



Title	脂質およびタンパク質による消化管ホルモンを介した生理作用に関する研究
Author(s)	落合, 啓太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第7244号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7244
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100103
Type	doctoral thesis
File Information	Keita_0chiai.pdf, 全文



博士論文

脂質およびタンパク質による 消化管ホルモンを介した生理作用に 関する研究

落合 啓太

目次

略語一覧.....	6
図リスト.....	8
表リスト.....	10
序論	11
栄養素と消化管ホルモン.....	12
脂質による消化管ホルモン分泌制御.....	12
脂質の健康への影響と機能性脂質の可能性.....	14
エネルギー代謝とその歴史.....	15
食事誘発性熱産生の生理的役割と未解明課題.....	16
本研究の目的および論文構成.....	18
第 1 章 消化管内分泌細胞における 2-モノアシルグリセロール (2-MG) の CCK、GLP-1 分泌 活性	
評価およびその作用機構の解明.....	19
1-1. 背景と目的.....	20
1-2. 実験材料と実験方法.....	22
1-2-1. 実験材料.....	22
1-2-2. 細胞培養.....	22
1-2-3. cholecystokinin (CCK)、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 分泌試験.....	22
1-2-4. 細胞傷害性の測定.....	23
1-2-5. 上清中の遊離脂肪酸濃度の測定.....	23
1-2-6. RT-PCR.....	24
1-2-7. 統計解析.....	24
1-3. 結果.....	26

1-3-1. 種々の 2-MG の CCK、GLP-1 分泌活性評価	26
1-3-2. 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) による CCK、GLP-1 分泌における構造活性相関	32
1-3-3. STC-1 細胞における 2-AG からのアラキドン酸遊離の検証	37
1-3-4. cannabinoid receptor 1 (CB1) の関与	38
1-3-5. 長鎖脂肪酸受容体 G protein-coupled receptor 120 (GPR120) の関与	42
1-4. 考察	45
第 2 章 マウスにおける 2-arachidonoyl glycerol (2-AG)の胃排出抑制作用およびその作用機構の検討	49
2-1. 背景と目的	50
2-2. 実験材料と実験方法	52
2-2-1. 実験動物および食餌	52
2-2-2. 試薬	52
2-2-3. アセトアミノフェンを用いた胃排出速度の評価	52
2-2-4. RT-PCR	54
2-2-5. フェノールレッドを用いた胃排出率の評価	54
2-2-6. マウス門脈血漿中 CCK、GLP-1 濃度測定	55
2-2-7. 統計解析	55
2-3. 結果	56
2-3-1. 2-AG の胃排出抑制作用	56
2-3-2. 2-AG の作用における CCK シグナルの関与	57
2-3-3. 2-AG の作用における CB1 の関与	58
2-3-4. フェノールレッド試験による胃排出率評価	61
2-3-5. 2-AG 腹腔内投与による胃排出抑制効果	63
2-3-6. 2-AG 経口投与による CCK、GLP-1 分泌変動と CB1 の関与	64
2-4. 考察	66

第 3 章 食品タンパク質誘導性熱産生における GLP-1 の関与	71
3-1. 背景と目的	72
3-2. 実験材料と実験方法	74
3-2-1. 実験動物（ラット）および食餌	74
3-2-2. 実験動物（マウス）および食餌（京都府立大学にて実施）	74
3-2-2. 実験材料	74
3-2-3. ラットの直腸温測定	75
3-2-4. 野生型および glucagon-like peptide-1 receptor knockout (GLP-1r KO) マウスの直腸温測定（京都府立大学にて実施）	75
3-2-5. ラットにおける食後直腸温測定	76
3-2-6. 三大栄養素経口投与下におけるラットの直腸温測定	76
3-2-7. 種々の食品タンパク質経口投与下におけるラットの直腸温測定	76
3-2-8. ラットにおける非選択 β -adrenergic receptor (β AR) アンタゴニスト処理	76
3-2-9. 赤外線サーモグラフィによるラットの interscapular brown adipose tissue (iBAT) 上皮層表面温度の測定	77
3-2-10. 赤外線サーモグラフィによるラットの尾部皮膚表面温度の測定	77
3-2-11. ラットにおける種々の消化管ホルモン受容体アンタゴニスト処理	78
3-2-12. ラット門脈血漿中 GLP-1 濃度の測定	78
3-2-13. 酸素消費量 (oxygen consumption; VO_2 と身体活動量の測定（北海道大学獣医学研究院にて実施）	79
3-2-14. 野生型および Glp1r KO マウスの門脈血漿中 GLP-1 濃度の測定（京都府立大学にて実施）	80
3-2-15. dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害剤投与ラットの尾静脈血漿中の GLP-1 およびインスリン濃度の測定	80
3-2-16. DPP-4 阻害剤投与ラットにおける直腸温測定	81

3-2-17. アミノ酸混合液経口投与ラットの直腸温、尾静脈血漿中 GLP-1 濃度測定	81
3-2-18. 統計解析	87
3-3. 結果	88
3-3-1. AIN-93G 飼料を与えたラットの食後直腸温変動	88
3-3-2. 三大栄養素の経口投与がラットの直腸温に及ぼす影響	88
3-3-3. ラットの直腸温に及ぼす様々な食品タンパク質の影響	90
3-3-4. 大豆タンパク質による直腸温上昇に対する非選択的 β AR アンタゴニスト処理の影響 ...	94
3-3-5. 大豆タンパク質の経口投与がラットの尾部皮膚表面温度に及ぼす影響	94
3-3-6. 大豆タンパク質によるラット直腸温上昇における消化管ホルモンの関与	101
3-3-7. ラットの GLP-1 分泌に及ぼす大豆タンパク質の影響	101
3-3-8. 大豆タンパク質の経口投与が VO_2 に及ぼす影響と GLP-1 シグナルの関与	105
3-3-9. Glp1r KO マウスにおける食品タンパク質経口投与が直腸温に及ぼす影響	109
3-3-10. ラットにおける DPP-4 阻害剤投与が大豆タンパク質の作用に及ぼす影響	113
3-3-11. アミノ酸混合液経口投与ラットの直腸温、尾静脈血中 GLP-1 への影響	119
3-4. 考察	121
総括	126
引用文献	136
発表論文	158
謝辞	159

略語一覧

1-AG	1-arachidonoyl glycerol
2-AG	2-arachidonoyl glycerol
2-AG ether	2-arachidonoyl glycerol ether
2-LG	2-linoleoyl glycerol
2-MG	2-monoacylglycerol(s)
2-OG	2-oleoyl glycerol
2-PG	2-palmitoyl glycerol
16:0	palmitic acid
18:1n-9	oleic acid
18:2n-6	linoleic acid
18:3n-3	α -linolenic acid
20:4n-6	arachidonic acid
AEA	<i>N</i> -arachidonylethanolamine
ATP	adenosine triphosphate
AUC	area under the curve
BAT	brown adipose tissue
β AR	β -adrenergic receptor
BIIE	BIIE 0246
BSA	bovine serum albumin
CB1	cannabinoid receptor 1
CB2	cannabinoid receptor 2
CCK	cholecystokinin
CCK-A	cholecystokinin A
CCK-B	cholecystokinin B
CMC	carboxymethyl cellulose
DIO	diet-induced obesity
DIT	diet-induced thermogenesis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide

DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
Dvz	devazepide
EtOH	ethanol
Ex9	exendin (9-39)
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GIP	glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GLP-1R	glucagon-like peptide-1 receptor
Glp1r KO	glucagon-like peptide-1 receptor knockout
GPCR	G protein-coupled receptor
GPR40	G protein-coupled receptor 40
GPR41	G protein-coupled receptor 41
GPR43	G protein-coupled receptor 43
GPR119	G protein-coupled receptor 119
GPR120	G protein-coupled receptor 120
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
iBAT	interscapular brown adipose tissue
LDH	lactate dehydrogenase
MAGL	monoacylglycerol lipase
PYY	peptide-YY
SDA	specific dynamic action
SEM	standard error of the mean
SNS	sympathetic nervous system
SNS-BAT	sympathetic nervous system-brown adipose tissue
TG	triacylglycerol(s)
TGR5	Transmembrane G protein-coupled receptor 5
VO ₂	oxygen consumption
WT	wild-type

図リスト

第 1 章

Fig. 1-1. Secretion of CCK in response to various 2-MG and fatty acids.

Fig. 1-2. Release of LDH in STC-1 cells exposed to various 2-MG and fatty acids.

Fig. 1-3. Secretion of GLP-1 in response to various 2-MG and fatty acids.

Fig. 1-4. Effect of extracellular Ca^{2+} on 2-AG and 20:4n-6-induced CCK secretion.

Fig. 1-5. Chemical structures of 2-AG and similar compounds.

Fig. 1-6. Effect of compounds structurally related to 2-AG on CCK secretory activity.

Fig. 1-7. Effect of compounds structurally related to 2-AG on GLP-1 secretory activity.

Fig. 1-8. Changes in free fatty acid concentrations in the supernatant during the secretion study in STC-1 cells.

Fig. 1-9. Expression of CB1 in STC-1 cells and mouse intestine, and effects of CB1 antagonist on CCK secretion induced by 2-AG and 20:4n-6.

Fig. 1-10. Expression of CB1 in GLUTag cells and effects of CB1 antagonist on GLP-1 secretion induced by 2-AG.

Fig. 1-11. Effects of GPR120 antagonist on CCK secretion induced by 2-AG and 20:4n-6.

第 2 章

Fig. 2-1. Effects of oral administration of 2-AG or 20:4n-6 on gastric emptying.

Fig. 2-2. Effects of 2-AG on gastric emptying in the absence (A) or presence (B) of the CCK-A receptor antagonist (devazepide).

Fig. 2-3. Expression of CB1 in the mouse intestinal mucosa and effects of 2-AG on gastric emptying in the absence or presence of CB1 antagonist (SR141716A).

Fig. 2-4. Effects of 2-AG on the gastric emptying rate in the absence (A, C) or presence (B, D) of

SR141716A (phenol red recovery method).

Fig. 2-5. Effect of intraperitoneal administration of 2-AG on gastric emptying.

Fig. 2-6. Effects of oral administration of 2-AG on the portal (A, B) CCK and (C, D) total GLP-1 concentration in the absence (A, C) or presence (B, D) of CB1 antagonist (SR141716A).

第3章

Fig. 3-1. Amino acid sequence of the subunit of β -conglycinin, one of the major components of soy protein.

Fig. 3-2. Amino acid sequence of the subunit of glycinin, one of the major components of soy protein.

Fig. 3-3. Feeding and protein administration increase the rectal temperature in rats.

Fig. 3-4. Among dietary proteins, rectal temperature is increased in a dose-dependent manner and to the greatest extent by soy protein.

Fig. 3-5. Dose-dependence of various oral proteins on rectal temperature increase.

Fig. 3-6. Effects of β -AR antagonist, propranolol, on the thermic effect of soy protein.

Fig. 3-7. Nonselective β -AR antagonist abolishes norepinephrine-induced increase in rectal temperature.

Fig. 3-8. Subcutaneous norepinephrine increases iBAT surface temperature of rats.

Fig. 3-9. Oral soy protein did not increase iBAT surface temperature of rats.

Fig. 3-10. Mild cold exposure lowers the tail skin surface temperature of rats.

Fig. 3-11. Heat loss from the tail skin surface is not involved in the thermic effect of soy protein.

Fig. 3-12. GLP-1R antagonist abolishes soy protein-induced increase in rectal temperature.

Fig. 3-13. Oral soy protein stimulates GLP-1 secretion with or without GLP-1R antagonist treatment.

Fig. 3-14. Physical activity and correlation between oxygen consumption (VO_2).

Fig. 3-15. Oral soy protein increases oxygen consumption (VO_2) via GLP-1 signaling.

Fig. 3-16. GLP-1R is essential for the increasing effect of soy protein on rectal temperature.

Fig. 3-17. GLP-1R is involved in the whey protein-induced increment of rectal temperature.

Fig.3-18. DPP-4 inhibition enhances the rectal temperature-elevating effect of soy protein.

Fig. 3-19. Oral soy protein and DPP-4 inhibition did not affect insulin levels.

Fig. 3-20. Effects of the amino acid mixture on the rectal temperature and active GLP-1 concentrations in tail vein plasma

総括

Fig. 4-1. Schematic diagram of the proposed mechanism of gastric emptying inhibition by oral 2-AG.

Fig. 4-2. Schematic diagram of the findings revealed in this study.

表リスト

第 3 章

Table. 3-1 各種アミノ酸組成

序論

栄養素と消化管ホルモン

私たち人間は、食物中の栄養素を消化・吸収という作用を経て体内に取り込んでいる。消化・吸収を行う消化管は、部位により構造が異なっており、その働きもさまざまである。消化・吸収を効率よく進行させるためには、消化管内の栄養素情報を感知し、消化管全体の機能を統合的に働かせる必要がある（川端、2014）。消化管に沿って散在している消化管内分泌細胞は、栄養素の化学的情報を的確に捉え、消化管ホルモンという情報伝達物質を体内に放出し、循環系や神経系を介して、消化液の分泌、消化管の運動などを調節している（Zhang et al., 2019）。これまでに、膵液の分泌促進作用を有するセクレチンをはじめとして、胃酸分泌を促進するガストリン、インスリン分泌を促進するグルカゴン様ペプチド-1（glucagon-like peptide-1; GLP-1）やグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド（glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GIP）、胃酸分泌・胃排出を抑制する Peptide-YY（PYY）など多くの消化管ホルモンが見出されている。消化管ホルモンの中には、食欲の調節に寄与しているものがあり、摂食促進に働くものとして、胃から分泌されるグレリンが、摂食抑制に働くものとして、コレシストキニン（cholecystokinin; CCK）や前述の GLP-1、PYY などが知られている（Murphy and Bloom, 2006）。

脂質による消化管ホルモン分泌制御

摂食抑制作用を有する消化管ホルモンとして最初に報告された CCK は、上部小腸に散在する消化管内分泌細胞「I 細胞」が、主に脂質やタンパク質などの栄養素を感知することで分泌が促進される（Dockray 2012; Rehfeld 2000）。その生理作用としては、食欲抑制の他に、胆のう収縮、膵酵素分泌促進、胃排出抑制などがある（Liddle 1997）。CCK は二つの特異的な G タンパク質共役型受容体（G protein-coupled receptor; GPCR）、cholecystokinin A（CCK-A）受容体および cholecystokinin B（CCK-B）受容体に認識される（Egberts et al., 2020; Liddle, 1997; Miyasaka and Funakoshi, 2003）。CCK-A 受容体は胃粘膜の主細胞や骨格筋、膵臓の腺房細胞、迷走神経、中枢またはその周囲の神経系に発現し、CCK の主要な生理作用である食欲抑制、胆のう収縮、胃排出抑制、膵酵素分泌を仲介している（Herranz, 2003）。一方で、CCK-B 受容体は胃粘膜の壁細胞や

膵臓、脳、中枢神経などにおいて発現し、胃酸分泌や不安の惹起、神経保護などの作用を仲介している (Herranz, 2003; Rehfeld, 2000)。

脂質は CCK 分泌の主要な促進因子である (Liddle, 1997)。マウス十二指腸上皮由来消化管内分泌細胞株 STC-1 の樹立 (Rindi et al., 1990) 以降、脂質が消化管内分泌細胞に直接作用することで、CCK 分泌を促進することが明らかになった (McLaughlin et al., 1998)。CCK 分泌活性を有する脂質の構造的特性に関しては、*in vivo*、*in vitro* 両方の試験系でこれまでに多数の報告がある。トリアシルグリセロール (triacylglycerol; TG) は、胆汁酸のような界面活性剤により乳化されたものの方が、乳化されていないものよりも CCK 分泌活性が高いことが示唆されている (Ledeboer et al., 1999)。TG が膵リパーゼにより加水分解されて生じる脂肪酸は、鎖長が 12 以上のもので CCK 分泌を促進することが明らかになっている (Little et al., 2007; McLaughlin et al., 1998)。また、飽和脂肪酸より不飽和脂肪酸の方が、不飽和脂肪酸の中でもシス型のものが、トランス型より CCK 分泌活性が高いことが示唆されている (Hand et al., 2010)。TG とその消化産物である遊離脂肪酸を比較すると、TG の方が、CCK 分泌活性が低いことが示唆されている (Damgaard et al., 2013; Hildebrand et al., 1998)。また、加熱した油や脂質酸化から生じるアルデヒドのうち、シス型の不飽和アルデヒドが強く CCK 分泌を誘導することが見出されている (Nakajima et al., 2014)。さらに、腸内細菌による菌体代謝物を調べたところ、二重結合を有するいくつかのオキソ脂肪酸に CCK 分泌活性が確認されている (Hira et al., 2018)。

脂質の化学的情報の感知および CCK 分泌誘導には細胞膜に発現する GPCR が関与することがこれまでに明らかになっている (Reimann et al., 2012)。遊離脂肪酸を感知する GPCR として、中・長鎖脂肪酸を認識する G protein-coupled receptor 40 (GPR40)、G protein-coupled receptor 120 (GPR120) や、短鎖脂肪酸を認識する G protein-coupled receptor 41 (GPR41)、G protein-coupled receptor 43 (GPR43) の 4 種類が同定されている (Covington et al., 2006; Hirasawa, 2015; Milligan et al., 2017)。これらはすべて I 細胞や STC-1 細胞において発現が確認されている (Hirasawa, 2015; Kim et al., 2015; Liou et al., 2011; Milligan et al., 2017; Sykaras et al., 2012)。また、味覚受容体や胆汁酸感知受容体である Transmembrane G protein-coupled receptor 5 (TGR5) などが、脂質による CCK 分泌に関与している可能性が示唆されているが、I 細胞で実際に発現し

ているかどうか、どのように CCK 分泌誘導に関わるかなどの詳細は明らかになっていない。

脂質は CCK だけでなく、GLP-1 や GIP などの多くの消化管ホルモンの分泌を強力に刺激する (Elliott et al., 1993; Liddle et al., 1985)。GLP-1 は、主に回腸や結腸に散在する消化管内分泌細胞「L 細胞」が、炭水化物や脂質、タンパク質などの栄養素を感知することで分泌が促進される消化管ホルモンであり (Baggio and Drucker 2007; Elliott et al. 1993)、満腹感の誘導 (Gutzwiller et al. 1999a; Gutzwiller et al. 1999b)、胃排出の抑制 (Nauck et al. 1997)、インクレチン効果として知られるグルコース依存的なインスリン分泌促進を介した食後血糖調節 (Kreymann et al. 1987; Komatsu et al. 1989) など、さまざまな食後生理作用を有している。インクレチン効果は 2 型糖尿病における血糖調節に有益であるため、GLP-1 受容体 (glucagon-like peptide-1 receptor; GLP-1R) 作動薬や分解酵素ジペプチジルペプチダーゼ-4 (dipeptidyl peptidase-4; DPP-4) 阻害薬は 2 型糖尿病治療に広く用いられている (Ahmed et al. 2025)。

脂質の健康への影響と機能性脂質の可能性

ヒトはエネルギー源として、細胞膜を構成する成分として、食品から脂質を摂取する。また、脂質には、脂溶性のビタミンやカロテノイドなど油脂に溶けやすい栄養成分を含む食品と一緒に調理し摂取することで、これらの栄養成分を体内に吸収されやすくする働きもある。さらに、リノール酸や α -リノレン酸などの必須脂肪酸は生命活動の維持に不可欠で、食事により摂取する必要がある。しかしながら、食品から脂質を摂りすぎると、肥満やメタボリックシンドローム、心臓疾患をはじめとした生活習慣病のリスクを高めたりすることにつながってしまう。令和 5 年の国民健康・栄養調査結果では、肥満者 ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) の割合は、男性 31.5%、女性 21.1% であり、この 10 年間でみると、女性では有意な増減はみられないが、男性では平成 25 年から令和元年の間に有意に増加している。また、世界的には 2050 年までに過体重および肥満の成人の総数は 38 億人に達し、その時点での推定世界成人人口の半分以上を超過すると予測されており (Ng et al. 2025)、食を介する予防・改善の方策の提案は喫緊の課題である。

近年、GLP-1R 作動薬が、その顕著な抗肥満効果から、北米を中心に市場が爆発的に拡大

している (Mahase 2024)。しかしながら、CCK や GLP-1 などの消化管ホルモン自体やその受容体作動薬を日常的に投与することは、医薬品用途に限定される (Zheng *et al.* 2024)。その一方で、脂質の負の側面ではなく、良い側面に着目し、CCK や GLP-1 の分泌を促進する脂質の摂取により、食欲や消化管の機能を安全かつ日常的に制御できれば、肥満やメタボリックシンドロームの予防・改善に寄与する可能性がある。そのため、CCK や GLP-1 などの消化管ホルモン分泌を促進する新たな機能性脂質の発見や、その作用機構の解明、生体内での効果を明らかにしていくことは重要な研究課題であると考えられる。

エネルギー代謝とその歴史

抗肥満対策のターゲットの一つとして、エネルギー消費を高めることも考えられる。私たち人間は生命活動のために必要なエネルギーを、食物中の熱量素である糖質、脂質、タンパク質から得ており、これらの栄養素は体内でさまざまなエネルギーに変換されて利用される。体内で利用されるエネルギーには次のようなものがある (川端、2014)。(1) 熱エネルギー：体温の維持。(2) 機械エネルギー：筋収縮、体内での物質移動 (能動輸送)、神経の刺激伝達など。(3) 電気エネルギー：神経の刺激伝達。(4) 化学エネルギー：体内での物質合成。

生命維持のためにエネルギーが必須であることや、食品成分がどのように関わっているかの解明は、18 世紀後半のラボアジェの研究に端を発する。フランスの化学者ラボアジェ (1743-1794) は、呼吸中に発生する熱は酸素の消費と二酸化炭素の生成に伴って発生することを観察した (Karamanou *et al.* 2013)。そして、食後に酸素の消費量と二酸化炭素の生成量が増加することを示し、呼吸による食物の燃焼が体内でエネルギー (熱) をつくり出すことを見出した。この発見でエネルギー代謝の概念が示されたことにより、栄養学が学問としての地位を得たとされる。また、1849 年に、フランスのルニョー (1810-1878) とリイゼ (1818-1896) は、呼吸による酸素吸入量と二酸化炭素排出量との比率が、摂取する食物によって 0.62 から 1.04 まで変動することを見出し、ドイツのフリーガー (1829-1910) はこの比率を呼吸商と呼んだ (Frankenfield 2010)。生体内でのエネルギー燃焼量 (生理的燃焼値) の算定に貢献したのはドイツのルブネル

(1854-1932) と、アメリカのアトウォーター (1844-1907) である。ルブネルはタンパク質が体内では完全に燃焼されず、アミノ基部分が排泄されることを見出し、糖質、脂質、タンパク質それぞれ 1 g あたりのエネルギー量を、4.1 kcal、9.45 kcal、4.4 kcal と定めた (Borsook 1936)。また、食後に熱の発生量が増大することを動物試験で証明し、これを特異動的作用 (specific dynamic action; SDA) と呼んだ (Carlson 1997)。アトウォーターは糖質、脂質、タンパク質それぞれ 1 g あたりの燃焼値を、4 kcal、9 kcal、4 kcal と定め (Carpenter 2003)、これらをアトウォーター係数と呼んだ。他方、ドイツのツンツ (1847-1920) は、食後 12 時間以上経過して常温で静かに横になっているときの代謝値を測定し、同一人物ではこの値がいつも一定であることを示した。1906 年ツンツの門下マグヌス・レビ (1865-1955) が、この代謝を基礎代謝 (basal metabolism) と命名した (Magnus-Levy 1942)。その後、アトウォーターとベネディクト (1870-1957) は、食後の基礎代謝量は絶食時よりも大きいことを明らかにし、また、身体活動によるエネルギー代謝の増加を算定した (川端、2014)。さらに、一連のヒト試験の結果、摂食に伴うエネルギー消費の増加を各食品の摂取カロリーに対する割合で表すと、タンパク質が圧倒的に大きな SDA (30%) を持つのに対し、炭水化物や脂質のそれは有意に小さい (それぞれ 6% と 4%) ことが示された (Lusk 1931; Keele and Neil 1961)。しかしながら、後の研究において、さまざまな組成の食餌がエネルギー消費に同様の影響を及ぼすことが示され (Ashworth 1969; Garrow and Hawes 1972; Pittet *et al.* 1974)、この効果がタンパク質に特異的でないことから、SDA という用語は、食事誘発性熱産生 (diet-induced thermogenesis; DIT) や食物の産熱効果 (thermic effect of food; TEF) に定義し直された。

食事誘発性熱産生の生理的役割と未解明課題

DIT は、摂食によって増加する熱産生の総称である。DIT は、基礎代謝、身体活動時代謝とともに、一日のエネルギー消費を構成する三要素のうちの一つである (Westerterp 2004)。DIT は一日のエネルギー消費の 10% 程度に過ぎないが、その低下はエネルギー収支を正に傾け、長期的には体脂肪の蓄積につながると考えられている (Ho 2018)。食餌に対する発熱反応の違いが肥

満の要因となるという可能性は約 100 年前に提唱された (Wang and Strouse 1924)。その後、1997 年に報告されたレビューによると (Jonge and Bray 1997)、49 件の臨床研究のうち 29 件で、健康者よりも肥満者の DIT が低かった。先行研究間における肥満と DIT の関連の有無の違いは、測定方法や試験条件の違いといった試験デザインのばらつきに由来する可能性がある」と著者らは結論付けている。また、肥満がエネルギー消費量の変化と関連しているかどうかを取り上げた 2016 年のレビューでは (Carneiro *et al.* 2016)、「肥満者の DIT は低いという説を支持する証拠は不十分である」と結論づけられている。このように、肥満と DIT の関連についてはさまざまな意見・報告があるのが現状である。

DIT は一般的に、不可避の体熱産生 (obligatory thermogenesis) と任意的体熱産生 (facultative thermogenesis) の 2 つの要素に分けられる。不可避の体熱産生は、摂取した栄養素の消化、吸収、貯蔵などの義務的な反応、エネルギーコストを指す。一方、任意的体熱産生は、不可避の体熱産生に付随的な熱産生で、過剰に摂取したエネルギーを感知して、熱としてそのエネルギーを放散する熱産生を指す (Saito *et al.* 2020)。この熱の放散には褐色脂肪組織 (brown adipose tissue; BAT) が関与していると考えられている (Bastías-Pérez *et al.* 2020)。日本人成人が一日に摂取するエネルギー量は約 1900 kcal (令和 5 年「国民・健康栄養調査」、厚生労働省) であり、1 年に約 70 万 kcal ものエネルギー (飲食物) を摂取していることになる。しかし、ヒトの体には体重を一定に保つ機構が備わっているため、日々の体重はほぼ一定の範囲内に収まっている。任意的体熱産生には、この体重を一定に保つ調節機構としての役割があると考えられている (永井、2015)。

不可避の体熱産生の大きさは摂取する食品のエネルギーだけでなく、その食品成分にも依存し、摂取エネルギーに対して、タンパク質 20-30%、糖質 5-10%、脂質 0-3%、混合食 10% 程度とされている (Scott and Devore 2005; Karst *et al.* 1984; Tappy 1996)。タンパク質摂取による DIT の亢進が見出されてから 100 年ほどの長い歴史があるにも関わらず、その根底となるメカニズムは十分に解明されておらず、代謝に多くのエネルギーを消費するためと抽象的な説明に留まっている (Halton and Hu 2004)。

体温や代謝の低下は肥満だけでなく、免疫力の低下や冷え性、運動障害、筋肉・筋力の

衰え、ひいては近年社会問題となっているサルコペニアなど、さまざまな健康障害を招く可能性がある。裏を返せば、食を介して日常的かつ効率的に体温やエネルギー代謝を高めることができれば、これら健康障害の予防・改善への貢献が期待される。そのため、DIT、とりわけ、食品タンパク質摂取による高い DIT 亢進のメカニズム解明は、社会的意義の大きな重要課題といえる。

本研究の目的および論文構成

本研究は、脂質およびタンパク質の消化管ホルモンを介した生理作用に着目し、新たな生理活性物質や生理学のプロセス、生理的相互作用の発見と、古くから知られる生理現象に新たな洞察を与え、より深い理解へと貢献することを目指した基盤研究である。脂質およびタンパク質摂取による食後生理応答を正しく、かつ、深く理解することは、栄養学のさらなる発展や、世界中で重要課題となっている、さまざまな疾患の予防・改善策の策定を目指した研究への発展に重要であると考えられる。

本論文は、上述の目的に沿って実施した研究内容を章立てて記載した。序論では本研究遂行にあたっての基盤的背景を端的にまとめ、実験内容を第 1 章から第 3 章に記載した。各章ごとに背景と目的、実験方法、結果、考察を記述し、考察の冒頭には各章で明らかになった事象の概要を示した。第 1 章では、食餌性脂質 TG の消化産物の一つである 2-モノアシルグリセロール (2-monoacylglycerol; 2-MG) に着目し、消化管内分泌細胞株 STC-1 および GLUTag を用いて、2-MG の CCK・GLP-1 分泌活性とその作用機構を検証した。第 2 章では、第 1 章の *in vitro* 試験で活性が観察された 2-MG の、マウスにおける生理作用 (胃排出抑制作用) およびその作用機構を、胃排出速度を評価する代表的な試験である、アセトアミノフェン試験およびフェノールレッド試験により検証した。第 3 章では、食品タンパク質による DIT における消化管ホルモン、特に GLP-1 の関与を検証した。総括では、以上の実験結果を包括的にまとめ、既存研究から眺めた本研究の立ち位置や学術的意義、本研究成果の活用と今後の展望を示した。末尾には本論文中で引用・参考した文献および著者の学術雑誌に掲載された論文を記載した。

第 1 章

消化管内分泌細胞における 2-モノアシルグリセロール（2-MG）の CCK、GLP-1 分泌 活性評価およびその作用機構の解明

1-1. 背景と目的

常温で固体の脂肪と常温で液体の油をあわせて油脂といい、多くの食餌性油脂において、その組成は TG が約 95%、リン脂質が約 4.5%（うち 95%以上がレシチン）、コレステロールエステルが約 0.5%となっている（Wang et al., 2013）。このように、食餌性脂質は主に長鎖脂肪酸から成る TG で構成される（Wang et al., 2013）。ラードなどの動物性油脂の TG は主に飽和脂肪酸で構成されており、TG の *sn*-2 位には飽和脂肪酸が存在することが多い（Wang et al., 2013）。一方、大豆油や亜麻仁油などの植物性油脂の TG は主に不飽和脂肪酸で構成されており、*sn*-2 位には不飽和脂肪酸が存在することが多い（Berry, 2009; Mattson and Volpenhein, 1961）。これら食餌性 TG は消化管内で胃リパーゼや膵リパーゼによる加水分解を受けた後、消化産物である遊離脂肪酸と 2-MG として主に小腸で吸収される（Mu, 2004; Singh et al., 2009）。

炭素数 12 以上の鎖長を持つ脂肪酸は CCK 分泌を強く促進するが（Feltrin et al. 2004）、2-MG が CCK 分泌に及ぼす影響については明らかでない。GLP-1 は短鎖脂肪酸から長鎖脂肪酸までさまざまな鎖長の脂肪酸に応答して分泌が促進される（Hirasawa et al. 2005; Nonaka et al. 2022; Christiansen et al. 2018）。2-MG では、パルミチン酸やオレイン酸がグリセロールの *sn*-2 位にエステル結合した 2-パルミトイルグリセロール（2-palmitoyl glycerol; 2-PG）、2-オレオイルグリセロール（2-oleoyl glycerol; 2-OG）が GPR119（G protein-coupled receptor 119）を介して GLP-1 分泌を促進することが報告されている（Funatsu et al. 2025）。GPR119 はヒトや齧歯類の I 細胞や L 細胞（Chu et al. 2008; Lauffer et al. 2009; Sykaras et al. 2012）、マウス由来の消化管内分泌細胞株である STC-1 や GLUTag（Chu et al. 2008）に発現している GPCR の一つである。しかしながら、他の 2-MG が GPR119 を介して CCK、GLP-1 分泌を促進するかは不明である。

摂食に対する 2-MG の効果を検証した先行研究もいくつか存在する。2-OG の静脈内投与により、下痢を誘発することなくラットの摂食量が減少し（Okuma et al. 2016）、2-MG のジアシルグリセロールへの変換を触媒するモノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2 の阻害または欠損は、高脂肪食を与えたマウスの摂食量を減少させた（Nelson et al. 2014; Okuma et al. 2015）。さらに、小腸で 2-MG を遊離脂肪酸とグリセロールに特異的に加水分解するモノアシ

ルグリセロールリパーゼ (monoacylglycerol lipase; MAGL) をマウスに過剰発現させると、正常マウスに比べて摂食が亢進された (Chon *et al.* 2012)。これらの結果は、**2-MG** が食欲抑制に関与することを示すとともに、**CCK** や **GLP-1** などの食欲に関連する因子の制御を介してその作用を発現する可能性を示唆している。

本章では、マウス小腸上皮由来内分泌細胞株 **STC-1** およびマウス大腸上皮由来内分泌細胞株 **GLUTag** を用いて、**2-MG** の **CCK**、**GLP-1** 分泌活性およびその分子メカニズムを検証した。

1-2. 実験材料と実験方法

1-2-1. 実験材料

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) および fetal bovine serum (FBS) は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) と脂肪酸は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。2-MG、2-アラキドノイルグリセロールエーテル (2-AG エーテル, 2-arachidonoyl glycerol ether; 2-AG ether)、1-アラキドノイルグリセロール (1-arachidonoyl glycerol; 1-AG)、および GPR120 阻害剤 AH7614 は、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。グリセロールは東京化成工業 (Tokyo, Japan) から購入した。選択的 Cannabinoid receptor 1 (CB1) 阻害剤 SR141716A は、Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA) から購入した。特に言及しない限り、その他の試薬はすべて富士フイルム和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した。

1-2-2. 細胞培養

マウス小腸上皮由来内分泌細胞株 STC-1 (Prof. Douglas Hanahan, The Hormone Research Institute, University of California, San Francisco より供与) またはマウス大腸上皮由来内分泌細胞株 GLUTag (Prof. Daniel J. Drucker, University of Toronto, Canada より供与) を用いた。STC-1 細胞、GLUTag 細胞は、10% FBS、100 IU/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM (Invitrogen, #12100-038) にて 37°C、5% CO₂ 環境下で培養し、80-90% のコンフルエントに達した時点でトリプシン処理により継代した。

1-2-3. cholecystikinin (CCK)、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 分泌試験

STC-1 細胞または GLUTag 細胞を 48 ウェル培養プレートに 1 ウェルあたり 1.5×10^5 個で播種し、80-90% のコンフルエントに達するまで 2-3 日培養した。細胞を HEPES 緩衝液で 2 回洗浄し、培養液を除去した後、0.1 または 0.2% エタノールを含む HEPES 緩衝液 (モノアシルグ

リセロールおよび脂肪酸溶液の調製用) に溶解した被検溶液をウェルに添加し、37°C、5% CO₂ 環境下で1時間インキュベートした。HEPES 緩衝液 (pH7.4) の組成は 140 mM NaCl、4.5 mM KCl、20 mM HEPES、1.2 mM CaCl₂、1.2 mM MgCl₂、10 mM D-Glucose である。インキュベーション後、上清を 1.5 mL チューブに回収し、800 × g、4°C で 5 分間遠心分離し、残存細胞を除去した。上清は測定まで -30°C で保管し、上清中の CCK 濃度を Cholecystokinin Octapeptide (CCK) (26-33) (Human, Rat, Mouse) (Non-Sulfated) EIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., #EK-069-04)、GLP-1 濃度を Multi Species GLP-1 Total ELISA, 96-well plate (Millipore, #EZGLP1T-36K) を用いて測定した。

Ca²⁺選択性が高いキレート剤であるエチレングリコール-ビス(β-アミノエチル エーテル)-N,N,N',N'--四酢酸 四ナトリウム塩 (Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'--tetraacetic acid tetrasodium salt; EGTA 四ナトリウム, Sigma Aldrich, #E8145) を用いて細胞外 Ca²⁺を除去した分泌試験も実施した。培地の洗浄には、Ca²⁺を含まず、0.2 mM の EGTA 四ナトリウムを含む HEPES buffer (pH7.4) を用いた。その組成は 140 mM NaCl、4.5 mM KCl、20 mM HEPES、1.2 mM MgCl₂、10 mM D-Glucose、0.2 mM EGTA 四ナトリウムである。

1-2-4. 細胞傷害性の測定

細胞傷害性は、上記のように被検溶液に細胞を暴露した後、傷害を受けた細胞の細胞質から放出された、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) 活性を測定することによって評価した。LDH 活性の測定には Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (同仁化学研究所, #374-91751) を用いた。細胞傷害性は、キットに含まれる細胞溶解試薬で処理したときに放出された全 LDH を 100% として、被検溶液に暴露した後の LDH の相対的放出 (%) として算出した。

1-2-5. 上清中の遊離脂肪酸濃度の測定

上記のように細胞を被検溶液に暴露し、上清を 15 分毎に、1 時間後まで回収した。上清中の遊離脂肪酸濃度は NEFA-C キット (Wako, #279-75401) を用いて測定した。

1-2-6. RT-PCR

75 cm² の組織培養フラスコで培養した STC-1、GLUTag 細胞および BALB/cByJJcl マウス (CLEA Japan) の組織 (十二指腸、空腸、回腸、結腸) から、RNeasy Mini kit (Qiagen, # 74106) または FastGene™ RNA Premium Kit (Nippon genetics, # FG-81050) を用いて、RNA サンプルを得た。本研究は北海道大学動物委員会の承認を得ており (承認番号: 19-0017)、マウスは北海道大学実験動物飼育・使用ガイドラインに従って飼育された。1 µg の RNA から ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, #FSQ-301) を用いて cDNA を調製した。プライマー配列および反応条件

マウス CB1: Accession No.: NM001355020

Fwd: 5'-CCACCTTCCGTACCATCACC-3'

Rev: 5'-AACCAACGGGAGTTGTCTC-3'

反応条件: 95°C 2 分→95°C 30 秒、63.3°C 30 秒、72°C 30 秒 x35 サイクル

マウス glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) : Accession No.: NM008084

Fwd: 5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3'

Rev: GCTAAGCAGTTGTGGTGCA-3'

反応条件: 95°C 2 分→95°C 30 秒、55°C 1 分、68°C 1 分 x40 サイクル

PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動で分離し、Midori Green Advance DNA stain (NIPPON Genetics, #MG04) で可視化した。

1-2-7. 統計解析

結果は平均値を示す棒グラフと標準誤差 (standard error of the mean; SEM) を示す正方向のエラーバーで表した。統計解析には JMP Pro version 14.0.0 software (SAS Institute, Inc., Cary, USA) を用いた。統計学的に有意な差は、一元配置分散分析の後に Tukey-Kramer's test を用いて決定した。脂質 (2-MG または脂肪酸)、阻害薬、およびそれらの相互作用の有意な影響は、二元

配置分散分析を用いて評価した。すべての解析において、 $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

1-3. 結果

1-3-1. 種々の 2-MG の CCK、GLP-1 分泌活性評価

まず、市販で入手できた 4 種類の 2-MG (2-PG、2-OG、2-リノレオイルグリセロール (2-linoleoyl glycerol; 2-LG)、2-アラキドノイルグリセロール (2-arachidonoyl glycerol; 2-AG)) の CCK および GLP-1 分泌活性を、それぞれ STC-1 細胞、GLUTag 細胞にて評価した。STC-1 細胞において、用いた 2-MG のうち、2-AG は 100 μ M、200 μ M とともにコントロール (Vehicle) 群と比較して上清中 CCK 濃度がそれぞれ 3 倍、8 倍以上有意に高かった (Fig. 1-1A, B)。200 μ M では、2-AG は STC-1 細胞において CCK 分泌を促進することが知られている α -リノレン酸 (α -linolenic acid; 18:3n-3) (Tanaka *et al.* 2008) と同等の CCK 分泌を誘導した。観察された上清中 CCK 濃度の増大が、細胞傷害性を伴うかどうかを調べるために LDH 放出を測定した結果、どの群もコントロール群と比較して顕著に高い LDH 放出は見られなかった (Fig. 1-2)。GLUTag 細胞において、上清中 GLP-1 濃度は、100 μ M の 2-PG、2-LG、2-AG がコントロール (Vehicle) 群と比較してそれぞれ約 1.7 倍、2.6 倍、2.7 倍有意に高かった (Fig. 1-3A)。

次に、これらの 2-MG を構成する脂肪酸 (パルミチン酸 (palmitic acid; 16:0)、オレイン酸 (oleic acid; 18:1n-9)、リノール酸 (linoleic acid; 18:2n-6)、アラキドン酸 (arachidonic acid; 20:4n-6)) の 100 μ M での CCK および GLP-1 分泌活性を検証した。脂肪酸のうち、アラキドン酸はコントロール群と比較して上清中 CCK 濃度が 3 倍以上有意に高く、 α -リノレン酸よりも約 1.5 倍高い活性を示した (Fig. 1-1C)。上清中 GLP-1 濃度は、リノール酸、アラキドン酸、ポジコンとして使用した α -リノレン酸がコントロール群と比較して、それぞれ約 1.6 倍、1.5 倍、2.2 倍有意に高く、アラキドン酸が最も高かった (Fig. 1-3B)。

2-AG は濃度依存的に CCK 分泌を誘導し (Fig. 1-1D)、コントロール (Vehicle) 群と比較して上清中 CCK 濃度の有意な増加 (約 6-10 倍) は、50 μ M 以上でみられた。一方、アラキドン酸では上清中 CCK 濃度の有意な増加は 100 μ M 以上で観察された (約 2.2 倍, Fig. 1-1E)。2-AG は GLP-1 分泌においても 50-200 μ M で濃度依存的な作用を示した (Fig. 1-3C)。

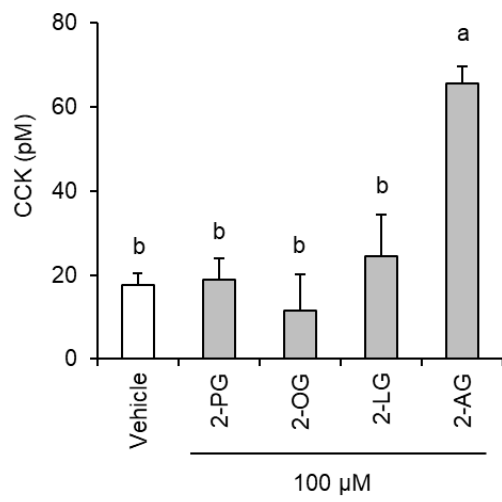
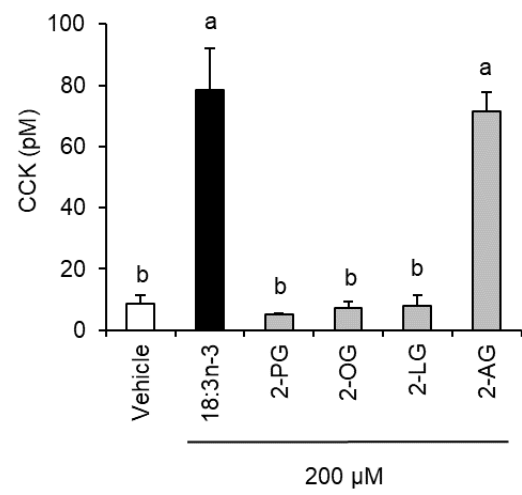
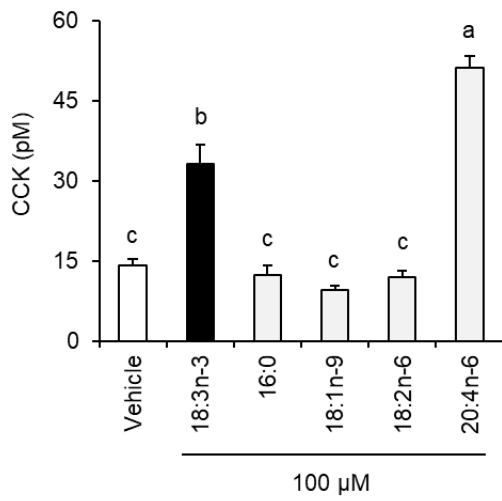
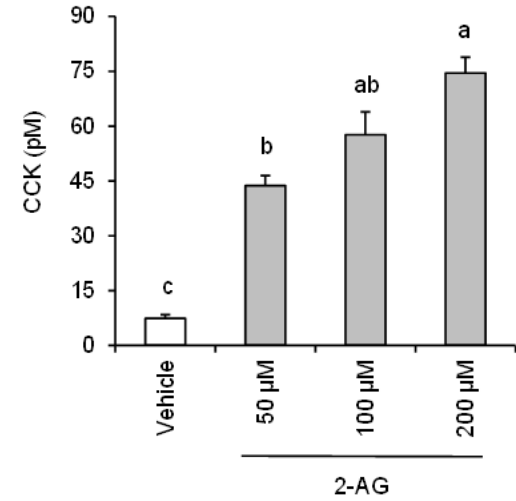
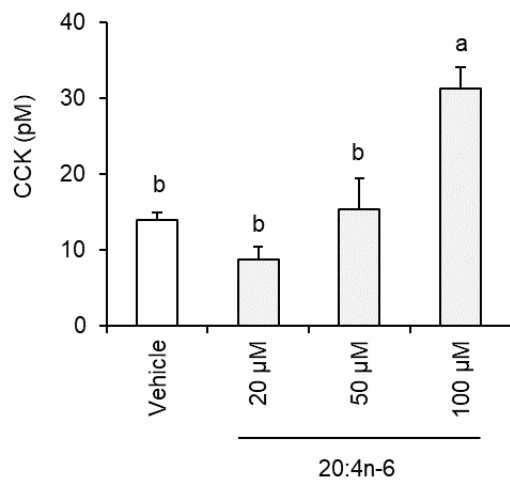
A**B****C****D****E**

Fig. 1-1. Secretion of CCK in response to various 2-MG and fatty acids. STC-1 cells cultured in 48-well plates were exposed to (A) 100 μ M, (B) 200 μ M 2-MG, and 200 μ M 18:3n-3, (C) various fatty acids, various concentrations of (D) 2-AG, or (E) 20:4n-6 for 60 min at 37°C. Values are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). Values not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test). 2-PG, 2-palmitoyl glycerol; 2-OG, 2-oleoyl glycerol; 2-LG, 2-linoleoyl glycerol; 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; 18:3n-3, α -linolenic acid; 16:0, palmitic acid; 18:1n-9, oleic acid; 18:2n-6, linoleic acid; 20:4n-6, arachidonic acid.

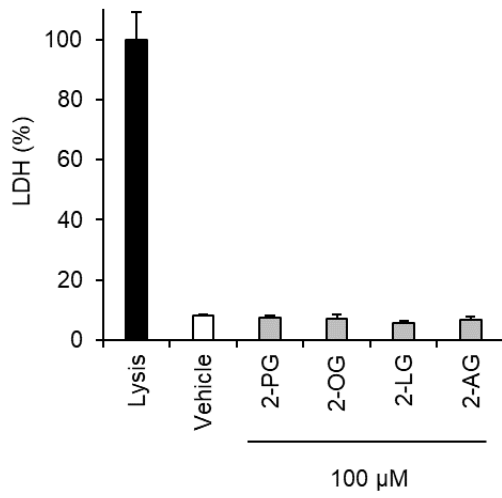
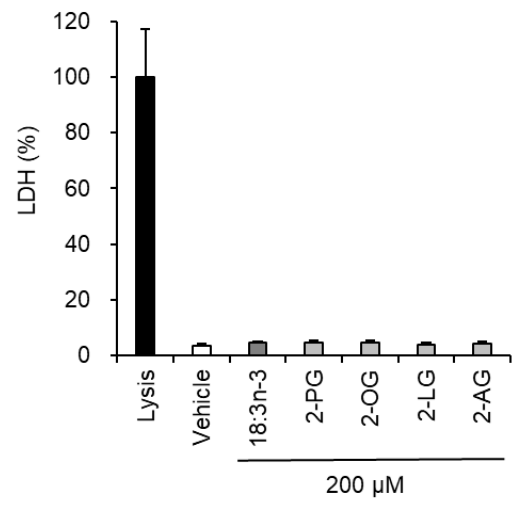
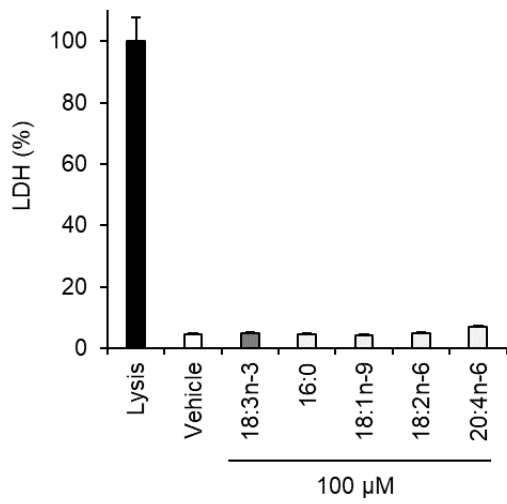
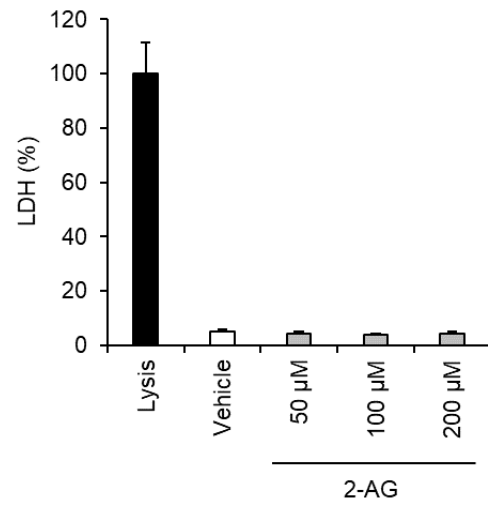
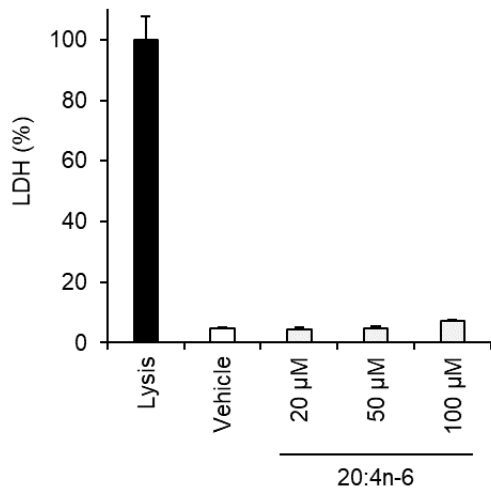
A**B****C****D****E**

Fig. 1-2. Release of LDH in STC-1 cells exposed to various 2-MG and fatty acids. LDH activity was measured in the supernatant of STC-1 cells exposed to (A) 100 μ M, (B) 200 μ M 2-MG, and 200 μ M 18:3n-3, (C) various fatty acids, various concentrations of (D) 2-AG, or (E) 20:4n-6. The lysis reagent was used to release total intracellular LDH. The values represent LDH activity (%) relative to the total LDH control (Lysis) and are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). 2-PG, 2-palmitoyl glycerol; 2-OG, 2-oleoyl glycerol; 2-LG, 2-linoleoyl glycerol; 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; 18:3n-3, α -linolenic acid; 16:0, palmitic acid; 18:1n-9, oleic acid; 18:2n-6, linoleic acid; 20:4n-6: arachidonic acid.

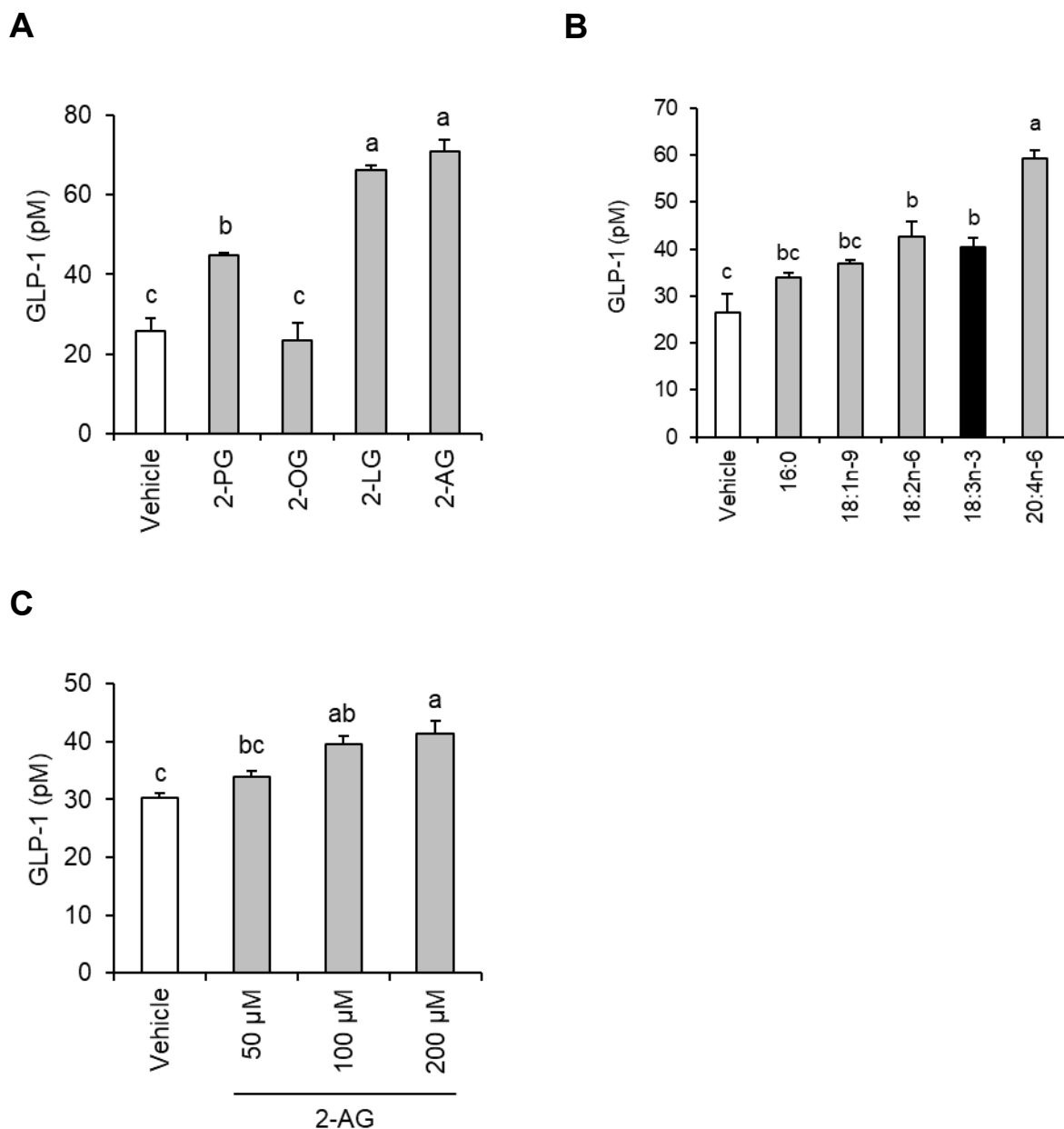


Fig. 1-3. Secretion of GLP-1 in response to various 2-MG and fatty acids. GLUTag cells cultured in 48-well plates were exposed to (A) 100 μ M 2-MG, (B) various fatty acids, or various concentrations of (C) 2-AG for 60 min at 37°C. Values are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). Values not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test). 2-PG, 2-palmitoyl glycerol; 2-OG, 2-oleoyl glycerol; 2-LG, 2-linoleoyl glycerol; 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; 16:0, palmitic acid; 18:1n-9, oleic acid; 18:2n-6, linoleic acid; 18:3n-3, α -linolenic acid; 20:4n-6: arachidonic acid.

1-3-2. 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) による CCK、GLP-1 分泌における構造活性

相関

脂肪酸によって誘導される細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が、CCK 産生細胞における CCK 分泌の引き金となることが報告されている (Hira *et al.* 2004; McLaughlin *et al.* 1998)。その上流では Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外 Ca^{2+} の取り込みや、細胞内シグナルを介した細胞内 Ca^{2+} 貯蔵小胞体ストアからの Ca^{2+} 放出がある (Némoz-Gaillard *et al.*, 1998)。本研究において、EGTA 四ナトリウム処理により細胞外 Ca^{2+} を除去すると、アラキドン酸同様に 2-AG においても CCK 分泌誘導が見られなくなったことから、細胞外 Ca^{2+} の流入が 2-AG の CCK 分泌誘導に重要であることが示唆された (Fig.1-4A)。この際、LDH 放出の増大はいずれの群でもみられなかった (Fig. 1-4B)。

培養神経系細胞である NG108-15 細胞や N18TG2 細胞を用いた先行研究では (Sugiura *et al.* 1996; Sugiura *et al.* 1997)、2-AG が速やかで一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こした一方で、1-AG やアラキドノイルエチレングリコール、*N*-アラキドノイルセリノール等の構造類縁体では細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動はみられなかったことから、2-AG 特異的な認識機構の存在が示唆された。STC-1 細胞における構造と活性の関係を調べるために、2-AG と構造が類似する様々な化合物や 2-AG の加水分解物を用いて (Fig. 1-5)、その作用を 2-AG と比較した。Fig. 1-6A に示すように、100 μM の 2-AG とアラキドン酸は STC-1 細胞の上清中 CCK 濃度をそれぞれコントロール群と比較して約 2.3 倍、2.0 倍有意に増加させたが、100 μM の 2-AG ether、1-AG、グリセロールは増加させなかった。試験した化合物はいずれも LDH 放出を引き起こさなかった (Fig. 1-6B)。

Fig. 1-7A, B に示すように、GLUTag 細胞上清における GLP-1 濃度は、100 μM のアラキドン酸、1-AG、2-AG、2-AG ether、1,3-diarachidonin がコントロール (Vehicle) 群と比較して、それぞれ約 1.7 倍、2.6 倍、2.7 倍、1.5 倍、1.5 倍有意に高く、1-AG と 2-AG は中でも高い同程度の GLP-1 分泌を誘導した。これらの試験溶液添加による LDH 放出の増大はみられなかった (Fig. 1-7C)。

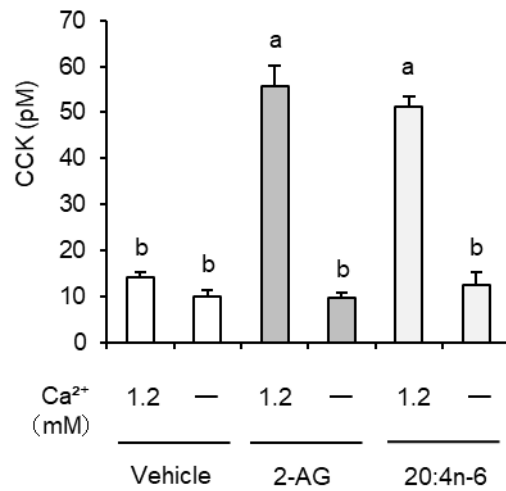
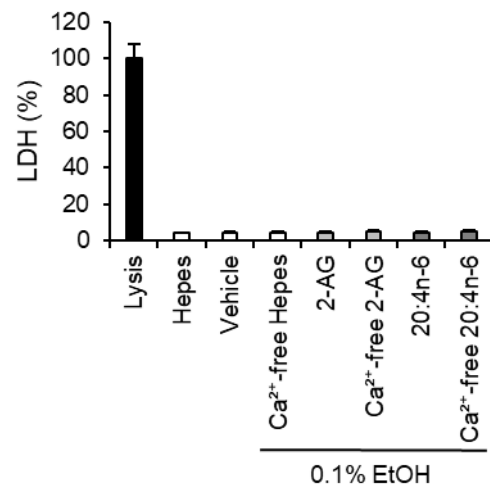
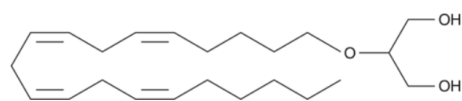
A**B**

Fig. 1-4. Effect of extracellular Ca²⁺ on 2-AG and 20:4n-6-induced CCK secretion. STC-1 cells cultured in 48-well plates were exposed to 2-AG or 20:4n-6 (both 100 μ M) in BSA-free HEPES buffer containing 0.1% EtOH and 0 or 1.2 mM Ca²⁺ for 60 min. (A) CCK concentrations and (B) LDH activity in the supernatant were measured. The lysis reagent was used to release total intracellular LDH and the values represent LDH activity (%) relative to the total LDH control (Lysis). Values are expressed as the means + SEM ($n = 3$). Values not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test). 2-AG; 2-arachidonoyl glycerol, 20:4n-6; arachidonic acid, EtOH; ethanol.

A 2-arachidonoyl glycerol; 2-AG



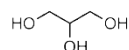
B 2-arachidonoyl glycerol ether; 2-AG ether



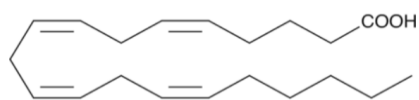
C 1-arachidonoyl glycerol; 1-AG



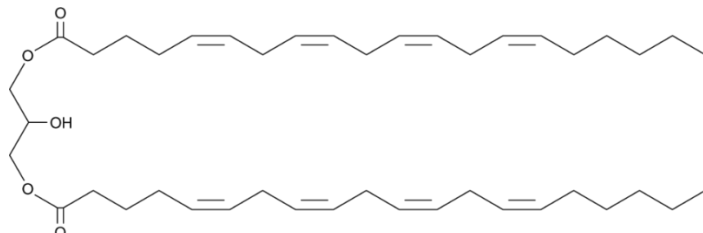
D Glycerol



E Arachidonic acid; 20:4n-6



F 1,3-diarachidonin



G Triarachidonin

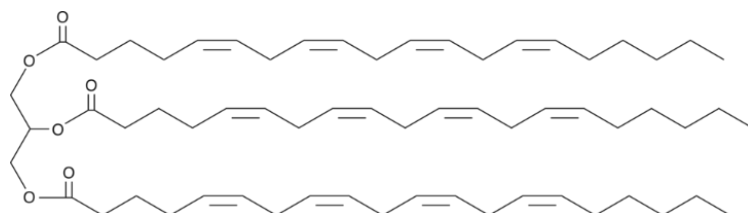


Fig. 1-5. Chemical structures of 2-AG and similar compounds.

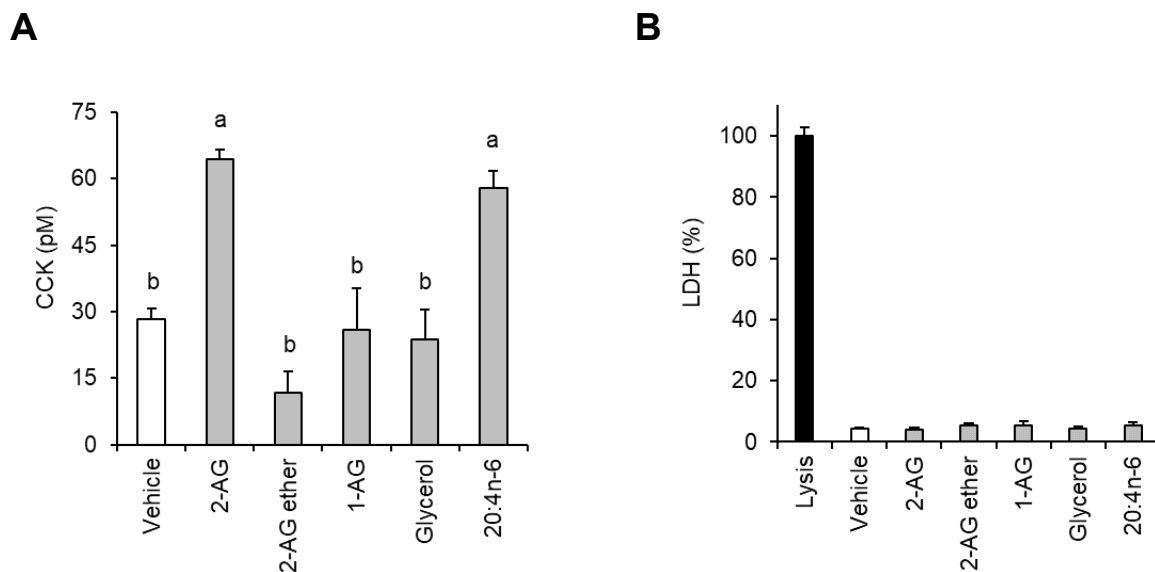


Fig. 1-6. Effect of compounds structurally related to 2-AG on CCK secretory activity. STC-1 cells cultured in 48-well plates were exposed to 100 μ M 2-AG, structurally related compounds (i.e., 2-AG ether and 1-AG), glycerol, and 20:4n-6. (A) CCK concentrations and (B) LDH activity in the supernatant were measured. The lysis reagent was used to release total intracellular LDH and the values represent LDH activity (%) relative to the total LDH control (Lysis). Values are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). Values not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test). 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; 2-AG ether, 2-arachidonoyl glycerol ether; 1-AG, 1-arachidonoyl glycerol; 20:4n-6; arachidonic acid.

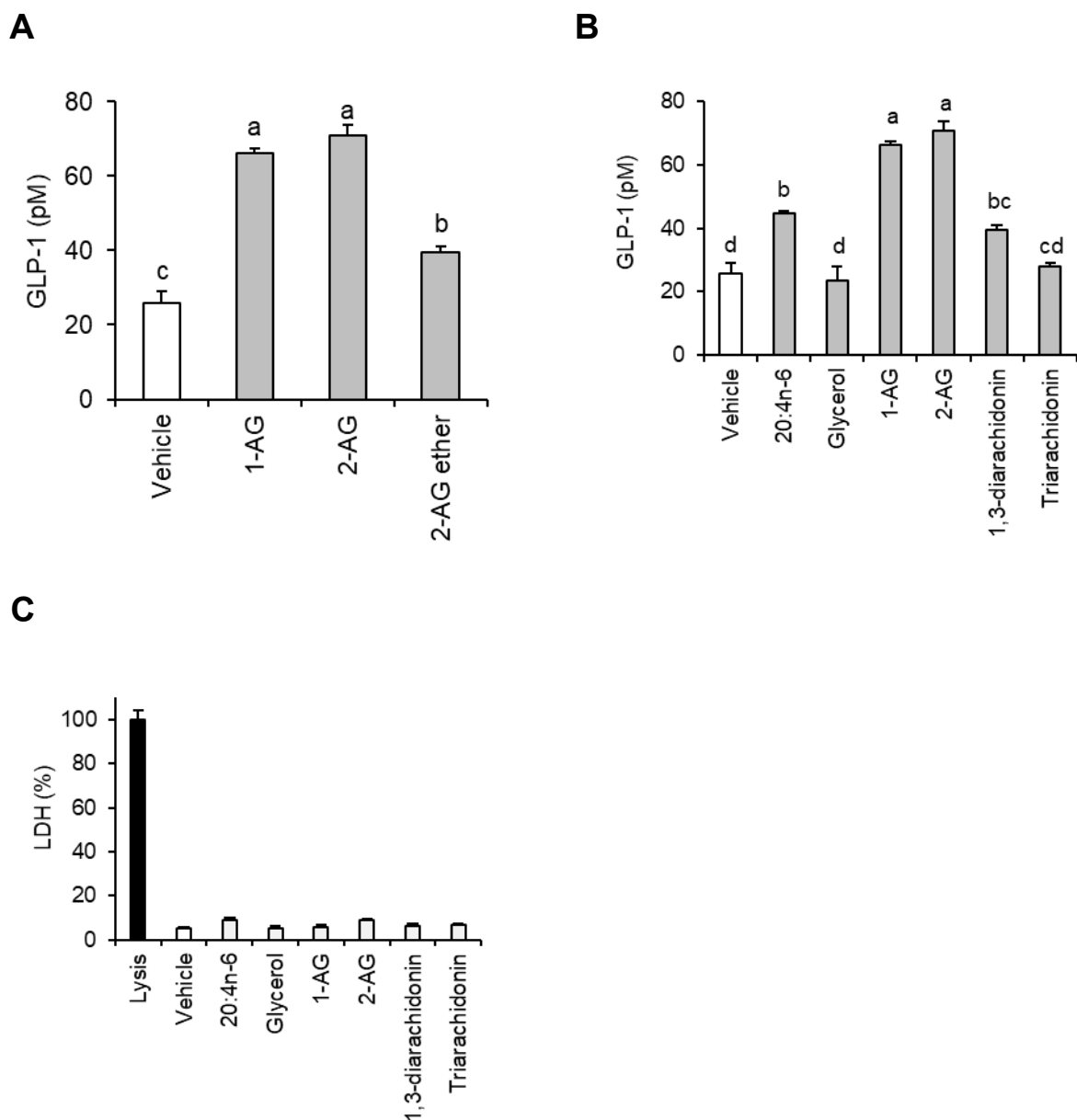


Fig. 1-7. Effect of compounds structurally related to 2-AG on GLP-1 secretory activity.

GLUTag cells cultured in 48-well plates were exposed to 100 μ M 2-AG or structurally related compounds. (A, B) GLP-1 concentrations and (C) LDH activity in the supernatant were measured.

The lysis reagent was used to release total intracellular LDH and the values represent LDH activity (%) relative to the total LDH control (Lysis). Values are expressed as the mean + SEM ($n = 3$).

Values not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test). 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; 2-AG ether, 2-arachidonoyl glycerol ether; 1-AG, 1-arachidonoyl glycerol; 20:4n-6; arachidonic acid.

1-3-3. STC-1 細胞における 2-AG からのアラキドン酸遊離の検証

STC-1 細胞での分泌試験中にアラキドン酸が 2-AG から遊離されたかどうかを調べるために、上清中の遊離脂肪酸濃度を測定した。Fig. 1-8A に示すように、STC-1 細胞上清中の遊離脂肪酸濃度は 2-AG および Vehicle 群で上昇しなかった。100 μ M のアラキドン酸を細胞に供すると、遊離脂肪酸濃度は経時的に低下し、1 時間後には 60 μ M まで低下した。STC-1 細胞の非存在下では、ウェルに添加した 100 μ M アラキドン酸を含む溶液中の遊離脂肪酸濃度は低下しなかったことから (Fig. 1-8B)、遊離のアラキドン酸がインキュベーション中に細胞に取り込まれたことが示唆された。

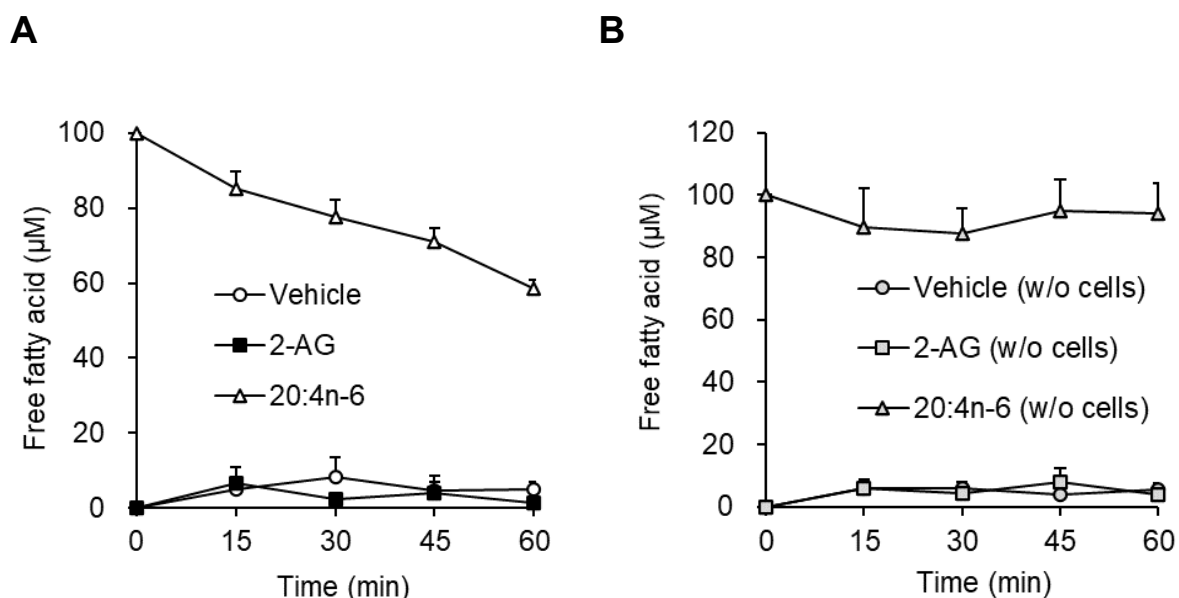


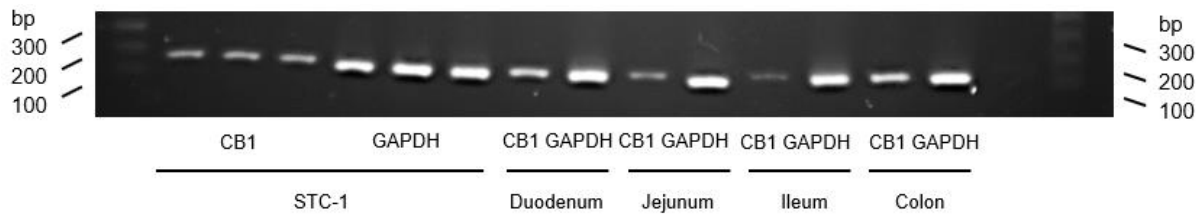
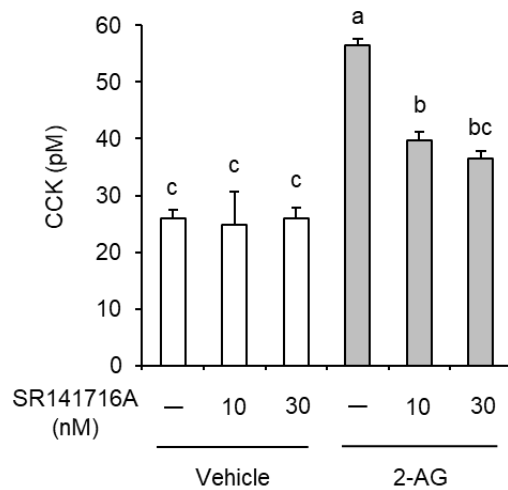
Fig. 1-8. Changes in free fatty acid concentrations in the supernatant during the secretion study in STC-1 cells. 2-AG (100 μ M) or 20:4n-6 (100 μ M) in BSA-free HEPES buffer containing 0.1% ethanol exposed to 48-well plates (A) with STC-1 cells cultured or (B) without cells. The supernatants were collected every 15 min until 60 min. The concentration of free fatty acid in the supernatants was measured. Values are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; 20:4n-6, arachidonic acid.

1-3-4. cannabinoid receptor 1 (CB1) の関与

2-AG は内因性カンナビノイドとして知られており、カンナビノイド受容体 CB1 と cannabinoid receptor 2 (CB2) の両方に対する内因性リガンドである (Ueda *et al.* 2011; Gendaszewska-Darmach *et al.* 2019)。また、CB1 はマウス十二指腸 CCK 産生細胞で発現している (Argueta *et al.* 2019; Sykaras *et al.* 2012)。PCR 法により、STC-1 細胞および BALB/cByJJcl マウス腸組織において、CB1 について予想される DNA サイズ (182 bp) の単一バンドを検出した (Fig. 1-9A)。

次に、CB1 選択的阻害薬 SR141716A の存在下で CCK 分泌試験を実施した。SR141716A を 10 nM および 30 nM で処理したところ、2-AG による CCK 分泌誘導は減少したが (Fig. 1-9B)、アラキドン酸による CCK 分泌誘導は影響を受けなかった (Fig. 1-9C)。いずれの処理においても細胞傷害性はみられなかった (Fig. 1-9D, E)。

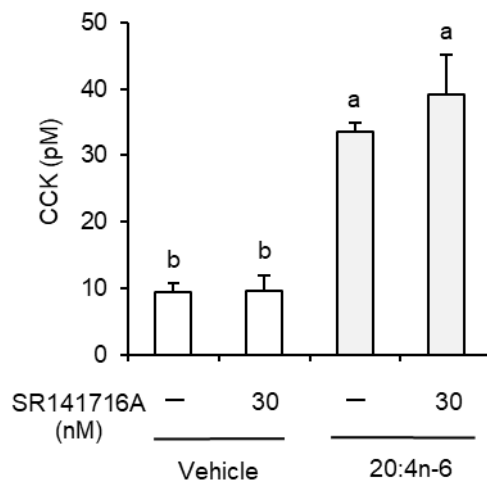
GLUTag 細胞においても CB1 のバンドが検出されたが (Fig. 1-10A)、2-AG による GLP-1 分泌誘導は SR141716A 処理の影響を受けなかった (Fig. 1-10B)。SR141716A 処理による細胞傷害性はみられなかった (Fig. 1-10C)。

A**B**2-way ANOVA *p* values

2-AG: < 0.01

SR141716A: < 0.01

2-AG x SR141716A: < 0.01

C2-way ANOVA *p* values

20:4n-6: < 0.01

SR141716A: 0.39

20:4n-6 x SR141716A: 0.44

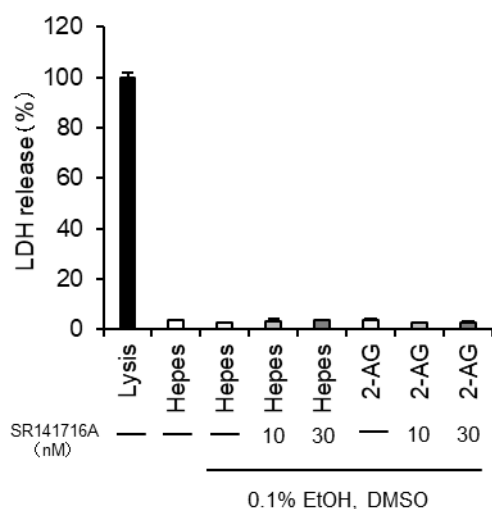
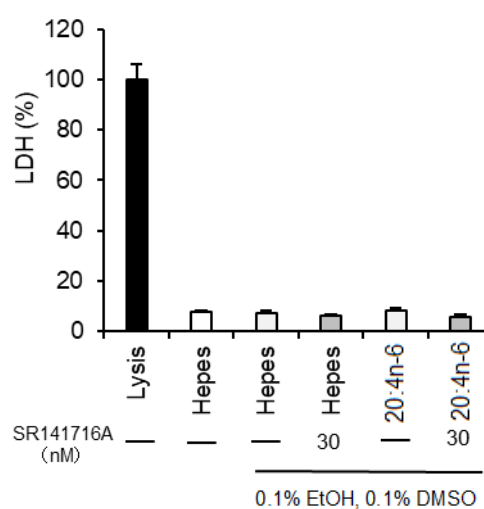
D**E**

Fig. 1-9. Expression of CB1 in STC-1 cells and mouse intestine, and effects of CB1 antagonist on CCK secretion induced by 2-AG and 20:4n-6. (A) Total RNA was extracted from STC-1 cells and BALB/cByJJcl mouse intestine (duodenum, jejunum, ileum, and colon) and then subjected to RT-PCR with specific CB1 or GAPDH primers. PCR products were separated in agarose gel and visualized by Midori Green Advance DNA stain. STC-1 cells cultured in 48-well plates were exposed to (B) 2-AG (100 μ M) or (C) 20:4n-6 (100 μ M) in the presence of a CB1 antagonist (SR141716A) for 60 min at 37°C. CCK concentrations were measured in the supernatant. Values are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). Values not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test). P values of two-way ANOVA for lipid (2-AG or 20:4n-6), antagonist (SR141716A), and their interactions are shown in the panels. (D, E) LDH activities were measured. The lysis reagent was used to release total intracellular LDH. The values represent LDH activity (%) relative to the total LDH control (Lysis) and are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; 20:4n-6, arachidonic acid; EtOH, ethanol; DMSO, dimethyl sulfoxide.

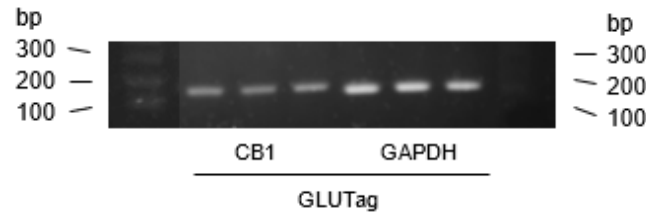
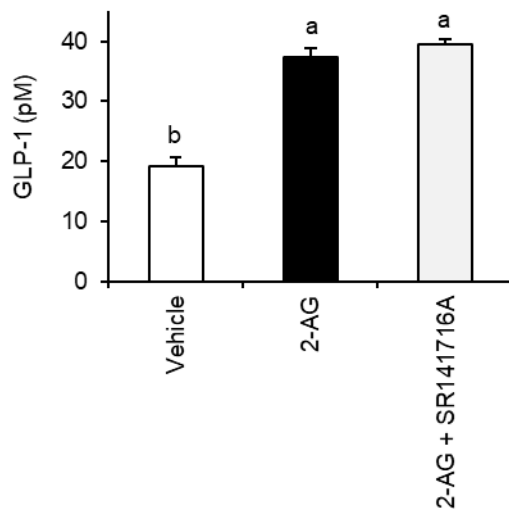
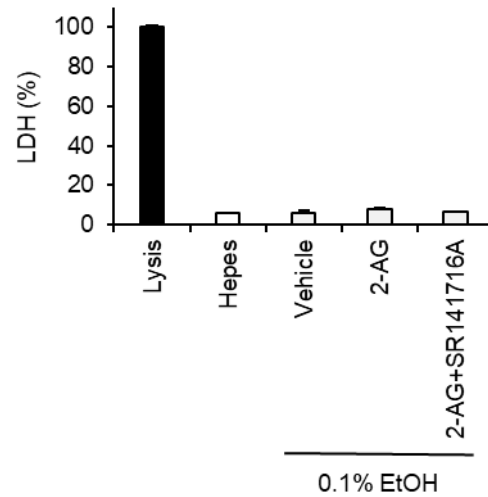
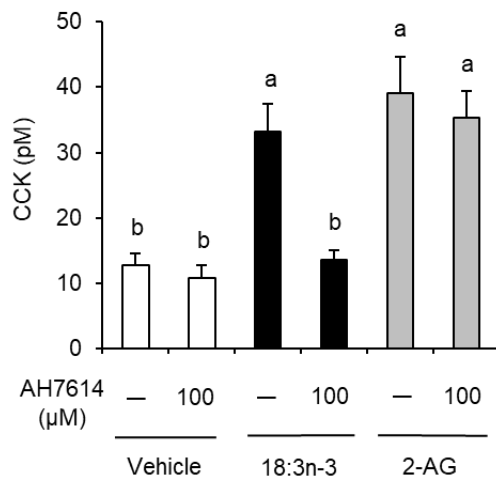
A**B****C**

Fig. 1-10. Expression of CB1 in GLUTag cells and effects of CB1 antagonist on GLP-1 secretion induced by 2-AG. (A) Total RNA was extracted from GLUTag cells and then subjected to RT-PCR with specific CB1 or GAPDH primers. PCR products were separated in agarose gel and visualized by Midori Green Advance DNA stain. GLUTag cells cultured in 48-well plates were exposed to 2-AG (100 μ M) in the presence of a CB1 antagonist (SR141716A, 30 nM) for 60 min at 37°C. (B) GLP-1 concentrations were measured in the supernatant. Values are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). Values not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test). (C) LDH activities were measured. The lysis reagent was used to release total intracellular LDH. The values represent LDH activity (%) relative to the total LDH control (Lysis) and are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; EtOH, ethanol.

1-3-5. 長鎖脂肪酸受容体 G protein-coupled receptor 120 (GPR120) の関与

2-AG の CCK 分泌促進作用に CB1 受容体の関与が示唆されたが、アラキドン酸が長鎖脂肪酸受容体 GPR120 に作用することが報告されているため (Mobraten *et al.* 2013; Villegas-Comonfort *et al.* 2017)、2-AG の CCK 分泌促進作用に関与する潜在的な感知受容体として、GPR120 (Tanaka *et al.* 2008; Ulven and Christiansen 2015) の関与を検討した。GPR120 アンタゴニストである AH7614 で処理すると、GPR120 を介して CCK 分泌を促進することが知られている α -リノレン酸 (Tanaka *et al.* 2008) で誘導された CCK 分泌誘導は完全に抑制されたが、2-AG で誘導された CCK 分泌は低下しなかった (Fig. 1-11A)。アラキドン酸による CCK 分泌誘導は、この処理によって部分的に抑制された (Fig. 1-11B)。AH7614 処理による細胞傷害性はみられなかった (Fig. 1-11C, D)。

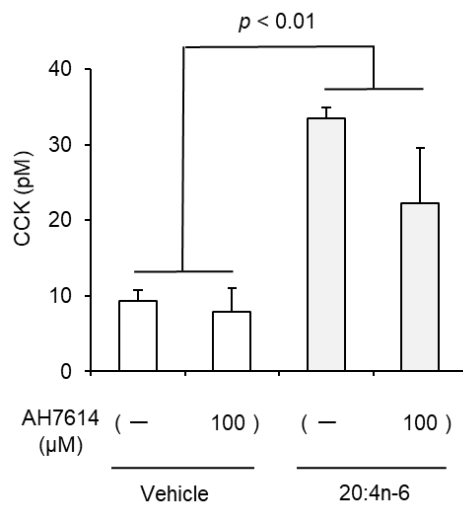
A

2-way ANOVA *p* values

Lipids: < 0.01

AH7614: < 0.05

Lipids x AH7614: 0.05

B

2-way ANOVA *p* values

20:4n-6: < 0.01

AH7614: 0.16

20:4n-6 x AH7614: 0.27

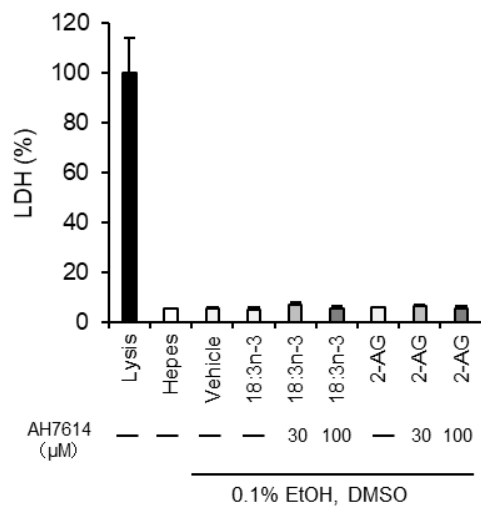
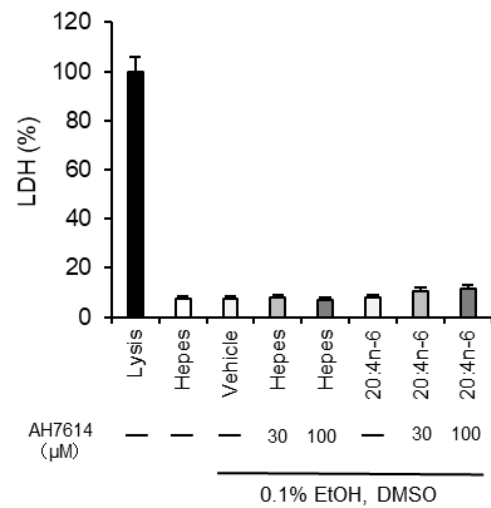
C**D**

Fig. 1-11. Effects of GPR120 antagonist on CCK secretion induced by 2-AG and 20:4n-6.

STC-1 cells cultured in 48-well plates were exposed to (A) 2-AG (100 μ M) or (B) 20:4n-6 (100 μ M) in the presence of a GPR120 antagonist (AH7614) for 60 min at 37°C. Values are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). Values not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test). P values of two-way ANOVA for lipids (18:3n-3 and 2-AG, or 20:4n-6), antagonist (AH7614), and their interactions are shown in the panels. (C, D) LDH activities were measured. The lysis reagent was used to release total intracellular LDH. The values represent LDH activity (%) relative to the total LDH control (Lysis) and are expressed as the mean + SEM ($n = 3$). 18:3n-3, α -linolenic acid; 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; 20:4n-6, arachidonic acid; EtOH, ethanol; DMSO, dimethyl sulfoxide.

1-4. 考察

脂肪酸は炭素鎖長依存的に CCK 分泌を誘導するが (Feltrin *et al.* 2004; Hirasawa *et al.* 2005; McLaughlin *et al.* 1999; McLaughlin *et al.* 1998; Sidhu *et al.* 2000)、2-MG が CCK 分泌に及ぼす影響は明らかにされていなかった。また、2-MG の GLP-1 分泌に及ぼす影響に関する知見も限定的である。本章では、マウス小腸上皮由来内分泌細胞株 STC-1 およびマウス大腸上皮由来内分泌細胞株 GLUTag を用いて、2-MG が CCK や GLP-1 分泌を誘導するかどうかを検証した。その結果、アラキドン酸結合型 2-MG である 2-AG が、CCK および GLP-1 の分泌を強く促進し、CCK 分泌はカンナビノイド受容体 CB1 を介して促進されることが示された。

まず、市販されている 4 種類の 2-MG (2-PG、2-OG、2-LG、2-AG) の CCK および GLP-1 分泌活性を検証した。このうち、2-PG、2-OG、2-LG、特に 2-OG は GPR119 のアゴニストとして知られている (Hansen *et al.* 2012)。2-OG は、ヒト、動物、およびマウス消化管内分泌細胞株 GLUTag において、GPR119 を介してインクレチンホルモンである GLP-1 および GIP の分泌を誘導する (Hansen *et al.* 2011; Hansen *et al.* 2012; Okuma *et al.* 2016; Hassing *et al.* 2016)。GPR119 の関与を調べるには更なる検討が必要であるが、GLUTag 細胞を用いた本研究において、2-PG や 2-LG は GLP-1 分泌を誘導した (Fig. 1-3A)。GPR119 の発現は、GLUTag 細胞よりも発現は低いものの STC-1 細胞でも報告されていることから (Chu *et al.* 2008)、これらの 2-MG が GPR119 を介して CCK 分泌を促進する可能性があった。しかしながら、2-OG、2-PG および 2-LG は、STC-1 細胞において CCK 分泌を促進せず、試験に供した 2-MG の中で CCK 分泌を誘導したのは、50 μ M 以上の 2-AG だけであった (Fig. 1-1A, B, D; Fig. 1-3)。アラキドン酸も CCK 分泌を誘導したが、その濃度は 100 μ M 以上であったことから、2-AG の CCK 分泌活性はアラキドン酸よりも強力であることが示された。

Fig. 1-5 に示した 2-AG に構造が類似する化合物 (2-AG エーテル、1-AG、グリセロール) との CCK 分泌活性の比較から (Fig. 1-6)、2-AG のエステル結合と、アシルグリセロールの *sn*-1 位ではなく *sn*-2 位への結合が、2-AG による CCK 分泌誘導に必須であることが明らかになった。一方で、2-AG だけでなく、1-AG や 2-AG エーテル、1,3-diarachidonin も GLP-1 分泌を誘導した

ことから (Fig. 1-7)、2-AG による CCK と GLP-1 の誘導機構 (2-AG の感知機構) は異なることが示唆された。

アラキドン酸も CCK 分泌を誘導したことから (Fig. 1-1C)、2-AG 誘導性 CCK 分泌が 2-AG から遊離したアラキドン酸によるものである可能性が考えられた。2-AG は、MAGL などの加水分解酵素によって分解される (Dinh *et al.* 2002b; Dinh *et al.* 2002a)。MAGL は脳と腸上皮に発現しており、細胞質と細胞膜の両方で機能している (Blankman *et al.* 2007)。STC-1 細胞上清中の遊離脂肪酸濃度は 2-AG 暴露中に上昇しなかった (Fig. 1-8A)。このことは、2-AG が STC-1 細胞の細胞外表面でほとんど加水分解されないことを示唆している。一方、2-AG から遊離したアラキドン酸はすぐに細胞内に取り込まれたため、上清中のアラキドン酸を検出できなかった可能性がある。Fig. 1-8A に示すように、上清に添加した遊離アラキドン酸 100 μM は 60 分間の培養中に徐々に減少し、60 分後の上清中遊離脂肪酸濃度は 60 μM となった。これらの結果は、STC-1 細胞が 60 分以内に約 40 μM の減少に相当する細胞外アラキドン酸を取り込んだか分解したことを示唆している。Fig. 1-1E に示すように、50 μM のアラキドン酸は CCK 分泌を誘導するには十分ではなかった。もし 50 μM 相当以上のアラキドン酸が分泌試験中に 2-AG から遊離したのであれば、上清中の遊離脂肪酸の増加を検出できるはずである。さらに、先行研究では、30 μM 以下のアラキドン酸では細胞内 Ca^{2+} 濃度に明らかな変化はなかったと報告されている (Sugiura *et al.* 1996)。これらの結果は、2-AG 誘導性 CCK 分泌は 2-AG から遊離したアラキドン酸によるものではない可能性を示唆する。

RT-PCR により、STC-1 細胞 (Fig. 1-9A)、GLUTag 細胞 (Fig. 1-10A) およびマウス腸組織における CB1 mRNA の発現が確認された。CB1 は、2-AG や *N*-arachidonoyl ethanolamine (AEA) などのエンドカンナビノイドに対する特異的受容体である (Ueda *et al.* 2011; Pacher *et al.* 2006)。2-AG 誘導性 CCK 分泌は CB1 アンタゴニストによって効果的に抑制された一方で、GPR120 アンタゴニストでは抑制されなかった (Fig. 1-9B, 1-11A)。これらの結果は、CCK 産生消化管内分泌細胞において、CCK を分泌する 2-AG センサーとして CB1 が機能していることを示唆するとともに、2-AG 誘導性 CCK 分泌は 2-AG から遊離したアラキドン酸によるものではないという考えを支持する。対照的に、アラキドン酸誘導性 CCK 分泌は GPR120 アンタゴニスト

によって減衰したが (Fig. 1-11B)、CB1 アンタゴニストによって減衰しなかった (Fig. 1-11A)。これらの結果は、2-AG 自体は CB1 に作用することによって CCK 分泌を誘導するが、2-AG から放出されたアラキドン酸は CB1 を介して CCK 分泌を誘導しないことを示している。2-AG エーテルや 1-AG も CB1 に対するアゴニストとして知られているが、CCK 分泌を誘導しなかったのは、おそらく CB1 に対するアゴニストとしての作用が 2-AG よりも 10-100 倍弱いからと考えられる (Sugiura *et al.* 1997; Sugiura *et al.* 1996; Sugiura *et al.* 1999; Hanuš *et al.* 2001)。

構造活性相関の検証で、2-AG による CCK、GLP-1 分泌誘導機構が異なることが示唆されたが、この可能性は CB1 アンタゴニスト処理により、2-AG の GLP-1 分泌活性が減衰しなかった結果からも支持される (Fig. 1-10)。2-OG は GPR119 を介して (Hansen *et al.* 2011; Hansen *et al.* 2012; Hassing *et al.* 2016)、また、2-PG は GPR119 や GPR40 を介して GLP-1 分泌を誘導する (Funatsu *et al.* 2025) という報告がある。GPR120 を含むこれらの受容体が 2-AG による GLP-1 分泌誘導に関与するかどうかを明らかにするには今後さらなる検証が必要である。

CB1 の活性化は、食欲増進、エネルギー恒常性、胃腸機能の制御に関与していると報告されている (Izzo *et al.* 1999; Krowicki *et al.* 1999; Landi *et al.* 2002; Marzo *et al.* 2008; Pertwee 2001; Argueta and DiPatrizio 2017; DiPatrizio *et al.* 2011)。先行研究では、マウスにおいて、コーン油経口投与による CCK 分泌促進と、それに伴う満腹感誘導が CB1 アゴニスト処理により抑制されたことが実証されている (Argueta *et al.* 2019)。これらの結果は、ほとんどが WIN 55,212-2 や CP 55,940 などの薬理的アゴニストを用いた試験によって得られている。一方で、食餌脂質由来の 2-AG が、I 細胞膜に発現する CB1 に作用して CCK 分泌を誘導するかどうかは依然として不明である。本研究では、2-AG とアラキドン酸の両方が CCK 分泌を強力に促進したことから、アラキドン酸を豊富に含む TG は、*in vivo* で CCK 分泌を促進することにより、満腹感誘導や胃排出抑制などの生理作用を効果的に発揮する可能性がある。

アラキドン酸が豊富に含まれるのは、鶏肉、卵、魚、乳製品などの動物性食品である (Li *et al.* 1998; Taber *et al.* 1998; Komprda *et al.* 2005; Abedi and Sahari 2014; Kawashima 2019; Tallima and El Ridi 2018)。食餌由来のアラキドン酸を含む膜リン脂質は、ホスホリパーゼ C とそれに続くジアシルグリセロールリパーゼの作用により、内因性の 2-AG 生成に利用される可能性

がある (Ueda *et al.* 2011)。さらに、肉製品や卵黄を摂取すると、消化管内でホスホリパーゼ **A1** が作用し、それに続いて細胞内でホスファターゼまたはホスホリパーゼ **C** が作用することにより、**2-AG** が生成される可能性がある (Aoki *et al.* 2007; Ueda *et al.* 1993; Nakane *et al.* 2002)。これらの可能性を検証し、食餌脂質由来または内因性 **2-AG** が、**CCK** や **GLP-1** 分泌の誘導を介して生理作用を誘導するかどうか、また、*in vivo* における消化管内分泌細胞の栄養感知における **CB1** の関与を実証するためには、さらなる検討が必要である。

本章の研究成果をまとめると、種々の **2-MG** を検討することにより、**2-AG** がマウス小腸上皮由来内分泌細胞株 **STC-1** において **CCK** 分泌を強力に促進すること、マウス大腸上皮由来内分泌細胞株 **GLUTag** において **GLP-1** 分泌を誘導することを見出した。また、アラキドン酸、**1-AG**、**2-AG** エーテルなどとの比較により、構造活性相関を明らかにした。さらに、**CB1** が **2-AG** による **CCK** 分泌誘導を媒介することを明らかにした。これらの結果は、消化管内分泌細胞における新しい **2-MG** 感知機構を明らかにし、食餌脂質由来の **2-AG** または内因性 **2-AG** が **CCK** 分泌を介して生理作用を引き起こす可能性を示唆している。

第 2 章

マウスにおける 2-arachidonoyl glycerol (2-AG)
の胃排出抑制作用およびその作用機構の検討

2-1. 背景と目的

胃からの内容物の排出、すなわち胃排出は食後、主に腸での栄養素の消化・吸収に影響を及ぼす。小腸にある脂質、タンパク質、糖質およびそれらの消化産物などの管腔内栄養素は、消化管内分泌系や神経系を介した胃排出の抑制に重要である（Hellström et al., 2006; Luttikhoud et al., 2013）。胃排出の遅延は栄養素の効率的な消化に寄与する。そのため、胃排出速度は食後の血糖値および脂質代謝に顕著に影響し（Muramatsu et al., 2014; Phillips et al., 2015; Westphal et al., 2004）、胃排出の抑制は食後高血糖、食後高脂血症の緩和をもたらす。

小腸において食餌脂質由来の TG は脂肪酸および 2-MG に加水分解される。2-OG が GLP-1 分泌促進を介して胃排出を抑制することが示唆されているものの（Hansen et al., 2012, 2011; Lauffer et al., 2009）、脂肪酸とは対照的に（Hunt and Knox, 1968; McLaughlin et al., 1999b）、胃排出に対する 2-MG の影響を評価した研究は少ない。

内因性カンナビノイド（Di Marzo and Matias, 2005; Gendaszewska-Darmach et al., 2019; Ueda et al., 2011）の一つである AEA は、脳や末梢組織の CB1 を介して摂食やエネルギー恒常性を調節する。先行研究（Marzo et al., 2008）において、AEA を腹腔内投与することでマウスの胃排出が抑制され、この胃排出抑制作用は CB1 アンタゴニストの腹腔内投与で解除された。これらの結果は、CB1 の活性化が胃排出を抑制することを示唆しているが、その作用部位や消化管ホルモン分泌との関連は不明である。

前章において、2-MG の一種で内因性カンナビノイドの一つである 2-AG が、STC-1 細胞において、CB1 を介して CCK 分泌を強力に促進することを明らかにした。CCK は上部小腸に散在する消化管内分泌細胞である I 細胞から産生される消化管ホルモンの一つ（Dockray, 2012; Rehfeld, 2000）、その生理作用の一つに胃排出の抑制が知られている（Liddle et al., 1986）。さらに、CB1 はマウス十二指腸の CCK 産生細胞に発現していることが報告されている（Argueta et al., 2019; Sykaras et al., 2012）。そこで、「2-AG が消化管内分泌細胞に発現する CB1 を活性化し、CCK 分泌を促進することで胃排出を抑制する」と仮説を立てた。

本章では、マウスにおける 2-AG の胃排出抑制作用およびその作用機構を、胃排出速度

を評価する代表的な試験であるアセトアミノフェン試験およびフェノールレッド試験により検討した。

2-2. 実験材料と実験方法

2-2-1. 実験動物および食餌

雄性 C57BL/6J マウス（6 週齢）を日本 SLC（Hamamatsu, Japan）から購入し、明期 08:00-20:00、温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ に管理された環境で個別に飼育した。自由摂食・自由飲水の条件下で飼育を行い、炭水化物 49.9%、タンパク質 24.8%、脂肪 4.6% を含む実験用飼料（CE-2, CLEC Japan Inc., Tokyo）を与えた。試験は 1 週間以上の馴化期間後に実施し、試験前日に一晩絶食させた。この試験は国立大学法人北海道大学の施設動物管理・使用委員会で承認されており（承認番号：19-0064）、全ての動物実験は北海道大学動物実験に関するガイドラインに従って実施した。

2-2-2. 試薬

アラキドン酸とアセトアミノフェンは Sigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）から購入した。2-AG は Cayman Chemical（Ann Arbor, MI, USA）から購入した。CCK-A 受容体阻害剤である devazepide（Dvz）は ML Laboratories（Liverpool, UK）から寄贈され、選択的 CB1 阻害剤である SR141716A は Tocris Bioscience（Ellisville, MO, USA）から購入した。特に言及しない限り、その他の試薬はすべて富士フイルム和光純薬（Osaka, Japan）から購入した。

2-2-3. アセトアミノフェンを用いた胃排出速度の評価

被検物質は、1.5% w/v のカルボキシメチルセルロース（carboxymethyl cellulose; CMC）、1% w/v のアセトアミノフェン、2% の EtOH を含む生理食塩水に懸濁した。アセトアミノフェン（100 mg/kg BW）は、胃排出速度を評価するための吸収性マーカーとして用いられた（Heading *et al.* 1973; Maida *et al.* 2008）。被検溶液または Vehicle を 10 mL/kg BW の用量でマウスに経口投与した。投与前（0 分）および投与 15、30、60、120 分後に尾静脈血を採取した。血液サンプルは直ちにヘパリン（最終濃度 50 IU/mL ; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan）と混合し、氷冷した。血

液サンプルを $2300 \times g$ 、10 分間、 4°C で遠心分離して分離し、上清（血漿）を分析まで -80°C で保存した。血漿中のアセトアミノフェン濃度測定には、アセトアミノフェン検出キット（Kanto Chemical CO., Inc., Tokyo, Japan）を用いた。

Dvz を用いた試験では、Dvz は 10% TWEEN80、10% DMSO を含む生理食塩水に懸濁した。Dvz (0.5 mg/kg BW) 含有被検溶液または Vehicle を 5 mL/kg BW の用量で腹腔内投与した。その 15 分後に上記の 2-AG (25 mg/kg BW) 含有被検溶液または Vehicle を 10 mL/kg BW の用量で経口投与した。

また、SR141716A を経口投与する試験では、被検物質は、1.5% w/v の CMC、1% w/v のアセトアミノフェン、10% TWEEN80、10% DMSO、2% の EtOH を含む生理食塩水に懸濁した。Vehicle、2-AG (25 mg/kg BW) 含有被検溶液、SR141716A (10 mg/kg BW) 含有被検溶液または、2-AG (25 mg/kg BW) および SR141716A (10 mg/kg BW) 含有被検溶液を 10 mL/kg BW の用量で経口投与した。

SR141716A を腹腔内投与する試験では、腹腔内投与用の被検物質は、10% TWEEN80、10% DMSO を含む生理食塩水に懸濁した。経口投与用の被検物質は、1.5% w/v の CMC、1% w/v のアセトアミノフェン、2% の EtOH を含む生理食塩水に懸濁した。SR141716A (0.5 mg/kg BW) 含有被検溶液または Vehicle を 5 mL/kg BW の用量で腹腔内投与し、その 15 分後に 2-AG (25 mg/kg BW) 含有被検溶液または Vehicle を 10 mL/kg BW の用量で経口投与した。

さらに、別の試験では、胃排出に対する 2-AG の経口投与と腹腔内投与の効果を比較した。マウスをコントロール群、2-AG 経口投与群、2-AG 腹腔内投与群に分けた。コントロールマウスには、アセトアミノフェン溶液 (100 mg/kg BW) を 10 mL/kg BW の用量で経口投与した直後に、1.5% CMC と 2% EtOH を含む滅菌生理食塩水を 10 mL/kg BW の用量で腹腔内投与した。2-AG 経口投与群には、アセトアミノフェン溶液に懸濁した 2-AG (25 mg/kg BW) を 10 mL/kg BW の用量で経口投与した直後に、滅菌生理食塩水を 10 mL/kg BW の用量で腹腔内投与した。最後に、2-AG 腹腔内投与群には、アセトアミノフェン溶液経口投与直後に、1.5% CMC および 2% EtOH を含む滅菌生理食塩水に懸濁した 2-AG (25 mg/kg BW) を 10 mL/kg BW の用量で腹腔内投与した。尾静脈採血を行い、血漿中のアセトアミノフェン濃度を上記と同様に測定した。

2-2-4. RT-PCR

マウスの腸粘膜（十二指腸、空腸、回腸）から、Fast Gene™ RNA Premium Kit（NIPPON Genetics, Tokyo, Japan）を用いて、RNA サンプルを得た。1 µg の RNA から Rever Tra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（TOKYOBO, Osaka, Japan）を用いて cDNA を調製した。

プライマー配列および反応条件

マウス CB1: Accession No.: NM001355020

Fwd: 5'-CCACCTTCCGTACCATCACC-3'

Rev: 5'-AACCAACGGGAGTTGTCTC-3'

反応条件：95°C 2 分→95°C 30 秒、63.3°C 30 秒、72°C 30 秒 x35 サイクル

GAPDH: Accession No.: NM008084

Fwd: 5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3'

Rev: GCTAAGCAGTTGTGGTGCA-3'

反応条件：95°C 2 分→95°C 30 秒、55°C 1 分、68°C 1 分 x40 サイクル

PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動で分離し、Midori Green Advance DNA stain（NIPPON Genetics, #MG04）で可視化した。

2-2-5. フェノールレッドを用いた胃排出率の評価

2-AG（25 mg/kg BW）または Vehicle（生理食塩水中の 1.5% w/v CMC および 2% エタノール）をマウスに 10 mL/kg BW の用量で経口投与した。懸濁液には、胃排出速度を評価するためにアセトアミノフェン（100 mg/kg BW）と、非吸収性マーカーとしてフェノールレッド（5 mg/kg BW）を添加した（Feldman and Gibaldi 1968; Nishimukai *et al.* 2003）。経口投与から 10-12 分後にペントバルビタールナトリウムをマウスに腹腔内投与（50 mg/kg BW）し、麻酔下で経口投与 15 分後に門脈血を採取した。採血用のシリンジには、事前にヘパリン（終濃度 50 IU/mL）、アプ

ロチニン（終濃度 500 KIU/mL）、および DPP-4 阻害剤（終濃度 50 μ M, Millipore, MA, USA）を分取した。血漿は前述の方法で分離・保存した。門脈血採取処置後直ちに、マウスを放血死させた。食道遠位端と十二指腸近位端の両方をクランプした後、胃を摘出した。胃内容物を冷生理食塩水で 2 回洗浄し、洗浄液を回収した。8400 $\times$ g、10 分間、4°C で遠心分離し、残渣を除去した。上清に 1 N NaOH を加えた後（上清の 1/10 量）、フェノールレッドの濃度を 560 nm で分光光度計により測定した。胃排出率は以下のように計算した：

$$\text{胃排出率 (\%)} = \left[\{ \text{投与したフェノールレッドの量 (mg)} - \text{胃に残ったフェノールレッドの量 (mg)} \} / \text{投与したフェノールレッドの量 (mg)} \right] \times 100$$

2-2-6. マウス門脈血漿中 CCK、GLP-1 濃度測定

上述で採取した門脈血漿中の CCK、Total GLP-1 濃度をそれぞれ Cholecystokinin Octapeptide（CCK）（26-33）（Human, Rat, Mouse）（Non-Sulfated）EIA Kit（Phoenix Pharmaceuticals, Inc., #EK-069-04）、Multi Species GLP-1 Total ELISA, 96-well plate（Millipore, #EZGLP1T-36K）を用いて測定した。

2-2-7. 統計解析

結果は平均値を示す棒グラフまたはマーカーと SEM を示す正方向のエラーバーで表した。統計解析は JMP Pro version 14.0.0 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。群間の有意差は、2 群の比較には Student's-*t* test を用い、複数群の比較には Dunnett's post hoc test を用いた。すべての解析において、 $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

2-3. 結果

2-3-1. 2-AG の胃排出抑制作用

まず、2-AG またはアラキドン酸の経口投与が絶食マウスの胃排出に及ぼす影響を、吸収性マーカーであるアセトアミノフェンを用いて検討した (Fig. 2-1)。すべての群において、尾静脈血漿中アセトアミノフェン濃度は試験液経口投与直後に上昇し、15 分または 30 分以後に徐々に低下した。コントロール (Vehicle) 群と比較して、2-AG 経口投与群およびアラキドン酸経口投与は 15 分後の尾静脈血中のアセトアミノフェン濃度が有意に低かった (Vehicle, $487.4 \pm 38.1 \mu\text{M}$; 2-AG, $377.8 \pm 12.8 \mu\text{M}$; アラキドン酸, $332.9 \pm 32.9 \mu\text{M}$)。

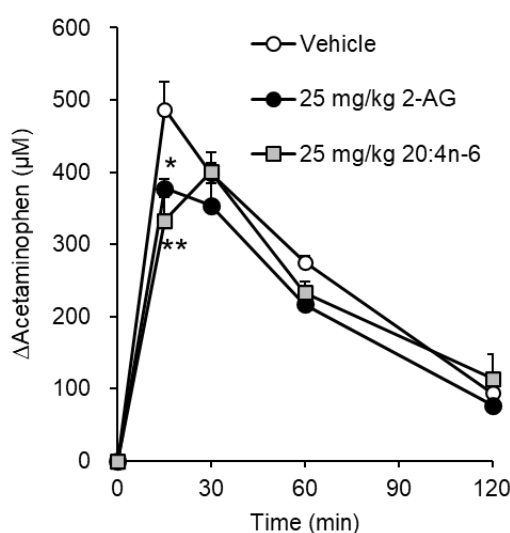


Fig. 2-1. Effects of oral administration of 2-AG or 20:4n-6 on gastric emptying. 2-AG or 20:4n-6 (25 mg/kg) was orally administered to fasted mice along with acetaminophen. Blood samples were collected from the tail vein for up to 120 min, and plasma acetaminophen concentrations were measured. Values are expressed as changes from the basal (0 min) concentration of plasma acetaminophen ($\Delta\text{Acetaminophen}$) and as the mean + SEM ($n = 6$). Plots with asterisks (*) show significant differences compared with the control group at the same time point (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test). 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; 20:4n-6, arachidonic acid.

2-3-2. 2-AG の作用における CCK シグナルの関与

次に、CCK-A 受容体アンタゴニストである Dvz を用いて、経口 2-AG の作用における CCK-A 受容体の関与を検討した。Control / Vehicle 群（15 分後、 $574.5 \pm 30.7 \mu\text{M}$; 30 分後、 $489.9 \pm 23.0 \mu\text{M}$ ）と比較して、2-AG の単回経口投与は、15 分後（ $428.0 \pm 36.2 \mu\text{M}$ ）および 30 分後（ $386.9 \pm 30.7 \mu\text{M}$ ）のアセトアミノフェン濃度を有意に低下させた（Fig. 2-2A）。一方で、Dvz を腹腔内投与した後に 2-AG を経口投与した群は、アセトアミノフェン濃度が Vehicle の経口投与群と比較して有意な差がみられなかった（Fig. 2-2B）。

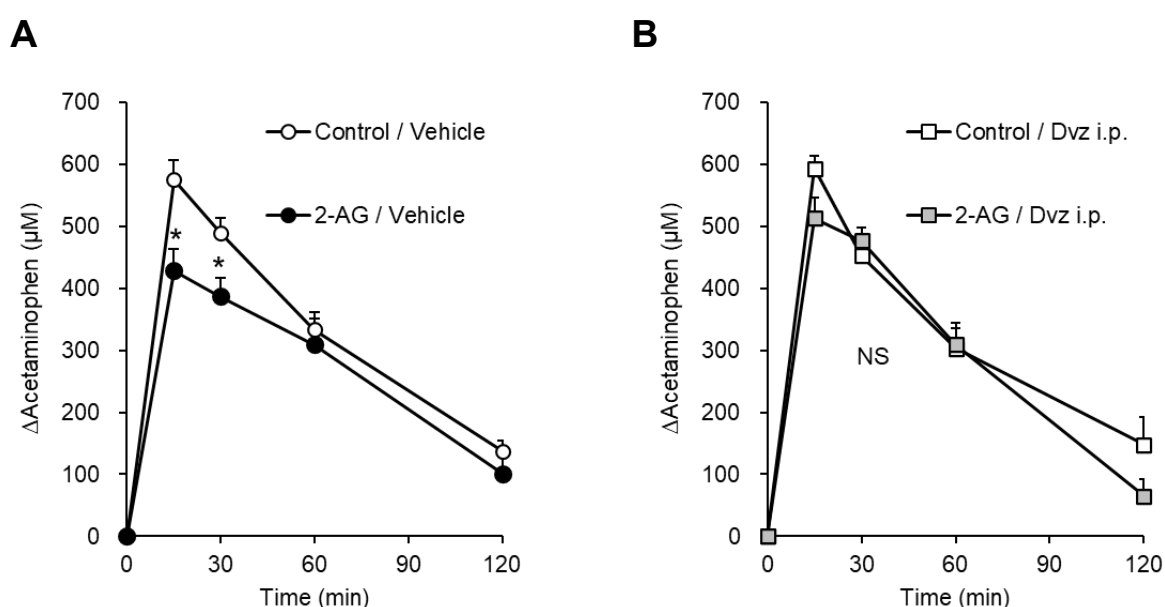


Fig. 2-2. Effects of 2-AG on gastric emptying in the absence (A) or presence (B) of the CCK-A receptor antagonist (devazepide). Dvz (0.5 mg/kg) or vehicle (10% TWEEN80 + 10% DMSO in sterilized saline) was intraperitoneally injected at a dose of 5 mL/kg, 15 min before the oral administration of 2-AG (0 or 25 mg/kg) and acetaminophen (100 mg/kg) in fasted mice. Values are expressed as changes from the basal (0 min) concentration of plasma acetaminophen ($\Delta\text{Acetaminophen}$) and as the mean + SEM ($n = 6$). Plots with asterisks (*) show significant differences compared with the control group at the same time point (* $p < 0.05$, Student's t -test). NS indicates that there was no significant difference between treatments. 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; Dvz, devazepide; CCK, cholecystokinin.

2-3-3. 2-AG の作用における CB1 の関与

2-AG はエンドカンナビノイド受容体である CB1 のリガンドである (Ueda *et al.* 2011; Gendaszewska-Darmach *et al.* 2019)。PCR 法により、C57/BL6J マウスの十二指腸、空腸、回腸では、CB1 について予想される DNA サイズ (182 bp) で単一バンドが検出された (Fig. 2-3A-C)。

CB1 の関与を検証するために、次に選択的 CB1 阻害剤である SR141716A を投与してアセトアミノフェン試験を行った。2-AG を単回経口投与すると、15 分後のアセトアミノフェン濃度が対照群に比べて有意に低下した (Fig. 2-3D; Control, $515.7 \pm 35.6 \mu\text{M}$; 2-AG, $369.3 \pm 24.5 \mu\text{M}$)。一方で、2-AG とともに SR141716A を経口投与した群は、対照群との間にアセトアミノフェン濃度の有意な差は認められなかった (Fig. 2-3E)。次に、SR141716A の腹腔内投与の効果を調べた。SR141716A の腹腔内投与下では (Fig. 2-3G)、2-AG 経口投与による 15 分後のアセトアミノフェン濃度の有意な低下 (Fig. 2-3F, Control/ Vehicle, $496.6 \pm 34.2 \mu\text{M}$; 2-AG/ Vehicle, $366.4 \pm 30.6 \mu\text{M}$) は観察されなかった。

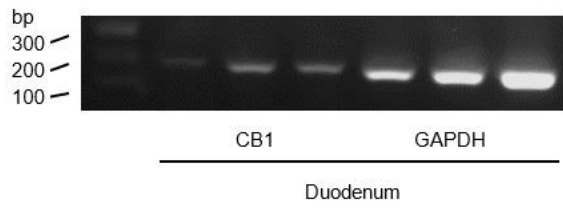
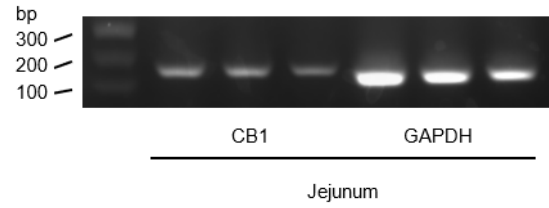
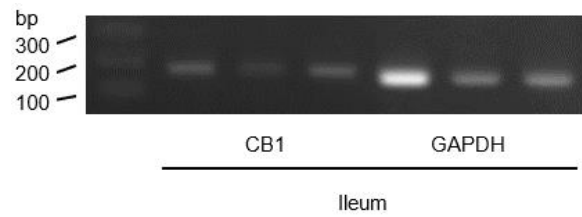
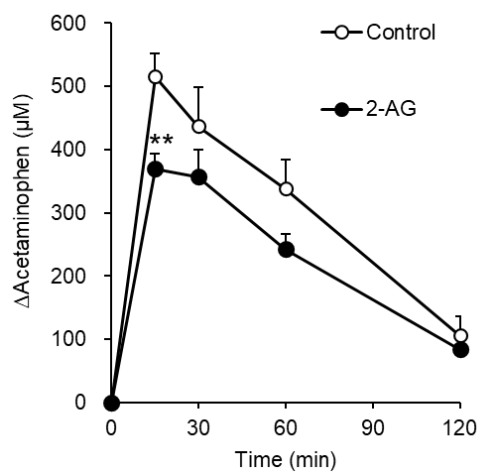
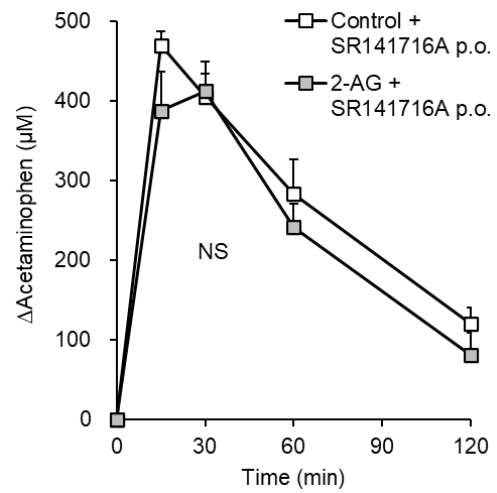
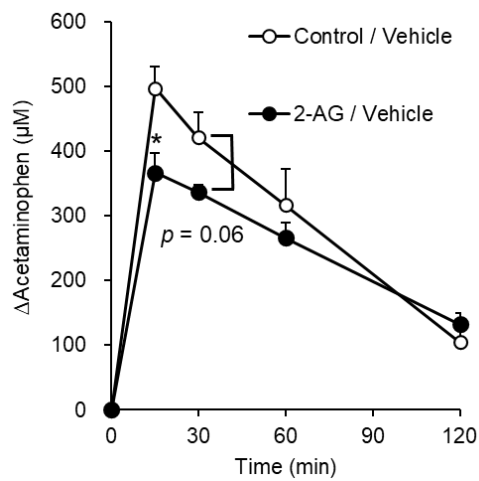
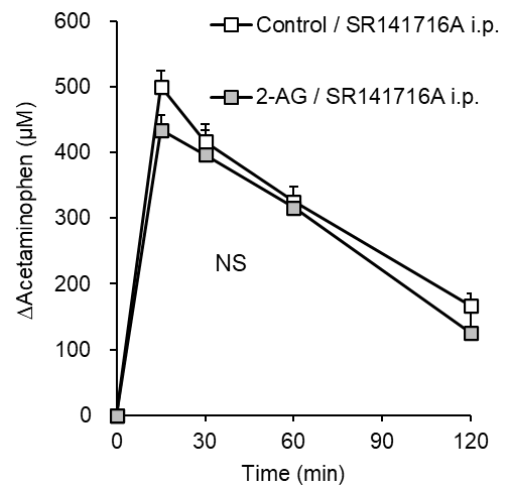
A**B****C****D****E****F****G**

Fig. 2-3. Expression of CB1 in the mouse intestinal mucosa and effects of 2-AG on gastric emptying in the absence or presence of CB1 antagonist (SR141716A). Total RNA was extracted from the C57/BL6J mouse small intestine ((A) duodenum, (B) jejunum, or (C) ileum) and then subjected to RT-PCR with specific CB1 or GAPDH primers. PCR products were separated in agarose gel and visualized by Midori Green Advance DNA stain. (D, E) 2-AG (25 mg/kg) was orally administered to fasted mice with SR141716A (10 mg/kg) or vehicle (saline containing 1.5% w/v CMC, 1% w/v acetaminophen, 10% TWEEN80, 10% DMSO, and 2% ethanol). (F, G) SR141716A (0.5 mg/kg) or vehicle (10% TWEEN80 + 10% DMSO in sterile saline) was intraperitoneally injected at a dose of 5 mL/kg, 15 min before the oral administration of 2-AG (0 or 25 mg/kg) and acetaminophen in fasted mice. Values are expressed as changes from the basal (0 min) concentration of plasma acetaminophen (Δ Acetaminophen) and as the mean + SEM ($n = 5-6$). Plots with asterisks (*) show significant differences compared with the control group at the same time point (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Student's t -test). NS indicates that there was no significant difference between the treatments. 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol.

2-3-4. フェノールレッド試験による胃排出率評価

2-AG の胃排出抑制作用に CB1 が関与していることをさらに検証するために、非吸収性マーカーであるフェノールレッドを用いた試験を実施した。その結果、2-AG 経口投与群では胃排出率が Control / Vehicle 群よりも有意に低く (Fig. 2-4A; Control / Vehicle, $85.2 \pm 2.1\%$; 2-AG / Vehicle, $66.7 \pm 6.3\%$)、2-AG の胃排出抑制作用がさらに支持された。SR141716A を事前に腹腔内投与すると、対照群と 2-AG 経口投与群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 2-4B; Control / SR141716A, $79.2 \pm 4.9\%$; 2-AG / SR141716A, $73.1 \pm 5.6\%$)。フェノールレッド試験の結果と同様に、門脈血漿中のアセトアミノフェン濃度は、2-AG 経口投与群で Control / Vehicle 群よりも有意に低く (Fig. 2-4C; Control / Vehicle, $646.4 \pm 24.2 \mu\text{M}$; 2-AG / Vehicle, $490.1 \pm 28.1 \mu\text{M}$)、対照的に、SR141716A を腹腔内投与すると、血漿中アセトアミノフェン濃度は対照群と 2-AG 群の間に有意な差はみられなくなった (Fig. 2-4D; Control / SR141716A i.p., $636.8 \pm 50.8 \mu\text{M}$; 2-AG / SR141716A i.p., $546.8 \pm 55.5 \mu\text{M}$)。

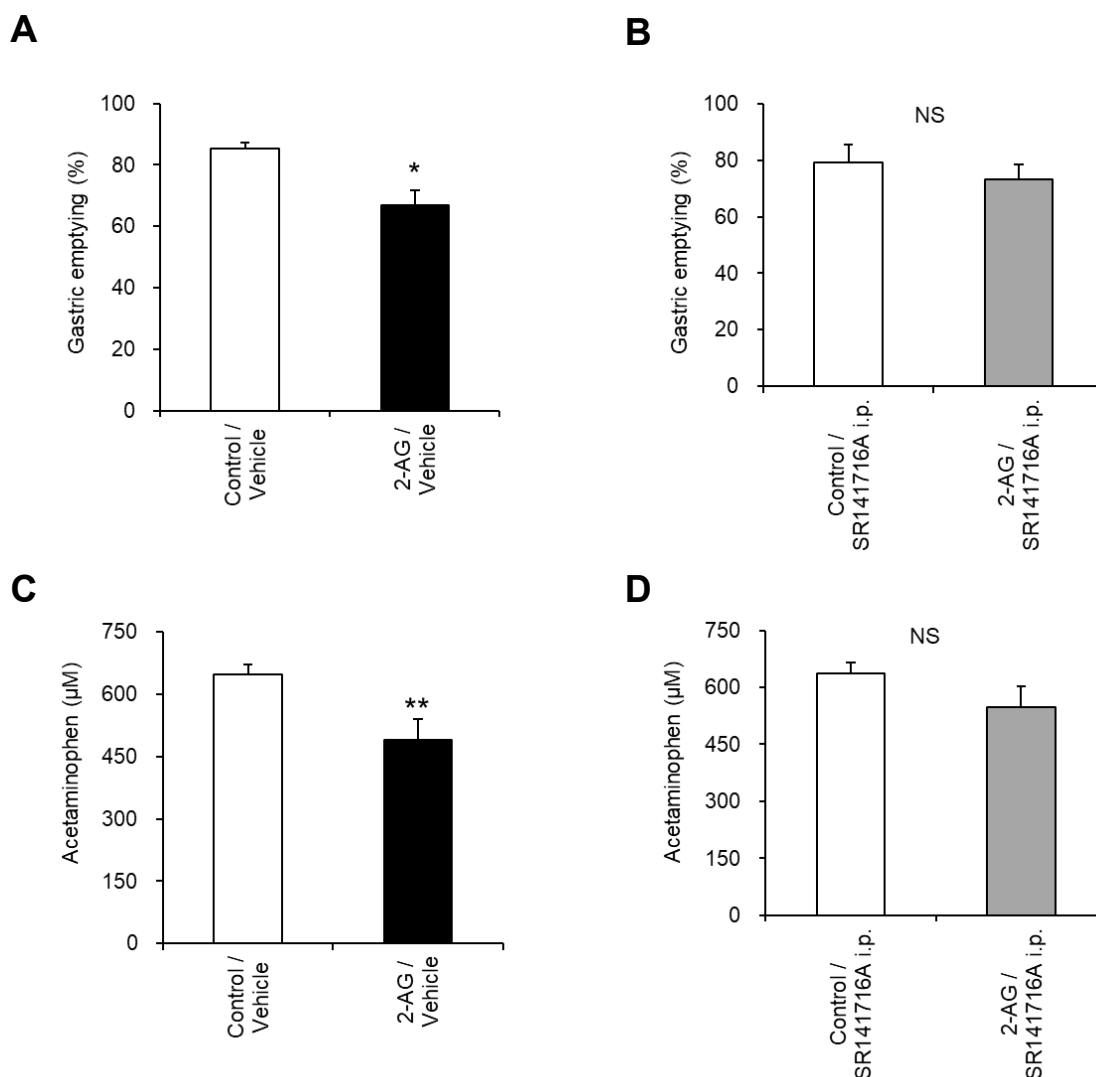


Fig. 2-4. Effects of 2-AG on the gastric emptying rate in the absence (A, C) or presence (B, D) of SR141716A (phenol red recovery method). 2-AG (25 mg/kg) was orally administered to fasted mice along with phenol red and acetaminophen, 15 min after the intraperitoneal injection of SR141716A (0.5 mg/kg) or vehicle (10% TWEEN80 + 10% DMSO in sterilized saline). Stomach contents and portal blood were collected 15 min after oral administration. (A, B) The gastric emptying rate was determined by measuring luminal phenol red collected from the stomach. (C, D) Acetaminophen levels in the portal plasma were measured. Values are expressed as the mean + SEM ($n = 5-6$). Plots with asterisks (*) show significant differences compared to the control group (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Student's t -test). NS indicates that there was no significant difference between the treatments. 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol.

2-3-5. 2-AG 腹腔内投与による胃排出抑制効果

CB1 アンタゴニストの腹腔内投与が 2-AG の胃排出抑制作用を減弱させた (Fig. 2-3, 2-4) ことから、次に 2-AG の腹腔内投与の効果を検討した (Fig. 2-5)。同一用量 (25 mg/kg) では、2-AG の経口投与と腹腔内投与の両方が、15 分後の血漿アセトアミノフェン濃度の上昇を有意に抑制した (Vehicle, $437.8 \pm 12.9 \mu\text{M}$; Oral 2-AG, $352.9 \pm 31.9 \mu\text{M}$; Intraperitoneal 2-AG, $188.5 \pm 21.3 \mu\text{M}$)。腹腔内投与では 30 分後でもアセトアミノフェン濃度がコントロール (Vehicle) 群と比較して有意に低く (Vehicle, $363.4 \pm 29.5 \mu\text{M}$; Intraperitoneal 2-AG, $236.8 \pm 30.5 \mu\text{M}$)、経口投与より胃排出抑制作用の持続性が認められた。120 分後、2-AG 腹腔内投与群のアセトアミノフェン濃度はコントロール群より有意に高かった (Vehicle, $41.8 \pm 16.0 \mu\text{M}$; Intraperitoneal 2-AG, $209.4 \pm 39.6 \mu\text{M}$)。

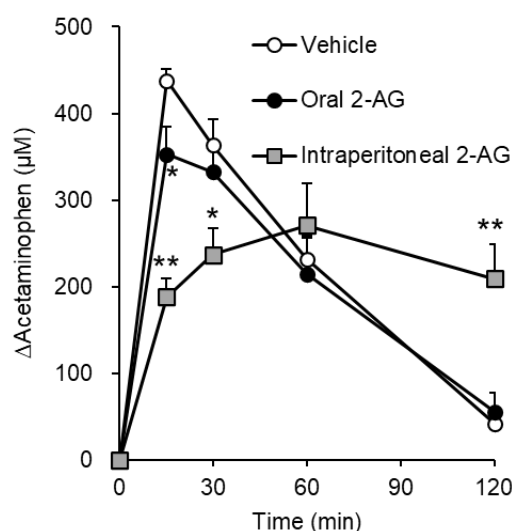


Fig. 2-5. Effect of intraperitoneal administration of 2-AG on gastric emptying. 2-AG (25 mg/kg) was orally or intraperitoneally coadministered (10 mL/kg) to fasted mice with oral acetaminophen. Values are expressed as changes from the basal (0 min) concentration of plasma acetaminophen (Δ Acetaminophen) and as the mean + SEM ($n = 6$). Plots with asterisks (*) show significant differences compared to the control group at the same time point (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test). 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol.

2-3-6. 2-AG 経口投与による CCK、GLP-1 分泌変動と CB1 の関与

2-AG 経口投与により実際に CCK 分泌が亢進されているか、またその作用における CB1 の関与を検証した。また、マウス大腸上皮由来内分泌細胞株 GLUTag を用いた前章の試験において、2-AG が GLP-1 分泌を誘導することが示されており、GLP-1 も CCK 同様に胃排出抑制作用を有するため、2-AG 経口投与による GLP-1 分泌への影響も併せて検証した。その結果、門脈血漿中 CCK 濃度は 2-AG 経口投与群でコントロール群と比較して有意に高く (Fig. 2-6A; Control / Vehicle, $53.7 \pm 5.7 \mu\text{M}$; 2-AG / Vehicle, $75.4 \pm 7.1 \mu\text{M}$)、SR141716A の事前腹腔内投与処理で有意な差はみられなくなった (Fig. 2-6B; Control / SR141716A i.p., $55.2 \pm 6.2 \mu\text{M}$; 2-AG / SR141716A i.p., $59.4 \pm 7.2 \mu\text{M}$)。一方で、門脈血漿中 total GLP-1 濃度は 2-AG の有無 (Fig. 2-6C; Control / Vehicle, $27.1 \pm 5.3 \mu\text{M}$; 2-AG / Vehicle, $24.7 \pm 4.3 \mu\text{M}$)、SR141716A の有無 (Fig. 2-6D; Control / SR141716A i.p., $37.9 \pm 5.7 \mu\text{M}$; 2-AG / SR141716A i.p., $26.0 \pm 7.0 \mu\text{M}$) に関わらず、有意な差はみられなかった。

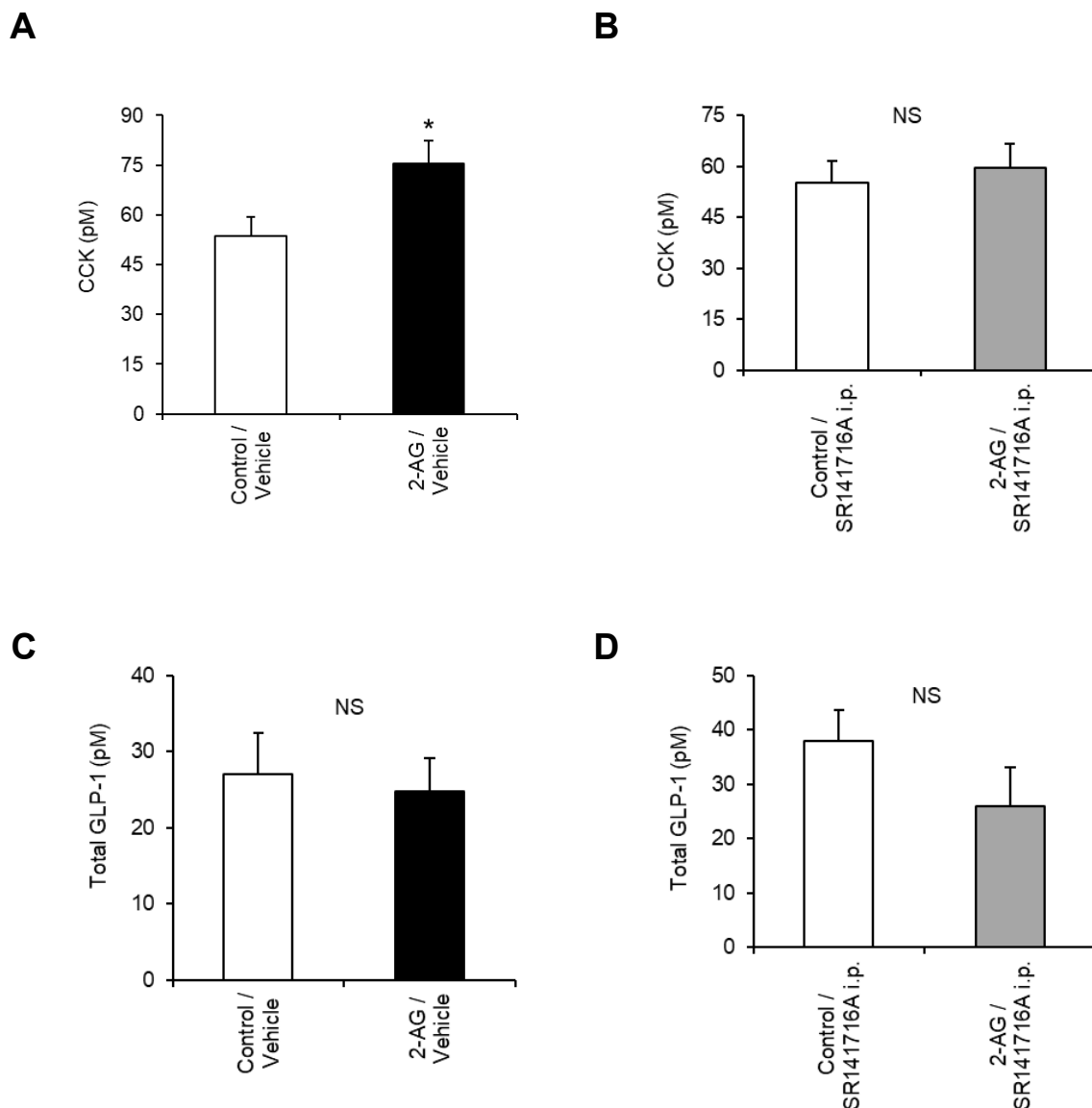


Fig. 2-6. Effects of oral administration of 2-AG on the portal (A, B) CCK and (C, D) total GLP-1 concentration in the absence (A, C) or presence (B, D) of CB1 antagonist (SR141716A). SR141716A (0.5 mg/kg) or vehicle (10% TWEEN80 + 10% DMSO in sterile saline) was intraperitoneally injected at a dose of 5 mL/kg, 15 min before the oral administration of 2-AG (0 or 25 mg/kg) in fasted mice. Portal blood was collected 15 min after oral administration of vehicle or 2-AG. Values are expressed as the mean + SEM ($n = 5-6$). Plots with asterisks (*) show significant differences compared with the control group at the same time point (* $p < 0.05$, Student's t -test). NS indicates that there was no significant difference between the treatments. 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol.

2-4. 考察

本章では、アラキドン酸結合型 **2-MG** である **2-AG** のマウスにおける胃排出への影響を検証し、そのメカニズムを解明することを研究目的とした。その結果、**2-AG** の経口投与 (**25 mg/kg BW**) により、マウスの胃排出が抑制されることが確認された。さらに、**CCK-A** および **CB1** 受容体アンタゴニストを用いた試験により、**CCK** シグナルおよび **CB1** の関与を明らかにした。これらの結果は、消化管内分泌細胞における **2-MG** の感知機構ならびに、**2-MG** の生理的役割の理解を深めるものであると考えられる。

2-AG の経口投与 (**25 mg/kg BW**) は、アラキドン酸 (**25 mg/kg BW**) と同様に 15 分後のアセトアミノフェン濃度の上昇をコントロール群と比較して有意に低下させたが、アセトアミノフェン濃度がピークとなる時間は **2-AG** 投与群 (15 分) とアラキドン酸投与群 (30 分) では異なる傾向があった (Fig. 2-1)。前章では、マウス消化管内分泌細胞株 **STC-1** において、**2-AG** は **CB1** を介して **CCK** 分泌を促進し、アラキドン酸は **GPR120** を介して **CCK** 分泌を促進することが示唆された。アラキドン酸の生体内における作用機序の解明にはさらなる研究が必要であるが、今回の結果 (Fig. 2-1) は、アラキドン酸が構成脂肪酸として多くの割合を占める **TG** が強い胃排出抑制作用を示すことを示唆するものであった。

本研究で用いた **2-AG** の投与量 (**25 mg/kg BW**) について考察する。これまでの報告 (Hansen and Vana, 2019; Hansen et al., 2012) によると、欧米人は 1 日に約 100 g の脂質 (**TG**) を摂取しており、1 日 3 食と仮定すると 1 食あたり 33 g の脂質に相当する。1 回の食事で 33 g の脂質を摂取すると、理論上、小腸で最大 11 g の **2-MG** が生成する可能性がある。例えば、11 g/80 kg BW は 138 mg/kg BW に相当し、本研究で使用した用量 (**25 mg/kg BW** = 2 g/80 kg BW) よりもかなり高いことが分かる。また、先行研究では、体重 73-97 kg のヒトにおいて、2 g の **2-OG** を空腸に投与することにより **GLP-1** 分泌が促進されることが示されている (Hansen et al., 2011)。この先行研究では、脂肪酸組成の大部分をオレイン酸が占めるオリーブオイルを 5 ml 摂取した際に、膵リパーゼによる消化で、約 2 g の **2-OG** と約 3.2 g のオレイン酸が産生されるものとして臨床試験が設計されている。5 ml は小さじ 1 杯相当であり、食経験からも生理的な範囲内であると考え

られる。一方で、アラキドン酸はオレイン酸とは異なり、食餌由来 TG の脂肪酸組成に占める割合は一般に低く、その摂取量は一般的な成人において 100–250 mg/日程度と報告されている (Kawashima 2019)。そのため、TG 摂取量から単純に 2-AG 生成量を外挿することは適切ではなく、2-OG 投与研究と同用量であることのみをもって 2-AG の投与量を生理的であるとは結論づけられない。しかしながら、2-AG は空腹時には中枢神経系および空腸粘膜で増加するため (Argueta and DiPatrizio, 2017; Burdyga et al., 2010; DiPatrizio et al., 2015; Gómez et al., 2002; Kirkham et al., 2002)、消化管において局所濃度が一過的に上昇する可能性がある。そのような環境下では、総摂取量としては微量であっても、局所的には生理作用を発揮し得る濃度に到達する可能性も否定できない。この可能性を検証するには、さらなる検討が必要であるが、本研究は、2-AG が消化管において局所的に増加した場合にどのような生理応答を誘導し得るかを明らかにするための基礎的検討として意義を有すると考えられる。

CCK は主に末梢神経に発現する CCK-A 受容体に認識され、胃排出を抑制する (Herranz, 2003)。CCK-A 受容体アンタゴニストである Dvz を腹腔内投与処理すると、経口 2-AG の胃排出抑制作用が解除された (Fig. 2-2) ことから、CCK シグナルの関与が示唆された。STC-1 細胞において、2-AG が CCK 分泌を促進するという前章の結果は、経口投与した 2-AG が CCK 産生消化管内分泌細胞、すなわち I 細胞に作用して CCK 分泌を促進することを支持する。実際に本研究において、2-AG の経口投与がマウス門脈血漿中 CCK 濃度をコントロール群と比較して有意に増大させた (Fig. 2-6A) ことから、CCK シグナルの関与が支持される。

2-AG はエンドカンナビノイドの一つであり、これまでの報告ではエンドカンナビノイド系が脳や末梢神経の CB1 を介して摂食やエネルギーバランスを調節するとされている (Di Marzo and Matias, 2005; Osei-Hyiaman et al., 2006; Sharkey and Pittman, 2005)。本研究において、マウスの小腸（十二指腸、空腸、回腸）に CB1 が発現していることを確認した (Fig. 2-3A-C)。この結果は、マウスの消化管全体に CB1 が発現していることを明らかにした過去の知見と一致する (Casu et al., 2003)。CB1 アンタゴニストである SR141716A を経口投与すると、2-AG の経口投与による胃排出抑制作用が解除されたことから、腸管に発現する CB1 は、2-AG による胃排出抑制の作用経路に関わっていると考えられる (Fig. 2-3D, E)。さらに、CB1 の発現はマウスの CCK

産生細胞、すなわち I 細胞において確認されており (Argueta et al., 2019; Sykaras et al., 2012)、前章においても、2-AG が STC-1 細胞に発現する CB1 を介して CCK 分泌を強力に促進することを明らかにした。これらを踏まえると、2-AG は I 細胞に発現する CB1 に作用して CCK 分泌を促進し、それによって胃排出を抑制している可能性がある。また、CB1 アンタゴニストの腹腔内投与処理は、アセトアミノフェン試験およびフェノールレッド試験における経口 2-AG の胃排出抑制作用を解除した (Fig. 2-3F, G; Fig. 2-4)。これらの結果から、2-AG は腸上皮細胞で吸収された後、CCK 産生細胞の基底膜側または末梢神経に発現する CB1 に作用して胃排出を抑制することが示唆された。

この考えと一致するように、2-AG の腹腔内投与は経口投与と比較して胃排出を強力に抑制した (Fig. 2-5)。また、先行研究 (Marzo et al., 2008) では、AEA の腹腔内投与により観察された胃排出の抑制が、CB1 アンタゴニストの腹腔内投与処理により解除された。さらに、本研究において、2-AG の経口投与による門脈血漿中 CCK 濃度の増大が CB1 アンタゴニストの腹腔内投与処理によって解除された (Fig. 2-6B)。これらの結果は上述の可能性を支持するものである。

CCK-A 受容体アンタゴニストや CB1 アンタゴニストを投与しても、2-AG による胃排出抑制作用を完全に解除することはできなかった (Fig. 2-2, 2-3D-G, 2-4)。これらの結果は、本実験条件下での CCK-A または CB1 の阻害が不十分であること、または他のメカニズムの関与によるものと思われる。前者に関しては、本研究で用いた用量は過去の報告 (Chen et al., 2012; Hira et al., 2015; Madsen et al., 2009; Marzo et al., 2008; Orio et al., 2011) に基づくものであるため、阻害が不十分であったとは考えにくい。他のメカニズムとして、GLP-1 が胃排出を抑制する代表的な消化管ホルモンとして知られており (Phillips et al., 2015)、マウス大腸上皮由来内分泌細胞株 GLUtag を用いた前章の試験で、2-AG が GLP-1 分泌を促進することが示されているため、GLP-1 の関与が疑われた。そこで、2-AG の経口投与ならびに CB1 アンタゴニストの腹腔内投与処理による門脈血漿中 Total GLP-1 濃度への影響を検討したが、いずれの操作でも GLP-1 濃度の変動は認められなかった (Fig. 2-6C, D)。先行研究 (González-Mariscal et al., 2016) では、CB1 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ、再給餌後の血中 GLP-1 濃度が有意に高く、CB1 が GLP-1 を負に制御する可能性が示唆されている。また、2-MG を含む脂質の多くは上部小腸で吸収され

(Lema et al. 2020)、L 細胞が主に下部小腸から大腸に散在するため (Baggio and Drucker 2007)、GLP-1 分泌促進に必要な量の 2-AG が下部小腸まで到達しなかった可能性がある。これらを踏まえると、少なくとも GLP-1 が 2-AG の胃排出抑制作用に関与する可能性は低いと考えられる。

先行研究 (Burdyga, 2004) により、CCK-A 受容体を発現する求心性迷走神経が CB1 も共発現すること、節上神経節における CB1 の発現が空腹時に増加し、CCK (食後シグナルを模倣する) により抑制されることが示されている。さらに、CCK-A 受容体アンタゴニストである lorglumide は、再給餌後の求心性迷走神経における CB1 発現の低下を阻害する報告がある (Burdyga, 2004)。これらの先行研究の結果と本研究の結果より、2-AG による胃排出抑制機構として以下の経路が考えられる。CCK-A 受容体を阻害した際、2-AG による求心性迷走神経上の CB1 の活性化が胃排出の抑制に寄与する。求心性迷走神経および腸上皮細胞基底膜側の CB1 を阻害すると、2-AG による I 細胞の管腔側に発現する CB1 の活性化を介した CCK 分泌の促進が胃排出の抑制に寄与する。今後の研究で、CCK-A 受容体アンタゴニストと CB1 アンタゴニストの経口または腹腔内の共投与により、これらの可能性が明らかになるとと思われる。

2-AG の腹腔内投与は同用量 (25 mg/kg BW) の経口投与と比較して (Fig. 2-5)、より強く、かつ持続的に胃排出を抑制した (~30 分)。その結果、血漿中アセトアミノフェン濃度のピークは、他の群 (15 分後) に比べてかなり遅く (60 分後)、2-AG 腹腔内投与群では、120 分後の血漿中アセトアミノフェン濃度が他の 2 群より有意に高くなった。2-AG の腹腔内投与が 2-AG の経口投与よりも強力な作用を示す理由は 3 つ考えられる。第一に、経口投与された溶液は短時間に一定量しか小腸に流れ込まず、胃液や腸液によって希釈されるためである。第二に、2-AG は腸上皮細胞の細胞膜および細胞質に発現する MAGL などの加水分解酵素によって分解され (Blankman et al., 2007; Dinh et al., 2002a, 2002b)、また、細胞内では TG に再合成されるので、基底膜外側に移行するのはほんの一部にすぎない (Mu and Høy, 2004) と考えられるためである。第三に、腹腔内投与では消化管内分泌細胞以外に発現する CB1 に広く作用する可能性があるためである。経口投与後の管腔内における 2-AG の存在量や吸収後の細胞外への移行、腹腔内投与時の 2-AG の作用点等を確認するためにはさらなる検討が必要である。

急速な胃排出は食後高血糖や食後高脂血症の原因となるため、胃排出の抑制は耐糖能異常

や脂質異常症の予防・軽減のための有望なターゲットと考えられる。本研究の限界として、主に **2-AG** の *in vivo* での作用に着目したため、**2-AG** の胃排出抑制作用を他の **2-MG** と比較しなかったことが挙げられる。本研究の目的の範囲外ではあるが、**2-AG** と他の **2-MG** の胃排出に対する影響を比較することは、**2-MG** の生理的役割について新たな知見を与えるものであり、今後の研究の余地があると思われる。また、**2-AG** を含む食餌脂質由来の **2-MG** が、食後の血糖値や脂質異常症などの疾患に及ぼす影響を検証するためには、さらなる検討が必要である。

本章では、**2-AG** の経口投与はアセトアミノフェン試験およびフェノールレッド試験で評価したマウスの胃排出を抑制した。さらに、**CCK-A** 受容体や **CB1** のアンタゴニストを用いた試験により、**CCK** や、求心性迷走神経および **CCK** 産生消化管内分泌細胞に発現する **CB1** の関与が示唆された。以上の結果より、**2-AG** は **CB1-CCK** および/または **CB1** シグナル経路を介して、マウスの胃排出を抑制することが明らかとなり、**2-AG** と胃排出速度を制御する神経内分泌系との間の新たな生理的相互作用が示された。

第 3 章

食品タンパク質誘導性熱産生における GLP-1 の関与

3-1. 背景と目的

食後の体温上昇は、TEF、DIT、SDA などと呼ばれ、食事摂取後のエネルギー消費量の増加によって引き起こされるものである (Westerterp 2004)。DIT は、基礎代謝、身体活動時代謝とともに、1日のエネルギー消費量を構成する3要素のうちの1つである (Westerterp 2004)。DIT は1日のエネルギー消費量の10%程度に過ぎないが、その低下はエネルギー収支を正に傾け、長期的には体脂肪の蓄積につながると考えられている (Ho 2018)。DIT は一般的に、不可避の体熱産生 (obligatory thermogenesis) と任意的体熱産生 (facultative thermogenesis) の2つの要素に分けられる。不可避の体熱産生とは、摂取した栄養素の消化・吸収・貯蔵などの義務的な反応、エネルギーコストを指し、一方で、任意的体熱産生とは、過剰に摂取したエネルギーを感知して、熱としてそのエネルギーを放散する付随的な熱産生を指す (Saito et al. 2020)。

DIT、特に不可避の体熱産生の大きさは、食品のエネルギー量だけではなく、食品の構成成分にも依存し、摂取エネルギーに対して、タンパク質 20-30%、糖質 5-10%、脂質 0-3%、混合食 10%程度とされている (Scott and Devore 2005; Karst et al. 1984; Tappy 1996)。タンパク質の強力な熱産生作用は、代謝に多くのエネルギーを消費するためと推測されているが (Van Milgen 2002)、その根底となるメカニズムは十分に解明されていない。

BAT の活性が高いヒトと低いヒトを用いた研究では、エネルギーバランスのとれた食事に対する DIT 応答への BAT の寄与は部分的 (約 30%) であることが示されており (Hibi et al. 2016)、食後熱産生において、BAT 活性化とは異なる主要なメカニズムが存在することが示唆されている。

ラットを用いた先行研究において、タンパク質の摂取は、炭水化物や脂質を摂取するよりも血中 GLP-1 濃度を高めることが見出されている (Shimizu et al. 2021; Hira et al. 2021)。このメカニズムは、食餌性タンパク質 (ホエイタンパク質など) の消化により生成されるペプチドが大きく寄与し、消化管管腔での GLP-1 分泌を促進するとともに、腸内局所血中の DPP-4 活性を阻害するためと推察される。食後熱産生の強力な誘導因子として知られるタンパク質摂取が、GLP-1 分泌も強力に誘導するというこれまでの知見に基づき、食餌性タンパク質の熱産生作用に

GLP-1 が関与していると仮説を立てた。

いくつかの先行研究では、GLP-1 の熱産生に対する効果が検討されている。GLP-1 の静脈内投与は、ラットにおいて用量依存的にエネルギー消費量および深部体温の上昇を引き起こし (Osaka *et al.* 2005)、また、ヒトにおいても GLP-1 の静脈内注射はエネルギー消費量を上昇させた (Shalev *et al.* 1997)。さらに、GLP-1 または GLP-1R アゴニストの脳室内投与は、交感神経系 (sympathetic nervous system; SNS) の活性化を介して肩甲骨間褐色脂肪組織 (interscapular brown adipose tissue; iBAT) の熱産生を促進した (Lockie *et al.* 2012; Beiroa *et al.* 2014)。しかしながら、内因性 (消化管由来) の GLP-1 が食後熱産生にどの程度寄与しているかは不明である。

本章では、「食餌性タンパク質の熱産生作用に GLP-1 が関与する」という仮説を検証するために、簡便で一般的な深部体温の評価法である直腸温測定により、まず、食餌性タンパク質が炭水化物や脂質と比較して強力な熱産生作用を持つかどうかを検討した。次に、GLP-1 をはじめとする各種消化管ホルモンがタンパク質による熱産生作用に関与しているかどうかを、各種消化管ホルモン受容体アンタゴニスト、GLP-1R ノックアウト (glucagon-like peptide-1 receptor knockout; Glp1r KO) マウス、DPP-4 阻害剤などを用いて検討した。

3-2. 実験材料と実験方法

3-2-1. 実験動物（ラット）および食餌

雄性 Sprague-Dawley ラット（6 週齢）は日本 SLC（Hamamatsu, Japan）から購入し、明期 08:00-20:00、温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ に管理された環境で個別に飼育した。自由摂食・自由飲水の条件下で飼育を行い、AIN-93G 飼料 (Reeves 1997) を与えた。試験は 4-7 日間の馴化期間を経て、動物が取り扱いおよび測定環境に十分に慣れた後に実施した。本研究は、国立大学法人北海道大学の施設動物管理・使用委員会で承認されており（承認番号：19-0064）、全ての動物実験は北海道大学動物実験に関するガイドラインに従って実施した。

3-2-2. 実験動物（マウス）および食餌（京都府立大学にて実施）

雄性 C57BL/6J マウス（8 週齢）はジャクソン・ラボラトリー・ジャパン（Yokohama, Japan）から購入した。Glp1r KO C57BL/6J マウス (Scrocchi *et al.* 1996) は Lunenfeld Tanenbaum Research Institute で生まれ、Dr. J. Drucker 博士より供与された。温度と湿度が調節された部屋（ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $55 \pm 5\%$ ）で飼育され、12 時間の明暗サイクル（8:00-20:00 の明期）に維持された。標準的な飼料（CE-2, CLEC Japan Inc., Tokyo）と水を自由に摂取できた。試験は、4-7 日間の馴化期間を経て、動物が取り扱いおよび測定環境に十分に慣れた後に実施された。本研究は、京都府立大学動物実験委員会の承認を得て（承認番号：KPU040907-4C-C）、同大学の動物実験規程に従って実施された。

3-2-2. 実験材料

分離大豆タンパク質 (soy protein) は MP Biomedicals 社から購入した（タンパク質 92%；905456；Solon, OH, USA）。分離ホエイタンパク質 (whey protein, > 90% タンパク質；WPI8855) は Fonterra 社から購入した。精製米胚乳タンパク質 (rice protein；78.5%タンパク質) は亀田製菓株式会社 (Niigata, Japan) より提供された。デキストリン (TK-16；重合度 5.5) は、松谷化学

工業株式会社 (Hyogo, Japan) より提供された。大豆油は、株式会社 J-オイルミルズ (Tokyo, Japan) より提供された。非選択的 β -アドレナリン受容体 (β -adrenergic receptor; β AR) 阻害剤である塩酸プロプラノロールは、LKT Laboratories 社 (Minneapolis, MN, USA) より購入した。GLP-1R 阻害剤 Exendin (9-39) (Ex9; analytical grade, purity > 95%) および GIP 受容体阻害剤 GIP (7-30)-NH₂ (analytical grade, purity > 95%) は Thermo Fisher Scientific 社から購入した。CCK-A 受容体阻害剤である Dvz は ML Laboratories 社 (Liverpool, UK) から寄贈され、PYY 受容体 (Y2R) 拮抗薬である BIIE 0246 (BIIE) は、Tocris Bioscience 社 (Ellisville, MO, USA) から購入した。特に言及しない限り、その他の試薬はすべて富士フイルム和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した。

3-2-3. ラットの直腸温測定

4 時間または 5 時間絶食させたラットの直腸温を、熱電対温度計 (Delta OHM HD 2128.2 T-type, Caselle di Selvazzano, Italy) に接続した直腸プローブ (RET-2 rectal probe for rats, Physitemp, Clifton, NJ, USA) を用いて、試料経口投与前 (0 時間) と投与後に測定した。プローブは測定直前までヒーティングブロックで約 34°C に保持したワセリン中に置いた。プローブを肛門 (3 cm) に静かに挿入し、測定中、ラットは軍手で短時間 (20 秒以内) 軽く拘束した。特に言及しない限り、直腸温は覚醒状態で通常の飼育条件下 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) で測定した。

3-2-4. 野生型および *glucagon-like peptide-1 receptor knockout (GLP-1r KO)* マウスの直腸温測定 (京都府立大学にて実施)

野生型マウス (wild-type; WT; C57BL/6J) と Glp1r KO マウスを 5 時間絶食させた (9:00-14:00)。基礎直腸温は、マイクロプローブ温度計 (BAT-12, Physitemp) に接続した熱電対プローブ (RET-3 マウス用直腸プローブ, Physitemp, Clifton, NJ, USA) を用いて測定した。大豆タンパク質またはホエイタンパク質溶液 (2 g/20 mL) または生理食塩水 (コントロール) を 20 mL/kg BW の用量で経口投与した後、投与 1、2、3 時間後に直腸温を測定した。直腸温の測定は、通常の飼育環境 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) で実施した。

3-2-5. ラットにおける食後直腸温測定

5 時間絶食後（9:00-14:00）のラットの直腸温（0 時間）を測定した。その後、絶食群では絶食を続け、再給餌群では飼料（AIN-93G）を自由摂取させた。食餌摂取量と直腸温は、再給餌後 1、2、3 時間後のタイミングで測定した。

3-2-6. 三大栄養素経口投与下におけるラットの直腸温測定

4 時間絶食後（9:00-13:00）、基礎直腸温（0 時間）を測定した。その後、ラットにフィードリングチューブ（6Fr、Atom Medical, Tokyo, Japan）を用いて試験液（等カロリーのタンパク質、炭水化物、脂質）を 15 mL/kg BW の用量で経口投与した。タンパク質および炭水化物の代表として、カゼインナトリウムおよびデキストリンをそれぞれ水に溶解し、2 g/15 mL (= 8 kcal/15 mL) に調製した。脂質の代表として、大豆油を 1.5% CMC 溶液に懸濁し、0.89 g/15 mL (= 8 kcal/15 mL) に調製した。経口投与から 0.5、1、2、3 時間後に直腸温を測定した。

3-2-7. 種々の食品タンパク質経口投与下におけるラットの直腸温測定

大豆タンパク質、カゼイン、ホエイタンパク質、米タンパク質、卵アルブミンをそれぞれ水に溶解、懸濁して 2 g/15 mL の溶液を作製し、15 mL/kg BW の用量で経口投与した。別の試験では、ラットに異なるタンパク質量（1 または 2 g/15 mL）を 15 mL/kg BW の用量で経口投与した。コントロール群には Vehicle（水）を 15 mL/kg BW の用量で経口投与し、上記と同様に直腸温を測定した。

3-2-8. ラットにおける非選択 β -adrenergic receptor (β AR) アンタゴニスト処理

4 時間絶食させたラットに、大豆タンパク質溶液（2 g/15 mL）または Vehicle（水）を 15 mL/kg BW の用量で経口投与した直後に、非選択的 β AR 阻害剤であるプロプラノロール溶液（生

理食塩水に溶解し、3 mg/mL に調製 (Kawada *et al.* 1986) または Vehicle (生理食塩水) を 1 mL/kg BW の用量で腹腔内投与した。別の試験では、4 時間絶食させたラットに、BAT 活性化剤として L-ノルエピネフリン塩酸塩 (ノルエピネフリン; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 生理食塩水に溶解して 0.3 mg/mL となるように調製) を 1 mL/kg BW の用量で皮下注射した。皮下注射直後に、プロプラノロール (3 mg/mL) または Vehicle (生理食塩水) を 1 mL/kg BW の用量で腹腔内投与し、上記と同様に直腸温を測定した。

3-2-9. 赤外線サーモグラフィによるラットの interscapular brown adipose tissue (iBAT) 上皮表面温度の測定

試験の前日にイソフルラン麻酔下でラットの肩甲骨間部を剃毛した (Beiroa *et al.* 2014)。ストレスを最小限に抑えるため、自由に動くラットの赤外線ビデオをサーモグラフィ (FLIR ONE PRO) で撮影した (Oelkrug and Mittag 2021; Van der Vinne *et al.* 2020)。3-4 時間絶食させた後 (9:00-12:00 or 13:00)、最も暖かい場所を表示するモードで 3 分間撮影した。FLIR ONE Ver.4.4.0 を用いて、肩甲骨間部 (iBAT の下にある肩甲骨の間) の皮膚表面温度の最高値 (3 分間の測定で最も高い温度) を測定し、ベースライン温度とした。iBAT の体温変化が正確に測定されていることを確認するために、13 時以降に生理食塩水またはノルエピネフリン (生理食塩水に溶解し 1 mg/mL に調製) を 1 mL/kg BW の用量で皮下注射した。投与 0.5、1、2、3 時間後に皮膚温度を 1 分間測定し、1 分間あたりの iBAT 表面温度の最大値を上記と同様に求めた。

別の試験では、ラットを 4 時間絶食させ、その後、Vehicle (水) または 2 g/15 mL となるように調製した大豆タンパク質溶液を 15 mL/kg BW の用量で経口投与し、上記と同様に肩甲骨間皮膚温度を測定した。

3-2-10. 赤外線サーモグラフィによるラットの尾部皮膚表面温度の測定

3-4 時間絶食させた後 (9:00-12:00 or 13:00)、周囲温度 22°C の室内で皮膚温度の赤外線画像を撮影した。FLIR ONE Ver.4.4.0 を用いて毛の無い尾部の最高表面温度を測定し、基礎尾部

皮膚表面温度とした。その後、13:00 に一方のグループのラットを 18°Cの部屋に入れ、もう一方のグループを 22°Cの部屋に入れた。0.5 時間後に皮膚温度を測定し、最高尾部表面温度を上記のように決定した。

別の試験では、ラットを 4 時間絶食させ、Vehicle（水）または 2 g/15 mL となるように調製した大豆タンパク質溶液を 15 mL/kg BW の用量で経口投与した。通常の飼育条件下（22 ± 2°C）での皮膚温度を、経口投与から 0.5、1、2、3 時間後に測定し、尾部皮膚表面温度の最大値を上記のように求めた。

3-2-11. ラットにおける種々の消化管ホルモン受容体アンタゴニスト処理

まず、4 時間の絶食後（9:00-13:00）の基礎直腸温（0 時間）を測定した。その後、ラットに Vehicle（水）または 2 g/15 mL となるように調製した大豆タンパク質溶液を 15 mL/kg BW の用量で経口投与した。経口投与直後、アンタゴニスト溶液または Vehicle を 1 mL/kg BW の用量で腹腔内投与した。GLP-1R アンタゴニストである Ex9 を生理食塩水に溶解し、30 nmol/mL（100 µg/mL）を投与した（Williams *et al.* 2009; Williams *et al.* 2011）。GIP 受容体阻害剤である GIP (7-30)-NH₂ は、7% DMSO を含む生理食塩水に溶解し、6.9 nmol/mL（20 µg/mL）を投与した（Tseng *et al.* 1999）。CCK-A 受容体阻害剤である Dvz は、5% DMSO と 5% Tween 80 を含む生理食塩水に溶解し、222 µmol/mL（0.5mg/mL）投与した（Muramatsu *et al.* 2014）。PYY 受容体（Y2R）阻害剤である BIIE は、7% DMSO を含む生理食塩水に溶解し、653 nmol/mL（0.62 mg/mL）投与した（Igarashi *et al.* 2021）。経口投与から 0.5、1、2、3 時間後に直腸温を測定した。

3-2-12. ラット門脈血漿中 GLP-1 濃度の測定

4 時間絶食後（9:00-13:00）、基礎直腸温（0 時間）を測定した。ラットに Vehicle（水）または 2 g/15 mL となるように調製した大豆タンパク質溶液を 15 mL/kg BW の用量で経口投与した。経口投与直後に Ex9 溶液（30 nmol/mL）またはその Vehicle（生理食塩水）を 1 mL/kg BW の用量で腹腔内投与した。覚醒下で経口投与 0.5 時間および 1 時間後に直腸温を測定した。その後、

ペントバルビタールナトリウム麻酔 (50 mg/kg BW) 下で門脈から血液サンプルを採取し、直後に、放血致死させた。採血に用いたシリンジには、ヘパリン (終濃度 50 IU/mL)、アプロチニン (終濃度 500 KIU/mL)、および DPP-4 阻害剤 (終濃度 50 μ M ; Millipore, MA, U.S.A.) をあらかじめ分注した。血漿を遠心分離 (2300 $\times$ g, 4°Cで 10 分間) 後に採取し、分析まで -80°Cで保存した。

血漿中の Active GLP-1 濃度を、ELISA キット (Immuno-Biological Laboratories CO., Ltd., #27700) を用いて測定した。

3-2-13. 酸素消費量 (oxygen consumption; VO_2 と身体活動量の測定 (北海道大学獣医学研究院にて実施)

VO_2 を、酸素代謝測定装置 (MM102R 型 ; 室町機械, Tokyo, Japan) を用い、チャンバー (幅 230 mm $\times$ 奥行 320 mm $\times$ 高さ 250 mm) 内、気流 2.4-2.5 L/min で測定した (Okamatsu-Ogura *et al.* 2007a; Okamatsu-Ogura *et al.* 2007b)。各ラットを、測定開始前に一晩チャンバーに順応させた。試験液経口投与の 4 時間前から 3 時間後 (ZT1-8) まで、3 分間隔で 1 分間 VO_2 を測定した。0.5 時間の累積 VO_2 を計算し、kg 体重の 0.75 乗あたりの mL O_2 で表した (Osaka *et al.* 2005; Munch *et al.* 1993)。4 時間の絶食後 (9:00-13:00; ZT1-5)、Vehicle (水) または 2 g/15 mL となるように調製した大豆タンパク質懸濁液を 15 mL/kg BW の用量で経口投与した。測定中、水は自由摂取とした。同時に、ビデオ記録システム (デジタルビデオカメラ NV-GS50K および DVD ビデオレコーダー DMR-E90H ; Panasonic, Osaka, Japan) を用いて各ラットの身体活動を連続的に記録し、後で評価した。ビデオ記録は、歩行運動、立ち上がり、毛づくろい、飲水についてチェックした。これらの行動が 3 分間の間に観察された場合、それぞれを身体活動の 1 カウントとして採点し、0.5 時間の累積身体活動量を算出した。

先行研究 (Okamatsu-Ogura *et al.* 2007a; Okamatsu-Ogura *et al.* 2007b) に基づき、投与前後の熱産生の差 [ΔVO_2 (thermogenesis)] を DIT として算出した。すなわち、絶食ラットの総 VO_2 と身体活動量の相関データから得られた回帰直線を用い、身体活動量に依存する VO_2 [VO_2

(activity)] を算出した。投与前後の身体活動量に依存しない VO_2 は、 VO_2 (activity-independent) = $VO_2 - VO_2$ (activity) として求めた。最後に、 ΔVO_2 (thermogenesis) は、投与後の VO_2 (activity-independent) から投与前の VO_2 (activity-independent) を差し引いて算出した。

別の試験では、水に 2 g/15 mL となるように懸濁した大豆タンパク質をラットに 15 mL/kg BW の用量で経口投与した。経口投与直後に Ex9 (30 nmol/mL) またはその Vehicle (生理食塩水) を 1 mL/kg BW の用量で腹腔内投与した。 VO_2 と身体活動量を測定し、 ΔVO_2 (thermogenesis) を上記のように推定した。

3-2-14. 野生型および Glp1r KO マウスの門脈血漿中 GLP-1 濃度の測定 (京都府立大学にて実施)

C57BL/6J および Glp1r KO マウスを 5 時間絶食させた (9:00-14:00)。2 g/20 mL となるように調製した大豆タンパク質溶液または生理食塩水を、20 mL/kg BW の用量で経口投与した 1 時間後に、イソフルラン麻酔下で門脈から採血した。採血用のシリンジには、事前にヘパリン、アプロチニン、DPP-4 阻害薬であるビルダグリプチン (終濃度がそれぞれ 50 IU/mL、500 KIU/mL、10 μ M) を分取した。血液サンプルを遠心分離して分離し、血漿を分析まで -80°C で保存した。血漿中の Total GLP-1 濃度測定には、Multi Species GLP-1 Total ELISA, 96-well plate (Millipore , #EZGLP1T-36K) を用いた。

3-2-15. dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害剤投与ラットの尾静脈血漿中の GLP-1 およびインスリン濃度の測定

経口で有効な DPP-4 阻害剤としてシタグリプチンリン酸塩 (sitagliptin; Sigma-Aldrich) を用いた。まず、2 時間絶食後 (9:00-11:00) に、50 mg/5 mL となるよう水に溶解し調製したシタグリプチンまたは水を、フィーディングチューブ (6Fr) を用いて 5 mL/kg BW の用量で経口投与した。試料投与時を 0 時間として、-2、-1、0、0.5、1、2 および 3 時間後に尾静脈から採血し、

ヘパリン（終濃度 50 IU/mL）、アプロチニン（終濃度 500 KIU/mL）および DPP-4 阻害剤（終濃度 50 μ M）を添加した。上記のように血漿を採取し、保存した。

血漿中の Active GLP-1 濃度を、上述の ELISA キットを用いて測定した。血漿中インスリン濃度を、ラットインスリン ELISA キット（U-E タイプ, #AKRIN-130, Shibayagi Co Ltd.）を用いて測定した。先行研究 (Shimizu *et al.* 2021) では、シタグリプチン投与後 1-4 時間において、血漿中 DPP-4 活性が 20-50%抑制されたことから、シタグリプチン経口投与 2 時間後に試料を経口投与した。

3-2-16. DPP-4 阻害剤投与ラットにおける直腸温測定

2 時間絶食後（9:00-11:00）、直腸温を測定し、50 mg/5 mL となるよう水に溶解し調製したシタグリプチンまたは水を 5 mL/kg BW の用量で経口投与した（-2 時間）。その 1 時間後、2 時間後（-1、0 時間）に直腸温を測定した。試料（水または前述の等カロリータンパク質、炭水化物、脂質）を 15 mL/kg BW の用量で経口投与し、その時間を 0 時間として、0.5、1、2、3 時間後に直腸温を測定した。

3-2-17. アミノ酸混合液経口投与ラットの直腸温、尾静脈血漿中 GLP-1 濃度測定

分離大豆タンパク質を構成する遊離アミノ酸の影響を評価するため、市販の総合アミノ酸製剤（PROTEAMIN12 注射液; Terumo Co. Ltd., Tokyo, Japan）に各アミノ酸を必要量添加することで試料を調製した（Table. 3-1）。

Asp、Asn、Glu、Gln の濃度は以下のように推定した。分離大豆タンパク質は、単一ではなく様々なタンパク質から成る。主成分は、その免疫沈降係数 2S、7S、11S、15S により、4 つのタンパク質に分類される (Nishinari *et al.* 2014)。この 4 つのタンパク質のうち、7S (β -コングリシニン) と 11S (グリシニン) が 80%以上を占め、7S/11S の比率は品種により 0.5-1.3 程度と報告されている (Saio *et al.* 1969)。また、 β -コングリシニンは 3 つ、グリシニンは 5 つのサブユニットからなり、そのアミノ酸配列が公開されている。そこで、この 2 つのタンパク質に着目し、

これらが分離大豆タンパク質の 90%を占めると仮定し、アミノ酸組成が製品情報に近くなるように 7S/11S 比は 0.52 とした。次に、Asp (78.4 mg/15mL)、Asn (125.6 mg/15mL)、Glu (181.1 mg/15mL)、Gln (168.9 mg/15 mL) は、 β -コングリシニン (GenBank Accession Number, BAE46788, BAB64303, BAB64306; Fig. 3-1) およびグリシニン (GenBank Accession Number, BAC55938, AAA33966, BAA74953, CAA68460, BAA74952; Fig. 3-2) のサブユニットのアミノ酸配列に基づいて推定した。

試験液は以下のように調製した。まず、アミノ酸混合液とするために、PROTEAMIN12 注射液を超純水で希釈し、各アミノ酸を必要量添加した。希釈倍率は各アミノ酸について製品情報を基に算出した。具体的には、PROTEAMIN12 注射液 15 mL 中に含まれる各アミノ酸の重量を、分離大豆タンパク質 2 g (15 mL/kg BW 溶液) 中に含まれる同アミノ酸の重量で除して比を求めた。この比は、2 g/15 mL の大豆タンパク質溶液の組成を模したアミノ酸混合液を調製するために必要なアミノ酸量に相当する希釈倍率を示すものである。得られた希釈倍率のうち、最も高い値を示したアミノ酸はグリシンであった。そこで、全体の希釈倍率はグリシンに合わせて 3.27 倍と決定した。試験液中の全アミノ酸合計濃度は 906.8 mM となった。その後、1 M の NaOH を加えて pH を約 7.0 に調整した。浸透圧と pH の違いによる影響を排除するため、対照群には 0.5 M NaCl 溶液 (食塩水, pH = 6.95-7.05) を用いた。同様に、大豆タンパク質懸濁液は、2 g/15 mL となるように 0.5 M NaCl 溶液 (食塩水) で作製し、pH を約 7.0 に調整した。

4 時間の絶食後 (9:00-13:00)、ラットの基礎直腸温 (0 時間) を測定した。その後、0.5 M NaCl 溶液または 2 g/15 mL となるように調製した大豆タンパク質溶液、または上記アミノ酸混合液を 15 mL/kg BW の用量で経口投与し、上述のように投与 0.5、1、2、3 時間後に直腸温測定、尾静脈血採血を実施した。血漿中の Active GLP-1 濃度を、前述の ELISA キットを用いて測定した。

Table. 3-1 各種アミノ酸組成

Amino acids	g AA/100 g 分離大豆タンパク質 ¹	PROTEAMIN12 注射液 ² mg in 15 mL	PROTEAMIN12 注射液希釈液 ³ mg in 15 mL	Amino acid mixture ⁴ mg in 15 mL
Ala (A)	3.6	123.2	37.7	72.0
Arg (R)	6.7	184.5	56.5	134.0
Asn (N)	-	0.0	0.0	125.6
Asp (D)	10.2	30.3	9.3	78.4
Cys (C)	1.1	3.5	1.1	22.0
Gln (Q)	-	0.0	0.0	168.9
Glu (E)	17.5	15.3	4.7	181.1
Gly (G)	3.6	235.2	72.0	72.0
His (H)	2.2	78.2	23.9	44.0
Ile (I)	4.3	89.6	27.4	86.0
Leu (L)	6.8	170.7	52.3	136.0
Lys (K)	5.6	117.6	36.0	112.0
Met (M)	1.1	65.0	19.9	22.0
Phe (F)	4.7	146.1	44.7	94.0
Pro (P)	4.9	159.5	48.8	98.0
Ser (S)	4.5	70.1	21.4	90.0
Thr (T)	3.2	75.6	23.1	64.0
Trp (W)	1.2	28.1	8.6	24.0
Tyr (Y)	3.8	8.6	2.6	76.0
Val (V)	4.2	103.5	31.7	84.0

¹ 分離大豆タンパク質 (MP Biomedicals, #905456) アミノ酸組成製品情報, ² 総合アミノ酸製剤 (Terumo Co. Ltd.) アミノ酸組成製品情報, ³ 総合アミノ酸製剤を超純水で 3.27 倍希釈した際の アミノ酸組成, ⁴ 最終被検溶液のアミノ酸組成; Ala (Wako, 018-01043), Arg (Wako, 019-04611), Asn (L-アスパラギン-水和物, ナカライテスク, 03427-82), Asp (Wako, 013-04832), Cys (sigma, C7352), Gln (Wako, 074-00522), Glu (Wako, 070-00502), His (Wako, 086-00681), Ile (sigma, I-7403), Leu (Wako, 126-00851), Lys (L-リシン-塩酸塩, Wako, 121-01462), Met (sigma, M5308), Phe (Wako, 161-01302), Pro ((株) ペプチド研究所, 2718), Ser (Wako, 197-00403), Thr (Wako, 204-01322), Trp (sigma, T-8941), Tyr (Wako, 204-03561), Val (sigma, V-0513).

(A) β -conglycinin alpha subunit; GenBank Accession Number: BAE46788

1 MMRARFPLLL LGLVFLASVS VSFGIAYWEK ENPKHNKCLQ SCNSERDSYR
51 NQACHARCNL LKVEKEECEEE GEIPRPRPRP QHPEREPQQP GEKEEDEDEQ

101 PRPIPFPRPQ PRQEEEHEQR EEQEWPRKEE KRGEKGSEEE DEDEDEEQDE
 151 RQFPFPRPPH QKEERKQEED EDEEQQRESE ESEDSELRRH KNKNPFLFGS
 201 NRFETLFKNQ YGRIRVLQRF NQRSPQLQNL RDYRILEFNS KPNTLLLPNH
 251 ADADYLIVIL NGTAILSLVN NDDRDSYRLQ SGDALRVPSG TTYVVPNDN
 301 NENLRLITLA IPVKNPGRFE SFFLSSTEAQ QSYLQGFSRN ILEASYDTKF
 351 EEINKVLFSR EEGQQQGEQR LQESVIVEIS KEQIRALSKR AKSSSRKTIS
 401 SEDKPFNLRS RDPIYSNKLK KFFEITPEKN PQLRDLDFL SIVDMNEGAL
 451 LLPHFNSKAI VILVINEGDA NIELVGLKEQ QQEQQQEEQP LEVRKYRAEL
 501 SEQDIFVIPA GYPVVVNATS NLNFFAIGIN AENNQRNFLA GSQDNVISQI
 551 PSQVQELAFP GSAQAVEKLL KNQRESYFVD AQPKKKEEGN KGRKGPLSSI
 601 LRAFY

(B) β -conglycinin alpha prime subunit; GenBank Accession Number: BAB64303

1 MMRARFPLLL LGVVFLASVS VSFGIAYWEK QNPSHNKCLR SCNSEKDSYR
 51 NQACHARCNL LKVEEEEECE EGQIPRPRPQ HPERERQQHG EKEEDEGEQP
 101 RPFPPRPRPQ PRQEGEHEQK EEHEWHRKEE KHGGKGSEEE QDGREHPRPH
 151 QPHQKEEEKH EWQHKQEKHQ GKESEEEEEED QDEDEEQDKE SQESEGESQ
 201 REPRRHKNKN PFHFNSKRFQ TLFKNQYGHV RVLQRFNKRS QQLQNLRDYR
 251 ILEFNSKPNT LLLPHHADAD YLIVILNGTA ILTLVNDDR DSYNLQSGDA
 301 LRVAGTTYY VVNPNDENL RMITLAIPVN KPGRFESFFL SSTQAQQSYL
 351 QGFSKNILEA SYDTKFEEIN KVLFGREEGQ QQGEERLQES VIVEISKKQI
 401 RELSKRAKSS SRKTISEDK PFNLRSRDPI YSNKLGKLFE ITPEKNPQLR
 451 DLDVFLSVVD MNEGALFLPH FNSKAIVLV INEGEANIEL VGIKEQQQRQ
 501 QQEEQPLEVR KYRAELSEQD IFVIPAGYPV VVNATSDLNF FAFGINAENN
 551 QRNFLAGSKD NVISQIPSQV QELAFLGSAK DIENLIKSQS ESYFVDAQPQ
 601 QKEEGNKGRK GPLSSILRAF Y

(C) β -conglycinin beta-subunit; GenBank Accession Number: BAB64306

1 MMRVRFPLL VLLGTVFLASV CVSLKVREDE NNPFYFRSSN SFQTLFENQN
 51 GRIRLLQRFN KRSPQLENLR DYRIVQFQSK PNTILLPHHA DADFLLFVLS
 101 GRAITLVNN DDRDSYNLHP GDAQRIAGT TYLVNPHDH QNLKIIKLAI
 151 PVNKPSTRYDD FFLSSTQAQQ SYLQGFSHNI LETSFHSEFE EINRVLFGE

201 EEQRQQEGVI VELSKAQIRQ LSRRAKSSSR KTISSSEDEPF NLRSRNPIYS
 251 NNFGKFFEIT PEKNPQPRDL DIFLSSVDIN EGALLPHFN SKAIVILVIN
 301 EGDANIELVG IKEQQQKQKQ EEEPLEVQRY RAELSEDDVF VIPAAYPFVV
 351 NATSNLNFLA FGINAENNQR NFLAGEKDNV VRQIERQVQE LAFPGSAQDV
 401 ERLLKKQRES YFVDAQPQQK EEGSKGRKGP FPSILGALY

Fig. 3-1. Amino acid sequence of the subunit of β -conglycinin, one of the major components of soy protein.

Sequences of (A) β -conglycinin alpha subunit, (B) β -conglycinin alpha prime subunit, and (C) β -conglycinin beta-subunit, with the number of amino acids residues are shown.

(A) glycinin A1bB2; GenBank Accession Number: BAC55938

1 MAKLVLSLCF LLFSGCCFAF SFREQPQQNE CQIQRLNALK PGNRIESEGG
 51 FIETWNPNNK PFQCAGVALS RYTLIRNALR RPSYTNAPQE IYIQQGNGIF
 101 GMIFPGCPST FEPPQQKGQS SRPQDRHQKI YHFREGDLIA VPTGLAYWMY
 151 NNEDTLVVAV SIIDTNSLEN QLDQMPPRFY LAGNQQQEFL QYQSQKQQGG
 201 TQSQKGKRQQ EEENEGBSML SGFAPEFLEH AFVVDRQIVV RKLQGENEEEE
 251 EKGAIIVTVRG GLSVISPPTE ERRQRPEEEEE KPDCDEKDKH CQSQSRNGID
 301 ETICTMGLRH NIGQTSSPDI FNPQAGSITT ATSLDFPALS WLKLSAQFGS
 351 LRKNAMFVPH YNLNANSIY ALNGRALVQV VNCNGERVFD GELQEGQVLT
 401 VPQNFAVAAR SQSDNFEYVS FKTNDRPSIG NLAGANSLN ALPEEVIQQT
 451 FNLRRQQARQ VKNNNPFSFL VPPKESQRRV VA

(B) glycinin A-1a-B-x; GenBank Accession Number: AAA33966

1 MAKLVFSLCF LLFSGCCFAF SSREQPQQNE CQIQKLNALK PDNRIESEGG
 51 LIETWNPNNK PFQCAGVALS RCTLNARNALR RPSYTNBPQE IYIQQGKGIF
 101 GMIYPGCPST FEPPQQPQQR GQSSRPQDRH QKIYNFREGD LIAVPTGVAW
 151 WMYNNEDTPV VAVSIIDTNS LENQLDQMPR RFYLAGNQE EFLKYQQEQG
 201 GHQSQKGKHQ QEEENEGBSI LSGFTLEFLE HAFSVDKQIA KNLQGENEGE
 251 DKGAIIVTVKG GLSVIKPPTD EQQQRPEEEE EEEEEDEKPQC KGKDKHCQRP
 301 RGSQSKSRRN GIDETICTMR LRHNIGQTSS PDIYNPQAGS VTTATSLDFP

351 ALSWLRLSAE FGSLRKNAME VPHYNLNANS IYALNGRAL IQVVNCNGER
 401 VFDGELQEGR VLIVPQNFVV AARSQSDNFE YVSFKTNDTP MIGTLAGANS
 451 LLNALPEEVI QHTFNLKSQQ ARQIKNNNPF KFLVPPQESQ KRAVA

(C) glycinin A5A4B3; GenBank Accession Number: BAA74953

1 MGKPFTLSLS SLCLLLLSSA CFAISSSKLN ECQLNNLNAL EPDHRVESEG
 51 GLIQTWNSQH PELKCAGVTV SKLTLNRNGL HLPSPYPR MIIAQGKGA
 101 LGVAIPGCPE TFEPPQEQSN RRGSRQKQQ LQDSHQKIRH FNEGDVLVIP
 151 PGVPYWTYNT GDEPVVAISL LDTSNFNNQL DQTPRVFYLA GNPDIETPET
 201 MQQQQQQKSH GGRKQGQHQE EEEEEGGSVL SGFSKHFLAQ SFNTNEDIAE
 251 KLQSPDDERK QIVTVEGGLS VISPKWQEQE DEDEDEDEDD EDEQIPSHPP
 301 RRRSHGKREQ DEDEDEDEDEK PRPSRPSQK REQDQDQDED EDEDEDQPRK
 351 SREWRSKKTQ PRRPRQEEPR ERGCETRNGV EENICTLKLH ENIARPSRAD
 401 FYNPKAGRIS TLNSLTLPAL RQFQLSAQYV VLYKNGIYSP HWNLNANSVI
 451 YVTRGQGKVR VVNCQGNVAV DGELRRGQLL VVPQNFVVAE QAGEQGFYI
 501 VFKTHHNAVY SYLKDVFAI PSEVLAHSYN LRQSQVSELK YEGNWGPLVN
 551 PESQQGSPRV KVA

(D) glycinin A2B1a; GenBank Accession Number: CAA68460

1 MAKLVLSLCF LLFSGCFALR EQAQQNECQI QKLNALKPDN RIESEGGFIE
 51 TWNPNNKPFQ CAGVALSRCT LNRNALRRPS YTNGPQEIIY QQGNGIFGMI
 101 FPGCPSTYQE PQESQQRGRS QRPQDRHQKV HRFREGDLIA VPTGVAVWMY
 151 NNEDTPVVAV SIIDTNSLEN QLDQMPPRFY LAGNQEQEFL KYQQQQQGGG
 201 QSQKGKQEE ENEGSNILSG FAPEFLKEAF GVMNQIVRNL QGENEEEDSG
 251 AIVTVKGGLR VTAPAMRKPK QEEDDDDEEE QPQCVETDKG CQRQSKRSRN
 301 GIDETICTMR LRQNIQNSS PDIYNPQAGS ITTATSLDFP ALWLLKLSAQ
 351 YGSLRKNAME VPHYTLNANS IYALNGRAL VQVVNCNGER VFDGELQEGG
 401 VLIVPQNFAV AAKSQSDNFE YVSFKTNDTP SIGNLAGANS LLNALPEEVI
 451 QHTFNLKSQQ ARQVKNNNPF SFLVPPQESQ RRAVA

(E) glycinin A3B4; GenBank Accession Number: BAA74952

1 MGKPFTLSL SSLCLLLLSS ACFAITSSKF NECQLNNLNA LEPDHRVESE

```

51      GGLIETWNSQ HPELQCAGVT VSKRTLNRNG LHLPSYSPYP QMIIVVQGKG
101     AIGFAFPGCP ETFEKPQQQS SRRGSRSQQQ LQDSHQKIRH FNEGDVLVIP
151     PGVPYWTYNT GDEPVVAISL LDTSNFNQL DQNPRVFYLA GNPDIHPET
201     MQQQQQQKSH GGRKQGQHQQ QEEEGGSVLS GFSKHFLAQS FNTNEDTAEK
251     LRSPDDERKQ IVTVEGGLSV ISPKWQEQED EDEDEDEEYE QTPSYPPRRP
301     SHGKHEDDED EDEEEDQPRP DHPPQRPSRP EQQEPRGRGC QTRNGVEENI
351     CTMKLHENIA RPSRADFYNP KAGRISTLNS LTLPALRQFG LSAQYVVLRY
401     NGIYSPHWNL NANSVIYVTR GKGRVRVVNC QGNAVFDGEL RRGQLLVVPQ
451     NFVVAEQGGE QGLEYYVFKT HHNAVSSYIK DVFRLIPSEV LSNSYNLGQS
501     QVRQLKYQGN SGPLVNP

```

Fig. 3-2. Amino acid sequence of the subunit of glycinin, one of the major components of soy protein.

Sequences of (A) glycinin A1bB2, (B) glycinin A-1a-B-x, (C) glycinin A5A4B3, (D) glycinin A2B1a, and (E) glycinin A3B4, with the number of amino acids residues are shown.

3-2-18. 統計解析

データは平均値 $\pm$ SEM で表した。統計解析には JMP Pro version.16.1.0 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いた。統計的な有意差は、一元配置分散分析、二元配置分散分析、または非構造共分散を用いた混合モデルを用いて評価した。平均値間の統計的な有意差は、Dunnett's test、Student's-*t* test、paired-*t* test、Tukey Kramer's test、Bonferroni's test によって決定した。すべての解析において、 $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

3-3. 結果

3-3-1. AIN-93G 飼料を与えたラットの食後直腸温変動

まず、摂食による直腸温の変化を検証した。0 時間時点（基礎状態）の直腸温は絶食群で $36.08 \pm 0.10^{\circ}\text{C}$ 、再給餌群で $35.86 \pm 0.05^{\circ}\text{C}$ で、食後の変化を見やすくするために、結果は基礎状態からの変化（ Δ 直腸温）として示した。ラットが AIN-93G 食（0-1 時間、 $1.77 \pm 0.21 \text{ g}$ ；1-2 時間、 $0.80 \pm 0.22 \text{ g}$ ；2-3 時間、 $0.63 \pm 0.28 \text{ g}$ ）を摂取したところ、直腸温が有意に上昇し（ 0.4°C ）、その上昇は 3 時間後まで維持された（Fig. 3-3A）。一方、絶食群では直腸温は変化しなかった。0-3 時間後の曲線下面積（area under the curve; AUC）（ ΔAUC ）は再給餌群で有意に高かった（Fig. 3-3B; Fasting, $0.03 \pm 0.23^{\circ}\text{C} \cdot 3 \text{ h}$; Refeeding, $0.92 \pm 0.18^{\circ}\text{C} \cdot 3 \text{ h}$ ）。

3-3-2. 三大栄養素の経口投与がラットの直腸温に及ぼす影響

次に、様々な栄養素の経口投与に対する直腸温の変化を比較した。等カロリーの栄養素（カゼイン、デキストリン、大豆油）のうち、カゼインだけがすべての時点で直腸温を有意に上昇させ（Fig. 3-3C; 約 $0.1\text{-}0.6^{\circ}\text{C}$ ）、その ΔAUC はデキストリン（ $0.16 \pm 0.14^{\circ}\text{C} \cdot 3 \text{ h}$ ）や大豆油（ $0.20 \pm 0.07^{\circ}\text{C} \cdot 3 \text{ h}$ ）よりも有意に高かった（Fig. 3-3D; $1.06 \pm 0.07^{\circ}\text{C} \cdot 3 \text{ h}$ ）。

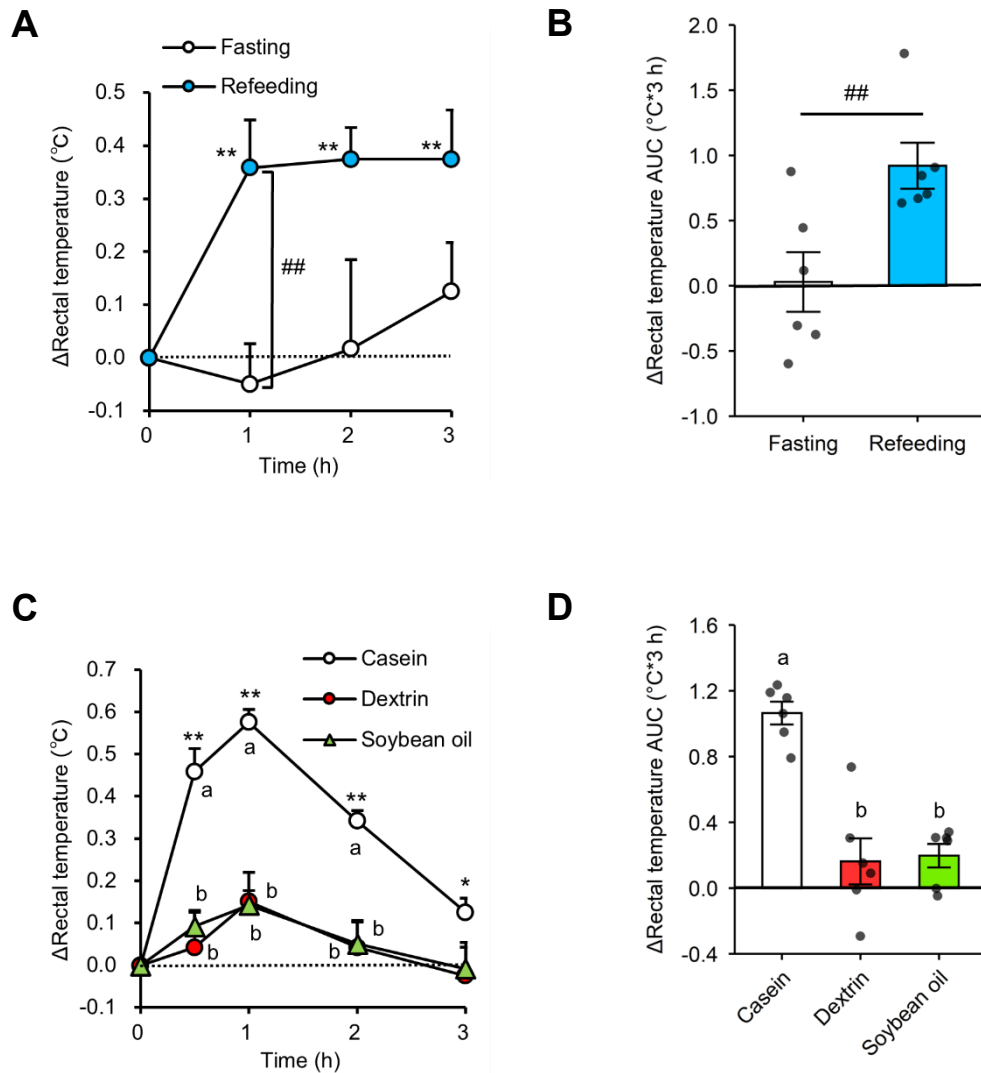


Fig. 3-3. Feeding and protein administration increase the rectal temperature in rats. (A)

Changes in rectal temperature (Δ Rectal temperature, $n = 6$) after refeeding or continued fasting in 5 h-fasted rats and (B) its AUC (Δ AUC). (C) Changes in rectal temperature after oral administration of isocaloric casein (2 g/kg), dextrin (2 g/kg), or soybean oil (0.89 g/kg) solution in 4 h-fasted rats and (D) its AUC ($n = 6$). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. In (A, C), plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h values within each treatment (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test). # symbols and different letters indicate significant differences between the treatments (A and B, crossover design, ## $p < 0.01$, paired t -test; C and D, crossover design, $p < 0.05$, Bonferroni's test).

3-3-3. ラットの直腸温に及ぼす様々な食品タンパク質の影響

検討した 5 種類の食品タンパク質（カゼイン、ホエイ、米、卵、大豆）はすべて経口投与後 0.5 時間で直腸温を約 0.3-0.4°C 上昇させた（Fig. 3-4A）。その後、米タンパク投与ラットでは直腸温上昇は徐々に低下したが、ホエイタンパク投与ラットでは経口投与 3 時間後まで直腸温上昇が維持された。カゼイン、卵アルブミンおよび大豆タンパクでは、直腸温は経口投与後 1 時間でピークに達した。その後、カゼインおよび卵アルブミン投与群の直腸温は徐々に低下したが、大豆タンパク投与群では経口投与 3 時間後まで直腸温上昇は維持された。 ΔAUC （Fig. 3-4B）が示すように、大豆タンパク質が最も高い深部体温上昇作用を示した。

別の試験では、大豆タンパク質は用量依存的に直腸温とその ΔAUC を上昇させた（Fig. 3-4C, D）。他の 4 つのタンパク質についても用量依存的な反応が観察された（Fig. 3-5）。直腸温を上昇させる作用が最も強かったため、以降の試験では大豆タンパク質を 2 g/kg の用量で用いた。

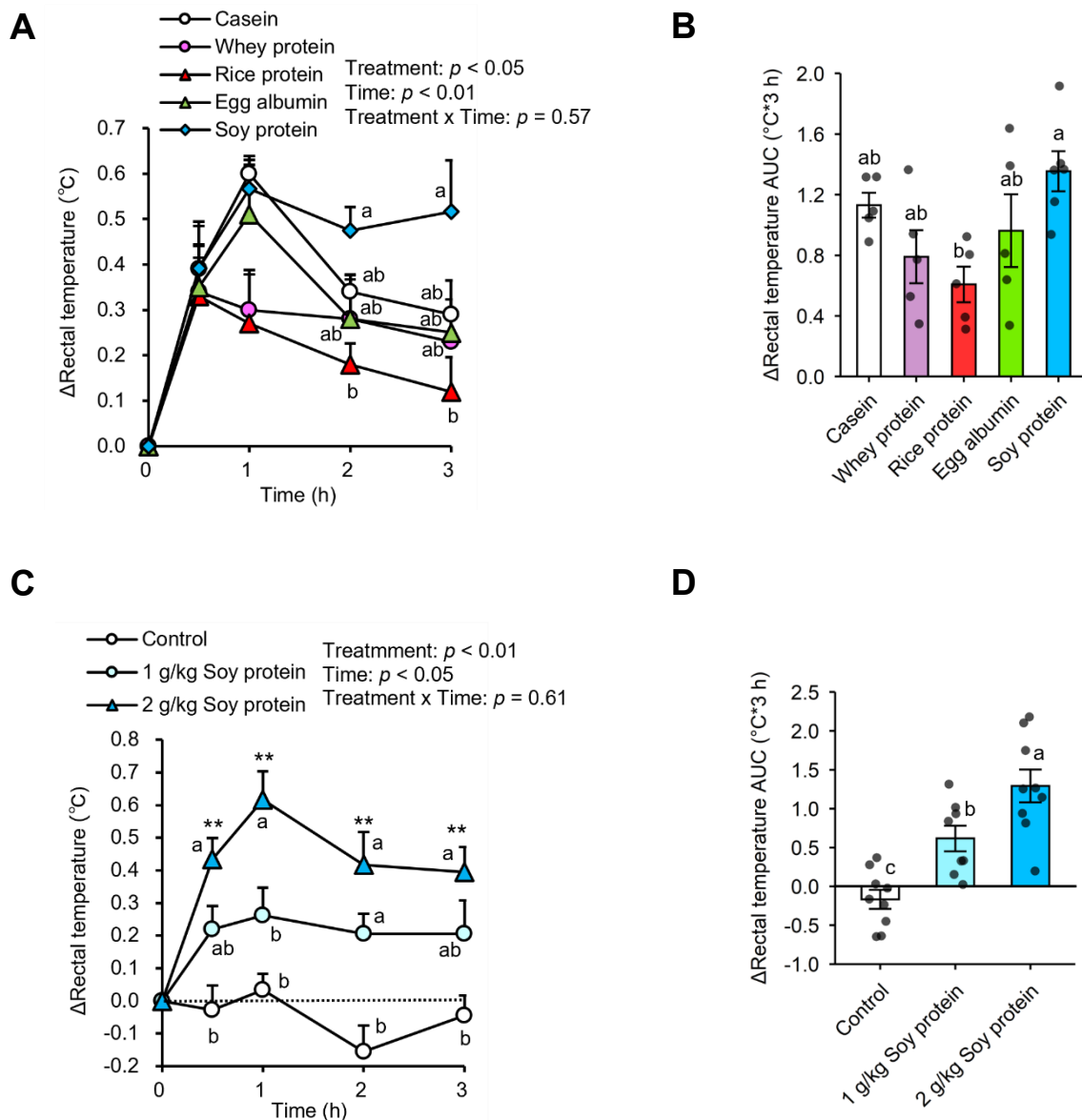
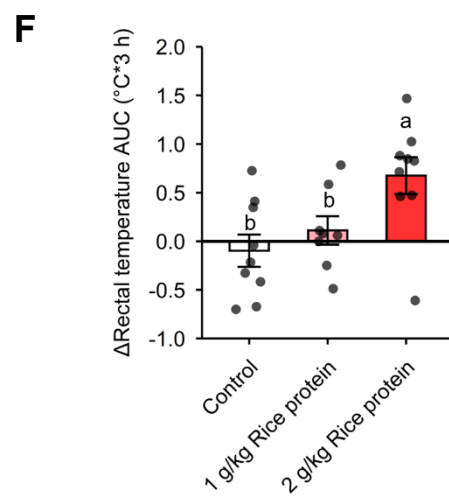
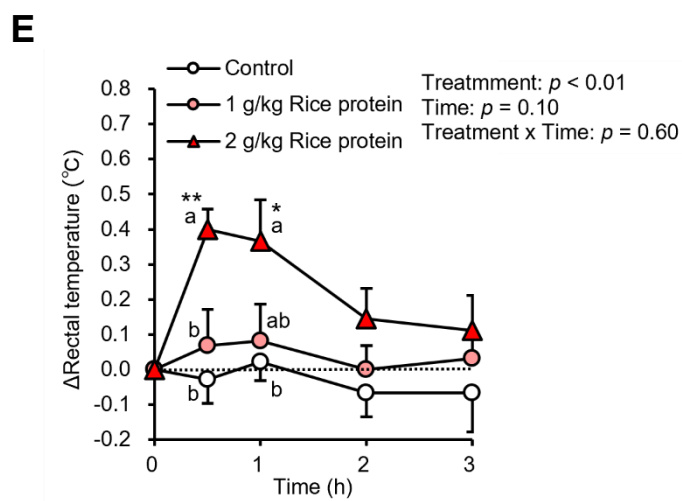
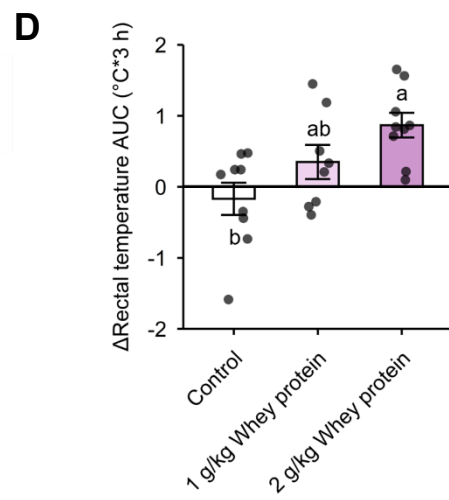
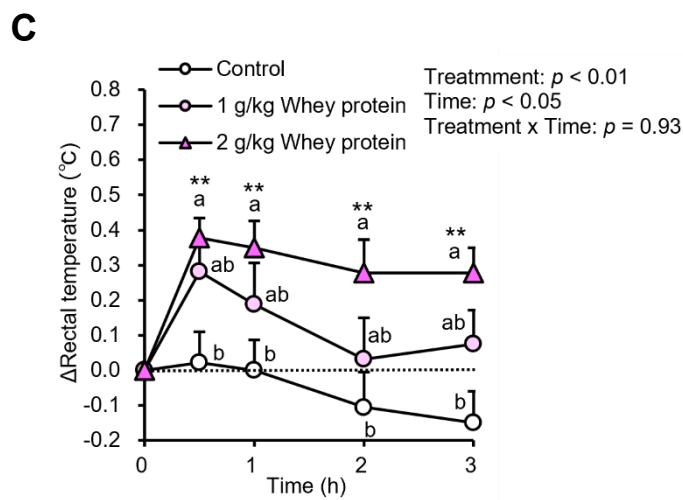
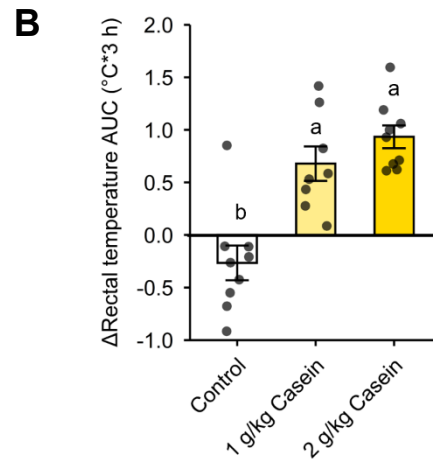
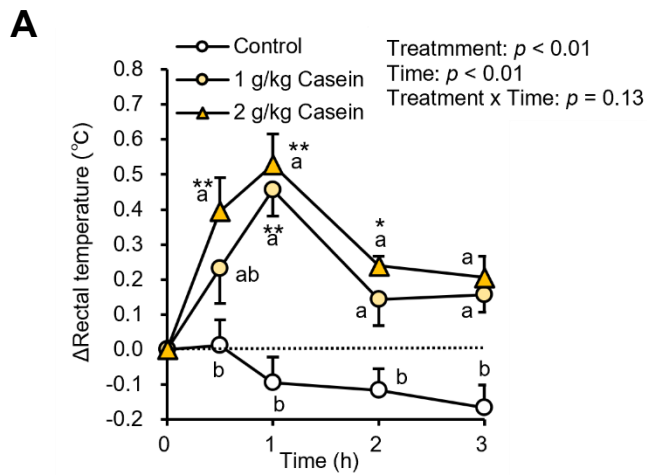


Fig. 3-4. Among dietary proteins, rectal temperature is increased in a dose-dependent manner and to the greatest extent by soy protein. (A) Changes in rectal temperatures after oral administration of different dietary proteins (2 g/15 mL/kg) in 4 h-fasted rats and (B) its AUC ($n = 5-6$). (C) Changes in rectal temperatures after oral administration of different soy protein doses (1 or 2 g/kg) or water (control, 15 mL/kg) in 4 h-fasted rats and (D) its AUC ($n = 8-9$). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Different letters indicate $p < 0.05$ between treatments by Tukey's test. The p values of the mixed model with unstructured covariance are shown in each panel (A, C). In (C), plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h values within each treatment (** $p < 0.01$, Dunnett's test).



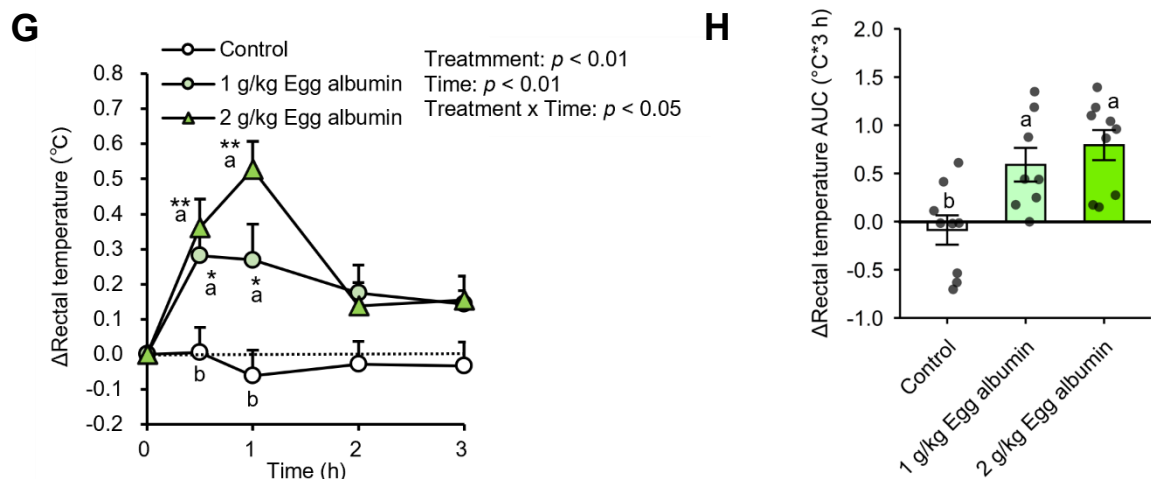


Fig. 3-5. Dose-dependence of various oral proteins on rectal temperature increase. Changes in rectal temperatures after oral administration of different protein doses (1 or 2 g/kg) or water (control, 15 mL/kg) in 4 h-fasted rats and its AUC. (A, B) Casein. (C, D) Whey protein. (E, F) Rice protein. (G, H) Egg albumin. $n = 8-9$, respectively. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Different letters indicate $p < 0.05$ by Tukey's test. In (A, C, E, G), the p values of the mixed model with unstructured covariance are shown in each panel, and plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h values within each treatment (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test).

3-3-4. 大豆タンパク質による直腸温上昇に対する非選択的 β AR アンタゴニスト処理の影響

大豆タンパク質による直腸温上昇に BAT が関与していることを調べるために、非選択的 β AR アンタゴニストであるプロプラノロールを用いた。大豆タンパク質はプロプラノロール処理の有無に関わらず直腸温を上昇させた (Fig. 3-6A, B)。プロプラノロール処理自体は直腸温に影響を与えなかった (Fig. 3-6C, D)。プロプラノロールの腹腔内投与はノルエピネフリンによる直腸温上昇を十分に抑制した (Fig. 3-7)。

さらに、赤外線カメラを用いて iBAT の皮膚表面温度を測定し、BAT の関与を調べた。iBAT の表面温度は、ノルエピネフリン皮下投与 1 時間後をピークに有意に上昇 (1.0°C) し (Fig. 3-8)、本実験方法はこれまでに報告されている方法 (Oelkrug and Mittag 2021) と互換性があることが示された。一方、大豆タンパク質の経口投与では iBAT 表面温度は上昇しなかった (Fig. 3-9)。

3-3-5. 大豆タンパク質の経口投与がラットの尾部皮膚表面温度に及ぼす影響

ラットは、寒冷環境では尾部皮膚の血管収縮を引き起こし、熱放散を防いで体温を一定に保つ。この反応には、交感神経末端のノルアドレナリン活性が一部関与している (Ishikawa 2008; Rand *et al.* 1965)。本研究において、ラットを 22°C の部屋から 18°C の部屋に 0.5 時間移動させたところ、尾部皮膚表面温度は $5.13 \pm 0.70^{\circ}\text{C}$ 低下した (Fig. 3-10) が、これは尾部皮膚の血管収縮を反映していると考えられる。次に、大豆タンパク質による直腸温の上昇が、血管収縮に伴う熱放散の抑制を介して起こった現象かどうかを検証した。Fig. 3-11 に示すように、大豆タンパク質経口投与後も尾部皮膚表面温度は $27.5\text{-}29.5^{\circ}\text{C}$ の範囲にとどまり、ベースライン温度 ($27.47 \pm 0.37^{\circ}\text{C}$) から低下しなかった。

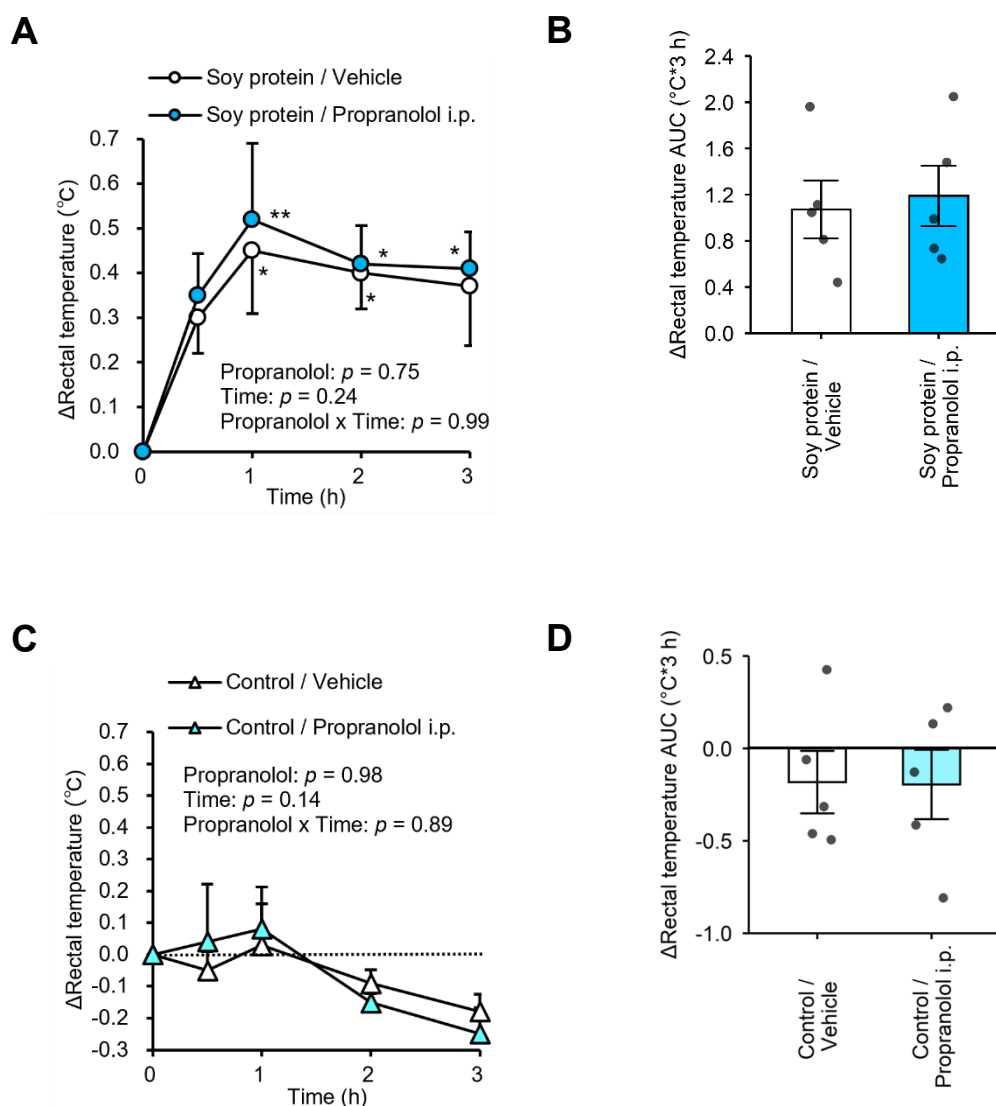


Fig. 3-6. Effects of β -AR antagonist, propranolol, on the thermic effect of soy protein. (A-D) Propranolol (3 mg/kg) or its vehicle (saline) was intraperitoneally injected at a dose of 1 mL/kg immediately after oral administration of (A, B) soy protein (2 g/kg) or (C, D) water (control, 15 mL/kg) in 4 h-fasted rats. (A, C) Changes in rectal temperatures and (B, D) its AUC ($n = 5$). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h (baseline) values within each treatment (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test), and comparisons between treatments were performed using Student's t -test. The p values of the mixed model with unstructured covariance are shown in each panel (A, C).

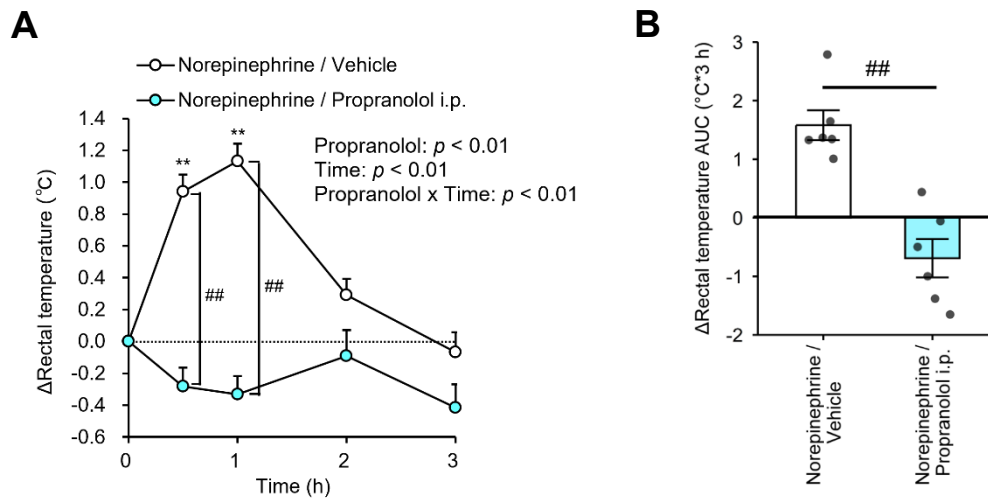


Fig. 3-7. Nonselective β -AR antagonist abolishes norepinephrine-induced increase in rectal temperature. Propranolol (3 mg/kg) or its vehicle (saline) was intraperitoneally injected at a dose of 1 mL/kg immediately after subcutaneous administration (1 mL/kg) of norepinephrine (0.3 mg/kg) in 4 h-fasted rats. (A) Changes in rectal temperatures and (B) its AUC ($n = 6$). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Plots with asterisks (*) show significant differences compared with baseline values within each treatment (** $p < 0.01$, Dunnett's test), and comparisons between treatments were performed using Student's t -test (## $p < 0.01$). The p values of the mixed model with unstructured covariance are shown in the panel.

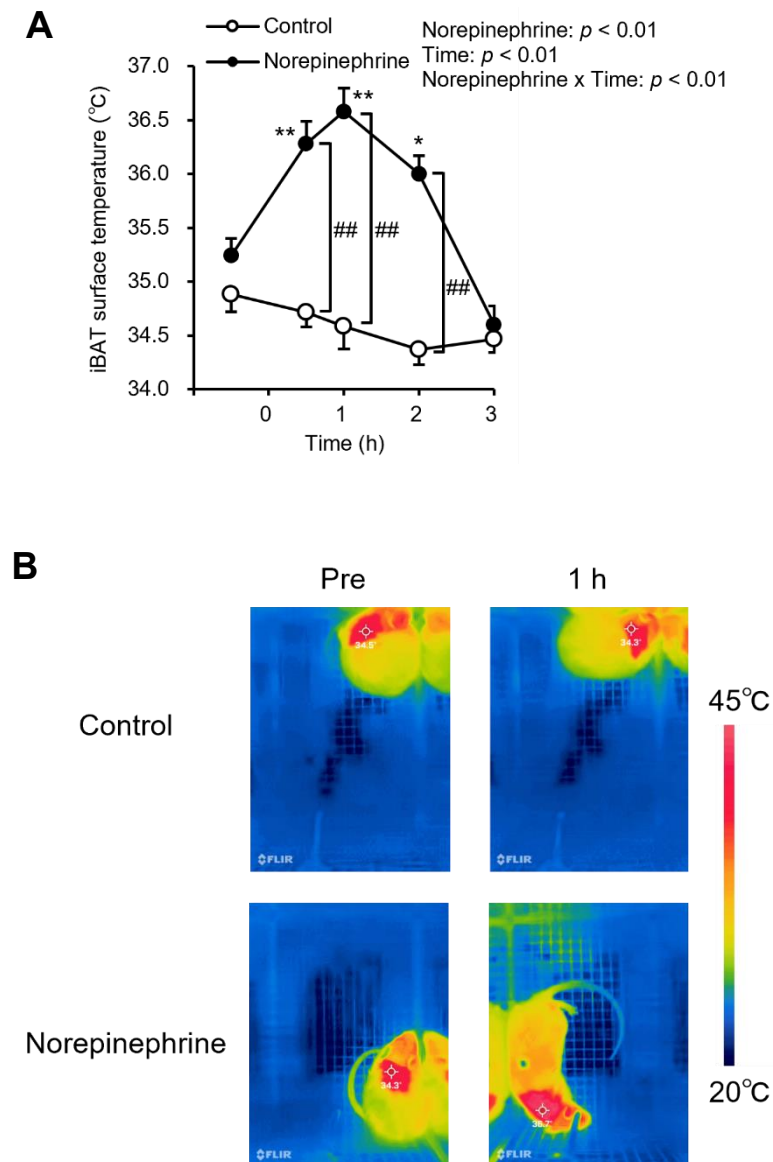


Fig. 3-8. Subcutaneous norepinephrine increases iBAT surface temperature of rats. (A) iBAT surface temperatures before and after subcutaneously injection of saline (control, 1 mL/kg) or 1 mg/kg norepinephrine in 4 h-fasted rats ($n = 5-6$) and (B) representative infrared pictures from video recordings before and 1 h after the injection (upper row, control; lower row, norepinephrine). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Plots with asterisks (*) show significant differences compared with baseline values within each treatment (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test), and comparisons between treatments were performed using Student's t -test (## $p < 0.01$). The p values of the mixed model with unstructured covariance are shown in the panel.

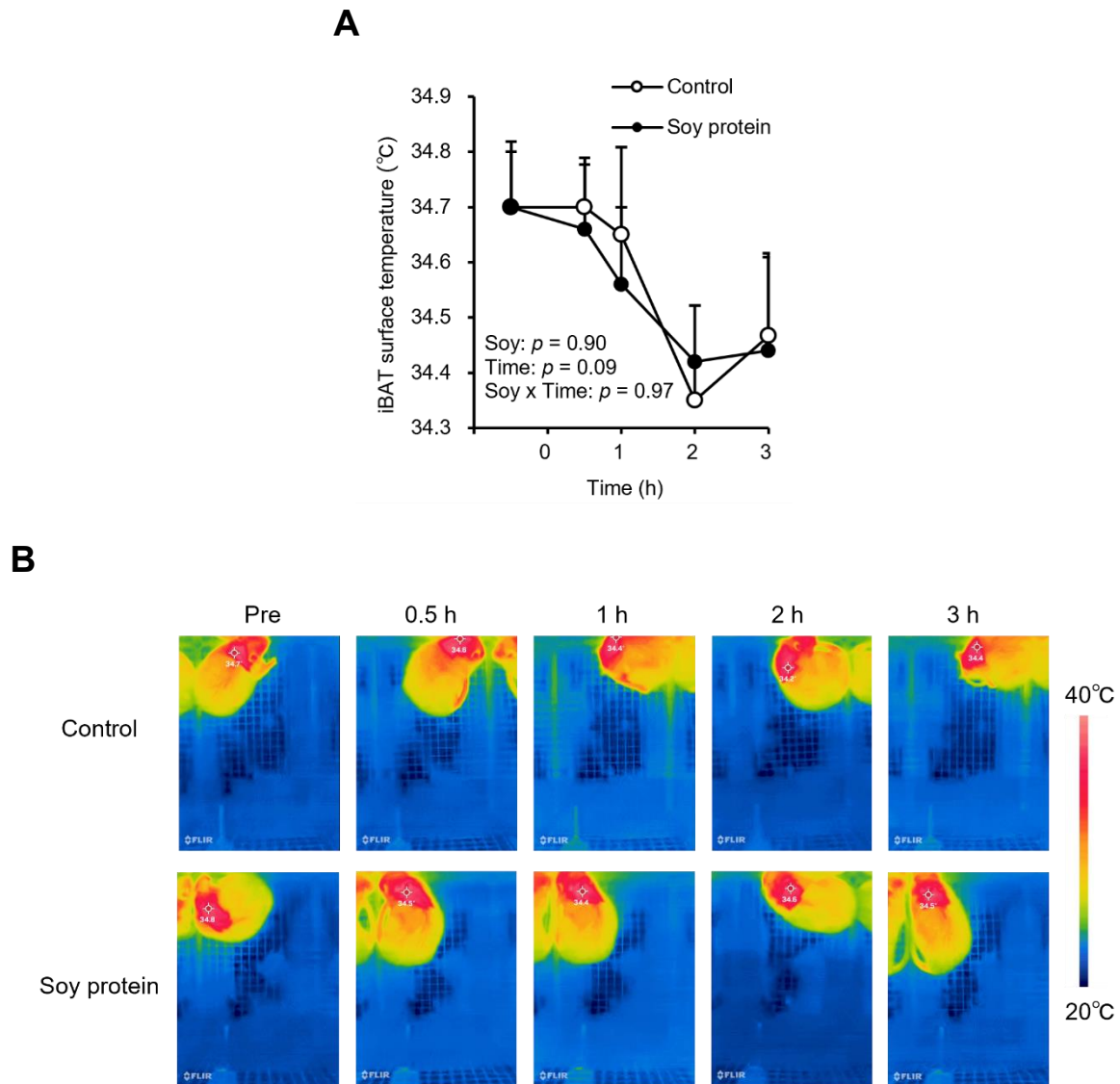


Fig. 3-9. Oral soy protein did not increase iBAT surface temperature of rats. (A) iBAT surface temperatures of 4 h-fasted rats before and after oral administration of water (control, 15 mL/kg) or 2 g/kg soy protein ($n = 5$). Values are expressed as the mean + SEM. Significant differences compared with 0 h (baseline) values within each treatment (Dunnett's test), and comparisons between treatments were performed using Student's t -test. The p values of the mixed model with unstructured covariance are shown in the panel. (B) Representative infrared pictures from video recordings, for measurement of iBAT surface temperature, before and after oral administration (upper row, control; lower row, soy protein).

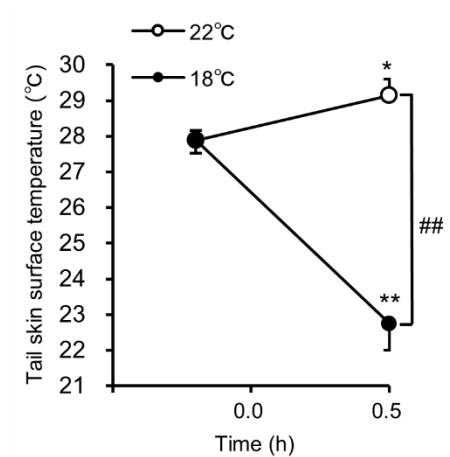
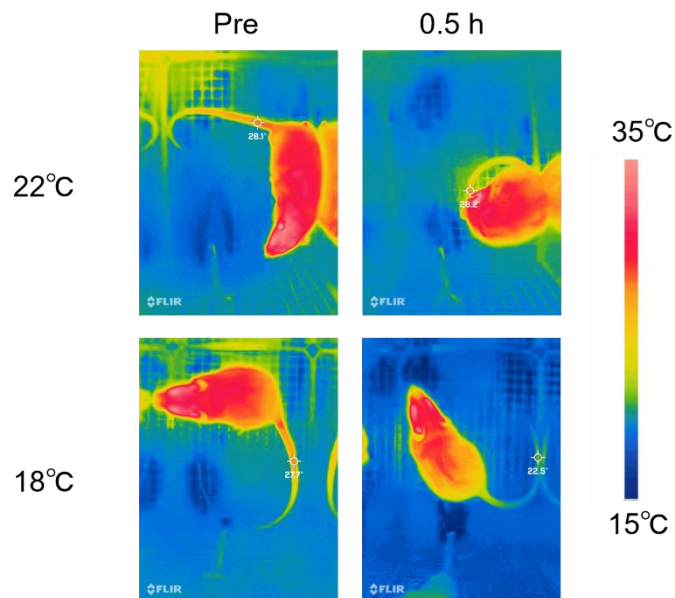
A**B**

Fig. 3-10. Mild cold exposure lowers the tail skin surface temperature of rats. One group of 4 h-fasted rats was moved into a room at 18°C from a room at 22°C, while the other group was placed in a room at 22°C. (A) Tail skin surface temperatures before and 0.5 h after treatments ($n = 6$) and (B) representative infrared pictures (upper row, 22°C group; lower row, 18°C group). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Plots with asterisks (*) show significant differences compared with baseline values within each treatment (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test), and comparisons between treatments were performed using Student's t -test (## $p < 0.01$).

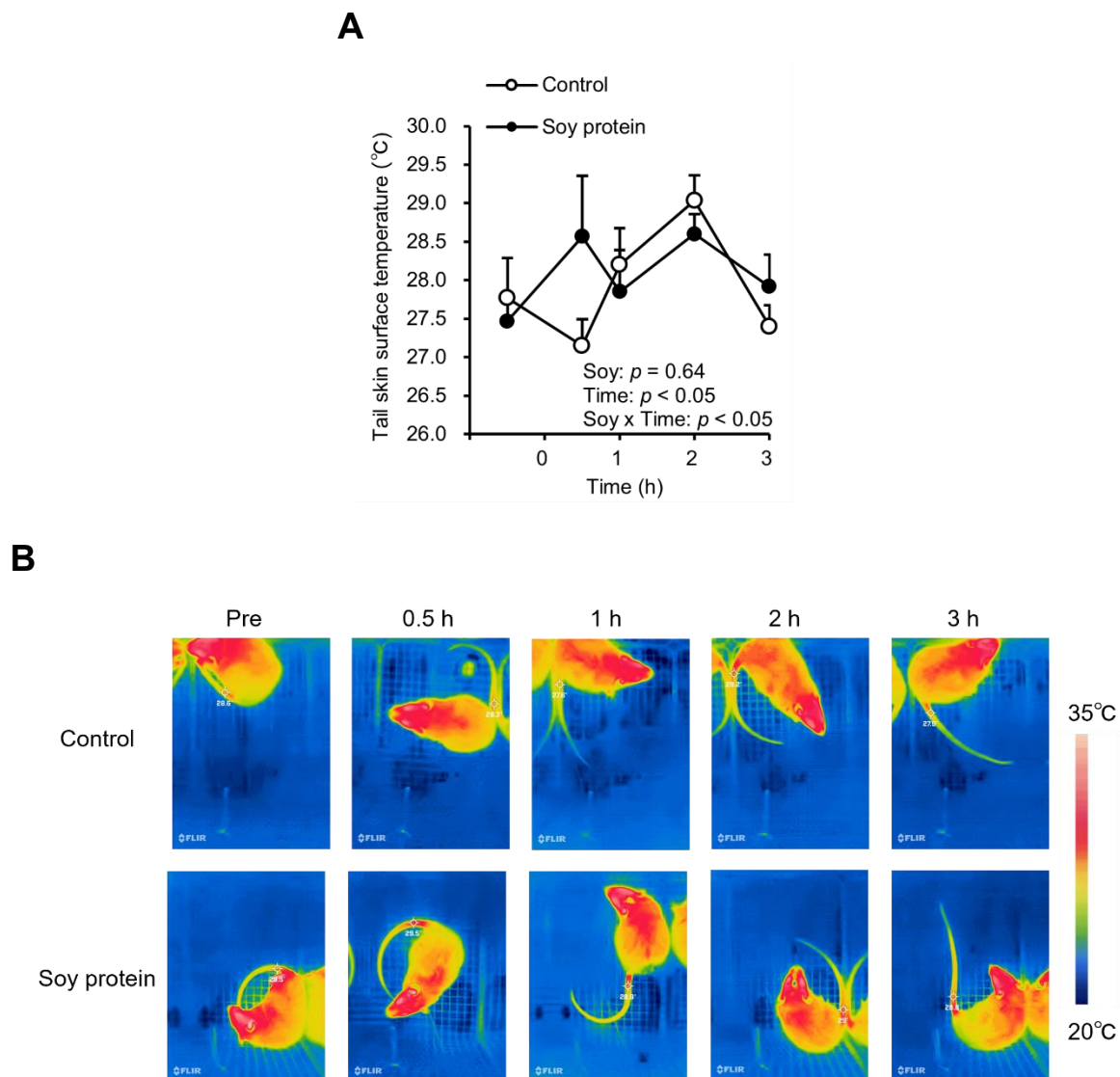


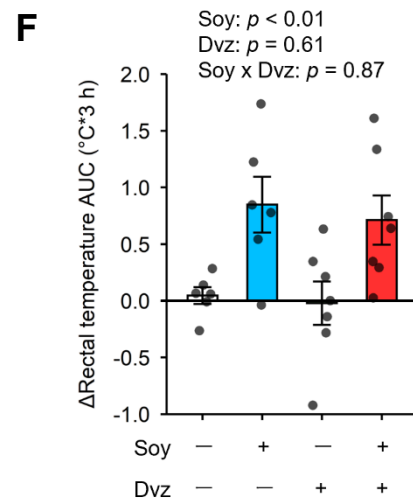
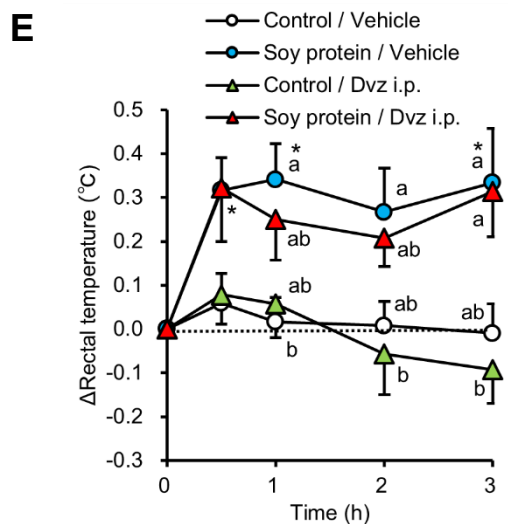
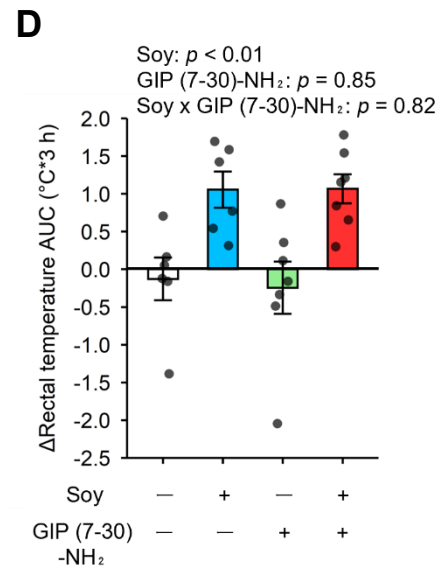
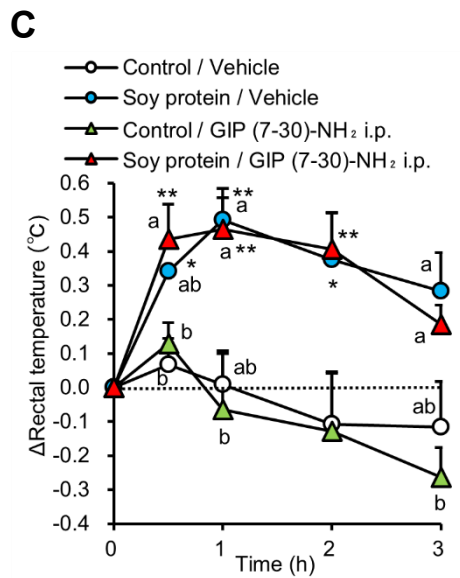
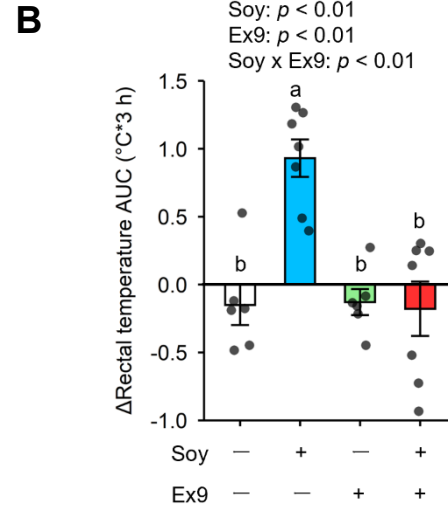
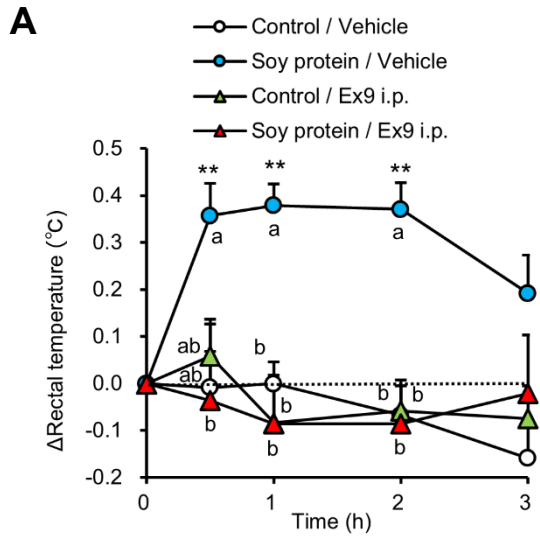
Fig. 3-11. Heat loss from the tail skin surface is not involved in the thermic effect of soy protein. (A) Tail skin surface temperatures of 4 h-fasted rats before and after oral administration of water (control, 15 mL/kg) or 2 g/kg soy protein ($n = 6$). Values are expressed as the mean + SEM. Significant differences compared with 0 h (baseline) values within each treatment (Dunnett's test), and comparisons between treatments were performed using Student's t -test. The p values of the mixed model with unstructured covariance are shown in each panel. Representative infrared pictures, for measurement of tail skin surface temperature, before and after oral administration (upper row, control; lower row, soy protein).

3-3-6. 大豆タンパク質によるラット直腸温上昇における消化管ホルモンの関与

大豆タンパク質による直腸温上昇に消化管ホルモンが関与している可能性を検討するため、種々の消化管ホルモン受容体阻害剤を用いた。大豆タンパク質を経口投与し、生理食塩水を腹腔内投与したラットは、0.5-2 時間の直腸温と 0-3 時間の ΔAUC を有意に上昇させたが、大豆タンパク質のこの効果は GLP-1R アンタゴニストである Ex9 の投与により完全に消失した (Fig. 3-12A, B)。Ex9 投与自体は直腸温に影響を与えなかった。対照的に、GIP、CCK-A または PYY 受容体に対する阻害剤（それぞれ GIP (7-30)-NH₂、Dvz、BIIE）を投与しても、大豆タンパク質による直腸温の上昇は抑制されなかった (Fig. 3-12C-H)。さらに、これらのアンタゴニスト投与は、Control / Vehicle 群と同様に、そのものの処理自体は直腸温に影響を与えなかった。

3-3-7. ラットの GLP-1 分泌に及ぼす大豆タンパク質の影響

Fig. 3-12 に示した結果と同様に、Ex9 の腹腔内投与は、大豆タンパク質の経口投与 0.5 時間および 1 時間後における直腸温の上昇、および 0-1 時間における ΔAUC の上昇を抑制した (Fig. 3-13A, B)。門脈血漿中の Active GLP-1 濃度は、Ex9 投与の有無にかかわらず、大豆タンパク質経口投与後 1 時間で上昇した ($p < 0.05$, 2-way ANOVA ; Fig. 3-13C)。



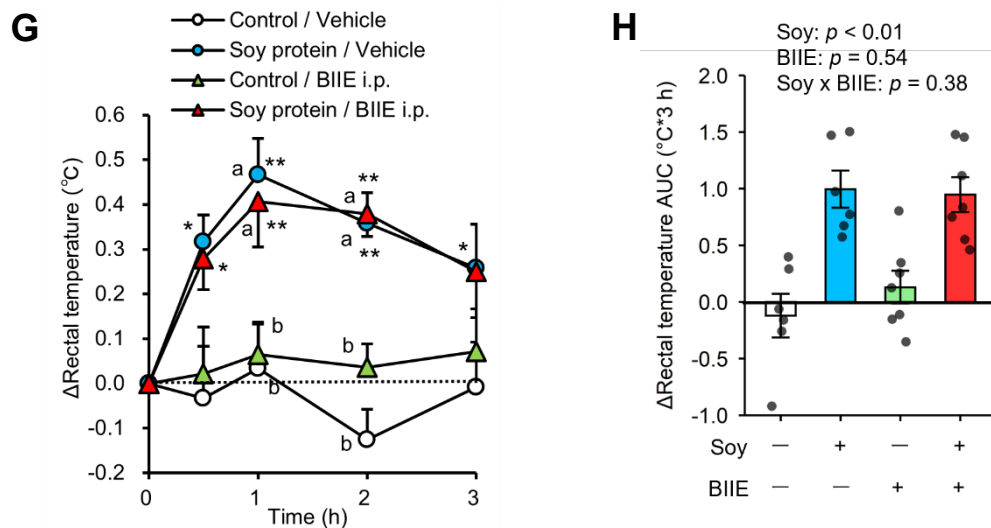


Fig. 3-12. GLP-1R antagonist abolishes soy protein-induced increase in rectal temperature.

Various receptor antagonists (A, B, 30 nmol/kg Ex9; C, D, 6.9 nmol/kg GIP (7-30)-NH₂; E, F, 222 μmol/kg Dvz; G, H, 653 nmol/kg BIIE) or their vehicle was intraperitoneally injected at a dose of 1 mL/kg immediately after oral administration of soy protein (2 g/kg) or water (control, 15 mL/kg) in 4 h-fasted rats. (A, C, E, G) Changes in rectal temperatures and (B, D, F, H) its AUC ($n = 6-7$, respectively). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h values within each treatment (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test). Different letters indicate $p < 0.05$ between treatments by Tukey's test. The p values of two-way ANOVA are shown in each panel (B, D, F, H).

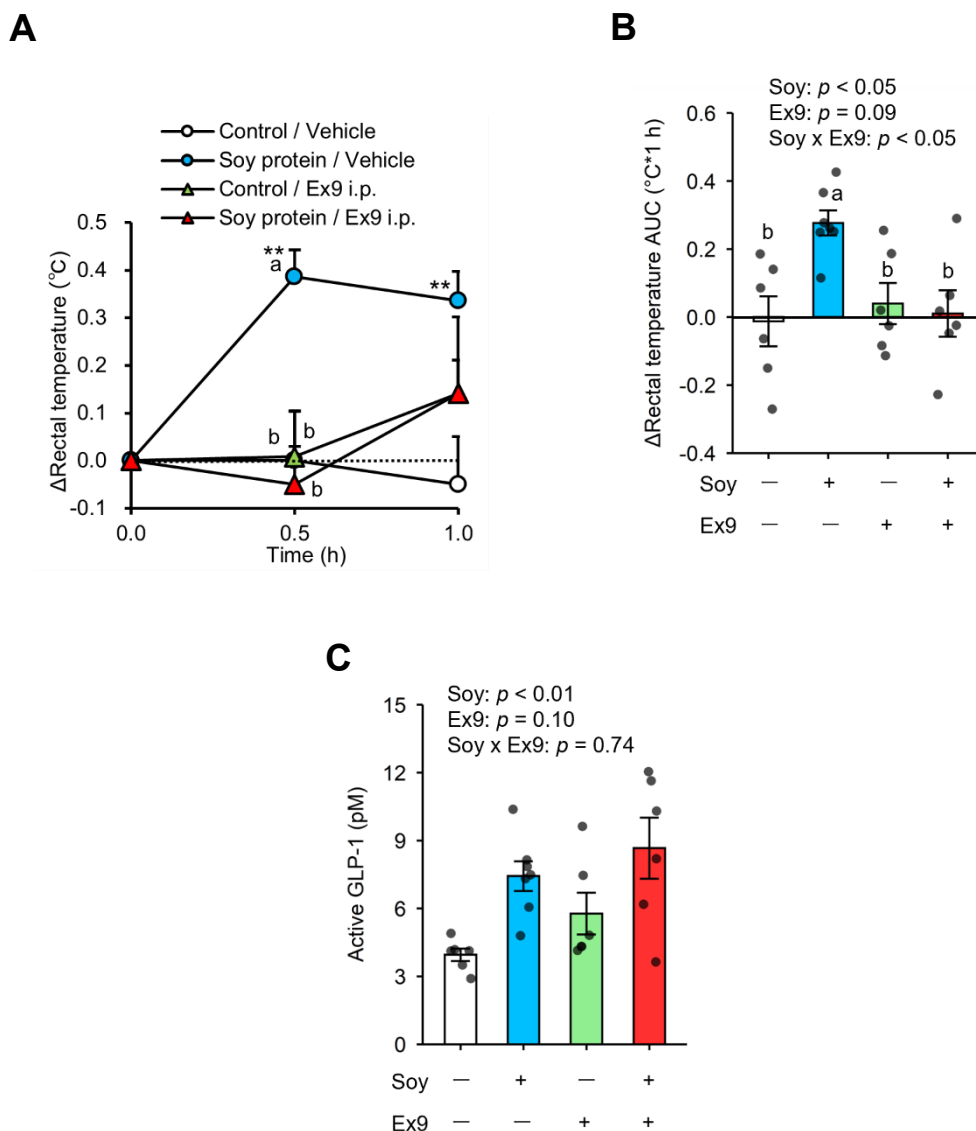


Fig. 3-13. Oral soy protein stimulates GLP-1 secretion with or without GLP-1R antagonist treatment. Ex9 (30 nmol/kg) or its vehicle (saline) was intraperitoneally injected at a dose of 1 mL/kg immediately after oral administration of soy protein (2 g/kg) or water (control, 15 mL/kg) in 4 h-fasted rats. (A) Changes in rectal temperatures and (B) its AUC ($n = 6-7$). (C) Active GLP-1 concentrations in portal vein plasma 1 h after oral administration of test solutions. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h values within each treatment (** $p < 0.01$, Dunnett's test). Different letters indicate $p < 0.05$ between treatments by Tukey's test. The p values of two-way ANOVA are shown in each panel (B, C).

3-3-8. 大豆タンパク質の経口投与が VO_2 に及ぼす影響と GLP-1 シグナルの関与

大豆タンパク質がエネルギー消費を増加させるかどうかを調べるために、 VO_2 と身体活動量を測定した。身体活動は明暗周期の影響を受けることから、本試験では明期（ZT5）に経口投与を実施し、投与後 0-3 時間（ZT5-8）のデータを解析対象とした。結果として、その差は有意ではなかったが、大豆タンパク質のラットへの経口投与は身体活動量を抑制する傾向があった（Fig. 3-14A）。Fig. 3-14B に示すように、 VO_2 は身体活動量の増加とともに増加し、経口投与前の絶食ラットでは正の相関を持つ回帰直線が得られた（ $y = 9.5703x + 445.45$, $n = 80$, $R^2 = 0.83$, $p < 0.01$ ）。この回帰直線を用いて、「3-2-13. 酸素消費量と身体活動量の測定（北海道大学獣医学研究院にて実施）」に記載の方法で算出された ΔVO_2 (thermogenesis) は、コントロール群と比較して大豆タンパク経口投与 1、2、3 時間後で有意に高く（Fig. 3-15A）、混合モデル解析により大豆タンパクの有意な効果が検出された（ $p < 0.05$ ）。また、大豆タンパク質投与群では 0-3 時間の VO_2 (thermogenesis) の変化に対する AUC がコントロール群に比べて有意に高かった（Fig. 3-15B）。

次に、大豆タンパク質によるエネルギー消費増加における GLP-1 シグナルの関与を検討した。本試験も明期（ZT5）に投与を実施し、投与後 0-3 時間（ZT5-8）のデータを解析対象とした。身体活動量は Ex9 投与の有無にかかわらず有意な差はなかった（Fig. 3-14C）。 ΔVO_2 (thermogenesis) は、経口投与前の絶食ラットにおける正の相関を持つ回帰直線に基づいて計算した（ $y = 9.8341x + 412.85$, $n = 77$, $R^2 = 0.54$, $p < 0.01$; Fig. 3-14D）。Ex9 投与は、大豆タンパク質誘導性 VO_2 増加を減少させた（混合モデルによる Ex9 の効果、 $p < 0.05$; Fig. 3-15C）。その差は有意ではなかったが（ $p = 0.12$, paired t -test, Fig. 3-15D）、 ΔAUC は Ex9 投与群で低かった。

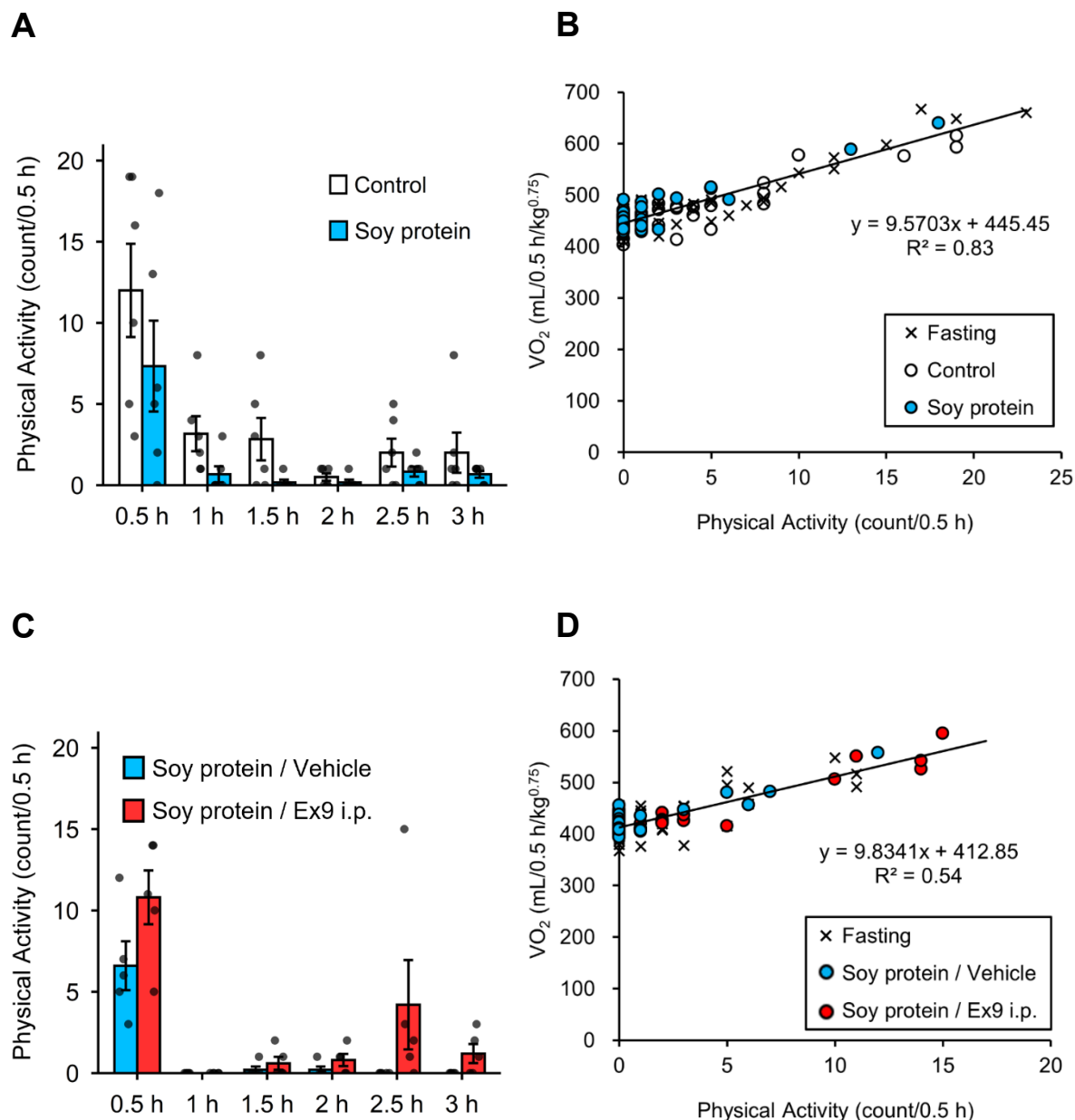


Fig. 3-14. Physical activity and correlation between oxygen consumption (VO_2). (A, B) Soy protein (2 g/kg) or water (control, 15 mL/kg) was orally administered in 4 h-fasted rats. (C, D) Ex9 (30 nmol/kg) or its vehicle (saline) was intraperitoneally injected at a dose of 1 mL/kg immediately after oral administration of soy protein (2 g/kg) in 4 h-fasted rats. (A, C) Physical activity after administration (A, $n = 6$; C, $n = 5$). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. Comparisons between treatments were performed by paired t -test (crossover design). (B, D) Correlation between physical activity and VO_2 in rats before and after administration. In (B), crosses are the data from

fasted (before administration) rats, and open and gray circles indicate the data from water-administered or soy protein-administered rats, respectively. In (D), crosses are the data from fasted (before administration) rats, and open and gray circles indicate the data from saline-injected or Ex9-injected rats, respectively.

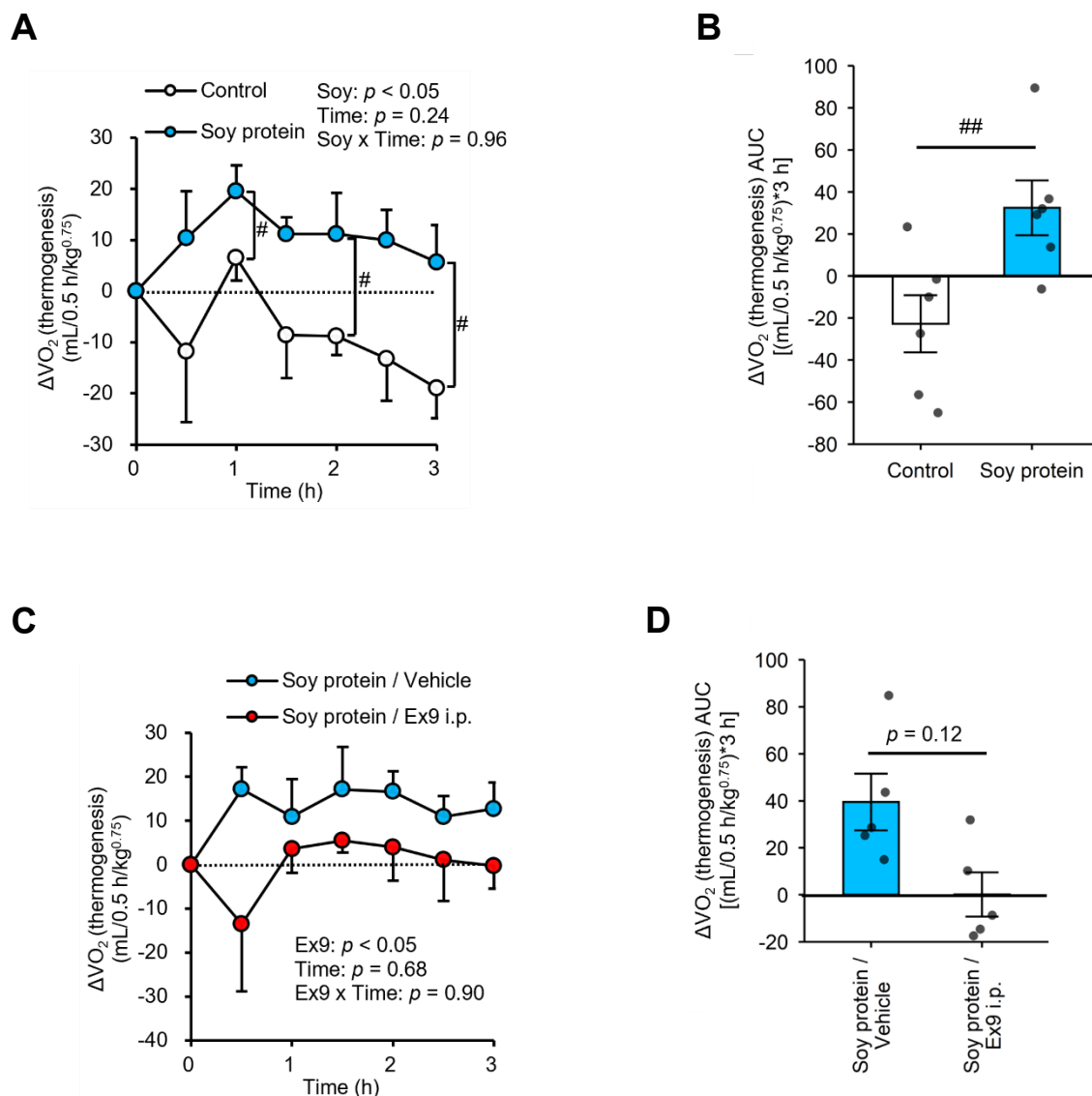


Fig. 3-15. Oral soy protein increases oxygen consumption (VO₂) via GLP-1 signaling. (A, B) Soy protein (2 g/kg) or water (control, 15 mL/kg) was orally administered in 4 h-fasted rats. (C, D) Ex9 (30 nmol/kg) or saline (1 mL/kg) was intraperitoneally injected immediately after oral administration of soy protein (2 g/kg) in 4 h-fasted rats. (A, C) The changes of thermogenesis from pre-administration [ΔVO_2 (thermogenesis)] and (B, D) its AUC during 0-3 h post-administration are presented. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ by paired t -tests between treatments (crossover design). The p values of the mixed model with unstructured covariance are shown in each panel (A, C).

3-3-9. Glp1r KO マウスにおける食品タンパク質経口投与が直腸温に及ぼす影響

大豆タンパク質の直腸温上昇作用における GLP-1 シグナルの関与をさらに検証するために、Glp1r KO マウスを用いた。WT マウスでは (Fig. 3-16A, C)、大豆タンパク質を 2 g/kg 経口投与すると、1 時間後および 2 時間後の直腸温が有意に上昇し、その ΔAUC はコントロール群よりも有意に高かった。一方、Glp1r KO マウスでは、大豆タンパク質の経口投与により直腸温は上昇せず (Fig. 3-16B)、その ΔAUC はコントロール群と差がなかった (Fig. 3-16D)。門脈血漿中の Total GLP-1 濃度は、WT および Glp1r KO マウスともに大豆タンパク質経口投与 1 時間後に有意に高値を示した (Fig. 3-16E, F)。

GLP-1 シグナルが他のタンパク質によって誘導される直腸温上昇にも関与しているかどうかを検証するために、ホエイタンパク質を用いて同様の試験を実施した。ホエイタンパク質を 2 g/kg 経口投与すると、Glp1r KO マウスではどの時点でも直腸温は上昇しなかったが (Fig. 3-17B, D)、WT マウスでは 1 時間と 2 時間後で直腸温が有意に上昇した (Fig. 3-17A, C)。

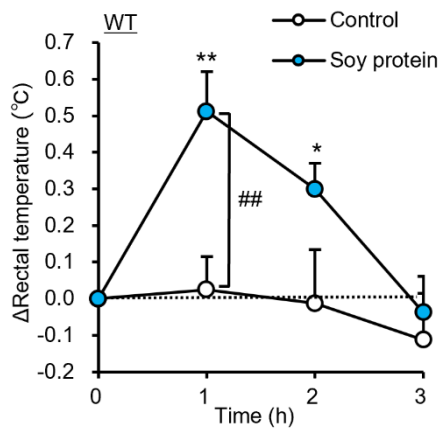
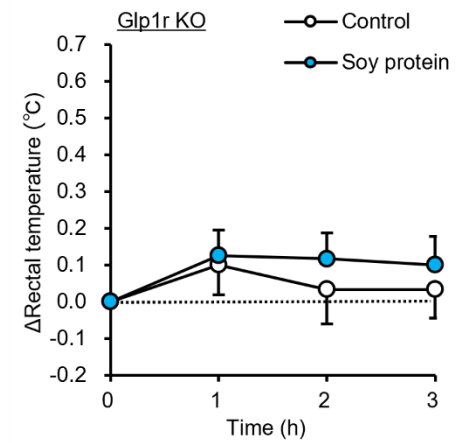
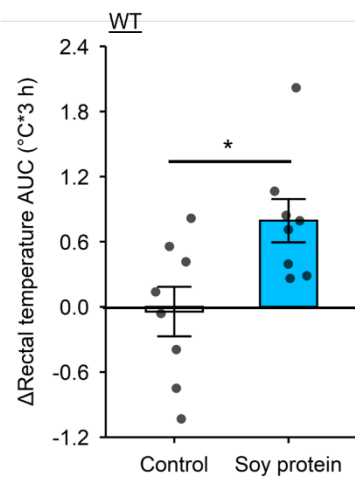
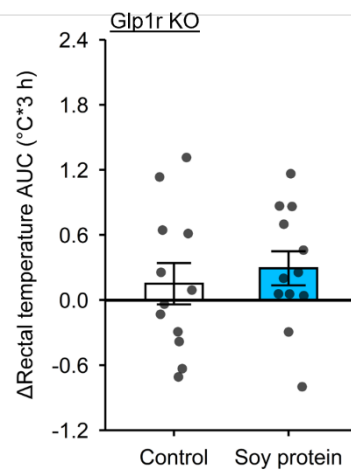
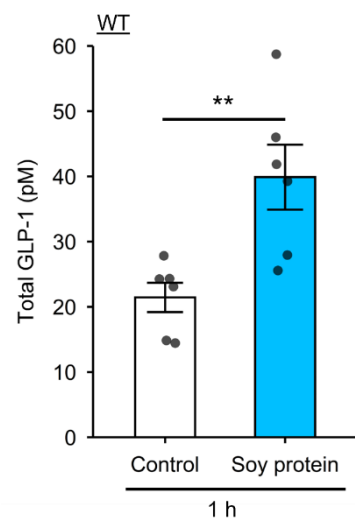
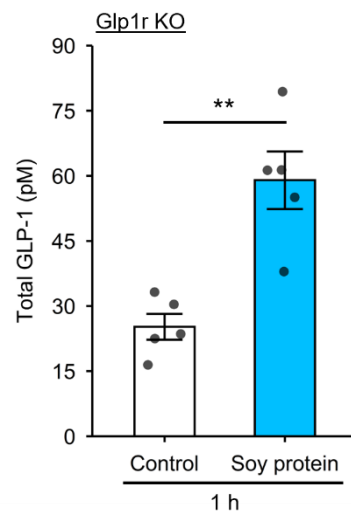
A**B****C****D****E****F**

Fig. 3-16. GLP-1R is essential for the increasing effect of soy protein on rectal temperature.

Changes in rectal temperatures after oral administration of soy protein (2 g/kg) or saline (control, 20 mL/kg) and its AUC in (A, C) wild-type (WT) C57BL/6J mice ($n = 8$) and (B, D) Glp1r KO mice ($n = 12$, crossover design) fasted 5 h. Total GLP-1 concentrations in portal vein plasma 1 h after oral administration of test solutions in (E) WT mice ($n = 6$) and (F) Glp1r KO mice ($n = 5$). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. In (A, B), plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h values within each treatment (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test), and comparisons between treatments were performed using (A) Student's t -test ($^{##}p < 0.01$) or (B) paired t -test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by (C, E, F) Student's t -test or (D) paired t -test.

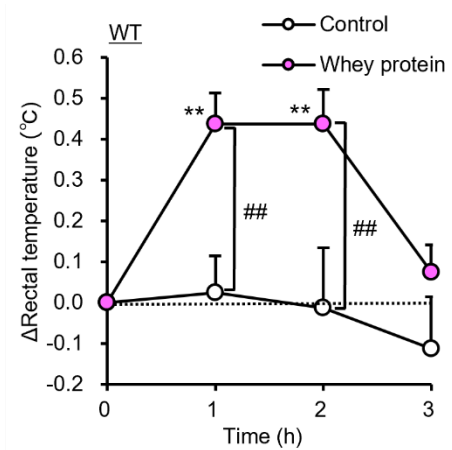
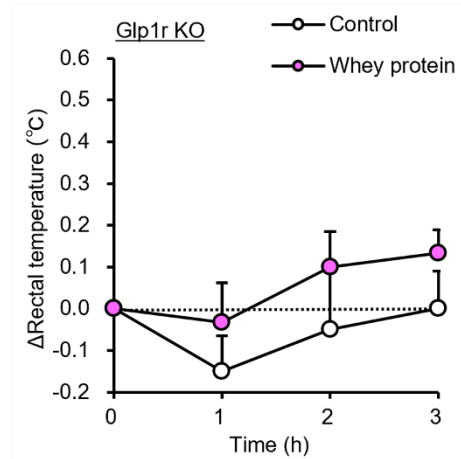
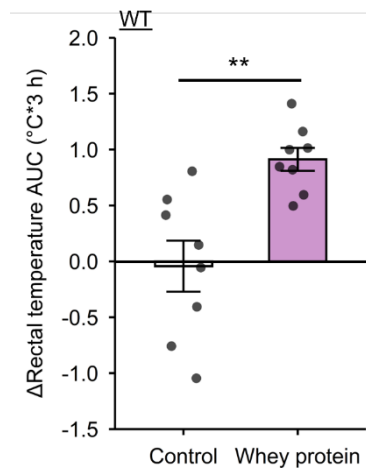
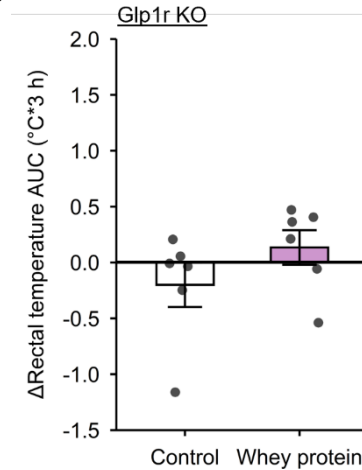
A**B****C****D**

Fig. 3-17. GLP-1R is involved in the whey protein-induced increment of rectal temperature.

Changes in rectal temperatures after oral administration of whey protein (2 g/kg) or saline (control, 20 mL/kg) and its AUC in (A, C) WT mice ($n = 8$) and (B, D) Glp1r KO mice ($n = 6$) fasted 5 h. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM; those of the control group of WT mice are the same as Fig. 3-14. In (A, B), plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h values within each treatment (** $p < 0.01$, Dunnett's test), and comparisons between treatments were performed using Student's t -test (## $p < 0.01$). (C, D) ** $p < 0.01$ by Student's t -test.

3-3-10. ラットにおける DPP-4 阻害剤投与が大豆タンパク質の作用に及ぼす影響

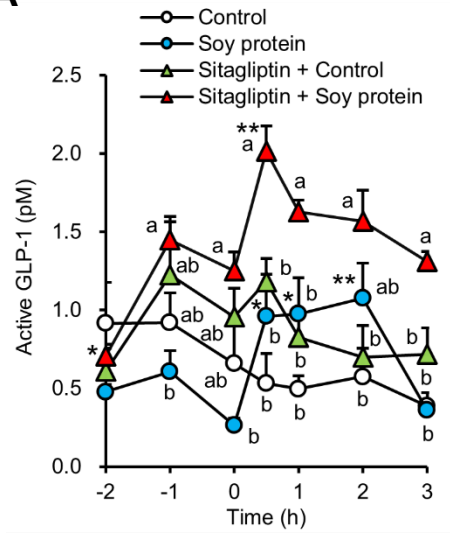
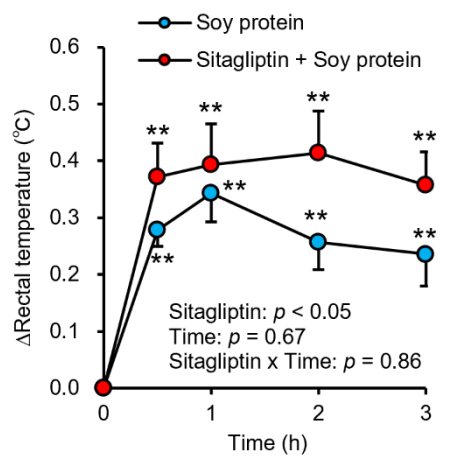
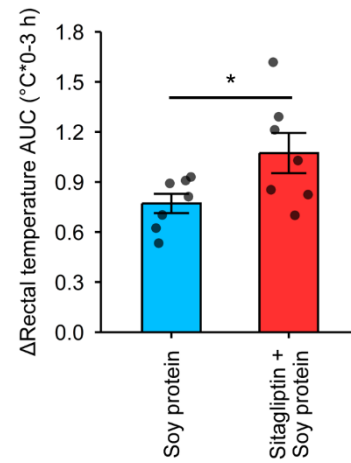
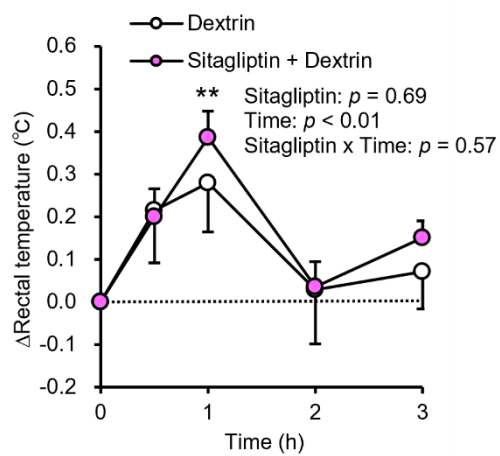
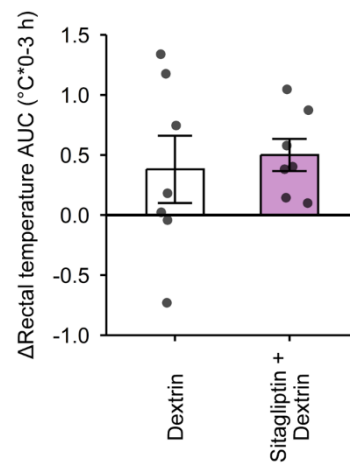
Ex9 投与ラットおよび Glp1r KO マウスの結果から、内因性 GLP-1 の増加が大豆タンパク質による直腸温上昇を増強する可能性を検討した。まず、経口投与で DPP-4 阻害効果を示す DPP-4 阻害剤、シタグリプチンの血漿中 GLP-1 濃度への影響を検討した。シタグリプチン無投与のラットでは、血漿中 GLP-1 濃度は大豆タンパク経口投与 0.5、1、2 時間後で投与前（0 時間）と比較して有意に上昇した（Fig. 3-18A）。

ラットにシタグリプチンを前投与した場合、血漿中 Active GLP-1 濃度はタンパク質投与前に上昇し（Fig. 3-18A）、先行研究（Shimizu *et al.* 2021）で示された血漿中 DPP-4 活性の低下時に Active GLP-1 濃度が増加した結果と一致した。大豆タンパク質の経口投与後、血漿中 GLP-1 濃度は 0.5 時間で投与前（0 時間）と比較して有意に上昇した。シタグリプチンの前処理をした大豆タンパク質経口投与群では、2 時間を除く -1-3 時間の GLP-1 濃度がシタグリプチン未処理大豆タンパク質投与群よりも有意に高かった。大豆タンパク質の経口投与は、シタグリプチン投与の有無にかかわらず、インスリン分泌を促進しなかった（Fig. 3-19）。

次に、大豆タンパク質による直腸温上昇に対するシタグリプチン投与の効果を検証した。-2 時間時点（基礎状態）の直腸温は、シタグリプチン投与群で $36.10 \pm 0.09^{\circ}\text{C}$ 、Vehicle 投与群で $36.07 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$ 、0 時間時点での直腸温は、シタグリプチン投与群で $35.95 \pm 0.05^{\circ}\text{C}$ 、Vehicle 投与群で $35.98 \pm 0.16^{\circ}\text{C}$ であり、シタグリプチン投与の有無にかかわらず、大豆タンパク質投与前までに直腸温に有意な変動は観察されなかった。シタグリプチンを前投与したラットはシタグリプチンを投与していないラットよりも大豆タンパク質に対する直腸温反応が高かった（混合モデルによるシタグリプチンの効果、 $p < 0.05$ 、Fig. 3-18B）。さらに、シタグリプチン投与群の 0-3 時間の直腸温変化の AUC はシタグリプチン無投与群よりも有意に高かった（Fig. 3-18C）。

さらに、炭水化物（デキストリン）および脂質（大豆油）投与による直腸温変化に対するシタグリプチンの影響を検証した。シタグリプチン投与下では、デキストリン経口投与後 0.5 時間で直腸温が投与前と比較して有意に上昇した（Fig. 3-18D）。しかしながら、いずれの時点、また 0-3 時間における ΔAUC においても、群間（シタグリプチン投与の有無）に有意差は認められ

なかった (Fig. 3-18E)。さらに、大豆油はシタグリプチン投与の有無にかかわらず直腸温を上昇させなかった (Fig. 3-18F, G)。また、シタグリプチン処理自体も直腸温に影響を与えなかった (Fig. 3-18H, I)。

A**B****C****D****E**

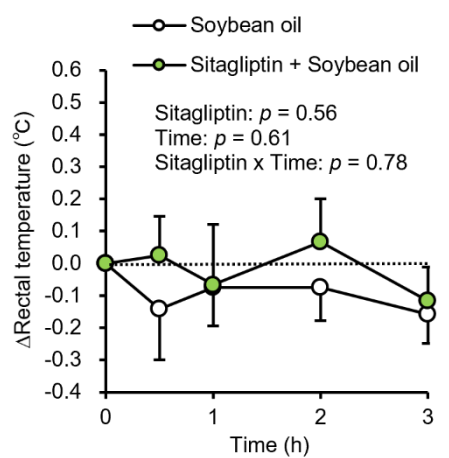
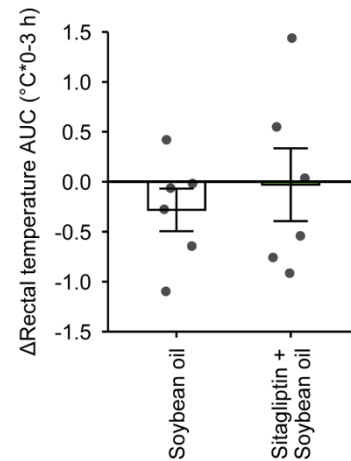
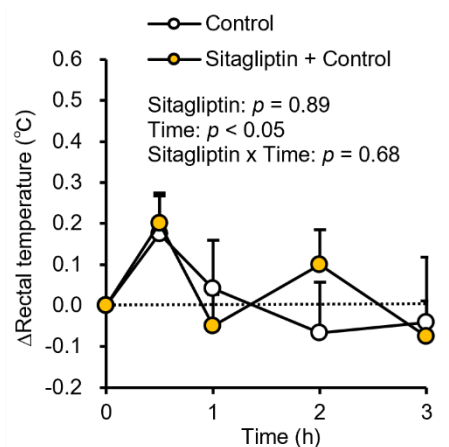
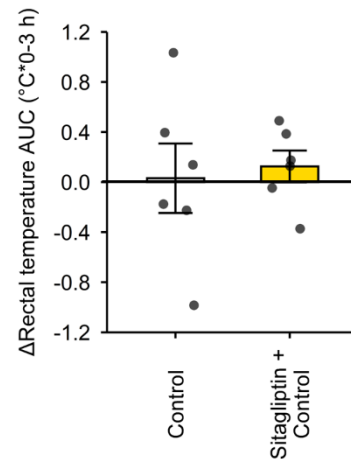
F**G****H****I**

Fig.3-18. DPP-4 inhibition enhances the rectal temperature-elevating effect of soy protein.

Sitagliptin (50 mg/kg) or water (5 mL/kg) was administered orally at 2 h before the oral administration of soy protein (2 g/kg) or water (control, 15 mL/kg) in rats fasted for 2 h. (A) Active GLP-1 concentrations in tail vein plasma ($n = 6-7$). Changes in rectal temperatures and its AUC during 0-3 h in rats orally given (B, C) soy protein (2 g/kg), (D, E) dextrin (2 g/kg), (F, G) soybean oil (0.89 g/kg), or (H, I) water (15 mL/kg) with or without 50 mg/kg sitagliptin treatment (B-E, $n = 7$; F-I, $n = 6$). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM. In (A, B, D, F, H), plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h values within each treatment (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

0.01, Dunnett's test), and different letters or symbols indicate $p < 0.05$ between treatments by Tukey's test or Student's t -test. In (C, E, G, I), $*p < 0.05$ by Student's t -test. The p values of the mixed model with unstructured covariance are shown in each panel (B, D, F, H).

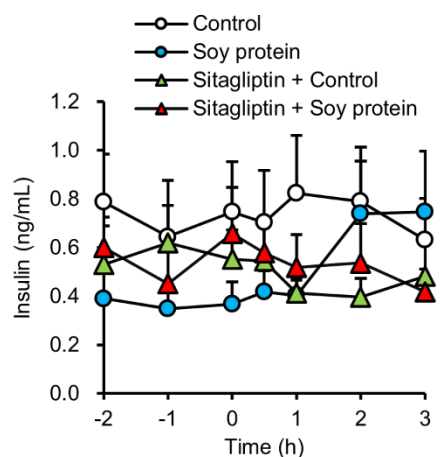


Fig. 3-19. Oral soy protein and DPP-4 inhibition did not affect insulin levels. Sitagliptin (50 mg/kg) or water (5 mL/kg) was administered orally at 2 h before the oral administration of soy protein (2 g/kg) or water (control, 15 mL/kg) in rats fasted for 2 h. Insulin concentrations in tail vein plasma were measured ($n = 6-7$). Values are expressed as the mean + SEM. No significant differences were detected within (vs. 0 h, Dunnett's test) and between treatments (Tukey's test), respectively.

3-3-11. アミノ酸混合液経口投与ラットの直腸温、尾静脈血中 GLP-1 への影響

投与形態としてのタンパク質とアミノ酸の違いによる直腸温変動への影響を検討するために、大豆タンパク質溶液の組成に相当するアミノ酸混合溶液（2 g/15mL）を経口投与した。Fig. 3-20A に示すように、大豆タンパク質は経口投与 0.5、1 時間後の直腸温を投与前より有意に上昇させ、0.5、1、2 時間後でコントロール群と比較して有意に高い直腸温を示した。一方、アミノ酸混合液投与では直腸温の有意な上昇はみられなかった。大豆タンパク質投与群の ΔAUC はコントロール群より有意に高かったが、アミノ酸混合液投与群はコントロール群と大豆タンパク質投与群の中間の値を示した（Fig. 3-20B）。

Fig. 3-20C に示すように、尾静脈血中 Active GLP-1 濃度は、コントロール群で 0.5、2 時間後の尾静脈血漿中 Active GLP-1 濃度が投与前と比較して有意に増加し、大豆タンパク質投与群では 1、2、3 時間後の Active GLP-1 濃度が有意に増加した。さらに、アミノ酸混合液投与群では、ベースラインと比較すると 3 時間後のみの有意な増加であったが、すべてのタイムポイントで増加傾向にあった。0-3 時間の ΔAUC に有意な群間差はなかった（Fig. 3-20D）。

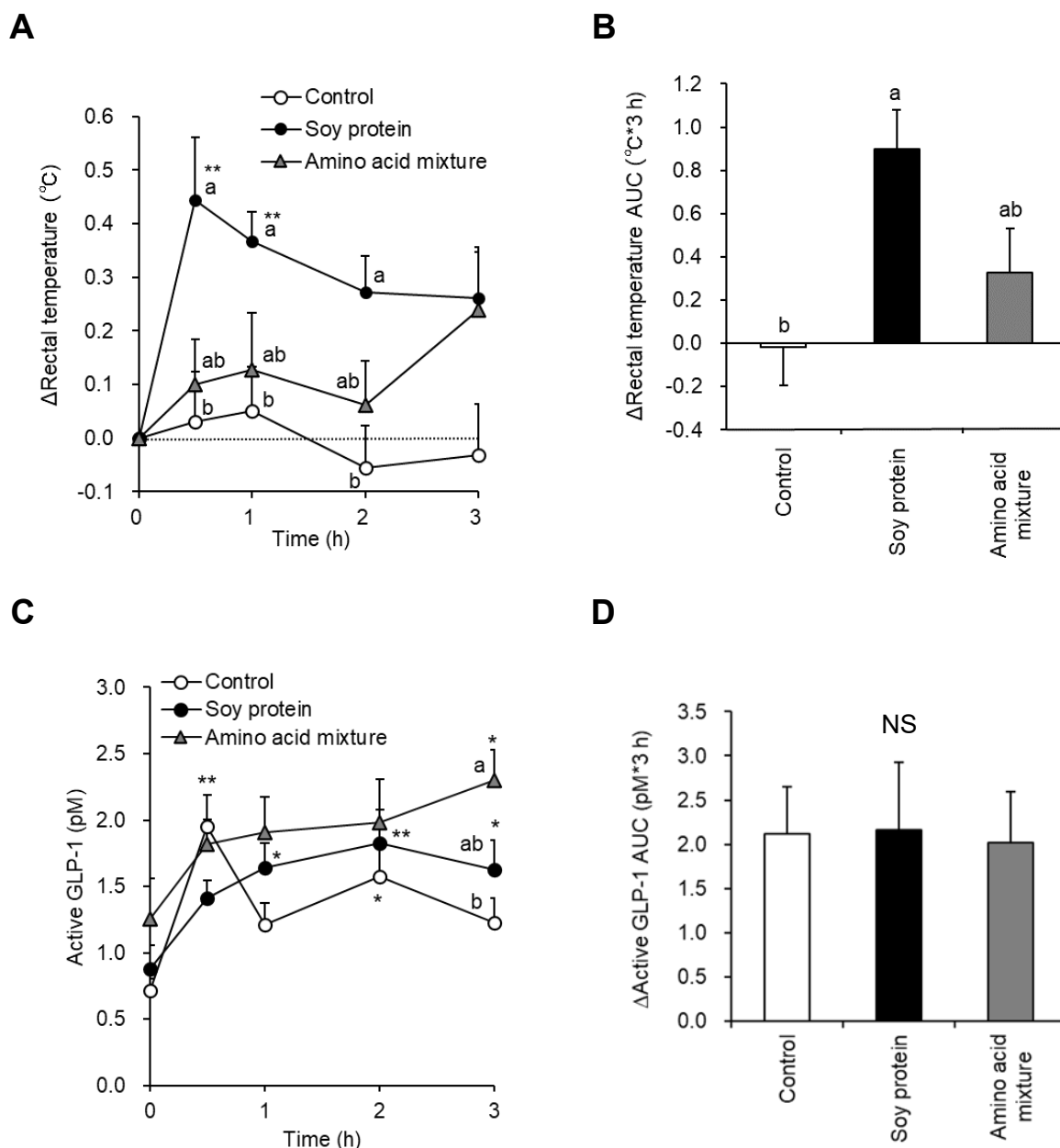


Fig. 3-20. Effects of the amino acid mixture on the rectal temperature and active GLP-1 concentrations in tail vein plasma. (A) Changes in rectal temperature (Δ Rectal temperature) after oral administration of soy protein (2 g/kg), amino acid mixture, or their vehicle (15 mL/kg) in 4 h-fasted rats and (B) its AUC (Δ AUC). (C) Active GLP-1 concentrations in tail vein plasma before and after oral administration of test solutions, and (D) AUC of the changes in active GLP-1 concentration (Δ AUC). Values are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 8-9$). Plots with asterisks (*) show significant differences compared with 0 h values within each treatment (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Dunnett's test). Different letters indicate $p < 0.05$ between treatments by Tukey's test.

3-4. 考察

食餌性タンパク質は強力な熱産生作用を示すが (Scott and Devore 2005; Karst *et al.* 1984; Tappy 1996)、その根底となるメカニズムは明らかにされていない。本研究では、タンパク質摂取により分泌が強く促進される消化管ホルモンである GLP-1 や、他の代表的な消化管ホルモン (GIP、CCK、PYY) が食餌性タンパク質の熱産生作用に関与しているかどうかを検証した。その結果、大豆タンパク質の経口投与は、GLP-1 シグナルを介して直腸温とエネルギー消費を上昇させることを見出した。これらの結果は、GLP-1 の新しい生理的役割を提唱し、食餌性タンパク質の強力な熱産生作用のより深い理解に貢献する。

先行研究 (Perry *et al.* 2020) 同様に、再給餌はラットの直腸温を有意に上昇させた (Fig. 3-3A, B)。AIN-93G 準拠飼料は 1 g あたり 0.2 g のカゼインを含み (Reeves 1997)、ラット (250-320 g) は 3 時間で約 3.2 g の飼料 (= 2-2.56 g casein/kg BW) を摂取した。ほぼ等量 (2 g/kg) のカゼインで直腸温が上昇し、デキストリンや大豆油では直腸温は上昇しなかった (Fig. 3-3C, D) ことから、先行研究 (Scott and Devore 2005; Karst *et al.* 1984; Tappy 1996) と同様にタンパク質の強力な熱産生作用が確認された。直腸温の変動パターンは異なるが (Fig. 3-3A, C)、これらの結果から、AIN-93G 準拠飼料摂取による直腸温上昇にはカゼインが大きく寄与していることが示唆された。

カゼイン、ホエイ、米、卵、大豆の 5 種類の食餌性タンパク質の中で、大豆タンパク質が最も高い熱産生作用を示した (Fig. 3-4A, B)。ヒトにおける先行研究では、Acheson ら (Acheson *et al.* 2011) は、カゼインおよび大豆タンパク質 (それぞれ 50% のタンパク質) を含む食事の後よりも、ホエイ (50% のタンパク質) を含む食事の後に高い熱産生があることを報告した。一方、Alfenas ら (Alfenas *et al.* 2010) は、カゼイン、ホエイ、大豆タンパク質 (それぞれ 50% のタンパク質) を含む朝食後、大豆タンパク質群のみコントロール群と比較して有意に高い DIT を示すこと、および、この大豆タンパク質摂取群の DIT はホエイ食摂取群よりも有意に高いことを観察した。これらの先行研究は、タンパク質を含む混合食を用いており、タンパク質を単独で投与していないことに留意すべきである。食餌性タンパク質の熱産生作用の違いの理由を解明するため

には、さらなる研究が必要であるが、本研究は 5 種類の食餌性タンパク質の単回投与による熱産生作用をラットで比較した最初の研究である。

齧歯類およびヒトにおけるこれまでの報告では、交感神経系-褐色脂肪組織 (sympathetic nervous system- brown adipose tissue; SNS-BAT) 軸の活性化は、高炭水化物食で高く、高タンパク質および高脂質食で低いことが示唆されている (Potter *et al.* 1989; Astrup *et al.* 1989; Vander Tuig and Romsos 1984; Johnston and Balachandran 1987)。これらの報告と一致するように、非選択的 β AR アンタゴニストであるプロプラノロールの投与は大豆タンパク質による直腸温上昇に影響を与えなかった (Fig. 3-6A, B)。他方、胆汁酸や、消化管ホルモンのセクレチンは β AR シグナル経路非依存的に BAT の熱産生を高めることが報告されている (Broeders *et al.* 2015; Li *et al.* 2018)。しかしながら、大豆タンパク質は iBAT 温度を上昇させなかった (Fig. 3-9)。近年のヒト試験 (Aita *et al.* 2022) で、高タンパク食摂取後の DIT に、BAT 活性が高いグループと低いグループの間で差がないことが示された。この報告はタンパク質誘導性の直腸温上昇に BAT が関与していない可能性をさらに支持するものである。

大豆タンパク質を経口投与しても尾部皮膚表面温度は低下しなかった (Fig. 3-11) ことから、大豆タンパク質誘導性の直腸温上昇は、血管収縮に伴う熱放散の抑制によるものではなく、熱産生によるものであることが示唆された。

大豆タンパク質を経口投与すると、GLP-1R アンタゴニストである Ex9 投与の有無に関わらず、ラットの門脈血漿中の Active GLP-1 濃度が上昇したが (Fig. 3-13C)、大豆タンパク質の熱産生作用を消失させた (Fig. 3-12A, B; Fig. 3-13B, C) ことから、GLP-1 シグナルが関与していることが示唆された。Fig. 3-11 を含むこれらの結果は、GLP-1 の静脈内投与が尾部皮膚血管収縮を起こすことなくラットの体温を上昇させるという以前の知見からも一部支持される (Osaka *et al.* 2005)。一方、GIP、CCK-A および PYY 受容体アンタゴニスト処理は、大豆タンパク質による直腸温上昇に影響を与えなかった (Fig. 3-12C-H)。先行研究において、食後の GIP レベルと熱産生効率の間に負の相関があることが示されている (Ishii *et al.* 2016)。GIP は主に食事由来の炭水化物や脂質によって分泌が促進される (Sarson *et al.* 1980; Cataland *et al.* 1974)。これらの知見は、GIP に依存しない食餌性タンパク質の強力な熱産生作用と一致する。CCK は BAT の熱産生

を活性化すると報告されているが (Yamazaki *et al.* 2019; Blouet and Schwartz 2012)、大豆タンパク質は BAT の活性を増加させず (Fig. 3-6; Fig. 3-9)、CCK-A 受容体アンタゴニストを用いた試験の結果 (Fig. 3-12E, F)、大豆タンパク質による直腸温上昇に CCK シグナルが関与していないことが示唆された。PYY と DIT を関連づける報告もあるが (Ishii *et al.* 2016; Doucet *et al.* 2008)、本研究では PYY は大豆タンパク質熱産生作用に関与しないことが示唆された (Fig. 3-12G, H)。このデータの不均一性は、混合食の使用やラットとヒトの種差を含む実験デザインの違いを反映していると考えられる。

大豆タンパク質の経口投与は、 VO_2 の測定によって示されるように、エネルギー消費量を増加させたが (Fig. 3-15A, B)、その増加は身体活動量の増加とは関連していなかった (Fig. 3-14A)。直腸温測定試験と同様に、大豆タンパク質によるエネルギー消費量 [ΔVO_2 (thermogenesis)] の増加は Ex9 処理により消失した (Fig. 3-15C, D)。これらの結果は、大豆タンパク質が GLP-1 シグナルを介して DIT を増加させるという仮説をさらに支持するものである。ヒトでの先行研究では、GLP-1 の静脈内投与によりエネルギー消費量が増加し、これはインスリンによって媒介されていると考えられた (Shalev *et al.* 1997)。しかしながら、本研究では、大豆タンパク質の経口投与はインスリン分泌を促進しなかったことから (Fig. 3-19)、大豆タンパク質はインスリンシグナル非依存的に DIT を増加させることが示唆された。さらに、GLP-1 や GLP-1R アゴニストの脳室内投与による中枢の GLP-1R 活性化は、それに伴う SNS-BAT 軸の活性化を介してエネルギー消費量を増加させることが示唆されている (Osaka *et al.* 2005; Lockie *et al.* 2012; Beiroa *et al.* 2014; Hwa *et al.* 1998)。しかしながら、消化管由来の GLP-1 は DPP-4 によって速やかに分解されるため、視床下部の GLP-1R を直接活性化する可能性は低い (Deacon *et al.* 1995) とされている。消化管由来の GLP-1 が迷走神経に作用して SNS-BAT 軸を活性化する可能性はあるが、大豆タンパク質の経口投与による体温上昇作用に BAT の寄与がないことから (Fig. 3-6A, B; Fig. 3-9)、求心性迷走神経-SNS-BAT 軸とは異なるメカニズムが想定され、その解明には今後さらなる研究が必要である。

大豆タンパク質による熱産生に GLP-1 シグナルが関与することは、Glp1r KO マウスを用いた試験によっても示された (Fig. 3-16)。注目すべきことに、WT マウスで見られたホエイタ

ンパク質の経口投与による直腸温上昇も、Glp1r KO マウスでは消失した (Fig. 3-17)。これらの結果より、大豆タンパク質に限らず、食餌性タンパク質の熱産生作用には、GLP-1 シグナルが必須であることが示唆された。

先行研究において (Conarello *et al.* 2003)、DPP-4 を欠損させた高脂肪食負荷マウスにおいて、エネルギー消費量が増加し、体重増加が相対的に減少することが報告された。清水らの先行研究 (Shimizu *et al.* 2021) と同様に、シタグリプチン前処理は、大豆タンパク質経口投与前後の血漿中 Active GLP-1 濃度を効果的に上昇させた (Fig. 3-18A)。また、シタグリプチン前処理は大豆タンパク質による直腸温上昇を増強した (Fig. 3-18B, C)。一方、デキストリンを経口投与した場合、大豆タンパク質と比較してシタグリプチン処理の効果は限定的で一過性であり、統計的に有意ではなかった (Fig. 3-18D, E)。さらに、大豆油およびシタグリプチンを経口投与しても、直腸温はそれ以上上昇しなかった (Fig. 3-18F, G)。これらの結果は、GLP-1 が炭水化物や脂質ではなく、タンパク質摂取による体温上昇とエネルギー消費量の増加に重要であることを示している。

0.5 M に調製した生理食塩水を経口投与したコントロール群で尾静脈血漿中 Active GLP-1 濃度が増大したが (Fig. 3-20C)、直腸温上昇はみられなかった (Fig. 3-20A, B)。経口投与物による腸の膨れ、伸展刺激が GLP-1 分泌を誘導することが報告されており (Mizuma *et al.* 2025)、この GLP-1 分泌促進は伸展刺激によるものである可能性がある。それを検証するためには浸透圧を調整していない生理食塩水を比較対象として投与する必要がある。いずれにせよ、大豆タンパク質投与時に認められたような直腸温上昇が 0.5 M に調製した生理食塩水投与では認められなかったこと (Fig. 3-20)、GLP-1 分泌の増加のみでは体温上昇を引き起こすには不十分であり、タンパク質やその消化産物といったエネルギー基質の存在が同時に必要であることを示唆している。

本研究の限界の一つは、大豆タンパク質誘導性かつ GLP-1R 依存的な DIT に寄与する組織を同定していないことである。アミノ酸混合液を静脈内投与すると、覚醒下ラットの直腸温が上昇し (Yamaoka *et al.* 2006)、ラットにおけるエネルギー消費量の増加はアミノ酸混合液の静脈内投与よりも経口投与で大きかった (Hayashida *et al.* 1992) という報告がある。そのため、GLP-1 は腸上皮細胞、肝臓などにおいて、利用できるアミノ酸やアミノ酸の代謝を増大させることに

より、体温とエネルギー消費量を高める可能性が考えられる。しかしながら、本研究において、アミノ酸混合液の経口投与は **GLP-1** 分泌を促進する傾向にありながら直腸温上昇は限定的で、大豆タンパク質よりも小さかった (**Fig. 3-20**)。これらの結果は、アミノ酸よりもタンパク質を経口投与する方が **GLP-1** を介した熱産生作用が強いことを示唆している。その要因として、タンパク質の消化・吸収過程で生じる熱エネルギーの違いや、タンパク質の消化により生成するペプチドの方がアミノ酸よりも熱産生組織における基質として優れている可能性、体内動態や吸収効率の観点から、ペプチドとして体内に吸収される方が、そのペプチドや、それが分解されて生成するアミノ酸が熱産生組織に供給されやすいといった可能性などが考えられる。今後、これらの可能性を検討し、**GLP-1** シグナルがどのように、どこで、一つまたは複数の部位で熱産生を増強するかなどの、より詳細なメカニズムを解明することが重要である。

本章の研究成果をまとめると、直腸温測定により、食餌性タンパク質が炭水化物や脂質と比較して強力な熱産生作用を有することを確認した。大豆タンパク質は特に強力な熱産生作用を有し、エネルギー消費量を増加させた。重要なことは、**GLP-1** シグナルが食餌性タンパク質の強力な熱産生作用を媒介することを見出したことである。これらの知見は、これまで長い間曖昧な説明に留まっていた食餌性タンパク質の熱産生作用の根底となるメカニズムに新たな知見をもたらし、体温や代謝の低下に伴う健康障害の予防・改善に向けた研究への基盤作りに貢献するものであると考えられる。

総括

健康の維持・増進、疾病予防に関わる食の機能性（三次機能）が着目される現代において、摂取される栄養素だけでなく、「栄養」に関するすべての現象を研究する学問である「栄養学」の重要性は増している。中でも消化管ホルモンは、摂取した栄養素の消化・吸収や食欲の調節をはじめ、多様な食後生理応答において重要な役割を果たす。それゆえ、消化管ホルモンの分泌を促進する新たな生理活性物質や消化管ホルモンを介した生理学的プロセス、生理的相互作用の発見とその機構解明は、栄養学のさらなる発展や、世界中で喫緊の課題となっている、さまざまな疾患の予防・改善策の策定を目指した研究への発展を目指すうえで極めて重要な課題であると考えられる。総括では、本研究が明らかにした成果の要約を端緒として、本研究の学術的な意義や研究分野における立ち位置、そして本研究成果の活用と今後の展望について議論する。

第1章：2-AGはCCK、GLP-1分泌を強く誘導し、CCK分泌誘導はCB1を介した作用である

第1章では、消化管内分泌細胞株 STC-1 および GLUTag を用いて、食餌性脂質の多くを占める TG の消化産物の一つである 2-MG の CCK、GLP-1 分泌促進能とその作用機構を検証した。その結果、アラキドン酸結合型 2-MG である 2-AG に強い CCK、GLP-1 分泌活性があることを見出した。また、構造活性相関の検証やアンタゴニストを用いた試験等により、2-AG による CCK、GLP-1 分泌促進機構はそれぞれ異なることが示された。さらに、CCK 分泌誘導については、アラキドン酸が長鎖脂肪酸受容体である GPR120 を介した作用であるのに対し、2-AG はカンナビノイド受容体である CB1 を介した作用であり、より低濃度で分泌を誘導することが明らかとなった。

第2章：2-AGはCCKやCB1を介したシグナルで胃排出を抑制する

第2章では、2-AG がマウス生体内で CCK や GLP-1 分泌を促進することで、これらの消化管ホルモンの生理作用の一つとして知られる胃排出抑制が誘導されること、および、その作用機構を検証した。胃排出速度は、代表的なアセトアミノフェン試験およびフェノールレッド試験により評価した。その結果、2-AG 経口投与により、門脈血漿中 CCK 濃度の増大が観察された一方で、Active GLP-1 濃度の増大は見られなかった。また、2-AG 腹腔内投与や、CCK-A 受容体、

CB1 アンタゴニストを用いた試験等によって、2-AG は CB1-CCK および/または CB1 シグナル経路を介して、マウスの胃排出を抑制することが明らかとなった (Fig. 4-1)。

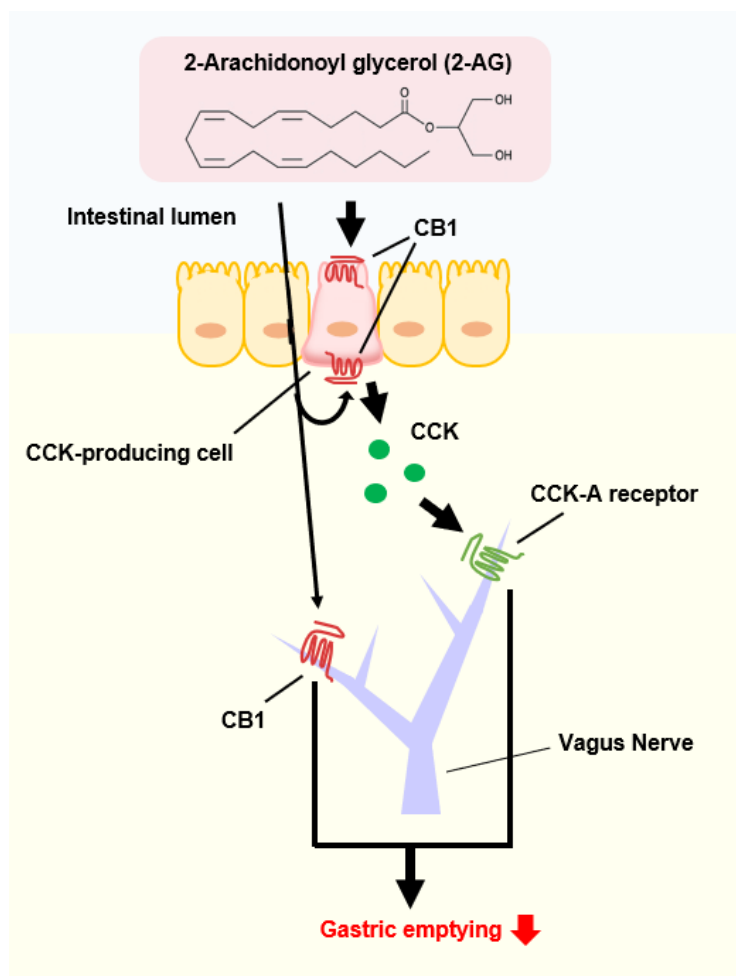


Fig. 4-1. Schematic diagram of the proposed mechanism of gastric emptying inhibition by oral 2-AG.

第 3 章：タンパク質摂取による DIT 亢進には GLP-1 を介したシグナルが必要である

第 3 章では、タンパク質摂取が GLP-1 分泌と DIT を強く誘導することに着目し、「食餌性タンパク質の熱産生作用に GLP-1 が関与する」という仮説を立て、マウスおよびラットを用いて検証した。その結果、大豆タンパク質などの食品タンパク質の経口投与は、BAT 非依存的に GLP-1 シグナルを介して直腸温（深部体温）とエネルギー消費、つまり、DIT を高めることを見出した (Fig. 4-2)。さらに、この作用は炭水化物や脂質では認められず、タンパク質摂取に特異的であり、GLP-1 分泌の亢進に加えて、タンパク質あるいはその消化産物の存在が同時に必要であるこ

とが示唆された。また、この作用はアミノ酸として経口投与するよりも強いことが示された。

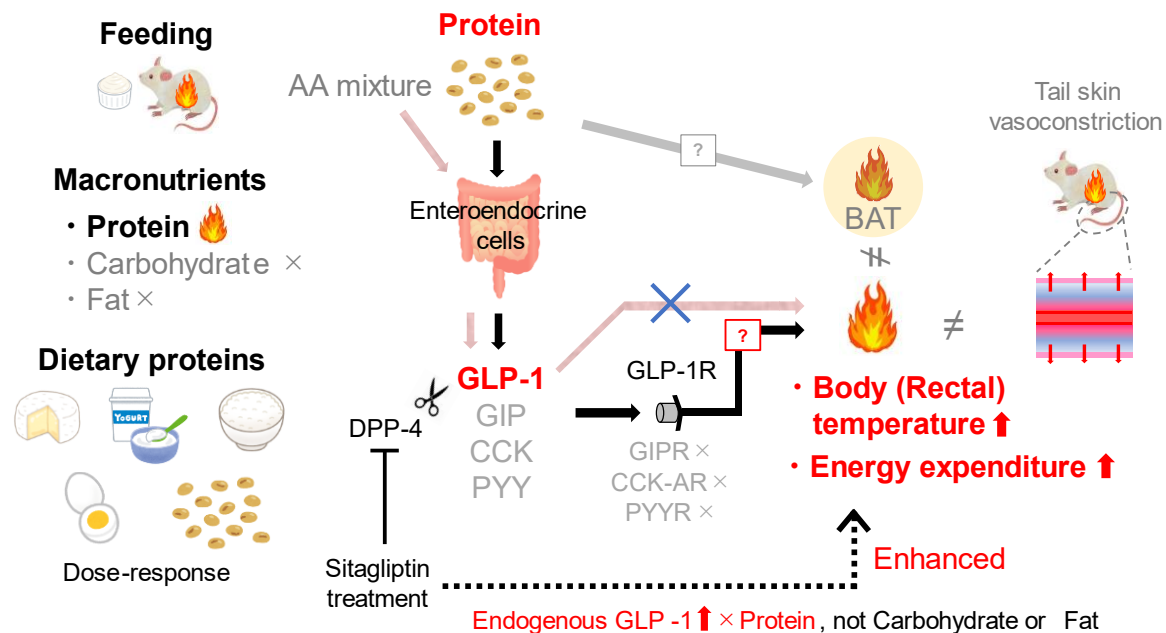


Fig. 4-2. Schematic diagram of the findings revealed in this study.

以上の成果をまとめると、本研究は CCK および GLP-1 の分泌を促進する新規生理活性脂質として 2-AG を見出し、その作用分子機構を一部解明した。また、細胞レベルにとどまらず、経口 2-AG が実際にマウス生体内で胃排出を抑制すること、および、2-AG と胃排出速度を制御する神経内分泌系との間の新たな生理的相互作用を見出した点も重要であると思われる。さらに、発見から約一世紀の長い歴史があるタンパク質摂取による DIT 亢進において、その根底となるメカニズムとして GLP-1 シグナルが不可欠であるという新たな洞察を与え、GLP-1 を介した新たな生理学的プロセスの発見をもたらした。ここからは、過去の研究も含めて、本研究の学術的意義や研究分野における立ち位置、本研究成果の活用と今後の展望について議論していく。

2-AG による CCK・GLP-1 分泌誘導と新たな生理的相互作用の発見について

カンナビノイドは大麻草由来の生理活性物質であり (DiPatrizio, 2016)、内因性カンナビノイド (2-AG、AEA)、それらの生合成・分解酵素、受容体 CB1/CB2 から成るエンドカンナビ

ノイド系は全身に広く分布する (Argueta et al., 2019)。エンドカンナビノイドは必要時に膜リン脂質から迅速に合成され (Muccioli, 2010; Ueda et al., 2011)、空腹時には中枢神経系および空腸粘膜で増加し、食後に減少する (Argueta and DiPatrizio, 2017; Burdyga et al., 2010; DiPatrizio et al., 2015; Gómez et al., 2002; Kirkham et al., 2002)。この変動は一般的な 2-MG では見られないことから (Ben-Shabat et al., 1998; DiPatrizio et al., 2015)、2-AG や AEA は栄養状態を鋭敏に反映する特異的分子の一つであることが示されている。迷走神経を介した脳-腸軸シグナルが腸粘膜のエンドカンナビノイド合成を促進するとされ (DiPatrizio et al., 2011)、AEA は迷走神経に発現する CB1 を介して摂食を促進するという報告がある (Capasso and Izzo, 2008; Gómez et al., 2002; Izzo et al., 2009)。また、食事誘導性肥満 (diet-induced obesity; DIO) マウスにおいて、アゴニストによる空腸の CB1 活性化は過食を誘導し (Argueta and DiPatrizio, 2017)、末梢神経や腸上皮 CB1 の阻害が摂食量を減少させることも示されている (Avalos et al., 2020; DiPatrizio et al., 2011, 2013)。このように、これまで CB1 は摂食促進に働く受容体と位置付けられ、経口投与可能な中枢神経 CB1 特異的アンタゴニストであるリモナバントが開発されたことで、抗肥満のターゲットとして関心が高まった。リモナバントは食欲抑制に効果的だったものの、重度のうつ病などの精神的な副作用があったため (Christensen et al., 2007)、市場から排除された。しかしながら、末梢神経や腸上皮特異的な CB1 阻害剤が副作用を誘発することなく、食欲や摂食を抑制できるかどうかは未だ明らかでないため、このターゲットに対する関心は依然として高い。

このような背景のもと、I 細胞に CB1 が発現するという報告は (Sykaras et al. 2012; Argueta et al. 2019)、I 細胞における CB1 の役割が摂食促進方向に働くのか、それとも CCK の生理作用通り、食欲を抑制させる方向に働くのかという新たな疑問を生じさせた。先行研究では (Argueta et al. 2019)、WT マウスにおいて、コーン油経口投与による CCK 分泌促進と、それに伴う満腹感誘導が、腸上皮への CB1 アゴニスト処理により抑制された。また、DIO マウスでは、腸上皮の CB1 阻害により循環血中の CCK 濃度が増大すること、および、これに伴う食欲抑制が CCK-A 受容体アンタゴニストの前処理により解除されることが示されている。このように、CB1 の活性化が CCK 分泌を抑制し得ることが示唆されており、上述の「CB1 は食欲亢進の方に働く受容体」という定説と相違はない。しかしながら、これらの知見は薬理的アゴニストやアンタゴ

ニストに依存した間接評価に留まり、**2-AG** や **AEA** といった生理的リガンドが I 細胞にどのように作用するのかは解明されていなかった。

本研究では、マウス I 細胞モデルである **STC-1** 細胞を用いて、**2-AG** が **CB1** を介して強力に **CCK** 分泌を促進することを直接的に実証した。また、マウス生体内において、経口 **2-AG** が I 細胞–**CB1**–**CCK**–迷走神経系および/または求心性迷走神経上 **CB1** の直接活性化を介して胃排出を抑制する可能性を示した。胃排出の抑制は摂食制御に寄与することから、これらの結果は、**CB1** の生理作用が従来のように一元的な摂食促進に限定されるものではなく、生理的文脈やリガンドに応じて異なる役割を担うことを示唆する。すなわち、**CB1** は空腹時には摂食促進的に働く一方、食後には I 細胞などを介して摂食抑制的に働いたり、また、薬理的アゴニストによる比較的強い作用と、食餌由来（外因性）**2-AG** のマイルドな作用の違い等によって、機能的二面性を持つという可能性があり、興味深い。

リモナバント然り、医薬品による **CB1** の活性化は、安全面、技術面、コスト面、汎用性等からハードルが高い。その一方で、アラキドン酸を豊富に含む動物性食品等を食事により摂取し、消化によって生成した **2-AG** による I 細胞の **CB1** を介した作用を標的とするアプローチはより現実的と考えられる。また、急速な胃排出は、食後高血糖や食後高脂血症の原因となるため、胃排出の抑制は、耐糖能異常や脂質異常症の予防・軽減のための有望なターゲットと考えられる。さらに、**CCK** には胃排出抑制以外にも多様な生理作用が知られているため、世界中で課題となっている肥満や糖尿病など、さまざまな疾患への食餌脂質由来 **2-AG** の長期摂取による影響を検証することは今後の重要な研究課題であると考えられる。**2-AG** の化学的な不安定さゆえに、**CB1** を介した作用を検証する *in vivo* 試験において、**2-AG** エーテルなどの異性体が用いられることがある (Deshmukh and Sharma 2012)。しかしながら、本研究により、**CB1** は **2-AG** の構造を厳密に認識していることが示されたため、**2-AG** の直接投与、または消化管内で **2-AG** が確実に生成する素材、条件による検証が求められる。

また、マウス大腸上皮由来内分泌細胞株 **GLUTag** を用いた検証により、**2-AG** は **CCK** だけでなく、**GLP-1** 分泌も強く誘導することが明らかとなった。この作用は **2-PG** よりも強かったが、マウス小腸上皮由来内分泌細胞株 **STC-1** を用いた船津らの研究では (Funatsu *et al.* 2025)、

2-AG よりも 2-PG の GLP-1 分泌誘導能が高かった。この結果の不一致は、使用した細胞の違いによるものと考えられる。船津らの研究では、2-PG は GPR40 や GPR119 を介して GLP-1 分泌を誘導することが示されているが、GPR40 や GPR119 の発現は STC-1 よりも GLUTag の方が高い (Kamakura *et al.* 2020)。その GLUTag においても 2-AG の方が GLP-1 分泌活性が高いこと、GLUTag は L 細胞モデルであり、GLP-1 分泌を評価する系として STC-1 より優れている点を踏まえると、本研究における結果が妥当である可能性が高い。そして、2-AG は、STC-1 細胞では発現が低く、かつ GPR40 や GPR119 以外の受容体を介して GLP-1 分泌を誘導する可能性が考えられる。これを検証するためには、2 つの細胞間の 2-AG 添加有無の RNA-sequence 結果を比較したり、関与しそうな受容体のマウス腸部位別遺伝子発現を調査して参考にしたりするのが有効かもしれない。また、GPR119 は、ヒトでは回腸や結腸よりも十二指腸や空腸で高発現しているが、マウスでは結腸に高発現し、小腸での発現は圧倒的に少ないことが示されている (Chu *et al.* 2008)。このように、ヒトへの外挿性という点において、ヒトとマウスの種差を適切に考慮することが、臨床試験の確度を高め、ヒトでも有効な機能性成分を発見するうえでは重要だと考えられる。

総じて、本研究は、2-AG を介した腸内エンドカンナビノイド-消化管ホルモン-神経系連関という新規の生理的仕組みを提唱し、消化管制御、食欲制御、代謝調整、さらには肥満・糖尿病などの生活習慣病への応用可能性に新たな洞察を与えるものであると考えられる。食餌由来 2-AG の利用は、薬理的 CB1 操作に伴う中枢副作用を回避するという観点からも実用的価値が高い。今後、2-AG 生成を促す食品素材や栄養条件の探索、CB1 および関連受容体の腸局在性を踏まえた詳細な作用機序の解明、さらにはヒト介入研究を通じた臨床的意義の検証が進むことで、エンドカンナビノイド系を標的とした新規食機能・代謝制御戦略の確立に寄与することが期待される。

食品タンパク質誘導性熱産生の根底となるメカニズムの発見について

タンパク質摂取後の DIT が高いことについて、Van Milgen は、アミノ酸のアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate; ATP) 生成効率がグルコースや脂肪酸よりも低いことを自ら構築したモデルにより示し、代謝効率の悪さが DIT 増大の要因であると結論付けた (Van Milgen 2002)。

また、ラットへの静脈内アミノ酸投与により直腸温上昇およびタンパク質合成の増加が生じることを示した山岡ら (Yamaoka *et al.* 2006)、ロイシン投与によるエネルギー消費増大がタンパク質合成と正に相関することを示した Giordano や Castellino (Giordano and Castellino 1997) など、アミノ酸代謝とタンパク質合成のエネルギーコストに着目した研究は数多い。さらに、特定のアミノ酸（ロイシン、グリシンなど）の熱産生性が示される一方で (Tsujioka *et al.* 1996; Sakaue *et al.* 1994)、分岐鎖アミノ酸を極端に偏った状態で投与すると逆にエネルギー消費が低下するという研究もあり (Pitkanen 1992)、アミノ酸組成が DIT 応答に大きく影響することが示唆されている。また、静脈内アミノ酸投与では経口投与よりも DIT が小さく (Hayashida *et al.* 1992)、腸上皮細胞でのアミノ酸代謝 (O'Dwyer *et al.* 1989)、肝臓での糖新生 (Veldhorst *et al.* 2009) が関与する可能性が示唆されるなど、食後生理応答としての DIT は単なる代謝コストでは説明しきれない複雑性を有し、多臓器協調的な応答である可能性が示されていた。しかしながら、これらの研究は、なぜタンパク質摂取は他の栄養素よりも一貫して DIT が高いのかを完全には説明し得ないという限界を有していた。本研究は、こうした代謝コスト説に基づく説明が不十分な部分に対して、食餌性タンパク質により、他の栄養素よりも強力に分泌が促進される内因性 GLP-1 が、DIT に関与するという新たな概念を提示した点で、既存の考えの枠組みを大きく拡張する意義を持つ。

近年、消化管ホルモンがエネルギー消費や熱産生調節に関与する可能性が着目されている。セクレチンが BAT の熱産生を直接活性化し、ヒトでも食後のセクレチン上昇が BAT 活性と正に相関すること (Li *et al.* 2018)、CCK が迷走神経・交感神経系を介して BAT 熱産生を促進すること (Yamazaki *et al.* 2019; Blouet and Schwartz 2012)、グレリンが逆に BAT 熱産生を抑制すること (Lin *et al.* 2014)、レプチンが SNS-BAT 軸を介して熱産生を増大させること (Perry *et al.* 2020) など、消化管ホルモンと BAT の連関は広がりを見せている。

その一方で、GLP-1 については結果が二分していた。GLP-1 中枢投与で BAT 活性増大 (Lockie *et al.* 2012)、脳室内や皮下への GLP-1R アゴニスト投与で BAT 熱産生増大 (Beiroa *et al.* 2014; Wang *et al.* 2021)、GLP-1 静脈内投与でヒトやラットのエネルギー消費増加 (Shalev *et al.* 1997; Osaka *et al.* 2005) など、GLP-1 の熱産生促進を支持する研究がある一方で、GLP-1 注入で DIT が低下 (Flint *et al.* 2000)、GLP-1R アゴニストの腹腔内投与でエネルギー消費低下 (Krieger

et al. 2018) など、相反する知見も多い。これらの矛盾は、末梢か中枢かといった投与経路の違い、インスリン分泌の影響、胃排出抑制による栄養素吸収速度変化などの違いによるものであると考えられる。これらの先行研究は薬理作用を検証しているが、GLP-1 は DPP-4 により極めて速く分解されるため、消化管由来（内因性）GLP-1 が、特に中枢の GLP-1R へ直接到達する可能性は低い (Deacon et al. 1995)。つまり、通常食後に分泌促進される GLP-1 が DIT を誘導し得るのかという最も重要な問いには、先行研究では明確に答えられていなかった。本研究では、GLP-1R アンタゴニスト、GLP-1r KO マウス、DPP-4 阻害による内因性 GLP-1 増大という複数のアプローチを用い、食品タンパク質摂取により分泌が促進される内因性 GLP-1 が、高い DIT を誘導するという、内因性 GLP-1 の新たな生理的役割を明確に実証した。これは、先行研究の矛盾を整理し、GLP-1 の薬理作用ではなく、生理作用を定義し直す成果であると考えられる。また、この作用は BAT 非依存的であったことから、これまで BAT を中心に議論されてきた消化管ホルモンを介する研究に一石を投じ、骨格筋・肝臓・腸管といった新たな組織の関与を示唆するものであると思われる。今後は、特異的ノックアウトモデルや組織特異的神経回路解析を組み合わせることで、GLP-1 がどの組織を介し、どの経路でエネルギー代謝を制御するのかをより精緻に明らかにする必要がある。

応用的観点からは、本研究で示された内因性 GLP-1 の DIT 誘導作用は、食事設計・食事介入に基づくエネルギー消費制御戦略の開発に直接的な示唆を与える。本研究では、種々の食品タンパク質を単独で経口投与した際に、DIT 応答が異なることを示した。文部科学省の食品データベースによると、最も高い DIT がみられた大豆タンパク質は、GLP-1 分泌を誘導するグルタミン酸やアスパラギン酸 (Modvig et al. 2021)、アルギニン (Amin et al. 2018)、リジン (Irie and Hira 2025) などの割合が一般的に高く、一方で、最も DIT が低かった米タンパク質はリジンやアルギニンの割合が一般的に低く、全体の必須アミノ酸バランスは他のタンパク質に劣る。また、ホエイの消化・吸収速度は速く、一方で、カゼインは消化が緩やかで腸管に長くとどまることが知られており (Farup et al. 2016)、アミノ酸により吸収効率・速度が異なる (Katsura and Hira 2024)。今後、タンパク質の量だけでなくアミノ酸組成や消化・吸収速度といった食事要因が GLP-1 分泌とその下流の DIT 応答をどのように規定するかを精緻に明らかにすることで、「GLP-1 分泌を最

大化し、DIT を効率的に高める食事様式」の提案が可能になるかもしれない。さらに、ヒトにおいても同様の結果が得られるかや、アミノ酸組成、食品マトリックス、加工度、咀嚼など、実際の食事が GLP-1 シグナルと DIT をどのように修飾するかを検討することで、基礎研究の知見を実際の食環境へと橋渡しすることが可能になると考えられる。

総じて、本研究は食品タンパク質がもたらす高い DIT の生理的基盤を内因性 GLP-1 シグナルという観点から再定義し、食後エネルギー代謝の理解に新たな道筋を示した。本成果を起点として、GLP-1 を中心とした内分泌-代謝ネットワークの構造解明、そしてそれを活用した実践的な食事戦略や代謝疾患予防法の開発へと発展することが期待される。

以上、本研究の成果と過去の知見を統合的にまとめると、本研究は、従来の薬理的評価だけでは捉えきれなかった内因性消化管ホルモンの生理作用や、栄養素特異的応答の理解に新たな契機を提供するものであると考えられる。近年、GLP-1R 作動薬が抗肥満治療において広く用いられているが、本研究は、脂質やタンパク質の摂取に伴って内因的に誘導される消化管ホルモン応答に着目し、薬理介入とは異なるアプローチから、食欲制御や消化管機能を介した代謝調節の新たな可能性を提示した。これらの成果は、栄養学のさらなる発展に寄与するとともに、生活習慣病の予防・改善策の策定に向けた学術的基盤を提供するものであると考えられる。今後は、作用メカニズムのさらなる解明やヒトでの検証、ならびに個人差や食品条件による応答の違いを考慮した評価を進めることで、食事設計に基づく新たな代謝制御戦略の確立に寄与することが期待される。

引用文献

- Abedi E., Sahari M. A. (2014) Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci. Nutr.* **2**, 443–463.
- Acheson K. J., Blondel-Lubrano A., Oguey-Araymon S., Beaumont M., Emady-Azar S., Ammon-Zufferey C., Monnard I., Pinaud S., Nielsen-Moennoz C., Bovetto L. (2011) Protein choices targeting thermogenesis and metabolism^{1–3}. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 525–534.
- Ahmed A., Tan Z., Abd El-Radi W., Rajamani K. (2025) Insulin versus established GLP-1 receptor agonists, DPP-4 inhibitors, and SGLT-2 inhibitors for uncontrolled type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Cureus* **17**, e92175.
- Aita S., Matsushita M., Yoneshiro T., Hatano T., Kameya T., Ohkubo I., Saito M. (2022) Brown fat-associated postprandial thermogenesis in humans: Different effects of isocaloric meals rich in carbohydrate, fat, and protein. *Front. Nutr.* **9**, 1040444.
- Alfenas R. de C. G., Bressan J., Paiva A. C. de (2010) Effects of protein quality on appetite and energy metabolism in normal weight subjects. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **54**, 45–51.
- Amin A., Neophytou C., Thein S., Martin N. M., Alamshah A., Spreckley E., Bloom S. R., Murphy K. G. (2018) L-Arginine increases postprandial circulating GLP-1 and PYY levels in humans. *Obesity* **26**, 1721–1726.
- Aoki J., Inoue A., Makide K., Saiki N., Arai H. (2007) Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* **89**, 197–204.
- Argueta D. A., DiPatrizio N. V. (2017) Peripheral endocannabinoid signaling controls hyperphagia in western diet-induced obesity. *Physiol. Behav.* **171**, 32–39.
- Argueta D. A., Perez P. A., Makriyannis A., DiPatrizio N. V. (2019) Cannabinoid CB1 receptors inhibit gut-brain satiation signaling in diet-induced obesity. *Front. Physiol.* **10**, 704.
- Ashworth A. (1969) Metabolic rates during recovery from protein–calorie malnutrition: the need for a new concept of specific dynamic action. *Nature* **223**, 407–409.
- Astrup A., Simonsen L., Bulow J., Madsen J., Christensen N. J. (1989) Epinephrine mediates facultative carbohydrate-induced thermogenesis in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*

- Baggio L. L., Drucker D. J. (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**, 2131–2157.
- Bastías-Pérez M., Serra D., Herrero L. (2020) Dietary options for rodents in the study of obesity. *Nutrients* **12**, 3234.
- Beiroa D., Imbernon M., Gallego R., Senra A., Herranz D., Villarroya F., Serrano M., Fernø J., Salvador J., Escalada J., Dieguez C., Lopez M., Frühbeck G., Nogueiras R. (2014) GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* **63**, 3346–3358.
- Ben-Shabat S., Fride E., Sheskin T., Tamiri T., Rhee M.-H., Vogel Z., Bisogno T., De Petrocellis L., Di Marzo V., Mechoulam R. (1998) An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol.* **353**, 23–31.
- Berry S. E. E. (2009) Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.* **22**, 3–17.
- Blankman J. L., Simon G. M., Cravatt B. F. (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* **14**, 1347–1356.
- Blouet C., Schwartz G. J. (2012) Duodenal lipid sensing activates vagal afferents to regulate non-shivering brown fat thermogenesis in rats. *PLOS ONE* **7**, e51898.
- Borsook H. (1936) The specific dynamic action of protein and amino acids in animals. *Biol. Rev.* **11**, 147–180.
- Broeders E. P. M., Nascimento E. B. M., Havekes B., Brans B., Roumans K. H. M., Tailleux A., Schaart G., Kouach M., Charton J., Deprez B., Bouvy N.D., Mottaghy F., Staels B., van Marken Lichtenbelt W.D., Schrauwen P. (2015) The bile acid chenodeoxycholic acid increases human brown adipose tissue activity. *Cell Metab.* **22**, 418–426.

- Burdyga G. (2004) Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J. Neurosci.* **24**, 2708–2715.
- Burdyga G., Varro A., Dimaline R., Thompson D. G., Dockray G. J. (2010) Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons: kinetics and role in influencing neurochemical phenotype. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **299**, G63–G69.
- Carlson G. L. (1997) Nutrient induced thermogenesis. *Baillières Clin. Endocrinol. Metab.* **11**, 603–615.
- Carneiro I. P., Elliott S. A., Siervo M., Padwal R., Bertoli S., Battezzati A., Prado C. M. (2016) Is obesity associated with altered energy expenditure? *Adv. Nutr.* **7**, 476–487.
- Carpenter K. J. (2003) A short history of nutritional science: Part 2 (1885–1912). *J. Nutr.* **133**, 975–984.
- Casu M. A., Porcella A., Ruiu S., Saba P., Marchese G., Carai M. A. M., Reali R., Gessa G. L., Pani L. (2003) Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastroenteric tract. *Eur. J. Pharmacol.* **459**, 97–105.
- Cataland S., Crockett S. E., Brown J. C., Mazzaferri E. L. (1974) Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulation by oral glucose in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **39**, 223–228.
- Chen W., Hira T., Nakajima S., Tomozawa H., Tsubata M., Yamaguchi K., Hara H. (2012) Suppressive effect on food intake of a potato extract (Potein®) involving cholecystokinin release in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1104–1109.
- Chon S.-H., Douglass J. D., Zhou Y. X., Malik N., Dixon J. L., Brinker A., Quadro L., Storch J. (2012) Over-expression of monoacylglycerol lipase (MGL) in small intestine alters endocannabinoid levels and whole body energy balance, resulting in obesity. *PLOS ONE* **7**, e43962.
- Christiansen C. B., Gabe M. B. N., Svendsen B., Dragsted L. O., Rosenkilde M. M., Holst J. J. (2018) The impact of short-chain fatty acids on GLP-1 and PYY secretion from the isolated perfused rat colon. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **315**, G53–G65.

- Chu Z.-L., Carroll C., Alfonso J., Gutierrez V., He H., Lucman A., Pedraza M., Mondala H., Gao H., Bagnol D., Chen R., Jones R.M., Behan D.P., Leonard J. (2008) A role for intestinal endocrine cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulintropic peptide release. *Endocrinology* **149**, 2038–2047.
- Conarello S. L., Li Z., Ronan J., Roy R.S., Zhu L., Jiang G., Liu F., Woods J., Zycband E., Moller D.E., Thornberry N.A., Zhang B.B. (2003) Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 6825–6830.
- Covington D. K., Briscoe C. A., Brown A. J., Jayawickreme C. K. (2006) The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40–GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 770–773.
- Damgaard M., Graff J., Fuglsang S., Holst J. J., Rehfeld J. F., Madsen J. L. (2013) Effects of oleic acid and olive oil on gastric emptying, gut hormone secretion and appetite in lean and overweight or obese males. *E-SPEN J.* **8**, e8–e14.
- Deacon C. F., Nauck M. A., Toft-Nielsen M., Pridal L., Willms B., Hoist J. J. (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. **44**.
- Deshmukh R. R., Sharma P. L. (2012) Stimulation of accumbens shell cannabinoid CB₁ receptors by noladin ether, a putative endocannabinoid, modulates food intake and dietary selection in rats. *Pharmacol. Res.* **66**, 276–282.
- Di Marzo V., Matias I. (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* **8**, 585–589.
- Dinh T. P., Carpenter D., Leslie F. M., Freund T. F., Katona I., Sensi S. L., Kathuria S., Piomelli D. (2002a) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10819–10824.
- Dinh T. P., Freund T. F., Piomelli D. (2002b) A role for monoglyceride lipase in 2-

- arachidonoylglycerol inactivation. *Chem. Phys. Lipids* **121**, 149–158.
- DiPatrizio N. V. (2016) Endocannabinoids in the gut. *Cannabis Cannabinoid Res.* **1**, 67–77.
- DiPatrizio N. V., Astarita G., Schwartz G., Li X., Piomelli D. (2011) Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12904–12908.
- DiPatrizio N. V., Igarashi M., Narayanaswami V., Murray C., Gancayco J., Russell A., Jung K.-M., Piomelli D. (2015) Fasting stimulates 2-AG biosynthesis in the small intestine: role of cholinergic pathways. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **309**, R805–R813.
- Dockray G. J. (2012) Cholecystokinin. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **19**, 8–12.
- Doucet É., Laviolette M., Imbeault P., Strychar I., Rabasa-Lhoret R., Prud'homme D. (2008) Total peptide YY is a correlate of postprandial energy expenditure but not of appetite or energy intake in healthy women. *Metabolism* **57**, 1458–1464.
- Egberts J.-H., Raza G. S., Wilgus C., Teyssen S., Kiehne K., Herzig K.-H. (2020) Release of cholecystokinin from rat intestinal mucosal cells and the enteroendocrine cell line STC-1 in response to maleic and succinic acid, fermentation products of alcoholic beverages. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 589.
- Elliott R. M., Morgan L. M., Tredger J. A., Deacon S., Wright J., Marks V. (1993) Glucagon-like peptide-1(7–36)amide and glucose-dependent insulintropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J. Endocrinol.* **138**, 159–166.
- Farup J., Rahbek S. K., Storm A. C., Klitgaard S., Jørgensen H., Bibby B. M., Serena A., Vissing K. (2016) Effect of degree of hydrolysis of whey protein on in vivo plasma amino acid appearance in humans. *SpringerPlus* **5**, 382.
- Feldman S., Gibaldi M. (1968) Effect of bile salts on gastric emptying and intestinal transit in the rat. *Gastroenterology* **54**, 918–921.
- Feltrin K. L., Little T. J., Meyer J. H., Horowitz M., Smout A. J. P. M., Wishart J., Pilichiewicz A. N., Rades T., Chapman I. M., Feinle-Bisset C. (2004) Effects of intraduodenal fatty acids on

- appetite, antropyloroduodenal motility, and plasma CCK and GLP-1 in humans vary with their chain length. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, R524–R533.
- Flint A., Raben A., Rehfeld J. F., Holst J. J., Astrup A. (2000) The effect of glucagon-like peptide-1 on energy expenditure and substrate metabolism in humans. *Int. J. Obes.* **24**, 288–298.
- Frankenfield D. C. (2010) On heat, respiration, and calorimetry. *Nutrition* **26**, 939–950.
- Funatsu Y., Takahashi N., Yamazaki Y., Watanabe H., Nakagita T., Ishimaru Y., Nakamura K., Kaneko K. (2025) Fatty acid composition in 2-monoacylglycerol modulates GLP-1 secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **781**, 152546.
- Garrow J. S., Hawes S. F. (1972) The role of amino acid oxidation in causing ‘specific dynamic action’ in man. *Br. J. Nutr.* **27**, 211–219.
- GBD 2021 Adult BMI Collaborators. (2025) Global, regional, and national prevalence of adult overweight and obesity, 1990–2021, with forecasts to 2050: a forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* **405**, 813–838.
- Gendaszewska-Darmach E., Drzazga A., Koziolkiewicz M. (2019) Targeting GPCRs activated by fatty acid-derived lipids in type 2 diabetes. *Trends Mol. Med.* **25**, 915–929.
- Giordano M., Castellino P. (1997) Correlation between amino acid induced changes in energy expenditure and protein metabolism in humans. *Nutrition* **13**, 309–312.
- Gómez R., Navarro M., Ferrer B., Trigo J. M., Bilbao A., Arco I. D., Cippitelli A., Nava F., Piomelli D., Fonseca F. R. de (2002) A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J. Neurosci.* **22**, 9612–9617.
- González-Mariscal I., Krzysik-Walker S. M., Kim W., Rouse M., Egan J. M. (2016) Blockade of cannabinoid 1 receptor improves GLP-1R mediated insulin secretion in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* **423**, 1–10.
- Gutzwiller J.-P., Drewe J., Göke B., Schmidt H., Rohrer B., Lareida J., Beglinger C. (1999a) Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **276**, R1541–R1544.

- Gutzwiller J.-P., Göke B., Drewe J., Hildebrand P., Ketterer S., Handschin D., Winterhalder R., Conen D., Beglinger C. (1999b) Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut* **44**, 81–86.
- Halton T. L., Hu F. B. (2004) The effects of high protein diets on thermogenesis, satiety and weight loss: A critical review. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**, 373–385.
- Hand K. V., Bruen C. M., O'Halloran F., Giblin L., Green B. D. (2010) Acute and chronic effects of dietary fatty acids on cholecystokinin expression, storage and secretion in enteroendocrine STC-1 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, S93–S103.
- Hansen H. S., Rosenkilde M. M., Holst J. J., Schwartz T. W. (2012) GPR119 as a fat sensor. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 374–381.
- Hansen H. S., Vana V. (2019) Non-endocannabinoid N-acylethanolamines and 2-monoacylglycerols in the intestine. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 1443–1454.
- Hansen K. B., Rosenkilde M. M., Knop F. K., Wellner N., Diep T. A., Rehfeld J. F., Andersen U. B., Holst J. J., Hansen H. S. (2011) 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E1409–E1417.
- Hanuš L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D. E., Kustanovich I., Mechoulam R. (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3662–3665.
- Hassing H. A., Engelstoft M.S., Sichlau R.M., Madsen A.N., Rehfeld J.F., Pedersen J., Jones R.M., Holst J.J., Schwartz T.W., Rosenkilde M.M., Hansen H.S. (2016) Oral 2-oleyl glyceryl ether improves glucose tolerance in mice through the GPR119 receptor. *BioFactors* **42**, 665–673.
- Hayashida Y., Kido Y., Tsujinaka T., Abe Y., Kobayashi M., Nishi T., Ogawa A., Tanaka T., Mori T. (1992) Increased energy expenditure after intravenous administration of amino acids. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **16**, 142–148.
- Heading R. C., Nimmo J., Prescott L. F., Tothill P. (1973) The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. *Br. J. Pharmacol.* **47**, 415–421.

- Hellström P. M., Grybäck P., Jacobsson H. (2006) The physiology of gastric emptying. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **20**, 397–407.
- Herranz R. (2003) Cholecystokinin antagonists: Pharmacological and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* **23**, 559–605.
- Hibi M., Oishi S., Matsushita M., Yoneshiro T., Yamaguchi T., Usui C., Yasunaga K., Katsuragi Y., Kubota K., Tanaka S., Saito M. (2016) Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int. J. Obes.* **40**, 1655–1661.
- Hildebrand P., Petrig C., Burckhardt B., Ketterer S., Lengsfeld H., Fleury A., Hadváry P., Beglinger C. (1998) Hydrolysis of dietary fat by pancreatic lipase stimulates cholecystokinin release. *Gastroenterology* **114**, 123–129.
- Hira T., Elliott A. C., Thompson D. G., Case R. M., McLaughlin J. T. (2004) Multiple fatty acid sensing mechanisms operate in enteroendocrine cells: Novel evidence for direct mobilization of stored calcium by cytosolic fatty acid. *J. Biol. Chem.* **279**, 26082–26089.
- Hira T., Ogasawara S., Yahagi A., Kamachi M., Li J., Nishimura S., Sakaino M., Yamashita T., Kishino S., Ogawa J., Hara H. (2018) Novel mechanism of fatty acid sensing in enteroendocrine cells: Specific structures in oxo-fatty acids produced by gut bacteria are responsible for CCK secretion in STC-1 cells via GPR40. *Mol. Nutr. Food Res.* **62**, 1800146.
- Hira T., Sekishita M., Hara H. (2021) Blood sampling from rat ileal mesenteric vein revealed a major role of dietary protein in meal-induced GLP-1 response. *Front. Endocrinol.* **12**.
- Hira T., Yahagi A., Nishimura S., Sakaino M., Yamashita T., Hara H. (2015) Diunsaturated aldehyde, *trans,trans*-2,4-decadienal in the intestinal lumen suppresses gastric emptying through serotonin signaling in rats. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 8177–8181.
- Hirasawa A. (2015) Free fatty acid receptor family: A new therapeutic target for metabolic diseases. *Yakugaku Zasshi* **135**, 769–777.
- Hirasawa A., Tsumaya K., Awaji T., Katsuma S., Adachi T., Yamada M., Sugimoto Y., Miyazaki S.,

- Tsujimoto G. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* **11**, 90–94.
- Ho K. K. Y. (2018) Diet-induced thermogenesis: fake friend or foe? *J. Endocrinol.* **238**, R185–R191.
- Hunt J. N., Knox M. T. (1968) A relation between the chain length of fatty acids and the slowing of gastric emptying. *J. Physiol.* **194**, 327–336.
- Hwa J. J., Ghibaudi L., Williams P., Witten M. B., Tedesco R., Strader C. D. (1998) Differential effects of intracerebroventricular glucagon-like peptide-1 on feeding and energy expenditure regulation. *Peptides* **19**, 869–875.
- Igarashi A., Ogasawara S., Takagi R., Okada K., Ito Y. M., Hara H., Hira T. (2021) Acute oral calcium suppresses food intake through enhanced peptide-YY secretion mediated by the calcium-sensing receptor in rats. *J. Nutr.* **151**, 1320–1328.
- Irie A., Hira T. (2025) Oral administration of l-lysine potently promotes glucagon-like peptide-1 secretion and lowers glycemic response in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **89**, 1630–1639.
- Ishii S., Osaki N., Shimotoyodome A. (2016) The effects of a hypocaloric diet on diet-induced thermogenesis and blood hormone response in healthy male adults: A pilot study. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **62**, 40–46.
- Ishikawa T. (2008) [In-vivo analysis of skin microcirculation in rats and mice]. *Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacol. Jpn.* **132**, 79–82.
- Izzo A. A., Mascolo N., Capasso R., Germanò M. P., De Pasquale R., Capasso F. (1999) Inhibitory effect of cannabinoid agonists on gastric emptying in the rat. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **360**, 221–223.
- Johnston J. L., Balachandran A. V. (1987) Effects of dietary protein, energy and tyrosine on central and peripheral norepinephrine turnover in mice. *J. Nutr.* **117**, 2046–2053.
- Jonge L. de, Bray G. A. (1997) The thermic effect of food and obesity: A critical review. *Obes. Res.* **5**, 622–631.

- Kamakura R., Raza G. S., Prasannan A., Walkowiak J., Herzig K.-H. (2020) Dipeptidyl peptidase-4 and GLP-1 interplay in STC-1 and GLUTag cell lines. *Peptides* **134**, 170419.
- Karamanou M., Tsoucalas G., Androutsos G. (2013) Hallmarks in the study of respiratory physiology and the crucial role of Antoine-Laurent de Lavoisier (1743–1794). *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **305**, L591–L594.
- Karst H., Steiniger J., Noack R., Steglich H.-D. (1984) Diet-induced thermogenesis in man: Thermic effects of single proteins, carbohydrates and fats depending on their energy amount. *Ann. Nutr. Metab.* **28**, 245–252.
- Katsura K., Hira T. (2024) Amino acid transport dynamics in the jejunum and ileum in rats: a regional and time-course analysis. *Br. J. Nutr.* **132**, 1278–1288.
- Kawada T., Watanabe T., Takaishi T., Tanaka T., Iwai K. (1986) Capsaicin-induced β -adrenergic action on energy metabolism in rats: Influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **183**, 250–256.
- Kawashima H. (2019) Intake of arachidonic acid-containing lipids in adult humans: dietary surveys and clinical trials. *Lipids Health Dis.* **18**, 101.
- Keele C. A., Neil E. (1961) Samson wright's applied physiology. *Acad. Med.* **36**, 1754.
- Kim J., Lee K., Park S., Kang S., Huang J., Lee J., Sato K., Chung H., Okajima F., Im D. (2015) Omega-3 fatty acids induce Ca^{2+} mobilization responses in human colon epithelial cell lines endogenously expressing FFA4. *Acta Pharmacol. Sin.* **36**, 813–820.
- Kirkham T. C., Williams C. M., Fezza F., Marzo V. D. (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 550–557.
- Komatsu R., Matsuyama T., Namba M., Watanabe N., Itoh H., Kono N., Tarui S. (1989) Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7-36)-amide. *Diabetes* **38**, 902–905.
- Komprda T., Zelenka J., Fajmonová E., Fialová M., Kladroba D. (2005) Arachidonic acid and long-

- chain $n-3$ polyunsaturated fatty acid contents in meat of selected poultry and fish species in relation to dietary fat sources. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6804–6812.
- Kreymann B., Ghattai M. A., Williams G., Bloom S. R. (1987) Glucagon-like peptide-1 7-36: A physiological incretin in man. *The Lancet* **330**, 1300–1304.
- Krieger J.-P., Santos da Conceição E.P., Sanchez-Watts G., Arnold M., Pettersen K.G., Mohammed M., Modica S., Lossel P., Morrison S.F., Madden C.J., Watts A.G., Langhans W., Lee S.J. (2018) Glucagon-like peptide-1 regulates brown adipose tissue thermogenesis via the gut-brain axis in rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **315**, R708–R720.
- Krowicki Z. K., Moerschbaecher J. M., Winsauer P. J., Digavalli S. V., Hornby P. J. (1999) Δ^9 -Tetrahydrocannabinol inhibits gastric motility in the rat through cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **371**, 187–196.
- Landi M., Croci T., Rinaldi-Carmona M., Maffrand J.-P., Le Fur G., Manara L. (2002) Modulation of gastric emptying and gastrointestinal transit in rats through intestinal cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **450**, 77–83.
- Lauffer L. M., Iakoubov R., Brubaker P. L. (2009) GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* **58**, 1058–1066.
- Ledeboer M., Masclee A. a. M., Biemond I., Lamers C. B. H. W. (1999) Differences in cholecystokinin release and gallbladder contraction between emulsified and nonemulsified long-chain triglycerides. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **23**, 203–206.
- Lema I., Araújo J. R., Rolhion N., Demignot S. (2020) Jejunum: The understudied meeting place of dietary lipids and the microbiota. *Biochimie* **178**, 124–136.
- Li D., Ng A., Mann N. J., Sinclair A. J. (1998) Contribution of meat fat to dietary arachidonic acid. *Lipids* **33**, 437–440.
- Li Y., Schnabl K., Gabler S.-M., Willershäuser M., Reber J., Karlas A., Laurila S., Lahesmaa M., Din M.U., Bast-Habersbrunner A., Virtanen K.A., Fromme T., Bolze F., O'Farrell L.S., Alsina-

- Fernandez J., Coskun T., Ntziachristos V., Nuutila P., Klingenspor M. (2018) Secretin-activated brown fat mediates prandial thermogenesis to induce satiation. *Cell* **175**, 1561-1574.e12.
- Liddle R. A. (1997) Cholecystokinin cells. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 221–242.
- Liddle R. A., Morita E. T., Conrad C. K., Williams J. A. (1986) Regulation of gastric emptying in humans by cholecystokinin. *J. Clin. Invest.* **77**, 992–996.
- Lin L., Lee J. H., Bongmba O. Y. N., Ma X., Zhu X., Sheikh-Hamad D., Sun Y. (2014) The suppression of ghrelin signaling mitigates age-associated thermogenic impairment. *Aging* **6**, 1019–1032.
- Liou A. P., Lu X., Sei Y., Zhao X., Pechhold S., Carrero R. J., Raybould H. E., Wank S. (2011) The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology* **140**, 903-912.e4.
- Little T. J., Russo A., Meyer J. H., Horowitz M., Smyth D. R., Bellon M., Wishart J. M., Jones K. L., Feinle-Bisset C. (2007) Free fatty acids have more potent effects on gastric emptying, gut hormones, and appetite than triacylglycerides. *Gastroenterology* **133**, 1124–1131.
- Lockie S. H., Heppner K.M., Chaudhary N., Chabenne J.R., Morgan D.A., Veyrat-Durebex C., Ananthakrishnan G., Rohner-Jeanrenaud F., Drucker D.J., DiMarchi R., Rahmouni K., Oldfield B.J., Tschöp M.H., Perez-Tilve D. (2012) Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes* **61**, 2753–2762.
- Lusk G. (1931) The specific dynamic action. *J. Nutr.* **3**, 519–530.
- Luttikhoud J., Ruijter F. M. de, Norren K. van, Diamant M., Witkamp R. F., Leeuwen P. A. M. van, Vermeulen M. A. R. (2013) Review article: the role of gastrointestinal hormones in the treatment of delayed gastric emptying in critically ill patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **38**, 573–583.
- Madsen A. N., Jelsing J., Wall E. H. E. M. van de, Vrang N., Larsen P. J., Schwartz G. J. (2009)

- Rimonabant induced anorexia in rodents is not mediated by vagal or sympathetic gut afferents. *Neurosci. Lett.* **449**, 20–23.
- Magnus-Levy A. (1942) Basal metabolism in the same person after an interval of fifty years. *J. Am. Med. Assoc.* **118**, 1369.
- Mahase E. (2024) GLP-1 agonists: US sees 700% increase over four years in number of patients without diabetes starting treatment. *BMJ* **386**, q1645.
- Maida A., Lovshin J. A., Baggio L. L., Drucker D. J. (2008) The glucagon-like peptide-1 receptor agonist oxyntomodulin enhances β -cell function but does not inhibit gastric emptying in mice. *Endocrinology* **149**, 5670–5678.
- Marzo V. D., Capasso R., Matias I., Aviello G., Petrosino S., Borrelli F., Romano B., Orlando P., Capasso F., Izzo A. A. (2008) The role of endocannabinoids in the regulation of gastric emptying: alterations in mice fed a high-fat diet. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 1272–1280.
- Mattson F. H., Volpenhein R. A. (1961) The specific distribution of fatty acids in the glycerides of vegetable fats. *J. Biol. Chem.* **236**, 1891–1894.
- McLaughlin J., Lucà M. G., Jones M. N., D'Amato M., Dockray G. J., Thompson D. G. (1999) Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility. *Gastroenterology* **116**, 46–53.
- McLaughlin J. T., Lomax R. B., Hall L., Dockray G. J., Thompson D. G., Warhurst G. (1998) Fatty acids stimulate cholecystokinin secretion via an acyl chain length-specific, Ca^{2+} -dependent mechanism in the enteroendocrine cell line STC-1. *J. Physiol.* **513**, 11–18.
- Milgen J. van (2002) Modeling biochemical aspects of energy metabolism in mammals. *J. Nutr.* **132**, 3195–3202.
- Milligan G., Shimpukade B., Ulven T., Hudson B. D. (2017) Complex pharmacology of free fatty acid receptors. *Chem. Rev.* **117**, 67–110.
- Miyasaka K., Funakoshi A. (2003) Cholecystokinin and cholecystokinin receptors. *J. Gastroenterol.* **38**, 1–13.

- Mizuma S., Hayakawa M., Hira T. (2025) Intestinal distension induced by luminal D-allulose promotes GLP-1 secretion in male rats. *Endocrinology* **166**, bqaf002.
- Mobraten K., Haug T. M., Kleiveland C. R., Lea T. (2013) Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells. *Lipids Health Dis.* **12**, 101.
- Modvig I. M., Kuhre R. E., Jepsen S. L., Xu S. F. S., Engelstoft M. S., Egerod K. L., Schwartz T. W., Ørskov C., Rosenkilde M. M., Holst J. J. (2021) Amino acids differ in their capacity to stimulate GLP-1 release from the perfused rat small intestine and stimulate secretion by different sensing mechanisms. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **320**, E874–E885.
- Mu H., Høy C.-E. (2004) The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.* **43**, 105–133.
- Muccioli G. G. (2010) Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov. Today* **15**, 474–483.
- Munch I. C., Markussen N. H., Øritsland N. A. (1993) Resting oxygen consumption in rats during food restriction, starvation and refeeding. *Acta Physiol. Scand.* **148**, 335–340.
- Muramatsu M., Hira T., Mitsunaga A., Sato E., Nakajima S., Kitahara Y., Eto Y., Hara H. (2014) Activation of the gut calcium-sensing receptor by peptide agonists reduces rapid elevation of plasma glucose in response to oral glucose load in rats. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **306**, G1099–G1107.
- Murphy K. G., Bloom S. R. (2006) Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* **444**, 854–859.
- Nakajima S., Hira T., Yahagi A., Nishiyama C., Yamashita T., Imagi J., Hara H. (2014) Unsaturated aldehydes induce CCK secretion via TRPA1 in STC-1 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **58**, 1042–1051.
- Nakane S., Oka S., Arai S., Waku K., Ishima Y., Tokumura A., Sugiura T. (2002) 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid-containing lysophosphatidic acid: occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor

- ligand, in rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.* **402**, 51–58.
- Nauck M. A., Niedereichholz U., Ettler R., Holst J. J., Ørskov C., Ritzel R., Schmiegeler W. H. (1997) Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **273**, E981–E988.
- Nelson D. W., Gao Y., Yen M.-I., Yen C.-L. E. (2014) Intestine-specific deletion of acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) 2 protects mice from diet-induced obesity and glucose intolerance. *J. Biol. Chem.* **289**, 17338–17349.
- Némoz-Gaillard E., Bernard C., Abello J., Cordier-Bussat M., Chayvialle J.-A., Cuber J.-C. (1998) Regulation of cholecystokinin secretion by peptones and peptidomimetic antibiotics in STC-1 cells. *Endocrinology* **139**, 932–938.
- Nishimukai M., Hara H., Aoyama Y. (2003) The addition of soybean phosphatidylcholine to triglyceride increases suppressive effects on food intake and gastric emptying in rats. *J. Nutr.* **133**, 1255–1258.
- Nishinari K., Fang Y., Guo S., Phillips G. O. (2014) Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocoll.* **39**, 301–318.
- Nonaka H., Ohue-Kitano R., Masujima Y., Igarashi M., Kimura I. (2022) Dietary medium-chain triglyceride decanoate affects glucose homeostasis through GPR84-mediated GLP-1 secretion in mice. *Front. Nutr.* **9**.
- O'Dwyer S. T., Smith R. J., Hwang T. L., Wilmore D. W. (1989) Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **13**, 579–585.
- Oelkrug R., Mittag J. (2021) An improved method for the precise unravelment of non-shivering brown fat thermokinetics. *Sci. Rep.* **11**, 4799.
- Okamatsu-Ogura Y., Kitao N., Kimura K., Saito M. (2007a) Brown fat UCP1 is not involved in the febrile and thermogenic responses to IL-1 β in mice. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **292**, E1135–E1139.
- Okamatsu-Ogura Y., Uozumi A., Kitao N., Kimura K., Saito M. (2007b) Day–night difference in β 3-

- adrenoceptor agonist-induced energy expenditure: Contribution of brown fat thermogenesis and physical activity. *Obes. Res. Clin. Pract.* **1**, 61–67.
- Okuma C., Ohta T., Ito M., Tadaki H., Oda T., Kume S., Nishiu J., Kakutani M. (2016) Intrajejunal infusion of 2-monoacylglycerol reduced food intake without inducing diarrhea in rats. *J. Pharmacol. Sci.* **130**, 136–138.
- Okuma C., Ohta T., Tadaki H., Hamada H., Oda T., Taniuchi H., Yamanaka K., Ishii Y., Ohe Y., Yata S., Nishiu J., Aratsu Y., Oshida S., Kume S., Kakutani M. (2015) JTP-103237, a novel monoacylglycerol acyltransferase inhibitor, modulates fat absorption and prevents diet-induced obesity. *Eur. J. Pharmacol.* **758**, 72–81.
- Orio L., Crespo I., López-Moreno J. A., Reyes-Cabello C., Rodríguez de Fonseca F., Gómez de Heras R. (2011) Additive effects of cannabinoid CB1 receptors blockade and cholecystokinin on feeding inhibition. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **98**, 220–226.
- Osaka T., Endo M., Yamakawa M., Inoue S. (2005) Energy expenditure by intravenous administration of glucagon-like peptide-1 mediated by the lower brainstem and sympathoadrenal system. *Peptides* **26**, 1623–1631.
- Osei-Hyiaman D., Harvey-White J., Bátkai S., Kunos G. (2006) The role of the endocannabinoid system in the control of energy homeostasis. *Int. J. Obes.* **30**, S33–S38.
- Pacher P., Bátkai S., Kunos G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **58**, 389–462.
- Perry R. J., Lyu K., Rabin-Court A., Dong J., Li X., Yang Y., Qing H., Wang A., Yang X., Shulman G. I. (2020) Leptin mediates postprandial increases in body temperature through hypothalamus–adrenal medulla–adipose tissue crosstalk. *J. Clin. Invest.* **130**, 2001–2016.
- Pertwee R. G. (2001) Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* **48**, 859–867.
- Phillips L. K., Deane A. M., Jones K. L., Rayner C. K., Horowitz M. (2015) Gastric emptying and glycaemia in health and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 112–128.
- Pitkanen O. (1992) Reduced thermogenic response to branched-chain amino acid infusion in

- healthy volunteers. *Clin. Nutr.* **11**, 52–53.
- Pittet P., Gygax P. H., Jéquier E. (1974) Thermic effect of glucose and amino acids in man studied by direct and indirect calorimetry. *Br. J. Nutr.* **31**, 343–349.
- Potter J. F., Heseltine D., Hartley G., Matthews J., Macdonald I. A., James O. F. W. (1989) Effects of meal composition on the postprandial blood pressure, catecholamine and insulin changes in elderly subjects. *Clin. Sci.* **77**, 265–272.
- Rand R. P., Burton A. C., Ing T. (1965) The tail of the rat, in temperature regulation and acclimatization. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **43**, 257–267.
- Reeves P. G. (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.* **127**, 838S–841S.
- Rehfeld J. F. (2000) Cholecystokinin and panic disorder — three unsettled questions. *Regul. Pept.* **93**, 79–83.
- Reimann F., Tolhurst G., Gribble F. M. (2012) G-protein-coupled receptors in intestinal chemosensation. *Cell Metab.* **15**, 421–431.
- Rindi G., Grant S. G., Yiangou Y., Ghatei M. A., Bloom S. R., Bautch V. L., Solcia E., Polak J. M. (1990) Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am. J. Pathol.* **136**, 1349–1363.
- Saio K., Kamiya M., Watanabe T. (1969) Food processing characteristics of soybean 11S and 7S proteins. *Agric. Biol. Chem.* **33**, 1301–1308.
- Saito M., Matsushita M., Yoneshiro T., Okamatsu-Ogura Y. (2020) Brown adipose tissue, diet-induced thermogenesis, and thermogenic food ingredients: From mice to men. *Front. Endocrinol.* **11**, 222.
- Sakaue M., Sujinaka T., Kido Y., Hayashida Y., Yano M., Homma T., Iijima S., Kan K., Ebisui T., Mori T. (1994) Nutrient-induced thermogenesis (NIT) following amino acid infusion. *Clin. Nutr.* **13**, 116–122.
- Sarson D. L., Bryant M. G., Bloom S. R. (1980) A radioimmunoassay of gastric inhibitory

- polypeptide in human plasma. *J. Endocrinol.* **85**, 487–496.
- Scott C. B., Devore R. (2005) Diet-induced thermogenesis: variations among three isocaloric meal-replacement shakes. *Nutrition* **21**, 874–877.
- Scrocchi L. A., Brown T. J., Maclusky N., Brubaker P. L., Auerbach A. B., Joyner A. L., Drucker D. J. (1996) Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat. Med.* **2**, 1254–1258.
- Shalev A., Holst J. J., Keller U. (1997) Effects of glucagon-like peptide 1 (7–36 amide) on whole-body protein metabolism in healthy man. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**, 10–16.
- Sharkey K. A., Pittman Q. J. (2005) Central and peripheral signaling mechanisms involved in endocannabinoid regulation of feeding: A perspective on the munchies. *Sci. STKE* **2005**, pe15–pe15.
- Shimizu Y., Hara H., Hira T. (2021) Glucagon-like peptide-1 response to whey protein is less diminished by dipeptidyl peptidase-4 in comparison with responses to dextrin, a lipid and casein in rats. *Br. J. Nutr.* **125**, 398–407.
- Sidhu S. S., Thompson D. G., Warhurst G., Case R. M., Benson R. S. P. (2000) Fatty acid-induced cholecystokinin secretion and changes in intracellular Ca^{2+} in two enteroendocrine cell lines, STC-1 and GLUtag. *J. Physiol.* **528**, 165–176.
- Singh H., Ye A., Horne D. (2009) Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog. Lipid Res.* **48**, 92–100.
- Sugiura T., Kodaka T., Kondo S., Nakane S., Kondo H., Waku K., Ishima Y., Watanabe K., Yamamoto I. (1997) Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca^{2+} transient in NG108–15 cells¹. *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 890–895.
- Sugiura T., Kodaka T., Kondo S., Tonegawa T., Nakane S., Kishimoto S., Yamashita A., Waku K. (1996) 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca^{2+} in neuroblastoma × glioma hybrid

- NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 58–64.
- Sugiura T., Kodaka T., Nakane S., Miyashita T., Kondo S., Suhara Y., Takayama H., Waku K., Seki C., Baba N., Ishima Y. (1999) Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor: Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J. Biol. Chem.* **274**, 2794–2801.
- Sykaras A. G., Demenis C., Case R. M., McLaughlin J. T., Smith C. P. (2012) Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors. *PLoS ONE* **7**, e42373.
- Taber L., Chiu C.-H., Whelan J. (1998) Assessment of the arachidonic acid content in foods commonly consumed in the American diet. *Lipids* **33**, 1151–1157.
- Tallima H., El Ridi R. (2018) Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *J. Adv. Res.* **11**, 33–41.
- Tanaka T., Katsuma S., Adachi T., Koshimizu T., Hirasawa A., Tsujimoto G. (2008) Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **377**, 523–527.
- Tappy L. (1996) Thermic effect of food and sympathetic nervous system activity in humans. *Reprod. Nutr. Dev.* **36**, 391–397.
- Tseng C.-C., Zhang X.-Y., Wolfe M. M. (1999) Effect of GIP and GLP-1 antagonists on insulin release in the rat. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **276**, E1049–E1054.
- Tsujinaka T., Sakaue M., Iijima S., Ebisui C., Kan K., Kishibuchi M., Morimoto T., Kido Y. (1996) Modulation of thermogenic response to parenteral amino acid infusion in surgical stress. *Nutrition* **12**, 36–39.
- Ueda H., Kobayashi T., Kishimoto M., Tsutsumi T., Okuyama H. (1993) A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. *J. Neurochem.* **61**, 1874–1881.
- Ueda N., Tsuboi K., Uyama T., Ohnishi T. (2011) Biosynthesis and degradation of the

- endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *BioFactors* **37**, 1–7.
- Ulven T., Christiansen E. (2015) Dietary fatty acids and their potential for controlling metabolic diseases through activation of FFA4/GPR120. *Annu. Rev. Nutr.* **35**, 239–263.
- Vander Tuig J. G., Romsos D. R. (1984) Effects of dietary carbohydrate, fat, and protein on norepinephrine turnover in rats. *Metabolism* **33**, 26–33.
- Veldhorst M. A. B., Westerterp-Plantenga M. S., Westerterp K. R. (2009) Gluconeogenesis and energy expenditure after a high-protein, carbohydrate-free diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **90**, 519–526.
- Villegas-Comonfort S., Takei Y., Tsujimoto G., Hirasawa A., García-Sáinz J. A. (2017) Effects of arachidonic acid on FFA4 receptor: Signaling, phosphorylation and internalization. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **117**, 1–10.
- Vinne V. van der, Potheary C.A., Wilcox S.L., McKillop L.E., Benson L.A., Kolpakova J., Tam S.K.E., Krone L.B., Fisk A.S., Wilson T.S., Yamagata T., Cantley J., Vyazovskiy V.V., Peirson S.N. (2020) Continuous and non-invasive thermography of mouse skin accurately describes core body temperature patterns, but not absolute core temperature. *Sci. Rep.* **10**, 20680.
- Wang C. C., Strouse S. (1924) Studies on the metabolism of obesity: III. The specific dynamic action of food. *Arch. Intern. Med.* **34**, 573–583.
- Wang T. Y., Liu M., Portincasa P., Wang D. Q.-H. (2013) New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 1203–1223.
- Wang X., Ma B., Chen J., You H., Sheng C., Yang P., Qu S. (2021) Glucagon-like peptide-1 improves fatty liver and enhances thermogenesis in brown adipose tissue via inhibiting BMP4-related signaling pathway in high-fat-diet-induced obese mice. *Int. J. Endocrinol.* **2021**, e6620289.
- Westerterp K. R. (2004) Diet induced thermogenesis. *Nutr. Metab.* **1**, 5.
- Westphal S., Kästner S., Taneva E., Leodolter A., Dierkes J., Luley C. (2004) Postprandial lipid and

- carbohydrate responses after the ingestion of a casein-enriched mixed meal. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 284–290.
- Williams D. L., Baskin D. G., Schwartz M. W. (2009) Evidence that intestinal glucagon-like peptide-1 plays a physiological role in satiety. *Endocrinology* **150**, 1680–1687.
- Williams D. L., Hyvarinen N., Lilly N., Kay K., Dossat A., Parise E., Torregrossa A.-M. (2011) Maintenance on a high-fat diet impairs the anorexic response to glucagon-like-peptide-1 receptor activation. *Physiol. Behav.* **103**, 557–564.
- Yamaoka I., Doi M., Nakayama M., Ozeki A., Mochizuki S., Sugahara K., Yoshizawa F. (2006) Intravenous administration of amino acids during anesthesia stimulates muscle protein synthesis and heat accumulation in the body. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **290**, E882–E888.
- Yamazaki T., Morimoto-Kobayashi Y., Koizumi K., Takahashi C., Nakajima S., Kitao S., Taniguchi Y., Katayama M., Ogawa Y. (2019) Secretion of a gastrointestinal hormone, cholecystokinin, by hop-derived bitter components activates sympathetic nerves in brown adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.* **64**, 80–87.
- Zhang X., Grosfeld A., Williams E., Vasiliauskas D., Barretto S., Smith L., Mariadassou M., Philippe C., Devime F., Melchior C., Gourcerol G., Dourmap N., Lapaque N., Larraufie P., Blotti  re H.M., Herberden C., Gerard P., Rehfeld J.F., Ferraris R.P., Fritton J.C., Ellero-Simatos S., Douard V. (2019) Fructose malabsorption induces cholecystokinin expression in the ileum and cecum by changing microbiota composition and metabolism. *FASEB J.* **33**, 7126–7142.
- Zheng Z., Zong Y., Ma Y., Tian Y., Pang Y., Zhang C., Gao J. (2024) Glucagon-like peptide-1 receptor: mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **9**, 234.
- 川端 輝江 (2014)、『しっかり学べる！栄養学』、ナツメ社
- 永井成美「糖質摂取と食事後体熱産生—適正エネルギー比率の糖質摂取と若年者の健康—」応用糖質科学 第5巻 第4号 (2015), 216-222.

発表論文

Ochiai K., Hirooka R., Sakaino M., Takeuchi S., Hira T. (2021) 2-Arachidonoyl glycerol potently induces cholecystokinin secretion in murine enteroendocrine STC-1 cells via cannabinoid receptor CB1. *Lipids* 56, 603–611.

Ochiai K., Hirooka R., Sakaino M., Takeuchi S., Hira T. (2022) 2-Arachidonoyl glycerol suppresses gastric emptying via the cannabinoid receptor 1-cholecystokinin signaling pathway in mice. *Lipids* 57, 173–181.

Ochiai K., Muto A., Seok B. S., Doi Y., Iwasaki Y., Okamatsu-Ogura Y., Drucker D. J., Hira T. (2023) Glucagon-like peptide-1 is involved in the thermic effects of dietary proteins in male rodents. *Endocrinology* 164, bqad068.

謝辞

本論文は数多くの方々のご協力を賜り、作成されたものであります。研究室配属後から細部にわたるご指導とご助言、さらに本論文の主査としてご校閲を賜りました北海道大学大学院農学研究院基盤研究部門生物機能化学分野食品栄養学研究室の比良徹准教授に心より感謝申し上げます。また、ご多忙にもかかわらず、副査のご快諾とご校閲を賜りました食品栄養学研究室の石塚敏教授、食品機能化学研究室の加藤英介准教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、京都府立大学大学院生命環境科学研究科動物機能学研究室の岩崎有作教授、武藤明日香さんには、食品タンパク質摂取時のマウス直腸温変動を評価いただき、研究結果の解釈に際し、多くのご助言、ご指導をいただきました。また、北海道大学大学院獣医学研究院基礎獣医科学講座生化学教室の岡松優子教授、**Bong Soo Seok** さんには、ラットのエネルギー消費を測定する評価系の立ち上げや実験データの解析、研究結果の解釈に際し、多くのご協力、ご助言、ご指導をいただきました。厚く感謝申し上げます。加えて、食品栄養学研究室の先輩、同期、後輩、事務員の皆様にも筆舌に尽くしがたいほどのご支援をいただきました。全ての皆様に心より御礼申し上げます。また、数多くの犠牲となりましたラット、マウスに深く感謝するとともに、心よりご冥福をお祈り申し上げます。最後に、長きにわたって経済的、精神的支援をしてくださいました両親と、そばで支えてくれた妻に心より感謝申し上げます。

2026 年 4 月

落合 啓太