

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20877

研究課題名（和文）海馬アストロサイトからのL-乳酸低下に着目した糖尿病の認知機能障害の発症機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of cognitive dysfunction in diabetes mellitus by focusing on the decrease of L-lactate from hippocampal astrocytes

研究代表者

森島 徹朗（Morishima, Tetsuro）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・准教授

研究者番号：10448714

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病マウスでは、新規物体認識試験により、記憶障害が生じていることが明らかになった。これは、海馬におけるアストロサイトの機能低下が関与し、アストロサイトから神経細胞へ輸送されるL-乳酸量が減少するためであることを、行動生物学的に明らかにした。また、アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を用いて興奮性のデザイナー受容体であるhM3Dqを海馬のアストロサイトに発現させ、その機能を活性化すると、糖尿病で見られた認知機能障害が改善することが明らかになった。この海馬アストロサイトの活性化による糖尿病マウスの認知機能低下改善作用は、L-乳酸を輸送するトランスポーターを阻害すると消失した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者の数は、全世界的に爆発的に増加しており、その合併症に悩まされる患者の数も多くなっている。糖尿病患者にみられる中枢神経系の合併症として認知機能障害があるが、その治療法は少なく、病態生理学的な理解も進んでいない。糖尿病患者にみられる認知機能障害のメカニズムを明らかにすることは、超高齢社会となった日本だけでなく、今後、高齢化が進む先進国においても重要な課題である。また、本研究は、アデノ随伴ウイルスベクターと化学遺伝学的手法を用いて、特定の神経系細胞の機能を時空間的に調節できる技術を利用した結果であり、学術的意義も高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：The number of diabetic patients is exploding worldwide, and the number of patients suffering from its complications is also increasing. Cognitive dysfunction is a common complication of the central nervous system in diabetic patients, but there are few treatment options and the pathophysiology is not well understood. It is important to elucidate the mechanisms of cognitive dysfunction in diabetic patients, not only in Japan, which has become a hyper-aged society, but also in other developed countries with aging populations. This study is also of great academic significance because it is the result of the use of technology that enables the spatio-temporal regulation of specific nervous system cell functions using adeno-associated viral vectors and chemical genetic techniques.

研究分野：麻酔科学

キーワード：認知機能障害 糖尿病 アストロサイト L-乳酸

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、認知機能の障害を起こす(Ott et al. Neurology 1999)。糖尿病マウスでは、短期記憶は正常だが長期記憶が低下することから、記憶情報を長期記憶に変換するステップに異常があることが示唆される。

記憶の固定の機序として、徐波睡眠や安静時に海馬で見られる Sharp-Wave Ripple (SWR) 波が重要である(Girardeau et al. Nat Neurosci 2009)。SWR は、海馬 CA3 領域の神経細胞集団の同期発火により生じる脳波であるが、糖尿病など認知機能に影響をもたらす疾患モデルでの報告が少ない。また、記憶の形成には、グリア細胞から神経細胞へ供給される伝達物質の「L-乳酸」が必要である(Suzuki et al. Cell 2011)。糖尿病マウスでは海馬アストロサイトの形態が変化しており、L-乳酸の供給異常により記憶の保持ができない可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病マウスにおける短期記憶を長期記憶に変換する機構の障害が、アストロサイトから放出される L-乳酸量の低下による神経細胞の自発的同期発火の異常に起因することを確認し、その機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

4~12 週齢の ICR (Institute of Cancer Research) 系雄性マウスを用いた。動物は餌と水を自由に摂取でき、明暗サイクル 12 時間で、温度・湿度をコントロールした部屋で飼育した。

(2) Streptozotocin (STZ) 誘発性糖尿病モデルマウスの作製

4 週齢の ICR 系雄性マウスを用いた。約 24 時間の絶食の後、麻酔下で STZ (200mg/kg) を尾静脈より投与 (intravenous administration : i.v.) した。クエン酸バッファー (pH 4~5) を調整し、STZ を溶解した。対照群マウスには、クエン酸バッファーのみを投与した。これらを投与したマウスを 2 週間以上飼育した後に実験に用いた。

(3) 新奇物体認識試験 (Novel Object Recognition Test : NORT)

マウスを実験室に移動し、15 分間の馴化を行った。handling を行い、実験手技者への馴化を行った後、紙製チップの敷かれた 345×403×177mm の観察箱にマウスを入れ、30 分間観察箱への馴化を行った。マウスをホームケージに戻し 1 時間以上放置した。まず、Training Session として、観察箱に壁から 100mm 以上離れた場所に 2 つの同形の物体 (木製) を置き、マウスを観察箱内に入れそれぞれの物体への探索時間を測定した。翌日、Test Session を行った。Test Session では、マウスを実験室に移し、1 時間以上の馴化を行った後、Training Session で探索時間が短かった方の物体を新奇物体 (木製) に交換し、観察箱に Training Session の際と同じ位置に両物体を置き、マウスを観察箱に入れ、それぞれの物体への探索時間を測定した。

得られたデータは、Training Session の際に探索時間が短かった物体の探索時間、または Test Session の新奇物体への探索時間を Training Session と Test Session それぞれの総探索時間で割り、百分率として算出 (Preference index : PI) し評価した。

(4) ウイルスインジェクション

4 週齢の ICR 系雄性マウスを pentobarbital sodium salt (60 mg/kg, i.p.) で麻酔後、頭部を脳定位固定装置に固定した。その後、頭部を切開し、マイクロマニピュレーターを用いて、海馬 CA1 領域に adeno-associated virus (AAV) (rAAV5 GFAP-eGFP, rAAV5 GFAP-HA-hM3Dq-mCitrine) を 0.1 μ L/min の速度で計 0.5 μ L 投与した。AAV $\sim 10^{12}$ IU/mL を 0.1 μ L/min で計 0.5 μ L 投与した (Murray et al., 2011)。AAV の投与後、マウスの頭部を縫合し、翌日から 1 日間絶食を行った後、STZ (200mg/kg, i.v.) を投与した。導入したプラスミド由来のタンパク質を十分に発現させるために、投与から 3 週間後に行動試験を行った。

行動試験後、灌流固定により脳サンプルを作製した。脳サンプルは、ビブラトームで 50 μ m の切片とし、投与部位ならびに感染部位の確認を行った。

(5) 海馬 CA1 領域における Slow wave の発生頻度の検討

記憶の形成に重要であるとされる海馬 CA1 領域における Slow wave の発生頻度について検討を行った。STZ 誘発性糖尿病モデルより作製した海馬スライス標本を用いて、Slow wave の発現について解析を行った。

(6) 統計

データは全て平均値 \pm 標準誤差で示した。同一個体間での比較は t 検定、別個体間での二群比

較は F 検定を行い、等分散である場合は t 検定、非等分散である場合は Welch の t 検定を用いて有意差検定を行った。また、多群間での比較は Bonferroni 検定を用いて有意差検定を行った。危険率 5%未満の変化を有意な変化とした。p<0.05 は*で示した。

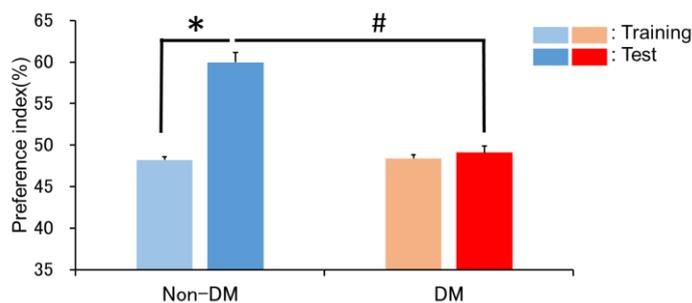
4. 研究成果

(1) 糖尿病マウスにおける認知機能の検討

STZ 誘発性の糖尿病マウスにおける認知機能について、新奇物体認識試験 (NORT) を用いて検討した。対照群マウスにおいて、Test Session の新奇物体への探索時間の割合が有意に上昇したのに対し、糖尿病マウスでは Test Session の新奇物体への探索時間の割合の有意な上昇は見られなかった (図 1)。

図 1. 糖尿病マウスにおける NORT による認知機能の測定

*p<0.05 vs. Training, p#<0.05 vs. Non-DM Test Non-DM n=15, DM n=11



(2) 糖尿病マウスにおける認知機能障害に対する L-乳酸の効果

対照群マウスおよび糖尿病マウスへ L-乳酸を Training Session 30 分前に脳室内投与した際の認知機能に対する効果を検討した。対照群マウスでは、L-乳酸の投与により影響がなかったのに対し、糖尿病マウスでは用量依存的に Test Session での新奇物体への探索時間の割合が上昇した (図 2)。

図 2. L-乳酸の認知機能に対する効果

(a) 実験スケジュール

(b) NORT による評価

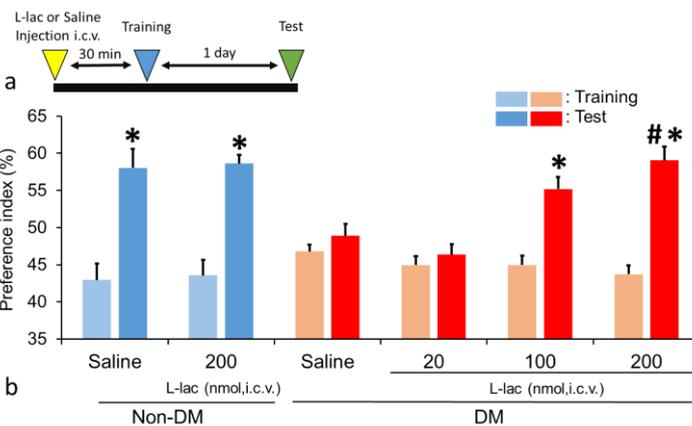
*p<0.05 vs. Training, p#<0.05

vs. Non-DM Saline Test

Non-DM Saline n=10, 200nmol n=11

DM Saline n=10, 20nmol n=11,

100nmol n=9, 200 nmol n=7



(3) 糖尿病マウスにおける認知機能障害に対する D-乳酸の効果

L-乳酸の光学異性体である D-乳酸は不活性化体であり、ラットを用いた恐怖条件付けの検討から恐怖記憶の形成を阻害することが報告されている (Suzuki et al., 2011)。そこで、対照群マウスおよび糖尿病マウスの認知機能に対する D-乳酸の影響を検討した。対照群マウスにおいては Test Session 前の D-乳酸の投与により、用量依存的な Test Session での新奇物体に対する探索時間の割合が減少した。一方、糖尿病マウスにおいては有意な影響が認められなかった (図 3)。

図 3. D-乳酸の認知機能に対する効果

(a) 実験スケジュール

(b) 認知機能の NORT による評価

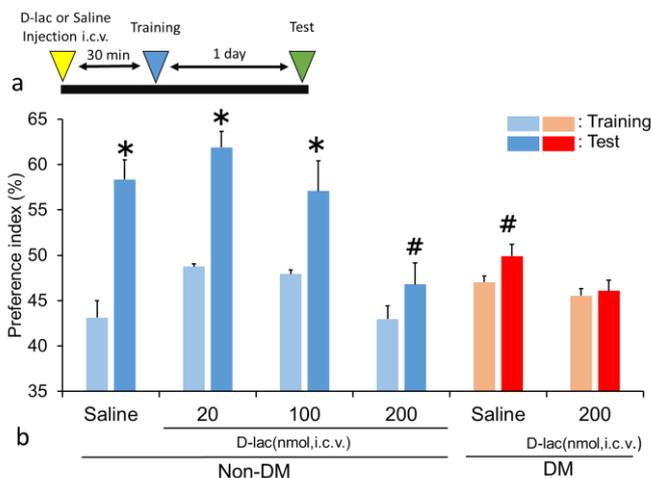
*p<0.05 vs. Training, p#<0.05 vs.

Non-DM Saline Test

Non-DM Saline n=12, 20nmol n=5,

100nmol n=6, 200nmol n=10

DM Saline n=12, 200nmol n=13



(4) 糖尿病マウスにおける L-乳酸の認知機能改善作用に対する D-乳酸の効果

D-乳酸は L-乳酸の競合的阻害薬としても用いられる (Tang et al., 2014)。そこで、L-乳酸の脳室内投与による糖尿病マウスの認知機能改善作用に対する D-乳酸の効果を検討した。

L-乳酸処置により、糖尿病マウスの Test Session における新奇物体への探索時間の割合が上昇したのに対し、L-乳酸と D-乳酸を同時に投与した群ではその効果が消失した (図 4)。

図 4. L-乳酸と D-乳酸の効果

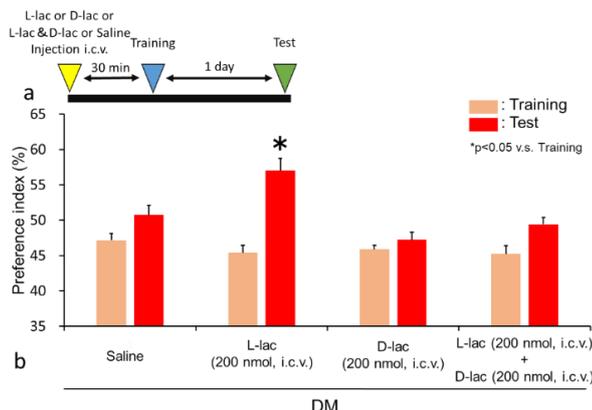
(a) 実験スケジュール

(b) NORT による評価

* $p < 0.05$ vs. Training DM Saline

n=10, L-lactate n=7, D-lactate

n=13, L-lactate+D-lactate n=8



(5) アストロサイト阻害薬による効果

糖尿病マウスでは、海馬 CA1 のアストロサイトの発現が対照群マウスと比べ増加していることが明らかになったため、アストロサイトの阻害薬である fluorocitric acid (FC) と DL-2-amino adipic acid (α -AA) を対照群マウスおよび糖尿病マウスに脳室内へ急性投与した際の NORT における認知学習への影響を検討した。FC は TCA サイクルを阻害することでアストロサイトの活動を抑制し、 α -AA はグルタミン酸トランスポーターを介してアストロサイト内に取り込まれアストロサイトの機能を抑制する (Miguel-Hidalgo et al., 2009)。FC を脳室内投与すると、対照群マウスでは Test Session における新奇物体への探索時間の割合が有意に減少したのに対し、糖尿病マウスでは Test Session における新奇物体への探索時間の割合に変化が認められなかった (図 5)。

図 5. 認知機能に対する fluorocitric acid の効果

(a) 実験スケジュール

(b) NORT による評価

* $p < 0.05$ vs. Training, $p\# < 0.05$ vs. Non-

DM Vehicle Test

Non-DM Vehicle n=10, FC n=10, DM

Vehicle n=9, FC n=8

また、 α -AA を脳室内投与すると同様に、対照群マウスでは Test Session における新奇物体への探索時間の割合が用量依存的に減少した。糖尿病マウスでは Test Session における新奇物体への探索時間の割合に変化は認められなかった (図 6)。

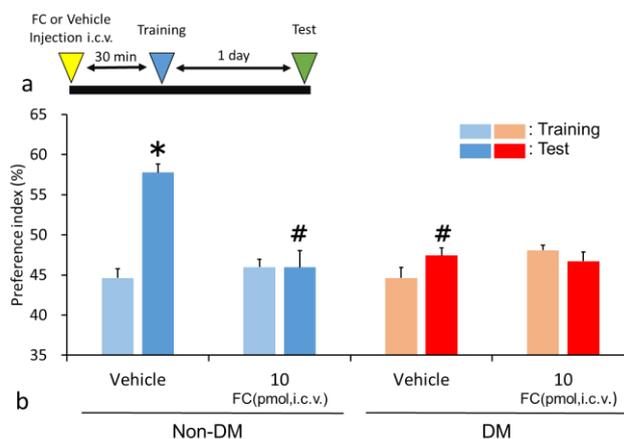


図 6. 認知機能に対する α -amino adipate の効果

(a) 実験スケジュール

(b) NORT による評価

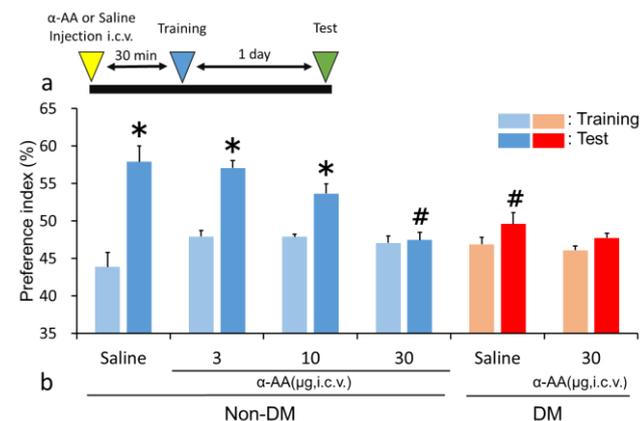
* $p < 0.05$ vs. Training, $p\# < 0.05$ vs. Non-

DM Saline Test

Non-DM Saline n=12, α -AA 3 μ g n=6, α -

AA 10 μ g n=5, α -AA 30 μ g n=9

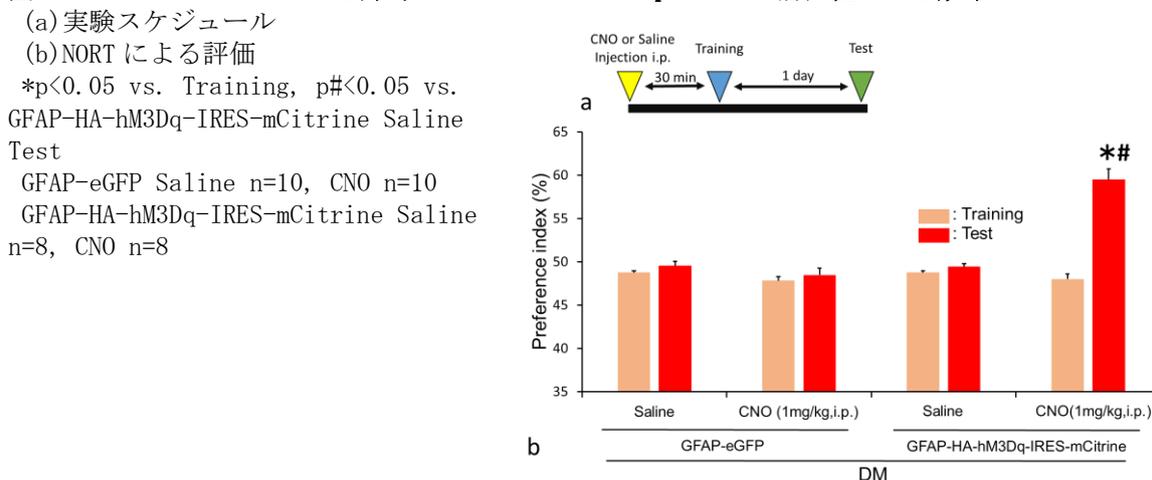
DM Saline n=11, α -AA 30 μ g n=10



(6) DREADD システムを用いた糖尿病マウスの認知機能障害に対する影響

糖尿病マウスの認知機能障害に対する海馬 CA1 領域のアストロサイト特異的な Gq シグナル活性化の効果を検討した。AAV(GFAP-eGFP)を微量注入したマウスでは、saline または CNO の投与による Test Session における新奇物体・既知物体への探索時間はほぼ同程度であったのに対し、AAV(GFAP-HA-IRIS-hM3Dq-mCitrine)を海馬 CA1 領域へ微量注入したマウスでは、CNO 投与により Test Session における新奇物体への探索時間の割合が有意に増大した。一方、saline 投与によって探索時間の増大は認められなかった (図 7)。

図 7. DREADD システムによる海馬アストロサイトの Gq シグナル活性化による効果

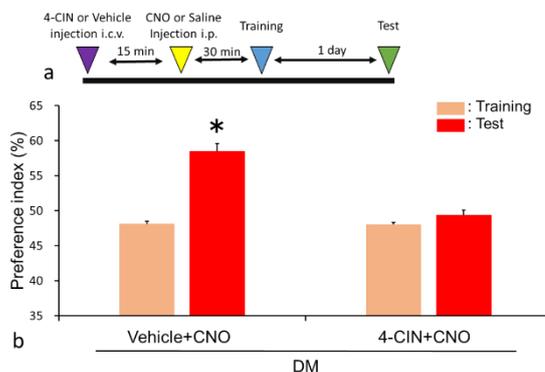


次に、糖尿病マウスの海馬 CA1 領域のアストロサイト選択的な Gq シグナルの活性化による認知機能改善が乳酸輸送を介した作用であることを検討するため、4-CIN 前投与の効果を検討した。4-CIN を前処置することで、糖尿病マウスの海馬 CA1 アストロサイト選択的な Gq シグナルの活性化により認められた新規物体への探索時間の延長作用が有意に抑制された (図 8)。

図 8. DREADD システムを介した効果に対する 4-CIN の効果

(a) 実験スケジュール
(b) NORT による評価

*p<0.05 vs. Training. Vehicle+CNO n=8, 4-CIN+CNO n=8



(7) 海馬 CA1 領域における Slow wave の発生頻度の検討

記憶の形成に重要であるとされる海馬 CA1 領域における Slow wave の発生頻度について検討を行った。STZ 誘発糖尿病マウスより作製した海馬スライス標本を用いて、Slow wave の発現について解析を行った結果、健常マウスより作製した海馬スライスと比較すると、糖尿病マウスでは Slow wave の発現頻度が低下していた。また、L-乳酸を外因的に与えると、糖尿病マウスの Slow wave の発現頻度が上昇した。

以上の研究結果から、糖尿病マウスの認知機能障害には、海馬アストロサイトの機能低下に伴う L-乳酸の生成低下が一部関与することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------