

腸内細菌叢の代謝制御型ヨーグルトの開発とその機能

松本光晴*

(協同乳業株式会社 研究所 技術開発グループ
〒190-0182 東京都西多摩郡日の出町平井20-1)

Development and application of functional yogurt that upregulate polyamine production by controlling the metabolism of commensal intestinal microbiota

Mitsuharu Matsumoto

(Dairy Science and Technology Institute, Kyodo Milk Industry Co. Ltd.
20-1 Hirai, Hinde-machi, Nishitama-gun, Tokyo 190-0182, Japan)

要旨

腸内細菌叢の代謝産物は、吸収され宿主の細胞に直接的に作用するため健康/疾病と深く関わっている。ヨーグルトは腸内細菌叢に直接的に働きかける力を秘めた食品であるが、複雑且つ個体差の大きい腸内細菌叢の代謝産物を制御するのは極めて困難で、代謝産物を標的として開発されたヨーグルトは存在しなかった。細胞健全性の維持に関わるポリアミンは、加齢に伴い生体内濃度が低下するが、生体外から補充が可能で、腸内細菌叢は主要な外因性ポリアミン供給源である。腸内細菌叢の代謝を変化させ、安定的にポリアミン産生を誘導する方法として、アルギニンとビフィズス菌(LKM512株)の併用投与方法(Arg+Bif)を見出し、この機序として、複数の細菌グループの独立した生存戦略に関わる代謝系が絡む「腸内ハイブリッド・ポリアミン生合成機構」を遺伝子レベルで解明した。Arg+Bifの経口投与で、マウスにおける寿命延伸および加齢時の学習記憶力への効果が認められた。また、プトレッシン産生菌およびその合成遺伝子破壊株(非産生菌)の単独定着ノトバイオオートマウスを作製し、腸内細菌由来プトレッシンによる大腸の上皮細胞増殖亢進と粘膜固有層の抗炎症性マクロファージの分化誘導を認め、さらにこれら現象が、プトレッシンから変換されたスペルミジンによる真核生物翻訳伸長因子eIF5Aのハイブシン化を介して誘導されることを認めた。Arg+Bif含有ヨーグルトを作製し、BMIが高めの健常成人を対象に無作為化二重盲検試験を実施し、糞便および血中ポリアミン濃度上昇に成功すると共に、ポリアミンの機能で説明可能な血管内皮機能の改善効果が得られた。

1. はじめに

メチニコフが腸内腐敗と老化の関係に着目し、機能性食品の原点ともいえる「ヨーグルト不老長寿

説¹⁾を提唱して110年以上経過した現在、我が国を含む多くの先進国および新興国の市場では、膨大な種類の機能性ヨーグルトが販売されている。その多くは、ヨーグルト中にプロバイオティクスが付加されており、その作用機序は、「腸内細菌叢が改善され、宿主に有益な作用が生じる」とされている。大

* Tel : 042-597-5911, Fax : 042-597-5910
E-mail: m-matsumoto@meito.co.jp

局的にはこの解釈に間違いはないが、科学的エビデンスは脆弱なものが大半を占める。近年の次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析で判明した腸内細菌叢の構成細菌の多様性と個体差を考慮すると、この作用機序の基盤となっている「腸内細菌叢の改善」の定義すら、曖昧となっているのが現状である。筆者は、医師主体の学会等で講演し医師の考えを聞く機会が多いが、大半の医師の意見は、機能性ヨーグルト（プロバイオティクス）が予防医学に有用なツールである可能性を認めつつも、現状は単なる現象論に過ぎず、疾病予防との因果関係は極めて乏しいというものである。将来、機能性ヨーグルト（プロバイオティクス）が、超高齢社会に突入した我が国の健康寿命延伸のための有用なツールとなり、さらにその市場を拡張するためには、これらを摂取することで、腸管腔内で何が生じており、それがどのように生体に作用するのかというメカニズムを遺伝子・分子レベルで解明し、さらにそれを制御できる技術を反映させたヨーグルトの開発が不可欠と考える。

腸管腔内から吸収され、宿主細胞を直接的に刺激すると考えられる腸内細菌叢由来の低分子代謝産物は、メカニズム解明に繋がる重要因子である。筆者は長年、腸内細菌叢由来の遊離低分子代謝産物の研究を進め、その中でも生理活性物質ポリアミンに着目してきた。約20年の研究により、腸内細菌叢のポリアミン産生を誘導する技術の開発に成功し、そのメカニズムを遺伝子レベルで解明すると共に、腸管腔内ポリアミン産生誘導がマウスへ及ぼす効果の検証とその分子レベルでの作用機序の解明に取り組んできた。さらに、最終的にこの技術を反映させたヨーグルトを作製し、ヒト加齢性疾患（動脈硬化予防）への応用で有用なデータを得たので紹介する。2014年にも本誌にポリアミンの機能に関する総説を書かせて頂いたが、本稿では、それ以降の研究成果を中心に紹介する。

2. 腸内細菌叢由来の代謝産物

腸内細菌叢は、食事由来の未消化物や分解物（未吸収物質）、生体由来の粘液や剥離細胞由来物質等を吸収・利用し、低分子の二次代謝産物を産生し、その一部を菌体外に放出する。筆者らが同腹の無菌マウスとそれに通常細菌叢を定着させたマウスの結腸内容物をキャピラリー電気泳動—飛行時間型質量分析装置（CE-TOFMS）でメタボローム解析をした結果、両群間の差異は大きく（図1a）、同定された成分の約43% [77/179種類の化合物、後述するポリアミン（プトレッシンとスペルミジン）も含む] は腸内細菌叢定着マウスにおいて高濃度で、腸内細菌叢由来の化合物であった²⁾（図1b）。一般的に栄養学では、大腸は水分、ミネラルおよび一部の脂溶性ビタミンのみを吸収するとされている。しかしながら、我々が無菌マウスと腸内細菌叢定着マウスの結腸内容物、結腸組織、血液（血漿）、脳（前頭前皮質）をメタボロミクス解析し、各化合物の群間比を比較した結果、結腸管腔内の低分子化合物の約37%、約13%および約3.5%は、それぞれ結腸組織、心臓血漿および前頭前皮質との群間比が類似しており、大腸管腔から大腸組織、血液や脳中枢に移行している可能性を示した^{3,4)}。後述するが、ポリアミンに関しては、大腸上皮細胞に移行することは検証済みである⁵⁾。この結果は、代謝産物の一部は宿主の細胞に作用し、健康/疾病に関与している可能性を示している。

3. 細胞の健全性に不可欠なポリアミン

ポリアミン（主としてプトレッシン、スペルミジン、スペルミン）はアミノ基を二つ以上含む低分子の塩基性物質であり、原核生物からは乳類および高等植物に至るまで全ての細胞内に普遍的に存在する。動物細胞内でのポリアミン代謝系を図2に示す。ポリアミンはオルニチンを前駆体として、律速酵素オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）によりプトレッシンが合成され、さらにスペルミジン、スペルミンの順で合成される。また、逆の流れの分

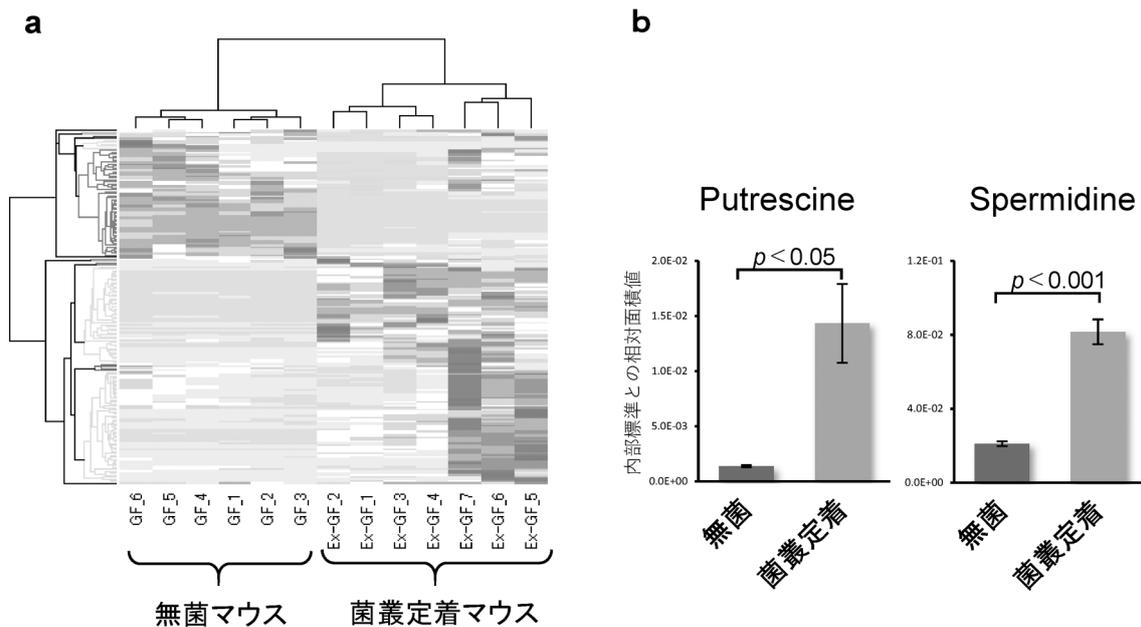


図1 無菌マウスと通常菌叢定着マウスの結腸内容物メタボロームの比較
 (a)無菌マウスと菌叢定着マウスの結腸内容物メタボロームパターン（階層型クラスタ解析）(b)ポリアミンの濃度 CE-TOFMS メタボロミクス解析し、内部標準との相対面積値で表示した。

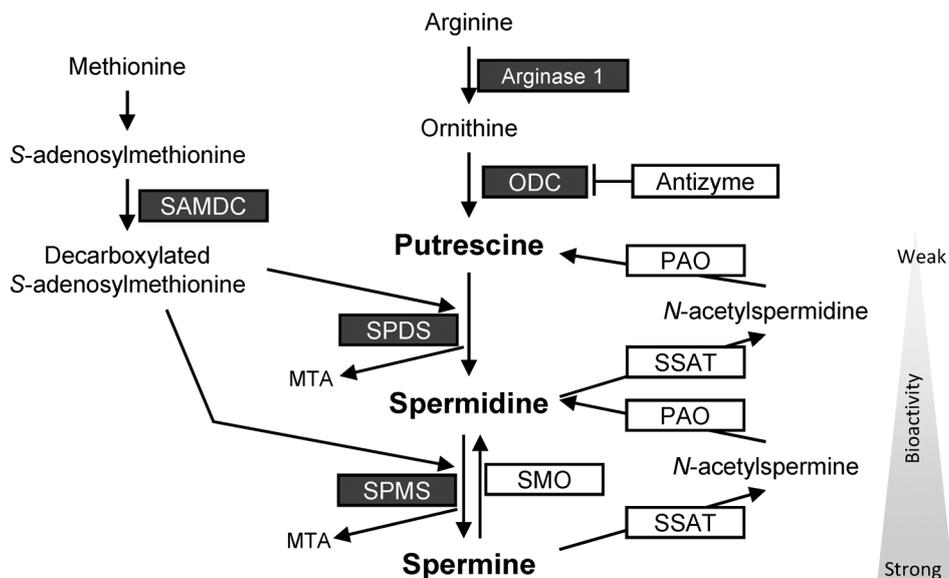


図2 動物細胞内のポリアミン代謝経路
 酵素は四角で囲み、白抜きは合成系、それ以外は分解・抑制系を示す。Ornithine decarboxylase (ODC) と S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) が本合成経路の律速酵素となる。SAMDCは、S-adenosylmethionineを脱炭酸し、decarboxylated S-adenosylmethionine (dcSAM)を合成、さらにdcSAMのアミノプロピル基が spermidine synthase (SPDS) によりプトレッシンに付加されスペルミジンが、同様に spermine synthase (SPMS) によりスペルミジンに付加されスペルミンが合成される。分解系も備わっており、スペルミンは spermine oxidase (SMO) により直接的に、あるいは spermidine/spermine-N1-acetyltransferase (SSAT) と polyamine oxidase (PAO) による2段階でスペルミジンに変換される。スペルミジンは spermidine/spermine-N1-acetyltransferase (SSAT) と polyamine oxidase (PAO) によりプトレッシンに変換される。Antizymeは、ポリアミンによるネガティブ・フィードバックのもと、ODCを分解しポリアミン濃度調整を担う。大半の生命現象に対する生理活性はスペルミン、スペルミジン、プトレッシンの順で強い。

解経路も存在し、さらに、高濃度時に ODC を分解するアンチザイムというタンパク質も備わっており、正常細胞においては細胞内濃度が厳密に制御されている。これは、細胞活動において極めて重要な生理活性物質であることを示唆している（ポリアミン代謝系に関しては詳細なレビュー^{6,7)}があるので参照されたい。

細胞活動におけるポリアミンの役割は、細胞増殖や分化、核酸の保護作用（抗変異原性、メチル化異常の抑制）^{8,9)}、真核生物における翻訳伸長因子 eukaryotic initiation factor-5A (eIF5A) のハイプシン化と称される翻訳後修飾（スペルミジンがハイプシン化の唯一の基質となる）、オートファジーの促進等が挙げられる。すなわち、セントラルドグマに深く関与する細胞の健全性（正常活動の維持）に不可欠な物質である。マウスのポリアミン生合成経路の破壊により、正常な発育が阻害され、殆どは胎生致死を誘発することは、その重要性を裏付けている。細胞の健全性維持に伴い、様々な臓器や組織で、且つ様々な疾病に対して、ポリアミンの効果は期待できる¹⁰⁾。

げっ歯類での研究で、各臓器・組織中のポリアミン（特にスペルミジン）の生合成能および濃度が加齢に伴い減少することが知られている^{11,12,13)}。ヒトにおいても、百寿者の血中ポリアミン濃度が60～80歳代の濃度より大幅に高く、30～50歳代の濃度に近い値を示し¹⁴⁾、生体内ポリアミン濃度を高く維持できている個体が生き残っていると推測される。これらから、筆者は、細胞内ポリアミンの減少が、細胞の健全性の破綻を導くことで老年病のトリガーになると考え、反対に、細胞内ポリアミン濃度を維持できれば健康寿命の延伸が可能になると仮説を構築するに至った。

4. 外因性ポリアミン供給源としての腸内細菌叢

生体内ポリアミン合成（内因性ポリアミン）が減少しても、外因性ポリアミンで補填が可能である。外因性ポリアミンは食事あるいは腸内細菌叢由来で

ある。食餌由来のポリアミンは、ほぼ全てが小腸内で生体に吸収される¹⁵⁾。一方で、我々は、大腸管腔内のプトレッシンとスペルミジンは腸内細菌叢由来であることを確認した²⁾。更に、高齢者やアレルギー患者型の腸内細菌叢のヒトは健康成人と比較して糞便ポリアミン濃度が低いことも見出した^{16,17)}。さらに、これまでに回収した約200名の日本人の平均糞便ポリアミン濃度と大腸管腔の内容物量（400 ml）¹⁸⁾をベースに算出した大腸管腔内に存在する平均ポリアミン量は約300 μmol であった（未発表、データ蓄積中につき変動する可能性あり）。一方、高ポリアミン食材から得られるポリアミン量^{13,19)}を算出した結果、例えば、納豆（50 g）は50 μmol 、ブルーチーズ（50 g）は22 μmol 、ブロッコリー（100 g）は61.5 μmol であり、腸内細菌叢由来ポリアミン量は食事成分に勝るとも劣らない外因性ポリアミンの供給源であることが認められた。また、食事由来ポリアミンは生体に吸収されれば消失する一過性であるが、腸内細菌由来ポリアミンは、腸内細菌が活動していれば継続的に供給し続けることが期待できる。以上より、筆者は、「腸内細菌叢の代謝制御でポリアミン産生を誘導し、継続的且つ多量に生体へ供給できれば細胞健全性が維持され、健康寿命延伸に繋がる」と仮説を構築し²⁰⁾、研究を進めてきた。

5. 腸内細菌由来ポリアミンの大腸上皮粘膜健全化作用

腸内細菌叢由来ポリアミンの機能を精度高く検証する目的で、スペルミジンとスペルミンの前駆体で、ヒトの大腸管腔内で最も濃度が高いプトレッシンに着目し、プトレッシンを産生する野生型大腸菌（PUT 産生菌）とプトレッシン合成酵素遺伝子を破壊した大腸菌（非産生菌）をそれぞれ無菌マウスへ単独定着させたノトバイオートマウスを作製し、大腸管腔内のプトレッシン濃度のみが異なるモデルを構築し、大腸上皮粘膜への影響を調べた⁵⁾。その結果、PUT 産生菌定着マウスでは、大腸上皮細胞の増殖促進（図 3a）および大腸粘膜固有層の炎症症

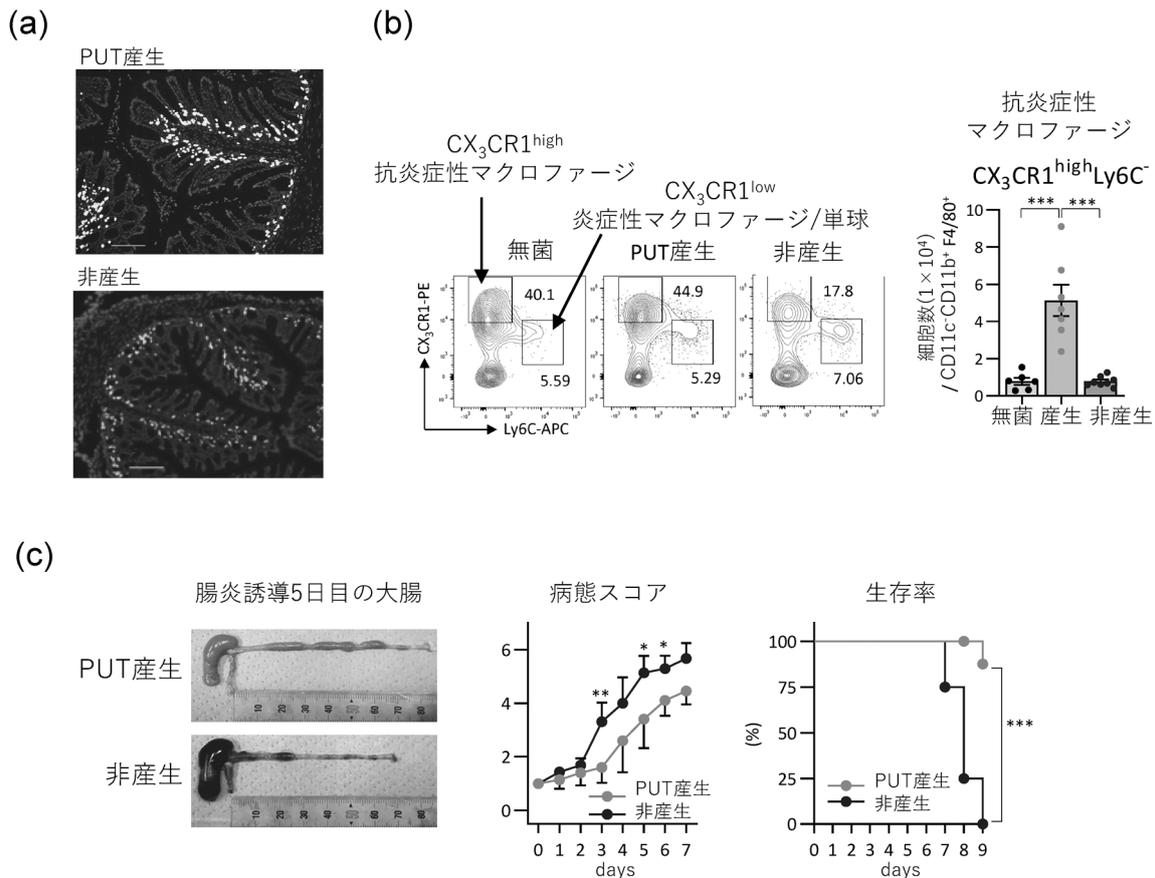


図3 プトレッシン産生大腸菌（PUT産生菌）およびその合成系破壊菌（非産生菌）の単独定着ノトバイオートマウスによる大腸上皮粘膜への影響

(a)大腸上皮組織のEdUアッセイ顕微鏡像。EdUを取り込んだ増殖中の細胞は蛍光色を発するため本写真では白く検出される。(b)フローサイトメトリーによる大腸粘膜固有層中のマクロファージ集団の解析例(左)と各群の抗炎症性マクロファージの細胞数(右)。PUT産生菌定着マウスの大腸粘膜固有層では、CX₃CR1^{high}抗炎症性マクロファージが非産生菌定着マウスや無菌マウスと比較し、多いことが認められた。****p* < 0.001。(c)DSS誘導性大腸炎に対する影響。非産生菌定着マウスでは、大腸炎の症状の一つである大腸長の短縮と出血が観察された。PUT産生菌定着マウスでは、非産生菌定着マウスと比較し、病態スコアが低くと生存率が高かった。

型マクロファージの分化誘導(図3b)が認められ、腸内細菌由来プトレッシンが大腸上皮粘膜の健全化に関与していることが証明された。また、安定同位体ラベル化解析で、腸内管腔中の遊離プトレッシンがこれらの細胞内に取り込まれ、スペルミジンへ変換されることが証明された。さらに、大腸オルガノイドあるいは骨髓由来マクロファージを用いた培養系実験にて、大腸上皮細胞の増殖促進および抗炎症性マクロファージの分化誘導は、スペルミン合成阻害剤あるいはハイプシン阻害剤で抑制されること等から、細胞内で変換されたスペルミジンがeIF5Aのハイプシン化を介して作用していることが認めら

れた。同じくeIF5Aのハイプシン化が関与しているオートファジーをマウス大腸切片で検出したところ、PUT産生菌定着マウスで、オートファジーが強く誘導されていた。ターンオーバーが非常に早い大腸上皮細胞でのオートファジーの意義は今後の検討課題であるが、上皮細胞の増殖に重要な役割を担っていると推測している。最後に、これらのノトバイオートマウスでDSS大腸炎を誘発させた結果、PUT産生菌定着マウスは非産生菌定着マウスと比較し、腸炎病態スコアの緩和および生存率の上昇が認められた(図3c)。

以上より、腸内細菌叢の代謝産物であるプトレッ

シンは、生体に移行し細胞内でスペルミジンへと変換され、スペルミジンの eIF5A を介した作用により大腸粘膜層の健全化に寄与することが証明された。また、これは腸内細菌叢と宿主の両者が関与する共役的な代謝 (symbiotic metabolism) による生理活性物質産生という新しい概念の提示でもある。

6. 安定的且つ高濃度に腸内ポリアミン濃度を高める技術 (機能性食品) の創出

(1) ポリアミン産生細菌の探索

腸内細菌叢の代謝変化を誘導するためには、菌叢変化や代謝産物刺激が必要と考え、我々は耐酸性が強く、腸管内で増殖できるビフィズス菌 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512^{21,22)}) を選出し、複数の小規模なヒト摂取試験で糞便ポリアミン濃度を上昇させることを確認した²³⁻²⁵⁾。しかしながら、その有効性は個体差が大きく、十分に便中ポリアミン濃度が上昇しない被験者が存在し、特に低濃度の被験者では効果が得られない傾向が強かった。より安定的なポリアミン産生を目指して、ポリアミン不含培地で生育する約300株の腸内細菌を糞便培養でポリアミン産生菌のスクリーニングを試みたが、再現性があるデータは得られなかった。

(2) ポリアミン産生誘導物質の探索

そこで発想を転換し、腸内常在菌のポリアミン産生を誘導する物質の探索に切り替えた。食事成分の糞便メタボロームへの影響を考慮し、4日間の統一食を摂取した被験者の糞便を CE-TOFMS メタボロミクス解析し、同定された221成分からポリアミン増強物質をスクリーニングした (統一食摂取した糞便を解析する意義等は、本稿の主旨と異なるため別途解説記事²⁶⁾を参照頂きたい)。特に、ヒト糞便内で最も濃度が高く、且つ活性が強いスペルミジンとスペルミンの前駆体であるブトレッシンに着目し、食への応用も考慮して安価で安全な物質を糞便培養系で探索した。その結果、アルギニン (Arg) に強い作用を見出した²⁷⁾。げっ歯類への Arg 経口投与で、糞便内ブトレッシン濃度が濃度依存的に上

昇し (図 4a)、さらに血中スペルミジン濃度が有意に上昇した (図 4b)。これは、腸内細菌叢由来ブトレッシンが生体内に移行し、スペルミジンに変換されたことを示唆している²³⁻²⁷⁾。また、Arg およびビフィズス菌 (LKM512 株) を単独/併用で12ヶ月齢マウスに半年間投与して比較したところ、併用で最も効果が強かった²⁷⁾。発見当時、併用で効果が高まる理由は謎であったが、その後の研究で、その理由は解明された (下記「ポリアミン産生機構」の章に記述)。

(3) Arg とビフィズス菌の併用投与による健康寿命延伸効果 (マウス)

14ヶ月齢 ICR マウス (日本人平均寿命換算すると40歳代後半に相当) への Arg とビフィズス菌の併用経口投与 (3回/週) を行った結果、有意な寿命延伸を認めた (図4c)²⁷⁾。国内外の他のグループもポリアミンの経口投与によるマウスの寿命延伸効果を報告しており²⁸⁻³⁰⁾、外因性ポリアミンの供給でマウスの寿命延伸が得られることはほぼ間違いないと考えている。マウス以外のモデル生物 (ショウジョウバエ, 線虫) においても、経口投与による寿命延伸効果が認められており³¹⁾、ポリアミンが生物種を超えた生命活動に普遍的に作用していることを示唆している。

脳機能の維持にも着目し、モリス水迷路試験で学習記憶力を評価した。投与開始前は両群間に差がなかったが、投与6ヶ月後 (20ヶ月齢) には併用投与群が対照群と比較し有意に成績が高く、加齢時の学習記憶力に腸内ポリアミン濃度上昇の有効性が示唆された (図 4d)²⁷⁾。ポリアミンの血液脳関門の通過等、多くの検討課題は存在するが、ショウジョウバエにおいて、高ポリアミン食による加齢依存性記憶力低下の抑制³²⁾をはじめ、ポリアミン合成阻害による学習記憶の低下がラットで報告されており³³⁾、たとえ血液脳関門を通過しなくても、迷走神経、消化管ホルモン、或いは臓器間ネットワークを介した経路が存在する可能性が推測され、現在研究を進めている。

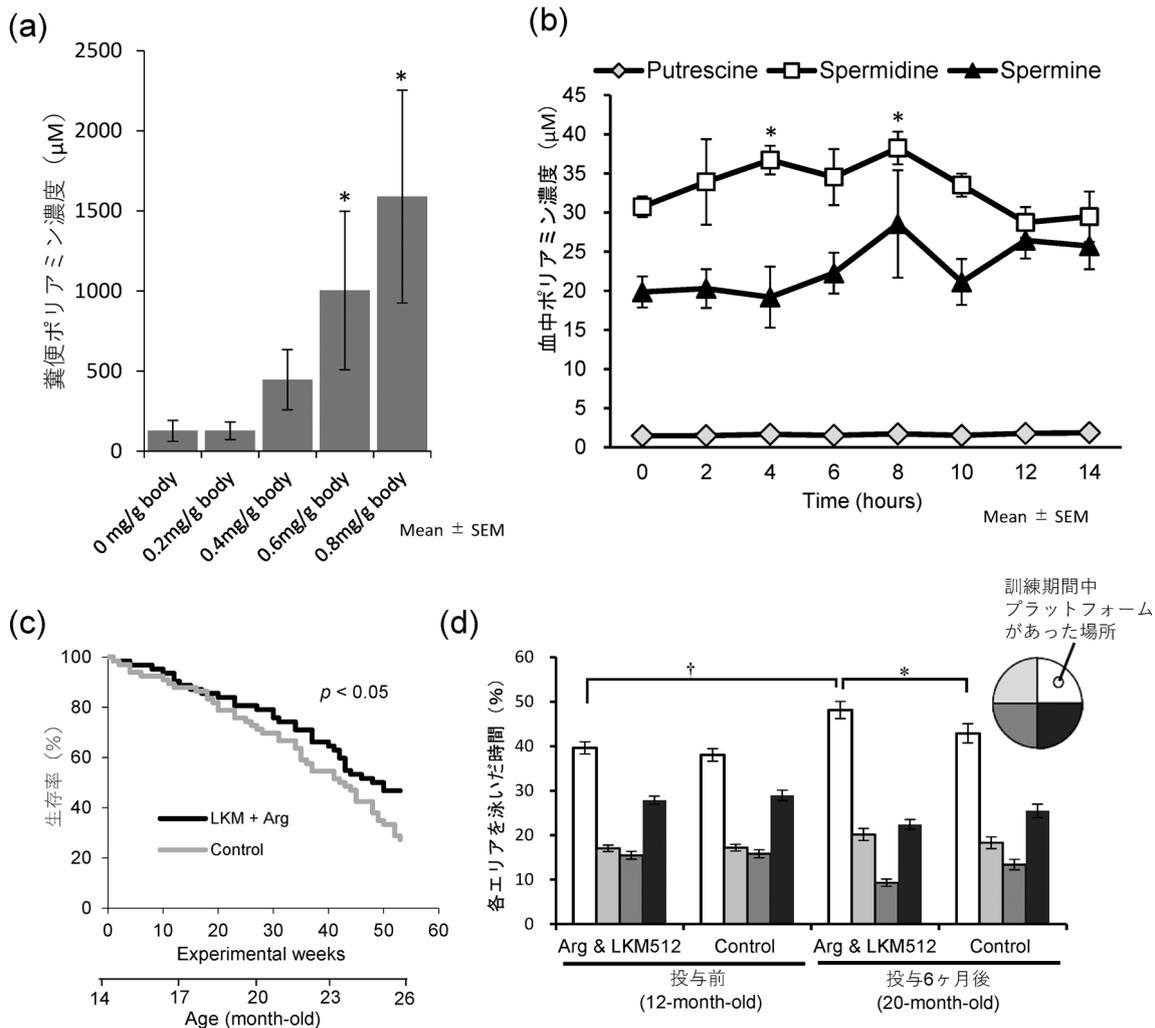


図4 アルギニンのポリアミン産生誘導効果と Arg とビフィズス菌 LKM512 の長期投与の影響
 (a) 9 週齢雄性マウス (n=8) に 3 時間の絶食後、アルギニンを各濃度で強制経口投与し、3~4 時間後の糞便抽出液中のプトレッシン濃度。* $p < 0.05$ (vs. 0 mg/body)。 (b) 頸静脈カニューレ挿入ラット (雄性, 9 週齢) に 3 時間の絶食後、アルギニン (0.9 mg/body) を強制経口投与し経時的に採血した (n=5)。* $p < 0.05$ (vs. pre-treatment : 0 h)。 (c) 14 ヶ月齢雌性マウスへの Arg + Bif の強制経口投与 (3 回/週) による生存曲線 (Kaplan-Meier survival curve)。 (d) 上記マウスを用いて Arg + Bif 投与前後にモリス水迷路試験を実施したプローブ試験結果。決まった場所にプラットフォームを置き (水面下に置きマウスからは見えない), 3 回/日 × 7 日の訓練を繰り返し, 最終日のプローブ試験ではプラットフォームを取り除き, そのエリアを遊泳した時間を比較した。棒グラフの色は遊泳エリアを 4 分割した位置 (右上) を示す。* $p < 0.05$ (Student's t-test), † $p < 0.01$ (paired t-test)

7. 腸内ポリアミン生合成機構

当初, 我々はビフィズス菌が Arg からプトレッシンを産生していると考え, 幾度となく培養条件を変えて実験を繰り返したが, 培養液中のプトレッシン濃度は上昇しなかった。そこで, 腸内常在菌を介して産生されていると考えるに至った。

(1) 複数菌種を介したプトレッシン生合成・放出

Arg がどのように変換されるのかを安定同位体ラベル解析で調べた。安定同位体ラベル化 Arg を添加し糞便培養した結果, 個々の腸内細菌による「物質吸収—菌体内代謝—副産物放出」の連鎖が腸内環境中 (糞便中) で生じ, 複数の菌種が関与し, 各代謝により放出される副産物 (中間体) を介して Arg からプトレッシンまで変換されることを見出した

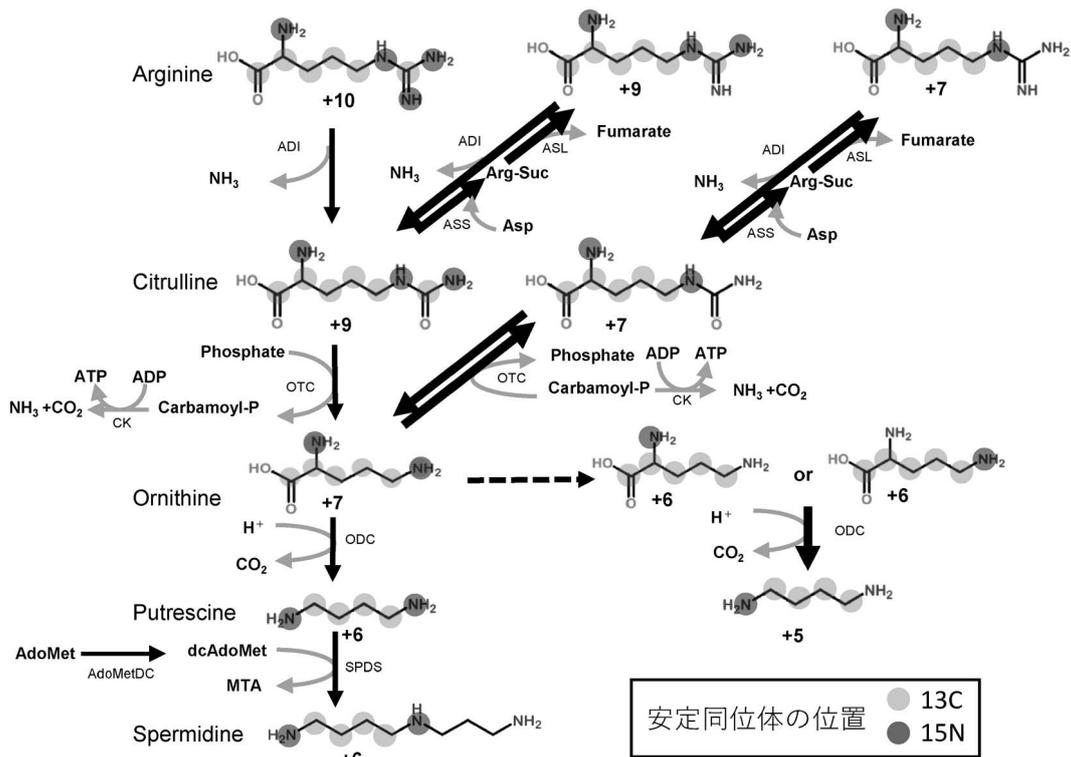


図5 安定同位体アルギニンを用いたラベル解析による腸内細菌叢の集成的代謝経路の解明

窒素および炭素を安定同位体ラベルしたアルギニン (+10) を準備し、これを添加した糞便を培養後、菌体を破壊せずに抽出した培養上清中に存在するアルギニン (+10) から代謝 (合成・分解) された化合物を CE-TOFMS で追跡調査した。左側のアルギニンからスペルミジンまでの直線の黒矢印は、ゲノム情報を元にした生合成経路で、単独菌体内でプトレッシンまで生合成される (中間体は放出されない) と考えられていたが、遊離中間体 (シトルリンやオルニチン) が培養液中に検出された。右側で斜め上方向の太い黒矢印は逆方向 (代謝が上流に遡る) の想定外の代謝経路を示す。点線矢印は、現時点で説明が困難な変換を示す。これらより、様々な種類の腸内細菌が関与し、中間体の産生と放出、さらには逆方向への代謝も含んだ集成的な代謝経路の存在が明らかになった。

(図5)³⁴)。これは、ゲノム情報を元にした解析では発見困難な複雑系による代謝経路の存在を示した重要な知見である。次に、ヒト腸内主要細菌グループ (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria) から各々の代表的な細菌 (合計14株) を選出し Arg 含有培養液で混合培養した結果、プトレッシン濃度が各菌株単独培養時平均 (0.21 mM) の約40倍 (8.5 mM) に増加した³⁵)。

(2) 複数菌種を介した複合プトレッシン生合成経路の同定

上述の14株から2菌種ずつの組合せで混合培養した結果、*Enterococcus faecalis* と *Escherichia coli* の組合せが突出して高濃度のプトレッシンを産生し (8.0 mM)、この産生量はビフィズス菌 LKM512

の添加 (3菌培養) で増強された。さらに、培養液中の物質動態解析、培養条件変更 (pH、培養の順番等) および文献情報により複合生合成経路の仮説を立案し、さらにその仮説に関連する遺伝子欠損菌株および相補菌株を用いた実験を繰り返した。その結果、*E. coli* 等が保有する Arg を利用した耐酸性機構 (副産物としてアグマチンを放出) と、*E. faecalis* が保有するアグマチンを利用した ATP 産生機構により、副産物としてプトレッシンが腸内環境中に放出されるという、異菌種間の代謝経路が合わさった「腸内ハイブリッド・ポリアミン生合成機構」を発見した (図6)。さらに、この反応は、ビフィズス菌の産生する酸をトリガーとして作動することが確認された。これは、過去に報告が無い3菌種の独立した生命活動に関する代謝経路が組み

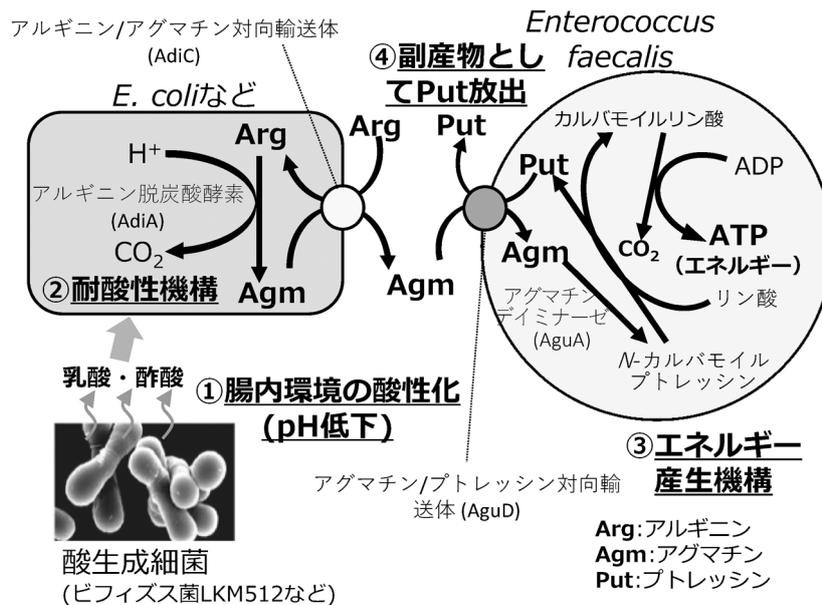


図6 腸内ハイブリッド・ポリアミン生合成機構の概要図

- ①ビフィズス菌等の酸生成細菌由来の酢酸・乳酸等で、腸内環境が酸性化する (pH 低下)。この酸性化が本機構のトリガーとなる。
- ②酸性環境で生き残るためアルギニンを利用する耐酸性機構を保有する腸内常在菌 (*E. coli* 等) は、この機構を作動させ菌体内 pH を中性に保つ。その際、環境中のアルギニンを取り込み、菌体外にアグマチンを放出する。
- ③アグマチンを利用した ATP (エネルギー) 産生機構を保有する腸内常在菌 (*Enterococcus faecalis*) は、放出されたアグマチンを取り込み、この機構を作動させて ATP を産生する。
- ④その際、アグマチンを取り込み、副産物としてプトレッシンが菌体外に放出され、腸管内プトレッシン濃度が上昇する。

合わさった生理活性物質の生合成機構で、且つ、それが遺伝子レベルで解明されている点で極めて先進的な知見となった³⁵⁾。これらの3種の菌を組み合わせたノトバイオートマウス実験でも、大腸管腔内でプトレッシンが産生されることが認められた。さらに、*E. faecalis* は多くのヒトの腸内に常在する主要細菌であるが、*E. coli* はヒト腸内ではマイナーであるため、*E. coli* の耐酸性機構に関与する遺伝子 (AdiA, AdiC) のホモログを保有する *Fusobacterium varium* を用いて、*E. faecalis* との組合せで混合培養およびノトバイオートマウス実験を行った結果、プトレッシンが放出されることを確認した。これは、腸内ハイブリッド・ポリアミン生合成機構は特定の菌種の組合せ (*E. faecalis* と *E. coli*) のみに該当するのではなく、同様の耐酸性機構を保有する他の腸内常在細菌を介しても機能するヒト腸管内での普遍性を有していることを示唆している。なお、

酸産生能力や他の代謝産物の影響と考えられるが、ビフィズス菌株により産生されるプトレッシン量は大きく異なる点は興味深い。

8. 血管内皮機能をターゲットとしたヒト臨床試験

(1) 腸内ポリアミン産生誘導ヨーグルト

従来のプロバイオティクスあるいはプレバイオティクスで腸内細菌叢を改善することを目的としたヨーグルトではなく、プロバイオティクスとプレバイオティクス (プロバイオティクスの栄養としての意味も含め) を混合したシンバイオティクスでもなく、狙った生理活性物質を腸内細菌叢の代謝を制御して産生誘導するために必要な微生物 (ビフィズス菌 LKM512) と物質 (Arg) を付加した、全く新しいコンセプトの次世代型ヨーグルトとして「腸内プトレッシン産生誘導ヨーグルト (Arg+Bif YG)」

を作製した。予備検討で、9割以上のヒト（日本人）糞便中でプトレッシンが増える量の Arg とビフィズス菌 LKM512 量を決定した。

(2) 動脈硬化予防とポリアミン

筆者は、既知のポリアミンの機能から、以下のメカニズムで生体へのポリアミン供給が動脈硬化予防に有効と考え準備をしてきた。ポリアミンは炎症時に血管内皮細胞で誘導される Intercellular adhesion molecules のリガンドとなる免疫細胞表面の接着分子 Lymphocyte function-associated antigen 1 レベルを抑制し³⁶、これらの結合を阻害し、免疫細胞の血管壁への過剰移入を防ぐと共に、末梢血単核球の炎症性サイトカイン分泌も抑制する³⁷。これらにより、プラーク形成前の免疫細胞の炎症惹起による進展を抑制する。また、ポリアミンは血小板凝集抑制作用を有しており³⁸、プラーク形成後の血栓形成の予防にも貢献する。また、ポリアミンのオートファジー促進作用により血管内皮細胞内の健全性が維持され、LDL コレステロールの血管内皮下への侵入抑制が期待できる。同じく血管平滑筋細胞のオートファジー低下は、細胞死や細胞老化を誘導

し、これが血管壁への炎症細胞の集積を導き動脈硬化が促進されることが報告されており³⁹、ポリアミンによるオートファジー誘導でこれが予防できる。事実、マウスではスペルミジンの経口投与が心筋細胞のオートファジーを誘導し、心臓機能を改善することが報告されている²⁹。食由来スペルミジン摂取量と心血管疾患リスクが負の相関性を示す疫学データは²⁹、ポリアミン供給により、上記機能が複合的に作用して動脈硬化が予防できる可能性を支持している。

(3) ヒト臨床試験

BMI が高めの健常成人（平均年齢45歳）を対象に、Arg + Bif YG およびプラセボ（Arg とビフィズス菌を含まないヨーグルト）の12週間のランダム化二重盲検並行群間比較試験を実施した。血管内皮機能は、非侵襲的で再現性が高い EndoPAT 2000（Itamar Medical）を用いて反応性充血指数（Reactive Hyperemia Index; RHI）を測定した。その結果、Arg + Bif YG 群ではプラセボ群と比較して、血管内皮機能の変化量で有意に高値（=改善）を示した（図 7a）。群内変化でも Arg + Bif YG 群

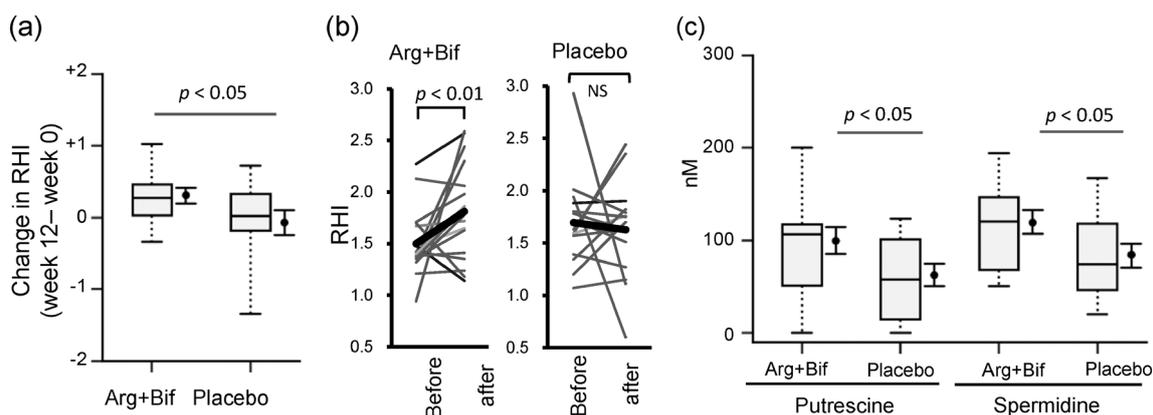


図 7 Arg とビフィズス菌 LKM512 含有ヨーグルトが血管内皮機能、血中ポリアミン濃度に与える影響

(a)血管内皮機能（RHI）の変化量。RHI（Relative hyperemia index, 反応充血指数）は、EndoPAT で測定した血管内皮機能を表す数値である。両手の指 2 本にプローブを装着して指先の脈波を計測する。途中で片腕を駆血し、駆血前後の脈波の差から算出する。箱ひげ図のひげは 5% 値と 95% 値、箱は四分位範囲（25%–75%）、箱中の線は中央値を示し、箱ひげ図横に平均値（黒点）と標準誤差を表記した。* $p < 0.05$ (Two-way ANOVA)。 (b)血管内皮機能（RHI）の群内変化。黒い太線は平均値を表す。Arg + Big YG 摂取群は大半の被験者で改善したことがわかる。** $p < 0.01$ (paired t-test) ; NS : 差なし。 (c)血清ポリアミン濃度（摂取12週目）。Arg + Big YG 摂取により生理活性を有するスペルミジンが高濃度になった。箱ひげ図の説明は (a) と同じ。

でのみ有意な上昇 (=改善) が認められた (図 7b)。現在, 血管内皮機能 (RHI) が1.67未満のヒトは将来の動脈硬化症リスクが高いとされている。本試験で, Arg + Bif YG 摂取で, この値の平均値が摂取前の1.50から1.81に増加したことは, 血管内皮機能が危険域から正常域まで回復したことを示している。また, 血管内皮機能の改善を裏付けるように, Arg + Bif YG 群ではプラセボ群と比較し, 血小板数の変化量が有意に低く (=改善), 収縮期血圧が低い傾向を示した。これらは, それぞれ, プラークに裂け目が入ったり破綻したりすることに起因する血小板凝集頻度の減少および血管柔軟性の回復を示唆している。また, 期待通り, Arg + Bif YG 群はプラセボ群と比較し, 糞便中プトレッシン濃度が有意に高く, 同時に血清スペルミジンが有意に高濃度であった (図 7c)。これらの結果は, Arg + Bif YG の摂取により腸内でプトレッシンが生合成され生体に吸収され, その後, 生体内でプトレッシンより変換されたスペルミジンの作用により血管内皮機能が改善したことを示唆している。

9. おわりに

現在, 腸内細菌の代謝産物の研究は盛んに行われている。ポリアミン以外にも有用な代謝産物が見出される可能性は十分ある。この研究は, 個体差の大きいヒト腸内細菌叢に標的代謝産物(生理活性物質)を産生させ, その血中移行を確認し, 期待通りの保健効果を得ることに成功した世界初の知見であることから, 類似研究の参考になれば幸いである。

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。

引用文献

1) Metchnikoff E., The prolongation of life. Optimistic studies., William Heinemann, London, 1907.

2) Matsumoto M., Kibe R., Ooga T., Aiba Y., Kurihara S., Sawaki E., Koga Y., and Benno Y.: Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci Rep* 2: 233, (2012).

3) Matsumoto M., Ooga T., Kibe R., Aiba Y., Koga Y., and Benno Y.: Colonic absorption of low-molecular-weight metabolites influenced by the intestinal microbiome: a pilot study. *PLoS One* 12: e0169207, (2017).

4) Matsumoto M., Kibe R., Ooga T., Aiba Y., Sawaki E., Koga Y., and Benno Y.: Cerebral low-molecular metabolites influenced by intestinal microbiota: a pilot study. *Front Syst Neurosci* 7: 9, (2013).

5) Nakamura A., Kurihara S., Takahashi D., Ohashi W., Nakamura Y., Kimura S., Onuki M., Kume A., Sasazawa Y., Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S., Saiki S., Matsumoto M., and Hase K.: Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon. *Nature Communications* (in press): (2021).

6) Igarashi K., and Kashiwagi K.: Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 39-51, (2010).

7) Pegg A. E., and Casero R. A., Jr.: Current status of the polyamine research field. *Methods Mol Biol* 720: 3-35, (2011).

8) Medina M. A., Urdiales J. L., Rodriguez-Caso C., Ramirez J., and Sanchez-Jimenez F.: Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38: 23-59, (2003).

9) Soda K., Kano Y., Chiba F., Koizumi K., and Miyaki Y.: Increased polyamine intake inhibits age-associated alteration in global DNA methylation and 1,2-dimethylhydrazine-in-

- duced tumorigenesis. *PLoS One* 8: e64357, (2013).
- 10) Madeo F., Eisenberg T., Pietrocola F., and Kroemer G.: Spermidine in health and disease. *Science* 359: eaan2788, (2018).
 - 11) Das R., and Kanungo M.S.: Activity and modulation of ornithine decarboxylase and concentrations of polyamines in various tissues of rats as a function of age. *Experimental Gerontology* 17: 95–103, (1982).
 - 12) Jaenne J., Raina A., and Siimes M.: Spermidine and spermine in rat tissues at different ages. *Acta Physiol Scand* 62: 352–358, (1964).
 - 13) Nishimura K., Shiina R., Kashiwagi K., and Igarashi K.: Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *J. Biochem.* 139: 81–90, (2006).
 - 14) Pucciarelli S., Moreschini B., Micozzi D., De Fronzo G. S., Carpi F. M., Polzonetti V., Vincenzetti S., Mignini F., and Napolioni V.: Spermidine and spermine are enriched in whole blood of nona/centenarians. *Rejuvenation Res* 15: 590–595, (2012).
 - 15) Uda K., Tsujikawa T., Fujiyama Y., and Bamba T.: Rapid absorption of luminal polyamines in a rat small intestine ex vivo model. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 554–559, (2003).
 - 16) Matsumoto M., and Benno Y.: The relationship between microbiota and polyamine concentration in the human intestine: a pilot study. *Microbiol Immunol* 51: 25–35, (2007).
 - 17) Matsumoto M., Kakizoe K., and Benno Y.: Comparison of fecal microbiota and polyamine concentration in adult patients with intractable atopic dermatitis and healthy adults. *Microbiol Immunol* 51: 37–46, (2007).
 - 18) Sender R., Fuchs S., and Milo R.: Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 14: e1002533, (2016).
 - 19) Atiya Ali M., Poortvliet E., Stromberg R., and Yngve A.: Polyamines in foods: development of a food database. *Food Nutr Res* 55: (2011).
 - 20) Matsumoto M., and Kurihara S.: Probiotics-induced increase of large intestinal luminal polyamine concentration may promote longevity. *Med Hypotheses* 77: 469–472, (2011).
 - 21) Matsumoto M., Ohishi H., and Benno Y.: H⁺-ATPase activity in Bifidobacterium with special reference to acid tolerance. *Int J Food Microbiol* 93: 109–113, (2004).
 - 22) Matsumoto M., Sakamoto M., and Benno Y.: Dynamics of fecal microbiota in hospitalized elderly fed probiotic LKM512 yogurt. *Microbiol Immunol* 53: 421–432, (2009).
 - 23) Matsumoto M., Ohishi H., and Benno Y.: Impact of LKM512 yogurt on improvement of intestinal environment of the elderly. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31: 181–186, (2001).
 - 24) Matsumoto M., and Benno Y.: Consumption of Bifidobacterium lactis LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutat Res* 568: 147–153, (2004).
 - 25) Matsumoto M., Aranami A., Ishige A., Watanabe K., and Benno Y.: LKM512 yogurt consumption improves the intestinal environment and induces the Th1-type cytokine in adult patients with intractable atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 37: 358–370, (2007).
 - 26) 松本光晴：健康寿命伸長のための大腸内ポリアミン増強食品の開発 —狙った生理活性物質を腸内細菌に産生させることができるのか？—。 *生物工学* 92: 516–518, (2014).
 - 27) Kibe R., Kurihara S., Sakai Y., Suzuki H., Ooga T., Sawaki E., Muramatsu K., Nakamura A., Yamashita A., Kitada Y., Takeyama M., Benno Y., and Matsumoto M.:

- Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. *Sci Rep* 4: 4548, (2014).
- 28) Soda K., Dobashi Y., Kano Y., Tsujinaka S., and Konishi F.: Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp Gerontol* 44: 727–732, (2009).
 - 29) Eisenberg T., Abdellatif M., Schroeder S., Primessnig U., Stekovic S., Pendl T., Harger A., Schipke J., Zimmermann A., Schmidt A., Tong M., Ruckstuhl C., Dammbrueck C., Gross A. S., Herbst V., Magnes C., Trausinger G., Narath S., Meinitzer A., Hu Z., Kirsch A., Eller K., Carmona-Gutierrez D., Buttner S., Pietrocola F., Knittelfelder O., Schrepfer E., Rockenfeller P., Simonini C., Rahn A., Horsch M., Moreth K., Beckers J., Fuchs H., Gailus-Durner V., Neff F., Janik D., Rathkolb B., Rozman J., de Angelis M. H., Moustafa T., Haemmerle G., Mayr M., Willeit P., von Frieling-Salewsky M., Pieske B., Scorrano L., Pieber T., Pechlaner R., Willeit J., Sigrist S. J., Linke W. A., Muhlfeld C., Sadoshima J., Dengjel J., Kiechl S., Kroemer G., Sedej S., and Madeo F.: Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat Med* 22: 1428–1438, (2016).
 - 30) Yue F., Li W., Zou J., Jiang X., Xu G., Huang H., and Liu L.: Spermidine Prolongs Lifespan and Prevents Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma by Activating MAP1S-Mediated Autophagy. *Cancer Res* 77: 2938–2951, (2017).
 - 31) Eisenberg T., Knauer H., Schauer A., Buttner S., Ruckstuhl C., Carmona-Gutierrez D., Ring J., Schroeder S., Magnes C., Antonacci L., Fussi H., Deszcz L., Hartl R., Schraml E., Criollo A., Megalou E., Weiskopf D., Laun P., Heeren G., Breitenbach M., Grubeck-Loebenstein B., Herker E., Fahrenkrog B., Frohlich K. U., Sinner F., Tavernarakis N., Minois N., Kroemer G., and Madeo F.: Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.* 11: 1305–1314, (2009).
 - 32) Gupta V. K., Scheunemann L., Eisenberg T., Mertel S., Bhukel A., Koemans T. S., Kramer J. M., Liu K. S., Schroeder S., Stunnenberg H. G., Sinner F., Magnes C., Pieber T. R., Dipt S., Fiala A., Schenck A., Schwaerzel M., Madeo F., and Sigrist S. J.: Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner. *Nat Neurosci* 16: 1453–1460, (2013).
 - 33) Gupta N., Zhang H., and Liu P.: Chronic difluoromethylornithine treatment impairs spatial learning and memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 100: 464–473, (2012).
 - 34) Nakamura A., Ooga T., and Matsumoto M.: Intestinal luminal putrescine is produced by collective biosynthetic pathways of the commensal microbiome. *Gut Microbes* 10: 159–171, (2019).
 - 35) Kitada Y., Muramatsu K., Toju H., Kibe R., Benno Y., Kurihara S., and Matsumoto M.: Bioactive polyamine production by a novel hybrid system comprising multiple indigenous gut bacterial strategies. *Sci Adv* 4: eaat0062, (2018).
 - 36) Soda K., Kano Y., Nakamura T., Kasono K., Kawakami M., and Konishi F.: Spermine, a natural polyamine, suppresses LFA-1 expression on human lymphocyte. *J Immunol* 175: 237–245, (2005).
 - 37) Zhang M., Caragine T., Wang H., Cohen P. S., Botchkina G., Soda K., Bianchi M., Ulrich P., Cerami A., Sherry B., and Tracey K. J.: Spermine inhibits proinflammatory cytokine syn-

- thesis in human mononuclear cells: a counter-regulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 185: 1759–1768, (1997).
- 38) de la Pena N. C., Sosa-Melgarejo J. A., Ramos R. R., and Mendez J. D.: Inhibition of platelet aggregation by putrescine, spermidine, and spermine in hypercholesterolemic rabbits. *Arch Med Res* 31: 546–550, (2000).
- 39) Osonoi Y., Mita T., Azuma K., Nakajima K., Masuyama A., Goto H., Nishida Y., Miyatsuka T., Fujitani Y., Koike M., Mitsumata M., and Watada H.: Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis. *Autophagy* 14: 1991–2006, (2018).