

## 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 3月 31日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591416

研究課題名（和文） 妊娠中の運動による胎仔脳の発達と生後の学習・情動行動における効果とそのメカニズム

研究課題名（英文） Effects of exercise during pregnancy on brain development and learning and emotional behavior in adult offspring and its mechanism

研究代表者

中村 彰治 (NAKAMURA SHOJI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80112051

研究成果の概要（和文）：妊娠中の運動が、生後の仔の学習・情動行動に及ぼす影響を検討した。妊娠ラットは、全妊娠期間中に自由に回転ケージで運動できるようにした。学習・情動行動は、生後7週から15週で評価した。さらに、妊娠中の運動が、仔の遺伝子発現に及ぼす影響についてもDNAマイクロアレイ解析法で検討した。母体が妊娠中に運動をした仔は、うつ様行動が増加し、学習能力が低下していた。さらに、海馬の脳由来神経栄養因子（BDNF）の発現が、著しく低下していた。これらの結果は、妊娠中の運動は、海馬のBDNF発現を低下させることにより、仔の生後の学習・情動行動を阻害する可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：Effects of exercise during pregnancy on learning and emotional behavior in adult offspring were examined. Pregnant rats were allowed to perform spontaneous running in wheel cage during pregnancy. Learning and emotional behaviors were assessed at 7 to 15 weeks after birth. In addition, using DNA microarray analysis technique, genes affected by exercise during pregnancy were examined. Adult offspring whose dams performed spontaneous running during pregnancy showed increased depression-like behavior and reduced levels of learning performance. DNA microarray analysis showed that exercise during pregnancy induced a large decrease in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus of adult offspring. These results suggest that spontaneous running during pregnancy causes impairment of learning and emotional behavior, possibly due to reduction in BDNF expression in the hippocampus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：妊娠、運動、ストレス、学習、情動、海馬

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは、これまでに、妊娠中のストレスは、ラット胎仔脳の発達に二面的な影響を与えることを報告してきた (Fujioka et al., *Neuroscience*, 1999, 2001, 2003, 2006 ; 中村, 千里ライフサイエンスセミナー, 2005年10月)。すなわち、長時間の妊娠ストレスは、胎仔脳にアポトーシスや細胞死などの傷害を起こすが、短時間の軽度ストレスは、胎仔脳の発達をむしろ促進した。また、脳の発達を促進するストレスを受けた胎仔は、生後の学習行動の促進とストレスへの耐性を示した。一方、運動も、その強度が強い場合や時間が長い場合にはストレスホルモンである副腎皮質ホルモンが血中に増えるので、一種のストレスと考えることができる。また、運動においても、二面的な効果が知られている。すなわち、適度な運動は健康のために良いが、過度の運動は、健康を障害し時にうつ病を引き起こす (Armstrong & VanHeest, *Sports Med.*, 2002)。さらに、Clapp (*Clin Sports Med*, 2000; *J Pediatr*, 1996) は、ヒトにおいて妊娠中の持続的な適度の運動は、胎児の生後のストレス耐性や神経行動学的成熟の促進をもたらすことを報告している。しかし、動物において胎仔脳を直接に対象として研究を行なうことは技術的に大きな困難を伴うために、妊娠中の運動が、胎仔脳に実際にどのような影響を与えているかについてはよく知られていない。

妊娠中の運動は、母親と児にとって良いのかあるいは良くないのか、という問題については、これまでに大きな論争があった。Clapp は、広範な研究成果に基づいて、妊娠中の運動の有効性を確立した (Clapp, *Exercising Through Your Pregnancy*, 1998 : 目崎登監訳, 妊娠中の運動ハンドブック, 2000年)。Clapp の研究成果の中で、本研究の内容とも密接に

関連する重要な知見は、妊娠中の運動は、生後の子供のストレス耐性や神経行動学的成熟の促進をもたらすという点である。運動もストレスの一種であることを考えると、この知見は、妊娠中の軽度ストレスが、生後の学習行動の促進とストレス耐性をもたらすという私たちの動物実験の結果とよく一致する。私たちのストレスの研究結果をヒトに応用するには、ストレス (拘束) に代わるものとして運動が最も適していると考えられる。

ラットにおいて、妊娠中の運動が、生後40日齢の新生仔の空間学習を促進していたという報告がある (Parnpiansil et al., *Neurosci. Lett.*, 2003)。一方、運動は、成熟脳 (van Praag et al., *Nat Neurosci.*, 1999) や老化脳 (van Praag et al., *J Neurosci.*, 2005) における neurogenesis を促進するという結果が報告されているが、妊娠中の運動が胎仔脳の neurogenesis にどのような影響を与えるかについては明らかではない。特に、妊娠中の持続的な運動が、胎仔脳ニューロンの発達・分化にどのような変化を生じるかについては、申請者が知る限りでは、まったく報告はない。以上のことから、本研究は、妊娠中の運動が胎仔脳に与える直接的な影響を明らかにする点で、この分野の先駆的な研究となると確信する。

## 2. 研究の目的

本研究は、妊娠中の適度な運動が胎仔脳の発達と生後の学習・情動行動に与える効果およびその分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。そのために、平成21年度から23年度にわたる3年間の研究を行い、以下の点を明らかにする。

(1) 学習および情動に重要な海馬のニューロンの形態と neurogenesis を胎仔脳で検討し、海馬ニューロンの発達を促進あるいは阻害

する運動強度、持続時間、頻度を明らかにする。

(2) 妊娠中に運動負荷した胎仔の生後の海馬ニューロンの形態・neurogenesis の変化と学習・ストレス耐性との関連を明らかにする。

(3) 妊娠中の運動による海馬ニューロンの発達と生後の学習・情動行動変化に関与する遺伝子を同定するために、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 妊娠ラットへの運動負荷

Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。オスラットと同じケージに入れたメスラットのスメアで妊娠を確認後、妊娠ラットを出産まで回転ケージで自発運動をさせた。対照群は通常飼育した。

これら運動群について、生後の学習、情動行動、形態変化、分子レベルの研究を行なう。

#### (2) 学習・情動行動の解析

妊娠中に運動をした胎仔が生後7~15週齢に成熟した段階で、行動実験を行なう。対照群は、妊娠中に運動群と同じ時間だけ放置されただけで運動をしなかった妊娠母体から生まれた動物を用いる。ここで実施する行動実験は、オープンフィールドテスト、八方向放射状迷路学習、高架式十字迷路試験、強制水泳テストである。

①学習・記憶の行動を検討する前にオープンフィールドテストにより、自発運動量・情動行動に差がないかを確認しておく。

②空間認知記憶をみるために八方向放射状迷路学習をおこなう。

③不安行動を解析するために、高架式十字迷路試験を用いる。

④うつ行動を評価するために、強制水泳テストを行う。

(3) DNAマイクロアレイによる遺伝子解析

各実験群の生後ラットの脳を取り出し、DNA マイクロアレイによる遺伝子解析を業者に委託する。

### 4. 研究成果

#### (1) 妊娠中の運動が生後の情動行動に及ぼす影響

妊娠中の運動として自発運動を妊娠ラットにさせて、情動行動の変化を観察した。自発運動は、飼育ケージの中に回転ケージを入れて、妊娠全期間を通じて妊娠ラットが自由に運動できるようにした。

方法：Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。オスラットと同じケージに入れたメスラットのスメアで妊娠を確認後、妊娠ラットを出産まで回転ケージで自発運動をさせた。対照群は通常飼育した。生まれた仔が成熟後、15週齢でオープンフィールド (OF)、16週齢で高架式十字迷路 (EPM)、17週齢で強制水泳 (FST) を行った。

結果：OF:運動群(n=4)は対照群(n=3)に比べて、中心での活動量、全活動量のうちの中心での活動量の割合が有意に増加していた。

EPM:運動群(n=6)は対照群(n=6)に比べ、open arm の進入回数と滞在時間 (および全体に対するそれらの割合) が有意に増加した。

FST:運動群(n=6)は対照群(n=6)に比べ、無動時間が有意に長かった(図1)。

考察：行動実験の OF と EPM では、運動群は不安行動の減少を示したが、FST では無動時間が逆に長くなっていた。FST の無動時間の延長は、うつ行動の増加と一般的に解釈されるので、OF および EPM における不安行動の減少とは矛盾する結果に見える。この矛盾点をさらに検討するためには、うつ行動を評価する他の方法も実施する必要がある。

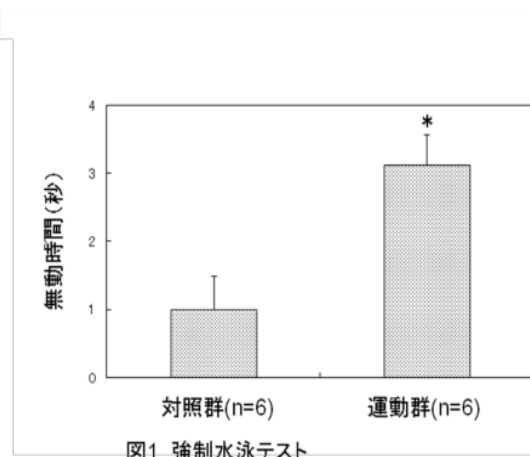


図1 強制水泳テスト

(2) 妊娠中の運動が生後の学習行動に及ぼす影響

学習行動として八方向放射状迷路学習を用いた。この学習は、八方向に放射状に突出した通路の先端に餌の小塊を置き、ラットは周囲の空間を認識してエラーなくすべての通路の先端にある餌を取るという場所記憶の学習である。一度入って餌を取った通路に再度入った場合はエラーとなる。検討した項目は、最初にエラーするまでに成功した回数、エラー回数、すべて成功までの時間である。対照群と妊娠中に運動した実験群は、各 14 匹の SD ラットを用いた。生後 3 週齢で離乳した後、実験開始までは単独飼育した。学習実験は、7~9 週齢で行った。本実験の 5 日前から食餌制限をし、体重を元の体重の 10% 以下にならないように維持した。本実験 3 日前からは、1 日 5 分間は装置上に動物を放置して、装置に慣らした。試行は一日 1 回として連続する 8 日間で成績を評価した。1 回の試行は、ラットがすべての餌を取り終えるか、あるいは 10 分を経過した時を終了とした。その結果、エラー回数では対照群と実験群との間で統計学的に有意な差を認めなかった。一方、最初にエラーをするまでに成功した回数は、実験群では対照群に比較して有意に減少していた。すべて成功するまでの時間では、

実験群は対照群よりも有意に長い時間を要していた。さらに、実験群のラットでは、学習行動中に“すくみ”行動を示す動物が多く見られた。以上の結果から、妊娠中に運動した母体から生まれた仔の学習行動は低下している可能性が示唆された。

(3) 妊娠中の運動が仔の海馬の遺伝子発現に及ぼす影響

DNA マイクロアレイ解析法を用いて、妊娠中の運動が生後の海馬の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。妊娠の全期間で自発運動をさせた実験群と運動をしなかった対照群との間での遺伝子発現を比較した。生後約 8 週齢で対照群 (6 匹) と実験群 (6 匹) の海馬を取り出した。各群の 6 匹は、それぞれ 2 匹の母体から出産したものである。解析の結果、t 検定で有意な差があった 8,009 遺伝子データから 6 アレイすべてで 2 倍以上の変動を示した遺伝子が 40 あった。この 40 遺伝子の中で、遺伝子の発現が増加したのが 3 遺伝子あり、減少したのは 37 遺伝子あった。全体的に実験群では、遺伝子発現が増加するよりも減少する遺伝子のほうが優勢であった。特に明瞭に減少した遺伝子の中に、脳由来栄養因子 (BDNF) が含まれていたことは注目に値する。昨年度の行動実験の結果では、うつ行動を判定する強制水泳テストで運動群で無動時間の延長 (うつ行動) が見られていた。海馬での BDNF の減少は、うつ行動と関連していることが報告されている。したがって、うつ行動を示す運動群で、BDNF 遺伝子発現が減少していたことは理解しやすい結果である。海馬の BDNF の減少は、海馬の記憶機能の低下とも関係すると報告されているので、妊娠中に自発運動をさせた運動群での学習行動の低下は、BDNF の減少と関連している可能性がある。

#### (4) 今後期待される展開

本研究の最初の目的では、妊娠中の運動が胎仔脳の発達を促進し、生後の学習・情動行動に良い効果を及ぼすことを期待していた。しかし、実際は妊娠中の自発運動は、うつ様行動の発現と学習行動の低下という予想とは全く異なる結果となった。その原因は、使用した動物は、妊娠前は運動をしていない飼育環境にあったため、妊娠後の運動が母仔に強いストレスとなった可能性が考えられる。今後、海馬 BDNF 発現低下を有するこのうつ病モデルを用いてうつ病の病態を解明する研究の新しい展開が、期待される。さらに、このうつ病モデルは、学習能力の低下も伴っていたので、海馬 BDNF 発現低下と学習との関連を研究するモデル動物ともなり得る可能性がある。

#### 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 5 件)

- ①M. Tanaka, S. Hayashi, T. Fujioka, I. Tobe, S. Nakamura. The effects of three types of stress on Fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus, hippocampus and amygdala in female rats at different stages of pregnancy. Bull Yamaguchi Med Sch, 58(3-4): 19-30, 2011. 査読有
- ②SS.Mohideen, G. Ichihara, S. Ichihara, S. Nakamura. Exposure to 1-bromopropane causes degeneration of noradrenergic axons in the rat brain, Toxicology, 285(1-2): .67-71、2011. 査読有
- ③T. Ohnuki, A. Nakamura, S. Okuyama, S. Nakamura. Gene expression profiling in progressively MPTP-lesioned macaques reveals molecular pathways associated with sporadic Parkinson's disease, Brain Res.1346: 26-42, 2010. 査読有
- ④T. Katagiri, N. Hatano, M. Aihara, H. Kawano, M. Okamoto, Y. Liu, T. Izumi, T. Maekawa, S. Nakamura, T. Ishihara, M. Shirai, Y. Mizukami. Proteomic analysis of proteins expressing in regions of rat brain by a combination of SDS-PAGE with nano-liquid

chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry, Proteome Science 8:41-52, 2010. 査読有

- ⑤M. Kuramochi, S. Nakamura. Effects of postnatal isolation rearing and antidepressant treatment on the density of serotonergic and noradrenergic axons and depressive behavior in rats, Neuroscience 163: 448-455, 2009. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ①石川晃教 内側前頭前皮質と扁桃体からなるループ神経回路の電気生理学的解析、Neuro2010、2010/9/2、神戸コンベンションセンター

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 彰治 (NAKAMURA SHOJI)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80112051

##### (2) 研究分担者

石川 淳子 (ISHIKAWA JUNKO)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30570808

石川 晃教 (ISHIKAWA AKINORI)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：40363098