

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15797

研究課題名（和文）行動神経栄養学を用いた発酵乳による認知機能障害予防法の確立

研究課題名（英文）Establishment of an animal model of cognitive deficit which is useful for exploring nutritional prophylaxis

研究代表者

長澤 麻央（Nagasawa, Mao）

名城大学・農学部・助教

研究者番号：80759564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：記憶機能は「記録」-「保持」-「想起」から構成される。本研究では認知症患者で障害されている「想起」に着目し、想起障害の発症ならびに病態メカニズムの解明を目指した。「想起」を誘導したマウスの海馬ではMyelinationに関わる遺伝子の発現変動が確認された。また、「想起」が障害された認知機能障害モデルでは炎症反応に関わるいくつかのBiological processに影響が認められた。以上より、神経炎症によって産生された炎症性サイトカインがミエリン機能にダメージを与えることで脳機能障害が誘導されるという「ミエリン仮説」を補強する成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の認知機能障害モデルは試薬の急性投与による重症度の高いモデルがほとんどである。これらのモデルは病態メカニズムの解明や治療法の探索を行う上では有効なモデルとなる。一方で、食品や食品成分を用いた栄養学的予防法を探索する上では、重篤すぎる症状ゆえにそれらの持つ予防効果を見落としがちになる。本研究で作製したモデルは「想起」の機能が完全に消失しているわけではないため、栄養学的アプローチを介した予防研究を進める上で有用なモデルと成り得る。

研究成果の概要（英文）：Memory function is consisted of three process, such as memorization - retention - retrieval. The purpose of the present study was to elucidate the onset and pathophysiological mechanisms by focusing on “retrieval” which is impaired in subjects with dementia. In the hippocampus of mice with “retrieval”, mRNA expressions related to myelination were fluctuated. In addition, retrieval deficit model showed the alterations in gene expression related to neuroinflammation in hippocampus. The present results supported a hypothesis for the malfunction of myelination mediated by neuroinflammation in cognitive impairment.

研究分野：行動神経科学

キーワード：認知機能障害モデル 想起 トランスクリプトーム解析 神経炎症 Myelination

1. 研究開始当初の背景

認知症は、記憶障害を中心とした症候群である。認知症によって記憶障害が引き起こされると、日常生活を送ることが困難となるため、患者の「生活の質」を維持する上で大きな障害となる。厚生労働省の平成 26 年度患者調査によると、認知症の患者数は、平成 11 年に 12.1 万人であったのに対し、平成 26 年には 53.4 万人へと急激に増加している。認知機能の低下は加齢に伴って進むため、現在の状況は医療技術の進歩が生みだした弊害とも言える。超高齢化社会に突入する日本において、認知症患者の増加を食い止めるための早急な対応が求められている。しかし、記憶障害の治療法ならびに予防法を探索する上で、最も根源的な部分である記憶のメカニズム自体が完全には解明されていない。記憶とは、「記銘」(覚えること) - 「保持」(覚えた事柄を留める) - 「想起」(覚えた事柄を思い出す)の 3 つの過程から構成される。この過程の中でも、認知症で大きな問題となっているのは覚えていた事柄を思い出せなくなることで、つまり、「想起」の機能が損なわれることである。そのため、「想起」のメカニズムを解明することが、認知機能低下に対する新たな治療法あるいは予防法の提案において重要である。また、食品や食品成分を用いた栄養学的アプローチを介した認知機能障害の予防法を探索するためには、比較的軽微な認知機能障害モデルの確立も必要不可欠となる。

2. 研究の目的

本研究では、記憶のメカニズムの中でも認知症で問題となっている「想起」に着目し、想起が誘導される際のメカニズムの探索を行った。また、「想起」の障害された認知機能障害モデルを確立し、その病態メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

1) 想起誘導モデルを用いた「想起」に関わるメカニズムの探索

げっ歯類が新しいものに興味を示すという習性を利用した「想起誘導試験」を実施した。オープンフィールド装置(縦 45 cm × 横 45 cm × 高さ 45 cm)内に同じ物体(赤色の円柱、直径 6 cm × 高さ 15 cm)を 2 個設置した状態で、マウスを自由に探索させることで、物体に対する記憶を「記銘」「保持」させるという工程を 3 日間連続して行った。4 日目に一方の物体を新奇物体(黄色の四角柱、縦 5 cm × 横 5 cm × 高さ 15 cm)に置き換えることで、マウスに既存物体(赤色の円柱)と新奇物体(黄色の四角柱)を提示し、物体に関する記憶を「想起」させた。対照群には同じ物体(赤色の円柱)を 2 個設置した状態の試験を 4 日間連続して実施することで、記憶を「記銘」ならびに「保持」はさせるものの「想起」はさせない状態とした。行動試験終了直後に脳を採取し、トランスクリプトーム解析に供した。

2) ガラクトース投与モデルを用いた認知機能障害の病態メカニズムの探索

本研究では、ガラクトースを 6 週間経口投与することによって認知機能障害モデルを作製した。作製したモデルの認知機能はバーンズ迷路試験を実施することで評価した。バーンズ迷路試験装置は直径 90 cm の円盤の外縁部に 16 個の穴(直径 5 cm)が等間隔に設置されたフィールドで構成されている。一つの正解の穴の下にはマウスが逃避可能となる引き出しが設置されており、他の穴にはマウスが侵入できないように黒い板で穴を塞いでいる。フィールドの照度は 300 lux に設定し、マウスにとって忌避環境とすることで、逃避可能な正解の穴へと導く試験である。本研究では、この装置上でマウスを自由に行動させ、逃避可能な正解の穴に侵入するまでの時間を測定する試験を 3 日間連続して行った。行動試験の翌日に脳を採取し、メタボローム解析に供した。

3) 想起障害モデルを用いた認知機能障害の病態メカニズムの探索

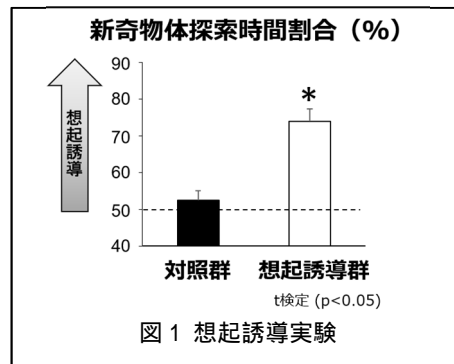
本研究では、スコポラミンの連続腹腔内投与によって脳機能障害モデルを作製し、認知機能障害の有無を確認するためにバーンズ迷路試験を行った。本研究では、装置上でマウスを 3 分間自由に行動させ、退避可能な正解の穴に侵入した時点で終了とするトレーニング試験を 24 時間おきに 4 日間実施することで、正解の穴までの記憶を「記銘」させた。4 日目のトレーニング試験終了後から 7 日間に渡りスコポラミンを腹腔内投与し、最終投与から 24 時間後に本試験を実施した。本試験は全ての穴を塞いだ状態で実施し、正解の穴周辺での滞在時間を測定することで認知機能の評価を行った。本試験終了の 24 時間後に脳を採取し、トランスクリプトーム解析に供した。

4. 研究成果

1) 想起誘導モデルを用いた「想起」に関わるメカニズムの探索

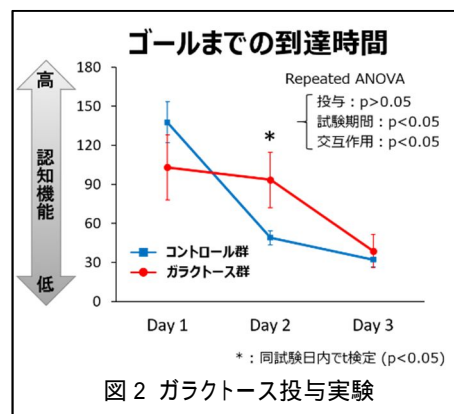
想起誘導試験の結果を図 1 に示す。対照群は 3 日間同じ物体に接していたため、4 日目の試験においても 2 個の物体に対して同程度(約 50% ずつ)の探索行動を行った。一方で、想起誘導群は、4 日目の試験において新奇物体が現れたために、そちらを選択的に探索した結果、新奇物

体探索時間の割合が高値 (73.9%) を示した。新奇物体を選択的に探索するという事は既存物体を認識しているということなので、想起誘導群は試験実施時に「想起」が誘導されていたと結論づけた。「想起」が誘導される際の分子機構を明らかにするために、海馬のトランスクリプトーム解析を実施した。得られたデータから Gene Ontology Enrichment 解析を行ったところ、「想起」によって Myelination という Biological process に影響が現れていることが明らかとなった。以上より、「想起」のメカニズムに海馬のミエリン形成に関わる可能性が示唆された。



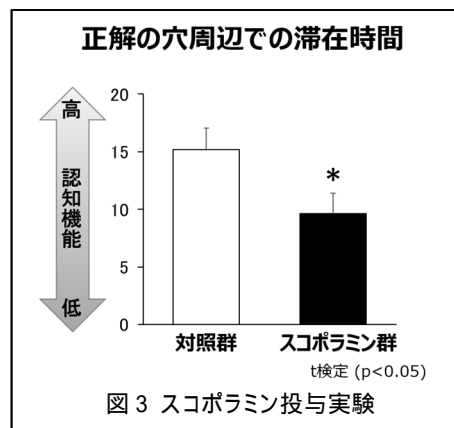
2) ガラクトース投与モデルを用いた認知機能障害の病態メカニズムの探索

ガラクトースの慢性投与がバーンズ迷路試験の成績に及ぼす影響を図 2 に示す。1 日目は試験初日であるため、両群において到達時間に有意差は認められなかった。一方で、2 日目はコントロール群では到達時間が短縮されたものの、ガラクトース投与群では短縮されなかった。そのため、ガラクトース投与が記憶の「記録」、「保持」、および「想起」の機能を障害させた可能性が考えられた。しかし、3 日目では両群において到達時間は同値となった。そのため、ガラクトース投与群において、記憶の「想起」の機能には障害が現れていないと推測できる。以上より、ガラクトース慢性投与は記憶の「記録」あるいは「保持」に影響を及ぼすものと結論付けた。記憶の「記録」あるいは「保持」が障害された際の脳への影響を明らかにするため、メタボローム解析を実施した。ガラクトース慢性投与によって、短期記憶との関連が示唆されている海馬において Adenosine-5-monophosphate、Dehydroascorbate の減少が、長期記憶との関連が示唆される大脳皮質において Proline の増加や Phosphoethanolamine、Aspartate、Glutamate の減少が、そして、パーキンソン病で認められる認知機能障害との関連が示唆されている線条体において Lactate、Gamma-aminobutyrate、Glycine の増加や Pantothenate の減少が認められた。



3) 想起障害モデルを用いた認知機能障害の病態メカニズムの探索

認知機能障害を誘導する手法として、一般的にスコポラミン投与が用いられる。これは、脳内でアセチルコリンが減少することで認知機能障害が誘導されるという報告を基にしており、スコポラミンのムスカリン性アセチルコリン受容体の競合阻害作用に起因する。最近の研究において、スコポラミンの慢性投与によって脳に酸化ストレスが誘導されることが明らかとなってきた(引用文献 1)。しかし、多くの研究者はアセチルコリン受容体阻害作用によって誘導される認知機能障害に着目しているため、スコポラミンが酸化ストレスを誘導するという知見が重要視されていない。実際に、認知機能評価を行う直前にスコポラミン投与が行われるため、誘導された認知機能障害がアセチルコリン受容体阻害作用に大きく依存するのか、あるいは、脳への酸化ストレス暴露がそのメカニズムの一端を担うかは不明なままである。本研究では、バーンズ迷路試験のトレーニング期間が終了した後にスコポラミン投与を行うことで、記憶の「記録」に影響を与えないように考慮しただけでなく、スコポラミンの最終投与の 24 時間後に本試験を実施することで、アセチルコリン受容体阻害作用を排除し、酸化ストレス暴露が記憶の「保持」ならびに「想起」へ及ぼす影響を評価した。スコポラミン投与によって、正解の穴周辺での滞在時間が有意に減少したことから、記憶の「保持」あるいは本研究課題のターゲットである「想起」が障害されたモデルを作製できた(図 3)。本モデルの海馬におけるトランスクリプトーム解析を実施したところ、Acute inflammatory response や Regulation of cytokine secretion、Regulation of immune response といった炎症反応に関わる Biological process に影響が現れていることが確認された。1)の研究成果より、ニューロンの軸索を覆うことで神経伝達効率を制御するミエリンの機能が、記憶の「想起」のメカニズムに密接に関わる可能性を明らかにしている。一方で、このミエリンが、神経炎症時に産生される炎症性サイトカインによって分解(脱鞘)されることで脳機能障害が誘導されるという可能性が他研究グループから報告されている(引用文献 2)。以上を踏まえ、スコポラミン投与は海馬における神経炎症を介して、記憶の「保持」や「想起」といった認知機能を障害させる可能性が示唆された。本研究より、認知機能の維持にミエリンの機能が関



わるという「ミエリン仮説」を補強する成果が得られた。

<引用文献>

1. Fronza MG, Baldinotti R, Fetter J, Sacramento M, Sousa FSS, Seixas FK, Collares T, Alves D, Praticò D, Savegnago L. QTC-4-MeOBnE rescues scopolamine-induced memory deficits in mice by targeting oxidative stress, neuronal plasticity, and apoptosis. *ACS Chemical Neuroscience*, 11: 1259-1269, 2020.
2. Matsui M. Immunology for understanding the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical Neurology*, 53: 898-901, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M. Marui, K. Adachi, T. Hayashi, M. Nagasawa
2. 発表標題 Tracking metabolic changes associated with retrieval in the hippocampus
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------