HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	トウモロコシタンパク質由来 GLP-1 分泌誘導成分の同定および有効性に関する研究
Author(s)	野口, 洋樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15752号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15752
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/97125
Type	doctoral thesis
File Information	NOGUCHI_Hiroki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

表紙

トウモロコシタンパク質由来 GLP-1 分泌誘導成分の同定および有効性に関する研究

2022 年 9 月 2 日　初版
2023 年 9 月 18 日　第 2 版
2023 年 10 月 20 日　第 3 版

応用生物科学専攻　博士後期課程
野口　洋樹

略号一覧

略号：	用語：
ALB	Albumin
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
ATCC	American type culture collection
BMI	Body mass index
BS	Blood sugar
BSA	Bovine serum albumin
BUN	Blood urea nitrogen
CaSR	Calcium-sensing receptor
C_{max}	Maximum concentration
CREA	Creatinine
DMEM	Dulbecco’s modified Eagle’s medium
DPP-4	Dipeptidyl peptidase 4
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
FAS	Full analysis set
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and drug administration
FFA	Free fatty acid
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GIP	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GRAS	Generally recognized as safe
γ-GTP	Gamma-glutamyl transpeptidase
Hb	Hemoglobin
HbA1c	Hemoglobin A1c
HBs	Hepatitis B surface
HCV	Hepatitis C virus
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	Human immunodeficiency virus
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
Ht	Hematocrit

iAUC	Incremental area under curve
IGT	Impaired glucose tolerance
Ins	Insulin
IPGTT	Intraperitoneal glucose tolerance test
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LDH	Lactate dehydrogenase
LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol
MA	Malic acid
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
MTT	Meal tolerance test
OGTT	Oral glucose tolerance test
PEPT1	peptide transporter 1
Phe	Phenylalanine
Plt	Platelet count
PPS	Per protocol set
pH	Potential hydrogen
RBC	Red blood cell
SAS	Safety analysis set
SPE	Solid phase extraction
TBI	Total bilirubin
T-Cho	Total cholesterol
TG	Triglyceride
TP	Total protein
TPMPA	(1,2,5,6-tetrahydropyridine-4-yl)methylphosphinic acid
UA	Uric acid
WBC	White blood cell

目次

表紙 1
略号一覧 2
目次 4
要旨 8
1. 序論 11
1.1. 背景 11
1.2. Glucagon-like peptide-1（GLP-1） 11
1.3. トウモロコシタンパク質加水分解物（ZeinH） 12
1.4. トウモロコシタンパク質水抽出物（ZeinS） 12
1.5. 本研究の目的 13
2. トウモロコシタンパク質加水分解物（ZeinH）由来の GLP-1 分泌誘導ペプチドの探索（*in vitro*） 14
2.1. 緒言 14
2.2. 材料と方法 14
2.2.1. 試薬類 14
2.2.2. 細胞 14
2.2.3. GLP-1 分泌試験 15
2.2.4. ペプチド類の同定 15
2.2.5. 被験物 16
2.2.5.1. ZeinH 16
2.2.5.2. ZeinH プロナーゼ消化物 16
2.2.5.3. 合成ペプチド 16
2.2.6. 統計解析 16
2.3. 結果 17
2.4. 図表 17
2.5. 考察 19
2.6. 小括 21
3. トウモロコシタンパク質水抽出物（ZeinS）の GLP-1 分泌誘導作用の検討（*in vitro*・*in vivo*） 22
3.1. 緒言 22
3.2. 材料と方法 22
3.2.1. 試薬類 22
3.2.2. 細胞 22
3.2.3. GLP-1 分泌試験 22
3.2.4. 被験物 23

3.2.4.1. ZeinH 23
3.2.4.2. ZeinS 23
3.2.5. 動物試験 23
3.2.6. 統計解析 24
3.3. 結果 24
3.4. 図表 25
3.5. 考察 28
3.6. 小括 29
4. ZeinS の活性成分の特定（*in vitro*） 30
4.1. 緒言 30
4.2. 材料と方法 30
4.2.1. 試薬類 30
4.2.2. 細胞 30
4.2.3. GLP-1 分泌試験 30
4.2.4. 被験物 31
4.2.4.1. ZeinS 31
4.2.4.2. ZeinS の SPE 分画物：（F1–5） 31
4.2.4.3. ZeinS および ZeinS-SPE 分画物（F1）の HPLC 精製物：（ZeinS-a–r、および F1-a–r） 31
4.2.5. 質量分析による ZeinS の主要活性画分中の活性化合物の同定 31
4.2.6. 統計解析 32
4.3. 結果 33
4.4. 図表 33
4.5. 考察 40
4.6. 小括 41
5. ZeinS および活性成分の GLP-1 分泌促進機構の検討（*in vitro*） 42
5.1. 緒言 42
5.2. 材料と方法 42
5.2.1. 試薬類 42
5.2.2. 細胞 43
5.2.3. GLP-1 分泌試験 43
5.2.4. 被験物 44
5.2.4.1. ZeinS 44
5.2.4.2. ZeinS の SPE 分画物：（F1, 4） 44
5.2.5. 細胞外 Ca^{2+}除去試験 44
5.2.6. 阻害剤試験 44

5.2.7. 統計解析 44
5.3. 結果 44
5.4. 図表 45
5.5. 考察 48
5.6. 小括 49
6. ZeinS 由来活性成分の追加探索（*in vitro*） 50
6.1. 緒言 50
6.2. 材料と方法 50
6.2.1. 試薬類 50
6.2.2. リンゴ酸定量分析 50
6.2.3. 細胞 51
6.2.4. GLP-1 分泌試験 51
6.2.5. 被験物 51
6.2.5.1. ZeinS 51
6.2.6. 統計解析 51
6.3. 結果 51
6.4. 図表 52
6.5. 考察 53
6.6. 小括 54
7. GABA とリンゴ酸の単回同時摂取が健康成人の GLP-1 分泌誘導および食後血糖応答に及ぼす影響の検討－無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験－ 55
7.1. 緒言 55
7.2. 研究方法 56
7.2.1. 被験者 56
7.2.2. 研究方法の概要および期間 56
7.2.3. 介入の概要 57
7.2.4. 研究スケジュール 58
7.2.5. 研究手順 59
7.2.6. 盲検化 61
7.2.7. 制限事項 62
7.2.7.1. 日常生活における制限事項 62
7.2.7.2. 規定食および飲水に関する要件 62
7.2.8. 評価項目 62
7.2.8.1. 有効性の評価 62
7.2.8.2. 安全性の評価 62
7.2.9. 解析対象集団 63

7.2.10. 解析方法.....63
7.2.10.1. 有効性の解析.....63
7.2.10.2. 安全性の解析.....64
7.3. 結果.....64
7.3.1. 被験者.....64
7.3.1.1. 被験者の内訳.....64
7.3.1.2. 逸脱.....64
7.3.1.3. 盲検性が破られた被験者.....65
7.3.2. 有効性の評価.....65
7.3.2.1. 解析したデータセット.....65
7.3.2.2. 被験者背景.....65
7.3.2.3. 試験食品摂取の遵守状況.....65
7.3.2.4. 有効性の解析.....65
7.3.2.5. 有効性の結果の要約.....67
7.3.3. 安全性の評価.....67
7.3.3.1. 試験食品を摂取した被験者数、期間および摂取量.....67
7.3.3.2. 安全性の結果の要約.....67
7.4. 図表.....68
7.5. 考察.....74
7.6. 小括.....76
8. 総括.....77
9. 謝辞.....81
10. 参考文献.....82

要旨

トウモロコシタンパク質由来 GLP-1 分泌誘導成分の同定および有効性に関する研究

現代では、健康寿命の向上を目指し、食環境や運動などの日常生活行動を中心に据え、疾病の予防や健康維持・増進に重点が置かれるようになってきた。食環境については、特定保健用食品や機能性表示食品など、食品の機能性に焦点を当てた製品が制度化されており、新規有効性成分の探索と製品開発の重要性が高まっている。

GLP-1 は、食後の糖代謝調節に深く関与する消化管ホルモンの一種で、インスリンの分泌促進作用に加えて、膵外作用として食欲の調節、抗炎症、血管機能の改善などに寄与することが示されている。GLP-1 受容体作動薬などのインクレチン薬の使用は、糖尿病や肥満関連疾患の予防と治療に注目されているが、副作用のリスクがあるとともに糖尿病や肥満の予備軍への適用性においては制約もある。そのため、生体内の GLP-1 利用能を高めるための栄養ベースのアプローチが代替または補完的な解決策として考えられている。実験動物を用いた先行研究において、トウモロコシ由来のタンパク質（Zein）から調製した加水分解物（ZeinH）が GLP-1 分泌を促進し、その後のインスリン分泌を促進することで糖尿病の重要な指標の一つである食後高血糖を抑制することが明らかにされた。本研究では、その有効成分を同定し、さらに、臨床試験においてその有効性を検証した。

トウモロコシタンパク質加水分解物（ZeinH）由来の GLP-1 分泌誘導ペプチドの探索（*in vitro*）

【背景・目的】　ZeinH は多数のペプチド断片を含む複雑な混合物であり、その作用本体は特定されていない。当試験では、ZeinH の活性ペプチドを特定することを目的とした。

【方法】　ZeinH のプロナーゼ処理前後での質量分析とペプチド同定を行い、処理前後で重複するペプチド群を選抜した。ZeinH および合成した候補ペプチドの GLP-1 分泌活性は、マウス腸管由来内分泌細胞株（GLUTag）を用いて評価した。

【結果と考察】　ZeinH 中に含まれる関与成分として、12 種類のペプチド候補を同定したが、合成したペプチドの GLP-1 分泌活性はいずれも確認できなかった。今回の試験条件下では、ZeinH の GLP-1 分泌誘導活性において寄与度の高いペプチドを特定することができなかった。

トウモロコシタンパク質水抽出物（ZeinS）の GLP-1 分泌誘導作用の検討（*in vitro*・*in vivo*）

【背景・目的】　ZeinH の活性画分は、その調製方法に基づいて、Zein の水抽出物（ZeinS）

の活性画分と一部共通であると仮定できる。当試験では、ZeinS の GLP-1 分泌活性を *in vitro* 試験および *in vivo* 試験で評価することを目的とした。

【方法】　GLP-1 分泌活性は同様の細胞試験とラットを用いた動物試験で評価した。

【結果と考察】　ZeinS による GLP-1 分泌誘導活性および血糖上昇抑制効果を確認した。これにより、ZeinS が ZeinH の活性画分として寄与する可能性が示された。

ZeinS の活性成分の特定

（*in vitro*）

【背景・目的】　当試験では、ZeinS の活性成分を特定することを目的とした。

【方法】　GLP-1 分泌活性は同様の細胞試験で評価した。ZeinS を固相抽出と HPLC により分画し、それらの活性評価および LC-MS/MS 分析による活性成分の同定を試みた。

【結果と考察】 GLP-1 分泌活性を示す画分を固相抽出および HPLC 分画により特定した。その後、LC-MS/MS 分析の結果に基づき、ZeinS の活性画分中の代表的なアミノ酸を同定した。特に、γ-アミノ酪酸（GABA）は単独およびフェニルアラニン（Phe）との相乗的効果による有意な GLP-1 分泌活性を示した。ZeinS の活性成分として、GABA と Phe を単独および相乗活性を示す化合物として特定した。

ZeinS および活性成分の GLP-1 分泌促進機構の検討

（*in vitro*）

【背景・目的】　当試験では、ZeinS について GLP-1 分泌誘導活性の作用メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】　GLP-1 分泌活性は同様の細胞試験で評価した。作用メカニズムを検討するため、候補受容体の阻害剤の併用下で ZeinS および同定した成分による GLP-1 分泌試験を実施した。

【結果と考察】　ZeinS および GABA と Phe の併用による GLP-1 分泌は、$GABA_A$ 受容体およびカルシウム感知受容体の阻害剤により抑制された。これらの結果から、ZeinS の GLP-1 分泌活性には、GABA と Phe の両方が関与していること、ならびに、それらの作用は $GABA_A$ 受容体およびカルシウム感知受容体を介することが明らかとなった。

ZeinS 由来活性成分の追加探索

（*in vitro*）

【背景・目的】　被験食品の安全性の観点から、GABA については適切な摂取量に関する安全性情報が十分得られたが、Phe については不十分であった。当試験では、GABA との組み

合わせで相乗的な GLP-1 分泌誘導活性を示す Phe に替わる化合物としてリンゴ酸（MA）の有効性を確認することを目的とした。
【方法】　ZeinS に含まれる MA を定量分析した。GLP-1 分泌活性はマウス腸管由来内分泌細胞株（STC-1）を用いて評価した。
【結果と考察】　MA が ZeinS に含まれること、および、GABA と MA の組み合わせによる相乗的な GLP-1 分泌活性を確認した。これにより、Phe に代わる化合物として MA を見出した。

GABA とリンゴ酸の単回同時摂取が健康成人の
GLP-1 分泌誘導および食後血糖応答に及ぼす影響

【背景と目的】　当試験では、GABA と MA の単回同時摂取が健康成人における GLP-1 分泌誘導および食後血糖応答に及ぼす影響を評価することを目的とした。
【方法】　健康成人を対象に無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験を実施した。被験者は、食事負荷前に GABA と MA あるいはプラセボを単回摂取した。食事負荷後 180 分間採血を行い、血中 GLP-1（総・活性型）、グルコース、インスリン濃度を測定した。
【結果と考察】　GABA と MA の摂取により食後の血中 GLP-1（総・活性型）濃度および曲線下面積（0-180 分）が有意に増加した。一方、血中グルコースとインスリン濃度については、GABA と MA の摂取による顕著な変動は認められなかった。
食事負荷前の GABA と MA の同時摂取は食後 GLP-1 分泌を増大させることから、内因性の GLP-1 利用能の亢進を介して糖尿病などの慢性疾患、肥満関連疾患、血管障害の予防や改善に役立つ可能性がある。

【結論】　本研究により、ZeinH の有効性に寄与する関与成分として GABA、Phe、および MA を特定した。さらに、GABA と Phe、または MA を組み合わせることで相乗的な GLP-1 分泌増加を認めた。これにより、複数の成分を組み合わせることで、単独の成分よりも低い用量で GLP-1 の生体利用能を高める可能性が示唆された。GLP-1 の糖代謝調節作用や膵外作用への栄養学的アプローチは、糖尿病や肥満の予備軍や健康意識の高い人々における疾病予防や健康維持への寄与が期待される。

1. 序論

1.1. 背景

医療技術の進歩や健康志向の高まりに伴って、現代人の平均寿命は最高水準に達している。現代では、平均寿命だけはなく健康な状態での寿命の延伸に焦点が当てられ、食環境や運動を主体とした疾病の予防や健康維持・増進にも重点が置かれるようになってきた。一方、糖尿病は肥満や過体重になりやすい食習慣やライフスタイルの変化（van Dam 2003, Ojo 2019）、加齢（Charvat et al. 2015）などによって、その発症頻度が高くなる現代人の生活習慣病の一つである。さらに、疫学研究によれば、糖尿病の合併症である心疾患や脳血管疾患などの大血管障害の発症は、75 g 糖負荷試験（oral glucose tolerance test, OGTT）2 時間値を指標とした耐糖能異常（impaired glucose tolerance, IGT）の段階から生じている（DECODE Study Group. 2001, Hyvärinen et al. 2009, Ning et al. 2010, 2012）。この問題は糖尿病患者だけではなく、健康な人々にも関連しており、血管機能と食後の血糖コントロールの関係の重要性が報告されている（DECODE Study Group. 2001, Hyvärinen et al. 2009, Ning et al. 2010, 2012）。IGT と食後高血糖は異なる病態だが（Meier et al. 2009）、いずれも食後の血糖変動の大きさが、大血管障害を促進する要因となっている（DECODE Study Group. 2001, Levitan et al. 2004）。つまり、空腹時血糖や過去 1–2 ヶ月間の平均血糖値を反映する hemoglobin A1c（HbA1c）を改善しても、人々は依然として大血管障害の危険にさらされており、食後高血糖状態の改善が非常に重要である。

1.2. Glucagon-like peptide-1（GLP-1）

インクレチンは、栄養素の摂取に伴って分泌され、血糖依存的にインスリン分泌を刺激する消化管ホルモンである。小腸上部の K 細胞から分泌される glucose-dependent insulinotropic polypeptide（GIP）と、小腸下部および大腸の L 細胞から分泌される GLP-1 がある（Kieffer and Habener 1999）。GLP-1 は dipeptidyl peptidase (DPP)-4 によって速やかに分解・不活化されるため、近年、糖尿病治療において DPP-4 を標的とする糖尿病治療薬が注目されている。DPP-4 阻害薬は、内因性のインクレチン活性を高め、血糖依存的にインスリン分泌を促すとともに、グルカゴン分泌を抑制する効果があり、低血糖のリスクが低く、食後高血糖の是正に繋がることが示されている（Müller et al. 2019）。DPP-4 阻害薬などのインクレチン製剤の登場により、近年の糖尿病治療は HbA1c の改善のみならず、血糖変動の少ない良好な血糖コントロールを達成することを目指している（Araki et al. 2020）。

また、GLP-1 は、糖代謝で重要な働きをするインスリン分泌促進作用に加えて、膵外的な効果も持っている。これには食欲の調節、抗炎症、血管機能の改善などが含まれる（Nauck et al. 2017, Müller et al. 2019）。そのため、GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害薬などによって

GLP-1 の利用能を増強するアプローチが多く研究されており、これらの手法は糖尿病、肥満関連疾患、血管イベントの予防・治療において多くのエビデンスが集積されている（Nauck et al. 2017, Drucker 2018, Müller et al. 2019）。ただし、これらの医学的アプローチは副作用のリスクを伴い（Nonaka et al. 2008, Drucker 2018）、また、糖尿病や肥満の予備軍においても適用性に制約がある。

そのため、GLP-1 の有効性を向上させる新たなアプローチとして、栄養学的な視点が注目されている。内因性の GLP-1 の利用能を高めるメカニズムとしては、腸内分泌細胞に対する分泌促進作用が挙げられる（Lacroix and Li-Chan 2014）。食事成分が腸内分泌細胞上の関連受容体や輸送体を介して GLP-1 分泌に影響を与えることが知られており、これには糖質だけでなく、タンパク質、アミノ酸、脂質などが含まれる（Thomsen et al. 1999, 2003, Lejeune et al. 2006, Müller et al. 2019）。糖尿病予備軍および健康成人において、食事ペプチドおよびアミノ酸が内因性 GLP-1 分泌に影響を及ぼすかどうかを調べる研究が実施されている（Greenfield et al. 2009, Samocha-Bonet et al. 2011, Chang et al. 2013, Hoefle et al. 2019）。

1.3. トウモロコシタンパク質加水分解物（ZeinH）

Zein はトウモロコシ由来の難消化性タンパク質で、古くからコーティング剤や造粒のバインダー（賦形剤）など、食品の加工助剤として使用されている（FDA 2022）。トウモロコシタンパク質の加水分解物から調製されるトウモロコシペプチドは通常、低栄養製品として扱われる（Wang et al. 2016）。

先行研究（*in vitro, in vivo*）において、zein の加水分解物である ZeinH の糖負荷後の食後高血糖を抑制する効果が報告されている（Hira et al. 2009, Mochida et al. 2010, Higuchi et al. 2013）。また、その作用メカニズムとして、ZeinH は GLP-1 の分泌を促進し、血中の DPP-4 活性を低下させ、さらにはインスリン分泌を促進することが示唆された（Mochida et al. 2010）。

ただし、ZeinH は単なる化合物ではなく、複雑なペプチドの混合物であるため、トウモロコシ原料や加水分解の品質の影響によって、バッチ間で生理活性に差異が生じる可能性がある。この成分のばらつきは、ZeinH の有用性の正確な評価の妨げとなり、今後の応用研究に制限を与える恐れがある。したがって、ZeinH の品質管理を確保し、その臨床応用の可能性をより的確に評価するために、ZeinH の活性成分を特定する必要がある。

1.4. トウモロコシタンパク質水抽出物（ZeinS）

ZeinH は原料である zein の加水分解で生じたペプチド混合物である。この zein は、酵素処理のために溶媒（水）中へ懸濁されることで、水溶性の zein 由来成分が ZeinH に抽出さ

れる可能性が考えられた。実際に、水抽出後の凍結乾燥物量を評価した結果、zein 100 g あたり約 0.6 g の回収量（約 0.6%）があることを確認した。この構成成分には、アミノ酸などの可溶性化合物が含まれると予想された。

1.5. 本研究の目的

現代の食環境では、糖尿病などの慢性疾患の予防を目的として食品の機能性（第三次機能）を活かした食品の開発が盛んに行われている。一方、近年 GLP-1 の有効活用に着目したアプローチが肥満関連疾患や血管イベントの予防・治療に関する多くのエビデンスとともに注目されている。

そこで本研究では、先行研究で糖尿病対策に寄与する可能性が示されている zein という食品素材に含まれる GLP-1 分泌誘導活性成分を特定し、その有効性をヒトにおいて評価することを目的とした。これにより、内因性の GLP-1 の利用を高める新しいアプローチを提案し、糖尿病対策に新たな手段を展開することを目指す。

2. トウモロコシタンパク質加水分解物（ZeinH）由来の GLP-1 分泌誘導ペプチドの探索（*in vitro*）

2.1. 緒言

先行研究において、zein の加水分解物である ZeinH に糖負荷後の食後高血糖の是正効果がラットでの *in vivo* 試験で見出された（Hira et al. 2009, Mochida et al. 2010, Higuchi et al. 2013）。また、その作用メカニズムとして、インスリン分泌を刺激する消化管由来の因子であるインクレチン、なかでも GLP-1 の分泌を促進し、さらに血中 DPP-4 活性を低下させ、インスリン分泌を促進して食後の血糖値の上昇を抑制することが示唆された（Mochida et al. 2010）。GLP-1 分泌活性については、GLP-1 産生細胞上に発現する G タンパク質共役型受容体（calcium-sensing receptor, CaSR 等）やペプチドトランスポーター（peptide transporter 1, PEPT1 等）（Diakogiannaki et al. 2013, Pais et al. 2016）が関与することが報告されている。一方、DPP-4 阻害活性については、DPP-4 に対するペプチドの競合的な阻害作用が報告されており（Gunnarsson et al. 2006）、ZeinH 中に存在するペプチド成分がこれらを介して作用すると考えられる。しかしながら、ZeinH は多くのペプチド断片を含む複雑な混合物であり、その作用本体は特定されていない。また、原料となるトウモロコシの品質や調製過程の加水分解反応のばらつきの影響を受けてバッチ間で生理活性に差異が生じる可能性があることに留意する必要がある。そのため、ZeinH の生理活性をより明確に理解するためには、関与成分の特定と有効濃度の決定が重要となる。さらに、特定成分を機能性素材として事業化する際にも、関与成分の同定が重要な役割を果たす。

そこで当試験では、ZeinH 由来の関与成分として候補となる活性ペプチドを同定し、合成した候補ペプチドの GLP-1 分泌活性を *in vitro* 試験によって評価した。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 試薬類

特に明記しない試薬や溶液は富士フイルム和光純薬㈱の特級以上の純度を使用した。

2.2.2. 細胞

GLUTag 細胞はトロント大学（カナダ）Professor D. J. Drucker より供与された。GLUTag 細胞は培養プレート中にサブコンフルエントに達するまで 37°C、5% CO_2 存在下で培養した。培地には、10% fetal bovine serum（FBS; FB-1380, Lot 013BS802, Biosera, Nuaille, France）、50 IU/mL penicillin および 500 μg/mL streptomycin を含む Dulbecco’s modified Eagle’s medium（DMEM; 12100-046, Gibco, Grand Island, NY, USA）を用いた。0.25%トリプシン-EDTA 処理

を行い継代培養した（Hira et al. 2009）。

2.2.3. GLP-1 分泌試験

培地を取り除き、HEPES バッファー（140 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 20 mM HEPES, 1.2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 10 mM D-glucose, 0.1% BSA, pH 7.4）にてウェルを洗浄後、同バッファーに溶解したサンプル（ZeinH 5 mg/mL 相当）をウェルに添加し、37°C にて 60 分間インキュベーションした。ウェルより上清を回収し、遠心分離後（800×g, 5 分, 4°C）の上清を回収し、GLP-1 濃度測定まで－80°C で保管した（Hira et al. 2009）。総 GLP-1 濃度は ELISA 法（Multi Species GLP-1 Total ELISA, EZGLP1T-36K, Merck Millipore, Darmstadt, Germany）にて測定した。

なお、各サンプルの用量は以下の通り。

- KCl：70 mM
  - 74.5 mM NaCl, 70 mM KCl, 20 mM HEPES, 1.2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 10 mM D-glucose, 0.1% BSA, pH 7.4
  - 評価系成立確認ため、先行研究と同様の用量で評価した（Hira et al. 2009）。
- ZeinH（調製法は後述）：5 mg/mL
  - 先行研究と同様の用量で評価した（Hira et al. 2009）。
- ZeinH プロナーゼ消化物（調製法は後述）：ZeinH 5 mg/mL 相当
- 合成ペプチド：0.1、0.2、1.0 mg/mL
  - Zein のアミノ酸残基を 240 とし、ペプチドを 10 残基とした場合の重量比を用いて ZeinH 中のペプチド存在量を概算した。最終的に、0.2 mg/mL を供試濃度の基準値に設定した（5.0 mg/mL×10/240）。

2.2.4. ペプチド類の同定

ZeinH はトウモロコシタンパク質 zein の食品酵素（パパイン）の加水分解物のため、その構成成分の多くはペプチド成分だと考えられる。もし、これらのペプチド成分が GLP-1 分泌誘導活性の中心である場合、パパインよりも強力にタンパク質を消化できるプロテアーゼの処理によって、ZeinH 中の活性ペプチド鎖がさらに加水分解されることでその活性が失われると考えた。先行研究において、ZeinH は、胃や小腸におけるタンパク質の消化酵素であるペプシン/パンクレアチンへの消化耐性が高く、タンパク質を遊離アミノ酸まで消化できる放線菌由来の非特異的プロテアーゼ混合物であるプロナーゼへの消化耐性が低いことが確認されている（Higuchi et al. 2013）。そこで、ZeinH に含まれる消化耐性の高い活性ペプチド候補の選抜を以下の方法で実施した。

ZeinH のプロナーゼ処理前後での質量分析とペプチド同定を行い、処理前後で共通するペプチドがプロナーゼ消化後の ZeinH の GLP-1 分泌誘導活性を担っていると仮定し、処理前後比較で重複するペプチド群を選抜した。ZeinH は調製日が異なる 2 ロットを供した。ZeinH およびプロナーゼ消化物のそれぞれをチップカラム（GL-Tip SDB; GL Sciences, 東京）を用いて脱塩・濃縮し、液体クロマトグラフィ・タンデム質量分析法（Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS）に供した。

- 分析： Orbitrap Elite（Thermo Fisher Scientific）
- 解析： Proteome Discoverer 2.0（Thermo Fisher Scientific）
- プリカーサーイオンの質量範囲：350～10,000 Da

2.2.5. 被験物

2.2.5.1. ZeinH

Zein（小林ツェイン DP-N）は小林香料㈱から購入した。Zein（10 g）を超純水（100 mL）に懸濁して pH 調整（pH 7.0）後、酵素（パパイン, 50 mg: 終濃度 0.5 mg/mL（対基質濃度 0.5%）, パパイン F, アサヒフードアンドヘルスケア㈱）を添加し、55℃ で 60 分間振盪した。沸騰浴中で 20 分間加熱してパパインを失活させ、可溶性画分をフィルター濾過（孔径 0.45 μm）により回収し、凍結乾燥した。（収率 約 10% : Zein 10 g から ZeinH 約 1 g を調製）

2.2.5.2. ZeinH プロナーゼ消化物

ZeinH（5 mg/mL 相当）に対してプロナーゼ（53702: PRONASE Protease, *Streptomyces griseus* 25 ku, Calbiochem）を ZeinH 量の 0.5% 相当となるように添加し、37℃ で 4 時間静置反応した。沸騰浴中で 20 分間加熱して酵素失活させ、凍結乾燥した（Higuchi et al. 2013）。

2.2.5.3. 合成ペプチド

ZeinH のプロナーゼ処理前後での質量分析とペプチド同定結果に基づき選抜した活性ペプチド候補（Table 2-1）について、ペプチド合成をユーロフィンジェノミクス㈱に委託した。

2.2.6. 統計解析

平均値±標準偏差（SD）で表記した。各群間比較には Tukey 法を用い、有意水準は両側 5%とした。解析には SAS R9.4 を使用した。

2.3. 結果

既報（Hira et al. 2009）に基づいて調製した ZeinH において、プロナーゼ消化後に GLP-1 分泌誘導活性が低下したが、消失はしなかった（Fig. 2-1）。

次に、ZeinH およびそのプロナーゼ消化物中の活性画分に含まれる全てのペプチドを同定した。この中から、両者に共通するペプチドがプロナーゼ消化後の ZeinH の GLP-1 分泌誘導活性を担っていると仮定し、12 ペプチドを候補として選抜した（Table 2-1）。これらのペプチドを合成し、その活性を評価した結果、いくつかのペプチド（sequence: YPQQF（No. 6）, AYPQQF（No. 9））にわずかな GLP-1 分泌誘導活性が観察されたが（Fig. 2-2）、これらの活性は ZeinH レベルには達しなかった。

2.4. 図表

Table 2-1　ZeinH 中に含まれる活性ペプチド候補リスト

ID	Sequence	ID	Sequence
1	LPPYLPS	7	LPPYLSPA
2	LPPYLSP	8	ALNSPAY
3	LPFNQ	9	AYPQQF
4	LPPYLP	10	LPFSQL
5	LPLIN	11	LPFSQ
6	YPQQF	12	TIFPQC

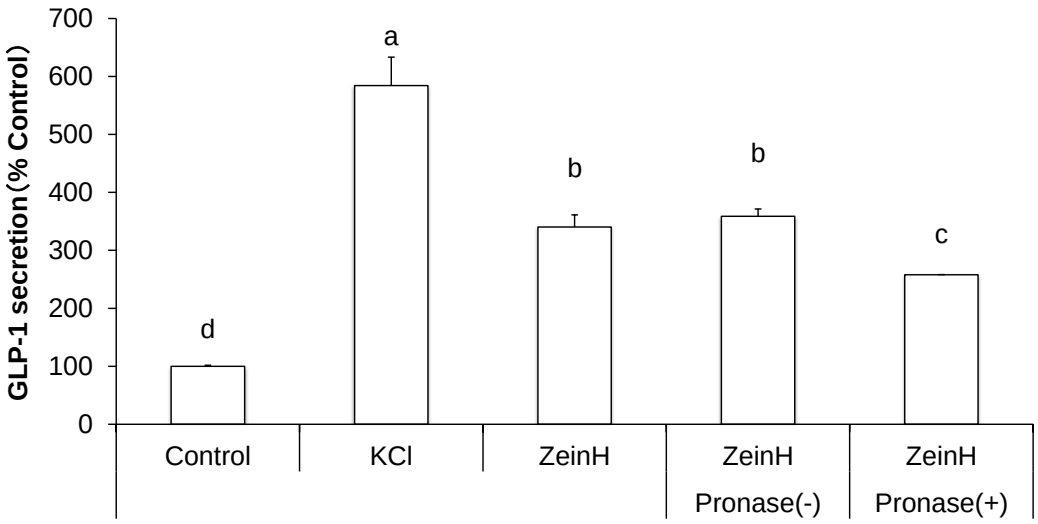

Fig. 2-1　GLUTag 細胞における ZeinH およびそのプロナーゼ消化物の GLP-1 分泌誘導活性

GLUTag 細胞を Control（HEPES バッファー）、70 mM KCl、ZeinH（5 mg/mL）、ZeinH プロナーゼ未消化物（加熱反応のみ、ZeinH 5 mg/mL 相当）および ZeinH プロナーゼ消化物（ZeinH 5 mg/mL 相当）に 60 分間暴露した。上清中の GLP-1 濃度は GLP-1 ELISA で測定した。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n=3）。同じ文字を共有しない値は有意に異なる（Tukey 検定, $p < 0.05$）。

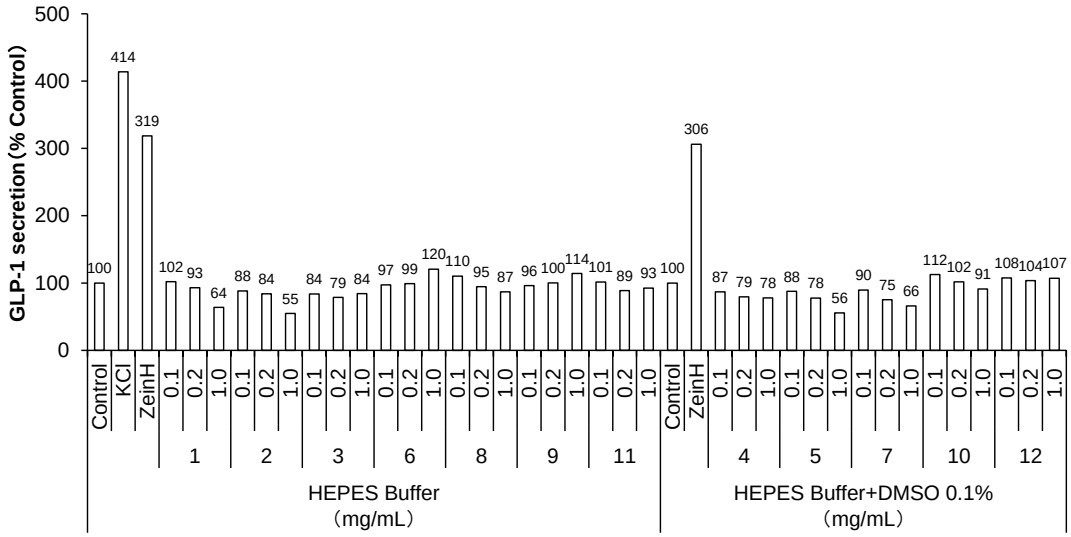

Fig. 2-2　GLUTag 細胞における合成ペプチドの GLP-1 分泌誘導活性

GLUTag 細胞を Control（HEPES バッファー）、70 mM KCl、ZeinH（5 mg/mL）および合成ペプチド（0.1、0.2、1.0 mg/mL）に 60 分間暴露した。ペプチド ID. 1, 2, 3, 6, 8, 9, 11 は HEPES Buffer、ID. 4, 5, 7, 10, 12 は疎水性のため DMSO（終濃度 0.1%）を含む HEPES Buffer にて調製した。上清中の GLP-1 濃度は GLP-1 ELISA で測定した。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、1 試験の測定値のみで表した（n=1）。

2.5. 考察

ZeinH 中の活性成分の多くは、その調製方法からペプチド類であると予想されたため、プロナーゼ消化によって活性が消失するだろうと予想した。しかしながら、予想に反して、多くの活性が残存していたことから、プロナーゼ耐性を有するペプチドが ZeinH の生理活性に関与していると考えられた。つまり、プロナーゼ処理前後の各検体に共通のペプチドが特定できれば、それらが活性ペプチドの候補である可能性が高い。しかし、当試験条件下ではどの候補ペプチドも顕著な活性を示さず、ZeinH の GLP-1 分泌誘導活性において寄与度の高いペプチドを特定することはできなかった。

ただし、用量依存的な GLP-1 分泌活性の変化に関して、一部のペプチド（sequence: YPQQF（ID. 6）, AYPQQF（ID. 9））は高濃度では若干の活性変化を示し、これらのペプチドは共通の”YPQQF”の配列が含まれていた。過去の研究では、STC-1 細胞（Caron et al. 2016, Santos-Hernández et al. 2020, Theysgeur et al. 2020, Santos-Hernández et al. 2023）、GLUTag 細胞（Komatsu

et al. 2019）、NCl-H716 細胞（Le Nevé and Daniel 2011）、マウス初代培養細胞（Diakogiannaki et al. 2013）において、GLP-1 分泌を促進するペプチドがいくつか報告されている。ペプチド配列はウシヘモグロビン由来の 4 つ、化学合成による 5 つ、乳タンパク質由来の 4 つ、卵白タンパク質由来の 6 つ、および淡水魚（ティラピア）副産物由来の 1 つの 20 個が報告されている（Hira et al. 2021, Santos-Hernández et al. 2023）。しかし、当試験で高濃度で若干の活性を示したペプチド YPQQF と AYPQQF は、これらの既知の配列とは異なっていた。L 細胞におけるペプチド感知機構としては、PEPT1 やペプチド受容体（G-protein receptor-93, GPR93）、カルシウム感知受容体（CaSR）の関与が指摘されている（Choi et al. 2007, Diakogiannaki et al. 2013, Pais et al. 2016）。ペプチド YPQQF と AYPQQF はこれらの経路を介して GLUTag 細胞に感知される可能性がある。また、ペプチド配列における芳香族アミノ酸（Y（チロシン）, F（フェニルアラニン）など）の存在が消化管ホルモンの一つであるコレシストキニン分泌を促進する可能性も示唆されており（Caron et al. 2016）、ペプチド内の Y や F の存在が GLP-1 分泌作用に影響を及ぼした可能性も考えられる。

一方、他の合成ペプチド（sequence: LPPYLPS（ID. 1）, LPPYLSP（ID. 2）, LPLIN（ID. 5）, LPPYLSPA（ID. 7）, ALNSPAY（ID. 8）, LPFSQL（ID. 10））は負の活性変化を示した。調査した範囲では、zein や他の食物タンパク質に由来するある種のペプチドが GLP-1 の分泌を阻害することを示す情報はない。しかし、ガラニンという神経ペプチドは、腸管において消化管機能を調節すると考えられており、腸内分泌 L 細胞における受容体（ガラニン受容体 1）と Gi 共役シグナルを介して GLP-1 分泌を阻害することが示されている（Psichas et al. 2016）。したがって、zein 由来のペプチドは、ガラニンのように GLP-1 の分泌を阻害する可能性がある。また、負の活性変化を示した合成ペプチドのうち 5 つには”LP”の配列が共通していた。GLP-1 を分解・不活性化する酵素 DPP-4 は、ペプチド鎖の N 末端から 2 番目の P（プロリン）あるいは A（アラニン）を認識し、N 末端の 2 アミノ酸を切断する。また、DPP-4 は N 末端から 3 番目のアミノ酸に P（プロリン）を持つペプチドの加水分解を触媒することができないことも報告されている（Lorey et al. 2003）。したがって、先行研究（*in vivo*）で報告された ZeinH の血中 DPP-4 活性低下とインスリン分泌促進を介した食後血糖値上昇抑制作用において（Mochida et al. 2010）、これらのペプチドが ZeinH 内で DPP-4 阻害作用を発揮し、GLP-1 の分解を抑制して食後血糖値上昇抑制作用に寄与する可能性が考えられる。

また、既存の研究報告では、細胞モデルを用いて食物タンパク質由来ペプチドおよび合成ペプチドの GLP-1 分泌促進作用における有効濃度を評価し、異なる細胞モデルに対して 0.1–20 mM（約 0.1–6 mg/mL）の濃度で活性が確認されている（Hira et al. 2021, Santos-Hernández et al. 2023）。当試験では、ZeinH 中に占める各ペプチド含量の概算含有量を考慮し、最大 1.0

mg/mL の濃度で GLP-1 分泌評価を行った。そのため、正の活性を示す候補ペプチドの至適濃度条件検討によって活性ペプチドが特定できる可能性がある。また、ZeinH の活性はそれらの組み合わせによる相互作用によって総合的に引き起こされている可能性がある。関連する先行研究によれば、ペプチドによる GLP-1 分泌には、GLP-1 産生細胞上に発現する CaSR や PEPT1 が関与していることが報告されている（Diakogiannaki et al. 2013, Pais et al. 2016）。同様に、腸内分泌細胞からの GLP-1 分泌においては、細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇が複数の細胞内シグナル伝達経路を介して誘導され、相乗的な分泌応答が確認されている（Hauge et al. 2017）。これらの知見から、ペプチドの CaSR と PEPT1 への作用は、それぞれ Gq タンパク質共役型受容体（GPCR）が関与する細胞内に蓄積した Ca^{2+} の放出経路と、膜の脱分極とそれに続く電位依存性 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入経路といった異なる経路を介して、細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇とそれに続く GLP-1 分泌応答を相乗的に増強させる可能性が考えられる。さらに、将来的な臨床応用を考えた場合、ヒト由来細胞モデルを含めた複数の細胞モデルにおける応答性を確認する必要もある。したがって、候補ペプチドが活性を示す最適な条件を見出すためには多くの条件設定が必要であり、その実施は難しいかもしれない。

ZeinH の中には加水分解によって生じたペプチド以外に、原料自体に由来する可溶性化合物も含まれている可能性がある。そのため、それら可溶性化合物の中に関与成分が存在する可能性も考えられた。これらの可溶性化合物には遊離アミノ酸が含まれている可能性が考えられ、実際にフェニルアラニン（Phe）やトリプトファン（Trp）といったアミノ酸が腸内分泌細胞において GLP-1 分泌を促進することや（Modvig et al. 2021, Osuga et al. 2022）、動物およびヒトにおいてアミノ酸（グルタミン）単独投与後に血中 GLP-1 濃度が増加することが報告されている（Greenfield et al. 2009）。したがって、ZeinH の調製原料である zein に由来する可溶性化合物に関する研究は、ZeinH の生理活性の特定につながる可能性がある。

2.6. 小括

ZeinH 中に含まれる関与成分として活性ペプチド候補 12 種を同定し、それらの活性を *in vitro* 試験で確認したが、顕著な GLP-1 分泌誘導活性はいずれも確認できなかった。

3. トウモロコシタンパク質水抽出物（ZeinS）の GLP-1 分泌誘導作用の検討（*in vitro*・*in vivo*）

3.1. 緒言

前章において、ZeinH の GLP-1 分泌誘導活性に関与する成分を検討したが、候補とされた各ペプチドについては活性が認められなかった。この結果から、活性ペプチドを特定するためには、候補ペプチドの組み合わせや至適濃度条件の検討が必要であることが示唆された。一方、ZeinH には zein 由来の可溶性化合物も含まれており、これらの中に関与成分が存在する可能性も考えられた。さらなる関与成分の検討を進めるにあたり、前者のアプローチでは多くの条件設定が必要であることから、後者の可能性を優先して検討することとした。

そこで当試験では、zein 由来の水溶性成分に GLP-1 分泌誘導活性が存在するかどうかを明らかにすることを目的とし、まず、zein の水抽出物（ZeinS）の GLP-1 分泌誘導活性を *in vitro* 試験で評価した。その後、GLP-1 分泌誘導作用を介した血糖上昇抑制作用を *in vivo* 試験（ラット）で評価した。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 試薬類

特に明記しない試薬や溶液は富士フイルム和光純薬㈱の特級以上の純度を使用した。

3.2.2. 細胞

「2.2.2. 細胞」参照

3.2.3. GLP-1 分泌試験

「2.2.3. GLP-1 分泌試験」参照

なお、各サンプルの用量は以下の通り。

- ZeinH：0.04、0.2、1.0、5.0 mg/mL
  - 用量依存的な活性変化を確認するために 5 mg/mL を最大用量とした 5 倍希釈条件下で暫定評価した。陰性対照（Control）との差を認めない最低用量として 0.04 mg/mL を設定した。
- ZeinS（調製法は後述）：0.04、0.2、1.0、5.0 mg/mL
  - ZeinH との比較のため、同様の用量条件で評価した。
  - ZeinH 中に含まれる ZeinS 量の推定量は、以下の方法に基づいて計算した。Zein（小林ツェイン DP-N）の規格試験成績値は、タンパク質が 97.4%、水分が 0.8%、その他の成分が 1.8%（概算）であった。また、先述の ZeinH の

凍結乾燥重量から得られた収率は約 10%であった。これらの情報を元に、ZeinH 中に含まれる ZeinS の理論的な量を約 20%と概算した。具体的には、タンパク質（97.4%）が難溶解性であるため、水懸濁時に可溶化されるのは主にタンパク質以外の「その他の成分（1.8%）」であると仮定した。その場合、前章の「2.2.5.1. ZeinH」で述べたように、zein を 10 g 使用して調製された ZeinH 約 1 g（収率約 10%として）のうち、その他の成分を全量（0.18 g 相当）回収できたとすると、その他の成分は約 20%に相当すると推計した。最終的に、ZeinH 5 mg/mL の 20%、つまり 1 mg/mL を ZeinS の含有量として、以降の試験に用いた。

3.2.4. 被験物

3.2.4.1. ZeinH

「2.2.5.1. ZeinH」参照

3.2.4.2. ZeinS

Zein（10 g）を超純水（100 mL）に懸濁して遠心（9,400×g, 5 分, 室温）後、粗濾過液をフィルター濾過（孔径 0.45 μm）により回収し、凍結乾燥した。

3.2.5. 動物試験

北海道大学動物実験委員会の承認（承認番号 19-0064）を得て、先行研究に準じて実施した（Hira et al. 2009, Mochida et al. 2010）。Sprague-Dawley ラット（6 週齢, 雄性, 日本エスエルシー㈱）を入荷後、約 1 週間予備飼育した。飼育中は、CE-2 固形飼料（日本クレア㈱）を与えた。体重を基に、統計解析ソフトウェア （JMP Pro 12, SAS Institute Inc.）を用いて無作為抽出法により、対照群（Control）、陽性対照群（ZeinH）および試験群（ZeinS）（各 4 匹）の 3 群に割り付けた。群分け後、16 時間絶食させたラット（8 週齢時（体重: 260–310 g））に対して、腹腔内糖負荷試験（intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT）開始の 15 分前（−15 分）に尾静脈より事前採血（200 μL）した後、蒸留水（8 mL/kg body weight（BW））、陽性対照（ZeinH: 2 g/kg BW）または被験物（ZeinS: 0.4 g/kg BW）を経口投与した。その 15 分後（0 分）に尾静脈より採血（200 μL）した後、グルコース溶液（1 g/kg BW）を腹腔内投与した。

グルコース投与後 15 分、30 分、60 分、90 分および 120 分後に尾静脈より採血した（各 200 μL）。採取した血液は、予めヘパリン（50 IU/mL Blood, ナカライテスク㈱）とアプロチニン（200 kIU/mL Blood）を分注したチューブに移して良く混和し、氷冷した。血液を遠

心分離し（2,400×g, 10 分間, 4°C）、血漿を回収した。得られた血漿は分析時まで−80°C で保存した。

血漿中の総 GLP-1 濃度を ELISA 法（GLP-1 ELISA キットワコー 高感度品，富士フイルム和光純薬㈱）、グルコース濃度を酵素法（Glu C Ⅱテストワコー，富士フイルム和光純薬㈱）により測定した。

なお、各サンプルの用量根拠は以下の通り。

- ZeinH：2 g/kg BW
  - 同モデルを用いた先行研究において、ZeinH 2 g/kg BW の単回投与でラットの血漿 GLP-1 濃度の増加および IPGTT 後の血糖上昇抑制作用が確認されている（Hira et al. 2009, Mochida et al. 2010）。
- ZeinS：0.4 g/kg BW
  - 前述（3.2.3. GLP-1 分泌試験）にて、ZeinH 中に含まれる ZeinS 量は約 20%と推計した。そこで当試験では、ZeinH の用量 2 g/kg BW の 1/5 倍濃度である 0.4 g/kg BW を ZeinS の用量とした。

3.2.6. 統計解析

In vitro 試験では、平均値±SD で表記した。各群間比較には Tukey 法を用い、有意水準は両側 5%とした。解析には SAS R9.4 を使用した。

In vivo 試験では、平均値±標準誤差（SEM）で表記した。経時データは群（被験物: treatment）および時間（計測時点: time）の反復測定二元配置分散分析（絶対値はベースラインで補正）を行った。同時点および上昇曲線下面積（incremental area under curve, iAUC）の比較は対照群を基準群とした Dunnett 法を用い、有意水準は両側 5%、傾向差は 10 %とした。解析には SAS R9.4 を使用した。

3.3. 結果

In vitro 試験において、ZeinH と ZeinS の両方において、GLP-1 分泌が 0.2、1.0、5.0 mg/mL の濃度で用量依存的に有意に増加した（Fig. 3-1, $p < 0.05$）。また、ZeinS の活性は ZeinH と比較して有意に高かった（Fig. 3-1, $p < 0.05$）。

次に、*in vivo* 試験において、ZeinH と ZeinS の GLP-1 分泌誘導活性と血糖上昇抑制作用を評価した。ZeinH 群では、単回投与後の血漿中総 GLP-1 濃度（ベースラインからの経時変化（A）と iAUC（B））が有意に増加し（Fig. 3-2, $p < 0.01$）、同時に血漿中グルコース濃度の上昇抑制が観察された（Fig. 3-3A・C, $p < 0.01$; Fig. 3-3B, $p = 0.1841$）。

ZeinS 群では、単回投与後の血漿中総 GLP-1 濃度（ベースラインからの経時変化（A））

が有意に増加し（Fig. 3-2A, $p < 0.01$; Fig. 3-2B, $p = 0.1279$）、その際の血漿中グルコース濃度（ベースラインからの経時変化（A）と iAUC（B））が、Control 群と比較して ZeinS 群で有意に低下した（Fig. 3-3A, $p < 0.05$（30 分値）; Fig. 3-3B, $p < 0.05$）。

3.4. 図表

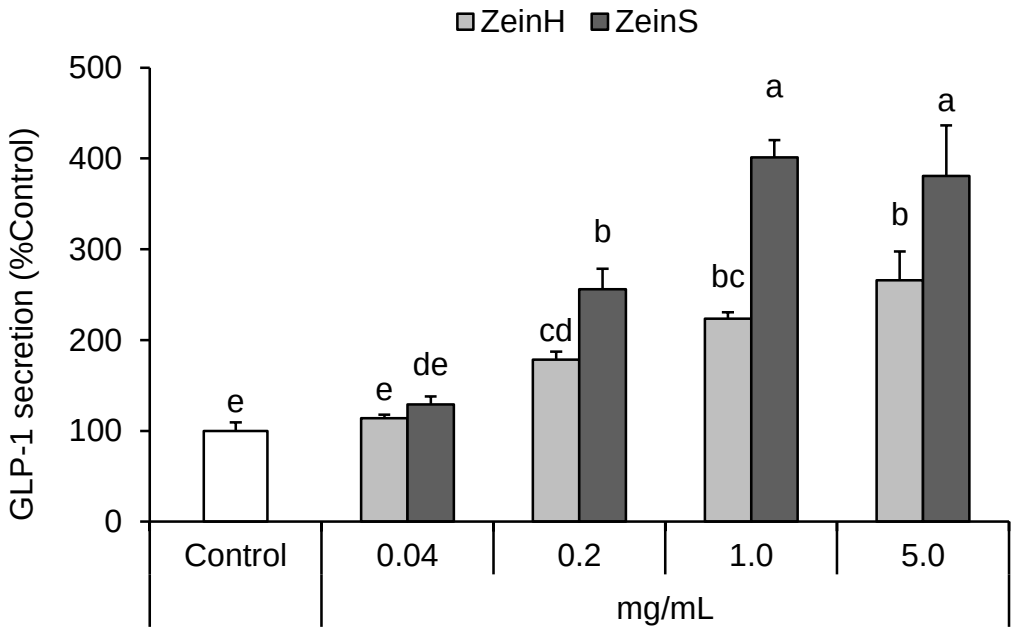

Fig. 3-1　GLUTag 細胞における ZeinH および ZeinS の GLP-1 分泌誘導活性

GLUTag 細胞を Control（HEPES バッファー）および様々な用量の ZeinH（0.04, 0.2, 1,0, 5.0 mg/mL）、ZeinS（0.04, 0.2, 1.0, 5.0 mg/mL）に 60 分間暴露した。上清中の GLP-1 濃度を GLP-1 ELISA にて測定した。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n=4）。同じ文字を共有しない値は、有意に異なる（Tukey 検定, $p < 0.05$）。

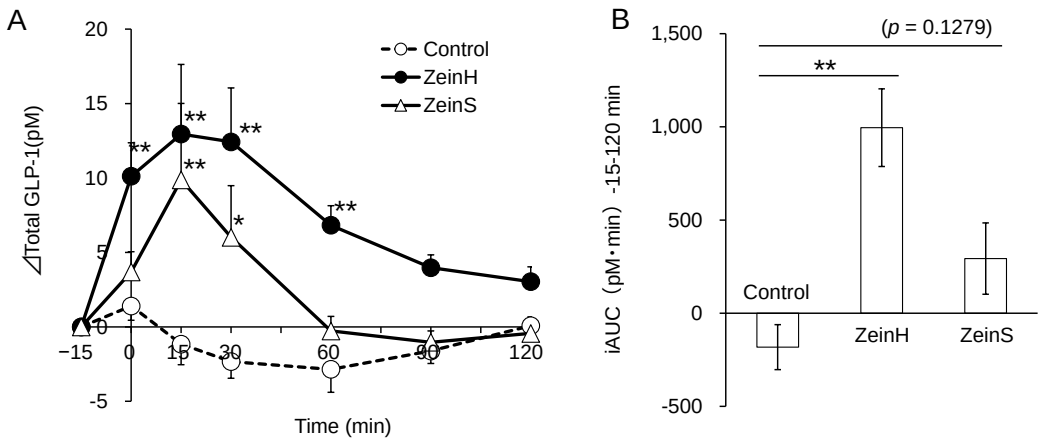

Fig. 3-2　ラットにおける ZeinH および ZeinS の経口投与後の IPGTT における血漿中総 GLP-1 濃度の変化

対照として水（○: 8 mL/kg）、ZeinH（●: 2 g/kg）、ZeinS（△: 0.4 g/kg）を腹腔内グルコース投与（1 g/kg）15 分前に経口投与した。グルコース投与の前後に尾静脈から血液を採取して血漿中総 GLP-1 濃度を測定した。A は、−15 分値からの変化量、B は、その曲線下面積（iAUC）を示す。Repeated measures ANOVA の *P* 値（総 GLP-1 濃度）は、$p < 0.01$（treatment）、$p < 0.01$（time）、$p < 0.01$（treatment×time）であった。各時点および iAUC の Control 群に対する 3 群間比較での有意差を、$^{**}p < 0.01$、$^{*}p < 0.05$ で示した（Dunnett 検定）。数値は平均値±SEM で表示した（n=8）。

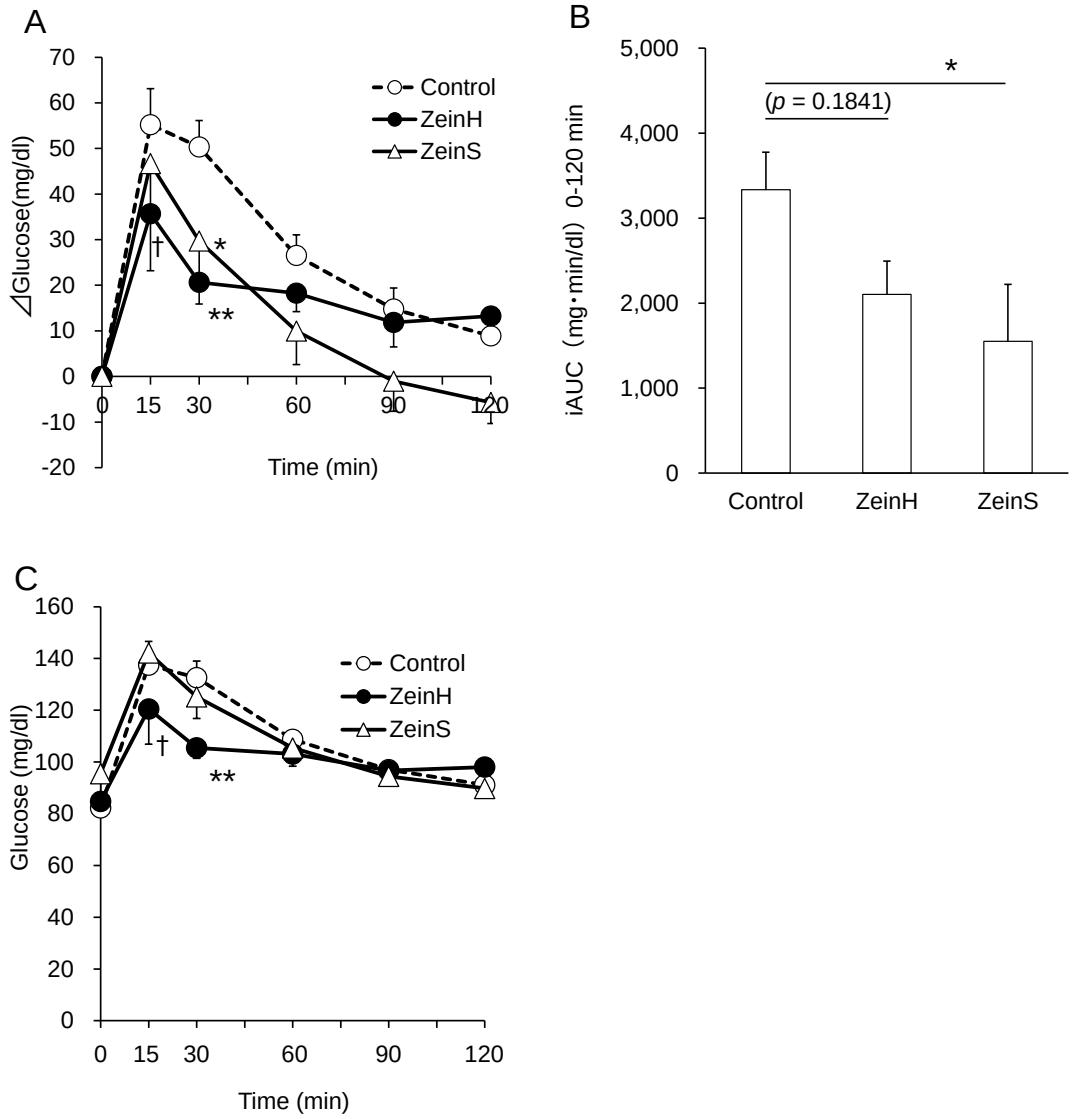

Fig. 3-3　ラットにおける ZeinH および ZeinS の経口投与後の IPGTT における血糖値の変化

対照として水（○: 8 mL/kg）、ZeinH（●: 2 g/kg）、ZeinS（△: 0.4 g/kg）を腹腔内グルコース投与（1 g/kg）15 分前に経口投与した。A は、0 分値からの変化量、B は、その曲線下面積（iAUC）を示す。グルコース投与の前後に尾静脈から血液を採取して血漿中グルコース濃度を測定した。Repeated measures ANOVA の *P* 値（血糖値）は、$p < 0.1$（treatment）、$p < 0.01$（time）、$p < 0.05$（treatment×time）であった。各時点および iAUC の Control 群に対する 3 群間比較での有意差を、$^{**}p < 0.01$、$^{*}p < 0.05$、†$p < 0.1$ で示した（Dunnett 検定）。数値は平均値±SEM で表示した（n=8）。

3.5. 考察

この試験では、まず、zein の水抽出物（ZeinS）の GLP-1 分泌誘導活性を *in vitro* 試験で評価した。その結果、ZeinH よりも ZeinS の GLP-1 分泌誘導活性が高いことが観察された。これにより、食品酵素によって得られる ZeinH の GLP-1 分泌誘導活性を、ZeinS に含まれる zein 由来の可溶性化合物で代替できる可能性を見出せた。その後、*in vivo* 試験において GLP-1 分泌誘導活性と血糖上昇抑制作用を評価した。ZeinH と ZeinS の両方で対照群に比べて GLP-1 応答の増加が認められたが、ZeinS の分泌誘導活性は ZeinH に比べて低かった。その際の糖負荷後の血糖値応答については、ZeinH と ZeinS の両方で対照群に比べて血糖値の低下が認められた。これらのことから、ZeinS の関与成分を特定できれば、ZeinH の関与成分の一部が明らかになるかもしれない。

ただし、ZeinH と ZeinS の構成成分、特に低分子ペプチドの含有量は調製方法の違いによって大きく異なる可能性があることに留意する必要がある（Le Maux et al. 2016）。実際、*in vivo* 試験では ZeinH に比べて ZeinS で GLP-1 分泌誘導活性が低かった。また、GLP-1 と血糖値応答の時間的な変化にも違いが見られた。GLP-1 の応答差は、ZeinH に含まれるペプチド成分の DPP-4 阻害作用の違いに起因する可能性がある。一方、ZeinH に比べて GLP-1 分泌レベルが低値を示した ZeinS でも血糖値上昇抑制効果が観察された。血中インスリン濃度の評価についての評価は行っていないが、この事象は ZeinS に含まれる可能性のあるインスリン様作用成分が影響している可能性がある。例えば、正常ラットのヒラメ筋を用いた実験から、分岐鎖アミノ酸（ロイシン）がインスリンとは別の経路で細胞内へのグルコースの取り込みを促進することや、分岐鎖アミノ酸の中でもイソロイシンが、インスリン非依存的にグルコース投与に伴う血糖値上昇を抑制する作用が報告されている（Nishitani et al. 2002, Doi et al. 2003, 吉澤, 長澤 2007）。今後、関与成分同定を進めることでこれらのアミノ酸の関与が明らかになれば、今回得られた結果についてより詳細な考察ができると考える。

ZeinS および ZeinH の原料である zein は精製タンパク質であり、これらの調製過程（水懸濁時）で可溶性化合物（例えば、遊離アミノ酸類）が溶出する可能性がある。他の *in vitro* および *in vivo* 研究からは、各種アミノ酸の単独投与が GLP-1 分泌を誘導することが広く報告されている（Reimann et al. 2004, Gameiro et al. 2005, Mace et al. 2012, Modvig et al. 2021）。したがって、ZeinS の活性成分に関して、特定のアミノ酸が関与している可能性を検討する必要がある。ただし、前章で示したように、一部のアミノ酸は GLP-1 分泌応答に関して負の影響を与える可能性もあることに留意する必要がある。さらに、活性成分同士の相互作用が複雑な生理活性に影響を及ぼすこともあるため、関与成分の探索においては、質的および定量的な観点だけではなく、相互作用も考慮する必要がある。

ZeinH の GLP-1 誘導活性成分の探索を進める過程で、最初に着目していた候補ペプチド

には顕著な活性が見られなかったため（第 2 章参照）、ZeinS 由来の成分が関与成分である可能性を検討した。その結果、*in vitro* および *in vivo* 試験において ZeinS の有効性が確認され、ZeinS が ZeinH の活性画分の一部である可能性が示された。さらに、既存の報告からは、ZeinS 由来の関与成分として特定のアミノ酸群が考えられた。このため、ZeinS に焦点を当てて、関与成分の探索を進めることとした。

3.6. 小括

In vitro および *in vivo* 試験において、ZeinS による GLP-1 分泌誘導活性および血糖上昇抑制効果を確認した。このことから、ZeinS が ZeinH の活性画分として寄与する可能性が示された。

4. ZeinS の活性成分の特定（*in vitro*）

4.1. 緒言

これまでの研究から、ZeinH の活性画分として、ZeinS が寄与する可能性を示した。

この試験は、まず ZeinS には様々な可溶性化合物が含まれていると予想し、ZeinS 由来の関与成分を特定することを目的とした。そのために、一般的な固相抽出（solid phase extraction, SPE）法と HPLC 法を用いて ZeinS を分画し、各画分の GLP-1 分泌誘導活性を *in vitro* 試験によって評価した。その後、活性が確認された画分について、化合物同定のための質量分析を実施した。

さらに、これまでの知見に基づき、活性候補の化合物の定性および定量的な評価に加えて、これらの相互作用も考慮し、候補化合物の GLP-1 分泌誘導活性を *in vitro* 試験によって評価した。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 試薬類

特に明記しない試薬や溶液は富士フイルム和光純薬㈱の特級以上の純度を使用した。

4.2.2. 細胞

「2.2.2. 細胞」参照

4.2.3. GLP-1 分泌試験

「2.2.3. GLP-1 分泌試験」参照

各サンプルの用量は以下の通り。

- ZeinS : 1 mg/mL
- SPE 分画物（F1–5）（調製法は後述） : ZeinS 1 mg/mL 相当
- HPLC 精製物（F1-a–r）（調製法は後述） : ZeinS 1 mg/mL 相当
- 同定アミノ酸：
  - 活性画分（F1-b）より同定された活性成分（γ-アミノ酪酸, γ-aminobutyric acid, GABA）の定量分析結果（2.30±0.08 μg/mL、外部委託分析（北海道大学グローバルファシリティセンター機器分析受託サービス））を基準とし、用量依存的な活性変動を評価するために各検体について計 3 用量を設定した。
  - 0.1 μg/mL、2.0 μg/mL、1.0 mg/mL、または、2.0 μg/mL、20.0 μg/mL、100 μg/mL

4.2.4. 被験物

4.2.4.1. ZeinS

「3.2.4.2. ZeinS」参照

4.2.4.2. ZeinS の SPE 分画物：（F1–5）

ZeinS 原液を固相抽出カラム（ウォーターズ社製 OASIS HLB, 1 cc Vac Cartridge）に所定量（1 mL）ロード後、カラムに装着したシリンジにてロード液を押し出してカラム非吸着画分（F1）として回収した。ロードした ZeinS 原液量（1 mL）と同量（1 mL）の超純水（MilliQ 水）を送液してカラム洗浄した（先の F1 と混和回収）。次に、超純水とアセトニトリル（ACN）の異なる混合比率で調製した溶出液（超純水/CAN: F1 100/0, F2 90/10, F3 70/30, F4 50/50, F5 20/80（%））を段階的に送液（各 1 mL にて 1 回）して各溶離液を回収し、各画分の溶離液を乾固した。

4.2.4.3. ZeinS および ZeinS-SPE 分画物（F1）の HPLC 精製物：（ZeinS-a–r、および F1-a–r）

ZeinS および活性粗画分である F1 について HPLC システム（下記条件）による追加精製を実施した。以下の逆相システム条件下にてグラジエント溶離液を回収し、各画分の溶離液を乾固した。

［HPLC（逆相）］

- Instrument　Ultimate3000
- Column　InertSustain C18 5 μm, 150×4.6 mm I.D.
- Temperature　40°C
- Eluent　A: 超純水, B: ACN
- Gradient　0–30 min: 100–0%A, 0–100%B
- Flow rate　1.0 mL/min
- Sample　ZeinS（Lot. 180403, 15 mg/mL 相当）
- Injection vol.　20 μL
- Fraction vol.　0.5/1.0 mL
- Detection wavelength　254 nm（190–254 nm）

4.2.5. 質量分析による ZeinS の主要活性画分中の活性化合物の同定

ZeinS の主要活性画分を LC-MS/MS で分析した。MS/MS は、ポジティブおよびネガティ

ブエレクトロスプレーイオン化（ESI）モードで実施した。水 100%に溶解した試料を、タンデム質量分析計と結合した液体クロマトグラフィーによって分析した。操作システムの詳細は以下の通りである。

フィルターろ過後、高速液体クロマトグラフ（Paradigm MS2, Michrom BioResources）および Orbitrap フーリエ変換質量分析計（LTQ Orbitrap XL, ThermoFisher Scientific）を用いて、網羅的に測定した。得られたデータは、Compound Discoverer（ThermoFisher Scientific）による同定を行った。

[LC conditions]

- Instrument　Paradigm MS2
- Column　InertSustain AQ-C18 3 μm, 100 mm×1.0 mm ID (GL Sciences)
- Temperature　40°C
- Eluent　A: 0.1% formic acid in water, B: 0.1% formic acid:10% water in ACN
- Gradient　0% B for 5 min; 35% B at 20 min; 100% B at 21 min; 100% B for 14 min; 0% B at 36 min; 0% B for 19 min
- Flow rate　0.05 mL/min
- Sample　ZeinS（F1-b, F4）
- Injection vol.　5 μL

[MS conditions]

- Instrument　LTQ Orbitrap XL
- ESI　Positive/Negative
- Scan range　50–800 *m/z*
- Source voltage　3.0 kV
- Sheath gas flow rate　20 au
- Aux gas flow rate　7 au
- Capillary temperature　275°C
- Capillary voltage　10/−20 V
- Tube lens voltage　80/−80 V.

4.2.6. 統計解析

[ZeinS の SPE 分画物の GLP-1 分泌誘導活性]

平均値±SD で表記した。各群間比較には Dunnett 法、Tukey 法、または、対応のない *t* 検

定を用い、有意水準は両側 5%とした。解析には SAS R9.4 を使用した。

[同定された化合物の併用による GLP-1 分泌誘導活性]

相乗効果の有意性は、二元配置分散分析を用いて解析した。各群間比較には Tukey 法を用い、有意水準は両側 5%とした。解析には SAS R9.4 を使用した。

4.3. 結果

Fig. 4-1 には、ZeinS 中の活性画分を評価するための調製と分析手順を示した。

逆相カラムを用いた固相抽出法で ZeinS を分画し、各画分の GLP-1 分泌誘導活性を測定した。その結果、ZeinS の非吸着画分（F1）と、アセトニトリルと超純水を 1：1 の比率で溶出した画分（F4）に、活性の一部が観察された（Fig. 4-2A, F1, $p < 0.05$; F4, $p = 0.1548$）。さらに、F1 と F4 の混合画分の活性を測定した結果、ZeinS と同程度の活性を示した（Fig. 4-2B, $p < 0.05$）。

そこで、活性の一部が認められた F1 に対して HPLC（逆相）を用いてさらに細分画し、各画分の活性を測定した。なお、比較対照として ZeinS に対しても同様の操作を行った。その結果、F1 および ZeinS の両方において、HPLC（逆相）への送液から 1.5～2.0 分後に溶出された高親水性画分である画分 b においてのみ有意な活性を示した（Fig. 4-3A, $p < 0.05$; Fig. 4-3B, $p < 0.01$）。

次に、F1 の活性画分（F1-b）と F4 に含まれる化合物を同定するために、質量分析を実施した。なお、Fig. 4-2 の結果から、F4 にも活性の一部があることが示唆され、F1 と F4 が組み合わさると単独の活性を上回ることから、F4 にも関与成分を含む可能性があった。その結果、代表的な化合物（アミノ酸）として、F1-b から asparagine、L-serine、DL-arginine、GABA、L-glutamic acid、F4 から L-phenylalanine を同定した（Table 4-1）。

F1-b と F4 から同定された候補化合物（計 6 種）の各 3 用量で GLP-1 分泌誘導活性を評価した結果、GABA が同一用量条件（2.0 μg/mL）で最も高い活性を示した（Fig. 4-4）。また、GABA と F4 の併用活性を評価した結果、その活性は単独活性の合計よりも高い値を示した（Fig. 4-5）。

したがって、同定された化合物の中で、GABA と F4 にて同定された Phe に焦点を当てて、これらの併用が GLP-1 分泌に及ぼす影響を評価した。その結果、GABA の単独活性を上回り、有意な相乗効果が観察された（Fig. 4-6）。

4.4. 図表

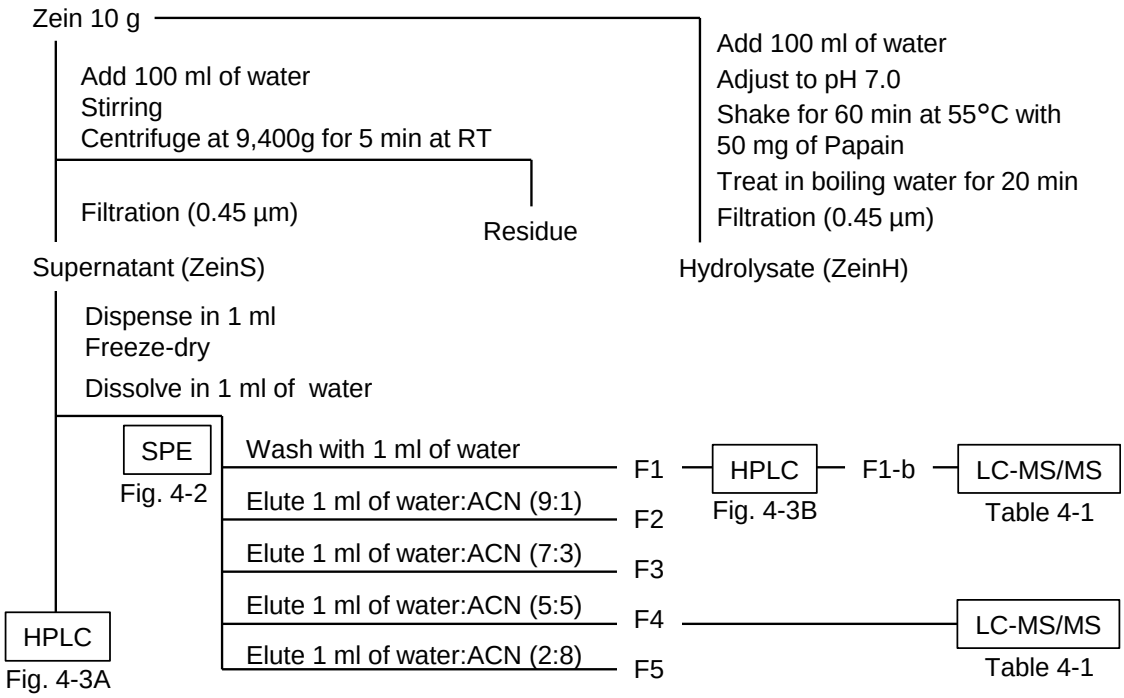

Fig. 4-1　　ZeinS 中の活性画分を評価するための分析手順

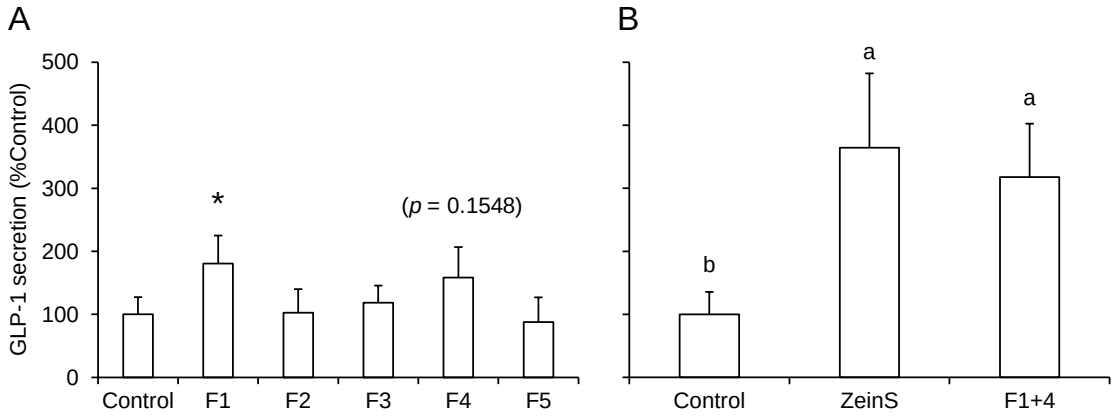

Fig. 4-2　GLUTag 細胞における ZeinS の SPE 分画物の GLP-1 分泌誘導活性

ZeinS を固相抽出カラムに供し、アセトニトリル-水混合溶媒によるステップワイス溶出を実施した。A）1 mL の 100%水（F1 : 非吸着画分）に続いて、F2、3、4、5 をそれぞれ 10%、30%、50%、80%のアセトニトリルで溶出し、各画分を回収した。B）他の画分よりも高い GLP-1 分泌誘導活性を示した F1 と F4 についてはそれらの混合物（F1+4）の活性を評価した。GLUTag 細胞を Control（HEPES バッファー）、ZeinS（1 mg/mL）および SPE 画分（ZeinS 1mg/mL 相当）に 60 分間暴露した。上清中の GLP-1 濃度は、その後、GLP-1 ELISA によって測定した。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n=3）。（A）Dunnett 法を用いた（*, $p < 0.05$）。（B）同じ文字を共有しない値は有意に異なる（Tukey 検定, $p < 0.05$）。

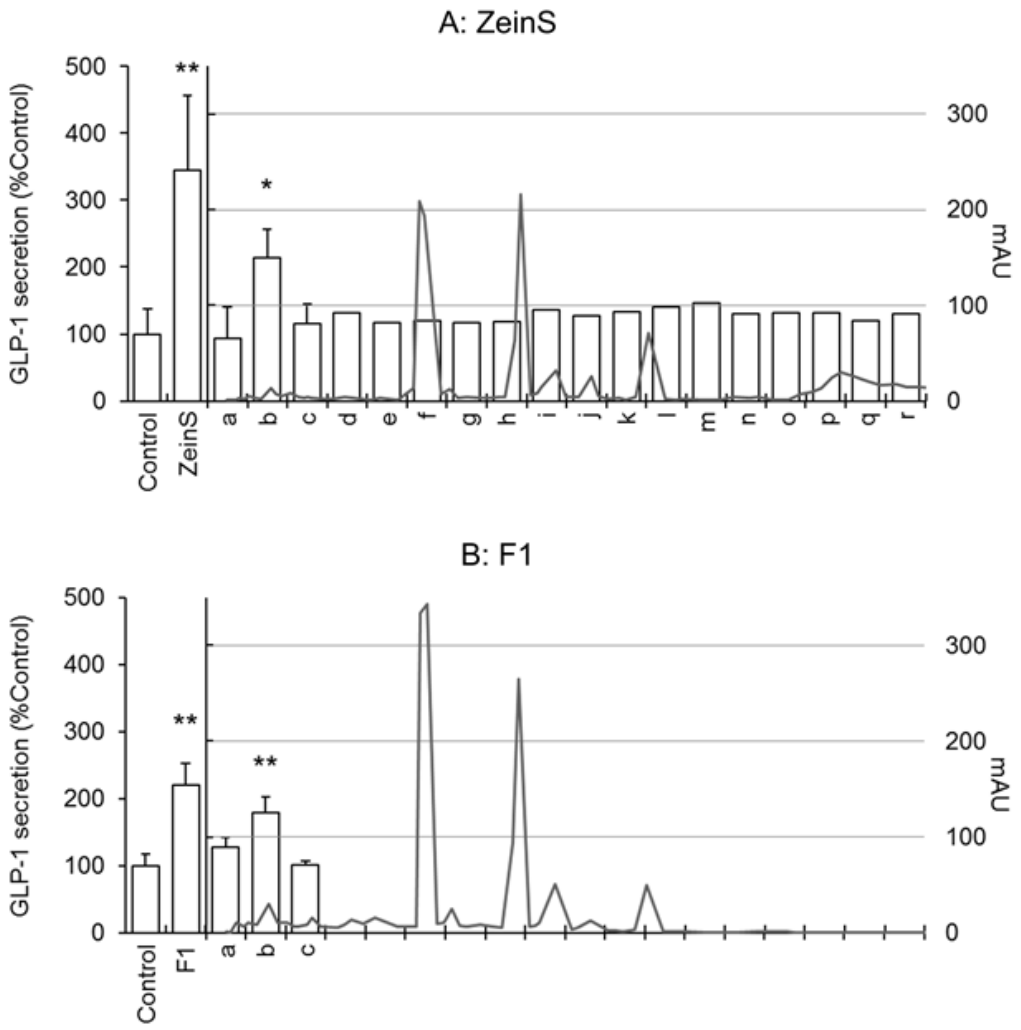

Fig. 4-3　ZeinS と F1 のクロマトグラムおよび GLUTag 細胞における HPLC 精製画分の GLP-1 分泌誘導活性

HPLC クロマトグラム（線）と、30 または 60 秒間隔で採取したフラクションの GLP-1 分泌誘導活性（棒グラフ）の重ね合わせ図。HPLC（逆相、A: MilliQ, B: acetonitrile, 0–30 min: 100–0%A, 0–100%B）にて ZeinS (A)および F1 (B)を分画し、GLUTag 細胞に Control（HEPES バッファー）、ZeinS（1 mg/mL）または F1（ZeinS 1mg/mL 相当）、および各画分（ZeinS 1 mg/mL 相当）を 60 分間暴露した。上清中の GLP-1 濃度を ELISA にて測定した。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD（n=3–4）または平均値（n=2–3, 画分 d–r, 統計解析対象外）で表した。統計解析は対応のない *t* 検定を使用した（*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs. control）。

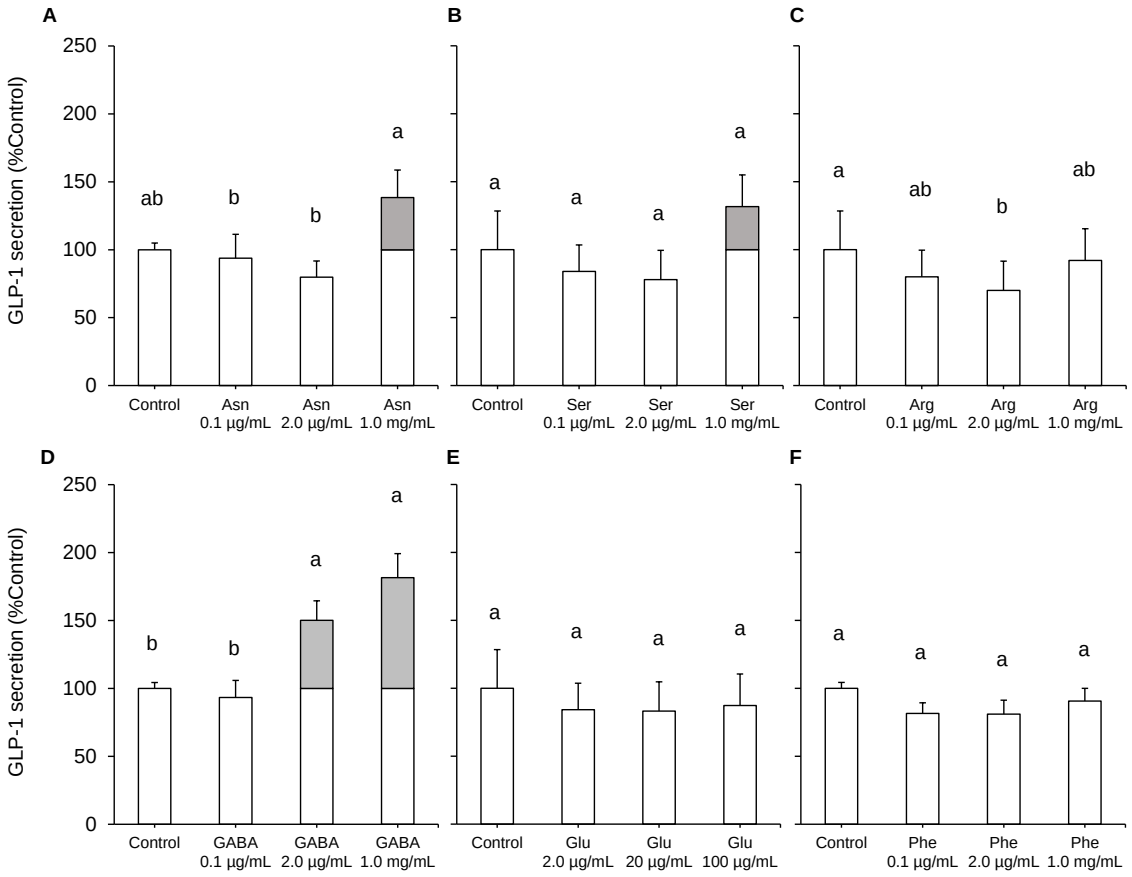

Fig. 4-4　GLUTag 細胞における同定された化合物の GLP-1 分泌誘導活性

GLUTag 細胞を Control（HEPES バッファー）および様々な用量のアミノ酸（0.1 µg/mL, 2.0 µg/mL, 1.0 mg/mL, Glu のみ: 2.0, 20, 100 µg/mL）に 60 分間暴露した。上清中の GLP-1 濃度を GLP-1 ELISA にて測定した。棒グラフの灰色の部分は被験物の効果を表している。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n=3）。同じ文字を共有しない値は、有意に異なる（Tukey 検定, $p < 0.05$）。

（Asn, asparagine; Ser, serine; Arg, arginine; GABA, γ-aminobutyric acid; Glu, glutamic acid; Phe, phenylalanine）

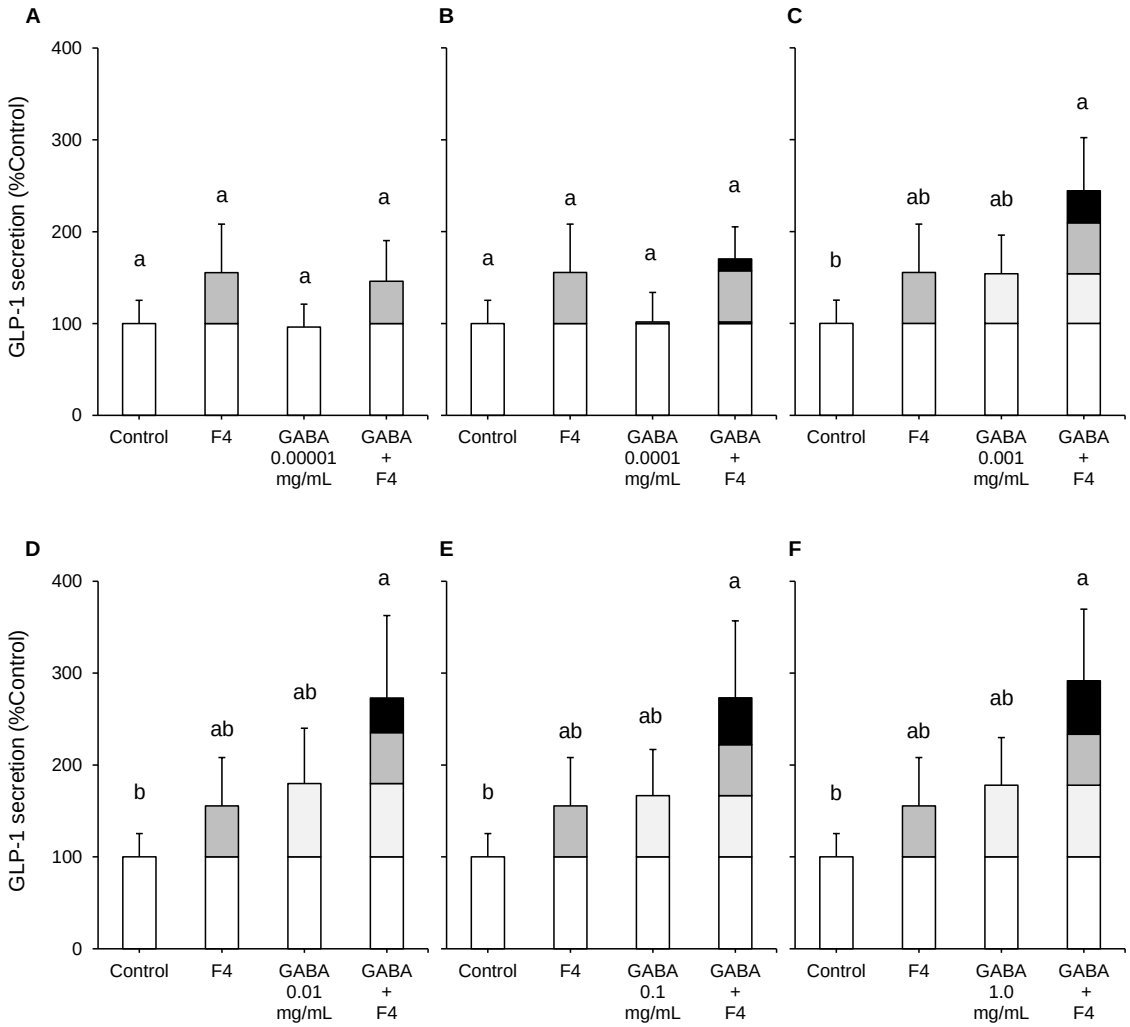

Fig. 4-5　GLUTag 細胞における同定された化合物（GABA）と F4 の併用による GLP-1 分泌誘導活性

GLUTag 細胞を Control（HEPES バッファー）、F4（ZeinS 1mg/mL 相当）、様々な濃度の GABA（0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 mg/mL）、およびそれぞれの混合物に暴露させた。棒グラフの灰色の部分は GABA もしくは F4 単独の効果を表し、黒色の部分は併用の相加的な効果以上の効果を表している。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n=3）。同じ文字を共有しない値は有意に異なる（Tukey 検定, $p < 0.05$）。

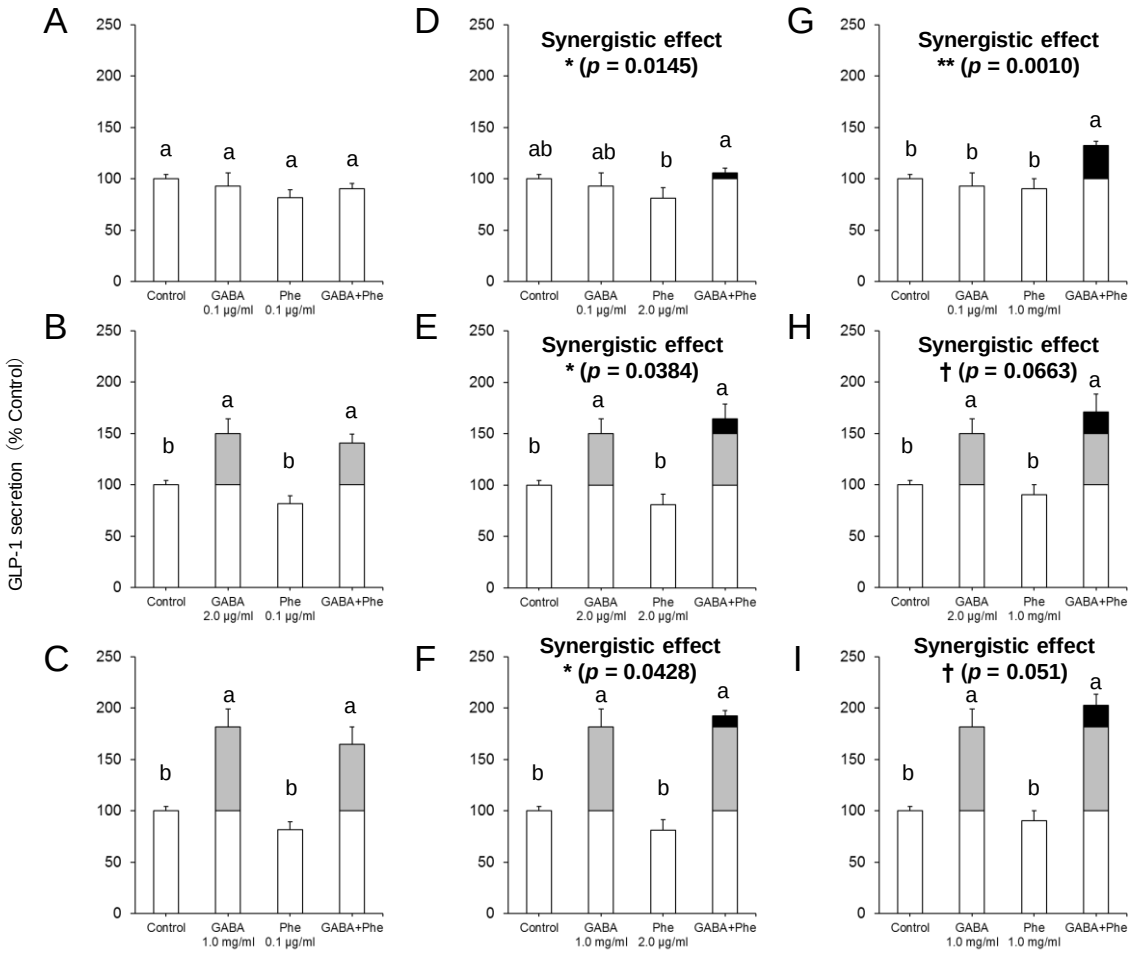

Fig. 4-6　GLUTag 細胞における同定された化合物の併用による GLP-1 分泌誘導活性

GLUTag 細胞を Control（HEPES バッファー）、様々な濃度の GABA（0.1 μg/mL, 2.0 μg/mL, 1 mg/mL）、Phe（0.1 μg/mL, 2.0 μg/mL, 1 mg/mL）、および 2 つの化合物の混合物に暴露させた。棒グラフの灰色の部分は GABA 単独の効果を表し、黒色の部分は 2 つの化合物の相加的な効果以上の効果を表している。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n=3）。相乗効果の有意性は、二元配置分散分析を用いて解析した。同じ文字を共有しない値は有意に異なる（Tukey 検定, $p < 0.05$）。

Table 4-1　LC-MS/MS で測定した ZeinS に含まれる代表的アミノ酸

Fraction	Molecular formula	Suggested compound	MS/MS (database search score)	Polarity	Exact mass (*m/z*)	Retention time (min)	Max area (arbitrary unit, 1.0×10^4)
F1-b	$C_4H_8N_2O_3$	Asparagine	99.6	+	132.0535	2.221	128.6
	$C_3H_7NO_3$	L-Serine	100.0	+	105.0426	2.167	81.7
	$C_6H_{14}N_4O_2$	DL-Arginine	97.7	+	174.1117	2.803	40.1
	$C_4H_9NO_2$	GABA	99.3	+	103.0633	2.908	28.6
	$C_5H_9NO_4$	L-Glutamic acid	98.7	+	147.0532	2.378	17.1
F4	$C_9H_{11}NO_2$	L-Phenylalanine	99.6	+	165.0790	13.815	2.8

ZeinS の活性画分に含まれるアミノ酸は、thermo scientific compound discoverer software を用いて同定した。（これらのアミノ酸は、他の研究において GLP-1 分泌を促進するものとして同定されている。）

Annotation sources: Predicted Compositions; mzCloud Search; mzVault Search; ChemSpider Search; MassList Match. MS/MS（database search score）： mzCloud Best Match.

（GABA, γ-aminobutyric acid; LC, liquid chromatography; MS/MS, tandem mass spectrometry）

4.5. 考察

これまでの検討結果として、ZeinH の活性画分として ZeinS が部分的に寄与する可能性を示した。ここでは ZeinS 由来の関与成分の特定を試みた。その結果、精製手法として汎用的な固相抽出を用いて粗活性画分 F1 と F4 を単離した。さらに、F1 と F4 の混和によって ZeinS の活性が再現され、その活性は単独の F1 および F4 の活性の合計よりも高い値を示したことから相乗効果が示唆された。次に、活性の高かった F1 に対して HPLC による追加の精製と活性評価を行い、その際の活性画分（F1-b）を質量分析した。その結果、GABA が候補化合物として同定された。GABA と F4 の併用により、単独の活性を上回る相乗活性が観察されたため、F4 には相乗作用に寄与する化合物が含まれる可能性が高いと考えられた。質量分析の結果、F4 からは Phe が同定された。Phe の単独活性は確認されなかったが、単独活性を示す GABA との併用による相乗作用が統計学的な交互作用として確認できた。

ここでの試験条件下では、先行研究（Osuga et al. 2022）とは異なり、Phe 単独では GLP-1 分泌作用は観察されなかった。ただし、同じ物質でも細胞株や実験方法の違いにより、GLP-1 分泌量にはかなりのばらつきがあることが報告されている（Reimann et al. 2004, Kuhre et al. 2016, Kamakura et al. 2020）。Osuga ら（2022）は、STC-1 細胞を用いて 10 mM の Phe に 120 分間暴露した際の GLP-1 分泌応答を報告している。対照的に、本研究では GLUTag 細胞を用いて 1.0 mg/mL（約 6 mM）以下の Phe に 60 分間暴露した後の反応を評価した。さらに、別の研究では、GLP-1 分泌促進物質（10 mM グルタミン）が GLP-1 分泌を促進し、120 分間にわたって分泌速度がゆっくりと増加することが報告されている（Reimann et al. 2004）。このため、実験方法の違いが先行研究との不一致に影響している可能性が考えられる。

これにより、ZeinS 由来の主要な関与成分として GABA と Phe が特定された。先行研究において、GABA と Phe それぞれについて GLP-1 放出効果が報告されているが（Gameiro et al. 2005, Mace et al. 2012, Osuga et al. 2022）、それらの併用が GLP-1 分泌における相乗効果をもたらすメカニズムの解明についてはさらなる検討が必要である。以降の研究では、GABA と Phe の作用メカニズム解明を目指すこととした。

4.6. 小括

ZeinS に関して、汎用的な手法（固相抽出, HPLC）にて活性画分を特定し、質量分析結果をもとに化合物を同定した。最終的に、複数の同定化合物について活性を確認し、GABA と Phe を単独および相乗活性を示す化合物として特定した。

5. ZeinS および活性成分の GLP-1 分泌促進機構の検討（*in vitro*）

5.1. 緒言

これまでに、トウモロコシ由来の難消化性タンパク質である ZeinS において GLP-1 誘導活性を示す化合物を複数同定した。その中で、特に GABA が単独で高い活性を示すことを明らかにした。また、Phe が GABA との組み合わせによって相乗的な活性を示す化合物であることを示した。

ここでは、ZeinS について GLP-1 分泌誘導活性の作用メカニズムを解明することを目的とした。これを明らかにすることで、GLP-1 の分泌に関与する分子をターゲットとした新しい機能性素材の開発や、それに伴う安全性確保に繋がることが期待される。

前章において、複数のアミノ酸成分の組み合わせによって相乗的な GLP-1 分泌応答が誘導されたことを報告した。このようなアミノ酸の相乗効果はこれまでに報告されていない。まず、細胞外の Ca^{2+}の関与を検討するため、Ca^{2+}を含まない HEPES バッファーで ZeinS と関連成分を溶解し、GLP-1 分泌誘導活性を評価した。続いて、GLP-1 産生細胞における外因性アミノ酸の細胞膜受容体反応を介した GLP-1 分泌促進を報告する既存情報に基づき、Phe の受容体として知られるカルシウム感知受容体（Calcium-sensing reseptor, CaSR）（Conigrave et al. 2000, Mace et al. 2012）および GABA の受容体として $GABA_{A/C}$ と $GABA_B$ 受容体（Owens and Kriegstein 2002, Hyland and Cryan 2010）に焦点を当てて、それぞれの受容体阻害剤処理下で GLP-1 分泌誘導活性を評価した。さらに、GLP-1 分泌の相乗効果は、長鎖脂肪酸や胆汁酸（内因性脂質リガンド）により Gq および Gs を介してシグナル伝達する 2 つの異なる受容体応答の結果として生じることを示す報告（Hauge et al. 2015, 2017）に基づき、阻害剤の複合処理下で GLP-1 分泌誘導活性を評価した。

5.2. 材料と方法

5.2.1. 試薬類

特に明記しない試薬や溶液は富士フイルム和光純薬㈱の特級以上の純度を使用した。

【阻害剤】

- Specific $GABA_A$ receptor antagonist
  - Bicuculline methiodide（cat. 2503; Tocris Bioscience, Bristol, UK, CAS: 40709-69-1）

- Selective antagonist for $GABA_B$ receptors
  - Phaclofen（cat. 0178; Tocris Bioscience, CAS: 114012-12-3）

- Saclofen（cat. 0246; Tocris Bioscience, CAS: 125464-42-8）

・ Specific $GABA_C$ receptor antagonist
  - TPMPA（(1,2,5,6-tetrahydropyridine-4-yl)methylphosphinic acid）（cat. 1040; Tocris Bioscience, CAS: 182485-36-5）

・ CaSR antagonist
  - NPS2143 hydrochloride（cat. SML0362; Sigma-Aldrich, CAS: 324523-20-8）
  - Calhex 231（cat. 17268; Cayman Chemical, CAS: 652973-93-8）

5.2.2. 細胞

「2.2.2. 細胞」参照

5.2.3. GLP-1 分泌試験

「2.2.3. GLP-1 分泌試験」参照

各サンプルの用量は以下の通り。

- ZeinS : 1 mg/mL
- SPE 分画物（F1, 4） : ZeinS 1 mg/mL 相当
- GABA : 0.1 μg/mL, 2.0 μg/mL, 1 mg/mL
- Phe : 0.1 μg/mL, 2.0 μg/mL, 1 mg/mL
- 阻害剤：
  - Bicuculline methiodide : 1 mM
  - TPMPA : 1 mM
  - Phaclofen : 1 mM
  - Saclofen : 1 mM
  - NPS2143 : 25 μM
  - Calhex 231 : 12.5 μM
  - 予備試験において GLP-1 分泌促進物質（ZeinS, GABA+Phe）の作用を抑制した阻害剤 3 種の混合液（Mix）
    - Bicuculline : 1 mM
    - NPS2143 : 25 μM
    - Calhex 231 : 12.5 μM

5.2.4. 被験物

5.2.4.1. ZeinS

「3.2.4.2. ZeinS」参照

5.2.4.2. ZeinS の SPE 分画物：（F1, 4）

「4.2.4.2. ZeinS の SPE 分画物：（F1–5）」参照

5.2.5. 細胞外 Ca^{2+}除去試験

細胞外の Ca^{2+}の関与を検討するために、「2.2.3. GLP-1 分泌試験」の HEPES バッファーを、Ca^{2+}を含まない HEPES バッファー（Ca^{2+}不含, 0.2 mM ethylene glycol tetraacetic acid（EGTA）添加）に置き換えて試験を実施した。

5.2.6. 阻害剤試験

ZeinS の GLP-1 分泌誘導作用に関して、同定化合物である GABA と Phe の細胞膜関連受容体、およびその他の候補受容体の影響を検討するために、各種阻害剤の共添加処理下で試験を実施した。

5.2.7. 統計解析

平均値±SD で表記した。各群間比較には Tukey 法を用い、有意水準は両側 5%とした。解析には SAS R9.4 を使用した。

5.3. 結果

ZeinS および同定された活性化合物の GLP-1 分泌誘導活性の作用メカニズムを検討した。

まず、Ca^{2+}不含 HEPES バッファー（0.2 mM EGTA 添加）を用いて細胞外の Ca^{2+}の関与を検討した。その結果、被験物による GLP-1 分泌誘導活性がほぼ消失した（Fig. 5-1）。同様に、基礎分泌も低下した（Fig. 5-2）。

次に、各種関連受容体阻害剤を用いて、各被験物の GLP-1 分泌活性に及ぼす影響を検討した。その結果、$GABA_A$ 受容体阻害剤（Bicuculline）または CaSR 阻害剤（NPS2143, Calhex231）の存在下では、ZeinS の GLP-1 分泌活性が有意に低下した（Fig. 5-3A, B）。一方、$GABA_B$ 受容体阻害剤（Phaclofen, Saclofen）または $GABA_C$ 受容体阻害剤（TPMPA）の存在下では、ZeinS の活性にほとんど影響がなかった（Fig. 5-3A, B）。さらに、活性への影響が認められた $GABA_A$ 受容体阻害剤（Bicuculline）と CaSR 阻害剤（NPS2143, Calhex231）を同時に用いた場合（Mix）、ZeinS の活性はほぼ消失した（Fig. 5-3C）。

同様に、GABA と Phe の中用量（各 2.0 μg/mL）における GLP-1 分泌活性は $GABA_A$ 受容体阻害剤（Bicuculline）処理により完全に消失したが（Fig. 5-3D）、高用量（各 1.0 mg/mL）では Bicuculline 処理はほとんど効果を示さず（Fig. 5-3E）、CaSR 阻害剤（NPS2143, Calhex231）処理は若干の活性を残して GLP-1 分泌作用を阻害した（Fig. 5-3E）。さらに、阻害剤の混合条件下（Mix）では GABA と Phe の併用活性に対しても活性の一部を残す同様の阻害効果を示した（Fig. 5-3E, Mix）。

5.4. 図表

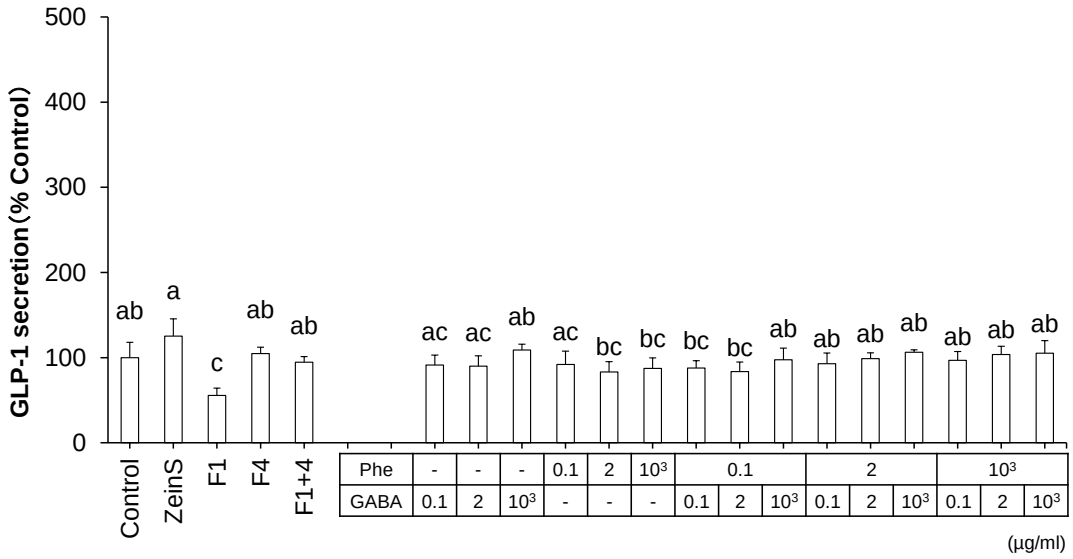

Fig. 5-1　GLUTag 細胞における細胞外 Ca^{2+}除去下での ZeinS および同定化合物暴露に対する GLP-1 分泌応答

GLUTag 細胞を HEPES バッファー（Ca^{2+}不含有, 0.2 mM EGTA）下で ZeinS（1 mg/mL）、ZeinS の SPE 活性画分、GABA（0.1 μg/mL, 2.0 μg/mL, 1 mg/mL）、Phe（0.1 μg/mL, 2.0 μg/mL, 1 mg/mL）および GABA と Phe 混合物に 60 分間暴露した。上清中の GLP-1 濃度を ELISA にて測定した。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n=3）。同じ文字を共有しない値は有意に異なる（Tukey 検定、$p < 0.05$）。

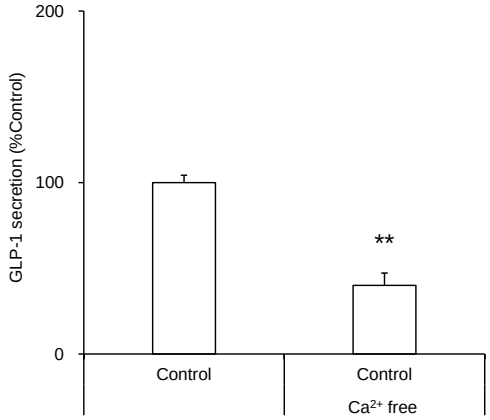

Fig. 5-2　GLUTag 細胞における細胞外 Ca^{2+}非除去または除去下での基礎 GLP-1 分泌

GLUTag 細胞を HEPES バッファー（Ca^{2+}不含有, 0.2 mM EGTA）に 60 分間暴露した。上清中の GLP-1 濃度を ELISA にて測定した。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD（n=3）として表した。統計解析は対応のない *t* 検定を使用した（**, $p < 0.01$ vs. control）。

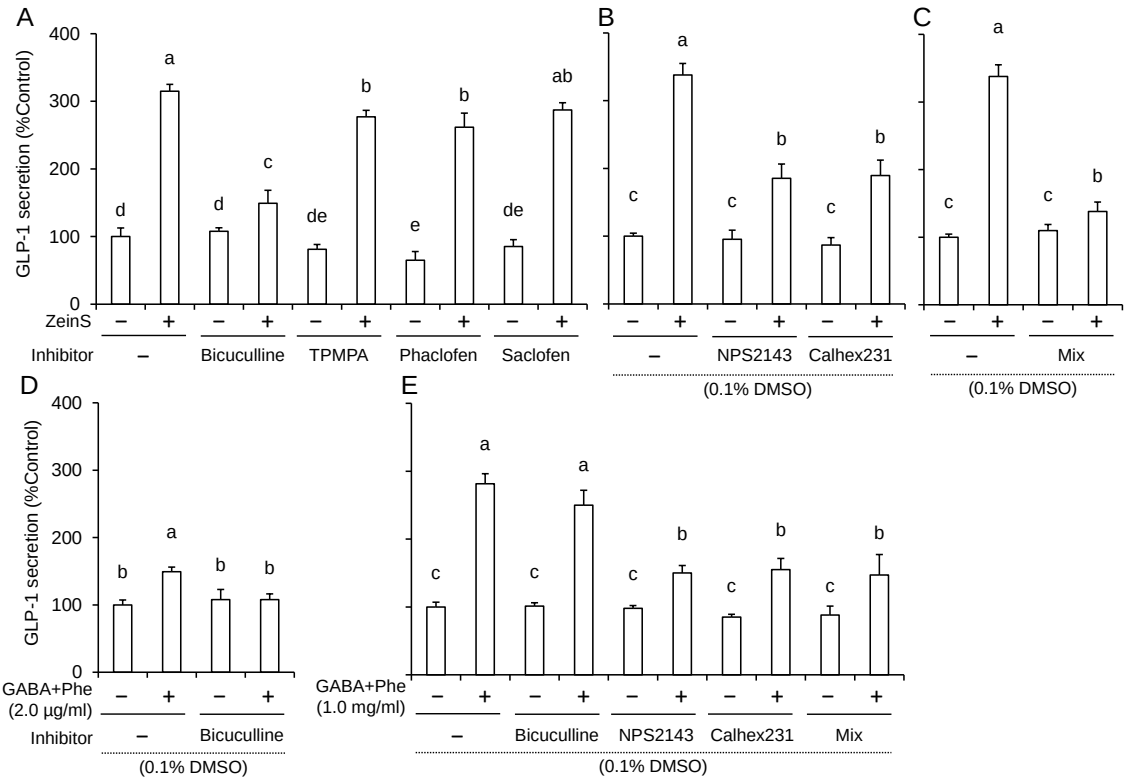

Fig. 5-3　GLUTag 細胞における ZeinS およびその活性化合物（GABA と Phe）と各種阻害剤の共添加による GLP-1 分泌誘導活性

種々の受容体に対する選択的/非選択的阻害剤存在下での ZeinS（1 mg/mL）および GABA と Phe の混合物（2.0 μg/mL, 1.0 mg/mL）の GLP-1 分泌誘導活性を評価した。各実験は、$GABA_A$（Bicuculline）、$GABA_B$（Phaclofen, Saclofen）、$GABA_C$（TPMPA）に対する阻害剤を 1 mM、さらに、CaSR（NPS2143, Calhex 231）に対する阻害剤をそれぞれ 25 μM、12.5 μM の存在下で実施した。Mix は、3 つの主要な阻害剤を混合したものを指す（Bicuculline: 1 mM, NPS2143: 25 μM, Calhex 231: 12.5 μM）。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n = 4）。各カラムの上に、様々な阻害剤を添加した場合と比較して、化合物が刺激した GLP-1 分泌の統計的差異を示した。同じ文字を共有しない値は、有意に異なる（Tukey 検定, $p < 0.05$）。

5.5. 考察

前章では、ZeinS に含まれる主要な活性成分として GABA と Phe を同定した。そこで当試験では、ZeinS が GLP-1 分泌を誘導するメカニズムの解明を目指し、細胞外 Ca^{2+}および細胞膜受容体が関与する可能性を *in vitro* 試験で検討した。

まず、ペプチドホルモンや神経伝達物質の分泌には細胞内カルシウムシグナルがセカンドメッセンジャーとして機能し、Ca^{2+}の供給源として細胞外液、小胞体等の細胞内 Ca^{2+}ストアが知られている。細胞外 Ca^{2+}の除去により、ZeinS に対する GLP-1 分泌応答が消失したことから、細胞外 Ca^{2+}が基礎分泌だけではなく、ZeinS による GLP-1 分泌誘導に関与する可能性が考えられた。したがって、ZeinS およびその活性成分である GABA と Phe の作用機序の一部として、細胞外の Ca^{2+}が寄与することが示唆された。

Gq タンパク質共役型受容体（GPCR）である CaSR は、細胞外 Ca^{2+}によって活性化されるほか（Brown et al. 1993, Nemeth et al. 1998, Magno et al. 2011）、アミノ酸（Phe, Trp）によって活性化されることが知られている（Rasoamanana et al. 2012, Alamshah et al. 2017, Acar et al. 2020）。その他、食事性アミノ酸やペプチドは L 細胞などの内分泌細胞に発現する GPCR の GPRC6A（Oya et al. 2013）や Gq/i-coupled GPR93（Choi et al. 2007）、GPR142（Rudenko et al. 2019）に対するアゴニストとして、GLP-1 分泌誘導効果を示すことが知られている（Modvig et al. 2021）。

GABA は中枢神経系において重要な神経伝達物質であり、$GABA_A$、$GABA_B$、$GABA_C$ 受容体という 3 つの構造的および薬理作用的に異なった受容体を介して作用する（Owens and Kriegstein 2002, 折出ら 2015）。$GABA_A$ と $GABA_C$ 受容体は Cl^-チャネル結合型であり、リガンド依存性イオンチャネルのファミリーに属する。一方、$GABA_B$ 受容体は GPCR に属する（Owens and Kriegstein 2002）。これらの 3 つの GABA 受容体は中枢神経系だけではなく、腸内分泌細胞が分布する消化管にも発現しており（Gameiro et al. 2005, Hyland and Cryan 2010）、GABA 阻害剤を用いた *in vitro* 試験により、$GABA_A$ および $GABA_C$ 受容体を介して GABA が GLP-1 分泌を誘導する作用が明らかにされている（Gameiro et al. 2005, 上野ら 2016）。

ここでは、ZeinS の活性が $GABA_A$（Bicuculline）および CaSR（NPS2143, Calhex231）の阻害剤処理によって低下することが確認された。腸内分泌細胞からの相乗的な GLP-1 分泌は、複数の細胞内シグナル伝達経路を介した細胞内 Ca^{2+}レベルの上昇、あるいはそれに加えて細胞内 cAMP レベルの上昇から生じると考えられる。Hauge らは、相乗的な GLP-1 応答は、長鎖脂肪酸や胆汁酸（内因性脂質リガンド）による Gq および Gs を介してシグナル伝達する 2 つの異なる受容体の相互作用によって誘導されることを示した（Hauge et al. 2015, 2017）。そこで、ZeinS の活性に関わるこれら 3 つの阻害剤（Bicuculline, NPS2143, Calhex 231）で同

時に処理した結果、ZeinS の活性がほぼ消失した。興味深いことに、3 つの主要阻害剤を併用しても、ZeinS の活性は完全には消失しなかった。これは、Gs シグナル伝達経路あるいは他の受容体への作用が寄与した可能性が考えられる。したがって、ZeinS の活性には GPCR 型受容体（CaSR）とイオンチャンネル型受容体（$GABA_A$）が複合的に寄与すると考えられる。一方、$GABA_B$ 阻害剤（Phaclofen, Saclofen）と $GABA_C$ 阻害剤（TPMPA）の処理による ZeinS の GLP-1 分泌活性の変化はわずか、あるいはほとんど見られなかったため、ZeinS の活性に対する $GABA_B$ 受容体と $GABA_C$ 受容体の関与は低いと思われた。

続いて、GABA と Phe の組み合わせによる GLP-1 分泌活性に対する影響を評価するため、先述の 3 つの主要な阻害剤（Bicuculline, NPS2143, Calhex 231）を、同様の用量条件で共投与して GLP-1 分泌抑制反応を検討した。この試験では、各化合物の中用量（2.0 μg/mL）および高用量（1.0 mg/mL）を評価した。GABA と Phe の組み合わせによる GLP-1 分泌活性は、ZeinS による GLP-1 分泌の阻害アッセイで観察されたように、阻害剤 3 種がそれぞれ存在する条件下で低下することが確認された。同様に、阻害剤 3 種を同時に処理した場合でも、GABA と Phe の組み合わせによる GLP-1 分泌活性は完全には消失しなかった。これは、GABA（1.0 mg/mL）による GLP-1 分泌活性が Bicuculline（1mM）処理では阻害されなかったためと考えられる。したがって、腸内分泌細胞における GABA と Phe による相乗的な GLP-1 分泌の促進には、$GABA_A$ 受容体と CaSR の共活性化による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与していることが示唆された。

5.6. 小括

ZeinS およびその主要な活性化合物である GABA と Phe について、GLP-1 分泌誘導の作用メカニズムの一部を明らかにした。すなわち、いずれの活性成分の作用にも細胞外 Ca^{2+} が寄与すること、また、ZeinS と GABA と Phe の組み合わせによる活性には GPCR 型受容体（CaSR）およびイオンチャンネル型受容体（$GABA_A$）が複合的に寄与することを明らかにした。

6. ZeinS 由来活性成分の追加探索（*in vitro*）

6.1. 緒言

これまでに、GLP-1 分泌誘導作用を介して食後血糖上昇抑制を示す機能性食品成分としてトウモロコシ由来タンパク質（zein）の水抽出画分（ZeinS）に着目し、その代表的な活性成分として、単独で活性を示す GABA と、GABA との組み合わせで相乗的な GLP-1 分泌誘導活性を示す Phe を見出した。また、ZeinS と GABA と Phe の組み合わせの GLP-1 分泌誘導作用の一部のメカニズムも明らかにした。ところが、これらの成分を臨床試験に進める際に、GABA は既に多くの食品に含まれており、GLP-1 分泌誘導活性を確保するための有効量に関する安全性情報が存在する一方で、Phe は香料としての用途に限定されており、臨床試験における適切な有効量についての安全性情報が不足していた。そのため、Phe に替わる GABA との併用で相乗作用を示す新たな成分を探索する必要が生じた。

リンゴ酸（Malic acid, MA）はトウモロコシ穀粒中に含まれる代表的な有機酸として知られており（Masuda et al. 1997）、天然の動植物中に広く存在する有機酸の一種でクレブス回路の代謝物でもある。現在、MA は食品添加物として清涼飲料などの酸味料や pH 調整剤、一般食品の調味料や品質改良剤として幅広く利用されており、その毒性は極めて低く、米国 Food and drug administration（FDA）においても一般的に安全と認められる物質（Generally Recognized As Safe, GRAS 物質）となっている（FDA 2022）。予備検討として ZeinS に含まれる MA を市販の定量キットを用いて測定したところ、0.0002%（w/w, zein 100 g あたり 2 mg）含有することが分かった。さらに、MA と GABA の組み合わせによる GLP-1 分泌活性に対する影響の予備検討では、相乗的な効果が示唆された。

そこで当試験では、GABA との組み合わせで相乗的な GLP-1 分泌誘導活性を示す Phe に替わる化合物として MA の有効性を確認することを目的に、GABA と MA の組み合わせによる GLP-1 分泌誘導活性を *in vitro* 試験で評価した。

6.2. 材料と方法

6.2.1. 試薬類

特に明記しない試薬や溶液は富士フイルム和光純薬㈱の特級以上の純度を使用した。

6.2.2. リンゴ酸定量分析

ZeinS 中の MA 濃度は市販アッセイキット（D/L-リンゴ酸, 株式会社ジェイ・ケイ・インターナショナル, 東京）にて測定した。

6.2.3. 細胞

マウス GLP-1 産生腸内分泌細胞株である STC-1 細胞は、Summit Pharmaceuticals International Corporation（東京）を通じて American Type Culture Collection（ATCC; Manassas, VA, USA）より入手した。STC-1 細胞は培養プレート中にサブコンフルエントに達するまで 37°C、5%CO_2 存在下で培養した。培地には、10% FBS（ATCC）、100 U/mL penicillin および 100 µg/mL streptomycin を含む DMEM を用いた。0.25%トリプシン-EDTA 処理を行い継代培養した（Sufian et al. 2007, Hira et al. 2009 を一部改変）。

6.2.4. GLP-1 分泌試験

アッセイは、Hira らが報告した方法（Sufian et al. 2007, Hira et al. 2009）に若干の変更を加えて実施した。

STC-1 細胞を 48 ウェルプレートに 1.0×10^5 cells/well の密度で播種し、48 時間培養を行った。培養培地を取り除き、HEPES バッファー（140 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 20 mM HEPES, 1.2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 10 mM D-glucose, 0.1% BSA, pH 7.4）にて well を洗浄後、同バッファーに溶解したサンプル（ZeinS 1 mg/mL 相当）をウェルに添加し、37°C にて 30 分間インキュベーションした。ウェルより上清を回収し、遠心分離後（800×g, 5 分, 4°C）の上清を回収し、GLP-1 濃度測定まで－80°C で保管した。総 GLP-1 濃度は ELISA 法（Merck Millipore）にて測定した。

なお、各サンプルの用量は以下の通り。

- GABA　: 1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、2 µg/mL（Fig. 6-2 のみ）
- MA　: 1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、2 µg/mL（Fig. 6-2 のみ）

6.2.5. 被験物

6.2.5.1. ZeinS

「3.2.4.2. ZeinS」参照

6.2.6. 統計解析

平均値±SD で表記した。相乗効果の有意性は、二元配置分散分析を用いて解析した。各群間比較には Tukey 法を用い、有意水準は両側 5%とした。解析には SAS R9.4 を使用した。

6.3. 結果

ZeinS に含まれる MA を測定した結果、予備試験の結果と同様に、Zein 100 g あたり 2 mg（w/w, 0.0002%）含有することが確認された。

GABA と MA の単独および併用による GLP-1 分泌誘導活性を評価した。その結果、GABA 単独では用量依存的な活性変化の傾向が観察されたが、MA 単独ではどの用量でも活性は認められなかった（Fig. 6-1, 6-2）。一方、GABA と MA の併用では、GLP-1 レベルが相乗的に増加し、この相乗効果は統計的に有意であった（Fig. 6-2, 二元配置分散分析による交互作用, $p < 0.01$）。

6.4. 図表

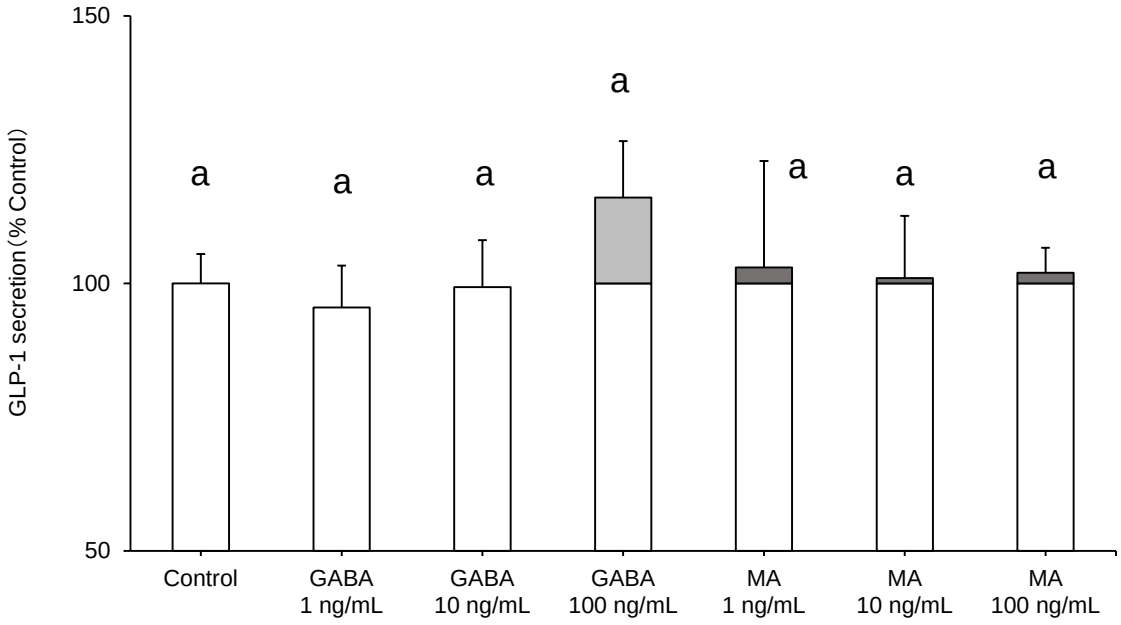

Fig. 6-1　STC-1 細胞における GABA と MA の GLP-1 分泌誘導活性

STC-1 細胞を Control（HEPES バッファー）、様々な濃度の GABA（1, 10, 100 ng/mL）および MA（1, 10, 100 ng/mL）に暴露した。棒グラフの灰色部分は GABA と MA 単独の効果を表している。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n=3）。（Tukey 検定, $p < 0.05$）。

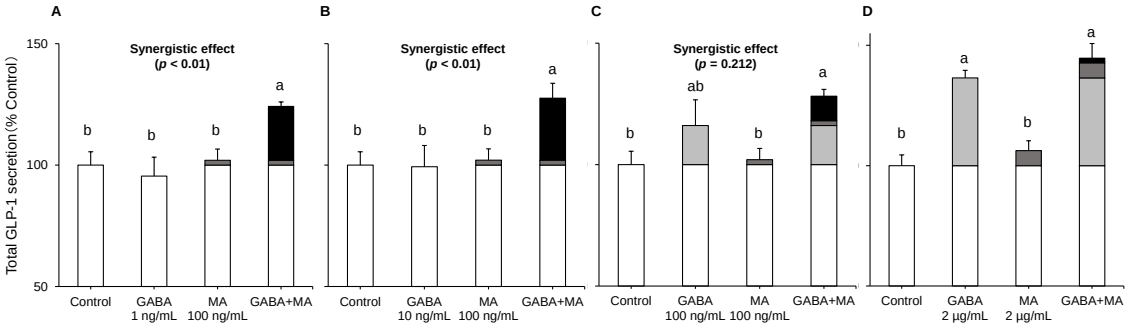

Fig. 6-2　STC-1 細胞における GABA と MA の併用による GLP-1 分泌誘導活性

STC-1 細胞を Control（HEPES バッファー）、様々な濃度の GABA（1, 10, 100 ng/mL, 2 μg/mL）および MA（100 ng/mL, 2 μg/mL）に暴露した。棒グラフの灰色部分は GABA と MA 単独の効果を、黒色部分は 2 つの化合物の相加的以上の効果をそれぞれ表している。数値は Control の GLP-1 分泌量に対する相対値（%）であり、平均値±SD で表した（n=3）。相乗効果の有意性は、二元配置分散分析を用いて解析した。同じ文字を共有しない値は有意に異なる（Tukey 検定, $p < 0.05$）。

6.5. 考察

これまでに、ZeinS に含まれる 2 成分、GABA と Phe の間で相乗的な GLP-1 分泌誘導作用を明らかにした。GABA については、引用研究から十分な安全性情報が確認できたが、Phe については十分な情報が得られなかった。今後の臨床試験の観点から、Phe に代わるより安全性の高い活性成分探索が必要と判断した。

当試験において、新たに ZeinS 中に存在する有機酸の一種である MA を確認し、その後、GABA 単独での GLP-1 分泌誘導作用に対する MA の相乗作用を検討した。その結果、GABA と MA の組み合わせによる GLP-1 分泌誘導活性への相乗効果を確認した。GLP-1 の相乗効果は、長鎖脂肪酸や胆汁酸（内因性脂質リガンド）により Gq および Gs を介してシグナル伝達する 2 つの異なる受容体応答の結果として生じることが報告されている（Hauge et al. 2017）。具体的には、この 2 つの経路の同時の活性化は、IP_3 と Ca^{2+} のレベルを上昇させることに加えて、細胞内 cAMP のレベルを上昇させ、顕著な GLP-1 分泌をもたらすことが示されている。また、第 5 章の *in vitro* 試験で示したように、GABA と Phe の組み合わせによる相乗的な GLP-1 分泌誘導活性には、イオンチャンネル型受容体（$GABA_A$）および GPCR 型受容体（CaSR）が複合的に寄与することを示した。したがって、GABA と MA の併用に

よる複合的な刺激が、それぞれの単独刺激に比べて細胞内 Ca^{2+}濃度を増加させ、あるいはそれに加えて cAMP レベルを増加させ、相乗的な GLP-1 分泌の増加を誘導した可能性がある。

GABA については、$GABA_A$ 受容体を介した GLP-1 分泌誘導の作用のほか、$GABA_B$ 受容体を介して Gq 経路を活性化することが報告されている（Chen et al. 2014, Karls and Mynlieff 2015）。一方、MA の作用機序はまだ不明確であるが、MA が、上部消化管のグレリン産生内分泌細胞の基底側表面へ発現が報告されている、G タンパク質共役型受容体 GPR81/ヒドロキシカルボン酸受容体 1（HCA1）のリガンドであることが示されている（Liu et al. 2009, Engelstoft et al. 2013, Steinert et al. 2017）。さらに、MA と同様に主要な酸味料である塩酸が STC-1 細胞からの GLP-1 分泌を誘導し、カルシウム流入阻害剤存在下でその分泌が減少することを示した報告がある（Geraedts et al. 2011）。細胞内 Ca^{2+}はペプチドホルモンの分泌にとって重要なセカンドメッセンジャーであるため、Phe の CaSR を介した細胞内 Ca^{2+}の動員作用と同様、MA による細胞内 Ca^{2+}レベルの変化が GABA との相乗効果を通じて GLP-1 分泌に影響を与える可能性が考えられた。

6.6. 小括

GABA と MA の組み合わせによる GLP-1 分泌誘導活性の相乗効果が *in vitro* 試験において認められたことから、Phe に代わる化合物として MA を見出した。

7. GABA とリンゴ酸の単回同時摂取が健康成人の GLP-1 分泌誘導および食後血糖応答に及ぼす影響の検討－無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験－

7.1. 緒言

これまでに、糖尿病対策に寄与する機能性食品成分候補としてトウモロコシタンパク質（zein）由来の GLP-1 分泌活性成分を特定した。これらの成分は、単独で GLP-1 分泌を誘導する作用するだけでなく、他の成分と組み合わせることで相乗的な GLP-1 分泌誘導活性を示すこともある。2 型糖尿病の特徴の一つとして、GLP-1 分泌応答の低下が示されており（Holst et al. 2011）、そのため、食品由来の GLP-1 分泌誘導素材の利用は糖尿病予防策として期待できる。ここでは、GABA とリンゴ酸（ラセミ体, MA）という候補成分の GLP-1 分泌誘導素材としての有効性と安全性を評価した。

GABA は穀類、果実類、野菜類などの食品に広く存在するアミノ酸の一種である。健康な成人の睡眠の質（寝つき、眠りの深さ、すっきりとした目覚め）の改善や、精神的なストレスや疲労感の緩和などの機能があることが報告されており（Hepsomali et al 2020）、多くの食品に添加物として使用されている。その生物学的効果は、中枢から末梢組織に存在する GABA 受容体の活性化によって説明される（Gameiro et al. 2005, Hyland and Cryan 2010）。また、腸内での GABA は、膜の脱分極を介して腸内分泌細胞（L 細胞など）からの GLP-1 分泌を促進することが *in vitro* 評価系にて報告されている（Gameiro et al. 2005）。さらに、健康な被験者における GABA 経口投与後の薬物動態、薬力学および安全性プロファイルが評価されている（Li et al. 2015）。この報告によると、GABA はヒトにおいて迅速に吸収され、安全性の懸念は認められなかった。さらに、膵島ホルモン分泌の増加に代表される内分泌作用は、GABA の糖尿病に対する治療効果の可能性を示唆していた。しかしながら、空腹時および摂食時における血中活性型 GLP-1 とグルコース値に関して、2 g GABA 1 回/日を単回経口投与、および、2 g GABA 3 回/日を 7 日間の連続経口投与後にプラセボ投与との間に有意な差は示されていない。

リンゴ酸（MA）は、天然の動植物中に広く存在する有機酸の一種であり、クレブス回路中の代謝物でもある。また、トウモロコシ穀粒中に含まれる代表的な有機酸としても知られている（Masuda et al. 1997）。現在、商業的に利用されている MA はラセミ体であり、食品添加物として清涼飲料などに用いられている。その毒性は極めて低く、米国 FDA においても GRAS 物質の一つである（FDA 2022）。MA は食後高血糖を改善する可能性があり、α-グルコシダーゼ活性の阻害に関しては *in vitro* で報告されているが（Gou et al. 2015）、GLP-1 などの消化管ホルモン分泌についての研究は未だ知られていない。

そこで当試験では、GABA と MA のヒトにおける有効性を検討するために、それらの成

分の単回同時摂取がヒトにおける GLP-1 分泌誘導および食後血糖応答に及ぼす影響について調査した。

7.2. 研究方法

健康成人男女最大 22 例を対象に、GABA と MA の混合物（Test）もしくはプラセボを単回投与し、GLP-1 分泌応答および食後血糖値への影響について調査した。

7.2.1. 被験者

糖代謝が正常型もしくは境界型（空腹時血糖が 126 mg/dL 未満かつ 75 g 経口ブドウ糖負荷試験（oral glucose tolerance test; OGTT）2 時間値 200 mg/dL 未満）かつ BMI が 18.5 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満の 20 歳以上 50 歳未満の男女 22 例を研究に組み入れた。本研究では 192 例がスクリーニング検査を受けた。薬物および食物アレルギーのある者、重篤な既往のある者、アルコール多飲者および過度の喫煙者、試験に影響する可能性のある医薬品、特定保健用食品、健康食品等を常用している者、妊婦あるいは授乳婦、その他試験責任医師により本試験参加に不適切と判断された者は予め除外した。事前検診およびスクリーニングの結果から総合的に被験者を決定した。最終的に適格と判断された 22 例が無作為化された。投与完了例は全例であった（試験食品を摂取した被験者は 22 例であった）。うち 2 例を解析逸脱例（検査期間中の服薬、コンプライアンス違反）と判断し、最終的な有効性の解析対象は 20 例とした。安全性の解析対象の除外例はなかった。なお、本試験は、福原医院治験審査委員会（IRB 番号 20000005）の承認を受け、UMIN-CTR に登録された（UMIN000041578）。「ヘルシンキ宣言」および「臨床研究に関する倫理指針」に則り、本試験に参加を希望した者に対して研究内容、方法などについて十分な説明を行い、文書による同意を得て、福原医院（北海道恵庭市）にて実施した。

7.2.2. 研究方法の概要および期間

本研究は無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験である。事前検診・スクリーニング検査（Visit 1）、前観察期間（スクリーニング期間を含めて 5〜6 週間）、単回摂取期間（本検査I・II期（Visit 2, 3）：本検査期間 2 週間の間に約 1 週間の休止期間を設けて計 2 回の摂取（1 回/検査日））、後観察期間（Visit 4: 本検査後 1 週間）からなる。研究参加の同意が得られた被験者候補に対し、事前検診として規定の検査を実施した。各検査来院日の前日は、提供した食品（3 食規定食）および水（規定水）のみを摂取した。適格性基準に基づき、被験者候補の中から、事前検診結果をもとに被験者を決定した。被験者、研究実施機関の関係者、およびすべての研究関係者に対して、研究が完了してデータが固定される

までは被験食摂取群の盲検性が保たれた状態とした。

概略図を以下に示す。

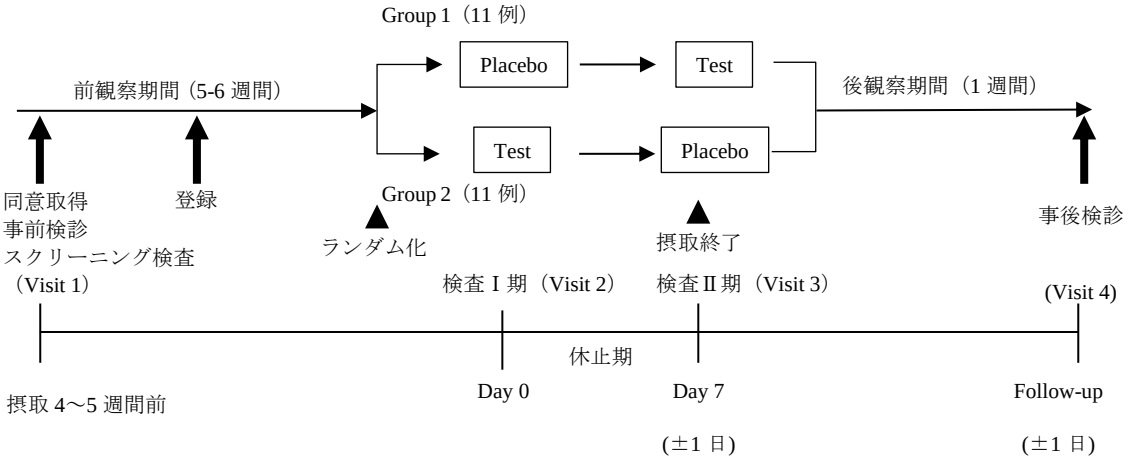

Fig. 7-1　試験スケジュール

7.2.3. 介入の概要

本研究で用いた試験食品の概要を以下に示す。

Table 7-1　試験食品の概要

試験食品名称	Placebo	Test
主成分および含量または本質	pH 調整剤：クエン酸 （風味外観調整）	GABA MA
形状	粉末	
用量、用法および摂取期間	・pH 調整剤：クエン酸 400 mg 風味への影響を考慮して、Test 群の被験食品の pH と酸度に近づけるため、1 回の摂取量を 400 mg に設定した。	・GABA：400 mg ・MA：400 mg
	摂取日に常温の規定水 50 mL に溶解して単回摂取 ・摂取日に各試験食品を常温の規定水を用いて必要量調製 ・調製液を割付コード表に従って規定量を分注	
保管条件	遮光、常温（18-25°C）	

7.2.4. 研究スケジュール

研究計画書で規定した以下の表に従って研究を実施した。

Table 7-2　研究スケジュール

実施項目		事前検診	摂取期間		事後検診
		Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
		摂取開始 5〜6 週間前	摂取 1 Day 0	摂取 2 Day 7	終了（中止） Day 14
同意取得 [a]		○	○		
被験者背景の確認 [b]		○			
ランダム化			○		
規定食（来院前日）		○	○	○	○
試験食品摂取			●	●	
医師診察		○	●	●	○
理学的検査 [c]		○	○（体温）	○（体温）	○
臨床検査	血液学的検査 [d]	○	○	○	○
	血液生化学検査 [e]	○	○	○	○
	免疫学的検査 [f]	○			○
	尿検査 [g]	○			○
糖/食事負荷試験 [h]		○（75 g グルコース）	●（食事）	●（食事）	
事前アンケート		○			
生活日誌 [i]		←	—	—	→
簡易型自記式食事歴法質問票		○			
食事調査票		←	—	—	→

○印は試験食品摂取開始前に行う項目、●印は試験食品摂取開始後に行う項目

a: 事前検診期間の開始 1 週間前までに事前説明を行い、事前検診 3 日前までに同意書取得。

b: 調査項目：性別、年齢、合併症、既往歴、現病歴、前治療など

c: 理学的検査：身長（事前検診時のみ）、体重、体脂肪率、BMI、血圧および脈拍（自動血

圧測定装置）による 2 回測定）、体温

d: 血液学的検査項目：WBC、RBC、Hb、Ht、Plt、MCV、MCH、MCHC。これらは安全性を確認するために行った。

e: 血液生化学検査項目： BS、Ins、TP、ALB、TBI、ALP、LDH、AST、ALT、γ-GTP、T-Cho、HDL-C、LDL-C、TG、FFA、HbA1c（事前・事後検診のみ）、UA、BUN、CREA、Na、Cl、K。これらは安全性を確認するために行った。

f: 免疫学的検査項目：HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗原抗体および梅毒血清反応を測定した。これらは研究担当者の安全を確保するために行った。

g: 尿検査項目：比重、pH、ケトン体、潜血反応、ウロビリノーゲン、ビリルビン、蛋白定性、糖定性。これらは安全性を確認するために行った。

h: GLP-1、BS、Ins。GLP-1 については、事前検診時は総 GLP-1 のみ、本検査期は総 GLP-1 と活性型 GLP-1 の両方を測定した。これらは有効性評価のために行った。

i: 生活日誌：体調、歩数および制限事項の遵守状況の確認など

7.2.5. 研究手順

以下の手順に従って研究を実施した。

1） 同意取得

「ヘルシンキ宣言」および「臨床研究に関する倫理指針」に則り、本試験に参加を希望した者に対して研究内容、方法などについて十分な説明を行い、文書にて研究参加の同意を得た。

2） スクリーニング（Visit 1）

研究参加の同意が得られた被験者候補に対し、事前検診およびスクリーニング検査として規定の検査を実施した。

前日は、提供した食品（規定食）および水（規定水）のみを摂取した。定刻（9 時 00 分）までに集合し、座位安静を維持し、肘静脈より空腹時の採血を行った後に、75 g ブドウ糖液を定刻（10 時）に摂取させた。ブドウ糖液摂取開始時間を 0 分とし、摂取 15、30、60、120 分後に肘静脈から採血を行い、血漿中総 GLP-1 濃度（#27788: GLP-1 (9-36/37) Assay Kit – IBL, 株式会社免疫生物研究所）、血糖値（株式会社エスアールエルに分析委託）、血清インスリン（株式会社エスアールエルに分析委託）濃度の推移を測定した（採血量, 採血管仕様は後述）。

研究責任医師は「7.2.1. 被験者」に示した被験者候補の中から、事前検診結果をもとに被

験者を決定した。

Table 7-3　スクリーニング検査の採血量と採血管（Visit 1）

	回数	採血量（/回）	採血管
スクリーニング検査	5 回	総 GLP-1： 2 mL 血糖値： 2 mL インスリン：3 mL	EDTA-2Na^{+}入り フッ化 Na 入り 血清分離剤入り

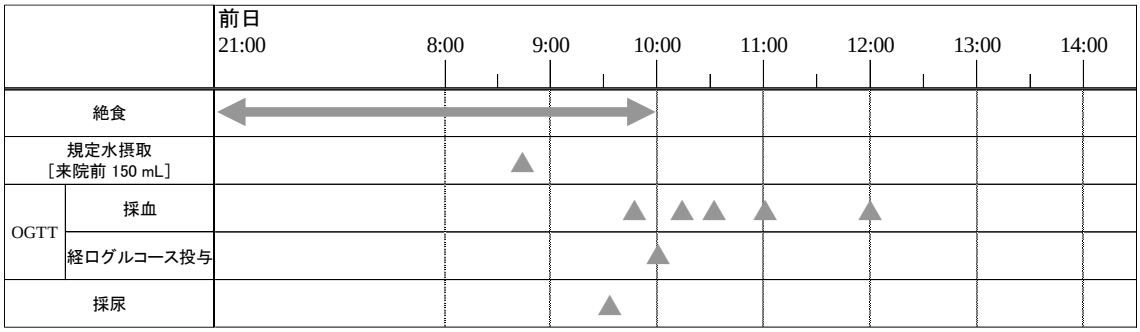

Fig. 7-2　事前検診・スクリーニング検査のタイムコース（Visit 1）

3）　無作為化

事前検診時の年代、性別によって層別化し、置換ブロック法により無作為化割付けを行い、各群の例数が出来るだけ均等になるように 2 群に分けた。

4）　摂取試験（Visit 2, 3）

前日は、提供した食品（規定食）および水（規定水）のみを摂取した。定刻（9 時 00 分）までに集合し、座位安静を維持し、静脈より空腹時の採血（9 時 20 分～、Pre 値）を行った後に、Placebo あるいは Test のいずれかを食事負荷試験（meal tolerance test, MTT）開始前に摂取させた（9 時 40 分～、−20 分）。米飯（サトウのごはん 200 g）を約 10 分かけて摂取し（10 時～）、食事終了後は規定水を 100 mL 摂取した。MTT 開始時間を 0 分とし、開始 15、30、45、60、90、120、180 分後に採血を行い、GLP-1（総・活性型）、血糖値、インスリンの推移を測定した。検査中（9 時から 13 時）は座位安静を維持した。

Table 7-4　本検査の採血量と採血管（Visit 2, 3）

	回数	採血量（/回）	採血管
摂取	8 回/試験×2 試験	総 GLP-1： 2 mL 活性型 GLP-1：2 mL 血糖値： 2 mL インスリン：3 mL	EDTA-2Na^{+}入り プロテアーゼおよびエステラーゼ阻害薬、DPP-IV 阻害薬入り フッ化 Na 入り 血清分離剤入り

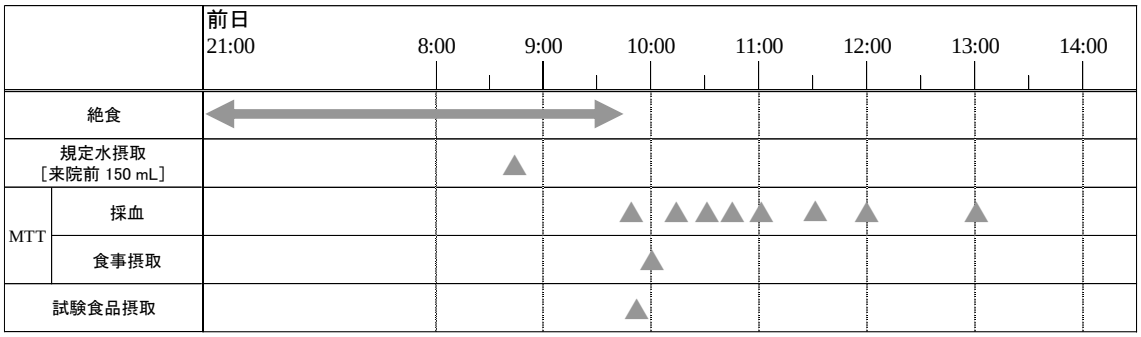

Fig. 7-3　本検査のタイムコース（Visit 2, 3）

5）　事後検診（Visit 4）

検査II期目終了約 1 週間後に、被験者に対し、事後検診として規定の検査を実施した。試験責任医師は、被験者が事後検診を終了し、その健康状態に異常が認められない場合に当試験の完了例と見なした。今回、研究責任医師が必要と判断した追跡調査事例は生じなかった。

7.2.6. 盲検化

本研究は二重盲検試験である。被験者、研究実施機関の関係者、及びすべての研究関係者に対して、研究が完了してデータが固定されるまでは試験食摂取群の盲検性が保たれた状態とした。なお、緊急開錠は生じなかった。

7.2.7. 制限事項

7.2.7.1. 日常生活における制限事項

本研究では、研究期間（事前検診の 1 週間前およびI期 1 週間前から事後検診当日の検査終了まで）中、原則として試験に影響する可能性のある医薬品、特定保健用食品、健康食品等の摂取や、食習慣、喫煙習慣、および運動習慣の変化、献血行為を制限した。来院時には制限事項の遵守状況を確認した。制限事項の逸脱が判明した場合は、その対応について協議した。

7.2.7.2. 規定食および飲水に関する要件

被験者は、検査前日の飲料は水のみ、スクリーニング時と同じ摂取時間帯に規定食を摂取した。検査当日は、起床後試験実施施設に来院する前までに水（規定水）をコップ 1 杯程度（約 150 mL）摂取した。これ以降、検査終了まで検査時に提供される試験食品および提供飲料水以外の飲食を禁止した。

事前検診・スクリーニング日、検査I期、検査II期、事後検診の前日の規定食（3 食）は既製品を用いた。

7.2.8. 評価項目

7.2.8.1. 有効性の評価

1） 主要評価項目

・ 被験食品単回摂取後の MTT 中の血漿中総 GLP-1 濃度の変化

（評価時点： 食事負荷開始時間を 0 分とし、開始 15、30、45、60、90、120、180 分後。なお、ベースラインは試験食品摂取前）

2） 副次的評価項目

・ 被験食品単回摂取後の MTT 中の血糖値、血清インスリン濃度、血漿中活性型 GLP-1 濃度の変化

（評価時点：主要評価項目と同様）

7.2.8.2. 安全性の評価

・ 事前検診から研究終了日（事後検診）までに生じた理学的・血液学的検査の異常変動

・ 同意摂取時から研究終了日（事後検診）までに生じた有害事象の発生頻度

7.2.9. 解析対象集団

解析対象集団は以下のとおりとした。

1） Full analysis set（FAS）：最大の解析対象集団

無作為化を行った全ての被験者から、以下に該当する者を除外した被験者集団

・試験食品を一度も摂取していない被験者

・試験食品を 1 回以上摂取したが、摂取後のデータのない被験者

・“主要な適格性基準”を満たさない被験者

2） Per protocol set（PPS）：研究計画書に適合した対象集団

FAS のうち、以下に該当する者を除外した被験者集団。ただし、下記以外の制限事項の逸脱例等、問題となるデータが得られた場合は、研究責任医師等の助言を得て、データの取扱いを決定した。

・制限事項を満たしていない被験者

・“主要評価項目の測定値”が利用不可能な被験者

・重大な研究計画書違反（FAS で規定した主要な適格性基準以外の適格性基準違反、禁止薬の併用、服薬の不遵守 等）

3） Safety analysis set（SAS）：安全性解析対象集団

試験食品を 1 回以上摂取した全ての被験者集団

7.2.10. 解析方法

7.2.10.1. 有効性の解析

1） 主要評価項目の解析

すべての検定は両側検定を行い、統計解析は、SAS software（R9.4, SAS Institute Japan）を使用した。

検定はクロスオーバーデザインを考慮した分散分析（要因として、試験食、時期、群、被験者）を行った。また、経時データの解析には、混合モデルを用い、時点ごとについては試験食と時間の交互作用で検定した。

各評価項目は、平均値±SD で表記した。検定の有意水準は 5 %、傾向差は 10 %とした。

欠測値の補完および外れ値の除外は行わなかった。

2） 副次的評価項目の解析

すべての検定は両側検定を行い、統計解析は、SAS software（R9.4, SAS Institute Japan）を使用した。

検定はクロスオーバーデザインを考慮した分散分析（要因として、試験食、時期、群、被

験者）を行った。経時データの解析には混合モデルを用い、時点ごとについては試験食と時間の交互作用で検定した。

各評価項目は、平均値±SD で表記した。検定の有意水準は両側 5 %、傾向差は 10 %とした。

欠測値の補完および外れ値の除外は行わなかった。

7.2.10.2. 安全性の解析

尿の半定量値以外の項目についての検定は対応のある *t* 検定（両側）を行った。尿の半定量値についての検定は Wilcoxon の符号付順位和検定を行った。

各評価項目は、尿の半定量値以外の項目については平均値±SD で、尿の半定量値についてはグレード/例数で表記した。検定の有意水準は 5%とした。

同意取得後の被験者の有害事象の発現の有無を確認し、発現頻度、発現時刻（検査日: 被験物摂取からの経過時間, 前後観察期間: 日時）、症状の程度等を集計した。

7.3. 結果

7.3.1. 被験者

7.3.1.1. 被験者の内訳

同意を取得した被験者の内訳を Fig. 7-4 に示した。

本研究では 192 例がスクリーニング検査を受けた。適格と判断された 22 例が無作為化された。試験食品を摂取した被験者は 22 例であった（Placebo: 22 例, Test: 22 例）。

無作為化された 22 例中、投与完了例は全例であった。中止例はなかった。

7.3.1.2. 逸脱

研究計画書からの重要な逸脱に該当した被験者を Table 7-5 に示した。解析対象集団として以下の逸脱例を考慮して解析を実施した。

本研究では重要な逸脱が 2 例に報告された。当該 2 例は有効性の解析対象（PPS）から除外した。安全性の解析対象（SAS）から除外されることはなかった。

Table 7-5　研究計画書からの重要な逸脱

被験者 ID	逸脱理由
11	本検査期間中の服薬
17	制限事項の不遵守

7.3.1.3. 盲検性が破られた被験者

いずれの被験者も盲検性は維持された。

7.3.2. 有効性の評価

7.3.2.1. 解析したデータセット

有効性の評価は「PPS」とするが、FAS による解析も併せて行い、二つの対象集団により同じ結論が導かれることを確認した。一方、安全性の評価は「安全性の解析対象（SAS）」を用いた。各解析対象集団の定義は「7.2.9. 解析対象集団」に示した。

データの取扱いは盲検下で決定し、開鍵した。有効性解析対象集団の不採用例一覧表を「7.3.1.2. 逸脱」に記載した。

7.3.2.2. 被験者背景

解析対象集団の被験者背景を Table 7-6 に示した。

本研究の各解析対象集団（FAS, PPS, SAS）では、すべての群で被験者層に特記すべき大きな違いはなかった。

7.3.2.3. 試験食品摂取の遵守状況

いずれの摂取群でもすべての被験者で摂取率は 100%であった。

7.3.2.4. 有効性の解析

有効性の評価は PPS を主たる解析対象とした。

1)　主要評価項目の解析結果

被験食品単回摂取後の MTT 中の血漿中総 GLP-1 濃度の変化：

食事負荷後血漿中総 GLP-1 濃度の経時変化および上昇曲線下面積の比較結果を Fig. 7-5 に示した。

平均ピーク濃度（C_{max}）は Placebo（23.5 ± 7.7 pmol/L）に比べて Test（27.4 ± 10.2 pmol/L,

$p < 0.05$）で有意に高値を示した。ベースラインからの変化量（⊿C_{max}）は Placebo（12.7 ± 6.3 pmol/L）に比べて Test（16.6 ± 9.7 pmol/L, $p = 0.0715$）で高値傾向を示した。

混合モデルによる経時データ解析の結果、「試験食」（$p < 0.05$）と「時間」（$p < 0.01$）による差はいずれも有意であった。「試験食」と「時間」の交互作用（$p = 0.13$）に有意差は認められなかった。さらに、各時点での解析の結果、血漿中総 GLP-1 濃度は食事負荷後 45、60 分値で Placebo と比較して Test で有意に高値を示した（45 分: $p < 0.01$, 60 分: $p < 0.01$）。

iAUC（0–180 分）についてクロスオーバーデザインを考慮した分散分析の結果、Placebo（1148 ± 496 pmol/L·min）と比較して Test（1433 ± 597 pmol/L·min, $p < 0.05$）で有意に高値を示した。

2） 副次的評価項目の解析結果

被験食品単回摂取後の MTT 中の血漿中活性型 GLP-1 濃度、血糖値、血清インスリン濃度の変化：

<u>活性型 GLP-1</u>：

食事負荷後血漿中活性型 GLP-1 濃度の経時変化および上昇曲線下面積の比較結果を Fig. 7-6 に示した。

C_{max} は Placebo（4.54 ± 1.82 pmol/L）に比べて Test（5.56 ± 2.33 pmol/L, $p = 0.0573$）で高値傾向を示した。⊿C_{max} は Placebo（2.59 ± 1.11 pmol/L）に比べて Test（3.78 ± 2.13 pmol/L, $p < 0.05$）で有意に高値を示した。

混合モデルによる経時データ解析の結果、「試験食」（$p < 0.01$）と「時間」（$p < 0.01$）による差はいずれも有意であった。「試験食」と「時間」の交互作用（$p = 0.11$）に有意差は認められなかった。さらに、各時点での解析の結果、血漿中活性型 GLP-1 濃度は食事負荷後 45、60 分で Placebo と比較して Test で有意に高値を示した（45 分: $p < 0.01$, 60 分: $p < 0.01$）。

iAUC（0–180 分）についてクロスオーバーデザインを考慮した分散分析の結果、Placebo（206 ± 130 pmol/L·min）と比較して Test（325 ± 169 pmol/L·min, $p < 0.01$）で有意に高値を示した。

<u>血糖値</u>：

食事負荷後血糖値の経時変化および上昇曲線下面積の比較結果を Fig. 7-7 に示した。

C_{max} と⊿Cmax において統計学的な群間差は認められなかった。

混合モデルによる経時データ解析の結果、「時間」（$p < 0.01$）による差は有意であった。

その際の「試験食」（$p = 0.67$）と「試験食」と「時間」の交互作用（$p = 0.92$）に有意差は認められなかった。

iAUC（0–180 分）についてクロスオーバーデザインを考慮した分散分析の結果、統計学的な群間差は認められなかった。

血清インスリン濃度：

食事負荷後血清インスリン濃度の経時変化および上昇曲線下面積の比較結果を Fig. 7-8 に示した。

C_{max} と⊿Cmax において統計学的な群間差は認められなかった。

混合モデルによる経時データ解析の結果、「時間」（$p < 0.01$）による差は有意であった。その際の「試験食」（$p = 0.49$）と「試験食」と「時間」の交互作用（$p = 0.90$）に有意差は認められなかった。

iAUC（0–180 分）についてクロスオーバーデザインを考慮した分散分析の結果、統計学的な群間差は認められなかった。

7.3.2.5. 有効性の結果の要約

PPS 解析の結果、GLP-1（総・活性型）では食事負荷後の経時的変化および曲線下面積において、Placebo と比較して Test で GLP-1 分泌促進効果が認められた。一方、食事負荷後血糖値と血清インスリン濃度については試験食間に差は認められなかった。

7.3.3. 安全性の評価

7.3.3.1. 試験食品を摂取した被験者数、期間および摂取量

本研究では，試験食品を 1 回以上摂取した全例が安全性解析対象となった。

本研究では被験者 22 例が Test および Placebo を単回摂取した。その用量は、Test は「GABA 400 mg＋MA 400 mg」、Placebo は「クエン酸 400 mg」であった。

7.3.3.2. 安全性の結果の要約

理学的検査・臨床検査値の変動は数件確認されたが、いずれも有害事象（異常変動）ではないものと研究責任医師により判断された。本研究での有害事象の要約を Table 7-7 に示した。有害事象は、22 例中 5 例に発現した。いずれの有害事象についても、非重篤な有害事象と判断され、研究期間内での消失を確認した。また、発生のタイミングや被験者への聞き取り内容から、試験食品摂取に伴うものではないものと判断された。

7.4. 図表

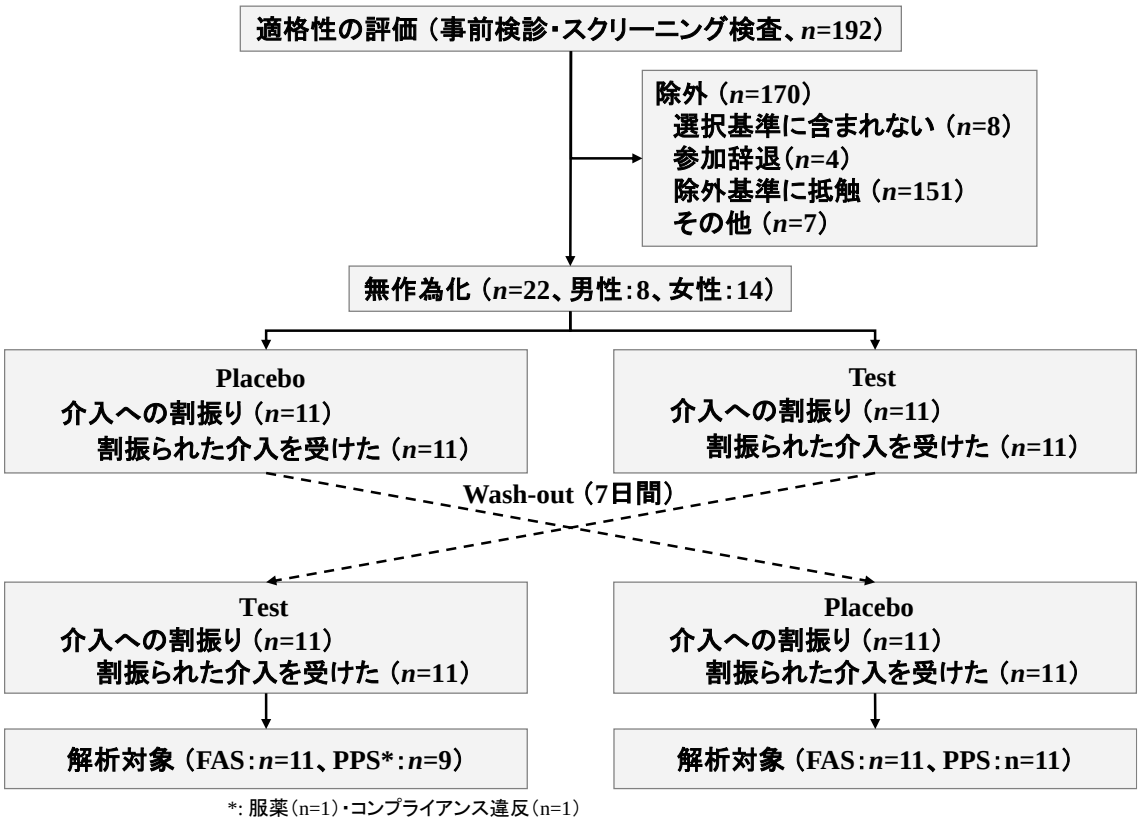

Fig. 7-4　被験者の内訳

FAS, full analysis set; PPS, per protocol set

Table 7-6　被験者背景

		FAS/SAS			PPS		
人数（男性）	（人）	22（男性：8、女性：14）			20（男性：8、女性：12）		
年齢	（歳）	44	±	5	44	±	5
身長	（cm）	163.3	±	7.2	163.3	±	7.5
体重	（kg）	65.8	±	7.7	66.6	±	7.5
体脂肪率	（%）	32.4	±	7.0	32.2	±	7.3
BMI	（kg/m^2）	24.7	±	2.5	25.0	±	2.4
体温	（℃）	36.6	±	0.2	36.6	±	0.2
収縮期血圧	（mmHg）	125.0	±	11.5	124.9	±	12.1
拡張期血圧	（mmHg）	75.9	±	8.0	76.2	±	8.4
脈拍	（beats/min）	73.4	±	8.0	73.8	±	7.8
空腹時血糖値	（mg/dL）	88.8	±	7.6	89.4	±	7.6
空腹時インスリン濃度	（μIU/mL）	6.2	±	2.2	6.2	±	2.2

数値は平均値±SD で表した。測定値はすべてスクリーニング訪問時（Visit 1）に記録された。

FAS, full analysis set; SAS, safety analysis set; PPS, per protocol set

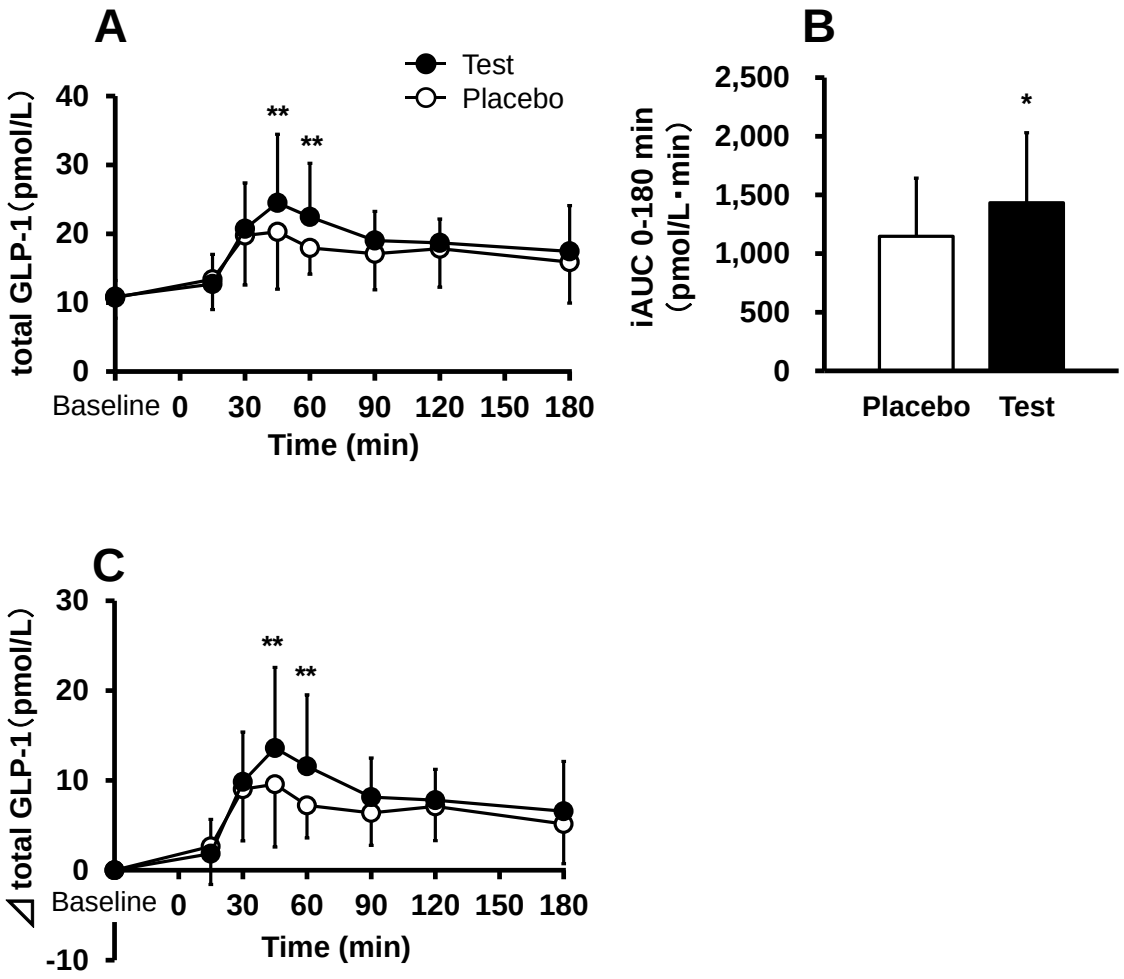

Fig. 7-5　GABA と MA の単回摂取後の MTT 中の血漿中総 GLP-1 濃度の変化

MTT（糖質約 70 g に相当）の 20 分前にクエン酸（○: Placebo として 400 mg/serving）および GABA と MA の混合物（●: Test として各 400 mg/serving）を経口摂取させた。試験食品摂取前と MTT 中に静脈から血液を採取し、血漿中の総 GLP-1 濃度を測定した。反復測定法（クロスオーバー、試験食、時間）のベースライン調整混合モデルを用い、「試験食」と「時間」、およびそれらの交互作用を解析した。*P* 値は、$p < 0.05$（試験食）、$p < 0.01$（時間）、$p = 0.13$（試験食×時間）であった。各時点における Placebo と Test の差は *t* 検定で解析した。数値は平均値±SD で表した（n=20）。各時点における試験食間での有意な差は、$^{**}p < 0.01$、$^{*}p < 0.05$ で表した。

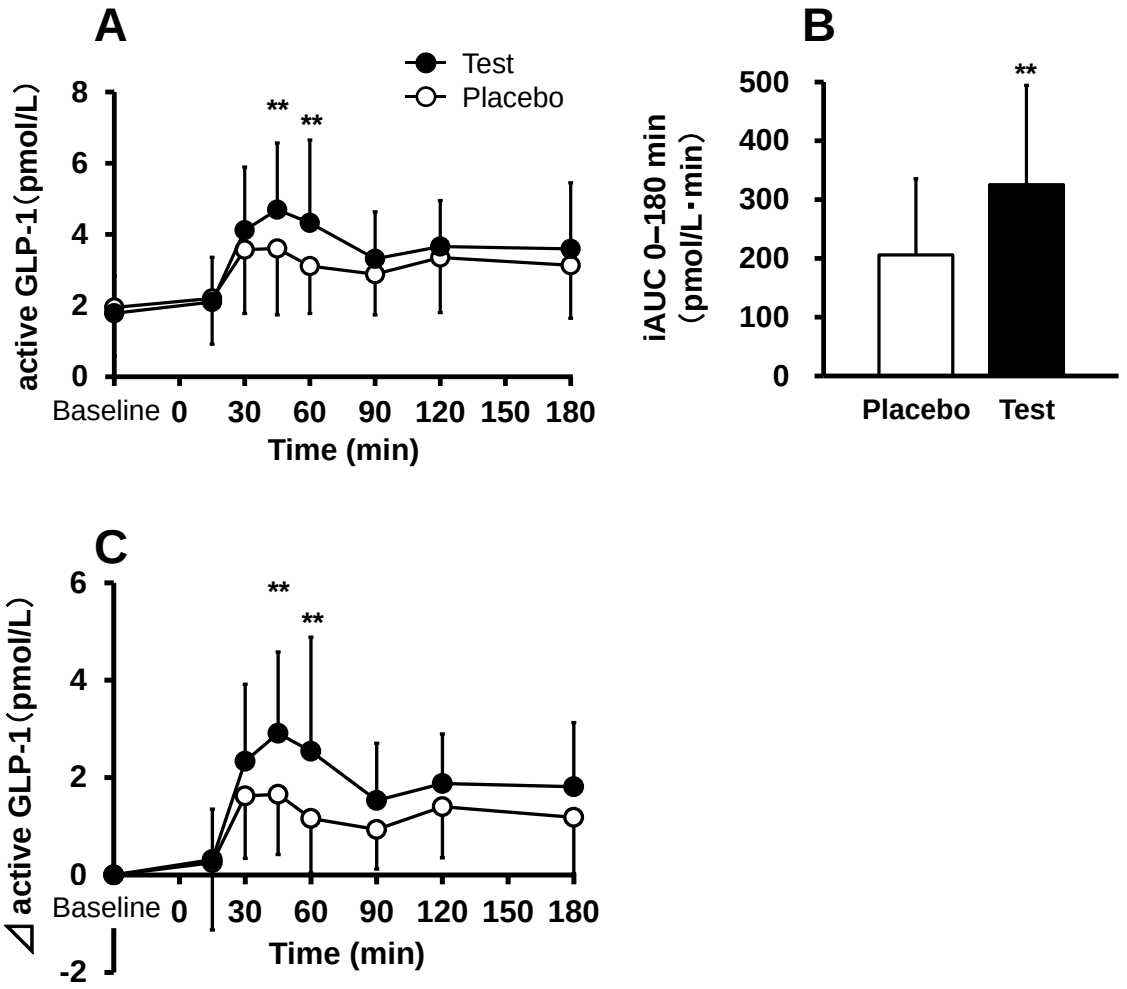

Fig. 7-6　GABA と MA の単回摂取後の MTT 中の血漿中活性型 GLP-1 濃度の変化

MTT（糖質約 70 g に相当）の 20 分前にクエン酸（○: Placebo として 400 mg/serving）および GABA と MA の混合物（●: Test として各 400 mg/serving）を経口摂取させた。試験食品摂取前と MTT 中に静脈から血液を採取し、血漿中の活性型 GLP-1 濃度を測定した。反復測定法（クロスオーバー、試験食、時間）のベースライン調整混合モデルを用い、「試験食」と「時間」、およびそれらの交互作用を解析した。*P* 値は、$p < 0.01$（試験食）、$p < 0.01$（時間）、$p = 0.11$（試験食×時間）であった。各時点における Placebo と Test の差は *t* 検定で解析した。数値は平均値±SD で表した（n=20）。各時点における試験食間での有意な差は、$^{**}p < 0.01$ で表した。

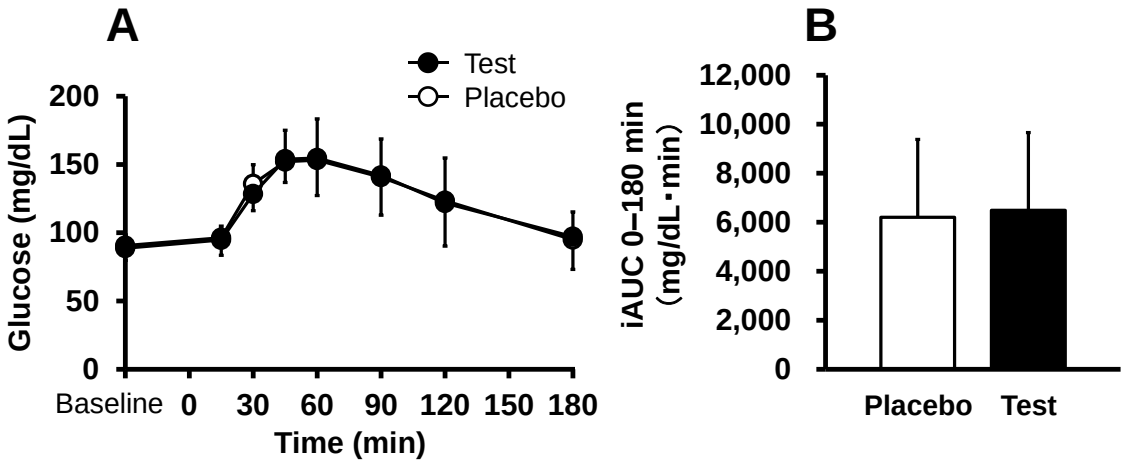

Fig. 7-7　GABA と MA の単回摂取後の MTT 中の血糖値の変化

MTT（糖質約 70 g に相当）の 20 分前にクエン酸（○: Placebo として 400 mg/serving）および GABA と MA の混合物（●: Test として各 400 mg/serving）を経口摂取した。試験食品摂取前と MTT 中に静脈から血液を採取し、血糖値を測定した。反復測定法（クロスオーバー、試験食、時間）のベースライン調整混合モデルを用い、「試験食」と「時間」、およびそれらの交互作用を解析した。*P* 値は、$p = 0.67$（試験食）、$p < 0.01$（時間）、$p = 0.92$（試験食×時間）であった。各時点における Placebo と Test の差は *t* 検定で解析した。数値は平均値±SD で表した（n=20）。

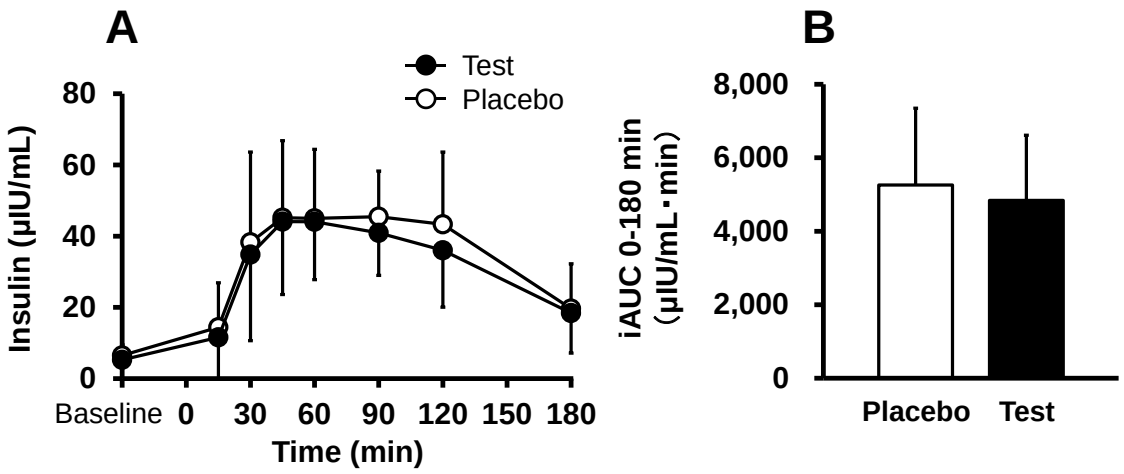

Fig. 7-8　GABA と MA の単回摂取後の MTT 中の血清インスリン濃度の変化

MTT（糖質約 70 g に相当）の 20 分前にクエン酸（○: Placebo として 400 mg/serving）および GABA と MA の混合物（●: Test として各 400 mg/serving）を経口摂取した。試験食品摂取前と MTT 中に静脈から血液を採取し、血清中のインスリン濃度を測定した。反復測定法（クロスオーバー、試験食、時間）のベースライン調整混合モデルを用い、「試験食」と「時間」、およびそれらの交互作用を解析した。各時点における「試験食」と「時間」の交互作用は *t* 検定で解析した。*P* 値は、$p = 0.49$（試験食）、$p < 0.01$（時間）、$p = 0.90$（試験食×時間）であった。各時点における Placebo と Test の差は *t* 検定で解析した。数値は平均値±SD で表した（n=20）。

Table 7-7　有害事象の要約（安全性解析対象）

有害事象名	件数（件）	（発生率）
頭痛	5	（22.7%）
良性発作性頭位眩暈症	1	（4.5%）
食欲不振	1	（4.5%）
消化不良	1	（4.5%）
倦怠感	1	（4.5%）
発現例数	9	（40.9%）

介入した被験者数：n=22

本試験における因果関係は認められなかった。

7.5. 考察

当試験では、臨床応用への可能性を検討するために、健康成人を対象に GABA と MA の混合物（Test）あるいは Placebo を単回摂取した後の食後 GLP-1 分泌および食後血糖応答について調査した。その結果、GABA と MA の同時摂取により食後 GLP-1 分泌が増強されることを確認した。先行研究では、健康成人において、食品由来の成分を 1 g 未満の用量で摂取した場合に糖負荷後の GLP-1 分泌誘導作用を確認した研究報告は無い。このため、今回のように比較的低用量の被験成分摂取により、内因性の GLP-1 の利用能を高めることができれば、糖尿病予備軍の病態進行予防に対する継続的な手段として有効となる可能性が示唆された。

一方、第 3 章で報告した ZeinS による GLP-1 分泌誘導とグルコース負荷後の血糖値上昇抑制の結果（*in vivo* 試験, ラット）から、当試験においても GLP-1 分泌誘導を介した血糖値上昇抑制効果が期待された。しかしながら、GLP-1 分泌量の増加が認められたにもかかわらず、インスリン分泌を介した食後血糖値上昇抑制には繋がらなかった。これらの結果は、食事（サトウのごはん）負荷前の GABA と MA 摂取による GLP-1 分泌応答が十分に得られなかったことに起因していると考えられる。先行研究（*in vivo* 試験, ラット）では、グルコース負荷前に食品ペプチド（ZeinH）を単回経口投与すると（−15 分）、GLP-1 の分泌が誘導され（0 分値）、グルコース負荷後のインスリン分泌が増強され（0–15 分値）、そして血糖応答（15–30 分値）が軽減されたことが示されている（Higuchi et al. 2013）。そのため、グルコース負荷による血中グルコースレベルの上昇前に GLP-1 の分泌を誘導することが重要であると考えられた。また、別の研究では、健康成人（正常型）において、グルコースまた

はアミノ酸（グルタミン 30 g）の摂取により、血中グルコースまたは GLP-1 濃度が摂取後 30 分をピークに上昇することや、グルタミン 15 g の摂取後 30 分間にわたって GLP-1 濃度が上昇することが示されている（Greenfield et al. 2009, Chang et al. 2013）。これらの情報を参考に、試験食摂取による GLP-1 応答が食事負荷 10 分後に最も高くなるように、試験食品の摂取タイミング（−20 分）を選択した。しかしながら、今回のプロトコールでは、食事負荷 15 分後など、食後血糖値が上昇する前に GABA と MA の併用による GLP-1 分泌増大が観察されなかった。このことから、健康成人において GABA と MA の同時摂取は食後 GLP-1 分泌を増強するが、この効果は食後のインスリンおよびグルコース応答に影響を与えるほどではなかったと考えられる。今後、GABA と MA の投与量や投与方法の最適化により、境界型および正常型の食後血糖値上昇を抑制する可能性があると考える。

GABA とリンゴ酸の食事前摂取に関する臨床研究情報は限られている。まず、GABA についての研究では、GABA 2 g（タブレット）の単回摂取後、4 時間後の食事（昼食）において、GLP-1 応答に差がなかったと報告されている（Li et al. 2015）。また、血中 GLP-1 応答の評価は行われていないが、GABA 500 mg（カプセル）の単回摂取後の OGTT（糖質 75 g）において、グルコース応答に差がなかったとの結果が報告されている（de Bie et al. 2023）。

一方、リンゴ酸の GLP-1 分泌に関する臨床研究情報は限られるが、同じ有機酸である乳酸 20 g を経口投与した際、血漿 GLP-1 濃度が静脈内投与と比較して有意に高値を示すことが示されている（Pedersen et al. 2022）。また、プロピオン酸 3 g を摂取した場合と摂取しなかった場合とで同量の炭水化物を摂取させた研究では、プロピオン酸を摂取した場合に GLP-1 分泌の増加が認められた（Frost et al. 2003）。さらに、酢酸（食酢）がグルコースを低下させる栄養補助食品としての役割を支持する研究のほとんどは、通常、炭水化物を多く含む食事との相互作用に関する急性試験において、1 食あたり 1 g 相当の酢酸を使用している（Santos et al. 2019）。

本研究では、GABA とリンゴ酸（有機酸）の摂取量がこれらの臨床試験よりも少ない用量で行っている。そのため、それぞれを単独摂取した場合では、食後の GLP-1 応答においてプラセボとの差は見られないと予想される。ただし、試験条件によっては、これらの臨床試験の結果が変わる可能性もあるため、今後の研究では単独摂取群と併用摂取群の同時試験によって結論を導く必要がある。

GLP-1 の生理作用は多岐にわたり、膵 β 細胞のインスリン分泌促進作用を介した血糖上昇抑制以外にも、膵外作用として腎・心・神経保護作用や中枢作用等が報告されている（Müller et al. 2019）。GABA と MA の摂取は、プラセボ摂取に比べて血中活性型 GLP-1 濃度のベースラインからの食後変化を 1.8 倍に増加させ（Fig. 7-3C）、iAUC を 1.6 倍に増加させた（Fig. 7-3B）。日本人の健常成人男性に DPP-4 阻害薬（アナグリプチン）を投与した試

験報告によれば、1 回の投与量である 100 mg 単回投与（食前）において、血中活性型 GLP-1 濃度の食後 4 時間の iAUC が、プラセボ摂取に比べて約 2 倍に増加した（角南ら 2012）。また、他の DPP-4 阻害薬（リナグリプチン）の報告においても、1 回の投与量である 5 mg 単回投与（食前）において、血中活性型 GLP-1 濃度のベースラインからの食後変化が、プラセボ摂取に比べて約 2 倍増加した（Sarashina et al. 2010）。したがって、食後の GLP-1 分泌応答に対する機能性成分の効果として、GABA と MA の摂取は十分期待できると考えられた。

境界型は糖尿病型に移行する率が高く、糖尿病特有の合併症は少ないが、動脈硬化症への危険性は正常型よりも大きい（寺内, 門脇 2005）。さらに、心不全の既往がある正常耐糖能者において、食後の GLP-1 分泌が減弱していることや、GLP-1 生体利用能の低下と心不全の予後因子との負の相関性が報告されている（Arruda-Junior et al. 2020）ことからも、GLP-1 と心保護作用との関連性は高いと考えられる。これらのことから、生理的条件下での GLP-1 分泌増大は心血管疾患の予防や進行リスク低減への有効性が期待できる。

安全性については、GABA と MA（Test）の同時摂取による有害事象は確認されなかった。GABA と MA は一般に広く利用されている食品素材であり、当該用量における安全性の臨床的リスクは非常に低いと考えられた。

以上の結果から、GABA と MA の単回同時摂取が食後の血中 GLP-1 分泌増強作用を示すことを明らかにした。しかしながら、食後血糖値上昇抑制作用は認められなかった。今後の試験において、投与量や投与方法の最適化によって食後血糖値上昇を抑制する可能性がある。また、安全性についての懸念も低いため、GABA と MA は糖尿病対策における機能性食品成分として有用であると考えられた。

7.6. 小括

健康成人において、GABA（400 mg）と MA（400 mg）の単回同時摂取は、安全上の懸念を伴わずに食事後の血中 GLP-1 分泌誘導を増大させることが明らかとなった。その際の血糖応答に対しては影響は認められなかった。

8. 総括

現代では、健康寿命の延長が重要視され、そのために食環境や運動を主体とした疾病の予防、健康維持と向上に焦点が当てられている。特に、生活習慣病などの慢性疾患の予防を目指し、食品が本来持つ機能性を活用した食品の開発が積極的に行われている。本研究は、糖尿病などの慢性疾患の予防を通じて健康寿命を延ばすために、新しい機能性の食品成分を探索し、臨床応用を検討することを目的としている。先行研究で、動物試験において GLP-1 誘導活性を介して糖負荷後の食後高血糖の是正効果が見出された（Hira et al. 2009, Mochida et al. 2010, Higuchi et al. 2013）、トウモロコシ由来の精製タンパク質（zein）に着目した。

GLP-1 は、インスリン分泌の促進や膵外作用（食欲, 炎症, 血管新生）を有し、GLP-1 作用の増強が糖尿病、肥満関連疾患、血管イベントの予防や治療に貢献することが示されている（Nauck et al. 2017, Müller et al. 2019）。そのため、GLP-1 アナログや DPP-4 阻害薬などによる GLP-1 の作用増強は、糖尿病、肥満関連疾患、血管イベントの予防・治療に有効であるが（Nauck et al. 2017, Drucker 2018, Müller et al. 2019）、既存のアプローチは適応範囲の制約や、有害事象（低血糖, 消化器症状, 知覚低下）のリスクを伴う（Nonaka et al. 2008, Drucker 2018）。したがって、GLP-1 の有効性を高める栄養学的なアプローチは、安全性の高い新たな手段の提案に繋がると考えられる。

Zein は、多くの食品や医薬品に広く利用されている。先行研究では、zein 加水分解物（ZeinH）が GLP-1 の分泌を促進し、その後のインスリン分泌を促進することにより食後高血糖を抑制することが示されたが、その効果に起因する化合物の同定には至っていなかった。

そこで本研究は、内因性の GLP-1 の利用能を高めるための新たな手段を提案することを目的に、zein 由来の GLP-1 分泌誘導活性成分を特定し、その有効性を臨床試験にて評価した。さらに、作用メカニズムの検討も実施した。

まず、ZeinH 中の関与成分として高い寄与度が期待される候補ペプチドの特定を目指した。ZeinH に含まれる 12 種類の活性ペプチド候補を選抜し、それぞれの GLP-1 分泌活性を *in vitro* 試験で評価した。しかしながら、顕著な GLP-1 分泌誘導活性はいずれも確認できず、ZeinH の GLP-1 分泌誘導活性において寄与度の高いペプチドは特定できなかった（第 2 章）。ただし、用量依存的な正の活性変化が観察されたため、ペプチドの組み合わせや至適濃度条件を検討することで、活性ペプチドが特定できる可能性が示唆された。また、ZeinH には zein に由来する可溶性化合物も含まれているため、これらの化合物にも活性成分が存在する可能性も考えられた。さらなる関与成分の検討を進めるにあたり、活性ペプチドの特定の場合は多様な条件設定が必要となり現実的ではないことから、可溶性化合物に焦点を当てて検討を進めた。

次に、zein 由来可溶性化合物が GLP-1 分泌活性を有するかを明らかにすることを目的に、zein の水抽出物（ZeinS）の GLP-1 分泌活性を *in vitro* 試験で評価した。その結果、ZeinS は ZeinH 以上の活性を示すことを確認した。続いて、ラット試験において ZeinS の経口投与による GLP-1 分泌促進作用および血糖上昇抑制作用が確認できたため、ZeinH の部分的な活性画分として ZeinS を特定した（第 3 章）。

さらに、固相抽出（SPE）法と HPLC 法を用いて ZeinS 中に含まれる様々な可溶性化合物を分画・精製し、各画分の GLP-1 分泌誘導活性を *in vitro* 試験で評価した。複数の同定された化合物について活性を評価し、単独活性および相乗活性を示す化合物として GABA と Phe を特定した（第 4 章）。複数のアミノ酸成分の併用によって相乗的な消化管ホルモン（GLP-1）分泌応答が誘導されることを示した研究報告はこれまでにない。

ZeinS およびその活性成分について GLP-1 分泌誘導活性の作用メカニズム仮説を構築することは、将来的な機能性素材の応用研究において重要な役割を果たし、同定された成分以外の GLP-1 分泌誘導に関わる分子を対象とした新たな機能性素材の開発および安全性確保に寄与することが期待される。ZeinS および GABA と Phe の併用による GLP-1 分泌誘導活性には、細胞外 Ca^{2+}および CaSR などの GPCR とイオンチャネル型 $GABA_A$ 受容体が複合的に寄与することが明らかとなった（第 5 章）。

一方、今後の臨床試験を計画・実施する際には、前述の GABA と Phe という関与成分の安全性情報を詳細に検討する必要がある。GABA については、関連情報の豊富さと機能性成分としての使用実績から、GLP-1 分泌誘導活性を確保するための適切な摂取量に関する安全性情報が得られる。しかしながら、Phe は香料用途に限定され、GLP-1 分泌誘導活性を想定した適切な摂取量に関する十分な安全性情報が得られなかった。そのため、Phe に代わる GABA との併用で相乗作用を示す新たな成分を探索する必要が生じた。リンゴ酸（MA）はトウモロコシ穀粒中に含まれる一般的な有機酸で、現在、食品添加物として幅広く用いられており、その毒性は極めて低い。したがって、Phe に代わる化合物として MA に着目し、GABA との併用による相乗的な GLP-1 分泌応答が *in vitro* 試験で確認できるかどうかを評価した。まず、ZeinS 中にも MA が一定量含まれることを定量分析により確認した。その後、*in vitro* 試験において、GABA と MA の併用によって Phe と同様に相乗的な GLP-1 分泌促進作用が確認され、Phe の代替として MA を選定した（第 6 章）。

最後に、GABA と MA の臨床応用への可能性を確認することを目的に、これらの成分の単回同時摂取が健康成人における GLP-1 分泌および食後血糖値に及ぼす影響について検討した。その結果、GABA と MA の同時摂取によって食後 GLP-1 分泌が促進されることが確認できた（第 7 章）。しかしながら、この摂取に伴うインスリン分泌応答や食後血糖値応答には Placebo との有意な差は認められなかった。これらの結果は、GABA と MA 摂取による

GLP-1 分泌促進が不十分であったことに起因していると考えられた。今後、投与量や継続摂取を含む投与方法の最適化によって、健康成人における食後血糖値の上昇抑制効果も期待できる。

この一連の研究成果により、ZeinH の有効性に寄与する関与成分の一部として GABA と MA が特定され、それらの成分を同時に摂取することが、健康成人における食後の GLP-1 分泌を促進することが確認された。食品の機能性に関する先行研究は多数存在するが、期待される効果を得るための適切な摂取用量を解明することも実際の利用を考える上で重要になる。特に、過剰な成分摂取を避けつつ、最適な効果を得るために必要な用量についての理解が不足していると思われる。例えば、ヒトを対象に血中の GLP-1 レベルを上昇させるには、高用量の栄養素が必要であることが示されている（メタボリックシンドロームには 20 g のホエイペプチド（Bjørnshave et al. 2019）、2 型糖尿病には 30 g のグルタミン（Samocha-Bonet et al. 2011）、健康な男性には 15 g のグルタミン（Chang et al. 2013））。これらの研究では、有効な用量での副作用は示されていないが、摂取の負担を軽減し、より低い mg レベルの用量で目標の効果を得ることが望ましい。本研究では、複数の成分を組み合わせることで、生体内での食後の GLP-1 分泌を相乗効果的に増加させる可能性を認めた。これにより、単独の成分よりも低い用量で目的の効果を達成できる可能性がある。

今後の研究では、次の内容に焦点を当てることが重要と考える。まず、今回の臨床試験の結果を受けて、用法用量の最適化について、血糖応答に対する効果を確認し、実用的で安全な摂取方法を特定する必要がある。第 3 章の動物試験では、被験物の糖負荷前摂取によって糖負荷後のインスリンおよびグルコース応答への有効性が確認され、同時に、被験物の摂取から糖負荷までの期間にわたり、血中 GLP-1 の分泌が増加することが示された。しかし、第 7 章の臨床試験では、食前に被験食品を摂取した場合、食事摂取までの間に血中 GLP-1 の分泌が増加せず、これが食後のインスリン分泌や血糖値応答に対して不十分であることを示唆した。そのため、食事の前に適切な量の GLP-1 分泌を誘導することができれば、食後の血糖値応答が緩やかになる可能性がある。これに関して、被験食品の摂取タイミングの再調整が有効かもしれない。先行研究（Geraedts et al. 2011）では、*in vitro* 試験において、主に酸味料として利用される塩酸が STC-1 細胞からの GLP-1 分泌を誘導し、時間依存的な影響が示された。よって、被験食品の単独摂取による血中 GLP-1 の経時的なモニタリングを行うことで被験食品の有効な摂取タイミングを判断できる可能性がある。一方、MA 自体には、食事由来の糖質の消化吸収を担う α-グルコシダーゼ阻害作用が *in vitro* で報告されていることから（Gou et al. 2015）、MA の α-グルコシダーゼ活性の阻害が発揮される用量の検討も食後高血糖の改善手段として考えられる可能性がある。

また、長期的な摂取の影響についても調査が不可欠である。現在、スマートフォンやスマ

ートウォッチを使用して、血糖値、心拍数、心拍変動、身体活動量などの生体情報をリアルタイムにモニタリングできるようになっている。特に、血糖値に関しては、小型の皮下センサーを装着することで間質液中のグルコース濃度を常時測定できる「持続血糖測定器」（FreeStyle リブレ; アボットジャパン合同会社）が市販され、薬局などで入手可能である。食品成分の長期的な摂取が健康へ及ぼす影響について、これらから得られる日常的な情報は消費者にとって極めて重要であり、安全性と効果の持続性を検討する研究は信頼性向上に寄与する。

さらに、GLP-1 の膵外作用に関する研究が必要である。GLP-1 は血糖値低下作用に加えて、膵臓以外への作用も誘導する。血管内皮は心血管機能の維持に重要な役割を果たしていることが知られており（Halcox et al. 2002）、GLP-1 とそのアナログが血管内皮に対して直接的な保護作用を有するという新たなエビデンスが示されている（Koska et al. 2015）。DECODE（Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis of Diagnostic criteria in Europe）研究により、糖尿病性大血管症の病態は 2 型糖尿病患者のみならず、糖尿病予備軍にも認められることが示されており（DECODE Study Group. 2001, Hyvärinen et al. 2009, 2010, Ning et al. 2010, 2012）、GLP-1 の膵外作用が血管機能の低下予防や改善に対して期待される。本研究で確認した GABA と MA の同時摂取による食後の GLP-1 分泌の促進効果が、実際に血管機能の維持や改善に寄与するかどうかについて、さらなる検証が必要である。

最後に、食の効果には個人差の考慮も重要である。国内では特定保健用食品や機能性表示食品が制度化されているが、同じ食品を摂取しても全ての個人が同じ効果を得られるわけではない。一方、近年の分析技術の進歩により、食の効果の個人差を規定する要因が徐々に明らかとなっている（de Toro-Martín et al. 2017）。これは遺伝的因子に加えて、生活習慣や腸内細菌などの外的因子の影響も考慮に入れ、個人の体質や生活スタイル、ライフスタイルに合わせた栄養情報を提供する「精密栄養」という概念と関連している。食事成分によって誘導される内因性の GLP-1 の利用能の個人差についても、個別化した栄養学的アプローチが必要な要素である可能性がある。

これらの研究方向は、食品の機能性に関する知識を深め、実用的な健康ケアや治療法の開発に向けて大きな成果をもたらすだろう。

9. 謝辞

この博士論文の完成にあたり、多くの方々からのご支援を受けました。深く感謝いたします。

指導教員の比良徹先生には、専門的なアドバイスと熱心な指導に感謝いたします。比良先生は、研究の方向性を明確にし、新たな視点を提供することで、私の研究に深みをもたらして下さいました。また、比良先生の貴重なネットワークにより、他の専門家からの洞察的な意見を得ることができました。

副査の先生方からは多くのご指摘や助言をいただきました。これにより、論文の明確さと一貫性が向上しました。ご協力に深く感謝いたします。

また、共同研究者と同僚にも深く感謝いたします。彼らの洞察力と助言は、研究を進める上で非常に貴重であり、協力に心から感謝いたします。

家族には、絶えず私を支え、励ましてくれたことに感謝いたします。彼らの理解と応援が、この研究を実施する励みとなりました。

最後に、北海道大学および大塚製薬株式会社には、施設の提供と資金提供に感謝いたします。今回の支援がなければ、この研究を進めることはできなかったでしょう。

これらの方々の協力と支援に感謝の意を表します。皆様のおかげで、この博士論文が実現しました。

野口洋樹

2023 年 12 月

10. 参考文献

- Acar I, Cetinkaya A, Lay I, Ileri-Gurel E. The role of calcium sensing receptors in GLP-1 and PYY secretion after acute intraduodenal administration of L-Tryptophan in rats. Nutr Neurosci. 2020, 23(6), 481−489.
- Alamshah A, Spreckley E, Norton M, Kinsey-Jones JS, Amin A, Ramgulam A, Cao Y, Johnson R, Saleh K, Akalestou E, Malik Z, Gonzalez-Abuin N, Jomard A, Amarsi R, Moolla A, Sargent PR, Gray GW, Bloom SR, Murphy KG. L-phenylalanine modulates gut hormone release and glucose tolerance, and suppresses food intake through the calcium-sensing receptor in rodents. Int J Obes (Lond). 2017, 41(11), 1693−1701.
- Araki E, Goto A, Kondo T, Noda M, Noto H, Origasa H, Osawa H, Taguchi A, Tanizawa Y, Tobe K, Yoshioka N. Japanese clinical practice guideline for diabetes 2019. Diabetol Int. 2020, 11(3), 165−223.
- Arruda-Junior DF, Martins FL, Salles TA, Jensen L, Dariolli R, Antonio EL, Dos Santos L, Crajoinas RO, Tucci PJF, Gowdak LHW, Krieger JE, Pereira AC, Girardi AC. Postprandial increase in glucagon-like peptide-1 is blunted in severe heart failure. Clin Sci (Lond). 2020, 134(9), 1081−1094.
- Bjørnshave A, Holst JJ, Hermansen K. A pre-meal of whey proteins induces differential effects on glucose and lipid metabolism in subjects with the metabolic syndrome: a randomised cross-over trial. Eur J Nutr. 2019, 58(2), 755−764.
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+}-sensing receptor from bovine parathyroid. Nature. 1993, 366(6455), 575−580.
- Caron J, Cudennec B, Domenger D, Belguesmia Y, Flahaut C, Kouach M, Lesage J, Goossens JF, Dhulster P, Ravallec R. Simulated GI digestion of dietary protein: Release of new bioactive peptides involved in gut hormone secretion. Food Res Int. 2016, 89(Pt 1), 382−390.
- Chang J, Wu T, Greenfield JR, Samocha-Bonet D, Horowitz M, Rayner CK. Effects of intraduodenal glutamine on incretin hormone and insulin release, the glycemic response to an intraduodenal glucose infusion, and antropyloroduodenal motility in health and type 2 diabetes. Diabetes Care. 2013, 36(8), 2262–2265.
- Charvat H, Goto A, Goto M, Inoue M, Heianza Y, Arase Y, Sone H, Nakagami T, Song X, Qiao Q, Tuomilehto J, Tsugane S, Noda M, Inoue M. Impact of population aging on trends in diabetes prevalence: A meta-regression analysis of 160,000 Japanese adults. J Diabetes Investig. 2015,

6(5), 533–542.

- Chen LH, Sun B, Zhang Y, Xu TJ, Xia ZX, Liu JF, Nan FJ. Discovery of a negative allosteric modulator of $GABA_B$ receptors. ACS Med Chem Lett. 2014, 5(7), 742−747.
- Choi S, Lee M, Shiu AL, Yo SJ, Halldén G, Aponte GW. GPR93 activation by protein hydrolysate induces CCK transcription and secretion in STC-1 cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007, 292(5), G1366-G1375.
- Conigrave AD, Quinn SJ, Brown EM. L-Amino acid sensing by the extracellular Ca^{2+}-sensing receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97(9), 4814−4819.
- Diakogiannaki E, Pais R, Tolhurst G, Parker HE, Horscroft J, Rauscher B, Zietek T, Daniel H, Gribble FM, Reimann F. Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-coupled uptake and the calcium-sensing receptor. Diabetologia. 2013, 56(12), 2688−2696.
- DECODE Study Group, the European Diabetes Epidemiology Group. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. Arch Intern Med. 2001, 161(3), 397−405.
- de Toro-Martín J, Arsenault BJ, Després JP, Vohl MC. Precision nutrition: a review of personalized nutritional approaches for the prevention and management of metabolic syndrome. Nutrients. 2017, 9(8), 913.
- de Bie TH, Witkamp RF, Balvers MG, Jongsma MA. Effects of γ-aminobutyric acid supplementation on glucose control in adults with prediabetes: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Am J Clin Nutr. 2023, 118(3), 708–719.
- Doi M, Yamaoka I, Fukunaga T, Nakayama M. Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C_2C_{12} myotubes. Biochem Biophys Res Commun. 2003, 312(4), 1111–1117.
- Drucker DJ. Mechanisms of action and therapeutic application of glucagon-like peptide-1. Cell Metab. 2018, 27(4), 740−756.
- Engelstoft MS, Park WM, Sakata I, Kristensen LV, Husted AS, Osborne-Lawrence S, Piper PK, Walker AK, Pedersen MH, Nøhr MK, Pan J, Sinz CJ, Carrington PE, Akiyama TE, Jones RM, Tang C, Ahmed K, Offermanns S, Egerod KL, Zigman JM, Schwartz TW. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. Mol Metab. 2013, 2(4), 376–392.
- Food and drug administration, 2022. Code of federal regulations title 21: Food and drugs, subchapter B - Food for human consumption (continued), part 184 – Direct food substances affirmed as generally recognized as safe, subpart B - Listing of specific substances affirmed as

GRAS; https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1069 (accessed Aug 2022).

- Food and drug administration, 2022. Code of federal regulations title 21: Food and drugs, subchapter B - Food for human consumption (continued), Part 184 – Direct food substances affirmed as generally recognized as safe, subpart B - Listing of specific substances affirmed as GRAS; https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1984 (accessed Jun 2023).
- Frost GS, Brynes AE, Dhillo WS, Bloom SR, McBurney MI. The effects of fiber enrichment of pasta and fat content on gastric emptying, GLP-1, glucose, and insulin responses to a meal. Eur J Clin Nutr. 2003, 57(2), 293–298.
- Gameiro A, Reimann F, Habib AM, O'Malley D, Williams L, Simpson AK, Gribble FM. The neurotransmitters glycine and GABA stimulate glucagon-like peptide-1 release from the GLUTag cell line. J Physiol. 2005, 569(Pt 3), 761−772.
- Geraedts MC, Troost FJ, Saris WH. Different tastants and low-caloric sweeteners induce differential effects on the release of satiety hormones. Food Chem. 2011, 129(3), 731−738.
- Gou L, Zhan Y, Lee J, Li X, Lü ZR, Zhou HM, Lu H, Wang XY, Park YD, Yang JM. Effects of L-malic acid on alpha-glucosidase: Inhibition kinetics and computational molecular dynamics simulations. Appl Biochem Biotechnol. 2015, 175(4), 2232−2245.
- Greenfield JR, Farooqi IS, Keogh JM, Henning E, Habib AM, Blackwood A, Reimann F, Holst JJ, Gribble FM. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. Am J Clin Nutr. 2009, 89(1), 106−113.
- Gunnarsson PT, Winzell MS, Deacon CF, Larsen MO, Jelic K, Carr RD, Ahrén B. Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. Endocrinology. 2006, 147(7), 3173−3180.
- Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. Circulation. 2002, 106(6), 653–658.
- Hauge M, Vestmar MA, Husted AS, Ekberg JP, Wright MJ, Di Salvo J, Weinglass AB, Engelstoft MS, Madsen AN, Lückmann M, Miller MW, Trujillo ME, Frimurer TM, Holst B, Howard AD, Schwartz TW. GPR40 (FFAR1) - Combined Gs and Gq signaling *in vitro* is associated with robust incretin secretagogue action *ex vivo* and *in vivo*. Mol Metab. 2015, 4(1), 3–14.
- Hauge M, Ekberg JP, Engelstoft MS, Timshel P, Madsen AN, Schwartz TW. Gq and Gs signaling

acting in synergy to control GLP-1 secretion. Mol Cell Endocrinol. 2017, 449, 64−73.

- Hepsomali P, Groeger JA, Nishihira J, Scholey A. Effects of oral gamma-aminobutyric acid (GABA) administration on stress and sleep in humans: A systematic review. Front Neurosci. 2020, 14, 923.
- Higuchi N, Hira T, Yamada N, Hara H. Oral administration of corn zein hydrolysate stimulates GLP-1 and GIP secretion and improves glucose tolerance in male normal rats and Goto-Kakizaki rats. Endocrinology. 2013, 154(9), 3089−3098.
- Hira T, Mochida T, Miyashita K, Hara H. GLP-1 secretion is enhanced directly in the ileum but indirectly in the duodenum by a newly identified potent stimulator, zein hydrolysate, in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009, 297(4), G663−G671.
- Hira T, Trakooncharoenvit A, Taguchi H, Hara H. Improvement of glucose tolerance by food factors having glucagon-like peptide-1 releasing activity. Int J Mol Sci. 2021, 22(12), 6623.
- Hoefle AS, Bangert AM, Rist MJ, Gedrich K, Lee YM, Skurk T, Danier J, Schwarzenbolz U, Daniel H. Postprandial metabolic responses to ingestion of bovine glycomacropeptide compared to a whey protein isolate in prediabetic volunteers. Eur J Nutr. 2019, 58(5), 2067–2077.
- Holst JJ, Knop FK, Vilsbøll T, Krarup T, Madsbad S. Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. Diabetes Care. 2011, Suppl 2(Suppl 2), S251–S257.
- Hyland NP, Cryan JF. A gut feeling about GABA: focus on $GABA_B$ receptors. Front Pharmacol. 2010, 1, 124.
- Hyvärinen M, Qiao Q, Tuomilehto J, Laatikainen T, Heine RJ, Stehouwer CD, Alberti KG, Pyörälä K, Zethelius B, Stegmayr B, DECODE Study Group. Hyperglycemia and stroke mortality: comparison between fasting and 2-h glucose criteria. Diabetes Care. 2009, 32(2), 348−354.
- Kamakura R, Raza GS, Prasannan A, Walkowiak J, Herzig KH. Dipeptidyl peptidase-4 and GLP-1 interplay in STC-1 and GLUTag cell lines. Peptides. 2020, 134, 170419.
- Karls A, Mynlieff M. $GABA_B$ receptors couple to $G\alpha_q$ to mediate increases in voltage-dependent calcium current during development. J Neurochem. 2015, 135(1), 88−100.
- Kieffer TJ, Habener JF, The glucagon-like peptides. Endocr Rev. 1999, 20(6), 876−913.
- Komatsu Y, Wada Y, Izumi H, Shimizu T, Takeda Y, Hira T, Hara H. Casein materials show different digestion patterns using an *in vitro* gastrointestinal model and different release of glucagon-like peptide-1 by enteroendocrine GLUTag cells. Food Chem. 2019, 277, 423−431.
- Koska J, Sands M, Burciu C, D'Souza KM, Raravikar K, Liu J, Truran S, Franco DA, Schwartz

EA, Schwenke DC, D'Alessio D, Migrino RQ, Reaven PD. Exenatide protects against glucose- and lipid-induced endothelial dysfunction: evidence for direct vasodilation effect of GLP-1 receptor agonists in humans. Diabetes. 2015, 64(7), 2624–2635.

- Kuhre RE, Wewer Albrechtsen NJ, Deacon CF, Balk-Møller E, Rehfeld JF, Reimann F, Gribble FM, Holst JJ. Peptide production and secretion in GLUTag, NCI-H716, and STC-1 cells: A comparison to native L-cells. J Mol Endocrinol. 2016, 56(3), 201−211.
- Lacroix IM, Li-Chan EC. Overview of food products and dietary constituents with antidiabetic properties and their putative mechanisms of action: A natural approach to complement pharmacotherapy in the management of diabetes. Mol Nutr Food Res. 2014, 58(1), 61–78.
- Lejeune MP, Westerterp KR, Adam TC, Luscombe-Marsh ND, Westerterp-Plantenga MS. Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. Am J Clin Nutr. 2006, 83(1), 89–94.
- Le Maux S, Nongonierma AB, Barre C, FitzGerald RJ. Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. Food Chem. 2016, 199, 246−251.
- Le Nevé B, Daniel H. Selected tetrapeptides lead to a GLP-1 release from the human enteroendocrine cell line NCI-H716. Regul Pept. 2011, 167(1), 14−20.
- Levitan EB, Song Y, Ford ES, Liu S. Is nondiabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease? A meta-analysis of prospective studies. Arch Intern Med. 2004, 164(19), 2147–2155.
- Li J, Zhang Z, Liu X, Wang Y, Mao F, Mao J, Lu X, Jiang D, Wan Y, Lv JY, Cao G, Zhang J, Zhao N, Atkinson M, Greiner DL, Prud'homme GJ, Jiao Z, Li Y, Wang Q. Study of GABA in healthy volunteers: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. Front Pharmacol. 2015, 6, 260.
- Liu C, Wu J, Zhu J, Kuei C, Yu J, Shelton J, Sutton SW, Li X, Yun SJ, Mirzadegan T, Mazur C, Kamme F, Lovenberg TW. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. J Biol Chem. 2009, 284(5), 2811–2822.
- Lorey S, Stöckel-Maschek A, Faust J, Brandt W, Stiebitz B, Gorrell MD, Kähne T, Mrestani-Klaus C, Wrenger S, Reinhold D, Ansorge S, Neubert K. Different modes of dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibition by oligopeptides derived from the N-terminus of HIV-1 Tat indicate at least two inhibitor binding sites. Eur J Biochem. 2003, 270(10), 2147−2156.
- Magno AL, Ward BK, Ratajczak T. The calcium-sensing receptor: A molecular perspective. Endocr Rev. 2011, 32(1), 3−30.

- Mace OJ, Schindler M, Patel S. The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. J Physiol. 2012, 590(12), 2917−2936.
- Masuda R, Yamashita I, Kaneko K. Contents of taste-related components of sugars, organic acids and free amino acids in current sweet corn (*Zea mays* L.) kernels. J Jpn Soc Food Sci Technol. 1997, 44(1), 23−30.
- Meier JJ, Baller B, Menge BA, Gallwitz B, Schmidt WE, Nauck MA. Excess glycaemic excursions after an oral glucose tolerance test compared with a mixed meal challenge and self-measured home glucose profiles: is the OGTT a valid predictor of postprandial hyperglycaemia and vice versa? Diabetes Obes Metab. 2009, 11(3), 213–222.
- Mochida T, Hira T, Hara H. The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. Endocrinology. 2010, 151(7), 3095−3104.
- Modvig IM, Kuhre RE, Jepsen SL, Xu SFS, Engelstoft MS, Egerod KL, Schwartz TW, Ørskov C, Rosenkilde MM, Holst JJ. 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. 2021, 320(5), E874−E885.
- Müller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, Fritsche A, Gribble F, Grill HJ, Habener JF, Holst JJ, Langhans W, Meier JJ, Nauck MA, Perez-Tilve D, Pocai A, Reimann F, Sandoval DA, Schwartz TW, Seeley RJ, Stemmer K, Tang-Christensen M, Woods SC, DiMarchi RD, Tschöp MH. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). Mol Metab. 2019, 30, 72−130.
- Nauck MA, Meier JJ, Cavender MA, Abd El Aziz M, Drucker DJ. Cardiovascular actions and clinical outcomes with glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. Circulation. 2017, 136(9), 849−870.
- Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BC, Van Wagenen BC, DelMar EG, Balandrin MF. Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95(7), 4040−4045.
- Ning F, Tuomilehto J, Pyörälä K, Onat A, Söderberg S, Qiao Q; DECODE Study Group. Cardiovascular disease mortality in Europeans in relation to fasting and 2-h plasma glucose levels within a normoglycemic range. Diabetes Care. 2010, 33(10), 2211−2216.
- Ning F, Zhang L, Dekker JM, Onat A, Stehouwer CD, Yudkin JS, Laatikainen T, Tuomilehto J, Pyörälä K, Qiao Q; DECODE Finnish and Swedish Study Investigators. Development of coronary heart disease and ischemic stroke in relation to fasting and 2-hour plasma glucose levels in the normal range. Cardiovasc Diabetol. 2012, 11, 76.

- Nishitani S, Matsumura T, Fujitani S, Sonaka I, Miura Y, Yagasaki K. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. Biochem Biophys Res Commun. 2002, 299(5), 693–696.
- Nonaka K, Kakikawa T, Sato A, Okuyama K, Fujimoto G, Kato N, Suzuki H, Hirayama Y, Ahmed T, Davies MJ, Stein PP. Efficacy and safety of sitagliptin monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2008, 79(2), 291–298.
- Ojo O. Dietary intake and type 2 diabetes. Nutrients. 2019, 11(9), 2177.
- Psichas A, Glass LL, Sharp SJ, Reimann F, Gribble FM. Galanin inhibits GLP-1 and GIP secretion via the GAL_1 receptor in enteroendocrine L and K cells. Br J Pharmacol. 2016, 173(5), 888–898.
- Osuga Y, Harada K, Tsuboi T. Identification of a regulatory pathway of L-phenylalanine-induced GLP-1 secretion in the enteroendocrine L cells. Biochem Biophys Res Commun. 2022, 588, 118−124.
- Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? Nat Rev Neurosci. 2002, 3(9), 715−727.
- Oya M, Kitaguchi T, Pais R, Reimann F, Gribble F, Tsuboi T. The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. J Biol Chem. 2013, 288(7), 4513−4521.
- Pais R, Gribble FM, Reimann F. Signalling pathways involved in the detection of peptones by murine small intestinal enteroendocrine L-cells. Peptides. 2016, 77, 9−15.
- Pedersen MGB, Søndergaard E, Nielsen CB, Johannsen M, Gormsen LC, Møller N, Jessen N, Rittig N. Oral lactate slows gastric emptying and suppresses appetite in young males. Clin Nutr. 2022, 41(2), 517–525.
- Rasoamanana R, Darcel N, Fromentin G, Tomé D. Nutrient sensing and signalling by the gut. Proc Nutr Soc. 2012, 71(4), 446−455.
- Reimann F, Williams L, da Silva Xavier G, Rutter GA, Gribble FM. Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. Diabetologia. 2004, 47(9), 1592−1601.
- Rudenko O, Shang J, Munk A, Ekberg JP, Petersen N, Engelstoft MS, Egerod KL, Hjorth SA, Wu M, Feng Y, Zhou YP, Mokrosinski J, Thams P, Reimann F, Gribble F, Rehfeld JF, Holst JJ, Treebak JT, Howard AD, Schwartz TW. The aromatic amino acid sensor GPR142 controls metabolism through balanced regulation of pancreatic and gut hormones. Mol Metab. 2019, 19, 49−64.
- Samocha-Bonet D, Wong O, Synnott EL, Piyaratna N, Douglas A, Gribble FM, Holst JJ,

Chisholm DJ, Greenfield JR. Glutamine reduces postprandial glycemia and augments the glucagon-like peptide-1 response in type 2 diabetes patients. J Nutr. 2011, 141(7), 1233–1238.

- Santos HO, de Moraes WMAM, da Silva GAR, Prestes J, Schoenfeld BJ. Vinegar (acetic acid) intake on glucose metabolism: A narrative review. Clin Nutr ESPEN. 2019, 32, 1–7.
- Santos-Hernández M, Amigo L, Recio I. Induction of CCK and GLP-1 release in enteroendocrine cells by egg white peptides generated during gastrointestinal digestion. Food Chem. 2020, 329, 127188.
- Santos-Hernández M, Vivanco-Maroto SM, Miralles B, Recio I. Food peptides as inducers of CCK and GLP-1 secretion and GPCRs involved in enteroendocrine cell signalling. Food Chem. 2023, 402, 134225.
- Sarashina A, Sesoko S, Nakashima M, Hayashi N, Taniguchi A, Horie Y, Graefe-Mody EU, Woerle HJ, Dugi KA. Linagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor in development for the treatment of type 2 diabetes mellitus: A phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of single and multiple escalating doses in healthy adult male Japanese subjects. Clin Ther. 2010, 32, 1188–1204
- Steinert RE, Feinle-Bisset C, Asarian L, Horowitz M, Beglinger C, Geary N. Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): Secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB. Physiol Rev. 2017, 97(1), 411–463.
- Sufian MK, Hira T, Asano K, Hara H. Peptides derived from dolicholin, a phaseolin-like protein in country beans (Dolichos lablab), potently stimulate cholecystokinin secretion from enteroendocrine STC-1 cells. J Agric Food Chem. 2007, 55(22), 8980−8986.
- Theysgeur S, Cudennec B, Deracinois B, Perrin C, Guiller I, Lepoudère A, Flahaut C, Ravallec R. New bioactive peptides identified from a tilapia byproduct hydrolysate exerting effects on DPP-IV activity and intestinal hormones regulation after canine gastrointestinal simulated digestion. Molecules. 2020, 26(1), 136.
- Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T, Holst JJ, Fenselau S, Schrezenmeir J, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. Am J Clin Nutr. 1999, 69(6), 1135–1143.
- Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. Am J Clin Nutr. 2003, 77(3), 605–611.
- van Dam RM. The epidemiology of lifestyle and risk for type 2 diabetes. Eur J Epidemiol. 2003, 18(12), 1115–1125.

- Wang C, He H, Zhang JL, Li X, Ma ZL. High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and primary structure identification of corn peptides by HPLC-diode array detection and HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Food Drug Anal. 2016, 24(1), 95–104.
- 上野伸哉, 古川智範, 二階堂義和, 下山修司, 柴祐子, 山田順子, $GABA_A$ 受容体応答の制御機構, 弘前医学, 2016, 66, 105−109.
- 折出亜希, 金崎春彦, ミジドルジ ツェルメグ, スクバッタル ウヌルジャルガル, 京哲, $\delta GABA_A$ 受容体特異的作動薬 DS1 によるゴナドトロピサブユニット発現, 日本生殖内分泌学会雑誌, 2015, 20, 53−58.
- 角南由紀子, 瀬底正吾, 加来浩平, 新規ジペプチジルペプチダーゼ-4 阻害薬 Anagliptin の単回および反復投与における薬物動態学的および薬力学的検討, 薬理と治療 2012, 40(10), 847–858.
- 寺内康夫, 門脇孝, 耐糖能以上（IGT）・境界型の今日的意義と今後の研究課題, 日本臨牀 2005, 63(増刊号 2), 21−26.
- 吉澤史昭, 長澤孝志, 代謝調節因子として注目される分岐鎖アミノ酸, 化学と生物, 2007, 45(3), 203−210.