

平成21年 5月14日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500446
 研究課題名（和文）高齢者の運動習慣による脳内シナプス増強に関する実験動物学的研究

研究課題名（英文）The study for the effects of exercises on cerebral synapses in the elderly based on animal experiments

研究代表者

前島 洋 (HIROSHI MAEJIMA)
 広島大学・大学院保健学研究科・講師
 研究者番号：60314746

研究成果の概要：ラットにおけるトレッドミル走行が大脳皮質運動関連領域および小脳皮質におけるグルタミン酸受容体と後シナプス蛋白の発現および機能修飾に与える影響について検討した。1日40分の中等度のトレッドミル走行を10日間および4週間行った。大脳皮質では、10日間介入でグルタミン酸受容体を含む後シナプス受容体 mRNA 発現量の低下が認められたが、4週間介入後ではこれらの mRNA 発現低下は認められなかった。一方、小脳皮質では10日間介入により、グルタミン酸受容体の中でも AMPA 受容体の特異的リン酸化が増強し、4週間介入後には AMPA 受容体の mRNA 発現の低下が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：運動療法学

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた今日、高齢者の健康で自立した地域生活を促進するための対策は医療・福祉の最も重要な課題のひとつである。特にアルツハイマー病をはじめとする認知症やパーキンソン病等の老化にともなう中枢神経疾患発症に対する抑制に関しては高い社会的関心が寄せられている。医学的リハビリテーションにおいて、運動療法はこれらの疾患に対する有効な治療手段であるが、そ

の一方で、ウォーキングをはじめとする日々の運動習慣がこれらの中枢神経系疾患の抑制と脳の老化に対して極めて有効であることが、今日、注目を集めている。高齢者における軽度な運動の継続はアルツハイマー病や他の認知症の発症を30—40%抑制する²⁾。また、アルツハイマーのモデルマウスを用いた実験では、ウォーキングはアルツハイマーの特徴であるアミロイド沈着を皮質・海馬ニューロンにおいて30-50パーセント抑制する。その科学的論拠として、シナプス増強因子と

して働く Brain derived neurotrophic factor (BDNF)をはじめとする神経栄養因子が注目されている。実際に、マウス、ラットを用いた動物実験においてウォーキングをはじめとする運動習慣は、脳皮質・海馬におけるBDNFの発現を増強することが報告されている。恒常的なシナプス活動とそれによるシグナル伝達系の維持は中枢神経の廃用的退行や疾病の抑制に重要な内部環境要因であることから、神経栄養因子の関与は十分に考えられるが、運動によって促進される神経栄養因子がどのようなかたちで脳内神経シナプスの可塑性を修飾しているのかについての知見は極めて乏しい。本研究の目的は運動習慣によって誘導されると推定される神経栄養因子の発現増強と相互作用するシナプス増強に対して、トレッドミル歩行を用いた動物実験を通して検証し、今日、高齢者のヘルスアップにおいて推奨されるウォーキングを始めとする運動習慣が中枢神経系可塑性に与える新たな可能性について基礎研究から検討することである。

2. 研究の目的

神経受容体の機能修飾はシナプス可塑性の重要なターゲットであり、特に脳内ニューロンの主要な興奮性受容体としてはたらくグルタミン酸受容体は、学習・記憶の背景となる長期増強・長期抑制の素子蛋白として重視されてきた。リハビリテーションにおける運動療法において、小脳・大脳運動関連領域を始めとする中枢神経系における可塑的な運動学習の獲得が必要となる。神経受容体の機能修飾はシナプス可塑性の重要なターゲットであり、特に脳内ニューロンにおける主要な興奮性受容体としてはたらくグルタミン酸作動性のAMPA受容体およびNMDA受容体は、この学習にともなう長期増強・長期抑制の素子蛋白として機能している。本研究では、運動習慣がシナプス機能修飾に与える影響として、シナプス可塑性において中心的役割を演じるこれらグルタミン酸受容体に焦点を当てて運動習慣の効果を検証する。従って、本研究では、ラットのトレッドミル走行によって促進されるBDNF発現と、それにもなうグルタミン酸受容体の機能的修飾およびその発現に対する影響を明らかにする。後シナプス膜において、AMPA受容体は間接的に、NMDA受容体は直接的にアンカー蛋白であるPSD-95に繋ぎ止められ、Src Family Kinase (SFK)等も含むPSD複合体を形成し、シナプス面における安定性と受容体活性を維

持している。AMPA受容体は4量体のサブユニット構成によりGluR1/2 (GluR1) とGluR2/3型 (GluR2) があり、一方、NMDA受容体は2つのNR1サブユニットとNR2サブユニット (NR2AまたはNR2B) より構成される (図3)。小脳皮質プルキンエ細胞には、NMDA受容体は発現しておらず、AMPA受容体GluR2が主要となる。一方、大脳では、NMDA受容体およびAMPA受容体両タイプが発現している。そこで、従来の報告を統合して、以下の大脳皮質運動関連領域における長期増強、小脳皮質における長期抑制の機構がトレッドミル運動において惹起されるかを検証する。

大脳皮質運動関連領域の長期増強：SFKはNMDA受容体NR2Bサブユニットをリン酸化 (Tyr1472) し、NMDA受容体の活性を促進する。BDNFはそのレセプター (TrkB) の活性を通して、SFK活性を介在してNMDA受容体を活性化する。その活性はBDNF発現を更に増強する。一方、AMPA受容体はNMDA受容体のシナプス活動状態に応じてその局在を変化させ、PSD複合体への局在を促進する。そのトリガーとしてGluR1の特異的リン酸化 (Ser845) が関与し、その後、GluR1は代謝されてGluR2に置換される。また、GluR1の特異的リン酸化 (Ser 831, Ser845) はチャンネル活性を促進する。

小脳学習 (長期抑制)：不適切な小脳運動調節に関与する責任プルキンエ細胞は、登上線維による誤差信号と平行線維入力との同期により長期抑制が生じ、GluR2はリン酸化 (Ser880) が促進され、PSD複合体からのエンドサイトーシスを受け、シナプス感受性が抑制される。このことにより目的運動に適切なシナプスが選択的に維持され、スムーズな運動が惹起される。

以上の仮説の機構を検証するため、成体マウスにおけるトレッドミル運動による効果を検証した。

3. 研究の方法

(1) 対象

8週齢のwister系雄性ラット (276±22.3g) 20匹を使用した。介入期間に関しては10日間介入、4週間介入の2期間を設定した (各n=10)。各介入群 (各n=5) に対してそれぞれコントロール群を設定した (各n=5)。なお、本実験は広島大学動物実験委員会の承認の下に行った (承認番号：A07-110、A08-62)。

(2) 運動介入条件

走行運動にはラット用トレッドミル（ラットランナー 強制運動装置 RR700型, 阿川機械工業社, 日本）を使用した。運動条件は、適応練習として8.7m/minで10分、走行運動として20.5m/minで40分と設定した。

(3) 脳サンプル採取

最終介入の翌日、介入群 (Exercise group: Ex) とその対象群 (Control group: Con) を屠殺し、大脳皮質運動関連領域および小脳皮質を採取した。採取した組織のうち各左半球は液体窒素で凍結固定後、ディープフリーザー (-80°C) で保存し Western blotting 法に用いた。残りの半球は定量的PCR法のために RNeasy (Applied Biosystems, 米国) 内に沈下し、4°Cで保存した。

(4) 定量的PCR法による後シナプス膜蛋白mRNA発現量の定量

採取した組織より RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, オランダ) を使用し、総RNAを抽出した。抽出総RNAに対して High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて逆転写を行い、cDNAを合成した。続いてリアルタイムPCRシステム (Mx3000P® Real time PCR system, Stratagene, USA) を用いて、Taqman® Gene Expression Master Mix と各蛋白のプライマーとして Taqman® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) を用いて増幅し、内部標準遺伝子として β -actin を用いて比較Ct法 ($\Delta\Delta$ Ct法) に基づき標的蛋白のCt値を計測した。標的蛋白として、大脳皮質においては NR2B、GluR1、GluR2、PSD-95、BDNF の mRNA 発現を計測した。また、小脳皮質においては、GluR2、PSD-95、BDNF の mRNA 発現量を定量した。

統計処理には SPSS® 11.5J for windows (エスピー・エス・エス株式会社, 日本) を使用した。

(5) Western blotting法による後シナプス蛋白の発現とリン酸化の定量

BCAに基づく総蛋白量計測の後、同蛋白量を SDS page においてゲルの各レーンに投与し、泳動を行い、メンブレンにブロッティングした。

抗体反応として、大脳皮質においては NMDA 受容体 (NR2B)、AMPA 受容体 (GluR1、GluR2) の蛋白発現とその特異的リン酸化を定量した。小脳皮質においては AMPA 受容体 GluR2 の

蛋白発現とその特異的リン酸化の程度を定量し、介入群と対象群間において比較した。

NR2Bリン酸化の定量においては、メンブレンを NR2B抗体でプローブした後、Tyr1472リン酸化NR2B抗体で再度プローブし、その比を算出することにより、同部位のリン酸化の程度を定量した。同様に、GluR2に対して Ser880リン酸化GluR2抗体、GluR1に対して Ser845リン酸化GluR1抗体を用いた。

4. 研究成果

(1) 大脳皮質運動関連領域における運動介入効果

①10日間の運動介入効果

定量的PCRによる mRNA 発現量の計測の結果、10日間介入後において、介入群における NR2B、GluR1、PSD-95 および BDNF の mRNA 発現量は対象群と比較して有意に少なかった (図1)。GluR2についても介入群の mRNA 発現量が対象群よりも少ない傾向が認められた ($p < 0.08$)。

Western blotting における特異的リン酸化に関しては、NR2B の Tyr1472 のリン酸化について3種類の抗体を用いて検討した。1抗体において介入群が対象群よりも有意に高いリン酸化が認められたが、残り2抗体においては、両群間の有意な違いは認められなかった。また、GluR1 Ser831、GluR1 Ser845 の何れのリン酸化においても介入群と対象群間に有意な差は認められなかった。

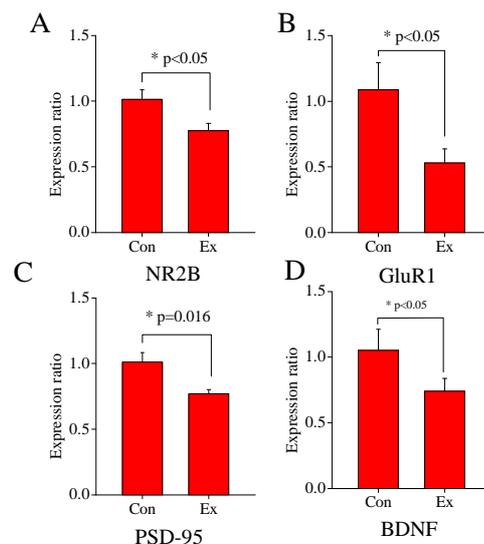


図1 10日間介入による mRNA 発現量

以上の結果から、運動によりBDNF発現は増強するという従来の報告とは異なり、10日間介入によってBDNF発現は抑制され、更その後シナプスにおける複数の蛋白mRNA発現が抑制されていることが示された。一方、リン酸化による受容体の機能修飾の明確な所見は認められなかった。

その後の運動継続により、4週間運動介入後では、10日間介入で認められた後シナプス蛋白のmRNA発現の抑制は生じていなかった。

②4週間の運動介入効果

定量的PCRによるmRNA発現量の計測の結果、4週間の介入後において、NR2B、GluR1、GluR2、PSD-95およびBDNFの何れのmRNA発現量に関して、介入群と対象群間に有意な違いは認められなかった。

Western blottingによる特異的リン酸化の定量において、NR2B Tyr1472、GluR1 Ser831、GluR1 Ser845の何れのリン酸化においても、介入群と対象群間に有意な差は認められなかった。

(2) 小脳皮質における運動介入効果

①10日間の運動介入効果

定量的PCRによるmRNA発現量の計測の結果、10日間介入後において、GluR2、GluR1およびPSD95のmRNA発現量については、介入群と対象群間に有意な差は認められなかった。一方、10日間介入後における介入群のBDNF mRNA発現量は、対象群と比較して有意に少なかった(図2)。

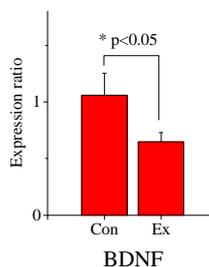


図2 10日間介入後のBDNF mRNA発現量

Western blottingによる特異的リン酸化の定量において、GluR2のSer880のリン酸化については、介入群が対象群よりも有意に高いリン酸化が認められた(図3)。

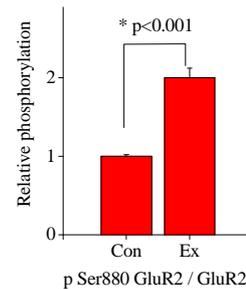


図3 10日間介入後におけるGluR2 Ser880の特異的リン酸化

②4週間の運動介入効果

定量的PCRによるmRNA発現量の計測の結果、10日間介入後における介入群のGluR2 mRNA発現量は、対象群と比較して有意に少なかった(図4)。一方、GluR1、PSD95およびBDNFのmRNA発現量については、介入群と対象群間に有意な差は認められなかった。

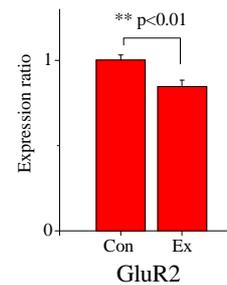


図4 4週間介入後におけるGluR2 mRNA発現

定量において、GluR2のSer880のリン酸化については、対象群に対して介入群のリン酸化が高い傾向は認められたが、有意な差は認められなかった。

以上の結果から、介入初期の10日間においてGluR2 Ser880リン酸化が増強し、AMPA受容体のエンドサイトーシスを伴うLTDの増強が生じていることが示唆された。一方、その後の4週間の長期介入を通して、抑制によりシナプス後膜から細胞内に除かれて機能的に不要となったGluR2量に適応し、その産生が減少していることが推察された。即ち、後シナプス細胞における効率的なGluR2産生が追従し、より安定した抑制に貢献していることが推察された。

本研究の成果として、運動療法として有用な走行運動が、大脳皮質運動関連領域および小脳皮質におけるシナプス受容体の機能修飾と発現調整に対して介入期間に依存した影響を与えることを明らかとした。

今後は、これらの機能修飾や発現調整に関わるシグナルの詳細な解明を進めるとともに、運動の強度や運動時間、対象の年齢の違いが、以上の機能修飾や発現調整に与える影響について解明を進めることが望まれる。

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2件)

(1) 前島 洋, 坂野周平, 大谷拓哉, 黒瀬智之, 出家正隆. 走行運動によるラット小脳 AMPA 受容体の修飾. 第14回理学療法の医学的基礎研究会学術集会. 東京. 5. 27. 2009

(2) Maejima H., Otani T., Kinoshita E., Saka Y., Tobimatsu Y. Effects of exercise on NR2B subunit phosphorylation in NMDA receptor. The Society for Neuroscience 38th Annual meeting. Washington, DC, USA, Nov. 17. 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前島 洋 (MAEJIMA HIROSHI)

広島大学・大学院保健学研究科・講師

研究者番号：60314746

(2) 研究分担者

飛松 好子 (TOBIMATSU YOSHIKO)

広島大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：20172174

木下 英司 (KINOSHITA EIJI)

広島大学・医歯薬総合研究科・准教授

研究者番号：80304418

(3) 連携研究者