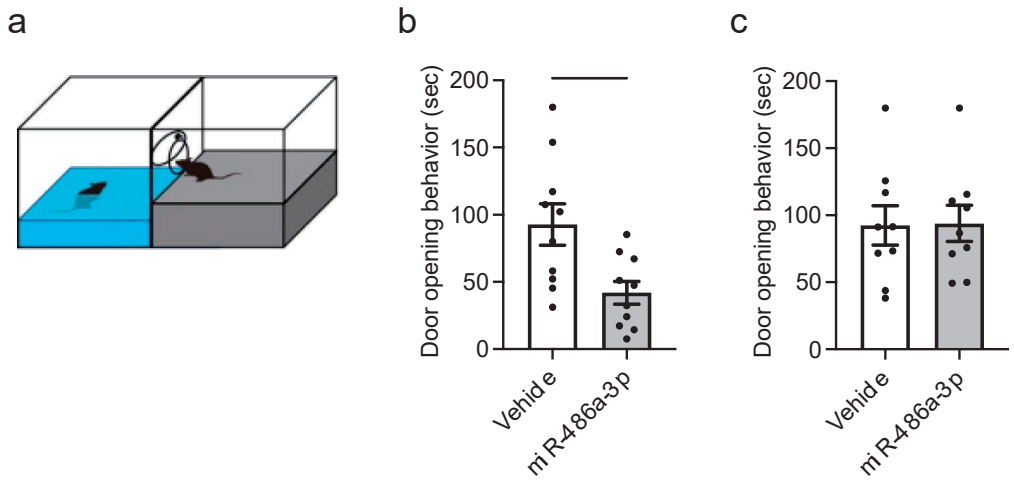
106　共感性を高める軽運動効果を模倣するmiRNAの探索	島　孟留

【目的】他者との関係構築・円滑化において、情動理解に関わる機能である「共感性」が不可欠である。これまでに、共感性を高める分子としてオキシトシンが想定されているが、その臨床応用には課題が残っている。近年、脳由来神経栄養因子（BDNF）が、オキシトシンと同様に共感性と関連することや、脳内の BDNF 発現を高めるような習慣的な軽運動が共感性を高めることが示された。特に、この軽運動を通じた共感性の向上に伴い島皮質内で高まる miR-486a-3p は、共感性の指標として評価された救助行動と有意な相関関係を示し、BDNF 発現の制御に関わりうる。そこで本研究では、miR-486a-3p mimic の腹腔もしくは島皮質局所への慢性的な投与が、マウスの共感性の指標となる救助行動の表出に及ぼす影響を評価し、miR-486a-3p が軽運動効果を模倣するかどうか検討する。

【方法】8 週齢の C57BL/6J マウスを、1 週間の予備飼育後に miR-486a-3p mimic 投与群と溶媒投与群に二分した。miR-486a-3p mimic もしくは溶媒を、腹腔内（8.0 nmol/kg B.W.、1 回／日）もしくは島皮質局所（0.8 nM、0.5 μ L/h）に 2 週間慢性的に投与した。その後、救助行動試験（下図 a）を全てのマウスに課した。

【結果】2 週間の miR-486a-3p mimic 腹腔内投与により、健康なマウスの救助行動の表出が有意に早まった（$p<0.01$）（下図 b）。一方で、島皮質局所への 2 週間の慢性的な miR-486a-3p mimic 投与は、マウスの救助行動の表出に変化をもたらさなかった（$p=0.945$）（下図 c）。

miR-486a-3p 投与による救助行動の変化



106. 共感性を高める軽運動効果を模倣する miRNA の探索

島　孟留

群馬大学 共同教育学部 保健体育講座

Key words：救助行動，miRNA，運動擬似効果

緒　言

現代社会でのいじめやハラスメントの発生に、解決の兆しが見えない。攻撃的な態度は、他者の情動理解に重要な「共感性」の低下によることから［1］、いじめやハラスメント問題は、現代の人々の共感性の欠如が原因と捉えられる。また共感性は、自閉スペクトラム症の主要な症状としても関わることから、多様な人々の well-being の達成に共感性を維持・改善させる手立ての開発が必要だといえる。

これまでに、共感性に関わる分子としてオキシトシンが想定されており、島皮質の神経可塑性を高めて共感性を向上させる可能性が報告されている［2］。一方で、オキシトシンは血液脳関門の通過が困難である。この解決方法として近年、経鼻投与による脳への送達が試みられ、その効果が示されつつあるものの、共感性を高める手立てとしては未だ確立されていない［3］。そのため、オキシトシンに代わる分子機構を見出すことができれば、共感性を制御する画期的な処方開発の礎になると考えられる。

近年、神経可塑性を高める神経ペプチドである脳由来神経栄養因子（BDNF）が、オキシトシンと同様に共感性と関連することが示された［4］。歩行運動のような軽運動は、脳内の BDNF 発現を高める上で有効であることから、私どもは同様の運動が共感性に及ぼす影響を検討してきた。その結果、習慣的な軽運動でヒト並びに小動物の共感性が高まることを見出した［5, 6］。さらに健康なマウスを用いて、習慣的な軽運動を通じた共感性の向上に伴い島皮質内の Bdnf mRNA 発現量が高まること、51 種の miRNA 発現が島皮質内で有意に変化することを見出した［6］。なかでも、軽運動で高まった miR-486a-3p は、共感性の指標として評価された救助行動と有意な相関関係を示し、BDNF 発現の制御に関わりうることから、共感性を高める軽運動の分子機構として想定されるが、その実態は不明である。

そこで本研究では、miR-486a-3p mimic の腹腔もしくは島皮質局所への慢性的な投与が、マウスの共感性の指標となる救助行動の表出に及ぼす影響を評価し、miR-486a-3p が軽運動効果を模倣するかどうか検討する。

方　法

1. 実験動物

本研究には、8 週齢の C57BL/6J マウス（日本 SLC 株式会社）を用いた。飼育環境を 22～24℃に保つとともに、8:00～20:00 を明期とする 12 時間の明暗サイクルに調整した。マウスに Rodent Diet CE-2（日本クレア株式会社）と蒸留水を自由に摂取させ、飼育した。なお本研究は、群馬大学動物実験委員会の承認を得て行われた（approval No. 22-012）。

2. 腹腔 miRNA 投与

1 週間の予備飼育後、マウスを miR-486a-3p mimic 投与群と溶媒投与群に二分した。溶媒として、生理食塩水（大塚製薬株式会社）を使用した。miR-486a-3p mimic 投与群のマウスへは、1 日 1 回、8.0 nmol/kg B.W. の mmu-miR-486a-3p mimic（株式会社ジーンデザイン）を投与した。2 週間連続して miR-486a-3p mimic もしく

は生理食塩水を投与した後、各マウスに救助行動試験を課した。

3. 島皮質局所 miRNA 投与

1 週間の予備飼育後、マウスを miR-486a-3p mimic 投与群と溶媒投与群に二分した。溶媒として、人工脳脊髄液（aCSF、Tocris Bioscience、UK）を使用した。イソフルラン吸入麻酔下で、マウスの両側の島皮質にカテーテルを留置し（AP＝＋0.30 mm、ML±3.50 mm、DV＝－3.20 mm from bregma）、浸透圧ポンプ（Alzet 2002、室町機械株式会社）を用いて、mmu-miR-486a-3p mimic（0.8 nM、0.5 μL/h、株式会社ジーンデザイン）もしくは aCSF（0.5 μL/h）を慢性的に投与した。2 週間の慢性投与後、各マウスに救助行動試験を課した。

4. 救助行動試験

2 週間の miR-486a-3p mimic もしくは溶媒投与後、先行研究 [6] に基づいて、マウスの救助行動を評価した。安全地帯（図 1a 右側）にいるマウスが、回転ドア（図 1a 中央）を開けることで、水で満たされたゾーン（図 1a 左側）にいるマウスを安全地帯へ逃れさせる試験を 1 回／日、5 日間課した。1 回あたり最大 3 分間（180 秒）とし、3 分間経過しても回転ドアを開けなければ、その時点でその日の試験を終了とした。試験 5 日目のドアを開けるまでの時間が短いほど、共感性が高いと評価した。なお、水浸ストレス経験は、この共感性試験のドア開け行動を早期に表出させることを踏まえて［7]、投与を受けたマウスとは別のマウス（同ケージ内で飼育）を、水で満たされたゾーンに配置した。

5. 免疫組織化学染色

5 日目の救助行動試験が終了した 2 時間後にマウスを屠殺し、半脳を 4%PFA に浸潤させ固定した。その後、スクロース／リン酸緩衝液に浸潤させて脱水させた脳で、凍結前額切片を作製した。前額切片を 1.0% Triton X-100／リン酸緩衝液（PB-T）で洗浄した後、2.0%正常ロバ血清／PB-T に 30 分間インキュベーションさせた。続いて、1 次抗体（anti-c-Fos [1 : 500、GTX60996 ; GeneTex Inc.、USA] と anti-Oxytocin [1 : 500、ab212193 ; Abcam plc.、UK] もしくは anti-Orexin [1 : 500、#16743 ; Cell Signaling Technology Inc.、USA]）を混合した 2.0%正常ロバ血清／PB-T に前額切片を 2 日間インキュベーションさせた。洗浄後、2 次抗体（Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse [1 : 500、#4408 ; Cell Signaling Technology Inc.、USA] と Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit [1 : 500、#8889 ; Cell Signaling Technology Inc.、USA]）を混合した 2.0%正常ロバ血清／PB-T に前額切片を一晩インキュベーションさせた。洗浄した前額切片をスライドガラス上にマウント・封入し、蛍光顕微鏡（BZ-9000、株式会社キーエンス）で撮影した。

6. 統計解析

データを平均値±標準誤差で示し、統計解析には Prism version 9（有限会社エムデーエフ）を用いた。解析にあたってまず、データの分布の正規性を確認した上で、対応のない t 検定で miR-486a-3p mimic 投与群と溶媒投与群を比較した。なお、有意水準を 5%未満に設定した。

結果および考察

1. miR-486a-3p mimic 投与が共感性に及ぼす効果

1 日 1 回の miR-486a-3p mimic の腹腔内投与を 2 週間続けたところ、健康なマウスの救助行動の表出が有意に早まった（$p<0.01$）（図 1b）。これまで、島皮質の網羅的な解析から、軽運動に伴って 26 種の miRNA 発現が有意に高まることが明らかとなっていたものの、運動効果をもたらす miRNA の特定には至っていなかった[6]。本研究により、miR-486a-3p の腹腔内投与のみで共感性が高まったことから、miR-486a-3p が運動効果を成す miRNA である可能性が示された。miR-486a-3p は、炎症反応の惹起や神経変性疾患の病理に関わる Nod-like

receptor family pyrin domain containing 3（NLRP3）の発現を抑制する［8］。中枢での NLRP3 発現の抑制を通じて、miR-486a-3p が BDNF 発現の増加に寄与することが想定されるため、今後、救助行動の表出に関わる脳部位（島皮質、視床下部、扁桃体など）で、これらを評価する必要がある。

先行研究において、島皮質 miR-486a-3p 発現と救助行動の表出の有意な相関関係が示されていたことから［6］、続いて、島皮質局所への miR-486a-3p 投与が共感性に及ぼす影響を検討した。しかしながら、島皮質局所への 2 週間の慢性的な miR-486a-3p mimic 投与は、マウスの救助行動の表出に変化をもたらさなかった（p=0.945）（図 1c）。そのため、miR-486a-3p mimic の腹腔内投与でみられた共感性向上効果（図 1b）は、島皮質以外の脳部位へ作用することでもたらされる可能性が示唆された。

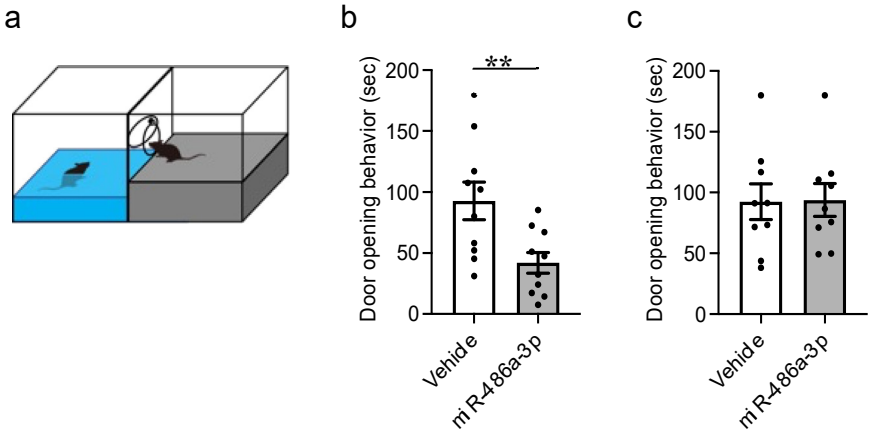


図 1.　miR-486a-3p mimic 投与による救助行動の変化

a）救助行動試験装置の概観。安全地帯（右側）にいるマウスが、回転ドア（中央）を開けることで、水で満たされたゾーン（左側）にいるマウスを安全地帯へ逃れさせる（救出する）試験。

b）腹腔内への miR-486a-3p mimic 投与が救助行動の表出に及ぼす効果（Vehicle：n＝10、miR-486a-3p：n＝10）

c）島皮質局所への miR-486a-3p mimic 投与が救助行動の表出に及ぼす効果（Vehicle：n＝9、miR-486a-3p：n＝9）

Vehicle：溶媒投与群、miR-486a-3p：mmu-miR-486a-3p mimic 投与群。平均値±標準誤差、プロットは各マウスの結果を示している。**p<0.01。

2. miR-486a-3p mimic 投与が救助行動試験に伴う神経活性に及ぼす効果

これまでに、後腹側視床下部におけるオキシトシン神経の活性が共感行動に関与［9］、外側視床下部におけるオレキシン神経の活性が攻撃的な行動に関与する可能性が示唆されている［10］。現在、miR-486a-3p mimic の腹腔内投与がこれらの活性に及ぼす影響を評価中である。

謝　辞

本研究は、上原記念生命科学財団の研究助成を受けて行われた。また、本研究の遂行に際して協力いただいた、群馬大学共同教育学部保健体育講座運動生理学研究室の方々に感謝申し上げる。

文　献

1) Gandhi AU, Dawood S, Schroder HS. Empathy Mind-Set Moderates the Association Between Low Empathy and Social Aggression. J Interpers Violence. 2021 Feb;36(3-4):NP1679-1697NP. PMID: 29284331 DOI: 10.1177/0886260517747604

2) Rogers-Carter MM, Varela JA, Gribbons KB, Pierce AF, McGoey MT, Ritchey M, Christianson JP. Insular cortex mediates approach and avoidance responses to social affective stimuli. Nat Neurosci. 2018 Mar;21(3):404-414. PMID: 29379116 DOI: 10.1038/s41593-018-0071-y

3) Keech B, Crowe S, Hocking DR. Intranasal oxytocin, social cognition and neurodevelopmental disorders: A meta-analysis. Psychoneuroendocrinology. 2018 Jan;87:9-19. PMID: 29032324 DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.09.022

4) Laviola G, Zoratto F, Ingiosi D, Carito V, Huzard D, Fiore M, Macrì S, Kavushansky A. Low empathy-like behaviour in male mice associates with impaired sociability, emotional memory, physiological stress reactivity and variations in neurobiological regulations. PLoS One. 2017 Dec 4;12(12):e0188907. PMID: 29200428 DOI: 10.1371/journal.pone.0188907

5) Shima T, Jesmin S, Nakao H, Tai K, Shimofure T, Arai Y, Kiyama K, Onizawa Y. Small Amounts of Physical Activity During the COVID-19 Pandemic May Contribute to Improve Empathy in Young Adults: An Observational Study. Asia Pac J Public Health. 2021 Jul;33(5):635-637. PMID: 34000841 DOI: 10.1177/10105395211016333

6) Shima T, Kawabata-Iwakawa R, Onishi H, Jesmin S, Yoshikawa T. Four weeks of light-intensity exercise enhances empathic behavior in mice: The possible involvement of BDNF. Brain Res. 2022 Jul 15;1787:147920. PMID: 35452659 DOI: 10.1016/j.brainres.2022.147920

7) Sato N, Tan L, Tate K, Okada M. Rats demonstrate helping behavior toward a soaked conspecific. Anim Cogn. 2015 Sep;18(5):1039-47. PMID: 25964095 DOI: 10.1007/s10071-015-0872-2

8) Zhang M, Zhang M, Wang W, Chen H, Wang X, Zhao K, Li Z, Xu J, Tong F. Dehydroepiandrosterone inhibits vascular proliferation and inflammation by modulating the miR-486a-3p/NLRP3 axis. Am J Transl Res. 2022 Sep 15;14(9):6123-6136. PMID: 36247250

9) Li LF, Yuan W, He ZX, Wang LM, Jing XY, Zhang J, Yang Y, Guo QQ, Zhang XN, Cai WQ, Hou WJ, Jia R, Tai FD. Involvement of oxytocin and GABA in consolation behavior elicited by socially defeated individuals in mandarin voles. Psychoneuroendocrinology. 2019 May;103:14-24. PMID: 30605804 DOI: 10.1016/j.psyneuen.2018.12.238

10) Flanigan ME, Aleyasin H, Li L, Burnett CJ, Chan KL, LeClair KB, Lucas EK, Matikainen-Ankney B, Durand-de Cuttoli R, Takahashi A, Menard C, Pfau ML, Golden SA, Bouchard S, Calipari ES, Nestler EJ, DiLeone RJ, Yamanaka A, Huntley GW, Clem RL, Russo SJ. Orexin signaling in GABAergic lateral habenula neurons modulates aggressive behavior in male mice. Nat Neurosci. 2020 May;23(5):638-650. PMID: 32284606 DOI: 10.1038/s41593-020-0617-7