

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08209

研究課題名(和文) 加齢により暑熱馴化形成機能が減弱するメカニズムの解明と熱中症予防への応用

研究課題名(英文) Aging deteriorates acquired heat tolerance and hypothalamic neurogenesis in rats

研究代表者

松崎 健太郎 (Matsuzaki, Kentaro)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：90457185

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)：これまでに我々は、暑熱馴化した若齢ラット視床下部で神経新生が促進されていることを見出している。本研究では、暑熱環境への持続的な暴露によるラット視床下部神経新生と暑熱馴化形成の年齢依存的な解析を行った。ラットの暑熱馴化形成機能は年齢依存的に低下することが示された。また、暑熱暴露は若齢ラット視床下部において熱刺激に応答性を持つ機能的な神経細胞を新生するが、老齢ラット視床下部にはほとんど影響しないことが示唆された。暑熱暴露による視床下部神経細胞新生の加齢による低下が、暑熱に対する高齢者の体温調節機能変化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that neuronal progenitor cell proliferation and neural differentiation are enhanced in the hypothalamus of long-term heat-acclimated (HA) rats. This study investigated age-dependent changes in heat exposure-induced hypothalamic neurogenesis and acquired heat tolerance in rats. Male Wistar rats, 5 weeks (Young) or 22 months (Old) old, were subjected to an ambient temperature of 32 °C for 40 days (HA rats). In HA rats, increases in abdominal temperature (Tab) in the Young, Adult, and Old groups were significantly smaller than those in their respective controls (CNs). However, increase in Tab of HA rats became greater with advancing age. The number of hypothalamic bromodeoxyuridine (BrdU)-immunopositive cells double stained with a mature neuron marker, neuronal nuclei (NeuN), of HA rats was significantly higher in the Young group than that in the CN group. Aging may interfere with heat exposure-induced hypothalamic neurogenesis and acquired heat tolerance in rats.

研究分野：環境生理学

キーワード：暑熱馴化 視床下部 体温調節 加齢

1. 研究開始当初の背景

暑熱馴化による末梢効果器の形態的・機能的変化については多くの研究があるが、中枢機構の研究は限られていた。これまでに我々はラット長期暑熱馴化の形成過程において、視床下部の神経新生が促進され、新生したニューロンが長期暑熱馴化の形成に与与する可能性を世界で初めて示唆した。しかし、暑熱馴化形成時に視床下部で新生したニューロンの機能性については十分に解析されていない。また、暑熱馴化の形成と中枢の形態学的変化に対する加齢の影響は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、視床下部で新生したニューロンの機能性について検討した。また、長期暑熱馴化形成に及ぼす加齢の影響について解析した。さらに、アルツハイマー病 (AD) 発症の原因物質であるアミロイド (A β) を脳室内に注入して作製した AD モデル動物の暑熱馴化形成機能についてあわせて解析した。

3. 研究の方法

【視床下部神経新生と暑熱馴化形成の関連解析】

我々は、暑熱暴露されたラットの視床下部において、神経前駆細胞の分裂が促進され、そのほとんどが神経細胞に分化することを見出している。また、暑熱暴露により新生した細胞はアストロサイトやオリゴデンドロサイトにはほとんど分化しないことも確認している。そこで、神経新生を阻害した際に暑熱馴化が形成されるか否かを解析し、新生したニューロンの機能特定を目指した。以下に具体的な実験方法を示す。

- 1) Wistar 系雄性ラット (5 週齢) を明暗周期 12:12 時間、環境温 24 $^{\circ}$ C、自由摂食・摂水下で飼育する。
- 2) ラットを全身麻酔し、腹腔内にテレメトリー送信機を挿入した。さらに、ラット背側皮下に細胞分裂阻害薬 Cytosine-arabioside (Ara-C; 2% / 生理食塩水) を充填した浸透圧ポンプ (Model 2006, Alzet) を留置し、側脳室にカニューレを挿入した。
- 3) 2 週間の回復期間の後、ラットを 32 $^{\circ}$ C の暑熱環境に暴露し、暑熱馴化の形成を試みた。なお、対照群は 24 $^{\circ}$ C の同一環境下で飼育した。
- 4) 暑熱暴露開始後、ラット腹腔内に Bromodeoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg/day) を 5 日間連続投与し、さらに 4~7 週間暑熱環境下で飼育した。
- 5) 暴露期間中、腹腔内温・行動量をテレメトリー法で測定した。
- 6) 暑熱暴露終了後に、ラットを全身麻酔し、経的に脱血後、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定した。

- 7) 脳組織を摘出後、生化学および免疫組織学的解析を行った。

【暑熱暴露による培養神経幹/前駆細胞の増殖機序解析】

暑熱暴露が神経幹/前駆細胞 (NSCs) の増殖に及ぼす効果を *in vitro* 培養系を用いて解析した。

【老齢および認知症ラットにおける暑熱馴化形成機能の解析】

老齢ラットやアルツハイマー病の原因物質であるアミロイド- β (A β) を脳室に投与して作製した AD モデルラットを用いて、暑熱暴露による視床下部神経新生と暑熱馴化形成するか否かを検討した。以下に具体的な実験方法を示す。

- 1) Wistar 系雄性ラット (5 週齢: 若齢群、12 ヶ月齢群: 中齢群、24 ヶ月齢: 老齢群) ならびに AD モデルラット (作製方法は後述) を明暗周期 12:12 時間、環境温 24 $^{\circ}$ C、自由摂食・摂水下で飼育した。
- 2) ラットを全身麻酔し、腹腔内にテレメトリー送信機 (TA10TA-F40:DSI) を留置した。
- 3) 2 週間の回復期間の後、ラットを 32 $^{\circ}$ C の暑熱環境に 30 日間暴露し、長期暑熱馴化の形成を試みた。なお、対照群は 24 $^{\circ}$ C の同一環境下で飼育する。
- 4) 暴露期間中、腹腔内温・行動量をテレメトリー法で測定した。
- 5) 暴露期間終了後にラットの耐暑熱性および行動性体温調節機能 (測定方法は後述) を測定した。

【AD モデルラットの作製】

- 1) Wistar 系雄性ラットを麻酔後に頭皮をメスで切開し頭蓋骨を露出させた。
- 2) Bregma から左右の位置 (0.8 mm posterior, 1.4 mm lateral) に歯科用ドリルを用いて 2 つ穴をあけ、左側脳室にハミルトンシリンジを用いて塩化アルミニウムを 0.5 μ g 注入した。
- 3) A β 1-40 を内蔵した浸透圧ポンプ (Model 2002, Alzet) をラット背皮下に留置し、ガイドカニューレをラット右側脳室に挿入した。
- 4) ガイドカニューレを歯科用樹脂で頭蓋骨に固定した後に頭皮を縫合した。
- 5) 2 週間以上の回復期間後に、行動性体温調節ならびに暑熱馴化の形成について検討した。

【行動性体温調節の解析】

行動性体温調節機能は本研究室が所有する選択環境温度測定装置を用いて測定した。

- 1) 内寸 200 \times 16 \times 18 cm の飼育実験装置の両端に溶接したパイプにそれぞれ冷水と温水を循環させ、装置内の長軸に沿って約 16 $^{\circ}$ C から 36 $^{\circ}$ C の温度勾配を形成させた。

- 2) 装置の中にラットを入れて3日間慣らしたのちに、2日間連続でラットの居る位置の環境温度(選択環境温度)を測定し、行動性体温調節の指標とした(図1)。
- 3) 実験後に脳組織を摘出し、生化学および免疫組織学的解析を行った。

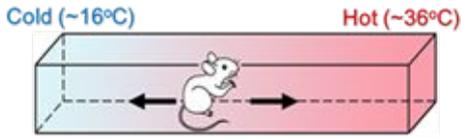


図1. 選択環境温度測定装置のイメージ。ラットは装置内を自由に移動し、好きな環境温度を選択できる。

4. 研究成果

【視床下部神経新生と暑熱馴化形成の関連解析】

Ara-C 投与により暑熱暴露による神経新生は完全に阻害された。Ara-C 投与ラットの耐暑熱性は、Vehicle 投与ラットに比較して有意に減弱した(図2)。Ara-C 長期投与は神経細胞死や脳組織の壊死などを誘導しないことを確認した。また、Ara-C 長期投与は、行動性体温調節機能には影響しないことを確認した。

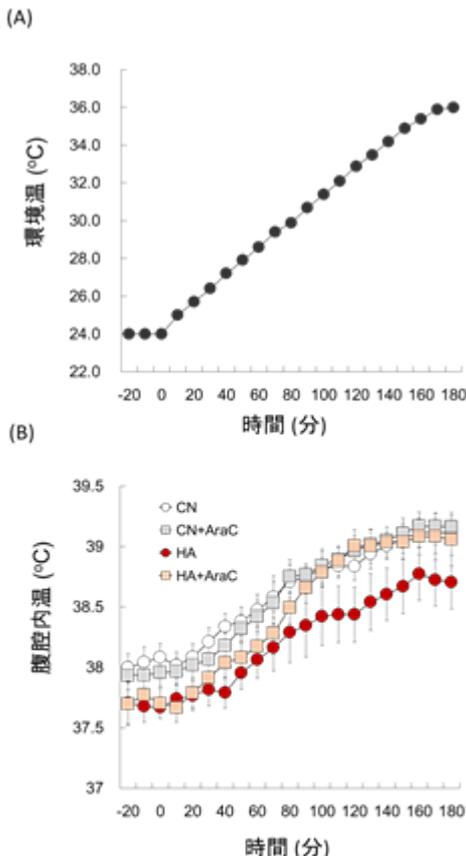


図2. 耐暑熱性解析。

(A)環境温度の上昇時の(B)ラット腹腔内温度の変化を示す。暑熱馴化したラット(HA群)の腹腔内温は対照群(CN群)に比較して有意に低下し、環境温の上昇に伴う増加が抑制された。Ara-C投与により視床下部の神経新生が阻害されたラット(HA+Ara-C)の腹腔内温はCN群に比較して低下したが、環境温上昇時の腹腔内温の上昇度合いがHA群より有意に高かった。

暑熱暴露により視床下部で新生した神経細胞が、暑熱馴化形成に關与する可能性が示唆された。暑熱暴露により視床下部で新生した細胞のうち、約15%はGABA作動性神経細胞マーカーにより、約12%はグルタミン酸作動性神経細胞マーカー(GAD67)により染色された。若齢ラットの視床下部で新生したニューロンは前視床下部/視索前野(POA/AH)に最も多く発現しており、その一部は視床下部背内側核(DMH)に投射していることを免疫組織学的に確認した。POA/AHからDMHに投射するニューロンは暑熱環境下における皮膚血管運動や血圧の調節、褐色脂肪熱産生の抑制などに深く關与することから、新生ニューロンの機能としてこれらの体温調節機能への關与を推察した。一方、体液量や浸透圧調節に關与する視床下部室傍核や外側野、唾液腺の一次中枢が存在する上・下唾液核では神経新生がほとんど見られないことを確認した。また、Ara-C投与により神経新生が阻害されたラットでは、尾部皮膚血流量が減少する傾向が觀察された。以上の結果から、暑熱暴露によって新生した神経細胞が暑熱馴化形成時の乾性熱放散機能の亢進に關与する可能性が示唆された。

【暑熱暴露による培養神経幹/前駆細胞の増殖機序解析】

培養神経幹/前駆細胞(NSCs)を用いて、暑熱刺激による細胞増殖への直接的な効果を解析した。NSCsを38.5で1~4日間培養したところ、通常の培養温度(37.0)で培養した細胞に比較して、細胞の増殖率や生存率が有意に増加した。また、暑熱刺激により、細胞の増殖や生存に深く關連するBrain Derived Neurotrophic Factor(BDNF)やHeat Shock Protein-27(HSP27)、HSP70、Reactive Oxygen Species(ROS)などの発現量が増加した。また、暑熱刺激により、BDNFの転写調節に關連するcAMP Responsive element Binding Protein(CREB)のリン酸レベルが有意に増加した。さらに、暑熱刺激によりNSCsの増殖に密接に關与するAktのリン酸化レベルが増加した。この暑熱刺激による細胞増殖の促進作用は、PI3K阻害剤LY294002によって抑制された。一方、NSCsの分化に及ぼす暑熱刺激の影響を検討したところ、一部のNSCs細胞がニューロンマーカーであるTuj-1と2重に染色された。以上の結果から、暑熱刺激はinvitro培養系において、Aktシグナル経路の活性化を介して、NSCsの増殖や生存を促進し、さらに神経細胞への分化を誘導する可能性が示唆された。

【老齡および認知症ラットにおける暑熱馴化形成機能の解析】

中・老齡ラットでは、若齢ラットに比較して暑熱暴露により誘導される視床下部神経新生が、有意に減弱することが明らかになった(図3)。また、中・老齡ラットにおける

暑熱馴化形成時の耐暑熱性は、若齢ラットよりも有意に低下することが明らかとなった。以上の結果より、加齢により視床下部の神経新生機能が低下し、それに伴い、暑熱馴化の形成能力が減弱する可能性が示唆された。

A を脳室に投与して作製したADモデルラットでは、対照ラットと比較して、行動性体温調節機能が変化することを確認した。また、この認知症モデルラットでは、暑熱馴化の形成能力が対照群と比較して有意に減弱することが明らかとなった。さらに、ADモデル動物の視床下部では、神経新生マーカーの Doublecortin や Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) などのタンパク質の発現量が有意に減少することが明らかとなった。以上の結果より、A 脳室投与は視床下部の神経新生や行動性体温調節機能ならびに暑熱馴化の形成機能などを障害する可能性が示唆された。高齢者や認知症患者における熱中症罹患率の増加の原因として、視床下部における神経可塑性の劣化が関与する可能性を考えた。

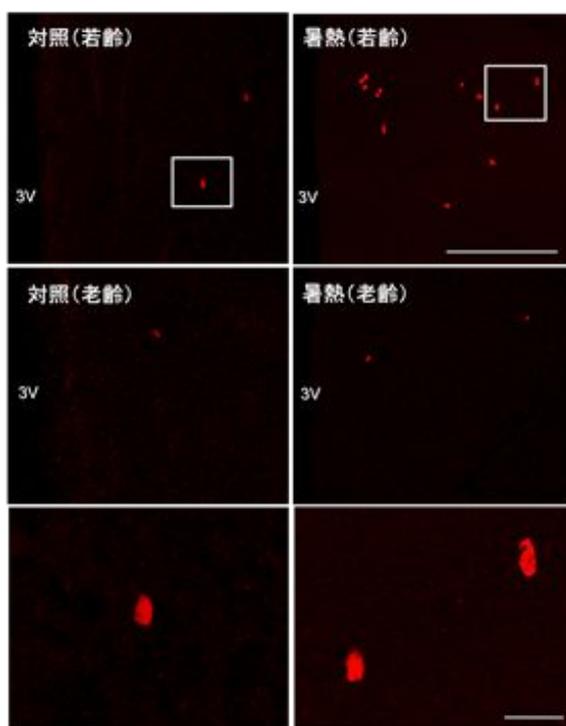


図3. 視床下部における神経前駆細胞の増殖に及ぼす暑熱曝露の影響。暑熱曝露は若齢ラットの視床下部においてBrdU陽性細胞数を顕著に増加させたが、中齢および老齢ラットにはほとんど影響しなかった。

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15件)

1. Matsuzaki K, Sugimoto N, Katakura M, Sumiyoshi E, Hara T, Hashimoto M, Shido O. Daily voluntary exercise enhances pilocarpine-induced saliva secretion and aquaporin 1 expression in rat submandibular glands. *FEBS Open Bio*, 2018; 8:85–93
2. Hossain E, Matsuzaki K, Katakura M, Sugimoto N, Mamun AA, Hashimoto M, Shido O. Direct exposure to mild heat promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells in vitro. *PLoS ONE*, 2017; 12:e0190356.
3. Matsuzaki K, Katakura M, Sugimoto N, Hara T, Hashimoto M, Shido O. Neural progenitor cell proliferation in the hypothalamus is involved in acquired heat tolerance in long-term heat-acclimated rats. *PLoS ONE*, 2017; 12:e0178787.
4. Matsuzaki K, Ohizumi Y. Anti-dementia effects of nobiletin, a citrus flavonoid: Toward the development of functional foods. *Pharmacometrics*, 2017; 92(5-6):107–112.
5. 大泉康, 松崎健太郎, 柑橘類果皮成分 nobiletin の抗認知症効果. *Medical Herb*, 2017; 40: 30–35.
6. Hashimoto M, Matsuzaki K, Yano S, Sumiyoshi E, Shido O, Katsube T, Tabata M, Okuda M, Sugimoto H, Yoshino K. Long-term oral intake of ultra-high hydrostatic pressurizing brown rice prevents bone mineral density decline in elderly people. *Pharmacometrics*, 2017; 92(3-4):69–73.
7. Sugimoto N, Katakura M, Matsuzaki K, Nakamura H, Yachie A, Shido O. Capsaicin partially mimics heat in mouse fibroblast

- cells in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2017; 390(3):281–289.
8. Yoneda M, Sugimoto N, Katakura M, Matsuzaki K, Tanigami H, Yachie A, Ohno-Shosaku T, Shido O. Theobromine upregulates cerebral brain-derived neurotrophic factor and facilitates motor learning in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2017; 39:110–116.
 9. Hashimoto M, Hossain S, Mamun AA, Matsuzaki K, Arai H. Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017; 37(5):579–597.
 10. Hashimoto M, Hossain S, Matsuzaki K, Mamun AA, Arai H, Shido O. Computational analyses of docosahexaenoic acid (DHA, C22: 6, n-3) with Alzheimer's disease-causing amyloid peptide A β ₁₋₄₂ reassures its therapeutic utility. *Advances in Alzheimer's Disease*, 2016; 5(2):73–86
 11. Hashimoto M, Inoue T, Katakura M, Hossain S, Mamun AA, Matsuzaki K, Arai H, Shido O. Differential effects of docosahexaenoic and arachidonic acid on fatty acid composition and myosin heavy chain-related genes of slow- and fast-twitch skeletal muscle tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016; 415(1-2):169–181.
 12. Matsuzaki K, Katakura M, Inoue T, Hara T, Hashimoto M, Shido O. Aging attenuates acquired heat tolerance and hypothalamic neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 2015; 523(8):1190–1201.
 13. Matsuzaki K, Katakura M, Sugimoto N, Hara T, Hashimoto M, Shido O. β -amyloid infusion into lateral ventricle alters behavioral thermoregulation and attenuates acquired heat tolerance in rats. *Temperature*, 2015; 2(3):418–424.
 14. Shido O, Matsuzaki K. Involvement of neurogenesis in the hypothalamic area in establishing long-term heat acclimation in rats. *Temperature*, 2015; 2(3):362–367.
 15. Miyamoto M, Matsuzaki K, Katakura M, Hara T, Tanabe Y, Shido O. Oral intake of encapsulated dried ginger root powder hardly affects human thermoregulatory function, but appears to facilitate fat utilization. *International Journal of Biometeorology*, 2015; 59(10):1461–1474.
- 〔学会発表〕(計 13 件)
1. 松崎健太郎、杉本直俊、片倉賢紀、原俊子、住吉愛里、橋本道男、紫藤治、自発運動トレーニングによるラット唾液分泌機能の亢進、第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 (香川)
 2. 松崎健太郎、暑熱馴化と視床下部神経新生奈良女子大学ライフサイエンスセミナー 2017 年 11 月 (奈良)
 3. 松崎健太郎、杉本直俊、片倉賢紀、原俊子、住吉愛里、紫藤治、暑熱馴化によるラット口腔内免疫機能の亢進、第 55 回日本生気象学会 2017 年 10 月 (東京)
 4. 松崎健太郎、橋本道男、田邊洋子、住吉愛里、並河徹、紫藤治、青魚摂取による赤血球膜不飽和脂肪酸組成変化ならびに精神神経機能改善作用の性差解析、日本脂質栄養学会第 26 回大会 2017 年 9 月 (東京)
 5. Kentaro Matsuzaki, Emon Md. Hossain, Masanori Katakura, Naotoshi Sugimoto, Eri Sumiyoshi, Michio Hashimoto and Osamu Shido, Heat stimulation enhances proliferation of neural progenitor cells in vivo and in vitro, 第 94 回日本生理学会大会 2017 年 3 月 (浜松)
 6. 松崎健太郎、金井真理子、片倉賢紀、田邊洋子、原俊子、橋本道男、紫藤治、年齢階層による母乳中脂肪酸組成の変化 - 食習慣の影響 -、第 3 回食と環境、そして高齢化を考える研究会 2017 年 3 月 (金沢)
 7. 松崎健太郎、住吉愛里、片倉賢紀、原俊子、杉本直俊、紫藤治、運動トレーニングによるラットの唾液分泌機能変化 第 55 回日本生気象学会 2016 年 11 月 (札幌)
 8. 松崎健太郎、片倉賢紀、井上隆之、原俊

子、橋本道男、紫藤治、暑熱暴露によるラット視床下部神経新生と暑熱馴化形成の加齢変化、第 55 回日本生気象学会 2016 年 11 月（札幌）

9. 松崎健太郎、緑茶成分による認知症予防効果、島根大学公開シンポジウム「健康にいい?! 島根の水・お茶・食品」2016 年 11 月（松江）
10. Kentaro Matsuzaki, Masanori Katakura, Toshiko Hara, Michio Hashimoto, Osamu Shido, Effects of β -amyloid-infusion on behavioral thermoregulation and acquired heat tolerance in rats, 第 93 回日本生理学会 2016 年 3 月（札幌）
11. 松崎健太郎、橋本道男、田邊洋子、並河徹、紫藤治、高齢者の青魚摂取頻度と赤血球膜不飽和脂肪酸組成ならびに精神神経機能の関連、第 9 回日本性差医学・医療学会 2016 年 1 月（札幌）
12. 松崎健太郎、片倉賢紀、杉本直俊、原俊子、橋本道男、紫藤治、アミロイド脳室投与はラット行動性体温調節機能と暑熱馴化形成機能を減弱させる、第 67 回日本生理学会中国四国地方会 2015 年 10 月（米子）
13. 松崎健太郎、片倉賢紀、杉本直俊、原俊子、橋本道男、紫藤治、アミロイド脳室投与がラット行動性体温調節機能と暑熱馴化形成機能に及ぼす影響、温熱生理研究会 2015 年 9 月（岡崎）

〔図書〕(計 2 件)

1. 松崎健太郎、大泉康、認知症と機能性食品 開発の最新動向とその可能性、第 2 章 認知機能に対する食品因子のエビデンス 5) ノビレチン、著：吉川敏一、2018 フジメディカル出版
2. Sugimoto N, Katakura M, Matsuzaki K, Yoneda M, Sumiyoshi E, Ohno-Shosaku T, Yachie A, Shido O. Theobromine crosses the blood brain barrier resulting in increased phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and cAMP-response element-binding protein in the mouse brain. Functional Foods and Bioactive Compounds in Health and Disease: Science and Practice, Edited by Martirosyan DM. 2017; Vol. 21: 161-163, Food Science Publisher.

〔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〕

1. Prof. Teruo Nakayama Memorial Award、2015 年 11 月、受賞
2. 日本性差医学・医療学会 Young Investigator Award、2016 年 1 月、受賞
3. 日本生気象学会研究奨励賞、2016 年 11 月、受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 健太郎 (Matsuzaki, Kentaro)
島根大学・医学部・講師
研究者番号：90457185

(2) 研究分担者

紫藤 治 (Shido, Osamu)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：40175386

片倉 賢紀 (Katakura, Masanori)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号：40383179

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()