

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 7日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500471

研究課題名（和文） 高齢者のバランス運動学習における脳内シナプス修飾に関する実験動物学的研究

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

研究代表者

前島 洋 (MAEJIMA HIROSHI)

帝京科学大学・医療科学部・教授

研究者番号：60314746

研究成果の概要（和文）：老化促進モデルマウスを対象に老化およびバランス運動介入が大脳皮質運動関連領野、小脳皮質、および海馬における神経栄養因子とシナプス受容体の発現と機能修飾に与える影響について検討した。4週間の高頻度・長時間のバランス運動介入によって、小脳皮質における神経栄養因子およびシナプス受容体の発現低下が生じた。一方、4週間の低頻度・短時間のバランス運動介入によって、上記の発現低下は生じず、更に、老齢マウスにおいてのみ海馬におけるシナプス受容体と神経栄養因子の受容体の発現増強が惹起された。

研究成果の概要（英文）：The effects of aging and balance exercise on the expression and the modification of synaptic receptors and neurotrophins in the cerebellum, the motor related-area, and the hippocampus were assessed using senescence-accelerated mice (SAM). High-frequent and long-time balance exercise for four weeks decreased the expression of synaptic receptors and neurotrophins, whereas low-frequent and short-time balance exercise for four weeks did not induce such down-regulation, and also increased the expression of synaptic receptors and the receptor of neurotrophin only in aged mice.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：リハビリテーション医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 今日、高齢者のバランス機能の低下による転倒は、大腿骨頸部骨折を始めとするその後の著しいADL低下を引き起こす重篤なリスクファクターとして重視されている。このため、高齢者の転倒予防を目的とする様々な介入が行われている。運動療法とりわけ高齢者のバランス学習を目的と

するバランス運動が多く介入で用いられ、臨床的な成果が報告されている。研究代表者も平成14年度よりこれまで、国保ヘルスアップモデル事業の事業評価者として運動介入が高齢者のバランス機能改善に与える効果について長期的に追跡し、その効果を発信してきた。

(2) リハビリテーションにおける運動療

法において特に重要となるバランス機能の改善には、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。海馬における長期増強に関する実験では、学習により AMPA 受容体は特異的リン酸化によりシナプス後膜への移動が増強し、NMDA 受容体もまた特異的リン酸化によりシナプス後膜における安定化、チャンネル感受性の向上が報告されている。一方、運動によるシナプス修飾因子として、Brain derived neurotrophic factor (BDNF)を始めとする神経栄養因子の関与が注目されている。実際に運動介入により大脳皮質、海馬における BDNF の発現が報告されている。

(3) 研究代表者は、これまでグルタミン酸受容体に対する様々な修飾薬の作用機構についてパッチクランプ法を用いた電気生理学的研究に携わってきた。また、運動療法モデルのひとつとして走行運動によるラット大脳皮質運動野における NMDA 受容体の機能修飾に関する生化学的研究を進めてきた。

(4) これまで、運動療法の臨床を想定して、バランス運動がどのような機構で中枢神経系運動関連領域のシナプスを修飾しているのか、*vivo* レベルでの統合的な研究は極めて乏しい。本研究では研究代表者の臨床的、基礎的研究の経緯を背景として、バランス運動がその制御に重要な小脳皮質および大脳皮質運動関連領域、更に海馬におけるグルタミン酸受容体の機能修飾とシナプス可塑性に与える機構、神経栄養因子の関与、更にそれに対する老化の影響を検証することとした。

2. 研究の目的

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³⁾。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。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、小脳皮質、大脳皮質運動関連領域、海馬におけるシナプス受容体の発現と機能修飾、および、それと関連する神経栄養因子の発現修飾がバランス運動においてどのように惹起されるかについて、更にそれらのシナプス修飾に対する老化の影響について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 老齢マウスにおけるバランス運動による小脳シナプス修飾の検証

①対象

介入開始時において 44 週齢の雄性老化促進モデルマウス (SAM) 10 匹を使用し、バランス運動介入群 (Exercise group: Ex, n=5) と対照群 (Control group: Con, n=5) に群分けした。尚、本実験は広島大学動物実験委員会の承認の下に行った。

②バランス運動介入法

バランス運動として、運動介入のバランス運動として、マウスの協調性試験としても用いられるローターロッド運動 (25rpm、30 分間) を週 6 回の頻度で 4 週間課した。



図 1 ローターロッド運動

③組織採取

最終介入の後、介入群とその対照群を屠殺し、小脳皮質 (虫部領域) 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。標的遺伝子として、AMPA 受容体各サブユニット (GluR1、GluR2)、神経栄養因子 (BDNF, NT-3, NT-4, NGF) およびその受容体 (p75, TrkB) の mRNA 発現を計測した。

⑤ Western blotting 法による後シナプス受容体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、AMPA 受容体 GluR1、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。GluR1 リン酸化の定量においては、メンブレンを GluR1 抗体でプローブした後、Ser-845, Ser-831 特異的リン酸化 GluR1 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。

(2) 老化およびバランス運動介入が運動学習転移と中枢神経系シナプス機能修飾因子発現に与える効果

① 対象

老化モデル動物として老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse: SAM) 28 匹を、1) 成体・対照群 (Adult, Con)、2) 成体・運動群 (Adult, Ex)、3) 老齢・対照群 (Aged, Con)、4) 老齢・運動群 (Aged, Ex) の 4 群 (各群 7 匹) に群分けした。実験開始時における介入前の週齢は成体マウスでは 10 週齢、老齢マウスでは 44 週齢であった。尚、本実験は埼玉県立大学動物委員会の承認のもとに行った。

② バランス運動介入法

(1) と同様にバランス運動として、運動介入のバランス運動として、マウスの協調性試験としても用いられるローターロッド運動 (25rpm、15 分間) を週 3 回の頻度で 4 週間課した。週当たり 3 回の設定の根拠は、実際の高齢者を対象とする無理のない現実的な運動介入頻度に基づいたものである。

③ バランス運動介入の運動学習転移に関する評価：運動機能試験

運動機能試験として同上のローターロッド

試験 (Rotor rod test) に加えて、beam walking test、incline test、wire-hanging test の 4 試験を介入前後に実施した。

④ 組織採取

最終介入の後、介入群とその対照群を屠殺し、小脳皮質 (虫部領域)、大脳皮質運動関連領域、海馬を採取した。採取組織は定量的 PCR 法のために RNAlater (Applied Biosystems, 米国) 内に沈下し、4°C で保存した。

⑤ 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 (Thermal Cycler Dice Real Time System, Takara, Tokyo) 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。標的遺伝子として、NMDA 受容体各サブユニット (NR1, NR2A, NR2B)、AMPA 受容体各サブユニット (GluR1、GluR2)、神経栄養因子 (BDNF, NT-3, NT-4, NGF) およびその受容体 (p75, TrkB) の mRNA 発現を計測した。

⑥ 統計解析

統計解析として二元配置分散分析法を用いて、老化と運動介入の 2 つの主効果について検証し、交互作用が認められた場合には、水準ごとに一元配置分散分析を行った。

4. 研究成果

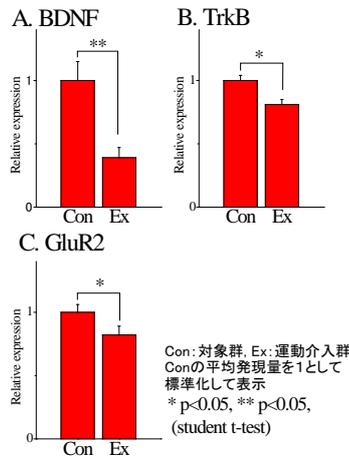
(1) 老齢マウスにおけるバランス運動による小脳シナプス修飾の検証

① 神経栄養因子と神経受容体の mRNA 発現に対するバランス運動の効果

神経栄養因子 BDNF とその受容体 TrkB の発現量は対照群と比較して介入群において有意に低く (図 2-A, B)、AMPA 受容体 GluR2 の発現量についても介入群において有意に低かった (図 2-C)。

その他の神経栄養因子 (NT-4, NT-3, NGF) および AMPA 受容体 GluR1 についても有意差は存在しないものの、介入群において低い発現傾向が認められた。

図2 バランス運動介入による小脳皮質における発現修飾



②AMPA 受容体のリン酸化に対するバランス運動の効果

Western blotting に基づく AMPA 受容体各サブユニットのリン酸化の定量的結果、何れの特異的リン酸化部位におけるバランス運動介入による有意なリン酸化レベルの修飾は同定されなかった。

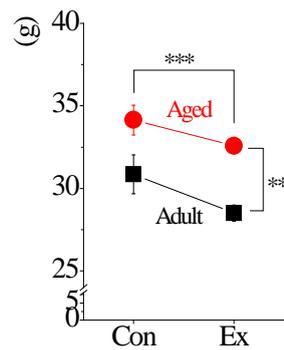
以上の結果から、小脳虫部において BDNF および GluR2 の mRNA 発現は1ヶ月間のバランス運動介入により有意な減少が生じた。その他の定量項目については運動介入による有意な効果は認められなかった。GluR2 mRNA 発現量の減少は、LTD に伴い小脳プルキンエ細胞における後シナプス膜における GluR2 のシナプス外への移動を伴うシナプス抑制に追従して適応的に GluR2 生成の抑制が惹起されている可能性も推察された。一方、神経栄養因子およびシナプス受容体のバランス運動介入による発現低下の所見から、本介入におけるほぼ毎日のバランス運動負荷は、老齢マウスにおいてはストレスとしてはたらく、発現の退行が惹起された可能性も示唆された。

(2) 老化およびバランス運動介入が運動学習転移と中枢神経系シナプス機能修飾因子発現に与える効果

①老化およびバランス運動によるマウスの体重変化

老化と運動介入共に主効果が認められた。体重は老化により有意に増加し、運動介入により有意に減少した (図3)。

図3 老化とバランス運動による体重変化

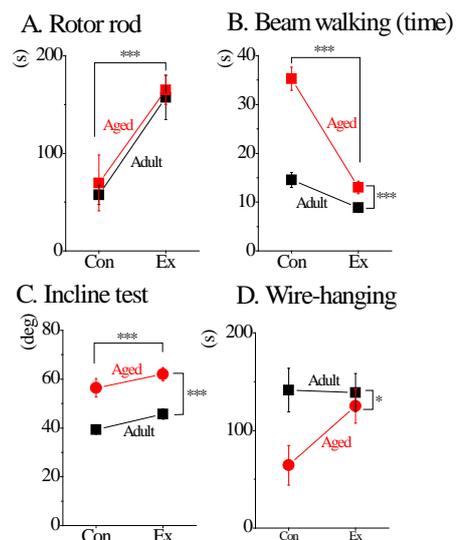


Adult, Con の平均値を1として標準化
*** p<0.001

②運動機能試験

- Rotor rod test: 運動の主効果が認められ、rod 耐久時間が有意に延長した (図4-A)。
- Beam walking test: Beam walking の所要時間に関して、老化と運動の主効果が認められ、交互作用も認められた。一元配置分散分析の結果、対照群、運動群の何れのマウスにおいても老化により所要時間は有意に延長した。また、成体、老齢マウスの何れにおいても運動介入により所要時間は有意に減少した (図4-C)。
- Incline test: 老化と運動の主効果が認められ、老化、運動介入により耐久角度が有意に増加した (図4-C)。
- Wire-hanging test: 老化による主効果が認められ、耐久時間が有意に短縮したが、運動の主効果は認められなかった (図4-D)。

図4 運動機能試験



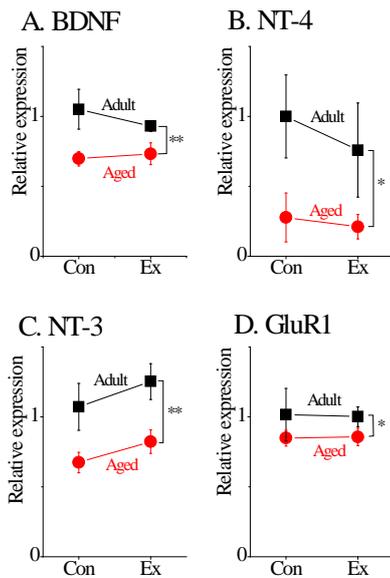
Adult, Con の平均値を1として標準化
* p<0.05, ** p<0.01

以上の所見より、複数の運動機能試験において、老化による成績の退行は生じて、4週間のローターロッドを用いた介入によりロッドの成績に加えて、beam-walking test、incline test といった協調性、バランス機能を伴う運動タスクにおいて改善が生じ、運動学習転移が確認された。一方、主に筋力、筋持久力を要する wire-hanging test への有意な学習転移は認められなかった。

③小脳皮質、大脳皮質運動関連領域におけるシナプス受容体、シナプス機能修飾因子の発現に対する老化とバランス運動の効果

小脳皮質虫部における神経栄養因子 BDNF、NT-4、NT-3 および AMPA 受容体 GluR1 サブユニットの発現量について老化による主効果が認められ、有意な発現減少が生じた (図 5-A, B, C, D)。一方、小脳皮質、大脳皮質運動関連領域の何れにおいても運動介入による標的遺伝子発現への効果は認められなかった。

図 5 老化およびバランス運動介入による小脳皮質における発現修飾



Adult, Con の平均値を 1 として標準化
* p<0.05, ** p<0.01

③海馬におけるシナプス受容体、シナプス機能修飾因子発現に対する老化とバランス運動の効果

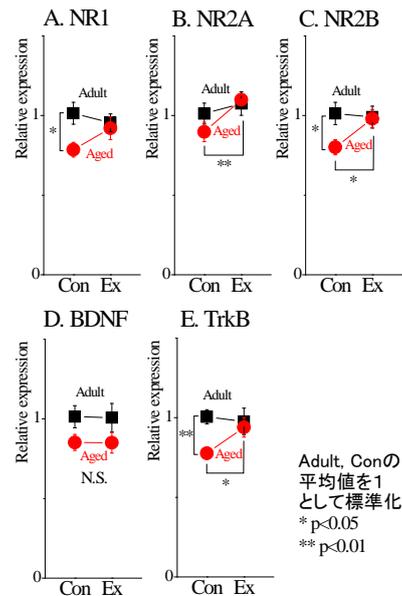
NMDA 受容体 NR1、NR2A、NR2B、TrkB について、二元配置分散分析における老化あるいは運動介入の主効果が認められた。いずれも交互作用が認められたため、一元配置分散分析を実施した。

・対照群間の比較において、老齢マウスの NR1、NR2B、TrkB の発現は成体マウスよりも有意に低下していた (図 6-A, C, E)。

・老齢マウスにおいてのみ、運動介入による NR2A、NR2B、TrkB の有意な発現増強が認められた (図 6-B, C, E)。同様の傾向が NR1 についても伺われた (図 6-A)。

・以上の結果として、老齢・運動群と成体・運動群の間に NR1、NR2A、NR2B、TrkB 発現の有意な差は認められなかった (図 6-A, B, C, E)。

図 6 老化およびバランス運動介入による海馬における発現修飾



Adult, Con の平均値を 1 として標準化
* p<0.05
** p<0.01

本研究の結果、(1)における高頻度・長時間の運動介入により生じた小脳シナプス受容体および神経栄養因子の発現低下は認められなかった。

一方、海馬の主要な神経受容体である NMDA 受容体の各サブユニットは老化により発現レベルが低下するが、低頻度、低負荷なバランス運動により成体レベルまで mRNA 発現が増強されることが確認された。また、BDNF の発現レベルへの修飾は認められないものの、その受容体である TrkB の発現に対する修飾も NMDA 受容体に対する修飾と相同していた。

これらの所見から、広く高齢者の運動介入に取り入れられている有酸素的効果を意図しない低負荷なバランス運動が、高齢者の運動機能のみならず、海馬におけるシナプス退行に対する抑制作用を有し、記憶・学習機能の維持に対しても有効に作用することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

①前島 洋. 高齢者の脳の可塑性と姿勢調節機能. 体育の科学, 査読無, 62(3):177-181, 2012

〔学会発表〕(計11件)

①前島 洋, 金村尚彦, 西川裕一, 高柳清美. 老化およびバランス運動介入が運動学習転移と中枢神経系シナプス機能修飾因子の発現に与える効果—老化促進モデルマウスを用いた実験動物学的研究—. 第47回本理学療法学会. 2012. 5. 26. 神戸市

②前島 洋, 金村尚彦, 西川裕一, 高柳清美. 高齢者におけるバランス運動が海馬シナプス退行の抑制に与える影響—老化促進モデルマウスを用いた検証—. 第2回日本基礎理学療法学会学術集会. 2012. 5. 24. 神戸市

③Maejima H., Kanemura N., Nishikawa Y., Takayanagi K. Accelerated decline of equilibrium function and neurotrophin expression in the cerebellum of the senescence accelerated mouse prone 10. The Society for Neuroscience 40th Annual Meeting. 2011.11.16. Washington, DC

④Otani T., Maejima H., Moriyama H., Shimada N., Shidahara H., Toriyama M., Orita N., Tobimatsu Y., Deie M. The number of synapses in the primary motor cortex of contralesional hemisphere does not increase after cerebral infraction. 16th International WCPT Congress. 2011. 6. 21. Amsterdam, Netherland

⑤前島 洋, 國西 遼, 濱崎 歩, 大谷拓哉, 黒瀬智之, 出家正隆. 老化および運動習慣が神経栄養因子・シナプス受容体発現に与える影響—老化促進モデルマウスを用いた検討—. 第46回日本理学療法学会学術集会. 2011. 5. 27. 宮崎市

⑥前島 洋, 金村尚彦, 西川裕一, 高柳清美. 高齢者における focal balance exercise の運動学習転移に関する実験動物学的研究. 第1回日本基礎理学療法学会学術集会. 2011. 5. 26. 宮崎市.

⑦Maejima H., Kunishi R., Hamasaki A., Otani T., Kurose T., Deie M. Effects of aging and exercise on the expression of neurotrophins and acetylcholine receptor in skeletal muscle. The Society for Neuroscience 39th Annual Meeting.

2010. 11. 15. San Diego, CA.

⑧Maejima H., Kunishi R., Hamasaki A., Otani T., Kurose T., Deie M. Effect of aging and exercise on expression of neurotrophin in skeletal muscle. 第33回日本神経科学大会. 2010. 9.2. 神戸市.

⑨Maejima H., Sakano S., Otani T., Kurose T., Deie M. Modification of cerebellar AMPA receptor by balance exercise in rats. The Society for Neuroscience 39th Annual meeting. Chicago, IL, USA, 2009, 10.20

⑩Maejima H., Sakano S., Otani T., Kurose T., Deie M. The modification of cerebellar AMPA receptor expression by motor exercises. the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009. 2009. 7.28). Kyoto

⑪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. 2009. 5. 27. 東京.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ntu.ac.jp/research/kyoin/iryou/t_pt/maejima.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前島 洋 (MAEJIMA HIROSHI)
帝京科学大学・医療科学部・教授
研究者番号: 60314746

(2) 研究分担者

出家 正隆 (DEIE MASATAKA)
広島大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号: 30363063

金村 尚彦 (KANEMURA NAOHICO)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・講師
研究者番号: 20379895

(3) 連携研究者

()

研究者番号: