

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500598

研究課題名(和文) 走行・バランス運動による老化中枢神経活性化プロセスの解明

研究課題名(英文) Elucidation of enhanced process in aging central nerve by the running and balance exercise

研究代表者

金村 尚彦 (KANEMURA, Naohiko)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授

研究者番号：20379895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：適度な運動は、神経栄養因子の放出が高まり、神経活動が活性化される。本研究では、老化により低下した神経機能を活性化することが可能であるか、走行・バランス運動の効果を検証した。長期の運動を行うことにより、神経栄養因子、神経形成成長因子やブチド等が選択的に増加し、またアポトーシス因子が低発現となる結果となった。腰髄の組織学染色による運動ニューロンの活性化は、運動によっては変化が少なかった。運動による機能改善は、神経単独ではなく、神経活動を活性化させる関連因子について多面的な機能連関の中で考える必要があり、また年齢による遺伝子発現活性化の違いも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Moderate exercise, the release of neurotrophic factors is increased, neural activity is activated. In this study, whether it is possible to activate the nervous system that has been decreased by aging and to verify the effect of the running and balance exercise. Activation of the motor neurons stained of the lumbar spinal cord was less change in some exercise. Their expression of neurotrophins, neurogenesis and neuropeptide were enhanced and the activity of apoptosis was down-regulated by locomotor exercise in the spinal cord of the difference of age. Improvements due to the motion, not the nerve itself, it is necessary to consider in the pleiotropic functions for related factors activated neural activity.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：老化 走行運動 バランス運動 中枢神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

高齢者の転倒は、加齢により、視覚、張力、平衡機能、固有感覚、筋力、機敏動作能力の低下や環境因子などの影響により、引き起こされる。筋力、中枢・末梢神経機能の低下、内服薬の影響、住宅環境の環境因子など様々な原因により引き起こされる。中枢神経は転倒を回避するために、視覚情報、前庭器情報とともに、関節や足底からの力学的情報をもとに制御・予測機構を動員し、関節周囲筋を制御する。申請者は、廃用や老化に伴う神経機能の活性化を目的に研究を行ってきた。高齢者に対しバランス機能向上を目的とした介入研究では、足底刺激の感覚受容器を賦活化する運動を行うと重心を制御する能力が高まる。週齢の影響で、運動介入により脊髄や足底皮膚に存在する神経栄養因子とその受容体 mRNA 発現の活性化の程度に差があることが明らかとなった。走行運動における神経栄養因子に着目した先行研究¹⁾では、栄養因子の活性化が報告されているが、対象が成体ラットであり、老齡ラットの報告ではない。また一部の栄養因子の影響について研究がなされているが、本研究では、老齡期に神経生存や維持に関わる神経栄養因子と神経可塑性に関する他の因子との関連性を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

老化により神経栄養因子の不活性化から神経機能の低下を引き起こす。適度な運動では、神経系内の栄養因子の放出が高まり、神経活動が活性化される。本研究では、老化により低下した神経機能を活性化することが可能であるか、走行・バランス運動の効果を検証する。具体的な目的は、成体から老齡にいたる過程での脊髄に存在する神経栄養因子-受容体の発現の相違と移行プロセス、同過程での脊髄神経における神経栄養因子

発現と他の神経形成関連因子、神経ペプチド、アポトーシス関連因子との関係性、脊髄神経における神経栄養因子と神経突起伸長関連分子発現の局在性を検証、老齡期の運動介入により、～ の項目について効果を検証した。

3. 研究の方法

研究 走行運動による成体から老齡にいたる過程での脊髄に存在する神経栄養因子-受容体の発現の相違と移行プロセス、他の神経形成関連因子、神経ペプチド、アポトーシス関連因子との関係性

Wistar 系雄性ラット 10 週齢 (走行群 5 匹、非走行群 3 匹)、6 ヶ月週齢 (走行群 5 匹、非走行群 3 匹)、1 年齢 (走行群 5 匹、非走行群 3 匹)、2 年齢 (走行群 5 匹、非走行群 3 匹) を対象とした。走行群は、小動物用トレッドミルにて、走行速度 5.8m/min、走行時間 1 時間の条件で運動を課した。走行群 (走行期間; 1 日群、5 日群、4 週間群)、非走行群とランダムに分けた。実験終了後、脊髄 (L3 - 5) を摘出し、total RNA を抽出した。逆転写反応により作成した cDNA を鋳型とし、PCR array 法 (84 遺伝子) にて発現量を検討した。2 倍以上の発現を認めた遺伝子を抽出した。

研究 脊髄神経における神経栄養因子と神経突起伸長関連分子発現の局在性を検証 Wistar 系雄性ラット 10 匹 (老齡群 2 年齢) を対象とした。さらに走行群、非走行群とランダムに分類した (老齡走行群 5 匹、老齡非走行群 5 匹)。実験終了後に L1-L3 レベルを摘出し、4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液にて固定した。その後 OCT コンパウンドに包埋し、急速凍結した。クリオスタットにて 16 μ m にて凍結切片を作成した。一次抗体を TrkB (チロシンキナーゼ B) GAP43 (成長関連タンパク-43)、2 次抗体を Dlight 488 にて可視化し、また 神

経細胞体に発現している Hu/D を一次抗体とし、2 次抗体は Cy3 に対し蛍光 2 重染色を実施した。蛍光光学顕微鏡で観察した。脊髄(片側)を倍率×20 でデジタルビデオカメラにて撮影後、画像解析ソフト Win Roof で解析を行った。解析方法は、RGB 分離後、脊髄前角エリアを TrkB についてはしきい値 131-224、GAP-43 については 140-224 で 2 値化を行った。その後、2 値化領域の 1 エリアあたり総面積を算出し、算出された値を TrkB および GAP-43 の発現量とした。

統計学的手法

算出した 2 値化領域の 1 エリアあたり総面積を用いて、対応のない T 検定を行った。有意水準は 5%未満とした。

研究

バランス運動と走行運動による脊髄神経栄養因子発現の比較

Wistar 系雄性ラット 2 年 15 匹 (走行群 5 匹、バランス群 5 匹、対照群 5 匹) を対象とした。走行群は 10.8m/min のトレッドミル運動を課し、バランス群は、回転角度±7 度、回転速度 25rpm のプラットフォーム上で外乱刺激を加えた。両群ともに 1 日 1 時間、5 日/週、1 ヶ月間実施した。実験終了後、腰髄を摘出し、リアルタイム PCR 法にて、BDNF、TrkB および CREBmRNA 発現量を比較した。統計は、一元配置分散分析 (Tukey 法) を実施した。

4. 研究成果

研究 走行運動後の各週齢腰髄脊髄神経における神経栄養因子発現と他の神経形成関連因子、神経ペプチド、アポトーシス関連因子、神経突起伸長関連分子発現動態に関し、各週齢の非走行運動に対する走行群に上記関連遺伝子発現について PCR array 法 (84 遺伝子) により検出した。非走行群に対して 2 倍以上の遺伝子発現が検出され

た項目について結果は、10 週齢では、高発現遺伝子は、検出されなかったが、低発現遺伝子は、3 遺伝子 (細胞分化関連遺伝子) であった。6 ヶ月齢では、高発現遺伝子は、検出されなかったが低発現遺伝子は、23 遺伝子 (神経栄養因子-受容体、神経新生、成長因子、アポトーシス関連因子) であった。1 年 1 齢では、高発現遺伝子は 6 遺伝子 (神経栄養因子-受容体、神経ペプチド)、低発現遺伝子は、1 遺伝子 (アポトーシス) であった。2 年 2 齢は、高発現遺伝子は 26 遺伝子 (神経栄養因子-受容体、神経ペプチド、神経新生)、低発現遺伝子は、1 遺伝子 (アポトーシス) であった。運動による機能改善は、神経単独ではなく、神経活動を活性化させる関連因子について多面的な機能連関の中で考える必要があり、また週齢による遺伝子発現活性化の違いも明らかとなった。

長期の運動を行うことにより、神経栄養因子、神経形成成長因子やペプチド等が選択的に増加し、またアポトーシス因子が低発現となる結果となった。神経栄養因子が運動によって脊髄神経自体での発現が増加したことや、末梢器官で発現したその因子が脊髄内の血管や神経の逆行性輸送によって脊髄へ到達し、脊髄内の mRNA 発現量が上昇したため脊髄神経が活性化されている事が示唆された。

研究

1) 各群における TrkB 発現量の比較

走行群、非走行群の TrkB 発現量を比較した。各群における TrkB 発現量の平均値は、走行群が $110321.21 \mu m^2$ 、非走行群が $57246.69 \mu m^2$ であったが、有意差を認められなかった。非走行群に比べて走行群における TrkB 発現量は増加傾向であった。

2) 走行群、非走行群の GAP-43 発現量を比較した。各群における GAP-43 発現量の平均値は、走行群が $46874.58 \mu m^2$ 、非走行

群が $44416.41\mu\text{m}^2$ であった。有意差を認められなかった。

走行群・非走行群の2群間の TrkB および GAP-43 発現量に有意な差を認めなかったもの、非走行群に比べ走行群の TrkB 発現量が増加傾向となった。Macias ら²⁾ は、長期間の中等度負荷走行運動を行った老齢ラット脊髄における BDNF と TrkB mRNA の発現量について、BDNF については発現量の増加が認められているものの、TrkB mRNA については運動効果がみられなかったとしている。しかしながら非走行群に比べ走行群の TrkB 発現量は増加傾向となったことから、運動介入が TrkB 発現量増加に影響する可能性がある。Skup ら³⁾ の報告によると、成人ラットの長期自発運動は、BDNF と mRNA を活性化させ、それは前角細胞に見られる TrkB の活性化に付随して引き起こされるとしている。このことから、長期間の低負荷走行運動により老齢ラット脊髄においても TrkB が活性化したため、走行群の TrkB 発現量が増加傾向となったのではないかと考えられた。しかし Monica ら⁴⁾ は短期間で中等度の運動は、脊髄レベルの神経栄養因子の発現を高めると報告しており、中年ラット、老齢ラットを対象とした長期間の低負荷走行運動によるラット脊髄での BDNF 発現量はいずれの群についても優位な差は認められなかった。これらのことから、長期間での低負荷走行運動では脊髄レベルでの BDNF の発現量に与える影響は少なく、そのため TrkB 発現量も活性が少なかったと考えられた。

老化による神経栄養因子産生能力の低下が TrkB、GAP-43 の発現量に影響を与えている可能性がある。

研究

BDNF mRNA 発現量は、対照群の発現量を1とすると、走行群 1.2 倍、バランス群

0.6 倍であった。TrkB mRNA 発現量は、対照群の発現量を1とすると、走行群 2.2 倍、バランス群 1.1 倍であった。CREB mRNA 発現量は、対照群の発現量を1とすると、走行群 2.2 倍、バランス群 1.1 倍であったがそれぞれ有意差を認めなかった。

CREB は脳内では、長期記憶や空間認知に関わるタンパクとして知られており、ニューロンで合成される際にスイッチの役目や BDNF と結合することで神経保護に関与すると考えられている。老齢ラットでは、筋障害と類似して筋を支配する神経線維の減少、神経ペプチドや栄養因子の発現が減少する。バランス運動よりも走行運動の方が、筋収縮を促し、骨格筋で生産された神経栄養因子を逆行性輸送により脊髄へ供給し、中枢神経の活性化に関与している可能性が示唆された。

成体ラット脊髄とヒラメ筋を対象に走行における BDNF mRNA の発現量について、1日走行群では BDNF mRNA 発現に変化はみられず、5日間走行群では有意に高かった¹⁾。

組織の老化は全体的に神経栄養因子の不活性化から神経機能の低下をもたらす。高強度運動による酸化ストレスが発生し、酸化ストレスが神経栄養因子発現を抑制すること運動強度や運動時間による影響を考慮する必要がある。また他の器官での発現も比較することで、運動による神経栄養因子の発現に与える影響を多角的に検証する事が重要である。

< 引用文献 >

Gomez-Pinilla et al, J Neurophysiol 188:2187-2195,2002, Macias M et al, Acta Neurobiol Exp(2005).65:177-182.

Matylda Macias, Anna Dwornik, Ewelina Ziemińska, et al. Locomotor exercise alters expression of pro-brain-

derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB in the spinal cord of adult rats. *European Journal of Neuroscience*(2007);25:2425-2444

Skup M, Dwornik A, Macias M, et al. Long-term locomotor training up regulates TrkB(FL)receptor-like proteins, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. *Exp Neurol*(2002);176(2):289-307
Monica J. McCullough, Amy M. Gyorkos, John M. Spitsbergen. Short-term exercise increases GDNF protein levels in spinal cord of young and old rats. *Neuroscience*(2013):3-31

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Kanemura N, Moriyama H, Takemoto H, Imagita H, Maejima H, Kokubun T, Nishihara K, Takayanagi K

Locomotor exercise enhances selectively their expression of neurotrophins and receptors in the spinal cord of aged rats. *Society for Neuroscience*, 2012年10月13日から10月17日, ニューオーリンズ(米国)

Kanemura N, Imagita H, Maejima H, Murata K, Kokubun K, Takayanagi K
Exercise on a moving platform elicits different gene expression of neurotrophins and receptors in the spinal cord of aged rats. *Experimental Biology*, 2013年4月20日から4月24日, ボストン(米国)

金村 尚彦, 森山 英樹, 今北 英高, 前島 洋, 武本 秀徳, 木藤 伸宏, 国分 貴徳, 村田 健児, 五味 敏昭, 高柳 清美.
ラット脊髄におけるグリア細胞株由来栄養因子 - 受容体 mRNA 発現量に対するバランス運動の影響 第48回日本理学療法学会大会, 2013年5月24日から5月26日, 名古屋市

金村 尚彦, 村田 健児, 国分 貴徳, 武本秀徳, 今北 英高, 藤野 努, 森山 英樹, 前島 洋, 高柳 清美, 運動様式の違いが老齢ラット腰髄神経活性化に与える影響、第33回関東甲信越ブロック理学療法士学会、2014年10月25日から10月26日、千葉幕張メッセ(千葉)

吉野晃平, 森下佑里, 中島彩, 金村尚彦,
トレッドミル走行運動がラット脊髄BDNF発現量の与える影響、第33回関東甲信越ブロック理学療法士学会、2014年10月25日から10月26日、千葉幕張メッセ(千葉)

6. 研究組織

(1) 金村 尚彦(KANEMURA, Naohiko)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授
研究者番号: 20379895

(2) 研究分担者

高柳 清美(TAKAYANAGI, Kiyomi)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号: 20274061

(3) 連携研究者

今北 英高(IMAGITA, Hidetaka)
畿央大学・健康科学部・教授
研究者番号: 00412148

森山 英樹(MORIYAMA, Hideki)
神戸大学大学院・保健学研究科・教授
研究者番号: 10438111

前島 洋(MAEJIMA, Hiroshi)
北海道大学院・保健学研究院・教授
研究者番号: 60314746