level of PGC-1 $\alpha$  transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

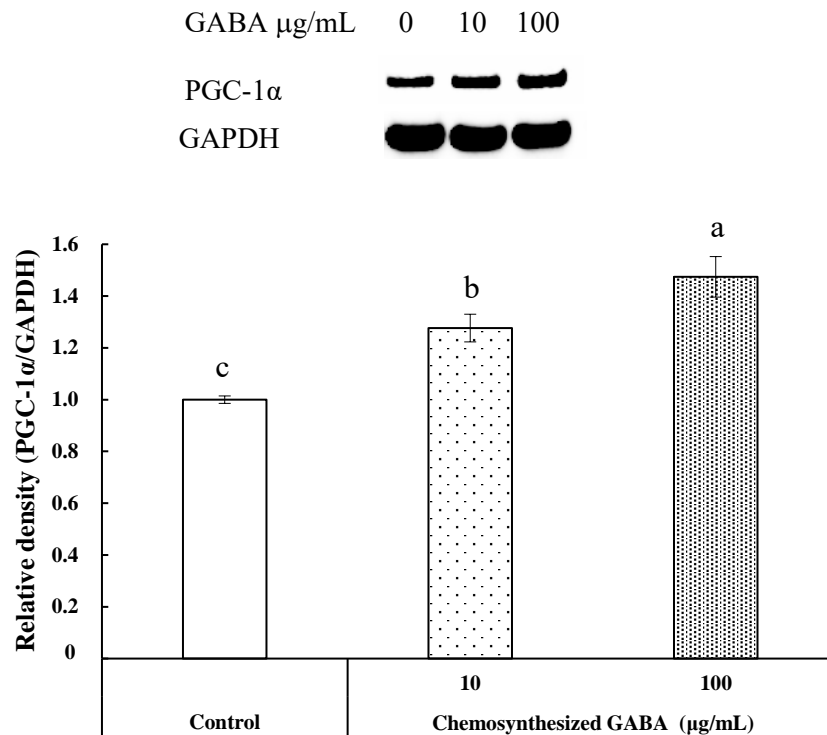


Figure 10-5. Effects of chemosynthesized GABA on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) protein expression in C2C12 myoblasts by Western blotting.

Cells were cultured for 5 days with 10–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chemosynthesized GABA, changing the medium every day. PGC-1 $\alpha$  protein levels in C2C12 myoblasts were analyzed by Western blotting. The relative protein expression levels were normalized to the GAPDH protein. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 10.3.3 GABA が C2C12 細胞における myostatin mRNA およびタンパク質の発現に与える影響

C2C12 細胞に 10–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の GABA を添加して培養した後、MyoD および PGC-1  $\alpha$  と同様の方法で試験を行った結果、GABA は control と比較して、myostatin mRNA (Figure 10-6) およびタンパク質 (Figure 10-7) の相対発現量を濃度依存的に有意に減少させた。

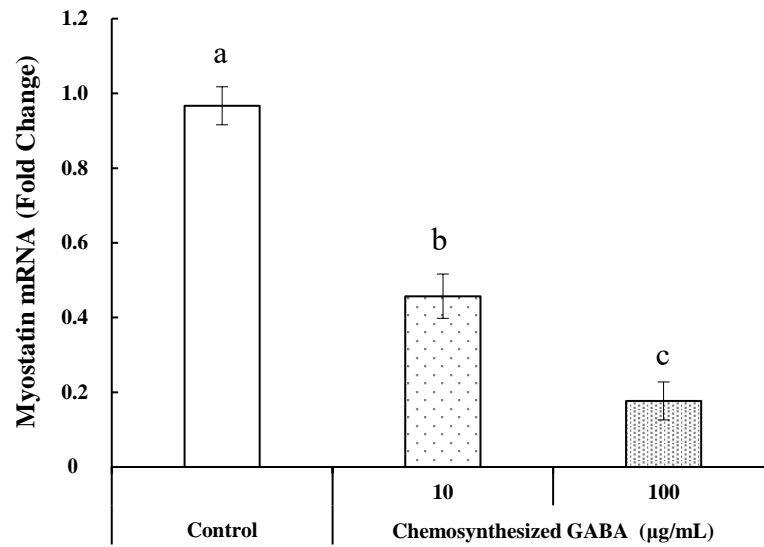


Figure 10-6. Effects of chemosynthesized GABA on myostatin mRNA expression in C2C12 myoblasts.

Cells were cultured for 4 days with 10–100 µg/mL of chemosynthesized GABA, changing the medium every day. The expression level of myostatin transcripts was analyzed using real-time PCR, normalized to the GAPDH gene. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



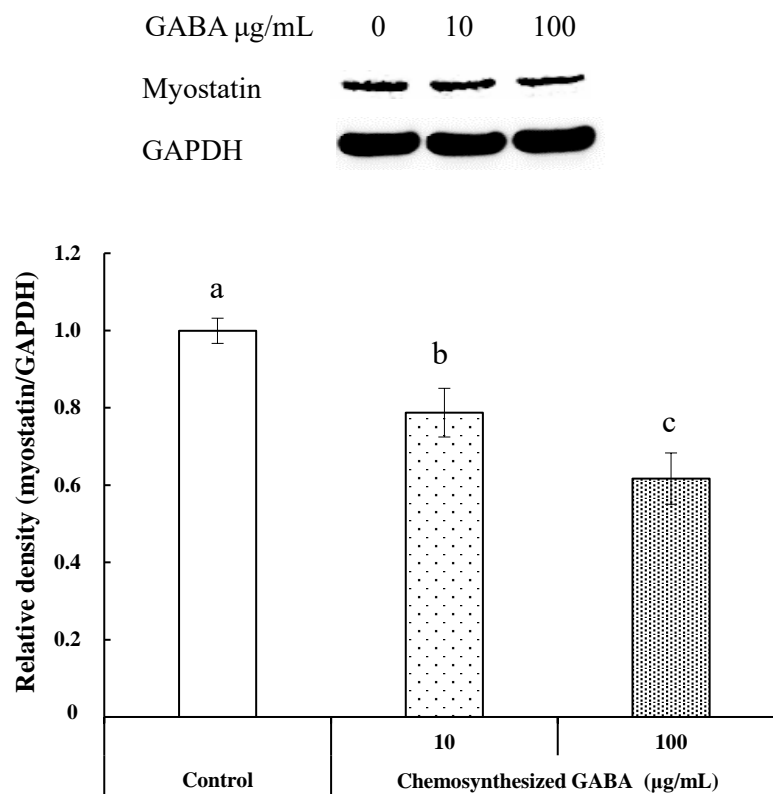


Figure 10-7. Effects of chemosynthesized GABA on myostatin protein expression in C2C12 myoblasts by Western blotting.

Cells were cultured for 5 days with 10–100 µg/mL of chemosynthesized GABA, changing the medium every day. Myostatin protein levels in C2C12 myoblasts were analyzed by Western blotting. The relative protein expression levels were normalized to the GAPDH. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Different letters (a, b, or c) above the columns indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

## 10.4 考察

100 µg/mL および 1000 µg/mL の GABA の添加により、C2C12 細胞の増殖が有意に増加した。単核細胞である C2C12 細胞は他の細胞と融合して多核筋管を形成し、筋管の数が増加した後、それらが結合して最終的には筋肉量が増加する。また、初めに述べた通り、C2C12 細胞に酸化ストレスを与えた研究では control 区に比べて GABA 添加区の細胞生存率が約 90 % 増加し、細胞保護効果が認められたことが報告されている<sup>122)</sup>。一方、本研究では酸化ストレス非存在下で C2C12 細胞に GABA を添加した際、細胞増殖が促進されることを明らかにした。

C2C12 細胞に 10–100 µg/mL の GABA を添加した結果、MyoD mRNA およびタンパク質は GABA の濃度依存的に有意に増加した。筋肉タンパク質合成は MyoD などの筋原性転写因子の発現によって媒介される<sup>127)</sup>。さらに、MyoD は成人の骨格筋収縮を促進するエネルギーの生成もサポートする<sup>127)</sup>。つまり、GABA は MyoD の発現量を増加させ、筋タンパク質の合成を促進することが示唆された。本試験の結果は GABA が骨格筋の発達を活性化し、骨格筋の収縮エネルギーの供給を促進する可能性を示唆するものである。

C2C12 細胞に 10–100 µg/mL の GABA を添加した結果、PGC-1α mRNA およびタンパク質は GABA の濃度依存的に有意に増加した。PGC-1α は骨格筋量とエネルギー代謝の正の調節因子であり、筋管において PGC-1α 発現量が増加することはタンパク質合成と筋管直径を増加させることにつながる<sup>125)</sup>。また、運動によって活性酸素種 (ROS) の産生が増加し、それによって PGC-1α の発現量が増加することが報告されている<sup>128)</sup>。一方、本研究では ROS といった刺激を与えない条件下で C2C12 細胞に GABA を添加し、PGC-1α 発現量が増加した。つまり、運動の有無に関わらず、GABA が直接的にミトコンドリアを増加させる可能性が考えられた。

C2C12 細胞に 10–100 µg/mL の GABA を添加した結果、myostatin の mRNA およびタンパク質は GABA 濃度依存的に有意に減少した。myostatin は筋肉の成長と代謝の負の調節因子であり<sup>126)</sup>、ミトコンドリアの生合成と代謝も調節

する<sup>129)</sup>。デキサメタゾン<sup>129)</sup>は合成副腎皮質ホルモン剤（ステロイド）であり、筋委縮症を引き起こすことが知られている<sup>130)</sup>。デキサメタゾンを添加した C2C12 筋管では myostatin の発現量が増加し、MyoD の発現量が減少する<sup>130)</sup>。一方、C2C12 にフィトケミカルの 1 つであるスルフォラファンを添加すると myostatin の発現量が減少し、MyoD の発現量が増加し、筋管の直径が増加したことが報告されている<sup>130)</sup>。これは myostatin 発現量の減少が MyoD 発現量を増加させ、筋肥大をもたらすことを示唆する。従って、GABA は myostatin の発現量を減少させ、MyoD の発現量を増加させることから、スルフォラファンと同様に、筋肥大を引き起こす可能性が考えられた。

冒頭で述べたように、1 日あたり約 50 mg の GABA を含む発酵昆布粉末を摂取し、定期的な運動を控えたヒトでは除脂肪体重、すなわち、筋肉量が増加したことが報告されている<sup>24)</sup>。引用文献 24 の著者らは作用機序について、GABA が成長ホルモンの分泌を促進し、IGF-1 と筋肉タンパク質を増加させることに起因するということを論文で述べた<sup>24)</sup>。一方、本研究において、C2C12 細胞に GABA に添加すると、細胞増殖および MyoD および PGC-1 $\alpha$  の発現が促進され、myostatin の発現が抑制された。従って、GABA は成長ホルモン分泌促進作用による間接的な効果のみならず、筋芽細胞に与える直接的な効果によって筋肉量を増加させることが本研究により示唆された。

第 8 および 9 章 考察で述べた通り、GABA 摂取による GABA 血中濃度の上昇<sup>99)</sup> と、様々な末梢組織での受容体の発現<sup>100)</sup>が報告されている。従って、摂取した GABA が血液を介して筋肉組織に運ばれ、受容体と結合することで筋肉量を増加させることや筋肉量の低下を抑制する可能性が考えられた。ただし、その調節メカニズムを理解するには、C2C12 細胞で発現する主要な GABA 受容体を特定する必要がある。

## 10.5 小括

GABA は C2C12 細胞の増殖および MyoD と PGC-1 $\alpha$  の発現量を有意に増加させ、myostatin の発現量を有意に減少させた。摂取した GABA は血中に入る<sup>99)</sup>

ことと、各組織では GABA 受容体が発現している<sup>100)</sup>ことが報告されている。つまり、GABA が筋肉細胞に到達して受容体と結合し、機能性を発揮する可能性が考えられる。本研究結果は GABA を摂取することにより、GABA が筋芽細胞に直接的に作用して骨格筋量を増加させ、減少を抑制することを示唆するものである。また、本研究では運動といったストレスがない環境下で試験を行った。つまり、運動の有無に関わらず、GABA が筋肉量を増加させる可能性を示唆するものである。ただし、ヒトにおける効果を検討するためには二重盲検試験といったさらなる研究が必要である。

## 第 11 章 総括

本研究では大麦焼酎粕の有効利用を目的として、発酵大麦エキスである FBE に含まれる健康機能性成分の抽出および同定を行い、機能性を実験的に証明した。また、FBE を培地として発酵生産される GABA の新たな機能性を探索し、実験的に証明した。

第 2 章では、FBE に含まれる抗ロコモ成分の抽出および同定について試験を行った。MMP-13 はリウマチおよび変形性膝関節症の発症に関与する軟骨分解酵素である<sup>21), 22)</sup>。そこで、OUMS-27 細胞における MMP-13 発現抑制効果を指標として有効成分の探索を行った結果、FBE-P40-5 に含まれるピログルタミンペプチド pEPYP (pyro-Glu-Pro-Tyr-Pro、分子量 486、分子式 C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) であることが判明した。

第 3 章では、化学合成された pEPYP を用い、OUMS-27 細胞における MMP-13 発現抑制効果と、TALL-1 細胞における抗炎症性サイトカインである IL-10 発現促進効果の検討を行った。その結果、pEPYP は MMP-13 の発現を抑制し、IL-10 の発現を促進することが遺伝子およびタンパク質レベルで明らかとなった。つまり、pEPYP は軟骨の分解を抑制する効果と抗炎症効果を有することが示唆された。

第 4 章では、リウマチ (CIA) モデルラットに pEPYP 含有飼料を強制経口投与し、抗ロコモ効果の検討を行った。その結果、有意差はなかったものの、control 群と比べ、リウマチ発症初期に増加する浮腫スコアおよび抗 II 型コラーゲン IgG 抗体量が低値に抑えられた。従って、pEPYP を摂取することによってロコモの予防、改善に効果を示す可能性が示唆された。

第 5 章では、膝関節に痛みや違和感のある 40 歳から 69 歳の健常な男女に、pEPYP を含むハードカプセルを 12 週間連続摂取させた際、膝関節に与える影響を検討した。プラセボを control として比較検討した結果、JKOM の痛み・こわばりに関するスコアにおいて、pEPYP 摂取群はプラセボ群と比べて有意に改善した。さらに層別解析では、痛み・こわばりの程度が軽い被験者層において、

pEPYP 摂取群はプラセボ群と比べて JKOM の痛み・こわばりスコアおよび QOL スコアが有意に改善した。従って、pEPYP を摂取することにより、日常生活における膝関節の痛みやこわばりの発生を予防あるいは改善させる効果が示唆された。

第 6 章では、FBE に含まれる尿酸排出促進成分の抽出および同定について研究を行った。FBE-P の摂取により、血清尿酸値が低下することが報告されている<sup>53)、54)</sup>。ABCG2 は腸上皮に発現する尿酸排泄機構の一つである<sup>51)</sup>。そこで Caco-2 細胞における ABCG2 相対発現量を評価指標として、FBE-P 中の尿酸排泄促進物質を探索した。その結果、FBE-P 中の ABCG2 発現促進成分はピログルタミンプロリン pEP (pyro-Glu-Pro、分子量 226、分子式 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) であり、FBE-P 粉末には 0.6 % (w/w) 含まれていることが分かった。

第 7 章では、Caco-2 細胞を用い、化学合成された pEP が ABCG2 の発現に与える影響を検討した。その結果、pEP は ABCG2 の mRNA およびタンパク質を有意に増加させた。従って、本研究結果は pEP が腸管での尿酸排泄を促進する可能性があることを示唆する。しかし、ヒトにおける pEP の経口摂取の効果を検討するためには二重盲検試験が必要である。

第 8 章では、大麦焼酎粕を培地とし、乳酸菌により発酵生産された GABA が皮膚の弾力を維持する効果について、作用機序を検討する試験を行った。日頃から疲労や睡眠の不調を感じ、肌荒れの自覚がある成人女性に摂取させた結果、頬の粘弾性の悪化を抑制することが報告されている<sup>74)</sup>。また、作用機序について、GABA のストレス軽減効果および睡眠の質改善効果といった間接的な効果によって、肌の粘弾性の悪化を抑制することが推測されていた。そこで本研究では、GABA が NHDF 細胞に直接的に与える影響について検討を行った。I 型コラーゲンおよび MMP-1 mRNA 相対発現量を評価指標として研究を行った結果、GABA は COL1A1 の発現量を増加させ、MMP-1 の発現量を低下させた。従って、GABA の摂取が I 型コラーゲンの合成と分解のバランスを制御することにより、皮膚の弾力性を改善する可能性が示唆された。つまり、GABA は間接的な効果だけではなく、直接的な効果によって肌の弾力を維持し、弾力の低下を抑制する

と考えられた。

第9章では、化学合成された GABA および FBE を培地として発酵生産された GABA が NHDF 細胞におけるエラスチン関連 mRNA およびタンパク質の発現に与える影響を検討した。その結果、いずれの GABA も ELN、FBN-1、FBN-2、FBLN-5 の mRNA の相対発現量を有意に増加させ、エラスチンタンパク質の相対発現量を有意に増加させた。本研究によって、GABA は NHDF 細胞による弾性線維形成を促進することが示唆された。つまり、第8章と同様、GABA は間接的な効果だけではなく、直接的な効果によって、肌の弾力を維持し、弾力の低下を抑制すると考えられた。また本研究では、化学合成された GABA と発酵生産された GABA の両方を使用した。いずれの GABA も遺伝子およびタンパク質レベルで同様の効果を示したことから、本効果をもたらす成分は GABA であり、GABA 以外の乳酸菌発酵生産物ではないことを明らかにした。

第10章では、化学合成された GABA が筋芽細胞に与える影響を検討した。健康女性が GABA を摂取した結果、除脂肪体重が増加した<sup>110)</sup>。この作用は GABA による成長ホルモンなどの分泌促進効果、つまり間接的な効果に起因すると報告された<sup>110)</sup>。本研究では、GABA が筋芽細胞に直接的に与える影響について検討を行った。その結果、GABA は C2C12 細胞の増殖を促進し、MyoD と PGC-1 $\alpha$  の発現を促進し、myostatin の発現を抑制した。これらの結果は、GABA が骨格筋量を増加させ、その減少を抑制すること、つまり GABA が筋肉に直接的な効果を与えることを示唆するものである。ただし、ヒトにおける効果を検討するためには、二重盲検試験といったさらなる研究が必要である。

以上の研究によって、大麦焼酎粕精製物である FBE には抗ロコモ成分 pEPYP および尿酸値低減成分 pEP が含まれていることを見出した。つまり、焼酎粕の機能性食品素材としての新たな用途を開発することができた。ただし、FBE に含まれる pEPYP および pEP は少ないため、有効摂取量を摂るためには FBE-P の粉末を 900–1400 mg/day 摂取する必要がある。一方、FBE-P 粉末を製造するためには、非常に多くの原料が必要となる上、精製、濃縮、粉末化に設備、労力、時間を要するため、製造原価が非常に高い。この課題については、

FBE からの精製および抽出ではなく、麹菌発酵および麹菌が作る酵素による反応などといった新たな製法によって、純度および収率の高い素材を収得することができるよう検討する必要がある。

また、GABA は肌の弾力性および筋肉量を維持する機能を有しており、本研究によってその作用機序が明らかとなった。つまり、本論文は焼酎製造の二次発酵産物である GABA が持つ機能性に関して、信憑性を高めるとともに、安全性に関わる問題を予測することが可能となり、ひいては消費者の信頼度を高めることに寄与するものである。ただし、培地として使用する FBE は少量であることから、本研究成果によって大麦焼酎粕の産廃処理量を減少させることは困難である。しかし、培養する乳酸菌の種類によっては増殖率を非常に高めることから、有用生産物の生産量も増加する可能性が高い。GABA 製造を好例として、他の乳酸菌素材メーカーに FBE を培地として広く利用して頂きたいと考えている。

なお、本研究で明らかとなった pEPYP およびその用途は特許第 6795670 号、発明の名称を「テトラペプチド化合物及びその用途」として特許査定された。同様に、GABA の肌弾力に関する作用は特許第 6944240 号、発明の名称を「GABA を有効成分とする生体組織の線維性構造タンパク質の含有量を維持または増加するための剤」として特許査定された。さらに、GABA が筋芽細胞に与える作用は特許第 7308329 号、発明の名称を「GABA を有効成分とするサルコペニア予防または改善剤」として特許査定された。

また、pEPYP を含有するサプリメントを機能性表示食品として消費者庁に届出し、受理された（届出番号：H715）。届出には本研究の内容を科学的根拠、または作用機序の説明書類に記載し、本研究成果を実際に活用している。GABA の肌弾力（G1362 など）および筋肉量の維持作用についても機能性表示食品として受理されている。



## 引用文献

1. 林國興. 総説 焼酎粕の飼料利用. 日本暖地畜産学会報, **55**, 101–107 (2012)
2. [http://www.tres-ltd.jp/biomass/h21/jirei/pdf/46\\_0\\_45.pdf](http://www.tres-ltd.jp/biomass/h21/jirei/pdf/46_0_45.pdf)
3. 株式会社栄電社. 戦略的基盤技術高度化支援事業（経済産業省）焼酎粕乳酸発酵液（SPL液）の飼料・肥料利用について (2021)
4. 塩盛弘一郎, 池田勇人. プロジェクトニッポン 宮崎県 地域課題「焼酎廃液」に着目 日本初技術を開発した建設会社. 月刊事業構想, **6** (2015)
5. 産経新聞. 崇城大院生らのバイオベンチャー始動 焼酎粕で「光合成細菌」培養. THE SANKEI NEWS, 2018/5/18
6. Circular Economy Hub. 「焼酎粕」を電池の材料に 廃棄処理を減らす薩摩酒造の取り組み. Forbes JAPAN, 2021.08.13
7. 塩盛弘一郎. リポート バイオマス燃料製造による焼酎粕処理プロセスの開発と焼酎バイオエナジー宮崎日南工場の開設—あなぶきグループと宮崎大学との連携—, 国立研究開発法人科学技術振興機構 産学官連携ジャーナル, 2021年9月15日
8. 森村茂. 発酵による食品産業副生物の機能性食品への転換. 温古知新, **47**, 61–67 (2010)
9. 池田浩二, 中野隆之, 藤井信ら. 米麴を添加した芋焼酎粕飲料の生理作用. 日本醸造協会誌, **107**, 355–361 (2012)
10. Takaya Y, Furukawa T, Miura S, et al. Antioxidant constituents in distillation residue of Awamori spirits. *J Agric Food Chem*, **55**, 75–79 (2007)
11. 井口隆文, 川田あゆみ, 有満瞳ら. オバルブミン感作鼻炎マウスに対する大麦醗酵エキスの効果. 日本食品科学工学会誌, **54**, 61–66 (2007)
12. 古水雄志, 朝長由夏, 田上修ら. 焼酎粕有効成分の美白効果に関する基礎研究. 化学工学論文集, **33**, 168–172 (2007)
13. Yokoi H, Aratake T, Nishio S, et al. Chitosan production from shochu distillery wastewater by fungi. *J Ferment Bioeng*, **85**, 246–249 (1998)

14. Yoshimoto M, Kurata-Azuma T, Fujii M, et al. Phenolic Composition and Radical Scavenging Activity of Sweetpotato-Derived Shochu Distillery By-Products Treated with Koji. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **68**, 2477–2483 (2004)
15. 外菌英樹. 肝機能改善素材「発酵大麦エキス・アルコケア」～人とお酒の良い関係づくりを目指して. *New Food Industry*, **56**, 20–26 (2014)
16. 古田吉史, 外菌理佐, 高下秀春ら. 大麦焼酎蒸留粕に含まれる乳酸菌・ビフィズス菌増殖促進因子の探索. *生物工学会誌*, **85**, 161–166 (2007)
17. 望月聡, 宮本安紀子, 萩原美和子ら. オロチン酸投与によるラット脂肪肝に対する大麦焼酎粕の抑制効果. *日本醸造協会誌*, **96**, 559–563 (2001)
18. Hokazono H, Omori T, Suzuki H, et al. Effects of Fermented Barley Extract on Antioxidant Status in Mice. *Food Sci Technol Res*, **15**, 599–604 (2009)
19. 植田一馬, Ardyansyah Ardy, 白川仁ら. 発酵大麦エキスは脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの高血压症を改善する. *日本農芸化学会大会要旨集*, **2013**, 1517 (2013)
20. Maruoka N, Watanabe B, Ando D, et al. Effects of a pyroglutamyl pentapeptide isolated from fermented barley extract on atopic dermatitis-like skin lesions in hairless mouse. *Biosci Biotechnol Biochem*, **84**, 1696–1705 (2020)
21. Hokazono H, Omori T and Ono K. Anti-hyperuricemic effect of fermented barley extract is associated with increased urinary uric acid excretion. *Food Sci Technol Res*, **16**, 295–304 (2010)
22. Hokazono H, Omori T, Yamamoto T, et al. Effects of a Fermented Barley Extract on subjects with slightly high serum uric acid or mild hyperuricemia. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 828–834 (2010)
23. 外菌英樹, 上原絵理子.  $\gamma$ -アミノ酪酸の経口摂取による皮膚状態改善効果. *日本食品科学工学会誌*, **63**, 306–311 (2016)
24. Choi WC, Reid SNS, Ryu JK et al. Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched fermented sea tangle (*Laminaria japonica*) on brain derived neurotrophic factor-related muscle growth and lipolysis in middle aged women. *Algae*, **31**, 1–13 (2016)

25. 厚生労働省, 生活習慣病予防のための健康情報サイト「健康寿命」  
<https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/dictionary/hale/ya-031.html>
26. 厚生労働省, 新健康フロンティア戦略賢人会議: 新健康フロンティア戦略.  
平成 19 年 4 月 18 日.
27. Nakamura K. A “super-aged” society and the “locomotive syndrome”. *J Orthop Sci*,  
**13**, 1–2 (2008)
28. 厚生労働省, 平成 25 年 国民生活基礎調査の概況.  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa13/>
29. 中村耕三. ロコモティブシンドローム (運動器症候群) . 日本老年医学会雑誌, **49**, 393–401 (2012)
30. 張英士, 石井隆雄, 徳橋泰明. ロコモシ리즈 1 変形性関節症. 日大医誌,  
**72**,77–80 (2013)
31. Du C, Smith A, Avalos M, et al. Blueberries Improve Pain, Gait Performance, and  
Inflammation in Individuals with Symptomatic Knee Osteoarthritis. *Nutrients*, **11**,  
290 (2019)
32. 中村洋. 運動器のアンチエイジング研究:運動のアンチエイジング効果. 医学のあゆみ, **261**, 632–637 (2017)
33. Giriwono PE, Shirakawa H, Hokazono H, et al. Fermented Barley Extract  
Supplementation Maintained Antioxidative Defense Suppressing  
Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Liver Injury in Rats. *Biosci Biotechnol  
Biochem*, **75**, 1971–1976 (2011)
34. Drevet S, Gavazzi G, Grange L, et al. Reactive oxygen species and NADPH oxidase  
4 involvement in osteoarthritis. *Exp Gerontol*, **111**, 107–117 (2018)
35. Vandenbroucke RE and Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix  
metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov*, **13**, 904–927 (2014)
36. Chan CM, Macdonald CD, Litherland GJ, et al. Cytokine-induced MMP13  
Expression in Human Chondrocytes Is Dependent on Activating Transcription Factor 3  
(ATF3) Regulation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **292**, 1625–

- 1636 (2017)
37. 伊藤崇, 宇月美和, 嶋村正ら. 慢性関節リウマチ血清 関節液中の Matrix metalloproteinase-13 の動態. *Connective tissue*, **34**, 90 (2002)
  38. Ihaka R and Gentleman R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J Comp Graph Stat*, **5**, 299–314 (1996)
  39. 岩崎由希子, 藤尾圭志, 岡村僚久ら. IL-10 産生制御性 T 細胞の治療応用について. *日本臨床免疫学会誌*, **36**, 40–46 (2013)
  40. Jüngel A, Ospelt C, Lesch M, et al. Effect of the oral application of a highly selective MMP-13 inhibitor in three different animal models of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum.* **69**, 898–902 (2010)
  41. Adorasio S, Fierabracci A, Muscari I, et al. Artocarpus tonkinensis Protects Mice Against Collagen-Induced Arthritis and Decreases Th17 Cell Function. *Frontiers in Pharmacology (Web)*, **10**, 503 (2019)
  42. Hsiao HB, Wu JB and Lin WC. Anti-arthritic and anti-inflammatory effects of (-)-Epicatechin-3-O- $\beta$ -d-allopyranoside, a constituent of *Davallia formosana*. *Phytomedicine*, **52**, 12–22 (2019)
  43. 松元優子, 今永知俊, 川尻龍典ら. 抗 II 型コラーゲン抗体の測定が診断と病勢評価に有用であった再発性多発性軟骨炎の 1 例. *日呼吸会誌*, **40**, 45–49 (2002)
  44. Ghimire S, Matos C, Caioni M, et al. Indoxyl 3-sulfate inhibits maturation and activation of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology*, **223**, 239–245 (2018)
  45. Lorenzetti R, Janowska I, Smulski CR, et al. Abatacept modulates CD80 and CD86 expression and memory formation in human B-cells. *J Autoimmun.*, **101**, 145–152 (2019)
  46. Choi B, Shin MK, Kim EY, et al. Elevated Neuropeptide Y in Endothelial Dysfunction Promotes Macrophage Infiltration and Smooth Muscle Foam Cell Formation. *Frontiers in Immunology (Web)*, **10**, 1701 (2019)

47. Mei WY, Yu MJ, Yao S, et al. Anti-inflammatory Effects of a Small Molecule Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist on Adjuvant-Induced Rheumatoid Arthritis in Rats. *Chem Pharm Bull*, **66**, 410–415 (2019)
48. Li YN, Fan ML, Liu HQ, et al. Dihydroartemisinin derivative DC32 inhibits inflammatory response in osteoarthritic synovium through regulating Nrf2/NF- $\kappa$ B pathway. *International Immunopharmacology*, **74**, 105701 (2019)
49. 赤居正美. 疾患特異的・患者立脚型変形性膝関節症患者機能評価尺度; JKOM(Japanese Knee Osteoarthritis Measure). *運動療物理療*, **16**, 55-62 (2005)
50. 腰野富久. OA 膝治療成績判定基準. *日整会誌*, **62**, 900–902 (1988)
51. 大淵 修一. 厚生労働省 運動器の機能向上マニュアル(改訂版). 平成 21 年 3 月 31 日
52. 濱崎伸明, 糸満盛憲, 須田久美ら. 日本版膝関節機能尺度(JKOM)の重症度に対する感度の検討. *理学療法*, **33**, 223 (2006)
53. Jinwei X, Zeyu H, Xijie Y, et al. Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **46**, 36–44 (2019)
54. Prado SA, Amaral MV, Pereira ANC, et al. Whole Body Vibration Training on Muscle Strength and Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Elderly Woman With Knee Osteoarthritis: A Randomized Clinical Trial Study. *Frontiers in Physiology (Web)*, **10**, 756 (2019)
55. 鹿取信, 馬嶋正隆. 誘導型シクロオキシゲナーゼ-2 の多彩な役割とその選択的阻害薬の効果. *日薬理誌*, **109**, 247–258 (1997)
56. Chen J, Si M, Wang Y, et al. Ginsenoside metabolite compound K exerts anti-inflammatory and analgesic effects via downregulating COX2. *Inflammopharmacology*, **27**, 157–166 (2019)
57. Jing R, Ban Y, Xu W, et al. Therapeutic effects of the total lignans from *Vitex negundo* seeds on collagen-induced arthritis in rats. *Phytomedicine*, **58**, 152825 (2019)
58. 金景成, 井須豊彦. 脊髄外科研究に用いられるスコアリングシステムおよび

- その特徴②腰椎疾患の評価システム. *Spinal Surgery*, **29**, 18–25 (2015)
59. Hancock GE, Hepworth T and Wembridge K. Accuracy and reliability of knee goniometry methods. *J Exp Orthop*, **19**, 46 (2018)
60. Ayabe T, Ohya R and Ano Y.  $\beta$ -lactolin, a whey-derived glycine-threonine-tryptophan-tyrosine lactotetrapeptide, improves prefrontal cortex-associated reversal learning in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, **84**, 1039–1046 (2020)
61. Saito Y, Tanaka A, Node K, et al. Uric acid and cardiovascular disease: a clinical review. *J Cardiol*, **78**, 51–57 (2021)
62. Kojima S, Matsui K, Hiramitsu S, et al. Febuxostat for cerebral and cardiorenovascular events prevention study. *Eur Heart J*, **40**, 1778–1786 (2019)
63. Choi HK, Liu S and Curhan G. Intake of purine-rich foods, protein, and dairy products and relationship to serum levels of uric acid: the Third national health and nutrition examination survey. *Arthritis Rheum*, **52**, 283–289 (2005)
64. Clebak KT, Morrison A and Croad JR. Gout: rapid evidence review. *Am Fam Physician*, **102**, 533–538 (2020)
65. Sun BG, Meng J, Xiang T et al. Acupuncture of the five Shu Acupoints in spleen meridian to lower blood uric acid level. *Ann Palliat Med*, **3**, 22–27 (2014)
66. Eckenstaler R and Benndorf RA. The role of ABCG2 in the pathogenesis of primary hyperuricemia and gout-an update. *Int J Mol Sci*, **22**, 6678 (2021)
67. Ichida K, Matsuo H, Takada T et al. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat Commun*, **3**, 764 (2012)
68. Wan S, Fang Y, Yu X, et al. The flavonoid-rich fraction from rhizomes of *Smilax glabra* Roxb. ameliorates renal oxidative stress and inflammation in uric acid nephropathy rats through promoting uric acid excretion. *Biomed Pharmacother*, **111**, 162–168 (2019)
69. Ogura J, Kuwayama K, Takaya A, et al. Intestinal ischemia-reperfusion increases efflux for uric acid via paracellular route in the intestine, but decreases that via transcellular route mediated by BCRP. *J Pharm Pharm Sci*, **15**, 295–304 (2012)

70. Zhang J, Sun-Waterhouse D, Feng Y, et al. The umami intensity enhancement of peanut protein isolate hydrolysate and its derived fractions and peptides by Maillard reaction and the analysis of peptide (EP) Maillard products. *Food Res Int*, **120**, 895–903 (2019).
71. Moore A, Luckett CR and Munafo JP, Jr. Taste-active dipeptides from hydrolyzed mushroom protein enhance saltiness. *J Agric Food Chem*, **69**, 11947–11959 (2021)
72. Shirako S, Kojima Y, Tomari N, et al. Pyroglutamyl leucine, a peptide in fermented foods, attenuates dysbiosis by increasing host antimicrobial peptide. *NPJ Sci Food*, **3**, 18 (2019)
73. Kiyono T, Hirooka K, Yamamoto Y, et al. Identification of pyroglutamyl peptides in Japanese rice wine (Sake): presence of hepatoprotective pyroGlu-Leu. *J Agric Food Chem*, **61**, 11660–11667 (2013)
74. Gheyntachi E, Naseri M, Karimi-Busheri F, et al. Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines. *Cancer Cell Int*, **21**, 204 (2021)
75. Yano H, Tamura Y, Kobayashi K, et al. Uric acid transporter ABCG2 is increased in the intestine of the 5/6 nephrectomy rat model of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*, **18**, 50–55 (2014)
76. Mozner O, Bartos Z, Zambo B, et al. Cellular processing of the ABCG2 transporter-potential effects on gout and drug metabolism. *Cells*, **8**, 1215 (2019)
77. Ramanathan S, Pooyan S, Stein S, et al. Targeting the sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT) for improving the oral absorption properties of a retro-inverso tat nonapeptide. *Pharm Res*, **18**, 950–956 (2001)
78. Sato K, Egashira Y, Ono S, et al. Identification of a Hepatoprotective Peptide in Wheat Gluten Hydrolysate against d-Galactosamine-Induced Acute Hepatitis in Rats. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6304–6310 (2013)
79. 古田吉史, 丸岡生行, 中村彰宏ら, 大麦焼酎蒸留粕に由来する発酵大麦エキスの微生物用培地としての利用, 生物工学会誌, **87**, 16–19 (2009)

80. 古田吉史, 丸岡生行, 中村彰宏ら, 乳酸菌を利用した焼酎蒸留粕の高付加価値素材への転換プロセスの構築, *生物工学会誌*, **8**, 114-120 (2010)
81. Erdo SL. Peripheral GABAergic mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*, **6**, 205–208 (1985)
82. Hokazono H, Omori T and Ono K. Effects of single and combined administration of fermented barley extract and g-aminobutyric acid on the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 135–139 (2010)
83. Nakamura H, Takishima T, Kometani T, et al. Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with gamma-aminobutyric acid (GABA) in humans : assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin. *A Int J Food Sci Nutr*, **60**, 106–113 (2009)
84. Yamatsu A, Yamashita Y, Maru I, et al. The improvement of sleep by oral intake of GABA and Apocynum venetum leaf extract. *J Nutr Sci Vitaminol*, **61**, 182–187 (2015)
85. 針谷毅, 平尾哲二, 勝山雅子ら. アトピー性皮膚炎患者における心身の状態と皮膚症状の関連性について. *アレルギー*, **49**, 463–471 (2000)
86. 相生章博, 古川福実, 心理的ストレスが皮膚防御機能に及ぼす影響-過密ストレス負荷マウスモデルを用いた検. *和歌山医学*, **53**, 113–120 (2002)
87. 佐藤育子, 佐々木昌世, 早尾弘子ら. 看護師におけるストレスと肌荒れの関係. *月刊ナーシング*, **26**, 98–103 (2006)
88. Gupta MA and Gupta AK. Sleep-wake disorders and dermatology. *Clin Dermatol*, **31**, 118–126 (2013)
89. 吉田和恵. アトピー性皮膚炎の皮膚バリアと表皮樹状細胞, *アレルギー*, **66**, 995–1000 (2017)
90. 田中浩, 岡田富雄. 活性酸素の培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン代謝に及ぼす影響. *J Soc Cosmet Chem Jpn*, **28**, 172–177 (1994)
91. 西田紀貴, 嶋田一夫. コラーゲン結合タンパク質を介した生命プロセスの活性化機構. *生化学*, **80**, 483–492 (2008)
92. 富永直樹, 西山敏夫, 林利彦. 皮膚とコラーゲン. *繊維学会誌*, **42**, 237–242



(1986)

93. 飯塚舜介, 桑原正憲, 内田幸男. 魚うろこ由来コラーゲン過剰摂取の安全性. 米子医誌 *J Yonago Med Ass*, **68**, 64–72 (2017)
94. 深田楓子, 内山太郎, 上田修. コラーゲンペプチド, リンゴンベリーおよびアマラ果実エキス併用による皮膚状態改善効果. 応用薬理, **101**, 45–52 (2021)
95. 畑隆一郎, 居作和人, 高見沢紳治ら. 正常および強皮症患者皮膚線維芽細胞におけるコラーゲンマトリックスによるコラーゲン合成制御機構の研究 (厚生労働省 S). 強皮症調査研究 平成 13 年度研究報告書, 45–50 (2002)
96. Moon HJ, Lee SR and Shim SN. Fucoidan Inhibits UVB-Induced MMP-1 Expression in Human Skin Fibroblasts. *Biol Pharm Bull*, **31**, 284–289 (2008)  
doi: 10.1248/bpb.31.284.
97. Qin Z, Balimunkwe RM and Quan T. Age-related reduction of dermal fibroblast size upregulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin in vivo. *Br J Dermatol*, **177**, 1337–1348 (2017)  
doi: 10.1111/bjd.15379. Epub 2017 Nov 1.
98. 清水忠道. 光老化の臨床とメカニズム 真皮の光老化の分子メカニズム. 医学のあゆみ, **248**, 587–591 (2014)
99. 堀江健二, 東口伸二, 横越英彦ら. GABA の免疫および心の健康に及ぼす影響. *FOOD Style 21*, **7**, 64–68 (2003)
100. ONG J and KERR D I B. GABA-receptors in peripheral tissues. *Life Sciences*, **46**, 1489–1501 (1990)
101. 小倉有紀, 牟田恵子, 松永由紀子ら. 新規真皮モデルによる三次元エラスチン線維形成モデル. *J Soc Cosmet Chem Jpn*, **44**, 278–284 (2010)
102. Kielty CM, Sherratt MJ and Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci*, **115**, 2817–2828 (2002)
103. 甲斐原梢, 宮川賢治, 岡元孝二ら. コアセルベート特性に基づく生体材料. 高分子論文集, **48**, 311–317 (1991)
104. 中邨智之. 生体の伸縮性を生み出す仕組み—弾性線維形成の分子機構—.

- 日本化粧品学会誌, **43**, 14–17 (2019)
105. Tzaphidou M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. *Micron*, **35**, 173–177 (2004)
106. 川田 暁. 新・皮膚科セミナーウム 高齢者の皮膚老化—基礎から臨床まで  
2. 皮膚の老化とは—通常の老化と光老化の違い. 日本皮膚科学会雑誌, **132**, 2665–2669 (2022)
107. Cho S. The role of functional foods in cutaneous anti-aging. *J Lifestyle Med.* **4**, 8–16 (2014)
108. Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Eisner P, et al. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmetic Sci.* **37**, 455–464 (2015)
109. Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, et al. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol*, **22**, 497–504 (2005)
110. Fotopoulos P, Kim J, Hyun M et al. DPY-17 and MUA-3 interact for connective tissue-like tissue integrity in *C. elegans*; a model for Marfan syndrome. *Genes Genomes Genetics*, 2015 doi:10.1534/g3.115.01846596.
111. Starcher B, d'Azzo A, Keller P.W., et al. Neuraminidase-1 is required for the normal assembly of elastic fibers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008  
doi: 10.1152/ajplung.90346.2008
112. Sabatier L, Miosge N, Hubmacher D, et al. Fibrillin-3 expression in human development. *Matrix Biology*, **30**, 43–52 (2011)
113. Li J, Zhang Z, Liu Z, et al. Study of GABA in healthy volunteers: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Front Pharmacol.* **6**, 260 (2015)
114. Tsugane S. Why has Japan become the world's most long-lived country: insights from a food and nutrition perspective. *Eur J Clin Nutr*, **75**, 921–928 (2021)
115. Tsuji I. Epidemiologic Research on Healthy Life Expectancy and Proposal for Its Extension: A Revised English Version of Japanese in the Journal of the Japan Medical Association, *Japan Med Assoc J*, **148**, 1781–1784 (2019)

116. Nishikawa H, Fukunishi S, Asai A et al. Pathophysiology and mechanisms of primary sarcopenia (Review). *Int J Mol Med*, **48**, 156 (2021)
117. Sirago G, Toniolo L, Crea E et al. A short-term treatment with resveratrol improves the inflammatory conditions of Middle-aged mice skeletal muscles. *Int J Food Sci Nutr*, **18**, 1–8 (2022)
118. Kitamura A, Seino S, Abe T, et al. Sarcopenia: prevalence, associated factors, and the risk of mortality and disability in Japanese older adults. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **12**, 30–38 (2021)
119. Shimada M, Hasegawa T, Nishimura C et al. Anti-Hypertensive Effect of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA)-Rich Chlorella on High-Normal Blood Pressure and Borderline Hypertension in Placebo-Controlled Double Blind Study. *Clinical and Experimental Hypertension*, 2016 DOI: 10.1080/10641960902977908
120. Powers ME, Yarrow JF, McCoy SC et al. Growth hormone isoform responses to GABA ingestion at rest and after exercise. *Med Sci Sports Exerc*, **40**, 104–110 (2008)
121. Velloso CP. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Clin Pharmacol*, **154**, 557–568 (2008)
122. Choe H, Lee H, Lee J et al. Protective effect of gamma-aminobutyric acid against oxidative stress by inducing phase II enzymes in C2C12 myoblast cells. *J Food Biochem*, 2021 DOI: 10.1111/jfbc.13639.
123. Matsubara T, Urata M, Nakajima T et al. Geranylgeraniol-induced Myogenic Differentiation of C2C12 Cells. *In Vivo*, **32**, 1427–1431 (2018)
124. Legerlotz K and Smith HK. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. *Muscle Nerve*, **38**, 1087–1100 (2008)
125. Brown EL, Foletta VC, Wright CR et al. PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  Increase Protein Synthesis via ERR $\alpha$  in C2C12 Myotubes. *Front Physiol*, 2018 DOI: 10.3389/fphys.2018.01336.
126. Ryan AS and Li G. Skeletal muscle myostatin gene expression and sarcopenia in overweight and obese middle-aged and older adults. *JCSM Clin Rep*, **6**, 137–142

(2021)

127. Shintaku J, Peterson JM, Talbert EE et al. MyoD Regulates Skeletal Muscle Oxidative Metabolism Cooperatively with Alternative NF- $\kappa$ B. *Cell Reports*, **17**, 514–526 (2016)
128. Bouviere J, Fortunato RS, Dupuy C et al. Exercise-Stimulated ROS Sensitive Signaling Pathways in Skeletal Muscle. *Antioxidants*, 2021  
DOI:10.3390/antiox10040537
129. Wang L, Ma S, Ding Q et al. CRISPR/Cas9-mediated MSTN gene editing induced mitochondrial alterations in C2C12 myoblast cells. *Electronic Journal of Biotechnology*, **40**, 30–39 (2019)
130. Son YH, Jang EJ, Kim YW et al. Sulforaphane prevents dexamethasone-induced muscle atrophy via regulation of the Akt/Foxo1 axis in C2C12 myotubes. *Biomed Pharmacother*, **95**, 1486–1492 (2017)

## 謝辞

本論文を校閲、添削され、御懇切なる御指導を頂きました九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門発酵化学教授 竹川薫先生に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文を校閲・添削され、御指導をいただいた九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門細胞制御工学教授 片倉喜範先生、九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門発酵化学准教授 樋口裕次郎先生に深く感謝申し上げます。

本研究の多くは細胞実験によって行われました。細胞実験の手技、手法を御教授下さいました大分大学医学部マトリックス医学研究室 松尾哲孝准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究は全て三和酒類株式会社研究所において行われたものであり、会社からの支援なくして実施することはできませんでした。このような機会を与えて下さった三和酒類株式会社の役員様をはじめ、従業員の皆様に深く感謝の意を表します。特に、学位取得の希望を申し上げた際、竹川教授を快く御紹介下さり、また多大なる御支援を下さった高下秀春取締役に厚く御礼申し上げます。。

さらに入社から今日まであらゆる場面で多大なる御指導と御鞭撻を賜り、本論文をまとめるに際しても御支援を頂きました三和酒類株式会社三和研究所 外菌英樹副所長に深く感謝の意を表します。

最後に入社以来、あらゆる場面で実験に関する御助言を下さった三和酒類株式会社三和研究所ウェルビーイング研究室 中村彰宏室長、クロスオーバーセンター 丸岡生行主任研究員に深く御礼を申し上げます。

## 要約 (英文)

We investigated the effective use of fermented barley extract (FBE), which is the liquid that remains after removing solids from barley shochu lees. A sample of FBE purified by a synthetic adsorbent was fractionated using high-performance liquid chromatography. Human chondrosarcoma cells were exposed to the FBE fractions and the expression of cartilage degrading enzyme matrix metalloproteinase (MMP)-13 mRNA was quantified by real-time polymerase chain reaction (PCR). pEPYP, a pyroglutamyl tetrapeptide in fraction FBE-P40-5, significantly suppressed the mRNA and protein expression of cartilage degrading enzyme MMP-13. Furthermore, pEPYP significantly enhanced interleukin 10 mRNA and protein expression in lymphoblastic leukemia T cells. When pEPYP was orally administered to rheumatoid arthritis model rats, the results indicated that the edema score and anti-type II collagen antibody IgG level decreased. Ingestion of pEPYP by humans with knee joint discomfort significantly reduced knee pain and stiffness. This result suggests that pEPYP intake suppresses arthritis. Similarly, exposure of human colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells to the pyroglutamylproline (pEP) contained in FBE-P60-4-6 significantly promoted expression of ATP binding cassette subfamily G member (ABCG)2 mRNA and protein. Immunostaining provided visual confirmation that ABCG2 was expressed in the plasma membrane of Caco-2 cells. This result suggests that pEP intake could lower serum uric acid levels.

FBE is an excellent medium for culturing lactic acid bacteria, and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is produced via a fermentation process using FBE as a medium. Using normal human dermal fibroblasts, we confirmed the effect of GABA on the expression of genes involved in skin elasticity by real-time PCR. GABA significantly promoted COL1A1 mRNA expression and significantly decreased MMP-1 mRNA expression. Significant increases in ELN and FBN-1, FBN-2, and FBLN-5 mRNA were also observed. Increased expression of elastin protein was visually confirmed by immunofluorescent staining. These results suggest that GABA intake directly maintains skin elasticity. Proliferation of mouse myoblasts exposed to GABA was significantly increased. GABA also significantly increased MyoD and PGC-1 $\alpha$  mRNA and protein expression and significantly decreased myostatin mRNA and protein expression. These results suggest that GABA may not only directly promote an increase in, but also prevent the loss of skeletal muscle mass.