

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350903

研究課題名(和文) 学習記憶機能におけるメラトニンの抗加齢効果に関する作用機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of anti-aging effects of melatonin on learning and memory.

研究代表者

千葉 篤彦 (CHIBA, Atsuhiko)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：40207288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、D-ガラクトース投与による亜急性老化モデルマウスでも自然老化マウスと同様にメラトニンの長期投与が加齢に伴う学習記憶機能の低下を抑制することを明らかにした。どちらのマウスでも、メラトニンは、加齢に伴う脳の酸化ストレスの蓄積や神経細胞の形態学的変化を抑制することが示された。自然老化マウスの大脳皮質における遺伝子の発現を解析した結果、その発現量の加齢に伴う変化がメラトニンの長期投与により抑制される遺伝子が80個ほど得られた。今後は実験動物として亜急性老化モデルマウスも動員してメラトニンの学習記憶機能に関する抗加齢効果の作用機序が解明されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that in D-galactose aging model mice long-term administration of melatonin attenuated the age-related deficit in learning and memory as observed in naturally-aged mice. In both mice, melatonin attenuated the accumulation of oxidative stress in the brain and age-related morphological changes in the neurons. Comprehensive analysis of the gene expression in cerebral cortex revealed that expression levels of approximately 80 genes were clearly changed during natural aging, and that these changes were attenuated by long-term melatonin administration. Further study using D-galactose aging model mice will contribute to elucidate the mechanisms to explain anti-aging effects of melatonin on learning and memory.

研究分野：神経行動学

キーワード：メラトニン 老化 学習記憶機能

1. 研究開始当初の背景

加齢による学習・記憶力の低下の原因のひとつは酸化ストレスで、神経細胞の変性やアポトシスによる脱落を引き起こして脳機能を低下させる。松果体ホルモンとして知られるメラトニンは、概日リズムの調節や生殖機能の季節変化に関係するだけでなく、生体内において抗酸化作用をはじめとする様々な重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。中年以降のメラトニン分泌の急速な減少は、脳の組織における酸化ストレスを増大させ、これが加齢性の記憶障害を引き起こす一因となっていると考えられている。

これまで老化促進モデルマウス(SAM)や、若い動物にX線照射などの強い酸化ストレスを与えた急性老化モデル動物を用いた研究によって、メラトニンの投与が脳の酸化ストレスを軽減し、学習記憶能力の低下を抑制ことが報告されており、自然老化のプロセスにおいてメラトニンが脳の酸化ストレスを軽減することによって加齢性の学習記憶障害を抑制する可能性が示唆されてきた。しかし、これらのモデル動物が自然な老化と全く同じ経過を再現するかどうかは不明である。また、長い時間をかけて老化する自然老化動物を用いた実験では、これらのモデル動物を用いた実験と比較してはるかに長い期間のメラトニン投与を必要とする可能性が高い。メラトニンの生理学的、薬理的な作用はまだ十分に分かっておらず、長期間にわたるメラトニンの投与が脳機能に与える影響は調べられていない。このため、自然な老化による学習記憶機能の低下がメラトニンの投与により改善されるか否かの検証は不可欠であった。

さらに、これらのモデル動物を用いた実験の多くで、学習記憶能力を評価するためにモリスの水迷路や電気ショックによる回避学習等が用いられることが多いが、恐怖情動やストレス負荷が記憶形成に与える影響は排除できず、これらの学習をヒトの通常的な記憶獲得のプロセスと単純に比較することは難しい。

このような背景を踏まえ、我々は自然な老化の過程にあるマウス(自然老化モデル)において、中年期から老年期にかけての8ヵ月間にわたりメラトニンを飲料水に混ぜて与えることにより、メラトニンの学習記憶機能における抗加齢効果を解析してきた(科研費補助金 基盤研究(C)平成22~24年度、課題番号2250677)。その際の学習記憶能力の評価には、記憶の獲得に恐怖情動を伴わない試験方法として物体認識記憶については物体認識試験(ORT)、空間記憶につ

ては位置認識試験(OLT)を採用した。またこれらのマウスの脳で学習記憶に関連する複数の領域において酸化ストレスによるDNA損傷の指標となる8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の量を調べた。その結果、自然老化マウスにおいて、メラトニン長期投与が、空間認識記憶及び物体認識記憶において学習記憶機能の加齢に伴う低下を抑制し、さらに脳の記憶関連脳部位での8-OHdGの蓄積も有意に抑制することを明らかにした。

2. 研究の目的

メラトニンの学習記憶機能における抗加齢効果の作用機序は、抗酸化作用だけではなく極めて広範囲にわたる可能性も示唆されている。その本格的な解析には、老化モデル動物を適切に利用して実験時間を短縮する利点は大きい。しかし、SAMや極端な酸化ストレスを与えて急速に老化させたモデル動物を自然老化のモデル動物として用いることは望ましくない。そこで本研究ではまず、7週間のD-ガラクトース投与により比較的緩やかに老化させた亜急性老化モデルマウスを自然老化モデルマウスと併用して学習記憶能力に対するメラトニンの抗加齢効果について解析し、亜急性老化モデルマウスを用いた研究の制限と有用性を検討する。亜急性老化マウス、自然老化マウスともに学習記憶機能の評価の後に、脳の酸化ストレスの指標として8-OHdGの蓄積量を調べるとともに、海馬におけるニューロン新生、長期増強など、異なる作用機序で学習記憶機能に関わると考えられる複数の指標について調べ、これらの加齢による変化、それに対するメラトニンの抑制効果などについて両モデルで比較する。

上記の実験で自然老化マウスと亜急性老化モデルマウスの差を踏まえた上で、学習後の両モデル動物の脳からRNAを抽出し、加齢により発現量が変化し、その変化がメラトニン投与によって減弱する学習記憶機能関連遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析する。これによりメラトニンの抗加齢効果の分子機構解明の基礎としたい。

3. 研究の方法

(1) 動物の準備

自然老化マウス: 中年期(10ヵ月齢)から老年期(18ヵ月齢)まで微量のエタノールに溶かしたメラトニンを飲み水に混ぜて与える群と、対照群として同濃度エタノールを含む水を与える群をつくった。

亜急性老化モデルマウス: 14週齢から21週齢までの7週間、D-ガラクトースを皮下注射

する群と溶媒のみ皮下注射する群を作り、それぞれの群を、同期間に上記と同様の方法でメラトニンを与える群と与えない群の二つに分けた。

(2) 行動実験による学習・記憶能力の評価

物体認識記憶の評価には ORT、空間記憶の評価には OLT を用いた。実験は全て LD 12:12 の明暗サイクル下の明期の後半に行い、行動実験開始の 24 時間前に飲み水を水道水に変えた。予め観察箱に馴化させておいた動物を観察箱に入れ、提示した 2 個の同一物体を自由に探索させる(獲得試行)。一定時間後、ORT の場合は片方の物体を新規の物体に、OLT の場合は片方の物体の位置を新規の位置に変え、再度動物を観察箱に入れ物体の探索時間を測定した(テスト試行)。獲得試行とテスト試行の間隔(ITI)が短く、獲得試行で提示された物体に関する記憶が保持されていれば、テスト試行で提示された新奇性のある物体(新奇の形状、あるいは新奇の位置)を有意に長い時間探索する。しかし、ITI を大きくしていくにつれて獲得試行で提示された物体に関する記憶は失われ、二つの物体の探索時間の間に有意差が無くなる。

なお、これらの試験においては、マウスの運動量の指標として観察時間中にマウスが観察箱の底面に描かれたグリッド線をマウスが横切る回数も記録した。

(3) 免疫組織化学的解析

各群のマウスは行動実験終了後、深麻酔して 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳切片を作成した。物体認識記憶と関連の深い嗅周囲皮質および空間記憶と関連の深い海馬における酸化ストレスの指標として 8-OHdG の蓄積量を抗 8-OHdG 抗体を用いて調べた。また、ニューロン新生の指標として抗 doublecortin (DCX) 抗体を用いて、海馬歯状回の DCX 陽性神経細胞数を測定した。

(4) 電気生理学的解析

一部のマウスは、行動実験終了後深麻酔し、灌流固定を行わず脳を取り出して海馬スライス切片を作成し、CA1 領域の長期増強(LTP)について調べた。顕微鏡観察下で刺激電極をシャプアー側枝(入力線維)上に配置し、記録電極を放線層(シナプス部位)上に配置した。0.1 Hz の頻度で刺激電極よりテスト刺激を提示し、それに対するシナプス応答として集合 EPSP を記録した。LTP を誘導するための刺激として 100 Hz・1 秒間の高頻度刺激をシャプアー側枝に提示したあと、テスト刺激による集合 EPSP の記録を続け、高頻度刺激から 60 分後の時点での集合 EPSP の増強があれば LTP とみなし、その大きさの程度を各群で比較した。

(5) 脳における遺伝子発現の網羅的解析

メラトニンを飲水に混ぜて与えた自然老

化群、与えなかった対照群、および若齢群(10 週齢)のマウスを用いて、物体認識試験後に深麻酔下で大脳皮質を取り出し、学習記憶機能に関連する遺伝子の発現をマイクロアレイおよび real-time PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 学習記憶能力

自然老化マウスおよび垂急性老化モデルマウスのいずれにおいても、メラトニン投与群では溶媒投与対照群に比べて物体認識記憶、空間記憶のいずれにおいても有意に良い成績を示し、メラトニンの学習記憶機能に対する抗加齢効果が確認された。

なお、自然老化マウスおよび垂急性老化モデルの各群間において、両物体の総探索時間、運動量には有意差はなかった。

(2) 自然老化マウスおよび垂急性老化モデルにおいて、メラトニン投与群では対照群に比べて嗅周囲皮質および海馬における酸化ストレスの指標である 8-OHdG の蓄積量が有意に少なかった。

(3) 自然老化マウスではメラトニン長期投与のニューロン新生に対する有意な促進効果が観察されず、垂急性老化モデルマウスにおいてはむしろメラトニン投与群でニューロン新生が低下した。メラトニン投与が自然老化マウスおよび垂急性老化モデルのどちらにおいても加齢性の学習記憶機能の低下を抑制したにもかかわらず、ニューロン新生を増加させないという予想に反する興味深いデータが得られた。そこで、海馬歯状回と嗅周囲皮質について、脳切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、ニューロン新生以外のいくつかの形態学的指標にも着目し、それらに対するメラトニンの効果の有無について検討し、(4)および(5)に示すような結果を得た。

(4) 垂急性老化モデルマウスでも自然老化マウスでも、メラトニン投与群では海馬歯状回の老化に伴う体積の減少が抑制され、さらに神経細胞数の増加も観察された。したがってこの領域において、脳組織切片作成の何日か前までのメラトニン投与期間中には対照群と比較してアポトーシスの減少やニューロン新生の増加があった可能性が示唆された。

(5) 垂急性老化モデルマウスでも自然老化マウスでも、嗅周囲皮質においては、神経細胞の密度には変化がなかったが細胞体のサイズの加齢に伴う減少がメラトニンの投与により抑制されることがわかり、この領域においては樹状突起のは発達メラトニンにより維持されている可能性が示唆された。

(6) 自然老化マウスの海馬スライスに対し高頻度刺激(100Hz×4回)を与えたところ、高頻度刺激 55-60分後のシナプス応答の強度はメラトニン投与群、対照群、ともに高頻度刺激前のベースライ

ンから有意な変化はみられなかったが、両群の高頻度刺激55-60分後のシナプス応答の強度を群間で比較すると、対照群のシナプス応答のほうがメラトニン投与群のそれよりも有意に小さな傾向にあった。つまり、老齡ラットの海馬スライスに対し高頻度刺激(100Hz×4回)を与えた場合、55-60分後の時点でシナプス応答の減弱傾向が誘発されるところ、メラトニン存在下ではその減弱が抑制される(シナプス応答がレスキューされる)という結果が得られた。

今回の実験において高頻度刺激後に長期増強が誘導されなかった理由は明らかではないが、一つの可能性は、長期増強を確実に誘導する目的で高頻度刺激として通常よりも強度の高いパラメータを採用していたために、対照群ではシナプス後部へのCa²⁺の過剰流入が引き起こされ、シナプス後細胞の細胞死をはじめとする何らかの負の作用が誘導されていたことが挙げられる。なお、今回の実験と同様のパラメータを用いて8週齢マウスの海馬スライスで調べたところ、老齡マウスの場合と同様、有意な長期増強は誘導されなかったため、今回の高頻度刺激によって長期増強がみられないのは老齡マウス特有のものではないことが示された。老齡マウスの海馬スライス標本にメラトニン処理を施すことによってシナプス応答の減弱が抑制される傾向にあることが見いだされ、その機序については今後の課題である。

(7) メラトニンを飲水に混ぜて与えた自然老化群、与えなかった対照群、および若齡群(10週齢)のマウスの大脳皮質を用いて、加齢により発現量が変化し、その変化がメラトニン投与群によって減弱される遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析した。このような遺伝子のうち自然老化により発現量が顕著に増加するものと減少するものが、それぞれ40個ほど得られた。順次これらの遺伝子の解析をすすめているが、メラトニンの学習記憶機能に関する抗加齢効果の作用機序の解明に直接つなげると考えられる遺伝子は現在までの解析では得られていない。今後、亜急性老化モデルマウスでも同様の解析を行う予定である。

(8) 補足的な実験として、8週齢の若齡マウスを用い、メラトニンの学習記憶機能への急性効果について検証したところ、物体認識試験の獲得試行の30分前あるいは5分後にメラトニンを腹腔投与したところ、いずれにおいても溶媒投与群と比較して有意に長く記憶が保持された。本研究課題では抗加齢効果を調べる目的で行ったメラトニンの長期投与は、学習記憶機能の評価を行う24時間以上に中止しているが、同様の目的で行われた多くの先行研究では、メラトニンの投与を継続しながら学習記憶機能の評価をおこなっている。メラトニンの急性効果と長期投与による抗加齢

効果を区別して学習記憶機能の評価することの必要性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

岩下光、若林恒佑、服部淳彦、千葉篤彦

メラトニンがマウスの学習・記憶機能に及ぼす影響、第93回日本生理学会大会、札幌コンベンションセンター(札幌市)、(2016, 3/22-24)

Hikaru Iwashita, Kosuke Wakabayashi, Atsuhiko Hattori, Atsuhiko Chiba. Long term administration of melatonin ameliorates age-related memory impairment in mice. Society for Behavioral Neuroendocrinology 19th Annual Meeting, Asilomar Conference Grounds (Pacific Grove, CA USA) (2015, 6/10-13)

Hikaru Iwashita, Atsuhiko Hattori, Atsuhiko Chiba. Inhibitory effects of melatonin on age-related memory impairment in mice. 第120回日本解剖学会総会 全国学術集会・第92回日本生理学会大会 合同大会、神戸国際会議場(神戸市)(2015, 3/21-23)

若林恒佑、岩下光、千葉篤彦、メラトニンがマウスの学習記憶機能に与える影響の用量依存的变化、日本動物学会第67回関東支部大会 早稲田大学・先端生命医科学センター(東京)(2015, 3/14)

前田齊嘉、五十嵐 - 右高潤子、千葉篤彦、服部淳彦、メタボローム解析によるマウス血中代謝物の加齢による変化とメラトニン長期投与の効果、第14回日本抗加齢医学会総会、大阪国際会議場(大阪府)(2014, 6/6-8)

岩下光、千葉篤彦、D-Galactose投与による脳の老化に対するメラトニンの影響、日本動物学会第66回関東支部大会 東京大学 大気海洋研究所(千葉県柏市)(2014, 3/15)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 篤彦 (CHIBA, Atsuhiko)
上智大学・理工学部・教授
研究者番号：40207288

(2) 研究分担者

服部 淳彦 (HATTORI, Atsuhiko)
東京医科歯科大学・教養部・教授
研究者番号：70183910

岡田 隆 (OKADA, Takashi)
上智大学・総合人間科学部・教授
研究者番号：00242082