

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：32429

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21227

研究課題名（和文）新規二重他動運動負荷による老化促進モデルマウスの大脳老化予防効果と作用機序解明

研究課題名（英文）Effects of Double Passive Exercise Load Device on Prefrontal-Thalamic-Hippocampal circuit senescence in SAMP10

研究代表者

姚 潤宏（Yao, Runhong）

日本保健医療大学・保健医療学部理学療法学科・助手

研究者番号：40909610

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）：T-mazeの結果では、20WのDPELD群の反応時間が有意に短かった。受動回避試験の結果から、20Wと30W共に対照群比べ長い潜時を示した。組織解析から、DPELD群ではより多くの正常な神経細胞がDG、近位CA3、遠位CA1、およびMPFC領域に保持されていた。抗FNDC5抗体によるDPELD群のCA1遠位部、subiculum、およびrostral MPFCにより多く観察された。DPELD群の広範囲脳と海馬では対照群に比べてIrisinの発現量が有意に少なかった。神経栄養因子群の発現を解析した結果、DPELD群のマウス海馬におけるNGFの発現レベルは顕著な上昇を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規刺激装置による脳機能と記憶に及ぼす影響についての知見を提供し、認知症の改善に寄与することが期待できる。mPFC-ATN-dHC神経回路が記憶の形成に関与することが知られているため、新規開発した装置による刺激が、この回路に与える影響を評価することは、認知症予防などを脳科学分野から理解を深める上で重要な成果となり得る。

高齢化社会が進む中、本研究で開発したDPELDは、運動刺激を通じて脳機能改善を行い、認知症の予防に寄与する可能性が示唆されるため、社会的意義が高いと言える。また、今後のヒトへの臨床応用研究に発展させることで、高齢者の健康維持や介護負担の軽減など、広範囲な分野での利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The DPELD makes more normal neurons remain in DG, proximal CA3, distal CA1 and mPFC subregions. The neuron density in the subiculum was higher in the DPELD group than in the control group. The effect of the DPELD was mainly reflected in the 20th week, and there was no intentional difference in the 30th week. According to the passive avoidance test results, there were significant differences both in the 20th and 30th weeks. We found the DPELD group's *fnDC5* was more expressed in the selective part of the hippocampus and mPFC, rather than evenly distributed throughout the organization. More FNDC5-positive proteins were maintained in the CA1 distal and subiculum subregions and the rostral mPFC in the DPELD group. Irisin was weaker in the hippocampus of the DPELD group compared to control controls. The NGF level in the mouse hippocampus was significantly higher in the DPELD group. There is no significant difference in NT4/5.

研究分野：医療福祉工学

キーワード：Hippocampus Medial prefrontal cortex SAMP10 memory

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症は進行性の脳疾患であり、現在の治療法では完全に治癒することができないが、運動によりその発症を予防、あるいは症状の進行を遅らせることが可能であると指摘されている¹⁾。運動は骨格筋において Fibronectin Type III Domain-containing Protein 5 (FNDC5) を切断し Irisin へと導き、それは血管系を介して脳に到達し、神経栄養因子の発現を誘発することで神経細胞の成長やシナプス可塑性を促進する。これにより神経ネットワークを維持し、認知機能の向上に重要な影響を与えることが示唆されている²⁾。一方で、加齢に伴い運動は、身体や精神への負荷を伴うことがある。そのため、高齢者では運動への意欲が低下し、運動を継続することが困難となり、運動効果が保証されているとは言えない。それは骨格筋で発現した物質が、血液を介して FNDC5/Irisin 系に作用するため発現量の低下がその系の活性を低下させることが懸念されるからである。高齢者に対する適切な運動刺激が、骨格筋由来あるいは脳由来の FNDC5/Irisin 作用経路を誘発できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、高齢者の認知機能低下を緩和するための効果的な運動療法を考案し、それを検証した後、人に応用出来る社会実装可能な振盪運動プログラムの立案及び開発することを目的に動物実験を行う。これまでの自身の研究で効果を確認出来ている水平方向振動刺激と垂直方向振動刺激を組み合わせた新規二重他動運動負荷装置 (DPELD: Double Passive Exercise Load Device) を開発し、老化促進モデルマウス (SAMP10) に DPELD による他動運動を実施する。記憶に関わる脳組織の Anterior Thalamic Nuclei (ATN)- Hippocampus (HPC)-Medial Prefrontal Cortex (MPFC) を中心とした組織解析を行う。広域脳組織と海馬局所における神経栄養因子 Nerve Growth Factor (NGF) と Neurotrophin 4/5 (NT4/5) の発現を ELISA により定量し評価する。また、行動解析による記憶機能測定を並行して行う。これらの解析から DPELD 運動刺激によって誘発される FNDC5/Irisin 伝達経路の活性化を解析する。また、それと神経栄養因子との相互作用を究明することで DPELD 運動刺激の経時的効果、持続効果を検証し、老化に伴う記憶力低下予防出来る方法となることを立証する。

3. 研究の方法

(1) DPELD 運動装置の開発と製作

これまで本研究組織では自発運動が困難な高齢者に注目し、他動運動療法により身体に適切な刺激を与える運動方法を開発してきた。自身の研究で成果を証明した水平方向振動刺激³⁾と垂直方向振動刺激を組み合わせた DPELD を開発する。本装置は自発運動が困難な高齢者に対して、他動的に効果的な刺激を行うことが出来、安全性と実用性を兼ね備えている。

(2) 実験対象

脳萎縮を伴う学習・記憶障害、老化アミロイドーシス病変を認める老化促進モデルマウス SAMP10 を認知記憶機能低下高齢者と模擬し、SAMP10 を運動ありの DPELD 群と運動なしの対照群 (各 n=14) の 2 群に分類する。運動群は DPELD を使用した他動運動を、30 分間 / 日、3 回 / 週、21 週間継続して実施する (図 1)。

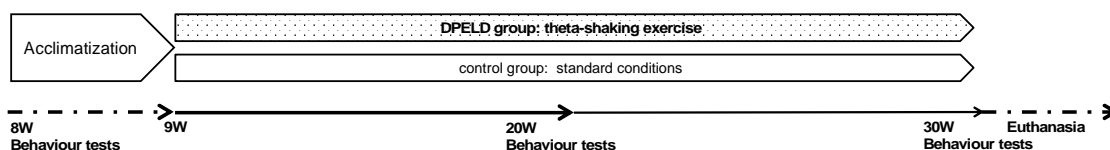


図 1

(3) 解析方法

T-maze テスト

T-maze テスト (300mm × 60mm × 150mm; LE843D-S, BRC Co., Nagoya, Japan) を 8W、20W、30W で行い短期記憶の指標として測定を行った。餌と飲水制限なし、事前訓練も行わない条件として選択する T-maze 腕と選択までの待機時間を記録した。

受動回避試験

受動的回避試験 (STC-001M and SGS-003DX; Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) は標準プロトコルに従い実施した。初日 (記憶獲得) に SAMP10 マウスを明室に配し、暗室に完全に入るまでの時間を記録すると同時に足への電気ショック (3S, 0.25mA) を与えた。翌日 (記憶再生) 暗室に入るまでの時間を (最大 300 秒) 遅延時間として測定した。

組織の準備

最終の行動テスト後、麻酔下で胸部切開を行い、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で灌流した後、脳を摘出した。生化学分析用組織は一時的に -80℃ で保存し、組織学的分析用組織は同様に PBS に続き 10% 中性緩衝ホルマリンで灌流固定し、自動包埋装置を使用して定法に従いパラフィン包埋を行った。各群 14 匹のマウスから 7 匹を免疫組織化学染色用の標本作成に、7 匹を ELISA 法に使用した。

免疫組織化学染色による解析

脳の矢状面切片 (20 μm) は、ATN、HPC、MPFC (interaural coordinates = 1.00 mm) を含む位置で薄切を行った。抗-FNDC5 抗体を一次抗体 (ab181884; Abcam PLC, Cambridge, UK) として 1:100 で使用した。二次抗体反応には、

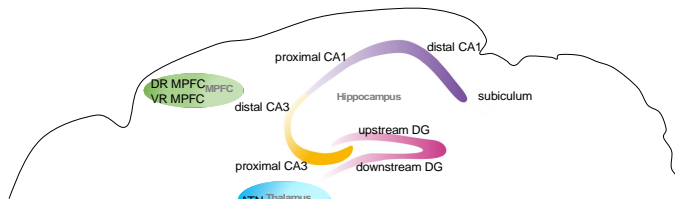


図 2

は、ビオチン結合ヤギ抗ウサギ IgG (H + L) (BA-1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を 1:1000 で使用した。色素検出には酵素基質溶液 (PK-6100; VECTASTAIN Elite ABC Standard Kit; Vector Laboratories) とジアミノベンジジン (cat. no. 40651; Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan) を適量で使用した。免疫組織化学の手順は標準プロトコルに従い実施した。

視床前核 (ATN) の観察を行った。海馬 (HPC) は Dentate Gyrus (歯状回上流 DG および下流 DG)、アンモン角 3 (cornu ammonis field 3; 近位 CA3 および遠位 CA3)、アンモン角 1 (cornu ammonis field 1; 近位 CA1 および遠位 CA1) および海馬台 (subiculum) に分けられた。内側前頭前皮質吻側 (Rostral MPFC) は、内側前頭前皮質背側吻側 dorsal rostral (DR MPFC) と内側前頭前皮質帯状吻側 (ventral rostral; VR MPFC) に分類した (図 2)。画像解析には ImageJ ソフトウェア (1.52a, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して定量化した。FNDC5 陽性神経細胞の発現割合 (%)、形態異常神経細胞 (n) および正常神経細胞数 (n) を測定した。

ELISA 解析

測定検体となる広域脳組織と海馬組織は液体窒素下で乳鉢乳棒により粉碎後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) を添加したタンパク質溶解剤 (RIPA Lysis and Extraction Buffer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) にて溶解した。遠心分離し、分析用に上清を回収し測定検体とした。タンパク質濃度を測定し標準レベルに調整した後、市販の ELISA キットを使用しプロトコルに沿って実施した。Irisin、NGF、NT4/5 の ELISA を実施しその発現レベルを評価した。

4. 研究成果

行動解析の結果から SAMP10 マウスでは加齢に伴い、記憶力が低下することが確認された。T-maze テストの結果では、20W の DPELD 群の反応時間が有意に短かった ($p < 0.05$)。一方で 30W には有意な差はなかった。DPELD による運動は SAMP10 マウスの短期記憶には正の影響を与えるが、実験終了時までそれは保持されていなかった (図 3A)。受動回避試験の結果から 20W と 30W 共に対照群比べ長い潜時を示した (図 3B)。DPELD による運動は SAMP10 マウスの中年期と老年期の長期記憶に対し、優位性を示していることが明らかとなった。これらの結果は、DPELD による運動が短期記憶と長期記憶の両方に効果があり、更に長期記憶を維持できることを示している。DPELD による運動に関連する潜在的な神経伝達のメカニズムが存在し、これが最適な記憶能への効果をもたらすことが推察された。

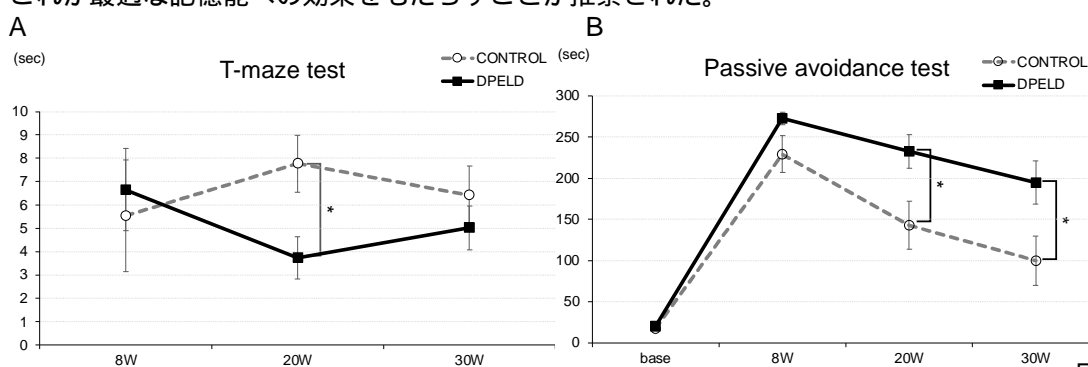


図 3

組織解析の結果から、抗 FNDC5 抗体による免疫組織化学染色による陽性細胞は組織全体の均一に分布するのではなく、対照群と比較すると DPELD 群の CA1 遠位部、subiculum 領域、および rostral MPFC により多く観察された。また、ATN 部位では対照群に比べ有意な差はなかった (図 4A, D)。DPELD 群ではより多くの正常神経細胞が DG、近位 CA3、遠位 CA1、および MPFC 領域に保持されていた (図 4B)。DPELD 群の subiculum においては神経細胞の密度が対照群に比べ高かった。しかし、ATN 部位では有意な差はなかった (図 4C)。これらの結果は神経細胞の脱落を推察するものである。

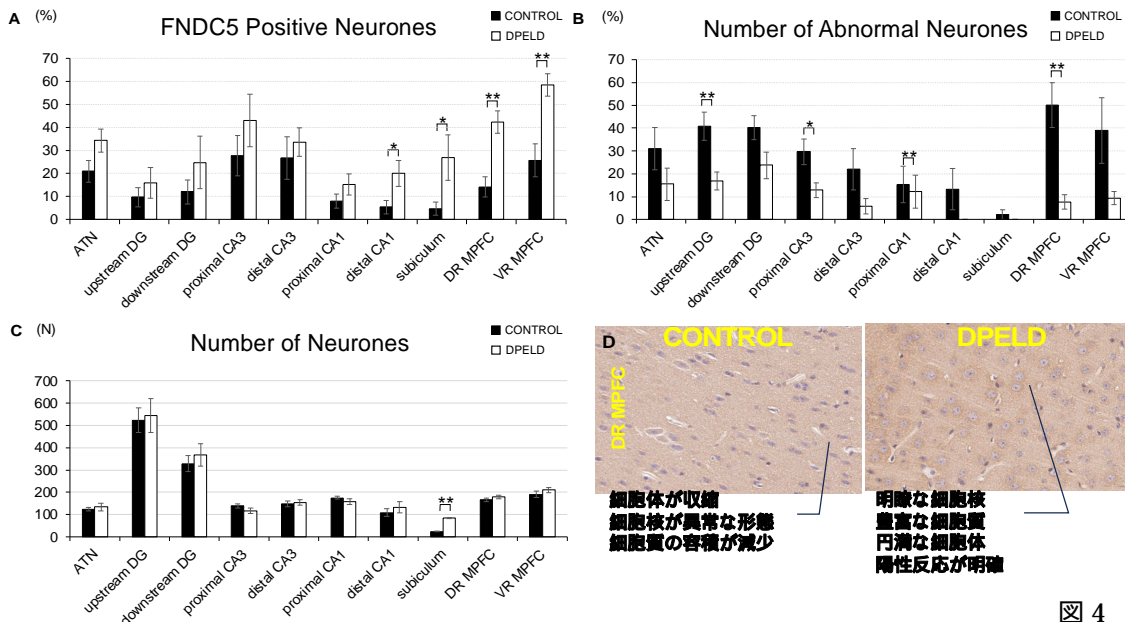


図 4

ELISA によるタンパク発現解析の結果から DPELD 群の広範囲脳 ($p < 0.01$) と海馬 ($p < 0.05$) では対照群に比べて Irisin の発現量が有意に少なかった (図 5A)。神経栄養因子群の発現を解析した結果では、DPELD 群のマウス海馬における NGF の発現レベルは顕著な上昇を示したが (図 5B)、NT4/5 には有意な差はなかった (図 5C)。これらの結果から老化促進する脳における ATN - HPC-MPFC 回路の記憶制御システムの可塑性が示唆される。DPELD 刺激運動による FNDC5 の発現が増加し、NGF の濃度が高まったこと、および Irisin の潜在的関与の可能性が、MPFC と海馬に遠位的な効果があると推測され、DPELD 刺激は記憶力の低下を緩和する有用な運動として、新しい知見となると考える。

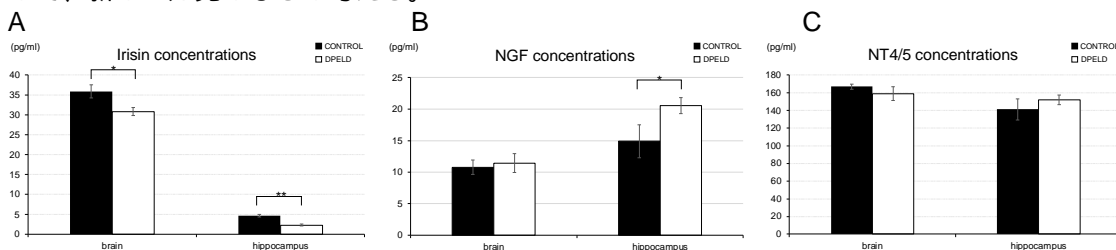


図 5

本研究では、DPELD 運動後の脳における FNDC5 の分布を明らかにし、ATN-HPC-MPFC 回路において、ATN より海馬と MPFC が記憶に深く関与していることが示された。また、FNDC5、Irisin、NGF、NT4/5 の興味深い発現パターンは、これら因子間の複雑な制御と調節、領域の特異性、差次的発現変動、経時的変化、別の他シグナル伝達経路との相互作用の結果である可能性がある。さらなる包括的な実験デザインの構築により、根本的なメカニズムが解明され、他の脳領域における記憶過程への寄与が明確に理解されたと考える。

新規刺激運動装置 DPELD による脳機能と行動に及ぼす影響についての知見を提供し、老化に伴う認知症の改善に寄与することが期待できる。特に、ATN-HPC-MPFC 神経回路が記憶の形成に関与することが知られているため、新規開発した DPELD 装置による刺激が、この回路に与える影響を評価することは、認知症予防およびその進行緩和などを脳科学分野から理解を深める上で重要な成果となり得る。高齢化社会が進む中、認知症を含む脳疾患の発症率が上昇している。本研究で開発した DPELD は、運動刺激を通じて脳の機能改善を行い、認知症の予防や症状の改善に寄与する可能性が示唆されるため、社会的意義が高いと言える。また、今後ヒトへの臨床応用研究に発展させることで、高齢者の健康維持や介護負担の軽減など、広範囲な分野での利用が期待される。

< 引用文献 >

1. Jia RX, Liang JH, Xu Y, Wang YQ. Effects of physical activity and exercise on the cognitive function of patients with Alzheimer disease: a meta-analysis. BMC Geriatr. 2019; 19(1): 181.
2. Wrann CD, White JP, Salogiannis J, et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 pathway. Cell Metab. 2013; 18(5): 649-659.
3. Yao R, Yamada K, Kito T, et al. Novel shaking exercises for hippocampal and medial prefrontal cortex functioning maintain spatial working memory. Exp Gerontol. 2023; 171: 112024.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yao Runhong, Nishii Kazuhiro, Aizu Naoki, Kito Takumi, Sakai Kazuyoshi, Yamada Kouji | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Maintenance of the Amygdala-Hippocampal Circuit Function with Safe and Feasible Shaking Exercise Therapy in SAMP-10 Mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra | 6. 最初と最後の頁 114 ~ 121 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000515957 | 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 該当する |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Yao Runhong, Yamada Kouji, Kito Takumi, Aizu Naoki, Iwata Daiki, Izawa Sho, Nishii Kazuhiro, Sawada Hirohide, Chihara Takeshi | 4. 巻 171 |
| 2. 論文標題 Novel shaking exercises for hippocampal and medial prefrontal cortex functioning maintain spatial working memory | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Gerontology | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exger.2022.112024 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Runhong Yao |
| 2. 発表標題 The Effect of PTMD Exercise on Cognitive and Physical Function in the Elderly |
| 3. 学会等名 International Convention on Rehabilitation Engineering and Assistive Technology（国際学会） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 姚 潤宏 |
| 2. 発表標題 新規ポリリズム他動運動負荷装置による認知症患者の脳老化予防効果と作用機序解明 |
| 3. 学会等名 第42回関東甲信越ブロック理学療法士学会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
|---------|---------|