

不活動がもたらす不安・記憶障害における 過酸化脂質制御の役割解明

江 島 弘 晃* 富 賀 裕 貴**

LIPID PEROXIDATION AS A KEY MEDIATOR OF ANXIETY AND COGNITIVE DYSFUNCTION INDUCED BY PHYSICAL INACTIVITY

Hiroaki Eshima and Yuki Tomiga

Key words: lipid peroxidation, anxiety, memory impairment, physical inactivity, small cage.

緒 言

日本を含む先進国では、過食および社会環境の変化に起因する身体活動量の低下（身体不活動）が公衆衛生上の課題となっている。特に、慢性的な身体不活動の状態は、全死亡率を約30%増加させ、40秒ごとに1人の死亡に相当すると考えられている³⁾。この背景には、身体不活動が2型糖尿病や心血管疾患をはじめとする慢性疾患リスクの悪化のみならず¹⁾、抑うつ症状、不安および記憶障害の発症とも関連している⁴⁾。このように、身体不活動は世界規模で進行する深刻な健康被害の1つである一方で、どのような機序を介して全身性の臓器・組織障害、特に脳機能への障害を引き起こされるのかは不明である。

酸化ストレスは、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患において顕著に認められることが広く知られている。脳は多価不飽和脂肪酸（polyunsaturated fatty acids; PUFAs）を豊富に含む脂質に富んだ臓器であることから、過酸化脂質が酸化ストレスの主要な発生要因である可能性が高

い。実際に、過酸化脂質はアルツハイマー病の発症初期段階に関与する重要な病態機序の1つであると考えられている⁶⁾。また、2012年に同定されたフェロトーシスは、遺伝学的、形態学的および生化学的特徴においてアポトーシスとは異なる新規の細胞死機構であり、その発生機序として過酸化脂質が中心的役割を担う。これまでに、腎尿細管細胞障害、Tリンパ球障害、肝細胞機能異常、更には海馬神経変性など、さまざまな病態においてフェロトーシスの関与が報告されているが¹⁰⁾、身体不活動が脳機能に及ぼす影響において、過酸化脂質およびフェロトーシスが関与するかなについては、依然として明らかにされていない。

これまで、身体不活動を再現する実験モデルとして、ヒトを対象としたベッドレスト試験や、実験動物を用いた後肢懸垂モデル、ギプス固定モデルなどが広く用いられてきた。これらのモデルは、筋量および筋力の低下、ならびにインスリン感受性の低下といった骨格筋の廃用性変化を解析するうえでは有用である。一方で、ヒトにおいて観察される身体不活動に起因した全身性の代謝適応や

* 長崎国際大学人間社会学部 Faculty of Human and Social Sciences, Nagasaki International University, Nagasaki, Japan.

** 福岡大学スポーツ科学部 Faculty of Sports and Health Science, Fukuoka University, Fukuoka, Japan.

生体反応を十分に反映するものとしては限界があると指摘されている⁷⁾。このような方法論的課題に対処するため、近年では骨格筋局所の変化にとどまらず、全身性の代謝調節をより包括的に反映可能な新規の不活動モデルとして、小型マウスケージ (small mouse cage; SMC) モデルが注目されている⁹⁾。

SMC モデルを用いた先行研究において、Park らは、SMC による身体不活動が不安様行動の増加および作業記憶の低下を引き起こすことを報告している⁵⁾。一方、Roemers らは、SMC による身体不活動は不安様行動に影響を及ぼさないと報告している⁸⁾。このように、SMC モデルにおける脳機能への影響は、不安様行動の増加と作業記憶が低下するという点に一致した見解は得られていない。以上を踏まえ、本研究では、実験動物を対象として SMC による身体不活動の慢性化が情動および記憶機能などの脳機能に及ぼす影響を詳細に解明することを目的とし、運動介入を用いた検討に加え、先行研究では十分に検証されていない雌雄差の影響にも着目した。更に、不活動が脳機能に影響を及ぼす基盤機構として過酸化脂質およびフェロトーシスの関与を仮定し、脳内過酸化脂質の評価ならびにフェロトーシス阻害剤を用いた検討を行うことを目的とした。

方 法

A. 実験動物

本研究には、4 か月齢の C57BL/6J マウス (日本 SLC 株式会社, 日本) を用いた。また、生物学的変数としての性別を考慮し、雄性和雌性の両方を用いて実験を実施した。なお本研究は、長崎国際大学動物実験委員会の承認を得て行われた (承認番号: 157および170)。

B. 不活動モデル (SMC)

高16 cm、縦6 cm、横9 cm の飼育面積を制限した SMC と高12 cm、縦14 cm、横20 cm の通常のマウス用飼育ゲージと区分し、8 週間の介入を実施した。SMC モデルを SMC+、通常のマウス用飼育ゲージで飼育したマウス (コントロール) を SMC- と定義した。

C. 運動モデル (Ex)

回転式運動量測定器 (SN-450-A, シナノ製作所, 日本) を用いた自発走行の運動を促す環境下で8週間飼育する運動モデルを作製した。運動モデルを Ex+、通常のマウス用飼育ゲージで飼育したマウス (コントロール) を Ex- と定義した。なお、上記の SMC- のマウスと別個体のマウスを Ex- では用いた。

D. オープンフィールドテスト

40 cm × 40 cm のフィールド上で5分間、マウスの行動を追跡した。中心領域に位置する四方に侵入回数、滞在時間、移動距離を分析した。中心領域に位置する四方に滞在するほど不安様行動が低く、滞在しないほど不安様行動が高いと評価した。SMART3.0ビデオ画像行動解析装置 (バイオリサーチセンター株式会社, 日本) を用いて分析した。

E. 高架式十字迷路

上下のオープンアーム (開空間) と左右のクローズアーム (閉空間) で設置された装置を用いて、5分間、マウスの侵入回数、滞在時間、移動距離を追跡した。マウスが開空間に滞在するほど不安様行動が低く、閉空間に滞在するほど不安様行動が高いと評価した。オープンフィールドテスト同様に、SMART3.0ビデオ画像行動解析装置を用いて分析した。

F. Y 字迷路試験

Y 字型の装置を用いて、8分間、マウスの自由移動を追跡し、アームへの進入回数を記録した。異なるアームへの侵入回数を総侵入回数で除算することで、短期記憶能を評価した。

G. 過酸化脂質の評価

SMC 介入後のマウスの海馬、大脳皮質から上清を採取し、マイクロプレートリーダー (Infinite M Plex, TECAN, Austria) を用いて、脂質ラジカル由来、過酸化脂質由来に反応して発光する Bodipy C11、Liperfluo の蛍光指示薬による蛍光強度を測定した。Bodipy C11は非酸化型・酸化型に由来する赤色蛍光ならびに緑色蛍光の蛍光比、Liperfluo は緑色蛍光の単波長の蛍光強度から SMC- との相対値で評価した。

H. 統計処理

データを平均値 ± 標準誤差で示し、統計解析には Prism version 10 を用いた。解析上、データの分布の正規性を確認し、対応のない t 検定で SMC- および SMC+ の比較、Ex- および Ex+ の比較をそれぞれ実施した。統計的有意性は $P < 0.05$ と定義した。

結 果

A. オープンフィールドテストによる不安情動の検証

オープンフィールドテストでは、雌雄ともに試験中の総移動距離は同等であった (図 1 A, F)。雄では、中心領域に移動した時間に差はないものの、移動距離では SMC+ が SMC- と比較して有意に低値を示した (図 1 B, C)。また、中心領域に侵入した相対値に差はないものの、侵入回数では SMC+ が SMC- と比較して有意に低値を示した (図 1 D, E)。雌では、中心領域に移動した距離に差はないものの、滞在時間では SMC+ が SMC- と比較して有意に低値を示した (図 1 G, H)。中心領域に侵入した侵入回数、相対値は SMC+ が SMC- と比較して有意に低値を示した (図 1 I, J)。

J)。以上の結果から、SMC による不活動は、雌雄ともにオープンフィールドテストによる不安水準が高まる可能性が示唆された。

B. Y 字型迷路試験短期間の認知記憶能の検証

次に、空間認知における記憶機能の不活動の影響を雌雄間で検証した。その結果、Y 字型迷路試験においては、雌雄ともに SMC+ と SMC- に空間認知正答率に差はみられなかった (図 2 A, B)。したがって、SMC は、Y 字型迷路試験による短期間の認知記憶能に影響を及ぼさない可能性が示唆された。

C. 高架式十字迷路試験による不安情動の検証

不安情動の検証として、オープンフィールドテスト上では、雌雄ともに不活動の影響がみられたため、次に実験条件を変更し、雄性を対象に高架式十字迷路試験を実施した。その結果、SMC+ は SMC- と比較して、開空間への侵入回数が有意に低かった (図 3 A)。そのため、開空間の滞在時間も SMC+ は SMC- と比較して、有意に低かった (図 3 B)。開空間への侵入回数、滞在時間の結果と対応して、閉空間の侵入回数に SMC+ と SMC- に差はなく (図 3 C)、滞在時間は、SMC+ が SMC- と比較して、有意に高かった (図 3 D)。

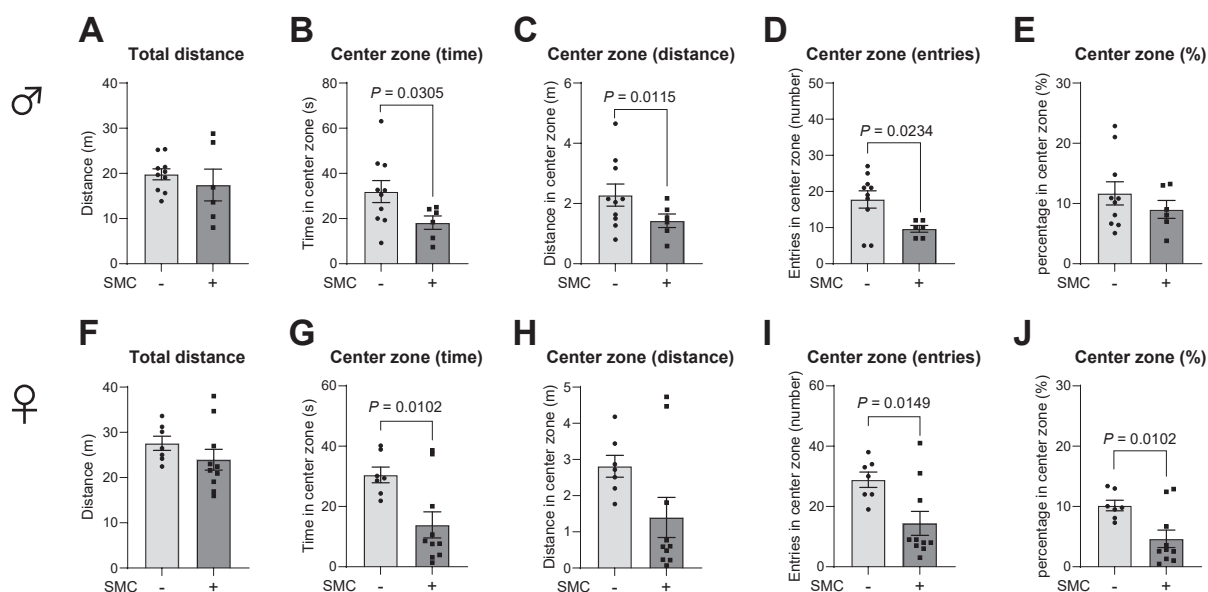


図 1. 雌雄ともに SMC はオープンフィールドテストにおける不安様行動が高まる

Fig.1. Effects of small mouse cage (SMC) on anxiety and depression-like behavior using the open-field test.

Total distance traveled (A and F), time spent (B and G), distance (C and H), entries (D and I), and percentage of time spent (E and J) in the center zone in the open-field test. Data are from male (A-E) and female mice (F-J). Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). All data were analyzed by unpaired t-test, Male: $n = 10$ mice for SMC - group, $n = 6$ mice for SMC + group, Female: $n = 7$ mice for SMC - group, $n = 10$ mice for SMC + group.

このことから、オープンフィールドテスト同様に、高架式十字迷路試験の結果からも SMC による不活動は不安水準が高まる可能性が示唆された。

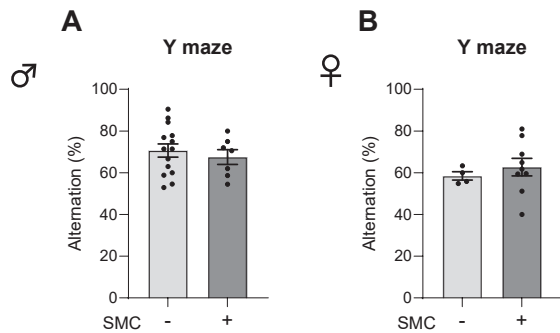


図2. SMC は Y 字迷路試験による短期の作業記憶能に影響を及ぼさない

Fig.2. Effects of small mouse cage (SMC) on cognitive function.

Percentage of spontaneous alternations in the Y-maze test from male (A) and female mice (B). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). All data were analyzed by unpaired t-test, Male: n = 14 mice for SMC - group, n = 7 mice for SMC + group, Female: n = 4 mice for SMC - group, n = 9 mice for SMC + group.

D. 習慣的な運動トレーニングによる不安情動の変化の検証

次に、不活動と対照的な身体活動量を高めた運動トレーニングが不安情動を変化させるか否かを検証した。当初、運動トレーニング後の不活動を実施したモデルの検討を予定していたが、まずは運動トレーニングそのものの影響を確認した。その結果、Ex+ および Ex- では試験中の総移動距離(図 4 A)、中心領域に移動した時間(図 4 B)、移動距離(図 4 C)、侵入した回数(図 4 D)、相対値(図 4 E) いずれにおいても差はなかった。以上の結果から、回転式運動量測定器を用いた自発走行による習慣的な運動トレーニングは、オープンフィールドテストによる不安水準に影響を与えないことが示唆された。

E. 海馬、大脳皮質における過酸化脂質の検証

過酸化脂質の関連性を検証するために、雄性マウスの海馬、大脳皮質から、過酸化脂質に反応して発光する Bodipy C11、Liperfluo の蛍光強度比

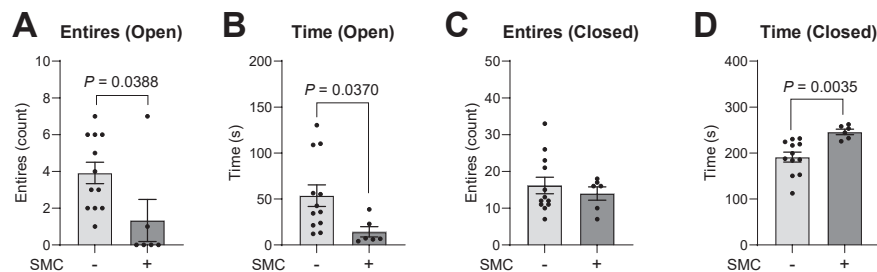


図3. SMC は高架式十字迷路における不安様行動が高まる

Fig.3. Effects of small mouse cage (SMC) on anxiety and depression-like behavior using the elevated plus maze.

Number of open arm entries (A) and time spent (B). Number of closed arm entries (C) and time spent (D). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). All data were analyzed using an unpaired t-test, and all experiments were conducted in male mice. n = 12 mice for SMC - group, n = 6 mice for SMC + group.

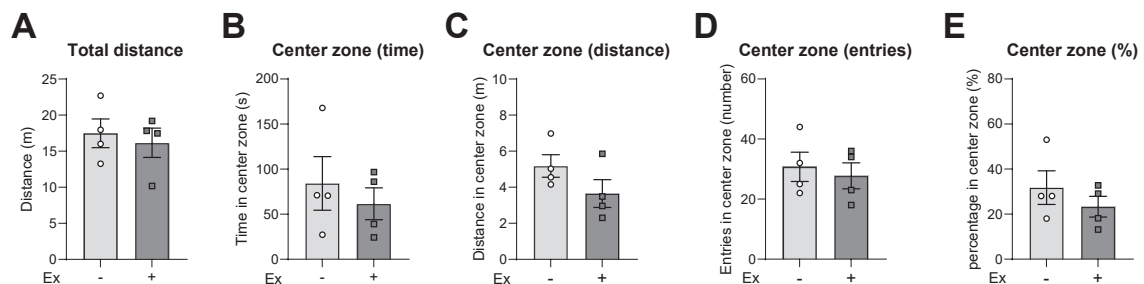


図4. Ex はオープンフィールドテストにおける不安様行動に影響を及ぼさない

Fig.4. Effects of exercise (Ex) on anxiety and depression-like behavior using the open-field test.

Total distance traveled (A), time spent (B), distance (C), entries (D), and percentage of time spent (E) in the center zone in the open-field test. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). All data were analyzed by unpaired t-test, n = 4 mice for Ex - group, n = 4 mice for Ex + group.

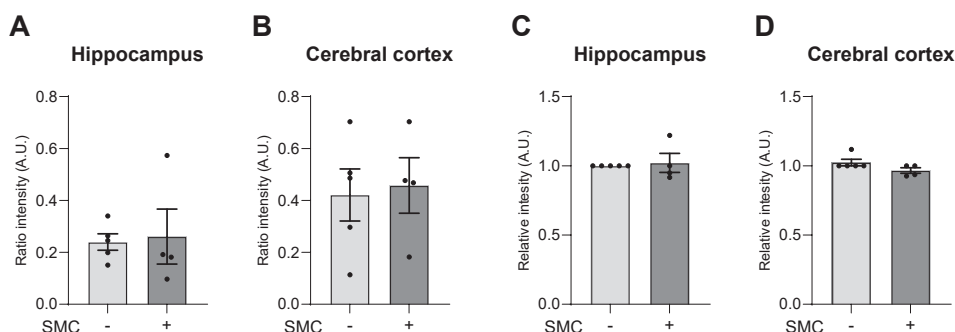


図5. SMCの海馬、大脳皮質の過酸化脂質は差を認めない

Fig.5. Effects of small mouse cage (SMC) on lipid peroxidation in brain tissue.

Bodipy C11 fluorescence intensity in the hippocampus (A) and cerebral cortex (B). Liperfluor fluorescence intensity in the hippocampus (C) and cerebral cortex (D). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

を比較した。その結果、SMC- と SMC+ では、海馬、大脳皮質における Bodipy C11、Liperfluor の蛍光強度は有意な差は観察されなかった (図 5 A-D)。

考 察

本研究では、身体不活動が不安様行動および記憶機能に及ぼす影響を、脳部位における過酸化脂質制御の観点から検討した。その結果、不活動は記憶機能の変化とは非依存的に不安様行動を亢進させる可能性が示唆された。一方で、本研究で用いた評価系においては、過酸化脂質との関連を明確に示す証拠は得られなかった。

オープンフィールドテストにおいて、先行研究と同様に不活動群は中央領域での滞在時間および侵入回数の有意な減少を示した一方で、総移動距離には大きな差が認められなかった⁵⁾。この結果は、不活動による行動変化が単なる運動能力の低下ではなく、不安水準の上昇に起因するものであることを示している。同様に、高架式十字迷路試験においても、不活動群はオープンアーム (開空間) への進入回数および滞在時間の減少が観察され、不安様行動が一貫して示された。

一方、記憶機能の評価では、Y 字型迷路試験上では、不活動群は空間認知正答率に変化は認められなかった。このことから、短期間の課題における空間認知記憶能は不活動が影響しない可能性が示唆された。本研究で用いた Y 字型迷路試験は、短期記憶の評価に適していることから、長期記憶を評価する実験系を用いた検討は今後の課題であ

る。

また、本研究において、身体不活動とは対照的な介入である運動トレーニングは、不安様行動に必ずしも影響を及ぼさないことが確認された。身体不活動および運動トレーニングに関する介入研究は、実験動物を用いた場合においても再現性の確保が必ずしも容易ではなく、十分なデータの蓄積が求められる。しかしながら、時間的制約のため、本研究期間内にその達成には至らなかった。当初の研究計画では、運動トレーニング後に身体不活動を負荷したモデルの作製を予定していたが、その前段階として運動トレーニング単独の影響を検討した結果、不安様行動への有意な影響は認められなかった。今後は、当初計画していた運動トレーニング後の身体不活動モデルを作製し、不安様行動に及ぼす影響について詳細に検証する予定である。

過酸化脂質は PUFA を豊富に含む神経細胞膜において生成されやすく、脳においては膜流動性の低下、受容体機能の異常、シナプス可塑性の障害を引き起こすことが知られている⁶⁾。身体不活動の状態では、ミトコンドリア機能の低下や抗酸化酵素活性の減弱により過酸化脂質の蓄積が促進される可能性が高く、その結果、海馬や前頭前皮質など記憶および情動制御に関与する脳領域において神経回路の機能破綻が生じ、不安様行動や記憶障害が顕在化する可能性が考えられる。過酸化脂質の過剰蓄積は鉄依存的細胞死であるフェロトーシスを誘導し、神経細胞の機能的・構造的損傷を引き起こす可能性が示唆されている²⁾。当初、不

活動が脳内のフェロトーシスを発生させ、不安様行動や記憶障害の原因と仮説を立てていたが、本研究の評価系ではフェロトーシスの関与は見いだすことはできなかった。フェロトーシスの主要因である過酸化脂質反応は即時的に進行しやすく、加えてその測定は対象や条件が限定され、定量的評価が困難であることがこれまで指摘されている。したがって、今後は過酸化脂質の下流産物であるアルデヒド類の測定を含め、Glutathione peroxidase 4やAcyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4、Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3などのフェロトーシス関連遺伝子の解析を実施することで、より適切な評価指標および実験条件について検討することが課題である。実験動物の生命倫理に十分配慮し、これらの課題を達成したうえで、今後は阻害剤を用いた *in vivo* における検証を実施する予定である。

以上より、不活動による不安様行動および記憶機能障害には、過酸化脂質の制御破綻を基盤とした酸化ストレスの関与を想定したが、本研究では仮説と必ずしも一致しない結果が得られた。今後は、炎症反応をはじめとする他の主要な分子機構について検討するとともに、過酸化脂質の時空間的变化や細胞種特異的影響を詳細に解析する必要があると考えられる。これらの検討を通じて、不活動が脳機能に及ぼす影響について、より包括的な理解が進むことが期待される。また、当初、研究計画で予定していたフェロトーシスの阻害剤投与および運動介入が不活動の抑制効果を担うのかの検証は達成できておらず、これらの因果検証を実施することで研究の発展が見込まれる。

総 括

本研究では、実験動物を用いた活動制限による慢性的な不活動が、短期的な作業記憶機能の変化に影響せずに不安様行動の水準を高める現象が雌雄ともに生じることを明らかにした。今後、研究計画で想定した慢性的な不活動に伴う脳機能変化におけるフェロトーシスの因果検証および介入効果の検証を実施することが本研究の課題である。

謝 辞

本研究の実施にあたり助成を賜りました公益財団法人明治安田厚生事業団に深く感謝申し上げます。また、本実験の遂行にあたり、ご協力いただきました長崎国際大学薬学部細胞生物学研究室の黒川健児教授、石原知明講師に感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Bowden Davies KA, et al. (2018): Short-term decreased physical activity with increased sedentary behaviour causes metabolic derangements and altered body composition: effects in individuals with and without a first-degree relative with type 2 diabetes. *Diabetologia*, **61**, 1282-1294.
- 2) Hambright WS, et al. (2017): Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox Biol*, **12**, 8-17.
- 3) Lee IM, et al. (2012): Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*, **380**, 219-229.
- 4) Loprinzi PD, et al. (2015): Exercise and cognitive function: a randomized controlled trial examining acute exercise and free-living physical activity and sedentary effects. *Mayo Clin Proc*, **90**, 450-460.
- 5) Park J, et al. (2022): Exercise hormone irisin prevents physical inactivity-induced cognitive decline in mice. *Behav Brain Res*, **433**, 114008.
- 6) Praticó D, et al. (2004): Lipid peroxidation and oxidative imbalance: early functional events in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **6**, 171-175.
- 7) Reidy PT, et al. (2021): Preclinical rodent models of physical inactivity-induced muscle insulin resistance: challenges and solutions. *J Appl Physiol*, **130**, 537-544.
- 8) Roemers P, et al. (2019): Inducing physical inactivity in mice: preventing climbing and reducing cage size negatively affect physical fitness and body composition. *Front Behav Neurosci*, **13**, 221.
- 9) Siripoksup P, et al. (2024): Sedentary behavior in mice induces metabolic inflexibility by suppressing skeletal muscle pyruvate metabolism. *J Clin Invest*, **134**, e167371.
- 10) Stockwell BR (2022): Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications. *Cell*, **185**, 2401-2421.