

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 6 月 13 日現在

機関番号：43606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700595

研究課題名（和文） マウス走運動が microRNA 発現に及ぼす影響

研究課題名（英文） The effect of running on the expression of microRNA in rats

研究代表者

川島 均 (HITOSHI KAWASHIMA)

松本大学松商短期大学部・商学科・准教授

研究者番号：10392416

研究成果の概要（和文）：運動習慣が海馬の神経新生を促進し、海馬の機能である記憶・学習の向上をもたらすことが多く報告されているが、そのメカニズムは不明のままである。近年、神経の分化や新生にマイクロ RNA（miRNA）と呼ばれる小さな RNA 分子が関与することが示唆されている。そこで本研究では、神経新生をもたらすことが知られている 12 日間の自発的走運動が miRNA に及ぼす影響をマウス海馬において調べた。その結果、調べた miRNA において有意な変化を見いだすことはできず、もっと早い段階において海馬 miRNA 発現が変化するのはのではないかと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Voluntary exercise has been reported to promote neurogenesis in the hippocampus and to improve learning and memory, the function of hippocampus. However, the mechanisms is yet unknown. Recently, it is suggested that short forms of RNA, microRNA (miRNA), may be involved in the neuronal differentiation and neurogenesis. In the present study, the expression level of miRNAs in the hippocampus was investigated after 12 days of voluntary running exercise in the mouse. As the result, no significant change was detected in the hippocampal miRNAs investigated. There may be a possibility that the expression of miRNAs would be changed in the early phase of voluntary exercise or acute exercise.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・身体教育学

キーワード：運動・海馬・神経新生・microRNA

1. 研究開始当初の背景

大脳辺縁系のある海馬は、それが記憶機能や認知機能に関係することもあって昔から多くの研究者の注目を集めてきた。2000 年前後から、運動習慣が大脳辺縁系の海馬領域

において神経新生を誘発することが報告され始めた。1999 年、van Praag らがマウスの自発性走運動が海馬の神経新生の促進と認知機能の上昇を引き起こすことを報告したのである。その後のヒトにおける研究では、

体力レベルと海馬体積や記憶機能に正の相関関係が観察されており、運動が海馬機能に影響している証拠だと考えられる。

このような運動が海馬の神経新生を促進するメカニズムについてはまだほとんど分かっていないが、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) は最も有力な因子の一つであろう。一方、近年では、マイクロ RNA (miRNA) と呼ばれる 20 塩基長ほどの小さな RNA 分子が数多く発見され、その中で神経細胞に発現するものは神経の分化や新生などの可塑性に関与することが報告されている。筆者の先行研究でも、BDNF による情報伝達の下流に miR-132 という miRNA が作用していることを明らかにしている。しかしながら、現在のところ運動あるいは運動習慣が海馬における miRNA 発現量におよぼす効果についての報告は全くない。

2. 研究の目的

以上のことから本研究では、海馬神経新生を誘発するような自発性走運動が海馬 miRNA 発現量に及ぼす影響について調べることを目的とした。

3. 研究の方法

6 週齢の雄性 C57BL/6 マウス 12 匹が用いられた。それらは、飼育ケージに回転車輪 (12cm 径) を設置して 12 日間の自発性走運動を行うグループ (運動群) と、飼育ケージに何も入れず 12 日間過ごすグループ (対照群) に分けられ、すべて 3 匹ずつ飼育された。運動群のマウスは平均して 1 日に約 35000 回転分の走行をおこなったので、単純計算して 3 匹あたり 12000m あまり、1 匹あたり 4000m あまりを走行した。全ての実験動物は飼育中に 5-ブromoデオキシウリジン

(BrdU) が投与され、後の脳組織免疫組織化学法による海馬神経新生のマーカーとされた。13 日目、実験動物の脳が摘出され、一方の半球は海馬神経新生確認用とされた。他方の半球の海馬からは RNA が抽出され、miRNA マイクロアレイ法による発現量解析が行われた。なお、マイクロアレイ法での測定では、対照群も運動群も、群内のマウスから等量の RNA を合わせ、各群一つのサンプルとして比較された。そして、対照群と比較して 1.5 倍以上あるいは 3 分の 2 以下の発現量を示す miRNA が運動により変化しうる miRNA の候補とされた。その後、より信頼性の高い定量的 RT-PCR 法を用い、各マウスサンプルにおいて発現量解析がおこなわれた。なお、各 miRNA 発現量の標準化には、U6 snRNA 発現量が内在性標準として用いられた。

4. 研究成果

マイクロアレイ法による測定では、12 日間の運動習慣により比較的大きな発現量変化を示した海馬 miRNA は二十種ほどあった。そのうち十分な発現が検出されるであろうと思われるもの、あるいは確認されたものを選別した (表 1)。2 倍以上の変化を示すものもいくつかあった。

表1
マイクロアレイ法により測定した12日間自発的走運動後のマウス海馬における各種miRNA発現量。対照群平均を100%とした数値で示している。

	対照群	運動群
miR-721	100.0	303.5
miR-669h-3p	100.0	262.8
miR-1191	100.0	238.4
miR-18a*	100.0	231.7
miR-503	100.0	219.4
miR-96	100.0	215.7
miR-30c-1*	100.0	205.5
miR-744*	100.0	161.2
miR-706	100.0	146.8
miR-491	100.0	68.5
miR-125b*	100.0	63.1
miR-1894-5p	100.0	48.0

それらについて、定量的 RT-PCR 法による測定をおこない、発現量の変化を再確認した。14 種の miRNA について調べたところ、12 日間の自発的走運動によって miR-1191、miR-744*、miR-491、miR-125b*、miR-1894-5p は ± 5 % 以内の変化、miR-669h-3p、miR-18a*、miR-503、miR-96、miR-30c-1* は ± 10 % 以内の変化、そして、miR-721 と miR-706 は ± 20 % 以内の変化を示した (表 2)。いずれについても有意な変化ではなかった。なお、miR-721 は運動群のうちの一例が 4000% 超という異常な値を示したので外した。以上の結果から見て、自発的な運動習慣が始まってから 12 日が経過した時点では海馬 miRNA 発現量に大きな変化が見られないということが示唆される。miRNA が運動誘発性の海馬機能の亢進に寄与するという仮説に基づけば、変化しないという本研究の結果も十分に重要な知見である。

ところで、miR-721 の測定値のように極端ではないものの、miR-96 発現量について個々の数値を見ると、対照群の一例が対照群

表2
12日間自発的走運動後のマウス海馬における各種miRNA発現量。対照群平均を100%とした数値で示している。誤差範囲は標準誤差である。

	対照群	運動群
miR-721	100.0 ± 28.0	81.6 ± 8.4
miR-669h-3p	100.0 ± 44.7	107.6 ± 48.1
miR-1191	100.0 ± 12.9	101.5 ± 11.1
miR-18a*	100.0 ± 14.0	105.7 ± 15.6
miR-503	100.0 ± 13.4	94.3 ± 18.3
miR-96	100.0 ± 58.8	92.0 ± 14.7
miR-30c-1*	100.0 ± 9.0	94.7 ± 15.5
miR-744*	100.0 ± 14.0	101.9 ± 12.1
miR-706	100.0 ± 14.0	113.3 ± 15.1
miR-491	100.0 ± 12.4	98.7 ± 14.2
miR-125b*	100.0 ± 10.8	100.4 ± 15.5
miR-1894-5p	100.0 ± 38.7	97.7 ± 30.6

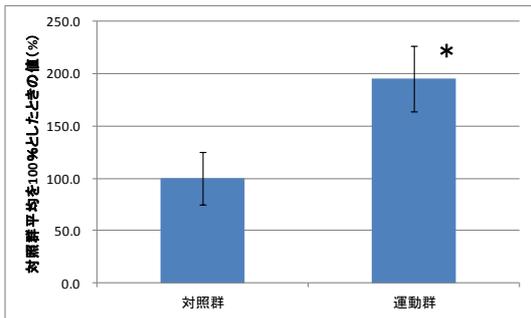


図1
12日間の自発的走運動後のmiR-96発現量。一例を外れ値とした場合の有意な変化。
(*は危険率5%以下の有意性を示している)

平均値に比べて3倍超という特異的な数値であった。仮にこの一例を対照群から外したところ、運動群は対照群を100%とした場合195%の発現量を示すことになり、T検定でも有意な差であることが示された(図1)。miR-96は先行研究によると、ガン細胞の増殖や細胞死に重要な役割を果たしているほか、聴力の損失における役割についてもいくつもの報告がされている。また、セロトニン受容体の遺伝子多型に影響して攻撃的行動にも影響していることが示唆されている。運動習慣に伴ってmiR-96が変化した場合にこれらの機能に影響するかは推測の域を出ないが、miRNAは何種類にもわたる遺伝子に影響しうることが知られているおり、以上の機能をもつ遺伝子以外にも影響しているの

かもしれない。

今後の課題としては、12日経過した時点で顕著なmiRNAの変化が見られないなら、運動習慣のより早い時期での検討がなされるべきであると考えられる。例えば、自発的走運動が開始された初期段階におけるmiRNA発現変化についての検討や、あるいは、自発的な運動ではないが、トレッドミルを用いた急性走運動に対する同様の検討なども考えられる。

一方、マイクロアレイ法により大きな変化が予測されたmiRNAのほとんどが定量的RT-PCR法ではあまり変化しなかったことについての原因ははっきりしない。また、図表からも分かるように、定量的RT-PCR法の結果においては数値のばらつきが大きいものが散見された。手技・手法の妥当性の検討や確実性の向上についても今後の課題であると考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計2件)

- ① 川島均、松本大学松商短期大学部、運動とこころの健康、2011
- ② 川島均、松本大学松商短期大学部、運動とからだの健康、2011

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 均 (KAWASHIMA HITOSHI)

松本大学松商短期大学部・商学科・准教授

研究者番号：10392416