

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00952

研究課題名(和文) リンゴ由来プロシアニジンの腸内細菌叢を介した認知能力低下抑制効果と作用機序の解明

研究課題名(英文) Intake of apple procyanidin improves cognitive function and gut microbiota.

研究代表者

升本 早枝子 (Masumoto, Saeko)

福島大学・食農学類・准教授

研究者番号：30596052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肥満や糖尿病は認知症発症の主要な要因である。また、認知症患者と健常者では腸内細菌叢が異なり、腸内細菌叢が認知機能に影響を及ぼすことが示唆されている。一方、フラボノイドが肥満や糖尿病を軽減し、酸化ストレスを軽減し認知機能低下を抑制することが報告されているが、腸内細菌叢を介した認知機能に対するフラボノイドの影響に関する報告は殆どない。本研究は、老化促進モデルマウスの腸内細菌叢および認知機能に及ぼすリンゴ由来プロシアニジン(APC)の影響を検討した。その結果、APCは腸と脳のバリア機能を改善し、老化促進マウスの腸内細菌叢を変動させることにより、認知機能低下を抑制する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管は多くの神経系・内分泌系組織を有する、生物における最大の免疫組織であり、『第二の脳』とも呼ばれ、情報伝達物質と受容体を介して、脳、肝臓、膵臓、脂肪組織など様々な器官とネットワークを形成している。これには宿主の腸内細菌叢が密接に関与し、食習慣および加齢により大きく変動する。本研究は、代表的な機能性成分であるポリフェノールが腸内細菌叢の変動を介して認知機能低下を抑制する可能性を示した。高齢化社会が進む現在、認知症患者の増加は深刻であり、その予防は重要である。本研究の結果は、ポリフェノールの腸内細菌叢を介した新しい作用機序の発見であり、次世代の食品機能性研究へ発展する可能性があり意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Hyperglycemia, inflammation, and oxidative stress due to obesity and diabetes are factors in the onset of dementia. On the other hands, it has been reported that gut microbiota is different between dementia patients and healthy subjects, suggesting that gut microbiota may affect cognitive function. Several studies have proved that flavonoids not only reduce obesity and diabetes but also inhibit cognitive decline by reducing oxidative stress due to antioxidant capacity. However, there has been little study done to effects of flavonoids on the cognitive function via the gut microbiota. In the present study, we investigated that the effects of Apple procyanidin (APC) on the cognitive function associated with the gut microbiota in senescence accelerating model mice. Consequently, APC administration improved the barrier function of the intestine and brain and contributed to suppression of cognitive function decline by affecting the gut microbiota in senescence-accelerated mice.

研究分野：食品機能学

キーワード：腸内細菌 認知機能 プロシアニジン フラボノイド 老化 SAMP8 バリア機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食生活の多様化によって脂肪・糖質摂取量の増加や栄養バランスの悪化、野菜・果実摂取量の減少により肥満や生活習慣病が増加している。前向き追跡研究である久山町研究や舟形研究によって、糖尿病や耐糖能異常が、虚血性心疾患やガンだけでなくアルツハイマー病を含めた認知症の発症リスクを高めることが明らかとなった。現在、65歳以上の高齢者のうち認知症の罹患者は460万人を超えており、2025年には現状の約1.5倍となる700万人を超えると推計されており、その対策が喫緊の課題となっている。

近年、多くの疫学研究や介入試験によって、野菜や果実の摂取が肥満や糖尿病などの生活習慣病発症の発症リスクを下げ、それに含まれるポリフェノールなどの『ファイトケミカル』が活性成分であることが報告されている。そのため、副作用のない食品成分による肥満や糖尿病、さらには認知症の予防や治療を目指した研究が行われている。

筆者らは、野菜や果実に含まれるポリフェノールが酸化ストレス抑制や遺伝子発現の正常化を介して肥満や糖尿病を改善することを報告した。また、リンゴの主要なポリフェノールであるプロシアニジン類(図1)の化学構造と生体利用性に着目し、糖・脂質代謝などの生体調節機能の研究を実施したところ、リンゴ由来プロシアニジン(APC)摂取が肥満マウスで増加した *Firmicutes* 門/*Bacteroidetes* 門比率の改善を始めとする腸内細菌叢の変化および腸管バリア機能の向上を介して、体重や脂肪組織重量の増加を抑制することを明らかにした。さらに、血中のLPSや炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)が減少していたことから腸内細菌による腸管バリア機能の改善が関係していることが示唆された。最近、クランベリーやブドウのポリフェノール抽出物においても、腸内細菌叢を変動させ炎症抑制や血糖値上昇抑制に寄与することが示され、プロシアニジン類が腸内細菌叢の変動を介して疾病予防に寄与していることが報告されている。プロシアニジン類をはじめとする食品中のポリフェノール類は強い抗酸化作用を持つことからアミロイド β 蓄積抑制や認知症の予防について報告されてきた。一方、肥満や糖尿病においてプロシアニジン類が腸内細菌叢を変化させ、LPSの流入を抑制し、インスリン抵抗性を改善することが示されたことから、プロシアニジン類摂取による慢性炎症や脳内のアミロイド β の蓄積抑制や認知症の予防について検討することで新たな知見が得られるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、APCの有する強い抗酸化能と腸内細菌叢への影響に着目し、老化促進モデルマウス(SAMP8)を用いてAPC摂取による老化に伴う認知能力の低下抑制効果を検討すると共に、盲腸内容物中の腸内細菌叢の解析および腸管および脳組織の炎症因子やバリア機能関連因子を解析し、APCの腸内細菌叢を介した認知能力低下抑制効果および作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

老化促進マウス(Senescence-Accelerated Mouse Prone : SAMP8)を用いた動物実験モデルにより、APC摂取による認知能力低下抑制効果の検討および腸内細菌叢やメタボロームを介した作用機序の解明の為、下記の研究を実施した。

(1) SAMP8マウスを用いたAPC摂取による認知能力低下抑制効果の検討

通常老化を示す Senescence-Accelerated Mouse Resistant : SAMR1 と SAMP8 の 16 週齢雄を用いて試験を行った。試験群として、SAMR1(R 群)、SAMP8(P 群)、SAMP8 にリンゴ由来プロシアニジンを与える群(PA 群)に分けた。飼料はいずれの群も高脂肪高ショ糖食を与え、23 週間飼育した。飼育期間中、体重と老化スコアを経時的に測定した。23 週間時点で認知機能評価試験のパスシブアポイダテストを実施し、解剖後に血液生化学検査など各種分析を行った。

(2) 盲腸内容物および糞便における腸内細菌叢解析

飼育48週目の解剖時採取した盲腸内容物からDNAを抽出した。解剖時採取した盲腸内容物から Power Fecal[®] DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratorys) を用いてDNAを抽出した。盲腸内容物から抽出されたDNAを鋳型とし、16S rRNA 遺伝子領域をPCRにて増幅し、得られた精製DNAを用いて次世代シーケンサーにより腸内細菌叢の解析を行った。

(3) 腸管および脳組織の遺伝子発現解析

抽出した腸管および脳組織から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。得られた cDNA を SYBR Green を用いた定量 Real-time PCR に供し、炎症性サイトカイン(TNF-、IL-6)、腸管バリア機能制御因子(Occludin、ZO-1)などの解析を行った。

(4) 血清分析

解剖時に採取した血清中の脂質およびグルコース濃度はドライケム 7000 (富士フイルム) を用いて測定した。TNF- および IL-6 は ELISA 法により測定した。

4. 研究成果

(1) 体重および臓器重量と血清分析

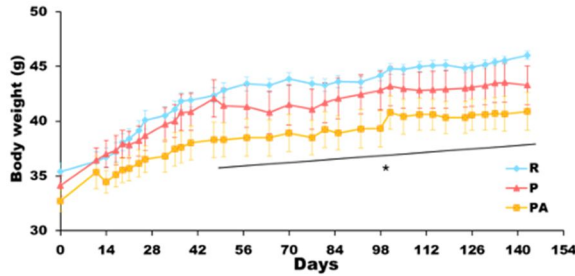


図1 飼育期間中の体重推移

Means ± SE, n=10, * : $p < 0.05$ vs R

飼育期間中の体重推移は、R群と比較してP群は体重増加にやや抑制傾向を示し、PA群では有意に体重増加が抑制されていた(図1)。続いて肝臓重量の結果は、有意差はないものの、P群と比較してPA群で重量の減少傾向が示された(図2・A)。総脂肪量は、R群と比較してP群およびPA群でいずれも有意に低値を示した(図2・B)。

血清分析の結果、総コレステロールはR群と比較してP群およびPA群のいずれも有意に低値を示し、P群と比較してPA群でも有意に低値であった。中性脂肪や血糖値においては、有意差はないものの、P群と比較してPA群で低下傾向を示した(図3, Means ± SE, * : $p < 0.05$ vs R, ** : $p < 0.01$ vs R, # : $p < 0.05$ vs P)。

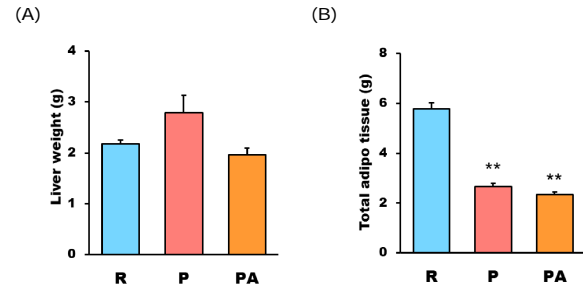


図2 肝臓および脂肪重量

(A) 肝臓重量、(B) 総脂肪量、

Means ± SE, * : $p < 0.05$ vs R, ** : $p < 0.01$ vs R

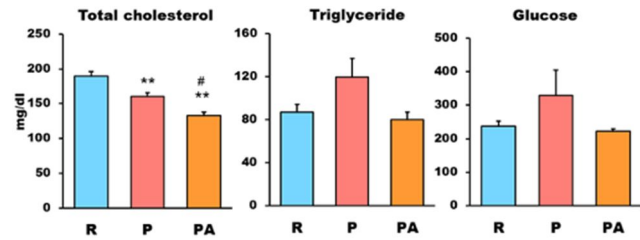


図3 血中脂質およびグルコース濃度

(2) 老化スコアおよび認知機能テスト(パッシブアボイダンス)

老化促進モデルマウス学会で定められた基準に則って、各マウス個体にみられる加齢変化を0から4までの5段階評価で評価し、スコア化した。加齢による変化が強くなるほど点数が高くなる。飼育23週時点での老化スコアは、脳機能を反映する指標の一つである探索行動や逃避行動は、どちらもP群と比較してPA群で有意な低値を示した。よってAPC摂取によって老化に伴う脳機能の低下が抑制された可能性が示された。一方、脱毛や毛づやといった外見に関する指標はP群とPA群で有意な差はなかった(図4, Means ± SE, n=10, * : $p < 0.05$ vs R, ** : $p < 0.01$ vs R, *** : $p < 0.001$ vs R, # : $p < 0.05$ vs P, ## : $p < 0.01$ vs P)。

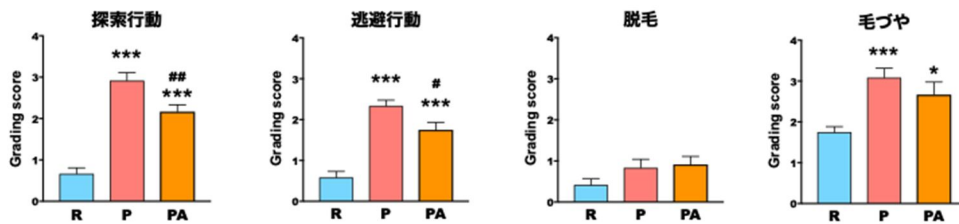


図4 飼育23週目の老化スコア比較

マウスの認知機能を評価するため、試験開始23週間時点でパッシブアボイダンステストを行った。テストケージ(SHINFACTORY, Japan)は、天井のない明室と暗室で構成されており、扉で仕切られている。マウスを明室へ入れ扉を開けると、マウスは暗い場所を好むため、暗室へ移動する。その後扉を閉め、電気刺激(0.5mA)を与えることで暗室へ入ると嫌悪刺激が起こることを経験させる。24時間後、マウスを再び明室へ入れ、暗室へ移動するまでの時間を上限180秒として測定した。明室に留まる時間が長いほど前日の嫌悪刺激を記憶していると判断した。R群と比較してP群では有意に秒数が減少しており、認知機能の低下が示された。一方、P群と比較してPA群では有意に秒数が増加しており、APC摂取による認知機能低下の抑制が示された(図5, Means ± SE, n=10, * : $p < 0.05$ vs R, # : $p < 0.05$ vs P)。

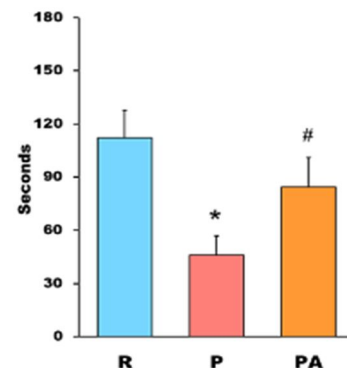


図5 パッシブアボイダンステスト

(3) 血中および脳組織における炎症関連因子の解析

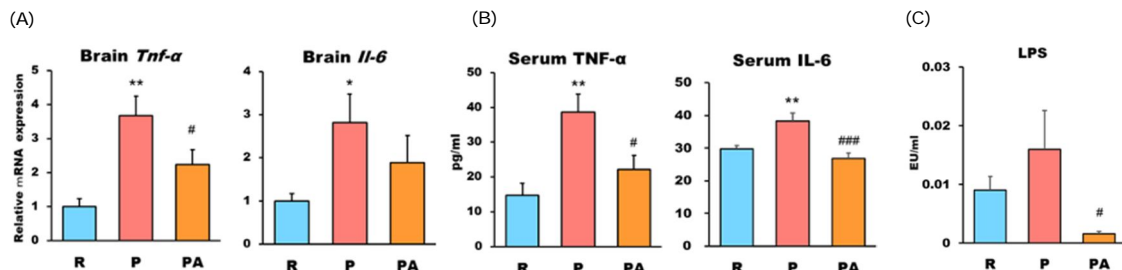


図 6 血清中および脳組織における炎症関連因子の解析

血中での TNF- α 、IL-6 を ELISA 法にて測定した結果、どちらも R 群と比較して P 群で有意に増加しており、P 群と比較して PA 群で有意に低値を示していた(図 6・A)。また、脳組織における *Tnf- α* 、*Il-6* の遺伝子発現結果は、いずれも R 群と比較して P 群で有意に増加し、P 群と比較して PA 群で有意な低値または低下傾向を示した(図 6・B)。また、血中 LPS の濃度を ELISA 法にて測定した結果、R 群と比較して P 群で増加傾向を示し、P 群と比較して PA 群で有意に低値を示していた(図 6・C)。Means \pm SE, n=10, * : $p < 0.05$ vs R, ** : $p < 0.01$ vs R, # : $p < 0.05$ vs P, ## : $p < 0.01$ vs P, ### : $p < 0.001$ vs P

(4) 腸管および脳組織におけるバリア機能関連因子の遺伝子発現

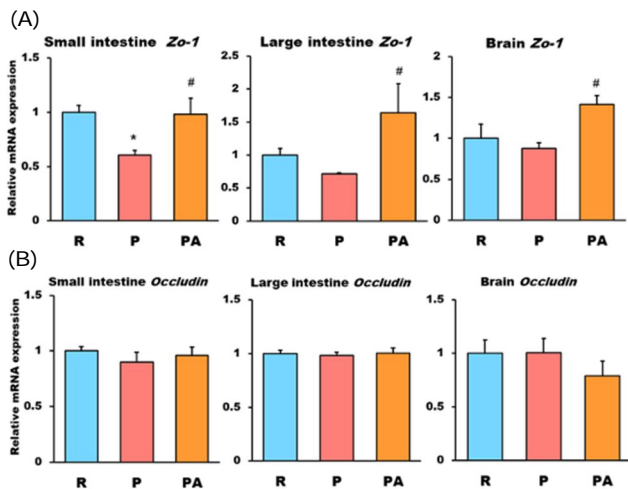


図 7 腸管および脳組織におけるバリア機能関連因子の遺伝子発現

腸管および脳でのバリア機能関連因子の遺伝子発現結果、*Zo-1* は小腸において R 群と比較して P 群で有意に低下しており、大腸や脳においても低下傾向を示していた。また、P 群と比較して PA 群ではいずれも有意に増加を示した(図 11・A)。*Occludin* は群間に有意な変動はなかった(図 11・B)。Means \pm SE, n=10, * : $p < 0.05$ vs R, # : $p < 0.05$ vs P

(5) 腸内細菌叢の解析

盲腸内容物における腸内細菌叢解析の結果を図 8 に示す。(A)は門レベルでの存在比を示しており、(B)はそれぞれの門の存在量を比較したものである。門レベルにおいて R 群、P 群と比較して PA 群で *Firmicutes* 門の有意な減少、*Bacteroidetes* 門の有意な増加を示した(図 8)。また、LPS 産生菌が多い *Proteobacteria* 門は、P 群と比較して PA 群で有意に減少していた。さらに属レベルの発現では、群間ごとに発現量の差異が認められ、それぞれの群で異なった菌叢パターンを示した(図 8)。

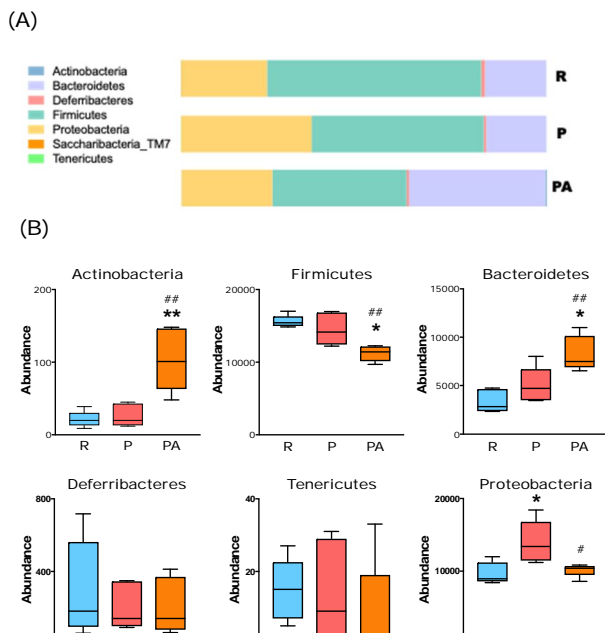


図 8 腸内細菌叢解析

(6) 総括

認知症罹患者と比較して健常者では *Firmicutes* 門の比率が低く、*Bacteroidetes* 門の比率が高い事が報告されている。本研究で APC 摂取により、より健常者に近い腸内細菌叢へ変動することが明らかになった。また、*Proteobacteria* 門は

肥満者やがん患者で増加し、さらに全身炎症の要因となる LPS を産生する腸内細菌の多くが *Proteobacteria* 門に属していることが報告されている。APC 摂取により *Proteobacteria* 門の発現有意に減少していたことから、腸管での LPS 産生量が減少している可能性が考えられた。また、老化や高脂肪食摂取は腸上皮細胞間隙のタイトジャンクションを司る遺伝子の発現減少を引き起こし、その結果、腸管バリア機能が破綻することにより腸透過性が増大し、腸内細菌由来 LPS の血中流入を増加させることが分かっている。今回、APC の摂取は、腸管および脳組織における *Zo-1* が APC 摂取により発現増加したことから、APC 摂取が老化や高脂肪食による腸管バリア機能の破綻を抑制したことが考えられた。実際、LPS の血中濃度は、APC 摂取により有意に低値を示した。また、脳や血中での炎症関連因子 (TNF- α 、IL-6) の結果も同様に APC の摂取により減少していることが示された。すなわち、APC 摂取により、腸内細菌叢の変動を介して LPS の血中への流入が減少し、炎症が抑制されたと考えられる。さらに脳組織においても *Zo-1* の発現が APC 摂取により増加が示された。脳組織には血液脳関門があり、不要な血液成分の流入を防ぎ、有害物質から脳を保護するバリアシステムとして機能している。肥満や老化に伴う慢性炎症は、血液脳関門のバリア機能を低下させることが報告されており、血液脳関門バリア機能低下は海馬の損傷、認知機能低下を引き起こす可能性があることが分かっている。APC 摂取による脳組織のバリア機能関連因子 *Zo-1* の発現増加は、腸管からの LPS 流入量減少に伴う全身の炎症が抑制され、脳の血液脳関門のバリア機能を維持、さらには認知機能低下抑制に寄与したと考えられる。

これまで、カテキンやケルセチンなどの低分子ポリフェノールが腸管から吸収され、血液脳関門を通過し、脳内で抗酸化作用を発揮することで認知機能低下を抑制すると報告されてきた。しかしながら、その吸収量は極わずかであり、認知機能改善の作用機序は未だ不明な点が多いのが現状である。本研究で用いたリンゴ由来のプロシアニジン (APC) は、分子量が大きく殆どが吸収されず、生体利用性が低いことが分かっている。今回の結果では、APC の摂取により *Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門、*Proteobacteria* 門などの腸内細菌叢の変動や腸管、脳組織におけるバリア機能関連因子の増加、血中、脳組織における炎症関連因子の減少が認められた。このことから、カテキンなどの低分子ポリフェノールのような脳組織に対する直接的なアプローチによる認知機能改善作用とは異なり、APC は腸内細菌叢の変動を介してバリア機能改善や炎症の抑制により、認知機能改善に寄与している可能性が示された。食品成分の摂取による認知機能改善効果を腸内細菌叢の変動を介したメカニズムで検討した例はこれまでに報告が無く、本研究の成果は次世代の食品機能性研究へ発展する可能性があり、意義のある研究成果と考えられる。

<参考文献>

Naoki S., et al., Analysis of the relationship between the gut microbiome and dementia: a cross-sectional study conducted in Japan., *Sci Rep.* 9, 1008 (2019)

Rohr MW., et al., Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review., *Adv Nutr.*, nmz061 (2019)

Boutagy NE., et al., Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie.* 124, 11-20 (2016)

Qu C., et al., Protection of blood-brain barrier as a potential mechanism for enriched environments to improve cognitive impairment caused by chronic cerebral hypoperfusion., *Behav Brain Res.* 379 (2019)

Braniste V., et al., The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice., *Science Translational Medicine.* 6, 263ra158 (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nozomi Tokuzato , Hiroshi Sakaue, Masashi Kuroda, Rie Tsutsumi, Toshihiko Shoji, Saeko Masumoto
2. 発表標題 Intake of apple procyanidin improves cognitive function and gut microbiota in senescence accelerated mice.
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenol and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 德里望, 阪上浩, 堤理恵, 黒田雅士, 庄司俊彦, 升本早枝子
2. 発表標題 リンゴ由来プロシアニジンの摂取が老化モデルマウスの認知機能および腸内細菌叢に及ぼす影響
3. 学会等名 第13回日本ポリフェノール学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 德里望, 阪上浩, 堤理恵, 黒田雅士, 庄司俊彦, 升本早枝子
2. 発表標題 リンゴ由来プロシアニジンの摂取が老化モデルマウスの認知機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第66回日本食品科学工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 德里望, 阪上浩, 堤理恵, 黒田雅士, 升本早枝子
2. 発表標題 リンゴ由来プロシアニジンの摂取が老化モデルマウスの肥満・認知機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本糖尿病学会中四国地方会第57回総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 德里望, 升本早枝子, 坂東正浩, 西岡千夏, 高原そら, 堤理恵, 黒田雅士, 阪上浩, 阪上浩
2. 発表標題 老化促進モデルマウスにおいてリング由来プロシアニジンが代謝や酸化ストレスに及ぼす影響
3. 学会等名 日本肥満学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	庄司 俊彦 (Shoji Toshihiko) (90582510)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・ユニット長 (82111)	