

高ポリアミン食による哺乳類のアンチエイジング

誌名	日本食品科学工学会誌 : Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology
ISSN	1341027X
著者名	早田, 邦康
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	61巻12号
掲載ページ	p. 607-624
発行年月	2014年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



シリーズ—研究小集会 (第 18 回) 大豆部会
解説

高ポリアミン食による哺乳類のアンチエイジング

早田 邦康

自治医科大学大学院循環器病臨床医学研究所

Polyamines

Kuniyasu Soda

Cardiovascular Research Institute, Saitama Medical Center, Jichi Medical University,
1-847 Amanuma, Omiya, Saitama-city, Saitama 330-8503

Considerable differences were found in the incidence of age-associated diseases and the mean lifespan between countries of similar social background. Previously, the inhibition of age-associated disease progression was considered to be attributable to anti-oxidants in foods, such as isoflavones and resveratrol. However, the results of recent studies do not support the role of anti-oxidants in the inhibition of age-associated diseases and senescence. We have reported that healthy foods such as beans, mushrooms, seafoods and vegetables, and healthy dietary traditions such as the Mediterranean diet and Japanese foods are rich in polyamines (spermine and spermidine). Polyamines are synthesized in rapidly growing cells; however, this ability decreases with aging. In addition to *de novo* synthesis, cells can take up polyamines from their surroundings. An important source of whole body polyamines originates in the intestinal lumen, e.g., food-derived polyamines. Polyamines in the intestinal lumen are absorbed quickly, and continuously increased polyamine intake elevates blood polyamine levels in humans and mice. In addition to the many biological activities that help protect cells and tissues from harmful stimuli, we have shown that polyamines suppress pro-inflammatory status, characterized by the suppression of leukocyte function associated antigen 1 (LFA-1) expression and pro-inflammatory cytokine production. Moreover, increased intracellular spermine from extracellular sources enhanced the activities of DNA methyltransferases (DNMT) and suppressed polyamine deficiency-induced genome-wide demethylation/methylation *in vitro*. Long-term increased polyamine intake inhibited age-associated pathological changes and suppressed abnormal genome-wide demethylation/methylation in Jc1 : ICR male mice. In addition, increased polyamine intake was associated with a decreased incidence of colon tumors in BALB/c mice after 1,2-demethylhydrazine administration. Aging is associated with decreased polyamine synthesis, enhanced pro-inflammatory status (e.g., increased LFA-1 expression), decreased DNMT activities, and enhanced genome-wide demethylation/methylation; therefore, dietary polyamine represents a valuable food element to suppress age-associated pathologies and extend the lifespan of humans. (Accepted Jun. 11, 2014)

Keywords : polyamine, spermine, demethylation, age-associated pathology, tumorigenesis

キーワード : ポリアミン, スペルミン, 脱メチル化, 生活習慣病, 発癌

1. はじめに

類似の社会的背景を有する地域間や国家間でも、疾患の発症率や寿命には大きな差がある。工業先進国においては、加齢とともに増加する動脈硬化疾患や癌などの生活習慣病と呼ばれる疾患が寿命を規定する因子となっており、その発症の抑制は重要な課題となっている。

これまでに、健康長寿と関連のある食品や食習慣が指摘されてきた。例えば大豆などの豆類、緑黄色野菜、魚介類などの食品、またこれらの食品を多く含む日本食や地中海食と呼ばれる食習慣である。ヒトを対象にした調査では、

地中海食の食習慣を励行することによって生活習慣病の発症や進行の抑制を達成できると考えられる調査結果が報告されている^{1)~4)}。

そこで、これらの食品に含まれる何らかの成分がヒトの健康長寿に寄与していると考えられ、ポリフェノール（イソフラボンやレスベラトロール）などの抗酸化作用を有する食成分の効果が検討されてきた。なぜならば、生活習慣病や老化は酸化ストレスにより進行すると考えられており^{5)~8)}、酸化ストレスを消去もしくは緩和するこのような抗酸化物質に注目が集まったわけである。しかし、マウスなどの哺乳類を用いた数多くの検討の結果、ポリフェノール

などの抗酸化作用を有する天然成分や類似の生物活性を有する物質の投与による生活習慣病抑制や寿命延長は確認できず、生活習慣病や老化抑制に対する寄与に関して大きな疑問が生じている⁹⁾¹⁰⁾。

われわれは、日本食や地中海食などの健康長寿食や健康長寿との関係がしばしば指摘されている食品中に多く含まれるポリアミンという物質が生活習慣病抑制や寿命延長に寄与していると考えて、研究をおこなってきた^{11)~14)}。そして、ポリアミンを多く含んだ餌を食べ続けたマウスでは、老化の進行が抑制され、寿命が延長する事を報告した^{15)~20)}。アンチエイジング、特に食成分によるアンチエイジングに関する最近の研究結果を概説するとともに、老化抑制や寿命延長に関するポリアミンの生物活性に関して考察を加える。

2. 食物中の健康長寿成分の現状

抗酸化物質を多く含んでいる食習慣や食品は生活習慣病に抑制的に作用するのではないかと考えられてきた。実際に、これらの食品を好む地中海地域の住民は健康長寿であることが指摘され、コホート研究などでも地中海食などの健康長寿食の励行により生活習慣病の改善がえられ、長寿に寄与していると思われる報告結果もある^{1)~3)}。しかし、このことはビタミンやポリフェノール等の抗酸化物質そのものが健康長寿をもたらす生活習慣病の発症を抑制する作用のあることを示しているわけではない。

例えば、強力な抗酸化作用を有する抗酸化ビタミンは、かつてマウスを含めた生物の寿命を延長する効果のあることが報告された²¹⁾。しかし、効果があるとする報告以上に、否定的な検討結果も数多く報告されている^{22)~27)}。ヒトを対象にした介入試験の結果では、抗酸化ビタミンは生活習慣病予防に効果がなく、その過剰投与は生活習慣病を悪化させ死亡率を増加させる可能性を示唆する検討結果が報告されている²⁸⁾²⁹⁾。そこで、ビタミンのような合成の抗酸化物質ではない天然の抗酸化物質であるレスベラトロールを用いた検討も行われた。レスベラトロールは赤ワインに含まれる強力な抗酸化物質であり、ワインを好むヒトは健康で長寿である事が多いことなどから、抗老化作用が期待されてきたが、レスベラトロールはマウスの寿命を延長できない事が報告されている²⁸⁾³⁰⁾。さらに、レスベラトロールのアンチエイジング効果を支持してきた基礎的な背景にも疑問が生じてきた。すなわち、レスベラトロールは長寿遺伝子と考えられてきたサーチュインを活性化せず³¹⁾、サーチュインは動物の寿命を延長する可能性が低いことも報告された³²⁾。

大豆に含まれる抗酸化物質であるイソフラボンも同様で、多くの動物実験やヒトの介入試験などの結果、大豆イソフラボンのアンチエイジングおよび寿命延長効果は否定的となっている³³⁾。ところが、イソフラボンの効果を否定

的に結論づけた論文の中でも、大豆の生活習慣病抑制効果は肯定的に結論づけられている³³⁾。興味深いのは、イソフラボン除去した大豆タンパクにも、イソフラボンに期待される生物活性を発揮できることが報告されていることである³⁴⁾³⁵⁾。すなわち、大豆が発揮する生物活性は、イソフラボン以外の成分による可能性が高いということである。同様に、抗酸化物質の健康長寿効果に関しては否定的な見解が多く存在するにも関わらず、抗酸化物質を多く含む食品や食習慣が健康長寿と密接な関係があることは広く認められている。

老化および様々な生活習慣病は体内で生じる酸化ストレスによる遺伝子、細胞、および組織の障害が重要な原因であると考えられている。よって、酸化ストレスを消去する作用のある抗酸化物質は、数多くの基礎的な実験結果と疫学的な調査結果と相まって大きな期待が集められてきた。しかし、抗酸化物質は、少なくとも哺乳類の寿命を延長できていないのが現状である^{10)21)36)~41)}。

3. ポリアミンとは

ポリアミンはほとんど全ての生物の細胞に存在する物質で、細胞の増殖や分化に必要な不可欠である。また、多くの細胞機能、例えば細胞膜の安定、細胞内シグナルや遺伝子発現などにも重要な役割を担っており^{42)~45)}、ポリアミン欠乏状態は細胞の機能や生存に重大な問題を生じさせる^{46)~53)}。かつて、培養液中にポリアミンを混じて免疫細胞を培養すると、強い細胞障害活性を誘発することが報告された⁵⁴⁾。このことからポリアミンによる細胞障害活性を応用した癌治療に関する多くの研究が行われてきた。しかし、実際には、培養に用いる仔ウシ血清中に存在する serum amine oxidase がポリアミンを分解してアルデヒドや過酸化水素を産生し、これらの物質が細胞障害を発揮することが判った。ヒトの血清中には serum amine oxidase は存在しないために、試験管レベルでの観察はヒト体内では再現できないことがわかってきた。しかし、その後の研究で、ポリアミンは細胞障害を生じることなく、癌の進展に関連する免疫細胞の機能に影響をおよぼすこともわかってきた¹²⁾¹³⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾。

ポリアミンの名前は、この物質がアミノ基を多数持つ事から名付けられている。ヒトの代表的なポリアミンはアミノ基が3個のスペルミジン (Spermidine)、4個のスペルミン (Spermine) である (図1A)。細胞内では、アルギニンやグルタミンから、オルニチン、プトレスシン、スペルミジン、スペルミンの順に合成される (図1B)。分子量は最も大きなスペルミンでも200程度である。アミノ基が2個のプトレスシンはジ (di=2つの) アミンと呼ばれているが、腸管からの吸収、合成酵素の活性の特性や抗炎症作用などの細胞機能におよぼす作用がスペルミジンとスペルミンとは異なっている。ポリアミンはある種の特定の生物に

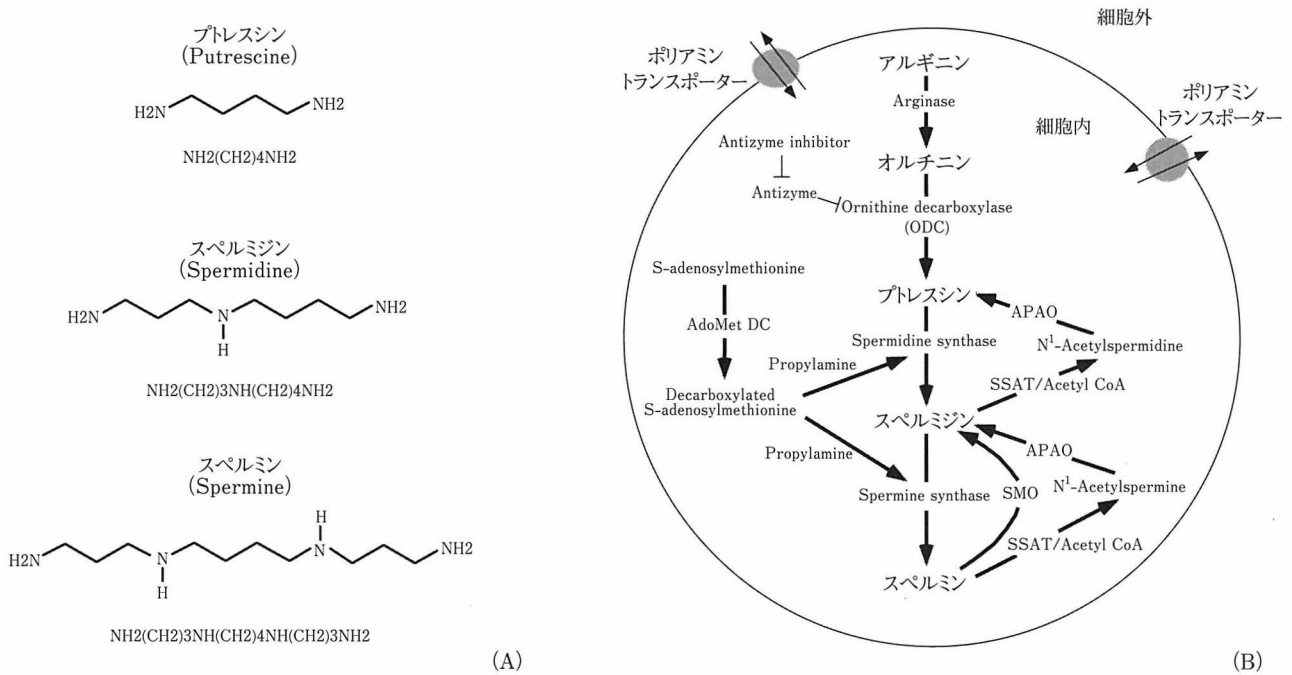


図 1 ポリアミン

(A) 代表的なポリアミンを示す。アミノ基が4個もしくは3個のスペルミンやスペルミジンが代表的なポリアミンである。プトレスシンはアミノ基が2個であるためにジアミンに分類されている。
 (B) ポリアミンの細胞内での代謝経路。

存在する物質ではなく、ヒト、動物、植物、微生物を含んだ、ほとんど全ての生物に共通に存在する。よって、これらの生物やその関連する物質から成り立っている食品は当然ポリアミンを含んでいるが、その濃度は食品毎に大きく異なる^{20)57)~59)}。

ポリアミンは細胞内で合成されるが、特に細胞分裂の活発な細胞、例えば胎児の細胞では活発に合成される。ポリアミン合成酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (Ornithine decarboxylase (ODC)), スペルミジン合成酵素 (Spermidine synthase), およびスペルミン合成酵素 (Spermine synthase) の活性は加齢とともに徐々に低下する。ODC活性は適切な刺激があると活性化されるが、加齢とともに低下したスペルミジンおよびスペルミン合成酵素を活性化させる刺激などは不明である。すなわち、アルギニンやオルニチンを高齢者や高齢の哺乳類に投与するとジアミンであるプトレスシンまでは合成されるが、ポリアミンの合成が刺激されるわけではない^{60)~63)}。動物の組織では、ODC活性は加齢とともに低下し、ポリアミン濃度も徐々に低下する。しかし、成人の血中ポリアミン濃度を測定すると、加齢に伴う低下は決して顕著ではなく、大きな個人差が認められる¹³⁾⁶⁴⁾。この理由は現時点では明らかではないが、食習慣の違いによる食物からのポリアミン供給の差や腸内細菌のポリアミン合成能の差によって生じているのではないかと考えられている。

細胞は細胞内でアルギニンからポリアミンを合成するだ

けでなく、ポリアミントランスポーターを介して細胞外に存在するポリアミンを細胞内に取り込むことができる。また、腸管からの吸収に関しても詳細に検討されており、腸管内のポリアミンは分解される事なく、そのまま体内に吸収され全身の臓器や組織に分布することが判っている⁶⁵⁾⁶⁶⁾。一方、ポリアミンより分子量の小さなプトレスシンは消化管の酵素により分解され、吸収されにくい⁶⁶⁾。

4. Inflamm-aging とポリアミンによる炎症抑制

老化の進行や多くの生活習慣病の発症や進行に慢性炎症が関与していることが明らかにされ、その密接な関連を表す inflamm-aging という造語も作られた^{67)~69)}。炎症とは、生体に発生した何らかの刺激に対して免疫機能が活性化され、そのために生じた疼痛、発赤、発熱などの生体の症候をさす。しかし、生活習慣病における炎症は慢性炎症であり、症状を伴う事なく徐々に進行する。高齢者の免疫細胞の機能は若年者とは異なることが挙げられ、immuno-senescence と呼ばれている。一般的に、高齢者の免疫細胞は活性化されやすく、軽微な刺激に対しても慢性炎症を誘発しやすい状態になっている⁷⁰⁾⁷¹⁾。そのために、高齢者では、慢性炎症が誘発する生活習慣病や老化が進行しやすいと考えられている。Immuno-senescence でよく知られていることの一つとして、免疫細胞の細胞膜に存在する Lymphocyte Function-associated Antigen 1 (LFA-1) という細胞膜分化抗原のタンパク量が加齢とともに増加する事

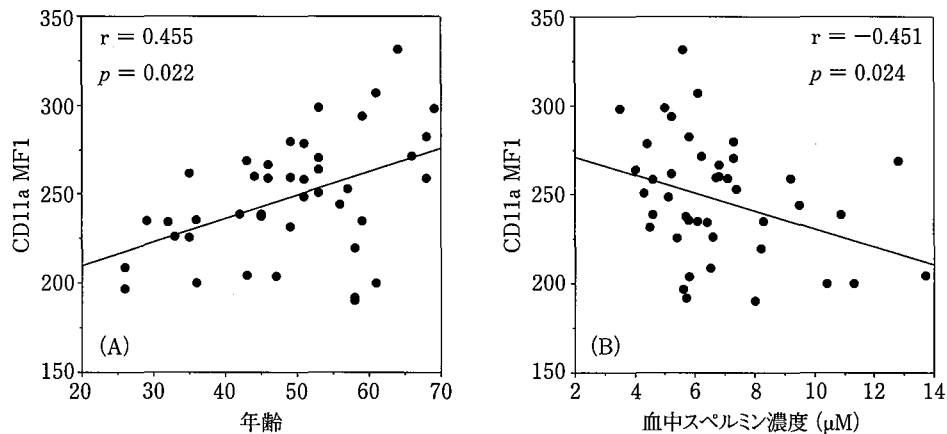


図2 ポリアミン

(A) 年齢とLFA-1 (CD11aMFI) の関係を示す。健康な成人男性から採取した末梢血単核球 (リンパ球および単球) の細胞表面に存在するCD11aの量と年齢の関係を検討した。加齢に伴ってCD11a量が増加することが判る。LFA-1はフローサイトメトリーで測定した。

(B) 血中スペルミン濃度と末梢血単核球細胞表面LFA-1量の関係を示す。年齢に関わらず、血中スペルミン濃度とLFA-1量には負の相関が存在する。

血中スペルミン濃度は高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography) で計測した。

MFI: mean fluorescent intensity.

が挙げられる (図2A)^{72)~75)}。細胞の表面にはLFA-1のようなタンパクが数多く存在し、それぞれ細胞の機能に重要な役割を果たしている。我々は、ポリアミンが炎症性サイトカインの産生を抑制する¹²⁾¹³⁾とともに、LFA-1のタンパク量を減少させることも報告している¹³⁾¹⁵⁾ (図2B)。

LFA-1は血管内皮細胞のICAMs (intercellular adhesion molecules) と選択的に結合する。この結合によって、免疫細胞は活性化され、炎症性サイトカインなどの細胞障害活性を發揮するタンパクを産生する。よって、LFA-1の発現低下は免疫機能の抑制を反映している可能性もある。ところが、*in vitro*での検討では、LFA-1の発現抑制は免疫細胞の機能低下を反映するものではなかった。すなわち、ポリアミン濃度の上昇した免疫細胞は、PhytohemagglutininやConcanavalinA (ConA) 刺激に対する幼若化反応が亢進していた¹³⁾¹⁵⁾。幼若化反応とは、マイトジェンと呼ばれる物質に対するリンパ球の反応の能力を検討する検査である。興味深いことに、LFA-1の増加とPHAやConAに対する反応の低下は加齢とともに進行することがしばしば指摘されている⁶⁹⁾⁷²⁾⁷³⁾⁷⁶⁾⁷⁷⁾。さらに、他の研究者からはポリアミンが細胞の寿命を延長させることが報告されているが⁷⁸⁾、我々もヒトから採取した末梢血中の免疫細胞のNatural killer (NK) 活性の変化を調べたところ、培養によって急速に低下するヒト末梢血単核球のNK活性が、ポリアミンの存在によって長時間にわたって維持され、培養した細胞の生存率も高い事を観察している¹⁵⁾⁷⁹⁾。さらに、ポリアミンは抗炎症作用以外にも、抗酸化作用やラディカルスクベンジャー作用、さらには放射線などの有害な刺激から遺伝子を保護する作用などを有することが数多く報告されている^{12)13)46)~53)80)~105)}。

細胞や遺伝子を外的刺激から保護する生物活性は、ポリアミンが生物の寿命延長に寄与する可能性を示唆するものである。そして、酵母、線虫、シロウジョウバエ、マウスなどの様々な生物においてポリアミンが寿命を延長することが報告されるようになった¹⁷⁾¹⁹⁾⁷⁸⁾。我々が行った検討では、大豆の2-3倍程度のポリアミン濃度になる様に調整した餌 (高ポリアミン餌) をJcl:ICRマウス (オス) に投与し続けると、徐々に血中ポリアミン濃度が上昇し、高齢マウスにおけるLFA-1の発現亢進が抑制され、老化に伴う病理学的な変化の進行が抑制されてマウスの寿命が延長した¹⁷⁾¹⁹⁾ (図3)。

これまで寿命延長や老化抑制の食成分として信じられてきたポリフェノールなどの抗酸化物質も、ポリアミンと同様に、抗炎症、抗酸化、外敵刺激に対する細胞の保護作用などの生物活性を有する。よって、抗酸化物質にもアンチエイジング効果が期待されて数多く検討されてきた。そして、酵母、線虫、シロウジョウバエや寿命の短い魚類などの下位の生物の寿命を延長することが報告されている^{106)~109)}。しかし、抗酸化物質には哺乳類に対する明確な寿命延長効果が認められないことが数多く報告されているのはすでに述べたとおりである^{10)21)~26)36)~41)110)}。

5. ポリアミンと遺伝子のメチル化の関係

ポリアミンはLFA-1とCD44の発現を抑制するが、我々が検討したその他の細胞膜分化抗原はほとんど変化させなかった。LFA-1発現の抑制は濃度依存性および時間依存性であり、発現抑制が明確になるためには72時間程度の長い時間を必要とした¹³⁾。また、LFA-1の発現に関連する細胞内シグナルであるRas-proximate-1 (Rap1)の発現は

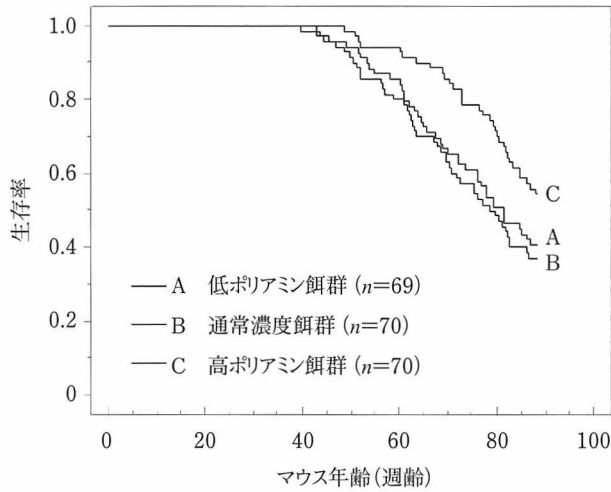


図 3 高ポリアミン食によるマウスの寿命延長

大豆の 2-3 倍程度のポリアミンを含んだ餌を食べ続けたマウス (高ポリアミン餌群) の寿命は低ポリアミン餌群や通常濃度餌群のマウスより長かった。

低ポリアミン餌：通常のマウスの餌から大豆等のポリアミン含量の多い成分を除去した餌。

通常濃度餌：大豆成分等の除去により減少した低ポリアミン餌のポリアミンを、合成ポリアミンを添加して補った餌。

高ポリアミン餌：低ポリアミン餌に合成ポリアミンを加え、大豆のおよそ 3~4 倍程度のポリアミン濃度に調整した餌。

変化しなかった。

そこで、ポリアミンによる LFA-1 および CD44 の発現抑制機序を検討した。ここで興味深いのは、ポリアミンの代謝と遺伝子のメチル化に密接な関係があることである。すなわち、ポリアミンの合成には体内のメチル基の供給源である S アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionin : SAM) が必要であり、ポリアミン代謝の変化により遺伝子へのメチル基の付与に変化が生じる。図 4 にポリアミン合成の経路とメチル化の関係を示す。アルギニンはアルギナーゼの作用を受けてオルニチンになる。オルニチンはオルニチンデカルボキシラーゼ (Ornithine Decarboxylase : ODC) の作用を受けてプトレスシンに変換される。プトレスシンは、スベルミジン/スベルミン合成酵素の作用によってスベルミジンおよびスベルミンになる。その際、脱炭酸アデノシルメチオニン (Decarboxylated S-adenosylmethionine : dcSAM) からプロピルアミン (propylamine) が供給される。dcSAM はアデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (Adenosylmethionine decarboxylase : AdoMetDC) の作用によって、S-adenosylmethionin から合成される (図 4)。

遺伝子のメチル化は、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNA methyltransferase : Dnmt) の作用によって SAM からメチル基がシトシンに付加され、メチルシトシンに変換されることによる¹¹¹⁾。メチル基のドナーである SAM の増加は遺伝子へのメチル基の供与を豊富にするが、dcSAM の増加は Dnmt の活性を抑制する¹¹²⁾¹¹³⁾。実際に、アンチ

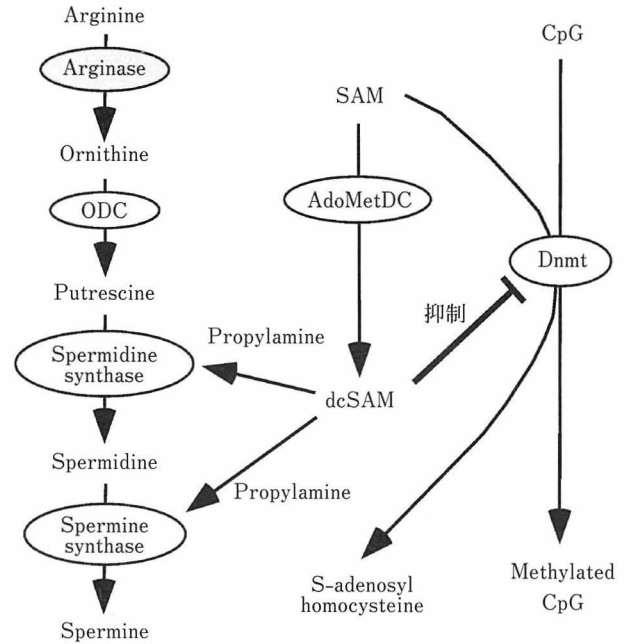


図 4 ポリアミン代謝とメチル化の関係

ポリアミン (spermine と spermidine) はアルギニン (arginine) から合成される。合成の過程で、脱炭酸 s-アデノシルメチオニン (dc-SAM) から propylamine を供与される。アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC) は S-アデノシルメチオニン (SAM) を dcSAM に変換する。SAM は体内のメチル基のドナーであり、dcSAM は DNA メチルトランスフェラーゼ (Dnmt) を抑制する様に作用する。Dnmt は遺伝子のシトシンにメチル基を供与し、メチル化 (メチルシトシン) させる。ODC=Ornithine decarboxylase, SAM=S-adenosylmethionine, dcSAM=Decarboxylated S-adenosylmethionine, AdoMetDC=Adenosylmethionine decarboxylase, Dnmt=DNA-methyltransferase.

ザイムや alpha-d,l- difluoromethylornithine hydrochloride (DFMO) によって ODC 活性を抑制した細胞やスベルミン合成酵素活性の欠損した細胞では、ポリアミン合成に利用されなくなった dcSAM が増加するが^{113)~116)}、同時に遺伝子の脱メチル化も著明になることが報告されている¹¹²⁾¹¹⁷⁾。我々も、Jurkat 細胞を用いて検討したところ、DFMO によって細胞内ポリアミン濃度の低下した細胞では Dnmt の活性は抑制された。さらに、LFA-1 のプロモーター領域のメチル化の状態をバイサルファイトシークエンス法で検討したところ、LFA-1 の発現に重要なプロモーター領域¹¹⁸⁾¹¹⁹⁾ の脱メチル化が進行し、LFA-1 のタンパク量が増加した¹²⁰⁾。

細胞外からポリアミンが供給されて細内ポリアミン濃度が上昇すると、ネガティブフィードバック機構が作用し、ポリアミン合成酵素である AdoMetDC の活性が抑制される¹²¹⁾¹²²⁾。AdoMetDC の活性抑制によって、SAM から dcSAM への変換が抑制され、SAM の増加と dcSAM の減少を生じる¹¹³⁾¹¹⁴⁾。メチル基の供給体である SAM の増加と Dnmt 活性抑制作用のある dcSAM の減少によって Dnmt

は活性化される。Dnmtの活性化はメチル化を促進するために、LFA-1プロモーター領域のメチル化が進行することが推測できる¹²³⁾¹²⁴⁾。実際に、DFMOで処理したJurkat細胞に500 μ Mのスペルミンを添加すると、細胞内のポリアミン濃度が著明に増加し、Dnmtは活性化され、LFA-1のプロモーター領域のメチル化が進行し、LFA-1発現が低下した¹²⁰⁾。プロモーター領域のメチル化とポリアミン代謝の関係は、HT-29細胞におけるCD44の発現においても検討しているが、Jurkat細胞における変化と同様の変化を確認している。すなわち、ポリアミン合成を阻害したHT-29細胞では細胞内ポリアミン濃度が低下し、Dnmtの活性が低下し、CD44の発現に参与するプロモーター領域が脱メチル化を受け、CD44のタンパク量が増加した。DFMOで処理したHT-29細胞に500 μ Mのスペルミンを加えると、Dnmtの活性が亢進し、CD44のプロモーター領域がメチル化を受け、CD44のタンパク量が減少した¹²⁵⁾ (未発表データ)。

このように、ポリアミンによって発現が減少するLFA-1とCD44では、その発現に重要なプロモーター領域のメチル化の進行がポリアミン供給によって生じるためであると考えられた。しかし、その他の部位ではポリアミン添加によって脱メチル化を生じる部位も存在した。そこで、ポリアミンによる遺伝子全体のメチル化におよぼす影響も検討する必要があると考えられた。

6. 加齢と食事が遺伝子のメチル化におよぼす影響

一般的に、いったん付けられたゲノム上のメチル化模様は安定的に次世代の細胞に受け継がれるとされているが¹²⁶⁾、メチル化修飾は可逆的に変化する部位のあることも報告されている¹¹³⁾¹²⁷⁾¹²⁸⁾。また、サケ、マウス、ラット、ウシ、ヒトの脳、肝臓、小腸粘膜、脾臓やT細胞などで、加齢とともに脱メチル化が進行するが^{118)129)~133)}、反対に加齢とともにメチル化が進行する遺伝子領域のあることも報告されている^{134)~136)}。このような加齢に伴う脱メチル化の進行とメチル化の進行は、異常メチル化とも呼ばれる。一般的に、加齢に伴って、ポリアミン合成酵素(ODC)の活性低下¹³⁷⁾、Dnmtの活性低下^{138)~140)}、異常メチル化(脱メチル化およびメチル化の増大)¹²⁸⁾¹⁴¹⁾¹⁴²⁾が進行することが報告されている。そして、遺伝子の異常メチル化は発癌を含めた多くの生活習慣病や老化の原因と考えられている¹⁴³⁾¹⁴⁴⁾。

遺伝子のメチル化の状態は食事内容によっても変化することが報告されている。経口的なメチル基の摂取も重要であることが判っており、メチル基の摂取が欠乏すると、DNAのグローバルな脱メチル化を進行させるとともに、遺伝子特異的な脱メチル化とメチル化も生じる。たとえば、メチル基の欠乏食はc-myc, c-fox, H-ras, p-53の脱メチル化を生じることが報告されている^{145)~149)}。反対に、メチル基を供給することによって、メチル化に影響がおよび、

遺伝子発現にも変化を与えることも報告されている¹²⁰⁾¹²⁴⁾。

7. スペルミンとスペルミジンの生物活性の違い

ポリアミンであるスペルミンとスペルミジンの生物活性には多くの共通点がある。しかし、その生物活性の強さには差があり、また生物の種類によってその重要性が異なる。例えば、酵母や植物などの下位の生物、さらには哺乳類の細胞の増殖と生存にスペルミジンは必須であるが、スペルミンは必ずしも必要ではない⁵⁰⁾¹⁵⁰⁾¹⁵¹⁾。近年になり、ヨーロッパのグループによってスペルミジンが酵母、線虫、ショウジョウバエなどの下位の生物やヒトの細胞の寿命を延長することが報告されているが、スペルミンに関する報告はなされていない⁷⁸⁾。下位の生物と比較すると、免疫機能や神経内分泌機能などが高度に発達した哺乳類においては、スペルミンの生物活性がより重要になる。すなわち、スペルミン欠損マウスではさまざまな障害が生じ、短命であることが分かっている⁵⁰⁾¹⁵²⁾¹⁵³⁾。また、ヒトのスペルミン合成酵素欠損であるSnyder-Robinson症候群においても様々な発育障害が生じることが知られている。

我々の検討でも、スペルミンの生物活性がスペルミジンより強いことがわかった。*in vitro*において、同一濃度におけるヒト末梢血単核球のLFA-1発現抑制効果は、スペルミンが若干スペルミジンより強い程度であった。しかし、培養細胞における細胞内濃度の変化は、スペルミンとスペルミジンでは大きく異なっていた。すなわち、500 μ Mのスペルミンを添加した細胞では、生体内で生じうる範囲のスペルミンの濃度変化が確認されたが、同じ500 μ Mのスペルミジンを添加した際には、生体内で観察されるスペルミジンの濃度変化を大きく越えていた¹³⁾。ボランティアを対象にした検討では、血中スペルミン濃度とLFA-1発現量には負の相関が認められたが、血中スペルミジン濃度と末梢血単核球のLFA-1発現との間には相関が認められなかった。さらには、高ポリアミン食をマウスやヒトが継続すると、血中のスペルミンは上昇するものの、スペルミジンの上昇は顕著ではなかった¹⁶⁾¹⁷⁾。哺乳類において、スペルミジンやプトレスシンよりスペルミンの生物活性が強いことは、他の論文でも指摘されている¹⁵⁴⁾。すなわち、生体内での濃度変化と活性強度の違いを考慮にいと、哺乳類ではスペルミンがより重要であるという事ができる。

スペルミジンによる酵母、線虫やショウジョウバエなどの下位の生物の寿命延長効果には、オートファジー機構や抗炎症作用および抗酸化作用が機序として提唱されている。同様に、強力な抗酸化物質であるレスベラトロールも下位の生物の寿命延長効果が報告されており^{155)~158)}、その機序としてはスペルミジンと同様の生物活性、すなわち、抗酸化作用、オートファジー機構の活性化や抗炎症作用が提唱されている¹⁵⁷⁾¹⁵⁹⁾。ところが、前述したとおり、レスベラ

トロールによる哺乳類の寿命延長効果は否定的な結果が多く報告されている。これらのことは、高ポリアミン餌によるマウスの老化抑制と寿命延長効果は、血中濃度の上昇が確認されたスペルミンが、抗酸化作用、オートファジー機構の活性化や抗炎症作用に加えて、それ以外の生物活性を発揮することによってもたらされている可能性を強く示唆するものであると考えられる。

8. スペルミンによるマウスの寿命延長

加齢とともに Dnmt の活性が低下し^{138)~140)}、遺伝子の異常メチル化 (脱メチル化およびメチル化の増大) が進行¹²⁸⁾¹⁴¹⁾¹⁴²⁾する。この加齢に伴う異常メチル化とは、遺伝子の脱メチル化の進行と^{118)129)131)~133)}領域によってはメチル化の進行が生じる^{134)~136)}ことを意味する。この異常メチル化は、LFA-1 と CD44 のプロモーター領域のメチル化の変化がポリアミン代謝の変化による Dnmt の活性化と関連していたように、加齢とともに低下する Dnmt の活性が原因の一つであると考えられる。そして、異常メチル化が生活習慣病の発症や老化の進行と関連していること^{160)~162)}を考慮に入れると、ポリアミン摂取の増加による異常メチル化の抑制がマウスの寿命延長に寄与したと思われる。

ポリアミンによる異常メチル化の抑制は、遺伝子全体像しか現時点では捕らえていない。脱メチル化・メチル化の状態だけを観察すると、加齢に伴って進行する異常メチル化 (脱メチル化およびメチル化の増強) を高ポリアミン餌が阻止している様に思われる。しかし、ポリアミンの供給がおよぼす遺伝子メチル化の変化がどのような遺伝子のプロモーター領域に生じ、関連するタンパクの発現に影響をおよぼすのかを検討する必要がある。

9. ポリアミンと内分泌機能 (糖代謝と脂質代謝) などの関連

経口的なポリアミン摂取の制限によって血中ポリアミン量は減少し、反対に継続的なポリアミンの供給は血中ポリアミン濃度を増加させる¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁶³⁾。腸管から吸収されたポリアミンは全身に移行する事が判っており⁶⁹⁾⁶⁶⁾、血中ポリアミン濃度の変化は全身の組織のポリアミン濃度を反映していると考えられるので、ポリアミンの経口的な供給の変化によって生じるポリアミン濃度の上昇とその結果として生じるポリアミン代謝の変化がおよぼす内分泌機能への影響を論じる。

Streptozotocin (STZ) を投与して糖尿病を誘発したラットでは、advanced glycation end product (AGE)、中性脂肪、コレステロール、低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein=LDL) が上昇する。ところが、STZ を投与したラットにスペルミンを混じた飲料水をのませたところ、対照群と比較してこれらの値が徐々に低下し、高密度リポタンパク質 (high density lipoprotein=HDL) が上昇する

ことが報告されている¹⁶⁴⁾。また、スペルミンの経口投与は Serum paraoxonase/arylesterase 1 (PON1) と Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) の活性も上昇させた¹⁶⁴⁾。PON1 は血中の HDL に結合して LDL の酸化を抑制し、粥状動脈硬化を防ぐように作用するが、PON1 ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べ有意に血管病変が亢進することが示されている¹⁶⁵⁾。一方、LCAT は遊離コレステロールからコレステロールエステルへの変換酵素で、この作用によって、結果的に末梢組織の細胞膜表面から遊離コレステロールを引き抜く作用がある。これらの作用は、スペルミンの上昇が動脈硬化の抑制に寄与する可能性を示唆するものである。

ポリアミンはインスリンの産生と分泌にも関与しており、インスリンの mRNA を安定化する作用がある。反対に、ポリアミン不足の状態ではブドウ糖に対するプロインスリンの生合成の反応が低下することが報告されている¹⁶⁶⁾¹⁶⁷⁾。同様の結果はアロキサン (alloxan) 投与に対するβ細胞の保護作用の検討でも確認されており、スペルミンによって血糖値や血中の中性脂肪およびコレステロール濃度の上昇が抑制され、acinar cell の再生も加速させることが報告されている¹⁶⁴⁾。

ポリアミンが細胞外から供給されると、細胞内のポリアミン濃度を一定に保とうとするホメオスタシスが働き、ポリアミンの分解酵素である spermine/spermidine-N1-acetyltransferase (SSAT) が活性化する¹⁶⁸⁾¹⁶⁹⁾。ポリアミン摂取によるポリアミン濃度上昇が誘発する SSAT の活性化が代謝におよぼす影響を図 5 に示す (図 5)。SSAT はポリアミン分解酵素であるが、acetyl-CoA を補酵素として利用する。acetyl-CoA はブドウ糖の解糖や脂肪酸のβ酸化によって生成されるが、SSAT の活性化は acetyl-CoA を消費し¹⁷⁰⁾、解糖やβ酸化の活性化を生じさせる。マウスに SSAT を過剰発現させると、白色脂肪内のアセチル CoA が消費され、マロニル CoA の量が減少する¹⁷¹⁾。マロニル CoA は脂肪酸の合成に重要な物質であり、一方でカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 型 (carnitine O-palmitoyltransferase type I=CPT-1) の活性を抑制する作用がある。CPT-1 は、脂肪酸から生成されたアシル-CoA (palmitoyl-CoA) とカルニチンを結合させてアシルカルニチン (palmitoylcarnitine) にする。アシルカルニチンはミトコンドリアへ運ばれβ酸化を受ける。すなわち SSAT の活性化によって生じるマロニル CoA の減少は脂肪酸合成の抑制とβ酸化の亢進を誘発し、蓄積脂肪の減少をもたらす事になる。実際に、SSAT を過剰発現させると、ブドウ糖やパルミチン酸の酸化が 20 倍に増加し、蓄積脂肪の著明な減少が観察され、基礎代謝の亢進、インスリン感受性の亢進、耐糖能の亢進が観察されるようになる¹⁷¹⁾。SSAT の過剰発現マウスでは、血漿コレステロール値の低下も観察されている。その背景としては、胆汁酸の合成亢

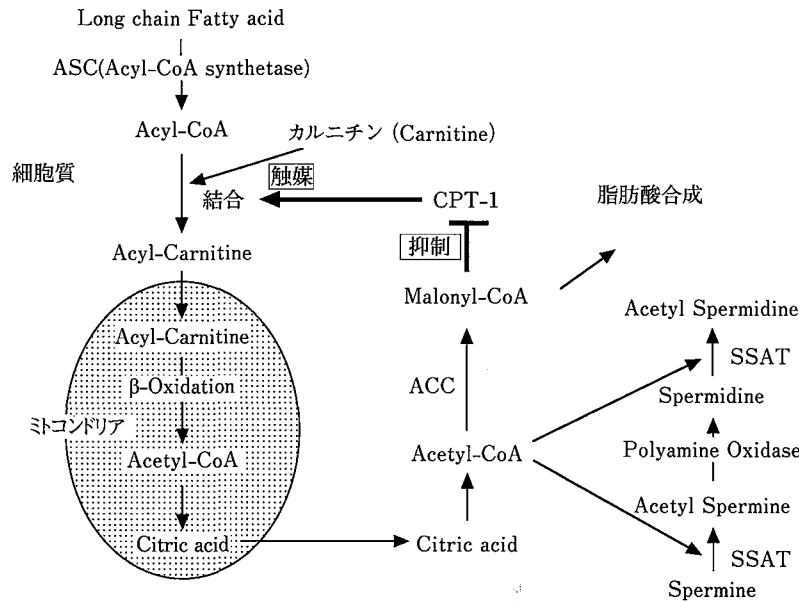


図5 脂質のβ酸化とポリアミンの関係

脂肪酸はエネルギー源として好氣的に代謝される(β酸化)。カルニチンは脂肪酸をミトコンドリア内部に運搬する役割を担う。ミトコンドリア内膜はアシル CoA を直接透過しないため、カルニチンが脂肪酸アシル運搬体の役割を果たす(動植物共通)。脂肪酸アシル CoA はカルニチンと一時的に結合し、脂肪酸アシルカルニチンを生成する。この反応はカルニチンアシルトランスフェラーゼ1 (CPT-1) により触媒される。その後、脂肪酸はミトコンドリア内でβ酸化を受け酢酸にまで分解されながら、生成したアセチル CoA はクエン酸回路を通じてエネルギーに転換される。

細胞の外からのポリアミンの供給は、ポリアミン分解酵素である SSAT を活性する。SSAT は補酵素であるアセチル CoA (Acetyl-CoA) を必要とするので、その活性化はアセチル CoA の消費を促進する。アセチル CoA の減少はマロニル CoA (Malonyl-CoA) 量の減少と関連する。マロニル CoA は脂肪酸合成の原料でもあり、その低下によって脂肪の合成が制限される。また、マロニル CoA は CPT-1 の活性を制御しており、マロニル CoA の減少は CPT-1 の抑制を解除することになり、CPT-1 の作用であるカルニチンとアシル CoA の結合を促進し、脂質のβ酸化が生じやすくなる。

SSAT : spermine/spermidine-N1-acetyltransferase, ACC : Acetyl-CoA Carboxylase, CPT-1 : carnitine palmitoyltransferase 1

進とコレステロール吸収の抑制が関与していると考えられている¹⁷²⁾。また、糖代謝に関与しては、SSAT を過剰発現させたマウスの白色脂肪や肝臓内のミトコンドリアの数は増加するとともに活性化し、エネルギー産生効率を高めるように作用することが確認されている¹⁷³⁾。反対に、SSAT をノックアウトしたマウスでは白色脂肪内のアセチル CoA とマロニル CoA の量が増加し、ブドウ糖やパルミチン酸の酸化が減少し、脂肪組織への脂肪の沈着が認められることが報告されている¹⁷¹⁾。また、インスリン抵抗性を示すようにもなる¹⁷⁴⁾。

加齢に伴って生じる深刻な問題は動脈内での血栓の形成による血流障害である。血栓形成は臓器の血流を阻害して機能不全を誘発し、老化や生活習慣病を進行させる要因となる。これまで、健康長寿食である大豆やその発酵食品の抽出物には血栓の形成を抑制し血栓溶解を促進する作用のあることが知られている^{175)~178)}。しかし、その機序は決して明確ではなかった。炎症の誘発は血栓の形成促進と血栓溶解の抑制を生じることが判っている。ポリアミンの有する炎症抑制作用は血栓形成の抑制と血栓溶解の促進に寄与すると考えられるが、実際にポリアミンが *in vivo* で血栓の形成を抑制し血栓溶解を促進することが報告されてい

る¹⁷⁹⁾¹⁸⁰⁾。

これらのことは、ポリアミンの増加が内分泌機能などに影響をおよぼし、生活習慣病の抑制に寄与している可能性を強く示唆するものである。

10. ポリアミンと発癌

これまでにポリアミンと癌の関係に関する多くの研究がある。癌患者の血中ではポリアミン濃度が上昇して尿中排泄量が増加しており、血中ポリアミン濃度が高く尿中ポリアミン排泄量が多い癌患者の予後は悪いことが明らかにされている^{181)~183)}。癌患者の血中ポリアミン濃度上昇と尿中ポリアミン排泄量増加は増殖の活発な癌細胞内で合成された多量のポリアミンが血中に移行し、尿中に排泄されることによる¹⁸⁴⁾¹⁸⁵⁾。ポリアミンは細胞の成長因子であり、ポリアミン合成が活発な細胞は細胞分裂の能力も高く、そのため癌の増殖速度が速いことがポリアミン濃度の高い癌患者の予後不良の一因と考えられる。さらに、筆者らは、癌細胞が合成するポリアミンが免疫細胞に移行することによって抗腫瘍性免疫機能を抑制し、同様に虚血に陥った癌細胞がポリアミンを取り込む事によってその生存能や遊走浸潤能が亢進する事も明らかにしている¹²⁵⁾¹⁸⁶⁾¹⁸⁷⁾。

ポリアミン合成酵素である ODC の活性は癌細胞で亢進しており、癌細胞や癌組織内のポリアミン濃度は高い^{188)~192)}。ポリアミンが癌の進展を促進するように作用することを考慮すると、ポリアミン濃度を減少させることによって、癌の進展を抑制する治療法の開発が考えられる。実際に癌患者や動物の腫瘍移植モデルにおいて、ODC 活性を阻害してポリアミン合成を抑制することによって腫瘍の発育抑制や転移や浸潤能などの悪性度の軽減、さらには生存期間の延長などの抗腫瘍効果が得られる事が数多くの研究で確認されている^{193)~208)}。

ポリアミン濃度上昇と癌の発育促進の密接な関係は、ポリアミンそのものが発癌を誘導するのではないかという疑問を生じさせた。そこで、ポリアミン濃度を変化させることによって発癌にどのような影響が生じるかが検討された。細胞内ポリアミン濃度を減少させる方法の一つとして、ポリアミンの分解酵素の活性を亢進させることが挙げられる (図 1B)²⁰⁹⁾²¹⁰⁾。発癌に関連する遺伝子異常のある動物にポリアミン分解酵素である SSAT を過剰発現させると腫瘍の発生が抑制されることが報告されている¹⁷⁰⁾。ところが、SSAT を過剰発現させても、必ずしも腫瘍の発育抑制が達成できるわけではない。例えば、小腸に腫瘍が発育する遺伝子異常を有するマウスに SSAT を過剰発現させると腫瘍の発生が増加し²¹¹⁾²¹²⁾、SSAT をノックアウトすると腫瘍の発生が抑制されるという報告がある²¹¹⁾。SSAT の過剰発現によってポリアミン濃度は減少することが推測されるが、実際にはポリアミンの分解の亢進によってフィードバック機構が働き、ポリアミン合成酵素の活性化が生じるためにスペルミンおよびスペルミジン濃度はあまり低下しない¹⁷⁰⁾²¹¹⁾。さらに、発癌を誘導した動物にスペルミン合成酵素を過剰発現させても癌の発生は増加しなかったことが報告されている²¹³⁾。これらの事はポリアミンの生物活性の複雑さを示しているが、同時に発癌にはポリアミン濃度の変化が重要ではなく、ポリアミン代謝の酵素活性の変化が重要な役割を果たしていることを示唆している。

細胞内ポリアミン濃度を上昇させる方法はポリアミン合成酵素である ODC を活性化させることが最も一般的である。ODC は c-Myc などの癌遺伝子のターゲットとして、その下流に存在することがわかっているが²¹⁴⁾²¹⁵⁾、ODC を過剰発現させると細胞の malignant transformation (悪性転換) が生じることが多くの論文で報告されている^{216)~220)}。しかし、非常に興味深いのは、これらの検討で使用されている細胞は、ほとんどすべてが NIH3T3 細胞というマウスの胎児皮膚から分離した培養細胞である。NIH3T3 細胞は正常のマウスの細胞と異なり、癌細胞のように無限に分裂する性質を併せ持っている。ところが、遺伝子変化などによる発癌のリスクを有さない正常細胞に ODC を過剰発現させても Malignant transformation を認めないことが報告されている^{221)~223)}。動物を用いた発癌実験でも、細胞レベルの

検討結果と同様の結果が報告されている。すなわち、発癌物質などの投与により発癌を誘発した動物や、発癌に関連する遺伝子異常や遺伝子修飾を有している動物に ODC を過剰発現させると、発癌が促進されることが報告されている^{224)~228)}。

このような ODC の活性化と発癌の密接な関係から、ODC を阻害することによって癌や腫瘍の発生そのものを抑制する試みがなされてきた^{224)229)~233)}。たしかに、発癌と関連のある遺伝子変異がすでに存在し、ODC の正常な制御機構が失われて自立的な活性化が生じている可能性のある細胞では、細胞増殖促進物質であるポリアミンの合成酵素である ODC の活性を抑制することによって発癌の抑制 (もしくは遅延) が期待できるであろう。実際に、遺伝子異常を有するか発癌物質を投与した動物では、DFMO の投与などによって ODC の活性を抑制すると腫瘍の発生が抑制される^{224)226)227)230)234)~238)}。前述した様に、SSAT を過剰発現させた動物では必ずしも腫瘍の発生が抑制されないことが報告されているが、同時に ODC 活性を抑制すると腫瘍の発育抑制が達成できることが報告されている²¹²⁾。ヒトにおいても、遺伝子異常などによる発癌のリスクを有する家族性大腸腺腫症の患者や大腸ポリープの切除後の患者に ODC 抑制作用のある DFMO を投与すると腫瘍発育を抑制できることが示されている²³²⁾²³⁹⁾。しかし、家族性大腸腺腫症では正常粘膜においても遺伝子変化がすでに存在している。また、大腸ポリープや癌の存在する患者の大腸粘膜では、腫瘍に侵されていない正常部位の粘膜においても遺伝子変化のあることが指摘されている²⁴⁰⁾。

では、発癌と関連のある遺伝子に異常や修飾が生じていない動物に ODC を過剰発現させると、発癌が増えるのか否かという疑問が生じる。ところが、正常なポリアミン合成の恒常性を維持する動物において、ODC を過剰発現させた場合に発癌が促進されたという報告は筆者が探した限りでは見当たらない。つまり、正常動物に DFMO などを投与し、ODC 活性を抑制することによって発癌リスクの低減が可能かどうかは不明である。我々は、ポリアミン濃度の高い餌で飼育したマウス (Jc1: ICR および BALB/c マウスのオス) において、明らかな発癌の増加を認める事なくマウスが長寿になったばかりではなく、1,2-demethylhydrazine によって発癌を刺激した BALB/c マウス (オス) においては、高ポリアミン餌を摂取したマウスの大腸癌発生率は、低ポリアミン濃度の餌を食べたマウスと比較すると低率であったことを報告している¹⁷⁾¹⁸⁾。

ポリアミンは抗酸化作用、抗炎症作用のほか遺伝子保護作用などの外的刺激から細胞を保護する生物活性を数多く有する^{12)13)46)~53)80)~105)}。さらに、前述した様に、ポリアミンの細胞外からの供給は Dnmt を活性化し、ポリアミン不足もしくは加齢に伴って生じる遺伝子の異常メチル化を抑制する作用がある¹⁸⁾¹²⁰⁾。また、ポリアミン代謝の恒常性を維持

している正常細胞において、細胞外からポリアミンが供給されるとODC活性は抑制される(図1)。異常メチル化が発癌の誘因となることや、発癌促進にはODC活性の亢進が重要な役割を演じる事を考慮すると、食物からのポリアミン供給はODC活性抑制や異常メチル化抑制を介して、ヒトを含めた哺乳類における発癌をも抑制する可能性が高いと考える。

11. 疫学調査とポリアミンの関係

これまで、食と健康に関しては多くの疫学調査がなされてきた。その中で、健康長寿に関連する食材としては、全粒粉、大豆などの豆類、野菜、および魚介類が挙げられる。精製していない穀物に含まれる胚芽やふすま、大豆などの豆類や野菜、および魚介類はいずれもカロリー当たりのポリアミン濃度が高い食品である^{20)57)~59)}。一方、生活習慣病の促進と関連のある食品も指摘されてきた。例えば、バター、ミルク、砂糖などを原料とした西洋のデザートがあげられるが、これらの食材はポリアミンをほとんど含まない^{20)57)~59)}。

我々は、国連のデータベースをもとに、国単位のエコロジカルスタディーではあるが、食物供給量からみた各国の食物の嗜好の傾向を検討し、食品中のポリアミンとの関係を調査した。すると、地中海沿岸国はカロリー当たりのポリアミン濃度が高い食品を好んでいることがわかった^{241)~244)}。興味深いのは、健康長寿との関連が示唆されているオリーブオイルやワインはポリアミンを全く含まないが、これらの食品を好む国民はポリアミン濃度の高い食品を好んでいるという事実である²⁴²⁾。ところが、オリーブオイルより動物性脂肪を好む国民やワインより蒸留酒を好む国民はポリアミン濃度の低い食材を好んでいる²⁴²⁾。また、しばしば健康長寿と関連のあることが指摘されるチーズを好む国民はポリアミンが多く含まれた食材を好み、生活習慣病の発症の増加と関連のある牛乳を好む国民はポリアミン含量の少ない食材を好む傾向がある²⁴²⁾。また、健康長寿食として知られている日本人の伝統的な食事は、一般的にポリアミン濃度の高い食材が多い²⁴⁴⁾。さらに、食材の部位によってもポリアミン濃度が異なる。例えば、魚介類の身や肉にはポリアミンは含まれているが、内臓にはさらに高濃度のポリアミンが含まれており、大豆や小豆などの豆類、そして魚卵などの内臓も含む魚介類が中心になり構成される伝統的な日本食には、ポリアミン濃度をさらに高める要素が多く含まれている。

12. おわりに

今後ポリアミンによる哺乳類の老化抑制の機序を、遺伝子のメチル化と関連して、さらに検討する必要がある。また、Jcl:ICRマウス(オス)以外のマウス、さらにはマウス以外の哺乳類においてもポリアミンが老化抑制と寿命延

長効果を発揮するか否かを検討する必要がある。

文 献

- 1) Kouris-Blazos, A., Gnardellis, C., Wahlqvist, M.L., Trichopoulos, D., Lukito, W. and Trichopoulou, A., Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *Br. J. Nutr.*, **82**, 57-61 (1999).
- 2) Lasheras, C., Fernandez, S. and Patterson, A.M., Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71** (4), 987-992 (2000).
- 3) Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C. and Trichopoulos, D., Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N. Engl. J. Med.*, **348** (26), 2599-2608 (2003).
- 4) Trichopoulou, A. and Lagiou, P., Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr. Rev.*, **55** (11 Pt 1), 383-389 (1997).
- 5) Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M. and Nystrom, T., Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*, **299** (5613), 1751-1753 (2003).
- 6) Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K.U. and Breitenbach, M., Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.*, **39** (5), 1166-1173 (2001).
- 7) Beckman, K.B. and Ames, B.N., The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, **78** (2), 547-581 (1998).
- 8) Harman, D., Free radicals in aging. *Mol. Cell Biochem.*, **84** (2), 155-161 (1988).
- 9) Couzin-Frankel, J., Genetics. Aging genes: the sirtuin story unravels. *Science*, **334** (6060), 1194-1198 (2011).
- 10) Strong, R., Miller, R.A., Astle, C.M., Baur, J.A., de Cabo, R., Fernandez, E., Guo, W., Javors, M., Kirkland, J.L., Nelson, J.F., et al., Evaluation of resveratrol, green tea extract, curcumin, oxaloacetic acid, and medium-chain triglyceride oil on life span of genetically heterogeneous mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, **68**, 6-16 (2013).
- 11) Soda, K., Polyamine intake, dietary pattern, and cardiovascular disease. *Med. Hypotheses*, **75** (3), 299-301 (2010).
- 12) Zhang, M., Caragine, T., Wang, H., Cohen, P.S., Botchkina, G., Soda, K., Bianchi, M., Ulrich, P., Cerami, A., Sherry, B., et al., Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J. Exp. Med.*, **185** (10), 1759-1768 (1997).
- 13) 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).
- 14) Soda, K., Polyamines - The Principal Candidate Substance of Soybean-Induced Health. In: *Soybean and health*, Edited by El-Shemy, H. Rijeka: InTech; 2011: 489-502.
- 15) 早田邦康, ポリアミンによるアンチエイジング (その1). *New Food Industry*, **51** (12), 55-64 (2009).
- 16) Soda, K., Kano, Y., Sakuragi, M., Takao, K., Lefor, A. and Konishi, F., Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **55** (4), 361-366 (2009).
- 17) 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** (11), 727-732

- (2009).
- 18) 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-induced tumorigenesis. *PLoS One*, **8** (5), e64357 (2013).
 - 19) 早田邦康, ポリアミンによるアンチエイジング (その 2). *New Food Industry*, **52**, 66-73 (2010).
 - 20) 早田邦康, ポリアミンと健康長寿食. *New Food Industry*, **54** (3), 27-36 (2012).
 - 21) Meydani, M., Lipman, R.D., Han, S.N., Wu, D., Beharka, A., Martin, K.R., Bronson, R., Cao, G., Smith, D. and Meydani, S. N., The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **854**, 352-360 (1998).
 - 22) Berg, B.N., Study of vitamin E supplements in relation to muscular dystrophy and other diseases in aging rats. *J. Gerontol.*, **14** (2), 174-180 (1959).
 - 23) Blackett, A.D. and Hall, D.A., The effects of vitamin E on mouse fitness and survival. *Gerontology*, **27** (3), 133-139 (1981).
 - 24) Morley, A.A. and Trainor, K.J., Lack of an effect of vitamin E on lifespan of mice. *Biogerontology*, **2** (2), 109-112 (2001).
 - 25) Hsieh, C.C. and Lin, B.F., Opposite effects of low and high dose supplementation of vitamin E on survival of MRL/lpr mice. *Nutrition*, **21** (9), 940-948 (2005).
 - 26) Selman, C., McLaren, J.S., Meyer, C., Duncan, J.S., Redman, P., Collins, A.R., Duthie, G.G. and Speakman, J.R., Life-long vitamin C supplementation in combination with cold exposure does not affect oxidative damage or lifespan in mice, but decreases expression of antioxidant protection genes. *Mech. Ageing Dev.*, **127** (12), 897-904 (2006).
 - 27) Sumien, N., Forster, M.J. and Sohal, R.S., Supplementation with vitamin E fails to attenuate oxidative damage in aged mice. *Exp. Gerontol.*, **38** (6), 699-704 (2003).
 - 28) Miller, R.A., Harrison, D.E., Astle, C.M., Baur, J.A., Boyd, A. R., de Cabo, R., Fernandez, E., Flurkey, K., Javors, M.A., Nelson, J. F., *et al.*, Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, **66** (2), 191-201 (2011).
 - 29) Vivekananthan, D.P., Penn, M.S., Sapp, S.K., Hsu, A. and Topol, E.J., Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, **361** (9374), 2017-2023 (2003).
 - 30) Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., *et al.*, Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.*, **8** (2), 157-168 (2008).
 - 31) Kaeberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E. A., Caldwell, S. D., Napper, A., Curtis, R., DiStefano, P.S., Fields, S., *et al.*, Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J. Biol. Chem.*, **280** (17), 17038-17045 (2005).
 - 32) Burnett, C., Valentini, S., Cabreiro, F., Goss, M., Somogyvari, M., Piper, M. D., Hodginott, M., Sutphin, G. L., Leko, V., McElwee, J.J., *et al.*, Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature*, **477** (7365), 482-485 (2011).
 - 33) Sacks, F.M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P. and Winston, M., Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*, **113** (7), 1034-1044 (2006).
 - 34) Balmir, F., Staack, R., Jeffrey, E., Jimenez, M.D., Wang, L. and Potter, S.M., An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *J. Nutr.*, **126** (12), 3046-3053 (1996).
 - 35) Ogborn, M.R., Nitschmann, E., Bankovic-Calic, N., Weiler, H. A. and Aukema, H. M., Dietary soy protein benefit in experimental kidney disease is preserved after isoflavone depletion of diet. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **235** (11), 1315-1320 (2010).
 - 36) Kohn, R.R., Effect of antioxidants on life-span of C57BL mice. *J. Gerontol.*, **26** (3), 378-380 (1971).
 - 37) Tappel, A., Fletcher, B. and Deamer, D., Effect of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse. *J. Gerontol.*, **28** (4), 415-424 (1973).
 - 38) Massie, H.R., Baird, M.B. and Piekieniak, M.J., Ascorbic acid and longevity in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.*, **11** (1-2), 37-41 (1976).
 - 39) Lipman, R.D., Bronson, R.T., Wu, D., Smith, D.E., Prior, R., Cao, G., Han, S.N., Martin, K.R., Meydani, S.N. and Meydani, M., Disease incidence and longevity are unaltered by dietary antioxidant supplementation initiated during middle age in C57BL/6 mice. *Mech. Ageing Dev.*, **103** (3), 269-284 (1998).
 - 40) Holloszy, J.O., Longevity of exercising male rats: effect of an antioxidant supplemented diet. *Mech. Ageing Dev.*, **100** (3), 211-219 (1998).
 - 41) Lee, C.K., Pugh, T.D., Klopp, R.G., Edwards, J., Allison, D.B., Weindruch, R. and Prolla, T.A., The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free Radic. Biol. Med.*, **36** (8), 1043-1057 (2004).
 - 42) Hochman, J., Katz, A. and Bachrach, U., Polyamines and protein kinase II. Effect of polyamines on cyclic AMP-dependent protein kinase from rat liver. *Life Sci.*, **22** (17), 1481-1484 (1978).
 - 43) Tabib, A. and Bachrach, U., Activation of the proto-oncogene *c-myc* and *c-fos* by *c-ras*: involvement of polyamines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202** (2), 720-727 (1994).
 - 44) Panagiotidis, C.A., Artandi, S., Calame, K. and Silverstein, S. J., Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. *Nucleic. Acids Res.*, **23** (10), 1800-1809 (1995).
 - 45) Childs, A. C., Mehta, D.J. and Gerner, E. W., Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci.*, **60** (7), 1394-1406 (2003).
 - 46) Arundel, C.M., Nishioka, K. and Tofilon, P.J., Effects of alpha-difluoromethylornithine-induced polyamine depletion on the radiosensitivity of a human colon carcinoma cell line. *Radiat. Res.*, **114** (3), 634-640 (1988).
 - 47) Chattopadhyay, M.K., Tabor, C.W. and Tabor, H., Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a spe2Delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23** (10), 751-761 (2006).
 - 48) Courdi, A., Milano, G., Bouclier, M. and Lalanne, C.M., Radiosensitization of human tumor cells by alpha-difluoromethylornithine. *Int. J. Cancer*, **38**, 103-107 (1986).
 - 49) Jung, I.L., Oh, T.J. and Kim, I.G., Abnormal growth of polyamine-deficient *Escherichia coli* mutant is partially caused by oxidative stress-induced damage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **418** (2), 125-132 (2003).
 - 50) Mackintosh, C. A. and Pegg, A. E., Effect of spermine synthase deficiency on polyamine biosynthesis and content

- in mice and embryonic fibroblasts, and the sensitivity of fibroblasts to 1,3-bis-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Biochem. J.*, **351 Pt 2**, 439-447 (2000).
- 51) Snyder, R.D. and Sunkara, P.S., Effect of polyamine depletion on DNA damage and repair following UV irradiation of HeLa cells. *Photochem. Photobiol.*, **52** (3), 525-532 (1990).
- 52) Snyder, R. D. and Schroeder, K. K., Radiosensitivity of polyamine-depleted HeLa cells and modulation by the aminothioliol WR-1065. *Radiat. Res.*, **137**, 67-75 (1994).
- 53) Williams, J.R., Casero, R.A. and Dillehay, L.E., The effect of polyamine depletion on the cytotoxic response to PUVA, gamma rays and UVC in V79 cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 1-7 (1994).
- 54) Byrd, W. J., Jacobs, D. M. and Amoss, M. S., Synthetic polyamines added to cultures containing bovine sera reversibly inhibit in vitro parameters of immunity. *Nature*, **267** (5612), 621-623 (1977).
- 55) 早田邦康, ポリアミンによる leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) 抑制. 臨床免疫, **45**, 226-230 (2006).
- 56) 早田邦康, 抗炎症剤としてのアンチエイジングの可能性. *Biotherapy*, **21**, 161-169 (2007).
- 57) Cipolla, B.G., Havouis, R. and Moulinoux, J.P., Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids*, **33** (2), 203-212 (2007).
- 58) Nishibori, N., Fujihara, S. and Akatuki, T., Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. *Food Chem.*, **100** (491-497) (2006).
- 59) 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).
- 60) Teixeira, D., Santaolalia, M.L., Meneu, V. and Alonso, E., Dietary arginine slightly and variably affects tissue polyamine levels in male swiss albino mice. *J. Nutr.*, **132** (12), 3715-3720 (2002).
- 61) Bedford, M.R., Smith, T.K. and Summers, J.D., Effect of dietary ornithine on renal and hepatic polyamine synthesis. *Ann. Nutr. Metab.*, **32** (5-6), 265-270 (1988).
- 62) Schleiffer, R., Duranton, B., Gosse, F., Hasselmann, M. and Raul, F., Blood polyamine levels after oral ornithine load, a diagnostic marker of hyperproliferative premalignant and malignant stages in a model of colon carcinogenesis. *Cancer Detect Prev.*, **24** (6), 542-548 (2000).
- 63) Yoshinaga, K., Ishizuka, J., Evers, B.M., Townsend, C.M., Jr. and Thompson, J.C., Age-related changes in polyamine biosynthesis after fasting and refeeding. *Exp. Gerontol.*, **28** (6), 565-572 (1993).
- 64) Elworthy, P. and Hitchcock, E., Polyamine levels in red blood cells from patient groups of different sex and age. *Biochim. Biophys. Acta.*, **993** (2-3), 212-216 (1989).
- 65) Bardocz, S., Duguid, T.J., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A., White, A. and Ralph, A., The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br. J. Nutr.*, **73** (6), 819-828 (1995).
- 66) Bardocz, S., Brown, D.S., Grant, G. and Pusztai, A., Luminal and basolateral polyamine uptake by rat small intestine stimulated to grow by Phaseolus vulgaris lectin phytohaemagglutinin in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1034**, 46-52 (1990).
- 67) Salvioli, S., Monti, D., Lanzarini, C., Conte, M., Pirazzini, C., Bacalini, M.G., Garagnani, P., Giuliani, C., Fontanesi, E., Ostan, R., et al., Immune system, cell senescence, aging and longevity - Inflamm-aging reappraised. *Curr. Pharm. Des.* (2012).
- 68) Boren, E. and Gershwin, M. E., Inflamm-aging: autoimmunity, and the immune-risk phenotype. *Autoimmun. Rev.*, **3** (5), 401-406 (2004).
- 69) Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G., Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **908**, 244-254 (2000).
- 70) Collerton, J., Martin-Ruiz, C., Davies, K., Hilkens, C. M., Isaacs, J., Kolenda, C., Parker, C., Dunn, M., Catt, M., Jagger, C., et al., Frailty and the role of inflammation, immunosenescence and cellular ageing in the very old: cross-sectional findings from the Newcastle 85 + Study. *Mech. Ageing Dev.*, **133** (6), 456-466 (2012).
- 71) Solana, R., Tarazona, R., Gayoso, I., Lesur, O., Dupuis, G. and Fulop, T., Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin. Immunol.*, **24** (5), 331-341 (2012).
- 72) Powers, D. C., Morley, J. E. and Flood, J. F., Age-related changes in LFA-1 expression, cell adhesion, and PHA-induced proliferation by lymphocytes from senescence-accelerated mouse (SAM)-P/8 and SAM-R/1 substrains. *Cell Immunol.*, **141** (2), 444-456 (1992).
- 73) Chiricolo, M., Morini, M.C., Mancini, R., Beltrandi, E., Belletti, D. and Conte, R., Cell adhesion molecules CD11a and CD18 in blood monocytes in old age and the consequences for immunological dysfunction. Preliminary results. *Gerontology*, **41** (4), 227-234 (1995).
- 74) Okumura, M., Fujii, Y., Takeuchi, Y., Inada, K., Nakahara, K. and Matsuda, H., Age-related accumulation of LFA-1high cells in a CD8 + CD45RAhigh T cell population. *Eur. J. Immunol.*, **23** (5), 1057-1063 (1993).
- 75) Pallis, M., Robins, A. and Powell, R., Quantitative analysis of lymphocyte CD11a using standardized flow cytometry. *Scand. J. Immunol.*, **38** (6), 559-564 (1993).
- 76) Pisciotta, A. V., Westring, D. W., DePrey, C. and Walsh, B., Mitogenic effect of phytohaemagglutinin at different ages. *Nature*, **215** (5097), 193-194 (1967).
- 77) Gillis, S., Kozak, R., Durante, M. and Weksler, M. E., Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. *J. Clin. Invest.*, **67** (4), 937-942 (1981).
- 78) Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Buttner, S., Ruckenstein, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., et al., Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.*, **11** (11), 1305-1314 (2009).
- 79) 早田邦康, 癌病態と栄養成分—ポリアミン, 脂肪酸, ポリフェノールについて— 静脈経腸栄養, **26** (5), 9-18 (2011).
- 80) Ha, H.C., Sirisoma, N.S., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., Woster, P.M., Casero, R.A., Jr., The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95** (19), 11140-11145 (1998).
- 81) Fujisawa, S. and Kadoma, Y., Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res.*, **25** (2A): 965-969 (2005).
- 82) Newton, G.L., Aguilera, J.A., Ward, J.F. and Fahey, R.C., Polyamine-induced compaction and aggregation of DNA—a major factor in radioprotection of chromatin under physiological conditions. *Radiat. Res.*, **145** (6), 776-780 (1996).
- 83) Tadolini, B., Cabrini, L., Landi, L., Varani, E. and Pasquali, P., Polyamine binding to phospholipid vesicles and inhibition of

- lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122** (2), 550-555 (1984).
- 84) Lovaas, E. and Carlin, G., Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. *Free Radic. Biol. Med.*, **11** (5), 455-461 (1991).
- 85) Rajalakshmi, S., Rao, P.M. and Sarma, D.S., Studies on carcinogen chromatin-DNA interaction: inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced methylation of chromatin-DNA by spermine and distamycin, A. *Biochemistry*, **17** (21), 4515-4518 (1978).
- 86) Di Mascio, P., Teixeira, P.C., Onuki, J., Medeiros, M.H., Dornemann, D., Douki, T. and Cadet, J., DNA damage by 5-aminolevulinic and 4,5-dioxovaleric acids in the presence of ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **373** (2), 368-374 (2000).
- 87) Brune, B., Hartzell, P., Nicotera, P. and Orrenius, S., Spermine prevents endonuclease activation and apoptosis in thymocytes. *Exp. Cell Res.*, **195** (2), 323-329 (1991).
- 88) Khan, A.U., Di Mascio, P., Medeiros, M.H. and Wilson, T., Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89** (23), 11428-11430 (1992).
- 89) Held, K.D. and Awad, S., Effects of polyamines and thiols on the radiation sensitivity of bacterial transforming DNA. *Int. J. Radiat. Biol.*, **59** (3), 699-710 (1991).
- 90) Warters, R.L., Newton, G.L., Olive, P.L. and Fahey, R.C., Radioprotection of human cell nuclear DNA by polyamines: radiosensitivity of chromatin is influenced by tightly bound spermine. *Radiat. Res.*, **151** (3), 354-362 (1999).
- 91) Chiu, S. and Oleinick, N.L., Radioprotection of cellular chromatin by the polyamines spermine and putrescine: preferential action against formation of DNA-protein crosslinks. *Radiat. Res.*, **149** (6), 543-549 (1998).
- 92) Spothem-Maurizot, M., Ruiz, S., Sabattier, R. and Charlier, M., Radioprotection of DNA by polyamines. *Int. J. Radiat. Biol.*, **68** (5), 571-577 (1995).
- 93) Newton, G.L., Aguilera, J.A., Ward, J.F. and Fahey, R.C., Effect of polyamine-induced compaction and aggregation of DNA on the formation of radiation-induced strand breaks: quantitative models for cellular radiation damage. *Radiat. Res.*, **148** (3), 272-284 (1997).
- 94) Sy, D., Hugot, S., Savoye, C., Ruiz, S., Charlier, M. and Spothem-Maurizot, M., Radioprotection of DNA by spermine: a molecular modelling approach. *Int. J. Radiat. Biol.*, **75** (8), 953-961 (1999).
- 95) Douki, T., Bretonniere, Y. and Cadet, J., Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. *Radiat. Res.*, **153**, 29-35 (2000).
- 96) Chattopadhyay, M.K., Tabor, C.W. and Tabor, H., Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100** (5), 2261-2265 (2003).
- 97) Ha, H.C., Yager, J.D., Woster, P.A., Casero, R.A., Jr., Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 298-303 (1998).
- 98) Belle, N.A., Dalmolin, G.D., Fonini, G., Rubin, M.A. and Rocha, J.B., Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Res.*, **1008** (2), 245-251 (2004).
- 99) Gaboriau, F., Vaultier, M., Moulinoux, J.P. and Delcros, J.G., Antioxidative properties of natural polyamines and dimethylsilane analogues. *Redox. Rep.*, **10**, 9-18 (2005).
- 100) Sava, I.G., Battaglia, V., Rossi, C.A., Salvi, M. and Toninello, A., Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, **41** (8), 1272-1281 (2006).
- 101) Farbiszewski, R., Bielawska, A., Szymanska, M. and Skrzydlewska, E., Spermine partially normalizes in vivo antioxidant defense potential in certain brain regions in transiently hypoperfused rat brain. *Neurochem. Res.*, **21** (12), 1497-1503 (1996).
- 102) Marzabadi, M.R. and Livaas, E., Spermine prevent iron accumulation and depress lipofuscin accumulation in cultured myocardial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **21** (3), 375-381 (1996).
- 103) Goss, S.P., Hogg, N. and Kalyanaraman, B., The antioxidant effect of spermine NONOate in human low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.*, **8** (5), 800-806 (1995).
- 104) Tadolini, B., Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochem. J.*, **249**, 33-36 (1988).
- 105) Tadolini, B., The influence of polyamine-nucleic acid complexes on Fe²⁺ + autoxidation. *Mol. Cell Biochem.*, **83** (2), 179-185 (1988).
- 106) Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L. and Cellerino, A., Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr. Biol.*, **16** (3), 296-300 (2006).
- 107) Bass, T.M., Weinkove, D., Houthoofd, K., Gems, D. and Partridge, L., Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.*, **128** (10), 546-552 (2007).
- 108) Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., et al., Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, **425** (6954), 191-196 (2003).
- 109) Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M. and Sinclair, D., Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, **430** (7000), 686-689 (2004).
- 110) 早田邦康, 食成分と健康長寿—レスベラトロールの研究結果を中心に—. *New Food Industry*, **55** (4), 14-20 (2013).
- 111) Goll, M.G. and Bestor, T.H., Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 481-514 (2005).
- 112) Tsuji, T., Usui, S., Aida, T., Tachikawa, T., Hu, G.F., Sasaki, A., Matsumura, T., Todd, R. and Wong, D.T., Induction of epithelial differentiation and DNA demethylation in hamster malignant oral keratinocyte by ornithine decarboxylase antizyme. *Oncogene*, **20**, 24-33 (2001).
- 113) Yamamoto, D., Shima, K., Matsuo, K., Nishioka, T., Chen, C. Y., Hu, G.F., Sasaki, A. and Tsuji, T., Ornithine decarboxylase antizyme induces hypomethylation of genome DNA and histone H3 lysine 9 dimethylation (H3K9me2) in human oral cancer cell line. *PLoS One*, **5** (9), e12554 (2010).
- 114) Pegg, A.E., Wang, X., Schwartz, C.E. and McCloskey, D.E., Spermine synthase activity affects the content of decarboxylated S-adenosylmethionine. *Biochem. J.*, **433**, 139-144 (2011).
- 115) Shantz, L.M., Holm, I., Janne, O.A. and Pegg, A.E., Regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity by alterations in the intracellular polyamine content. *Biochem. J.*, **288** (Pt 2), 511-518 (1992).
- 116) Frostesjo, L., Holm, I., Grahn, B., Page, A.W., Bestor, T.H. and

- Heby, O., Interference with DNA methyltransferase activity and genome methylation during F9 teratocarcinoma stem cell differentiation induced by polyamine depletion. *J. Biol. Chem.*, **272** (7), 4359-4366 (1997).
- 117) Papazafiri, P. and Osborne, H. B., Effect of alpha-difluoromethylornithine on DNA methylation in murine erythroleukaemic cells. Relationship to stimulation of induced differentiation. *Biochem. J.*, **242** (2), 479-483 (1987).
- 118) Zhang, Z., Deng, C., Lu, Q. and Richardson, B., Age-dependent DNA methylation changes in the ITGAL (CD11a) promoter. *Mech. Ageing Dev.*, **123** (9), 1257-1268 (2002).
- 119) Richardson, B.C., Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J. Nutr.*, **132** (8 Suppl), 2401S-2405S (2002).
- 120) Kano, Y., Soda, K. and Konishi, F., Suppression of LFA-1 expression by spermine is associated with enhanced methylation of ITGAL, the LFA-1 promoter area. *PLoS One*, **8** (2), e56056 (2013).
- 121) Holm, I., Persson, L., Heby, O. and Seiler, N., Feedback regulation of polyamine synthesis in Ehrlich ascites tumor cells. Analysis using nonmetabolizable derivatives of putrescine and spermine. *Biochim. Biophys. Acta.*, **972** (3), 239-248 (1988).
- 122) Mamont, P.S., Joder-Ohlenbusch, A.M., Nussli, M. and Grove, J., Indirect evidence for a strict negative control of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase by spermidine in rat hepatoma cells. *Biochem. J.*, **196** (2), 411-422 (1981).
- 123) Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. and Ingram, V., Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.*, **203** (4), 971-983 (1988).
- 124) Garcea, R., Daino, L., Pascale, R., Simile, M.M., Puddu, M., Ruggiu, M.E., Seddaiu, M.A., Satta, G., Sequenza, M.J. and Feo, F., Protooncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic liver nodules induced in the rat by diethylnitrosamine: effect of variations of S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio. *Carcinogenesis*, **10** (7), 1183-1192 (1989).
- 125) Tsujinaka, S., Soda, K., Kano, Y. and Konishi, F., Spermine accelerates hypoxia-initiated cancer cell migration. *Int. J. Oncol.*, **38** (2), 305-312 (2011).
- 126) Hashimoto, H., Vertino, P.M. and Cheng, X., Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*, **2** (5), 657-669 (2010).
- 127) Kangaspeska, S., Stride, B., Metivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R.P., Benes, V., Gannon, F. and Reid, G., Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature*, **452** (7183), 112-115 (2008).
- 128) Kim, S.H., Kang, Y.K., Koo, D.B., Kang, M.J., Moon, S.J., Lee, K.K. and Han, Y.M., Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 58-63 (2004).
- 129) Vanyushin, B.F., Tkacheva, S.G. and Belozersky, A.N., Rare bases in animal DNA. *Nature*, **225** (5236), 948-949 (1970).
- 130) Romanov, G. A. and Vaniushin, B. F., [Intragenomic specificity of DNA methylation in animals. Qualitative differences in tissues and changes in methylation of repeating sequences during aging, carcinogenesis and hormonal induction]. *Mol. Biol. (Mosk)*, **14** (2), 357-368 (1980).
- 131) Vanyushin, B.F., Nemirovsky, L.E., Klimenko, V.V., Vasiliev, V.K. and Belozersky, A.N., The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents. *Gerontologia*, **19** (3), 138-152 (1973).
- 132) Wilson, V.L., Smith, R.A., Ma, S. and Cutler, R.G., Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J. Biol. Chem.*, **262** (21), 9948-9951 (1987).
- 133) Golbus, J., Palella, T.D. and Richardson, B.C., Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. *Eur. J. Immunol.*, **20** (8), 1869-1872 (1990).
- 134) Wallace, K., Grau, M.V., Levine, A.J., Shen, L., Hamdan, R., Chen, X., Gui, J., Haile, R.W., Barry, E.L., Ahnen, D., et al., Association between folate levels and CpG Island hypermethylation in normal colorectal mucosa. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **3** (12), 1552-1564 (2010).
- 135) Issa, J.P., Ottaviano, Y. L., Celano, P., Hamilton, S. R., Davidson, N. E. and Baylin, S. B., Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat. Genet.*, **7** (4), 536-540 (1994).
- 136) Issa, J.P., Vertino, P.M., Boehm, C.D., Newsham, I.F. and Baylin, S.B., Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93** (21), 11757-11762 (1996).
- 137) Minois, N., Carmona-Gutierrez, D. and Madeo, F., Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)*, **3** (8), 716-732 (2011).
- 138) Oliveira, A.M., Hemstedt, T.J. and Bading, H., Rescue of aging-associated decline in Dnmt3a2 expression restores cognitive abilities. *Nat. Neurosci.*, **15** (8), 1111-1113 (2012).
- 139) Lopatina, N., Haskell, J. F., Andrews, L. G., Poole, J. C., Saldanha, S. and Tollefsbol, T., Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J. Cell Biochem.*, **84** (2), 324-334 (2002).
- 140) Romanenko, E.B., Demidenko, Z.N. and Vanyushin, B.F., RNA-polymerase, DNA-polymerase, DNA-methyltransferase and sphingomyelinase activities in liver nuclei of rats of different Age. *Biochemistry (Mosc)*, **63** (2), 159-163 (1998).
- 141) Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W. and Reik, W., Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.*, **14 Spec No 1**, R47-58 (2005).
- 142) Li, Y., Liu, Y., Strickland, F.M. and Richardson, B., Age-dependent decreases in DNA methyltransferase levels and low transmethylation micronutrient levels synergize to promote overexpression of genes implicated in autoimmunity and acute coronary syndromes. *Exp. Gerontol.*, **45** (4), 312-322 (2010).
- 143) White, R. and Parker, M., Developmental changes in DNA methylation around prostatic steroid-binding protein genes. *J. Biol. Chem.*, **258** (14), 8943-8948 (1983).
- 144) Ono, T., Uehara, Y., Kurishita, A., Tawa, R. and Sakurai, H., Biological significance of DNA methylation in the ageing process. *Age Ageing*, **22**, S34-43 (1993).
- 145) Christman, J.K., Sheikhejad, G., Dizik, M., Abileah, S. and Wainfan, E., Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. *Carcinogenesis*, **14** (4), 551-557 (1993).
- 146) Bhave, M.R., Wilson, M.J. and Poirier, L.A., c-H-ras and c-K-ras gene hypomethylation in the livers and hepatomas of

- rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis*, **9** (3), 343-348 (1988).
- 147) Zapisek, W.F., Cronin, G.M., Lyn-Cook, B.D. and Poirier, L.A., The onset of oncogene hypomethylation in the livers of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis*, **13** (10), 1869-1872 (1992).
- 148) Pogribny, I.P., Basnakian, A.G., Miller, B.J., Lopatina, N.G., Poirier, L.A. and James, S.J., Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. *Cancer Res.*, **55** (9), 1894-1901 (1995).
- 149) Dizik, M., Christman, J.K. and Wainfan, E., Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis*, **12** (7), 1307-1312 (1991).
- 150) Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W. and Tabor, H., Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine in vivo by the FMS1-amine oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100** (24), 13869-13874 (2003).
- 151) Imai, A., Akiyama, T., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Yamamoto, K. T. and Takahashi, T., Spermine is not essential for survival of *Arabidopsis*. *FEBS Lett.*, **556** (1-3), 148-152 (2004).
- 152) Lorenz, B., Francis, F., Gempel, K., Boddrich, A., Josten, M., Schmahl, W., Schmidt, J., Lehrach, H., Meitinger, T. and Strom, T.M., Spermine deficiency in Gy mice caused by deletion of the spermine synthase gene. *Hum. Mol. Genet.*, **7** (3), 541-547 (1998).
- 153) Wang, X., Ikeguchi, Y., McCloskey, D.E., Nelson, P. and Pegg, A.E., Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse. *J. Biol. Chem.*, **279** (49), 51370-51375 (2004).
- 154) Mendez, J.D., Hernandez Rde, H., L-arginine and polyamine administration protect beta-cells against alloxan diabetogenic effect in Sprague-Dawley rats. *Biomed. Pharmacother.*, **59** (6), 283-289 (2005).
- 155) Baur, J. A. and Sinclair, D. A., Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev Drug Discov.*, **5** (6), 493-506 (2006).
- 156) Yamamoto, M., Suzuki, S.O. and Himeno, M., Resveratrol-induced autophagy in human U373 glioma cells. *Oncol. Lett.*, **1** (3), 489-493 (2010).
- 157) Morselli, E., Marino, G., Bennetzen, M. V., Eisenberg, T., Megalou, E., Schroeder, S., Cabrera, S., Benit, P., Rustin, P., Criollo, A., *et al.*, Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J. Cell Biol.*, **192** (4), 615-629 (2011).
- 158) Jeong, J.K., Moon, M.H., Bae, B.C., Lee, Y.J., Seol, J.W., Kang, H.S., Kim, J.S., Kang, S.J. and Park, S.Y., Autophagy induced by resveratrol prevents human prion protein-mediated neurotoxicity. *Neurosci. Res.*, **73** (2), 99-105 (2012).
- 159) Kanamori, H., Takemura, G., Goto, K., Tsujimoto, A., Ogino, A., Takeyama, T., Kawaguchi, T., Watanabe, T., Morishita, K., Kawasaki, M., *et al.*, Resveratrol reverses remodeling in hearts with large, old myocardial infarctions through enhanced autophagy-activating AMP kinase pathway. *Am. J. Pathol.*, **182** (3), 701-713 (2013).
- 160) Ushijima, T. and Okochi-Takada, E., Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from? *Cancer Sci.*, **96** (4), 206-211 (2005).
- 161) Maegawa, S., Gough, S., Watanabe-Okochi, N., Lu, Y., Zhang, N., Castoro, R.J., Estecio, M.R., Jelinek, J., Liang, S., Kitamura, T., *et al.*, Age-related epigenetic drift in the pathogenesis of MDS and AML. *Genome Res.* 2014.
- 162) Borghini, A., Cervelli, T., Galli, A. and Andreassi, M.G., DNA modifications in atherosclerosis: from the past to the future. *Atherosclerosis*, **230** (2), 202-209 (2013).
- 163) Nishimura, K., Araki, N., Ohnishi, Y. and Kozaki, S., Effects of dietary polyamine deficiency on *Trypanosoma gambiense* infection in rats. *Exp. Parasitol.*, **97** (2), 95-101 (2001).
- 164) Jafarnejad, A., Bathaie, S.Z., Nakhjavani, M. and Hassan, M. Z., Effect of spermine on lipid profile and HDL functionality in the streptozotocin-induced diabetic rat model. *Life Sci.*, **82** (5-6), 301-307 (2008).
- 165) Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.R., Navab, M., Li, W.F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M., *et al.*, Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, **394** (6690), 284-287 (1998).
- 166) Sjöholm, A., Effects of secretagogues on insulin biosynthesis and secretion in polyamine-depleted pancreatic beta-cells. *Am. J. Physiol.*, **270** (4 Pt 1), C1105-1110 (1996).
- 167) Welsh, N., A role for polyamines in glucose-stimulated insulin-gene expression. *Biochem. J.*, **271** (2), 393-397 (1990).
- 168) Persson, L., Polyamine homeostasis. *Essays Biochem.*, **46**, 11-24 (2009).
- 169) Casero, R.A. and Pegg, A.E., Polyamine catabolism and disease. *Biochem. J.*, **421** (3), 323-338 (2009).
- 170) Kee, K., Foster, B.A., Merali, S., Kramer, D.L., Hensen, M.L., Diegelman, P., Kisiel, N., Vujic, S., Mazurchuk, R.V. and Porter, C. W., Activated polyamine catabolism depletes acetyl-CoA pools and suppresses prostate tumor growth in TRAMP mice. *J. Biol. Chem.*, **279** (38), 40076-40083 (2004).
- 171) Jell, J., Merali, S., Hensen, M.L., Mazurchuk, R., Sperryak, J. A., Diegelman, P., Kisiel, N.D., Barrero, C., Deeb, K. K., Alhonen, L., *et al.*, Genetically altered expression of spermidine N1-acetyltransferase affects fat metabolism in mice via acetyl-CoA. *J. Biol. Chem.*, **282** (11), 8404-8413 (2007).
- 172) Pirinen, E., Gylling, H., Ikonen, P., Yaluri, N., Heikkinen, S., Pietila, M., Kuulasmaa, T., Tusa, M., Cerrada-Gimenez, M., Pihlajamaki, J., *et al.*, Activated polyamine catabolism leads to low cholesterol levels by enhancing bile acid synthesis. *Amino Acids*, **38** (2), 549-560 (2010).
- 173) Koponen, T., Cerrada-Gimenez, M., Pirinen, E., Hohtola, E., Paananen, J., Vuohelainen, S., Tusa, M., Pirnes-Karhu, S., Heikkinen, S., Virkamaki, A., *et al.*, The activation of hepatic and muscle polyamine catabolism improves glucose homeostasis. *Amino Acids*, **42** (2-3), 427-440 (2012).
- 174) Niiranen, K., Keinanen, T.A., Pirinen, E., Heikkinen, S., Tusa, M., Fatrai, S., Suppola, S., Pietila, M., Uimari, A., Laakso, M., *et al.*, Mice with targeted disruption of spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene maintain nearly normal tissue polyamine homeostasis but show signs of insulin resistance upon aging. *J. Cell Mol Med.*, **10** (4), 933-945 (2006).
- 175) Potter SM., Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. *Nutr. Rev.*, **56** (8), 231-235 (1998).
- 176) Wilcox, J.N. and Blumenthal, B.F., Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. *J. Nutr.*, **125** (3 Suppl):631S-638S (1995).
- 177) Suzuki, Y., Kondo, K., Ichise, H., Tsukamoto, Y., Urano, T. and Umemura, K., Dietary supplementation with fermented soybeans suppresses intimal thickening. *Nutrition*, **19** (3),

- 261-264 (2003).
- 178) Suzuki, Y., Kondo, K., Matsumoto, Y., Zhao, B.Q., Otsuguro, K., Maeda, T., Tsukamoto, Y., Urano, T. and Umemura, K., Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. *Life Sci.*, **73** (10), 1289-1298 (2003).
- 179) Pakala, R., Inhibition of arterial thrombosis by polyamines in a canine coronary artery injury model. *Thromb Res.*, **110**, 47-51 (2003).
- 180) 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** (6), 546-550 (2000).
- 181) Bergeron, C., Bansard, J. Y., Le Moine, P., Bouet, F., Goasguen, J.E., Moulinoux, J.P., Le Gall, E. and Catros-Quemener, V., Erythrocyte spermine levels: a prognostic parameter in childhood common acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **11**, 31-36 (1997).
- 182) Cipolla, B., Guille, F., Moulinoux, J.P., Bansard, J.Y., Roth, S., Staerman, F., Corbel, L., Quemener, V. and Lobel, B., Erythrocyte polyamines and prognosis in stage D2 prostatic carcinoma patients. *J. Urol.*, **151** (3), 629-633 (1994).
- 183) Nishiguchi, S., Tamori, A., Koh, N., Fujimoto, S., Takeda, T., Shiomi, S., Oka, H., Yano, Y., Otani, S. and Kuroki, T., Erythrocyte-binding polyamine as a tumor growth marker for human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, **49** (44), 504-507 (2002).
- 184) Moulinoux, J.P., Quemener, V., Khan, N.A., Delcros, J.G. and Havouis, R., Spermidine uptake by erythrocytes from normal and Lewis lung carcinoma (3LL) grafted mice: I. In vitro study. *Anticancer Res.*, **9** (4), 1057-1062 (1989).
- 185) Moulinoux, J.P., Quemener, V., Khan, N.A., Havouis, R. and Martin, C., Spermidine uptake by erythrocytes from normal and Lewis lung carcinoma (3LL) grafted mice: II. In vivo study. *Anticancer Res.*, **9** (4), 1063-1067 (1989).
- 186) Kano, Y., Soda, K., Nakamura, T., Saitoh, M., Kawakami, M. and Konishi, F., Increased blood spermine levels decrease the cytotoxic activity of lymphokine-activated killer cells: a novel mechanism of cancer evasion. *Cancer Immunol. Immunother.*, **56** (6), 771-781 (2007).
- 187) Soda, K., The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **30**, 95 (2011).
- 188) Canizares, F., Salinas, J., de las Heras, M., Diaz, J., Tovar, I., Martinez, P. and Penafiel, R., Prognostic value of ornithine decarboxylase and polyamines in human breast cancer: correlation with clinicopathologic parameters. *Clin. Cancer Res.*, **5** (8), 2035-2041 (1999).
- 189) Weiss, T.S., Bernhardt, G., Buschauer, A., Thasler, W.E., Dolgner, D., Zirngibl, H. and Jauch, K.W., Polyamine levels of human colorectal adenocarcinomas are correlated with tumor stage and grade. *Int. J. Colorectal Dis.*, **17** (6), 381-387 (2002).
- 190) Rozhin, J., Wilson, P.S., Bull, A.W. and Nigro, N.D., Ornithine decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res.*, **44** (8), 3226-3230 (1984).
- 191) Porter, C.W., Herrera-Ornelas, L., Pera, P., Petrelli, N.F. and Mittelman, A., Polyamine biosynthetic activity in normal and neoplastic human colorectal tissues. *Cancer*, **60** (6), 1275-1281 (1987).
- 192) Naso, P., Lanteri, R., Acquaviva, R., Licata, F., Bonanno, G. and Licata, A., Polyamines levels in colorectal cancer: new markers? *Hepatogastroenterology*, **52** (62), 433-436 (2005).
- 193) Upp, J. R., Jr., Beauchamp, R. D., Townsend, C. M., Jr., Barranco, S. C., Singh, P., Rajaraman, S., James, E. and Thompson, J. C., Inhibition of human gastric adenocarcinoma xenograft growth in nude mice by alpha-difluoromethylornithine. *Cancer Res.*, **48** (11), 3265-3269 (1988).
- 194) Sunkara, P.S. and Rosenberger, A.L., Antimetastatic activity of DL-alpha-difluoromethylornithine, an inhibitor of polyamine biosynthesis, in mice. *Cancer Res.*, **47** (4), 933-935 (1987).
- 195) Seiler, N., Sarhan, S., Grauffel, C., Jones, R., Knodgen, B. and Moulinoux, J.P., Endogenous and exogenous polyamines in support of tumor growth. *Cancer Res.*, **50** (16), 5077-5083 (1990).
- 196) Niederkorn, J. Y., Sanborn, G.E. and Gamel, J.W., Suicide enzyme inhibition as a chemotherapeutic strategy for controlling metastases derived from intraocular melanomas. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.*, **28** (11), 1844-1850 (1987).
- 197) Matters, G. L., Manni, A. and Bond, J. S., Inhibitors of polyamine biosynthesis decrease the expression of the metalloproteases meprin alpha and MMP-7 in hormone-independent human breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, **22** (4), 331-339 (2005).
- 198) Manni, A., Washington, S., Hu, X., Griffith, J.W., Bruggeman, R., Demers, L.M., Mauger, D. and Verderame, M.F., Effects of polyamine synthesis inhibitors on primary tumor features and metastatic capacity of human breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, **22** (3), 255-263 (2005).
- 199) Luk, G.D., Abeloff, M.D., Griffin, C. A. and Baylin, S.B., Successful treatment with DL-alpha-difluoromethylornithine in established human small cell variant lung carcinoma implants in athymic mice. *Cancer Res.*, **43** (9), 4239-4243 (1983).
- 200) Levin, V.A., Hess, K.R., Choucair, A., Flynn, P.J., Jaeckle, K. A., Kyritsis, A.P., Yung, W.K., Prados, M.D., Bruner, J.M., Ictech, S., et al., Phase III randomized study of post-radiotherapy chemotherapy with combination alpha-difluoromethylornithine-PCV versus PCV for anaplastic gliomas. *Clin. Cancer Res.*, **9** (3), 981-990 (2003).
- 201) Kubota, S., Ohsawa, N. and Takaku, F., Effects of DL-alpha-difluoromethylornithine on the growth and metastasis of B16 melanoma in vivo. *Int. J. Cancer*, **39** (2), 244-247 (1987).
- 202) Klein, S., Miret, J.J., Algranati, I.D., de Lustig ES., Effect of alpha-difluoromethylornithine in lung metastases before and after surgery of primary adenocarcinoma tumors in mice. *Biol. Cell*, **53**, 33-36 (1985).
- 203) Kingsnorth, A.N., McCann, P.P., Diekema, K.A., Ross, J.S. and Malt, R.A., Effects of alpha-difluoromethylornithine on the growth of experimental Wilms' tumor and renal adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **43** (9), 4031-4034 (1983).
- 204) Jun, J. Y., Griffith, J. W., Bruggeman, R., Washington, S., Demers, L.M., Verderame, M.F. and Manni, A., Effects of polyamine depletion by alpha-difluoromethylornithine on in vitro and in vivo biological properties of 4T1 murine mammary cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, **107**, 33-40 (2008).
- 205) de Lustig, E.S., Klein, S., Fuchs, A. and Algranati, I.D., Long-term treatment of tumor-operated mice with high doses of alpha-difluoromethylornithine. *Biol. Cell*, **58** (3), 233-237 (1986).
- 206) Claverie, N. and Mamont, P.S., Comparative antitumor properties in rodents of irreversible inhibitors of L-ornithine decarboxylase, used as such or as prodrugs. *Cancer Res.*, **49** (16), 4466-4471 (1989).
- 207) Chen, Y., Weeks, R.S., Burns, M.R., Boorman, D.W., Klein-

- Szanto, A., O'Brien TG., Combination therapy with 2-difluoromethylornithine and a polyamine transport inhibitor against murine squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, **118** (9), 2344-2349 (2006).
- 208) Barthoelens, J., Treatment of metastatic Lewis lung carcinoma with DL-alpha-difluoromethylornithine. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **19** (4), 567-572 (1983).
- 209) Uimari, A., Keinanen, T. A., Karppinen, A., Woster, P., Uimari, P., Janne, J. and Alhonen, L., Spermine analogue-regulated expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase and its effects on depletion of intracellular polyamine pools in mouse fetal fibroblasts. *Biochem. J.*, **422**, 101-109 (2009).
- 210) Sun, H., Liu, B., Yang, Y.P., Xu, C.X., Yan, Y.F., Wang, W. and Liu, X.X., Adenovirus-mediated expression of SSAT inhibits colorectal cancer cell growth in vitro. *Acta. Pharmacol. Sin.*, **29** (5), 606-613 (2008).
- 211) Tucker, J. M., Murphy, J. T., Kisiel, N., Diegelman, P., Barbour, K.W., Davis, C., Medda, M., Alhonen, L., Janne, J., Kramer, D.L., *et al.*, Potent modulation of intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice by the polyamine catabolic enzyme spermidine/spermine N1-acetyltransferase. *Cancer Res.*, **65** (12), 5390-5398 (2005).
- 212) Wang, X., Feith, D.J., Welsh, P., Coleman, C.S., Lopez, C., Woster, P.M., O'Brien, T.G. and Pegg, A.E., Studies of the mechanism by which increased spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity increases susceptibility to skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **28** (11), 2404-2411 (2007).
- 213) Welsh, P.A., Sass-Kuhn, S., Prakashgowda, C., McCloskey, D. and Feith, D., Spermine synthase overexpression in vivo does not increase susceptibility to DMBA/TPA skin carcinogenesis or Min-Apc intestinal tumorigenesis. *Cancer Biol. Ther.*, **13** (6), 358-368 (2012).
- 214) Bello-Fernandez, C., Packham, G. and Cleveland, J.L., The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90** (16), 7804-7808 (1993).
- 215) Pena, A., Reddy, C.D., Wu, S., Hickok, N.J., Reddy, E.P., Yumet, G., Soprano, D.R. and Soprano, K.J., Regulation of human ornithine decarboxylase expression by the c-Myc. Max protein complex. *J. Biol. Chem.*, **268** (36), 27277-27285 (1993).
- 216) Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L.C. and Holtta, E., Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature*, **360** (6402), 355-358 (1992).
- 217) Auvinen, M., Laine, A., Paasinen-Sohns, A., Kangas, A., Kangas, L., Saksela, O., Andersson, L.C. and Holtta, E., Human ornithine decarboxylase-overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *Cancer Res.*, **57** (14), 3016-3025 (1997).
- 218) Shantz, L. M. and Pegg, A. E., Ornithine decarboxylase induction in transformation by H-Ras and RhoA. *Cancer Res.*, **58** (13), 2748-2753 (1998).
- 219) Tabib, A. and Bachrach, U., Polyamines induce malignant transformation in cultured NIH 3T3 fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**, 135-146 (1998).
- 220) Moshier, J. A., Malecka-Panas, E., Geng, H., Dosesco, J., Tureaud, J., Skunca, M. and Majumdar, A. P., Ornithine decarboxylase transformation of NIH/3T3 cells is mediated by altered epidermal growth factor receptor activity. *Cancer Res.*, **55** (22), 5358-5365 (1995).
- 221) Clifford, A., Morgan, D., Yuspa, S.H., Soler, A.P. and Gilmour, S., Role of ornithine decarboxylase in epidermal tumorigenesis. *Cancer Res.*, **55** (8), 1680-1686 (1995).
- 222) Hibshoosh, H., Johnson, M. and Weinstein, I.B., Effects of overexpression of ornithine decarboxylase (ODC) on growth control and oncogene-induced cell transformation. *Oncogene*, **6** (5), 739-743 (1991).
- 223) O'Brien, T.G., Megosh, L.C., Gilliard, G. and Soler, A.P., Ornithine decarboxylase overexpression is a sufficient condition for tumor promotion in mouse skin. *Cancer Res.*, **57** (13), 2630-2637 (1997).
- 224) Ahmad, N., Gilliam, A.C., Katiyar, S.K., O'Brien, T.G. and Mukhtar, H., A definitive role of ornithine decarboxylase in photocarcinogenesis. *Am. J. Pathol.*, **159** (3), 885-892 (2001).
- 225) Megosh, L., Halpern, M., Farkash, E., O'Brien TG., Analysis of ras gene mutational spectra in epidermal papillomas from K6/ODC transgenic mice. *Mol. Carcinog.*, **22** (3), 145-149 (1998).
- 226) Tang, X., Kim, A.L., Feith, D.J., Pegg, A.E., Russo, J., Zhang, H., Aszterbaum, M., Kopelovich, L., Epstein, E. H., Jr., Bickers, D.R., *et al.*, Ornithine decarboxylase is a target for chemoprevention of basal and squamous cell carcinomas in Ptc1 +/- mice. *J. Clin. Invest.*, **113** (6), 867-875 (2004).
- 227) Wattenberg, L. W., Wiedmann, T.S. and Estensen, R. D., Chemoprevention of cancer of the upper respiratory tract of the Syrian golden hamster by aerosol administration of difluoromethylornithine and 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, **64** (7), 2347-2349 (2004).
- 228) Peralta Soler, A., Gilliard, G., Megosh, L., George, K., O'Brien TG., Polyamines regulate expression of the neoplastic phenotype in mouse skin. *Cancer Res.*, **58** (8), 1654-1659 (1998).
- 229) Anderson, M.W., Goodin, C., Zhang, Y., Kim, S., Estensen, R. D., Wiedmann, T.S., Sekar, P., Buncher, C.R., Khoury, J.C., Garbow, J.R., *et al.*, Effect of dietary green tea extract and aerosolized difluoromethylornithine during lung tumor progression in A/J strain mice. *Carcinogenesis*, **29** (8), 1594-1600 (2008).
- 230) Fischer, S.M., Lee, M. and Lubet, R. A., Difluoromethylornithine is effective as both a preventive and therapeutic agent against the development of UV carcinogenesis in SKH hairless mice. *Carcinogenesis*, **22**, 83-88 (2001).
- 231) Bailey, H.H., Kim, K., Verma, A.K., Sielaff, K., Larson, P.O., Snow, S., Lenaghan, T., Viner, J. L., Douglas, J., Dreckschmidt, N.E., *et al.*, A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 skin cancer prevention study of alpha-difluoromethylornithine in subjects with previous history of skin cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **3**, 35-47 (2010).
- 232) Meyskens, F.L., Jr., McLaren, C.E., Pelot, D., Fujikawa-Brooks, S., Carpenter, P.M., Hawk, E., Kelloff, G., Lawson, M. J., Kidao, J., McCracken, J., *et al.*, Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **1**, 32-38 (2008).
- 233) Messing, E., Kim, K.M., Sharkey, F., Schultz, M., Parnes, H., Kim, D., Saltzstein, D. and Wilding, G., Randomized prospective phase III trial of difluoromethylornithine vs placebo in preventing recurrence of completely resected low risk superficial bladder cancer. *J. Urol.*, **176** (2), 500-504 (2006).
- 234) Ratko, T.A., Detrisac, C.J., Rao, K.V., Thomas, C.F., Kelloff, G. J. and Moon, R. C., Interspecies analysis of the chemopreventive efficacy of dietary alpha-difluoromethylornithine. *Anticancer Res.*, **10**, 67-72 (1990).
- 235) Erdman, S. H., Ignatenko, N. A., Powell, M. B., Blohm-

- Mangone, K. A., Holubec, H., Guillen-Rodriguez, J. M. and Gerner, E. W., APC-dependent changes in expression of genes influencing polyamine metabolism, and consequences for gastrointestinal carcinogenesis, in the Min mouse. *Carcinogenesis*, **20** (9), 1709-1713 (1999).
- 236) Feith, D. J., Shantz, L. M., Shoop, P. L., Keefer, K. A., Prakashgowda, C. and Pegg, A. E., Mouse skin chemical carcinogenesis is inhibited by antizyme in promotion-sensitive and promotion-resistant genetic backgrounds. *Mol. Carcinog.*, **46** (6), 453-465 (2007).
- 237) Chen, Y., Hu, J., Boorman, D., Klein-Szanto, A. and O'Brien TG., Therapy of murine squamous cell carcinomas with 2-difluoromethylornithine. *J. Carcinog.*, **3**, 10 (2004).
- 238) Smith, M.K., Trempus, C.S. and Gilmour, S.K., Co-operation between follicular ornithine decarboxylase and v-Ha-ras induces spontaneous papillomas and malignant conversion in transgenic skin. *Carcinogenesis*, **19** (8), 1409-1415 (1998).
- 239) Thompson, P. A., Wertheim, B. C., Zell, J. A., Chen, W. P., McLaren, C. E., LaFleur, B. J., Meyskens, F. L. and Gerner, E. W., Levels of rectal mucosal polyamines and prostaglandin E2 predict ability of DFMO and sulindac to prevent colorectal adenoma. *Gastroenterology*, **139** (3), 797-805, 805 e791 (2010).
- 240) Kamiyama, H., Suzuki, K., Maeda, T., Koizumi, K., Miyaki, Y., Okada, S., Kawamura, Y. J., Samuelsson, J. K., Alonso, S., Konishi, F., *et al.*, DNA demethylation in normal colon tissue predicts predisposition to multiple cancers. *Oncogene*, **31** (48), 5029-5037 (2012).
- 241) Soda, K., Kano, Y. and Chiba, F., Food polyamine and cardiovascular disease—an epidemiological study. *Glob. J. Health Sci.*, **4** (6), 170-178 (2012).
- 242) Binh PNT, Soda, K. and Kawakami, M., Mediterranean diet and polyamine intake: possible contribution of increased polyamine intake to inhibition of age-associated disease. *Nutrition and Dietary Supplements.*, **3**, 1-7 (2011).
- 243) Binh PNT, Soda, K. and Kawakami, M., Gross domestic product and dietary pattern among 49 western countries with a focus on polyamine intake. *Health*, **2** (11), 1327-1334 (2010).
- 244) Binh PNT, Soda, K., Maruyama, C. and Kawakami, M., Relationship between food polyamines and gross domestic product in association with longevity in Asian countries. *Health*, **2** (12), 1390-1396 (2010).

(平成 26 年 6 月 11 日受理)