

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：13201
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21790229
 研究課題名（和文） 老化における認知機能低下「もの忘れ」を予防する環境療法の細胞・分子メカニズム
 研究課題名（英文） The cellular and molecular mechanism of an environmental therapy to prevent the cognitive decline in aging
 研究代表者
 宮本 嘉明 (MIYAMOTO YOSHIKI)
 富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・准教授
 研究者番号：20449101

研究成果の概要（和文）：老齢マウスにおける海馬依存型認知機能の低下は、富裕環境訓練により改善された。その海馬では、塩基性線維芽細胞増殖因子をふくむ二十数種類のタンパク質が有意に発現変化していた。塩基性線維芽細胞増殖因子を老齢マウス海馬内に持続注入すると、認知機能の低下が抑制された。これらの結果は、富裕環境訓練による海馬での繊維芽細胞成長因子シグナルの活性化が、正常老化における学習記憶の減退を予防することを示唆した。

研究成果の概要（英文）：The hippocampus-dependent cognitive decline in aged mice was improved by enriched environmental training. In the hippocampus of these trained-aged mice, there were significant changes in the expression level of about twenty kinds of protein including basic fibroblast growth factor (bFGF). When bFGF was continuously infused into the hippocampus of aged mice, the cognitive decline was suppressed. These results suggest that the activation of bFGF signal in the hippocampus via the enriched environmental training prevents the decline of learning and memory in normal aging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：行動薬理学

科研費の分科・細目：環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：神経科学・老化・学習記憶・環境訓練

1. 研究開始当初の背景

正常老化による学習記憶減退メカニズムの研究については、国内外を問わずほとんどなされていない。その要因は、老化に伴う微細な神経機能の変化を実験的に捉えることが難しかったことにある。そこで、これまで

の研究では、この問題を解決するために、高感度電極を利用した脳内記録法と、従来の行動評価法との複合実験を行ってきた。その結果、海馬機能依存型 object recognition task（物質認知試験）における老齢（24ヶ月齢）齧歯動物の認知機能は、遅延時間（物質情報

を記録させる参照期から想起させる評価期までの期間：2分間～24時間）の延長に伴って徐々に低下していったが、若齢（9ヶ月齢）齧歯動物の認知機能は低下しなかった。また、この行動試験中に同時に測定した老齢動物の海馬 CA1 領域における神経発火頻度は、若齢動物と比較して、参照期ではほとんど差はなかったが、遅延 24 時間の評価期では低下していた。これらの知見は、ヒトの老化における認知機能低下と類似していることから、「もの忘れ」の原因が、記憶プロセスにおける保持機能の低下であることを提唱した（Miyamoto Y, Burke SN, Barnes CA. The effect of aging on object recognition memory. 36th The Society for Neuroscience Annual Meeting 2006, Poster 371.8）。

一方、近年、enriched environment training（富裕環境訓練）により、若齢齧歯動物の学習記憶能力が向上すること、さらに疾患モデル動物の学習記憶障害が改善されることなどが報告された [Nat Rev Neurosci 1: 191 (2000) & 7: 697 (2006)]。この訓練は、遊具（運動具や玩具など）を設置した広いケージにおいて、多くの齧歯動物を共に飼育する環境訓練で、学習記憶能力の基盤となる海馬における神経機能の強化が引き起こされることも報告された。

2. 研究の目的

我が国における人口の高齢化は、世界一の平均寿命とあいまって急速に進んでおり、総務省の調査では、65歳以上の高齢者人口が総人口の22.1%を占めるまでに至っている（平成20年10月1日現在概算値）。そのため、単に寿命を延ばすのではなく、健康寿命（健康で自立して暮らせる期間）を延ばし、元気に長寿を享受することが、国民的要望のひとつとなってきている。特に、最近では「健康な人のさらなる健康」を目指すアンチエイジング（抗加齢）医療に注目が集まっている。そこで、一般的な社会生活において軽視することのできない、老化における「もの忘れ」を標的としたアンチエイジング療法の開発を目的に、生物学的プロセスである正常老化による学習記憶減退メカニズムの研究を開始することとした。

本研究では、object recognition task における老齢齧歯動物の認知機能低下を、老化における「もの忘れ」と位置づけ、この「もの忘れ」を予防するための環境療法としての enriched environment training の効果を細胞および分子レベルで検討する。

3. 研究の方法

実験動物：C57BL/6J 雄性マウス（日本 SLC）を使用した。本実験における動物実験は、文部科学省動物実験指針および the Guidelines

for Proper Conduct of Animal Experiments Science Council of Japan, 2006 に準じて行われた。

Enriched environment training：老齢（18ヶ月齢：A）および若齢（6ヶ月齢：Y）マウスを、富裕（遊具あり：E、図1参照）もしくは通常（遊具なし：N）環境において3ヶ月間（6時間/日）訓練した。



図1. Enriched environment

Novel object recognition task：連続した2日間、マウスをアクリル製の箱（30×30×35 cm）に1日30分間入れた。3日目に箱内に2つの物体を置きマウスを入れ、各物体にマウスがアプローチした時間を10分間測定した（Training）。24時間後に、箱内の片方を新規物体に変えて同様にマウスを入れ、各物体にマウスがアプローチした時間を10分間測定した（Retention）。

電気生理学実験：急性マウス海馬スライス（350 μm）を作成し、高感度多電極細胞外電位記録システム（アルファメド MED-64）を用いて、海馬 CA3 領域から海馬 CA1 錐体細胞に入力している Shaffer 側枝を短期連続および高頻度刺激した。その際に海馬 CA1 領域で観察される興奮性シナプス後電位を、短期増強および長期増強（LTP）として測定した。

抗体アレイ法：マウス海馬 CA1 領域を採取し、RIPA buffer で溶解、遠心分離後、全タンパク質を抽出した。その抽出液を蛍光色素で標識した後、各種カテゴリーの抗体アレイチップ（Clontech：全1002種類）と反応させて蛍光強度を測定した。

ウエスタン・ブロット法：常法にしたがって、マウス海馬 CA1 領域の全タンパク質抽出液を SDS-PAGE 法にて分離し PVDF 膜に転写した。その PVDF 膜を特異的認識抗体と反応させた後、化学発光検出法を用いて発光強度を測定した。

統計処理：実験結果は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、分散分析の後、Student-Newmann-Keuls test を用いて行った。2群間比較には、Student's t-test を用いて検定した。

4. 研究成果

まず初めに、老齢マウスを用いて enriched environment training による学習記憶能力低下の改善を評価した。すなわち、老齢 (18 ヶ月齢 : A) および若齢 (6 ヶ月齢 : Y) マウスを、富裕 (遊具あり : E) もしくは通常 (遊具なし : N) の飼育環境において 3 ヶ月間訓練したのち、object recognition task (遅延 24 時間後) にて物質認知機能を検討した。その結果、A-E 群の認知能力は、A-N 群と比較して有意に向上しており、Y-N 群と同等レベルにまで改善された。

また、上記とは別の A-E 群と A-N 群を用いて、急性海馬スライスにおける電気生理学的実験を行った。その結果、A-E 群の海馬 CA1 領域におけるシナプス伝達効率に変化は見られなかったものの、シナプス可塑性 (LTP) は、A-N 群のそれと比較して、増強傾向が観察された。

次に、これらマウスの脳組織における各種タンパク質の発現量の変化を評価した。すなわち、認知機能低下の改善された老齢マウス (A-E 群)、改善されなかった老齢マウス (A-N 群) および若齢マウス (Y-N 群) の海馬 CA1 領域における 1002 種類のタンパク質発現量について、抗体アレイ法を用いて検討した。その結果、A-E 群において、A-N 群と比較して有意に増加したものが 29、減少したものが 15 の合計 44 種類の変動タンパク質が観察された。そのうち、A-E 群と Y-N 群との間に差がないものは 26 種類であった。さらに、この 26 種類のタンパク質については、ウエスタン・ブロット法による再評価においても、同様の発現変化が観察されることを確認した。

そこで、A-N 群と比較して、A-E 群において、2 倍以上の発現増加を示したタンパク質のひとつである basic Fibroblast Growth Factor (bFGF: 塩基性繊維芽細胞成長因子) に着目した。老齢マウスを用いて enriched environment training を行う代わりに、浸透圧ミニポンプにより bFGF を脳室内に 2 週間持続注入したのち、object recognition task にて認知機能の変化を評価した。その結果、対照群と比較して、bFGF 注入群では、富裕環境訓練と同様に有意な認知機能低下の改善が観察された。また、これらの動物群における急性海馬スライスを用いて、電気生理学的実験を試みたが、興奮性後シナプス電位を安定して検出することができず、シナプス可塑性の変化について検討することができなかった。

同様の海馬組織におけるシナプス可塑性関連タンパク質の発現レベルについて検討した結果、AMPA 受容体 GluR2 サブユニットおよびグルタミン酸トランスポーター Glut の発現量が増加していた。さらに、NMDA 受容体

NR2B サブユニットのリン酸化レベルが有意に増加していた。

以上のことから、enriched environment training が、老化における認知機能低下に対して個体および細胞レベルでの改善効果を持つことが明らかとなった。さらに、正常老化における認知機能低下は、脳内 bFGF を介したシナプス可塑性関連タンパク質の機能的変化により改善されることも明らかとなった。つまり、bFGF シグナルが老化における「もの忘れ」を予防するための新たな標的分子経路となることが示唆された。

一方、富裕環境訓練後に顕著な発現変化が観察された他のタンパク質 (例 : nNOS, NGF, GDNF, MAGE-D1) については、他機関との共同研究により中枢神経系の機能制御における新たな役割を見出した。nNOS は、老年期神経変性疾患であるパーキンソン病に対して神経保護作用を示すニコチン・シグナルを増強した。bFGF と同様の成長因子である NGF および GDNF は、視神経障害に対して保護作用を示した。また、MAGE-D1 は、セロトニン取り込み機能に影響を与え、うつ様行動を制御することが明らかとなった。

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 5 件)

- ① Mouri A., Sasaki A., Watanabe K., Sogawa C., Kitayama S., Mamiya T., Miyamoto Y., Yamada K., Noda Y., and Nabeshima T. MAGE-D1 regulates expression of depression-like behavior through serotonin transporter ubiquitylation. *J. Neurosci.*, 32: 4562-4580, 2012. 査読有。
- ② Miyamoto Y., Sakai R., Maeda C., Takata T., Ihara H., Tsuchiya Y., and Watanabe Y. Nitric oxide promotes nicotine-triggered ERK signaling via redox reactions in PC12 cells. *Nitric Oxide.*, 25: 344-349, 2011. 査読有。
- ③ Nakatani M., Shinohara Y., Takii M., Mori H., Asai N., Nishimura S., Furukawa-Hibi Y., Miyamoto Y., and Nitta A. Periocular injection of in situ hydrogels containing Leu-Ile, an inducer for neurotrophic factors, promotes retinal ganglion cell survival after optic nerve injury. *Exp. Eye Res.*, 93: 873-879, 2011. 査読有。
- ④ 新田淳美、日比陽子、宮本嘉明、鍋島俊隆 : 薬物依存におけるピッコロの役割. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 45 巻 6 号. 525-529, 2010. 査読有。

- ⑤ Kambe T., Song T., Takata T., Hatano N., Miyamoto Y., Nozaki N., Naito Y., Tokumitsu H., and Watanabe Y. Inactivation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. FEBS Lett., 584: 2478-2484, 2010. 査読有.

[学会発表] (計 26 件)

- ① 高山華南子、宮本嘉明、宇野恭介、徐承姫、松村祥平、和田淳子、新田淳美：覚醒剤投与マウスの側坐核より見出された TMEM168 の細胞内局在と脳内分布. 日本薬理学会第 85 回年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
- ② 家垣典幸、宮本嘉明、宇野恭介、日比陽子、鍋島俊隆、新田淳美：遺伝子組み換えマウスを用いた新規分子 “Shati” の情動行動への影響. 日本薬理学会第 85 回年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
- ③ 家垣典幸、宮本嘉明、石川雄大、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美：新規分子 Shati の脳部位特異的過剰発現がマウスの情動行動に及ぼす影響. 第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2011, 10, 27-29, 東京.
- ④ 齊鹿絵里子、宮本嘉明、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美：新規遺伝子 Shati の “ジストニア” モデル動物に対する影響. 第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2011, 10, 27-29, 東京.
- ⑤ 石川雄大、宮本嘉明、家垣典幸、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美：マウス覚せい剤応答性に対する新規遺伝子シャチの脳部位特異的過剰発現の影響. 第 21 回医療薬学会年会, 2011, 10, 1-2, 神戸.
- ⑥ 新田淳美、日比陽子、宇野恭介、鍋島俊隆、宮本嘉明：覚せい剤精神病マウス側坐核から単離された精神病関連分子について. 第 54 回日本神経化学学会, 2011, 9, 26-28, 加賀.
- ⑦ 宮本嘉明、村松慎一、新田淳美：側坐核ドパミン D2 受容体ノックダウンマウスにおける覚せい剤への低感受性. 第 54 回日本神経化学学会, 2011, 9, 26-28, 加賀.
- ⑧ Iegaki N., Miyamoto Y., Ishikawa Y., Furukawa-Hibi Y., Muramatsu Y., Nabeshima T., and Nitta A. Over-expressions of “shati” in the dorsal striatum or nucleus accumbens affect emotional behaviors in mice. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- ⑨ Saika E., Miyamoto Y., Furukawa-Hibi Y., Muramatsu S., Nabeshima T., and Nitta A. Role of a novel molecule “shati” in animal model of dystonia. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- ⑩ Miyamoto Y., Muramatsu S., and Nitta A. Knockdown of dopamine D2 receptor in the nucleus accumbens attenuates methamphetamine-induced behavioral responses in mice. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- ⑪ Takayama K., Miyamoto Y., Uno K., Seo S., and Nitta A. Expression of TMEM168, a multi-pass membrane protein, is induced in the nucleus accumbens by methamphetamine treatment in mice. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- ⑫ Nitta A., Furukawa-Hibi Y., Uno K., Nabeshima T., and Miyamoto Y. New three molecules related to psychiatric diseases. International Conference for Neurons and Brain Disease 2011, 2011, 8, 3-5, Toyama.
- ⑬ Ishikawa Y., Miyamoto Y., Iegaki N., Furukawa-Hibi Y., Muramatsu S., Nabeshima T., and Nitta A. Over-expression of Shati in the nucleus accumbens affects the abnormal behavior induced by methamphetamine in mice. International Conference for Neurons and Brain Disease 2011, 2011, 8, 3-5, Toyama.
- ⑭ 宮本嘉明、家垣典幸、石川雄大、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美：精神病関連遺伝子 Shati の脳部位特異的過剰発現マウスにおける行動解析. 第 12 回 Pharmaco-Hematology Symposium, 2011, 6, 17-18, 富山.
- ⑮ 渡辺裕之、鳥海和也、宋梓瑜、葛丹、本莊龍輝、毛利彰宏、古関竹直、間宮隆吉、宮本嘉明、新田淳美、福島健、鍋島俊隆：薬物依存関連分子 shati 遺伝子欠損マウスにおける行動異常と脳内の生化学的な変化. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011, 3, 22-24, 横浜.
- ⑯ 前田千春、宮本嘉明、土屋幸弘、居原秀、渡邊泰男：神経型 NO 合成酵素恒常発現 PC12 細胞での薬物誘発細胞障害性に対するニコチンの効果 (Effect of nicotine on drug-induced cytotoxicity in nNOS stable expressed PC12 cells). BMB2010, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.

- ⑰ 梶原綾、彦坂知佐、前田千春、宮本嘉明、土屋幸弘、居原秀、渡邊泰男：ニコチン誘発性 P38 活性化機構における一酸化窒素の関与 (Nitric oxide regulates nicotine-triggered p38 signaling in nNOS stable expressed PC12 cells). BMB2010, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.
- ⑱ Miyamoto Y., Sakai R., Maeda C., Ihara H. and Watanabe Y. Nitric oxide regulates nicotine-induced ERK activation via redox reaction in PC12 cells. 40th annual meeting of The Society for Neuroscience, Neuroscience 2010, 2010, 11, 13-17, San Diego, U. S. A.
- ⑲ 酒井亮介、宮本嘉明、前田千春、神戸敏江、居原秀、渡邊泰男：ニコチン誘発性 ERK シグナリングにおける神経型一酸化窒素合成酵素の関与. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010, 3, 16-18, 大阪.
- ⑳ 高田剛、神戸敏江、宮本嘉明、波多野直哉、内藤康仁、宋涛、野崎直仁、渡邊泰男：S-グルタチオン化によるカルモデュリンキナーゼ I の活性制御. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010, 3, 16-18, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 嘉明 (MIYAMOTO YOSHIKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・
准教授

研究者番号：20449101