

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11579

研究課題名(和文) 温浴が海馬の構造と機能に及ぼす効果の検討 温熱刺激をモデルとして

研究課題名(英文) The effects of mild heat exposure on hippocampal morphology and function: a model analysis using the short-term heat exposure.

研究代表者

棕田 崇生 (MUKUDA, Takao)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：60346335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：短時間の温熱刺激は血中Ang II濃度の一過性の上昇をトリガーとして海馬神経新生を促進することから、海馬の構造維持・リモデリングに有効な刺激である。また、週齢や雌雄に関係なく、海馬依存的な空間学習の成立を早めることがわかった。これは、温熱刺激が海馬機能の向上に有効であることを示す。さらに、温熱刺激により変動する遺伝子を網羅的に探索し、神経新生・再生、血管新生・透過性の調節に関する遺伝子が含まれることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおいて温熱刺激は入浴やサウナ浴などによって、健常者だけでなく、障害者や高齢者であっても介助支援のもと、日常的に繰り返し経験できる。これは、海馬の構造維持と機能向上を目指すとき、運動よりも応用し易いことを示唆している。本研究の成果は、疾患や高齢により体の自由が利かず運動困難な場合に、運動に代わって海馬に有効な影響を及ぼす刺激として、入浴やサウナ浴の可能性を検討するための立脚点となりうる。また、古典的な物理療法であるにも関わらず、脳機能に関する効果については必ずしも科学的根拠が明確ではなかった温熱療法に生理的基盤を提供することができる点においても社会への波及効果が高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：Short-term heat exposure induces transiently increased Ang II level in the systemic circulation and enhanced hippocampal neurogenesis, indicating systemic Ang II is important for maintaining the structural basis for the hippocampus. Regardless of age female or male, in the hippocampus-dependent spatial learning, repeated heat exposure has shortened the time it takes to reach their goal in Barnes Maze. These suggest that the repeated short-term heat exposure is a beneficial stimulus for hippocampal function. In addition, several gene sets whose expression was changed following to the short-term heat exposure were identified in the hippocampus. Among them, genes involved in the neurogenesis and angiogenesis were included.

研究分野：脳科学

キーワード：温熱刺激 海馬 神経新生 空間学習 血管構造 血管透過性

## 1. 研究開始当初の背景

海馬におけるニューロンの新生(神経新生)は、ヒトでも生涯継続しているが、最近になって、幼少期以降は劇的に低下することが知られている。神経新生は海馬の構造維持に重要なため、これまでもそれを促進させる刺激の探索が進められており、適度な運動の継続が最も強力な促進刺激であることが見出されている。また、こうした運動による神経新生の促進が海馬機能の向上に寄与する可能性も示唆されている。

申請者は、ラットを用いて、運動による呼吸及び唾液分泌の促進が体液量の減少をもたらす、血中アンジオテンシン II (Ang II) 濃度を一過性に上昇させ、これが 1 型受容体 (AT1R) に作用することで海馬神経新生を促進することを突き止めた (Mukuda & Sugiyama, 2007; Mukuda et al., 2014)。さらに、体液量減少を惹起して血中 Ang II/AT1R 系を駆動する運動以外の刺激として、短時間の温熱刺激の反復 (37 °C・1.5 時間/日・7 日間) (以下、温熱刺激) が適度な運動と同様に海馬神経新生を促進することを見出した (Koyama et al., 2018)。これは、温熱刺激が運動と同様に、海馬神経新生の促進に有効であることを示す。

しかしながら、温熱刺激は、(1) その刺激後短時間で海馬の機能や血管構造に影響を及ぼすのか (短期的効果) (2) 新生ニューロンが神経回路に組み込まれた後の海馬機能に影響を及ぼすのか (長期的効果) といった基本的な問いはまだ検討されていない。また、申請者は長期的効果として、Ang II/AT1R 系が関与する神経新生の促進を見ているが、(3) 短期的・長期的効果を問わず、関与する遺伝子の発現変化については不明なままである。

## 2. 研究の目的

温熱刺激は、入浴やサウナ浴など、私たちが日常的に容易に経験している刺激であるにもかかわらず、モデル動物においても、海馬に及ぼす効果の基礎的知見がほとんどない。これは、熱中症対策を見据えた暑熱環境に長期間曝露されることで獲得する暑熱馴化についての豊富な知見とは対照的である。

そこで本研究は、モデル動物にラットを用いて、上述の(1)~(3)の問いを明らかにすることを目的とした。具体的には、温熱刺激が(1)速やかに海馬機能(空間認知能)と海馬の血管構造と透過性に及ぼす効果(短期的効果)、(2)温熱刺激で誕生した新生ニューロンが神経回路に組み込まれた後の海馬機能に及ぼす効果(長期的効果)および(3)短期的、長期的効果が認められる際に発現が変化する遺伝子の同定。これらにより、海馬の構造と機能の維持・改善に対する温熱刺激の有効性の評価を行い、温熱刺激の応用に向けた生理学的基盤の構築を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 短期的効果：空間認知能および血管構造と透過性に及ぼす効果

採血や種々の物質投与のために、あらかじめすべてのラットの心房にカテーテルを留置した。温熱刺激は、室温：37 °C、湿度：45%、曝露時間：1.5 時間/日、期間：連続 7 日間とした。この刺激は血中 Ang II 濃度の一過性の生理的上昇を引き起こし、慢性的なストレスを惹起することなく、海馬神経新生を促進することをあらかじめ確認している。対照群は室温(25 °C)に置いた。Ang II/AT1R 系の関与を調べるために、AT1R 受容体阻害剤カンデサルタン (cnds) で処理した実験群も準備し、合計 4 群 (対照：CONT、温熱刺激群：HEAT、cnds 対照群：cndsCONT、cnds 温熱刺激群：cndsHEAT) を比較した。ストレス状態の評価となるコルチコステロンや血中 Ang II 濃度の変化を調べるために、温熱刺激の前後で採血し、それぞれの血タンパク質濃度を ELISA を用いて測定した。温熱刺激が海馬神経新生にもたらす効果を確認するために、温熱刺激期間の最終日(7 日目)の刺激直後に BrdU を血中に投与した。海馬機能を評価するための空間学習にはバーンズ迷路課題を用いた。温熱刺激期間を終えた翌日から 1 日 2 回 5 日間連続してバーンズ迷路課題を課した。学習の評価にはシェルター (ゴール) への到達時間と距離を用いた。

### (2) 長期的効果：温熱刺激で誕生した新生ニューロンが神経回路に組み込まれた後の海馬機能に及ぼす効果

短期的効果の検討と同様なスケジュールで温熱刺激と空間学習課題を実施した。空間学習に及ぼす短期的効果を評価するためのバーンズ迷路課題実施期間終了から 1 週間後に改めてバーンズ迷路課題を実施し、学習内容の記憶・想起に及ぼす効果 (長期的効果) を調べた。血管透過性に及ぼす効果を調べるために、改めて実施したバーンズ迷路課題直後に血中に Evans blue (EB) を投与した。

### (3) 温熱刺激が海馬での遺伝子発現に及ぼす効果

温熱刺激の急性および慢性的な効果を調べるために、それぞれ、刺激 3 日目または刺激 7 日目の温熱刺激後に速やかに左海馬をサンプリングし RNA seq を用いて遺伝子発現解析を行った。分析は山口大学研究推進機構総合科学実験センター遺伝子実験施設 (NextSeq 500, Illumina) に依頼した。

#### 4. 研究成果

温熱刺激直後のラットは、放射温度計による測定で尾部の体表温度が約5℃上昇していた。また、放熱を促進するために、顔面の毛に大量の唾液を塗布していた。温熱刺激直後の30分間の飲水量を測定したところ、HEATでCONTに比べて飲水量が増加したが、一方で、cdsHEATは温熱刺激に供しても飲水量はCONTレベルだった。血中Ang IIおよびコルチコステロン濃度は温熱刺激によって一過性に上昇した。これらのことから、今回用いた温熱刺激は、ラットの体内環境に十分変化を及ぼしているが、その影響は温熱刺激直後のみの一過性で慢性的なストレス状態に陥るものではないことを確認した。さらに、温熱刺激によって惹起される飲水量の増加はAng IIによるものであり、本研究で用いたcds投与はAT1Rの阻害に有効であることも再確認した。

#### 【温熱刺激が海馬機能に及ぼす効果：(1)および(2) 空間学習能の短期・長期的効果の評価】

空間学習能に及ぼす効果を調べるために、6週齢オス(性成熟直後の若齢オス個体)および48週齢メス(十分に成熟をきたしたメス個体)を用い、温熱刺激後にバーンズ迷路課題を実施した(図1)。課題の初回(Trial 1)では、いずれの個体も視覚的手掛かりを注視しつつ迷路区画を激しく探索したが、ゴールに達しなかったため実験者がゴールに誘導した。Trial 2では、6週齢オスおよび48週齢メスのいずれもゴールに到達した。到達時間はいずれもHEATで短縮していた。Trial 3でも48週齢メスではHEATの到達時間が短縮していた。その後はいずれの個体も短時間でゴールに到達し、連続5日間実施した最終回(Trial 9)でも変化は見られなかった。さらに、Trial 9を実施日から1週間後に再びバーンズ迷路課題(Trial 10)を実施したところ、いずれの個体もシェルターに到達する時間がTrial 9と同程度だった。今回の検討では雌雄および週齢はある程度限定されるが、HEATではTrial 2のゴール到達時間が短縮したことから、温熱刺激は空間学習の成立時間を早める効果(温熱刺激の短期的効果)があることを示唆している。また、Trial 10での到達時間がTrial 9と同程度だったことから、少なくとも、学習内容の記憶保持と想起には温熱刺激は影響を及ぼさない(長期的効果)と思われる。cdsによる阻害効果等は見られなかったことから、空間学習能そのものにはAng II/AT1R系は関与していないと思われる。なお、当初、学習成立に対する温熱刺激の効果を調べるために、温熱刺激期間終了1週間後からバーンズ迷路課題を実施する計画も立てていたが実施には至っていない。

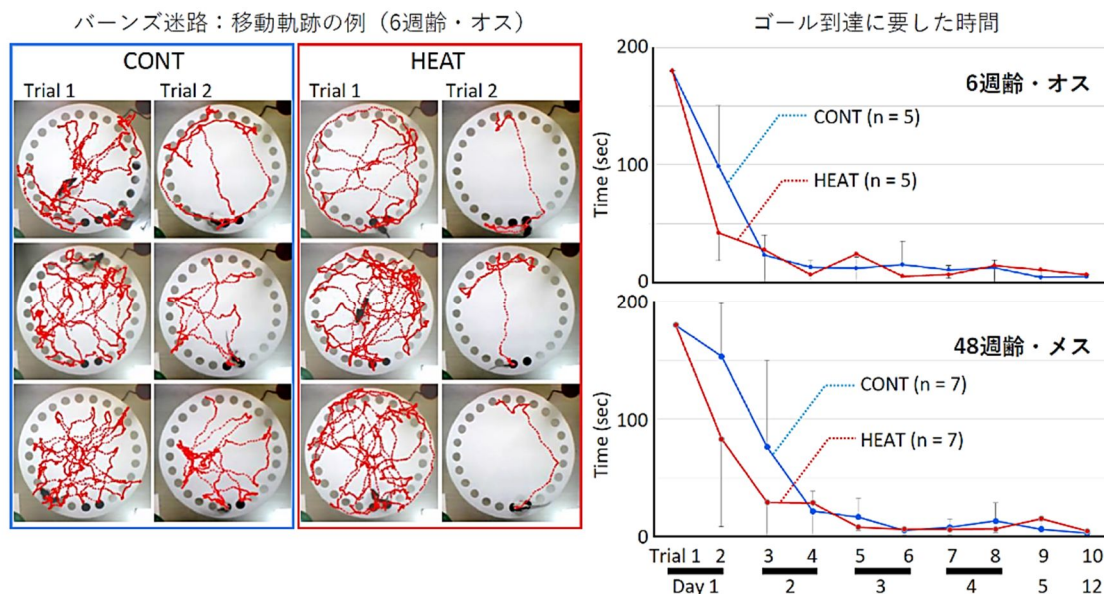


図1 温熱刺激が空間学習能に及ぼす効果

(左) Trial 1および2におけるCONTとHEAT(例として6週齢オス3個体:上・中・下段)の区画上での探索軌跡(赤色)。ゴールは画面6時のところの孔2つ(孔の直下にシェルターを設置)。HEATのTrial 2では、ゴールに到達する累積移動距離が短くなっていることが予想される。(右)各Trialのシェルター到達時間。6週齢オスではTrial 2、48週齢メスではTrial 2,3でHEATの到達時間が短縮している。その後はCONTおよびHEATともごく短い時間でゴールに到達しており、Trial 9および10では同程度であった。

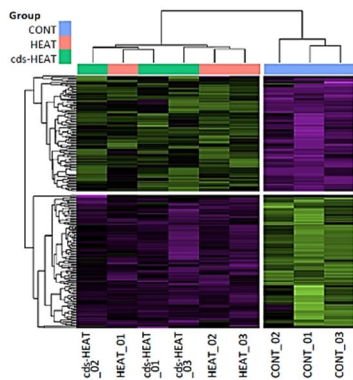
#### 【(3) 温熱刺激が海馬での遺伝子発現に及ぼす効果】

温熱刺激によって急性および慢性的に発現が変動する遺伝子を海馬で探索した。7日間の温熱刺激期間の最終日にサンプリングした海馬では、HEATによってFRD < 0.05を満たす遺伝子が194個見つかった(図2)。さらに、その変化量が絶対値で2倍以上となるものは58個あった。

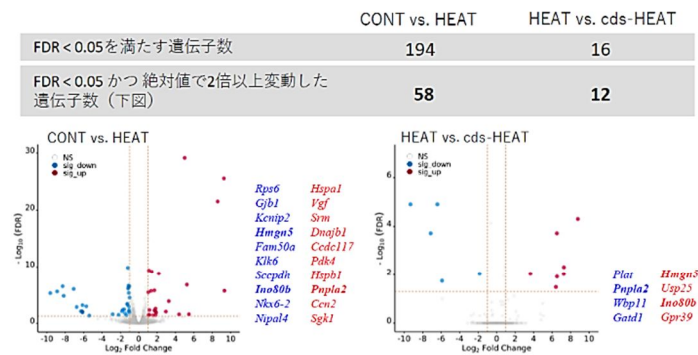


これらのなかには神経新生・再生および血管新生・透過性の調節に関わる遺伝子セットが含まれていた。また、Ang II/AT1R 系が関与する温熱刺激の影響下にある遺伝子は 12 個見つかった。現在も最終的な解析を実施しているところなので詳細は控えるが、海馬の構造維持・リモデリングに関わる遺伝子が温熱刺激の影響を受ける新たな知見が得られており、論文にまとめている。なお、急性効果を見るために実施した温熱刺激 3 日目にサンプリングした海馬からのデータセットについては、解析を進めているところである。

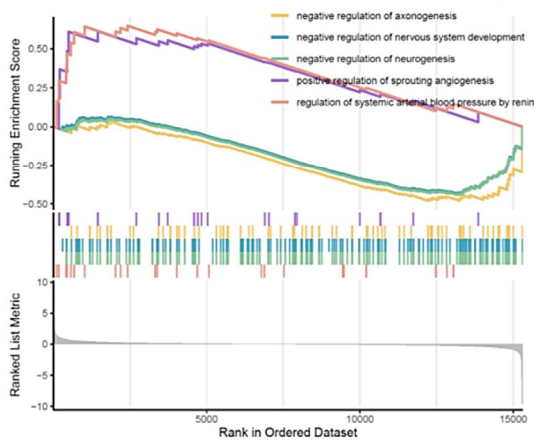
発現変動遺伝子(DEG)による分類



2群による変動遺伝子の比較



HEATとCONTによるエンリッチメント解析



神経新生・再生および血管新生に関わる遺伝子の発現変動の比較

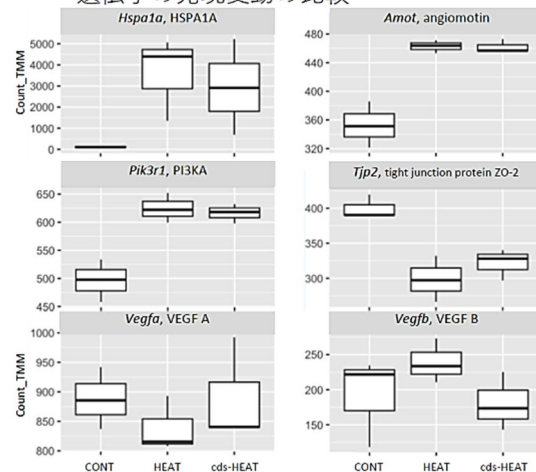


図2 温熱刺激により慢性的に発現が変動する遺伝子  
HEAT によって FDR < 0.05 を満たす遺伝子が 194 個、さらに、その変化量が絶対値で 2 倍以上となるものは 58 個あった。これらのなかには神経新生・再生および血管新生・透過性の調節に関わる遺伝子セットが含まれていた。Ang II/AT1R 系が関与する温熱刺激の影響下にある遺伝子は 12 個見つかった。

【血管構造・透過性に及ぼす効果】

海馬歯状回では、血中に投与した EB がインターニューロンに取り込まれることから、恒常的に血管透過性が高く、血液脳関門 BBB が充分でない可能性を見ている。Trial 10 終了後に EB を血中の投与し、90 分後に脳を摘出して組織切片を作製したところ、歯状回門や分子層、顆粒細胞層のインターニューロンに加え、歯状回の顆粒細胞そのものが EB を取り込んでいた。この結果は温熱刺激および cds 処理の有無に関係なく見られたことから、この手法によって検出できる効果はないと思われる。一方で、これまでは海馬血管からの血漿タンパク質の漏出の範囲が十分わかっていなかったが、本結果から、すくなくとも、顆粒細胞層には十分拡散していることが分かった。また、追加で実施した実験では、EB 陽性顆粒細胞は空間学習課題を実施した個体のみに見られ、この課題を経験していない個体では全く認められなかった。学習・記憶のパベツ回路において、顆粒細胞は海馬に入力される嗅内皮質からの神経線維とシナプスを形成することから、シナプス伝達が高まったニューロンで生じたグルタミン酸受容体の内在化によって、血中から漏出して細胞外液中に拡散している EB が細胞内に取り込まれ、顆粒細胞が EB 陽性を呈していると思われる。この現象の詳細を明らかにすることで、シナプス伝達が亢進したニューロンを簡便に迅速に同定する新たな手法の確立につながる可能性があることから、まずはこの現象を論文にまとめている。

EB を用いた手法では評価が困難なために、血管透過性を高める構造基盤として、海馬血管壁

の小孔をSEMを用いて探索した。脳血管は、密な内皮の糖鎖によって内膜の内腔表面の観察が極めて困難であった。この問題を克服するための工夫を行い、現在、内腔表面の観察が可能になった。現在までに小孔様の構造物を確認したので、さらなる微細構造解析を実施し、有窓性毛細血管である可能性を詰めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 棕田崇生、久米祥太郎、濱崎佐和子、小山友香、中根裕信、海藤俊行
2. 発表標題 蛍光色素エバンスブルーを用いた海馬歯状回シナプス伝達亢進ニューロン検出法の探索
3. 学会等名 日本解剖学会第76回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱崎佐和子、棕田崇生、福田和也、小山友香、中根裕信、海藤俊行
2. 発表標題 血中アルブミンの海馬への移行と血管構造
3. 学会等名 日本解剖学会第76回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 棕田崇生、小山友香、濱崎佐和子、福田和也、海藤俊行
2. 発表標題 短時間の温熱刺激が海馬の構造と機能にもたらす効果
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱崎佐和子、棕田崇生、福田和也、小山友香、中根裕信、海藤俊行
2. 発表標題 血中アルブミンの海馬への移行に関わる血管構造解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 棕田崇生、小山友香、濱崎佐和子、福田和也、海藤俊行
2. 発表標題 短時間の暑熱曝露が海馬神経新生と空間学習に及ぼす効果
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱崎佐和子、棕田崇生、小山友香、海藤俊行
2. 発表標題 血中タンパク質アルブミンの海馬への移行機序解明
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱崎佐和子、棕田崇生、久米祥太郎、小山友香、海藤俊行
2. 発表標題 血中アルブミン結合色素Evans blueを取り込むラット脳ニューロンについて
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	濱崎 佐和子  (HAMASAKI Sawako)  (80735267)	鳥取大学・医学部・助教    (15101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分担者	小山 友香  (KOYAMA Yuka)  (30827572)	鳥取大学・医学部・助教    (15101)	

	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
研究 協力者	福田 和也  (FUKUDA Kazuya)  (20882616)	北里大学・海洋生命科学部・助教    (32607)	

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