

平成30年6月15日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01501

研究課題名(和文) 発達期の運動技能の向上が認知機能に及ぼす効果

研究課題名(英文) The effect of motor training for cognitive function

研究代表者

木田 裕之 (KIDA, Hiroyuki)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70432739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：発達期の自発運動体験が脳内に及ぼす影響を調べるために、3週齢マウスを運動器具入りのケージ内で2週間飼育した。自発運動が行動に及ぼす影響および帯状皮質でのAMPA受容体、BDNF発現量の変化を検討した。長期運動群では、抗不安作用、能動的回避学習成績が有意に上昇し、総運動量との正の相関が観察された。さらにAMPA受容体の発現量は変化しなかったものの、BDNF発現量は上昇した。これらの結果から発達期運動による効果が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of voluntary movement in developmental period for cognitive function, we kept 3 week age mice in the environmental enrichment (EE) for 2 weeks. We examined AMPA receptor expression and Brain derive neurotrophic factor (BDNF) after in cingulate cortex after voluntary movement. The EE grope showed significantly increase of anti-anxiety behavior and inhibitory avoidance (IA) score, and positive correlation between IA score and the amount of movement. In addition, although AMPA receptor expression did not change, BDNF expression significantly increased in the EE group. These results suggest the trophic effect of voluntary movement in developmental period.

研究分野：神経科学

キーワード：AMPA受容体 運動学習 環境エンリッチメント 認知機能

1. 研究開始当初の背景

「運動は脳にどのような影響を及ぼすのか？」これまでこの問いに対して多くの研究者が挑んできた。マクロな点からは身体運動は海馬の神経新生を促進し、海馬の重量を増加させる。また分子レベルでは神経栄養因子を増加させ、次いでシナプス可塑性や神経回路再編を誘導する。このように運動は細胞レベルでの学習に直接影響し、新しい情報を記録し分析する脳の機能を高めていることが分かってきた。しかしながら、これらの研究は成熟あるいは高齢動物を用いたもので幼若動物の研究はあまり知られていない。

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、課題関連運動には AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) を介した神経伝達が必須である。AMPA 受容体はシナプス後部の細胞膜上にダイナミックに輸送され、学習を成立させることが近年明らかとなった。また AMPA 受容体のシナプス移行は、発達期における適切な神経回路形成や恐怖条件付け学習に必須である。しかしながら、認知課題に関する AMPA 受容体シナプス移行のダイナミクスは不明である。

2. 研究の目的

環境エンリッチメントと脳機能の向上の関係についてはこれまでに様々な報告がされてきたが、活動量まで定量化することは難しい。そこで本研究では、長期間における運動量を定量化した上で運動学習が前頭前野のネットワークにどのような効果を及ぼすのかという点を行動的・生化学的に検討した。

3. 研究の方法

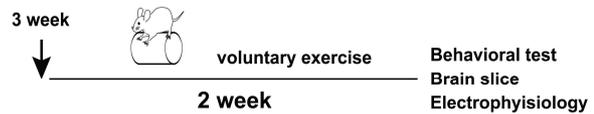
(1) 動物

全ての実験は山口大学動物使用委員会の承認を受け、動物実験ガイドラインに基づいて実施された。実験には 3 週齢 C57B6 系雄性マウス (体重 20 ~ 30g, 千代田開発) を用いた (n = 32)。飼育ケージ (40 × 25 × 25 cm) 内では食餌および水を自由に摂取させ、一定気温 (25°C) のもと 12 時間の明暗サイクル下で飼育した。

(2) 環境エンリッチメントと行動テスト

長期間、環境エンリッチメント下で飼育した動物の可塑性を調べるために、回転盤付イグルーやトンネル等の玩具 (アメニック) 下で 2 週間飼育した。直後に、新奇物体認識試験・ウエスタンプロットティングによるタンパク質定量・電気生理実験を行った (図 1)。訓練試行として、2 つのオブジェクトを置いた装置内で 10 分間自由に探索させた。1 時間後、片方を新奇オブジェクトに置換した装置内でさらに 5 分間自由に探索させた。訓練試行及び保持試行では、2 つのオブジェクトに対するそれぞれの接触回数を測定した。保持試行における総接触回数に対する新奇オブジ

ェクトの接触回数の割合を判別指数 (Discrimination index) として算出した。



(図 1)

(3) ウエスタンプロットティング

ウエスタンプロットティング法によって AMPA 受容体、リン酸化 AMPA 受容体および BDNF の発現量を調べた。タンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) を用いて測定した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、メンブレンにプロットティングし、ブロッッキングワン (ナカラテスク) でブロッッキングを行った。1 次抗体には BDNF (1:1000, Abcom)、 α -アクチン (1:1000, BioLegend, San Diego, CA, USA) への特異的抗体を用いて検出した。HRP 標識 2 次抗体には抗マウスを使用した。発光は、ECL ウエスタンプロットティング検出試薬 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) を用い、画像解析には Image-J (Alpha Innotech, San Leandro, CA) を用いた。

(4) 電気生理学

運動学習課題 (ローターロッドテスト) では最終試行から 30 分後、エンリッチメントでは急性期の影響を除くために 1 日後、動物に深麻酔を行って、急性脳スライスを作製した。動物を断頭後、脳を素早く取り出して混合ガス (5% CO₂/95% O₂) を飽和させた冰冷ダイセクションバッファー (25.0 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM KCl, 0.5 mM CaCl₂, 7.0 mM MgCl₂, 25.0 mM glucose, 110.0 mM choline chloride, 11.6 mM ascorbic acid) 内に浸した。ビブラトームを用い (Leica vibratome, VT-1200)、厚さ 350 μ m 脳の冠状断を作製し、混合ガスで飽和させた人工脳脊髄液 (22-25°C, 118 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, 4 mM MgCl₂, 4 mM CaCl₂, pH7.4) で満たしたインターフェイスチャンバー内に移した。ノマルスキー微分干渉装置を備えた正立顕微鏡 (倍率 600 倍, Olympus BX51) に装着した、赤外線高感度カメラ (C2741-79, Hamamatsu Photonics) を通して脳スライス標本を観察し、大脳皮質一次運動野または前辺縁皮質 (prelimbic cortex, PrL) の II/III 層の細胞からホールセル・パッチクランプ記録を行った。ガラス管微小電極 (GD-1.5, Narishige, JAPAN) はブラー (P-97, Sutter Instruments) を用い加熱、牽引して作製した。電極内部は実験に合った細胞内液で充填し、抵抗は 4-7 M Ω のものを用いた。記録中のチャンバーの温度は 22 から 25 °C に保った。電流・電圧は細胞内記録用増幅器 (Axoclamp 1D, Axon Instruments) にて増幅し、A-D コンバータ (Digidata 1440A, Axon Instruments) でデジタル化した。

後、ハードディスクに取り込んだ (Clampex 10, Axon Instruments)。

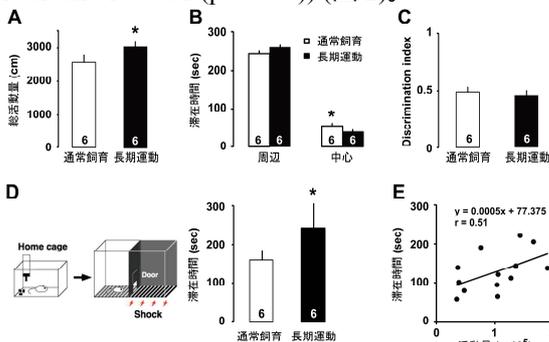
電流刺激によるシナプス後電流を記録するために、電位固定法によるスライスパッチ実験を行った。記録電極は細胞内液 (115 mM cesium methanesulfonate, 20 mM CsCl, 10 mM Hepes, 2.5 mM MgCl₂, 4 mM Na₂ATP, 0.4 mM Na₃GTP, 10 mM sodium phosphocreatine, 0.6 mM EGTA at pH 7.25) で充填した。記録チャンパー内にはピクロトキシン (Sigma, 100 μM) とクロロアデノシン (Sigma, 4 μM) を還流させた。刺激電極 (ユニークメディカル) はタングステン電極を用い、一次運動野 II/III 層 (外側 2 mm)、記録部位から 200-300 μm 内側に設置した。刺激の強度は 0.4 から 0.7 mA とし、10 pA 以上の反応が誘発できるようにした。-60 mV に電位固定したときのピークの電流値を AMPA 電流とし、+40 mV に固定したときの刺激オンセットから 150 ミリ秒後の電流値を NMDA 電流として記録した。記録は 50 から 100 回繰り返し、平均化した。NMDA 電流値に対する AMPA 電流値を AMPA/NMDA 比として算出した。

(5) データ解析

本研究の実験データは平均 ± 標準誤差で表記した。統計に関しては、二群間の比較において Mann-Whitney test を用いた。相関関係を検討する場合には Pearson's test を実施した。有意水準はそれぞれ 0.05 以下とした。

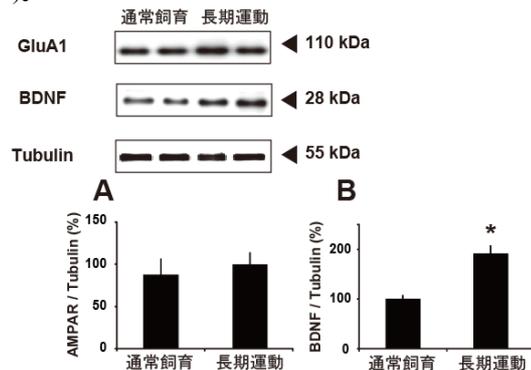
4. 研究成果

次に長期間、環境エンリッチメント下 (2 週間) で飼育した動物における行動の違いを調べた。オープンフィールドテストにおいて、長期運動群では単位時間の走行距離が有意に上昇し、中心部での滞在時間の延長が見られた (図 2B, Mann-Whitney test, $P < 0.05$)。一方で、認知テストとして用いた物体認識試験では、新奇物体に対する関心度を示す識別指数において両群に有意な差は観察されなかった (図 2C, Mann-Whitney test, $P = 0.66$)。さらに、能動的回避学習 (IA テスト) では、運動群では有意なスコア上昇が観察された (図 2D)。次に、運動量とスコアの関連を調べるために分布図を作成したところ、運動量と IA テストスコアには正の相関が見られた (図 2E, Pearson's $r = 0.51$ ($p < 0.05$)) (図 2)。



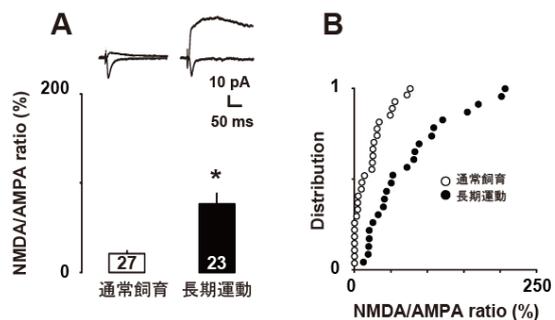
(図 2)

運動による AMPA 受容体のリン酸化を定量評価するために、長期飼育後の前頭葉サンプルよりウエスタンブロッティングによるタンパク質の定量評価を行った。AMPA 受容体、リン酸化 AMPA 受容体 (data not shown) とともに有意差は観察されなかった。(図 3A, Mann-Whitney test, $P < 0.05$)。また長期運動群では神経成長因子の増加が期待されることから同様の実験を行ったところ、運動群では正常飼育群と比較して BDNF 発現が有意に上昇した (図 3B, Mann-Whitney test, $P < 0.05$) (図 3)。



(図 3)

前辺縁皮質 V/VI 層電気刺激による II/III 層細胞の活動を記録した。顕著な増加が見られた NMDA 電流の変化に着目し、NMDA/AMPA 比を算出した。コントロール群 ($n = 27$) では 0.21 ± 0.04 、エンリッチメント後 ($n = 23$) では 0.77 ± 0.12 で有意に増加した (Mann-Whitney test, $P < 0.05$, 図 4A, B)。



(図 4)

考察

本研究から、長期間の運動が行動に及ぼす影響、および脳内の神経栄養因子の発現の増加が確認できた。行動実験からは、物体認識のようなストレス程度が低いものではなく、抗不安効果や高次脳機能への関与が示唆された。結果は未だプレリミナリーであるが、今後は前頭葉のシナプス可塑性にフォーカスを当てて電気生理実験を継続してゆく予定である。

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 6 件)

1. Mechanisms of motor learning mediated by synaptic plasticity in rat primary motor cortex.

Kida H, Mitsushima D. *Neurosci Res*.128:14-18. (2017), invited review. 査読有

2. Differential Temperature Sensitivity of Synaptic and Firing Processes in a Neural Mass Model of Epileptic Discharges Explains Heterogeneous Response of Experimental Epilepsy to Focal Brain Cooling.

Soriano J, Kubo T, Inoue T, Kida H, Yamakawa T, Suzuki M, Ikeda K. *PLoS Comput Biol*. 13(10):e1005736. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005736. (2017) 査読有

3. Slice patch clamp technique to analyze learning-induced plasticity.

Kida H, Sakimoto Y, Mitsushima D. *J Vis Exp*. e55876, doi:10.3791/55876 (2017) 査読有

4. Epidural Focal Brain Cooling Abolishes Neocortical Seizures in Cats and Non-human Primates.

Inoue T, Fujii M, Kida H, Yamakawa T, Maruta Y, Tokiwa T, He Y, Nomura S, Owada Y, Yamakawa T and Suzuki M. *Neurosci Res*. 122:35-44. (2017) 査読有

5. Motor training promotes both synaptic and intrinsic plasticity of layer II/III pyramidal neurons in the primary motor cortex.

Kida H, Tsuda Y, Ito N, Yamamoto Y, Owada Y, Kamiya Y, Mitsushima D. *Cerebral Cortex*. 26(8):3494-507. (2016) 査読有

6. Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons.

Ebrahimi M, Yamamoto Y, Sharifi K, Kida H, Kagawa Y, Yasumoto Y, Islam A, Miyazaki H, Shimamoto C, Maekawa M, Mitsushima D, Yoshikawa T, Owada Y. *Glia*.64(1):48-62. (2016) 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Motor training strengthens the glutamatergic synapses of layers V neurons in the primary motor cortex.

Hiroiyuki Otaku, Hiroiyuki Kida, Dai Mitsushima 2018年3月28日
サンポートホール高松、高松シンボルタワー

ー 第95回日本生理学会(香川県 高松市)

2. Motor training promotes both synaptic and intrinsic plasticity of layer II/III pyramidal neurons in the primary motor cortex.

木田裕之, 美津島大 2017年3月28日
アクトシティ 浜松 第94回日本生理学会
(招待講演)(静岡県 浜松市)

3. 一次運動野における AMPA/GABA シナプス可塑性による運動学習のメカニズム

木田裕之 2016年12月7日
生理学研究所 平成28年度 生理学研究所研究会(招待講演)(愛知県 岡崎市)

4. Motor training promotes both synaptic and intrinsic plasticity of layer II/III pyramidal neurons in the primary motor cortex.

Kida H, Tsuda Y, Yamamoto Y, Owada Y and Mitsushima D. 2016年11月17日
San Diego 46th Society for Neuroscience
(国際学会)(USA)

5. 一次運動野における AMPA/GABA シナプス可塑性による運動学習のメカニズム

木田裕之, 津田廉正, 山本由似, 大和田祐二, 美津島大 2016年3月22日
札幌コンベンションセンター 第93回日本生理学会(北海道 札幌市)

6. 一次運動野における AMPA/GABA シナプス可塑性による運動学習のメカニズム

木田裕之, 津田廉正, 山本由似, 大和田祐二, 美津島大 2015年10月24日
米子コンベンションセンター 第67回日本生理学会中国四国地方会(鳥取県 米子市)

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seiri2/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

木田 裕之 (KIDA, Hiroyuki)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70432739

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

美津島 大 (MITSUSHIMA, Dai)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70264603

山本 由似 (YAMAMOTO, Yui)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：80635087

(4)研究協力者

なし