

機関番号：24402

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21700654

研究課題名 (和文) 海馬ニューロン新生に及ぼす身体運動の効果
—エピジェネティクス機構の関与—研究課題名 (英文) Effects of physical activity level on hippocampal neurogenesis
in rats.

研究代表者

野村 幸子 (SACHIKO NOMURA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：30348784

研究成果の概要 (和文)：身体的な運動が海馬ニューロン新生を増加させ、記憶・学習を促進することが知られている。しかし、長期間の宇宙飛行やベッドレストなどによる慢性的な機械的負荷の減少が海馬のニューロン新生にどのような影響を及ぼすかはあまり明らかにされていない。したがって本研究では、後肢懸垂ラットの海馬を免疫組織化学的に解析し、ヒラメ筋などへの機械的負荷の減少が海馬ニューロン新生に及ぼす影響について検討した。

研究成果の概要 (英文) : Previous studies have reported that exercise enhances neurogenesis in the hippocampus. In the present study, we explored whether the lack of muscle activity affect neurogenesis in rats using the hindlimb suspension model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生理学・運動生化学

科研費の分科・細目：健康スポーツ科学・スポーツ科学、スポーツ医科学

キーワード：スポーツ生化学、海馬ニューロン新生

1. 研究開始当初の背景

身体的な運動が記憶・学習を促進することや、脳傷害からの回復を促すこと、知的能力の老化を抑えることが知られている。実験動物においても、運動量の増加が記憶・学習に有益な効果をもたらすことが証明されている。記憶・学習の責任中枢として脳内のいく

つかの部位があげられるが、最も重要な記憶の場として海馬が知られている。運動により記憶・学習の機能が亢進されるメカニズムに関してはまだ不明な点が多いが、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor; BDNF) の海馬濃度が運動によって増加することが多くの研究で証明されている。また、繰り返しの運動をおこなったトレーニ

ング個体の海馬において、BDNF の機能的な受容体 (Tropomyosin-related kinase B or tyrosine kinase B; TrkB) が増加していることも報告されている。さらに、TrkB 阻害剤を脳室内投与することによって、記憶・学習に対する運動の効果が弱まることも示された。この BDNF 増加に伴って、シナプスの可塑性に関わる因子の発現が増加することが知られている。

一方で、海馬における BDNF の増加はシナプス可塑性だけでなく、ニューロン新生にも関与している可能性が示されている。哺乳類の脳では、中枢神経系が形成される胎児期には神経幹細胞から多数のニューロンが産生されるが、発達期を終えた脳ではニューロンは作られないと長年信じられてきた。しかしその後の研究では、海馬歯状回 (dentate gyrus; DG) の顆粒細胞層下 (subgranular zone; SGZ) や側脳室の脳室下帯では、成体になってもニューロンの産生が持続していることが明らかになった。SGZ 新生ニューロンの生理学的機能についての研究はまだ始まったばかりであるが、薬剤投与や X 線照射などで新生ニューロンだけを除去した実験の結果から記憶・学習機能を高める働きがあることが示唆されている。SGZ 新生細胞は、顆粒細胞へと分化していくが、通常多くは 1~2 週間で死滅する。一部の細胞は生き延び、顆粒細胞層へ遊走しながら機能的なニューロンとして神経回路に組み込まれていくと考えられる。新生ニューロンの運命は細胞環境に敏感で、学習タスクの負荷や BDNF などの神経栄養因子によって生存数が増加する。このような新生ニューロンの運命に身体的な運動が影響を及ぼしていることが報告されている。運動群では、空間認知機能の充進にともなって、SGZ のニューロン密度が増加していることが確認された。様々な身体運動の作用は、ニューロン新生という点に集約されていくように思われる。しかし、長期間の宇宙飛行やベッドレストなどによる慢性的な機械的負荷の減少が海馬のニューロン新生にどのような影響を及ぼすかはあまり明らかにされていない。

2. 研究の目的

身体的な運動が海馬ニューロン新生を促進するのに対し、最も強力な負の環境調節因子としてストレスが挙げられる。心理的および生理学的ストレスの両方が海馬ニューロン新生のステップを阻害することが報告されている。最近、げっ歯類のストレスモデルとして注目を集めているのは、幼児期における母親からの隔離モデル、maternal separation である。母親から隔離されたラ

ットは成長後も海馬ニューロン新生が減少しており、抗不安作用や空間認知能も低下していることが証明された。この実験モデルによって、成長後よりも生後早期にさらされた環境因子の方が、その個体の海馬ニューロン新生により強力な影響を及ぼす可能性が示された。

一方、身体活動低下の実験モデルとして、抗重力活動を抑制する後肢懸垂が用いられている。後肢懸垂モデルは、もともと宇宙飛行モデルとして骨形成の抑制について実験するために開発されたが、その後、後肢の抗重力筋の研究などでも用いられるようになった。さらに最近の研究から、後肢懸垂によって海馬ニューロン新生が阻害されることが報告された。つまり、後肢懸垂は身体運動とは反対の作用を海馬ニューロン新生に示すことが明らかとなり、身体運動の効果を負の調節という側面から調べる有用なツールとなり得る可能性が指摘された。

前述のとおり、成長後よりも出生後早期のストレスの方がより強力に海馬ニューロン新生を抑制することが知られている。したがって、成長後よりも前の段階で後肢懸垂を施すことによってより深刻な変化が海馬ニューロン新生に現れることが予想される。しかし、海馬ニューロン新生に対する後肢懸垂の影響は成長後のラットでしか検討されていない。これらのことから、本研究では、海馬ニューロン新生に対する後肢懸垂の影響を離乳直後のラットを用いて検討した。さらに、後肢懸垂解除後の回復過程についても観察した。また、海馬ニューロン新生を調節しているいくつかのホルモンについて、海馬体および末梢血での濃度を測定し、後肢懸垂によって変化するかどうかを調べた。

3. 研究の方法

本研究では離乳直後のラットを用いて海馬ニューロン新生に対する後肢懸垂の効果を検討した。

実験動物として 3 週齢の雄ウィスターハノーバーラットを用いた。それらを実験前群、14 日間の後肢懸垂を行う群、14 日間の後肢懸垂後、14 日間ケージ内飼育に戻し後肢に抗重力活動を再負荷する群、それらと週齢を合わせた対照群 2 群の 5 群に分けて飼育し、灌流固定脳のサンプリングを行った。その後、脳サンプルの凍結切片を作成し、免疫組織化学的な解析を行った。切片は、抗体賦活化およびブロッキングを行った後、細胞増殖のマーカーである増殖性細胞核抗原 (PCNA) および未成熟ニューロンのマーカーであるダブルコルチン (DCX) に対する一次抗体で染色

した。検出は Alexa594 および Alexa488 で蛍光標識された二次抗体で行った。また、対比染色は核を染める DAPI で行った。一次抗体を除いて染色したネガティブコントロールの切片では、免疫反応は見られなかった。

染色した切片は、蛍光顕微鏡 (Olympus BX-51 fluorescent microscope) および共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope) を用いて両側の顆粒細胞層を観察した。顕微鏡像のデジタル画像を解析し、同一切片上の全顆粒細胞層に存在する PCNA 陽性 (PCNA+) 細胞および DCX 陽性 (DCX+) 細胞、PCNA と DCX のダブル陽性 (PCNA+/DCX+ cells) 細胞をカウントした。グループ間で顆粒細胞層の面積に差がなかったことから、顆粒細胞層の面積当たりの陽性細胞数を算出してグループ間で比較した。

一方で、同様に飼育したラットから未固定の脳および血液サンプルを採取した。未固定脳は海馬体を分離し液体窒素にて凍結した。また、腹大動脈から採取したヘパリン血は遠心分離後、血漿を回収して凍結保存した。血漿のインシュリン様成長因子-1 (IGF-1) およびコルチコステロンの濃度は ELISA キット (IGF-1; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, corticosterone; Endocrine Technologies, Inc., Newark, CA, USA) を用いて測定した。また、凍結海馬体はバッファー中でホモジネートし、遠心分離後、上清を回収してサンプルとした。その後ただちに、BDNF および血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の海馬体サンプル中の濃度をサンドイッチ ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

離乳期において、海馬体歯状回では発達期のニューロン新生と成体ニューロン新生が同居していると考えられるが、本研究ではまず、離乳直後の歯状回における増殖細胞や未成熟ニューロンの分布を観察し、続いてこれらの細胞に対する後肢懸垂の効果を検討した。離乳直後の3週齢において、核が密集している顆粒細胞層では DCX 陽性細胞は顆粒細胞下層に局在し、細胞層へ向かって神経繊維を伸ばしていた。また、PCNA 陽性細胞は、細胞下層では複数個の細胞からなるクラスターを形成していた。このクラスター部分を拡大すると、PCNA 陽性細胞、DCX 陽性細胞、DCX および PCNA の両方で染色されているダブルポジティブ細胞が観察された。これらのことから、海馬体歯状回の増殖細胞や未成熟ニューロンは、離乳直後において成長後と同様の分布を示しており、この段階ですでに成体ニューロン新生

が形成されていることが明らかとなった。

この PCNA、DCX それぞれの陽性細胞数と PCNA および DCX のダブルポジティブ細胞について、実験前の3週齢の群、5週齢、7週齢の対照群、14日間の後肢懸垂を行った群、その後14日間回復させた群、それぞれの顆粒細胞下層の細胞をカウントした。対照群において、PCNA 陽性細胞は3から5週齢にかけて顕著に減少したが、対照群と後肢懸垂群の間に有意な差はなかった。一方、DCX 陽性細胞は3から7週齢にかけて成長に伴い減少し、さらに後肢懸垂によって有意に減少した。しかし、14日間の回復後には DCX 陽性細胞数は同週齢の対照群と同程度だった。また、PCNA と DCX のダブルポジティブ細胞は、PCNA シングルポジティブの細胞と同様に、対照群では3から5週齢にかけて細胞数が減少したが、対照群と後肢懸垂群との間に有意な差はなかった。このように、14日間の後肢懸垂後では細胞増殖には差はなかったが、未成熟ニューロンが減少していることが確認された。したがって、海馬の未成熟ニューロン数は後肢懸垂により可逆的に減少することが示された。これらの結果を成長後のラットと比べると、予想に反して、離乳期の海馬ニューロン新生は後肢懸垂などの環境因子よりも、むしろ遺伝的にプログラムされた成長過程の影響を受けることが示唆された。

海馬ニューロン新生に対して抑制的に作用することが証明されているコルチコステロンの血漿濃度は、後肢懸垂群および後肢懸垂後に回復させた群でも、それぞれ同週齢の対照群と比較して高い傾向が見られたが有意な差はなかった。さらに、身体運動時の海馬ニューロン新生の増加に関わっていることが知られている血漿 IGF-1 は、ラットの成長に伴って増加したが、対照群と後肢懸垂群の間に有意な差は見られなかった。一方で、海馬体サンプル中のタンパク濃度に対する BDNF 濃度は、対照群と比較して後肢懸垂群で低い値を示す傾向がみられた。同様に、VEGF の海馬体サンプル中濃度も後肢懸垂によって減少傾向が認められた。BDNF や VEGF は、ともに神経保護作用を有し、海馬ニューロン新生を増加させることが報告されている。したがって、免疫組織化学的解析で明らかになった後肢懸垂による歯状回の未成熟ニューロン数の減少には、BDNF や VEGF の海馬体濃度の低下が関わっている可能性が高いと思われる。

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)

〔学会発表〕（計 4 件）

① S. Nomura, K. Kami, F. Kawano, Y. Oke, T. Ohira, R. Fujita, N. Naoya, Y. Ohira
Effect of hindlimb suspension on hippocampal neurogenesis in weaned rats.
Experimental Biology Annual Meeting 2010
(Apr 26, 2010, Anaheim, USA)

② 野村幸子、上勝也、河野史倫、尾家慶彦、
大平宇志、藤田諒、大平充宣
後肢懸垂が発育期ラットの脳ニューロン新生に及ぼす影響。
第 55 回日本宇宙航空環境医学会大会（2009
年 11 月 14 日、岐阜）

③ S. Nomura, K. Kami, F. Kawano, Y. Oke, N. Naoya, M. Terada, T. Ohira, K. Imaizumi, Y. Ohira
Hindlimb suspension impairs hippocampal neurogenesis in weaned rats.
The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (29, July, 2009, Kyoto)

④ 野村幸子、上勝也、河野史倫、尾家慶彦、
大平宇志、藤田諒、大平充宣
離乳期ラット海馬ニューロン新生に及ぼす後肢懸垂の影響。
第 17 回日本運動生理学会（2009 年 7 月 25 日、東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 幸子 (NOMURA SACHIKO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：30348784

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし