

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月12日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500483

研究課題名（和文） 老齢と廃用による膝関節の感覚機能低下を回復させる運動の賦活作用

研究課題名（英文）

Physical exercise enhanced the sensory function in the knee joint with aging and disuse

研究代表者

金村 尚彦（KANEMURA NAHIKO）

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・講師

研究者番号：20379895

研究成果の概要（和文）：

本研究は、老齢期における運動が、膝関節の神経機能を活性化させるのかどうか分析する事を目的とした。免疫組織化学染色では、脊髄における神経栄養因子陽性神経が増加することが認められた。また生化学分析では、老齢期では運動により腰部脊髄神経における神経栄養因子 mRNA は選択的に活性化された。運動は、腰髄神経自体の生理学的過程により、神経栄養因子やその受容体 mRNA の発現を活性化させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of study is to analyze whether physical exercise enhanced the neural function in the knee joint with aging and disuse. Exercised rats showed a quantitative increase neurotrophin immunostaining that was mostly evident in the spinal cords. In biochemical assay, exercise increases selectively expression of neurotrophins and receptors mRNA in the lumbar spinal cord in senescence. These results suggest that exercise enhanced neurotrophins and their receptors by physiological process that it is endogenous in the lumbar spinal cords which innervate the knee joints.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：基礎リハビリテーション

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：老化、運動、感覚機能

1. 研究開始当初の背景

高齢者の転倒は、何らかの原因により姿勢制御が不能になり、姿勢反射などで対応できない場合に発生する。地域在宅高齢者を対象とする研究では、「過去の転倒経験」がその後の転倒にきわめて強い予知因子となっている（Takazawa K et al. Disabil Rehabil 2003;25(8):399-404）。また2002年の全国調査では、大腿骨頸部骨折が1年間で11万7900件発生しており、国内での1年間に大腿骨頸部骨折による医療・介護費用は

年間7277億円で、医療・介護費総額の約5%を占めている。さらに2010年には約17万人、2043年には約27万人と患者数の増加が予測されている（林泰史 日老医誌 2007:44 591-594）。転倒を予防し、骨折を防ぐ対策を行うことは社会的にも急務である。

身体を制御する場合、個々の構成体を統合する上位中枢における運動制御として、神経運動器協調機構がある。中枢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。姿勢制御には膝関節や股関節などに存在する機械受容器からの情報が重要である (Bloom et al. Exp Brain Res 2000 13: 375-391). 転倒を防止するために、神経伝達機能や感覚器の機能を維持向上させる事はバランス機能を高めるうえで重要な要因である。

2. 研究の目的

老化の影響について、運動介入の効果についてその基礎的データを提示することを目的とする。

- ① 末梢(膝関節)から中枢神経系までの神経伝達プロセスがどのように行われているか
- ② 神経栄養因子-受容体系の遺伝子発現について腰髄レベルの神経栄養因子と受容体の発現にどのような影響を及ぼすのか
- ③ 走行運動によりどのような影響をうけるか

3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラット(日本 SLC, 浜松, 日本) 25 匹(老齢群 2 年齢 13 匹, 成体群 10 週齢 12 匹)を対象とした。走行群, 非走行群とランダムに分けた(老齢走行群 6 匹, 老齢非走行群 7 匹, 成体走行群 5 匹, 成体非走行群 7 匹)。走行群は小動物用トレッドミル(大阪マイクロシステムズ, 大阪, 日本)を使用し走行運動を課した。走行運動終了後すべてのラットにおいてネブタールにて深麻酔した。4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した後、脊髄(L3-5)を摘出し、実験終了後にラットをネブタールにて麻酔後、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定した後、脊髄 L1-L5 レベルで摘出し、後固定(4%パラホルムアルデヒド)を行った。その後、pH7.2 の 0.01Mリン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline, 以下 PBS)に以下の濃度のスクロースを加えた PBS で洗浄を行った。

- ① 10%スクロール入り PBS にて 4 時間浸漬
 - ② 15%スクロール入り PBS にて 4 時間浸漬
 - ③ 20%スクロール入り PBS にて 12 時間浸漬
- その後 OCT コンパウンドに組織を浸漬し、液体窒素で -100°C に冷却したイソペンタン・ヘキサン混合液の中で急速凍結した。凍結組織から、クリオスタット(CM3050S Leica 社製 ドイツ)を用いて約 $12\mu\text{m}$ 厚の横断切片を作成した。液体窒素で -100°C に冷却したイソペンタン・ヘキサン混合液の中で急速凍結した。凍結組織から、クリオスタット(CM3050S Leica 社製 ドイツ)を用いて約 $12\mu\text{m}$ 厚の横断切片を作成した。一次抗体として、脳由来神経栄養因子

(brain-derived neurotrophic factor, 以下 BDNF) とその受容体 Tyrosin Kinase B (TrkB) Neurtrophin 3 (NT3), TyrosinKinase C (TrkC) と二次抗体 Cy3 を用いて、蛍光顕微鏡にて観察した。また酵素抗体法、一次抗体 BDNF を用いて、脊髄神経を可視化し、画像解析ソフト WinRoof Professional (三谷商事製) で解析した。

生化学分析では、RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用しプロトコルに従い total RNA を抽出した。High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, United States) を用いてプロトコルに従い、Palm Cycler CG1-96 (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用し逆転写反応により cDNA を作製した。リアルタイム PCR 法(The Chromo4 Real-Time Detector (Bio-Rad Laboratories, Hercules, United States) にて mRNA 発現量を解析した。ターゲット遺伝子は、Neuro growth factor (NGF) とその受容体 Troshin Kinase A (TrkA), BDNF とその受容体 TrkB, NT3 とその受容体 TrkC, Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), GFR α 1 (GDNF family receptor alpha 1) GFR α 2, (GDNF family receptor alpha 2), また内部標準遺伝子として beta-actin を利用し、正規化後、解析を行った。

統計解析は、組織像から得られた陽性細胞をグレースケール化し、濃淡値と脊髄レベルにおける神経栄養因子とその受容体における mRNA 発現量の比較について一元配置分散分析と多重比較 Tukey 法を用いた。

本研究は、埼玉県立大学動物倫理委員会の承認のもとに実験を行った。

4. 研究成果

1) 組織像

免疫組織化学染色法 アビジン・ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法 (avidin biotin-peroxidase complex method: ABC 法) を用い、脊髄前角付近を検鏡した結果を示す。

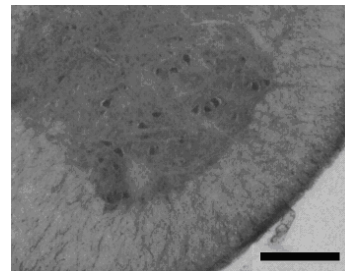
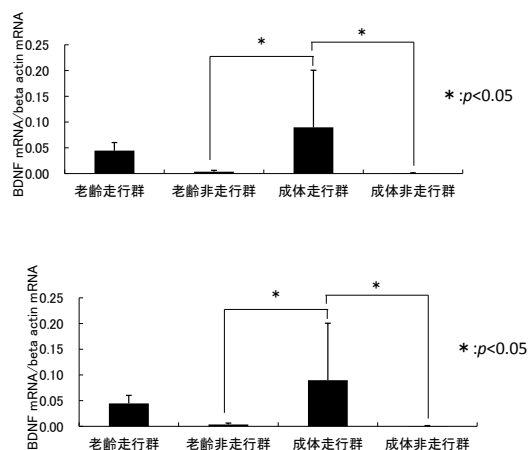


図 1. 若齢走行群の脊髄前角エリア
Bar=500 μm

画像解析 BDNF 陽性神経細胞について定量化を行った。成体走行群は、対照群に比べて、濃染された神経細胞が増加した ($p < 0.05$) (図 1)。同様に、老齡走行群については、老齡対照群と比較して、陽性神経細胞が増加傾向を示した。

2) 生化学分析

腰髄レベルにおける発現量を比較した結果、NGF, TrkA mRNA 発現量について、老齡群、成体群ともに有意差を認めなかった。BDNF mRNA 発現量においては、成体群では走行群と非走行群の間に有意な差が生じた ($p < 0.05$)。老齡非走行群と成体走行群に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。TrkB mRNA 発現量においては、老齡走行群と成体走行群の間に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。老齡非走行群と成体走行群 ($p < 0.01$)、成体走行群と成体非走行群の間においても有意な差が認められた ($p < 0.01$)。(図 3)。



(図 3)。

NT3 mRNA について、老齡群、成体群ともに有意差を認めなかった。TrkC mRNA 発現量は、成体走行群と比較して老齡群と比較して、有意に増加した ($p < 0.05$)。

GDNF mRNA 発現量は、成体走行群と比較して老齡走行群、老齡非走行群、成体非走行群と比較して、有意に増加した ($p < 0.05$)。GFR α 1 mRNA 発現量は、老齡走行群と比較して成体非走行群に比べ有意に増加した ($p < 0.05$)。GFR α 2 mRNA 発現量は、各群ともに有意差を認めなかった。

4. 考察

神経栄養因子は、筋、皮膚、脳、神経などで産生される。特に BDNF は、運動は海馬をはじめとする脳内の様々な領域に加え骨格筋での BDNF や TrkB 受容体の発現が増加することが報告されている。また BDNF mRNA 発現レベルは心臓、脾臓、後根神経節、脊髄に多く、TrkB mRNA は広範に発現しており、一般

臓器にも広くみられたが、脊髄、脳、後根神経節に発現レベルが高い。BDNF は中枢神経系に多く存在しているが、血液中にも存在する¹⁾。血小板内には血中の 90%以上の BDNF が蓄えられているが、血小板での mRNA 発現レベルでは低値であることから、他の組織から BDNF を得ていると考えられる。本研究では脊髄レベルでの発現量を検討したため、他の組織での発現量を確認することはできなかった。

成体群において長期の運動で発現量が高値であったのは、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 BDNF 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 BDNF 濃度が上昇したため脊髄神経が活性化されたのではないかと推測された^{19, 23, 24)}。

また、Gomez-Pinilla らは走行運動を課したラットの腰髄を対象に、BDNF の発現について検討した。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と報告している。このことからニューロトロフィンの発現は継続して運動を行うことで変化する、運動の慢性効果として捉えることができる可能性がある。本研究では1ヶ月間の走行運動を課したことから、慢性効果として発現量が増加していることが考えられた。

老齡期では、運動によって神経栄養因子 mRNA の産出されるもののその発現量が成体群と比べて低い。末梢臓器の神経栄養因子 mRNA を産出する能力の低下や、逆行性輸送能力の低下などにより神経栄養因子発現量が低下したと考えられる。成体期と比較して、老齡期では、神経栄養因子とその受容体において、発現様式が変化する可能性が示唆された。対象週齢を拡大し、運動によりどのように神経栄養因子が活性化されるのかそのプロセスについて検討することが必要である。

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 1 件)
Hideki Moriyama · Naohiko Kanemura · Inge Brouns · Isabel Pintelon · Dirk Adriaensen · Jean-Pierre Timmermans (他4名) Effects of aging and exercise training on the histological and mechanical properties of articular structures in knee joints of male rat. Biogerontology. In press (査読有)
 DOI10.1007_s10522-012-9381-8

[学会発表] (計 3 件)

- ① Naohiko Kanemura, Inge Brouns Isabel Pintelon, Hidenori Takemoto Hideki Moriyama, Kiyomi Takayangi, Hiroyuki Hayashi, Hideo Naruse, Akihiko Kimura, Dirk Adriaensen, Jean-Pierre Timmermans, Toshiaki Gomi. Effect of locomotor exercise on the expression of BDNF and TrkB in the spinal cord of aged rats. 第115回解剖学会総会・全国学術集会. 平成22年3月29日. 岩手県盛岡市.
- ② 金村尚彦 森山英樹 高柳清美 林弘之 五味敏昭. 走行運動によるラット脊髄 GDNF-受容体 mRNA の発現に与える影響. 第117回日本解剖学会総会, 全国学術集会 2012年3月26日 山梨県甲府市
- ③ 金村尚彦, 森山英樹, 今北英高, 武本秀徳, 木藤伸宏, 国分貴徳, 碓友子, 五味敏昭, 高柳清美. ラット脊髄における神経成長因子-受容体 mRNA 発現量に対する走行運動の影響. 第47回日本理学療法学術大会 平成24年5月26日 兵庫県神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金村 尚彦 (KANEMURA NAHIKO)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・講師
研究者番号：20379895

(2) 研究分担者

今北 英高 (IMAGITA HIDETAKA)
畿央大学・健康科学部・教授
研究者番号：00412148
武本 秀徳 (TAKEMOTO HIDENORI)
県立広島大学・保健福祉学部・助教
研究者番号：10453218
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
森山 英樹 (MORIYAMA HIDEKI)
埼玉県立大学・保健福祉学部・講師
研究者番号：10438111 (平成21年度)

(3) 連携研究者

森山 英樹 (MORIYAMA HIDEKI)
広島大学大学院・保健学研究科・講師
研究者番号：10438111 (平成22年度から平成23年度)

(4) 研究協力者

木藤 伸宏 (KITO NOBUHIRO)
広島国際大学・保健学研究科・准教授
研究者番号：40435061