

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17547

研究課題名（和文）運動による神経血管ユニットのリモデリングが神経新生の促進をもたらすメカニズム

研究課題名（英文）Exercise-induced remodeling of neurovascular unit promoting neurogenesis and the underlying mechanism

研究代表者

征矢 茉莉子（Soya, Mariko）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80830562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：成体のPdgfrb^{+/+}- マウスにおける神経血管ユニットの機能異常は、安静時および慢性的なストレス負荷時における不安やうつ様行動、作業記憶や恐怖記憶にも影響を及ぼさなかった。次に、60-80週齢の高齢マウスに対して、全身性の炎症を惹起させるlipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与し、情動行動や記憶能を評価したところ、WTと比べPdgfrb^{+/+}- マウスのオープンフィールドテストにおける中心エリアの滞在時間が短く、LPSを投与したPdgfrb^{+/+}- マウスはLPS投与による全身炎症に耐える事ができなかった。現在、40-50週齢のマウスを用いて検討を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動は海馬の神経新生を促進し、記憶能を高める事が多くの研究で証明されているが、そのメカニズムはまだ不明な点が多い。本研究では、神経新生を促進する新たなメカニズムとして神経血管ユニットに着目し、ペリサイトの機能が低下したPdgfrb^{+/+}- マウスを用いて研究に取り組んだ。本研究から、安静時や慢性的なストレス負荷時には、Pdgfrb^{+/+}- マウスの行動異常は見られず、全身性の強い炎症をもたらすLPS投与によって、ペリサイト機能異常の影響を見出せる可能性が見出された。この結果をもとに運動の効果を検証することで、運動が神経新生を高める新たな条件を捉える事が学術的意義も高い。

研究成果の概要（英文）：Dysfunction of the neurovascular unit in adult Pdgfrb^{+/+}- mice did not affect behavioural tests assessing anxiety and depressive-like behaviour, memory performance such as working memory and fear memory. No effects of dysfunction of pericyte were also observed in behavioural tests in Pdgfrb^{+/+}- mice under chronic stressful conditions such as restraint stress or chronic unpredictable stress. Next, Lipopolysaccharide (LPS) was administered intraperitoneally to 60-80 weeks aged mice and behavioral tests were performed, Pdgfrb^{+/+}- mice spent less time in the central area during open field test compared to WT. LPS-treated Pdgfrb^{+/+}- mice were unable to tolerate the inflammation induced by LPS administration. This study is currently continuing with 40-50 weeks mice.

研究分野：神経解剖学

キーワード：運動 神経血管ユニット 神経新生 ペリサイト

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の海馬歯状回において、生涯を通じてニューロンが産生され続ける現象は、成体海馬神経新生と呼ばれている。多くの先行研究によって、成体海馬神経新生は認知・情動機能の制御基盤の一つであり、様々な要因によって抑制もしくは促進されることが示されている。神経新生が抑制されるメカニズムについては、加齢やストレス、うつ病などとの関連で急速に研究が進んでおり、抗うつ薬の作用発現には神経新生の促進が必要であることも明らかにされている (Planchez et al., 2020, *Curr Opin Pharmacol*)。一方で、神経新生が促進されるメカニズムについては、「豊かな環境」や (Kempermann, 2019, *Nat Rev Neurosci*)、運動 (Farioli-Vecchioli et al., 2014, *Stem Cells*) との関連で進んでいる。そのメカニズムについては、脳由来神経栄養因子 (BDNF) や血管内皮増殖因子 (VEGF) 等に代表される末梢血液中の液性因子にフォーカスした研究が広く行われてきたが、更なる研究の進展が求められている。

運動によって脳血流が増加することは良く知られているが、認知機能が改善する可能性については肯定的な結果だけでなく (Guadagni et al., 2020, *Neurology*)、否定的な結果 (Kleinloog et al., 2019, *Front Aging Neurosci*) もあり、現在も活発に研究が進められている。一方で最近、運動によって脳の神経血管ユニット (神経細胞、血管内皮細胞、ペリサイト等からなる血管の基本単位) の遺伝子発現のリモデリングが起こることが報告された (Foley et al., 2019, *BMC Genomics*)。また、運動によって血小板由来増殖因子 (PDGF) の血中濃度が高まることや (Czarkowska-Paczek et al., 2006, *J Physiol Pharmacol*)、神経血管ユニットを構成するペリサイトには PDGFR- α が発現していること、ペリサイトは拡散性シグナル放出を介して成体海馬神経新生を促進する可能性があること (Crouch et al., 2015, *J Neurosci*) などが報告されている。これらから我々は、運動と PDGF シグナリングの關係に着目した。本研究の核心をなす学術的な「問い」とは、「運動による神経血管ユニットのリモデリングは、ペリサイトの PDGF シグナリングを介し、成体海馬神経新生を促進するか?」というものである。

2. 研究の目的

本研究で我々は、神経血管ユニット (神経細胞、血管内皮細胞、ペリサイト等からなる血管の基本単位) のリモデリングが運動による成体海馬神経新生の促進に関わるとの独自の仮説に基づき、ペリサイトに着目した集学的研究を展開する。実験には、ペリサイトの機能が低下した血小板由来成長因子受容体 (PDGFR- α) のヘテロノックアウトマウス (*Pdgfrb*^{+/-}) を導入し、アデノ随伴ウイルス (AAV) による海馬の PDGFR- α のノックダウン実験と、機能回復実験を組み合わせる。本研究の目的は、「運動によって神経血管ユニットのリモデリングが起こり、ペリサイトの PDGF シグナリングを介し、成体海馬神経新生が促進されるメカニズム」を捉えることである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には *Pdgfrb*^{+/-} マウスを用いた。成体マウスは 10 週齢、高齢マウスは 40-80 週齢を用いた。飼育環境は、温度 23 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 10% に維持し、12 時間の明暗サイクル (点灯 7:00、消灯 19 時) に設定し、餌は自由摂取させた。

(2) Lipopolysacchhalide (LPS) 投与

LPS 投与群には 0.5mg/kg の LPS を、Control 群には PBS を腹腔内投与した。LPS 投与後に減少した体重が回復し始め、自発行動量が増加し始める投与後 3 日から行動実験を開始した。

(3) 慢性予測不能ストレス (CUMS)

6 週間の慢性予測不能ストレスは全 8 種類のストレス (Shaking, Wet bedding, Restriction, 45 $^{\circ}$ cage tilt, cold water, over illumination, Isolation & water deprivation, reversed light/dark cycle) を 1 日 2 種類マウスに負荷した。1 日 2 種類のストレスは Day time stress (9:00-18:00) と Night time stress (18:00-9:00) に分け、ストレスはランダムに組み合わせた。

(4) 拘束ストレス

拘束ストレスは 50 ml のファルコンチューブに空気孔を複数開け、その中にマウスを入れ、1 日 6 時間の拘束を 3 週間行った。

(5) 行動解析

オープンフィールド試験

マウスをオープンフィールドチャンバーに入れ、10 分間の探索行動を評価した。チャンバー中央の明るさは 100 lux に設定した。総走行距離、中心領域の滞在時間、外側領域の滞在時間について、Any-maze を用いて測定した。

Y字迷路試験

マウスを3本の走路からなるY字迷路に入れ、8分間の探索行動を測定し、交替行動を評価した。迷路中心の明るさは100 luxに設定した。マウスが各アームに侵入した回数および連続して異なる3本のアームに進出した組み合わせの数を計測し、下記の式より交替行動率を算出した。

$$\text{交替率} = \text{交替行動数} \div (\text{総アーム進入回数} - 2) \times 100$$

高架式十時迷路試験

高さ40 cmの高架式十時迷路にマウスを入れ、クローズアームとオープンアームの付いた迷路内での10分間の自由探索行動を測定した。

強制水泳試験

マウスを水深15cm、水温25 ± 2の円柱型の水槽に入れ、無動時間を測定した

恐怖条件付け試験

1日目の条件付け（文脈A）では、四角いチャンバー内でマウスに電気ショック（0.5mA, 1sec）を3回、60秒の間隔で与えた。4日目に同様のチャンバー（文脈A）にマウスを入れ、6分間のすくみ反応を測定した。5日目に三角チャンバー（文脈B）にマウスを入れ、6分間のすくみ反応を測定した。

4. 研究成果

（1）安静時における *Pdgfrb*^{+/-}マウスの行動テストバッテリー

10週齢の *Pdgfrb*^{+/-}マウスに5種類（オープンフィールド試験、Y字迷路試験、高架式十時迷路試験、強制水泳試験、恐怖条件付け試験）の行動テストを課したが、WTと *Pdgfrb*^{+/-}マウスの間に差は認められなかった。ペリサイト機能異常の影響は、成体の安静時では今回実施した行動テストバッテリーで検出することができなかったため、ストレスを負荷した際の行動を確認する必要がある事が示唆された。

（2）CUMSによる *Pdgfrb*^{+/-}マウスの行動テストバッテリー

Pdgfrb^{+/-}マウスを4群に分け（WT-cont, WT-CUMS, *Pdgfrb*^{+/-} cont, *Pdgfrb*^{+/-} CUMS）6週間のCUMSを課し、5種類の行動テストを課したところ、WTおよび *Pdgfrb*^{+/-}マウスはCUMSによりオープンフィールドにおける活動量が増加し、過活動の傾向が見られたが、群間の有意な差は認められなかった。また、強制水泳試験においても両群の不動時間が延長する傾向が見られたが有意な差はなく、群間の差も認められなかった。その他のテストにおいても群間の差は見られなかった。CUMSはマウスが複数のストレスに予測不可能なタイミングで慢性的に暴露されるが、それぞれのストレスはマイルドなものが多く、先行研究で報告されるうつ様行動も十分に確認する事ができず、ストレス負荷が不十分であった事が示唆された。

（3）拘束ストレスによる *Pdgfrb*^{+/-}マウスの行動テストバッテリー

Pdgfrb^{+/-}マウスを4群に分け（WT-cont, WT-RS, *Pdgfrb*^{+/-} cont, *Pdgfrb*^{+/-} RS）に3週間の拘束ストレスを負荷した後に5種類の行動テストを課したところ、強制水泳試験において *Pdgfrb*^{+/-} cont と *Pdgfrb*^{+/-} RS との間に差が見られる傾向があったが、全ての行動テストにおいて有意な差は見られなかった。

（4）LPS投与による *Pdgfrb*^{+/-}マウスの行動テストバッテリー

これまでの実験では10週齢の成体マウスを用いていたが、LPS投与実験では神経血管ユニットの機能が衰える高齢マウスを用いて、全身性の強い炎症をもたらすLPSを投与し、その際の行動を5種類の行動テストで評価した。マウスを3群に分け（WT-cont, *Pdgfrb*^{+/-}-Veh, *Pdgfrb*^{+/-}-LPS）LPS投与後3日から行動テストを行った。LPSを投与した *Pdgfrb*^{+/-}マウスは行動実験開始前に死んでしまったため行動テストを行うことができなかった。40-80週齢の中で、60-80週齢のマウスはLPS投与に耐えることができなかったため、今後の高齢マウスへのLPS投与は40-50週齢のマウスを用いる必要がある事が明らかになった。オープンフィールド試験において、中央領域での滞在時間がWT-contと比べ *Pdgfrb*^{+/-}-Vehで減少している傾向が見られた。

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