

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750335

研究課題名(和文) ラットを用いた自発運動量の個体差を規定する脳内神経システムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of brain systems for regulating daily spontaneous running volume using rat models

研究代表者

柳田 信也 (Yanagita, Shinya)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：80461755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自発運動量を規定する脳内因子を探索することを目的として、ラットモデルを用いたいくつかの実験的検討が行われた。その結果、日常的な自発運動量と脳内モノアミン量の関係性が明らかとなり、特に神経薬理的検討によって脳内のセロトニン量が増加すると自発運動量の低下につながる可能性が示された。さらに、このセロトニン量と自発運動量の関連性は遺伝子発現変動の解析によっても確認された。本研究の成果は、自発運動量の増加に向けた生物学的施策を展開する上で非常に重要な知見となったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to examine the brain mechanisms regulating daily spontaneous running using rat experimental models. The results showed that daily spontaneous exercise volume could be regulated by brain monoamine levels, and the levels of brain serotonin could influence daily inactivity. Furthermore, DNA microarray analysis also showed that serotonin systems in the brain were involved with daily spontaneous physical activity. The results of present study suggest that brain monoamine system is one of the major regulator for daily spontaneous physical activity. Our results blight a new research field on the relationship between physical exercise and biological science.

研究分野：行動生理学

キーワード：自発運動 モノアミン セロトニン ドーパミン DNAマイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 日常的な運動量と心身の健康

日常的な自発運動量が少ないことは、様々な健康を阻害する因子と関連性が高いことが示唆されており、自発運動量増加は心身の健康増進のキーポイントであると考えられる。2011年に発表された21世紀における国民健康づくり運動(健康日本21)の最終答申によって、我が国の国民における日常的な運動習慣や運動量は過去10年間で変化していないことが明らかになった。健康に対する関心はメディアなどを通して高まっていると予想されるものの、自発的に運動を行う行動変容は起こっていないと言える。日常的な身体活動・運動の量が多い者は、不活発な者と比較して循環器疾患やがんなどの非感染性疾患(NCD)の発症リスクが低いことが実証されている。これらの疫学研究による知見を踏まえ、WHOは、高血圧、喫煙、高血糖に次いで、身体不活動を全世界の死亡に対する危険因子の第4位であるとする認識を発表した(WHO, 2010)。これらのことから、日常的な自発運動量の増加は達成されるべき21世紀の健康課題であると言え、その対策は急務である。この問題を解決するためには、社会学的検討はもとより、自発運動という行動の生物学的意義を解明することが重要である。

(2) ラットモデルにおける自発運動量の個体差

近年、ラットやマウスなどのげっ歯類においても、自発運動量には個体差がみられることが報告されている(Tarr et al. 2004, Behavioral Brain Research)。申請者はこれらの動物モデルを用い、自発運動を規定する脳内神経システムの解明を試み始めている。これまでに、ラットにおけるランニングホイールによる4週間の自発運動量を測定し、高活動群と低活動群にスクリーニングを行った上で、運動時のストレスに関連する脳部位である視床下部室傍核の神経活動を免疫組織化学的に検討している(柳田ら, 2006)。その結果、運動時の室傍核の神経活動は低活動群で有意に高いことがわかり、運動時のストレス反応の違いが自発運動量を規定する要因の一つであることを示唆した。また、自発運動時にはセロトニンやドーパミンなどのモノアミン神経の活動が有意に亢進することを明らかにし、自発運動という行動を起こす際の重要な規定因子であると考えている(Yanagita et al. 2007, Life Sciences)。これらのことから、自発運動量を規定する主要な要因として、これらの脳内神経システムの機能的変化が挙げられる。

しかしながら、一連の先行研究は神経活動の観点から自発運動の特徴を捉えただけのものであり、脳内神経システムの重要な要素である神経伝達物質放出量や受容体活性、遺

伝子発現量などについては未だ不明な点が多く残されている。事実、バソプレッシン遺伝子やドーパミン遺伝子および受容体と自発運動量の関連も示唆され始めており、これらの観点も踏まえた上で、網羅的に脳内神経システムを探索する学術的意義は深いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では日常的な自発運動量の異なるラットを用い、自発運動量に影響を及ぼす脳内神経システム、特に関連する遺伝子やタンパク質、神経伝達物質を網羅的に解明することを目的として、実験的検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には、Wistar系の雄ラットを用いた(n=32)。3週齢のラットをランニングホイール付のケージ(Lafayette inst.製)もしくは通常のプラスチックケージ(コントロール群)で飼育した。飼育環境は、12時間ごとの明暗サイクル、環境温23℃が保たれ、水と餌は自由摂取とした。すべての実験は、東京理科大学動物実験倫理委員会の規定に基づき承認、実施された。

(2) 自発運動量のスクリーニング

全てのラットは、それぞれのケージで4週間飼育された。ランニングホイール付ケージで飼育されたラットの走行量について、ケージに付属されているデジタルカウンターで測定し、飼育開始3週間の走行量によって高活動群(HR)と低活動群(LR)にスクリーニングした。スクリーニングの基準は、まず、すべての個体のランニングホイールによる自発運動量を平均し、その平均値+0.5標準偏差以上の走行量を示したラットをHRに分類し、平均値-0.5標準偏差以下の走行量のラットをLRとした。また、その中間の走行量の個体は分析から除外した。

(3) 脳内モノアミン量の測定

本研究では、自発運動量の個体差を規定する脳内因子として、さまざまな生理機能と関連が深い脳内モノアミンに注目し、まず網羅的に検討を行った。先行研究と同様の8部位(前頭前野;PFC、尾状核;CPu、側坐核;NAc、視床下部室傍核;PVN、海馬;Hipp、扁桃体中心核;CeA、腹側被蓋野;VTA、背側縫線核;DRN)をマイクロディセクションし、ホモジナイズサンプルについて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いてモノアミン量の定量を行った。

(4) モノアミン前駆体投与の影響

本研究では、特にセロトニンの役割に注目し、薬理的に脳内セロトニン濃度を変化させた場合の自発運動量の変化を解析した。3週間のスクリーニング期間終了後にHR群に分

類されたラットに対し、セロトニン前駆体 (5-HTP) を腹腔内に投与した。投与量は 60mg/kg であり、1 日 2 回 (明期と暗期の開始時) のスケジュールで投与を行った。また、コントロールとして、HR 群の半分の個体には生理食塩水を同量、同方法で投与した。

(5) 遺伝子発現変動 (マイクロアレイ)

本研究で注目した脳内モノアミン量の変化において、重要な調節部位 (投射先) であると考えられる PVN について、マイクロアレイ法を用いて HR と LR における遺伝子発現変動の比較を行った。

モノアミンを分析したサンプルと同様な方法で、PVN をマイクロディセクションし、液体窒素で凍結保存後、RNA 抽出を行った。抽出された RNA について、DNA チップ (Agilent) を用いてマイクロアレイ解析を行った。

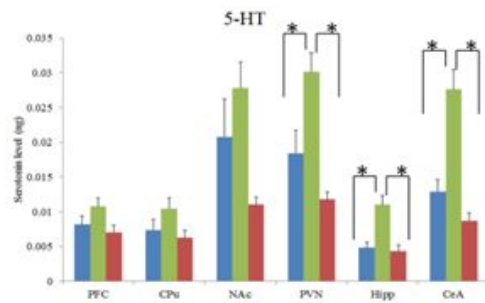
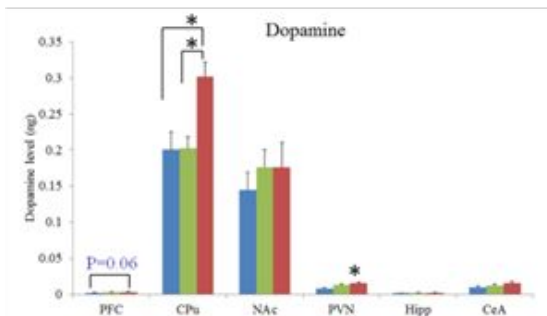
(6) 統計解析

コントロール群、HR 群および LR 群の行動データおよび脳内モノアミン量について一元配置の分散分析を行い、主効果が認められた場合には多重比較検定を行った。また、HR 群に対する 5-HTP 投与の影響については、5-HTP を投与されたラットと生理食塩水を投与されたラットの 2 群間において t 検定を用いて平均値の差の検定を行った。本研究における統計的有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

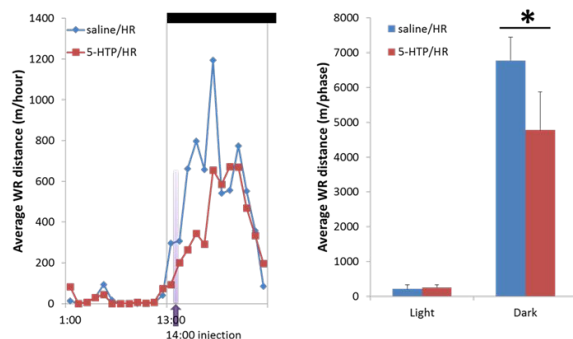
(1) 自発運動量とモノアミン量

4 週間の自発運動によって、脳内モノアミン量は上昇する傾向が認められた。さらに、高活動群では低活動群に比べ、視床下部や線条体におけるドーパミン量が有意に高いことが明らかになった。また、視床下部や扁桃体におけるセロトニン量が低活動群では有意に高い値を示した。これらの結果から、自発運動量の個体差を生じさせる要因として、ドーパミンやセロトニンなどのモノアミン神経システムの関与が示唆された。



(2) 5-HT 投与による自発運動量の変化

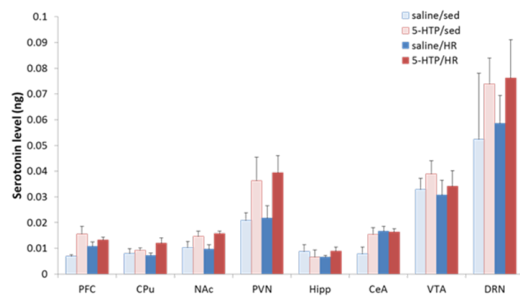
統計的に有意な差は認められないものの、5-HTP を投与された期間 (自発運動開始後 23 日以降) において、投与された個体の自発運動量が低下する傾向が認められた。さらに、ラットの活動期である暗期の自発運動量に注目してみると、生理食塩水を投与された群に比べ、有意に自発運動量が低い値を示すことが明らかとなった。この結果から、セロトニン量の変化が起こることによって自発運動量に影響が及ぶことが強く示唆された。



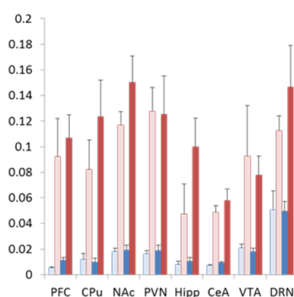
(3) 5-HT 投与によるセロトニン量の変化

セロトニン前駆体である 5-HTP 投与後の脳内各部位のセロトニン量を、生理食塩水を投与されたラットと比較した結果、セロトニン量自体には両条件間で有意な差は認められなかった。しかしながら、5-HTP を投与された個体におけるセロトニン代謝産物 (5-HIAA) およびセロトニン代謝回転 (5-HIAA 量/5-HT 量) は、すべての脳部位において有意に亢進していた。このことから、5-HTP 投与によって脳内のセロトニン量は一過性に増加したものの、そのほとんどが代謝されてしまったことが示唆される。

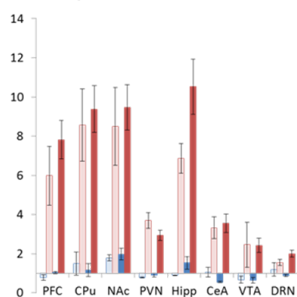
Serotonin



5-HIAA



5-HIAA/5-HT



(4) マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析において、全 21929 遺伝子のうち、18087 遺伝子の発現がみられた。発現がみられた遺伝子の中で、HR と LR における発現変動がみられた遺伝子数は 184 遺伝子であり、HR と LR を比較して発現亢進 (HR>LR) がみられた遺伝子が 42 であり、発現低下 (HR<LR) がみられた遺伝子が 142 であった。これらの遺伝子について、GO やパスウェイ解析を用いて機能解析を行った結果、GO term を用いた解析においては social behavior など 12 のカテゴリーが抽出された。また、パスウェイ解析においては、4 つのカテゴリーの機能にかかわる遺伝子の発現変動がみられることが明らかとなった。これらの遺伝子群について、詳細に検討を行った結果、ドーパミン受容体やセロトニン代謝にかかわる遺伝子の発現変動が有意にみられることが明らかとなった。

本研究では、日常的な自発運動量の個体差を規定する脳内因子を網羅的に探索することを目的とし、いくつかの実験的検討を行った。ラットモデルを用いた検討の結果、自発運動の個体差を制御する因子としての脳内モノアミンの役割がタンパク質および遺伝子発現レベルで注目された。

これまでもいくつかの先行研究において、自発運動量を規定する脳内因子の探索が試みられているが、明確にモノアミンとの関係性を示した研究は皆無である。

脳内モノアミンは、さまざまな心身の疾患と関連し、心と体の健康の維持に重要な脳内因子である。本研究において、このモノアミン量と自発運動量の関係性を示すことができ

たことは、自発運動という行動の生物学的意義を解明する上での重要な一歩であり、自発運動量の増加という極めて今日的な健康課題に対する対策を講じることにおける重要な基礎データを提供するものとなったと考えられる。

脳内モノアミンは、必須アミノ酸から合成され、食事などの生理的反応に影響を強く受けるなど、日常生活習慣とも関連が深いことから、本研究の結果をベースに考えると、日常の自発運動量の増加に対する施策には、生活習慣全体を考慮に入れる必要があるのかもしれない。今後、より詳細な実験的検討が展開されることによってこの問題は明らかとなっていく、日常的な運動習慣の形成に対する有効な対策が構築されていくと思われる。

(引用文献)

Tarr BA, Kellaway LA, St Clair Gibson A, Russell VA. (2004): Voluntary running distance is negatively correlated with striatal dopamine release in untrained rats. *Behav Brain Res*, 154(2): 493-499.
Yanagita, S., S. Amemiya, et al. (2007). Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. *Life Sci* 80(4): 356-363.

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6件)

Hiroshi Hori, Masakazu Umezawa, Mariko Uchiyama, Rikio Niki, Shinya Yanagita, Ken Takeda, Effect of high-fat diet prior to pregnancy on hepatic gene expression and histology in mouse. *Journal of Perinatal Medicine* 42(1): 83-91, 2014
DOI: 10.1515/jpm-2013-0091

(査読有)

Satoshi Yokota, Hiroshi Hori, Masakazu Umezawa, Natsuko Kubota, Rikio Niki, Shinya Yanagita, Ken Takeda, Gene expression changes in the olfactory bulb of mice induced by exposure to diesel exhaust are dependent on animal rearing environment. *PLoS ONE* 8(8): e70145, 2013
DOI: 10.1371/journal.pone.0070145

(査読有)

[学会発表](計35件)

Shinya Yanagita, Natsuko Kubota, Yurika Takano, Tomomi Matsuzawa, Takayuki Ishiwata, Ken Takeda, Monoamine precursor injections influence individual difference of spontaneous physical

activity in rats. Society for Neuroscience, 44th Annual Meeting, Washington DC (USA), 2014.11.15~19

Shinya Yanagita, Natsuko Kubota, Yurika Takano, Tomomi Matsuzawa, Ken Takeda, Effects of serotonin precursor injections on daily spontaneous activity in physically active rats. 9th Federation of European Neuroscience Society Forum of Neuroscience, Milan (Italy), 2014.7.5~9

Shinya Yanagita, Natsuko Kubota, Yurika Takano, Tomomi Matsuzawa, Ken Takeda, Housing conditions influence the positive effects of spontaneous running on brain monoamine levels in rat. 19th Annual Congress of the European College of Sport Science, Amsterdam (Netherlands), 2014.7.2~5

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田 信也 (YANAGITA Shinya)
東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：80461755

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし