

プロバイオティクスを用いた腸内ポリアミン 濃度コントロールによる寿命伸長効果

松本 光晴

はじめに

ヒト大腸内に棲息する腸内常在菌は1000種類以上、糞便1gあたり約 10^{12} 個存在し、宿主の健康に強く関与していると考えられている。腸内常在菌と健康の関連性を調べるにあたり、長年、菌種構成を調べるアプローチが盛んに行われてきた。特に、1990年代後半より盛んに実施されている16S rRNA遺伝子を用いた系統分類学的解析は腸内常在菌の構造的複雑性（大部分を占める難培養性細菌の存在と個体差の大きさ）を明らかにし、それまで一般的であった「善玉菌 vs. 悪玉菌」「腸内菌叢の改善 = *Bifidobacterium* の増加」という図式を描くことさえ困難にした。近年の次世代型シーケンサーの導入は腸内常在菌の構造的複雑性をさらに深掘りした形で我々に再認識させる結果になっている。また、メタゲノム解析により遺伝子情報の組成や機能を解析できる時代に突入したが、全ゲノム情報が得られない難培養性細菌の存在を含めた解釈は困難であり課題は多い。

一方で、腸管内には腸内常在菌の産生する代謝産物も存在し、その重要性は多くの研究者が認識している。腸内細菌の代謝産物が宿主に与える影響はMitsuokaが1969年に提案した腸内常在菌と健康との関連性の仮説にて具体化されている¹⁾。この内容は、構成菌種に関しては大幅に修正が必要であるが、40年を経過したにも関わらずその他の大部分は現在でも十分に通用する。これはMitsuoka仮説が正しいことが最大の理由であるが、一方で、代謝産物の研究がほとんど進展しておらず、新規物質やネットワークが提案されなかった面を露呈している。

本稿では、おそらく数百種類以上は存在すると推測される腸内常在菌の代謝産物の中から、もっとも健康増進に関連が深い物質の一つとしてポリアミン（PA）に着目し実施してきた研究から、寿命伸長効果について紹介する。

腸内常在菌の代謝産物と健康

さまざまな疾病や現象を腸内常在菌に依存する事象と代謝産物に依存している事象とにわけて示したところ、

代謝産物の影響を受けていると考えられる項目が多いことに気づく(図1)。すなわち、腸内常在菌が間接的な要因として、その代謝産物が直接的な要因として宿主の健康に影響を与えている流れが見えてくる。腸内常在菌が腸上皮細胞などのToll様受容体に認識されること²⁾などから、腸内常在菌が直接的に免疫系を刺激していると考えられているが、厚い腸管粘液層が上皮細胞層を覆っていることを考慮すると、その頻度は決して高いとは言えないであろう。ただし、乳幼児期の腸管組織が未発達な時は、腸内常在菌が直接的に免疫系を刺激していることは否定できない。一方、低分子の代謝産物は粘液層に浸透し、腸上皮細胞や粘膜固有層内の免疫担当細胞、さらには血中に移行し全身の細胞にも影響を与えるため、生体への影響はきわめて大きいと考えられる。

そもそも腸管内にはどのような成分が存在するのか？筆者らは、できるだけ多くの代謝産物を一斉に分析するため、キャピラリー電気泳動（CE）と飛行時間型質量分析装置（TOF-MS）を組み合わせたメタボローム解析を実施した。CE-TOF MSは、腸管内に多量に存在する考えられる水溶性・イオン性の高い代謝分子の測定において高い分離能と定量性をもつ。これら分子の測定に比較的相性の悪いLC-MSやGC-MSより適しており、また、NMRと比べるとより高感度な測定が可能である。

同腹の無菌（GF：germ-free）マウスと生後4週目に人為的に菌叢を定着させた（Ex-GF）マウスを比較する

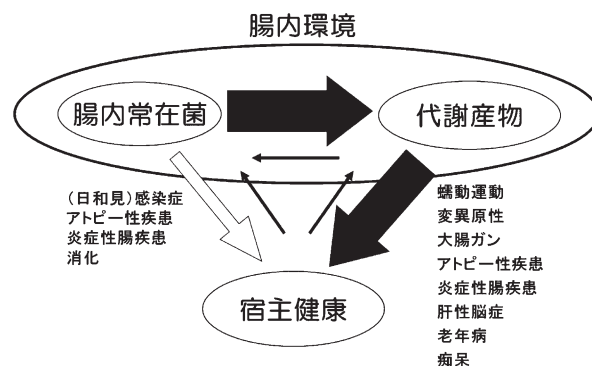


図1. 腸内細菌叢、代謝産物および宿主の健康の関係。腸内細菌が間接的に、腸内菌叢の産生する代謝産物が直接的に宿主に影響を与える流れが見えてくる（黒太矢印）。

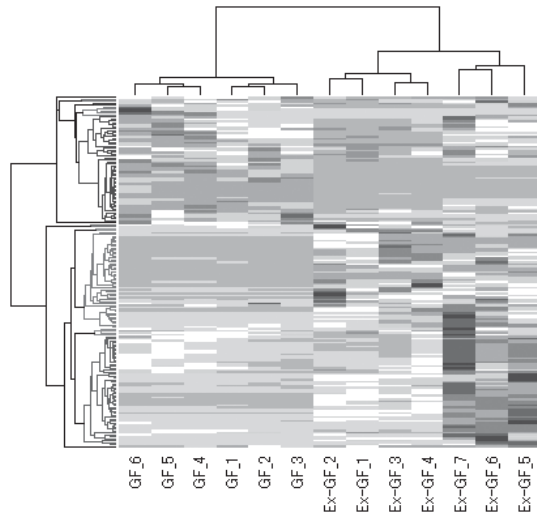


図2. 無菌マウスと通常菌叢定着マウスの大腸内容物メタボロームプロファイル (階層型クラスタリング)。

ことで腸内常在菌の代謝産物を調べた³⁾。それぞれの群で2匹の母胎から得られた雄個体(3-4匹)を無菌環境下で飼育し、7週目に開腹して得られた大腸内容物を試料として用いた。その結果、大腸内容物抽出液から179個の候補化合物をもつピークを検出した。この中には、アミノ酸、有機酸、核酸、短鎖脂肪酸、糖誘導体、ペプチドなど多様な代謝産物が含まれており、一般的なマウスおよび微生物の代謝経路上には存在が確認されていないものも含まれていた。大腸内容物抽出液における代謝プロファイルと比較すると(図2)、GF群とEx-GF群で大きく異なるパターンであることが確認された。GF群での検出量が多かった46成分は、腸内常在菌が吸収・消費する、あるいは腸内常在菌の作用で生体への吸収が促進されるものであり、この中には一部のアミノ酸(Pro, Thr, Asn, Arg)とペプチドなどが多く含まれていた。反対にEx-GF群での検出量が多かった77成分は、腸内常在菌により産生されている可能性が高い成分であり、従来、腸内常在菌により産生されることが知られている短鎖脂肪酸の他に本稿の主役であるポリアミンなどのアミン類が含まれていた。また、この解析にて結腸内での存在が初めて確認された成分が多量に存在する(個々の成分は原文参照³⁾)。が、これらの中には、大腸上皮細胞へ直接的刺激を与えている成分も少なくないであろう。今後、これらの研究が腸内常在菌-宿主間クロストークに関わる新たな作用機序や新規マーカーの発見へとつながることに期待する。

ポリアミン

筆者らは、多くの代謝産物の内、もっとも健康増進に

関連が深い物質の一つとして、加齢に伴い多くの組織中含量が減少するポリアミン(PA)⁴⁾に着目してきた。PAは低分子の塩基性物質であり、プトレッシン(PUT)、スペルミジン(SPD)、スペルミン(SPM)などの総称である。核酸の合成や安定化、細胞の増殖や分化など多方面の生命現象に関連している⁵⁾。食事由来PAはほとんどが小腸上部で吸収され⁶⁾、消化管下部のPUTおよびSPMのほとんどは腸内細菌由来であり³⁾、ヒトでは高齢者型腸内菌叢が形成されると腸内PA濃度が低下することが知られている⁷⁾。炎症との関連は深く、マクロファージなどからの炎症性サイトカインの分泌を抑制し炎症を抑える⁸⁾。ヘルパーT細胞に対しても作用し、スギ花粉症患者の末梢血単核球をConA刺激条件下でSPMを添加し培養したところ、1および10 μM(血中のSPM濃度とほぼ同等レベル)の添加でIL-4およびIL-10の産生量が無添加時と比較して減少することが認められた⁹⁾。腸管バリア機能に関しては、腸上皮細胞からの粘液やsIgAの分泌促進¹⁰⁾、粘膜の修復¹¹⁾、Tight junctionの接着因子¹²⁾の合成を誘導する。また、抗変異原性や酸素ストレスからの保護作用も知られている¹³⁾。SPDによるオートファジー誘導が酵母、線虫、ショウジョウバエなどの寿命延長作用を示すことが報告されている¹⁴⁾。最近、SPMの異常メチル化抑制作用が老化予防に関与しているとの報告も得られている¹⁵⁾。

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* LKM512

プロバイオティクスLKM512は耐酸性が強く¹⁶⁾、ヒト腸管粘液への接着性も高い菌株である¹⁷⁾。ヒト試験では、LKM512含有ヨーグルト(10⁷ cfu/g)の2週間摂取(100 g/day)で、ほとんどの被験者で10⁹⁻¹¹/g of wet fecesレベルまで増殖し¹⁸⁾、その影響で腸内菌叢は大きく変動し腸管内PA濃度が上昇することが認められている^{19,20)}。すでにヒトを対象とした研究で、LKM512含有ヨーグルトの摂取にて、高齢者の炎症抑制および大腸内変異原活性の低下²¹⁾、健康成人の大腸内変異原活性の低下²²⁾、成人型アトピー性皮膚炎患者の症状改善効果²⁰⁾などが確認されている。

LKM512投与によるマウスの寿命延長効果²³⁾

メチニコフがヨーグルト不老長寿説²⁴⁾を唱えて100年以上経過したが、ヨーグルトあるいはプロバイオティクスの寿命延長効果を検証し国際的査読ジャーナルに発表された例はなかった。疫学的調査では、加齢に伴い炎症性サイトカインが増加し慢性炎症状態に陥り、それが引き金となりアルツハイマー病や2型糖尿病などの老年病

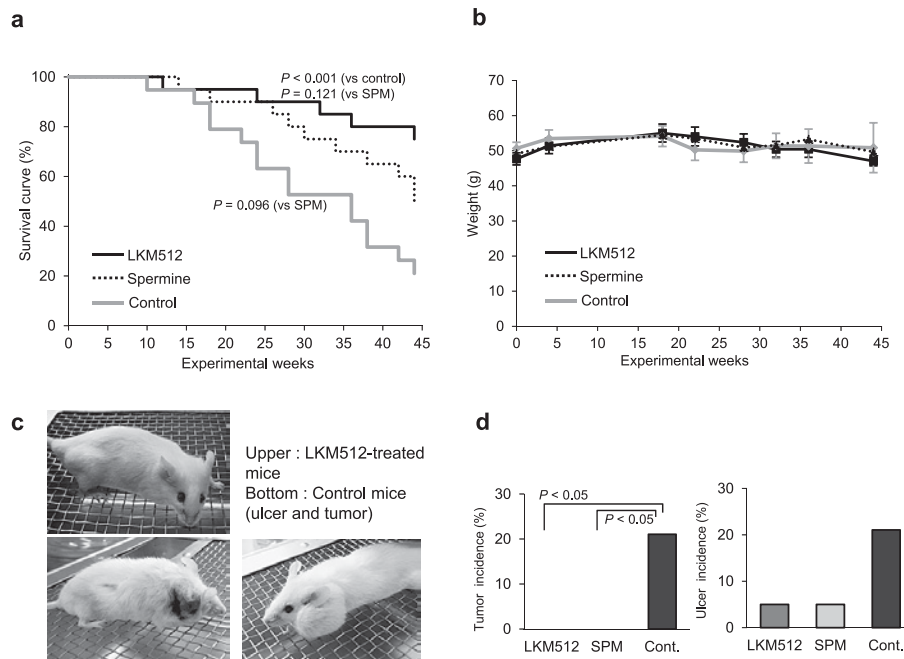


図3. LKM512およびスベルミンの経口投与がマウス寿命および外観に与えた影響. a. 生存曲線, b. 体重変動, c. マウス外観, d. 腫瘍および潰瘍の発生頻度.

が発症することが明らかにされ²⁵⁾, 慢性炎症を抑えることが健康寿命の延伸に最も有効な手段の一つであると考えられる²⁶⁾. そこで, 筆者らは, これまでの研究成果から, 腸内ポリアミン濃度コントロールで寿命伸長が期待できると考えた. すなわち, 「プロバイオティクス(LKM512)を用いてPAを継続的に産生する腸内菌叢を形成することで, ①腸管バリア機能を高い状態で維持し炎症原因物質の体内への侵入機会を減少, ②腸管粘膜固有層および全身性免疫の炎症反応の抑制を誘導し, 慢性炎症を軽減, ③さらに強い抗変異原性や抗酸化効果も働き, 寿命が伸長する」と仮説を立てた.

実験方法と寿命伸長効果²³⁾ 雌性ICRリタイアマウス(繁殖以外は何の実験にも使用されていない)を日本チャールズリバーより購入し10か月齢までの予備飼育後, LKM512 (10^9 cfu/kg/dose)投与群 ($n = 20$), SPM(最も活性の強いPA) (3 mg/kg/dose)投与群 ($n = 20$) および生理的リン酸バッファー(PBS)投与(対照)群 ($n = 19$)に分けて, それぞれ11か月間投与した(3回/週)(LKM512およびSPMはPBSに懸濁および溶解して投与). その結果, LKM512群で明らかな寿命の伸長が認められた(図3a). 食事のカロリー制限により寿命が伸びることが多くの生物で確認されているが, 本実験は, 自由摂取で実施し, かつ体重に差もなかった(図3b)ことから, カロリー制限時と異なるメカニズムで寿命延伸効果が認められたことを示している. 外見にも

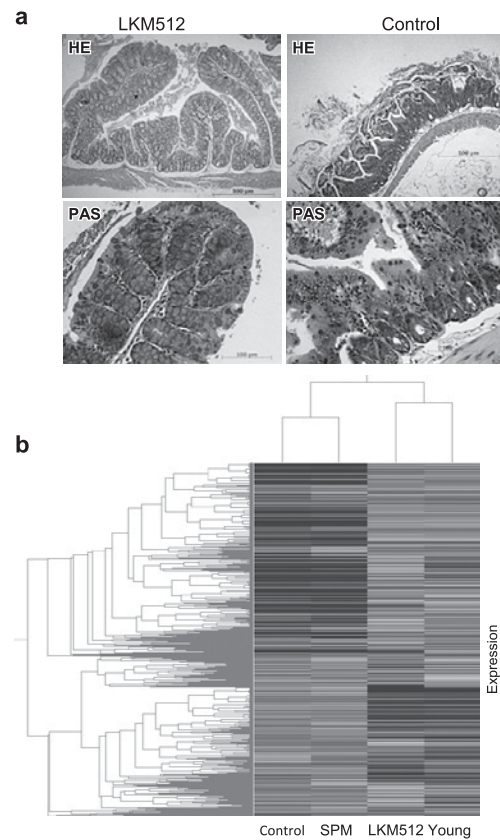


図4. LKM512経口投与による腸のアンチエイジング. a. 結腸切片(上段: HE染色, 下段: PAS染色). 対照群マウスの写真は半数の個体から検出された黒ずんだ結腸の切片, b. 結腸DNAマイクロアレイ結果. LKM512を投与することで老化に伴う遺伝子発現パターンの変動を抑制した.

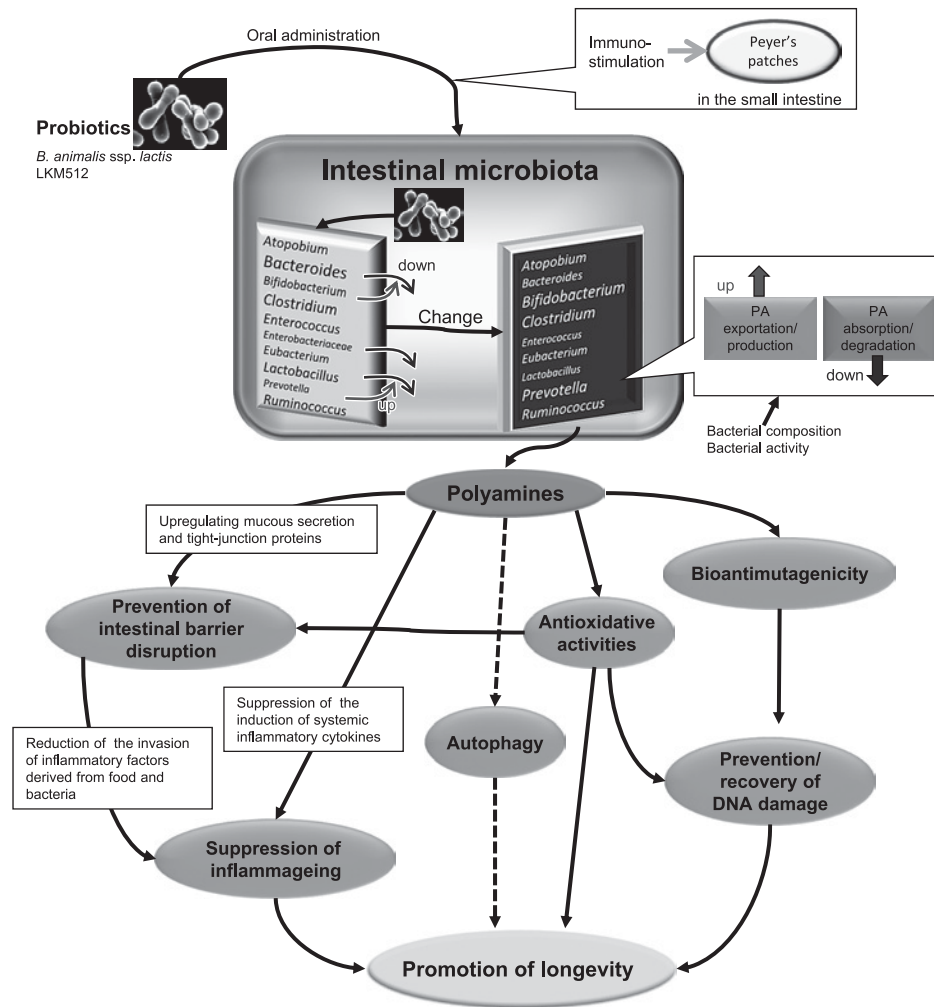


図5. LKM512による大腸内ポリアミン濃度上昇による寿命伸長メカニズム

差が認められ、対照群は毛並みや動作の衰退した個体が数多く観察され、潰瘍および腫瘍の出現頻度にも差があった(図3c, d)。SPM投与群も寿命伸長傾向を示した。すなわち、PAはマウス寿命を伸長させる効果を有し、腸内常在菌に産生させた方が効果的である可能性を示唆している。ただし、投与PAの構成比率や量は再検討が必要である。また、寿命の試験はファクターが多いためクローズドコロニーで遺伝的多様性があるICR系統で実施したが、他系統での検討も必要である。

寿命伸長マウスの生体内での現象²³⁾ LKM512群は対照群と比較し*B. animalis* subsp. *lactis* と *Prevotella* 属の発現が著しく増加し、大腸内SPM濃度が有意 ($P < 0.05$) に高かった。実験開始45週目の結腸組織切片のHE染色の結果(図4a)、LKM512群は正常な粘膜組織を形成していたが、対照群の半数から検出された黒ずんだ結腸は粘膜層が崩壊していた。PAS染色の結果、LKM512群の粘膜は陰窩を形成し、粘液を産生する杯

細胞が規則正しく並んでいるのに対し、対照群は僅かに散在している程度であった。ラクチュロース-ラムノース負荷試験でもLKM512群はバリア機能が維持されていることが認められた。結腸のDNAマイクロアレイ解析を行った結果、LKM512投与マウスと10か月齢マウスは類似した発現パターンを示し、対照マウスとSPM投与マウスがこれに相反する発現パターンで類似していた(図4b)。これは、LKM512投与により老化に伴う結腸遺伝子発現の変動が抑制されたことを示している。反対に、SPM投与では老化に伴う変動が抑制されなかった。さらに、LKM512群は対照群と比較して、急性期タンパク質で炎症マーカーとなる尿中ハプトグロビン量が有意 ($P < 0.05$) に少なく、血清TNF- α 量も低下傾向を示し、結腸の炎症系遺伝子 (Traf6, Tnf) 発現も有意 ($P < 0.05$) に低く、LKM512投与により炎症が抑制されていたことが認められた。また、LKM512群では対照群と比較して酸化ストレス損傷マーカー(尿中8-ヒ

ドロキシ-2'-デオキシグアノシン)が減少する傾向を示し、糞便エキスの変異原活性が有意に($P < 0.05$)抑制され、突然変異が起りにくい腸内環境が得られた。

メカニズム²³⁾

図5に筆者が考えているLKM512のポリアミンを介した寿命伸長の作用機序をまとめた。LKM512を投与するとPAを産生する腸内菌叢が形成される。その結果、PAが腸上皮細胞に作用し粘液などの防御因子の産生を維持、さらにPAの抗酸化作用で腸管組織の損傷を抑制し、消化管内に存在する炎症因子の侵入が物理的に減少する。同時に腸管より吸収されたPAは全身性の免疫担当細胞にも作用し抗炎症効果を誘導し、老年病の原因である慢性炎症が抑えられる。また、PAの抗変異原作用にてDNAの損傷が減少する。さらにオートファジー誘導作用も加わり、寿命伸長効果が誘導される。また、最近、PAの異常メチル化抑制作用が関与しているとの報告¹⁵⁾もあり、幾重にも重なる生理機能が関与している可能性が高い。

おわりに

PAは1970年代にガンマーカーとしての報告がなされて以来、ガンとの関連性を示す膨大な研究がなされ、ガンの原因物質のような扱いを受けてきた。しかしながら、これらの多くの研究者は、正常細胞にとってもPAは必須のものであることを軽視している。PAは原核生物から植物および哺乳類まで全生物が有する生理活性物質であり、その作用は多岐にわたっており、欠乏すると生命活動そのものが危機に陥る重要な物質と認識すべきである。PAの寿命伸長効果は、酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスにおいて他グループからも確認されており^{14,27)}、今後、PAを興味深い生理活性物質という視点で研究が増加することに期待する。

謝 辞

本研究成果の一部は、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業の支援を受けて得られたものである。

文 献

- 1) Mitsuoka, T.: *Pharmacia*, **5**, 608 (1969).
- 2) Takeuchi, O. *et al.*: *Immunity*, **11**, 443 (1999).
- 3) Matsumoto, M. *et al.*: *Sci. Rep.*, **2**, 233 (2012).
- 4) Nishimura, K. *et al.*: *J. Biochem.*, **139**, 81 (2006).
- 5) Medina, M. A. *et al.*: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 23 (2003).
- 6) Uda, K. *et al.*: *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 554 (2003).
- 7) Matsumoto, M. *et al.*: *Microbiol. Immunol.*, **51**, 25 (2007).
- 8) Li, L. *et al.*: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **280**, G992 (2001).
- 9) Matsumoto, M. *et al.*: *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, **72**, 1604 (2008).
- 10) Buts, J. P. *et al.*: *Dig. Dis. Sci.*, **38**, 1091 (1993).
- 11) Lux, G. D. *et al.*: *Science*, **210**, 195 (1980).
- 12) Guo, X. *et al.*: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **288**, G1159 (2005).
- 13) Rhee, H. J. *et al.*: *J. Cell. Mol. Med.*, **11**, 685 (2007).
- 14) Eisenberg, T. *et al.*: *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1305 (2009).
- 15) Soda, K. *et al.*: *PLoS One*, **8**, e64357 (2013).
- 16) Matsumoto, M. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **93**, 109 (2004).
- 17) Matsumoto, M. *et al.*: *Curr. Microbiol.*, **44**, 212 (2002).
- 18) Matsumoto, M. *et al.*: *Microbiol. Ecol. Health Dis.*, **12**, 77 (2000).
- 19) Matsumoto, M. *et al.*: *Microbiol. Immunol.*, **53**, 421 (2009).
- 20) Matsumoto, M. *et al.*: *Clin. Exp. Allergy*, **37**, 358 (2007).
- 21) Matsumoto, M. *et al.*: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **31**, 181 (2001).
- 22) Matsumoto, M. *et al.*: *Mutat. Res.*, **568**, 147 (2004).
- 23) Matsumoto, M. *et al.*: *PLoS One*, **6**, e23652 (2011).
- 24) Metchnikoff, E.: *The prolongation of life. Optimistic studies* (William Heinemann, 1907).
- 25) Bruunsgaard, H. *et al.*: *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, **23**, 15 (2003).
- 26) Franceschi, C. *et al.*: *Mech. Ageing Dev.*, **128**, 92 (2007).
- 27) Soda, K. *et al.*: *Exp. Gerontol.*, **44**, 727 (2009).