

# 令和5年度豆類振興事業調査研究 「小豆摂取による腸内細菌の二次代謝 産物を介した認知症予防に関する検討」

大分大学福祉健康科学部教授 後藤 孔郎

## 1. 背景・目的

加齢は全身性に炎症性変化をもたらすことが広く知られている。また加齢はアルツハイマー型認知症（AD）を含む認知症の危険因子であることが多くの研究で報告されている<sup>1)</sup>。一方、加齢は腸内でも炎症性変化をもたらすが、そのような炎症性変化が腸管バリアの破綻を招き、腸管腔内で生成される炎症惹起物質であるlipopolysaccharide（LPS）が腸管外へと漏出し体循環を介して脳に到達することで、脳内炎症が発症しさらには認知機能の低下もおこると考えられている<sup>2, 3)</sup>。具体的には、血中のLPSが血液脳関門を通過後、脳における唯一の免疫担当細胞であるミクログリア上に存在するLPS受容体を結合し、Toll様受容体2を介して炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ が生成される。さらにIL-1 $\beta$ がニューロンにあるIL-1受容体を介してNF- $\kappa$ Bが核内移行しアミロイド $\beta$ （A $\beta$ ）が合成され、A $\beta$ がニューロン内に沈着することで神経細胞死が起り、ADが発症する（図1参照<sup>4)</sup>。

したがって、血中LPS濃度をいかに低下させるかが、認知機能低下を予防するのに重要になってくる。肥満も加齢と同様に認知症発症の危険因子と考えられている。筆者らは肥満モデル動物に小豆パウダーを投与すると、肥満による腸管バリアの破綻が抑制され、血中LPS濃度が低下することを見出している。

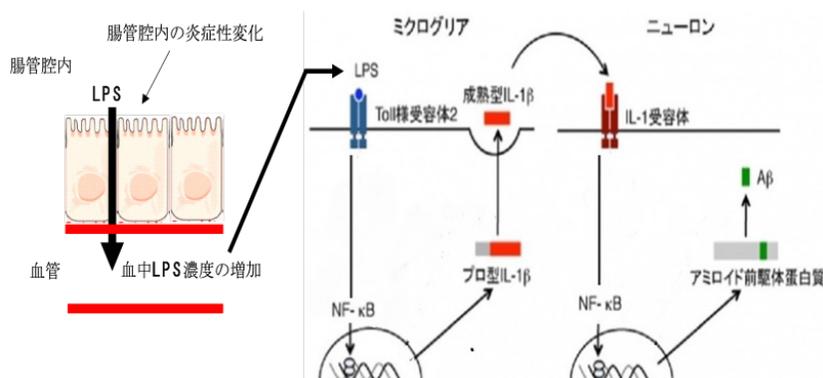


図1 LPSによる脳内でのA $\beta$ の生成メカニズム

近年、食品由来成分や腸内細菌代謝産物と免疫応答制御との関係がますます注目され、“腸内細菌叢仮説”が唱えられている。特に炎症性変化に関しては、腸内細菌の二次代謝産物として腸管内で産生される短鎖脂肪酸（short chain fatty acid: SCFA）の関与が大きいと推測されている<sup>5, 6)</sup>。SCFAは、難消化性の食物繊維が腸内細菌によって分解される際に発生する微生物二次代謝産物であり、その中でも特に多く含まれる酢酸には抗炎症作用がある。しかしながら、酢酸自体は酸性で危険物であり多量に経口摂取できず、また酢酸ナトリウムはナトリウムの過剰摂取につながる可能性がある。そこで腸内細菌代謝産物として腸管内で酢酸を増加させるという発想が重要となってくる。加齢に伴う全身の炎症性変化の発症にも、腸内細菌からのSCFA産生の低下といったことが関与していると推測されている。

本研究は、不溶性食物繊維を多く含む小豆の摂取によって、腸内で酢酸が多く生成されさらに腸管内での炎症を抑制、腸管バリアの保持によって血中LPS濃度を低下させることが認知機能の低下に重要であることを明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究方法

### [1] モデル動物の作製：

若い野性雄マウス（8週齢：ヒトで換算すると20歳台に相当, YOUNG）と老化モデルの雄マウス（56週齢：ヒトで換算すると70歳台に相当, OLD）に対して、通常餌（通常）、通常餌に3%小豆パウダーを添加（小豆）した餌に各々分け、1ヶ月摂取させる。したがって、YOUNG+通常群、YOUNG+小豆群、OLD+通常群、OLD+小豆群の4群を作製する。

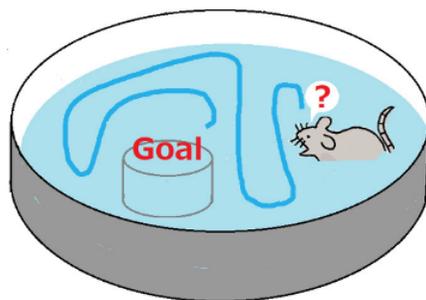
### [2] 小腸に関する評価：

- a) 各群の便を採取し、次世代シーケンサーを用いて、腸内細菌の分布を検討する。T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 法を用いて、腸内細菌解析を検討した。
- b) 腸内環境でいわゆる“悪玉菌”が増加すると、それらの細菌から炎症惹起物質であるLPSが分泌されることが分かっている。今回、血中LPS濃度を測定した。
- c) 腸管バリア機能の保持に必要なタンパク質であるZO-1抗体を用いて、免疫組織学的に腸管バリア機能を評価した。

- d) 小腸内でのTNF- $\alpha$ といった炎症に関与するサイトカインの発現を評価した。
- e) 小腸内での炎症性マクロファージ (M1マクロファージ) の浸潤度について、免疫組織学的に検討した。

### [3] 脳に関する評価：

- a) 脳内のミクログリアの活性化については、ミクログリアが活性化すると細胞体が腫大することから、免疫組織染色を用いて形態学的にミクログリアの活性化を評価した。
- b) 脳内のTNF- $\alpha$  発現を評価した。
- c) モーリス水迷路試験を用いて、空間学習能力と記憶力を評価するための行動実験を行った。マウスを直径100cmのプールに浮かべる、視覚的の手がかりの助けを借りてプールの水面からは見えないようにプラットフォーム (PF) の設置し、マウスがそこにたどり着くと登って休むことが出来る。PFは常に同じ位置に設定しておく。何回かトレーニングを行うと、空間認知機能の高いマウスほどPFにたどり着く時間が短くなる、今回、トレーニング期間を5日間とする。その後、以下の評価を行う。
  - ①PFにたどり着くまでの時間測定する (空間認知機能)。
  - ②PFを取り除き、プールを4等分して各々の区画に存在する時間を測定する (記憶能)。



## 3. 研究結果

### (1) 加齢による腸内細菌叢の悪化や小腸内炎症変化の亢進および血中LPS濃度の増加が小豆の摂取によって改善

加齢により腸管の炎症を抑制する作用をもつ腸内細菌であるBlautia属の減少がみられたが、小豆の摂取はその減少を抑制させた。実際、加齢による小

腸内TNF- $\alpha$ 発現やM1マクロファージ浸潤といった小腸内炎症性変化の亢進や腸管バリア機能の低下も、小豆摂取によって抑制された。また、腸内細菌の二次性代謝産物であるSCFAのうち、酢酸の血中濃度が老化モデルマウスで低下していたが、小豆摂取によってそのような低下が抑制された（図2）。さらに小豆摂取は加齢による血中LPS濃度の増加も抑制させた（図3）。

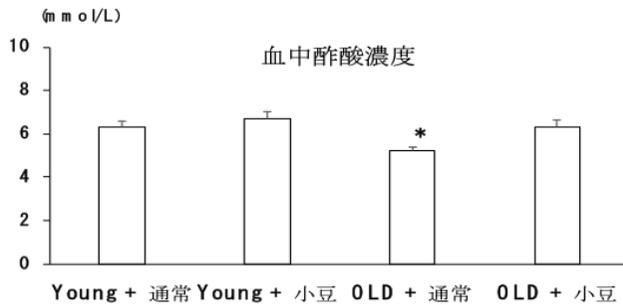


図2 各群での血中酢酸濃度  
\*  $p < 0.05$  vs. Young + 通常

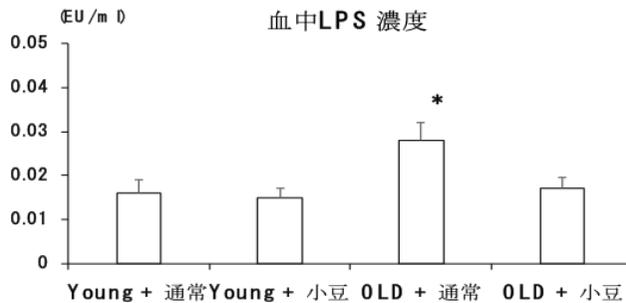


図3 各群での血中LPS濃度  
\*  $p < 0.05$  vs. Young + 通常

## (2) 加齢による脳内炎症性変化の亢進および認知機能の悪化が小豆の摂取によって改善

加齢により脳内での免疫担当細胞であるミクログリアが活性化するが、小豆摂取によって血中LPS濃度の低下作用に伴い、ミクログリアの活性も抑制された（図4）。

さらにモーリスの水迷路試験を用いて、空間認知機能や記憶能について検討した。老化モデルマウスではプール内に設置されたプラットホーム（PF）に辿り着くまでの時間が延長した（空間認知機能の低下を意味している）が、

老化モデルマウスに小豆を摂取させると、PFに辿り着くまでの時間の延長が軽減された（図5）。これは、小豆の摂取によって加齢による空間認知機能の低下が改善したために、PFに早く辿り着いたことを示している。一方、老化モデルマウスでは、PFを取り除いたあとにPFが存在していた区画に滞在していた時間が短くなった（記憶能の低下を意味している）が、小豆を摂取さ

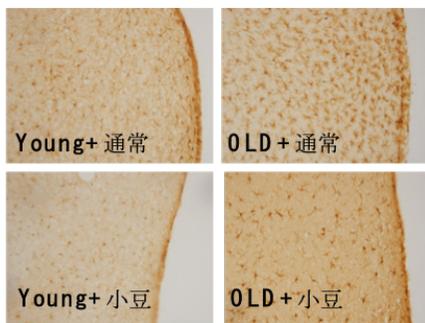


図4 各群での脳内マイクログリアの活性

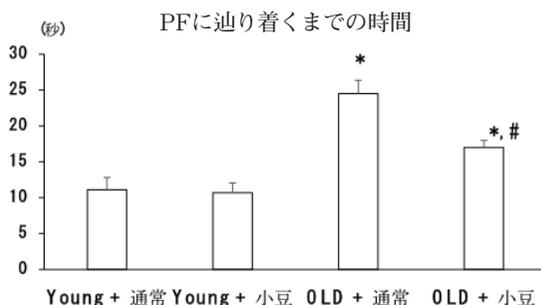


図5 空間認知機能の評価

\*  $p < 0.05$  vs. Young + 通常、#  $p < 0.05$  vs. OLD + 通常

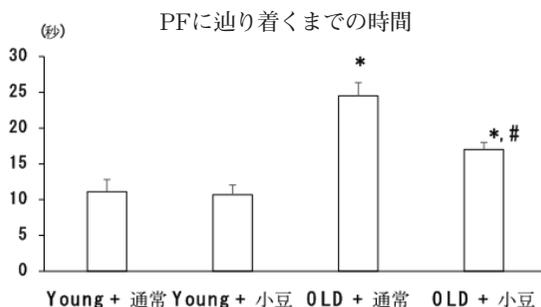


図6 記憶能の評価

\*  $p < 0.05$  vs. Young + 通常、#  $p < 0.05$  vs. OLD + 通常

せると、そのような滞在時間の短縮が軽減された(図6)。これは、加齢によってPFが取り除かれる前の記憶力が低下しているのを、小豆の摂取が改善させたことを示唆するものである。

#### 4. 考察

本研究では、加齢に伴う腸内細菌叢の悪化により腸内細菌からの生成されるSCFAの低下が、小腸内炎症性変化を亢進さらには腸管バリア機能を低下させ、腸管外に漏出したLPSが体循環を介して脳内に到達し、脳内でミクログリア活性といった炎症性変化をもたらし、さらに認知機能を低下させたことが推測される。これに対して小豆の摂取は、腸内細菌からのSCFAの生成を改善させることで腸管内炎症性変化を抑制させ、腸管バリア機能の保護作用が発揮されることが明らかになった。さらに、このような保護作用が血中LPS濃度を正常化させることで脳内での炎症性変化も抑制されて、認知機能の低下が軽減したことが示唆された。加齢が認知機能の低下をもたらすことを考慮すると、腸内でのSCFAの生成を促進させる小豆を多く摂取することが、認知症の発症予防に有効であると考えられる(図7)。

本研究によって、加齢に伴う認知機能の低下には腸内環境の悪化が関与しており、「腸内環境が改善すれば認知機能の低下が軽減される」ことが推測され、新たな認知症発症予防の治療戦略として貢献できると確信する。

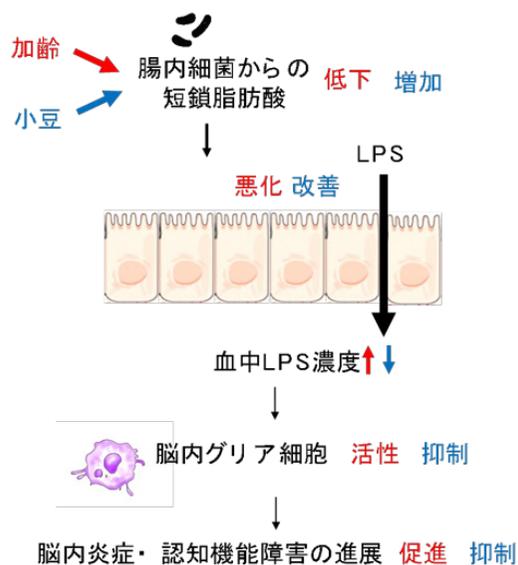


図7 小豆による認知機能改善メカニズム

## 5. 今後の研究の見通し

今回、加齢による認知機能の低下には血中LPSが関与しているということが推測されるが、現段階ではLPSが本当に認知機能低下に影響を及ぼすのかは不明瞭な点がある。今後、LPSを慢性に末梢投与しても本研究と同様の結果がみられるか検討する必要があると考える。さらには、摂取した小豆がLPSと吸着することでLPSが便中に排泄された可能性もあるため、便中のLPS濃度の評価も検討したいと考えている。

国連が国際目標として提示したSDGs「持続可能な世界」が目指すものなかに、Leave No One Behind「誰ひとり取り残さない」とある。ここには権利や福祉の概念が盛り込まれている。日本は世界に冠たる少子超高齢社会であり、今後も高齢者人口は膨れ上がり、反して子供人口は縮み続けることが予想されており、認知症をはじめとする老年性疾患に対してどう持続可能な対応を行っていくのか真剣に取り組む必要がある。高齢者の健康寿命を考えるうえで、小豆製品を日常の食生活にしっかり取り入れることによって、腸内環境の改善へとつながるといったことが解明されることを期待する。

### (引用文献)

- 1) Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR.: Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13(12): 875-887, 2013
- 2) Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW.: Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA*; 108 (Suppl 1) : 4586-4591, 2011
- 3) Biagi E, Candela M, Fairweather-Tait S, Franceschi C, Brigidi P.: Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age* 34(1): 247-267, 2012
- 4) Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, Matsumoto M, Kato D, Ono R, Kiyama H, Moorhouse AJ, Nabekura J, Wake H.: Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun.* 10 (1): 5816, 2019.
- 5) Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP.: The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 9(1): 123, 2009
- 6) Iwao M, Gotoh K, Arakawa M, Endo M, Honda K, Seike M, Murakami K, Shibata H.: Supplementation of branched-chain amino acids decreases fat accumulation in the liver through intestinal microbiota-mediated production of acetic acid. *Sci Rep.* 10(1):18768, 2020