

加齢に伴う学習・記憶機能低下に及ぼすトレハロース摂取の影響

本 田 陽 子

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所
老化制御研究チーム健康長寿ゲノム探索 客員研究員

緒 言

アルツハイマー型認知症など神経変性疾患の高齢者での罹患が急増しており深刻な社会問題になっている。これらは一度、罹患すると現在では医学的に完治させることは容易ではない。その発症に未解明で制御が難しい「老化」の過程に関わることが完治の方法を見出せない大きな理由と考えられる。老化を抑制する化合物を見出すことができれば、これら的高齢期に発症する神経変性疾患を大きく予防できる可能性がある。現在、免疫抑制薬であるラパマイシンがマウスの老化を抑制することが報告されているが¹⁾、白内障や腎臓障害など多くの副作用が知られ、高齢期の神経変性疾患の予防薬として使用するのには難しい。

そこで我々は、老化を抑制する化合物のヒントを得るために、寿命が1ヵ月と短い線虫を用いた遺伝子解析により老化抑制に関わる遺伝子を探索した。その結果、老化抑制遺伝子としてトレハロース合成酵素遺伝子を見出した。この合成酵素の生成物であるトレハロースを線虫に与えると老化が抑制されることを証明した²⁾。

トレハロースはグルコースの二糖で、細胞内に蓄積した変性・凝集タンパク質などを分解・除去するオートファジー(自己食)系を活性化することが知られている^{3,5,6)}。老化に伴って変性・凝集タンパク質が細胞内に蓄積することが知られており、トレハロースはオートファジーを活性化させて、これらの分解・除去を促進する可能性がある。

トレハロースの摂取がヒトでも老化を抑制し、高齢期の神経変性疾患の予防に有効である可能性を探るため、マウスで加齢に伴う学習・記憶機能の低下などの脳障害へのトレハロースの効果を確認した。そこで加齢に伴って学習や記憶能力が顕著に低下し、脳の萎縮が見られるマウスとして知られる老化促進マウスSAMP10を用いて、長期にわたるトレハロースの摂取の、加齢に伴う学習・記憶機能の低下と脳における遺伝子発現変化へ

の影響を研究した。

実験方法

- 1) 実験動物：老化促進マウスSAMP10雄40匹。
- 2) トレハロースの投与：1ヵ月齢よりトレハロースを2%濃度に溶かした塩素2ppm添加、5 μ mフィルターろ過水道水(対照群は同塩素添加水道水のみ)を飲水投与した。
- 3) 飼育条件：餌は放射線6kGy照射、CRF-1(オリエンタル酵母工業(株)製)を自由摂取、紙製床敷「ペーパークリーン」(日本エス・エル・シー製)、明暗サイクル8~20時まで明、20時~翌8時まで暗、飼育室温度22 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度55 \pm 5%、各ケージ5匹で飼育した。
- 4) 学習・記憶機能試験：上記の条件で飼育した17ヵ月齢のSAMP10マウス40匹(トレハロース投与群20匹、対照群20匹)を被検体とした。本試験は①オープンフィールド、②受動的回避学習、③水迷路学習の3課題より構成されており。すべての被検体にこれら3課題をこの順序で与えた。

①オープンフィールド

タイヨー電気株式会社製のマウス用オープンフィールド実験装置を用いた。被検体を放つオープンフィールドは、天井部のない透明アクリル板製の立方体の箱(各辺30cm)であり、防音チャンバー(縦70cm \times 横60cm \times 高さ50cm)内に格納されていた。オープンフィールドの各側面外側、床面から2cmの位置にはそれぞれ2個の赤外線センサーが10cm間隔で内向きに設置されていた。被検体が各側面の2個の赤外線センサーの前方を連続して通過すると移動反応(locomotion)として検出された。さらに向かい合う2側面の床面から4.5cmの位置にもそれぞれ12個の赤外線センサーが2.5cm間隔で内向きに並置され、これらのセンサーの前方を被検体が遮断すると立ち上がり反応(rearing)として検出された。防音チャンバー内部には白色LEDが

設置されており、点灯時の照度は110 luxであった。また防音チャンバー背面部には小型換気扇が取り付けられており、換気を行うと共にその駆動音をマスキングノイズとした。音圧はオープンフィールドの床面中央部で約45 dB (C) であった。すべての被検体に、10分間のセッションを1日1回、3日間連続で与えた。各セッションでは、被検体をオープンフィールドの床面中央部に置いた後、速やかに防音チャンバー閉じて行動測定を開始した。セッションの開始と修了は防音チャンバー内の照明の点灯と消灯により規定した。

②受動的回避学習

タイヨー電気株式会社製のマウス用回避学習実験装置を用いた。実験箱（縦30 cm×横15 cm×高さ15 cm）は側面部と天井部が厚さ5 mmの亚克力板製で、床部は直径3 mmの鉄棒が10 mm間隔で並列された通電可能なグリッド状であった。実験箱内を亚克力板製のギロチンドアによって分けし、暗室と明室を構成した。暗室は側面壁と天井部が黒色、明室は側面壁が白色で天井部が透明であった。明室の天井部には白色LEDが取り付けられており、その照度は明室の床面中央部で約340 luxであった。暗室内の側面床上15 mm、ギロチンドアから50 mmの位置には、被検体の反応検出用の赤外線センサーが設置されていた。

(1) 条件付け (Day1) 被検体を暗室の中へ入れ、10秒間放置したのちにギロチンドアを開け、被検体が暗室へ移動するまでの潜時を測定した。移動から10秒後にグリッド床から電激（140 V、5秒）を1回提示して条件付けを行った。被検体は電激提示終了から10秒間暗室内に放置し、実験装置から取り出した。

(2) 保持テスト (Day2) 条件付けの24時間後に保持テスト（受動的回避テスト）を1試行実施した。条件付け試行と同様に被検体を暗室へ入れて10秒間放置した後にギロチンドアを開き、暗室へ移動するまでの潜時を測定した。被検体が暗室へ移動しても電撃は提示しなかった。被検体が移動しなかった場合は180秒で試行を打ち切り、反応潜時は180秒として記録した。

③水迷路学習

高さ30 cmの設置台上に水平に固定された内径95 cm、高さ35 cmの背の低い円筒形プールを用いた。プラットフォームは直径10 cm、厚さ1 cmの円盤に台座を取り付けたもので、高さは21 cmであった。プラットフォームは円形の水面を均等に4分割した仮想の4分象限の内、特定の区画の中央部に設置した。プラット

フォームの縁とプールの内壁との最短距離は15 cmとした。水位はプラットフォームの表面上約5 mmとした。水は毒性のない水溶性のインクを加えて黒濁させた。水温は25±1℃に維持した。

(1) 獲得訓練 (Days1~5) 全被検体に対し、1日5試行の獲得訓練を5日間連続で与えた。各試行では、被検体をプラットフォームが設置されていない仮想の4分象限いずれかの壁際からランダムな順序で頭を壁面に向けてプールへ投入して水泳させ、プラットフォームに両前肢が接触するまでの時間を逃避潜時として計測した。被検体がプラットフォームにのると10秒間そこに留めた。プールへ投入後60秒以内に被検体がプラットフォームに到達しなかった場合は、実験者が被検体をプラットフォームの上へ誘導し、そこに10秒間留めた。この場合、逃避潜時は60秒として記録した。試行間間隔は30秒とした。

(2) プローブテスト (Day6) 獲得訓練最終日の翌日、プラットフォームを取り去ったプールに被検体を放ち、1分間自由に水泳させるプローブテストを1試行実施した。行動追跡・解析ソフト（株式会社行医研製BeChase3.0）を用いて、プラットフォーム設置象限（ターゲット象限）およびその他の仮想の4分象限それぞれへの滞在時間を測定した。

5) 組織採取：学習・記憶機能試験終了後、被検体は3.5時間の絶食後、全採血を開始し血清を採取した。ネンブタール麻酔下で全採血後、生理食塩水で全身灌流を実施した。灌流後、腎臓（左右）、脳を摘出し、脳は縦方向で分割し、左側（脳は左脳側）はブアン固定、右側（脳は右脳側）は液体窒素で凍結した。

6) 遺伝子発現解析：液体窒素凍結された右脳は、RNeasy mini spin columns, QIAGENを用いてtotal RNAを抽出され、NanoDrop, BioAnalyzerにて品質検査を行われた後、SurePrint G3 Mouse GEマイクロアレイ8×60Kにて解析された。

結 果

1) 記憶・学習機能試験

①オープンフィールド

各群の移動反応得点は3日間の試験期間で減少したが、トレハロース投与による有意な違いは認められなかった（図1a）。立ち上がり反応得点はトレハロース投与群において2日目、3日目において対照群よりも高かった（図1b）。

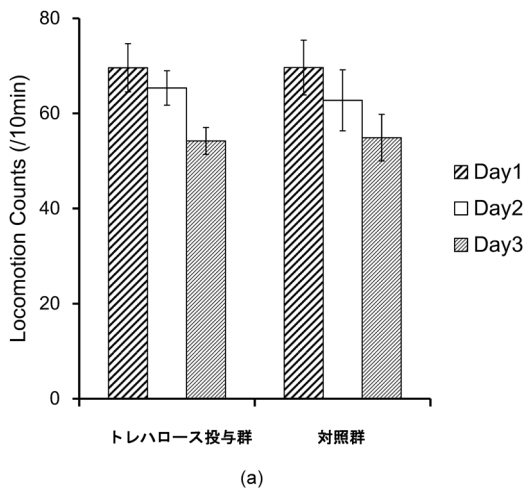


図1a オープンフィールドの結果 (移動)

縦軸は10分間の測定中に赤外線を横切った回数を表す。

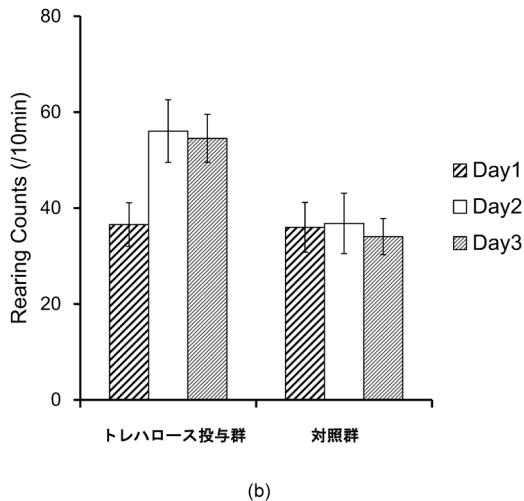


図1b オープンフィールドの結果 (立ち上がり)

縦軸は10分間の測定中に立ち上がった回数を表す。

②受動的回避学習

トレハロース投与群において、条件付けの際の暗室へ移動するまでの潜時は対照群のそれよりも短い傾向があったが、電気ショックを与えられた後の保持テストにおいては、トレハロース投与群の暗室へ移動するまでの潜時は対照群のそれよりも長かった (図2)。

③水迷路学習

1日目から5日目までの獲得訓練において、トレハロース投与群の逃避潜時は対照群のそれと比べて短かった (図3a)。すなわち対照群よりも早い時間でプラットフォームへ到達した。しかし6日目のプローブテストにおいては、トレハロース投与群と対照群との間に有意な違いは認められなかった (図3b)。

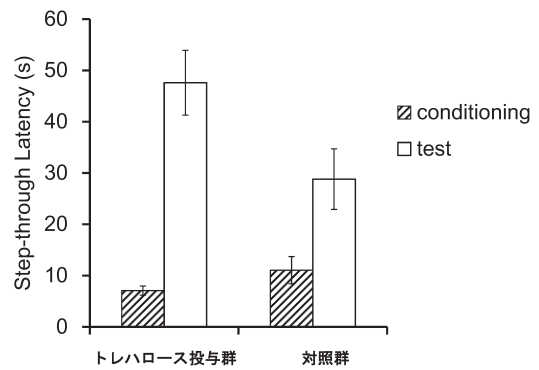


図2 受動的回避学習

縦軸は被検体が暗室へ移動するまでの潜時 (秒) を表す。条件付け■、保持テスト□

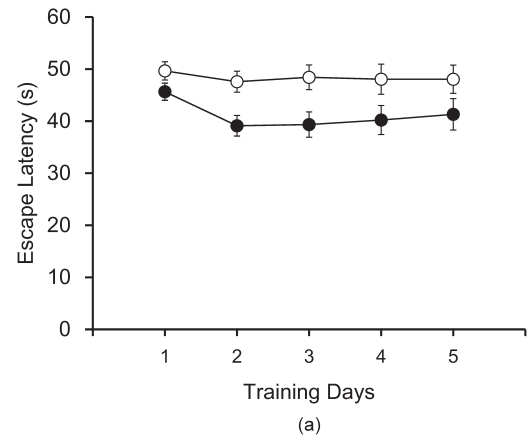


図3a 水迷路学習、獲得訓練 (Days1~5)

縦軸は被検体がプラットフォームへ到達するまでの逃避潜時 (秒) を表す。

●トレハロース投与群、○対照群

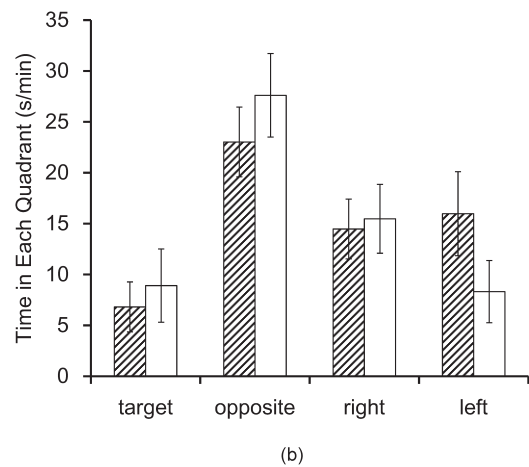


図3b 水迷路学習、プローブテスト (Day6)

縦軸は被検体がプラットフォーム設置象限 (ターゲット象限) およびその他の仮定の4分象限それぞれへの滞在時間 (秒) を表す。

■トレハロース投与群、□対照群

2) 遺伝子発現変化：DNAマイクロアレイ解析の結果、トレハロース長期投与により脳で発現が2倍以上増加した遺伝子の中に、オートファジー関係1遺伝子、FGF関係2遺伝子、FOXO転写因子1遺伝子が、トレハロース長期投与により脳で発現が1/2以下に低下した遺伝子の中にインスリンシグナル関係3遺伝子、炎症に関係するインターロイキン受容体1遺伝子など興味深いものがみられた。

考 察

受動的回避学習の結果から、トレハロース投与は電気ショックの記憶保持に関しては有効であると考えられた。水迷路学習の獲得訓練においても、トレハロースを長期間投与された群は、プラットフォームの位置へ比較的速い時間に到達することができた。しかし水迷路学習のプローブテストにおいては、対照群においても記憶学習の獲得がなされず、トレハロースの効果を検証することができなかった。この結果は、本研究で材料としたSAMP10マウスが、水迷路学習で試験される高度な空間記憶の保持には向いていなかったことを示唆している。近年、本研究で用いたSAMP10マウスの系統(SAMP10/TaSlc)においてグルコース輸送体遺伝子のひとつにフレームシフトの変異が発見された。その結果腎臓での糖の再吸収率が低下し、尿中に大量のブドウ糖が放出されていることがわかった⁴⁾。この系統のマウスに二糖であるトレハロースを長期間投与することが、どのような生理的影響を与えるかは不明である。

トレハロースを長期間投与されたSAMP10マウスの脳における遺伝子発現を解析した結果、オートファジーに関連した遺伝子の発現増加が認められたことは興味深い。トレハロースはハンチントン舞踏病やパーキンソン病の原因となる、異常なタンパク質の除去を行うオートファジーを促進する物質として報告されている^{3,5,6)}。

また、低下すると種々の動物で寿命延長に関わるといわれているインスリンシグナル経路の関連遺伝子や、炎症に関わる遺伝子の発現が低下していたことから、トレハロースが老化を抑制する効果をもつ化合物であることが示唆された。

要 約

加齢に伴って学習や記憶能力が顕著に低下し、脳の萎縮が見られるマウスとして知られる老化促進マウスSAMP10を用いて、長期にわたるトレハロースの摂取の、加齢に伴う学習・記憶機能の低下と脳における遺伝子発現変化への影響を研究したところ、老化を抑制する効果が示唆された。しかしこの系統のマウスにおいては高度な記憶・学習の試験が困難であることがわかり、さらに糖輸送に関連した遺伝子の変異が近年報告されたことから、通常寿命を示すマウスを用いた実験の必要性が示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、研究助成をして下さった公益財団法人三島海雲記念財団に厚く御礼申し上げます。また、共同研究者である東京都健康長寿医療センター研究所の本田修二研究員と、マウスの記憶学習試験でお世話になった土江伸誉博士に感謝致します。

文 献

- 1) D. E. Harrison, et al.: *Nature*, **460**, 392–395, 2009.
- 2) Y. Honda, et al.: *Aging Cell*, **9**, 558–569, 2010.
- 3) S. Sarkar, et al.: *J. Biol. Chem.*, **282**, 5641–5652, 2007.
- 4) K. Unno, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **454**, 89–94, 2014.
- 5) K. Castillo, et al.: *Autophagy*, **9**, 1308–1320, 2012.
- 6) X. Zhang, et al.: *Autophagy*, **10**, 588–602, 2014.
- 7) C. J. Kenyon: *Nature*, **464**, 504–512, 2010.