

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500876

研究課題名(和文)海馬ニューロン新生に対する身体運動制御の定量的評価

研究課題名(英文)Quantitative analysis of neurogenesis in the adult murine dentate gyrus during voluntary upslope exercise

研究代表者

山田 久夫(YAMADA, Hisao)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00142373

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)：海馬歯状回では成熟後も恒常的にニューロンが新生し、学習や記憶に働く。このニューロン新生を促進させると理解されている「豊かな環境」のうち、重要要素の抽出と定量的評価をおこなう目的で、上向き勾配の遊歩運動に着眼した。マウスを、角度の異なる傾斜トンネル付きケージにて、BrdU含有水を与え、2週間トンネルを自由遊歩させた。海馬歯状回単位面積当たりで、BrdU検出によるニューロン新生数は、90度群の数(14.2)は、水平群(9.6)や対照群(9.5)より有意に多かった。遊歩距離は、90度群でやや短かった他はほぼ一定であるので、運動時間や運動距離ではなく、体重に抗して「運動する」ことが重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Keeping in an enriched environment increases neurogenesis in the dentate gyrus of adult animals. We focused on upslope exercises and kept mice in three types of cages with slant tunnels for two weeks. During the period, the mice were allowed to behave voluntarily, and BrdU was ingested with drinking water (1mg/ml). The volume of water intake (i.e. BrdU intake) and the number of passage through the sensor in tunnel did not show apparent differences. In the specimens of hippocampal dentate gyrus, the BrdU-positive neuronal precursors were counted. The number of the 90-degree group (14.2) is significantly higher than the number of 0-degree group (9.6) and control group (9.5). Our findings demonstrate that voluntary upslope exercise is one of the components of enriched environments and sufficient for enhanced neurogenesis in the adult murine dentate gyrus.

研究分野：神経科学・細胞科学

キーワード：神経新生 海馬歯状回 昇降運動 BrdU 細胞更新 マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスの海馬と呼ばれる脳領域では成個体でも恒常的な細胞新生によりニューロンが更新し、学習や記憶に働いている。海馬での細胞更新を促す方策が考案できれば、高齢者のニューロン脱落性痴呆からの予防や再生医療に果たす役割が大きい。

海馬領域でのニューロン新生について、「豊かな環境」が新生を増加させるとの報告が相次いでいる。しかし「豊かな環境」はいくつもの要素から成り立っており、「質」と「量」の解析が必要である。我々のこれまでの研究成果や数十年前からのさまざまな報告から、成熟個体の脊髄前角や終脳皮質で、身体運動からの刺激によって神経活動依存性に神経系幹細胞の分裂が増加することが確認されているので、その入力刺激としての身体運動の「質と量」に着眼した研究を計画した。

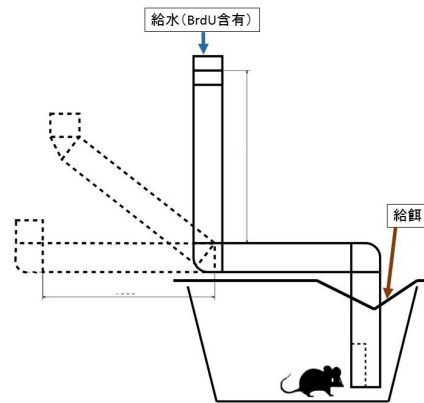
2. 研究の目的

海馬でのニューロン新生は、マウス飼育ケージ内に遊具などを置く「豊かな環境」によって増加するとされていて、その理由として「ストレスのない環境」が重要なだと考察されている。しかし我々は、遊具等の多方面からの刺激に応じて動き回ること、すなわち身体運動することが重要である、という仮説を立てた。この仮説を定量的に証明するために、傾斜トンネル付きケージでマウスを飼育し、海馬歯状回でのニューロン新生を計数する実験をおこなった。

3. 研究の方法

給餌器付きの中型ケージと、BrdU (1mg/ml) を含む飲料水付の小型ケージの間を、直径5cm 長さ50cm の塩化ビニル製の管 (遊具トンネル) でつなぎ、このトンネル内にマウス通過を感知する電子カウンターを設置した。トンネルの角度を0度 (水平) または小型ケージを上にした45度、90度 (垂直) とし、マウス (CL57BL/6、8週齢雄) をこのケージセットの中で2週間飼育した。その後、深麻酔下でかん流固定してマウスを安楽死させた。実験マウ

スから得られた厚さ (25 μ m) を一定にした海馬標本に組織化学法を施した。海馬歯状回の最も典型的な前頭断標本で、単位面積当たりのBrdU陽性細胞の計数をおこない、顆粒層断面の幅100 μ m当たりの数に置換した。計数する細胞は、存在部位や細胞形態のみならず2重組織化学法にて、ニューロン分化することが判明している前駆細胞に限定した。



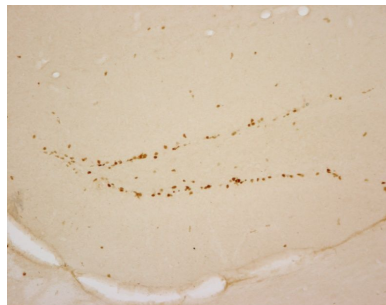
なお、BrdUはチミジンアナログで、細胞の分裂周期の複製DNAを合成する時期にチミジンの代わりに取り込まれる。すなわちBrdU投与時に分裂しようとしていた細胞にだけ取り込まれるので、このBrdUを組織化学的に染色すれば、分裂細胞を同定できる。

4. 研究成果

(1) 運動量について：マウスは自由行動させたものの、トンネル通過回数は0度や45度の場合で約3900回とほぼ同回数、90度の場合はやや少ない3250回であった。すなわち、遊歩距離や運動時間は90度ではやや少ないがほぼ同程度と考えられる。各群内での個体間差はほとんど見られなかった。ただし、マウスの体重を持ち上げる重力エネルギー量で考えると、90度 > 45度 > 0度となる。

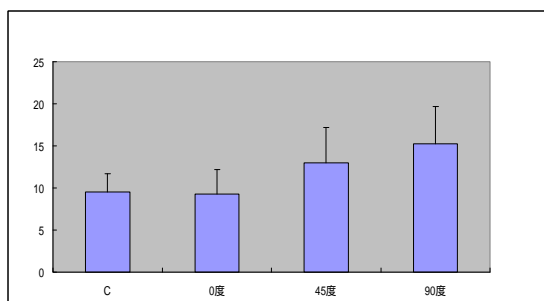
(2) 飲水量について：1日あたり約5.5mlで、各群間、各個体間で差がなかったことから、BrdUの摂取量は、一定であると考えられた。

(3) 新生細胞の計数：海馬歯状回の特定期限に限定して観察、細胞形態と存在部位、および、マーカーを用いた組織化学的2重染色によって、ニューロンに分化する前駆細胞に限定し、一定面積内での BrdU 陽性数をカウントした。



海馬歯状回での顕微鏡写真：BrdU 陽性(こげ茶色)は新生した細胞の核を示している。

(4) 計数の結果：標本(切片)1枚につき、100 μ m あたりの数は、0度(水平)群とトンネルなしコントロール群では差がなく約 9.5、90度(垂直)群では 14.2 で、有意な差を呈していた。45度群は 12.3 で、水平と垂直の2群の中間の値であった。



以上のことから、豊かな環境の要素として「運動」は明らかに1つの重要な要素であり、海馬でのニューロン新生を促す、運動時間や走行距離ではなく、体重を持ち上げようと重力に抗しておこなう運動がニューロン新生をより促す、という結論となる。

なお、より強度な運動を伴う自由走行実験モデルとしてランニングローターを用いる実験もおこなったが、マウスの個性によって走行時間が異なる。大雑把な観察では、走行時間が多くなればなるほど海馬領域の細胞新生数が増加する所見が得られた。しかしこれを「定量的」に解析するためには、実際の走行時間ごとの「群」作成を試みなければならず、きわめて多数の例数を集めるための実

験を継続している。

さらにストレス負荷と運動負荷をかける強制水浴実験では、得られたデータは不揃いであった。水を怖がらず浮かんでいるだけのもの、壁に身を寄せてストレスを避けるもの、必死にもがき泳ぐものなど大きな個体差があり、またこの解析にはストレスの負荷と運動負荷という相反する2つの因子が絡むため、我々の実験目的では解析が不可能と判断した。

最終的な結論として、定量的な評価から、より過重のかかる身体運動が海馬歯状回のニューロン新生を促すことが判明した。その結果として、学習や記憶の能力の向上・維持に役立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、連携研究者、研究協力者大学院生に下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Takamori Y, Wakabayashi T, Mori T, Kosaka J, Yamada H

Organization and cellular arrangement of two neurogenic regions in the adult ferret (*Mustela putorius furo*) brain.

J Comp Neurol 査読有, 522(8): 1818-1838, 2014. DOI: 10.1002/cne.23503

2. Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Takamori Y, Hirahara Y, Yamada H

Sox2 in the adult rat sensory nervous system. *Histochem Cell Biol* 査読有, 141(3): 301-309, 2014. DOI: 10.1007/s00418-013-1158-x

3. Mori T, Wakabayashi T, Ogawa H, Hirahara Y, Koike T, Yamada H

Increased histone h3 phosphorylation in neurons in specific brain structures after induction of status epilepticus in mice.

PLoS ONE 査読有, 8(10): Article No.e77710, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0077710

4. Cui Y, Li QH, Yamada H, Watanabe Y, Kataoka Y Chronic degeneration of dorsal raphe serotonergic neurons modulates cortical spreading depression:

A possible pathophysiology of migraine. *J Neurosci Res* 査読有, 91: 737-744, 2013. DOI: 10.1002/jnr.23209

5. Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Kurokawa K, Yamada H
Differential responses of endogenous adult mouse neural precursors to excess neuronal excitation.
Eur J Neurosci, 査読有 36(9): 3184-3193, 2012.
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08244.x

〔学会発表〕(計7件)

1. Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamaori T, Koike T, Kurokawa K, Yamada H; Cell cycle analysis of endogenous neural precursors in the adult mouse brain after brief seizures; 120 回日本解剖学会学術集会(英語発表) 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015年3月21-23日
2. 平原幸恵、山田久夫; 質量顕微鏡で髄鞘脂質を観る!
解剖学会 90 回近畿支部学術集会、大阪大学(大阪府吹田市) 2014年11月29日
3. Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamaori T, Yamada H; Proliferating glial cells in the normal young rat DRG; 37 回神経科学大会(英語発表) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014年9月11-13日
4. Kurebayashi S, Mori T, Wakabayashi T, Koike T, Yamada H; Ascending exercise increases neurogenesis in the dentate gyrus of adult mouse; Society Neuroscience 43rd Annual Meeting, (北米神経科学学会) サンディエゴ国際会議場(米国カリフォルニア州サンディエゴ市) 2013年11月9-13日
5. Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamaori T, Yamada H; Localization and role of Sox2 in the adult rat DRG; 36 回神経科学大会(英語発表) 京都国際会議場(京都府京都市) 2013年6月20-22日
6. 森徹自、若林毅俊、平原幸恵、高森康晴、小池太郎、山田久夫;
線条体ニューロンにおけるヒストンのリン酸化上昇; 118 回日本解剖学会学術集会、サンポート高松(香川県高松市)、2013年3月28-30日
7. 高森康晴、若林毅俊、森徹自、平原幸恵、小池太郎、山田久夫;
成獣ラットのニューロンおよびグリア細胞におけるラミン結合タンパク質の構成パターン;
35 回神経科学大会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2012年9月18-20日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www3.kmu.ac.jp/anat1/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
山田 久夫 (YAMADA, Hisao)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00142373
- (2) 連携研究者
紅林 秀治 (KUREBAYASHI, Shuji)
静岡大学・教育学部・教授
研究者番号: 60402228
- (3) 連携研究者
森 徹自 (MORI, Tetsuji)
2014~ 鳥取大学・医学部・教授
関西医科大学・医学部・非常勤講師
~2013 関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30285043
- (4) 研究協力者(大学院生)
小池 太郎 (KOIKE, Taro)
2015~ 関西医科大学・医学部・助教
2014 関西医科大学・医学部・ポスドク
~2013 関西医科大学大学院医学研究科
博士課程学生
研究者番号: 00735590