高β-グルカン大麦粉を配合した高脂肪食を与えたマウスの短鎖脂肪酸、胆汁酸を介したシグナルが糖・脂質代謝に及ぼす影響

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2023-04-26
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 三尾, 建斗
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://otsuma.repo.nii.ac.jp/records/7501

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

令和４年度　博士論文

高β-グルカン大麦粉を配合した高脂肪食を与えたマウスの短鎖脂肪酸、胆汁酸を介したシグナルが糖・脂質代謝に及ぼす影響

指導教員　青江誠一郎　教授

大妻女子大学大学院
人間文化研究科
人間生活科学専攻
051120401
三尾　建斗

目次

第 1 章：序論・研究背景 7

第 2 章： C57BL/6J マウス、短鎖脂肪酸受容体（Gpr43）欠損マウス、GLUTag 細胞における大麦粉の摂取による腸内発酵の増加を介した Gpr43 のシグナルが耐糖能改善に及ぼす影響 10

第 1 節：概略 10

第 2 節：実験方法 10

2-2-1：実験試料の調整 10

2-2-2：実験動物 10

2-2-3：実験飼料 10

2-2-4：飼育方法（動物実験） 11

2-2-5：耐糖能試験 11

2-2-6：動物解剖とサンプル採取 11

2-2-7：短鎖脂肪酸分析 11

2-2-8：GLUTag 細胞の培養 12

2-2-9：生化学分析 12

2-2-10：siRNA トランスフェクション 12

2-2-11：Ca^{2+}イメージング 12

2-2-12：糖代謝、L 細胞分化、GLP-1 分泌に関わる遺伝子の mRNA 発現量(Real-time PCR) 13

2-2-13：統計解析 13

第 3 節：実験結果 13

2-3-1： C57BL/6J マウスの成長結果、耐糖能試験、糖代謝に関わる肝臓の mRNA 発現量 13

2-3-2：C57BL/6J マウスの各臓器内での SCFAs 濃度及び L 細胞分化に関わる遺伝子発現量 14

2-3-3：マウスの盲腸内容物を添加した GLUTag 細胞の GLP-1 濃度、Ca^{2+}分泌量、L 細胞分化に関わる遺伝子発現量 14

2-3-4：Gpr43 欠損マウスの成長結果、臓器重量、耐糖能試験結果及び腸内 SCFAs 濃度 15
第 4 節：考察 15
Table 1-1～1-5 19
Figure 1-1～1-10 24
第 3 章：C57BL/6J マウスにおける大麦粉の摂取による耐糖能の改善が β-グルカン特異的かどうかの検証 34
第 1 節：概略 34
第 2 節：実験方法 34
3-2-1：実験試料の分析 34
3-2-2：実験動物 34
3-2-3：実験飼料 34
2-2-4：飼育方法（動物実験） 34
3-2-5：耐糖能試験 35
3-2-6：動物解剖とサンプル採取 35
3-2-7：短鎖脂肪酸分析 35
3-2-8：マウス回腸の mRNA 発現量の分析（Real-time PCR） 35
3-2-9：盲腸内容物中の腸内細菌数 36
3-2-10：統計解析 36
第 3 節：実験結果 36
3-3-1：大麦粉から抽出した水溶性食物繊維画分の組成分析 36
3-3-2：成長結果及び耐糖能試験結果 36
3-3-3：盲腸内容物中の短鎖脂肪酸 37
3-3-4：盲腸内容物中の主要な腸内細菌数 37
3-3-5：L 細胞分化に関わる mRNA 発現量及び相関分析結果 37
第 4 節：考察 37
Table 2-1～2-6 40

Figure 2-1～2-6 46
第 4 章：C57BL/6J マウスにおける大麦由来水溶性食物繊維（β-グルカン、アラビノキシラン）の単回投与が、ファーストミール及びセカンドミールの血糖値変動に及ぼす影響 51
第 1 節：概略 51
第 2 節：実験方法 51
4-2-1：実験試料の調整 51
4-2-2：実験動物 52
4-2-3：飼育方法（試験 1） 52
4-2-4：飼育方法（試験 2） 52
4-2-5：生化学分析（試験 2） 52
4-2-6：短鎖脂肪酸（SCFAs）の分析（試験 2） 52
4-2-7：腸管内容物中の単糖分析（試験 2） 53
4-2-8：L 細胞機能、GLP-1 分泌に関連する mRNA 発現量(Real-timePCR)（試験 2） 53
4-2-9：統計解析 53
第 3 節：実験結果 53
4-3-1：ファーストミール及びセカンドミールの血糖値変動（試験 1） 53
4-3-2： セカンドミール時の GLP-1、インスリン濃度（試験 2） 53
4-3-3： セカンドミール時の腸管内の代謝産物（試験 2） 53
4-3-4： セカンドミール時の腸管内の L 細胞分化に関わる mRNA 発現量（試験 2） 54
第 4 節：考察 54
Table 3-1 57
Figure 3-1～3-4 58
第 5 章：C57BL/6J マウスにおける大麦粉の摂取が生体内での胆汁酸組成に及ぼす影響 62
第 1 節：概略 62

第 2 節：実験方法 62
5-2-1：実験試料の調整 62
5-2-2：実験動物 62
5-2-3：実験飼料 62
5-2-4：飼育方法（動物実験） 62
5-2-5：動物解剖とサンプル採取 63
5-2-6：胆汁酸分析 63
5-2-7：血清、肝臓脂質分析 63
5-2-8：脂質代謝、胆汁酸代謝に関わる mRNA 発現量(Real-time PCR) 63
5-2-9：メタボローム分析 63
5-2-10：統計解析 63
第 3 節：実験結果 64
5-3-1：血清、肝臓、糞中脂質含量 64
5-3-2：各組織内の胆汁酸含量 64
5-3-3：脂質代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現量 64
5-3-4：胆汁酸代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現量 64
5-3-5：メタボローム分析結果 65
第 4 節：考察 65
Table 4-1～4-2 68
Figure 4-1～4-7 71
第 6 章：抗生物質を投与し腸内細菌活性を低下させた C57BL/6J マウスにおける大麦粉の摂取による胆汁酸組成の変動を介した脂質代謝への影響 78
第 1 節：概略 78
第 2 節：実験方法 78
6-2-1：実験試料の調整 78
6-2-2：実験動物 78
6-2-3：実験飼料 79

6-2-4：飼育方法（動物実験） 79
6-2-5：動物解剖とサンプル採取 79
6-2-6：胆汁酸分析 79
6-2-7：脂質代謝、胆汁酸代謝に関わる mRNA 発現量(Real-time PCR) 79
6-2-8：Western blot （AMPK、pAMPK） 80
6-2-9：統計解析 82
第 3 節：実験結果 82
6-3-1：成長結果、臓器重量、血清・肝臓脂質濃度 82
6-3-2：各組織内の胆汁酸含量 82
6-3-3：脂質合成および胆汁酸代謝に関する mRNA 発現量（Real-time PCR） ... 82
6-3-4：肝臓内での AMPK, pAMPK のタンパク質濃度（Western blot） 83
6-3-5：肝臓内での AMPK signal に関わるシグナルの mRNA 発現量（HC・HB 群） 83
第 4 節：考察 83
Table 5-1～5-2 87
Figure 5-1～5-8 91
第 7 章：総括 99
Figure 6-1～6-2 102
第 8 章：謝辞 104
第 9 章：参考文献 105

第 1 章：序論・研究背景

メタボリックシンドロームは内臓脂肪型肥満に加え、高血圧、高血糖（インスリン抵抗性）、脂質異常症などの症状が 2 つ以上軽度でも重複する状態を示す疾患で、冠動脈性疾患や 2 型糖尿病等の病気を引き起こすリスク要因である(1)。そのメカニズムについては色々な因子が関与しているが、上記に述べた症状が密接に関連している事が示唆されている(2)。令和元年の国民健康・栄養調査によるとメタボリックシンドロームが強く疑われるもの、あるいは予備群と考えられるものの割合は男性では 55%、女性では 17%であり(3)、日本人はメタボリックシンドロームになると欧米人、米国人よりも遺伝的な特徴により悪影響を及ぼすことが報告されている。

近年様々な疫学研究やメタアナリシスにより、食事とメタボリックシンドロームの関係が明らかにされている(4-6)。タンパク質、脂質、炭水化物の構成が偏った栄養バランスの悪い食事や過剰なエネルギー摂取は、肥満、高血圧、高血糖、インスリン抵抗性を引き起こし、世界的に深刻化している。これらの疾患は、2 型糖尿病、冠状動脈性心臓病、心血管疾患を促進するメタボリックシンドロームの発症と関連している。食生活を改善することは、このような障害を回避する手段の 1 つである。例えば食物繊維の摂取量とメタボリックシンドロームとの関係は注目を集めている。主に全粒粉シリアル、豆類、新鮮な果物、野菜に含まれる食物繊維の摂取が脂質および糖代謝に影響を及ぼすことがいくつかの研究で示されている(7,8)。185 のコホート研究と 58 の臨床試験の結果をまとめたメタアナリシスでは、食物繊維の摂取量が多い人ほど、肥満、2 型糖尿病、大腸がんに対する予防効果が高まると報告されている(7)。別の研究では、全粒粉の摂取量の増加がメタボリックシンドロームのリスク低減と関連することが示された(8)。さらに 1994 年から 2005 年にかけて実施されたコホート研究では、野菜や果物由来の食物繊維ではなく、穀物由来の食物繊維の摂取が糖尿病のリスクを低減する事が報告されている(9)。これらの研究は、食物繊維の摂取がメタボリックシンドロームの発症を予防することができる事を示唆している。

大麦は、食物繊維が豊富に含まれている穀物であり、水溶性食物繊維と不溶性食物繊維をバランス良く含んでいる事が大きな特徴である。特に主な水溶性食物繊維源である「β-グルカン」はその生理的作用が着目されており、いくつかの研究で、大麦の摂取により血中脂質パラメータや耐糖能が改善されることが報告されている(10-13)。海外では 2010 年代より β-グルカンを用いた食品について健康強調表示が認められている。日本においても機能性表示食品制度について、食後血糖値の上昇抑制作用、コレステロール値の低下作用、腸内環境の改善作用を謳う複数の商品が事業者の責任における科学的根拠（システマティックレビュー）を用いて表示されている。

一般にこれらの効果は、β-グルカンが消化管内で粘度が上昇することで、栄養吸収速度が低下する作用や、糞中への脂質排泄が亢進するためと考えられている(11)。この粘性の上昇は食後のグルコース上昇やインスリンの過剰分泌を抑制する。著者が所属する研究室の

過去の研究でも、大麦β-グルカン抽出物の摂取によって耐糖能異常改善や肝臓内脂肪蓄積を抑制する事が確認されている(14)。またこれらの効果は高粘性の水溶性食物繊維に多く見られる特徴であり、粘性の殆ど無い不溶性食物繊維は食後血糖値やインスリン濃度に無関係であることも示唆されている。実際に粘性のない穀物のシリアルを対照群として、粘性のある穀物のシリアルを介入群とした臨床試験をまとめたメタアナリシス分析では、粘性のある食物繊維は、LDL コレステロール濃度および脂質代謝マーカーを減少させることが報告された(15)。

近年では腸内細菌によるβ-グルカンの発酵とそれに伴う代謝産物の増加によって耐糖能や脂質代謝に影響を与える可能性が示唆されている(12,13)。大麦に含まれるβ-グルカンは、腸内細菌叢によって発酵を受ける多糖類であり(16)、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸（SCFAs）が生成される(17)。SCFAs は宿主のエネルギー源となるとともに、G タンパク質共役型受容体（GPCR）の一種である脂肪酸受容体を活性化する(18)。脂肪酸の GPCR は炭素鎖の長さによって活性化する受容体が異なり、SCFAs は Gpr41 や Gpr43 によって認識される。その中でも Gpr43 は腸管 L 細胞や白色脂肪組織で発現しており(19)、腸内で認識されるとグルカゴン様ペプチド（GLP-1）の分泌を増加させ、インスリン抵抗性や耐糖能の改善をもたらす(20)。これらの結果から、大麦摂取により促進される腸内発酵による SCFAs の増加が、Gpr43 シグナルを介して耐糖能の改善をもたらすと予想されている。著者が所属する研究室では、過去にβ-グルカンを多く含む大麦を与えたマウスが、L 細胞数の増加および GLP-1 の分泌促進を介して耐糖能の改善を示したことを報告した(21)。さらに大麦粉を与えたマウスでは、SCFAs が GLP-1 などの腸管ホルモンの分泌を促進することにより、インスリン感受性が改善されることも報告されている(22)。しかし、いずれの研究も SCFAs 受容体を介した作用については検討していないことから、大麦の摂取による SCFAs の増加を介した代謝への影響は不明なままである。

一方で、β-グルカンはその粘性により他の栄養素や胆汁酸（BA）などを消化管下部へ移送するが、小腸下部で吸収されなかった一部の BA は腸内細菌によって代謝され、二次 BA となる。BA は肝臓において一次 BA(コール酸など)が合成され、回腸から 95%以上が吸収されて肝臓に戻る。この流れは腸肝循環と呼ばれている。これまでの報告から大麦β-グルカンの摂取はこの腸肝循環による吸収を阻害して、糞中での BA 排泄量を増加させる事により肝臓で BA 合成が増加し、結果としてコレステロールの低下に繋がる事が推測されている。しかしながら著者の修士研究では糞中排泄量が増加せず、肝臓での胆汁酸合成に関わる経路は抑制されていたにもかかわらず脂質代謝が改善していた(23)。最近の報告では腸内細菌による BA 組成の変動が主要な胆汁酸受容体である Tgr5 に認識され、cAMP が増加して生体内で代謝に影響することも報告されている(24)。さらに肝臓では BA の核内受容体である Farnesoid X receptor (Fxr)が活性化することで、BA 分泌の調整と、脂質代謝の調整を担っているとの報告もある(25)。高脂肪食環境下において BA 量が増加する事を考慮に入れると、大麦β-グルカンの摂取によって消化管に大量に脂質が流入することにより一次 BA の

分泌が増加する事で、その一部が受容体を介して各臓器に影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、腸内細菌によって一次 BA は二次 BA に代謝されるが、二次 BA（デオキシコール酸（DCA）、リトコール酸（LCA））は Tgr5 の活性能が一次 BA より高いことが報告されていることから(26)、盲腸以降の消化管下部では二次 BA が Tgr5 を介して各臓器に影響を及ぼしている可能性も考えられる。しかし、大麦の摂取によって変動する BA の動態、及び生体内でどのような作用を及ぼすかは殆ど明らかになっておらず、不明な点が多く残っている。

これらの事から、本研究では大麦の摂取による SCFAs 及び BA の動態変化が受容体を介して糖、脂質代謝に影響を及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には SCFAs と糖代謝（耐糖能改善）の関係、BA と脂質代謝（血清コレステロール値低下）の関係に着目し、実験動物、細胞を用いて作用機序の推定を行った。

2 章では糖代謝（耐糖能改善作用）における SCFAs の作用機序を明らかにするため、高脂肪肥満モデルマウスと Gpr43 欠損マウス、また L 細胞モデルの GLUTag 細胞を用いて検討を行った。3 章では 2 章で大麦の摂取による SCFA の増加を介した Gpr43 のシグナルが耐糖能改善作用に影響することが示されたため、この作用が β-グルカン特異的かどうか、β-グルカンを含まないアラビノキシラン主体の大麦粉を用いて検討を行った。4 章では血糖値の上昇抑制作用について、β-グルカンの粘性を介した作用と β-グルカン、アラビノキシランの腸内発酵を介した作用は影響を及ぼす時間帯が異なることが推測されたため、これらの抽出物をマウスに単回投与させ、投与後すぐの血糖値（ファーストミール）と投与後数時間後に標準食を摂取した場合の血糖値（セカンドミール）の影響を確認した。

5 章・6 章では脂質代謝（血清コレステロール値低下）における BA の作用機序を明らかにすることを目的とした。5 章では、2 章で使用した C57BL/6J マウスの各臓器を採取し、BF の摂取による BA の動態を把握した。さらに血中、門脈中の代謝産物の違いをキャピラリー電気泳動質量分析計（CE-MS）を用いたメタボローム分析にて確認した。結果として、仮説通り、高脂肪食における大麦の摂取は BA の腸肝循環を促進させるとともに、腸管内では一次 BA が減少し二次 BA が増加した。さらに回腸では Tgr5 の発現量が増加し、肝臓では BA の流入に伴い Fxr の発現量が増加した。これらの結果を踏まえ、6 章では抗生物質を添加した混合水をマウスに摂取させて腸内細菌の二次 BA への変換活性を落としたマウスを作成し、通常の飲料水を摂取させた群も加えて、BA 動態の変化が脂質代謝へ及ぼす影響の詳細を確認した。

第 2 章： C57BL/6J マウス、短鎖脂肪酸受容体（Gpr43）欠損マウス、GLUTag 細胞における大麦粉の摂取による腸内発酵の増加を介した Gpr43 のシグナルが耐糖能改善に及ぼす影響

第 1 節：概略

大麦 β-グルカンが発酵されると、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの SCFAs が生成される。SCFAs は宿主のエネルギー源となるとともに、L 細胞に存在する G タンパク質共役型受容体（GPCR）の一種である SCFAs 受容体 Gpr43 を刺激する。Gpr43 は GLP-1 の分泌を増加させ、その結果、インスリン抵抗性や耐糖能が改善されることが分かっている。これらの結果から、大麦摂取により促進される腸内発酵による SCFAs の増加が、Gpr43 シグナルを介して耐糖能の改善をもたらすことが期待されるが、Gpr43 を介した大麦の生理作用を検討した研究報告はない。従って、大麦摂取による腸内発酵を介した耐糖能の改善機構は不明なままである。

よって、第 2 章では、大麦摂取による空腹時および耐糖能改善効果作用が、消化管における腸内発酵と Gpr43 を介したものであるかどうかを、C57BL/6J マウス、Gpr43 欠損マウス、L 細胞モデルである GLUTag 細胞を用いて検討を行った。

第 2 節：実験方法

2-2-1：実験試料の調整

高 β-グルカン含有の大麦品種「ビューファイバー」（BF）の搗精粉（歩留まり 70%）豊橋糧食工業株式会社（日本、愛知）から購入した。大麦粉の栄養成分は Table1-1 に示した。

2-2-2：実験動物

雄の 4 週齢の C57BL/6J マウスと Gpr43 欠損(-/-)マウスを用いた。C57BL/6J マウスは株式会社チャールズリバーラボラトリーズジャパン（日本、横浜）より購入した。Gpr43 欠損(-/-)マウスは京都大学の木村郁夫教授より提供していただいた。

2-2-3：実験飼料

飼料は AIN-93G 組成を基本とし、脂肪エネルギー比が 50%の高脂肪食となるようラードを添加した。対照食（C）は総食物繊維量が 5%になるようセルロースを添加し、大麦群（B）は BF を添加した。大豆油、酒石酸コリン、*t*-ブチルヒドロキノンは富士フィルム和光純薬株式会社、ラードは植田製油株式会社より購入した。各実験飼料のタンパク質含量は、同等となるようにカゼインで調整した。実験飼料組成を Table1-2 に示した。

2-2-4：飼育方法（動物実験）

実験動物は室温 22±1℃、湿度 50±5%、12 時間明暗サイクル (8:00～20:00)で飼育した。

Table1-2 で示した実験飼料と水をそれぞれ 12 週間自由摂取させた。2～3 日毎に体重と飼料摂取量を測定し、飼料摂取量は飼料を入れた給餌器と摂取後の給餌器の重量を測定し、その差を摂取量とした。飼育最終週の 5 日間は動物をステンレスメッシュの上で飼育し、糞を採取した。糞は表面を洗浄後、凍結乾燥、粉砕して分析用の試料とした。

2-2-5：耐糖能試験

耐糖能試験は飼育 11 週目に朝 9 時より 6 時間の絶食後、20%グルコース溶液を、1.5g/kg 体重になるように経口ゾンデを用いてマウスの胃内に投与した。投与前に尾部より採血し（0 分)、投与後 15 分、30 分、60 分、120 分後に同様に採血を行った。血糖値の定量には「小型血糖測定器　グルテストエース R」（株式会社三和科学研究所）を使用した。空腹時血糖値（T0）と血清インスリン値から HOMA-IR を算出した（HOMA IR＝（血清インスリン（ng/ml）×26）×（空腹時血糖値（T0）(mmol/L）／22.5)。さらに各時点（T15、T30、T60、T120）で得られた血糖値から空腹時血糖値（T0）を引いた値を用いて、血中濃度時間曲線下面積（AUC）を算出した。T15 から T60 までに得られた血糖値の直線に近い値を用いて、先行研究(27)に基づきグルコース消失率（K 値）を求めた。

2-2-6：動物解剖とサンプル採取

解剖当日は 8 時間マウスを絶食させ、イソフルラン麻酔下で開腹し、心臓、門脈より採血、肝臓、盲腸、後腹壁脂肪組織、副睾丸周辺脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出し、重量を測定した。血液は氷中保存し、6500rpm、15 分間、4℃で遠心分離して血清を採取し-80℃で保存した。肝臓、盲腸はチャック付きビニール袋に入れ、-30℃で保存した。
また遺伝子抽出用に回腸、肝臓を切り出し、1ml の RNA Stabilization Reagent（Qiagen, Hilden、ドイツ）を添加し-30℃で保存した。また、本実験において,使用された動物プロトコルは大妻女子大学の動物研究委員会によって承認され、規則に従い実施した。

2-2-7：短鎖脂肪酸分析

盲腸・回腸内容物、血清、糞便、門脈中の SCFAs 濃度は、先行研究(28)に従ってガスクロマトグラフ質量分析計（5977A MSD 搭載 7890B GC システム；Agilent)）システムを用いて分析した。各マウスのサンプルは、抽出液（HCl、ジエチルエーテル、内部標準（クロトン酸)）中で 5mm ステンレスビーズ（AS ONE 株式会社、大阪、日本）を用いて TissueLyser II（Qiagen、Hilden、ドイツ）を使用してホモジナイズした。その後、遠心分離した上清を N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide と混合し、誘導体化した。サンプル上清を 7890B GC システムで分析した。各 SCFA のイオン質量は、選択イオンモードで測定した。オーブンを 60℃で 3 分間維持し、5℃/分の速度で 120℃まで昇温し、その後 20℃/

分の速度で300℃まで昇温し、最終的に300℃で2分間維持した。前記入口、電子衝撃イオン源、トランスファーラインの温度はそれぞれ250 ℃、230 ℃、260 ℃とした。SCFAsの濃度は，内部標準物質のピーク面積と比較することで算出した。

2-2-8：GLUTag細胞の培養

マウス大腸由来株である腸管分泌細胞モデルの GLUTag 細胞をトロント大 Daniel J. Drucker 教授の許可を得て、北海道大学比良徹教授より提供していただいた。細胞は10% FBSと1% penicillin/streptomycinを添加したDMEM（4500 mg/L glucose, L-glutamine, and sodium pyruvate,）中、37℃、5% CO_2で培養した。実験に使用する細胞は、Matrigel 24-well (Corning Inc., Corning, NY, USA)にプレーティングした。

2-2-9：生化学分析

マウスの血清および門脈中のインスリンおよび総 GLP-1 の濃度は、それぞれマウスインスリンELISAキット（柴柳株式会社、日本、群馬）およびGLP-1 ELISAキット（富士フィルム和光純薬株式会社、日本、東京）を用いて酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）により測定した。GLUTag細胞の総GLP-1含量は、以下のように測定した。1.25×10^5個の細胞を用いて24ウェルプレートに播種した。3日間培養した後、細胞をPBSで洗浄し、990μLのクレブスリンガー溶液（KRBH）（135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM NaH_2PO_4, 2. 0 mM $CaCl_2$ -$2H_2O$, 0.5 mM $MgSO_4$, 10 mM HEPES, 2.0 mM $NaHCO_3$）にマウス盲腸内容物の上清10μL（100 mg盲腸内容物に対して2.5 mlの滅菌水で遠心分離した）を添加した。上清を回収し、製造元のプロトコルに従い、ELISA法により総GLP-1含量を定量した。

2-2-10：siRNAトランスフェクション

Lipofectamine RNAiMAX（Thermo Fisher, Waltham, MA, USA）を用いて、24ウェル中のGLUTag細胞にネガティブコントロールsiRNAまたはGpr43 siRNA（Mm_Gpr43_5, Qiagen）をトランスフェクトした。ノックダウンの効率は、Gpr43のmRNA発現量によって確認した。総GLP-1、mRNA発現量、Ca^{2+}イメージングの測定は、トランスフェクション後24時間から48時間の間に実施した。

2-2-11：Ca^{2+}イメージング

細胞内Ca^{2+}濃度は，Fluo-4（富士フィルム和光ケミカルズ）の蛍光強度により評価した。蛍光画像は、Hamamatsu ORCA-ERデジタルカメラとOlympus 40×油浸対物レンズ(UPlanFLN; Olympus, Tokyo, Japan）を搭載したOlympus IX81蛍光顕微鏡を用いて取得した。GLUTag細胞を0.01% Pluronic入りKRBHバッファー中5μM Fluo-4で37℃、30分間インキュベートし、KRBHバッファーで3回洗浄後、37℃上に設置した。励起光は460-495 nm、発光は510-550 nmであった。実験開始60秒後に11倍濃縮試薬(MCC)を1/10量添加した。KCl(30mmol/L)

は実験終了 60 秒前に添加した。KCl の最大ピーク値を 100%として相対的なΔAUC を算出した。解析前に HCImage ソフトウェア（Hamamatsu, Japan）を用いてバックグラウンドを減算した。

2-2-12：糖代謝、L 細胞分化、GLP-1 分泌に関わる遺伝子の mRNA 発現量(Real-time PCR)

動物実験では、マウスの回腸と肝臓の total RNA を RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いて製造元のプロトコルに従って抽出し、その RNA から cDNA を合成した。GLUTag 細胞を 1.25 ×10^5 個の細胞を用いて 24 ウェルプレートに播種した。3 日間培養した後、PBS で洗浄し、MCC に上清を 10μL 含む KRBH を 990μL 加えて 24 時間培養した。上清を回収し、製造元のプロトコルに従って ISOGEN を用いて RNA を抽出した。 cDNA を混合し、L 細胞機能およびグルコース代謝に関するプライマー配列（Table 1-3）と PowerUp SYBR Green Master Mix を用いて Applied Biosystems Quant3 Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific）によるリアルタイム PCR により増幅させた。mRNA の発現解析には、$2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を使用した。参照遺伝子として 36B4 を用い、算出したΔCT 値を比較した。次に、各プライマーに添加した cDNA 溶液について、HC 群と HB 群のΔCT を差としてのΔΔCT を算出した。相対発現量は、HC 群に対する fold change で示した。

2-2-13：統計解析

本研究におけるすべての解析は R studio ソフトウェア（ver.1.3.1093; R-Tools Technology Inc., Richmond Hill, ON, Canada）を用いて行った。統計データは、Mean ± SE（平均値±標準誤差）で示した。2 章において実験群間の有意差は、値が正規分布している場合は Student の t-test によって検定した。データが正規分布でない場合は、Wilcoxon rank test を実施した。OGTT、および GLUTag 細胞を用いた mRNA 発現と Relative IAUC のデータについては、2 元配置分散分析を行い、因子の主効果と因子間の交互作用を評価した。因子間の相関解析は、Spearman の順位相関係数を用いて評価した。$p < 0.05$ を統計的に有意とした。

第 3 節：実験結果

2-3-1： C57BL/6J マウスの成長結果、耐糖能試験、糖代謝に関わる肝臓の mRNA 発現量

試験期間中の実験食の摂取量は、各群のマウス間で差はなかった（Figure 1-1A、Table 1-4）。12 週目の体重および飼料効率比にも各群で有意差は認められなかった（Figure 1-1B-C）。空腹時血糖値は HC 群に比べ HB 群で有意に低く（Figure 1-1D）、インスリン濃度は HC 群に比べ HB 群で低い傾向にあった（$p = 0.07$、Figure 1-1E）。インスリン感受性指数である HOMA-IR は、HC 群に比べ HB 群で有意に低かった（Figure1-1F）。グルコース投与後 15 分、30 分、60 分、120 分の血糖値は、HC 群に比べ HB 群で有意に低かった（Figure1-1 G）。 ま

た、AUC も有意に低かった（Figure 1-1H)。グルコース投与後のグルコース消失率（K 値）は、各群で有意差はなかったが、HB 群で高かった（p = 0.19、Figure 1-1I)。また、T15 分におけるインスリン濃度も HC 群に比べ HB 群で有意に低かった(Figure 1-2)。したがって、HB 群は高脂肪食による過剰なグルコースによる血糖値の上昇を防ぎ、インスリン感受性を改善した。一方、肝臓の糖代謝関連遺伝子の mRNA 発現量について、両群間に有意な差は認められなかった（Figure 1-1J)。

2-3-2：C57BL/6J マウスの各臓器内での SCFAs 濃度及び L 細胞分化に関わる遺伝子発現量

C57BL/6J マウスでは、HC 群に比べ、HB 群では盲腸の重量、酢酸、イソ酪酸、イソ吉草酸、吉草酸などいくつかの SCFAs、および盲腸内の総 SCFAs が有意に増加した（Figure 1-3 A-B)。一方、血清中の SCFAs 濃度には、両群間に有意な差は認められなかった(Figure 1-4A)。門脈中の酢酸および総 SCFAs の濃度は、HC 群に比べ HB 群で有意に増加した(Figure 1-4B)。回腸における酢酸、イソ酪酸および総 SCFAs の濃度は、HC 群に比べ HB 群で有意に増加した（Figure 1-5A)。また、糞便中の酢酸、酪酸、プロピオン酸、総 SCFAs の濃度は、HB 群で HC 群に比べ有意に増加した（Figure 1-5B)。また、門脈の血清中の総 GLP-1 濃度は、HB 群で HC 群に比べ有意に上昇した（Figure 1-3C)。次に、L 細胞の分化と GLP-1 分泌に関与する酵素の mRNA 発現量を測定した。プログルカゴン（Pgcg）を GLP-1 に処理する律速酵素である Pc1/3 の mRNA 発現量は、HB 群の回腸で HC 群に比べ有意に増加した（Figure 1-3D)。さらに、Gpr43 の mRNA レベルも増加する傾向にあったが（p = 0.06、Figure 1-3d)、Pgcg には両実験群間で有意差は認められなかった（Figure 1-3d)。しかし、Pc1/3 は Gpr43 と正の相関を示した（r = 0.61, p < 0.05）(Figure 1-6)。

2-3-3：マウスの盲腸内容物を添加した GLUTag 細胞の GLP-1 濃度、Ca^{2+}分泌量、L 細胞分化に関わる遺伝子発現量

大麦を摂取したマウスの盲腸内容物の上清を GLUTag 細胞に添加すると、対照群と比較して総 GLP-1 の濃度が有意に増加した（Figure 1-7A)。この効果は、Gpr43 をノックダウンした細胞では観察されなかった（Figure 1-7B)。Gpr43 を siRNA でノックダウンした GLUTag 細胞では、Gpr43 の発現が有意に低下（56%減少）し、Gpr43 の発現が安定して低下していることが示された（Figure 1-7B-C)。細胞内 Ca^{2+}の増加は GLP-1 やインスリンの分泌に影響を及ぼすことから、上清添加後の Ca^{2+}濃度動態を蛍光観察により検討した。その結果、大麦を摂取したマウスの盲腸内容物の上清を添加した GLUTag 細胞では、コントロールと比較して Ca^{2+}濃度が有意に上昇した（Figure 1-7D,F)。Gpr43 ノックダウン細胞では、これらの増加は実験群間で認められなかった(Figure 1-7E-F、2-way ANOVA（gene × diet, P <0.01）)。Gpr43 の mRNA 発現は HC 群に比べ HB 群で高い傾向にあった（Figure 1-7G、p = 0.07)。Pc1/3 の mRNA 発現は HB 群に比べ HC 群に有意に高かった（Figure 1-7H)。しかし、Gpr43

ノックダウン細胞では、これらの効果は消失した（Figure 1-7G-H、2-way ANOVA（gene × diet, Gpr43; p <0.05, Pc1/3; p <0.01)). 以上の結果から、大麦の摂取による腸内代謝産物の変化により、L 細胞-Gpr43 を介して GLP-1 分泌に影響を与えることが明らかとなった。

2-3-4：Gpr43 欠損マウスの成長結果、臓器重量、耐糖能試験結果及び腸内 SCFAs 濃度

Gpr43 欠損マウスの検討結果を下記に示す。マウスは試験期間中の実験食の摂取量に差がなかったため、同等のエネルギー量を摂取したと判断した（Figure 1-8A、Table 1-5)。Gpr43 欠損マウスは、体重および摂食効率比に実験群間の差は認められなかった（Figure 1-8B-C、Table 1-5)。空腹時血糖値については、実験群間で有意な差は認められなかった（Figure 1-8D)。HC（KO-HC）群に比べ HB（KO-HB）群を与えた Gpr43 欠損マウスではインスリン濃度が低下する傾向にあったが（p = 0.06、Figure 1-8E)、HOMA-IR 値には実験群間で有意な差は見られなかった（Figure 1-8F)。グルコース投与後の血糖値、AUC、K 値、T15 でのインスリン濃度は、実験群間で有意な差はなかった（Figure 1-8G-I、Figure 1-9)。盲腸内容物中のギ酸、酢酸、酪酸、コハク酸、総 SCFAs 濃度および盲腸重量は、大麦群が対照群に比べ有意に高かった（Figure 1-10A-B)。しかし、総 GLP-1 の濃度に有意差はなかった（Figure 1-8J)。したがって、大麦粉の摂取による腸内発酵の増加を介した総 GLP-1 濃度の上昇、並びにインスリン感受性を改善するには、Gpr43 の発現が必要であることが明らかとなった。

第 4 節：考察

第 2 章では、高脂肪条件下の C57BL/6J マウス、Gpr43 欠損マウス、腸管 L 細胞のモデルである GLUTag 細胞を用いて、L 細胞-Gpr43 シグナルが GLP-1 分泌に及ぼす影響を確認した。

大麦粉を添加した高脂肪食を与えた C57BL/6J マウスでは、空腹時血糖値、血清インスリン、グルコース誘発性血糖値上昇の抑制がみられた。一般に、大麦粉の摂取による食後血糖上昇抑制は、β-グルカンの粘性による他の栄養素の消化吸収の遅延に起因するとされている。しかし、著者の以前の研究では、低粘度の加水分解βグルカンを含む高脂肪食を与えたマウスでは、腸内 SCFAs が増加し、耐糖能が改善したことを報告している(29)。SCFAs は、いくつかの *in vivo* 研究において、GLP-1 の分泌を促進することが報告されている(17,22,30)。GLP-1 は、グルコース依存的にインスリン分泌を増加させ、血糖値を低下させる。また、グルカゴン分泌の抑制や骨格筋、脂肪細胞におけるグルコース取り込みの増加、肝臓における糖新生経路の抑制に働く。これらの作用機序により血糖コントロールが改善されインスリン抵抗性が緩和される(31,32)。

本章では HB 群において絶食時のインスリン濃度が低下していた。これは高脂肪食によって生じるインスリン抵抗性の悪化が大麦の長期摂取による GLP-1 の分泌促進によって抑制されたことで、血糖コントロールが改善され、結果として血糖依存的にインスリン濃度が低下したと推測した。

実際に、大麦を与えたマウスの門脈血中の総 GLP-1 分泌量は、回腸、盲腸、糞便中の SCFAs の増加とともに増加し、HOMA-IR が有意に減少した。過去の研究では、門脈にカテーテルを入れ、オーツ麦β-グルカンを与えた豚は、SCFA 吸収を増加させ、グルコースフラックスを減少させ、GLP-1 に関連した変化が報告された (30)。別の研究では、大腸にプロピオン酸を投与すると、ラットとマウスで GLP-1 の放出が促進されることを明らかにした(33)。研究デザインに違いはあるものの、本結果はこれらの先行研究と一致している。各群でグルコース消失率に差はなかったが、グルコース刺激後 15 分での血糖値およびインスリン値は大麦群で低下した。したがって、大麦摂取により、血糖値上昇を抑制するための適切な量のインスリンが分泌と考えられる。また、糖新生やグルコース輸送に関わる遺伝子の mRNA 発現量には変化がなかった。著者は以前に大麦粉を与えたマウスの肝臓、回腸、脂肪組織における糖代謝関連遺伝子の発現量は、コントロールと比較して変化がなかったことを修士論文研究にて報告している(23)。つまり本研究で観察された耐糖能の改善は、糖代謝関連遺伝子の mRNA 発現量ではなく、主に腸内の GLP-1 の分泌に起因するものであった。さらに、大麦の摂取により回腸の Gpr43 の mRNA 発現量が増加する傾向がみられた。同様の傾向は、マウス大腸由来の細胞モデルでも確認された。SCFAs は L 細胞に発現する Gpr43 を介して GLP-1 の放出を増加させる(34)。以上の結果から、大麦の摂取は SCFAs の増加を介して GLP-1 の分泌を増加させ、Gpr43 を活性化させ、耐糖能の改善に寄与すると結論付けた。

マウス盲腸内容物の上清を GLUTag 細胞に添加すると、Ca^{2+}濃度と GLP-1 分泌が促進されることが示された。この効果は、大麦を摂取させたマウスの盲腸内容物の上清によって亢進した。しかし、Gpr43 を siRNA でノックダウンすると、これらの作用は消失した。Gpr43 は、腸管の L 細胞で G タンパク質の Gq ファミリーと共役していることが知られている。Gpr43 の活性化は、SCFAs 刺激に応答して、細胞内シグナル伝達経路を介して細胞内 Ca^{2+} によって上昇する(35,36)。Gq シグナルが活性化され、Ca^{2+}濃度が上昇すると、GLP-1 の分泌が引き起こされる(37)。以前の研究では、酢酸またはプロピオン酸で L 細胞を刺激すると、Gpr43 依存的に Ca^{2+}濃度が上昇し、GLP-1 の分泌が誘導されることが報告されている (38)。これらのことから、大麦の摂取による SCFAs の上昇が Gpr43 を活性化し、細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させ GLP-1 分泌を誘発することが示唆された。さらに、本研究では、Pgcg を活性型 GLP-1 に変換する酵素である Pc1/3 が Gpr43 依存的に発現上昇したが、Pgcg の mRNA 発現は *in vivo* および *in vitro* ともに上昇しないことが確認された。従って、大麦摂取による GLP-1 分泌増加のメカニズムは、mRNA 発現量では説明できない。しかし、過去の研究では大麦粉を摂取したマウスは、Pgcg などの L 細胞の機能に関連する遺伝子発現は変化しないものの、L 細胞の数が増加することで GLP-1 分泌が増加したとの報告がある(21)。GLP-1 の分泌シグナルについては、さらなる研究が必要である。さらに、GLUTag 細胞は、Gpr43 の発現が低いことが報告されている(38)。しかし本研究では Real-time PCR を用いて、Gpr43 が同細胞で発現していることを明らかにした。さらに、最近の研究では、Gpr43 が GLUTag 細胞で発現していることも確認されている(39)。GLUTag 細胞における Gpr43 の発現に関する

これらの相違は、異なる培養条件および/またはドナーに起因している可能性がある。

C57BL/6Jマウスとは対照的に、Gpr43欠損マウスでは、大麦粉の摂取により盲腸内のSCFAsが増加するにもかかわらず、血糖値の上昇抑制および門脈内の総 GLP-1 の増加が減弱することが示された。本研究は、大麦の摂取が Gpr43 を介して GLP-1 の分泌を増加させることにより、血糖値の上昇を抑制することを初めて示した。以前の研究では、プロバイオティクス株（*Bifidobacterium animalis* subsp. lactis GCL2505）の摂取によって、マウスの血中SCFAsが増加するとともに耐糖能試験における血糖値の上昇が抑制されたが、Gpr43欠損マウスではこれらの効果が消失することが報告されている(40)。さらに、血清酢酸濃度がGpr43を活性化し、宿主のエネルギー消費を増加させ、体脂肪蓄積を抑制することも報告している。Gpr43の活性化には生理的濃度のSCFAsで十分であることから(18)、本研究では大麦粉の摂取による SCFAs 増加率でも Gpr43 の活性化により耐糖能に影響する可能性が示唆された。しかし、本研究では、腸管内のSCFA濃度も上昇する一方で、血清酢酸濃度に有意な変化は見られなかった。これは解剖前に 8 時間絶食をした事により血中の酢酸がエネルギーとして使用された事も考えられる。しかしながら Gpr43 を介した血糖コントロールの改善および脂肪率の減少に対するSCFA増加の効果は不明なままである。この矛盾を解決するためには、血清酢酸の用量反応と脂肪率の減少／血糖コントロールの改善を検討するさらなる研究が必要である。さらに、Gpr43欠損マウスでも、大麦摂取後にインスリン濃度の低下が見られる傾向があった。大麦摂取による高インスリン血症の改善は、腸内発酵の効果とβ-グルカンの粘性による栄養吸収の抑制の両方によるものと思われる。しかし、グルコースによる血糖値の上昇は抑制されなかったことから、腸内発酵による Gpr43 シグナルが主に耐糖能の改善に関与していることが示唆された。以前の研究では、Gpr43欠損マウスは体重、脂肪重量が増加し、GLP-1が減少し、インスリン感受性が低くなることが報告されている(20)。しかし、本研究では、C57BL/6J マウスと Gpr43 欠損マウスの間で最終体重に差はなかった。この相違は、C57BL/6J マウスが高脂肪食を与えると肥満を生じ高血糖症状を発症することに起因すると考えられる。さらに、今回は他の臓器に発現しているGpr43のインスリンシグナルに関連する要因については調査していない。Gpr43は脂肪組織に発現しており、脂肪蓄積を抑制し、脂質およびグルコース代謝を促進することが報告されている(20)。しかし，大麦摂取によるSCFAsの増加は，盲腸・結腸の腸内細菌叢による発酵に起因するため，他の組織でのGpr43シグナルの確認は，SCFAsの腸管吸収率を考慮する必要がある．腸管で吸収された酢酸とプロピオン酸の大部分は、肝臓や他の組織で代謝される(41,42)。酪酸は主に腸管で利用され、主要なエネルギー源であるとともに、大腸のバリア機能を高める(43)。門脈の酢酸と総SCFAsの濃度は、有意に増加した。したがって、門脈を経由して肝臓に運ばれたSCFAは、肝臓で速やかに代謝された可能性がある。他の組織におけるGpr43シグナルを解明するためには、さらなる研究が必要である。

以上、肥満マウスにおける大麦粉の摂取は、腸内発酵を介してグルコース負荷による血糖値の上昇を抑制することを示した。GLUTag細胞を用いた検討により、大麦由来のSCFA増加

を介した Gpr43 シグナルの活性化により、細胞内 Ca^{2+} レベルと GLP-1 分泌が亢進することを明らかにした。さらに、Gpr43 欠損マウスでは、グルコースによる血糖値上昇の抑制と門脈中の総 GLP-1 の増加が消失した。したがって、大麦摂取による耐糖能異常の改善効果には、SCFAs を介した Gpr43 シグナルが寄与していることが示唆された。

Table 1-1～1-5

Table 1-1: 大麦粉の栄養成分表

(g/100g dry matter)	Barley flour (BF)
Fat	3.4
Protein	9.4
Available carbohydrate	67.8
Ash	1.0
Total dietary fiber	18.4
β-(1-3)-(1,4) Glucan	10.1

Fat: Acid hydrolysis method

Protein: Kjeldahl method

Ash: Dry ashing method

Total dietary fiber: AOAC 991.43 method

β-(1-3)-(1,4) Glucan: McCleary method (AOAC 995.16)

Available carbohydrate: (100 − (“Fat” + “Protein” + “Ash” + “Total dietary fiber”)

Table.1-2: 実験に用いた対照および大麦群の飼料組成

(g/kg diet)

	Control diet	Barley diet
Casein	200.0	167.9
Corn starch	132.0	132.0
Dextrinized corn starch	197.5	17.6
Sucrose	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	70.0
Lard	200.0	190.9
Cellulose	50.0	-
Barley flour	-	271.1
AIN-93G mineral mixture	35.0	35.0
AIN-93 vitamin mixture	10.0	10.0
L-cystine	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5
t-butylhydroquinone	0.014	0.014

Table 1-3: リアルタイム PCR で使用したプライマー配列

gene symbol	Forward	Reverse
G6pd	5’-TACTGGCAGAGCAGGT-3’	5’-GATCTGGTCCTCACG-3’
Pepck	5’-CCACAGCTGCTGCAGAACA-3’	5’- GAAGGGTCGCATGGCAAA-3’
Glut2	5’-CGCAATGGTCGCCTCATT-3’	5’-CAGTCCTGATACACTTCGTC-3’
Pk	5’-TGCAATTGGAGCCGTGGA-3’	5’-CCTGGGCAGAACGAGTCACA-3’
Gpr43	5’-GGGATCTGGGTCACATGCTTAT-3	5’-ATGTCAGACAGACGGGTACCAA-3’
Pc1/3	5’-AGACAGCATTACACCATCTCTA-3’	5’-AGAACACTTCTCTGCATACCAAGGT-3’
Pgcg	5’-ATTGCCAAACGTCATGATGA-3’	5’-GGCGACTTCTTCTGGGAAGT-3’
NeuroD	5’-CTTGGCCAAGAACTACATCTGG-3’	5’-CGTGTTTGAAAGAGAAGTTGCC-3’
Reference		
36B4	5’-GGCCCTGCACTCTCGCTTTC-3	5’-TGCCAGGACGCGCTTGT-3’

Table 1-4: 実験飼料を与えたC57BL/6Jマウスの体重、飼料摂取量、および臓器重量

	HC (C57BL/6J)	HB (C57BL/6J)	p value
Initial weight (g)	20.92 ± 0.49	20.72 ± 0.44	0.84
Final weight (g)	43.67 ± 1.47	41.13 ± 1.15	0.29
Body weight gain (g/d)	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.26
Food intake (g/d)	2.83 ± 0.06	2.85 ± 0.06	0.84
Food efficiency ratio (%)	8.99 ± 0.32	8.27 ± 0.46	0.21
Liver weight (g)	1.52 ± 0.11	1.29 ± 0.04	0.05
Cecum with contents (g)	0.29 ± 0.01	0.37 ± 0.02	< 0.01
Retroperitoneal fat (g)	1.06 ± 0.07	0.91 ± 0.06	0.13
Epididymal fat (g)	2.50 ± 0.10	2.47 ± 0.17	0.91
Mesenteric fat (g)	1.17 ± 0.14	0.91 ± 0.09	0.12

データはMean ± SEで示した (n=8)。

Food efficiency ratio = Body weight gain / Feed intake × 100

Table 1-5: 実験飼料を与えたGpr43欠損マウスの体重、飼料摂取量、臓器重量

	*Gpr*43(-/-) HC	*Gpr*43(-/-) HB	p value
Initial weight (g)	22.26 ± 0.36	22.30 ± 0.59	0.95
Final weight (g)	38.37 ± 1.50	36.54 ± 2.09	0.49
Body weight gain (g/d)	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.42
Food intake (g/d)	2.60 ± 0.14	2.69 ± 0.18	0.71
Food efficiency ratio (%)	6.31 ± 0.55	5.24 ± 0.69	0.24
Liver weight (g)	1.51 ± 0.10	1.44 ± 0.13	0.67
Cecum with contents (g)	0.26 ± 0.02	0.40 ± 0.02	<0.01
Retroperitoneal fat (g)	0.91 ± 0.07	0.75 ± 0.10	0.20
Epididymal fat (g)	1.90 ± 0.13	1.63 ± 0.18	0.22
Mesenteric fat (g)	0.77 ± 0.10	0.68 ± 0.15	0.63

データはMean ± SEで示した (n=8-10)。

Food efficiency ratio = body weight gain / food intake × 100

Figure 1-1～1-10

Figure 1-1

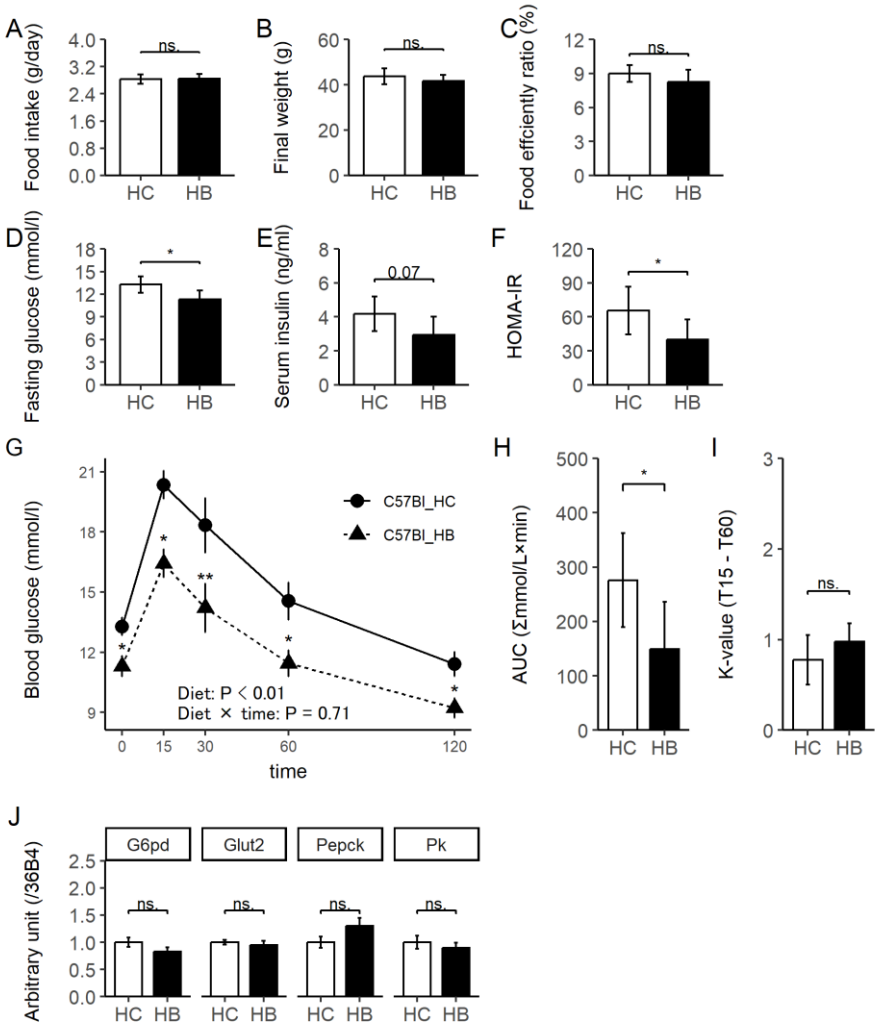


Figure 1-1(A)対照食または大麦食を与えた C57BL/6J マウスの実験期間中の飼料摂取量。(B-C) 試験終了時のマウスの体重および飼料摂取効率（体重増加量／飼料摂取量×100)。(D)空腹時血糖値。(E)血清中のインスリン濃度。(F) インスリン濃度と空腹時血糖値を用いて算出した HOMA-IR。(G) 耐糖能試験における 15 分、30 分、60 分、120 分での血糖値。g の下段は、2 元配置分散分析により決定した、食事(Diet)の主効果、および食事と時間(time)との交互作用の p 値を示す。(H) 各期間で得られた血糖値を用いて算出した血中濃度時間曲線下面積（AUC)。(I) T15 から T60 までに得られた血糖値の直線に近い値を用いたグルコース消失率（K 値)。(J) Real-time PCR を用いた肝臓の糖代謝に関与する遺伝子の mRNA 発現量。データは Mean ± SE で示した（n=8)。図中の上付き文字は、実験群間の有意差を示す（*p <0.05, **p <0.01)。

Figure 1-2

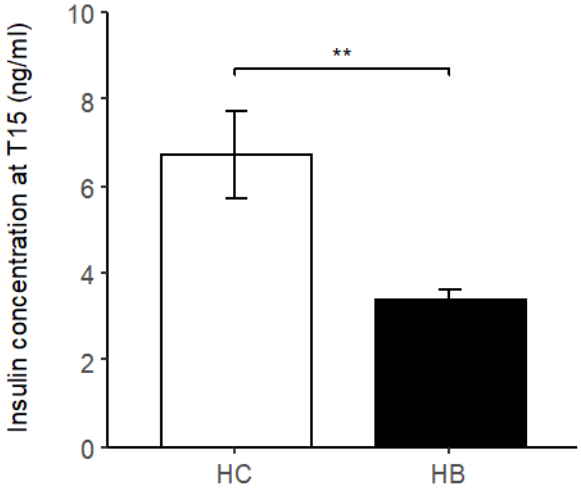


Figure 1-2：T15 のインスリン濃度。

データは Mean ± SE で示した（プールデータ、繰り返しによる n=4）。

図中の上付き文字は実験群間の有意差を示す（*p <0.05, **p <0.01）。

Figure 1-3

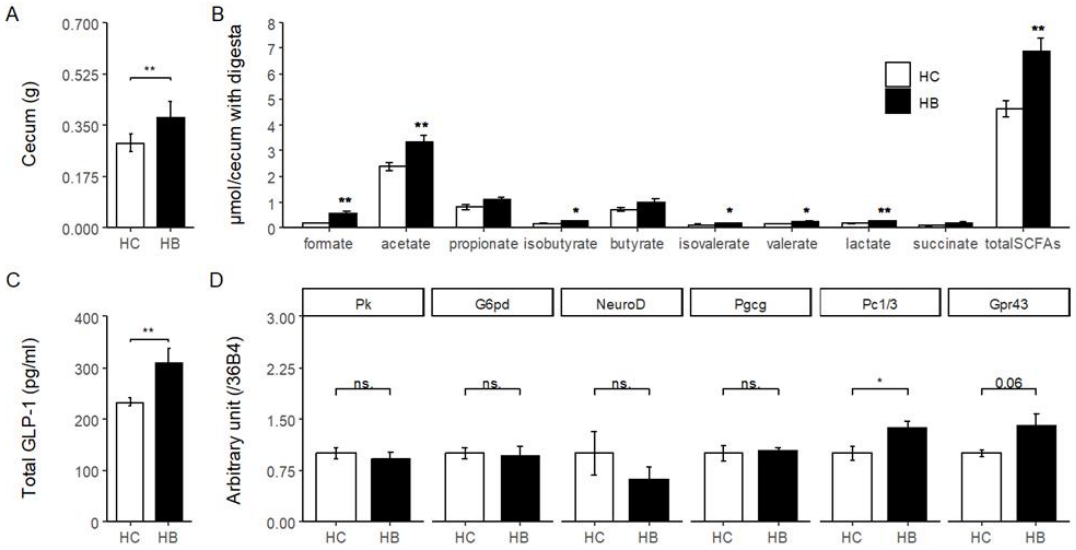
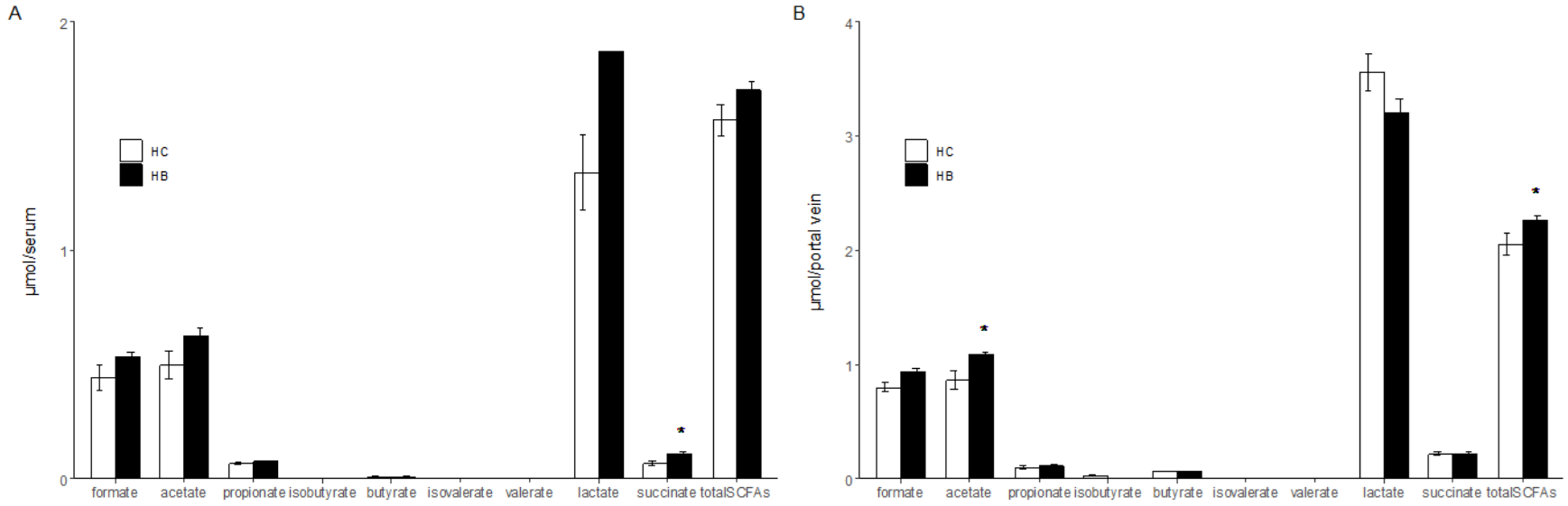


Figure1-3 (A) C57BL/6J マウスに対照食または大麦食を与えたときの盲腸重量。(B) 盲腸内容物中の SCFAs および有機酸の濃度。(C) 門脈中の総 GLP-1 濃度。(D) Real-time PCR 法による回腸の糖代謝および L 細胞機能に関与する遺伝子の mRNA 発現レベル。データは Mean ± SE で示した (n=8)。図中の上付き文字は、実験群間の有意差を示す (*p <0.05, **p <0.01)。

Figure 1-4

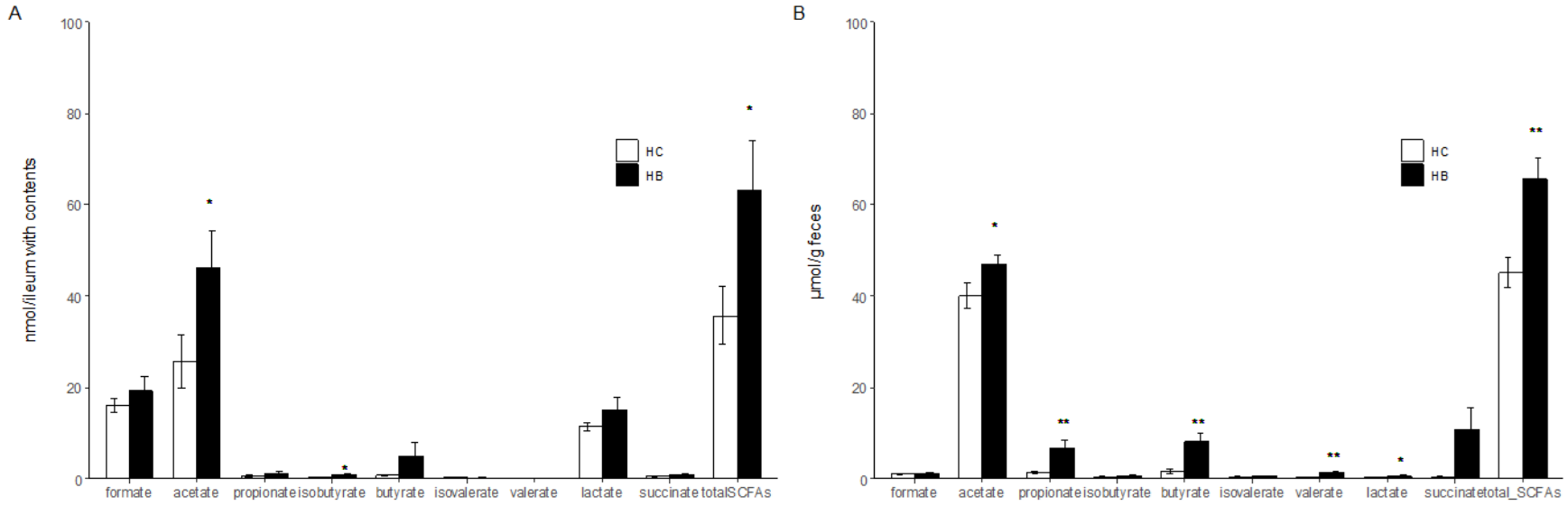


血清（A）および門脈（B）中の SCFAs と有機酸の濃度を示す。

データは Mean ± SE で示した（n=8）。

図中の上付き文字は実験群間の有意差を示す（*p <0.05, **p <0.01）

Figure 1-5

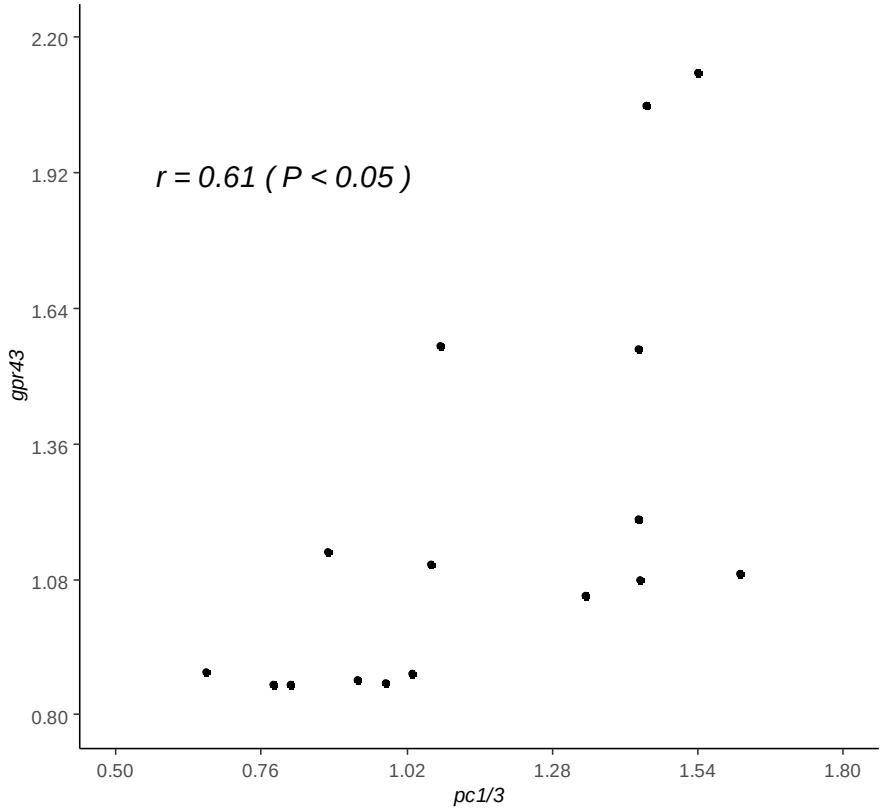


回腸（A）および糞便（B）中の SCFAs および有機酸の濃度。

データは Mean ± SE で示した（n=8）。

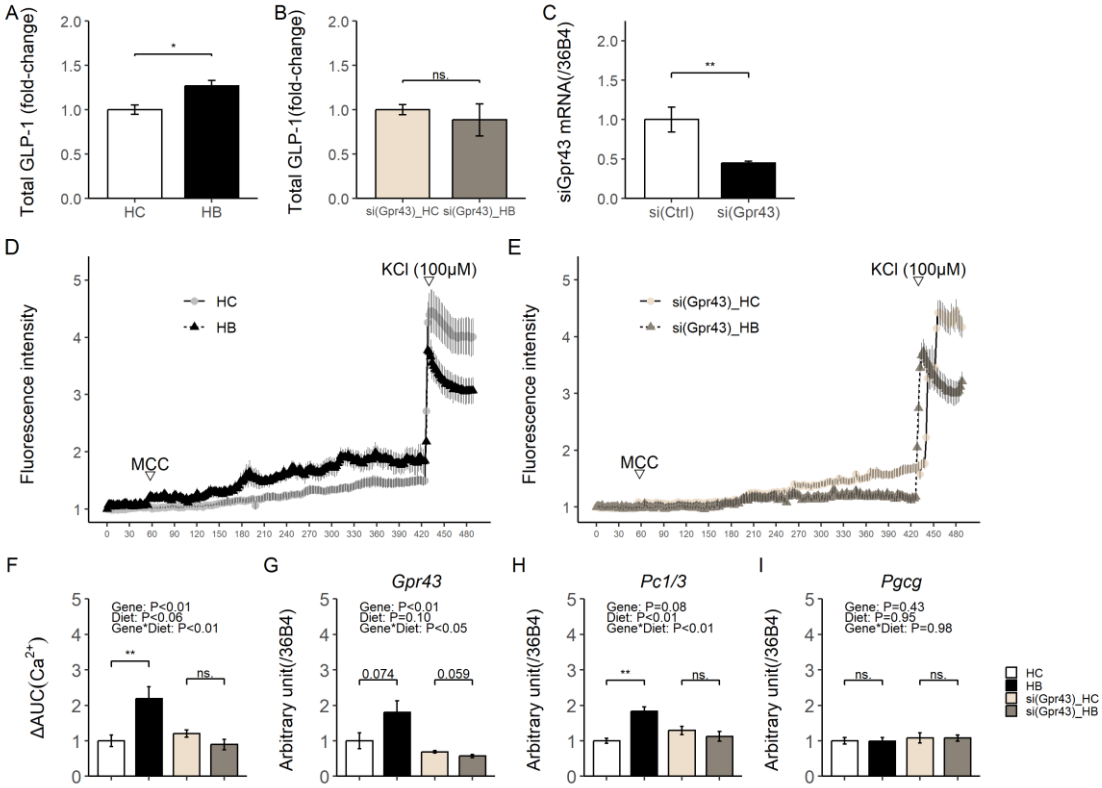
図中の上付き文字は、実験群間の有意差を示す（*p <0.05, **p <0.01）。

Figure 1-6



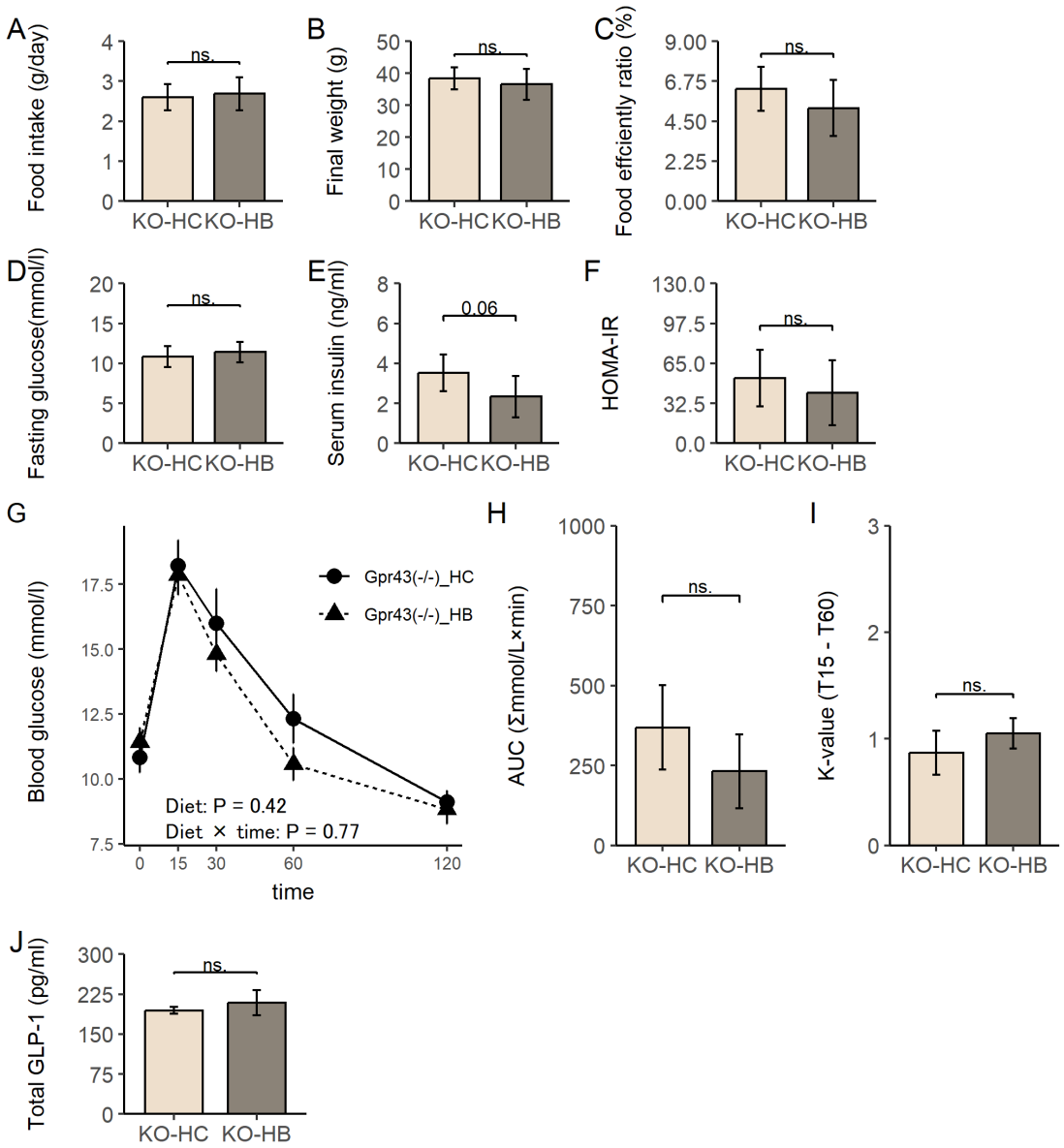
C57BL/6J マウスの回腸における Gpr43 と pc1/3 の mRNA 発現量の Spearman の散布図。
r 値は Spearman の相関係数を示す。

Figure 1-7



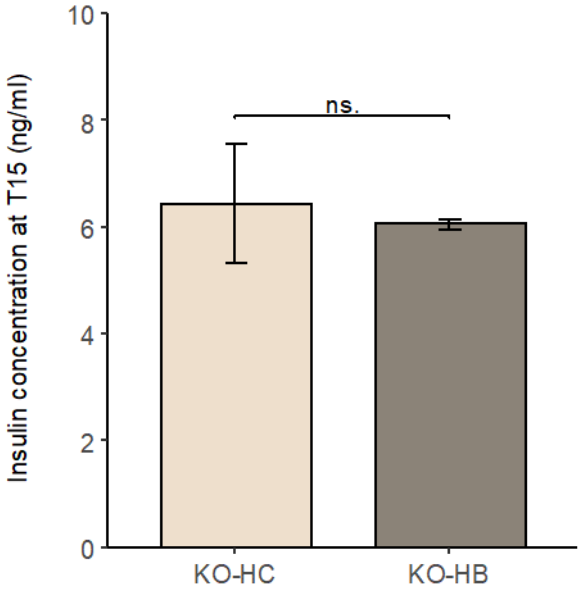
大麦または対照飼料を摂取したマウスの盲腸内容物中の上清を添加した GLUTag 細胞(A) または Gpr43 ノックダウン GLUTag 細胞 (B) から上清を採取して測定した総 GLP-1 の濃度 (n=6)。(C) Gpr43 ノックダウン細胞および正常細胞における Gpr43 の mRNA 発現量(n=6)。(D-E) Gpr43 ノックダウン細胞または正常 GLUTag 細胞に上清を添加した際のレシオメトリック蛍光による Ca^{2+}濃度の変化(n=3～5)。(F) 細胞内 Ca^{2+}値を用いて算出した濃度-時間曲線下面積 (AUC) (n=3～5)。(G-I) 大麦またはコントロール飼料を与えたマウスの盲腸内容物の上清を添加した GLUTag 細胞及び Gpr43 ノックダウン GLUTag 細胞での L 細胞機能に関連する mRNA 発現量(n=6)。F-I の上部は、2 元配置 ANOVA によって決定された、遺伝子型 (Gene)、添加盲腸内容物 (Diet)、およびそれらの相互作用の主効果の p 値を示している。データは、Mean ± SE で示した。図中の上付き文字は、実験群間の有意差を示す (*p <0.05, **p <0.01)。

Figure 1-8



(A) Gpr43 欠損マウスに対照食（KO-HC）または大麦（KO-HB）を摂取させた実験期間中の摂取量。(B-C) 実験期間終了時のマウスの体重および飼料効率(体重増加量/摂取量×100)。(D)空腹時血糖値。(E)血清中のインスリン濃度。(f) インスリン濃度と空腹時血糖値を用いて算出した HOMA-IR。(G) 15 分、30 分、60 分、120 分での耐糖能試験時の血糖値 g の下段は、2 元配置分散分析によって決定された、食事の主効果、および食事と時間との間の交互作用の p 値を示す。(H) 各期間で得られた血糖値を用いて計算した血中濃度時間曲線下面積（AUC)。(I) T15 から T60 までに得られた血糖値の直線に近い値を用いた K 値。(J) 門脈中の総 GLP-1 の濃度。データは Mean ± SE で示した(n=8～10)。図中の上付き文字は、実験群間の有意差を示す（*p <0.05, **p <0.01)。

Figure 1-9

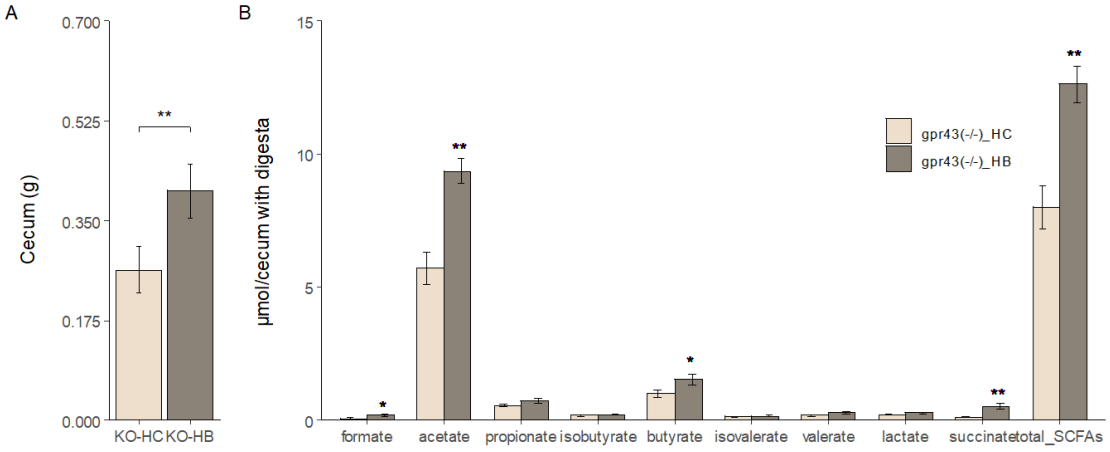


Gpr43 欠損マウスにおける T15 のインスリン濃度。

データは Mean ± SE で示した（プールデータ、繰り返しによる n=4)。

図中の上付き文字は実験群間の有意差を示す（*p <0.05, **p <0.01)。

Figure 1-10



Gpe43 欠損マウスの盲腸の重量(A)と盲腸内の SCFAs と有機酸の濃度(B)。

データは Mean ± SE で示した(n=8～10)。

図中の上付き文字は実験群間の有意差を示す(*p <0.05, **p <0.01)。

第 3 章：C57BL/6J マウスにおける大麦粉の摂取による耐糖能の改善がβ-グルカン特異的かどうかの検証

第 1 節：概略

第 2 章の結果より、大麦粉の摂取による耐糖能改善作用は腸内発酵を介した SCFAs の増加による Gpr43 のシグナルが寄与していると推定された。次に 3 章として、第 2 章で得られた作用がβ-グルカン特異的な作用であるか、β-グルカンを含まないアラビノキシラン主体の大麦粉(bgl)及び BF を C57BL/6J マウスに摂取させて検討した。

第 2 節：実験方法

3-2-1：実験試料の分析

BF とβ-グルカンフリー大麦（「四国はだか 84」(bgl)）を使用した。各大麦粉の栄養組成を Table 2-1 に示す。大麦粉中のβ-グルカン濃度は、McCleary 法（AOAC 995.16）により測定した。総食物繊維は、酵素重量法（AOAC 991.43）により測定した。タンパク質および脂質は、それぞれケルダール法および酸加水分解法で分析した。水溶性食物繊維画分(SDF)は BF および bgl 粉から抽出し、糖質組成を分析した（Figure 2-1)。大麦粉 10g にヘキサン 100ml を加え、8 時間攪拌した。その後、遠心分離により残渣を回収し、ヘキサンを除去した。この脱脂大麦粉を用いて、先行研究(44)に準じて、SDF を抽出した。SDF を硫酸で酸分解して単糖を抽出し、中和した溶液を GC/MS で分析した。

3-2-2：実験動物

雄の 4 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。C57BL/6J マウスは株式会社チャールズリバーラボラトリーズジャパンより購入した。

3-2-3：実験飼料

飼料は AIN-93G 組成を基本とし、脂肪エネルギー比が 50%の高脂肪食となるようラードを添加した。対照食（C）は総食物繊維量が 5%になるようセルロースを添加し、大麦群はそれぞれ BF、及び bgl を添加した。大豆油、酒石酸コリン、*t*-ブチルヒドロキノンは富士フィルム和光純薬株式会社、ラードは植田製油株式会社より購入した。各実験飼料のタンパク質含量は、同等となるようにカゼインで調整した。実験飼料組成を Table 2-2 に示した。

2-2-4：飼育方法（動物実験）

実験動物は室温 22±1℃、湿度 50±5%、12 時間明暗サイクル (8:00～20:00)で飼育した。

Table 2-2 で示した実験飼料と水をそれぞれ 12 週間自由摂取させた。2～3 日毎に体重と飼料摂取量を測定し、飼料摂取量は飼料を入れた給餌器と摂取後の給餌器の重量を測定し、その差を摂取量とした。

3-2-5：耐糖能試験

耐糖能試験は飼育 11 週目に朝 9 時より 6 時間の絶食後、20%グルコース溶液を、1.5g/kg 体重になるように経口ゾンデを用いてマウスの胃内に投与した。投与前に尾部より採血し（0 分）、投与後 15 分、30 分、60 分、120 分後に同様に採血を行った。血糖値の定量には「小型血糖測定器　グルテストエース R」（株式会社三和科学研究所）を使用した。空腹時血糖値（T0）と血清インスリン値から HOMA-IR を算出した（HOMA IR＝（血清インスリン（ng/ml）×26）×（空腹時血糖値（T0）(mmol/L）／22.5)。またグルコース溶液投与後 0、15、30、60 分の血清を採取し、活性型 GLP-1 およびインスリン濃度を、マウスインスリン ELISA キット（シバヤギ株式会社）および GLP-1 ELISA キット（富士フィルム和光純薬株式会社）を用いて測定した。各期間で得られた血糖値、インスリン、総 GLP-1 の値を用いて、血中濃度時間曲線下面積（AUC）を算出した。

3-2-6：動物解剖とサンプル採取

解剖当日は 8 時間マウスを絶食させ、イソフルラン麻酔科で開腹し、心臓、門脈より採血、肝臓、盲腸、後腹壁脂肪組織、副睾丸周辺脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出し、重量を測定した。血液は氷中保存し、6500rpm、15 分間、4℃で遠心分離して血清を採取し-80℃で保存した。肝臓、盲腸はチャック付きビニール袋に入れ、-30℃で保存した。
また遺伝子抽出用に回腸を切り出し、1ml の RNA Stabilization Reagent を添加し-30℃で保存した。また、本実験において,使用された動物プロトコルは大妻女子大学の動物研究委員会によって承認され、規則に従い実施されている。

3-2-7：短鎖脂肪酸分析

盲腸中の SCFAs 濃度は、ガスクロマトグラフ質量分析計（5977A MSD 搭載 7890B GC システム；Agilent)）システムを用いて、2 章と同様の分析方法で実施した。

3-2-8：マウス回腸の mRNA 発現量の分析（Real-time PCR）

マウスの回腸の total RNA を RNeasy Mini Kit を用いて製造元のプロトコールに従って抽出し、その RNA から cDNA を合成した。L 細胞機能および糖代謝に関するプライマー配列（2 章と同様、Table 1-3）と PowerUp SYBR Green Master Mix を用いて Applied Biosystems Quant3 Real-Time PCR System によるリアルタイム PCR により増幅させた。mRNA の発現解

析には、$2^{-\Delta\Delta CT}$法を使用した。参照遺伝子として36B4を用い、算出したΔCT値を比較した。次に、各プライマーに添加したcDNA溶液について、C群とBF群、及びbgl群のΔCTを差としてのΔΔCTを算出した。相対発現量は、C群に対するfold changeで示した。

3-2-9：盲腸内容物中の腸内細菌数

盲腸内の主要な腸内細菌叢を、既報(45)に従って、real-time PCRで解析した。QIAamp® Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen) を用いて盲腸消化物中の全DNAを抽出した。DNAにPowerUp SYBR Green Master Mixと属レベルの細菌プライマーを混合した(Table 2-3)。この混合溶液を増幅し、閾値サイクル (Ct) 値を求めた。同様に、各標準細菌株を連続希釈して標準DNA溶液を調製し、増幅してCt値を得た (Table 2-3)。標準菌株のCt値から検量線を作成し、盲腸消化物中のコロニー形成単位(CFU)を算出した。

3-2-10：統計解析

すべてのデータは、Mean ± SEで示した。実験群間の有意差は、対照(C)群とのDunnettの多重比較検定により判定した。$p < 0.05$を統計的に有意とした。

第3節：実験結果

3-3-1：大麦粉から抽出した水溶性食物繊維画分の組成分析

BF及びbglの水溶性食物繊維成分をGC/MSで分析した (Figure 2-2A、Table 2-4)。BFではβ-グルカン画分であるグルコースが全SDFの84.4%を占め、bglは35.7%であった。アラビノキシラン画分であるアラビノースとキシロースはBFの4.9%と8.3%を占め、bglはそれぞれ20.4%と40.4%であった。以前の研究では、アルカリで抽出した全粒大麦のアラビノースとキシロースの比率はそれぞれ26.3%と38.3%と報告されており(46)、本研究とほぼ一致する結果であった。したがって、BFのSDFはβ-グルカンの純度が高く、bglはアラビノキシランが高いことがわかった。

3-3-2：成長結果及び耐糖能試験結果

各試験飼料を摂取したマウスの摂餌量に差はなく、同等のエネルギー量を摂取した (Figure 2-3B)。最終体重、体重増加率、飼料効率、腹部内臓脂肪はC群に比べBF群で有意に低かった ($p < 0.05$) (Table 2-5)。OGTTでは，空腹時，グルコース投与後30分後の血糖値およびAUCは，C群に比べBF群で有意に低く ($p < 0.05$)，60分では低い傾向にあった ($p = 0.06$) (Figure 2-3C-D)．空腹時のインスリン濃度は、C群に比べBF群で有意に低

く（$p < 0.05$）、15 分で低下する傾向があった（$p = 0.06$）（Figure 2-4A）。空腹時、グルコース投与後 15 分、30 分の GLP-1 濃度に有意差はなかった。しかし、60 分後の GLP-1 濃度は、BF 群および bgl 群で C 群に比べ有意に高かった（Figure 2-3E）。また、グルコース投与後 30 分から 60 分までの AUC は、bgl 群、BF 群ともに C 群に比べ有意に高かった（Figure 2-3F）。したがって、大麦摂取による GLP-1 分泌量の増加は、β-グルカンだけでなくアラビノキシランも関与していることがわかった。

3-3-3：盲腸内容物中の短鎖脂肪酸

盲腸の内容物重量は、C 群に比べ BF 群で有意に増加し（$p < 0.05$）、bgl 群でも増加する傾向が見られた（$p = 0.10$）（Figure 2-5A）。盲腸内容物中の酢酸、コハク酸、総 SCFAs の濃度は、C 群と比較して bgl 群および BF 群で有意に高かった（$p < 0.05$）（Figure 2-5B）。また、酪酸および吉草酸濃度は、C 群と比較して bgl 群で有意に高かった（$p < 0.05$）。

3-3-4：盲腸内容物中の主要な腸内細菌数

*Clostridum leptum sub*group の数は、C 群と比較して BF 群で有意に高かった（$p < 0.05$）。*Lactobacillus* の数は C 群と比較して bgl 群で有意に高かった（$p < 0.05$）（Table 2-6）。その他の細菌数に各群有意な差は見られなかった。

3-3-5：L 細胞分化に関わる mRNA 発現量及び相関分析結果

回腸中の Gpr43 の発現は、C 群に比べ bgl 群および BF 群で有意に増加した（$p < 0.05$）（Figure 2-6A）。Pc1/3 の発現は、C 群に比べ bgl 群および BF 群で有意に増加した（Figure 2-6B）。NeuroD の発現も、C 群に比べ bgl 群および BF 群で有意に増加した（$p < 0.05$）（Figure 2-6C）。Pgcg と Ngn3 の発現量には、各群で有意な差は見られなかった（Figure 2-6D-E）。さらに、Pc1 は酢酸、酪酸および総 SCFAs と正の相関があった（$p < 0.05$）。同様に、NeuroD および Gpr43 は、酪酸と正の相関を示した（$p < 0.05$）（Figure 2-6D）。これらの結果は、大麦がβ-グルカンを含んでいなくても、アラビノキシランが SCFA の増加を介して L 細胞分化と GLP-1 分泌遺伝子に影響を与えることを示した。

第 4 節：考察

第 3 章ではβ-グルカンを含まないアラビノキシランが主な繊維源である大麦品種を摂取させたマウスを用い、第 2 章で得られた大麦の摂取による腸内発酵性および GLP-1 分泌に及ぼす影響がβ-グルカン特異的な効果であるか検討した。その結果、大麦アラビノキシラン摂取により、大麦β-グルカンと同様に腸内の SCFAs が増加し、GLP-1 の分泌が促進されることがわかった。さらに、大麦アラビノキシランが SCFAs の増加を介して L 細胞分化や

GLP-1 分泌遺伝子に影響を与える可能性があることを示した。

OGTT では、グルコース投与 60 分後に両大麦群で GLP-1 濃度が劇的に上昇した。以前の研究では、C57BL/6J マウスに大麦粉（β-グルカン 2%）を高脂肪食と一緒に与えると、GLP-1 の分泌が増加し、インスリン感受性が改善されることが示されている(22)。したがって、β-グルカンを多く含む大麦粉は、GLP-1 分泌の増加を通じて耐糖能の改善をもたらす可能性がある。ただし、この効果はβ-グルカンを含まない大麦粉（bgl 群）でも認められた。以前の研究では、過体重の女性（BMI 25.0-29.9 kg/m^2）が小麦由来のアラビノキシランを含むシリアルを摂取すると、低繊維のシリアルと比較して食後の血中 GLP-1 濃度が増加すると報告されている(47)。一方、別の研究では、5%のアラビノキシラン（小麦由来）と 5%のβ-グルカン（オーツ麦由来）を含む飼料を与えた豚は、OGTT で GLP-1 濃度に変化がないことが示されている(48)。これらの先行研究では、実験に小麦由来のアラビノキシランを使用している。本研究は、大麦由来のアラビノキシラン摂取が OGTT において GLP-1 分泌を増加させることを初めて証明したものである。しかし、bgl 群では、食後血糖値上昇の抑制は確認できなかった。この相違は、BF 群に比べ、bgl 群の水溶性食物繊維含有量が少ないことに起因すると思われる。さらにアラビノキシランはβ-グルカンよりも粘性が低いために、栄養素の吸収遅延効果が低いことも考えられる。実験飼料には各大麦粉が同量添加されていたため、水溶性食物繊維の量に差が生じた。さらに、GLP-1 はグルコース依存的にインスリン分泌を促進するが(49)、糖質投与 60 分後のインスリン濃度はいずれの群でも上昇しなかった。アラビノキシランとβ-グルカンのインスリン分泌への影響については、さらなる研究が必要である。

3 章の結果より大麦由来のアラビノキシランも SCFAs の増加に寄与することが示された。これは、キシロースとアラビノースの発酵特性に起因していると考えられる。以前の研究では、キシロースは回腸で酪酸を増加させ、アラビノースは結腸で増加させることが示された(50)。さらに、豚糞便を用いた累積ガス発生法を用いて 48 時間後の発酵と最終生成物の動態を調べた別の研究(51)では、アラビノキシランとβ-グルカンで SCFAs 生成物の比率が同程度であることが示された。このことから、大麦摂取に伴う SCFAs の増加は、必ずしもβ-グルカンのみに依存しないことが示唆された。さらに、SCFAs 受容体である Gpr43 の発現は、C 群に比べ両大麦群で有意に増加した。Gpr43 の活性化は、SCFAs 刺激による GLP-1 分泌に関与している(38)。Gpr43 と酪酸および酢酸の間に見出された正の相関は、この仮説を支持するデータである。さらに、NeuroD の mRNA 発現量も bgl 群および BF 群で有意に増加した。OGTT で GLP-1 分泌が増加するのは、回腸の L 細胞数が増加するためと思われる。以上より、大麦由来のアラビノキシランも SCFA を増加させることで L 細胞数を増加させる可能性があることが示唆された。

bgl 群と BF 群で増加した盲腸内容物の腸内細菌叢は異なり、BF 群では *Clostridium*

leptum subgroup(Collins らの分類では Clostridium cluster IV に相当)が増加した。*Clostridium leptum subgroup* は難消化性炭水化物を発酵させて SCFAs を産生する(52)。一方、bgl 群では *Lactobacillus* の増加がみられた。*Lactobacillus* は常在嫌気性乳酸菌で、糖を発酵させ、乳酸や酢酸を産生する(53)。以前の *in vitro* 研究では、小麦からのアラビノキシラン抽出物が *Lactobacillus* と *Bifidobacterium* の増殖をサポートし、その増殖速度はイヌリンを用いた場合よりも高かったことが報告されている[25]。別の *in vivo* 研究では、アラビノキシランを添加した高脂肪食を与えたラットは、大腸で乳酸菌が増加することが示されている(54)。本研究では、大麦由来のアラビノキシランも選択的に *Lactobacillus* 属を増加させることを示し、これらの先行研究と一致する。 また、異なる細菌がβ-グルカンとアラビノキシランを選択的に発酵させることが示されたが、これはアラビノキシランとβ-グルカンの発酵速度や発酵基質の違いによるものと思われる。重合度や分子量といった発酵基質の構造は、発酵速度に影響を与える(55)。*Lactobacillus* は常在嫌気性乳酸菌であるため、アラビノキシランは主に近位結腸で発酵する可能性がある。一方、*Clostridium leptum subgroup* は絶対嫌気性であるため、β-グルカンは遠位結腸で発酵している可能性が示唆された。今後、大麦粉由来のアラビノキシランの発酵特性を明らかにする研究が必要である。以上より、大麦の摂取による腸内発酵や GLP-1 分泌への影響はβ-グルカン特異的ではなく、β-グルカン、アラビノキシランの 2 つの発酵性食物繊維が寄与することが示された。

Table 2-1～2-6

Table 2-1: 大麦粉の栄養成分

(g/100g dry matter)	Bgl	BF
Ash	1.0	1.0
Fat	3.4	2.2
Protein	8.4	9.4
Total starch	68.4	59.0
Total dietary fiber	6.7	18.4
β-(1-3)-(1,4) Glucan	0.0	8.0

Fat: Acid hydrolysis method

Protein: Kjeldahl method

Ash: Dry ashing method

Total dietary fiber: AOAC 991.43 method

β-(1-3)-(1,4) Glucan: McCleary method (AOAC 995.16)

Table 2-2: 実験に用いた対照および大麦群の飼料組成

(g/kg diet)

	Control diet	BF diet	bgl diet
Casein	200.0	171.7	175.1
Corn starch	132.0	132.0	107.3
Dextrinized corn starch	197.5	13.9	0.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	70.0	70.0
Lard	200.0	190.9	194.0
Cellulose	50.0	-	31.8
Beau Fiber (BF)	-	271.2	-
Shikoku hadaka S84 (bgl)		-	271.2
AIN-93G mineral mixture	35.0	35.0	35.0
AIN-93 vitamin mixture	10.0	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014

Table 2-3: 標準菌株とリアルタイム PCR 用プライマー配列

Genus	Fw/Rv	Primer sequence	Standard bacteria	Strain No.	Reference
Bacteroides	Fw	5'-GTCAGTTGTGAAAGTTTGC-3'	*Bacteroides fragilis*	JCM11019	Bernard AE et al: Appl Environ Microbiol, 66: 1587-94, 2000.
	Rv	5'-CAATCGGAGTTCTTCGTG-3'			
Lactobacillus	Fw	5'-TGGAAACAGGTGCTAATAGGC-3'	*Lactobacillus ramnosus*	ATCC8530	Roy Byun et al: J Clin Microbiol, 42(7): 312836, 2004.
	Rv	5'-GTCCATTGTGGAAGATTCCC-3'			
Bifidobacterium	Fw	5'-AGGGTTCGATTCTGGCACAG-3'	*Bifidobacterium longum*	JCM1217	Kok RG et al: Appl Environ Microbiol, 62: 3668-72, 1996.
	Rv	5'-CATCCGGCATTACCACCC-3'			
Blautia_cocoides *sub*group	Fw	5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3'	*Clostridium coccoides*	JCM1395T	Matsuki et al: Appl Environ Microbiol, 70: 7220-8, 2004.
	Rv	5'-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA-3			
Clostridium_leptum	Fw	5'-GCACAAGCAGTGGAGT-3'	*Ruminococcus albus*	JCM14654	Matsuki et al: Appl Environ Microbiol, 70: 7220-8, 2004.
	Rv	5'-CTTCCTCCGTTTTGTCAA-3'			
Prevotella	Fw	5'-CACCAAGGCGACGATGA-3'	*Prevotella malaninogenica*	JCM6325	Larsen et al: PLos ONE, 5: e9085, 2010.
	Rv	5'-GGATAACGCCTGGACCT-3'			

Table 2-4: Bgl および BF から抽出した水溶性食物繊維画分の組成分析

Component (%)	Bgl	BF
Total arabinose	20.4	4.9
Total xylose	40.4	8.3
(D-xylose)	(18.8)	(3.7)
(D-xylopyranose)	(21.6)	(4.6)
Tota galactose	1.7	2.5
Total glucose	35.7	84.4
(Glucopyranose)	(14.9)	(43.9)
(D-glucose)	(20.8)	(40.5)

Table 2-5: 実験飼料を与えたマウスの体重、飼料摂取量および臓器重量

	C	Bgl	BF	*p* value C - bgl	*p* value C - BF
Initial weight (g)	18.91 ± 0.37	19.60 ± 0.30	19.09 ± 0.28	0.99	0.99
Final weight (g)	42.71 ± 1.38	41.57 ± 0.79	38.25 ± 1.03	0.69	0.02
Body weight gain (g/d)	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.44	0.02
Food intake (g/d)	3.02 ± 0.14	3.19 ± 0.06	3.26 ± 0.15	0.53	0.32
Food efficiency ratio (%)	9.63 ± 0.45	8.42 ± 0.36	7.35 ± 0.68	0.19	0.001
Liver weight (g)	1.53 ± 0.09	1.60 ± 0.12	1.29 ± 0.04	0.78	0.14
Cecum with contents (g)	0.29 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.10	<.001
Retroperitoneal fat (g)	0.98 ± 0.06	0.95 ± 0.04	0.79 ± 0.04	0.82	0.02
Epididymal fat (g)	2.52 ± 0.05	2.35 ± 0.08	2.21 ± 0.13	0.33	0.05
Mesenteric fat (g)	1.06 ± 0.14	1.11 ± 0.10	0.70 ± 0.07	0.91	0.05

データは、Mean ± SE で示した(n = 8)。

Feed efficiency ratio = body weight gain / food intake × 100

Abbreviations: C, control group; bgl, bgl flour group; BF, BF flour group.

Table 2-6:盲腸内容物中の主要な属レベルの腸内細菌の存在量

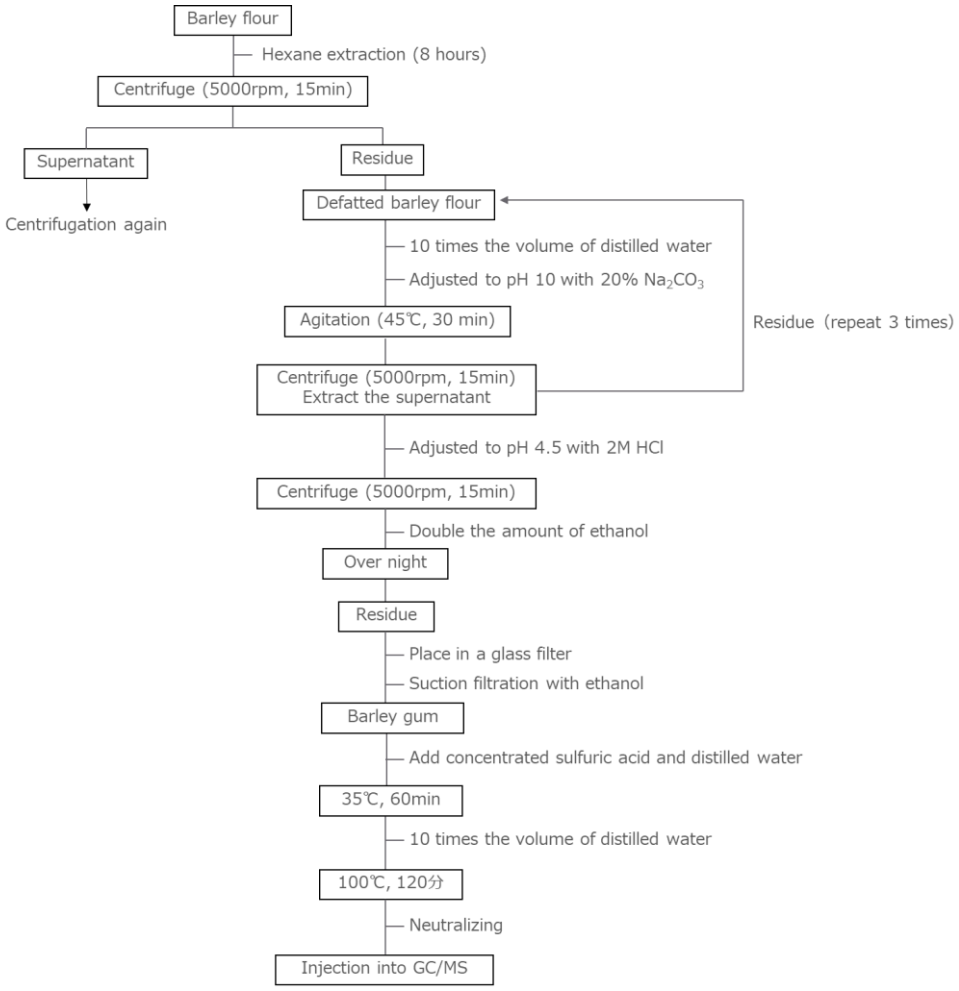
Log/CFU g	C	Bgl	BF	*p* value C - bgl	*p* value C - BF
Bacteroides	9.50 ± 0.19	9.11 ± 0.15	9.91 ± 0.15	0.21	0.19
Bifidobacterium	8.56 ± 0.19	8.72 ± 0.12	8.10 ± 0.34	0.73	0.44
Lactobacillus	9.01 ± 0.24	10.30 ± 0.22	8.71 ± 0.34	0.004	0.70
Blautia_cocoides subgroup	8.90 ± 0.15	9.10 ± 0.15	8.79 ± 0.14	0.56	0.81
Clostridium_leptum	10.09 ± 0.15	10.24 ± 0.12	10.97 ± 0.11	0.66	0.001
Prevotella	5.74 ± 0.05	5.69 ± 0.06	5.84 ± 0.09	0.79	0.58

データは、Mean ± SE で示した(n = 8)。

Abbreviations: C, control group; bgl, bgl flour group; BF, BF flour group.

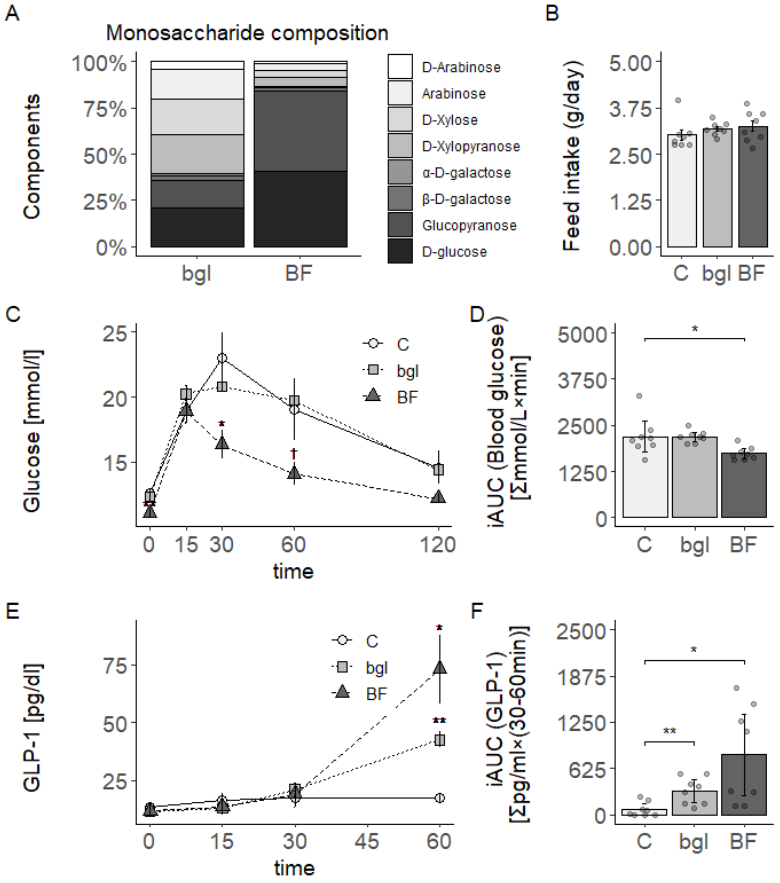
Figure 2-1～2-6

Figure 2-1



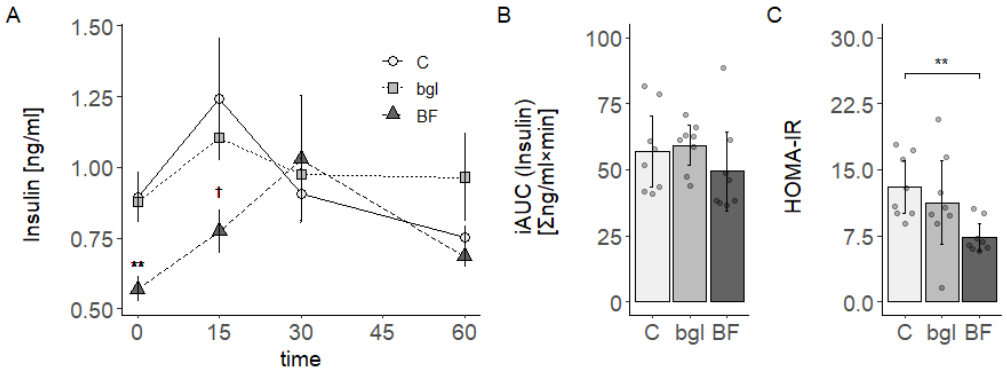
大麦粉水溶性ガム質の抽出および単糖分解までのフローチャート

Figure 2-2



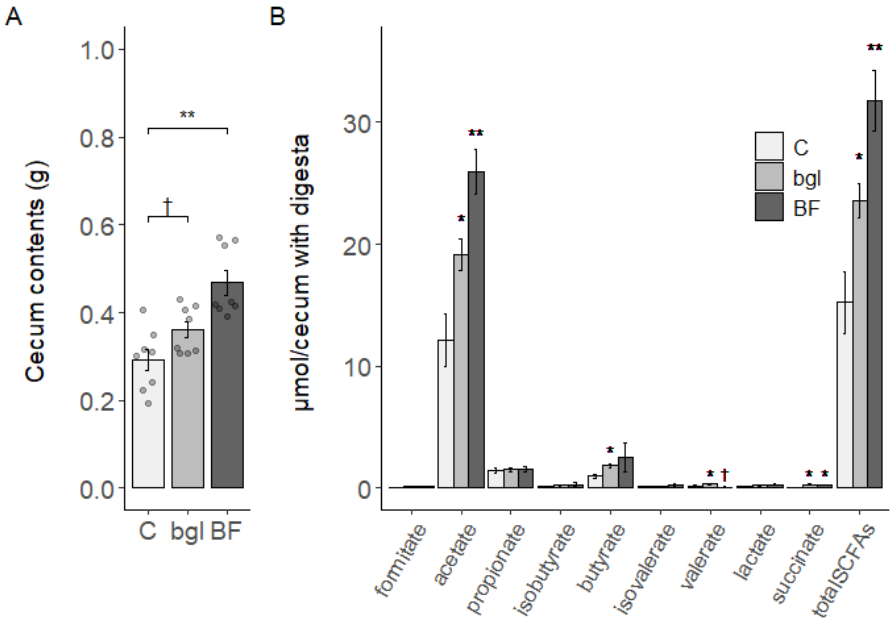
(A) bgl および BF から抽出した水溶性食物繊維画分の単糖組成。(B)セルロース (C)、bgl および BF を含む高脂肪食を 12 週間摂取させたマウスの飼料摂取量 (C-D) 試験開始 11 週目に実施した OGTT における血糖応答と AUC。 (E-F) 試験開始 11 週目の OGTT における GLP-1 の濃度及び 30 分から 60 分までの AUC。結果は Mean ± SE で示した。図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（†p = 0.06, *p <0.05, **p <0.01)。

Figure 2-3



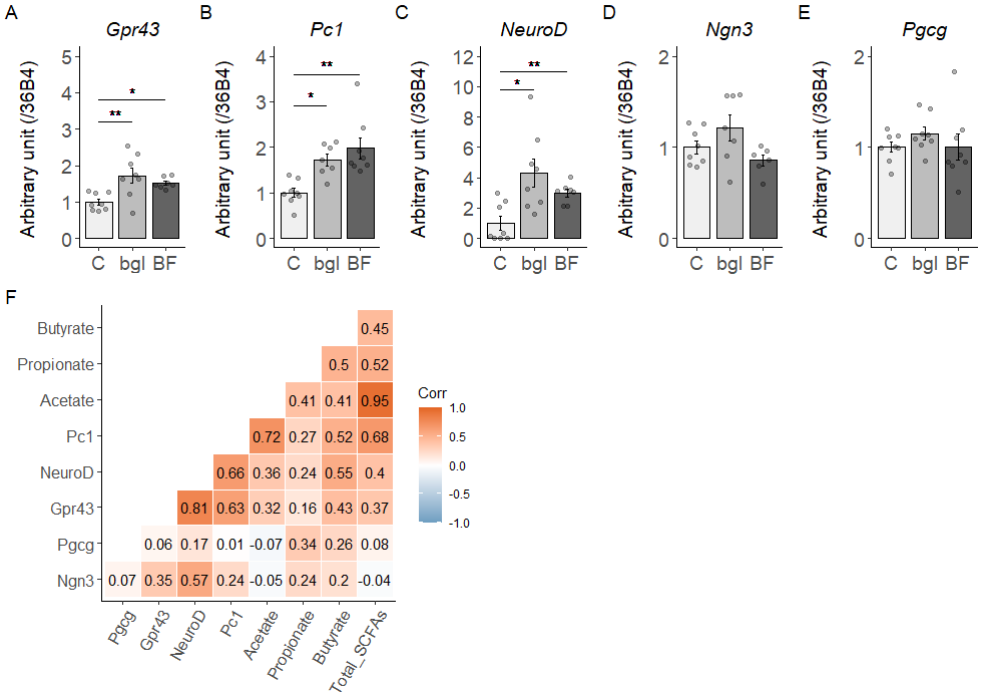
試験開始 11 週目に実施した OGTT におけるインスリン濃度(A)、AUC(B)、HOMA-IR(C)
結果は Mean ± SE で示した。図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す
(†p = 0.06, *p < 0.05, **p < 0.01)。

Figure 2-4



(A) マウスの盲腸重量、(B)マウスの盲腸内容物中の SCFAs 濃度。結果は Mean ± SE で示した (n = 8)
図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（†p = 0.06, *p < 0.05, **p < 0.01)。

Figure 2-5



(A) 回腸の L 細胞に関連する遺伝子の mRNA 発現量。(B) L 細胞と SCFAs の mRNA 発現量の相関分析結果、数値は各因子間の相関係数を表す。結果は Mean ± SE で示した。図中の上付き文字は、実験群間の有意差を示す（*p < 0.05, **p < 0.01)。

第 4 章：C57BL/6J マウスにおける大麦由来水溶性食物繊維（β-グルカン、アラビノキシラン）の単回投与が、ファーストミール及びセカンドミールの血糖値変動に及ぼす影響

第 1 節：概略

第 3 章の結果より、大麦粉の摂取による耐糖能改善作用はβ-グルカンに依存するものの、腸内 SCFAs の増加や GLP-1 分泌はβ-グルカン依存的ではなく、アラビノキシランも寄与していることが明らかとなった。加えて 3 章では bgl に含まれる水溶性食物繊維量自体が BF より少なかった事から、β-グルカンと同等のアラビノキシランを添加した場合、腸内発酵の増加を介して血糖値の応答にも変動を及ぼす可能性が考えられた。

ここで、大麦の摂取による食後血糖値上昇の抑制メカニズムとして、大麦の摂取直後（ファーストミール＝食後血糖応答試験）と摂取数時間後の食事（セカンドミール＝耐糖能試験）での血糖値上昇抑制のメカニズムは異なると推測した。ファーストミール は食物繊維の粘性による栄養素の吸収遅延効果が寄与すると考えられる。一方で、セカンドミールはそれとは異なり、摂取数時間後に水溶性食物繊維が腸内で発酵し、SCFAs が増加することによって GLP-1 分泌が亢進し、膵臓からのインスリン分泌を誘導することで食後高血糖を抑制することが主なメカニズムであると推定されている(56)。しかしながらセカンドミール効果については、現在までのところほとんどの研究がヒトを対象としたものであり、大麦の摂取後のセカンドミールにおける腸管内の代謝物、GLP-1 分泌、遺伝子発現の変動について詳細に検討した研究はない。さらに 3 章の結果より、大麦アラビノキシランも腸内細菌によって発酵を受ける事が明らかとなったことから、β-グルカンとアラビノキシランのどちらがセカンドミール効果に寄与しているかは不明である。そこで第 4 章では bgl を希アルカリ処理して大麦よりアラビノキシランを抽出し、β-グルカン抽出物と共に C57BL/6J マウスに同濃度で単回投与した。同濃度の比較により、前章で考察した bgl 中の食物繊維量が少なかった可能性を排除した。以上より、アラビノキシラン、β-グルカンのファーストミール、セカンドミール時の血糖値上昇への影響と作用機序を明らかにすることを目的に検討を行った。

第 2 節：実験方法

4-2-1：実験試料の調整

大麦β-グルカン抽出物（BG）は、Megazyme Ltd（Bray, Ireland）から購入した（BG の平均分子量は約 500kDa)。アラビノキシラン抽出物（AX）は、bgl のヘミセルロース B 画分を過去の文献に従って抽出することによって調製した(57)。具体的には bgl をグルコアミラーゼ溶液で抽出し、澱粉を除去した後、0.5N 水酸化ナトリウム溶液で抽出した。その後、溶液を中和し、透析し、トリクロロ酢酸の添加によりタンパク質を除去した。エタノール残

渣を凍結乾燥し、アラビノキシラン画分を得た。BG および AX の総食物繊維含量は、以前の文献(58)を参考に定量したところ、それぞれ 94%および 78%であった。

4-2-2：実験動物

試験 1、2 ともに雄の 8 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。C57BL/6J マウスは株式会社チャールズリバーラボラトリーズジャパンより購入した。

4-2-3：飼育方法（試験 1）

実験動物は室温 22±1℃、湿度 50±5%、12 時間明暗サイクル (8:00～20:00)で飼育した。BG または AX と水溶性デンプンを蒸留水に懸濁した溶液をマウスに投与してファーストミールでの血糖値変動を確認した（Table 3-1)。水溶性食物繊維を加えると高粘度になるため、食物繊維以外の炭水化物は、溶液中のデンプンが 20%になるように調整した。BG と AX は、食物繊維の総量が 2%になるように添加した。次に、腸内発酵の効果を確認するために、セカンドミール試験を実施した。マウスに大麦食物繊維抽出物を含む 20%デンプン溶液をファーストミールとして経口投与した（1.5g/kg 体重)。その後、6 時間絶食させ、20%デンプン溶液を投与し血糖値変動を確認した。ファーストミール、セカンドミール共に溶液投与後 0（空腹時)、15、30、60、120 分に尾部から採血を行い、血糖値を測定した。

4-2-4：飼育方法（試験 2）

食物繊維抽出物（BG または AX）を含むデンプン溶液を 1.5 g/kg 体重としてマウスに与え、6 時間絶食させた。イソフルラン/CO_2 麻酔で安楽死させる 30 分前に 20%グルコース溶液（1.5g/kg 体重）をマウスに投与した。血清はマウスの門脈と心臓から直ちに採取した。盲腸と回腸の内容物を採取し、分析まで-30℃で保存した。回腸、盲腸、結腸の組織は一部を採取し、RNAlater RNA Stabilization Reagent を 1ml 入れ、分析に供するまで-80℃で保存した。

4-2-5：生化学分析（試験 2）

門脈および心臓から採取した血清中の GLP-1 およびインスリン濃度を、それぞれ ELISA 法にて 2 章と同様の方法及び試薬を用いて測定した。

4-2-6：短鎖脂肪酸（SCFAs）の分析（試験 2）

2 章と同様の方法で、回腸及び盲腸内容物中の SCFAs 濃度を測定した。

4-2-7：腸管内容物中の単糖分析（試験 2）

回腸および盲腸の内容物を硫酸により酸分解し、単糖類を抽出した。その後中和したサンプルを過去の研究に基づき、誘導体化した後、GC/MS で単糖類の組成を分析した(59)。

4-2-8：L 細胞機能、GLP-1 分泌に関連する mRNA 発現量(Real-timePCR)（試験 2）

2 章と同様の方法で、回腸、盲腸、結腸の TotalRNA から cDNA を合成したのち、対照群と BG、AX 群における L 細胞機能と GLP-1 分泌に関連する mRNA の相対発現量を比較した。

4-2-9：統計解析

データは平均値±標準誤差(SE)で示した。実験群間の各パラメータの有意差は、対照群との比較を行う Dunnett の多重比較検定により判定した。データが正規分布でない場合は、Steel 検定を行った。$p < 0.05$ を有意とした。

第 3 節：実験結果

4-3-1：ファーストミール及びセカンドミールの血糖値変動（試験 1）

ファーストミールにおいて、投与 30 分後の血糖値は、BG 群が Ctrl 群に比べ有意に低かった（Figure 3-1a)。iAUC も BG 群が Ctrl 群に比べ有意に低かった（Figure 3-1b)。セカンドミール時の 30 分後の血糖値は、AX 群が Ctrl 群に比べ有意に低下した (Figure 3-1c)。BG 群でも Ctrl 群と比較して 30 分後の血糖値が低下傾向（p=0.07）を示した（Figure 3-1d)。iAUC は BG 群および AX 群で Ctrl 群と比較して有意に低下した（Figure 3-1d)。

4-3-2： セカンドミール時の GLP-1、インスリン濃度（試験 2）

セカンドミール時における盲腸重量は、各群で有意な差は認められなかった（Figure 3-2a)。回腸内容物重量は、Ctrl 群と比較して AX 群で増加する傾向があった (p = 0.07、Figure 3-2b)。血清インスリン濃度および総 GLP-1 濃度には、各群間に有意差はなかった。しかし、門脈の総 GLP-1 濃度は、Ctrl 群と比較して BG 群で有意に増加し、AX 群では増加傾向を示した（p = 0.07、Figure 3-2c-e)。

4-3-3： セカンドミール時の腸管内の代謝産物（試験 2）

セカンドミール時において、回腸内容物の酢酸および総 SCFAs 濃度は、Ctrl 群に比べ AX 群で増加傾向を示した（Figure 3-3a-d)。さらに、盲腸の酢酸濃度は、Ctrl 群に比べ AX 群で有意に増加した(Figure 3-3e)。プロピオン酸の濃度は各群で有意ではなかった(Figure 3-3f)。酪酸の濃度は、Ctrl 群と比較して BG 群で増加傾向を示した（Figure 3-3g)。さら

に、総 SCFAs の濃度は、Ctrl 群と比較して、AX 群で有意に増加した(Figure 3-3h)。また、マウスの回腸および盲腸内容物に残存する水溶性食物繊維抽出物の量を分析した。回腸内容物では、Ctrl 群では未消化の飼料由来のグルコースが観察されたが、BG 群ではグルコースの量が増加していたことから、未消化のβ-グルカンが残存していることが明らかとなった（Figure 3-3i)。AX 群ではアラビノキシラン画分であるアラビノースとキシロースが確認された（Figure 3-3i)。盲腸内容物については、BG 群でのみグルコースが確認され、未消化のβ-グルカンと判断した（Figure 3-3j)。

4-3-4： セカンドミール時の腸管内の L 細胞分化に関わる mRNA 発現量（試験 2)

AX 群では、回腸における Ngn3、Pgcg の mRNA 発現量が Ctrl 群に比べ有意に上昇した（Figure 3-4a-c)。同様に、BG 群では Ngn3 の発現が有意に上昇した（Figure 3-4b)。Pc1/3 および Gpr43 には有意差は認められなかった（Figure 3-4d-e)。盲腸では、NeuroD と Pgcg は各群で差がなかった（Figure 3-4f-h)。Ngn3 と Pc1/3 の mRNA 発現量は AX 群で Ctrl 群と比較して有意に上昇した（Figure 3-4g-i)。Gpr43 の mRNA 発現量は BG 群では Ctrl 群に比較して有意に上昇した（Figure 3-4j)。大腸では、Neuro D、Pc1/3、Gpr43 の発現量に各群で有意差はなかった（Figure 3-4j、m、n)。ngn3 の mRNA 発現量は、Ctrl 群と比較して、BG 群および AX 群で有意に上昇した（Figure 3-4k)。同様に、Pgcg の発現量は、Ctrl 群と比較して BG 群で有意に上昇した（Figure 3-4i)。

第 4 節：考察

第 4 章では、大麦由来の水溶性食物繊維抽出物を単回投与した際のセカンドミール効果およびその基礎的なメカニズムについて検討した。その結果、マウスにおいて大麦由来水溶性食物繊維の抽出物の投与によるセカンドミール効果が初めて証明された。さらにセカンドミール時の血糖値上昇抑制効果は、腸管でのβ-グルカン、アラビノキシランの発酵とそれに伴う SCFAs の生成を介した GLP-1 の分泌に起因するものであることが明らかとなった。

実験 1 では、BG 単回投与でファーストミールの血糖値上昇が抑制されることが確認された。一方、β-グルカンを含まない AX は、初回食事時の血糖値上昇を抑制する効果がなかった。この結果は、β-グルカンが腸管内容物の粘性を高めることによる効果に起因すると示唆された。β-グルカンは水中で粘性のある懸濁液を生成し、消化管への栄養素の吸収を遅らせる(60)。Regand らは、オート麦β-グルカンを含む様々な加工食品を摂取した後の血糖値を測定した。その結果、粘度の高いお粥やグラノーラが最も血糖値のピークを抑制する効果があることを示した(61)。過去の研究では、β-グルカンの血糖コントロール効果には、粘度よりも分子量と用量が重要であると報告されている(62)。本研究で用いたβ-グルカン抽出物は高分子量（約 500kDa）であった。したがって、粘度の上昇と高分子量により、血糖

コントロールが改善された可能性がある。本研究の結果は、これらの既報と一致する。したがって、水溶性食物繊維の粘性の程度がファーストミールに影響することが示唆された。また今回の結果から、BG のセカンドミール効果も確認された。さらに、β グルカンと同様にアラビノキシランを摂取した場合にもセカンドミール効果が確認された。したがって、セカンドミールの効果は、ファーストミールの効果をもたらすメカニズムとは異なる可能性が高く、腸管内容物の粘性上昇とは無関係であることが示唆された。実際、健常者を対象とした過去の介入研究において、大麦から抽出した低粘度β-グルカンを含む飲料は、セカンドミールでの食後グルコースを低下させるが、ファーストミールでは低下しなかったという報告がある(63)。また、大麦アラビノキシランの糖代謝への影響について検討した研究はほとんどない。大麦由来のアラビノキシランの摂取についてセカンドミール効果があることを実証したのは本研究が初めてである。健康な被験者に小麦アラビノキシラン抽出物を含むパンを摂取させた臨床研究では、アラビノキシラン含有パン摂取後の次の食事（標準食）後 3 時間における血糖値反応の低下とインスリン感受性の改善が報告されている。これらの知見は、使用した穀物が異なるものの、本研究の知見と一致している(64)。実験 2 では、BG の摂取により、セカンドミール時の門脈の総 GLP-1 濃度が上昇することが確認された。また、AX 群においても同様の傾向が認められた。さらに、腸管における SCFAs の濃度変動が観察された。成人 20 名に大麦または小麦のパンを 3 日間摂取させた過去の臨床試験では、4 日目の朝食後に血糖値上昇が抑制され、血中の GLP-1 および SCFAs 濃度が上昇したと報告されている(65)。動物モデルではあるが本研究はこれらの知見と一致する。さらに、AX の摂取は、回腸における Ngn3、Neuro D、Pgcg の発現を増加させた。NeuroD と Ngn3 はともに腸内分泌細胞に発現し、L 細胞の分化に関与している(66,67)。BG の摂取は、Gpr43 の発現も増加させた。さらに、大腸では、BG 摂取に伴い、Ngn3 および Pgcg の mRNA 発現量が上昇することが確認された。したがって、大麦摂取によるセカンドミール効果は、L 細胞への刺激を介した GLP-1 分泌の上昇によってもたらされることが示唆された。本研究では、β-グルカン抽出物の単回投与でも腸内遺伝子の発現が変化することを明らかにした。NCI-H716 腸管細胞を用いた先行研究では、0.5%のβ-グルカン含有入り溶液に曝露した 24 時間後に、脂肪生成に関連する遺伝子の発現が変化することが報告されている(68)。 これらの報告は、水溶性食物繊維の投与が短時間で遺伝子発現に影響を与えることを示唆している。さらに、本結果は、AX と BG の粘度の違いから生じる発酵部位に差異があることを示唆した。実際に回腸の SCFAs 濃度は AX 群でのみ増加した。一方、盲腸の SCFAs レベルの増加は、AX 群および BG 群の両方で観察された。同様に、Ngn3 および Pgcg の mRNA 発現レベルは、AX 群では回腸で、BG 群では結腸で上昇した。さらに、回腸では BG と AX の繊維が残っていたが、盲腸では BG のみが残っていた。このことから、腸内細菌が回腸で AX を、盲腸や大腸で BG を発酵させて SCFA 産生を促進し、GLP-1 分泌を誘導していることが示唆された。また、未消化

の糖質は BG と AX による水溶性ゲル形成により L 細胞を直接刺激する可能性がある。セカンドミール時の血糖値上昇抑制効果が AX に比べてやや BG で低いのは、BG がすべて発酵部位に到達していないためであると考えられる。以前の研究では、発酵特性（発酵速度および SCFAs プロファイル）が繊維によって異なることが示唆された(69)。大麦と小麦の AX の基本構造は似ているが、大麦由来の AX はアラビノース側鎖の割合が高く、より高分岐である(70)。さらに、抽出方法や試験設計の違いも結果の違いにつながる可能性がある。今後、大麦 BG と AX の発酵時間や発酵特性の詳細について検討する必要がある。

4 章のまとめとして、大麦 β-グルカンの単回投与によるファーストとセカンドミール効果および大麦アラビノキシランによるセカンドミール効果が実証された。大麦由来のアラビノキシランと β-グルカンは、分解する腸内細菌が異なることや、それらの棲息部位の違いなどから、腸内の異なる部位で発酵している可能性がある。そのため、SCFAs 産生および GLP-1 分泌に関連する遺伝子の mRNA 発現は、アラビノキシランでは主に回腸で、β-グルカンでは主に盲腸で増加した。これらの変化により GLP-1 濃度が上昇したことで、セカンドミールの血糖値低下に寄与した可能性が示唆された。

Table 3-1

Table 3-1：大麦由来水溶性食物繊維抽出物を添加した澱粉液の組成

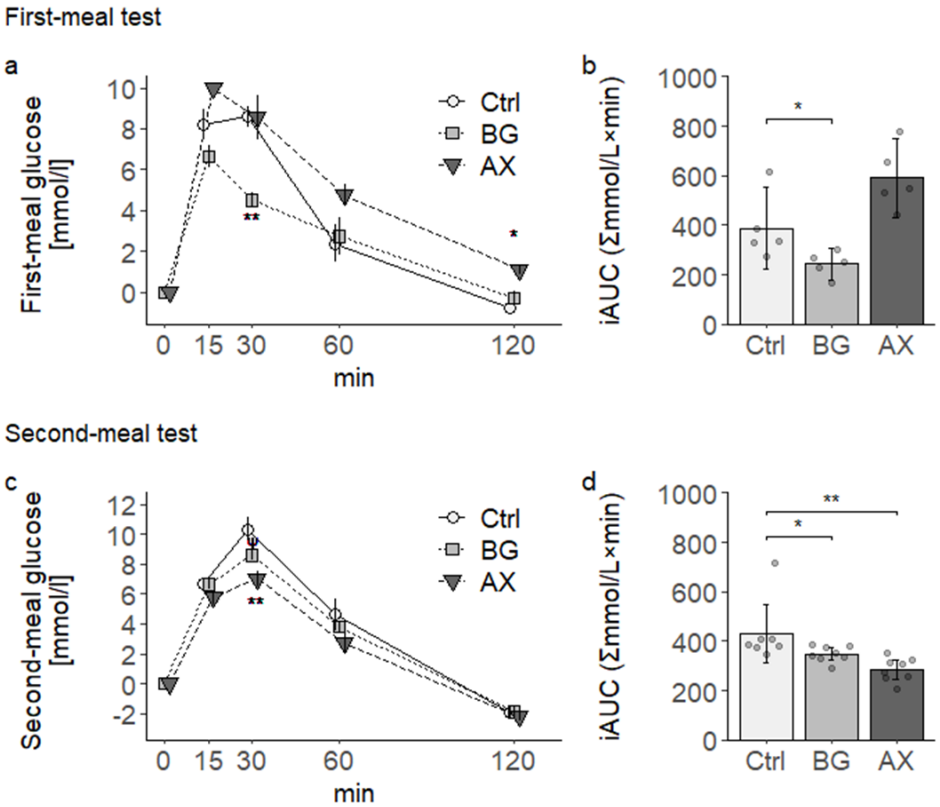
(%)	Ctrl	BG	AX
Distilled water	80.0	78.0	78.0
Soluble starch	20.0	20.0	20.0
BG	-	2.1	-
AX	-	-	2.6
Total starch (%)	20.0	20.0	20.0
Total dietary fiber (%)	0.0	2.0	2.0

Abbreviations: Ctrl: control group, BG: extract of β-glucan derived from barley, AX: extract of β-glucan derived from barley.

Total dietary fiber, BG：94%, AX：78%.

Figure 3-1～3-4

Figure 3-1

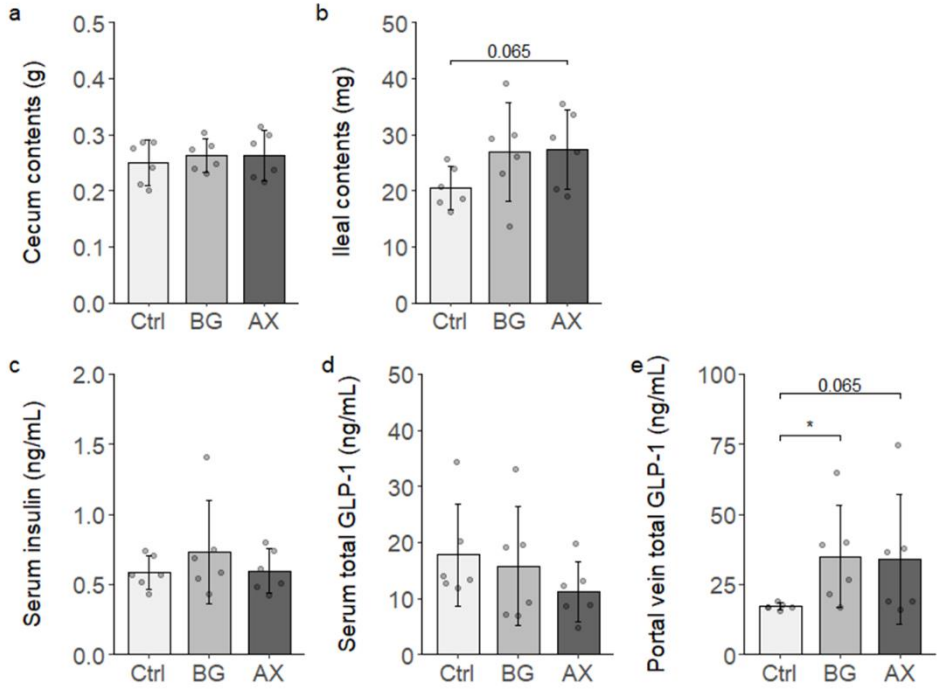


(a) 大麦由来の水溶性食物繊維抽出物を含む澱粉溶液を単回投与後の血糖値および(b) iAUC (n=5-6)。

(c) 大麦由来の水溶性食物繊維抽出物を単回投与後、6 時間後のセカンドミール (20%澱粉溶液) の血糖値と (d) iAUC (n=7-8)。

データは Mean ± SE で示した。図中の上付き文字は、対照 (Ctrl) 群との有意差を示す (*p < 0.05, **p < 0.01)。

Figure 3-2

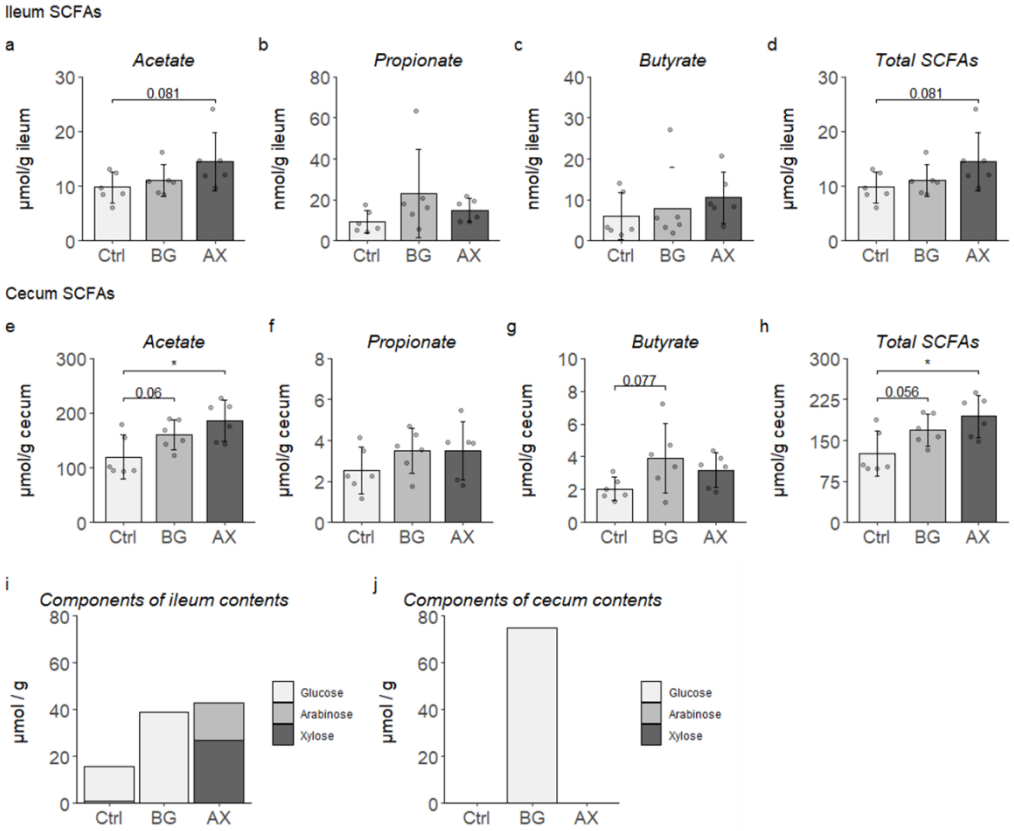


(a)セカンドミール時における各マウスの盲腸内容物および回腸内容物の重量。

(c) セカンドミール時の各マウスの血清インスリン濃度。(d-e) セカンドミール時の血清および門脈の GLP-1 濃度

データは Mean ± SE で示した (n=6)。図中の上付き文字は、対照 (Ctrl) 群との有意差を示す (*p < 0.05, **p < 0.01)。

Figure 3-3



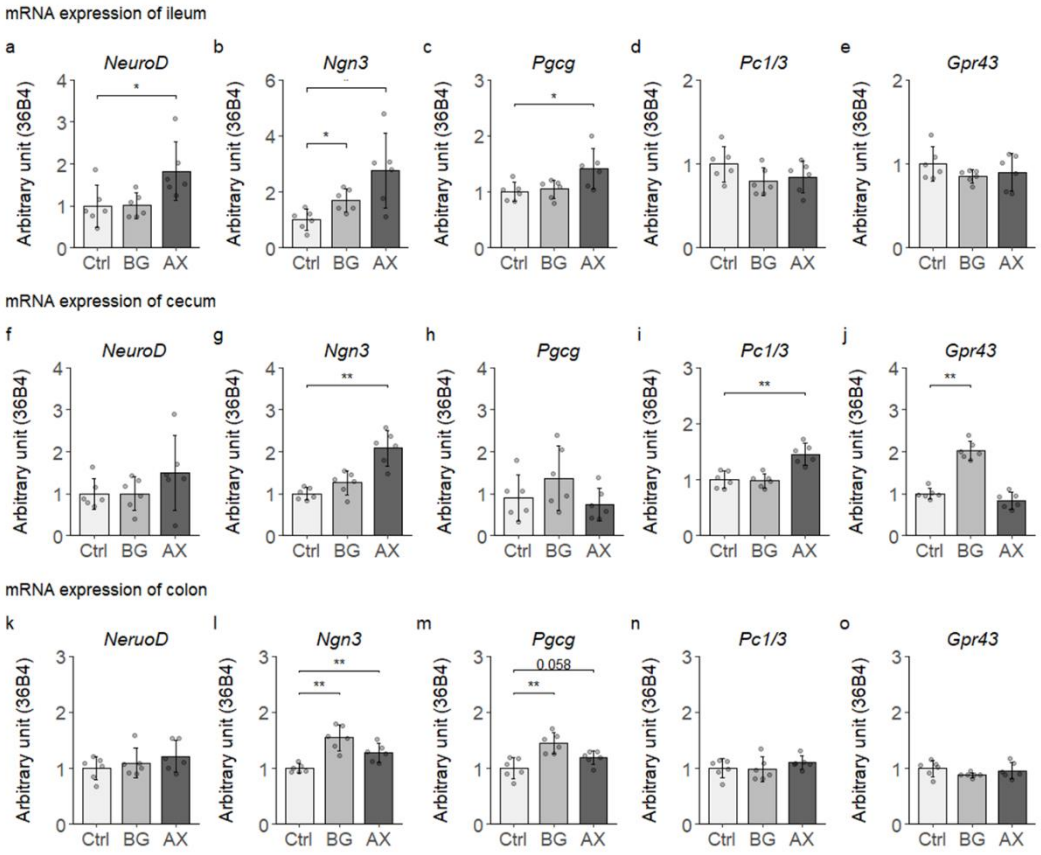
(a) セカンドミール時における各実験群の回腸内容物の酢酸、(b) プロピオン酸、(c) 酪酸および (d) 総 SCFAs 濃度。

(e) セカンドミール時の盲腸内容物における酢酸、(f) プロピオン酸、(g) 酪酸、(h) 総 SCFAs 濃度。

(i) セカンドミール時の回腸内容物および(j)盲腸内容物における残存した単糖量。

データは Mean ± SE で示した (a-h、n=6)。図中の上付き文字は、対照 (Ctrl) 群との有意差を示す (*p < 0.05, **p < 0.01)

Figure 3-4



各実験群の回腸（a-e）、盲腸（f-j）、結腸（k-o）におけるセカンドミール時の GLP-1 分泌および L 細胞機能に関連する mRNA 発現量。データは Mean ± SE で示した（a-h、n=6）。図中の上付き文字は、対照（Ctrl）群との有意差を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

第 5 章：C57BL/6J マウスにおける大麦粉の摂取が生体内での胆汁酸組成に及ぼす影響

第 1 節：概略

一般的に大麦のような食物繊維を多い食品を摂取すると腸内で嵩が増す事により、排便量が増加する事が言われている。さらに胆汁酸（BA）や脂質を含む糞の排便が促進される事で、肝臓では BA 合成が増加し、結果としてコレステロール低下が促進されると考えられている(71)。その一方で、我々は過去の検討において、マウスに大麦を含む高脂肪食を 12 週間摂取させると糞中排泄量は変わらず、BA 合成の律速酵素である Cytochrome P450 Family 7 Subfamily B Member 1(Cyp7a1)の発現量が有意に減少していたが、肝臓、血中脂質は低下した(23)。この結果は筆者及び筆者が所属する研究室の別の研究でも確認されており(29、71)、高脂肪食のような脂質が多い食事と共に大麦を摂取すると、BA 合成の増加を大麦が逆に抑制している可能性が示唆された。これらの結果を踏まえると、BA 分泌が亢進している高脂肪環境下においては、大麦の摂取による脂質低下作用は既存のメカニズムと異なる可能性がある。しかしながら、これまでの研究では BA 含量は糞便や盲腸など、殆ど局所的にしか測定されておらず、かつ組成まで調べた文献は多くないことから不明な点も多い。消化管の部位によって発酵する代謝産物や BA 含量は異なると考えられることから、上記の結果を証明するにはまずは BA の動態を確認する必要がある。そこで第 5 章では上記作用を確認する為、第 2 章で使用した C57BL/6J モデルマウスを用いて、大麦の摂取による消化管内での BA 動態の変化を把握することを目的とした。

第 2 節：実験方法

5-2-1：実験試料の調整

2 章と同様の BF を用いた。

5-2-2：実験動物

2 章で使用した雄の 4 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。

5-2-3：実験飼料

実験飼料は 2 章と同様である。

5-2-4：飼育方法（動物実験）

飼育方法は 2 章と同様である。

5-2-5：動物解剖とサンプル採取

解剖方法およびサンプル採取方法は2章と同様である。

5-2-6：胆汁酸分析

回腸、盲腸、糞便中のBA濃度を過去の文献(73)を参考に、5～10mgの内容物を採取して有機溶媒及び誘導体化試薬を用いて抽出し、GC/MSにて定量分析した。定量は各胆汁酸の標準品 100μM のコール酸（CA)、ケノデオキシコール酸（CDCA)、デオキシコール酸（DCA)、リトコール酸（LCA)、総ミュリコール酸（MCA）の標準品のピーク面積を元にして各サンプルのBA含量を定量した。血中、門脈中の総BA濃度は酵素法にて測定した。

5-2-7：血清、肝臓脂質分析

マウス血清中の総コレステロール及びトリグリセリド濃度を酵素法（コレステロール E-テストワコー、トリグリセリドE-テストワコー、富士フィルム和光純薬社）にて分析した。肝臓及び糞は凍結乾燥後粉砕し、Folch法にて脂質を抽出した後血清脂質の分析と同様の試薬を用いて酵素法にてトリグリセリド濃度及び総コレステロール濃度を測定した。糞中の総脂質量は、恒量を求めたアルミカップに抽出液を入れホットプレート上で溶媒を蒸発させた後、105℃で1時間以上加熱し、デシケーターで放熱後重量を測定して算出した。

5-2-8：脂質代謝、胆汁酸代謝に関わるmRNA発現量(Real-time PCR)

2章と同様の方法で、肝臓と回腸からTotal RNAを抽出した後、cDNAを混合し、肝臓脂質代謝、BA代謝に関するプライマー配列（Table 4-1）とPowerUp SYBR Green Master Mixを用いてApplied Biosystems Quant3 Real-Time PCR Systemによるリアルタイム PCRにより増幅させた。mRNAの発現解析には、2～4章と同様に、$2^{-\Delta\Delta CT}$法を使用した。参照遺伝子として36B4を用い、算出したΔCT値を比較した。次に、各プライマーに添加したcDNA溶液について、HC群とHB群のΔCTを差としてのΔΔCTを算出した。相対発現量は、HC群に対するfold changeで示した。

5-2-9：メタボローム分析

血清、門脈中の代謝産物をキャピラリー電気泳動質量分析計（CE-MS）を用いたメタボローム分析にて確認した。分析はヒューマンメタボロームテクノロジーズに依頼した。それぞれHC群、HB群のマウスの血清、門脈血をプールし、分析を行った。

5-2-10：統計解析

各パラメータについて、データが正規分布に基づいている場合はStudent's t-testを用

いた。正規分布が確認できない場合は，Wilcoxon 検定を用いた。

第 3 節：実験結果

5-3-1：血清、肝臓、糞中脂質含量

血清、肝臓、糞中脂質含量の結果を Table 4-2 に示した。HC 群と比較して血清中の総コレステロールが HB 群で有意に低下した。一方血清トリグリセリド含量は有意に高値を示した.肝臓脂質量に有意差は見られなかったが、一貫して HB 群で低値を示した.糞中総脂質量は有意差が見られなかった。

5-3-2：各組織内の胆汁酸含量

各臓器辺りの BA 含量を Figure 4-1～4-4 に示した。回腸内容物の BA 含量（Figure 4-1）は変動が大きかったが、HC と比較して HB では MCA が有意に低かった。また、有意差はつかないものの総 BA 含量が HB 群では低値を示した(p = 0.11)。盲腸内容物中の BA 濃度(Figure 4-2）は HC と比較して HB 群では CA、 MCA 含量が有意に低く、一次 BA(CA、MCA)の割合が有意に低下した。一方で二次 BA である DCA、LCA は HB 群で有意に増加し、二次 BA 量(DCA+LCA)の割合は増加傾向にあった（P <0.1)。また総 BA 含量は HB 群で有意に減少した。糞中の BA 濃度（Figure 4-3）は殆ど盲腸と同じ挙動を示し、HC と比較して HB 群では CA、 MCA 含量が有意に低下し、一次 BA(CA、MCA)含量は有意に低下した。一方で DCA、LCA は HB 群で有意に増加し、二次 BA の割合(DCA+LCA)もまた有意に増加した。また総 BA 含量は減少した。血中の総 BA 量に各群有意な差はなかったが（Figure 4-4A)、門脈中の総 BA 量は Hb 群で有意に増加した（Figure 4-4B)。

5-3-3：脂質代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現量

肝臓における脂質代謝に関わる mRNA の発現量を Figure 4-5 に示した。HC 群と比較して、fatty acids synthase (Fas)、sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2)、HMGCoA reductase の mRNA 発現量が HB 群で有意に低下した。lipoprotein lipase (Lpl)の mRNA 発現量は有意差はないものの、HB 群で低値傾向を示した(p = 0.05)。

5-3-4：胆汁酸代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現量

肝臓、回腸における BA 代謝に関わる mRNA 発現量を Figure 4-6 に示した。Fxr の発現量は HC 群と比較して HB 群で有意に増加した(Figure 4-6A)。また Fxr によって調節を受ける Bile salt export pump (Bsep) の発現量も有意に増加した。さらに BA 合成の律速酵素である Cyp7a1 は HB 群で有意に減少した。回腸では、BA 輸送に関わる ileal bile-acid binding

protein (Ibabp)の mRNA 発現量が HB 群で有意に増加した(Figure 4-6B)。

5-3-5：メタボローム分析結果

血中及び門脈中のメタボローム分析結果を Figure 4-7 に示す。HB 群で増加、あるいは減少した上位 10 種の代謝産物を示した。血中では HB 群で、AMP、コール酸、タウロコール酸などの BA が増加していた。門脈中でもコール酸、AMP、ADP が増加した。一方で、血清では 3-ホスホグリセリン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸が減少した。門脈ではアスコルビン酸、コリン、グルコース 6 リン酸、尿酸、グリシンが減少した。

第 4 節：考察

第 5 章では第 2 章で使用した C57BL/6J モデルマウスを用いて、大麦の摂取による消化管内での BA 動態を把握することを目的とした。結果として、高脂肪環境下における BF の摂取によって腸肝循環が促進されるとともに、二次 BA 代謝が亢進することが示唆された。さらに肝臓では BA の調節因子である Fxr の発現量が増加し、Fxr によって調節を受ける Cyp7a1 ならびに脂質合成に関わる Srebp2 や Fas の mRNA 発現量は有意に低下した。さらにメタボローム分析の結果より、血中、門脈中で AMP や BA が増加していたことから、大麦の摂取による BA 組成が変化することで、腸肝循環による Fxr 経路の活性化と、二次 BA が増加することによる BA 受容体 Tgr5 が活性化している可能性が示唆された。

回腸内容物では MCA が HC 群と比較して HB 群で有意に低下していた。また、個体差が多く各群間に有意差は見られなかったが、一次 BA、総 BA 含量は HB 群で低値を示した。MCA は一次 BA である CDCA から肝臓で代謝される事で産生されるマウス特異的な BA であり(74)、CA と共に消化管上部に多く存在している。その機能性については未だ不明な点も多いが、以前に無菌マウスと通常のマウスを用いた研究において、腸内細菌の存在下では Fxr の抑制物質であるタウロ-β-MCA が低下するため、結果として肝臓中の Fxr が活性化し Cyp7a1 発現を低下させ、BA のプールサイズを減少させる事が示されている(75)。本研究における Fxr の mRNA 発現量は HB 群で有意に増加し、Cyp7a1 は HB 群で有意に低下した事から、大麦の摂取に伴い腸内細菌叢に変動が生じ、CA、MCA 産生の抑制に影響を与えた可能性がある。盲腸と糞便中の BA は似た傾向が見られ、どちらも一次 BA である CA、CDCA、MCA が HB 群で減少した一方で、二次 BA である LCA、DCA が増加した。これらの結果は腸管循環を逃れた一次 BA が盲腸以降で腸内細菌によって代謝を受け、二次 BA に変換されたことを示唆している。特に CA はコレステロール吸収能が高く、HB 群による CA や MCA の低下は消化管でのコレステロールの過度な吸収を阻害している可能性がある。一方で、HB 群で有意に増加した LCA や DCA は殺菌作用があるとともに、過度な蓄積は肝不全の原因物質となる事が報告されている(76)。しかしながら、マウスに生理的濃度で LCA や DCA を添加すると肝臓内のトリ

グリセリドや血糖値を改善すると報告した研究もあり(77)、未だ議論すべき点は多い。本研究で用いたマウスには肝臓がんなどの症状は見られず、肝臓中の脂質や肝臓重量はHB群で低値を示していた事から、本研究の大麦の摂取による二次BAの増加は生理的濃度内であると考えられた。

盲腸と糞便中のHB群の総BA含量は有意に減少した。これまで、大麦などの食物繊維はBAに吸着して糞便排泄量を促進する事が言われていたが、逆の結果となった。加えて、回腸ではBAの取り込みと細胞内輸送を促進するIbabpのmRNA発現量がHB群で増加しており、HC群と比べてBAが肝臓に再吸収されている事が示唆された。これはメタボローム分析による結果でも血中、門脈中のコール酸が増加していたことからも確認できる。またHB群において肝臓中のCyp7a1のmRNA発現量が低下したことから、高脂肪環境下で大麦を摂取するとBAの腸肝循環が促進し、胆汁酸合成量を調整している可能性が示唆された。大麦β-グルカンを添加した高脂肪食を与えたハムスターを用いた先行研究では、8g/100gの大麦β-グルカンの摂取により糞便中の総ステロール濃度が上昇し、血中脂質濃度が有意に減少したことが報告されている。しかし、2g/100gのβ-グルカンを摂取させたハムスターでは、この効果は見られなかった(78)。さらにオーツ麦β-グルカンを与えたマウスを使った別の研究では、分子量（1450-371kDa）と胆汁酸の吸着能に関係なく、コレステロール低下作用が見られた(79)。しかし、この実験では高濃度（実験食の8.3%のβグルカン）の濃縮β-グルカンを使用したものである。したがって、水溶性食物繊維の摂取が糞便中の脂質排泄に及ぼす影響は、過剰摂取による可能性がある。また、本検討では水溶性食物繊維の抽出物ではなく、β-グルカンを豊富に含む大麦粉を使用した。大麦粉はデンプンの周りの細胞壁に食物繊維が存在するため、胆汁酸へのβ-グルカンの吸着能に差異が生じた可能性も考えられる。以上のことから、HB群では、β-グルカンが脂質を小腸下部や盲腸に運ぶが、生理的濃度の摂取量であったために、糞中までは運ばれず、上記部位で脂質の吸収が生じた可能性が考えられる。したがって、糞中の脂質排泄量も対照群と同程度であった可能性が示唆された。

BAの受容体であるTgr5は腸管ではL細胞に存在しており、cAMPの増加、並びにGLP-1分泌を促すことが示唆されている。本研究ではTgr5のmRNA発現量はHB群で有意に増加した。また、Tgr5はLCAやDCAによって強く活性化する事が知られており(80)、盲腸～結腸で増加したLCAやDCAがTgr5を活性化させ、その後シグナル伝達に影響を与えた可能性がある。過去に2型糖尿病モデルマウスを用いた研究ではTgr5のアゴニスト化合物を与えるとTgr5が活性化し、耐糖能、空腹時血糖値が改善された(81)。これらの事から大麦を摂取した事によるLCAやDCAの増加を介したTgr5の活性化が生体内での代謝改善に寄与している可能性が考えられた。

Table 4-1～4-2

Table 4-1：real time PCR 用プライマー配列

gene symbol	Forward	Reverse
Acox	5’-CAGCGTTACGAGGTGGCTGTTA-3’	5’-AATCCCCTCCTGCAACTTCT-3’
Dgat1	5’-GCTGAGTCTGTCACCTACTTTTGG-3’	5’-AGGCTTGTAGAAGTGTCTGATGCA-3’
Dgat2	5’-CTGGCTGATAGCRGTGCTCTACTT-3’	5’-CGATCTCTCTGCCACCTTTCTTT-3’
Fas	5’-CCTGGATAGCATTCCGAACCT-3’	5’-AGCACATCTCGAAGGCTACACA-3’
Hmgcoar	5’-CCAAGGTGGTGAGAGAGGTGTT-3	5’- CGTCAACCATAGCTTCCGTAGTT-3’
Lpl	5’-AGGGCTCTGCCTGAGTTGTA-3’	5’-AGAAATCTCGAAGGCCTGGT-3’
Pparα	5’- AGGAAGCCGTTCTGTGACAT-3’	5’-AATCCCCTCCTGCAACTTCT-3’
Srebp1c	5’-GGCACTAAGTGCCCTCAACCT-3’	5’-GCCACATAGATCTCTGCCAGTGT-3’
Srebp2	5’-GACCCGCTCTCGAATCCTCTTATGTG-3’	5’-GTTTGTAGGTTGGCAGCAGCA-3’
Bsep	5’-CTGCCAAGGATGCTAATGCA-3’	5’-CGATGGCTACCCTTTGCTTCT -3’
Cyp7a1	5’-CTGATCCGTCTACGCATGTTTC-3’	5’-CAGGAATGGTGTTTGCTTGAGA-3’
Cyp7b1	5’- TAGCCCTCTTTCCTCCACTCATA -3’	5’-GAACCGATCGAACCTAAATTCCT-3’
Fxr	5’-TCCAGGGTTTCAGACACTGG-3’	5’-GCCGAACGAAGAAACATGG-3’
Mrp3	5’-TCCCACTTTTCGGAGACAGTAAC-3’	5’-ACTGAGGACCTTGAAGTCTTGGA -3’
Shp	5’-CGATCCTCTTCAACCCAGATG -3’	5’-AGGGCTCCAAGACTTCACACA -3’

Ibabp	5’-CAGGAGACGTGATTGAAAGGG-3’	5’-GCCCCCAGAGTAAGACTGGG-3’
Ibat	5’-ACCACTTGCTCCACACTGCTT-3’	5’-CGTTCCTGAGTCAACCCACAT-3’
Ost α	5’-TGTTCCAGGTGCTTGTCATCC-3’	5’-CCACTGTTAGCCAAGATGGAGAA-3’
Ost β	5’-GATGCGGCTCCTTGGAATTA-3’	5’-GGAGGAACATGCTTGTCATGAC -3’
Reference		
36B4	5’-GGCCCTGCACTCTCGCTTTC-3	5’-TGCCAGGACGCGCTTGT-3’

Table 4-2：血中、肝臓のコレステロール、トリグリセリド濃度

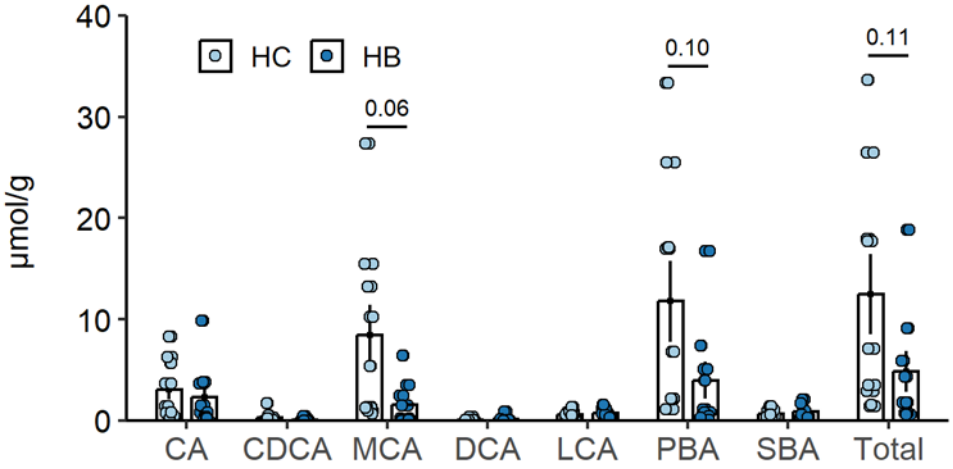
	Control diet	Barley diet	*p*-values
Serum			
Cholesterol (mmol/L)	12.69 ± 0.69	8.61 ± 0.36	< 0.001
Triglyceride (mmol/L)	6.20 ± 0.52	7.67 ± 0.47	< 0.05
Liver and feces			
Liver cholesterol (mmol/g liver)	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.19
Liver cholesterol (mmol/liver)	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.12
Liver triglyceride (mmol/g liver)	0.44 ± 0.08	0.29 ± 0.03	0.14
Liver triglyceride (mmol/liver)	0.27 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.11
Total fat output (mg/day)	8.83 ± 1.08	8.25 ± 1.01	0.79

結果はMean ± SEで示した(n=8)。

Abbreviations: HC, control group; HB, barley group.

Figure 4-1～4-7

Figure 4-1

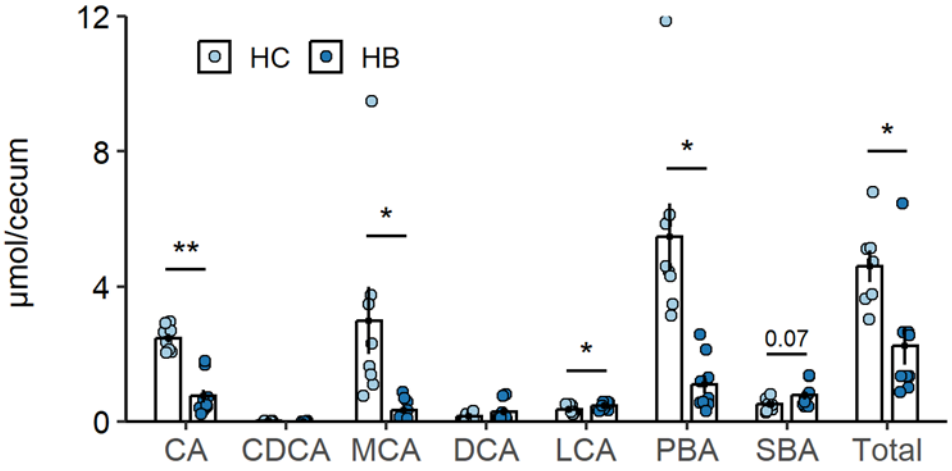


回腸内容物中の胆汁酸濃度。

結果は Mean ± SE で示した。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

Figure 4-2

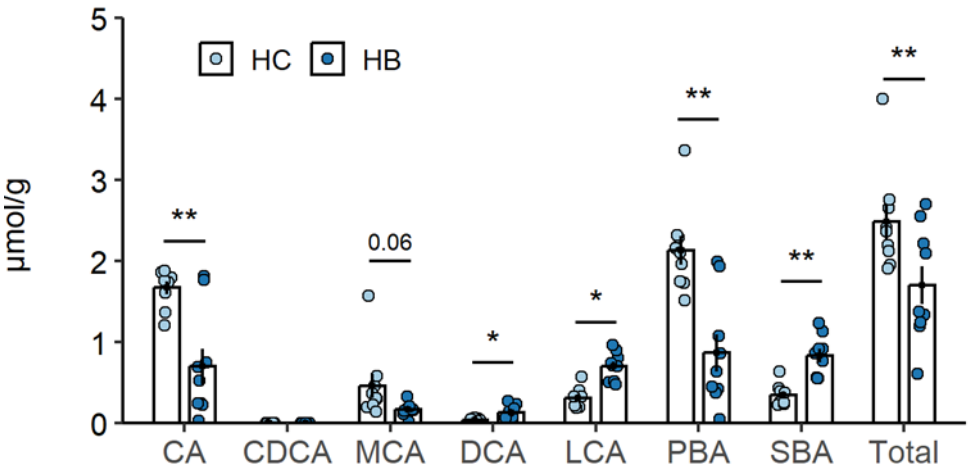


盲腸内容物中の胆汁酸濃度。

結果は Mean ± SE で示した。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（†p = 0.06, *p < 0.05, **p < 0.01)。

Figure 4-3

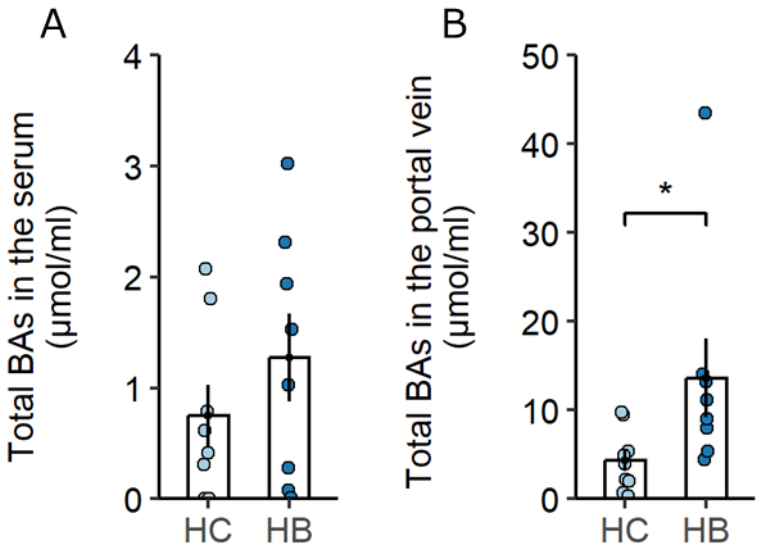


糞中の胆汁酸濃度。

結果は Mean ± SE で示した。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（†p = 0.06, *p < 0.05, **p < 0.01)。

Figure 4-4

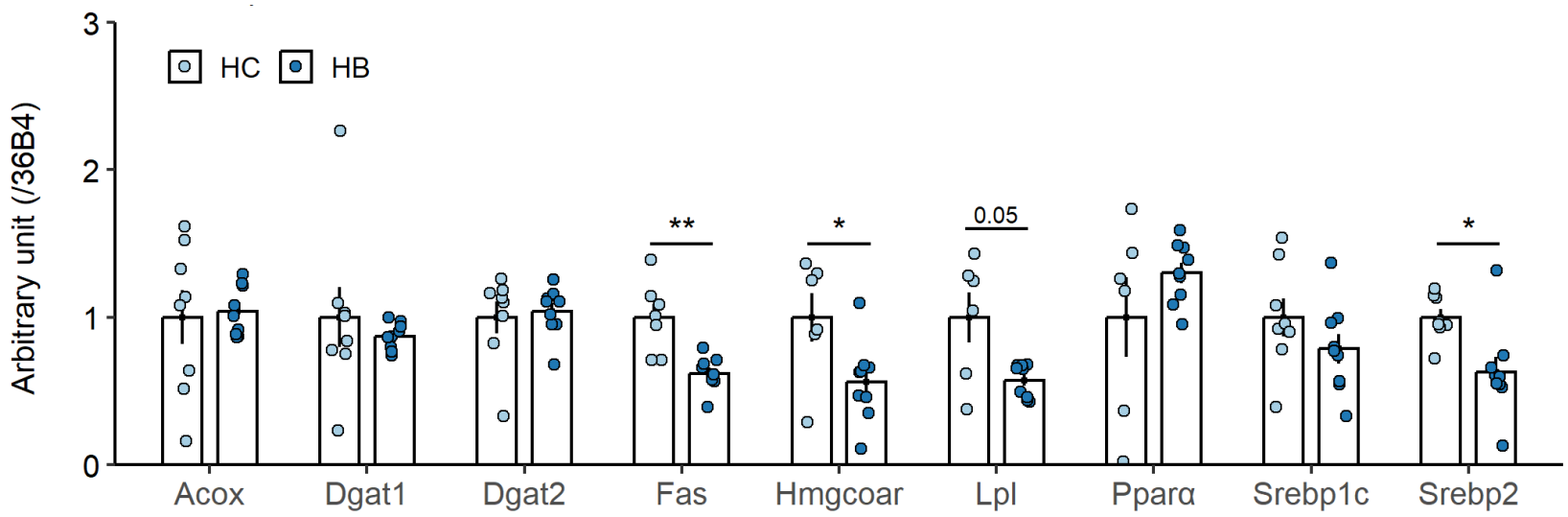


血中（A）及び門脈血中（B）の総胆汁酸濃度。

結果は Mean ± SE で示した。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

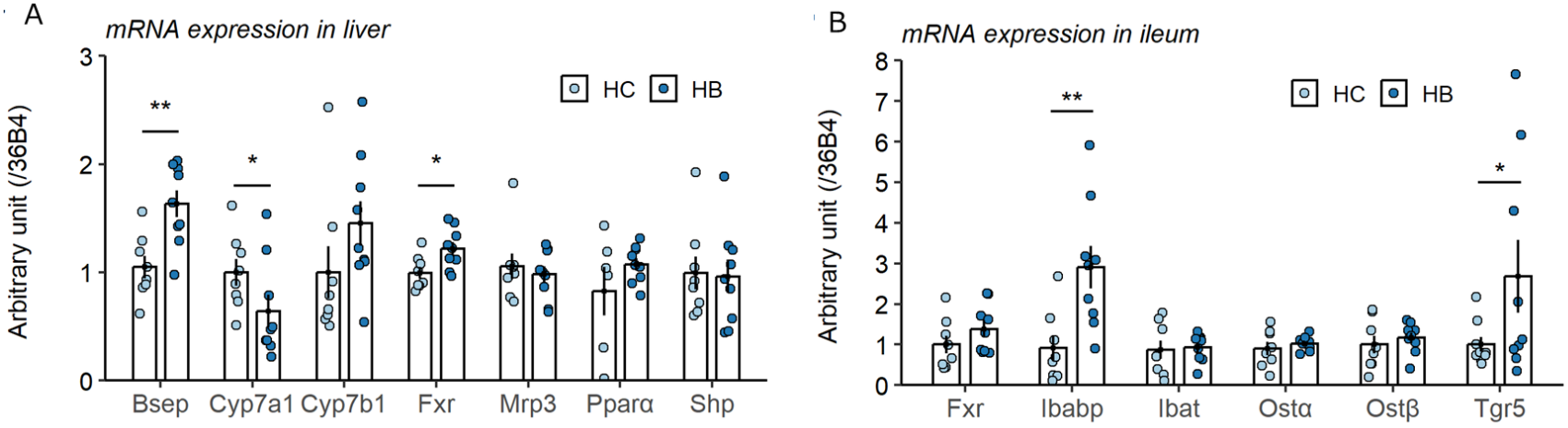
Figure 4-5



肝臓の脂質合成に関連する遺伝子の mRNA 発現量。

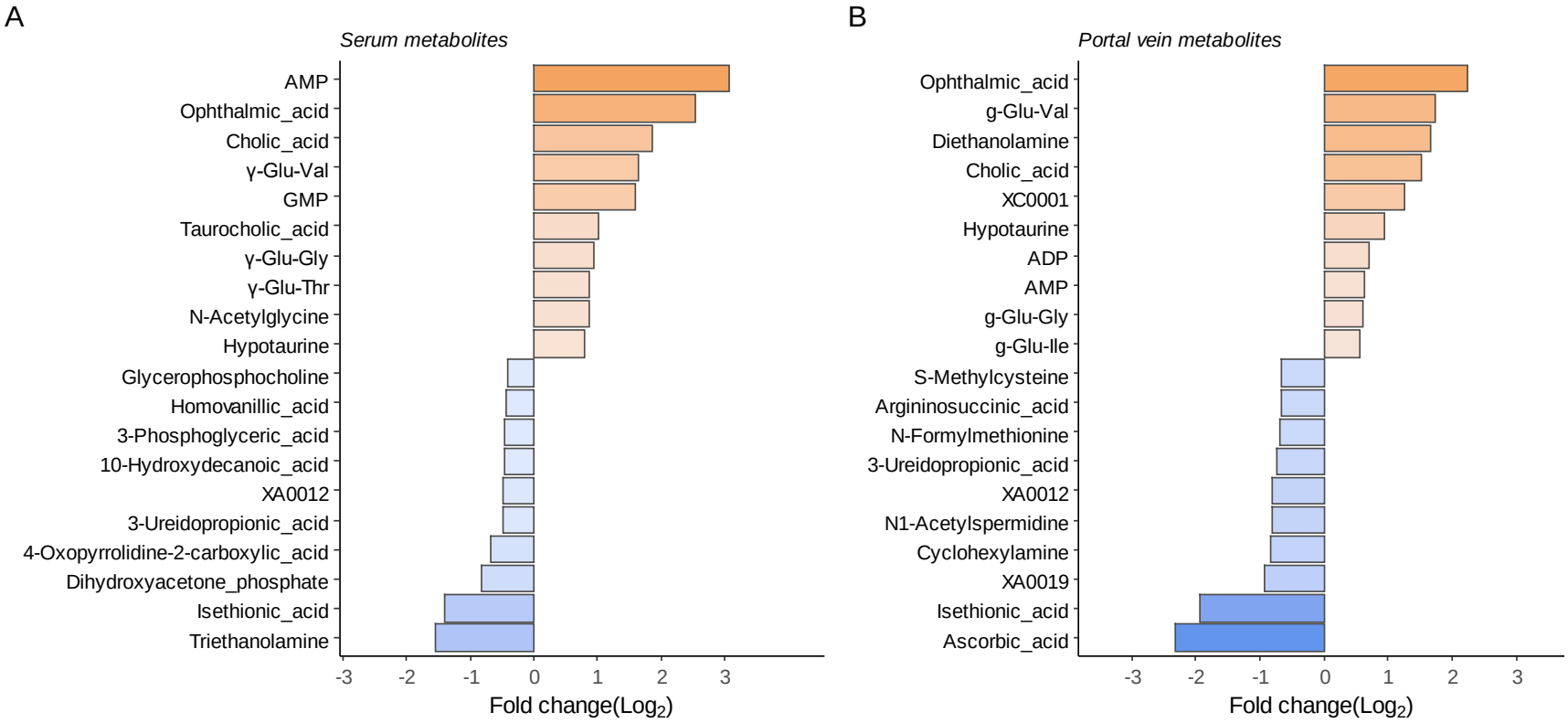
結果は Mean ± SE で示した。図中の上付き文字は、実験群間の有意差を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

Figure 4-6



肝臓（A）及び回腸（B）の胆汁酸調整（輸送、合成、排泄）に関連する遺伝子の mRNA 発現量。
結果は Mean ± SE で示した。図中の上付き文字は、実験群間の有意差を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

Figure 4-7



血清（A）及び門脈（B）のメタボローム分析結果。

結果は HB 群で増加、あるいは減少した代謝産物の上位 10 産物を示した。

縦軸は抽出された代謝産物を示し、横軸は HC 群と比較した HB 群の代謝産物の存在量を Fold-change（Log_2 変換）で示した。

第 6 章：抗生物質を投与し腸内細菌活性を低下させた C57BL/6J マウスにおける大麦粉の摂取による胆汁酸組成の変動を介した脂質代謝への影響

第 1 節：概略

第 5 章の結果より、高脂肪食の BF の摂取によって腸管循環が促進されるとともに、二次 BA 代謝が亢進することが示唆された。さらに肝臓では BA の核内受容体で調節因子である Fxr の発現量が増加し、Fxr によって調節を受ける Cyp7a1 ならびに脂質合成に関わる Srebp2、Dgat1 の mRNA 発現量は有意に低下した。Fxr は BA の流入によって活性化する事から、高脂肪食環境下において大麦の摂取により肝臓内に BA が蓄積し、Fxr シグナルが活性化した事が考えられる。これらの事から、高脂肪食での大麦摂取による肝臓・血清脂質蓄積の抑制作用は、腸および肝臓の Fxr 活性化を介した BA シグナルの変動による可能性がある。その一方で、メタボローム分析結果より、HC 群と比較して HB 群の血中では AMP が 7～8 倍、門脈血では 1.8 倍増加していた。生体内で AMP が増加すると様々なシグナルに影響を与えるが、肝臓では AMP-activated protein kinase(AMPK)シグナルが活性化する事が知られている。AMPK は全身のエネルギー代謝の調節に関わり、脂肪蓄積を抑制する作用もある。過去の報告では、大麦を含む高脂肪食を C57BL/6J マウスに摂取させると AMPK が活性化され、Srebp1c や Fas の発現が減少することが示されている(82)。肥満マウス（レプチン受容体欠損）においても大麦粉の摂取によって同様の作用が報告されている(83)。ここで、腸内における BA の受容体 Tgr5 は二次 BA によって活性化され、細胞内の cAMP 濃度を増加させる。これらの事から二次 BA の増加による Tgr5 の活性化を介した AMP の増加による AMPK の活性化を介した脂質合成の蓄積抑制作用も否定できない。

以上の事より、大麦粉の摂取による脂質の蓄積抑制作用は BA の変動を介した Fxr シグナル、AMPK シグナルの活性化が寄与していると仮説を立てた。そこで第 6 章では抗生物質の投与により腸内活性を著しく低下させ、腸内での BA 代謝を抑制するモデルマウスを用いて Fxr、 Tgr5-AMPK シグナルへの影響を確認する事を目的とした。

第 2 節：実験方法

6-2-1：実験試料の調整

2 章と同様である。

6-2-2：実験動物

雄の 4 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。予備飼育として、固形飼料（NMF;オリエンタル酵母工業株式会社）及び既存の文献(84)に基づいて 4 種類の抗生物質（アンピシリン（1g /

L)、ネオマイシン（1g / L)、メトロニダゾール（1g / L)、バンコマイシン（0。5g / L)）を飲料水と混合し、スターラーで 1 時間完全に撹拌させて完全に溶解させた。抗生物質混合液又はポジコンとして通常の飲料水と繁殖用の固形飼料を 4 週間摂取させた後、1 群 8 匹のコントロール-飲料水群（以下 HC)、BF－飲料水群（以下 HB)、コントロール－抗生物質水（AC)、BF-抗生物質水（AB）の 4 群に分けた。

6-2-3：実験飼料

実験飼料は 2 章と同様の組成の飼料を用いた。

6-2-4：飼育方法（動物実験）

実験動物は室温 22±1℃、湿度 50±5%、12 時間明暗サイクル（8:00～20:00)で飼育した。Table1-2 で示した実験飼料と水あるいは抗生物質混合水をそれぞれ 14 週間自由摂取させた。その他の方法は 2 章と同様である。

6-2-5：動物解剖とサンプル採取

解剖方法およびサンプル採取方法は 2 章と同様である。肝臓は Western blot 用に 50-100mg のサンプルを採取し液体窒素で急速冷凍したのち、分析に供するまで-80℃で保存した。

6-2-6：胆汁酸分析

盲腸、糞便中の BA 分析を 5 章と同様の分析方法で実施した。

6-2-7：脂質代謝、胆汁酸代謝に関わる mRNA 発現量(Real-time PCR)

5 章と同様の方法で、肝臓と回腸、結腸から Total RNA を抽出した後、cDNA を合成し、脂質代謝、胆汁酸代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現量を Applies Biosystems QuantStudio3 Real-Time PCRsystem を用いた SYBER Green 法にて内部標準にて用いた 36B4 との相対比より求めた。

HC 群、HB 群においては、AMPK signal に関わるシグナルの mRNA 発現量について、RT^2 Profiler PCR Array (PAMM-175ZC-6, Qiagen) を用いて分析を行った。各群の肝臓の cDNA を群間内でプールし、n=3 で製造元のプロトコルに基づき、Applies Biosystems QuantStudio3 Real-Time PCRsystem を用いて分析を行った。結果は先行研究(23)に基づき、HC 群と比較して HB 群での発現量が 1.2 倍以上、あるいは 0.77 倍以下かつ、有意差があった遺伝子を変動遺伝子(Deg：Differential expressed genes)と定義した。

6-2-8：Western blot （AMPK、pAMPK）

6-2-8-1：サンプルの調整

-80℃で保存したHC及びHB群の肝臓サンプルをProtease inhibitorを含むRIPA Bufferに入れ、30 freq/sで1分間破砕した。その後、4℃で1時間振とうさせたのち、遠心分離（15,000 rpm, 4℃, 15分）し，中間層をシリンジ＋針で採取してタンパク質を抽出した。タンパク質の濃度は Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay kit を用いて、サンプル10μL に Reagent A ： Reagent B = 50 ： 1 で調整した発光試薬を 200μL 加えてよく混合し、37℃で30分反応させた後、560 nm の吸光度を測定した。タンパク量の少ないサンプルに合わせるよう各サンプルにLysis buffer （Santa Cruz Biotechnology, Inc)を添加して濃度調整し、サンプルに6×Sample Bufferを添加し，98℃，5分でボイルした。

6-2-8-2：電気泳動

泳動層に泳動 buffer （EzBlot, ATTO）を半分ほど入れ、ゲル板 2 枚をセットして泳動層に静かに入れた。泳動 buffer を満たし、well を洗浄後、6-2-8-1で作成したサンプルとマーカーをアプライした。マーカーはピンク（Precision Plus Prote in Standards, BioRad #161-0374)、緑（Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards, BioRad #161-0375）の 2 種類を使用した。10mA で泳動を開始し、濃縮ゲルを過ぎた後、電流を 20mA に上げてさらに泳動を行った（約60分)。

6-2-8-2：Blotting

Blotting buffer（EzBlot、ATTO 社）を用いた。PVDF 膜（AmershamTM HybondTM-ECL（GE Healthcare)）を蒸留水で軽く振とうさせた後、Blotting Buffer B に交換し、10分以上振とうした。各トレイに Blotting Buffer A、B、C を注ぎ、濾紙を各 Buffer 中で数分振とうした(濾紙はそれぞれ A 液 2 枚、B 液 1 枚、C 液 3 枚)。電気泳動が終了したゲルを、Blotting Buffer B 液中で軽く振とうし、ゲル片を除去したのち、Blotting Buffer A が入ったトレイから数 ml の buffer を電極版にたらして電極版を濡らした。次に濡らした電極板の上に Blotting Buffer A に浸した濾紙を 2 枚重ね、Blotting Buffer B が入ったトレイから数 ml の buffer を Blotting BufferA 上に添加した。Blotting Buffer B に浸した濾紙を 1 枚重ね、PVDF 膜を 1 枚重ねた。Blotting Buffer B が入ったトレイから数 ml の buffer を PVDF 膜上に添加し気泡が入らないようにゲルを重ねた。Blotting Buffer C が入ったトレイから数 ml のバッファーをゲル上に添加したのち、Blotting Buffer C に浸した濾紙を 3 枚重ねた。上記工程を実施したのち、ブロッティング装置を閉じ、上から均等に押さえた。電極板をセットし、約200mAで約60分通電した。転写後のメンブレンを TBS-T(20mM Tris-HCl(pH7.6)、0.274M NaCl、10%Tween-20(1%))で洗浄した。

6-2-8-3：ブロッキング、抗体反応

メンブレンにブロッキング Buffer（ブロッキング ワン、ナカライテスク）を入れ、製造元のプロトコルに従い室温で約 1 時間振とうし、ブロッキングを行った。ブロッキング終了後のメンブレンを、マーカータンパク質の泳動パターンに従って切断し、それぞれ対応する抗体で下記の工程で染色した。最初にパラフィルムを用いて船を 2 つ作り、これに切断後のメンブレンをそれぞれ入れ、メンブレン面積(cm^2)×0.124μl を total の液量とした。
次に各一次抗体(AMPK:Cell Singaling, AMPKα Antibody (#2532)、pAMPK:Cell Singaling, Phosho-AMPKα Antibody (Thy172) (#2531))を 20 倍希釈したブロッキング ワンで希釈し、メンブレン上に静かに、かつまんべんなく乗せ、湿潤箱に入れて 4℃で一晩静置した。抗体溶液量は、メンブレン面積(cm^2)×0.124μl を total の液量とした。反応後、TBS-T を入れた洗浄用ケースにメンブレンを移し、軽く振とうしながら洗浄した。TBS-T でさらに 3 回洗浄し（5 分→10 分→15 分)、TBS-T でよく洗浄したパラフィルムの船にメンブレンを戻した。二次抗体（Anti mouse IgG, HRP 標識抗体（1：2000 で希釈)）を 1% BSA/TBS-T 溶液で希釈し、メンブレン上に静かに乗せ、湿潤箱に入れて室温で 1 時間振とうして反応させた。反応後、TBS-T を入れた洗浄用ケースにメンブレンを移し、軽く振とうしながら洗浄した（10 分→10 分）さらに Tween を含まない TBS でさらに 3 回、振とうしながら洗浄した（30 秒→2 分→10 分)。

6-2-8-4：発光検出、画像解析

化学発光検出専用撮影装置 Lumi Cube（リポニクス）と以下の基質溶液を用い、下記の手順で発光検出した。
基質：Pierce Western Blotting Substrate Plus (buffer A：buffer B = 40：1)
西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP；Horseradish Peroxidase)：標識された抗体基質と反応し、反応中間体が過酸化物と反応することで、化学発光シグナルおよび化学蛍光シグナルが得られる。

メンブレンについた TBS をキムワイプで軽くとったのち、数秒発光基質と反応させた後、キムワイプで余分な液を取った。その後すぐに取り出し、余分な発光基質を拭きとった。Lumi Cube 専用の台に載せ、メンブレンをキャビネット内に入れ、位置を確認して扉を閉めた。感度を High にし、露光時間は 2 分で撮影を行った。その後、画像を Adobe Photoshop Elements 10（Adobe 社）を用いて白黒反転、グレースケールへの変換などを行った。各バンドの定量解析は ImageJ を用いて行った。

6-2-9：統計解析

各パラメータについて、データが正規分布に基づいている場合はStudent's t-testを用いた。正規分布が確認できない場合は，Wilcoxon検定を用いた。有意水準は$p < 0.05$とした。

第3節：実験結果

6-3-1：成長結果、臓器重量、血清・肝臓脂質濃度

各試験飼料を摂取したマウスの摂餌量に差はなく、同等のエネルギー量を摂取した（Table5-1）。最終体重、体重増加率、飼料効率、腹部内臓脂肪はHC群に比べHB群で有意に低かった（$p < 0.05$）（Table5-1）。また、内容物を含む盲腸重量はHB群で有意に高かった（$p < 0.05$）。加えてHB群はHC群と比較して、血中コレステロール濃度および肝臓トリグリセリド濃度が有意に低下した（$p < 0.05$）。しかし、抗生物質を投与したマウス（AC・AB）では、これらの項目について有意な差は確認されなかった。

6-3-2：各組織内の胆汁酸含量

盲腸では、HC群に比べHB群でMCAおよびPBAが有意に減少し、LCAが有意に増加したが（$p < 0.05$）、抗生物質の投与群（ACおよびAB）ではこの変化は観察されなかった（Figure 5-1）。糞便中では、HC群に比べHB群でCA、MCA、PBAが有意に減少し、LCAが増加した（$p < 0.05$）（Figure 5-1）。大麦摂取は抗生物質投与下でもMCAとPBAを有意に減少させたが（$p < 0.05$）、その濃度は低かった（Figure 5-1）。抗生物質の投与により，腸管内の胆汁酸濃度は一貫して顕著に低下した(図0).血中の総胆汁酸濃度に各群有意差はなく(Figure 5-2)、門脈ではHC群に比べHB群で増加傾向を示したが（$p = 0.09$）、抗生物質を投与するとその変化は確認されなかった（Figure 5-2）。

6-3-3：脂質合成および胆汁酸代謝に関するmRNA発現量（Real-time PCR）

5章と同様に、肝臓内でのFxrおよびBsepのmRNA発現量はHC群に比べHB群で有意に増加した（$p < 0.05$）（Figure 5-3）。さらに、脂質およびコレステロール合成に関連する遺伝子（Srebp2、Fas、HmgCoA reductase、Dgat1）は、HB群において有意に減少するか、減少傾向を示した（$p < 0.05$）（Figure 5-3）。しかし、大麦摂取により、抗生物質を投与したマウス（AC・AB）においてもHmgCoA reductaseは減少傾向を示したが、他の遺伝子のmRNA発現量に有意差は確認されなかった（Figure 5-4）。回腸ではIbabp、結腸ではTgr5の発現がHC群と比較してHB群で有意に増加したが（$p < 0.05$）（Figure 5-5）、抗生物質を投与後するとこれらの変化は確認されなかった（Figure 5-5）。

6-3-4：肝臓内での AMPK, pAMPK のタンパク質濃度（Western blot）

肝臓内での AMPK のタンパク質濃度は、HC 群に比べて HB 群で有意に低く、pAMPK および pAMPK / AMPK 比が HB 群で有意に高かった（$p < 0.05$）（Figure 5-6）。抗生物質処理では、これらの変化は確認されなかった（$p < 0.05$）（Figure 5-6）。

6-3-5：肝臓内での AMPK signal に関わるシグナルの mRNA 発現量（HC・HB 群）

HC 群と比較して HB 群で mRNA 発現量が 1.2 倍以上かつ有意に異なる遺伝子は 21 個あった（Figure 5-7）。AMPK をリン酸化する上流遺伝子のほとんどが大麦摂取により発現が情報制御された（Table 5-2, Figure 5-7）。AMPK のリン酸化に関与する G タンパク質スーパーファミリーである Adra1d および Adra2a が増加し、AMPK の活性化キナーゼとして知られる CaM キナーゼ（CaMKK）Camkk1 も増加した。また、レプチン受容体である Lepr も増加した。一方で、AMPK シグナルに関与する遺伝子のうち、大麦の摂取によって mRNA 発現量が 0.77 倍未満で有意差があったのは 4 つだけであった（Figure 5-7）。AMPK がリン酸化され活性化されると抑制的に制御される Acacb と Lipe は、HB 群で減少していた（Figure 5-7）。さらに脂質合成に関する遺伝子は一貫して下方制御されていた（Table 5-2）。これらのことから、大麦摂取により AMPK がリン酸化され、高脂肪によって誘導される脂質合成経路を調節している可能性が示唆された。

第 4 節：考察

第 6 章では抗生物質混合水を投与して腸内細菌による BA 代謝を低下させたマウスを用い、脂質代謝と BA 組成への影響を確認した。その結果、抗生物質混合水の投与によりマウスの二次 BA 濃度は一貫して低下し、腸内細菌叢による一次 BA の脱水素や脱水素が減少したことが示唆された。また抗生物質群のマウスの体重は減少することなく適度に増加したことから、本試験における抗生物質の投与量は、マウスの成長に影響を与える代謝異常を引き起こさないと判断した。大麦粉の摂取による血中コレステロール濃度、肝臓トリグリセリド濃度、内臓脂肪重量の減少はマウスに抗生物質混合水を投与すると減弱した。したがって、腸内細菌叢を介したシグナルが、大麦粉の摂取による脂質およびコレステロール蓄積の抑制効果に大きく寄与している可能性が示唆された。

大腸では、大麦粉の摂取により Tgr5 の mRNA 発現が有意に増加したが、抗生物質混合水の投与によりこの変化は減弱した。Tgr5 は LCA > DCA > CDCA > CA の順に活性化され(85)、これらの BA によって活性化されると、cAMP 産生を誘導する(26)。さらに cAMP の増加を介してエネルギー消費の増加や炎症状態の低下など、各代謝に影響を与えると考えられる(75)。また、骨格筋や褐色脂肪組織で Tgr5 が活性化すると、不活性型チロキシン（T4）から活性型甲状腺ホルモン（T3）への変換が促進され、エネルギー消費量が増加する(75)。

C57BL/6J マウスを用いた先行研究では、Tgr5 アゴニストの投与により高脂肪食による脂肪肝と肥満が減少することが報告されている(86)。本研究の結果より、大麦粉を摂取すると盲腸以降で腸内細菌叢を介して LCA が増加し、Tgr5 が活性化することにより門脈を介して AMP 流入量が増加した可能性が示唆された。実際に第 5 章の検討により、大麦粉の摂取により血中および門脈の AMP 濃度は上昇した。さらに肝臓中では AMPK のリン酸化が促進され、この効果は抗生物質処理により減弱された。先行研究では、マウスに *Lactobacillus Plantarum* S58 と大麦βグルカンを同時投与すると AMPK が相乗的に活性化され、脂質合成が抑制されることが報告されている(82). 別の研究では、全粒大麦粉を肥満モデルマウス（db / db）に与えると、AMPK が活性化し、脂質合成関連遺伝子や miRNA が調節され、脂質異常症が緩和されることが示されている(83)。Tgr5 と AMPK の関係を確認した論文は少ないが、ポリコサノールの経口投与により AMPK-Tgr5-Fxr のクロストークが活性化し、肝臓の中性脂肪値およびコレステロール値が有意に低下することが示されている(87)。今回の結果は、これらの研究と一致する。しかし、これまで大麦摂取による AMPK 活性化のメカニズムを明らかにした報告はない。したがって、今回の結果は大麦粉の摂取により、腸管内の Tgr5 の活性化を通じて AMP が増加し、AMPK のリン酸化が促進されることで AMPK が活性化することを初めて証明するものであった。一方で、肝臓中の AMPK のリン酸化が、腸管細胞内での cAMP の増加を介した門脈中の AMP 由来であるかどうかは不明である。先行研究もないことから、今後検討していく必要がある。

AMPK は、AMP/ATP 比や ATP/ADP に応答して変化する生体のエネルギー代謝のマスタースイッチであり、脂質蓄積の抑制に寄与していることが分かっている。AMP が増加すると、Stk11 による Thr172 のリン酸化を介して AMPK が活性化される。Stk11 欠損マウスを用いたいくつかの研究から、Stk11 がエネルギーストレス下で AMPK の活性化を通じて代謝の改善に寄与することが示されている (88,89). 本研究でもわずかな差ではあるが、大麦摂取により Stk11 が有意に増加した。また、AMPK は Ca^{2+}に応答してカルシウム感受性キナーゼである Camkk1 および Camkk2 によって Thr172 にリン酸化される。細胞内 Ca^{2+} の増加は、Camkk2 を活性化し、Stk11 に依存しないシグナルで AMPK を活性化することが知られている (90,91)。 本研究では、HB 群では HC 群と比較して Camkk1 の mRNA 発現量が 1.5 倍となった。我々は 2 章の検討にて、大麦食用マウスの盲腸内容物を腸内分泌細胞に添加すると Ca^{2+}濃度が上昇することを明らかにしているため、大麦粉の摂取に伴い変動する SCFAs や BAs が、それぞれのシグナルを介して Ca^{2+}を増加させ、Camkk 依存的に AMPK の活性化に寄与している可能性がある。しかしながら、Gpr43 欠損マウスの血中コレステロール濃度や肝臓内のトリグリセリド濃度、並びに後腹壁周辺脂肪重量は大麦の摂取により低下していることから (Figure 5-8)、AMPK を介した脂質蓄積の抑制作用は SCFAs の受容体ではなく、BAs 及び BAs の受容体を介したシグナルが寄与していると推定した。

さらにAMPK は Srebp1c および Srebp2 の発現を抑制することにより、脂質およびコレステロールの合成を調節している。Srebp1c は脂質合成や糖代謝に関与し、Srebp2 はコレステロール合成に特異的に関与していることが示唆されている(92)。また、AMPK の活性化は Acc1, Acc2, HmgcoA reductase の発現を抑制することが知られている(93,94). 今回の結果より、肝臓では Srebp2、Hmgcoar の mRNA 発現量が減少しており、その他の脂質合成に関わる遺伝子（Fas、Dgat1）の mRNA 発現量も一貫して減少していた。従って、AMPK の活性化による脂質合成に関する遺伝子の mRNA 発現量の減少が引き起こされ、結果として内臓脂肪の蓄積や血中コレステロール濃度の減少が生じると推定した。

Table 5-1～5-2

Table 5-1: 実験飼料を与えたマウスの体重、飼料摂取量、臓器重量、血中と肝臓の脂質濃度

					p-value	
	HC	HB	AC	AB	HC vs HB	AC vs AB
Initial weight (g)	26.32 ± 0.49	25.95 ± 0.33	26.61 ± 0.34	27.16 ± 0.27	0.54	0.23
Final weight (g)	41.59 ± 1.23	36.89 ± 0.87	41.96 ± 1.13	41.48 ± 1.40	< 0.01	0.80
Food intake (g/d)	2.90 ± 0.05	2.78 ± 0.09	2.91 ± 0.08	3.02 ± 0.07	0.25	0.31
Food efficiency ratio (%)	8.61 ± 0.54	6.48 ± 0.46	8.58 ± 0.46	7.73 ± 0.65	< 0.01	0.31
Liver weight (g)	1.46 ± 0.07	1.28 ± 0.03	1.37 ± 0.06	1.38 ± 0.07	< 0.05	0.91
Cecum with contents (g)	0.28 ± 0.02	0.40 ± 0.02	1.13 ± 0.08	1.11 ± 0.04	< 0.01	0.79
Retroperitoneal fat (g)	0.99 ± 0.06	0.73 ± 0.06	0.94 ± 0.06	0.85 ± 0.06	< 0.01	0.28
Epididymal fat (g)	2.47 ± 0.13	1.94 ± 0.12	2.53 ± 0.12	2.44 ± 0.16	< 0.01	0.66
Mesenteric fat (g)	1.00 ± 0.12	0.64 ± 0.06	1.05 ± 0.10	1.06 ± 0.16	< 0.01	0.96
Serum cholesterol (mmol/l)	10.40 ± 0.55	7.89 ± 0.48	8.94 ± 0.28	9.90 ± 0.56	< 0.01	0.16
Serum triglyceride (mmol/l)	4.82 ± 0.33	5.53 ± 0.79	4.33 ± 0.65	4.25 ± 0.19	0.43	0.90
Liver cholesterol (μmol/g liver)	46.1 ± 8.4	38.9 ± 3.7	42.9 ± 9.4	40.6 ± 6.0	0.11	0.46
Liver cholesterol (μmol/liver)	30.4 ± 4.1	30.3 ± 3.0	31.3 ± 5.9	29.5 ± 3.2	0.93	0.60
Liver triglyceride (μmol/g liver)	549 ± 166	233 ± 64	420 ± 120	400 ± 185	< 0.01	0.60
Liver triglyceride (μmol/liver)	359 ± 89	182 ± 47	307 ± 89	281 ± 101	< 0.01	0.81

結果はMean ± SEで示した (n = 7-8)。

Food efficiency ratio = body weight gain / food intake × 100

Abbreviations: HC, drinking water - control group; HB, drinking water - barley group; AC, antibiotic water - control group; AB, antibiotic water - barley group.

Table 5-2: 肝臓中の AMPK シグナルに関連する遺伝子の mRNA 発現量。

Genes	Fold-change	Fold-ratio	*p* value
Acaca	1.09	1.09	**0.000024**
Acacb	-1.64	0.61	**0.000023**
Adipor1	-1.02	0.98	**0.037045**
Adipor2	-1.01	0.99	0.606630
Adra1a	-1.19	0.84	**0.023330**
Adra1b	-1.00	1.00	0.841690
Adra1d	1.98	1.98	**0.000061**
Adra2a	1.95	1.95	**0.000628**
Adra2b	-1.15	0.87	**0.002853**
Adra2c	1.25	1.25	0.188651
Ak1	1.63	1.63	**0.000007**
Ak2	-1.14	0.88	**0.003072**
Ak3	-1.03	0.97	0.157691
Akt1	1.20	1.20	**0.000092**
Akt2	1.11	1.11	**0.005229**
Akt3	1.04	1.04	0.464484
Atg13	1.19	1.19	**0.001951**
Cab39	1.18	1.18	**0.000384**
Camkk1	1.51	1.51	**0.004353**
Camkk2	1.12	1.12	**0.020546**
Chrna1	1.83	1.83	**0.000436**
Chrnb1	1.56	1.56	**0.003758**
Cpt1a	-1.25	0.80	**0.000010**
Cpt1b	1.05	1.05	0.363602
Cpt1c	1.86	1.86	**0.005993**
Cpt2	-1.06	0.94	**0.044113**
Crtc2	1.30	1.30	**0.005942**
Cry1	-1.00	1.00	0.886652
Eef2k	1.16	1.16	**0.003707**
Eif4ebp1	1.10	1.10	**0.008717**
Elavl1	1.20	1.20	0.132374

Fasn	-1.10	0.91	**0.000337**
Foxo3	-1.02	0.98	0.165791
Gpam	-1.00	1.00	0.977782
Gpat2	1.12	1.12	0.176789
Gys1	1.11	1.11	0.068720
Gys2	1.01	1.01	0.632623
Hmgcr	-1.09	0.91	**0.000470**
Hnf4a	1.12	1.12	**0.000587**
Insr	-1.16	0.86	**0.001632**
Lepr	1.70	1.70	**0.000138**
Lipe	-1.40	0.72	**0.001012**
Mlycd	-1.02	0.98	0.733277
Mtor	1.08	1.08	**0.017366**
Pdpk1	1.09	1.09	**0.005690**
Pfkfb1	-1.41	0.71	**0.000035**
Pfkfb2	1.05	1.05	0.255445
Pfkfb3	1.68	1.68	**0.003425**
Pfkfb4	1.51	1.51	**0.019762**
Pnpla2	1.10	1.10	**0.002649**
Ppargc1a	-1.06	0.94	**0.046261**
Ppargc1b	1.28	1.28	**0.003226**
Ppp2ca	-1.01	0.99	0.277907
Ppp2cb	1.36	1.36	**0.000005**
Ppp2r1a	-1.05	0.96	**0.042741**
Ppp2r1b	-1.01	0.99	0.692802
Ppp2r2b	1.64	1.64	**0.003314**
Ptpa	1.10	1.10	**0.001654**
Prkaa1	1.47	1.47	**0.006563**
Prkaa2	1.12	1.12	**0.000586**
Prkab1	1.11	1.11	**0.019024**
Prkab2	1.05	1.05	0.460796
Prkaca	-1.08	0.93	0.223845
Prkacb	1.08	1.08	**0.023641**

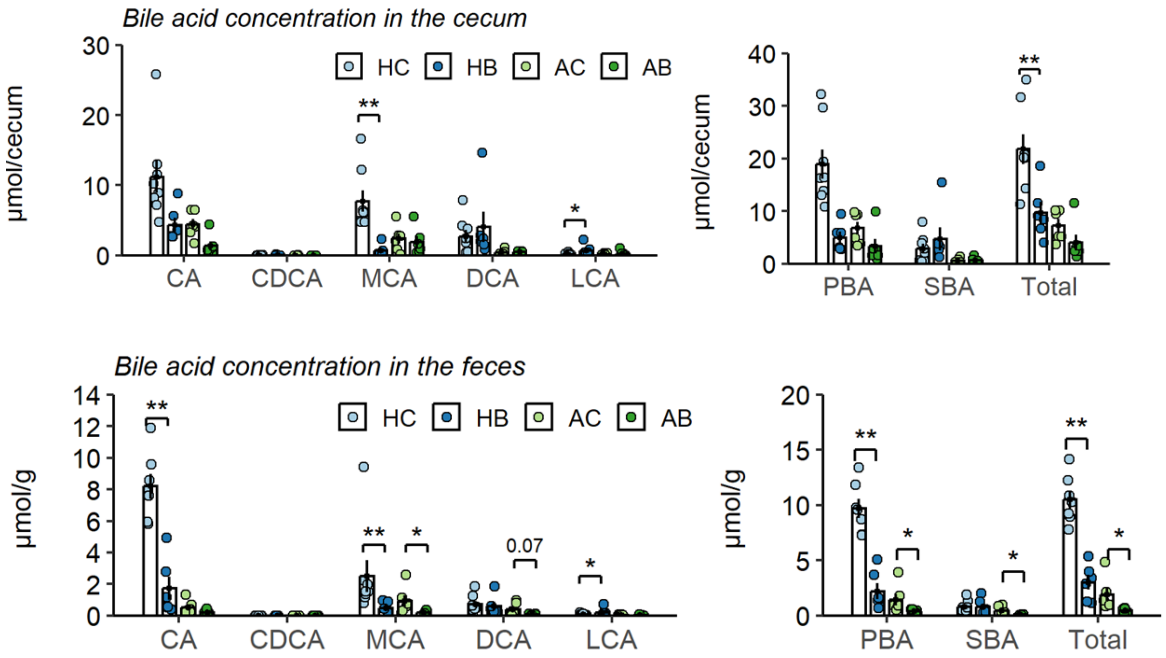
Prkag1	1.10	1.10	**0.016001**
Prkag2	-1.12	0.90	**0.001007**
Prkag3	1.74	1.74	**0.002241**
Prkar1a	1.07	1.07	**0.001292**
Prkar1b	1.79	1.79	**0.001510**
Prkar2a	-1.01	0.99	0.620843
Prkar2b	1.31	1.31	**0.003782**
Rb1cc1	1.44	1.44	**0.000061**
Rps6kb1	1.14	1.14	**0.030047**
Rps6kb2	-1.11	0.90	0.198654
Rptor	-1.07	0.94	**0.038660**
Slc2a4	1.45	1.45	**0.004200**
Srebf1	-1.14	0.88	**0.000087**
Stk11	1.09	1.09	**0.002732**
Strada	1.23	1.23	**0.001868**
Stradb	-1.12	0.90	**0.007636**
Trp53	-1.03	0.97	0.158118
Tsc1	1.16	1.16	**0.000224**
Tsc2	1.12	1.12	**0.004871**
Ulk1	-1.02	0.98	0.126267
Actb	-1.03	0.97	**0.030901**
B2m	-1.02	0.98	0.109141
Gapdh	-1.02	0.98	**0.023603**
Gusb	-1.02	0.98	0.408897
Hsp90ab1	1.10	1.10	**0.001667**

結果は平均値を示す（n = 3)。Fold-change と fold-ration は、HC 群に対する HB 群の mRNA 発現量の比率を示す。

Abbreviations: HC, control group; HB, barley group.

Figure 5-1～5-8

Figure 5-1

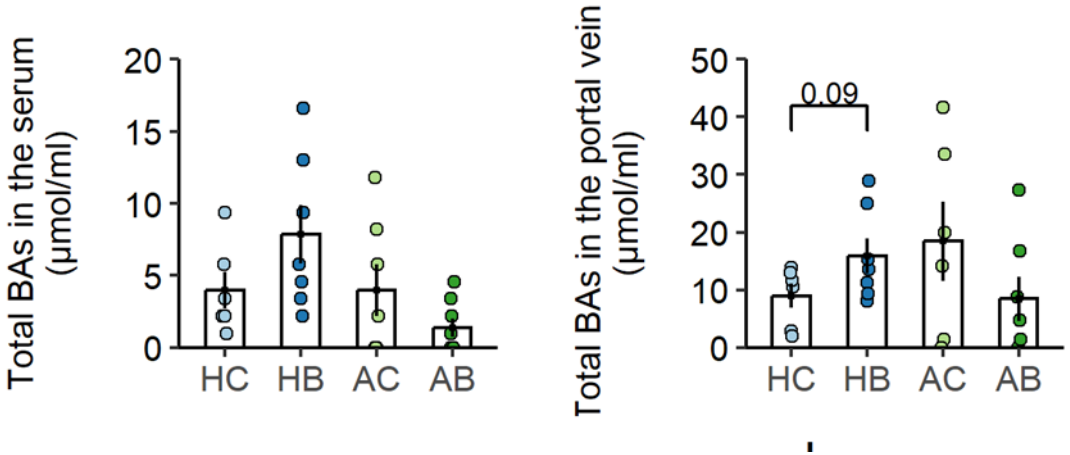


盲腸内容物及び糞中の胆汁酸濃度。

結果は Mean ± SE で示した（n=7-8）。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

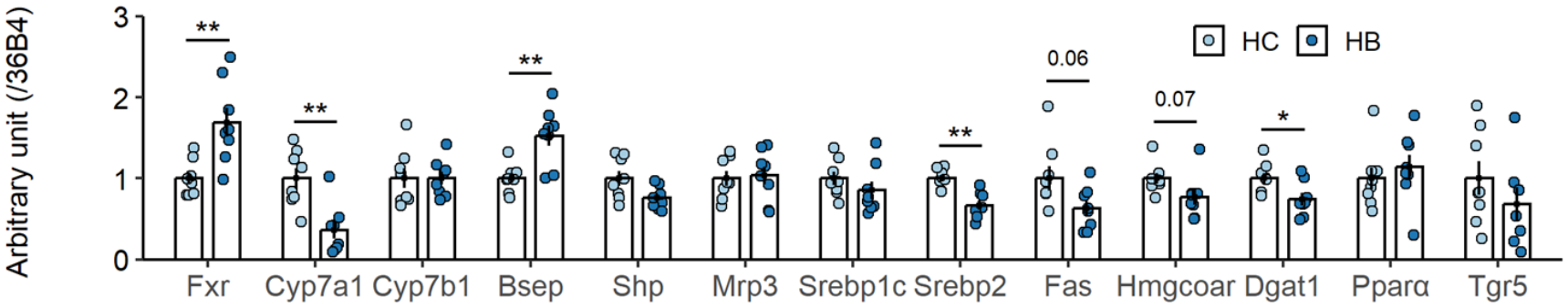
Figure 5-2



血中及び門脈中の総胆汁酸含量

結果は Mean ± SE で示した（n=7-8）。

Figure 5-3

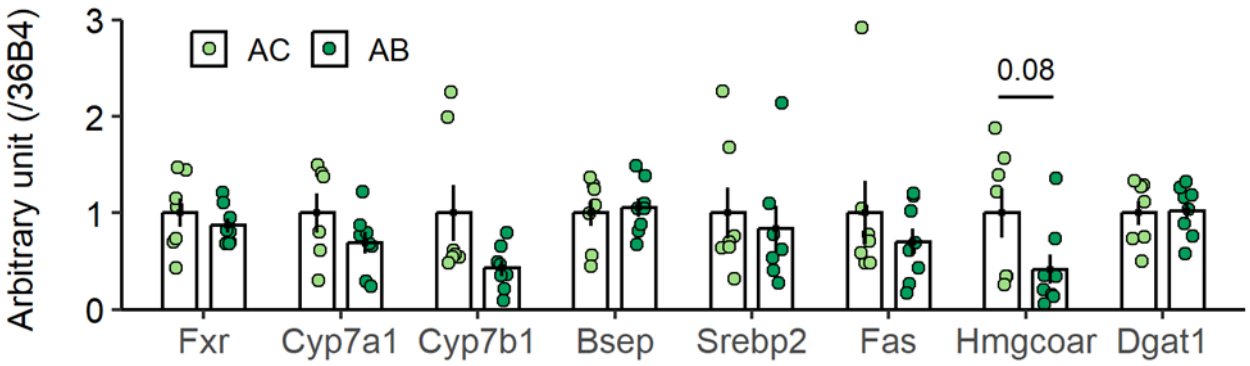


HC・HB 群における肝臓内での脂質合成、胆汁酸合成に関連する遺伝子の mRNA 発現量

結果は Mean ± SE で示した（n=7-8）。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

Figure 5-4

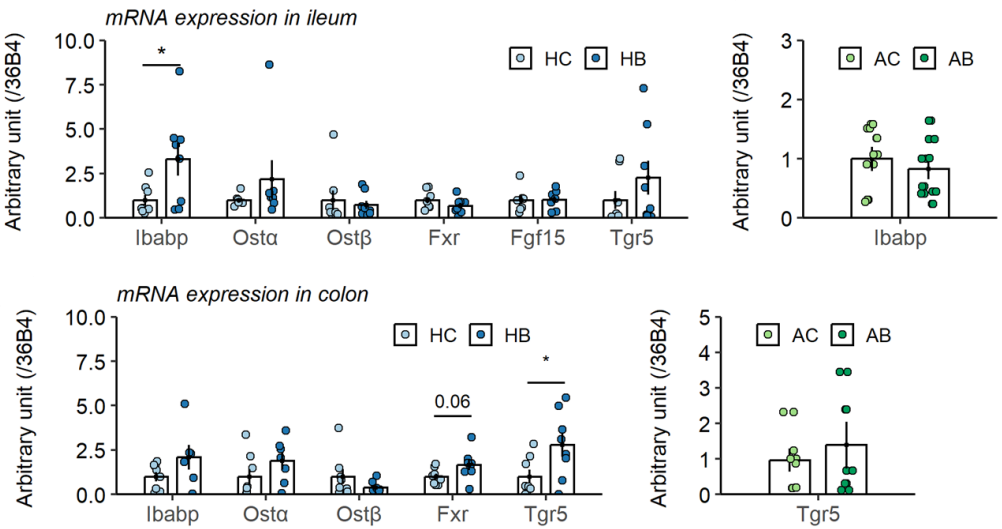


AC・AB 群における肝臓内での脂質合成、胆汁酸合成に関連する遺伝子の mRNA 発現量

結果は Mean ± SE で示した（n=7-8）。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

Figure 5-5

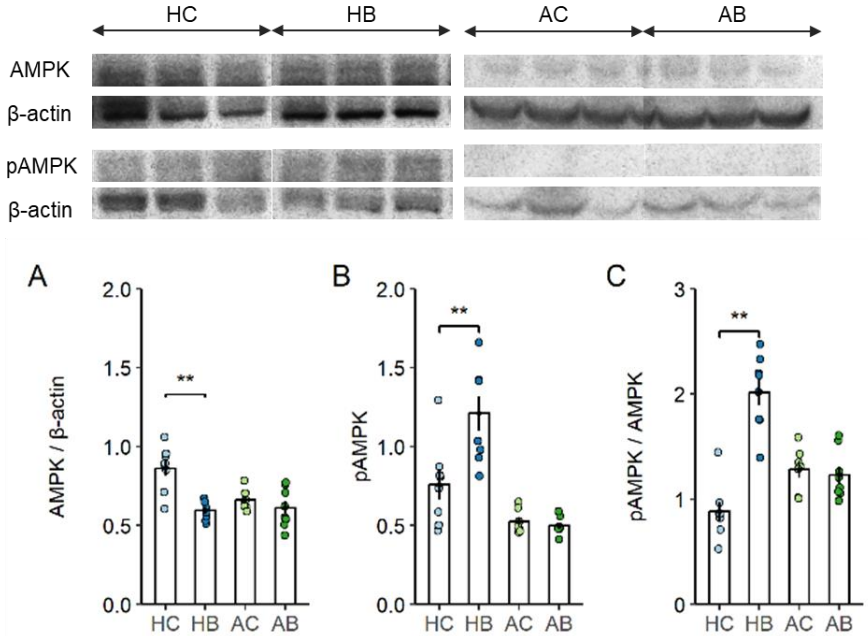


各群における回腸、結腸の胆汁酸代謝に関連する遺伝子の mRNA 発現量

結果は Mean ± SE で示した（n=7-8）。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

Figure 5-6

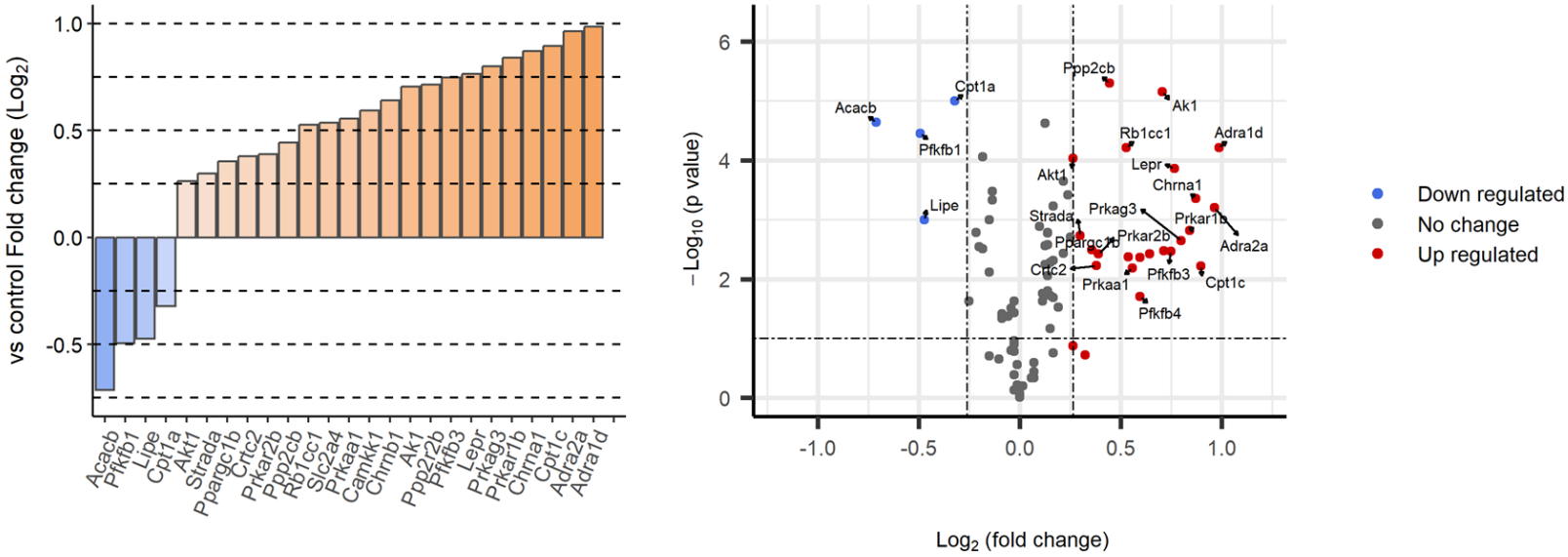


各群における肝臓内の AMPK, pAMPK のタンパク質濃度、及びその比率

結果は Mean ± SE で示した（n=7-8）。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

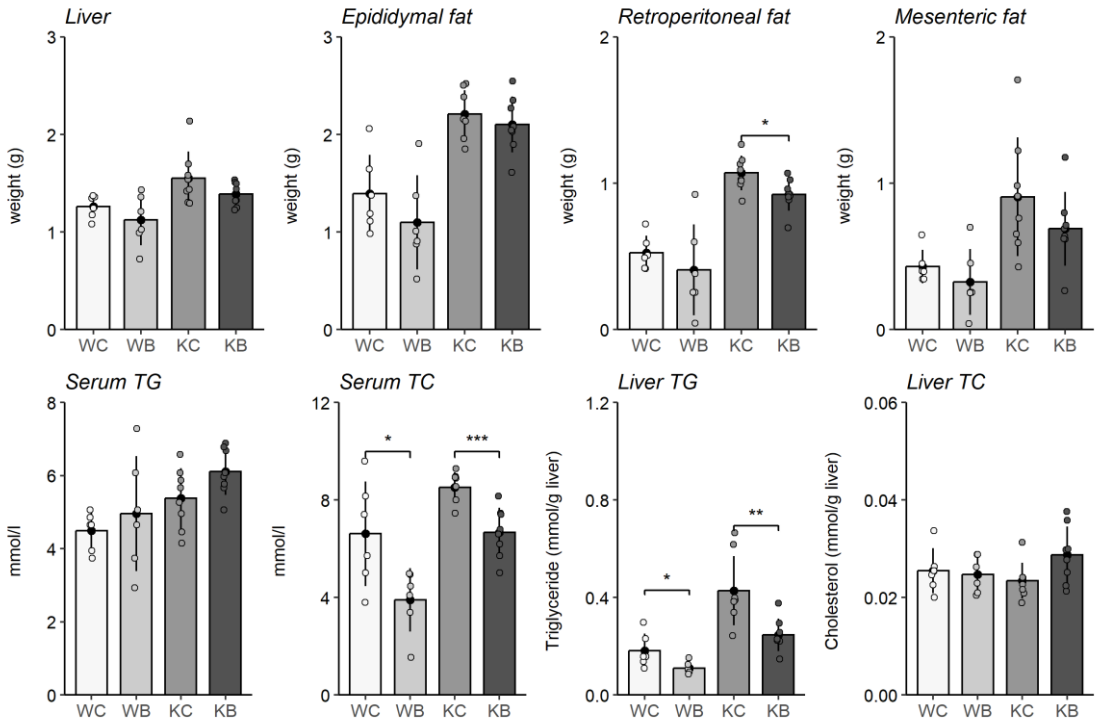
Figure 5-7



HC,HB 群における肝臓内での AMPK に関連する遺伝子の mRNA 発現量

右図は HC 群と比較して HB 群で有意に差があり、fold change が 1.2 以上の遺伝子を橙色、赤色で、fold change が 0.8 以下の遺伝子を青色で示した（n=4)。

Figure 5-8



Gpr43(+/+)マウス及びGpr43(-/-)マウスに本研究と同様の高脂肪食、、または高脂肪＋BF食を12週間摂取させた際の脂質代謝の表現型指標

結果はMean ± SEで示した（n=6-8）。

図中の上付き文字は、実験群間の有意差または傾向を示す（*p < 0.05, **p < 0.01）。

WC: Gpr(+/-)マウス（対照群）、WB: Gpr(+/-)マウス（対照群）、KC: Gpr43(-/-)マウス（対照群）、KB: Gpr43(-/-)マウス（大麦群）

第 7 章：総括

本論文では大麦の摂取により変動する SCFAs 及び BA 動態に着目し、受容体を介したシグナルが糖、脂質代謝に及ぼす影響を複数の動物マウスモデル、及び腸管分泌細胞を用いて検討した。第 1 章では背景およびこれまでの先行研究結果をまとめた。また第 2 章から 6 章までの検討において、以下の結論を得られた。

第 2 章から第 4 章では糖代謝及び SCFAs に焦点を当て、第 2 章では大麦摂取による空腹時および耐糖能改善効果作用のメカニズムを C57BL/6J マウス、Gpr43 欠損マウス、L 細胞モデルである GLUTag 細胞を用いて検討を行った。C57BL/6J マウスは高脂肪食の摂取で食後高血糖を呈し、耐糖能指標が悪化したが、大麦粉を添加した食事を摂取させるとこれらは改善した。また腸管内での SCFAs の増加、並びに門脈中の GLP-1 濃度の増加が確認された。さらに GLUTag 細胞に大麦を摂取したマウスの盲腸内容物を添加すると、L 細胞分化に関わる遺伝子発現量の亢進、ならびに GLP-1 分泌の増加が示された。一方で、SCFAs 受容体である Gpr43 の発現量を低下させた GLUTag 細胞ではこれらの効果は確認されなかった。さらに、Gpr43 欠損マウスでは腸内 SCFAs 濃度が増加するにも関わらず耐糖能指標は悪化したままとなり、GLP-1 分泌の増加も確認されなかった。これらの事から、大麦の摂取による耐糖能改善作用には SCFAs-Gpr43 を介したシグナルによる GLP-1 分泌の増加が大きく寄与している事が示唆された。

第 3 章では第 2 章で得られた作用機序が大麦の主な水溶性食物繊維源であるβ-グルカンに依存しているかどうか、β-グルカンを多く含む大麦（BF）及びβ-グルカンを含まないアラビノキシラン主体の大麦(bgl)を C57BL/6J マウスに摂取させ、耐糖能及び腸管発酵性を確認した。その結果、bgl の摂取は耐糖能を改善しなかったが、糖負荷後 60 分後の GLP-1 濃度は BF と同様に大きく増加し、腸管内 SCFAs 濃度も増加した。これらの事からβ-グルカンだけでなく、アラビノキシランも腸管内で腸内細菌によって発酵され、SCFAs の増加を介した GLP-1 分泌の増加に寄与している事が示された。耐糖能の改善が見られなかった理由としては bgl、BF を添加した食事の水溶性食物繊維量に違いがあった事、並びにβ-グルカンとアラビノキシランの粘性の違いによる栄養素の吸収速度の違いが影響を与えている可能性が示唆された。

第 4 章ではこれまでの検討結果より、大麦の摂取直後（ファーストミール）と摂取数時間後の食事（セカンドミール＝耐糖能試験）での血糖値上昇抑制のメカニズムは異なると推測し、大麦から単離したβ-グルカンとアラビノキシラン抽出物を使用したマウスの単回投与試験によりファーストミール、セカンドミールでの血糖値上昇抑制の作用機序を明らかにすることを目的とした。その結果として、ファーストミールではβ-グルカンの単回投与のみ食後 30 分後の血糖値と AUC が対照群と比較して有意に低下した。アラビノキシランの投

与群では有意差は見られなかったことから、これはβ-グルカンの粘性による栄養素の吸収遅延による効果が寄与したと考えられる。一方で、セカンドミールではβ-グルカン、アラビノキシランの両方でAUCが有意に低下した。また、セカンドミール時の門脈中のGLP-1濃度は両者で増加し、SCFAs産生およびGLP-1分泌に関連する遺伝子のmRNA発現は、アラビノキシランでは主に回腸で、β-グルカンでは主に盲腸で増加した。これらの事からセカンドミール時の食後血糖値の上昇抑制作用は、第2、3章で示したようにβ-グルカン、アラビノキシランが腸内細菌によって発酵されることによるSCFAsを介したシグナルによりGLP-1分泌が増加した事が寄与していると考えられた。また、大麦由来のアラビノキシランとβ-グルカンは、主に発酵する菌属の棲息部位が異なることから、発酵部位に違いが生じた可能性があるため、これについては今後追及していく必要があると考えている。

第5章、6章では脂質代謝及びBAsに焦点を当てた。第5章では大麦の摂取によるBAs動態の変化を報告した先行研究が殆ど無かったため、各臓器内でBAs濃度およびBA代謝に関わるmRNA発現量を測定し、大麦の摂取による動態変化を確認した。その結果、回腸や盲腸では大麦の摂取によって一次BAsが減少しており、回腸ではIbabpのmRNA発現量が増加していたことから、回腸において腸肝循環が促進されている可能性が示唆された。これは門脈中のCAの増加や、総BAsの増加によっても説明することができ、肝臓ではBAsの流入に伴いFxrの増加が確認された。つまりFxrの活性化によりCyp7a1が減少して胆汁酸の合成が抑制されていると推定した。また、盲腸、糞便では一次BAsが減少して、二次BAsが生理的濃度内で増加していたことから、回腸以降に流入したBAsは腸内細菌によって二次BAsに代謝されることが明らかとなった。しかしながら糞便中のBAsは増加していなかったため、少なくとも食事中の総食物繊維量が5%程度の条件下では大麦の摂取による糞中脂質の排泄能は確認されず、回腸から大腸にかけて胆汁酸の再吸収が亢進している事が示唆された。さらに腸管では二次BAsによって強く活性化されるBAsの受容体Tgr5のmRNA発現量が大麦の摂取で増加した。Tgr5はcAMPの増加やGLP-1の分泌に寄与しており、代謝へのシグナルに関与することが知られている。これらの結果から大麦の摂取により胆汁酸組成は大きく変動し、FxrやTgr5を介して脂質代謝に影響を与えている可能性が示唆された。

第6章では第5章の結果を受け、抗生物質を投与して腸内細菌活性を低下させ、胆汁酸代謝を抑制したマウスを用いて、脂質代謝と第5章で仮説立てしたBAs受容体を介したシグナルの関係について検討した。抗生物質の代わりに飲料水を投与したマウスは大麦を摂取すると対照群と比較して体重や脂肪重量が減少し、血中コレステロール濃度や肝臓内のトリグリセリド濃度が低下したが、抗生物質を投与するとこれらの効果は消失した。さらに第5章で確認された胆汁酸代謝に関わる遺伝子発現量の変動は抗生物質投与マウスでは確認されなかった。これは大麦の摂取による脂質代謝の改善作用は腸内細菌を介した胆汁酸組成の変化に大きく影響を受けていることを示している。加えて第5章の結果より門脈中

でAMPが増加していたため、AMPの増加を介したシグナルの影響を検討したところ、肝臓内でAMPKが活性化（リン酸化）していることが示された。この効果は抗生物質を投与したマウスでは確認されなかった。さらに、AMPKに関わる遺伝子のmRNA発現量を網羅的に分析すると、AMPKを活性化させる上流の遺伝子は大麦の摂取により一貫して上方制御されており、脂質合成に関わる遺伝子は下方制御されていた。従って二次BAsを介したTgr5の活性化によりcAMPの増加を介してAMPKが活性化し、脂質合成に関わる遺伝子が抑制されることで、肝臓内での脂質の合成が抑えられ、結果としてコレステロールや脂質濃度が改善されると推定した。

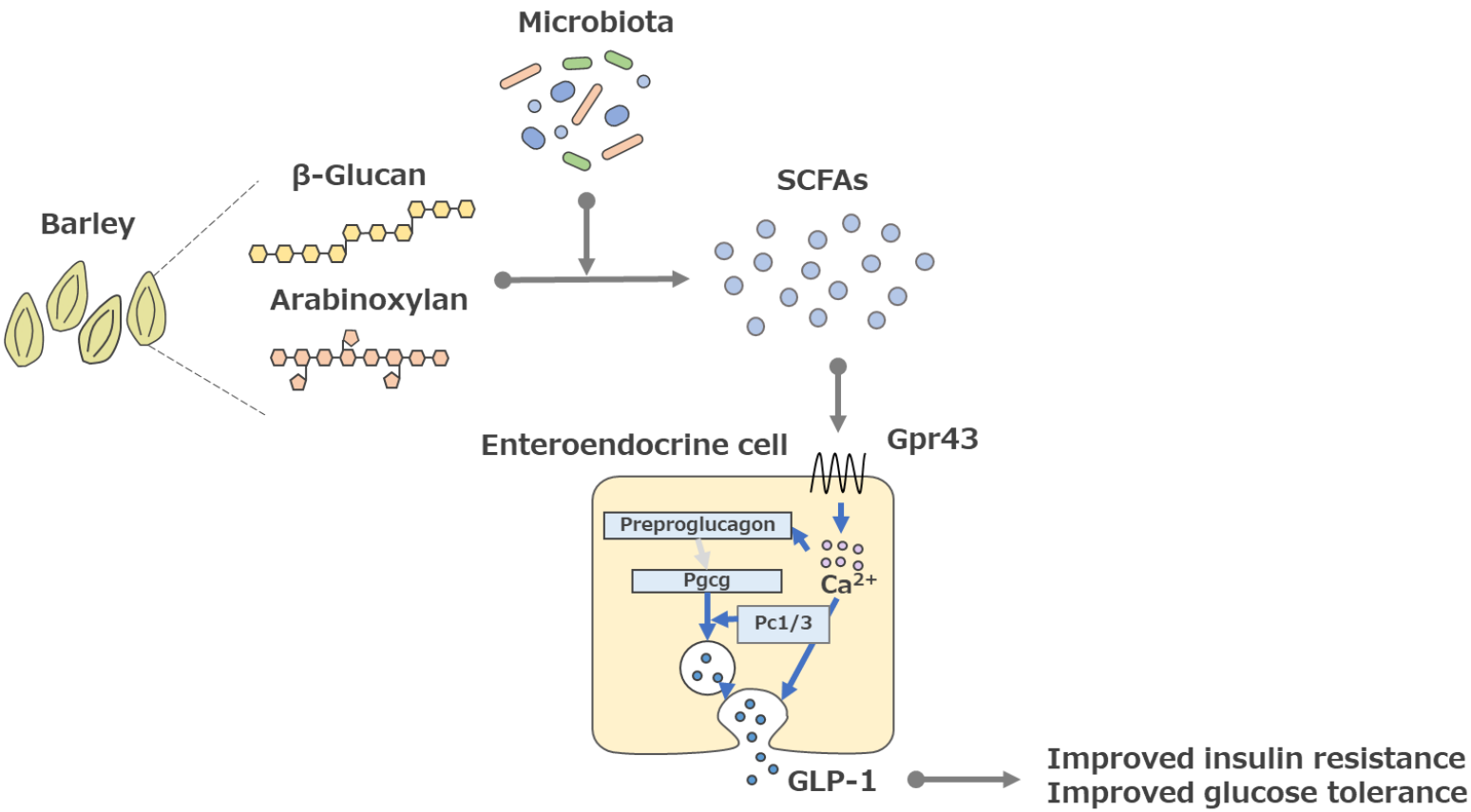
以上をまとめると、大麦の摂取による血糖値の上昇抑制作用のメカニズムとして、水溶性食物繊維が腸内細菌によって発酵され、産生されるSCFAsを介して、腸管内でGpr43が活性化しGLP-1分泌が惹起されることで血糖値依存的にインスリン感受性を高める事が寄与していると推定した。また、このGLP-1分泌の増加はβ-グルカンだけでなく、アラビノキシランも寄与していることが明らかとなった。加えて、大麦摂取直後の血糖値上昇抑制作用はβ-グルカンの粘性を介した物理的作用による栄養素の吸収遅延が寄与しており、摂取数時間後の食事に及ぼす血糖値の上昇抑制作用はβ-グルカン、アラビノキシランの発酵を介した上記作用によるものであることが明らかになった。

一方で、大麦の摂取による脂質代謝の改善作用は腸内細菌を介したBAsの組成の変化が関係していることが明らかとなった。高脂肪食のようなBAs分泌が亢進している環境下において、大麦の摂取により回腸でBAsの再吸収が惹起されることで肝臓内にBAsが流入し、Fxrが活性化してBAsの再合成の抑制及び転写因子Srebpが抑制される。盲腸以降では再吸収を逃れたBAsが腸内細菌によって二次BAsに変換される。生理的濃度内での二次BAsの増加によりBAs受容体であるTgr5が活性化し、門脈内、肝臓内でAMPが増加することで、肝臓でAMPKがリン酸化され、脂質合成に関わる遺伝子が下方制御される。これらの作用は抗生物質を投与して胆汁酸代謝を低下させたモデルマウスでは確認されなかったことから、腸管内でのBAs動態の変化によるFxr、Tgr5といったBAs受容体を介したシグナルにより血清、肝臓脂質濃度が抑制されると推定した。今後はTgr5やFxr欠損マウスを用いて、これらの作用が胆汁酸の変動による特異的な効果かどうか確認する必要がある。

これまでの研究により、大麦の摂取によるメタボリックシンドローム指標の改善、また、腸管内SCFAs濃度の増加は確認されてきたが、本研究ではSCFAsやBAs濃度の変化を介したシグナルがメタボリックシンドローム代謝指標に直接的に影響している事を証明した（Figure 6）。これらの結果は大麦の摂取によるメタボリックシンドローム発症予防の新たなメカニズムを探る研究であると考えている。

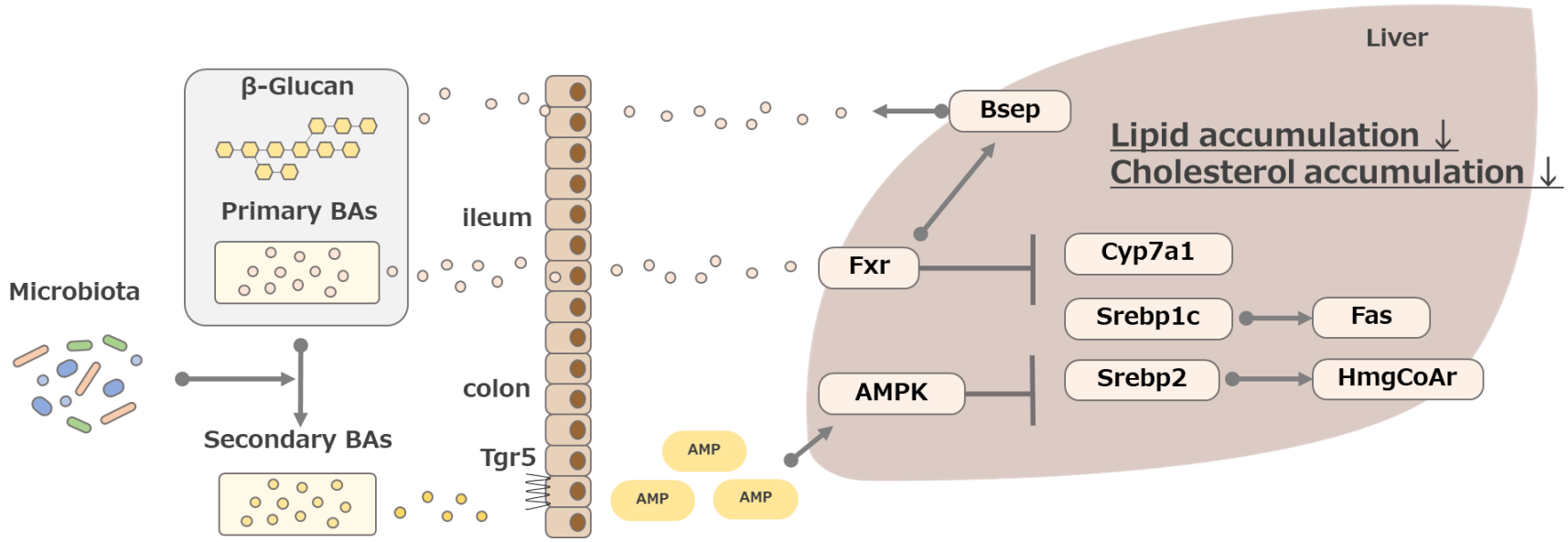
Figure 6-1～6-2

Figure 6-1



大麦の摂取による短鎖脂肪酸を介した耐糖能改善作用のメカニズム

Figure 6-2



大麦の摂取による胆汁酸を介した脂質代謝改善作用のメカニズム

第 8 章：謝辞

本博士論文をまとめるに当り、研修生時代を含めて 5 年半の間、終始適切な助言、ご指導、ご鞭撻を賜ると共に本日に至るまで温かくご支援くださいました青江誠一郎教授に心より御礼申し上げます。また副指導教員としてご指導いただきました高波嘉一教授、田中直子教授、授業や中間報告会など様々な場において温かくご指導ご鞭撻いただきました本学の先生方に心より感謝いたします。

大妻女子大学人間生活文化研究所研究員の山中千恵美様には実験指導や博士論文を初めとするあらゆる場面において丁寧なご指導と貴重な助言、細やかな気配りに助けて頂きました。心より感謝申し上げます。

大学院での研究生活を送るに当って、本研究室の代古遥助手、黒坂悠紀助手には実験動物解剖や実験において多岐に渡り補助して頂き大変お世話になりました。本研究室の卒論生の皆さんとも楽しい 5 年間を過ごすことが出来ました。改めて心より感謝申し上げます。

大学院の後輩である大竹那実様、小川玲奈様、蓼沼夏希様には実験指導や実験方法についての議論、また研究室での談義など様々な場面で大変お世話になりました。心より感謝いたします。

株式会社はくばく開発部の金子真吾部長、小林敏樹参事、研究開発課の松岡翼課長には私が本学の院生として出向するに当り、事務的な手続きから研究内容に対する適切な助言など多岐にわたり補助して頂きました。またこのような機会を頂いた代表取締役の長澤重俊社長に深く御礼申し上げます。

最後に、博士後期課程に進学するという私の気持ちを一番尊重してくれた妻と子供達、ならびに常に切磋琢磨しながら研究を共に進めた大学院の同期の皆様方、友人、両親に深く感謝申し上げます。

大妻女子大学大学院　人間文化研究科　人間生活科学専攻
栄養学研究室
三尾　建斗

令和 5 年　1 月 16 日

第 9 章：参考文献

1. Iichiro S, Yuuji M. メタボリックシンドローム 病態の分子生物学（The frontiers in medical sciences）. 南山堂 2005;
2. Yasushi S. Adipo science. フジメディカル出版 2005;2:39–44.
3. 令和元年 国民健康・栄養調査報告. Minist Heal Labour Welf 2020;
4. Carlos S, De La Fuente-Arrillaga C, Bes-Rastrollo M, Razquin C, Rico-Campà A, Martínez-González M, Ruiz-Canela M. Mediterranean Diet and Health Outcomes in the SUN Cohort. Nutrients [Internet] 2018;10:439. Available from: https://www.mdpi.com/2072-6643/10/4/439
5. Manheimer EW, van Zuuren EJ, Fedorowicz Z, Pijl H. Paleolithic nutrition for metabolic syndrome: systematic review and meta-analysis. Am J Clin Nutr [Internet] 2015;102:922–32. Available from: https://academic.oup.com/ajcn/article/102/4/922/4564680
6. Willems AEM, Sura–de Jong M, van Beek AP, Nederhof E, van Dijk G. Effects of macronutrient intake in obesity: a meta-analysis of low-carbohydrate and low-fat diets on markers of the metabolic syndrome. Nutr Rev [Internet] 2021;79:429–44. Available from: https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/79/4/429/5901338
7. Reynolds A, Mann J, Cummings J, Winter N, Mete E, Te Morenga L. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. Lancet [Internet] 2019;393:434–45. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618318099
8. Afshin A, Sur PJ, Fay KA, Cornaby L, Ferrara G, Salama JS, Mullany EC, Abate KH, Abbafati C, Abebe Z, et al. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet Lancet Publishing Group; 2019;393:1958–72.
9. Schulze MB, Schulz M, Heidemann C, Schienkiewitz A, Hoffmann K, Boeing H. Fiber and Magnesium Intake and Incidence of Type 2 Diabetes. Arch Intern Med [Internet] 2007;167:956. Available from: http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.167.9.956
10. Henrion M, Francey C, Lê K-A, Lamothe L. Cereal B-Glucans: The Impact of Processing and How It Affects Physiological Responses. Nutrients [Internet] 2019;11:1729. Available from: https://www.mdpi.com/2072-6643/11/8/1729
11. El Khoury D, Cuda C, Luhovyy BL, Anderson GH. Beta Glucan: Health Benefits in Obesity and Metabolic Syndrome. J Nutr Metab [Internet] 2012;2012:1–28.

Available from: http://www.hindawi.com/journals/jnme/2012/851362/

12. De Angelis M, Montemurno E, Vannini L, Cosola C, Cavallo N, Gozzi G, Maranzano V, Di Cagno R, Gobbetti M, Gesualdo L. Effect of Whole-Grain Barley on the Human Fecal Microbiota and Metabolome. Björkroth J, editor. Appl Environ Microbiol [Internet] 2015;81:7945–56. Available from: http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02507-15
13. Zhong Y, Marungruang N, Fåk F, Nyman M. Effects of two whole-grain barley varieties on caecal SCFA, gut microbiota and plasma inflammatory markers in rats consuming low- and high-fat diets. Br J Nutr 2015;113:1558–70.
14. Aoe S, Mio K, Yamanaka C, Kuge T. Low Molecular Weight Barley ß-Glucan Affects Glucose and Lipid Metabolism by Prebiotic Effects. Nutrients [Internet] 2020;13:130. Available from: https://www.mdpi.com/2072-6643/13/1/130
15. Jovanovski E, Nguyen M, Kurahashi Y, Komishon A, Li D, Hoang Vi Thanh H, Khayyat R, Jenkins AL, Khan TA, Zurbau A, et al. Are all fibres created equal with respect to lipid lowering? Comparing the effect of viscous dietary fibre to non-viscous fibre from cereal sources: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. Br J Nutr [Internet] 2022;1–13. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114522002355/type/journal_article
16. Topping DL, Clifton PM. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. Physiol Rev [Internet] 2001;81:1031–64. Available from: https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2001.81.3.1031
17. Aoe S, Yamanaka C, Fuwa M, Tamiya T, Nakayama Y, Miyoshi T, Kitazono E. Effects of BARLEYmax and high-ß-glucan barley line on short-chain fatty acids production and microbiota from the cecum to the distal colon in rats. Blachier F, editor. PLoS One [Internet] 2019;14:e0218118. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0218118
18. Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, Igarashi M. Free fatty acid receptors in health and disease. Physiol Rev American Physiological Society; 2020;100:171–210.
19. Kim M, Friesen L, Park J, Kim HM, Kim CH. Microbial metabolites, short-chain fatty acids, restrain tissue bacterial load, chronic inflammation, and associated cancer in the colon of mice. Eur J Immunol Wiley-VCH Verlag; 2018;48:1235–47.
20. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K,

Kashihara D, Hirano K, Tani T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. Nat Commun 2013;4.

21. Suzuki S, Aoe S. High β-Glucan Barley Supplementation Improves Glucose Tolerance by Increasing GLP-1 Secretion in Diet-Induced Obesity Mice. Nutrients [Internet] 2021;13:527. Available from: https://www.mdpi.com/2072-6643/13/2/527

22. Miyamoto J, Watanabe K, Taira S, Kasubuchi M, Li X, Irie J, Itoh H, Kimura I. Barley β-glucan improves metabolic condition via short-chain fatty acids produced by gut microbial fermentation in high fat diet fed mice. PLoS One Public Library of Science; 2018;13.

23. Mio K, Yamanaka C, Matsuoka T, Kobayashi T, Aoe S. Effects of β-glucan Rich Barley Flour on Glucose and Lipid Metabolism in the Ileum, Liver, and Adipose Tissues of High-Fat Diet Induced-Obesity Model Male Mice Analyzed by DNA Microarray. Nutrients [Internet] 2020;12:3546. Available from: https://www.mdpi.com/2072-6643/12/11/3546

24. Sasaki T, Watanabe Y, Kuboyama A, Oikawa A, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. Muscle-specific TGR5 overexpression improves glucose clearance in glucose-intolerant mice. J Biol Chem [Internet] 2021;296:100131. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820001234

25. Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, Mataki C, Sato H, Tanigawara Y, Schoonjans K, et al. Lowering Bile Acid Pool Size with a Synthetic Farnesoid X Receptor (FXR) Agonist Induces Obesity and Diabetes through Reduced Energy Expenditure. J Biol Chem [Internet] 2011;286:26913–20. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819485086

26. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). Biochem Biophys Res Commun [Internet] 2002;298:714–9. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X02025500

27. Lundbaek K. Intravenous Glucose Tolerance as a Tool in Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus. BMJ [Internet] 1962;1:1507–13. Available from: https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.1.5291.1507

28. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. Nature [Internet] 2013;500:232–6.

Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842501

29. Mio K, Yamanaka C, Ichinose Y, Kohyama N, Yanagisawa T, Aoe S. Effects of barley ß-glucan with various molecular weights partially hydrolyzed by endogenous ß-glucanase on glucose tolerance and lipid metabolism in mice. Cereal Chem Wiley-Blackwell; 2020;97:1056–65.

30. Hooda S, Matte JJ, Vasanthan T, Zijlstra RT. Dietary Oat ß-Glucan Reduces Peak Net Glucose Flux and Insulin Production and Modulates Plasma Incretin in Portal-Vein Catheterized Grower Pigs. J Nutr [Internet] 2010;140:1564–9. Available from: https://academic.oup.com/jn/article/140/9/1564/4600227

31. Müller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, Fritsche A, Gribble F, Grill HJ, Habener JF, et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). Mol Metab [Internet] 2019;30:72–130. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877819309135

32. Laurindo LF, Barbalho SM, Guiguer EL, da Silva Soares de Souza M, de Souza GA, Fidalgo TM, Araújo AC, de Souza Gonzaga HF, de Bortoli Teixeira D, de Oliveira Silva Ullmann T, et al. GLP-1a: Going beyond Traditional Use. Int J Mol Sci [Internet] 2022;23:739. Available from: https://www.mdpi.com/1422-0067/23/2/739

33. Psichas A, Sleeth ML, Murphy KG, Brooks L, Bewick GA, Hanyaloglu AC, Ghatei MA, Bloom SR, Frost G. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. Int J Obes [Internet] 2015;39:424–9. Available from: http://www.nature.com/articles/ijo2014153

34. Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiya H, Iwanaga T, Furness JB, Kuwahara A. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. Cell Tissue Res [Internet] 2006;324:353–60. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00441-005-0140-x

35. Schmidt J, Smith NJ, Christiansen E, Tikhonova IG, Grundmann M, Hudson BD, Ward RJ, Drewke C, Milligan G, Kostenis E, et al. Selective Orthosteric Free Fatty Acid Receptor 2 (FFA2) Agonists. J Biol Chem [Internet] 2011;286:10628–40. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820538866

36. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael J-Y, Lannoy V, Decobecq M-E, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, et al. Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. J Biol Chem [Internet] 2003;278:25481–9. Available from:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819750613

37. Holst JJ. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. Physiol Rev [Internet] 2007;87:1409–39. Available from: https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00034.2006

38. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, Cameron J, Grosse J, Reimann F, Gribble FM. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. Diabetes 2012;61:364–71.

39. Ducastel S, Touche V, Trabelsi MS, Boulinguiez A, Butruille L, Nawrot M, Peschard S, Chávez-Talavera O, Dorchies E, Vallez E, et al. The nuclear receptor FXR inhibits Glucagon-Like Peptide-1 secretion in response to microbiota-derived Short-Chain Fatty Acids. Sci Rep Nature Research; 2020;10.

40. Horiuchi H, Kamikado K, Aoki R, Suganuma N, Nishijima T, Nakatani A, Kimura I. Bifidobacterium animalis subsp. lactis GCL2505 modulates host energy metabolism via the short-chain fatty acid receptor GPR43. Sci Rep [Internet] 2020;10:4158. Available from: http://www.nature.com/articles/s41598-020-60984-6

41. Liu L, Fu C, Li F. Acetate Affects the Process of Lipid Metabolism in Rabbit Liver, Skeletal Muscle and Adipose Tissue. Animals [Internet] 2019;9:799. Available from: https://www.mdpi.com/2076-2615/9/10/799

42. Hosseini E, Grootaert C, Verstraete W, Van de Wiele T. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. Nutr Rev [Internet] 2011;69:245–58. Available from: https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.2011.00388.x

43. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. Front Immunol [Internet] 2019;10. Available from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00277/full

44. Wood PJ, Weisz J, Fedec P, Burrows VD. Large-scale preparation and properties of oat fractions enriched in β-glucan. Cereal Chemistry. 1989. p. 97–103.

45. Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K. Sensitive Quantitative Detection of Commensal Bacteria by rRNA-Targeted Reverse Transcription-PCR. Appl Environ Microbiol [Internet] 2007;73:6695–6695. Available from: https://aem.asm.org/content/73/20/6695

46. Yao H, Wang Y, Yin J, Nie S, Xie M. Isolation, Physicochemical Properties, and Structural Characteristics of Arabinoxylan from Hull-Less Barley. Molecules [Internet] 2021;26:3026. Available from: https://www.mdpi.com/1420-3049/26/10/3026
47. Lafond D, Greaves K, Maki K, Leidy H, Romsos D. Effects of Two Dietary Fibers as Part of Ready-to-Eat Cereal (RTEC) Breakfasts on Perceived Appetite and Gut Hormones in Overweight Women. Nutrients [Internet] 2015;7:1245–66. Available from: http://www.mdpi.com/2072-6643/7/2/1245
48. Pluschke AM, Williams BA, Zhang D, Anderson ST, Roura E, Gidley MJ. Male grower pigs fed cereal soluble dietary fibres display biphasic glucose response and delayed glycaemic response after an oral glucose tolerance test. Óvilo C, editor. PLoS One [Internet] 2018;13:e0193137. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0193137
49. De Silva A, Salem V, Long CJ, Makwana A, Newbould RD, Rabiner EA, Ghatei MA, Bloom SR, Matthews PM, Beaver JD, et al. The Gut Hormones PYY3-36 and GLP-17-36 amide Reduce Food Intake and Modulate Brain Activity in Appetite Centers in Humans. Cell Metab [Internet] 2011;14:700–6. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413111003561
50. Ivarsson E, Roos S, Liu HY, Lindberg JE. Fermentable non-starch polysaccharides increases the abundance of Bacteroides–Prevotella–Porphyromonas in ileal microbial community of growing pigs. Animal [Internet] 2014;8:1777–87. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751731114001827
51. Williams BA, Mikkelsen D, le Paih L, Gidley MJ. In vitro fermentation kinetics and end-products of cereal arabinoxylans and (1,3;1,4)-β-glucans by porcine faeces. J Cereal Sci [Internet] 2011;53:53–8. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521010001712
52. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. FEMS Microbiol Lett [Internet] 2009;294:1–8. Available from: https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x
53. Walter J. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. Appl Environ Microbiol [Internet] 2008;74:4985–96. Available from: https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00753-08

54. Li S, Sun Y, Hu X, Qin W, Li C, Liu Y, Liu A, Zhao Y, Wu D, Lin D, et al. Effect of arabinoxylan on colonic bacterial metabolites and mucosal barrier in high - fat diet - induced rats. Food Sci Nutr [Internet] 2019;7:3052–61. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fsn3.1164

55. Hughes SA, Shewry PR, Li L, Gibson GR, Sanz ML, Rastall RA. In Vitro Fermentation by Human Fecal Microflora of Wheat Arabinoxylans. J Agric Food Chem [Internet] 2007;55:4589–95. Available from: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf070293g

56. Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Griffiths C, Krzeminska K, Lawrie JA, Bennett CM, Goff D V, Sarson DL, Bloom SR. Slow release dietary carbohydrate improves second meal tolerance. Am J Clin Nutr [Internet] 1982;35:1339–46. Available from: https://academic.oup.com/ajcn/article/35/6/1339/4693290

57. Aoe S. Physiological Function of Dietary Fiber in Rice Bran. J Brew Soc Japan [Internet] 1994;89:48–52. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jbrewsocjapan1988/89/1/89_1_48/_article

58. Lee SC, Rodriguez F, Storey M, Farmakalidis E, Prosky L. Determination of Soluble and Insoluble Dietary Fiber in Psyllium-Containing Cereal Products. J AOAC Int [Internet] 1995;78:724–9. Available from: https://academic.oup.com/jaoac/article/78/3/724-729/5685630

59. Palazoglu M, Fiehn O. Metabolite identification in blood plasma using GC/MS and the Agilent Fiehn GC/MS metabolomics RTL library. Agil Appl Note 2009, 5990–3638 2009;

60. Würsch P, Pi-Sunyer FX. The Role of Viscous Soluble Fiber in the Metabolic Control of Diabetes: A review with special emphasis on cereals rich in ß-glucan. Diabetes Care [Internet] 1997;20:1774–80. Available from: https://diabetesjournals.org/care/article/20/11/1774/21167/The-Role-of-Viscous-Soluble-Fiber-in-the-Metabolic

61. Regand A, Tosh SM, Wolever TMS, Wood PJ. Physicochemical Properties of ß-Glucan in Differently Processed Oat Foods Influence Glycemic Response. J Agric Food Chem [Internet] 2009;57:8831–8. Available from: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf901271v

62. Kwong MGY, Wolever TMS, Brummer Y, Tosh SM. Increasing the viscosity of oat ß-glucan beverages by reducing solution volume does not reduce glycaemic responses. Br J Nutr [Internet] 2013;110:1465–71. Available from:

https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S000711451300069X/type/journal_article

63. Kamata N, Tsunoda C, Aoe S. Effect of beverage containing barley beta-glucan syrup on postprandial glucose response and its second-meal effect - A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. Japanese Pharmacol Ther 2016;44:1581–7.

64. Boll EVJ, Ekström LMNK, Courtin CM, Delcour JA, Nilsson AC, Björck IME, Östman EM. Effects of wheat bran extract rich in arabinoxylan oligosaccharides and resistant starch on overnight glucose tolerance and markers of gut fermentation in healthy young adults. Eur J Nutr [Internet] 2016;55:1661–70. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00394-015-0985-z

65. Nilsson AC, Johansson-Boll E V., Björck IME. Increased gut hormones and insulin sensitivity index following a 3-d intervention with a barley kernel-based product: a randomised cross-over study in healthy middle-aged subjects. Br J Nutr [Internet] 2015;114:899–907. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114515002524/type/journal_article

66. Gu C, Stein GH, Pan N, Goebbels S, Hörnberg H, Nave K-A, Herrera P, White P, Kaestner KH, Sussel L, et al. Pancreatic β Cells Require NeuroD to Achieve and Maintain Functional Maturity. Cell Metab [Internet] 2010;11:298–310. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413110000768

67. Jenny M. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. EMBO J [Internet] 2002;21:6338–47. Available from: http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/cdf649

68. Drozdowski LA, Reimer RA, Temelli F, Bell RC, Vasanthan T, Thomson ABR. β-Glucan extracts inhibit the in vitro intestinal uptake of long-chain fatty acids and cholesterol and down-regulate genes involved in lipogenesis and lipid transport in rats☆. J Nutr Biochem [Internet] 2010;21:695–701. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286309000862

69. Souza da Silva C, Bolhuis JE, Gerrits WJJ, Kemp B, van den Borne JJGC. Effects of dietary fibers with different fermentation characteristics on feeding motivation in adult female pigs. Physiol Behav [Internet] 2013;110–111:148–57. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938413000115

70. Zannini E, Bravo Núñez Á, Sahin AW, Arendt EK. Arabinoxylans as Functional

Food Ingredients: A Review. Foods [Internet] 2022;11:1026. Available from: https://www.mdpi.com/2304-8158/11/7/1026

71. Nakashima A, Yamada K, Iwata O, Sugimoto R, Atsuji K, Ogawa T, Ishibashi-Ohgo N, Suzuki K. β-Glucan in Foods and Its Physiological Functions. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2018;64:8–17.

72. Kato M, Ikegami S, Aoe S. Effect of high-beta;-glucan Barley on Adipose Tissue Inflammation and the Development of Arteriosclerosis in Spontaneously ApoE-deficient Mice. Japanese J Nutr Diet [Internet] 2013;71:196–203. Available from: http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/eiyogakuzashi/71.196?lang=en&from=CrossRef&type=abstract

73. Kakiyama G, Muto A, Takei H, Nittono H, Murai T, Kurosawa T, Hofmann AF, Pandak WM, Bajaj JS. A simple and accurate HPLC method for fecal bile acid profile in healthy and cirrhotic subjects: Validation by GC-MS and LC-MS. J Lipid Res American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2014;55:978–90.

74. Li J, Dawson PA. Animal models to study bile acid metabolism. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet] 2019;1865:895–911. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443918301819

75. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall H-U, Bamberg K, Angelin B, Hyötyläinen T, Orešič M, Bäckhed F. Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. Cell Metab [Internet] 2013;17:225–35. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413113000119

76. Hofmann AF. Detoxification of Lithocholic Acid, A Toxic Bile Acid: Relevance to Drug Hepatotoxicity. Drug Metab Rev [Internet] 2004;36:703–22. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/DMR-200033475

77. Kuno T, Hirayama-Kurogi M, Ito S, Ohtsuki S. Reduction in hepatic secondary bile acids caused by short-term antibiotic-induced dysbiosis decreases mouse serum glucose and triglyceride levels. Sci Rep [Internet] 2018;8:1253. Available from: http://www.nature.com/articles/s41598-018-19545-1

78. Delaney B, Nicolosi RJ, Wilson TA, Carlson T, Frazer S, Zheng G-H, Hess R, Ostergren K, Haworth J, Knutson N. β-Glucan Fractions from Barley and Oats Are Similarly Antiatherogenic in Hypercholesterolemic Syrian Golden Hamsters. J Nutr [Internet] 2003;133:468–75. Available from: https://academic.oup.com/jn/article/133/2/468/4687915

79. Immerstrand T, Andersson KE, Wange C, Rascon A, Hellstrand P, Nyman M, Cui SW, Bergenståhl B, Trägårdh C, Öste R. Effects of oat bran, processed to different molecular weights of ß-glucan, on plasma lipids and caecal formation of SCFA in mice. Br J Nutr [Internet] 2010;104:364–73. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114510000553/type/journal_article

80. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, et al. A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids. J Biol Chem [Internet] 2003;278:9435–40. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819713234

81. Zheng C, Zhou W, Wang T, You P, Zhao Y, Yang Y, Wang X, Luo J, Chen Y, Liu M, et al. A Novel TGR5 Activator WB403 Promotes GLP-1 Secretion and Preserves Pancreatic ß-Cells in Type 2 Diabetic Mice. Wagner B, editor. PLoS One [Internet] 2015;10:e0134051. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0134051

82. Tang T, Song J, Li J, Wang H, Zhang Y, Suo H. A synbiotic consisting of Lactobacillus plantarum S58 and hull-less barley ß-glucan ameliorates lipid accumulation in mice fed with a high-fat diet by activating AMPK signaling and modulating the gut microbiota. Carbohydr Polym [Internet] 2020;243:116398. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861720305725

83. Deng N, He Z, Guo R, Zheng B, Li T, Liu RH. Highland Barley Whole Grain (Hordeum vulgare L.) Ameliorates Hyperlipidemia by Modulating Cecal Microbiota, miRNAs, and AMPK Pathways in Leptin Receptor-Deficient db/db Mice. J Agric Food Chem [Internet] 2020;68:11735–46. Available from: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c04780

84. Ogawa Y, Miyoshi C, Obana N, Yajima K, Hotta-Hirashima N, Ikkyu A, Kanno S, Soga T, Fukuda S, Yanagisawa M. Gut microbiota depletion by chronic antibiotic treatment alters the sleep/wake architecture and sleep EEG power spectra in mice. Sci Rep [Internet] 2020;10:19554. Available from: http://www.nature.com/articles/s41598-020-76562-9

85. Li T, Chiang JYL. Bile Acid Signaling in Metabolic Disease and Drug Therapy. Ma Q, editor. Pharmacol Rev [Internet] 2014;66:948–83. Available from: http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.113.008201

86. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Mataki C, Pruzanski M, et al. TGR5-Mediated Bile Acid Sensing

Controls Glucose Homeostasis. Cell Metab [Internet] 2009;10:167–77. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413109002307

87. Zhai Z, Niu K, Liu H, Lin C, Tu Y, Liu Y, Cai L, Ouyang K, Liu J. Policosanol alleviates hepatic lipid accumulation by regulating bile acids metabolism in C57BL6/mice through AMPK–FXR–TGR5 cross - talk. J Food Sci [Internet] 2021;86:5466–78. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.15951

88. Ikeda Y, Sato K, Pimentel DR, Sam F, Shaw RJ, Dyck JRB, Walsh K. Cardiac-specific Deletion of LKB1 Leads to Hypertrophy and Dysfunction. J Biol Chem [Internet] 2009;284:35839–49. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820375487

89. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo S-H, Bardeesy N, DePinho RA, Montminy M, Cantley LC. The Kinase LKB1 Mediates Glucose Homeostasis in Liver and Therapeutic Effects of Metformin. Science (80-) [Internet] 2005;310:1642–6. Available from: https://www.science.org/doi/10.1126/science.1120781

90. Marcelo KL, Means AR, York B. The Ca 2+ /Calmodulin/CaMKK2 Axis: Nature's Metabolic CaMshaft. Trends Endocrinol Metab [Internet] 2016;27:706–18. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276016300625

91. Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. The Ca2+/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinases Are AMP-activated Protein Kinase Kinases. J Biol Chem [Internet] 2005;280:29060–6. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820564673

92. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. Biochimie [Internet] 2004;86:839–48. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908404001658

93. Carling D, Zammit VA, Hardie DG. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. FEBS Lett [Internet] 1987;223:217–22. Available from: http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2887%2980292-2

94. MUNDAY MR, CAMPBELL DG, CARLING D, HARDIE DG. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. Eur J Biochem [Internet] 1988;175:331–8. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14201.x