

<令和元年度助成>

ポリフェノール類による腸内細菌叢を介した 認知機能低下抑制効果と作用機序の解明

升本 早枝子
(福島大学 食農学類)

1. 背景と目的

World Alzheimer Report 2015 によると、2015 年時点での全世界の認知症患者数は 4,680 万人であり、2030 年には 2 倍の約 7,470 万人に達すると報告している。日本における 65 歳以上の高齢者のうち、認知症の罹患者は現在 460 万人を超え、2025 年には現状の約 1.5 倍の 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、前向き追跡研究である久山町研究や舟形町研究により、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分かり、食習慣が認知機能に関与することが明らかとなった。一方、果物や野菜、茶などに含まれるポリフェノール類は、肥満や糖尿病など生活習慣病予防・改善効果について広く研究されており、最近ではカテキンやケルセチンなどによる認知機能低下抑制効果が報告されている。しかし、ポリフェノール類は腸管での吸収性が低く、種類によって生体利用性が大きく異なることから、生体内での作用機序は不明な点が多い。最近では、腸内細菌による生体調節機能が注目されており、老化に伴う腸内細菌叢の変動が免疫機能や生活習慣病の発症、認知機能などに関与することが明らかになりつつある。また、ポリフェノール類が腸内細菌叢に影響を与えることが報告されている。しかし、ポリフェノール類による腸内細菌叢の変動を介した認知機能改善についての報告はまだ無い。

本研究では、腸内細菌叢を介した認知機能への影響に着目し、生体利用性の異なる代表的なポリフェノール（カテキン類、ヒドロキシ経皮酸類、プロシ

アニジン類）の摂取が、脂質代謝や糖代謝および腸内細菌叢に与える影響を解析するとともに、認知機能や脳組織のバリア機能の解析を行い、ポリフェノールの腸内細菌叢を介した認知能力低下抑制効果およびその作用機序を検討した。

2. 材料と方法

2-1 試料

生体利用性が高いとされる低分子ポリフェノールとして緑茶由来カテキン類高含有粉末（カフェインレス処理済・カテキン類含有率 85%以上：CAT）およびリンゴ由来ヒドロキシ経皮酸類粉末（ヒドロキシ経皮酸類含有率 85%以上：AHC）、生体利用性の低い高重合ポリフェノールとしてリンゴ由来プロシアニジン類粉末（プロシアニジン含率 85%以上：APC）を使用した。

2-2 動物飼育

6 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを 4 週間の予備飼育の後、Control 群（普通食）・HFHS 群（高脂肪高シヨ糖食）・APC 群（高脂肪高シヨ糖食+0.5% APC）・CAT 群（高脂肪高シヨ糖食+0.1% CAT）・AHC 群（高脂肪高シヨ糖食+0.5% AHC）の計 5 群に分けた。試料は APC および AHC は 0.5% 濃度、CAT は 0.1% 濃度となるよう水道水に溶解し、自由飲水で摂取させた。飼育期間中は自由摂食・自由飲水とし、体重・飲水量・摂餌量の測定を週 2 回行った。飼育 12 週後に各群よりランダムに選出した半数のマウスの解剖を実施し、摘出した臓器を各種分析に用い、残りの半数は継続飼育した。飼育 12 週目、32 週目に Y

字迷路試験を実施し、自発行動量と空間作業記憶を算出した。

2-3 マウス行動実験 (Y 字迷路試験)

黒色プラスチックダンボール製の Y 字型迷路 (幅 6 cm・奥行 30 cm・高さ 15 cm のアーム (通路) 3 本を 120° で連結) を使用した。アームそれぞれを A・B・C とし、アーム A にマウスを置き、5 分間自由に探索させ、アームへの進入回数および移動パターンを記録した。記録する際は、マウスの臀部がアームの入り口を通過した時点で「進入した」とみなした。自発行動量は、アームへの総進入回数をそのまま自発行動量とした。総進入回数は、人為的に置いた最初の A を除くため全ての移動回数から 1 を引いて求めた。空間作業記憶は、総進入回数のうち、3 回連続して異なるアームに進入した割合を空間作業記憶とした。まず、マウスが 3 回連続で異なるアームに入った回数を数え、それを自発行動量 (総進入回数) から 1 を引いた値で割り、100 を乗じて百分率で求めた。

2-4 組織染色 (大腸組織におけるムチン層の観察)

解剖時に摘出した大腸をカルノア液に浸漬した。パラフィン切片を作成し、アルシアンブルー染色を行うことにより、大腸組織内のムチンを可視化した。

2-5 遺伝子発現量解析および腸内細菌叢解析

定量 Real Time PCR を用いて、遺伝子発現量解析を行った。摘出した各種臓器から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、Rever Tra Ace[®] qPCR RT Master Mix (東洋紡株式会社) を用いて cDNA を調製した。定量 Real Time PCR は、Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems) を使用し、Step One Plus[™] Real time PCR システム (Applied Biosystems) により、各遺伝子の解析を行った。

腸内細菌叢解析は盲腸内容物中より、NucleoSpin[®] DNA Stool Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる 16S rRNA メ

タゲノム解析を行った。

3. 結果

Y 字迷路試験による自発行動量および空間作業記憶の検討

高脂肪高ショ糖食およびポリフェノール類の摂取による認知機能への影響を検討する為、Y 字迷路試験による自発行動量および空間作業記憶の検討を行った。飼育 12 週においては自発行動量および空間作業記憶いずれにおいても群間差は認められなかったが、32 週では Control 群と比較して高脂肪高ショ糖のみを摂取していた HFHS 群において自発行動量および空間作業記憶の有意な低下が認められた。一方、32 週の APC 群、CAT 群は自発行動量において HFHS 群と比較して有意に自発行動量の低下抑制が示された。また有意差は認められなかったが、APC 群および CAT 群において空間作業記憶の低下が抑制される傾向がみられた (Fig.1)。

3-1 大腸組織におけるムチン層への影響の検討

アルシアンブルー染色によりムチンを可視化し、ポリフェノール類の摂取が大腸組のムチンへ与える影響を検討した。Control 群と比較して HFHS 群では著しいムチンの減少が認められたが、APC 群、CAT 群、AHC 群いずれにおいてもムチンの減少は認められなかった (Fig.2A)。ムチン産生関連因子である *Muc2* の遺伝子発現は、Control 群と比較して HFHS 群では有意な発現量の減少が認められたが、HFHS 群と比較して APC 群では有意に、CAT 群および AHC 群においても有意差は認められないものの、発現量の増加を示した (Fig.2B)。組織染色で認められた HFHS 群におけるムチン層の減少は、高脂肪高ショ糖食の摂取による *Muc2* の発現低下が関連していると考えられる。またポリフェノールの摂取は *Muc2* の遺伝子発現を亢進し、ムチン層の減少を抑制することが示唆された。

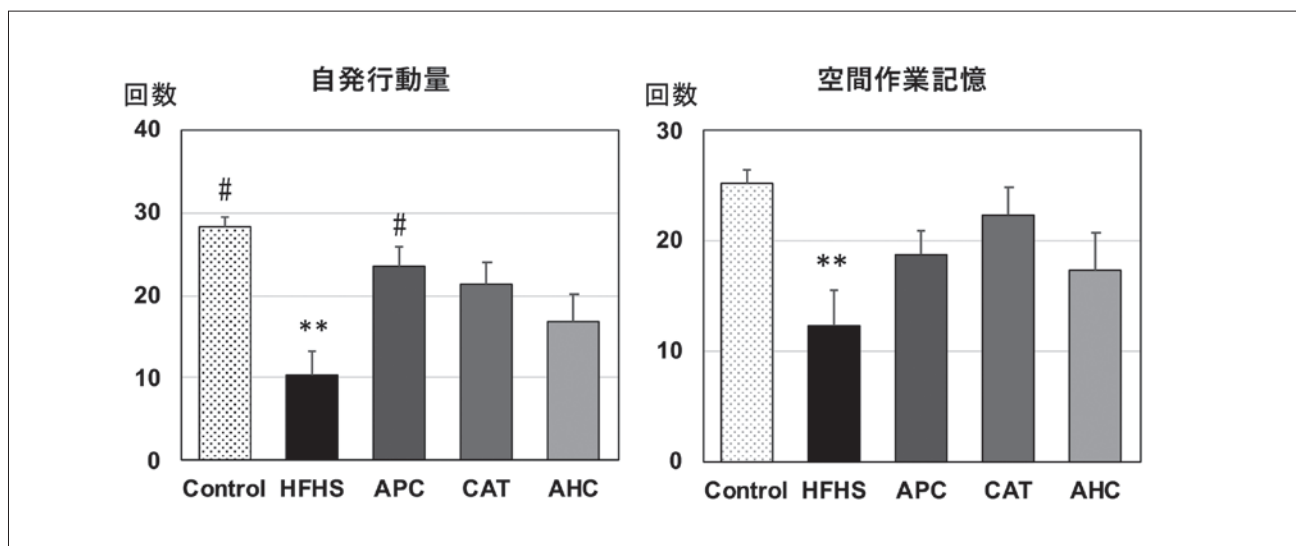


Fig.1 Y字迷路試験による自発行動量および空間作業記憶の測定
飼育 32 週目に自発行動量および空間作業記憶の測定を行った。
n = 8, means $\pm$ S.E, ** p < 0.01 vs Control, # p < 0.05 vs HFHS

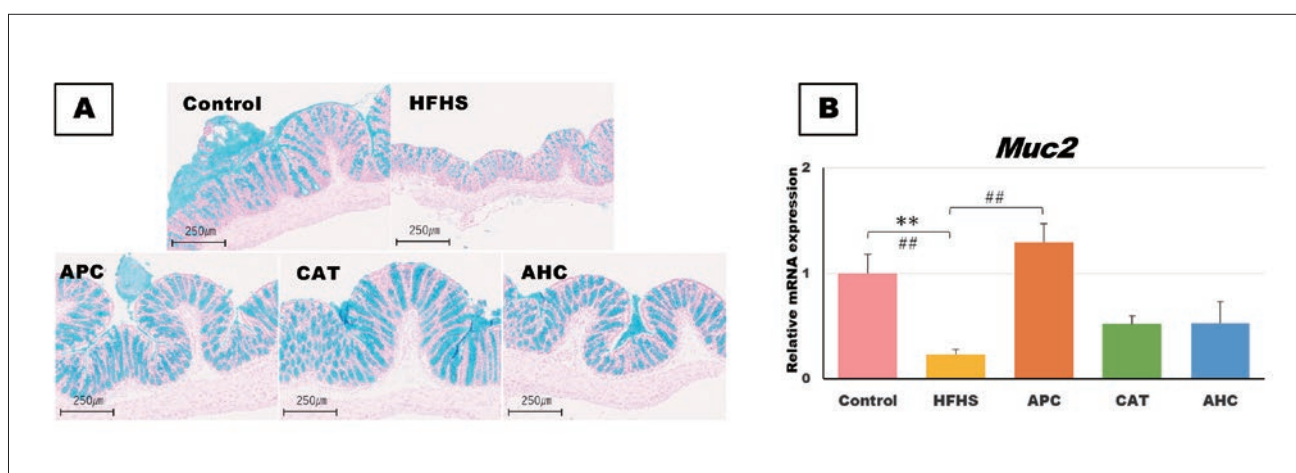


Fig.2 大腸組織におけるムチン層への影響の検討
飼育 12 週目の大腸組織におけるムチン層の状態およびムチン産生関連因子の遺伝子発現を比較検討した。
A: 大腸組織切片のアルシアンブルー染色によるムチン層の視覚化、B: 大腸組織におけるムチン産生関連因子 *Muc2* の遺伝子発現量の比較。
n = 8, means $\pm$ S.E, ** p < 0.01 vs Control, ## p < 0.01 vs HFHS

3-2 バリア機能関連因子の遺伝子発現解析

小腸、大腸および脳組織におけるバリア機能の変化を検討する為、飼育 12 週目の *Tjp-1* (Zonula occludens: ZO) および *Ocln* (Occludin) の遺伝子発現を解析した。*Ocln* は群間における有意な差は認められなかったが、*Tjp-1* の遺伝子発現はいずれの組織においても HFHS 群と比較して、APC 群では有意な発現量の増加が示された。また、脳組織においては、いずれの群においても HFHS 群と比較して有意な発現増加が認められた (Fig.3)。これらのことから高脂肪高ショ糖によるバリア機能の低下が、ポ

リフェノールの摂取により抑制されることが示唆された。

3-3 盲腸内容物における腸内細菌叢解析

門レベルにおける比較では Control 群と比較して高脂肪高ショ糖食を摂取した全ての群において *Firmicutes* の有意な増加が認められたが、APC 群、CAT 群、AHC 群では腸内細菌叢全体における *Firmicutes* の割合が減少し、*Actinobacteria* や *Bacteroidetes* および *Verrucomicrobiota* の割合が増加していることが示された。高脂肪高ショ糖食の影響による腸内細菌

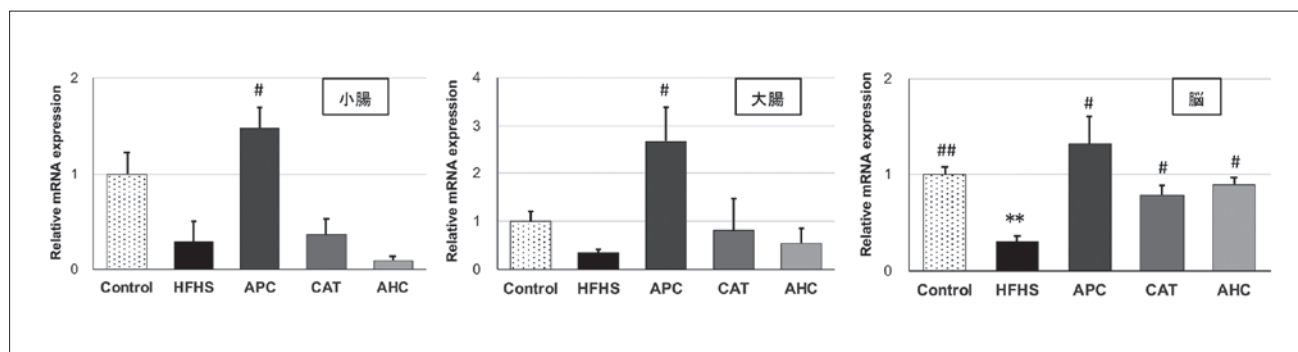


Fig.3 バリア機能関連因子 *Tjp-1* の遺伝子発現解析
飼育 12 週目の小腸、大腸および脳組織におけるバリア機能関連因子 *Tjp-1* の遺伝子発現を比較検討した。
n = 8, means $\pm$ S.E, ^{**} $p < 0.01$ vs Control, ^{##} $p < 0.01$ vs HFHS, [#] $p < 0.05$ vs HFHS

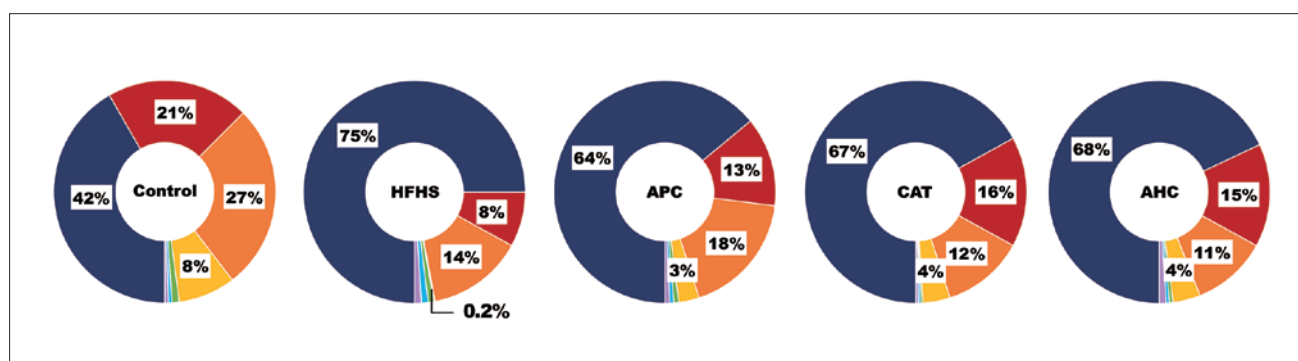


Fig.4 腸内細菌叢の解析
飼育 12 週目の盲腸内容物における腸内細菌叢を門レベルで比較検討した。
■ Firmicutes ■ Bacteroidetes ■ Actinobacteria ■ Verrucomicrobiota

叢の変動が、ポリフェノールの摂取により抑制されていると考えられた。特にムチンの産生に寄与すると報告されている *Akkermansia muciniphila* が属する *Verrucomicrobiota* の割合が増加していることから、*Muc2* の遺伝子発現の増加およびムチン層の増加に寄与していると考えられる (Fig.4)。

いては引き続き老齢期まで飼育を続け、腸内細菌叢および認知機能への影響を明らかにする。また、尿や血液によるメタボローム解析を行い、ポリフェノールの種類による作用機序の差異や腸内細菌叢の変動に伴う代謝物の変化を検証し、認知機能との関連性を明らかにしていきたいと考えている。

4. 今後の展望

腸内細菌叢およびバリア機能関連因子についての詳細な解析を更に進めると共に、半数のマウスにつ

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に心より御礼を申し上げます。

Elucidation of the inhibitory effect of polyphenols on cognitive function decline via gut microbiota and its mechanism

Saeko MASUMOTO

Fukushima University

Diet-induced obesity and impaired glucose tolerance have been reported to increase the risk not only of ischemic heart disease and cancer, but also of dementia, including Alzheimer's disease. On the other hand, polyphenols have been studied extensively due to their preventive and ameliorative effects on lifestyle diseases such as obesity and diabetes, and have recently been reported to affect gut microbiota. Since changes in gut microbiota affect immune function, the onset of lifestyle diseases, and cognitive function, polyphenols are expected to improve cognitive function through such changes. In this study, we investigated the effects of ingestion of representative polyphenols with different bioavailabilities on lipid and sugar metabolism, gut microbiota, cognitive function, and barrier function in C57BL/6J mice. Ingestion of polyphenols increased the ratio of *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobiota*, increased mucin in the intestine, and enhanced barrier function in intestinal and brain tissue.