

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 2月 9日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500619

研究課題名(和文) 中枢神経系抑制性シナプス伝達の制御による運動学習増強に関する実験動物学的研究

研究課題名(英文) Inhibition of GABAergic synapses modulates motor control and the expression of neurotrophins in motor cortex

研究代表者

前島 洋(MAEJIMA, HIROSHI)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授

研究者番号：60314746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では運動とGABA受容体の阻害がマウスの大脳皮質運動関連領域における神経栄養因子の発現に与える影響について検証した。運動介入はBDNF、NT-4の発現は増強したが、安静群に対するGABA受容体阻害による発現修飾は認められなかった。一方、運動群に対してGABA受容体阻害を行った場合、BDNF、NT-4の発現は安静群マウスの発現量にまで低下した。従って、GABA受容体阻害は大脳皮質運動関連領域におけるBDNF、NT-4の運動依存的な発現増強を阻害することが明らかとなり、興奮性入力と抑制性入力の適切なバランスが運動依存的な神経栄養因子発現増強に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study was to investigate the effects of exercise and the inhibition of GABAergic synapses on the expression of neurotrophins in the mouse motor cortex. After the intervention compromising exercise and GABA receptor blockage for 10 days, where exercise significantly increased the expression of BDNF and NT-4, GABA receptor blockade of sedentary mice showed no effect on the expression of the neurotrophins. On the contrary, GABA receptor blockade of exercised mice significantly decreased the expression of BDNF and NT-4 to the level of sedentary mice, indicating that GABA receptor blockade removed the exercise-induced up-regulation of BDNF and NT-4. Taken together, the present study elucidated that GABA receptor blockade negatively modifies exercise-induced up-regulation of neurotrophins and neural activity in the motor cortex.

研究分野：理学療法学

キーワード：運動 神経栄養因子 GABA シナプス

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床的背景：限られた理学療法診療時間内で有効な運動療法による運動学習効果が期待されるが、高齢者や中枢神経系疾患等の多くにおいて、運動療法時の覚醒レベルを含む中枢神経系全般の譜活レベルの低下、感受性の低下等の抑制状態によりアウトカムが大きく阻害されている。

(2) 本研究の神経科学的背景として、中枢神経系における神経活動は、グルタミン酸受容体を中心とする興奮性シナプス後電位 (EPSP) と GABA 受容体やグリシン受容体による抑制性シナプス後電位 (IPSP) により調整される。上記の中枢神経系全般の抑制状態においては、抑制系が優位となり、刺激に対する域値が高く、運動療法時の神経活動 (神経回路) に依存した学習が阻害されていることが示唆される。これに対し、最新の報告において、老化およびアルツハイマー病モデルマウスにおける GABA 受容体の阻害による適度の興奮性の増強は、マウスの迷路学習を促進し、グルタミン酸受容体を取り巻く可塑的修飾を海馬にて促進している。また、脳損傷モデルマウスを対象とする実験においても、脳損傷後の GABA 受容体の発現減少を伴う GABA 受容体活性低下がその後の機能回復に極めて重要であることが報告されている。これらの報告も踏まえ、GABA 系入力の適切な抑制は運動機能を含む機能の促進に対して広く影響することが期待される。

一方、過度な興奮は、脳卒中直後の損傷神経細胞からのグルタミン酸の過剰放出や癲癇によるグルタミン酸作動性 NMDA 受容体の過剰カルシウム細胞内流入による神経細胞死に見られる興奮毒性としても働く。

運動学習の転移において広く大脳皮質運動関連領域における可塑的なシナプス修飾が重要となる。神経受容体の機能修飾はシナプス可塑性の重要なターゲットであり、特に皮質神経細胞における主要な興奮性受容体としてはたらくグルタミン酸作動性の NMDA 受容体は、広く学習にともなう長期増強 (LTP) の素子蛋白として機能している。このとき、BDNF をはじめとする神経栄養因子が促進因子として発現増強が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、GABA 抑制系の阻害により、運動機能の増強とそれに伴う以下の大脳皮質運動関連領域のシナプス受容体、神経栄養因子の発現が促進することを仮説として、その検証を行うことを目的とした。

大脳皮質運動関連領域の修飾において SFK は直接 NMDA 受容体 NR2 サブユニットをリン酸化し、NMDA 受容体の活性を促進する。神経栄養因子 BDNF はそのレセプター (TrkB) の活性を通して、SFK 活性を介在し

て NMDA 受容体を活性化する。その活性は BDNF 発現を更に増強する。このようにシナプス受容体と神経栄養因子発現は相互作用の関係を有している。従って、本研究ではマウスを対象に、運動と GABA 受容体阻害の2つの要因とその相互作用が以下の運動機能の促進 (或いは抑制) とその背景となる大脳皮質運動関連領域におけるシナプス受容体、及びその修飾因子である神経栄養因子の発現に与える影響を精査することを目的とした。

(1) 運動機能評価：GABA 受容体抑制による運動機能の修飾について検証を行う。

(2) シナプス修飾要因の検証として、大脳皮質運動関連領域における下記のシナプス受容体及びその修飾因子が GABA 受容体阻害によりどのように発現修飾されるか検証を行う。

NMDA 受容体 (NR1 サブユニット, NR2A サブユニット) の修飾

神経栄養因子 (BDNF, NT-4) とその受容体 (TrkB, p75) の修飾

神経活動マーカー (c-fos) 発現の修飾

3. 研究の方法

研究デザインとして、はじめに運動介入下における GABA_A 受容体阻害が運動機能と大脳運動関連領域のシナプス修飾に与える効果に関する検証を行い、次にその研究結果を踏まえた修飾要因を検証するための研究デザインを検討した。即ち、(1) 運動介入下における GABA_A 受容体阻害が運動機能と大脳運動関連領域のシナプス修飾に与える効果、及び(2) 運動機能と大脳皮質運動関連領域のシナプス修飾に対する運動介入と GABA_A 受容体阻害の相互作用に関する検証より構成された。

(1) 研究1：運動介入下における GABA_A 受容体阻害が運動機能と大脳運動関連領域のシナプス修飾に与える効果の検証

対象

介入開始時において15週齢の雄性 ICR マウスを使用し、運動介入と並行して GABA_A 受容体アンタゴニスト (picrotoxin: PTX) を投与する群 (PTX-Ex 群, n=9) と非投与コントロール群 (Con-Ex 群, n=9) を設けた。尚、本実験は帝京科学大学動物実験委員会の承認の下に行った。

GABA_A 受容体の阻害

先行研究を参考に PTX 投与群に対して毎日 GABA_A 受容体アンタゴニストである PTX 1mg/kg を投与した。非投与群に対しては同容量の生理的食塩水を投与した。

運動介入法

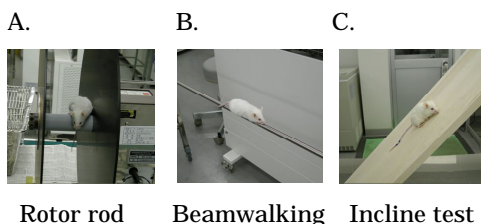
運動介入として、マウス用トレッドミルを

用いた走行運動 (15m/秒、60 分間) を 10 日間課した。

運動機能評価

介入終了時における運動機能評価として、Rotor rod test の耐久時間 (図 1 A)、Beam walking test における踏み外し (Drop foot) の回数と所要時間 (図 1 B)、Incline test における耐久傾斜角度 (図 1 C) を計測した。尚、Rotor rod test については、介入初日終了時においても計測が行われた。

図 1 運動機能評価



組織採取

最終介入の後、全脳を摘出の後、大脳皮質運動関連領域を採取し、液体窒素で凍結固定後、ディープフリーザー (-80 °C) で保存した。その後、定量的 PCR 法による mRNA 抽出の前処理として RNAlater (Applied Biosystems, 米国) 内に沈下し、4 °C で保存した。

定量的 PCR 法による後シナプス受容体および神経栄養因子とその受容体の mRNA 発現の定量

採取した組織より RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, オランダ) を使用し、総 RNA を抽出した。抽出総 RNA に対して High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて逆転写処理を行い、cDNA を合成した。続いてリアルタイム PCR システム (Real Time PCR System Step One Plus, ABI, USA) を用いて、Taqman® Gene Expression Master Mix と各蛋白のプライマーとして Taqman® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) を用いて増幅し、内部標準遺伝子として β -actin を用いて比較 Ct 法 (Relative Ct 法) に基づき標的蛋白の Ct 値を計測した。標的遺伝子として、NMDA 受容体各サブユニット (NR1, NR2A, NR2B)、神経栄養因子 (BDNF, NT-4) およびその共有する受容体 (p75, TrkB)、神経活動マーカーである c-fos の発現を定量した。

統計解析

統計解析として Student-t test を用いて、PTX 投与の効果について検証した。

(2) 研究 2: 運動機能と大脳皮質運動関連領域のシナプス修飾に対する運動介入と GABAA 受容体阻害の相互作用に関する検証

研究 1 に従い、介入開始時において 15 週

齢の雄性 ICR マウスを使用した。運動介入を課すことなく (Sedentary: Sed)、GABAA 受容体アンタゴニスト PTX を投与する群 (PTX-Sed 群, n=9) と非投与コントロール群 (Con-Sed 群, n=9) を設けた。尚、本実験は帝京科学大学動物実験委員会、北海道大学動物実験委員会の承認の下で行った。

運動機能評価、組織採取、遺伝子発現の定量解析は研究 1 に基づき行われた。尚、研究 1 において PTX 投与の効果が認められた遺伝子を中心に、神経栄養因子 (BDNF, NT-4) とその受容体 (TrkB, p75)、神経活動マーカー (c-fos) がターゲット遺伝子として採用された。

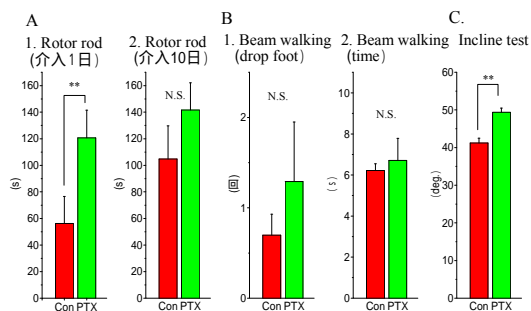
統計解析として、研究 1 の実験結果も包括し、4 群 (Con-Sed 群, PTX-Sed 群, Con-Ex 群, PTX-Sed 群) を対象に、PTX 投与と運動介入の効果について 2 元配置分散分析を用いて検定するとともに、併せて 1 元配置分散分析と多重比較により各群間の比較を図示・提示することとした。

4. 研究成果

(1) 研究 1: 運動介入下における GABAA 受容体阻害が運動機能と大脳運動関連領域のシナプス修飾に与える効果の検証

GABAA 受容体阻害による運動機能の修飾 Rotor rod 耐久時間は介入 1 日目においては PTX 投与により有意に延長していたが、介入終了時には有意な影響は認められなかった (図 1 A)。介入終了時の Beam walking の所見においても PTX 投与の有意な影響は認められなかった (図 2 B)。一方、Incline test の傾斜耐久角度は PTX 投与により有意な増加が認められた (図 2 C)。

図 2 運動機能評価



GABAA 受容体阻害による大脳皮質シナプスにおける遺伝子発現修飾

PTX 投与による NMDA 受容体の各サブユニット (NR1, NR2A, NR2B) の発現修飾は認められなかった (図 3 A-C)。一方、神経栄養因子 BDNF および NT-4 は PTX 投与により有意に発現が減少した (図 4 A, B)。更に、c-fos の発現もそれに相応する PTX 投与による発現減少の傾向が認められた (図 5)。神経栄養因子受容体 (TrkB, p75) 発現への影響は認

められなかった(図4 C, D)。

以上を総括すると、運動介入時における GABA_A 受容体の阻害は運動機能促進の傾向を示す一方で、当初の仮説に反して大脳皮質運動関連領域における神経栄養因子の発現は GABA_A 受容体阻害により減少することが確認された。

神経栄養因子は運動に依存的に発現増強されることが広く確認されている。このため、以上の研究結果における PTX 投与による神経栄養因子 BDNF, NT-4 の発現減少が、運動依存的に惹起された発現増強が PTX 投与により抑制されるのか、或いは GABA_A 受容体阻害は神経栄養因子発現をブロードバンドに阻害しているのかの課題が生じた。そこで、GABA_A 受容体阻害による神経栄養因子発現修飾の意義について検証することを研究2の焦点に定めた。

図3 NMDA 受容体の発現修飾

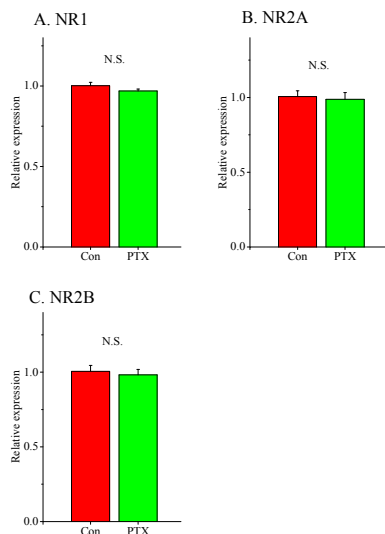


図4 神経栄養因子とその受容体の発現修飾

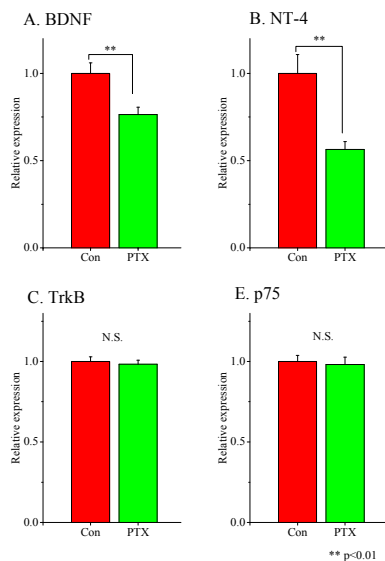
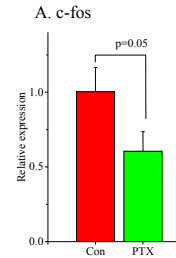


図5 神経活動マーカー (c-fos) の発現修飾

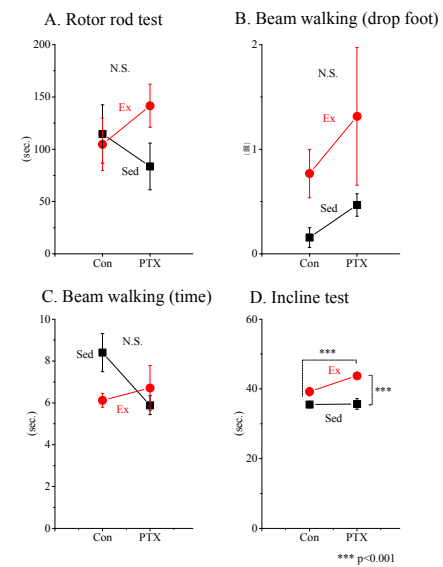


(2) 研究2: 運動機能と大脳皮質運動関連領域のシナプス修飾に対する運動介入と GABA_A 受容体阻害の相互作用に関する検証

運動介入と GABA_A 受容体阻害による運動機能修飾の相互作用

2元配置分散分析の結果、Incline test においてのみ運動介入の主効果が認められた意外には、運動介入、PTX 投与、交互作用は認められなかった(図6)。更に、1元配置分散分析においても、Incline test においてのみ PTX-Ex 群が他群よりも有意に耐久傾斜角度が大きかった(図6 D)。

図6 運動機能評価



運動介入と GABA_A 受容体阻害による大脳皮質シナプスにおける遺伝子発現修飾

2元配置分散分析の結果、BDNF 発現に対して運動介入と PTX 投与の主効果が認められ、交互作用も認められた(図7 A)。NT-4 についても運動介入の主効果と交互作用が認められた。更に図7は1元配置分散分析と多重比較に基づく有意差の認められる群間について図示したものである。以上の所見より、PTX 非投与時(Con)における運動介入によってのみ、これらの神経栄養因子の発現増強が生じ、その増強が PTX 投与により除去されたことが確認された。即ち、GABA_A 受容体阻害は運動依存性の神経栄養因子発現

の増強を阻害することを示していた。

神経栄養因子受容体については、2元配置分散分析の結果、TrkBの発現における運動介入の主効果を認める以外には、有意な効果は認められなかった(図8)。1元配置分散分析の結果、PTX-Ex群のTrkB発現が顕著に低いことがうかがえた(図8A)

c-fosの発現については、神経栄養因子発現修飾に相同した傾向はうかがえるものの、有意な主効果は認められなかった(図9)

以上、本研究の結果、海馬におけるGABA_A受容体の阻害による神経栄養因子発現の増強や記憶・学習の促進に認められてきた従来の報告とは相同せず、運動に直接的に関与する大脳皮質運動関連領域においては、運動依存的な神経栄養因子の発現増強は興奮性・抑制性シナプス入力 of 適切なバランス下における運動が重要であることが示唆された。

図7 神経栄養因子の発現修飾

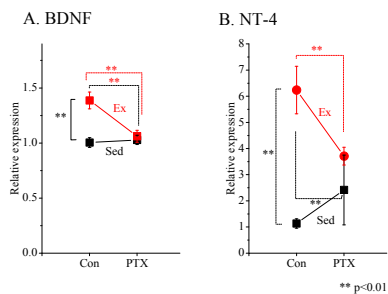


図8 神経栄養因子受容体の発現修飾

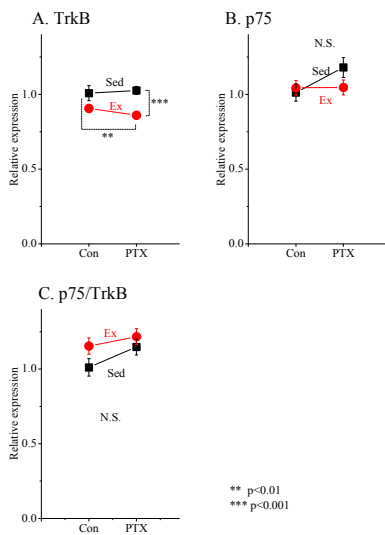
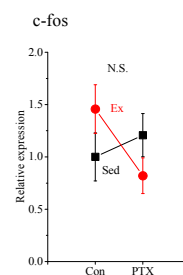


図9 神経活動マーカー (c-fos) の発現修飾



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 10 件)

Maejima H., Kanemura N., Kokubun N., Murata K., Takayanagi K. Effects of aging and exercise on the expression of neurotrophin and glutamate receptors in the hippocampus. Experimental Biology 2015, Boston, MA, USA, 2015.4.1.

前島 洋. シンポジウム 予防の理学療法 - 運動による脳機能の変化と障害予防 - : 予防的運動療法 - その可能性と展開. 第 1 回 JPTA 日本基礎理学療法学会・JPTF 日本基礎理学療法学会第 4 回学術集会 合同学会. 名古屋学院大学白鳥キャンパス, 名古屋市, 2014. 11. 15.

前島 洋, 金村尚彦, 国分貴徳, 村田健児, 高柳清美. GABA 受容体活性制御下の運動による皮質運動関連領域における神経栄養因子発現の修飾. 第 49 回日本理学療法学会大会. 横浜国際会議場, 横浜市. 2014.5. 31

Kanemura N., Kokumin T., Murata K., Fujino T., Takemoto H., Kito N., Moriyama H., Imagita H., Maejima H., Takayanagi K. Effect of balance exercise on plasticity after perioheral nerve injury of adult rats. The 12th International Congress of Asian Conferdration for Physical Therapy (ACPT Congress 2013). Taichung, Taiwan. 2013. 9. 8.

前島 洋, 金村尚彦, 国分貴徳, 村田健児, 高柳清美. バランス運動の継続が海馬における神経栄養因子の受容体発現に与える効果. 第 48 回日本理学療法学会学術集会. 名古屋国際会議場, 名古屋市. 2013. 5. 25.

□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学術集会. 名古屋国際会議場, 名古屋市. 2013. 5. 25.

Maejima H., Kanemura N., Kokubun N., Murata K., Takayanagi K. Effects of aging and low-loaded balance exercise on the expression of neurotrophins and glutamate receptors in the brain. Experimental Biology 2013, Boston, MA, USA. 2013. 4. 20-24

Kanemura N., Imagita H., Maejima H., Kokubun T. Murata 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, Boston, MA, USA. 2013.4. 20-24

Maejima H., Kanemura N., Nishikawa Y., Takayanagi K. Exercise up-regulates the expression of NMDA receptor in the aged hippocampus. The Society for Neuroscience 41th Annual Meeting. New Orleans, LA, USA. 2012.10. 14

Kanemura N., Moriyama H., Takemoto H., Imagita H., Maejima H., Kokubun T., Nishihara K., Takayanagi K. Locomoter exercise enhances selectively their expression of neurotrophins and receptors in the spinal cord of aged rats. The Society for Neuroscience 41th Annual Meeting. New Orleans, LA, USA. 2012.10. 14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

前島 洋 (MAEJIMA HIROSHI)

北海道大学・大学院保健科学研究所・教授
研究者番号：60314746

(2)研究分担者

金村 尚彦 (KANEMURA NAHIKO)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授
研究者番号：20379895