

## 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 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500637

研究課題名（和文） 身体運動は脳での血管新生を促進して学習記憶能力の低下やうつ様行動を改善するか否か

研究課題名（英文） Dose regular exercise improve cognition or prevent onset of depression via enhancement of hippocampal angiogenesis?

研究代表者：

三上 俊夫（MIKAMI TOSHIO）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60199966

研究成果の概要（和文）：

身体運動が脳での血管新生を促進してうつ様行動を予防するか否かについて検討して以下の結果を得た。(1) 運動トレーニングによる海馬の神経新生の増加には海馬での血管新生が関与した。(2) 高強度運動における神経新生の増加には海馬での VEGF signaling 経路が関係した。(3) 運動由来の抗うつ効果には運動による海馬の神経新生と血管新生の改善が影響した。これらの結果より、身体運動は脳での VEGF signaling 経路を活性化し、血管新生を促進してうつ様行動の予防に貢献することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to investigate whether physical exercise may prevent depressive behaviors via enhancement of angiogenesis in brain. Our studies revealed the following findings. (1) Exercise-induced enhancement of hippocampal neurogenesis was attributed to improvement of hippocampal angiogenesis via regular exercise. (2) Intense exercise-induced enhancement of hippocampal neurogenesis was closely related to activation of VEGF signaling cascade in hippocampus. (3) Exercise-induced prevention of depressive behaviors was attributed to the improvement of neurogenesis and angiogenesis in hippocampus. These findings suggested that regular exercise may be contributed to the prevention of depression via the activation of VEGF signaling cascade and the promotion of angiogenesis.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：ストレス、運動、神経新生、血管新生、VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

現代の高齢化社会で問題となっているアルツハイマー病の原因の一つには、酸化ストレスによる中枢神経細胞のアポトーシス死の亢進がある。これに関連して興味深いことは、アルツハイマー病の発症率は精神的ストレスの多い生活をしている人で高く、精神的ストレスによる脳での活性酸素の増加が脳機能の低下をもたらすと考えられている。

動物実験においてもストレスは学習記憶能力を低下させる。Stranahanら(2006)は、長期間の精神的なストレスを負荷したマウスでは学習記憶能力の低下が起こることを報告している。これに関して我々も、精神的ストレスを負荷したマウスでは、通常飼育のマウスと比較して学習記憶能力が低下することを報告している(Nagata et al, 2008)。また、精神的ストレス負荷による学習記憶能力の低下に対して身体運動(トレッドミル走)は改善効果をもたらす(平成 17-18 年度、科学研究費基盤研究C)、身体運動はストレスによる海馬歯状回における神経新生の低下を回復させ、この回復効果にはインスリン様成長因子(Insulin-like growth factor-1: IGF-1)が関与する結果を得ている(平成 19-20 年度、科学研究費基盤研究C)。

神経新生は胎生期に爆発的に起きるが、生後の脳においても側脳室前方上衣下層および海馬歯状回の顆粒細胞下層などの特定の領域で起こっており、これらの新たに生み出された神経細胞の一部は神経ネットワークに組み込まれて機能している。特に、海馬での神経新生はストレス、加齢、うつ様症状で低下し、その増減は学習記憶能力と深く関係している。

一方、海馬での神経新生は海馬での血管新生に影響を受ける。血管新生(Angiogenesis)とは、

既存の血管から新たな血管枝が分岐して血管網を構築する生理的現象である。この血管新生を調節する因子としては血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)、低酸素誘導因子(Hypoxia Inducible Factor、HIF-1 $\alpha$ )、一酸化窒素合成酵素(Nitric Oxide Synthase: NOS)などがあるが、運動による神経新生の亢進に関係するIGF-1はHIF-1 $\alpha$ を介して血管新生にも影響を与える(Lepez-Lopez et al, 2004)。

しかし、身体運動が脳の血管新生に及ぼす影響を検討した報告はなく、運動による神経新生や学習記憶能力の促進効果について、IGF-1と関係づけて血管新生の面から検討した研究はない。更に、運動によるうつ様行動の改善効果を血管新生と関連させて検討した研究もない。

## 2. 研究の目的

前述の研究背景を基に本研究では以下に示す1~3の実験を行い、身体運動が脳での血管新生を促進して学習記憶能力の低下やうつ様行動を改善するか否かについて検討した。

### 【実験1】

継続的な身体運動による海馬の神経新生の増加に海馬での血管新生が関係するか否かについて検討した。このために、血管新生を促進させるVEGFの受容体Flt-1に対する特異的阻害剤であるSU1498を投与することによりVEGFを介した血管新生を抑制したマウスに4週間の持久的走運動行わせ、運動による神経新生の増加に対する血管新生の関与の有無を検討した。

### 【実験2】

海馬での神経新生の低下がうつ病の発症要

因の一つと考えられる。運動は神経新生を増加させるため、運動によるうつ症状の改善要因に運動による海馬での神経新生の増加が考えられる。運動による神経新生の増加をもたらす因子として血管内皮細胞増殖因子(VEGF)が考えられる。本研究ではマウスに一過性の中強度あるいは高強度のトレッドミル走を負荷し、運動後の海馬 VEGF 量および VEGF 受容体のリン酸化について経時的に測定した。

#### 【実験3】

ストレスによるうつ様行動の発症を身体運動が予防するか否か、また改善が認めされた場合にはその改善効果に脳の血管新生が関係するか否かについて、血管新生と関係する VEGF の受容体の阻害剤である SU1498 を投与したマウスを用いて検討した。

### 3. 研究の方法

#### 【実験1】

実験動物には8週令の雄 C57/BL/6 マウスを用い、これらが無作為に(1)安静群、(2)運動群、(3)運動+SU1498 群の3群に分け、4週間飼育した。全てのマウスに Alzet 浸透圧ポンプをマウスの腹腔内に埋め込み、(1)と(2)群には生理食塩水、(3)群には VEGF 受容体の阻害剤 SU1498 を含む浸透圧ポンプを埋め込んだ。また、(2)、(3)群にはトレッドミル速度 20m/分、1日 60 分のトレッドミル走を週 6 日行わせた。4週間目に BrdU を腹腔内投与し、翌日、麻酔下で左心室から生理食塩水を灌流した後に脳を摘出した。脳は 4%パラホルムアルデヒド・リン緩衝液に浸して一晩固定した後に脳切片を作成し、抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織染色を行い、海馬の歯状回の subgranular zone (SGZ)における BrdU 陽性細胞数を測定して海馬での神経新生を調べた。また抗 CD31 抗体により染色された血管内皮細胞を測定して、海馬領域における毛細

血管量を測定した。

#### 【実験2】

雄 C57/BL/6 に小動物用トレッドミルを用いた走行運動(トレッドミル速度 10 m/分、10 分/日)を1週間行わせ、その後、マウスに中強度あるいは高強度のトレッドミル走を負荷した。中強度運動は速度 20 m/分で 60 分間走行させ、高強度運動は速度漸増法により(開始のトレッドミル走速度は 30 m/分)3 分間毎に速度を増加させ、マウスが疲労困憊に至るまで走行させた。海馬での神経新生を測定するために、運動終了直後に BrdU を腹腔内投与し、運動前、直後、運動後 1、2、4、6、12、24 時間後にネブタール麻酔下でマウスを解剖して左心室から採血した。その後左心室から生理食塩水を還流して全身の脱血を行った後に脳を採取した。

#### 【実験3】

8週齢の雄 C57/BL/6 マウスを(1)コントロール群、(2)CUS 群、(3)CUS+運動群、(4)CUS+運動+ SU1498 群の4群に分けて4週間飼育した。(2)~(4)群のマウスにはうつ様行動を引き起こさせるために継続的に Chronic unpredictable stress (CUS)を負荷した。(1)~(3)群のマウスには生理食塩水を、(4)群には VEGF 受容体の阻害剤である SU1498 を充填した Alzet 浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込んだ。運動はトレッドミル速度 20m/分、1日 60 分のトレッドミル走を週 6 日行わせた。4週間目に BrdU を腹腔内投与する。4週間後、強制水泳試験、ショ糖選択性試験等の行動試験を行い、試験終了の翌日、ネブタール麻酔下で灌流後に脳を摘出し、一晩固定した後、厚さ 40  $\mu$ m の切片を作成し、抗 BrdU 抗体または抗 CD31 抗体を用いた免疫組織学的分析を行った。

### 4. 研究成果

### 【実験1】

継続的な持久的運動トレーニングは海馬での血管新生と神経新生の増加をもたらした。しかし、これらの運動トレーニングによる効果はVEGF受容体阻害剤の投与により消失した。この結果より、運動トレーニングによる海馬の神経新生の増加には、運動による海馬での血管新生が関与することが示唆された。

### 【実験2】

一過性の高強度運動においては、運動4時間後に海馬でのVEGF受容体のリン酸化が観察された。しかし、中強度運動ではVEGF受容体のリン酸化は観察されなかった。また、中強度および高強度運動後24時後に海馬歯状回での神経新生が増加した。これらの結果より、高強度運動における神経新生の増加には海馬でのVEGF signaling経路が関係することが示唆された。

### 【実験3】

4週間のCUS負荷によりマウスにうつ様行動が発症した。しかし、運動の継続はうつ様行動の発症を予防し、SU1498投与は運動による抗うつ効果を消失させた。この時、CUSにより海馬の神経新生と血管新生は低下し、その低下は運動により回復したが、SU1498投与により運動による回復は消失した。これらの結果より、継続的な運動によりストレス由来のうつ様行動は予防され、その予防効果には運動による海馬の神経新生と血管新生の改善が大きな影響を持つことが示唆された。

### 【まとめ】

これらの研究結果より、身体運動は脳でのVEGF signaling経路を活性化し、血管新生を促進してうつ様行動の改善に貢献することが示唆された。

### 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1件)

1. Kiuchi T, Lee H, Mikami T: Regular exercise cures depression-like behavior via VEGF-Flk-1 signaling in chronically stressed mice.

Neuroscience. 207; 208-217, 2012.

Doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.023,

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

三上 俊夫(MIKAMI TOSHIO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号:60199966

#### (2)研究分担者

太田 成男(OHTA SHIGEO)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号:00125832

#### (3)連携研究者

( )

研究者番号: