

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：35309

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17876

研究課題名（和文）肥満誘導性不安障害モデルマウスの腸内細菌叢に対する運動の積極的予防効果

研究課題名（英文）The Preventive Effect of Voluntary Physical Exercise on Mental Disorders in High-Fat-Diet-Mice

研究代表者

小柳 えり (Oyanagi, Eri)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師

研究者番号：50804647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：うつ病、認知症などは、肥満率が2倍であり肥満との関連が強く、また特徴的な腸内細菌叢が形成される。予防には適切な食事および運動が推奨されるが、メカニズム、意義や効果的な活用法は不明である。本研究は、運動習慣が腸内細菌叢を介した肥満発症予防だけでなく、精神疾患の予防にも貢献するか検討することを目的とした。高脂肪食餌性肥満モデルマウスを用いて10週間の運動によるうつ様行動の変化および腸内有機酸、腸内細菌叢、脳内遺伝子発現を解析した。高脂肪食餌摂取による行動テストよりうつ様症状、強制水泳テストでは運動によるうつ改善効果を観察した。これらのマウスでは特徴的な有機酸および腸内細菌叢の変化が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動の効果は、腸内細菌叢由来の短鎖脂肪酸の変化さらに腸内細菌叢の変化も生じ、うつ様行動予防に貢献する可能性が示唆される結果を得た。本課題の成果は、応用健康科学の観点より、食事の改善と適度な運動の実施が心身ともに健康な生活を送るために重要であることを提示した。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that depression and/or dementia in obese persons are higher than that in healthy persons, and associated with a characteristic gut microbiota. Although to prevent depression, appropriate diet and exercise are recommended, the mechanism, significance and effective are unknown. In this study, we investigated whether exercise habits contribute to the prevention not only obesity but also psychiatric disorders through the gut microbiota. We used mice treated with a high-fat -diet (HFD) and/or voluntary exercise for 10 weeks, and then were observed with changes in depression-like behavior and were analyzed cecum organic acids, gut microbiota and brain gene expression. In conclusion, although depression-like behavior was observed in HFD mice, voluntary exercise contributed the preventive effect the depression.

研究分野：応用健康科学

キーワード：自発運動 健康 うつ様行動 腸内細菌叢 短鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

全世界の肥満人口は 21 億人とも報告され (Ng & Fleming, *Lancet*, 2014)、日本も例外ではない。肥満症は、精神疾患のリスクファクターの一つともされる。慢性の抑うつや不安障害患者を対象として行われたコホート研究によると、うつや不安障害患者は、健常者と比較して、体重の増加がみられ、肥満率が 2 倍であることが報告された (Kivimaki, et al., *BMJ*, 2009)。すなわち、うつ病、認知症などは、肥満との関連が強く (Bruce Keller, et al., *BBA*, 2009)、これらを予防するためには、適切な食事とともに運動の必要性が指定されている。一方、抑うつや不安亢進を引き起こすリスクファクターとして、脳内機能変容に関連する IL-1 β やプロスタグランジン (PG)E2 などの炎症関連分子が報告されている (Furuyashiki, et al., *Nat Rev Endocrinol*, 2011) が、これらに対する運動の抑制効果については不明である。近年、性格や心の状態に影響を与える要因として、腸内細菌叢が指摘されるようになり、サイコバイオティクスと呼ばれるようになった。自閉症や注意欠陥・多動性障害 (ADHD) など、心や精神あるいは脳の病とされてきた病気と腸内細菌叢との関連性が次々と報告されるようになり、我々の行動に影響を及ぼしている可能性は高い (Cryan & Dinan, *Nat Rev Neurosci*, 2012)。一方、運動習慣やスポーツ活動が、健康の維持増進にとって効果的であることは周知の事実であるが、近年、腸内細菌叢に変化を生じさせることも明らかとなってきた (Clarke, et al., *Gut*, 2014)。しかし、そのメカニズムとともに、その意義や効果的な活用法については、今までのところ不明である。また、運動には精神疾患の予防に効果的であることが報告されるようになった (Zschucke, et al., *J Prev Med Public Health*, 2013)。動物実験では、無菌マウスには、不安行動とともに神経細胞の可塑的变化が生じることから、腸内細菌によってこれらが調節されている可能性も指摘されている (Heijtz, et al., *PNAS*, 2011)。

2. 研究の目的

本研究では、運動習慣が腸内細菌叢を介して肥満症の発症予防だけでなく、精神疾患の予防にも貢献するのかについて明らかにするため、自発運動による腸内細菌叢の変化を介した抑うつ予防効果について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、食餌性肥満モデルマウスを用いて①高脂肪食摂取が、マウスの抑うつおよび不安行動に及ぼす影響、②運動習慣による高脂肪食摂取マウスの不安行動発症に対する予防効果、さらに、③その不安行動に及ぼす腸内細菌叢の影響について検討した。

1) 高脂肪食摂取マウスの抑うつおよび不安行動、および 2) 運動習慣による高脂肪食摂取マウスの不安行動発症に対する予防効果の検討

実験には、C57BL/6 雄マウス 4 週齢 (n=60) を用いて、通常食餌安静 (CDSED) 群 (n=15)、通常食餌自発運動 (CDWR) 群 (n=15)、高脂肪食餌安静 (HFDSED) 群 (n=15)、高脂肪食餌自発運動 (HFDWR) 群 (n=15) に分け、自発運動には、24 時間アクサエス可能な回転ケージ (WR) を使用し、10 週間負荷した。食餌は、通常食 (CD) および高脂肪食 (HFD) を自由摂取とした。その後、行動評価として、ガラス玉覆い隠し試験 (MBT)、オープンフィールドテスト (OFT)、強制遊泳テスト (FST)、シュクロース嗜好テスト (SPT) を実施した。行動測定終了後、イソフルラン麻酔下で、採血、さらに臓器摘出を実施した。行動に関連する脳内 (海馬、大脳、間脳) 遺伝子発現について評価。

3) 不安行動に及ぼす腸内細菌叢の影響

4 週齢の C57BL / 6 雄マウスを使用し、1)、2) マウス (ドナーマウス) の盲腸便を 4 週齢の C57BL / 6 雄マウス (レシピエントマウス, n=60) への便移植を行い、うつ様・不安行動に対する腸内細菌叢の関与について検討した。レシピエントマウスは、同系統同性同世代マウスからの便移植 (Control-TP) 群 (n=12)、通常食餌安静マウスからの便移植 (CDSED-TP) 群 (n=12)、通常食餌自発運動マウスからの便移植 (CDWR-TP) 群 (n=12)、高脂肪食餌安静マウスからの便移植 (HFDSE-TP) 群 (n=12)、高脂肪食餌自発運動マウスからの便移植 (HFDWR-TP) 群 (n=12) とした。便移植前の処理として、抗生剤アンピシリン (1 mg/ml) ・ネオマイシン (0.5 mg/ml) の混合水の自由飲水により腸内除菌処理 (1 週間) 後、0、1、2 週目 (3 回) にイソフルラン吸引麻酔下で便移植を実施した。移植に用いた便は、実験 I で回収した盲腸便 および コントロールとしては同系統同性同週齢のマウス盲腸便を使用した。無菌水に溶かした遠心分離処理済の上清便 (100 mg/ml) を胃ゾンデにて 200 μ l/匹投与した。行動評価として、1) と同様のテストを実施した後、自発運動試験 (回転ケージを使用) にて 6 日間測定し、評価を行った。

4. 研究成果

高脂肪食摂取マウスの抑うつおよび不安行動および運動の予防効果

(1) 高脂肪食餌摂取および自発運動による体重の推移

高脂肪食餌ならびに自発運動負荷による体重の変化は、高脂肪食餌摂取により有意に高値を示し、運動による体重増加抑制を確認した。

(2) 高脂肪食餌摂取および自発運動がマウスの行動に及ぼす影響

① OFT

オープンフィールド内でのマウスの総移動距離、中央滞在時間および移動速度には、運動および食餌の影響は観察されなかった。

② MBT

MBT は、両餌群ともに、自発運動条件で隠した数が多く、常同行動を示す傾向が観察された。また、高脂肪食餌摂取により有意に低値を示した($p < 0.01$)。

③ FST

FST は、両餌群ともに、自発運動条件で無動作時間の短縮が生じており ($p < 0.05$)、うつ状態の改善効果が観察された。高脂肪食餌摂取による影響はなかった。

④ SPT

ヒトのうつ病で認められる無欲状態を反映するとされる SPT は、CD 群と比較し HFD 群で有意な低下を示し ($p < 0.01$)、高脂肪食餌摂取による無欲状態が観察された。また自発運動により、有意に低値を示し、顕著な嗜好性の低下を示した($p < 0.05$)。

(3) 脳内の行動関連分子 mRNA 発現の変化

大脳では神経栄養因子である *Bdnf* は食餌および運動で有意に高値を示した。しかしながら、*Npy* 遺伝子発現には明らかな差は観察されなかった。また、*Il-1 β* および *Tnf- α* 遺伝子発現にも明らかな差は観察されなかった。血液脳関門(BBB)の評価としてのタイのタイトジャンクションである *Zo-1*、*Claudin5* および *Occludin* は運動により有意に低値を示し($p < 0.05$)、運動が BBB 低下に作用する可能性が示された。

一方、海馬の *Bdnf* 遺伝子発現は、変化は観察されなかったものの、*Npy* 遺伝子発現は、CD 群と比較し、HFD 群で有意に低くなる結果が観察された ($p < 0.01$)。 *Il-1 β* および *Tnf- α* 遺伝子発現には明らかな差は観察されなかった。

(4) 高脂肪食餌および運動負荷による盲腸内有機酸の変化

高脂肪食餌および運動負荷による盲腸内有機酸は、コハク酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸が検出された。盲腸内のコハク酸濃度は、運動により有意な増加が観察され($p < 0.05$)たものの、酢酸では運動による有意な減少($p < 0.05$)、および高脂肪食餌摂取による有意な減少($p < 0.01$)を観察した。高脂肪食餌摂取による有意な減少は、プロピオン酸、および酪酸でも観察された($p < 0.01$)。

(5) 高脂肪食餌および運動負荷による腸内細菌叢の変化

高脂肪食餌および運動負荷による腸内細菌叢の変化は、腸内細菌叢の多様性、主成分分析、およびクラドグラムにて分析し評価を行った。すなわち、腸内細菌叢の多様性を示す OUT、Whole tree および Chao1 は、高脂肪食餌摂取で有意に低値を示し、いずれの指数においても高脂肪食餌摂取による多様性の低下を示した($p < 0.01$)。また、Unifrac 解析においては、最も貢献度の高い PC1(32.71%)で通常食摂取、高脂肪食餌摂取が2つのグループに分かれたことから、腸内細菌叢に最も影響をもたらした因子として食餌が影響したことが推測された。また、PC2 においては、安静条件と運動条件で2つのグループに分類された。クラドグラムを用いた分析より食餌および運動の影響が観察され、HFDC で *Firmicutes* 門の有意な増加を観察し、*Firmicutes* / *Bacteroides* 比は、運動負荷により有意な低値を示した($p < 0.01$)。したがって、腸内細菌の評価から、食餌と運動による変化が観察されたことになる。

不安行動に及ぼす腸内細菌叢の影響

(1) 高脂肪食餌摂取および自発運動マウスの便移植による体重の推移

高脂肪食餌摂取および自発運動マウスからの便移植によるレシピエントマウスの体重変化は、観察されなかった。一方で、体脂肪率においては、すべての条件において通常食摂取にも関わらず食餌摂取、および運動により有意な変化を示した。すなわち、HFD 摂取したマウスの便移植を受けたレシピエントマウスは、CD 摂取マウスから便移植を受けたレシピエントマウス(HFDCTP および HFDWTP)と比較して有意に高値を示した(Effect of diet, $p < 0.01$)。また、運動負荷したマウスの便移植を受けたレシピエントマウス(CDWTP および HFDWTP)では、有意に体脂肪率の増加抑制が示された($p < 0.05$)。

(2) 高脂肪食餌摂取および自発運動マウスの便移植が不安行動に及ぼす影響

高脂肪食餌摂取および自発運動マウスの便移植が不安行動に及ぼす影響について行動テストを行

ったが、いずれのテストにおいても便移植による影響は観察されなかった。

(3) 脳内の行動関連分子 mRNA 発現の変化

ドナーマウスで観察された *Bdnf*, *Npy*, *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Zo-1*, *Claudin5* および *Occludin* の脳内遺伝子発現の変化は観察されなかった。

高脂肪食摂取マウスの抑うつおよび不安行動および運動の予防効果

本研究は、10 週間の自発運動が高脂肪食餌によって誘導された不安様行動を抑制すると仮説をたて実験を行った。高脂肪食摂取による明らかな体重増加と運動トレーニングによる体重減少が観察された。OFT の結果から高脂肪食摂取により誘導された不安行動が、運動によって改善されたことになり、マウスの不安行動に及ぼす運動の影響についての評価が OFT で可能となることが示唆された。さらに、FST の結果からも、うつ様行動の改善を生じる可能性が示された。FST では、うつ様行動を示すと水に入れた直後、マウスはストレスを回避しようと精力的に動き回るが、次第に動かない時間（無動作時間）が増え、いわゆる回避「あきらめる」ようになるが、抗うつ薬を投与すると無動作時間が減少することが報告されている (Iniguez, *Stress*, 2014.) が、本結果では、運動群で無動作時間の明らかな短縮が観察されたことから、運動によるうつ様行動の改善が示されたものと考えられる。一方で、MBT は、試行後に覆いかぶさっているガラス玉の数が多いほど、不安様行動の中でも常同行動が亢進しているとされる (Njung'e, *Pharmacol Biochem Behav*, 1991.)。常同行動とは、無目的に同じ行動を何度も繰り返すことであり、何の害もないガラス玉を次々と床敷きで覆い隠そうとする行動がヒトの常同行動のモデルとされている。本結果では、運動群で高値傾向を示し、運動により常同行動が増大する可能性が示されたことになる。さらに、3% ショ糖溶液の摂取量で評価する SPT では、FST と同様にうつ様行動を評価できるテストとされているが、自発運動による改善効果は観察されなかった。一方で、CD 群と比較して、HFD 群で有意な摂取量の減少が観察された。したがって、嗜好性の低下すなわち HFD 群でうつ様行動が観察されたことになる。このテストでは、FST とは異なり運動の影響があらわれなかったことになる。このように、すべての行動テストの結果は必ずしも一致した結果とはならず、いくつかの行動テストを併用することで、マウスの不安行動を詳細に評価することの必要性が示唆された。本研究では、さらに、マウスの不安行動メカニズムを遺伝子発現から評価を行った。先行研究によると、海馬における BDNF の減少がうつ様行動に深く関連することが報告されている (山田伸子, *肥満研究*, 2010.)。また、海馬における BDNF 発現が低下することで、SPT で嗜好性が低下することも報告されている (Grillo, *Behav Brain Res*, 2010.)。本結果では、CD 群と比較し、HFD 群で有意に BDNF 発現が低値を示したことから、高脂肪食摂取でうつ様行動が観察された SPT の結果を支持するものとなった。さらに、海馬における NPY 発現が高脂肪食摂取で有意に低値を示したことから、食欲促進に関わる NPY が嗜好性の評価である SPT の結果を支持するものとなった。海馬での BDNF と NPY の発現低下が、SPT で観察されたうつ様行動を誘導した可能性が示唆された。自発運動でうつ様行動の改善が観察されなかった理由として、Venzia ら (*Physiol Behav*, 2016.) の研究によると、20 週間の自発運動で BDNF 発現が増加したことが報告されていることから、自発運動を负荷した期間が短かったことも考えられる。

不安行動に及ぼす腸内細菌叢の影響

高脂肪食餌によって誘導された不安様行動が腸内細菌叢を介して伝播すると仮説をたて便移植実験を行った。便移植後、通常食摂取での飼育条件では、明らかな体重の変化は観察されないものと考えられた。一方で、体脂肪率の影響が便移植によってレシピエントマウスへすべての条件において通常食摂取にも関わらずドナーマウスの食餌摂取、および運動により有意な変化として観察された。したがって、ドナーマウスの身体的特徴の一部がレシピエントマウスに伝播したものと考えられた。しかしながら本研究では、高脂肪食餌摂取および自発運動マウスの便移植が不安行動に及ぼす影響について行動テストを行ったが、いずれのテストにおいても便移植による不安行動の伝播は生じなかった。腸内細菌移植後、高脂肪食餌での飼育を行った先行研究において、自発運動マウスの便移植後 3 週間後、安静マウスの便移植マウスよりも高い活動性を示すことを報告している (Oyanagi, *JPSFM*, 2018)。本研究でも、不安行動の伝播を予測し実施したものの、行動評価からは明らかとならなかった。

以上より、高脂肪食餌摂取および自発運動による不安行動変容と腸内細菌叢の変化は明らかとなったものの、便移植による不安行動の伝播は生じなかった。本研究モデルでは、腸内細菌叢を介した、抑うつ予防効果については明らかとならなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Chihiro Watanabe, Nanako Kobiki, Takafumi Aoki, Michael J. Kremenik, Takao Nagano, Hiromi Yano and Eri Oyanagi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of voluntary exercise on plasma and urinary metabolites and gut microbiota in mice fed with high-fat-diet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 渡邊知央, 小柳えり, 三浦鈴夏, 横川由佳, 青木孝文, 矢野博己
2. 発表標題 社会的敗北ストレスマウスの不安行動評価.
3. 学会等名 第9回日本運動免疫学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小柳えり, 渡邊知央, 小引菜々子, 青木孝文, 矢野博己.
2. 発表標題 腸内細菌とうつ様行動.
3. 学会等名 第9回日本運動免疫学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊知央, 小柳えり, 青木孝文, 三浦鈴夏, 横川由佳, 山形高司, 矢野博己
2. 発表標題 社会的敗北ストレスモデルを用いた自発運動習慣の抗うつ様効果
3. 学会等名 第75回大会日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oyanagi, E., Watanabe, C., Kobioki, N., Aoki, T., Kremenik, M.J., Nagano, T., Yano, H.
2. 発表標題 Effects of voluntary exercise on plasma and urinary metabolites and gut microbiota in a high-fat-diet fed mice.
3. 学会等名 24th Annual Congress of the European College of Sport Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe, C., Aoki, T., Kobioki, N., Kremenik, M.J., Oyanagi, E., Yano, H.
2. 発表標題 Effects of wheel running on blood-brain-barrier permeability in high-fat-diet fed mice.
3. 学会等名 4th Annual Congress of the European College of Sport Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊知央, 小柳えり, 小引菜々子, 三浦鈴夏, 横川由佳, 北村裕美, 青木孝文, 矢野博己.
2. 発表標題 自発運動に伴う脳内炎症性サイトカインとマイクログリアの動態
3. 学会等名 第83回日本体力医学会中国・四国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小柳えり, 渡邊知央, 小引菜々子, 青木孝文, 片岡浩巳, 長野隆男, 矢野博己
2. 発表標題 高脂肪食餌および運動が腸内細菌叢由来の血中ならびに尿中代謝産物に及ぼす影響
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊知央, 小柳えり, 小引菜々子, 北村裕美, 青木孝文, クレメニック・マイケル, 片岡浩巳, 矢野博己.
2. 発表標題 マウスの不安行動と腸内細菌叢の関係
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小柳えり, 渡邊知央, 小引菜々子, 北村裕美, 青木孝文, 宮川健, クレメニック・マイケル, 矢野博己
2. 発表標題 マウス不安様行動におよぼす高脂肪食と運動の影響
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊知央, 青木孝文, 小引菜々子, 矢野博己, 小柳えり
2. 発表標題 高脂肪食および自発運動が脳内タイトジャンクションにおよぼす影響
3. 学会等名 第82回日本体力医学会中国・四国地方会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------