

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01618

研究課題名(和文) 運動による海馬神経新生の促進における血中アンギオテンシンIIの役割

研究課題名(英文) Role of systemic angiotensin II in exercise-enhanced neurogenesis in adult hippocampus.

研究代表者

椋田 崇生 (Mukuda, Takao)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：60346335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：走行運動はアンギオテンシンII (Ang II) の血中濃度を一過性に高め、これが1型受容体(AT1R)を介して成熟個体の海馬で神経新生を促進する。本研究では、Ang IIによるAT1Rの活性化が海馬のアストロサイトにおける血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の産生を高めることを明らかにした。神経新生作用に加えて、こうした一過性の血中Ang II濃度の上昇は、海馬をはじめ、扁桃体や大脳皮質の一部などで血液脳関門の血管透過性を高める可能性が高いことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Running exercise induced an increased level of angiotensin II (Ang II) in the systemic circulation, which activated the type 1 receptor of Ang II (AT1R) and enhanced adult hippocampal neurogenesis. Further, activation of AT1R stimulated by Ang II promoted the synthesis of a potent neurogenic molecule, vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in the hippocampal astrocytes. Along with the neurogenic effect, we found a tendency that Ang II increases vascular permeability of the blood-brain barrier in the hippocampus, amygdala and some cortical areas.

研究分野：生理学

キーワード：海馬 神経新生 血液脳関門 血管透過性 アンギオテンシンII 血管内皮増殖因子

### 1. 研究開始当初の背景

適度な運動は、脳血管障害や外傷等で生じた脳機能の低下を改善することが知られている。近年、この効果は、運動が脳での血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) や脳由来神経成長因子 (BDNF) などの神経成長・保護因子の産生を高め、これらが神経系に作用することによってもたらされると考えられている。また、ヒトの海馬においては、適度な運動がアルツハイマー病に対する遺伝的リスクの軽減や加齢による海馬萎縮の抑制に有効な刺激であることも見いだされている。

海馬でのこうした機能維持・改善の基盤のひとつとして、神経新生の促進が挙げられており、新たに生まれたニューロンは海馬の神経ネットワークに組み込まれ、海馬機能の維持・向上に寄与していると考えられている。

適度な運動は、VEGF や BDNF を介して神経新生を促進する極めて有効な刺激であることが確立されている。一方で、私たちは、トレッドミルを用いた強制走行運動が血中アンジオテンシン II (Ang II) 濃度を高め、これが Ang II の 1 型受容体 (AT1R) に作用することで海馬神経新生を促進することを報告している。

しかしながら、Ang II/AT1R シグナルの作用部位や Ang II などの血中因子が海馬に作用する経路など、運動と海馬における成長因子の産生亢進及び神経新生の促進の間どのような機序が存在するのか、神経系と血管系の相互作用も含めて、その全貌は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、海馬での VEGF や BDNF の産生及び血管構造と神経新生に対する Ang II の効果を *in vitro* 系で検討し、さらに、生理的な血中 Ang II 濃度の上昇の効果を *in vivo* 系で検討することにした。また、Ang II による形態学的変化が海馬機能にもたらす効果を電気生理学、行動学的に検討し、成熟海馬における成長因子を介した運動依存的な神経新生の促進機序とその効果の全貌解明を目指すこととした。

### 3. 研究の方法

血中 Ang II が海馬の神経成長因子の産生及び血管構造の変化に与える効果、さらに、海馬の機能、神経新生に与える影響を明らかにするために、慢性的な悪性のストレス反応を生じさせないことを条件にしてラットを用いて次の実験を行った：

(1) 1 週間培養した海馬スライスに Ang II を添加し、海馬での VEGF 及び BDNF の産生に与える効果を検討した。また、ランニングホイールを用いた自発的な走行運動、Ang II 血中投与及び AT1R の阻害が海馬の VEGF 及び BDNF の産生に与える効果を個体で検討した。このとき、摘出した脳を左右の半球に分け、一方を急速凍結し生化学分析に、もう一方は

4%パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液固定し、免疫染色等の形態解析に充てた。

(2) (1) の個体を用いた検討と同様の処置が血液脳関門の透過性に与える影響を生化学的、形態学的に検討した。

(3) Ang II を介した神経新生の促進が海馬シナプス伝達に与える効果を電気生理学的に、さらに、空間学習に与える効果を行動学的に調べた。

(4) (1) の課題遂行において、ランニングホイールを用いた自発的な走行運動は、神経新生を促進する一方、血中 Ang II 濃度の明確な上昇を認めることができなかった。おそらく、自発運動の場合、適切な採血のタイミングを見逃すことが困難なためであると思われる。トレッドミルによる強制走行運動は、個体によっては強いストレスを伴うことから、代替実験にはふさわしくないため、比較的マイルドな刺激である短時間の暑熱環境曝露 (室温 37°C・湿度 45%、1 時間/日) を 1 週間ラットに課すことで体液の損失を惹起し、それによって生理的な血中 Ang II 濃度の上昇を誘導することで、(1) の代替・追加実験とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 海馬形態および機能に対する Ang II の効果

培養スライスに Ang II を添加すると、VEGF の発現が高まることをウェスタンブロットで確認した。しかしながら、この処置では BDNF の発現は変化しなかった。

同様な効果は Ang II の血中投与でも観察された：海馬での VEGF の発現が増強されるが BDNF の発現には影響を与えなかった。

半球を用いた免疫染色では、アストロサイトのマーカータンパク質であるグリア細胞産生タンパク質 (GFAP) 陽性細胞で VEGF 陽性反応が認められた (図 1)。免疫陽

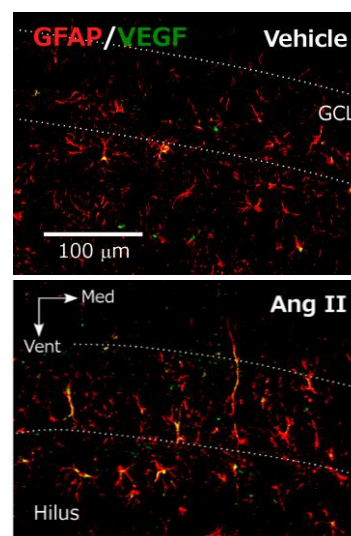


図 1 海馬歯状回の免疫染色像

上：生理食塩水投与、下：Ang II 投与、赤：GEFA、緑：VEGF、青：核

性反応及び細胞の形態から判断して、海馬実質での VEGF 産生細胞はアストロサイトであると考えられる。

これらのことは、Ang II が海馬アストロサイトの VEGF 産生を刺激することを示唆する。しかしながら、ランニングホイールを用いた走行運動では、VEGF の発現及び神経新生が促進されるものの、血中 Ang II 濃度の上昇を捉えることができなかった。そこで、血中 Ang II 濃度を生理的な範囲内で上昇させる代替刺激として、ラットを暑熱環境に 1 日 1 時間曝し、これを 1 週間繰り返した。血中 Ang II 濃度は安静時に比べ、暑熱後に上昇する傾向にあったが、有意な変化は認められなかった。しかしながら、AT1R 阻害剤であるカンデサルタンで処理すると、暑熱後の血中 Ang II 濃度は約 1.6 倍に上昇した。この上昇は AT1R を介したネガティブフィードバックがカンデサルタンによって抑制されることによるので、カンデサルタン非処理でみられた血中 Ang II 濃度のわずかな上昇は、ネガティブフィードバックによる調節を受けた結果であると判断できる。また、暑熱曝露後にはカンデサルタン非処理では強い飲水行動が誘導されたが、カンデサルタン処理群では見られなかった。これらを総合的に考えると、通常、Ang II の血中濃度はネガティブフィードバックによって調節されているので暑熱曝露によっても継続的に高い値を示すことはないが、一過性に十分な Ang II 濃度の生理的上昇を引き起こしていると考えられる。暑熱曝露も、Ang II の血中投与と同様に、海馬アストロサイトにおける VEGF の産生が高められた。さらに、このような海馬では、幼若ニューロンのマーカータンパク質であるダブルコルチン陽性細胞の数が増加していた。また、これらの効果は、カンデサルタンによる AT1R の阻害によって基礎レベルまで低下した。これらのことは、生理的な血中 Ang II 濃度の上昇が、海馬アストロサイトの VEGF 産生を高め、神経新生を増強することを示唆する。

こうした Ang II を介した形態的变化が海馬機能に与える影響を調べるために、急性海馬スライスを用いて電気生理学的に神経伝達について、モリス水迷路課題を用いて行動学的に空間学習能について検討した。しかしながら、いずれにおいても明瞭な変化は認められなかった。

## (2) 血液脳関門の血管透過性に対する Ang II の効果

蛍光色素 Evans blue (EB) は血液脳関門を通過できない物質なので、血中に投与した EB が脳実質で検出された場合、血液脳関門の血管透過性が亢進し、EB が血中から脳実質に漏れ出したと判断できる。また、脳実質に漏出した EB は周囲の細胞がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、蓄積されるので、EB で染まるニューロンの存在は、周囲の

血管透過性の亢進を示す指標となる。

Ang II を血中投与したラットでは、海馬歯状回門および顆粒細胞層の内側縁に局在するニューロンで EB 陽性が認められた。しかしながら、隣接する CA3 や顆粒細胞層などでは EB 陽性ニューロンはほとんど認められなかった。EB 陽性ニューロンの数を生理食塩水を投与した場合と比較すると、Ang II 投与は増加させる傾向にあった。また、自発運動を行った場合も海馬歯状回で EB 陽性ニューロンが認められた。このことから、血中 Ang II 濃度の上昇は海馬での血管透過性を亢進させる可能性が高い。さらに Ang II の血中投与によって、大脳皮質や扁桃体、視床下部（神経内分泌細胞ではない）でも EB を取り込んでいるニューロンの局在を認めた。このことから、Ang II の血管透過性亢進効果は海馬特異的なものではないと思われる。

## (3) まとめ

本研究では、自発走行運動では明確な血中 Ang II 濃度の上昇を直接捉えることはできなかったが、Ang II の作用実験及び急遽行った代替実験である暑熱曝露実験の結果を合わせて判断すると、運動による呼吸等の促進がもたらす体液量の減少が血中 Ang II 濃度の生理的上昇を引き起こし、これが海馬アストロサイトの VEGF 産生を高め、神経新生を促進する機序が存在すると考えられる。

また、こうしたホルモンが作用する経路として、血中 Ang II 自身が血液脳関門の血管透過性を高め、血中から脳実質に漏出して海馬の細胞に作用する可能性が浮かび上がった。今後、Ang II による血管透過性の分子局在と血管壁及び血管周囲の微細構造の変化を明らかにすることで、詳細な血管透過性亢進機序の解明に取り組む予定である。

本研究により、運動及び暑熱曝露が刺激となる Ang II/AT1R を介した神経新生の生理的促進機序の詳細と脳と血管系との関連がより明確になってきた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Koyama Y, Mukuda T, Hamasaki S, Nakane H, Kaidoh T. Short-term heat exposure promotes hippocampal neurogenesis via activation of angiotensin II type 1 receptor in adult rats. *Neuroscience*, 査読有, *in press*.
2. Yamazaki M, Yamada H, Munetsuna E, Ishikawa H, Mizuno G, Mukuda T, Mouri A, Nabeshima T, Saito K, Suzuki K, Hashimoto S, Ohashi K. Excess maternal fructose consumption impairs hippocampal function in offspring via

epigenetic modification of BDNF promoter. FASEB Journal, 査読有, 2018, fj201700783RR.

3. Fujimoto A, Kodani Y, Furukawa Y. Modulation of the FMRFamide-gated Na<sup>+</sup> channel by external Ca<sup>2+</sup>. Pflugers Arch, 査読有, 2017, 469, 1335-1347.
4. Nozaki K, Kubo R, Furukawa Y. Serotonin modulates the excitatory synaptic transmission in the dentate granule cells. J Neurophysiol, 査読有, 2016, 115, 2997-3007.

[学会発表] (計 8 件)

1. 濱崎佐和子, 椋田崇生, 小山友香, 海藤俊行. 血中アンギオテンシン II が海馬ニューロンに直接作用する可能性の検討. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018 年 3 月 30 日, 日本医科大学 (武蔵野市).
2. 小山友香, 椋田崇生, 濱崎佐和子, 海藤俊行. 短時間の暑熱曝露はアンギオテンシン III 型受容体を介して成熟海馬神経新生を促進する. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018 年 3 月 30 日, 日本医科大学 (武蔵野市).
3. 小山友香, 椋田崇生, 濱崎佐和子, 海藤俊行. 成熟海馬の神経新生に対する短時間の暑熱曝露の効果. 日本解剖学会第 72 回中国・四国支部学術集会, 2017 年 10 月 29 日, 広島大学 (広島市).
4. 濱崎佐和子, 椋田崇生, 小山友香, 海藤俊行. 血中アンギオテンシン II の濃度上昇が脳の血管透過性に与える影響. 日本解剖学会第 72 回中国・四国支部学術集会, 2017 年 10 月 29 日, 広島大学 (広島市).
5. 濱崎佐和子, 椋田崇生. ラット脳の血管透過性を亢進する外的刺激の探索と組織学的解析法の確立. 中国四国動物生理シンポジウム中国四国地区・九州地区合同シンポジウム, 2017 年 9 月 2 日, 下関市火の山ユースホステル (下関市).
6. 濱崎佐和子, 椋田崇生, 海藤俊行. 血中アンギオテンシン II がラット海馬の血管透過性に及ぼす影響. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017 年 3 月 30 日, 長崎大学 (長崎市).
7. 濱崎佐和子, 椋田崇生, 海藤俊行. ラット海馬の血管透過性に対する血中アンギオテンシン II の効果. 日本解剖学会第 71 回中国・四国支部学術集会. 2016 年 10 月 23 日, 岡山大学 (岡山市).
8. 椋田崇生. 運動によって促進される成熟海馬神経新生に対する血中アンギオテンシン II の関与. 第 24 回日本運動生理学会大会. 2016 年 7 月 23 日-24 日, 熊本大学 (熊本市).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/medicine/about/3318/3323/23762.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

椋田 崇生 (MUKUDA, Takao)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号: 60346335

### (2) 研究分担者

古川 康雄 (FURUKAWA, Yasuo)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号: 40209169