

令和 4 年 2 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03194

研究課題名(和文) 環境・社会的ストレスが加齢に伴い脳機能に与える負の影響と食品成分によるその防御

研究課題名(英文) Adverse effect on age-related brain function by environmental and social stress and a preventive role of food factors

研究代表者

下位 香代子(Shimoi, Kayoko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・客員教授

研究者番号：10162728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然な加齢に伴った各ライフステージの、すなわち、若齢、中齢、高齢のマウスに、単独隔離や対面による社会的ストレスを負荷したところ、どのステージでもHPA軸が活性化されストレス応答が見られた。特に中齢期はストレスが脂質代謝系に影響を与え脳内炎症が惹起される可能性が示唆された。なお、本研究を通して、肝臓および海馬中で発現が低下または増加した2つの遺伝子が新たなストレス応答性のマーカーとして利用できる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同じ系統のマウスで、若齢、中齢、高齢の各ライフステージで、ストレス応答や環境・社会的ストレス負荷による脳機能の変化を比較追究した報告がほとんどなかったが、本研究によりどのライフステージでもHPA軸を介したストレス応答があることがわかり、特に中齢期はストレスが脂質代謝系に影響を与え脳内炎症が惹起される可能性が示唆されたことは、ストレスによる健康障害を未然に防ぐために役立つと考える。

研究成果の概要(英文)：Effects of aging on social stress, such as isolation and confrontation, induced physiological responses were investigated using young, middle-aged, and old mice (C57BL/6N and BALB/c). A stress response via activated HPA axis was induced in each aged mice. It was suggested that isolation stress for a long period may affect the lipid metabolism and induce intracerebral inflammation, especially in middle aged mice. It was found that the expressions of two genes in the liver or the hippocampus were reduced or induced by social stress. These two genes could be used as a new stress related marker.

研究分野：食品機能学、生体機能学

キーワード：ストレス ライフステージ 加齢 脳機能 食品成分 予防

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代社会は、経済のグローバル化や IT の発達による情報の高度化、核家族をベースにした高齢化など社会構造の変化により人間関係の複雑化や生活環境の変化に伴う環境・社会的なストレス負荷が若齢者から高齢者まで増大している。ストレス負荷は、がん、心疾患、うつ病などの疾病の発症リスクを高め¹⁻³⁾、ストレスの蓄積が脳の老化を促進し⁴⁾、長期のストレスはアルツハイマー病の潜在的リスク因子であることが報告されている⁵⁾。また、孤独感が、うつ、認知力の低下、心疾患、脳卒中などの多くの疾患につながる可能性があり、孤独感は 30 歳前後と 60 歳前後に強くなり、高齢期では、ヒトにより大きく異なることが示唆されている⁶⁾。

我々は、以前より単独隔離、対面ストレス、集団の中におけるヒエラルキーなどの社会的ストレスや光環境ストレスが生体に与える影響を 8~10 週齢の若齢の雄性マウスを用いて検討してきた⁷⁻¹⁰⁾。同様に多くのげっ歯類を用いたストレス負荷試験では、8~10 週齢の若齢の雄性マウスに拘束ストレスや電気ショックなどの過激な一過性のストレスを負荷して検討されている。一方、文献によると、ストレス負荷の影響には性差があること¹¹⁾、マウスの系統によりストレス感受性が異なることが報告されている¹²⁾。加齢に伴う脳機能に関する研究については、老化促進マウスや高齢マウスを用いて検討した報告があり¹³⁾、脳の老化を抑制する食品因子に関する研究、ストレスが脳機能に与える影響に関する研究については多くの報告がある。しかし、同じ系統のマウスを用いて、若齢、中齢、高齢の各ライフステージで、ストレス応答や環境・社会的ストレス負荷による脳機能の変化を比較追究した報告はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究では、人間社会の現在の社会的状況を考慮して、自然な加齢に伴った各ライフステージ、すなわち、8 週齢 (若齢: ヒトではおよそ 20 歳前後)、32~56 週齢 (中齢: ヒトではおよそ 50~60 歳前後)、72~104 週齢 (高齢) の雌あるいは雄のマウスに、単独隔離や対面による環境・社会的ストレスを負荷して、加齢に伴うストレス応答 (視床下部-脳下垂体-副腎皮質 (HPA) 系など)、脳機能の変化 (セロトニン受容体などの遺伝子発現の変化、アミロイドタンパク質の蓄積、不安・うつなどの行動変化などを調べ、環境・社会的ストレスが加齢に伴い脳機能に与える負の影響を時間軸で明らかにし、その作用機序を考慮してこの負の影響を防御して脳機能の低下を防ぐ食品成分を探索し検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物とその飼育条件

雄性および雌性 C57BL/6N マウス、その卵巣摘出マウス、雄性および雌性 BALB/c マウス (日本 SLC 株式会社) を搬入後、5 匹飼育で 7~10 日間順化させ、それぞれ実験を行った。飼育室は 12 時間の明暗周期、温度および湿度は適切な条件下で調節され、餌料 (MF) 及び、水 (水道水またはイオン交換水) は自由摂取とした。なお、各所属機関の定める動物実験倫理指針に従い承認を得てから本実験を実施した。

(2) ストレス負荷と試料の採取

対照群は 1 ケージあたり 5 匹の標準飼育とした。単独隔離ストレス負荷群は、1 ケージに 1 匹飼育を 2、7 日間、長期間 (30 週以上) 行い、ケージ当たりのチップ量を約 2 g (対照群のおよそ 20 分の 1) とした。対面ストレス負荷群は、群飼育による馴化の後、異なるケージのマウスを対面させて 1 ケージに 2 匹飼育を 2、7 日間行った。解剖は 17:00~20:00 の間 (2 時間以内) に行った。解剖前に体重を測定し、イソフルランによる吸入麻酔下で、心臓採血によって採血し、胸腺、肝臓、副腎、脳 (海馬、大脳皮質、視床下部) を摘出した。高齢の C57BL/6 マウスについては二酸化炭素による吸入麻酔を行った。血漿画分を回収し、-80 で保存した。各臓器は一部を RNA later に浸し、一晚 4 (冷蔵庫) で静置後、-20 下で保存、残りを液体窒素 (またはドライアイス) による急速冷凍後、80 で保存した。副腎は秤量のみ行った。

(3) 血液生化学指標の測定

血清および血漿中の生化学指標 (トリグリセリド、総コレステロール、HDL-コレステロール、総タンパク質、アルブミン、グルコース、クレアチニンホスホキナーゼ等) は、富士ドライケム 4000V および各指標のプレートを用いて測定した。血中コルチコステロン量は、コルチコステロン測定 ELISA キット (ENZO, Life Sciences, Inc.) を用いて測定した。

(4) 遺伝子発現量の測定

RNA later に浸漬した組織より total RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行い解析した。

(5) 行動試験 (尾懸垂試験)

高さ 30 cm、幅 33 cm、奥行き 28 cm の試験箱内の天井中央に設置したフックに天井から 5 cm

のところ尾を固定して逆さの状態に吊り、試験時間 10 分中の不動時間を測定した。

4. 研究成果

(1) 単独隔離によるストレス負荷の影響

性差・系統差

雄性の BALB/c マウスについては上述したように以前に検討した結果では、2、7 日後に副腎肥大、血漿中のコルチコステロン値の上昇などストレス応答が見られたので、同様の試験を雌性マウスについても検討した結果、雄性マウスと同様な結果が得られ、性差は見られなかった。雌性の B57BL/6N マウスを用いての試験を行った際、7 日間の単独隔離によるストレス応答が見られなかったため、2 日間の単独隔離を行ったところ、コルチコステロン値は、2 日後に増加し、その後急速に減少した。また、副腎肥大も見られた。これらのことから、C57BL/6N マウスは、BALB/c マウスに比べ、ストレスに対して適応が早く耐性であることがわかった。ストレスに対する系統差については、BALB/c マウスの方が慢性ストレスに対して脆弱であり、その原因として、側坐核において GDNF をコードする遺伝子のプロモーター領域におけるエピジェネティックな遺伝子発現の制御が異なっていることが報告されている¹²⁾。単独隔離のような緩和なストレスでもその応答には系統差があることがわかった。

各ライフステージにおける短期の単独隔離によるストレス応答

10 週齢(若齢)、42 週齢(中齢)、78 週齢(高齢)の雌性 C57BL/6N マウスに、単独隔離による短期(7 日間)の社会的ストレスを負荷して、ストレス負荷後のマーカーとして、コルチコステロン値を測定し、肝臓における *HO-1* 等の各遺伝子の発現について、脳については、海馬中の *Bdnf*、*5-Htr4*、*5-Htr1a* の遺伝子、視床下部中の *Crh* の各遺伝子の発現について検討した。7 日間のストレスを負荷したので、いずれのマーカーも対照群と単独隔離群で有意な差は見られなかった。加齢に伴い、両群ともコルチコステロン値が低下しており、逆に酸化ストレスに対する防御機構として働く *HO-1* や血液の線溶系を抑制する *Pai-1* 遺伝子の発現が増加していた。加齢に伴って生体内の酸化や炎症が亢進していることが示唆された。

各ライフステージにおける長期の単独隔離によるストレス応答

9 週齢と 41 週齢の雌性 C57BL/6N マウスは、33 週間、77 週齢のマウスは、10 週間の単独隔離ストレスを負荷し、それぞれ 42 週齢、74 週齢、87 週齢時に解剖した。若齢マウスはコントロール群も単独隔離群も順調に体重が増加し両群で差は見られなかった。高齢マウスでは、両群とも体重増加はほとんど見られなかった。しかし、中齢マウスでは、49 週頃からコントロール群に比べ、単独隔離群で著しい体重増加が見られた(図 1)。中齢マウスの視床下部と海馬における遺伝子発現解析を行ったところ、視床下部では *Crh* 遺伝子、海馬では、炎症性サイトカインの *IL-1*、*TNF* 遺伝子の発現が増加しており、脳内炎症が起きていることが示唆された。*Bdnf* およびセロトニン受容体遺伝子にほとんど差は見られなかった(図 2)。

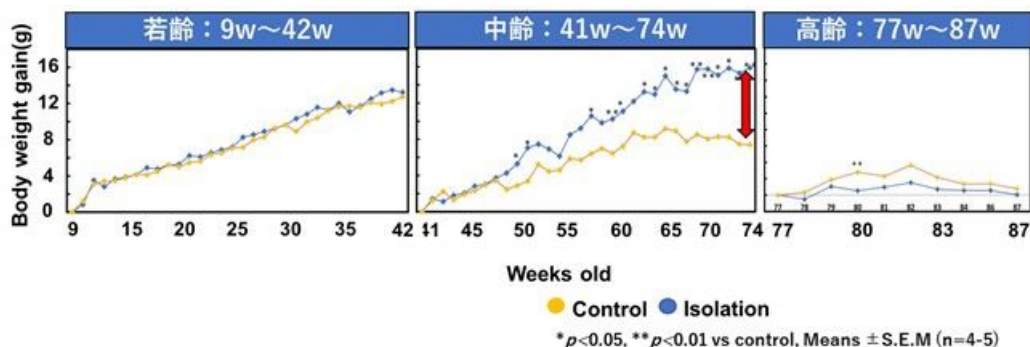


図 1 若齢期、中齢期、高齢期における長期間単独隔離の体重増加への影響

OVX マウス

中齢期に単独隔離ストレスを負荷すると体重が著しく増加したため、女性ホルモンが低下した更年期のモデルである卵巣摘出マウス(C57BL/6N 雌、OVX)を用いて単独隔離の影響について検討した。OVX マウスでは、卵巣摘出していない通常のマウスに比べてストレス負荷の有無にかかわらず体重が増加していた。単独隔離により副腎肥大が見られ、血中の TG、総コレステロールなどが有意に低下した(図 3)。肝臓中の *PPARα*、*Pdk4*、*X* 遺伝子の発現が低下し、視床下部中の *Crh*、海馬中の炎症性サイトカインの *TNF*、*Pai-1*、*ERβ* 遺伝子の発現が増加していた。一方、糖鎖の末端に結合し、認知機能に重要な役割を担うシアル酸(*Neu5Ac* と *Neu5Gc*)は 2 種あるが、

Neu5Gc は体内で生合成できないため外界から体内に取り込まれ脳に蓄積する。老化に伴って脳に蓄積してアミロイドの凝集を促進することから認知症促進因子として作用することが報告されている¹⁴⁾。OVX ラットの脳内にも蓄積する。そこで、OVX マウスの海馬について検討してみたが、OVX によりまたストレス負荷によって増加することはなかった。しかし、糖鎖からシアル酸を遊離する加水分解酵素であるシアリダーゼの4種のアイソザイムのうち *Neu1* 遺伝子だけ発現が有意に増加していた。海馬における *Neu1* の機能とストレスの関係は不明で今後検討する必要がある。

尾懸垂試験を行ったところ、OVX により不動時間が長くなったが、ストレスによりさらに長くなることはなく、OVX によるエストロゲンの低下がより反映した結果ではないかと思われる。

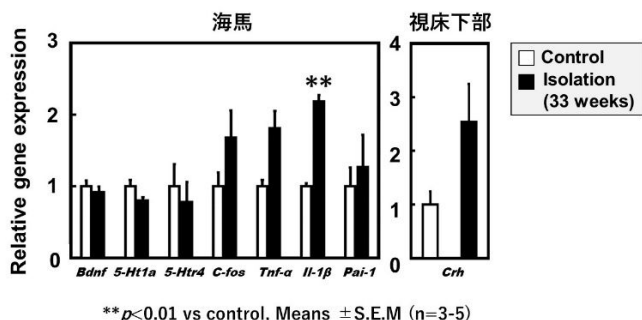


図2 中齢期における長期間単独隔離後の海馬および視床下部における遺伝子発現への影響

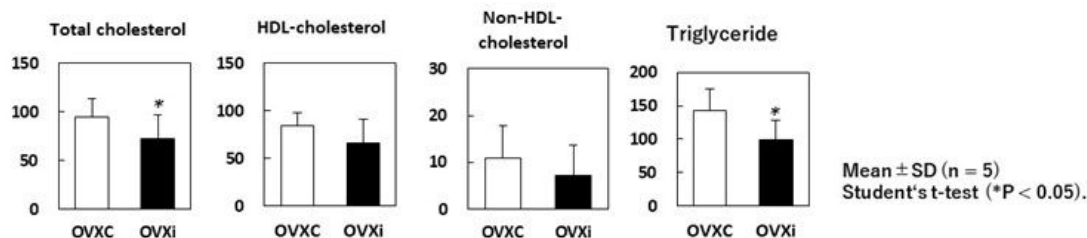


図3 卵巣摘出マウスにおける単独隔離の血液指標への影響

(2) 対面によるストレス負荷の影響

各ライフステージにおける短期の対面によるストレス応答

雄性 BALB/c マウスを用いた長期飼育試験を実施した結果、体重増加は32週齢まで継続し、その後定常状態を維持し、84週齢以降減少を始めると見出した。本結果を踏まえ、体重増加期の8週齢（成長期）、体重増加が停止した56週齢（中齢期）、体重増加が始まった後の104週齢（高齢期）の3つのライフステージにおいて、2日間ないしは7日間の対面ストレス負荷を行った時の生体応答評価を行った結果、次の知見を得た。

ライフステージが進行するに伴い、血中グルコース濃度が低下する傾向を示したが、それ以外の血液生化学指標（総タンパク質、総コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリド等）には顕著な変化は見られなかった。2日間の対面ストレス負荷により、血中トリグリセリドが顕著に低下したが、この変化は若齢期では見られなかった。ストレス負荷時に血中へ分泌が高まるコルチコステロン濃度は、ストレス負荷2日間で上昇し、7日間では定常レベルまで低下した（図4）。また、コルチコステロン分泌を司っている視床下部-下垂体-副腎（HPA）軸の活性化（視床下部中の *CRH* 遺伝子の発現増加）も確認された。一方、ライフステージによる違いは見られなかったことから、対面ストレスのような軽微なストレス負荷時の HPA 軸の活性化は、若齢期だけでなく高齢期においても主要なストレス応答機構であると考えた。一方、アルツハイマー病の病因の一つと考えられている海馬中アミロイド量については、ストレス負荷による変化は見られなかった。肝臓中の遺伝子発現を調べた結果、遺伝子 X の発現量が、ストレス負荷2日目に顕著に低下し、さらに7日目にはその差がより顕著に低下することを見出した。一方、ライフステージによる変化の違いは見られなかった。

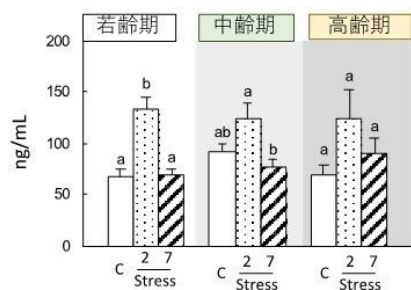


図 4 2日間および7日間の対面ストレス負荷時の血中コルチコステロン濃度に与えるライフステージの影響。平均値 ± 標準誤差で表示。異なるアルファベット間で統計学的有意差あり。

高齢マウスにおける短期の対面ストレス負荷の影響

100週齢前後まで4匹/ケージで長期飼育した雌性C57BL/6Jマウスに2日間の対面ストレスを負荷すると、副腎肥大、海馬の*Npas4*遺伝子の有意な発現低下などストレス応答が見られた。また、炎症性サイトカインの*IL-1*遺伝子の発現が増加しており、中齢期に単独隔離を行った場合と同様の結果を示していた。高齢期にはストレス負荷により脳内炎症が惹起される可能性があり、今後、さらに検討する必要がある。また、単独隔離によるストレス負荷の場合と同様に肝臓中の*X*遺伝子の発現低下が見られた。高齢になってもストレスに対して応答することが確認された。しかし、*Bdnf*およびセロトニン受容体遺伝子にほとんど差は見られなかった。

以上の結果より、単独隔離や対面などの社会的ストレスに対する応答には性差はなく系統差があり、BALB/cマウスよりもC57BL/6マウスの方がストレスに対する適応が早いこと、ライフステージでストレス応答を比べるとどのステージでもHPA軸が活性化され、海馬中の*Npas4*遺伝子の発現が低下すること、中齢期にストレスが負荷されると脂質代謝系に影響が出て脳内炎症が惹起される可能性があることが明らかになった。一方、社会的ストレスが脳機能に与える負の影響を防御する食品成分については、ポリフェノールの一種に効果があることを見出し検討中である。なお、本研究を通して、肝臓中の遺伝子*X*および海馬中のシアリダーゼ*Neu1*が新たなストレス応答性のマーカーとして利用できる可能性を見出したので、それらのストレス応答における機能的な役割について探究を続けている。

<謝辞>

本研究を行うにあたり、ご助言、解剖への協力をいただきました海野けい子客員准教授、田口今日子氏（静岡県立大学・茶学総合研究センター）、南 彰講師（静岡県立大学・薬学部）に感謝申し上げます。

<引用文献>

1. *Sci Rep*, 2018, doi:1038/s41598-017-13362-8
2. 平成14年人口動態統計、上巻、財団法人厚生統計協会、2014
3. *Circulation*, 106, 1229-1236, 2002
4. *Free Radic Res*, 45, 966-74, 2011
5. *Neuromol Med* 12, 56-70, 2010
6. *Scientific American*, 318, 64-69, 2018
7. *Biochem Biophys Res Commun*, 349, 775-80, 2006
8. *Physiol. Genomics*, 37, 79-87, 2009
9. *Sci. Rep.*, 7, 6991, 2017
10. *Exp Anim*. 63, 331-338, 2014
11. *Neuroendocrinol*, 96, 111-8, 2012
12. *Neuron*, 69, 359-72, 2011
13. *基礎老化研究*, 36, 13-20, 2012
14. *化学と生物*, 57(6), 346-351, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakakibara H., Shimoi K	4. 巻 11
2. 論文標題 Anti-stress effects of polyphenols: animal models and human trials	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 5702-5717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0fo01129k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 下位香代子, 室田佳恵子	4. 巻 225
2. 論文標題 ポリフェノールと健康に関する研究の最近の動向と今後	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FFIジャーナル	6. 最初と最後の頁 182-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Numata M, Hirano A, Yamamoto Y, Yasuda M, Miura N, Sayama K, Shibata M, Asai T, Oku N, Miyoshi N, Shimoi K	4. 巻 19
2. 論文標題 Metastasis of breast cancer promoted by circadian rhythm disruption due to light/dark shift and its prevention by dietary quercetin in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Circadian Rhythms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5334/jcr.203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 1. Yasuda MT, Watanabe Y, Hosono T, Seki T, Suzuki TA, Sakakibara H, Shimoi K	4. 巻 188
2. 論文標題 Nocturnal light exposure stimulates the cardiac fibrinolysis system and stress responses in C3H/He mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thromb Res.	6. 最初と最後の頁 79-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中 航, 下位 香代子, 榊原 啓之
2. 発表標題 加齢が社会的ストレス負荷時の生体応答機構に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakakibara H, Shimoi K
2. 発表標題 Effects of polyphenol-rich plants on physiological responses for social stress
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榊原啓之, 浦上倫緒, 田中 航, 松山弘希, 柴田ひかり, 平野明伽音, 下位香代子
2. 発表標題 社会的ストレス応答に与える週齢の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 榊原啓之, 下位香代子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 287
3. 書名 抗疲労・抗ストレス・睡眠改善食品の開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

柴田ひかり、平野明伽音、下位香代子、ストレス応答に系統差、性差はあるか、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア2018（富士）、2018年11月28日

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小出 剛 (Koide Tsuyoshi) (20221955)	国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・准教授 (63801)	
研究分担者	榊原 啓之 (Sakakibara Hiroyuki) (20403701)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------