

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17790

研究課題名（和文）低強度運動で高まるストレス適応と海馬グルタミン酸代謝の関与

研究課題名（英文）Involvement of hippocampal glutamate metabolism in light intensity induced stress adaptation

研究代表者

岡本 正洋（Okamoto, Masahiro）

筑波大学・体育系・助教

研究者番号：30726617

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病モデル動物（5XFAD）を用い、グルタミン酸代謝の異常が、アミロイドの蓄積や認知機能低下の原因であるという仮説を検証した。実験では、グルタミン酸トランスポーターを活性化し、アストロサイトへのグルタミン酸の取り込みを促進するリルゾールの効果を検証した。その結果、リルゾールの長期間投与により、5XFADマウスに見られるアミロイド₄₂の蓄積や認知機能の低下を抑制・改善することが明らかになった。また、RNA-Seqによる遺伝子発現の網羅的解析の結果、アルツハイマー病に伴う海馬における遺伝子発現の異常、特にミクログリアの関連遺伝子の発現を改善していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果はアルツハイマー病に伴うアミロイド₄₂の蓄積や認知機能の低下は、細胞外に過剰に放出されたグルタミン酸が要因であり、海馬のグルタミン酸代謝の恒常性を保つことが、海馬をストレスに伴う疾患から守る上で重要であることを示唆するものである。一過性の低強度運動により海馬のグルタミン酸濃度が上昇する傾向を示しており、習慣的な運動による適度なグルタミン酸放出の繰り返し、グルタミン酸の恒常性（放出されたグルタミン酸の取り込み・除去など）を強化し、ストレス適応力を高めていることが想定される。これらの知見は、運動がストレスに打ち克つための脳を育む分子機構を解明する糸口となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using Alzheimer's disease model animals (5XFAD), we examined the hypothesis that abnormal glutamate metabolism is responsible for amyloid₄₂ accumulation and cognitive decline. In the experiment, riluzole, which activates the glutamate transporter and promotes the uptake of glutamate into astrocytes, was administered for 6 months. As a result, it was clarified that long-term administration of riluzole suppressed that the accumulation of amyloid₄₂ in the subiculum and frontal cortex and improved the cognitive decline observed in 5XFAD mice. In addition, as a result of comprehensive analysis of gene expression by RNA-Seq, it was found that abnormalities in gene expression in the hippocampus associated with Alzheimer's disease, especially associated microglia, were also improved by administration of riluzole.

研究分野：スポーツ神経科学，運動生化学

キーワード：低強度運動 海馬 グルタミン酸 アルツハイマー病 ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ストレス対処能力の向上は、うつ病やアルツハイマー病などの精神疾患や認知機能障害の予防の観点から重要であるが、ストレス適応を高める分子機構は未だ不明である。申請者はこれまでに、低強度運動が海馬の神経新生を高め、記憶・学習能力を向上させる(岡本ら、2012, 2014)だけでなく、一過性のストレスによる認知機能の低下を防ぐことを明らかにした(ストレス耐性)。この時、RNA-Seqによる網羅的解析の結果から、グルタミン酸代謝に関連する因子やエピジェネティクス(ヒストンのアセチル化、メチル化)に関わる酵素の遺伝子変動が顕著であることがわかった。近年、グルタミン酸代謝における恒常性の破綻(細胞外におけるグルタミン酸濃度の上昇)がうつ病や認知症の一因とする説が浮上していることから、運動は海馬のグルタミン酸代謝の恒常性を強化することで、ストレス耐性を高めている可能性が考えられる。そこで、本研究では、グルタミン酸仮説に立脚し、運動がストレスに打ち克つための脳を育む分子機構を提唱することを目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低強度運動で高まる海馬のストレス適応の分子機構として、グルタミン酸代謝の関与を明らかにすることである。これまで、ストレス適応の破綻に起因する疾患への運動効果は、薬物治療を模して、セロトニンなどのモノアミンを中心に検討されてきたが、未だその分子機構解明には至っていない。本研究では、神経変性疾患、特にアルツハイマー病とグルタミン酸代謝異常を明らかにすることで、運動がストレス適応を高める分子機構解明の契機となることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 被検動物とリルゾールの投与

被検動物にはアルツハイマー型モデル動物である5XFADマウス(Jackson Laboratory)を使用した。5XFADマウスは家族性アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド前駆タンパク質(APP)やプレセニリンを過剰に発現する遺伝子改変マウスであり、早期にアルツハイマー病に類似した症状(アミロイドの蓄積や認知機能の低下など)を発症する。実験では、雄性のC57BL6を対照群とし、5XFAD群、5XFADにリルゾールを摂取させる群(5XFAD+Riluzole)の3群にわけて実験を行った(各群、n=8-10)。5XFAD+Riluzole群には飲水からのリルゾール(Sigma-Aldrich)摂取量が13 mg/kg/日になるように調整した。リルゾール投与期間は1ヶ月齢から6ヶ月齢の計5ヶ月間とした。

(2) Y字型迷路を用いた空間認識課題

5ヶ月間のリルゾール投与後、海馬依存性の記憶課題としてY字型迷路による空間認識課題を実施した。この課題は学習課題と認知課題の2つの課題から構成されており、学習課題では3本のアームの内2本のアームを探索できるのに対し、認知課題では3本全てのアームを探索することができる。マウスは新規の場所を好む特性があるので、認知課題時にどのアームが新しく解放されたアームか認識できれば、そのアームへの滞在時間が長くなる(図1A)。記憶課題成績は(新規アームの滞在時間)/(新規アーム+スタートしたアームではないアームの滞在時間)で算出した。課題の探索時間は各10分とし、課題間のインターバルは1時間であった。使用したY字型迷路の大きさは9 cm x 40 cmであり、光量は中心部が40ルクス、各アームでは25ルクスになるように調整し、各アームの先にはvisual cueを設置した。

(3) アミロイドの定量

行動実験後、摘出した脳を用いアミロイドの定量を行ったアミロイド₄₀、アミロイド₄₂、アミロイドオリゴマーの測定は酵素免疫測定法(ELISA)を用いて実施した。アミロイドオリゴマーのELISA測定(IBL)には10倍希釈した脳ホモジネイトを使用した。また、アミロイド₄₀とアミロイド₄₂のELISA測定(Invitrogen)にはジエチルアミン抽出分画を用い、それぞれ2倍希釈、10倍希釈したサンプルを定量した。また、アミロイド斑を定量するために摘出し、4%PFA固定した脳から矢状断切片(40μm)を作成し、チオフラビンS染色を施した。

(4) RNA-Seqを用いた網羅的な遺伝子発現解析

遺伝子の網羅的解析にはRNA-Seq技術を用いた。本研究では、摘出した海馬からRNAを抽出し、バイオアナライザ(Agilent)でRNA濃度と質を評価した。実験では、RIN(RNA Integrity Number)が8以上のサンプルを解析に用いた。ライブラリーを作成後、NexSeq 500(Illumina)を用いてデータを取得した。FastQCファイルの確認や解析にはGalaxy(<https://usegalaxy.org>)やDAVID bioinformatics website (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)を用いて行った。

4. 研究成果

(1) Y 迷路を用いた記憶課題成績の向上

3 群の学習課題時の探索行動時間に差は見られなかった (図 1B)。一方、認知課題では、3 群の Y 迷路の移動距離に差は見られなかったが、5XFAD 群では新規アームの滞在時間が有意に減少していた。この記憶能力の低下は、リルゾールを摂取することで有意に回復していたことが明らかになった (図 1C)。

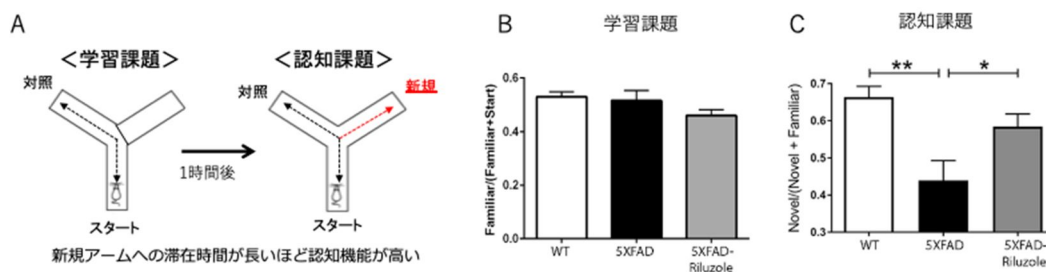


図 1 : Y 迷路を用いた記憶課題成績の結果

(2) アミロイド 蓄積の軽減

ELISA の結果、アミロイド 40、アミロイド 42、アミロイド オリゴマーいずれにおいても 5XFAD マウスで有意に増加し、リルゾールの摂取によりその蓄積は有意に減少することが分かった (図 2A)。また、免疫組織科学染色の結果、5XFAD に見られるアミロイド斑はリルゾール摂取により有意に減少していた (図 2BC)。

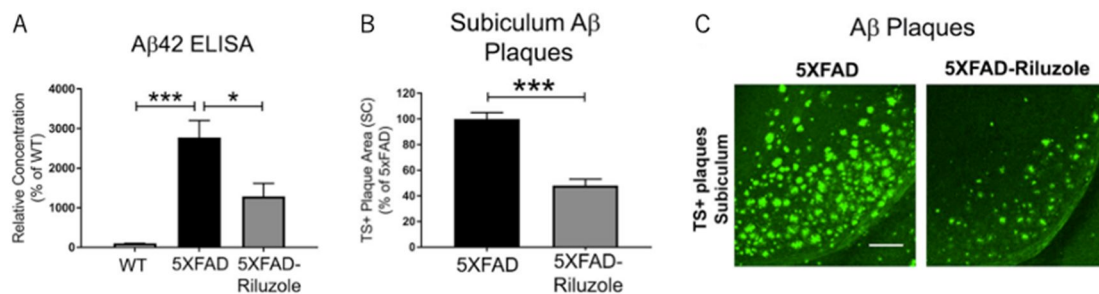


図 2 : リルゾールによるアミロイド 蓄積抑制効果

(3) AD に伴う異常な遺伝子発現の改善

RNA-Seq の解析の結果、対象群と比較し 5XFAD 群で 1541 遺伝子に有意な変動が見られた (図 3A)。また、5XFAD+Riluzole 群では 5XFAD 群と比較し、830 遺伝子において有意な差があった。これらの遺伝子群の内、247 遺伝子が重複しており、これらの遺伝子を散布図にプロットすると 86%もの遺伝子が正反対に変動していたことが分かった (図 3B)。この時、グルタミン酸の受容体である NMDA 受容体を構成するサブユニットの発現をみると、リルゾールがアルツハイマー病で見られる NMDA サブユニットの発現異常を改善していることが分かった。また、病態発症時にミクログリアで発現が高まる遺伝子群が知られているが、本研究でも 5XFAD 群ではこれらの遺伝子群が増加し、リルゾールを摂取することで、回復する傾向を示すことが明らかとなった (図 3C)。

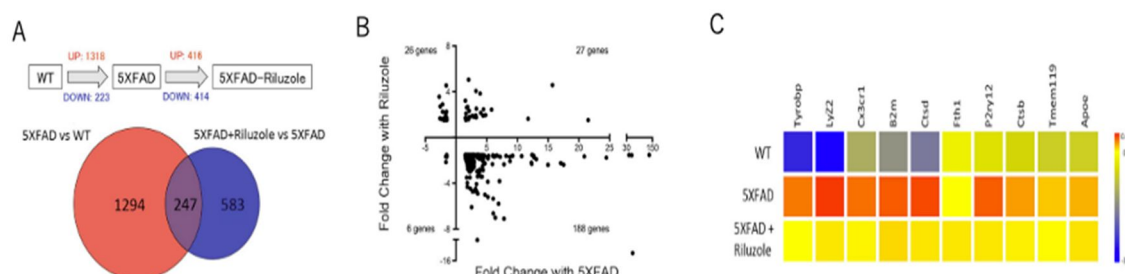


図 3 : RNA-Seq に遺伝子の網羅的解析結果

(4) まとめ

アルツハイマー病モデル動物 (5XFAD) を用い、グルタミン酸代謝の異常が、アミロイド の

蓄積や認知機能低下の原因であるという仮説を検証した。実験では、グルタミン酸トランスポーターを活性化し、アストロサイトへのグルタミン酸の取り込みを促進するリルゾールの効果を検証した。その結果、リルゾールの長期間投与により、5XFAD マウスに見られるアミロイド 42 の蓄積や認知機能の低下を抑制・改善することが明らかになった。また、RNA-Seq による遺伝子発現の網羅的解析の結果、アルツハイマー病に伴う海馬における遺伝子発現の異常、特にミクログリアの関連遺伝子の発現を改善していることが分かった。

本研究の成果はアルツハイマー病に伴うアミロイド の蓄積や認知機能の低下は、細胞外に過剰に放出されたグルタミン酸が要因であり、海馬のグルタミン代謝の恒常性を保つことが、海馬をストレスに伴う疾患から守る上で重要であることを示唆するものである。一過性の低強度運動により海馬のグルタミン酸濃度が上昇する傾向を示しており、習慣的な運動による適度なグルタミン酸放出の繰り返し、グルタミン酸の恒常性（放出されたグルタミン酸の取り込み・除去など）を強化し、ストレス適応力を高めていることが想定される。これらの知見は、運動がストレスに打ち克つための脳を育む分子機構を解明する糸口となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okamoto Masahiro, Gray Jason D., Larson Chloe S., Kazim Syed Faraz, Soya Hideaki, McEwen Bruce S., Pereira Ana C.	4. 巻 8
2. 論文標題 Riluzole reduces amyloid beta pathology, improves memory, and restores gene expression changes in a transgenic mouse model of early-onset Alzheimer's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-018-0201-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Takahashim K. Shima, T. Yook, J. Soya, M. Koizumi, H. Yakushiji, M. Okamoto, M. Soya, H
2. 発表標題 Running exercise-induced stress response is cooperatively regulated by hypothalamus AVP and CRH: anatomical and pharmacological approaches.
3. 学会等名 The 1st International Sport Neuroscience Conference 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita, M. Liu, YF. Okamoto, M. Soya, H
2. 発表標題 The establishment of the rat model for investigating the roles of exercise-increased blood BDNF
3. 学会等名 The 1st International Sport Neuroscience Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本正洋, Bruce S. McEwen, Teresa A. Milner, 征矢 英昭
2. 発表標題 低強度運動によるメスの海馬神経新生促進効果 : アンドロゲン受容体を介した二つの可能性
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本正洋, 島孟, 劉宇帆, Teresa A. Milner, Bruce S. McEwen, 征矢 英昭
2. 発表標題 低強度運動で高まる雌の海馬神経新生におけるアンドロゲン受容体の役割
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamoto, M. Koizumi, H. Inoue, K. Soya, H
2. 発表標題 Influence of X-ray irradiation on mild exercise-induced adult hippocampal neurogenesis
3. 学会等名 ARIHHPヒューマンハイパフォーマンスフォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiraga, T. Okamoto, M. Kuwamizu, R. Hata, T. Soya, H
2. 発表標題 Neural activation of hippocampal subregions following different intensity treadmill running.
3. 学会等名 ARIHHPヒューマンハイパフォーマンスフォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inoue K. Okamoto, M. Soya, H
2. 発表標題 Effect of post-learning mild exercise on memory consolidation: a study using object location test.
3. 学会等名 ARIHHPヒューマンハイパフォーマンスフォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okamoto M, Nozumi H, Yook JS, Soya H.
2. 発表標題 Role of hippocampal neurogenesis in mild exercise effects: Establishment of neurogenesis ablation by X-ray irradiation
3. 学会等名 ARIHHP Human High Performance International Forum (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamoto M
2. 発表標題 Animal exercise model for sport neuroscience
3. 学会等名 Promotion of East Asian Sports Sciences Focusing on Body Work Study (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本正洋、McEwen BS、Milner TA、征矢英昭
2. 発表標題 低強度運動はストレスに対する海馬腹側部の遺伝子発現応答を高める
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okamoto M, McEwen BS, Milner TA, Soya H
2. 発表標題 Mild exercise enhances adult hippocampal neurogenesis: A crucial role of local androgen synthesis in male and female
3. 学会等名 第2回NIPS-ARIHHP共同ワークショップ ヒューマン・ハイ・パフォーマンスの実現を目指した次世代健康スポーツ科学と神経科学の融合・統合
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi K, Shima T, Yook J, Soya M, Koizumi H, Okamoto M, Jesmin S, Soya H.
2. 発表標題 Evidence of Hypothalamic Regulation by AVP and CRH on Running-Induced Stress Response.
3. 学会等名 American College of Sports Medicine 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学 運動生化学研究室 http://soyalab.taiiku.tsukuba.ac.jp 筑波大学 体育系 ARIHHP https://www.arihhp.taiiku.tsukuba.ac.jp
--

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
---------	---------