

身体不活動が海馬神経新生を低下させる分子メカニズムに関する研究

西島 壮、市川 里紗、北 一郎

首都大学東京大学院人間健康科学研究科
ヘルスプロモーションサイエンス学域

1. 緒言

近年、「こころの健康」を損なう人々は増加の一途をたどり、ついに厚生労働省は2011年7月、これまでの4大疾病（がん、脳卒中、心筋梗塞、糖尿病）に精神疾患を加え、5大疾病とする方針を示した（厚生労働省，2011）。これまで、運動（身体活動）がうつ病やアルツハイマー病を代表する精神疾患の予防に有効であることは、多くの動物実験や、ヒトを対象とした疫学的調査（介入研究を含む）から明らかにされている（Babyak et al., 2000, Greenwood et al., 2003, Leppamaki et al., 2004, Bjornebekk et al., 2005, Larson et al., 2006）。そして、「こころの健康」を損なう人々が激増していることと反比例するかのように、我々の身体活動量は著しく低下している。しかしながら、身体活動量の低下が精神疾患の罹患リスクとなりうるか否かは、これまでほとんど注目されておらず、実験的検証は十分になされていない。そこで我々は、身体活動量の低下（身体不活動）は4大疾病だけでなく、精神疾患への罹患リスクを高めると仮説を立て、独自のマウス不活動モデルを用いて研究を進めている。この不活動モデルでは、マウスを離乳直後から高い身体活動量を維持できる自発運動ケージで飼育し、成熟後に通常の飼育ケージに移すことで、身体活動量を相対的に低下させる。これは、拘束などの特別な処置を伴わない自然な介入であるため、拘束などによるストレスの影響を除外して身体活動量低下の影響を検討できる点が最大の特徴である。

この不活動モデルを用いて我々はこれまで、身体不活動がマウスの不安様行動を増加させ、さらに海馬における神経新生を阻害することを明らかにした（Nishijima et al., 2013）。しかし、身体不活動が海馬神経新生を阻害する分子メカニズムを全く不明である。そのメカニズムを解明することにより、身体活動量低下に起因する海馬神経機能の低下を予防するための基礎的知見につながることを期待できる。

中枢神経系における炎症反応の亢進は、神経新生を阻害する一要因となるだけでなく、アルツハイマー病を代表とする神経変性疾患や認知機能低下の誘因となる（Yirmiya and Goshen, 2011, Kohman and Rhodes, 2013）。また興味深いことに、ヒトにおいて、習慣的な運動の中断やベッドレストが血中炎症生サイトカイン濃度を増加させることが報告されている（Yirmiya and Goshen, 2011, Kohman and Rhodes, 2013）。そこで本研究は、身体不活動が海馬における神経新生を低下させる分子機序の解明を目指し、身体不活動が抗炎症性および炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2-1. 被験動物および飼育条件

実験には3週齢の雄性C57BL/6マウス（日本エスエルシー）を用いた。飼育環境は5:00~17:00

を明期とする明暗サイクルで、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ に維持し、水および飼料は自由摂取とした。本実験は全て、首都大学東京南大沢キャンパスの研究安全倫理委員会の承認の下、動物実験管理規定に従い実施した。

実験デザインを図 1 に示した。1 週間の予備飼育を行った後 (4 週齢時)、マウスをランダムに対照群 (noEx 群、実験 1: 11 匹、実験 2: 10 匹) と不活動群 (Ex-noEx 群、実験 1: 10 匹、実験 2: 10 匹) に分けた。対照群は、実験期間中、通常のマウス用ケージで飼育した。不活動群は、11 週齢まで回転ホイールのついた自発運動ケージ (ENV-3046, MedAssociate Inc) で飼育し、12 週齢時に通常ケージに移すことにより、身体活動量を相対的に低下させた (不活動化)。さらに 5 週間飼育した後、17 週齢時に深麻酔下で脳を摘出した。なお、マウスをケージ内に単独で飼育する社会的隔離は、運動による神経新生促進効果を低下させることが報告されているため (Stranahan et al., 2006)、本研究では全て、1 ケージあたり 5 匹の群飼育とした。

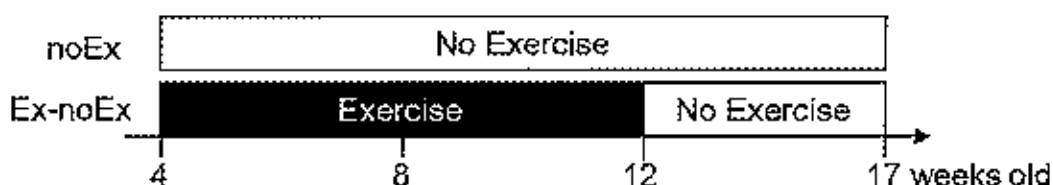


Figure 1. Timeline of the experiment. noEx mice were housed in standard plastic cages throuout the experiment. Ex-noEx started voluntary wheel running at 4 weeks of age, then stopped running at 12 weeks of age.

2-2. 不活動化がマウス海馬における神経新生に及ぼす影響 (実験 1)

我々の先行研究では、12 週齢の不活動介入開始から 9 週間後 (21 週齢時) に海馬を摘出して解析した結果、新生細胞から幼若神経細胞への分化が抑制されていることを明らかにした (Nishijima et al., 2013)。本研究では、不活動介入期間を 5 週間と短縮し、より早期においても海馬における神経新生が抑制されているか否かを、実験 1 において検証した。

飼育期間終了後、深麻酔下でマウスの左心室より全身に生理食塩水 (4°C) を灌流した。脳を摘出後、固定液 (4%パラホルムアルデヒド、0.1 M PBS) に浸し後固定処理を施した。スクロース溶液 (30%) による脱水処理を行った後、脳を凍結した。マイクロトームを用いて前額断切片 ($40 \mu\text{m}$ 、計 8 シリーズ) を作成した。1 シリーズの切片を Nissl 染色し、Cavalieri 法により海馬歯状回の体積を求めた (Llorens-Martin et al., 2007)。他の 2 シリーズの切片はそれぞれ、免疫組織化学染色法により細胞増殖マーカーである Ki-67、および幼若神経細胞マーカーである Doublecortin (DCX) を染色した。一次抗体には、ウサギポリクロナール抗 Ki-67 抗体 (1:1000, NCL-Ki67p, Novocastra)、ヤギ抗 DCX 抗体 (1:500, sc-8066, Santa Cruz) を用い、抗体希釈液 (0.5% TritonX-100, 0.5% BSA, in 0.1 M PBS, PBST-BSA) に希釈した。二次抗体には、ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:1000, AP182B, Millipore) およびロバ抗ヤギ IgG 抗体 (1:1000, AP180B, Millipore) を用い、アビジン-ビオチン複合体形成反応を行った後 (Vectastain ABC peroxidase kit, Vector Lab.)、DAB 法により発色させた。

海馬歯状回における総 Ki-67 陽性細胞数は、三次元ステレオロジー法により推定した (Llorens-Martin et al., 2007)。DCX 陽性細胞数は、イメージングソフトウェア (cellSens、オリンパス) を用いて歯状回顆粒細胞層の中央に線分 ($150 \pm 0.1 \mu\text{m}$) を描き、その線分と DCX 陽性樹状突起との交叉数を計数し、評価した。なお、DCX 陽性幼若神経細胞は、細胞体から $40 \mu\text{m}$ の距離までは軸索が平均 1 本であることが報告されている (Revest et al., 2009)。本実験で用いたマウスの歯状回顆粒細胞層の厚さは $60 \sim 80 \mu\text{m}$ であったことから、DCX 交叉数は DCX 細胞数を反映すると考えられる。

2-3. 不活動化がマウス海馬における炎症性・抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響 (実験 2)

実験 2 では、不活動化がマウス海馬における炎症性および抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響を検討した。実験 1 と同様の手続きによりマウスを飼育した後、深麻酔下でマウスの左心室より全身に生理食塩水 (4°C) を灌流した。脳を摘出後、直ちに氷冷したガラスプレート上で海馬を分画し、液体窒素を用いて瞬間凍結した。海馬 (片側) に可溶性バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 10% Glycerol, Protease Inhibitor Complete Tablet 1 錠 / 10 ml) を加え、氷上でホモジナイズした。遠心分離 (12,000 rpm, 10 分, 4°C) 後に上清を回収し、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて総タンパク質濃度を定量した。全てのサンプルを総タンパク質濃度が 1.0 ng/ml になるように調整した後、サイトカイン・アッセイに供した。

海馬における炎症性・抗炎症サイトカイン量は、Bio-Plex MAGPIX システム (BioRad) およびマウスサイトカインプレミックスパネル (6-Plex, Th17 パネル) を用いて定量した。本システムは、サスペンションビーズアレイテクノロジーを用いることにより、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、IL-1 β 、および TNF- α の計 6 種類のサイトカインを一度に定量することができる。なお、このサイトカイン・アッセイを用いて海馬抽出サンプルからサイトカイン濃度が定量可能であることが報告されており (Datta and Opp, 2008)、我々も先行研究と同様、リポポリサッカライド誘発性の炎症性サイトカインの増加を海馬で検出できることを、予備実験で確認した。

2-4. 統計・解析

2 群間 (noEx 群 vs. Ex-noEx 群) の平均値の差の検定には、対応のない t 検定を用いた。データは平均値 \pm 標準誤差で示し、統計的有意水準は 5% 以下とした。

3. 結果

3-1. 不活動化がマウス海馬における神経新生に及ぼす影響 (実験 1)

図 2 に、マウス海馬における神経新生の結果を示した。神経新生が生じる海馬歯状回 (DG, dentate gyrus) の総体積は、群間に差は認められなかった (Figure 2B)。一方、総 Ki-67 陽性細胞数 (Figure 2D) および DCX 軸索交叉数 (Figure 2F) は、Ex-noEx 群で有意に低値を示した ($P < 0.01$)。

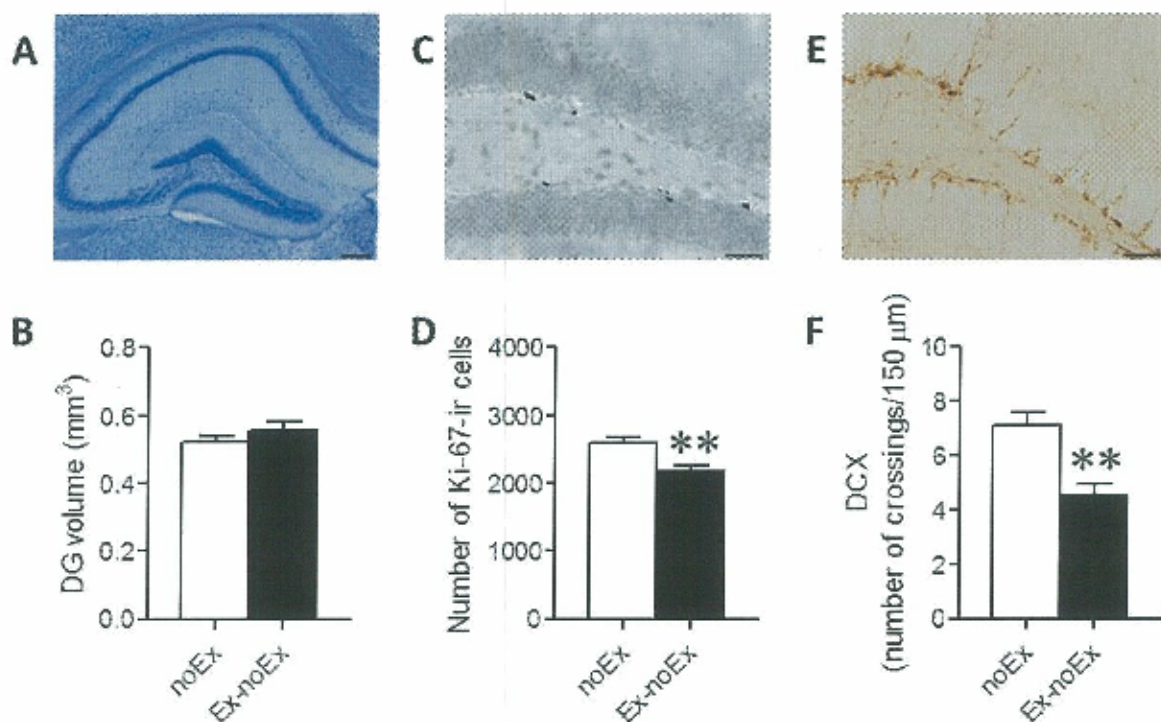


Figure 2. Cessation of voluntary wheel running impaired adult hippocampal neurogenesis in mice. Representative images of Nissl staining (A, scale bar = 200 μm), Ki-67-immunoreactive cells (C, scale bar = 50 μm), and doublecortin (DCX)-immunoreactive cells (E, scale bar = 50 μm) are shown. The total volume of the dentate gyrus (DG) did not differ between groups (B). The total number of Ki-67-ir cells (D) and the number of DCX crossings (F) was significantly smaller in Ex-noEx mice compared to noEx mice. Data are presented as mean \pm SEM (noEx, $n = 11$; Ex-noEx, $n = 10$). ** $P < 0.01$ vs. noEx mice.

3-2. 不活動化がマウス海馬における炎症性・抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響 (実験 2)

図 3 に、マウス海馬における炎症性および抗炎症性サイトカイン発現量を示した。抗炎症性サイトカインである IL-17A および IFN- γ 発現量は、不活動群において有意に低値を示し ($P < 0.05$)、IL-6 発現量は低下傾向 ($P = 0.07$) を示した。さらに、炎症性サイトカインである TNF- α 発現量も不活動群で有意に低値を示した ($P < 0.05$)。IL-10、および IL-1 β 発現量は、2 群間に有意差は認められなかった。

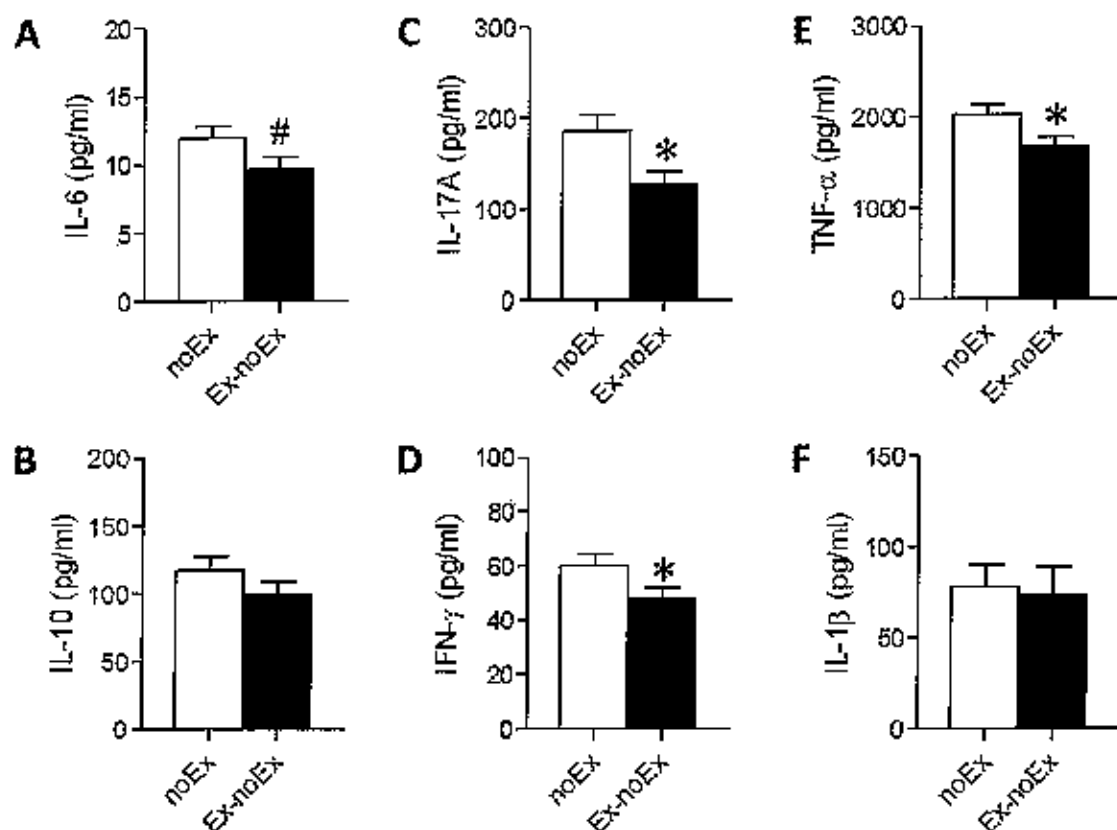


Figure 3. Cessation of voluntary wheel running altered balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines expression. Concentrations of IL-6 (A), IL-10 (B), IL-17A (C), IFN- γ (D), TNF- α (E), and IL-1 β in hippocampal homogenates were shown. Data are presented as mean \pm SEM (noEx, n = 10; Ex-noEx, n = 10). * $P < 0.05$, # $P < 0.1$ vs. noEx mice.

4. 考察

本研究では、まず、自発走運動中断による不活動化がマウス海馬における神経新生に及ぼす影響を検討した (実験1)。前述の通り、我々の先行研究では不活動介入期間を9週間としていたが (Nishijima et al., 2013)、不活動介入後のどのタイミングで神経新生が抑制されるか否かは検討課題として残されていた。そこで本研究では、不活動介入期間を5週間で短縮し、より早期においても神経新生が抑制されているか否かを検討した。

歯状回の総体積は、不活動化の影響は認められず、これは我々の先行研究と一致する結果であった。細胞増殖マーカーである Ki-67 陽性細胞数は、対照 (noEx) 群と比較し、不活動 (Ex-noEx) 群で有意に低値を示した。一方、先行研究では、有糸分裂マーカー (phospho-histone H3, PH3) を用いて細胞分裂能を評価した結果、不活動介入9週間後においては、PH3 陽性細胞数の低下は認められなかった。細胞増殖能を異なるマーカーを用いて評価しているため、結果の解釈に注意が必要であるが、これらの結果は、不活動介入5週間後は細胞増殖が抑制されるが、その抑制は9週間後には対照群と同程度まで回復することを示唆している。興味深いことに、運動による細胞増殖の促進効果にも運動期間が影響し、運動開始から約2週間後に最も顕著に運動効果が認め

られ、4週間後には対照(非運動)群と同程度になることが報告されている(Van der Borgh et al., 2009, Clark et al., 2010)。したがって、海馬神経新生の第一ステップである細胞増殖は、運動開始あるいは運動中断という環境の変化に大きく影響する可能性が示唆された。

幼若神経細胞マーカー(DCX)は、神経新生能(neurogenic activity)を評価する有効な指標であることが報告されている(Couillard-Despres et al., 2005)。本研究では、不活動群においてDCX陽性細胞数が有意に低下した。この結果から、不活動介入5週間後の時点においても、不活動化によって海馬における神経新生が阻害されていることが明らかとなった。なお、不活動介入直前(11週齢時)には、自発走運動によってDCX陽性細胞数が有意に増加することを確認している(未発表データ)。すなわち、本実験における不活動群では、12週齢時点ではDCX陽性細胞数が対照群より多かったものの、不活動介入5週間後には対照群より少なくなったと推察できる。これは、自発走運動中断による不活動化が海馬神経新生を抑制する影響が極めて強いことを示唆している。

本研究では、このように海馬における神経新生を顕著に抑制する不活動モデルを用いて、不活動化が海馬の炎症性・抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響を検討した(実験2)。本研究で解析した6種のサイトカインに関して、IL-10、IL-17A、IFN- γ は神経新生を促進する抗炎症性サイトカインとして(Baron et al., 2008, Chisholm et al., 2012, Kiyota et al., 2012)、IL-1 β 、TNF- α は神経新生を抑制する炎症性サイトカインとして(Iosif et al., 2006, Wu et al., 2012)報告されている。IL-6は一般的に炎症性サイトカインとして知られているが、神経新生に関しては促進的に作用することが報告されている(Bowen et al., 2011)。

本研究により初めて、自発走運動の中断による不活動化は、神経新生に促進的に作用する抗炎症性サイトカイン(IL-17A、IFN- γ)を減少させることが明らかとなった。すなわち、これら抗炎症性サイトカインの減少が、不活動化が海馬における神経新生を抑制した分子機序として一部関与している可能性が示唆された。一方、神経新生に抑制的に作用する炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α)が不活動化によって増加することも十分予想されたが、本実験ではIL-1 β 発現量に群間の差は認められず、予想に反してTNF- α 発現量は有意に低値を示した。なぜ、抗炎症性サイトカインと炎症性サイトカインの発現量がどちらも低下したのか、その原因、さらに生理学的意味は定かでないが、不活動群の海馬における炎症反応になんらかの調節異常が生じている可能性を示唆している。なお、本研究では、不活動介入後5週目で海馬を摘出し解析を行ったが、もしかしたらそれ以前においては、不活動化が契機となり一過性に炎症性サイトカインの増加が生じ、その後に減少に転じているのかもしれない。今後は、不活動介入後の時間経過に着目し、サイトカイン発現の変化を詳細に検討する必要がある。

本研究により、身体不活動が炎症性・抗炎症性サイトカインの発現バランスに顕著な影響をもたらすことが示唆された。炎症性・抗炎症性サイトカインは、神経新生の調節に関わるだけでなく、シナプス情報伝達にも関与する(Santello and Volterra, 2012)。さらに、中枢神経系における炎症反応の調節を担うミクログリア細胞は、生後の脳の発達や神経可塑性にも極めて重要な役割を担っている(Tremblay et al., 2011)。今後は、不活動化が海馬におけるミクログリア活性にどのような影響を及ぼしているかについても、検討を加える必要があろう。

5. 結語

自発走運動中断による不活動化は、海馬神経新生を著しく低下させた。このとき、神経新生に

促進的に作用する抗炎症性サイトカイン (IL-17A、IFN- γ) が有意に減少していたことから、これら抗炎症性サイトカインの減少が、身体不活動によって海馬神経新生が抑制される分子メカニズムとして関与している可能性が示唆された。今後は、抗炎症薬投与などにより炎症性・抗炎症性サイトカインの発現バランスを変化させることで不活動化による海馬機能低下が抑制できるか否かを検証し、身体不活動による海馬機能の低下の予防方略について検討していく予定である。

謝辞

本研究を助成いただきました公益財団法人ミズノスポーツ振興財団に、深く御礼申し上げます。

参考文献

- Babyak M, Blumenthal JA, Herman S, Khatri P, Doraiswamy M, Moore K, Craighead WE, Baldewicz TT, Krishnan KR (2000) Exercise treatment for major depression: maintenance of therapeutic benefit at 10 months. *Psychosom Med* 62:633-638.
- Baron R, Nemirovsky A, Harpaz I, Cohen H, Owens T, Monsonigo A (2008) IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28:2843-2852.
- Bjornebekk A, Mathe AA, Brene S (2005) The antidepressant effect of running is associated with increased hippocampal cell proliferation. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:357-368.
- Bowen KK, Dempsey RJ, Vemuganti R (2011) Adult interleukin-6 knockout mice show compromised neurogenesis. *Neuroreport* 22:126-130.
- Chisholm SP, Cervi AL, Nagpal S, Lomax AE (2012) Interleukin-17A increases neurite outgrowth from adult postganglionic sympathetic neurons. *J Neurosci* 32:1146-1155.
- Clark PJ, Kohman RA, Miller DS, Bhattacharya TK, Haferkamp EH, Rhodes JS (2010) Adult hippocampal neurogenesis and c-Fos induction during escalation of voluntary wheel running in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 213:246-252.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1-14.
- Datta SC, Opp MR (2008) Lipopolysaccharide-induced increases in cytokines in discrete mouse brain regions are detectable using Luminex xMAP technology. *J Neurosci Methods* 175:119-124.
- Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack SH, Campeau S, Maier SF, Fleshner M (2008) Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 28:2889-2898.
- Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, Pronk CJ, Bonde S, Kokaia Z, Jacobsen SE, Lindvall O (2006) Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 26:9703-9712.
- Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, Jacobsen MT, Andrews SJ, Ikezu T (2012) AAV serotype

- 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther* 19:724-733.
- Kohman RA, Rhodes JS (2013) Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun* 27C:22-32.
- Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, Kukull W (2006) Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med* 144:73-81.
- Leppamaki S, Haukka J, Lonnqvist J, Partonen T (2004) Drop-out and mood improvement: a randomised controlled trial with light exposure and physical exercise [ISRCTN36478292]. *BMC Psychiatry* 4:22.
- Llorens-Martin MV, Rueda N, Martinez-Cue C, Torres-Aleman I, Florez J, Trejo JL (2007) Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience* 147:631-638.
- Nishijima T, Llorens-Martin M, Tejeda GS, Inoue K, Yamamura Y, Soya H, Trejo JL, Torres-Aleman I (2013) Cessation of voluntary wheel running increases anxiety-like behavior and impairs adult hippocampal neurogenesis in mice. *Behav Brain Res* 245:34-41.
- Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV, Abrous DN (2009) Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry* 14:959-967.
- Santello M, Volterra A (2012) TNFalpha in synaptic function: switching gears. *Trends Neurosci* 35:638-647.
- Stranahan AM, Khalil D, Gould E (2006) Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 9:526-533.
- Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31:16064-16069.
- Van der Borght K, Kobor-Nyakas DE, Klauke K, Eggen BJ, Nyakas C, Van der Zee EA, Meerlo P (2009) Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. *Hippocampus* 19:928-936.
- Wu MD, Hein AM, Moravan MJ, Shaftel SS, Olschowka JA, O'Banion MK (2012) Adult murine hippocampal neurogenesis is inhibited by sustained IL-1beta and not rescued by voluntary running. *Brain Behav Immun* 26:292-300.
- Yirmiya R, Goshen I (2011) Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun* 25:181-213.
- 厚生労働省 (2011) 第 19 回社会保障審議会医療部会資料.