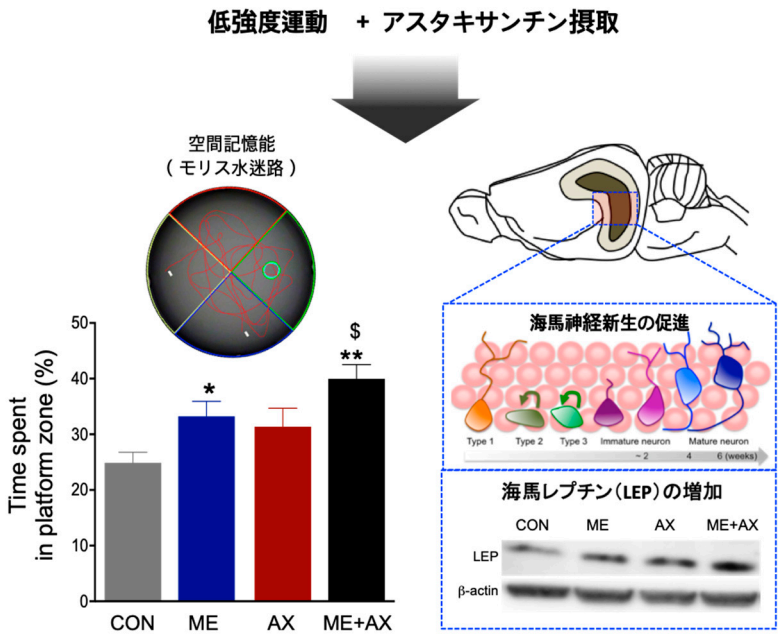
213　アルツハイマー病の次世代運動–栄養療法の開発	征矢　英昭

【目的】本研究は、これまで見出された低強度運動（ME）がもつ海馬機能を高める効果が、高い抗酸化作用を持つアスタキサンチン（AX）摂取で更に相乗的に増強され、その際の分子基盤として脳由来レプチン（LEP）の関与を明らかにするとともに、その増強効果がアルツハイマー病（AD）により生じる認知機能の低下に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

【方法】C57BL/6J 系雄性マウス（WT）、*LEP* 欠損遺伝性肥満マウス（*ob/ob*）、$APP^{NL\text{-}G\text{-}F}$ 系雄性 AD マウス用いた。低強度運動は、予め動物で決定しておいた換気性作業閾値（VT）を基準としてそれ以下の走速度で運動を課した。AX 摂取の濃度は海馬神経新生を促進する 0.5%濃度を用いた。最終週にモリス水迷路を用い、空間学習・記憶能を評価した。免疫組織化学染色法により海馬歯状回の増殖細胞数と新生成熟細胞数を評価した。レスキュー実験として、浸透圧ポンプシステムを用いて *ob/ob* マウスの脳室に LEP を投与した。

【結果】WT マウスにおける 4 週間の ME と AX の併用介入は、相乗的に海馬特異的な空間記憶能および神経新生を高めた。この相乗効果を生み出す分子機構として網羅的な遺伝子発現解析（DNA マイクロアレイ）及び RT-PCR や Western blotting の結果から脳内 LEP タンパク質を同定、その関与を調べたところ、海馬由来 LEP タンパク質の発現が上記の神経新生及び認知機能増進効果と同様に変化し、相乗効果を生む併用条件で最も増加すること、更にその効果は LEP を欠損する *ob/ob* マウスでは消失するが、4 週間の脳内 LEP 投与で回復することが判明した。最後に、AD の発症機序及び症状がよりヒトに近い新型モデルマウスである $APP^{NL\text{-}G\text{-}F}$ マウスにおいて、AX 摂取の効果を検討したところ、AD で低下した空間学習機能を改善することが初めて明らかになった。これを踏まえ運動と AX の併用効果の一部を報告する。

低強度運動とアスタキサンチン摂取による海馬機能の向上効果



213. アルツハイマー病の次世代運動－栄養療法の開発

征矢　英昭

筑波大学 体育系 ヒューマン・ハイ・パフォーマンス先端研究センター
運動生化学・神経内分泌学研究室

Key words：低強度運動，アスタキサンチン，海馬機能，神経新生，レプチン

緒　言

学習・記憶を司る海馬は、生涯を通じて神経が新生される（神経新生）など、脳の中でも可塑性に富んだ部位であるが、その反面、アルツハイマー病（Alzheimer's disease：AD）といった神経変性を伴う疾患への脆弱性が高く、その機能低下を招く。AD の原因は、老人斑（アミロイドβの凝集）と神経原繊維変化（異常リン酸化タウ蛋白）と想定されており、これはとりわけ、学習・記憶能をつかさどる脳部位である海馬の可塑性（神経新生）を低下させ、認知機能障害を惹起する。創薬ではこの点が標的となるがいまだ決着をみない。これは、AD 治療を薬物だけに頼らず、生活習慣を改善する療法を推奨する根拠となる。近年、アメリカ国立衛生研究所（NIH）の発表により、運動や食事などの健康な生活習慣によって、AD 改善の有効性が示唆されており、薬物に頼らない治療法の開発が注目を集めている。その中でも、海馬可塑性を高める運動や機能性食品の単独あるいは併用効果が注目されている。

近年、運動と天然サプリメント（脳機能改善食品）の併用により、それぞれの単独効果の合算を上回る効果を発揮することが知られるが、その相加・相乗効果の実態や作用機序はほとんど不明である。我々は、成体海馬神経新生（Adult hippocampal neurogenesis）及び記憶能を向上させる至適運動条件として低強度運動（Mild exercise：ME）の有効性を明らかにした［1，2］。更に最近では、海馬機能を高める機能性食品として、エビやカニに含まれる天然カロテノイドであるアスタキサンチン（Astaxanthin：AX）摂取の効果を見出した［3］。本研究では、ME による海馬機能の向上効果が、機能性食品としての AX の付加的摂取で増強される効果、並びに、その際の分子神経基盤として神経保護作用を持つレプチン（Leptin：LEP）の関与を解明する。その上で、AD 患者に近い脳病理像を示す次世代型の AD マウスを用いて［4］、運動と AX 摂取の併用効果を検討するが、今回はまず 6 週間の AX 摂取効果について報告する。

方　法

被験動物には 12 週齢の C57BL/6J 系雄性マウス（WT）と *LEP* 欠損遺伝性肥満マウス（*ob/ob*）を用いた。WT マウスは 4 週間の ME もしくは非運動に加えて 0.5%の AX 混餌摂取もしくはプラセボ摂取（PL）を課す 4 群に分けた（CON 群、ME 群、AX 群、ME＋AX 群）。*ob/ob* マウスは 4 週間の ME もしくは非運動に加えて 0.5%の AX 混餌摂取もしくはプラセボ摂取を課す 3 群に分けた（*ob/ob*-CON 群、*ob/ob*-ME 群、*ob/ob*-ME＋AX 群）。最終週に、モリス水迷路を用いて空間学習記憶能を評価した。海馬神経新生を評価するため、チミジンのアナログ分子として細胞周期の S 期に細胞核へ取り込まれる BrdU（bromodeoxyuridine）を ME と AX 摂取の開始前 3 日間にすべてのマウスに対して腹腔内投与した。海馬歯状回を含む前額断切片を作製し、免疫組織化学染色法により増殖細胞マーカーである Ki67 と新生成熟細胞マーカーである BrdU／NeuN を用いて免疫組織化学染色を行った。血漿 LEP の測定には、Mouse／Rat Leptin Quantikine ELISA Immunoassay Kit（SMOB00）を用いて行った。海馬 LEP タンパク質は、ウエスタンブロッティング法を用いて測定した。*ob/ob* マウスを用いたレスキュー実験では、ME と 0.5%の AX 混餌摂の取開始前に LEP（recombinant mouse leptin、0.1μg/d）を浸透圧ポンプシステム（A micro-osmotic pump、Alzet Model 1004）を用いて脳室内に投与した。最終週に、空間学習記憶能を評価した。

AD マウスを用いた実験では、9 ヶ月齢の C57BL/6J 系雄性マウスを WT マウスとして用い、AD モデルとして理研 RBC から提供された 9 ヶ月齢の $APP^{NL\text{-}G\text{-}F}$ 系雄性マウスを用いた［4］。WT-プラセボパウダー（PL）群、AD-PL 群 、AD-AX 群（0.5%の AX 濃度）の 3 群を設けて 6 週間の摂取実験を行った。AX 摂取期間の最後の 6 日間に、モリス水迷路テストを行い、空間学習記憶能を評価した。場所学習逃避訓練は、1 日に 4 回の試行を 5 日間連続で行った。初日は旗を設置したプラットフォーム（Visible platform）を、試行毎に移動させて実施した。2 日目以降は旗を外し（Hidden platform）、プラットフォームを 1 ヶ所に固定して行った。最後の場所学習逃避訓練の翌日に、プールからプラットフォームを取り除きプローブテストを 1 回行った。マウスを水迷路の中央から投入し、60 秒間遊泳させた。

結 果

1. ME と AX による空間認知機能と海馬神経新生の向上効果

場所学習逃避訓練時の逃避時間において（図 1A）、ME 群と ME＋AX 群は学習 3 日目に有意な短縮が認められ、AX 群は 4 日目に有意な短縮が認められた。プラットフォームがあった四分円内を遊泳した累積時間の総遊泳時間に対する割合は（図 1B）、CON 群に比較して ME 群と ME＋AX 群で有意に高かった。更に、ME＋AX 群は AX 群に比較して、総遊泳時間の延長も確認された。

細胞増殖マーカーである Ki67 陽性細胞数と新生成熟細胞マーカーである BrdU／NeuN 陽性細胞数は、ME 群と AX 群は CON 群に比べて有意な増加が、更に、ME 群及び AX 群と比較してもそれぞれ有意な増加が認められた（図 1C）。これらの結果から ME と AX 摂取の併用が海馬神経新生および記憶能を相乗的に高めることが初めて明らかとなった［7］。

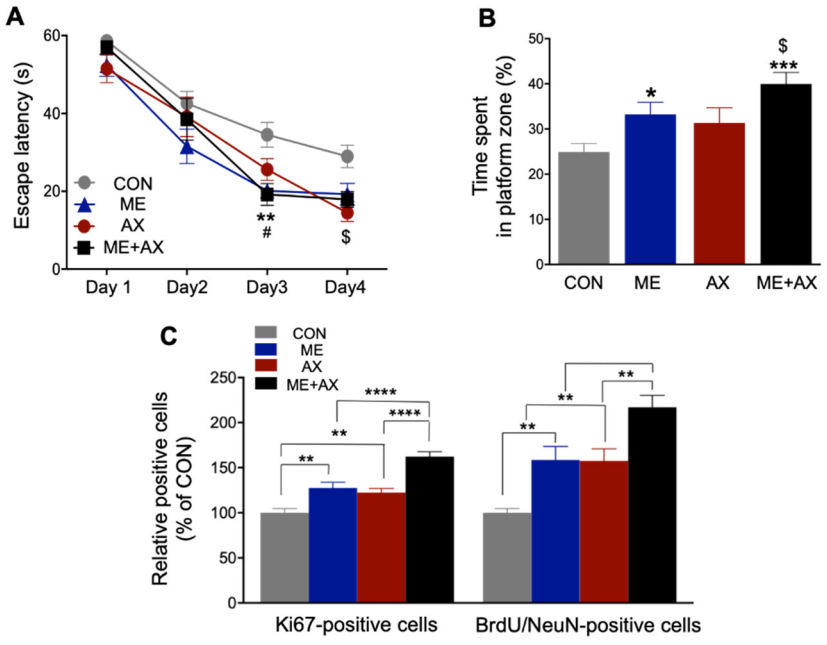


図 1. モリス水迷路による空間学習記憶能の評価

A) 場所学習逃避訓練により空間学習能の評価。統計処理は、Repeated two-way ANOVA。
（$^{\#}P< 0.05$、ME vs. CON、$^{**}P< 0.01$、ME+AX vs. CON、$^{\$}P< 0.05$、AX vs. CON）

B) プローブテストにより空間記憶能の評価。統計処理は、One-way ANOVA。
（$^{*}P< 0.05$、$^{***}P< 0.001$、vs. CON、$^{\$}P< 0.05$、vs. AX）

2. ME と AX 摂取による海馬機能改善の分子機構の検討；海馬レプチンの関与

DNAマイクロアレイと最先端の機能的解析手法であるIPA解析を用いて、MEとAX摂取の併用が海馬機能を相乗的に高める分子機構を推定した結果（図2A）、MEで高まった*LEP*遺伝子発現（4.18 fold）がAX摂取の併用で更に増強された（6.64 fold）。LEPのタンパク質発現では（図2B）、運動とAXの主効果が認められ、ME＋AX群におけるLEPタンパク質発現がCON群、ME群、AX群に比較して有意に増加した。更に、空間記憶能力と海馬LEPの間に正の相関が認められた（図2C）。一方、血漿LEP濃度は、いずれの群においても統計的な有意差は認められなかった（図2D）。更に、空間記憶能力とLEP濃度間にも有意な相関が認められなかった（図2E）。

A

Gene name	Description	Fold change ME	Fold change ME+AX
	UP-REGULATED GENES		
Klra4	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 4	37.17	48.44
IL17F	interleukin 17F	5.33	8.14
ABHD3	α/β-hydrolase domain containing 3	6.76	7.5
LEP	**leptin**	**4.18**	**6.64**
SPI1	Spi-1 proto-oncogene	2.97	5.61
HSD3B1	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	2.79	4.85
CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/ Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	4.08	4.63
SMAD1	SMAD family member 1	3.76	4.57
TP53BP2	tumor protein p53 binding protein 2	4.77	4.5
MBTPS1	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	2.84	4.46
	DOWN-REGULATED GENES		
VDR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	-3.03	-4.76
TRH	thyrotropin-releasing hormone	-2.7	-2.08
CXADR	coxsackie virus and adenovirus receptor	-1.82	-1.82

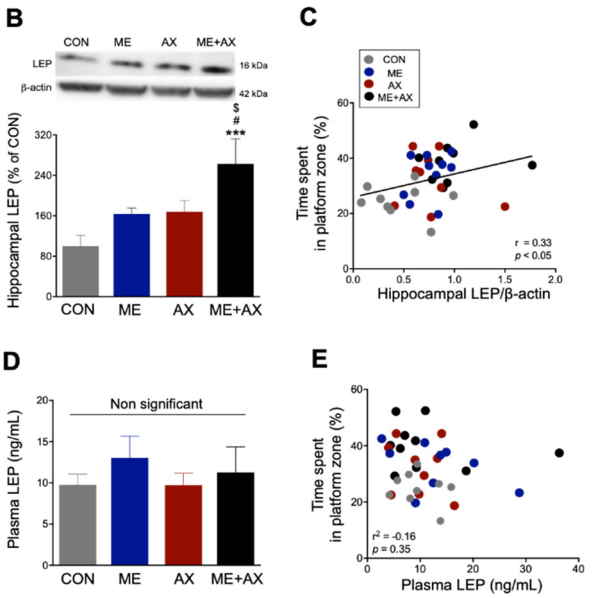


図 2. 海馬 LEP の関与

A）ME と ME＋AX による発現変動遺伝子リスト。

B）海馬 LEP タンパク質。$^{***}P$< 0.001 vs. CON; $^{\#}P$< 0.05 vs. ME; $^{\$}P$<0.05 vs. AX。

C）空間記憶能の成績と海馬 LEP タンパク質の相関関係（P< 0.05）。

D）血漿の LEP 濃度。

E）空間記憶能の成績と血漿 LEP 濃度の相関関係（P= 0.35）。

B）、D）の統計処理は、One-way ANOVA。C）、E）の統計処理は、Pearson's Correlation Analysis。

3. *LEP*欠損遺伝性肥満マウスにおける ME と AX の併用効果

*LEP*を欠損する遺伝性肥満マウス（*ob/ob*）に対して、MEのみとME＋AXが空間学習記憶機能に及ぼす影響を検討した。全ての群において学習を重ねるごとに逃避時間は短縮に有意な短縮が見られなかった（図3A）。四分円での遊泳時間は、MEで有意に増加しており、ME＋AXで上昇傾向が確認された（図3B）。プラットフォームのCrossing数は、両軍で有意な増加が見られた（図3C）。しかし、WTマウスと異なり、ME群とME＋AX群間で統計的な有意差は認められなかった。また、*ob/ob*マウスに慢性的に脳内LEP投与を行う実験を通じて、脳内LEPがMEとAXの併用で見られる海馬機能の相乗的増強効果への関与を検討したところ、全ての群において学習を重ねるごとに逃避時間に有意な短縮は見られないが（図3D）、四分円での遊泳時間は、人工的脳脊髄液の投与群（*ob/ob*-ME＋AX-aCSF）と比べて、LEP投与群（*ob/ob*-ME＋AX-LEP）が有意に増加した（図3E）。これらの結果から、*ob/ob*マウスにおいてMEとAXの併用により消失した海馬機能向上の相乗的増強効果は脳内の慢性的なLEP投与でレスキューされることが明らかとなった。

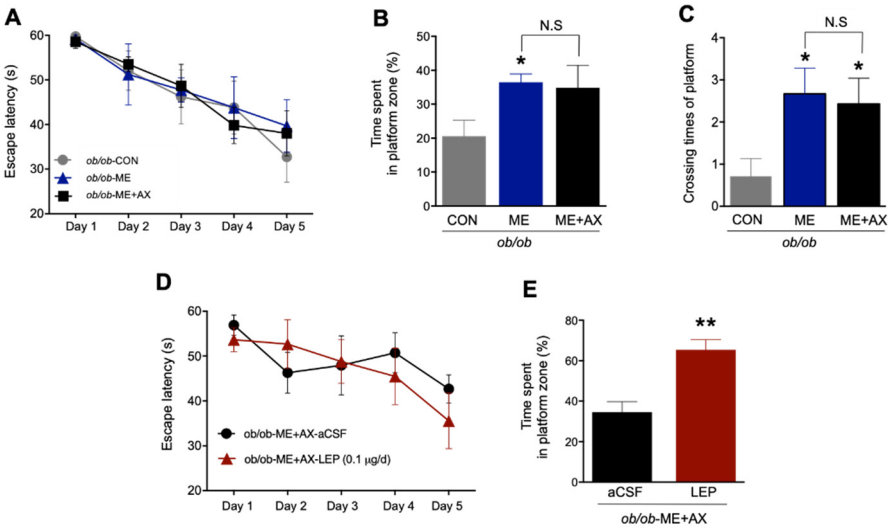


図 3. *LEP* 欠損遺伝性肥満マウスにおける ME と AX の併用、脳内 LEP 投与による海馬機能の向上効果

A、D） 場所学習逃避訓練により空間学習能の評価。

B、C、E）プローブテストにより空間記憶能の評価。$^{*}P < 0.05$ vs. *ob/ob*-CON。$^{**}P < 0.01$ vs. *ob/ob*-ME+AX-aCSF。N.S, Non significant。

B)、C）の統計処理は、One-way ANOVA。E）の統計処理は、Unpaired t テスト。

4. AD マウスにおける AX 摂取による海馬機能改善効果

場所学習逃避訓練における AD-PL 群の逃避時間は WT-PL 群と比較し 3 日目において有意に長いことから（図 4A）、AD モデルマウスの学習能低下が確認された。また、AD-AX 群の逃避時間は AD-PL 群と比較し 2 日目と 3 日目で有意に短かった（図 4A）。AD-AX 群の逃避距離は、AD-PL 群と比較し 3 日目で有意に短かった（図 4B）一方、記憶能を評価するプローブテストでは、プラットフォームのあった四分円での遊泳時間（図 4C）、及びプラットフォームの Crossing 数（図 4D）において、いずれも群間に統計的な有意差は認められなかった。

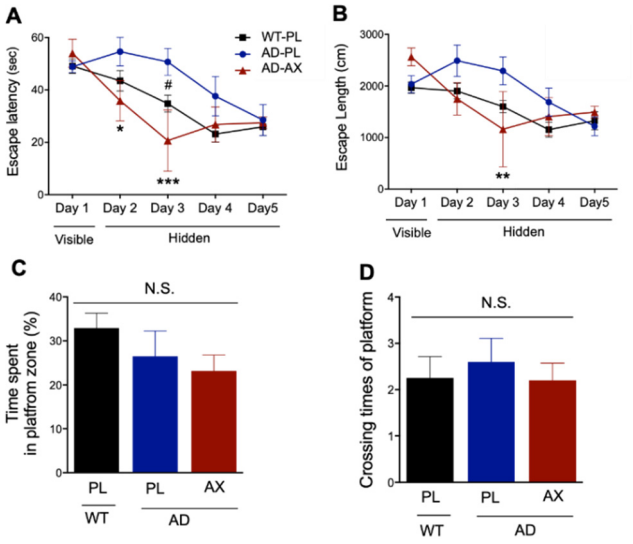


図 4. AD マウスにおける AX 摂取による空間学習記憶能

A、B）場所学習逃避訓練により空間学習能の評価。統計処理は、Repeated two-way ANOVA 。

$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$、$^{***}P < 0.001$、AD-AX vs. AD-PL、$^{\#}P < 0.05$、AD-PL vs. WT-PL。

C、D）プローブテストにより空間記憶能の評価。統計処理は、One-way ANOVA。N.S, Non significant。

考　察

本研究では、4 週間の ME と AX 摂取の併用が海馬機能を相乗的に増強すること、更にその脳内機序として神経保護作用を持つ海馬由来 LEP が重要な役割を果たすことを明らかにした。その上で、そうした相乗効果が AD モデルマウスでどう奏功するかをみるため、まずは 6 週間の AX 摂取効果を検討し、認知機能低下の回復の一部が見られることがわかり、今後、運動との併用効果をみる必然性を確認した。

これまでの AD 治療法として、アミロイドβの産生を根本的に抑制する薬物開発がなされてきたものの、未だ決着をみない。AD 病態の解明に基づく新規治療法の開発へのニーズは益々高まっている。AD の進行や悪化は、海馬などで神経細胞の変性や神経血管機能不全を伴うことから、これらが AD 治療の標的になると想定される。海馬では生涯にわたって新たな神経細胞（神経新生）が産生されており、これらは豊かな環境、とりわけ運動により高まることが多くの先行研究から明らかになり、運動が AD の病態改善や予防法として有望視されている。我々は、最近、強い抗酸化作用を持つ AX 摂取が AD で低下した認知機能を改善する効果と、ME による海馬神経新生ならびに記憶能を更に相乗的に増強する強い効果を見出した［5］。更に、その効果の裏に、脳由来 LEP が関与することも明らかにした。もしこうした相乗効果が AD でも奏功すれば、これまでに無い全く新しい AD 治療法と成り得る可能性がある。

LEP は脂肪組織由来のホルモンとして知られ、視床下部への作用による摂食抑制とエネルギー消費亢進をもたらす点からその抗肥満効果はよく知られている。しかし、最近、海馬内へのレプチン投与が神経新生を促進し［6］、記憶能の維持・改善に重要な役割を果たすことも明らかになり、認知症への新たな対策としての効能に注目が集まっている［7］。事実、外因性のレプチン投与はアミロイドβの蓄積を軽減することで認知機能低下などの症状を改善する［9］。ヒトの実験でも、血漿レプチン濃度が高いと AD の発症リスクが低く、高齢化の指標となる大脳容積も大きくなることが判明している［8］。一方、我々の知見は、そうした LEP 外因性投与効果を、日常の運動と食行動の変容を通じて自然に誘導できる点で、より生理的な療法として効果的である。本研究では、AD 動物の飼育環境にトラブルが生じ、当初の計画通り運動と AX の併用効果を検証するには至らなかったが、得られた成果はそうした併用効果を調べる意義を強く担保するものである。おそらく、AD における認知機能の低下に低強度運動と AX 摂取が海馬レプチンを高めることで神経新生を促進し認知機能の改善に貢献する可能性が期待される。

今後の展望としては、AD 患者に近い脳病理像を示す次世代型の AD マウスを用いて［4］、運動による海馬機能の向上効果が AX を脳機能改善食品として付加的に摂取することで果たして増強されるかどうか、更にその際のその分子機構を解明する。AD に伴う認知機能低下や神経変性疾患などの症状は、ヒトのクオリティー・オブ・ライフ（QOL）を著しく低下させる要因としても報告されている［10］。そのため、本研究で検討する神経変性ならびに認知機能低下への ME と AX 摂取効果は、AD を治療・予防する新たな次世代運動―栄養方法として提唱できる可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、筑波大学大学院体育系運動生化学研究室の荒井サブリナ博士及び Yook Jang Soo 博士、並びに理化学研究所神経老化制御チームの西道隆臣博士である。この場を借りて研究協力に心から感謝の意を表する。

文　献

1) Okamoto M et al. Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. 2012; 109(32): 13100–13105. DOI: 10.1073/pnas.1210023109
2) Inoue K et al. Long-term mild exercise training enhances hippocampus-dependent. Int J Sports Med. 2015; 36(4): 280-285. DOI: 10.1055/s-0034-1390465
3) Yook et al. Astaxanthin supplementation enhances adult hippocampal neurogenesis and spatial memory in mice. Mol Nutr Food Res. 2016; 60(3): 589-599. DOI: 10.1002/mnfr.201500634
4) Saito T et al. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. Nat Neurosci. 2014; 17(5): 661-663. DOI: 10.1038/nn.3697
5) Yook JS et al. Leptin in hippocampus mediates benefits of mild exercise by an antioxidant on neurogenesis and memory. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019; 116(22): 10988-10993. DOI: 10.1073/pnas.1815197116
6) Garza JC et al. Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3ß/ß-catenin signaling. Mol Psychiatry. 2012; 17(8): 790-808. DOI: 10.1038/mp.2011.161
7) Harvey J. Leptin regulation of neuronal excitability and cognitive function. Curr Opin Pharmacol. 2007; 7(6): 643-647. DOI: 10.1016/j.coph.2007.10.006
8) Lieb W et al. Association of plasma leptin levels with incident Alzheimer disease and MRI measures of brain aging. JAMA. 2009; 302(23): 2565-272. DOI: 10.1001/jama.2009.1836
9) Pérez-González R et al. Leptin gene therapy attenuates neuronal damages evoked by amyloid-ß and rescues memory deficits in APP/PS1 mice. Gene Ther. 2014; 21(3): 298-308. DOI: 10.1038/gt.2013.85
10) Conde-Sala JL et al. Discrepancies regarding the quality of life of patients with Alzheimer's disease: a three-year longitudinal study. J Alzheimers Dis. 2014; 39: 511–525. DOI: 10.3233/JAD-131286