

令和元年6月10日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01502

研究課題名(和文) 発育期の海馬の形態や機能に好影響を及ぼす運動の至適時期や至適強度はあるか？

研究課題名(英文) The sensitive period to and optimal intensity of exercise training for having the positive effects on the hippocampal structure and function at the developmental stage

研究代表者

丹 信介 (TAN, Nobusuke)

山口大学・教育学部・教授

研究者番号：00179920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：学習・記憶、不安やうつなどに関わる海馬の形態や機能の発育発達を促す効果的な発育期の運動の時期や運動条件は明らかでない。そこで、本研究では、この点に関して、発育期の異なる期間(発育前期および発育急進期)に、低強度と中・高強度の走行トレーニングを行わせ検討した。その結果、海馬容積の増加や神経新生の促進といった形態面や海馬の形態や機能的変化に関与する神経栄養因子の増加という点からは、発育急進期中・高強度の運動トレーニングを行うことが効果的であることが示唆された。一方、学習・記憶能力の向上や抗うつ・抗不安作用という機能面での効果は明らかとはならなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、海馬容積の増加や神経新生の促進といった海馬の形態面や海馬の形態や機能的変化に関与する神経栄養因子の増加という点からは、発育急進期中・高強度の運動トレーニングを行うことが効果的であることを、はじめて明らかにした。一方、学習・記憶能力の向上や抗うつ・抗不安作用という海馬の機能面での効果は明らかとはならなかった。そのため、強度の条件だけでなく、運動時間や運動トレーニング期間などの検討をさらに行う必要があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the sensitive period to and optimal intensity of exercise training for having the positive effects on the hippocampal structure and function at the developmental stage, we determined the effects of exercise training at two different intensities, low and moderate-to-high intensity, during prepubertal to early-adolescence or mid- to late-adolescence on hippocampal volume, neurogenesis, a level of hippocampal trophic factor involved with hippocampal structure and function, spatial learning and memory, anxiety-like behavior, and depressive-like behavior. The moderate-to-high intensity exercise training during mid- to late-adolescence might have the most positive effects on hippocampal volume, neurogenesis, and a level of hippocampal trophic factor. Neither of exercise training during prepubertal to early-adolescence and mid- to late-adolescence improved the hippocampal function, such as spatial learning and memory and anxiolytic/antidepressant effects.

研究分野：運動生理学、身体教育学、行動神経科学

キーワード：発育期 海馬 運動トレーニング 可塑性 空間学習・記憶 抗不安・抗うつ作用 適時性 運動強度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発達中の脳は、環境刺激に対して感受性が高く(Rise, D. et al., 2000)、海馬は、発育期に変化しやすい脳部位のひとつとされている(Wolfer, D. P. et al., 1995)。

継続的な運動は、脳の形態や機能に影響を及ぼす環境刺激のひとつと考えられ、実際に、継続的な運動は、認知機能の低下や海馬を含む脳の容積の減少を抑制する効果があることが高齢者で明らかにされている(Kramer, A. F. et al., 2006、Erickson, K. I. et al., 2011)。また、脳の発育・発達が著しい発育期においても、有酸素能力の違いは、海馬が関係する学習・記憶を含む認知機能や海馬の形態に影響を及ぼすことが明らかになりつつある。例えば、Chaddock, L. et al. (2010)は、有酸素能力の高い子どもは、低い子供に比べて海馬容積が大きく、海馬が関係する記憶能力を評価する課題の成績もよいことを報告している。また、齧歯類でも、発育期全体を通して走運動トレーニングを行わせた場合、行わせた場合に比べて、海馬が関係する空間学習・記憶能力が高いことが報告されている(Uysal, N. et al., 2005)。さらに、継続的な運動は、抗うつ、抗不安効果をもたらすことも示されており、このような効果にも海馬の形態や機能的変化が関与することが明らかになってきた(北ら、2014、Schoenfeld, T.J. et al., 2013)。

このようなことから、発育期に継続的な運動を行うことは、海馬が関係する学習・記憶能力の向上や抗うつ・抗不安効果をもたらすことが考えられる。また、学習・記憶機能には主に背側海馬領域、不安やうつ様行動、ストレス反応調節には主に腹側海馬領域が関与することが指摘されるようになってきており(Fanselow, M. S. et al., 2010、Tanti, A. et al., 2013)。学習・記憶機能の向上や抗うつ・抗不安効果をもたらす機序のひとつに、背側、腹側それぞれの海馬領域の容積の増加などの海馬における形態変化があることが考えられる。さらに、海馬の形態や機能に影響を及ぼす神経生物学的な変化である海馬の神経新生の程度や脳由来神経栄養因子(BDNF)の変化なども、継続的な運動により、その程度の促進や量の増加が認められることが報告されており(Clark, P. J. et al., 2008、Vaynman, S. et al., 2004)。それらの効果は、運動を行う発育期の時期(飯村ら、2007)や用いる運動強度(Lou, S. et al., 2008)によって異なる可能性が推測されている。

しかし、発育期のいつの時期に継続的な運動を行うのが、海馬が関係する学習・記憶機能の向上や抗うつ・抗不安効果を得るために最も適しているのかという点については必ずしも明らかでない。また、最も効果的な運動強度などの適切な運動の条件も明らかにされていない。さらに、それぞれの効果をもたらす機序について、海馬領域の機能的違いに着目し、背側および腹側それぞれの海馬領域の容積や神経新生の程度などに対する継続的な運動の影響を検討した報告もみられない。

2. 研究の目的

前述のとおり、発達中の脳の中でも、学習・記憶、不安やうつなどに関わる海馬は、環境刺激に対して発育期に変化しやすい脳部位のひとつである。また、運動は重要な環境刺激のひとつであると考えられるが、海馬の形態や機能の発育発達を促す効果的な運動の時期や条件は明らかでない。そこで、本研究では、発育期のラットに、トレッドミルを用いた低強度と中・高強度という2つの異なる強度での走行トレーニングを、発育期の異なる期間(発育前期および発育急進期)に行わせ、これらの運動トレーニングの効果の違いを、背側と腹側のそれぞれの海馬領域について、その容積およびその容積に影響を及ぼす神経新生の程度や血管密度、海馬容積にも影響を及ぼすシナプス形成に関与するタンパク分子(BDNFなど)の発現量の面から検討する。また、それぞれの運動トレーニング効果の違いを、背側と腹側のそれぞれの海馬領域が主に関係する空間学習・記憶能力、不安・うつ様行動の面からも検討する。そして、これらの検討結果から、海馬の形態や機能の発育発達を促す効果的な発育期の運動トレーニングの至適時期および至適強度を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

本実験は山口大学動物使用委員会の審査を受け、承諾を得て実施した。

(1) 実験動物および運動トレーニング条件

発育前期に相当する4週齢および発育急進期に相当する6週齢のウイスター系雄ラットを用い、乳酸閾値(LT)より明らかに低い低強度(速度11m/分)あるいはLTより明らかに高い中・高強度(速度25 m/分)のトレッドミルを用いた走行トレーニングを、1日30分、週5日の頻度で、それぞれ4週齢および6週齢から4週間行わせる運動群(4週齢低強度運動群、4週齢中・高強度運動群、6週齢低強度運動群および6週齢中・高強度運動群の4群)と、それぞれ同期間通常飼育のみの対照群(4週齢対照群および6週齢対照群の2群)に分けた。

(2) 背側および腹側海馬における神経新生の程度、血管密度および背側および腹側海馬容積の変化に関する検討

4週間のトレーニング期間終了後、麻酔下で、各群のラットの脳を還流固定し摘出した。そして、摘出した脳を用いて脳組織切片を作成し、作成した脳切片を免疫組織化学的染色に供し、海馬の幼若神経細胞(ダブルコルチン(DCX)陽性細胞)および血管内皮細胞(RECA-1陽性細胞)

胞)を、それぞれ同定した。また、これとは別の脳切片を用いてニッスル染色を行った。顕微鏡画像解析システムを用いて、同定した背側および腹側海馬の DCX 陽性細胞の数および RECA-1 陽性細胞の密度をそれぞれ測定し、それらの変化から背側および腹側海馬の神経新生の程度や血管密度の違いを検討した。また、ニッスル染色像をもとに、顕微鏡画像解析システムを用いて、背側および腹側海馬領域を同定し、それらの面積を測定し、それをもとに背側および腹側海馬それぞれの容積を推定した。

(3) 海馬における脳由来神経栄養因子(BDNF)、シナプス前部タンパクであるシナプトフィジンおよびシナプス後部タンパクである PSD95 発現量に関する検討

4 週間のトレーニング期間終了後、麻酔下で、各群のラットの海馬を摘出し、凍結保存した。後日、保存しておいた各群のラットの海馬全体をそれぞれホモジネート後、ウエスタンブロットリング法により、海馬全体における BDNF、シナプトフィジンおよび PSD95 タンパク発現量の測定を行った。また、海馬 BDNF 量については、ELISA 法による定量測定も行った。

(4) 空間学習・記憶能力および不安やうつ様行動に関する検討

4 週間のトレーニング期間終了後、まず、各群の不安様行動を評価するために高架式十字迷路試験を 1 回実施した。次に、その翌日に、うつ様行動を評価するために強制水泳試験を 2 日にわたり実施した。さらに、その翌日から各群の空間学習・記憶能力を評価するために水迷路試験を 6 日間連続して行った(5 日間は学習獲得試験、最後の 1 日は記憶保持を評価するためのプローブ試験)。これらの試験中の各群のラットの行動をビデオ撮影し、その動画をそれぞれの試験に対応した行動解析システムにより解析し、それぞれの試験における各群の行動の違いから、不安やうつ様行動、空間学習・記憶能力の違いを、それぞれ評価した。

以上の(2)~(4)の検討結果を最終的にまとめて検討することにより、海馬の形態や機能の発育発達に効果的な発育期の運動トレーニングの至適時期および強度条件について検討した。

4. 研究成果

(1) 背側および腹側海馬における神経新生の程度、血管密度および背側および腹側海馬容積の変化

背側海馬容積(Bregma-2.76~-4.20 mm)は、4 週齢低強度および中・高強度運動群のいずれも、対照群との間で有意な差は認められなかった。6 週齢低強度運動群の背側海馬容積は、対照群と比べて高値を示したが、有意な差ではなかったのに対して、6 週齢中・高強度運動群のその容積は、対照群と比べて有意に高値を示した。

腹側海馬容積(Bregma-5.76~-6.36 mm)は、4 週齢低強度および中・高強度運動群のいずれも、対照群との間で有意な差は認められなかった。6 週齢低強度および中・高強度運動群の腹側海馬容積は、統計的に有意な差には至らなかったが、いずれも対照群と比べて高値を示す傾向が認められた。

神経新生の程度を示す海馬歯状回における幼若神経細胞数(DCX 陽性細胞数)は、背側海馬(Bregma-2.92~-3.72 mm)では、4 週齢低強度および中・高強度運動群、6 週齢低強度および中・高強度運動群いずれも、それぞれの対照群と比べて有意に高値を示した。

腹側海馬(Bregma-5.76~-6.36 mm)歯状回における幼若神経細胞数(DCX 陽性細胞数)は、4 週齢および 6 週齢低強度運動群では、いずれも対照群と比べて有意な差は認められなかったが、4 週齢および 6 週齢中・高強度運動群では、いずれも対照群と比べて有意に高値を示した。

背側海馬(Bregma-2.76~-4.20 mm)歯状回およびアンモン角 1 における血管密度(RECA-1 陽性細胞の密度)は、4 週齢および 6 週齢低強度運動群のいずれも、それぞれの対照群と比べて有意な差は認められなかった。

以上のことから、背側および腹側海馬容積は、発育急進期の運動トレーニングで増大あるいは増大する傾向を示し、その効果は中・高強度運動トレーニングで高い傾向が認められた。一方、海馬神経新生については、背側、腹側海馬ともに、発育時期にかかわらず中・高強度運動トレーニングで、その促進効果が高く、背側海馬では低強度運動トレーニングでもその促進効果が認められた。血管密度に対する運動トレーニングの効果は、少なくとも背側海馬では、いずれの発育時期においても明らかではなかった。したがって、発育急進期中・高強度の運動トレーニングにおいて、海馬容積の増大やその一因となる海馬神経新生(荒牧、2016)の促進効果が生じやすいことが示唆された。しかし、海馬神経新生の促進効果は、発育前期や低強度の運動トレーニングでも認められることから、海馬容積の変化と神経新生の程度とは必ずしも対応しないことが示唆された。

(2) 海馬における脳由来神経栄養因子(BDNF)、シナプス前部タンパクであるシナプトフィジンおよびシナプス後部タンパクである PSD95 発現量

ELISA 法により測定した海馬 BDNF 量(1mg タンパク当たりの値)は、4 週齢低強度および中・高強度運動群のいずれも、対照群との間で有意な差は認められなかったが、6 週齢低強度および中・高強度運動群のその量は、いずれも対照群と比べて有意に高値を示した。一方、ウエス

タンブロット法による海馬 BDNF 量の測定では、同様な結果は得られなかった。

シナプス前部タンパクであるシナプトフィジンおよびシナプス後部タンパクである PSD95 それぞれの海馬における量は、4 週齢低強度および中・高強度運動群、6 週齢低強度および中・高強度運動群いずれも、それぞれの対照群と比べて有意な差は認められなかった。

以上のことから、神経新生やシナプスの可塑的变化に関与する BDNF (Li, Y. et al., 2008, Benarroch, E. E., 2015) の海馬における発現量は、運動強度にかかわらず発育急進期の運動トレーニングで増大するが、測定法によって結果が一致していないことから、その増加はそれほど大きなものではなかったのではないかと推測された。また、シナプトフィジンおよび PSD95 の発現量から、海馬におけるシナプスの可塑的变化 (シナプス形成の促進やシナプス機能の高進) に対する運動トレーニングの効果を推察した場合、いずれの発育時期においても、その効果は明らかではないことが示唆された。

(3) 空間学習・記憶能力および不安やうつ様行動

それぞれ一対の壁のない走路 (オープンアーム) と壁のある走路 (クローズドアーム) から構成される高架式十字迷路を用いた試験では、試験中のオープンアーム侵入回数率や時間率の高低が不安様行動の減少、増大を示すと考えられる (Walf, A. A. et al., 2007)。高架式十字迷路試験中のオープンアーム侵入回数率や時間率は、4 週齢および 6 週齢低強度運動群いずれも、それぞれの対照群と比べて有意な差は認められなかったが、4 週齢および 6 週齢中・高強度運動群では、いずれも、それぞれの対照群と比べて有意に低値を示した。したがって、4 週齢および 6 週齢中・高強度運動群では、不安様行動が増加したことが推察された。

強制水泳試験中に手足をほとんど動かさない不動の状況は、うつ様行動と考えられる (Slattery, D. A. et al., 2012)。2 日目の強制水泳試験中の不動時間は、4 週齢低強度および中・高強度運動群、6 週齢低強度および中・高強度運動群いずれも、それぞれの対照群と比べて有意な差は認められなかった。したがって、4 週齢、6 週齢それぞれ各群の間で、うつ様行動に違いはないことが推察された。

モリス水迷路試験の学習獲得試験において、水面下に隠れているプラットホーム (退避場所) までの遊泳到達時間の短縮は、空間学習の獲得が成されていることを示していると考えられる (Charles, V. V. et al., 2006)。また、プラットホームを取り除いたプローブ試験において、それまでプラットホームが設置してあったエリアの遊泳滞在時間の割合の高低は、記憶保持能力の高低を示していると考えられる (Charles, V. V. et al., 2006)。学習獲得試験において、プラットホームまでの遊泳到達時間は 5 日間を通して短縮したが、その経日的変化は、4 週齢低強度および中・高強度運動群、6 週齢低強度および中・高強度運動群いずれも、それぞれの対照群と比べて有意な違いは認められなかった。また、プローブ試験においても、プラットホームが設置してあったエリアの遊泳滞在時間の割合は、4 週齢低強度および中・高強度運動群、6 週齢低強度および中・高強度運動群いずれも、それぞれの対照群と比べて有意な差は示されなかった。したがって、4 週齢、6 週齢それぞれ各群の間で、空間学習・記憶能力に違いはないことが推察された。

以上のことから、うつ様行動および空間学習・記憶能力に対する運動トレーニングの効果は、いずれの発育時期においても認められないことが示唆された。一方、不安様行動は、いずれの発育時期においても、低強度の運動トレーニングによる影響は認められなかったが、中・高強度運動トレーニングでは、不安様行動を高める、すなわち催不安効果があることが示唆された。

(4) まとめ

上記研究成果の (1) ~ (3) を踏まえると、背側および腹側海馬の容積の増加や神経新生の促進といった海馬の形態面や BDNF のような海馬における神経栄養因子の増加という点からは、発育急進期中・高強度の運動トレーニングを行うことが効果的であることが示唆された。しかし、海馬神経新生の促進効果は、発育前期の運動トレーニングでも認められること、背側海馬では、低強度の運動トレーニングでもその促進効果が得られること、海馬 BDNF 量の増加は発育急進期の低強度運動トレーニングでも認められることから、発育前期の運動トレーニングや低強度の運動トレーニングでも、海馬に対する一部の効果は認められることが推察された。

このような海馬の形態や神経栄養因子に対する発育期の運動トレーニングの効果は、発育期の海馬の機能面にも好ましい影響を及ぼすと考えられる。しかし、本研究では、背側および腹側海馬領域がそれぞれ関与するとされる学習・記憶能力の向上や抗うつ・抗不安作用という機能面での効果には必ずしも結びつかなかったことが示唆された。本研究では、1 日 30 分、週 5 日の頻度で、4 週間の運動トレーニングを行ったが、今後は、機能面にも好ましい影響が生じるような運動条件の検索を、さらに進めていくことが望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

丹 信介、身体活動・運動と認知機能 - 太極拳やヨーガの有効性に関する考察を交えて -、日本統合医療学会誌、査読有 (招待総説) 9(1): 78-84、2016

〔学会発表〕(計 3 件)

丹 信介、加瀬谷直希、大野裕誉、曽根涼子、異なる強度の運動トレーニングが異なる発育時期のラットの不安およびうつ様行動に及ぼす影響、第 73 回日本体力医学会大会、2018

丹 信介、岡上 桂、曽根涼子、異なる強度の運動トレーニングが異なる発育時期のラット海馬脳由来神経栄養因子に及ぼす影響、第 72 回日本体力医学会大会、2017

丹 信介、中村大樹、山縣慎也、曽根涼子、異なる発育時期における中・高強度運動トレーニングがラット海馬容積に及ぼす影響、第 71 回日本体力医学会大会、2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：杉浦 崇夫

ローマ字氏名：SUGIURA, Takao

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。