

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11661

研究課題名（和文）新規開発する運動刺激装置を用いたオミックス解析による疾患特異的マイオカインの同定

研究課題名（英文）Identification of disease-specific myokines by omics analysis using a newly developed exercise stimulator

研究代表者

山田 晃司（Yamada, Kouji）

藤田医科大学・保健学研究科・教授

研究者番号：60278306

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：加齢に伴う疾患の予防と進行緩和を目的に新規開発した運動刺激装置による効果を検証した。卵巣摘出モデルマウスの大腿骨と腰椎においてその刺激は破骨細胞と骨芽細胞の両方を活性化し骨のリモデリングを促進することを明らかにした。この刺激はマイオカインの発現を誘発できると考え、老化促進モデルマウスを用いて認知症予防について解析を行った。刺激により誘発されたマイオカインがエンドクリンに脳に到達しmBDNFパスイェを介して加齢によるシナプスの損傷、神経伝達物質の減少、神経細胞死の抑制を示唆した。さらに消化器系ガンApcMin/+モデルマウスを用いて局所性炎症の抑制による進行緩和を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動することは身体に良いと言われるが、どこにどのように良いのかを疑問に、また、高齢者への無理のない運動方法の開発を合わせた研究を行った。高齢者への過度な運動は転倒やケガなどリスクを伴う。一方で運動の効果には継続が重要である。これらのことからモデルマウスを用いて新規に開発した運動刺激装置を用いてその効果の実証、作用メカニズムを解析することは学術的意義が大きいと考える。また、それが将来、ヒトに応用できる新しい運動療法が提案できると考えた。高齢者の身体の不調は加齢に伴う生理学的現象であり誰にでも起こり得る。高齢化社会となった現代では、これを予防できる運動法が確立できればその社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We verified the effectiveness of a newly developed exercise stimulation device for the purpose of preventing and slowing the progression of age-related diseases. We found that stimulation activated both osteoclasts and osteoblasts and promoted bone remodeling in the femur and lumbar vertebrae of ovariectomized model mice. We assumed that this stimulation could induce the expression of myokines, and analyzed the prevention of dementia using accelerated aging model mice. It was suggested that myokines induced by stimulation reach the brain as endocrine and inhibit age-related synaptic damage, decrease in neurotransmitters, and neuronal death through the mBDNF pathway. Furthermore, using ApcMin/+ mouse model of gastrointestinal cancer, we demonstrated that suppression of local inflammation alleviated the progression of the disease.

研究分野：運動生理学

キーワード：マイオカイン 振盪刺激 認知症 老化

1. 研究開始当初の背景

(1)医療の進歩に伴い高齢化社会となった現代において、数千万人が骨粗鬆症に罹患しており、転倒による大腿骨頸部骨折の発生件数は65歳以上では指数関数的に上昇し、数年後には20万人を超えることは明らかである¹⁻³⁾。高齢者にとって骨折は、歩行障害や長期臥床を引き起こす原因となり、身体的にも精神的にも大きな支障をきたし、QOLが著しく低下する^{4,5)}。また、腰椎の骨粗鬆症の有病率も同様に非常に高い⁶⁻⁷⁾。椎体の変形や骨折をもつ高齢女性の総死亡が、死亡関連交絡因子(年齢、喫煙、高血圧、心臓病など)を考慮しても相対リスク上昇に深く関与しているのは明らかである⁸⁾。骨密度低下は老化する女性にとって避けられない生理現象であり、閉経後1年間で全骨量の2~3%の減少が数年間続き、約20年で30~40%低下する。また、非荷重期間が長期になると例え運動を再開したとしても元の骨量レベルまで回復することはまれである。これを回避するためには、転倒を予防する平衡感覚を養う装置と骨折治癒時に老化した細胞を活性化させる刺激方法が必要である。本研究は既存の振動刺激に、新規の振盪刺激を組み合わせた二重運動負荷刺激(CMSS: Combination Mechanical Stress Stimulation)に加え、さらにそれを発展させた「不規則性振盪振動刺激装置(ISVS; Irrregular Shaking and Vibration Stimulator)」の新規物理療法の開発を行う。振盪刺激は水平盤が前後、左右に揺れその上で両足を踏ん張り、等尺性運動を強制し、腱を介して付着する骨へ刺激を及ぼす。その動きを不規則化、慣れを防止し刺激効率を上げる。

(2)これまでに振盪刺激において骨格筋および骨でその効果を実証して来た。そのメカニズムはWolffの法則に従い筋の収縮弛緩、腱を介した骨への直接刺激効果であると考察して来た。一方で骨細胞の活性化には別のメカニズムの存在があるのではないかと仮説を立てた。「運動することは身体によい」と一般的によく言われるが、「どこに、どうよいか」との疑問がある。その1つの可能性として「マイオカイン」の存在が挙げられる。運動刺激により誘発されたマイオカインが血管、血液を介して全身を循環し、エンドクリンに遠隔の組織・器官に運ばれ作用し、骨細胞を活性化しているのではないかと考えた。マイオカインは健康物質とも呼ばれ、これまで認識されてきた体液性免疫の中心的役割を担うだけでなく、様々な影響を生体へ及ぼす可能性が示唆され、その利用発展が期待されている。例えば、
メタボ抑制: 脂肪組織に働いて脂肪を分解、
糖尿病予防: 肝に作用して糖代謝を改善、
動脈硬化防止: 血管壁に働いて動脈硬化を防止、
認知症防止: 脳に作用して痴呆を予防、
成長促進効果: 筋や骨の成長を促す成長ホルモンを分泌
血圧安定: 直接または間接的に血圧調節、
ガン予防: 体液性免疫によるガン細胞増殖抑制効果、
アンチエイジング: 若返りにより疾病の予防、
感染予防: 感染症に対する抵抗力の向上などが挙げられる⁹⁾。それらを通して新規マイオカインの発見、作用メカニズムの解明を行う。

2. 研究の目的

(1)「運動することは身体によい」とよく言われるが、「どこに、どうよいか」の疑問がある。本研究はそれについてマイオカインに着目し、生体内の体液性調節メカニズムについて明らかにする。筋肉は運動器であるが、その刺激により発現が誘発され、身体のような組織・器官に作用するタンパク質(マイオカイン)がいくつか明らかになっている⁹⁾。骨密度の低下を緩和する結果¹⁰⁻¹⁵⁾は、単に筋の腱を介した骨への物理的的刺激により骨細胞を活性化しているだけでなく、新規メカニズムの可能性のあるマイオカインの作用が関与していると考えた。一方で骨への作用だけではなくマイオカインには様々な作用が明らかになっており、他の疾患等を通じても運動刺激による新規マイオカインの同定とそのメカニズムの解明し、エンドクリンに全身性に遠隔の組織・器官に運ばれ、成人病予防や老化防止など「~基礎研究から臨床応用まで~」その効果の可能性と利用発展について検証することを目的とした。

(2)運動の健康への効果は実証されてきているが、高齢者への過度な運動は転倒やケガなどリスクを伴う。一方で運動の効果には継続が重要である。高齢者への無理のない運動方法を考える中で本研究はこれまで成果を上げている振盪刺激に振動を組み合わせたCMSSに加え、さらにそれを発展させたISVSの新規物理療法の開発を行う。これについて疾患モデルマウスを用いてその効果の実証、作用メカニズムを解析することは学術的意義が大きいと考える。また、それが将来、ヒトに応用できる新しい運動療法として提案できると考えた。高齢者の身体の不調は、加齢に伴う生理学的現象であり誰にでも起こり得る。高齢化社会となった現代では、これを予防できる運動方法が確立できればその社会的意義は大きいと考える。

3. 研究の方法

(1)疾患モデル動物

- 1)骨密度低下モデルマウス:ICR(日本クレア株式会社)雌8週齢を12匹に卵巣摘出術を施し、実験に使用した(承認番号:H0771)
- 2)老化促進モデルマウス:SAMP10/TaldrSlc(senescence-accelerated mouse:SAM, SLC Inc.)8週齢の雄マウス12匹を実験に使用した(承認番号:APU19120)
- 3)消化器系発がんモデルマウス:*Apc*^{Min/+}雄マウスと8週齢のC57BL/6Jcl雌マウスを自然交配により繁殖を行った。得られた雄仔マウスを遺伝子解析し、4週齢の*Apc*^{Min/+}雄マウスを24匹準備し実験に使用した(承認番号:AP20024)
- (2)運動刺激装置:水平方向に360度どの方向からも均一な刺激を与える1)軸移動型の水平回転

型振盪 (NX-25D,日進理化) 装置と回転軸移動距離 0.5mm のトルネード型振動 (SK-40-D1,日進理化) 装置を組み合わせたコンビネーション刺激装置を作成した (日進理化特注)。また、2)3)には振盪刺激の単独振盪刺激装置 (NR-3, TAITEC Inc.) を使用した。

(3)運動刺激方法: マウスは1週間馴化した後、1)二重刺激は1日1回30分間の刺激を6日間継続して行い、1日休息するスケジュールを10週間継続して行った。刺激条件は振盪刺激を150回/分、振動刺激を2,400回/分に設定した。2)振盪刺激は1日1回30分間の刺激を週3回、25週間継続して行った。2)3)刺激条件は振盪刺激を150回/分に設定した。3)振盪刺激は4週齢から開始し、1日1回30分間の刺激を6日間継続し、11週間継続して行った。

(4)骨の二重標識: 1)骨形態計測を組織解析で行うためにテトラサイクリンとカルセインを用いて骨の標識を行った。

(5)骨組織標本作製: 1)最終刺激後、麻酔下にてPBSで全身灌流した後、腰椎を摘出し70%エタノールにて固定した。固定後に Villanueva Bone Stain 溶液に約4日浸透させエタノール置換、アセトン浸透、脱水を行った。アセトン対メタクリル酸メチル(methyl methacrylate: MMA)モノマーの1:3の混合液に24時間浸した。その後メチルメタクリレート樹脂(MMA樹脂)包埋した。

(6)標本観察: 1)自然光下と蛍光下で骨形態計測を行い、一次パラメーターを測定後、骨量・骨形成・骨吸収・石灰化の指標となる項目を二次パラメーターとして算出した。

(7)筋タンパク質溶液の作成: 1)最終刺激後、大腿四頭筋を採取し、液体窒素下で乳鉢にて粉碎後、プロテアーゼインヒビター(Complete protease inhibitor cocktail, Roche Applied Science 10190300)入りのタンパク質溶解剤 T-PER (Thermo SCIENTIFIC PB196592)に溶解した。それらを遠心後、上清を回収し、最終濃度を1 μ g/ μ lに調整した後、実験に使用した。3)腓腹筋と小腸も同様な処理を施し、タンパク質溶液を作成した。

(8)タンパク質発現解析: 1)インターロイキン(IL)-6、IL-15、IL-8、IL-1 β はELISA法を用いて解析を行った。測定には Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D SYSTEMS)、Mouse IL-15 ELISA kit (abcam)、Mouse CXCL2/MIP-2 Quantikine ELISA Kit (R&D SYSTEMS)、Mouse IL-1 beta ELISA Kit (abcam)を使用した。また、筋肥大の解析には Anti-MyoD 抗体(Santa Cruz Biotechnology Lot: H2107)を用いて Western Blotting (WB) 法を行った。3) 腓腹筋は Anti-Wnt5a-Pan 抗体(Abcam, US)及び Anti-Wnt5a-long 抗体(Eurofins Genomics K. K, Japan) を一次抗体として 1:1000 の希釈率で、小腸は一次抗体として Anti- β -catenin 抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)を 5000 倍、Anti-Pak1 抗体(GeneTex, USA)を 1000 倍希釈で WB 法を行った。発色には ECL Plus Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) を用い、ルミノイメージアナライザー (Image Quant LAS 4000mini; GE Healthcare, USA) にてデータ収集後、画像解析ソフト ImageJ (NIH, USA) を用いて各バンドの積算光学密度 (IOD; Integrated Optical density) を測定した。

(9)学習及び記憶能力の行動解析による評価: 2)学習及び記憶能力を評価する行動解析を32週齢で実施した。受動的回避試験はステップスルー型受動的回避試験装置(STC-001M&SGS-003DX、室町機械株式会社)を使用した。まず、マウスをこの装置の明室(100 lux)に投入し、マウスが隣接する暗室(1.0 lux以下)に移動したところで境界となる扉を閉め、電気ショック(5秒間、0.15 mA)を与えることで暗室に入室したら嫌悪刺激を受けるという記憶を獲得させた(獲得試行)。次いで、獲得試行の1週間後に再度マウスを明室に投入し、暗室に移動するまでの反応潜時時間を計測した(保持試行)。なお、暗室に入室しないと判断した最大観察時間としてのカットオフ値は300秒に設定した。

(10)組織解析: 2)最終振盪刺激の翌日に、麻酔下で脳を摘出し、定法に従い10%中性緩衝ホルマリンによる固定処理後、パラフィン包埋し、右脳を正中より外側1mmを矢状断で薄切し、組織切片を作成した。免疫組織化学染色の1次抗体には Anti- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA subtype; Glutamate Receptor1, Abcam plc, UK, ab31232)抗体を用いた。一次抗体の反応は100倍希釈、二次抗体には Anti-IgG(H+L), Rabbit, Goat-Poly, Biotin (Vector Laboratories, USA, BA-1000) を用い 1000 倍希釈で行った。酵素基質溶液 (VECTASTAIN Elite ABC Standard Kit , Vector Laboratories, USA, PK-6100) と DAB (武藤化学株式会社、日本、40651) を用いて反応させた。画像解析には、画像処理ソフトウェア ImageJ (NIH, USA) を使用して面積と免疫染色陽性の神経細胞数の測定を行った。3) 11週間の最終刺激後、麻酔下において血液を採取後、小腸及び腓腹筋を摘出した。小腸は内外部をPBSで洗浄後、上部、中部、下部の3部に分割し、縦方向に切開し、腸管内部を表面として黒色のシートに貼り付け、ポリープの個数および直径を計測するため写真撮影を行った。小腸は定法にて固定処理を行い、パラフィンを用いてスイスロール包埋後、厚さ4 μ mに薄切した。HE染色を行い Villus の長さ と Crypt の深さを計測後、V (villus)/ C (crypt)比を算出した。また、免疫組織化学染色では Anti- β -catenin 抗体を一次抗体として 100 倍希釈で Anti-Wnt5a-Pan 抗体を 50 倍の希釈率で室温にて反応させた。発色は同様な方法にて行った。 β -catenin はポリープ内の濃染した箇所の面積を各群で比較し、Anti-Wnt5a-Pan の陽性率は画像解析ソフト ImageJ を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) OV, OS, O.Th で刺激群は対照群に比べ有意に高い値を示した($p < 0.01$)。また、N.ObとN.Mu.Ocもまた、刺激群は対照群に比べ高い傾向を示した。骨量を表すパラメータとして骨量/組織量(BV/TV)、骨梁幅(Tb.Th)、骨梁数(Tb.N)、骨梁間隙(Tb.Sp)、骨形成を表すパラメータとして類骨量/骨量(OV/BV)、石灰化を表すパラメータとして骨石灰化速度(MAR)と骨形成速度/組織量(BFR/TV)などを算出した。その結果、OV/BVとBFR/TVは、刺激群は対照群に比べ有意に高い値を示した($p < 0.05$)、またMARは、刺激群は対照群に比べ有意に高い値を示した($p < 0.01$)。BV/TV、Tb.Th、Tb.Nは、刺激群は対照群に比べ高い傾向を示した。また、Tb.Spは、刺激群は対照群に比べ低い傾向を示した(図1)。大腿四頭筋のタンパク質発現解析をELISA法にて行ったところBone Morphogenetic Protein (BMP)-2、IL-1 β 、IL-6はいずれも刺激群は対照群に比べ有意に高い値を示した($p < 0.05$)。IL-15は、刺激群は対照群に比べ有意に高い値を示した($p < 0.01$)。また、WB法によりMyoDの発現解析を行った結果、刺激群は対照群に比べ有意に高い値を示した($p < 0.05$) (図2) 15)。

(2)記憶に関わる行動解析法の1つであるステップスルー型受動的回避試験は、反応潜時時間に対して群内計画と群間計画の混合型で二元配置分散分析を行った。時間要因に有意な差($p < 0.001$)と群間要因に有意な差($p = 0.028$)があり、また、交互作用にも有意な差($p = 0.044$)を示した。Bonferroniの方法による多重比較を行った結果、刺激群において、獲得試行時より保持試行時で反応潜時時間が有意に長くなる結果を示した($p < 0.001$)。対照群において、獲得試行時より保持試行時で反応潜時時間が有意に長かった($p = 0.002$)。また、獲得試行時において刺激群と対照群の間に有意な差はなかった($p = 0.083$)が、保持試行時において刺激群の方が対照群より反応潜時時間が有意に長くなった($p = 0.035$) (図3)。また、海馬は主要細胞の違いでアンモン角の領域のCA1、CA2、CA3と歯状回の領域に分けられる。歯状回は顆粒細胞を中心の層として外側に分子層、内側に多形細胞層が位置する3層構造である。一方、アンモン角は主要な錐体細胞を中心層として外側に上昇層、内側にCA1とCA2は放射層、網状・分子層が位置し、4層構造となっており、CA3では透明層が加わり5層構造となる。この各領域の面積あたりのAMPA receptor (AMPA)のサブタイプであるGlutamate Receptor1陽性神経細胞数を測定した。その結果、CA1領域では、刺激群で対照群と比較して面積あたりの陽性細胞数は有意に多かった($p = 0.015$)。また、海馬CA3領域でも刺激群は対照群と比較して面積あたりの陽性細胞数が有意に多かった($p = 0.041$)。しかし、海馬DG領域では、刺激群と対照群で面積あたりの陽性細胞数に有意な差はなかった($p = 0.082$) (図4)

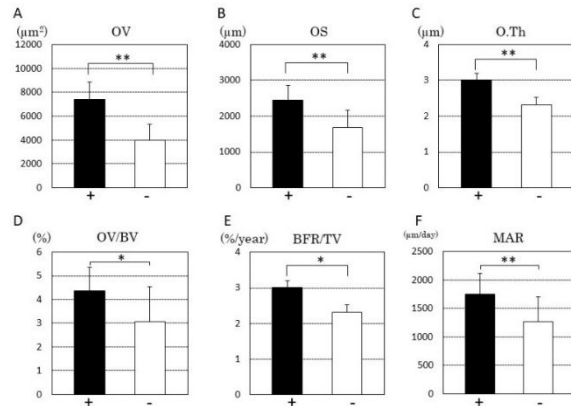


図1. 骨組織形態計測
図A-Cは一次パラメーター、図D-Fは二次パラメーターを示す。類骨量(OV: Osteoid volume)、類骨面(OS: Osteoid surface)、類骨幅(O.Th: Osteoid thickness)、相対的類骨量(OV/BV: Osteoid volume / Bone volume)、単位骨組織量当たりの骨形成率(BFR/TV: Bone formation rate / Tissue volume)、石灰化速度(MAR: Mineral apposition rate)を示す。黒は刺激グループ(+), 白は非刺激グループ(-)を表す。有意差 $p < 0.01$ *; $p < 0.05$

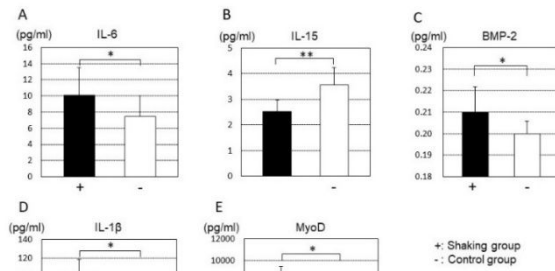


図2. 筋タンパク質発現
図A: IL-6, B: IL-15, C: BMP-2, D: IL-1 β , E: MyoDのELISA結果を示す。黒は刺激グループ(+), 白は非刺激グループ(-)を表す。有意差** $p < 0.01$ *; $p < 0.05$

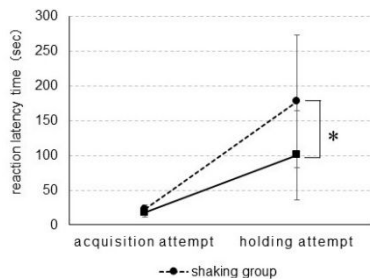
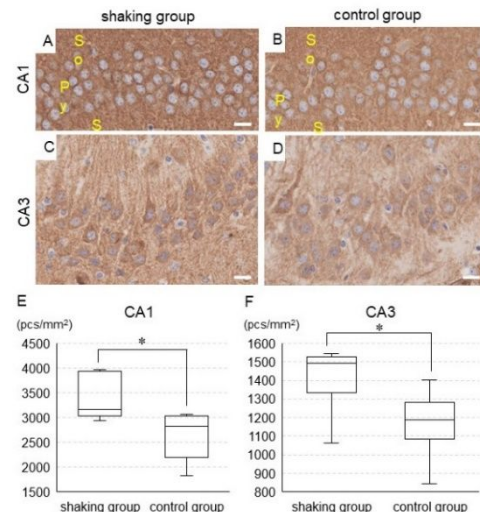


図3. 受動的回避試験
有意差*: $p = 0.035$

図4. 海馬CA1とCA3領域の面積あたりのAMPA染色陽性細胞数の比較
図Aはshaking group、図Bはcontrol groupのCA1領域の組織像を示す。図Cはshaking group、図Dはcontrol groupのCA3領域の組織像を示す。スケールバーは20 μ mを示す。略語はPy: pyramidal cell layer, So: stratum oriens, Sr: stratum radiatum, Sl: stratum lucidumである。図EはCA1領域、図FはCA3領域の面積あたりのAMPA染色陽性細胞数を示す。縦軸は面積あたりのAMPA染色陽性細胞数(pcs/mm 2)を示す。有意差は図E*: $p = 0.015$ 図F*: $p = 0.041$



(3) 小腸全長のポリープ数の平均値は、刺激群 53.5 ± 18.4 mm、対照群 56.8 ± 26.8 mm であり、両群間に有意な差はなかった。ポリープの直径平均値は刺激群が 1.55 ± 0.14 mm、対照群が 1.71 ± 0.18 mm であり、刺激群において有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。また、ポリープの直径 2mm 未満と 2mm 以上に分けて各個数の全体に占める割合は、刺激群でそれぞれ 83.2% (2mm 未満) と 16.8% (2mm 以上) 対照群ではそれぞれ 74.1% (2mm 未満) と 25.9% (2mm 以上) であり、刺激群において直径 2mm 以上のポリープ数の割合が有意に低い値を示した ($p < 0.01$)。さらに小腸を 3 部に分けた各部位別比較では、上部小腸は刺激群で 76.7% (2mm 未満) と 23.3% (2mm 以上) 対照群で 55.7% (2mm 未満) と 44.3% (2mm 以上) であり、刺激群において直径 2mm 以上のポリープ数の割合が有意に低い値を示した ($p < 0.01$)。中部小腸は刺激群で 90.8% (2mm 未満) と 9.2% (2mm 以上) 対照群で 78.2% (2mm 未満) と 21.8% (2mm 以上) であり、運動群において直径 2mm 以上のポリープ数の割合が有意に低い値を示した ($p < 0.01$)。下部小腸は刺激群で 81.6% (2mm 未満) と 18.4% (2mm 以上) 対照群で 75.2% (2mm 未満) と 24.8% (2mm 以上) であり、刺激群において直径 2mm 以上のポリープ数の割合が有意に低い値を示した ($p < 0.05$) (図 5)¹⁶⁾。下部小腸の V/C 比は、刺激群で 3.1 ± 0.1 、対照群で 2.7 ± 0.3 であり、刺激群において有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。腓腹筋における Wnt5a-Pan と Wnt5a-Long の発現量について比較したところ対照群に比べ刺激群は、Wnt5a-Pan が 1.37 倍、Wnt5a-Long が 1.25 倍と有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。下部小腸のポリープ内における β -catenin 陽性となった組織発現面積を算出し、その平均値を比較したところ刺激群で 0.95 ± 0.24 mm²、対照群では 0.91 ± 0.50 mm² と差はなかった。下部小腸の β -catenin および Pak1 の発現量は、対照群に比べ刺激群では β -catenin が 0.23 倍、Pak1 は 0.41 倍と低い値を示した (図 6)¹⁷⁾。

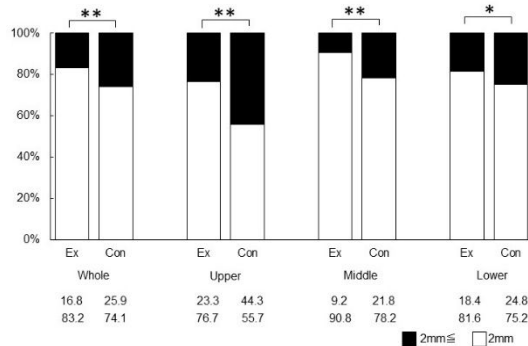


図5. 各部位別のサイズ別ポリープ数の割合
小腸を上部、中部、下部の3部位に切断し、サイズ別ポリープ数の割合を算出した。白が直径2mm未満のポリープを示し、黒が直径2mm以上のポリープの割合を示す。Ex: 運動群とCon: 対照群で比較した。有意差 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

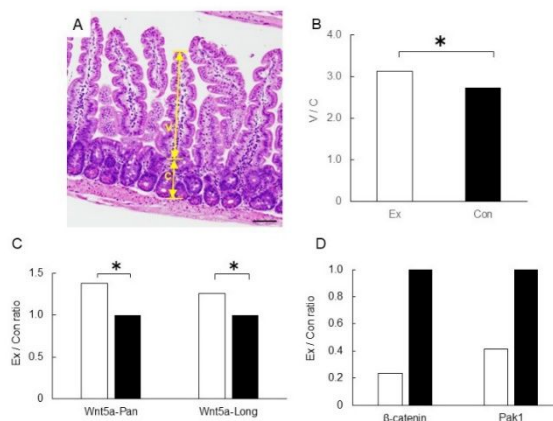


図6. 下部小腸のV/C比とタンパク質発現比較
図Aは下部小腸の絨毛、粘膜下組織のHE染色像を示す。スケールバーは100 μ mを示す。V: Villus, C: Crypt, V/C比はVillusの長さ/Cryptの深さとしてV/C比を算出した。図Bは下部小腸のV/C比を比較した。有意差 * $p < 0.05$
図Cは腓腹筋のWnt5a-PanとWnt5a-Longの発現をWestern blot法により検出し比較した。黒はEx: 実験群、白はCon: 対照群を示す。有意差 * $p < 0.05$
図Dは下部小腸の β -cateninとPak1の発現をWestern blot法により検出し比較した。黒はEx: 実験群、白はCon: 対照群を示す。

- 1) Kawashima T, *J Bone Miner Metab.* 7:46-54, 1989.
- 2) Dohmae Y, et al., *J Bone Miner Metab.* 9:94-98, 1991.
- 3) Orimo H, et al., *J Bone Miner Metab.* 15:100-106, 1996.
- 4) Melton LJ 3rd, et al., *J Bone Miner Res.* 12(1):16-23, 1997.
- 5) Hasegawa K, et al., *J Bone Joint Surg Br.* 79(3):452-456, 1997.
- 6) Yoshimura N, et al., *Int J Epidemiol.* 39(4):988-995, 2010.
- 7) Yoshimura N, et al., *J Bone Miner Metab.* 27(5):620-628, 2009.
- 8) Ensrud KE, et al., *J Am Geriatr Soc.* 48(3):241-249, 2000.
- 9) Nishii K, Aizu N, **Yamada K**, et al., *FMJ.* 9(3): 171-178, 2023.
- 10) **Yamada K**, et al., *J Anal Bio-Sci.* 33(4): 355-365, 2010.
- 11) **Yamada K**, et al., *J Anal Bio-Sci.* 33(2): 141-50, 2010.
- 12) **Yamada K**, et al., *Aging Clin Exp Res.* 25(6): 625-32, 2013.
- 13) **Yamada K**, et al., *Okajimas Folia Anat Jpn.* 91(2): 29-36, 2014.
- 14) Yao R, ..., **Yamada K**, *Okajimas Folia Anat Jpn.* 96(1): 13-21, 2019.
- 15) Kito T, ..., **Yamada K**, *FMJ.* 5(3): 57-62, 2019.
- 16) Izawa S, **Yamada K**, et al., *Dement Geriatr Cogn Disord.* 51(5):434-40, 2022.
- 17) Iwata D, **Yamada K**, et al., *Asian Pac J Cancer Prev.* 24(3):873-9, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Runhong Yao, Kouji Yamada, Takumi Kito, Naoki Aizu, Daiki Iwata, Sho Izawa, Kazuhiro Nishii, Hirohide Sawada, Takeshi Chihara	4. 巻 171.112024.
2. 論文標題 Novel shaking exercises for hippocampal and medial prefrontal cortex functioning maintain spatial working memory.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental gerontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000507884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sho Izawa, Kouji Yamada, Runhong Yao, Naoki Aizu, Takumi Kito, Daiki Iwata, Takeshi Chihara, Hirohide Sawada, Kazuhiro Nishii	4. 巻 51(5)
2. 論文標題 Exercise by shaking alleviates the decline in memory due to aging: a study in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dement Geriatr Cogn Disord.	6. 最初と最後の頁 434 - 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000526620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Daiki Iwata, Kouji Yamada, Takeshi Chihara, Hirohide Sawada, Takumi Kito, Naoki Aizu, Runhong Yao, Sho Izawa, Kazuhiro Nishii	4. 巻 24(3)
2. 論文標題 Exercise through shaking stimuli suppresses cancer growth via the Wnt pathway in ApcMin/+ mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Asian Pac J Cancer Prev.	6. 最初と最後の頁 873-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31557/APJCP.2023.24.3.873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuhiro Nishii, Naoki Aizu, Kouji Yamada.	4. 巻 -
2. 論文標題 Review of the health-promoting effects of exercise and the involvement of myokines.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fujita Medical Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20407/fmj.2022-020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Runhong Yao Kazuhiro Nishii Naoki Aizu Takumi Kito Kazuyoshi Sakai Kouji Yamada.	4. 巻 11
2. 論文標題 Maintenance of the Amygdala-Hippocampal Circuit Function with Safe and Feasible Shaking Exercise Therapy in SAMP-10 Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dement Geriatr Cogn Disord Extra	6. 最初と最後の頁 114-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000515957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------