

## 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 4 月 26 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700696

研究課題名（和文） 運動意欲促進の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Establishment of molecular mechanism of exercise motivation using a novel rat-strain featured by high levels of wheel-running activity

研究代表者

森島 真幸 (MORISHIMA MASAKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40437934

研究成果の概要（和文）：

本研究は、生まれつき自発運動への欲求が正常 Wistar ラットよりも強い自然発症の高運動性モデルラット SPORTS (Spontaneously Running Tokushima-Shikoku; Wistar 系) を実験のツールとして用いて、運動意欲の制御に関わる脳内分子基盤の解明を目指すと同時に、心臓自律神経活動への影響を解析することにより、神経性因子を介した自発運動の制御と心機能の連関作用を生理学的に実証することを目的とした。申請者は、これまで脳内モノアミン酸化酵素 A (MAOA) の活性低下がラットの自発運動を誘発していることを明らかにしてきた (Morishima et al., *Neuropsychopharmacology* 2006)。本研究では、安全で有益な運動不足解消法の開発の為に、運動負荷を行う上で心機能の重要なパラメータである心臓自律神経活動の評価を縦列して行う実験系を確立し、脳内モノアミンと心機能解析を同時に行った。その結果、SPORTS ラットは安静時において早い心拍を示すが自発運動時には心臓交感神経活動 (L/H 比) を極度に高めないことを見出した。さらに、対照ラットにモノアミン酸化酵素 A (MAOA) 阻害薬を投与し脳海馬モノアミン量を定量したところ、SPORTS ラットと同程度に海馬ノルエピネフリン放出量が増加し、自発運動量や心拍数の増加が認められた。また、心拍変動解析の結果、MAOA 阻害薬投与ラットでは、SPORTS ラットと同様に心拍数の増加の認められた夜間活動時間帯で交感神経活動指標である L/H 比が有意に上昇していたが、自発運動により是正されることが判明した。本事業により、自発運動を引き起こす因子（脳内ノルエピネフリン）が生体にとって質的良好な運動基盤分子である可能性が示唆された。本研究の成果は、運動療法を必要とする心疾患患者だけでなく健康な個人に対しても、運動の効果を最大限に発揮できるシステムの開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：

We established a novel rat strain featured by high levels of voluntary wheel-running, which is called SPORTS (Spontaneously-Running Tokushima-Shikoku) rat. The aim of this study was to investigate the effect of high- or low-intensities in voluntary exercise on sympathetic and vagal controls of heart at sedentary and during wheel-running exercise by use of SPORTS rats. At 15 weeks of age, each rat was moved to a new cage with or without an exercise wheel, and sorted into four groups; 1) SPORTS rat with an exercise wheel (running), 2) SPORTS rat without an exercise wheel (sedentary), 3) control rat with an exercise wheel (running), and 4) control rat without an exercise wheel (sedentary). Heart rate was significantly increased in sedentary SPORTS rats compared to those in control rats. SPORTS rats show a significant reduction in resting heart rate by high-intensity running. The low frequency/high frequency (LF/HF) ratio, which reflects cardiac sympathetic nerve activity, was significantly decreased in SPORTS rats by voluntary running. However, a decrease of sympathetic nerve activity was not observed in control rats with approximately 1/10 wheel-running activity. By wheel running, the low frequency (LF) power was augmented in control rats, and was markedly depressed in SPORTS rats. High

-intensity voluntary running decreases mean heart rate during resting period (sedentary) with a depression of sympathetic nerve activity. These results suggest that high-intensity voluntary exercise attenuates sympathetic nerve activity not only during exercise but also during resting period as a lasting effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：スポーツ医学

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病を引き起こす負の要因として、不適切な食習慣による肥満や高脂血症の重要性はこれまで指摘され、広く受け入れられているが、逆に、生活習慣病を予防あるいは改善する正の要因としての運動習慣をもたらす個体側因子の研究は少ない。我々は個人々の生活習慣に遺伝的要素が関与する可能性があると考え、自発的に高い走行運動を行うモデルラット **SPORTS(Spontaneously Running Tokushima Shikoku; Wistar系)**の近交系(遺伝子バックグラウンドが均一)を世界で初めて確立し、これを用いて運動習慣を規定する脳内因子、あるいはその分子基盤について解明してきた(Morishima et.al, *Life Sci.* 2005)。SPORTSラットは生まれつき強い運動意欲を有しており、同系の対照ラットに比べ、自発的回転カゴ運動において約10倍の走行量を示す。私は、自発的回転カゴ運動は脳内モノアミン動態の変化(モノアミン酸化酵素Aの活性低下)に起因することを発見し報告してきた(Morishima et.al., *Neuropsychopharmacology.* 2006)。しかし、その後の研究により、SPORTSラットは長期間飼育すると心筋に血腫を形成して死に至ることが多く、先天性の高運動性が本ラットの心機能を悪化させている可能性が疑われた。このため、当初の研究目的としていた運動習慣獲得の分子メカニズムの解明を目指すだけでなく、安全性を考慮し運動効果を最大限に得るための方法を確立するためには、心機能異常を伴わずに運動意識を高める手段を探索する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、自然発症の高運動性モデルラット **SPORTS** を実験ツールとして用い、同ラットの脳内モノアミンについて、その動態、作用機構、及び分子制御機構を解析し運動習性との関わりを明らかにすると同時に、心臓支配自律神経活動への影響を解析することにより神経性因子を介した自発運動の制御と心機能調節の連関作用の解明を目指す。

3. 研究の方法

- (1) SPORTSラットの中枢・末梢におけるモノアミン及びその代謝物の濃度を脳マイクロダイアリシス法により定量解析し、運動習性との関わりを明らかにする。
- (2) 脳内モノアミンの構成を再現あるいは変化させた際のラットの運動量を解析し特徴ある変動を示すモノアミンを同定する。さらに、並行して心電図記録を行い心拍変動スペクトル解析により心機能を評価する。
- (3)モノアミンを中心に、それ自体あるいはそのアナログ、拮抗薬、トランスポーター阻害薬をSPORTSラット及び対照ラットの脳内局所に直接投与し、走行量の変化と心拍数、心臓自律神経活動を解析する。これにより、心機能異常を伴わずに運動量を制御する脳内シグナル伝達経路をある程度同定する。
- (4) 遺伝的な差を調べるために、自発運動をさせない安静群のSPORTSラット及び対照ラットの心筋を採取し、RNAあるいはタンパクを抽出し心筋収縮に関わるタンパク群(イオンチャンネル、細胞内キナーゼ、転写因子等)の解析を分子生物学的手法で行う。心筋肥大の形態学的評価は、HE染色法あるいはマッソ

ン・トリクローム染色法により行う。

#### 4. 研究成果

(1) 脳海馬マイクロダイアリスの結果、SPORTS ラットのモノアミン(ノルエピネフリン) 放出量は、対照ラットに比べ有意に上昇しており、これにより自発運動が誘発されている可能性が示唆された。また、テレメトリー埋め込み法により安静時及び自発運動時の SPORTS ラット及び対照ラットの心電図を記録し、心拍変動スペクトル解析により心臓自律神経活動を比較することで、SPORTS ラットの心機能の評価を行った。

非運動環境下(安静時)における SPORTS ラットの心電図解析の結果、SPORTS ラットは対照ラットに比べ速い心拍を示し(下図 1)、著名な心肥大を呈することが判明した。また、心電図データを用いた心拍変動解析により、SPORTS ラットの心拍数の増加に伴い心臓交感神経活動が亢進しており、その際の血中エピネフリン濃度は顕著に増加していることが確認された。以上の結果より、SPORTS ラットの高運動性基質は、安静時の交感神経機能の亢進により規定されており、安静時における速い心拍が原因となり心肥大を呈している可能性が考えられた。

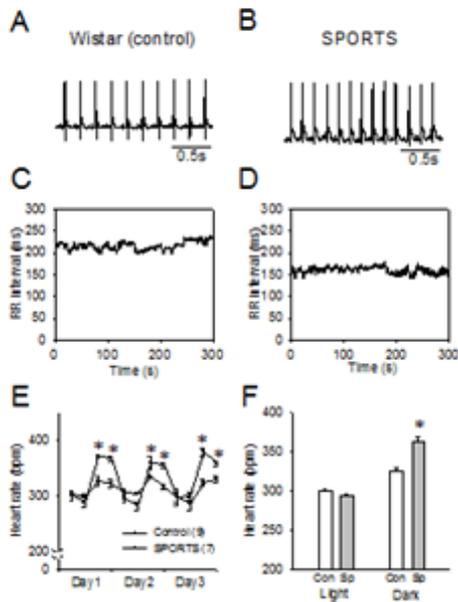


図1. SPORTS ラットと対照ラット(Control)の安静飼育時の心電図、及び心拍数の日内変動。

(A, B) 両ラットの心電図波形. (C, D) 両ラットのRR間隔. RR間隔が短いほど心拍数が速いことを示す. (E) 心拍数の日内変動. SPORTS ラットは夜間時間帯における心拍数

の上昇が著しい. (F) 両ラットの心拍数を昼間時間帯(Light)と夜間時間帯(Dark)で比較したもの. \* $p < 0.05$  v. s. 対照群. (N=9)

(2) 対照ラットの腹腔内に各種薬剤( $\alpha$ 遮断薬、 $\beta$ 遮断薬、モノアミン等)を投与し、中枢及び末梢におけるモノアミン構成を再現あるいは変化させた際のラットの自発運動量や心臓自律神経活動を解析した。対照ラットにモノアミン酸化酵素A(MAOA)阻害薬を投与し脳海馬モノアミン量を定量したところ、SPORTS ラットと同程度に海馬ノルエピネフリン放出量が増加し、自発運動量や心拍数の増加が認められた。また、心拍変動解析の結果、MAOA阻害薬投与ラットでは、SPORTS ラットと同様に心拍数の増加の認められた夜間活動時間帯で交感神経活動指標であるL/H比が有意に上昇していることが判明した。以上の結果より、ラットの自発運動量は脳海馬におけるノルエピネフリン放出量を変化させることで調節されており、また心拍変動を増加させることにも貢献していることが示唆された。

(3) 対照ラット脳海馬に、脳灌流用プローブを用いて各種薬剤( $\alpha$ 遮断薬、 $\beta$ 遮断薬)を拡散投与させた結果、 $\alpha_1$ 遮断薬であるprazosin、及び $\alpha_2$ 遮断薬yohimbine投与により自発運動量の顕著な抑制が認められた。 $\beta$ 遮断薬投与はラットの自発運動量に影響を及ぼさなかった。さらに、 $\alpha_2$ 刺激薬であるclonidine投与によってもラットの自発運動量は顕著に抑制された。このため、SPORTS ラット及び対照ラットの脳(海馬、大脳、小脳、脳幹)における $\alpha_2$ 受容体発現量をWestern blot法により定量した結果、SPORTS ラット脳海馬では対照ラットに比べ、 $\alpha_2A$ 受容体タンパク発現量が有意に低下していることが判明した。以上の結果より、SPORTS ラット脳海馬におけるノルエピネフリン代謝亢進には、 $\alpha_2A$ 受容体タンパク発現量の低下が起因しており、これが高運動性を誘発する一因となっている可能性が示唆された。

(4) SPORTS ラットの心臓組織の形態を観察するため、脱血、灌流固定後にパラフィン切片を作成しHE染色とマッソン・トリクローム染色を行った。SPORTS ラットの心筋において、筋原線維の肥大が顕著に認められたが、線維化は両ラット有意な差は認められなかった。また、SPORTS ラットの単離心筋においては、生理的心肥大に関わる細胞内シグナル分子(Akt, PI3K, CREB)のリン酸化が亢進しており、これにより心筋L型カルシウムイオンチャネル(Cav1.2)の発現が顕著に増大していることが判明した。ラット心筋におけるこ

これらの因子の発現増加は、心血管に対し保護作用を示す可能性が示唆された。

本事業により、自発運動を引き起こす因子（脳内ノルエピネフリン）が生体にとって質的良好な運動基盤分子である可能性が生理学実験により一部証明することができた。本研究の成果は、運動療法を必要とする心疾患患者だけでなく健康な個人に対しても、運動の効果を最大限に発揮できるシステムの開発に貢献することが期待される。

#### 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 5 件）

1. Morishima M, Tahara S, Wang Y, Kaku T, Ono K.

Nonapeptide hormones oxytocin and vasopressin distinctly regulate  $Ca_v1.2$  L-type calcium channel expression in cardiomyocytes. *J Arrhythmia* 26:111-118, 2010

2. Hattori A, Mawatari K, Tsuzuki S, Yoshioka E, Toda S, Yoshida M, Yasui S, Furukawa H, Morishima M, Ono K, Ohnishi T, Nakano M, Harada N, Takahashi A, Nakaya Y.

$\beta$ -Adrenergic-AMPK Pathway Phosphorylates Acetyl-CoA Carboxylase in a High-epinephrine Rat Model, *SPORTS. Obesity* 18:48-54, 2009

3. Morishima M, Wang Y, Akiyoshi Y, Miyamoto S, Ono K.

Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, attenuates T-type  $Ca^{2+}$  channel expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 609(1-3):105-12, 2009

4. Marni F, Wang Y, Morishima M, Shimaoka T, Uchino T, Zheng M-Q, Kaku T, Ono K.

$17\beta$ -estradiol modulates expression of low-voltage-activated  $Ca_v3.2$  T-type calcium channel via ERKs pathway in cardiomyocytes. *Endocrinology* 150(2): 879-888, 2009

5. Kang L, Zheng M, Morishima M, Wang Y, Kaku T, Ono K.

Bepridil upregulates cardiac  $Na^+$  channel as a long-term effect by blunting proteasome signals through inhibition of calmodulin activity. *Br J Pharmacol* 157(3):404-14, 2009

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Masaki Morisima, Yan Wang, Yuko Akiyoshi, Katushige Ono; Effects of

physical exercise on cardiac  $Ca^{2+}$  channel expression in SPORTS rat, a novel rat-strain featured by high levels of voluntary wheel-running activity. 20<sup>th</sup> World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto May 13-15, 2010（京都市）

2. 森島真幸、王岩、秋吉裕子、小野克重：アンジオテンシン受容体を介した心筋 T 型カルシウムチャネルの発現抑制。第 87 回日本生理学会大会 2010.5.19-21（盛岡市）

3. Katushige Ono, Masaki Morishima, Yan Wang: Transcription factor  $Csx/Nkx2.5$  and NFAT regulate expression of  $Ca_v3.2$  T-type  $Ca^{2+}$  channel via protein kinase C actions. 日本薬理学会年会 2010.3.16-18（大阪市）

4. Masaki Morishima, Yan Wang, Toshihiko Kaku, Katushige Ono: Nonapeptide hormone oxytocin regulates  $Ca_v1.2$  L-type calcium channel expression in cardiomyocytes. 第 26 回 I S R 日本部会総会 2009.12.4-5（札幌市）

5. Yan Wang, Masaki Morishima, Lin Kang, Toshihiko Kaku, Katushige Ono: Protein kinase C as a key modulator to switch isoforms from  $Ca_v3.2$  to  $Ca_v3.1$  of the T-type  $Ca^{2+}$  channel in neonatal rat cardiomyocyte. APHS 2009 (2<sup>nd</sup> Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session 5<sup>th</sup> Asia Pacific Atrial Fibrillation Symposium) Oct 22-25, 2009

6. 森島真幸、田原慎太郎、秋吉裕子、王岩、賀来俊彦、小野克重：Oxytocin は幼若ラット心筋細胞において転写因子 CREB を介して L 型  $Ca^{2+}$  チャネル ( $Ca_v1.2$ ) 発現を抑制する。第 26 回日本心電学会学術集会 2009.7.2-4（京都市）

〔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

<http://www.med.oita-u.ac.jp/pathophysiology/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森島 真幸 (MORISHIMA MASAKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40437934

(2)研究分担者 無し

(3)連携研究者

中屋 豊 (NAKAYA YUTAKA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：50136222