

## アスタキサンチン摂取は軽運動による海馬機能向上効果をさらに増強する

### 研究成果のポイント

1. 抗酸化能を有する天然色素アスタキサンチンの摂取により、低強度運動で生じる海馬神経新生および空間記憶能の向上効果がさらに増強されることを初めて確認しました。
2. 網羅的な遺伝子発現解析により、脳由来のレプチンが、上記の運動とアスタキサンチンの併用による海馬機能を相乗的に高める効果に参与することが示唆されました。
3. 認知機能低下の防止に向け、運動と抗酸化成分摂取を組み合わせた新たな介入プログラム開発に発展することが期待されます。

国立大学法人筑波大学 体育系 征矢英昭教授、陸 暲洙研究員らの研究グループは、米国ロックフェラー大学ならびに国立研究開発法人産業技術総合研究所との共同研究により、アスタキサンチン (Astaxanthin, AX) と低強度運動 (ME) との併用が海馬記憶能を相乗的に高めること、さらにその分子機構として海馬内のレプチン (Leptin, LEP) <sup>※1</sup> の関与を明らかにしました。

運動と機能性成分摂取の併用による有用性はこれまでにいくつかの報告がなされてきたものの、その効果の程度やメカニズムにまで踏み込んだ研究は進展していませんでした。本研究グループは、エビやカニなどに含まれるカロテノイドで強い抗酸化作用をもつ天然色素AXに着目し、マウスに4週間に渡ってMEを実施させながらAXを食餌に混ぜて摂取させることで、成体海馬神経新生 (Adult hippocampal neurogenesis, AHN) <sup>※2</sup> と空間記憶能が相乗的に高まることを明らかにしました。さらに、この相乗効果を担う分子機構を解明するため、DNAマイクロアレイ<sup>※3</sup> およびバイオインフォマティクス解析 (IPA) <sup>※4</sup> を用いて海馬内遺伝子発現を網羅的に検討したところ、神経栄養効果を持つLEPの遺伝子が関与していることが明らかとなりました。LEPを欠損する遺伝性肥満マウス (ob/obマウス) と脳内へのLEP投与実験から、脂肪細胞由来ではなく、脳由来のLEPがこのような相乗効果の発現に貢献することを実証しました。

本研究成果を足掛かりとし、軽度認知症やアルツハイマー病などの精神・神経疾患予防や改善に有用な方略の確立に向け、運動とその効果を増強する抗酸化成分摂取を組み合わせた介入プログラムの開発が期待されます。

本研究成果は、米国科学アカデミー発行の総合科学誌『PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)』で先行公開されました。

\* 本研究は、文部科学省特別経費プロジェクト「ヒューマン・ハイ・パフォーマンスを実現する次世代健康スポーツ科学の国際研究教育拠点」(平成26～30年度)、日本学術振興会戦略的国際研究交流推進事業費補助金「頭脳循環を加速する戦略的国際研究ネットワーク推進プログラム：スポーツ神経科学の国際研究拠点-認知機能を高める運動処方を目指して」(征矢代表、HFH27016、平成26～28年度)、ならびに科学研究費補助金基盤研究A(征矢代表、18H04081)の助成、科学研究費補助金新学術領域研究「意欲と身心パフォーマンスを共に育む次世代運動プログラム」(征矢英昭代表、16H06405)を受けて実施されました。

## 研究の背景

運動不足や睡眠不足、偏食などは、学習や記憶を司る海馬における神経細胞の障害や機能低下を引き起こし、ひいては神経変性疾患の危険因子ともなるため、ライフスタイルの改善とそれによる健康増進が喫緊の課題となっています。この方略として注目されるのが運動であり、抗ストレスや抗鬱、抗不安効果のみならず、認知機能の向上にも奏功することが知られています。近年、運動に加え、抗酸化作用をもつ天然サプリメントの併用により、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示されていますが、その作用機序は明らかではありませんでした。

これまでに征矢教授らの研究グループは、成体海馬神経新生 (Adult hippocampal neurogenesis, AHN) および、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、動物とヒトで明らかにしてきました (文献 1, 2, 3)。さらに、サケやエビなどに多く含まれる赤橙色カロテノイドの一種であるアスタキサンチン (Astaxanthin, AX) 摂取が、AHN および学習・記憶能を促進する効果を明らかにしました (文献 4)。これらの結果をもとに、本研究では ME による海馬機能の向上効果が、AX 摂取と併用することで増強するかどうかを検討しました。加えて、併用効果を担う分子基盤を網羅的遺伝子発現解析により推定し、ヒト神経芽細胞腫による細胞培養実験および LEP 欠損遺伝性肥満マウス (ob/ob マウス) を用いたレスキュー実験より検証することにしました。

## 研究内容と成果

### 1. ME と AX 摂取による相乗的な海馬機能の向上

本研究では、海馬機能向上に寄与する 0.5% の AX 摂取と、換気性作業閾値 (ヒトと動物で共通して見られる生理的な運動強度の指標) を基準に設定した ME モデルを用い、これらの併用が、空間学習記憶能および AHN に及ぼす影響を正常な成体マウスで検討しました。その結果、ME+AX 群は、それぞれ単独群に比べて空間記憶能がより向上し (図 1 A)、海馬の歯状回における細胞増殖の数 (Ki67 陽性細胞) と新生成熟細胞数 (BrdU/NeuN 陽性細胞) がさらに増加しました (図 1 B)。さらに、この効果は ME および AX 摂取の単独がもたらす効果の合算を超える、相乗的なものであることが初めて明らかになりました。

### 2. 海馬機能を高める ME と AX 摂取の分子機構；海馬レプチンの関与

続いて、網羅的な遺伝子発現解析が可能な DNA マイクロアレイと機能的解析手法である IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用い、ME と AX 摂取の併用による相乗的な海馬機能向上に関わる分子機構を検討しました。その結果、ME と AX 摂取の併用時には、神経栄養効果を持つレプチン (Leptin, LEP) が大きく変動しており、海馬内における LEP 発現増加が相乗効果を生み出すと想定されました。実際に、海馬内の LEP タンパク質発現量は、ME と AX 摂取の併用により相乗的に増加しており (図 2 A)、空間記憶能との間に正の相関が認められました (図 2 B)。一方、血漿 LEP では、ME と AX 摂取の併用による有意な変化は見られませんでした (図 2 C)。以上の結果から、末梢由来の LEP ではなく、脳由来の海馬内の LEP が併用効果に関与することが示唆されました。さらに、脳由来の LEP が AX で脳神経細胞にどのような作用を及ぼすのかを、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を用いて検討した結果、AX は濃度依存的に LEP 発現を増加させ、10 および 20  $\mu\text{M}$  で有意な発現増加が確認されました (図 2 D)。

### 3. ob/ob マウスにおける ME と AX の併用効果

上述した LEP の関与を検証するため、ob/ob マウスと脳内 LEP 投与を用いた実験により、脳由来の LEP が ME と AX による海馬機能の相乗効果に寄与するかどうかを検討しました。その結果、通常のマウスで見られていた、ME と AX 摂取による記憶能の相乗的な向上効果は (図 1 A)、ob/ob マウスでは認められませんでした (図 3 A)。一方、ME の実施期間中に、浸透圧ポンプを用いて ob/ob マウスの脳内に LEP を投与すると、消失していた併用効果が再現されることが明らかになりました (図 3 B)。脂肪細胞由来の末梢 LEP の効果を完全に否定することはまだできませんが、これまでの結果から、少なくとも、海馬内 LEP が ME と AX 摂取の併用効果に寄与していることは間違いないと考えられます (図 4)。

#### 今後の展開

近年、アルツハイマー病 (AD) の最先端治療戦略として外因的な LEP が注目されています。AD における認知機能の低下に対し、ME と AX 摂取の併用によって海馬 LEP を高めることができれば、神経新生を促進し認知機能の改善に貢献すると想定されます。軽度認知症や AD などに起因する認知機能低下の予防・治療方略確立に向け、本研究で得られた知見は、運動と抗酸化成分摂取を併用する新たな介入プログラムの開発とその実装に向けた重要なエビデンスになると考えられます。

#### 参考図

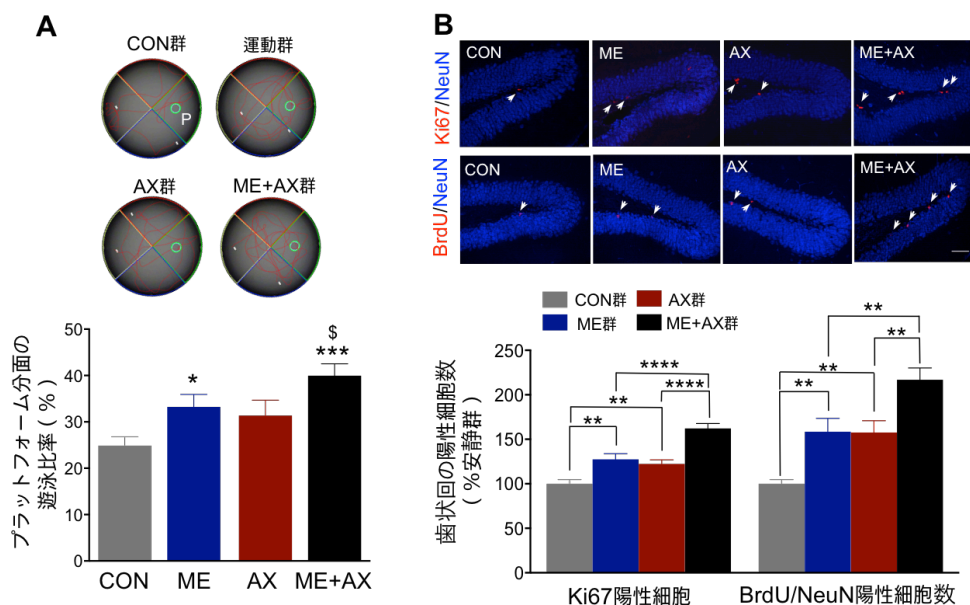


図 1. ME と AX 摂取の併用による海馬機能と神経新生の向上

(A) プローブテスト (空間記憶能力)、\* :  $P < 0.05$ , \*\*\* :  $P < 0.001$ , vs. CON; \$:  $P < 0.05$ , vs. AX。  
 (B) Ki67 陽性細胞数と BrdU/NeuN 陽性細胞数。\* :  $P < 0.01$ , \*\*\*\* :  $P < 0.0001$ . CON コントロール、ME : 低強度運動、AX : アスタキサンチン。

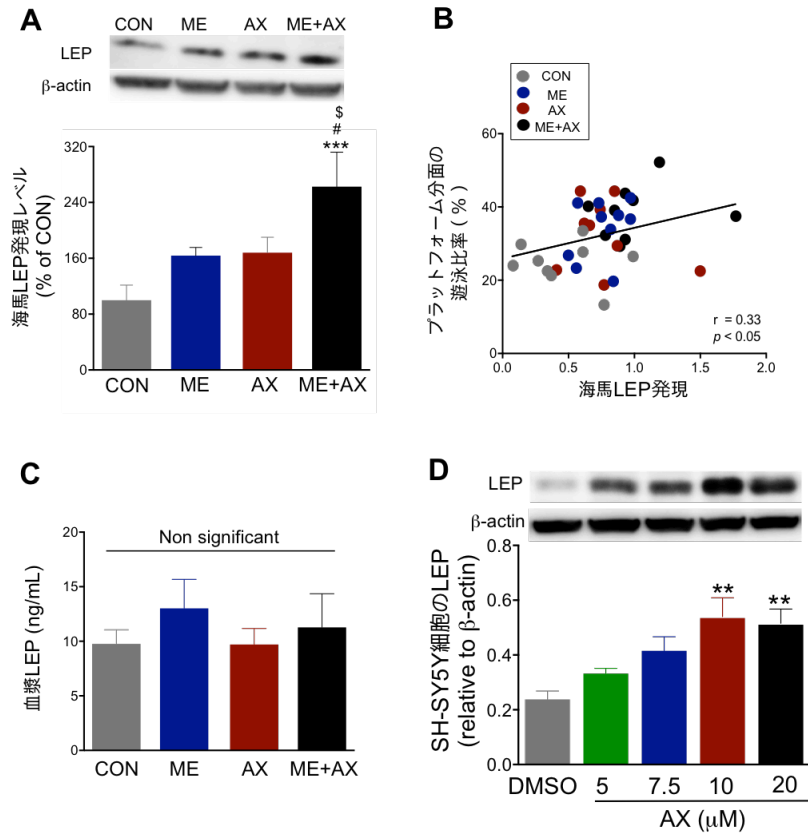


図2. 海馬機能をもつめる ME と AX 摂取の分子機構；海馬レプチンの関与

(A) 海馬内の LEP 発現、\*\*\* :  $P < 0.001$ , vs. CON、# :  $P < 0.01$ , vs. ME、\$ :  $P < 0.05$  vs. AX。(B)海馬内の LEP 発現と空間記憶能力の相関関係。(C) 血漿の LEP レベル。(D) ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) における LEP 発現。\* :  $P < 0.01$  vs. DMSO。DMSO : ジメチル スルホキシド。

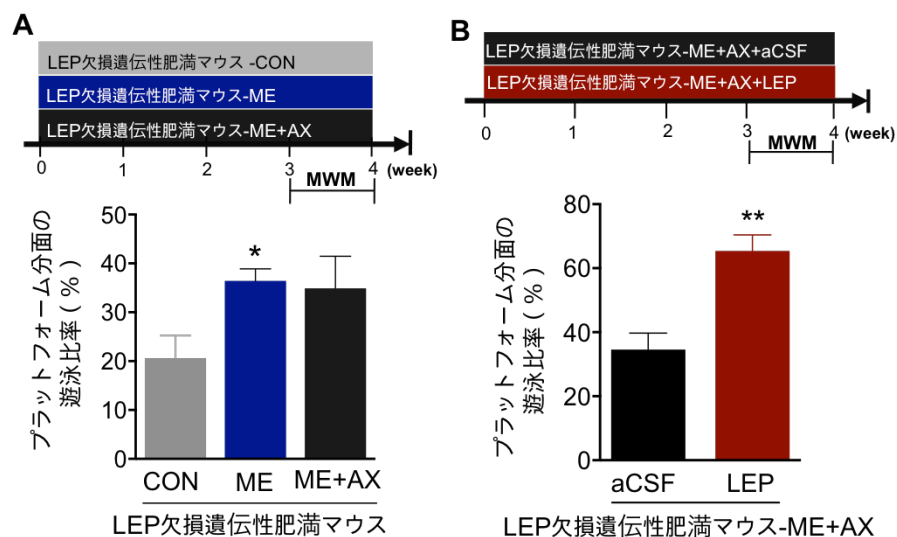


図3. ob/ob マウスにおける ME と AX の併用効果

(A) ob/ob マウスにおけるプローブテストの成績 (空間記憶能力)。海馬内の LEP 発現、\* :  $P < 0.05$ , vs. CON。(B)長期間の脳内 LEP 投与によるプローブテストの成績 (空間記憶能力)。\*\* :  $P < 0.01$ , vs. aCSF。MWM : モリス水迷路、aCSF : 人工の脳脊髄液。

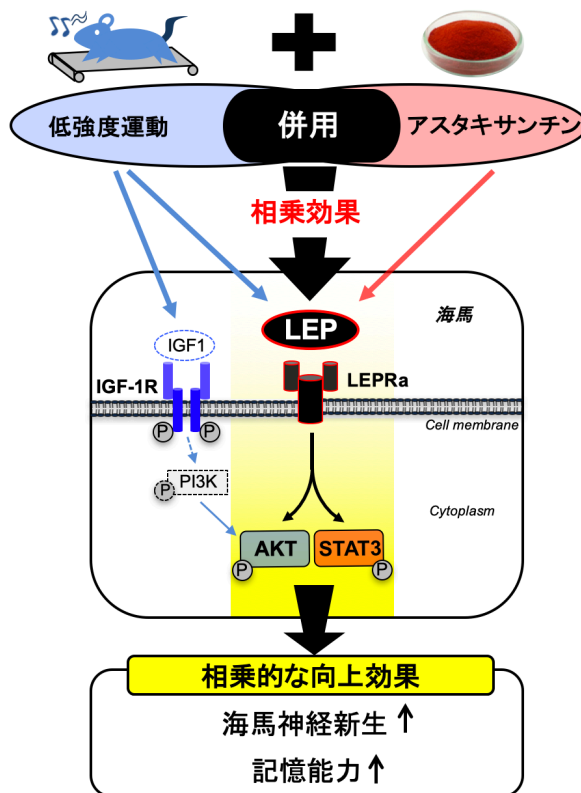


図4. ME と AX の併用効果で高まる海馬の神経新生と機能の分子機構

#### 用語解説

##### 注1) レプチン (Leptin)

脂肪細胞より分泌されるペプチドホルモンであり、主に視床下部の受容体を介して強力に摂食行動を抑制する。最近では、脳でも産生されており、エネルギー消費亢進だけでなく、海馬機能の維持・向上にも重要な役割を果たすと考えられている。

##### 注2) 成体海馬神経新生 (Adult hippocampal neurogenesis)

神経新生とは、成熟した個体でも一生涯に渡って新たな神経細胞が産生される現象であり、海馬や嗅球など一部の領域で確認されている。海馬における神経新生は、垂領域である歯状回の顆粒細胞下帯 (subgranular zone) 前駆細胞に端を発し、初期の前駆細胞から分化した新生細胞は、増殖・分化・生存 (組み込み) という3つの過程を経て成熟神経細胞に成長する。神経新生の評価は、新生細胞のマーカーである BrdU と、各成熟段階で特異的に発現するマーカーを組み合わせることで視覚化することで可能である。新しく産生された細胞のなかでも、神経へと分化・成熟し、既存の神経回路に組み込まれた細胞は記憶の形成において重要な役割を担っている。

##### 注3) マイクロアレイ (Microarray)

一度に複数の遺伝子の発現変化を同定できる手法であり、現在では、一度の解析で全遺伝子の発現プロファイルを検討できるようになった。マイクロアレイのチップ上には塩基配列が明らかになっているオリゴヌクレオチド (20 塩基対、またはそれ以下の長さの短いヌクレオチドの配列) や cDNA (mRNA と相補的な塩基配列を持つ DNA) といったプローブが数万種類配置されている。このチップ上に、あらかじめ異なる蛍光色素で標識しておいた 2 種の mRNA を加え、競合的にハイブリダイゼーションさせることで、両者の蛍光強度の差から各遺伝子の発現の違いを比較することができる。

#### 注4) バイオインフォマティクス解析 (IPA、Ingenuity Pathways Analysis)

マイクロアレイ実験より得られたデータをベースにして生物学的な機能の解釈やネットワーク解析を行うことができるソフトウェアである。過去の論文を基に開発した Ingenuity Knowledge Base により、大量の遺伝子発現を生理機能別に分類することが可能である。本研究では、各遺伝子間のネットワークが予測され、統計的 ( $P < 0.05$ 、right-tailed Fisher's exact test) に重要と思われるネットワーク順にランク付けを行った。

#### 参考文献

1. Okamoto and Soya *et al.*, PNAS, 2012
2. Inoue and Soya *et al.*, Int J Sports Med, 2015
3. Suwabe and Soya *et al.*, PNAS, 2018
4. Yook and Soya *et al.*, Mol Nutri Food Res, 2016

#### 掲載論文

【題名】 Leptin in Hippocampus Mediates Enhancement Benefits of Mild Exercise by an Antioxidant on Neurogenesis and Memory

(運動と抗酸化剤の併用が海馬内レプチンを介して海馬神経新生や記憶能を増進する)

【著者名】 Jang Soo Yook<sup>ab</sup>, Randeep Rakwal<sup>a</sup>, Junko Shibato<sup>a</sup>, Kanako Takahashi<sup>ab</sup>, Hikaru Koizumi<sup>ab</sup>, Takeru Shima<sup>a</sup>, Mitsushi J. Ikemoto<sup>cd</sup>, Leandro K. Oharomari<sup>ab</sup>, Bruce S. McEwen<sup>e,1</sup>, and Hideaki Soya<sup>ab,1</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Exercise Biochemistry and Neuroendocrinology, Faculty of Health and Sport Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8574, Ibaraki, Japan; <sup>b</sup>Division of Sport Neuroscience, Department of Mind, Advanced Research Initiative for Human High Performance (ARIHHP), Faculty of Health and Sport Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8574, Ibaraki, Japan; <sup>c</sup>Molecular Composite Medicine Research Group, Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba 305-8566, Ibaraki, Japan; <sup>d</sup>Graduate School of Science, Toho University, Funabashi, Chiba, 274-8510, Japan;

<sup>e</sup>Laboratory of Neuroendocrinology, The Rockefeller University, New York, NY 10065, USA

<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed.

【掲載誌】 PNAS(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)

DOI: 10.1073/pnas.1815197116

#### 問合わせ先

征矢英昭 (そや ひであき)

筑波大学 体育系 教授 (運動生化学研究室)、ヒューマン・ハイ・パフォーマンス先端研究センター (ARIHHP)センター長