

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24309

研究課題名（和文）高社会性動物モデルを用いた認知機能障害の社会的修飾機構の解明

研究課題名（英文）Can marriage be a preventive factor for cognitive decline?

研究代表者

高橋 麻衣子（池澤麻衣子）（Ikezawa, Maiko）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50701322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、一夫一婦制を呈するプレーリーハタネズミのアルツハイマー病（AD）モデルを作製・解析することで婚姻関係が認知障害に及ぼす影響とその神経機構を明らかにする。まずは、マウスやラットとは異なって高い社会性を持つことが知られるプレーリーハタネズミについて、その行動学的性状について調べた。

プレーリーハタネズミの物体認知・空間認知の特性について、婚姻関係の有無による主効果は認められなかった。しかし婚姻関係にあるプレーリーハタネズミの方がコントロール群より、物体認知や空間学習能力が向上することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えた本邦では認知症予防は喫緊の課題である。本研究では、「婚姻関係が認知機能低下の予防的因子となりうるか」といった問いを生物学的に取り組む。ヒトの認知機能の低下は数年から数十年にわたる長い経過をたどることや実験的にヒトの認知機能を低下させることが倫理的に不可能であるため、よりヒトに近いモデル動物を利用することが必要となる。本研究では、マウスやラットよりも高い社会性を持つプレーリーハタネズミの、行動学的性状や一夫一婦制に関わる神経基盤について生物学的にアプローチしている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we clarify the effect of the marital relationship of monogamous voles on cognitive impairment and its neural mechanism. We investigated the behavioral properties of the prairie vole, which is known to have a high degree of sociality unlike mice and rats.

Regarding the characteristics of object cognition and spatial cognition in voles, no main effect was observed depending on whether or not they were married. However, it was suggested that the marital voles had better object cognition and spatial learning ability than the control group.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アルツハイマー病 認知症（AD）モデル プレーリーハタネズミ 婚姻関係 streptozotocin

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた本邦において健康寿命の延伸は喫緊の課題である。特に65歳以上の認知症高齢者の数は、2012年には462万人であったのが、2025年には約700万人に増加するとの推計もなされている（日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究）。また疫学研究から種々の因子に加えて社会環境が認知症発症に影響を与えることが示唆されている。例えば、50歳程度の中年期に婚姻状態にあった人は、生涯未婚の人と比べて65歳以上で認知機能障害を起こす可能性が低くなる（BMJ 339, b2462, 2009）。逆に生涯を通じて未婚の人は婚姻状態にある人と比べて認知症になるリスクが高い（BMJ Open 6, e008565, 2016）。一方で、離婚した人や配偶者と死別した人の認知症リスクについては、婚姻状態にある人より高いとする報告（J Neurol Neurosurg Psychiatry 89, 231, 2019）と、高まらないとする報告（BMJ Open 6, e008565, 2016）が混在する。こうした矛盾点は調査したコホートや調査法・期間の違いに起因するが、婚姻状態が認知機能の低下に与える影響について生物学的知見が不足していることも一定の見解を与えない一因となる。本研究では、「婚姻関係が認知機能低下の予防的因子となりうるか」といった問いを生物学的に取り組む。

ヒトの認知機能の低下は数年から数十年にわたる長い経過をたどることや実験的にヒトの認知機能を低下させることが倫理的に不可能であるため、モデル動物を利用することが必要となる。本研究では、一夫一婦制を呈するプレリーハタネズミに streptozotocin (STZ) を脳室内投与してアルツハイマー病モデルを作製することで、上記問いに対する解答を得る。

プレリーハタネズミは北米原産のげっ歯類で、交尾した1つがいは雌雄のどちらか一方が死ぬまで同じ相手と繁殖活動を行う。また、プレリーハタネズミはストレスを受けた個体に対して慰める行動を示す（Science 351, 375, 2016）など、高い社会性を持つことが知られている。プレリーハタネズミの一夫一婦制にかかわる神経基盤が明らかにされ、その一部はヒトでの社会性にかかわる神経回路と共通性をもつとされる（Nat Rev Neurosci 19, 643, 2018）。しかし、一夫一婦の婚姻関係 (pair bond) が疾患の予防や回復に及ぼす影響について報告は皆無であり、明らかにすべき課題である。また、同種他者の存在がストレスに対する応答性を減弱させる効果は social buffering と呼ばれ、プレリーマウスなどのげっ歯類でも知られている（Biol Psychiatry 76, 281, 2014 など）。しかし、social buffering の報告はいずれも急性のストレス反応に対する応答であり、数ヶ月にわたる進行性の神経変性に対する効果を検討した例はなく、こうした観点からも本研究を遂行する必要性がある。

### 2. 研究の目的

プレリーハタネズミはマウスやラットとは異なる行動学的性状を示す。そこで、既報（Behav Neurosci 122, 498, 2008）に従い、成体のプレリーハタネズミにバーンズ迷路および novel object recognition test を行ってプレリーハタネズミの空間学習・物体認知における基盤情報を得る。

次いで、プレリーハタネズミの脳室内に streptozotocin あるいはヒト amyloid beta を投与することで、アルツハイマー病モデルの作製に取り組む。Barnes maze 等の行動学的解析とともに組織学的解析を行ってアルツハイマー病モデルとしての妥当性を検討する。

さらに、雌雄のプレリーハタネズミを同居させて pair bond を形成させた後に、上記のアルツハイマー病モデルを作製し、pair bond が病態に及ぼす影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

使用したプレリーハタネズミは群馬大学大学院医学系研究科附属生物資源センターにて自己繁殖させ、ポリカーボネートの標準的な飼育ケージに床敷き (white flake, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) をいれて飼育した。餌 (LRC4, Oriental Yeast Co., Ltd.) と水の取得は自由にさせ、23°C で 14 時間明期 ; 10 時間暗期の明暗サイクルで飼育した。3~4 週齢で離乳して親から離して同性・同日齢の個体を集めて飼育した。

Pair bond させる場合には、卵巣摘出術を行い、セサミンオイルに溶解した 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\beta$ -estradiol 3-benzoate 200  $\mu\text{l}$  を 3 日間連続して皮下注射したメスとオスとを 5 日間同居させた。対照群として、同様の処置を行ったメス同士 2 匹を 5 日間同居させたものを使用した (cage mate 群)。

#### (2) Barnes maze

直径 94 cm・厚さ 1 cm の円形・グレーの塩化ビニル板の端から 7 cm のところに直径 5 cm の穴を均等に 16 個開けた。1 カ所の穴の下には 20×10×7 cm のエスケープボックスを取り付けた。この円盤を高さ 75 cm のスタンドの上に置いて 120×140×200 cm のアングル内に設置した。アングルの 2 方の壁面は柄の異なるカーテンを張り、他の 2 方は実験室のクリーム色の壁とした。さらにアングルの 4 つの壁面にはボール、バット、円盤、四角の板、のランドマークを配置した。円盤中央の照度は 90~100 lx とし、中央部に置いた筒に被験動物を入れた。筒を取り除いて被験動物を 3 分間 maze 上を探索させる。3 分以内にエスケープボックスに退避した場合には、さらに 1 分間エスケープボックス内にとどめた後、飼育ケージに戻した。3 分以内にエスケープボックスに退避しない場合には、透明のアクリルケースで被験動物をエスケープボックスまで誘導し、中に入ってから 1 分間放置した後、飼育ケージに戻した。1 日 1~2 回のトレーニングを 4 日間行い、5 日目にエスケープボックスを外して、プローブテストを行った。行動は上部からビデオ撮影し、エスケープボックスに入るまでの潜時を測定した。

#### (3) Novel object recognition test

3 日間のスケジュールで行った。1 日目と 2 日目は、被験動物を 40 × 40 × 40 cm のアクリルボックスの中央に置き、10 分間自由に探索させてボックスに馴化させた。3 日目には、ボックスに同じ形の物体 (半分程度に砂利を入れたプラスチックのメディウ瓶、または、逆さに置いたマグカップ) 2 個を対角線上に配置して、被験動物を入れて自由に探索させた。5 時間後、物体の一つを他の物体に変更して、再び被験動物を入れて 10 分間探索させた。行動はビデオ撮影し、それぞれの物体を探索した時間を測定した。

#### (4) 薬剤の脳室内投与

イソフルランによる吸入麻酔をかけたプレリーハタネズミを脳定位装置に固定し、右側脳室 (ブレグマから前方に 0.6 mm、右側に 1.3 mm、深さ 3.0 mm) に薬剤を投与した。STZ (EMD Millipore Corp., 290 Concord Rd., Billerica MA USA) を 3 mg/mL とするように入口脳脊髄液 (aCSF, Tocris Bioscience, Minneapolis, MN) に溶解し、1 匹あたり 3  $\mu\text{l}$  投与した。2 日後に再度、STZ 溶液 3  $\mu\text{l}$  投与した。対照群は cCSF を同様に投与した。また、ヒト amyloid beta1-42 (ペプチド研究所) を 1 mg/ml とするように入生理食塩水に溶解し、側脳室に 3  $\mu\text{l}$  投与した。

### 4. 研究成果

### (1) プレリーハタネズミの物体認知・空間認知の特性

Novel object recognition test では既知物体と未知物体に対する探索時間を、pair bondの有無および物体の新規性の2項目についての2限配置分散分析で解析した(図1)。Pair bondの有無による主効果( $F_{1,38}=0.537$ ,  $p=0.468$ )は認められなかったが、物体の新規性については主効果を認めた( $F_{1,38}=6.505$ ,  $p=0.015$ )。また、両者の交互作用は認められなかった( $F_{1,38}=0.503$ ,  $p=0.483$ )。興味深いことに、pair bond群は既知物体よりも新規物体の方に優位に長く探索していたが( $p=0.017$ )、cage mate群にはそのような差は認められなかった( $p=0.231$ )。

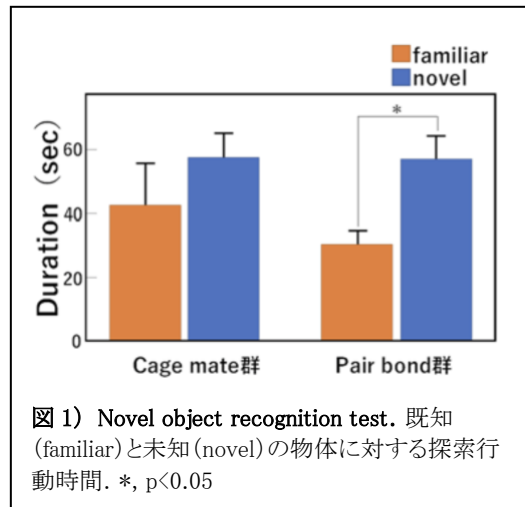


図1) Novel object recognition test. 既知(familiar)と未知(novel)の物体に対する探索行動時間. \*,  $p < 0.05$

Pair bond群とcage mate群とを対象に行ったBarnes mazeについて1~4日目までのトレーニングについて繰り返しのある二元配置分散分析を行った(図2)。トレーニングの日数に主効果を認めたが

( $F_{2,169,41,202}=52.337$ ,  $p < 0.001$ )、pair bondの有無に主効果は認めなかった( $F_{1,19}=6.632$ ,  $p=0.019$ )。また、両者の交互作用も認められなかった( $F_{2,169,41,202}=1.508$ ,  $p=0.233$ )。興味深いことに、1日目と2日目においてpair bond群はcage mate群より優位に短い潜時を示した(1日目,  $p=0.013$ ; 2日目,  $p=0.019$ ; 3日目,  $p=0.718$ ; 4日目,  $p=0.564$ )。さらに、cage mate群では1日目より2日目の方が、また、2日目より3日目の方が、優位に潜時が短縮していたが(1日目 vs 2日目,  $p=0.001$ ; 2日目 vs 3日目,  $p=0.002$ )、pair bond群では2日目と3日目の間に優位差は認めなかった(1日目 vs 2日目,  $p < 0.001$ ; 2日目 vs 3日目,  $p=0.223$ )。Probe testにおいては群間に有意な差は認めなかった。

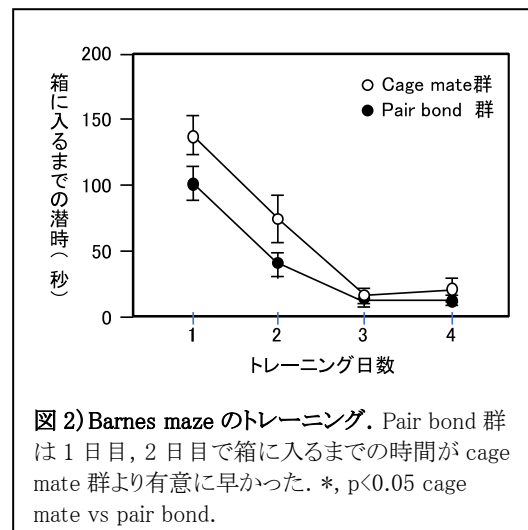


図2) Barnes mazeのトレーニング. Pair bond群は1日目, 2日目で箱に入るまでの時間がcage mate群より有意に早かった. \*,  $p < 0.05$  cage mate vs pair bond.

いずれの試験でもpair bondの有無に主効果は認められなかったが、これらの結果からプレリーハタネズミではpair bondすると物体認知や空間学習能力が向上することが示唆された。

### (2) プレリーハタネズミのアルツハイマー病モデルの作製

脳室内にSTZ投与を行って2ヶ月後、およびamyloid beta1-42ペプチドの投与から2週間後、Barnes mazeにより空間学習の試験を行った。1日1回のトレーニングによってもターゲットとなるエスケープボックスに到達する潜時は短縮した。しかしながら、STZやamyloid beta1-42を投与した個体において、対象となる生理食塩水やスクランブルペプチドの投与軍と比較して、優位な潜時の遅延は認められなかった(図3)。行動観察中、Barnes mazeの穴をのぞき込む様な仕草が観察され、マウスとは異なり上方に提示したランドマークではなく、エスケープボックスの色を目印にエスケープボックスへ到達している可能性が示された。現在、COVID-19まん延防止のために学内への入構が制限されたことなどが影響し、解析が終了していない。今後は、脳組織の炎症像を解析することによって神経細胞死などの影響の有無を検討する予定である。さらに、投与物質の濃度等を検討することにより、プレリーハタネズミのアルツハイマー病モデルの作製を目指す。

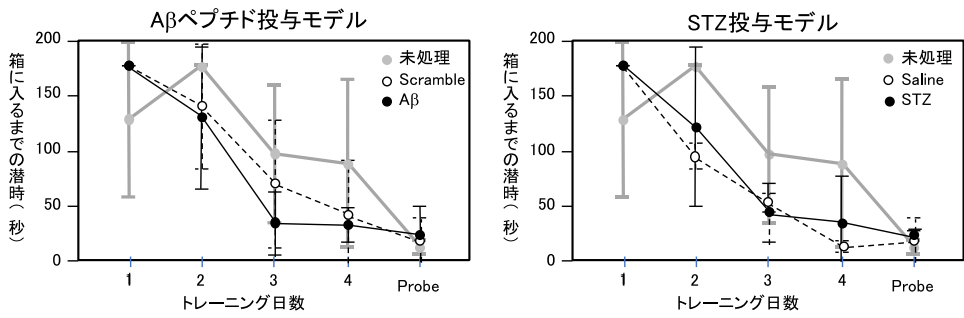


図 3)アルツハイマーモデルの作製. ヒト amyloid beta1-42 を投与した群(左)と STZ を投与した群(右)を用いて、Barnes maze による空間学習能を検討した。しかしながら、薬剤投与による学習能の低下は認められなかった。

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