

令和元年6月5日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01603

研究課題名(和文) ストレスが引き起こす生体防御反応が運動学習に及ぼす影響とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Influences of stresses to motor learning

研究代表者

加藤 明 (KATOH, Akira)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：70546746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はストレス反応と運動学習とのクロストークを明らかにすることを目的とした。拘束ストレス負荷により前庭動眼反射運動学習が低下する一方、短期ストレス負荷中の室傍核ニューロンの選択的抑制によって運動学習効率が改善した。これは室傍核から分泌されるストレス反応を引き起こすCRFが運動学習を制御する神経回路に対して負の方向に働いたことを示している。小脳に投射する下オリブ核のCRFは運動学習に正に働くことから、ストレスを受けることで室傍核からCRFが大量に放出されると、未知のプロセスによって下オリブ核におけるCRFの発現が抑えられ、小脳での運動学習プロセスが抑制されている可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

効果的な運動学習を行なうためには、トレーニングの強度だけでなく、いかにストレスを調節するかが重要であることは経験的に知られているが、運動学習の効率に及ぼすストレスの影響については行動学的・心理学的アプローチが多く行なわれており、その神経回路メカニズムの詳細については不明な点が多い。本研究で得られた、同じCRF分子が脳内の発現個所により運動学習に対して逆方向の働きを担うという結果は、将来的にスポーツやリハビリテーションにおける効果的なストレス抑制につながる意義深い結果となった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to approach the mechanisms of influences of stresses to motor learning. We found that restraining stresses impaired motor learning of the VOR in mice and that such impaired motor learning was improved by the selective suppression of PVN neurons during stress using optogenetics. These results suggest that CRF molecules released from PVN neurons, which is known to initiate stress responses, negatively affect on motor learning, although CRF has also been known to be essential in the cerebellum for the cerebellum-dependent motor learning. It is interesting that CRF molecules work differentially on motor learning, depending on where they are, and how we would reduce stresses to generate better training methods for sports or rehabilitation should be considered.

研究分野：神経生理学

キーワード：ストレス 運動学習 眼球運動 コルチコトロピン放出因子 室傍核 トレーニング

1. 研究開始当初の背景

ストレスは我々の行動に様々な影響を及ぼす。外界から通常とは異なる刺激を受けると、脳からの指令を介して、様々な器官で内分泌系が活性化されることで最終的に行動に変化が顕れる。本申請者は、運動学習の中枢メカニズム解明を目指して、遺伝子から神経回路、行動に至る多様な側面からアプローチを行ってきた。運動学習は、トレーニングによるスポーツの技能向上、運動障害患者のリハビリテーション等、私たちの日常生活にも深く関わっている。効果的な運動学習を行なうためには、トレーニングの強度だけでなく、いかにストレスを調節するかが重要であることは経験的に知られているが、運動学習の効率に及ぼすストレスの影響については行動学的・心理学的アプローチが多く行なわれており、その神経回路メカニズムの詳細については不明な点が多い。

コルチコトロピン放出因子 (corticotropine releasing factor: CRF) はストレス反応の鍵となる分子の一つである。通常 CRF は、ストレスを受けると視床下部室傍核の小型ニューロンから放出され、脳下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン分泌、副腎からのグルココルチコイドホルモン分泌を介する抗炎症作用等の一連の生体防御反応を引き起こす。近年、CRF 等のストレス関連因子が海馬の神経新生や海馬依存的学習に悪影響を及ぼすことが明らかとなってきた (Lehmann, 2013 等)。CRF は室傍核以外に、運動学習プロセスにおいて誤差信号を小脳に伝える下オリブ核ニューロンから放出され、小脳プルキンエ細胞上に発現する CRF 受容体に作用する。CRF 受容体を阻害すると長期抑圧と呼ばれるシナプス可塑性が生じなくなることが *in vitro* の系で示され (Miyata, 1999; Schmolesky, 2007)、また最近申請者らは、CRF の小脳局所投与が歩行協調運動学習獲得に対して正の方向に働くことを明らかにした (Takeuchi, Katoh, 2016)。これらの結果は、長期抑圧に重要な下オリブ核ニューロンから放出される CRF が、室傍核ニューロンから分泌されるストレス反応の引き金となる CRF とまったく異なる役割を持つことを示唆するが、ストレス反応における CRF との関係についてはよくわかっていない。また、ストレス負荷時に室傍核から分泌される CRF が運動学習に対して影響を及ぼすメカニズムについても明らかになっていない。本申請者は、CRF の時間的・空間的及び量的制御が運動学習に対して正負各方向への影響を及ぼすと考え、本プロジェクトを提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、急性あるいは慢性ストレス負荷により引き起こされるストレス反応と運動学習効率との関係、及び Optogenetics を用いた生体における CRF 分泌細胞の抑制が運動学習に及ぼす影響を解析することで、運動学習における CRF の役割及び学習効率改善につながるストレス反応抑制のメカニズムについて明らかにすることを目的とする。運動学習の評価には、前庭動眼反射 (vestibulo-ocular reflex: VOR) という反射性眼球運動の系をマウスに適用する。VOR は制御神経回路がよく知られており、また他の手法と比べ定量性に優れている。具体的な研究目的は以下の2つである。

- (1) 異なるストレス環境下における尿中コルチコステロン濃度の変化及び反射性眼球運動学習への影響
- (2) CRF 発現細胞選択的 ArchT 発現マウスを用いた、局所光刺激による神経回路特異的 CRF 分泌抑制とその運動学習への効果

3. 研究の方法

C57BL/6 系統の雄マウス (12-24 ヶ月齢) と及びアーキロドプシンプロトンポンプ ArchT を CRF 発現細胞選択的に発現するマウスである CRF-ArchT 雄マウス (12-24 ヶ月齢) を用いた。アーキロドプシン (ArchT) は藻類由来のプロトンポンプであり、緑色光によって活性化し、発現している細胞を過分極化することでその興奮を抑制する。ArchT 遺伝子を導入した R26 BAC::pCAG-loxP-ArchT-EGFP マウス (京都大学の今吉先生より供与) は、ArchT 遺伝子の upstream に loxP に挟まれたストップコドンがあることから、通常 ArchT を発現しない。このマウスと、CRF プロモーターの下流に Cre リコンビナーゼ遺伝子を導入した CRF-iCre ノックインマウス (東北大学の井樋先生より供与) とを掛け合わせることで、CRF 発現細胞選択的に ArchT が発現するダブルヘテロマウスを得た。

- (1) 異なるストレス環境下における尿中コルチコステロン濃度の変化及び反射性眼球運動学習への影響

拘束ストレス及び同居ストレス負荷による尿中コルチコステロン濃度変化の解析

拘束ストレスでは、C57BL/6 マウスの頭部につけたヘッドポストをナットを用いて固定し、体幹部はポリ塩化ビニル製の管に入れ、緩やかに固定した。同居ストレスは、通常ケージに親の違うマウスを 1 匹ずつ入れ、放置した。拘束ストレス、同居ストレスどちらにおいても 90 分、または 180 分間の短期ストレス負荷、または 1 日 180 分のストレス負荷を 5~

7日間連続して行う長期ストレス負荷を行った。いずれも60-90分おきに水を与えた。ストレス負荷前後には尿サンプルを採取し、ELISA法を用いて(コルチコステロン濃度はAssay Max Corticosterone ELISA Kit, Assaypro, 内部標準であるクレアチニン濃度はLabAssay Creatinine, Wako)クレアチニンモル濃度あたりのコルチコステロン濃度を算出した。

拘束ストレス負荷が反射性眼球運動に与える影響

VOR誘発には、頭部を固定したマウスを載せた回転台を地面と水平に振り子状に回転させることで前庭刺激を与えた。回転台の最大角速度は $10^{\circ}/s$ 、周波数は $0.5Hz$ とした。Matlabによる自作プログラムを用いて角速度を求め、正弦近似により、前庭刺激との速度振幅比(gain)を計算した。計測は暗所で行った。

90分間のストレス負荷直後あるいは一日180分の拘束ストレスを7日間続けた後にVORの運動学習を引き起こすトレーニングを30分間行い、トレーニング前後のVOR gainを比較した。トレーニングパラダイムには、前庭刺激と逆位相に組み合わせた視覚刺激を用いた。

(2) CRF発現細胞選択的ArchT発現マウスを用いた、局所光刺激による神経回路特異的CRF分泌抑制とその運動学習への効果

CRF-ArchTマウスの頭部に挿入したガイドチューブを用いて波長525nmの光を発するファイバーにより室傍核周辺への緑色光照射を行った。刺激条件は525nm、20hz、5ms-pulseで行った。短期ストレス負荷マウスについては90分間のストレス負荷開始30分後からトレーニング終了まで光刺激を行った。長期ストレス負荷マウスについては180分のストレス負荷中に光刺激を行い、これを7日間継続して行った。(1)と同様、VORの運動学習を引き起こすトレーニングを30分間行い、トレーニング前後のVOR gainを比較した。トレーニングパラダイムには、前庭刺激と逆位相に組み合わせた視覚刺激を用いた。

4. 研究成果

(1) 拘束ストレス及び同居ストレス負荷による尿中コルチコステロン濃度変化の解析

まず、生体ストレス反応の指標の一つとして通常用いられる血中コルチコステロン濃度に対し、よりサンプリング時の侵襲性が低い尿中コルチコステロン濃度とストレス負荷との相関をC57BL/6マウスを用いて調べたところ、拘束ストレス、非同腹雄との同居ストレス共に、負荷後90-180分にかけて尿中コルチコステロン濃度が上昇した。長期ストレス負荷では、短期ストレス負荷と同様に、各実験日における180分間の拘束ストレス負荷後の尿中コルチコステロン濃度はストレス負荷前と比較して増加した。5~7日間のストレス負荷期間を通じてストレス負荷前のコルチコステロン濃度に有意な上昇が見られないことから、一日180分のストレス負荷を5日~7日間継続する長期ストレスによる尿中コルチコステロン濃度への影響は見られなかった。一方、拘束ストレスと比較して、同居ストレスはDay3以降ストレス負荷前後の濃度がほとんど変化しなかった(図1)。

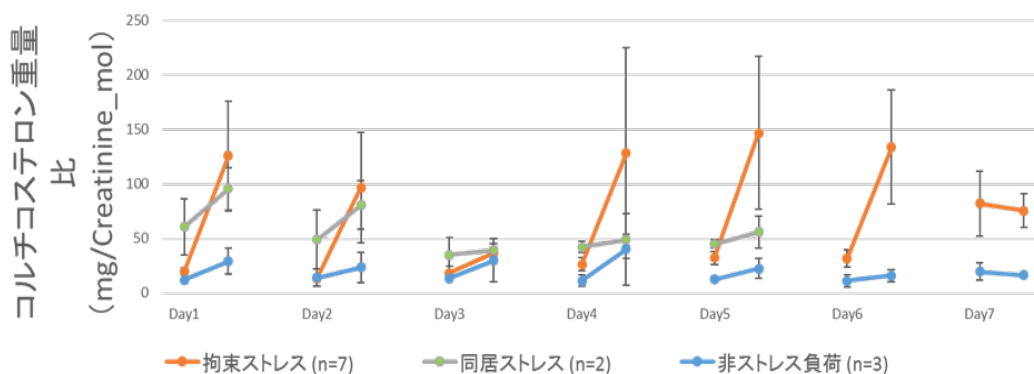


図1. 長期ストレス負荷による尿中コルチコステロン濃度の変動

(1) 拘束ストレス負荷が反射性眼球運動に与える影響

拘束ストレス負荷後に前庭動眼反射運動学習を行なったところ、ストレス負荷前と比べ、90分間のストレス負荷後では前庭動眼反射運動学習が低下した(図2)。また、一日180分の拘束ストレスを7日間継続して与えたあとでは、ストレス負荷前と比べ前庭動眼反射運動学習が低下する傾向を示した(図3)。

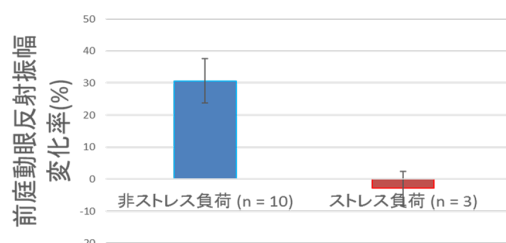


図2. 短期ストレス負荷による VOR 運動学習への影響

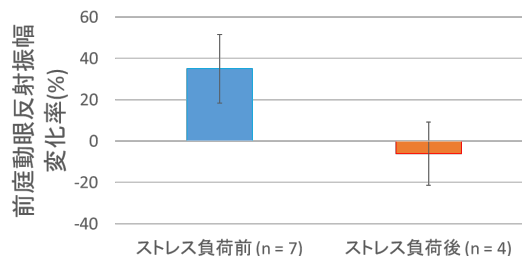


図3. 長期ストレス負荷による VOR 運動学習への影響

(2) CRF 発現細胞選択的 ArchT 発現マウスを用いた、局所光刺激による神経回路特異的 CRF 分泌抑制とその運動学習への効果

緑色光照射により活性化するプロトンポンプ ArchT を CRF 発現細胞選択的に発現する CRF-ArchT マウスを用いて、短期ストレス負荷及びトレーニング中に光刺激による室傍核神経細胞の抑制を行ったところ、ストレス負荷後の運動学習が改善する傾向を示した(図4)。また、一日180分間の拘束ストレス負荷を7日間続け、ストレス負荷中に光刺激による室傍核神経細胞の抑制を行ったマウスでは、運動学習効率が低下した。

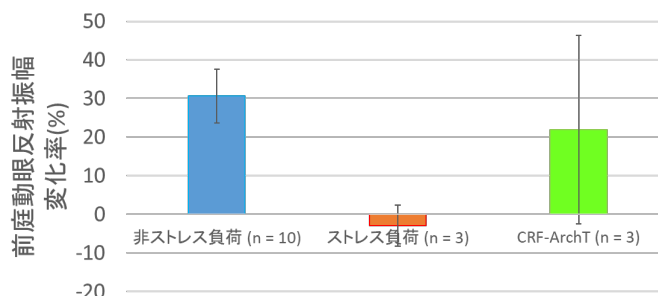


図4. 短期ストレス負荷下の CRF-ArchT マウスにおける光刺激による VOR 運動学習効率の変化

本研究により、短期ストレス負荷の指標として、採取時の侵襲性が低く、動物の負荷が小さい尿中のコルチコステロン濃度を用いる有用性が示された。一日180分の拘束ストレスを7日間継続して与えたところ、ストレス負荷前の値が有意に上昇していないことから長期におけるコルチコステロン濃度への影響が見られなかった一方で、7日間のストレス負荷後では VOR 運動学習が低下する傾向を示した。この結果は、尿中コルチコステロン以外の別の指標が長期のストレス負荷の指標に有効である可能性を示唆している。また、同居ストレスでは拘束ストレスと比較して尿中コルチコステロン濃度の変化が少なかったことから、ストレスの種類によっても尿中コルチコステロン以外の指標を用いる必要があると考えられる。

また、短期拘束ストレス負荷直後では前庭動眼運動学習が阻害されることに加え、7日間に渡り拘束ストレスを継続して与えることで、ストレス負荷直後ではなくとも前庭動眼反射運動学習が低下する傾向を示すことがわかった。更に、短期ストレス負荷中の光刺激による室傍核ニューロンの抑制によって前庭動眼反射運動学習効率が一部改善したことは、室傍核から分泌されるストレス反応を引き起こす CRF が運動学習を制御する神経回路に対して負の方向に働いたことを示唆している。CRF は長期抑圧における必須因子であることが報告されていることから、ストレスを受けることで室傍核から CRF が大量に放出されると未知のプロセスによって下オリブ核における CRF の発現が抑えられ、長期抑圧が抑制されている可能性が考えられる。同じ CRF 分子が脳内の発現個所により運動学習に対して逆方向の働きを担うという今回の結果は、ストレス抑制による効率的な運動学習成立には、その手法・タイミング等を工夫する必要があることを示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kakegawa, W., Katoh, A., Narumi, S., Miura, E., Motohashi, J., Takahashi, A., Kohda, K., Fukazawa, Y., Yuzaki, M., Matsuda, S., Optogenetic Control of Synaptic AMPA Receptor Endocytosis Reveals Roles of LTD in Motor Learning, Neuron, Vol.99, 985-998, 2018. 査読有
2. 加藤明 空間認知における前庭動眼反射適応のメカニズム. バイオメカニズム学会誌 vol.41, No.4, 171-175, 2017. 査読無
3. Hatanaka T, Takeuchi E, Katoh A, Yamaki T, Uchida M and Natsume H. Preparation of bioadhesive phosphorescent particles and their use as makers for video-oculography. Tokai J Exp Clin Med, 41, 46-53, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 木村 穰、加藤 明、阿部如子、本杉 奈美、坂部 貢 ヒト Neuropathy Target Esterase 高発現マウスとマウスホモログ遺伝子変異マウスの行動解析 第 41 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2018.11.28-30), 1P-0528
2. Akira Katoh and Aiko Yamagiwa Inhibition of PVN neurons influences stress-induced changes of motor learning in the VOR. The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA2018.11.3-7), 067.14
3. 加藤明.「眼」で診る脳 ~前庭動眼反射を中心として~. 第 10 回日本スポーツ視覚研究会 (東京都医師会館、東京, 2018. 8)
4. 加藤 明、酒井 駿一、遊部 雅生、立崎 武弘、坂部 貢、木村 穰 Influence of formaldehyde gas exposure to reflexive eye movements in mice Mechanisms for stimulus generalization of learned changes in the vestibulo-ocular reflex. 第 41 回日本神経科学大会 (神戸・神戸国際会議場, 2018.7.27-30)
5. 加藤明. 眼は心の窓 - 心を可視化する眼球運動研究 -. 知の拠点あいち重点研究プロジェクト第 II 期採択テーマ 「眼球運動を指標としたドライバ検知技術の実用化」チーム 平成 29 年度公開シンポジウム (中部大学、愛知, 2018.3.16)
6. Akira Katoh. Computational analysis to identify potential instructive signals for an oculomotor learning process. 4th Dynamics Days Central Asia (Bukhara, Uzbekistan, 2017.10.21-23)
7. 加藤明 「前庭動眼反射の運動学習を引き起こす instructive signal」Life Engineering Symposium (岐阜大学、岐阜 2017.9.4-6)
8. 木村 穰, 加藤 明, 本杉 奈美, 大久保 朋一, 畑中 朋美, 坂部 貢, 田中 正史 ヒト Neuropathy Target Esterase 遺伝子導入マウスを用いたシックハウス症候群関連化学物質の生体影響の解析 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜パシフィコ 2016.11.30-12.2) 1P-0541
9. Katoh A, Hatanaka T, Kimura M, Takeuchi E. Positive contribution of corticotropin releasing factor on motor learning. 15th MOLECULAR and CELLULAR COGNITION SOCIETY MEETING (Westin Gaslamp Quarter&Convention Center, San Diego, USA, 2016.11.10-11) ID1902
10. Takeuchi E, Hatanaka T, Katoh A and Kimura M. The role of corticotropin releasing factor on motor learning. 10th FENS Forum 2016 (Bella Center, Copenhagen, Denmark 2016.7.2-6) D058
11. 加藤 明, 三島亜希子, 麥倉信一郎, 立崎武弘, 遊部雅生, 坂部 貢, 木村 穰 ホルムアルデヒドガス曝露による反射性眼球運動への影響 第 25 回日本臨床環境医学会学術集会 (郡山商工会議所会館、福島、2016.6.17-18) O-28

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：木村 穰

ローマ字氏名：KIMURA, Minoru

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10146706