

平成 27 年 10 月 15 日現在

機関番号：27401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500794

研究課題名(和文)海馬神経新生増進のための最適運動時間帯の決定と運動効果を修飾する栄養環境の解明

研究課題名(英文) Effects of the period of time of exercise and the fat/carbohydrate ratio of the food on the hippocampal neurogenesis.

研究代表者

松本 直幸 (Matsumoto, Naoyuki)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：00252726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：海馬神経新生に及ぼす最適な運動時間帯および栄養環境を明らかにすることを目的に実験を行った。ラットを自由運動群と対照群に分類し、運動群には回転ホイールに自由にアクセスさせた。3週間の運動群の平均走行距離は $1,609 \pm 1,562$ m/day (平均 \pm 標準偏差)であった。21日目にY字および高架式十字迷路を用いて、両群の短期記憶能力および不安傾向をそれぞれ測定した。迷路試験翌日に脳を摘出し、免疫組織化学的に海馬における新生細胞を同定した。サンプル数が少ない影響もあると思われるが、現在のところ運動の有無による短期記憶能力や不安傾向および海馬の新生細胞数においても有意な差は認められていない。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of the period of time of exercise and the fat/carb ratio of the food on the hippocampal neurogenesis. Rats were divided into two groups, exercise and control groups. Average running distance during 3 weeks of experimental period was $1,609 \pm 1,562$ m/day in EX. Short term memory and anxious tendency were examined with use of Y- and elevated plus-maze, respectively in day 21. Neurogenesis was quantified by counting the number of immunohistochemically identified newly born cells in the dentate gyrus. There were no significant differences in ability of short term memory and anxious tendency between two groups. The number of newly born cells in the exercise group was also not different from that in the control group.

研究分野：運動生理学

キーワード：神経新生 海馬 運動 栄養

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む社会において、医療費の抑制、介護制度の拡充といった問題の解決は急務である。出来るだけ長く自立した生活を送ることを個人が目指し、社会がサポートすることが重要である。継続的運動により筋骨格系、呼吸循環系の機能維持あるいは増進を図ることが、自立的生活スタイルの獲得に有効であることは社会的に広く受け入れられ、さまざまな形で実践されている。健康への関心が高まる中メディアの関心も高く、社会(市民)への周知も進んでいる。しかしながら、身体運動能力の向上だけでは解決できない問題に、今社会の関心が高まってきている。脳の問題である。身体能力が高くても重度の認知症であれば、家族や地域の人々に介護のための多大な労力が必要となる。すなわちこれは患者個人の悲劇にとどまらず、家族や地域社会、ひいては国家に大きな財政的負担をも強いることとなり、この予防と改善へ向けて有効な対策を講じていかねばならない。即効性のある医薬品の開発といった対策と平行して、長期的展望に立った予防法および症状改善策の確立を目指し、高齢化や介護の問題に直面する社会や個人に有効な手立てを提示していくことが急務となっている。

さて、運動は認知機能に対してどのような効果を持つのか? この点については依然議論があり、科学的な知見の蓄積が望まれている。脳には可塑性が備わっており、この可塑性こそが脳が学習し高次な機能を実現するための基本的なしくみである。可塑性の実態はシナプスにおける信号伝達の長期増強(Bliss & Lomo, 1973)、長期抑圧(Ito & Kano, 1982)、神経線維の発芽・伸展・新生・消失などであるが、いずれの現象にも BDNF が必須の関与をすることが強く示唆されている(Ikegaya et al. 2002, Mamounas et al. 2000, Messaoudi et al., 2002, Patterson et al. 1996)。1995年に身体運動によって海馬の BDNF mRNA の発現量が増加することを Neeper らが報告したことが、運動と脳機能に関する研究が進む大きなきっかけとなった(Neeper et al. 1995)。Raffaella らは自発的運動が海馬の遺伝子発現に及ぼす影響をマイクロアレイ法で調べ、シナプス輸送にかかわる synapsinI や BDNF の転写調節に関わる CREB も運動により著明に発現が増強することを見いだした(Raffaella et al. 2002)。すなわち、運動により海馬で BDNF が増えることでシナプス可塑性に関わるタンパクの発現が増加し、シナプス機能やその適応的变化に大きな影響を及ぼすことが示唆されている。さらに運動によって海馬で神経新生が促進されたマウスは、空間的迷路学習の成績が良いことが報告され(Praag et al. 1999) 運動が認知機能に及ぼす効果が注目されることになった。これまでの研究により、運動は認知機能低下を招く遠因となる高血圧やインスリン抵抗性の改善、メタボリックシンドロームを悪化させると考えられる炎症の抑

制に関与し、さらに成長因子の発現を促進することで脳の健康に必須の関与をすることが明らかとなってきた(Cotman et al. 2007)。

2. 研究の目的

運動の認知機能改善やその向上にも寄与する可能性が示唆される中で、今後解決されるべき問題の一つは、「適切な運動方法とその効果に影響する諸因子との相互作用」である。運動の効果はその強度や種類だけで決まるものではなく、例えば栄養の摂取状態はどのように運動効果に影響するかなど、様々な因子との相互作用を明らかにしていくことが、運動の効果の本質を知る上で極めて重要である。本研究課題では運動負荷の与え方、食餌内容(栄養摂取状態)の違いが海馬での BDNF の発現や神経新生にどのように影響するのかを明らかにし、脳の健康にとって適切な運動様式や食習慣を社会に提言していくことを目的とする。

3. 研究の方法

< 被験動物と運動負荷 >

性周期やストレス耐性の違い(Westenbroel et al. 2004)の影響を除外するために 8-12 週齢の雄性 Wistar ラットを用いる。飼育中の明暗サイクルは 12 時間(8:00-20:00 を暗期)とし、食餌および水は自由摂取とする。動物はコントロール群と運動時間帯の異なる 3 群の計 4 群に分ける。

- ・コントロール群：走行用ホイールのないケージで飼育。

- ・覚醒直後群：9:00-11:00 の間、走行用ホイールが使用可能。

- ・活動期群：13:00-15:00 で走行用ホイール使用可能

- ・就寝直前群：17:00-19:00 で走行ホイール使用可能

強制運動などストレス環境下ではコルチコステロン等のストレスホルモンの分泌が増加し、神経新生を抑制する可能性が示唆されているので(Stranahan et al. 2006)、この影響を除外するために電撃などによる強制運動は行わず自発的な運動を行わせる。また、一群あたりの n 数を大きくし(10-15 匹) 実験期間中の走行量が極端に異なる(例えば平均走行距離の標準偏差の 2 倍を越える) 個体は解析から除外する。運動による脳の遺伝子発現変化をマイクロアレイ法で調べた研究によると(Raffaella et al. 2002) 3 日間の短期運動後と 28 日間の長期運動後では影響を受ける遺伝子やたんぱくに若干の違いがあるが、少なくとも BDNF は一貫してその発現が増加することから、今回は長期的効果に焦点を絞り、運動は週 5 日、4 週間行わせる。体重、一日あたりの走行距離を毎日測定する。

< 新生した神経細胞の同定と定量化 >

海馬での神経新生を定量するために、増殖している細胞で新たに合成される DNA へ取り込まれるチミジンの類似物質である BrdU お

よび成熟神経細胞マーカーである NeuN、幼若神経細胞のマーカー-Tuj-1、グリアのマーカーである GFAP の多重免疫組織化学染色を施し、神経細胞でありかつ BrdU 陽性である細胞数をカウントする。運動開始から 2 週間は毎日 50mg/kg の BrdU を腹腔に注入する。後半 2 週間は BrdU は注入せず運動負荷だけ与えることで、主に新生した細胞の生存状況を確認することができ、これを評価する(Kitamura et al. 2003)。これは各群の半数のラットについて行う。顕微鏡用デジタルカメラを用いて組織切片を写真として取り込み、細胞数カウントに用いる。

4 . 研究成果

8 週齢の Wistar 系雄性ラットを飼育室環境に 7 日間順化させた後、自由運動群(n = 4)と対照群(n = 6)に無作為に分類した。運動群では常時、回転ホイールに自由にアクセスさせた。21 日間の運動群の平均走行距離は $1,609 \pm 1,562$ m/day (平均 \pm 標準偏差)であった。21 日目に Y 字および高架式十字迷路を用いて、両群の自発的交替行動(短期記憶の指標)および不安傾向をそれぞれ測定した。迷路試験直後に BrdU (150 mg/kg)を腹腔注射し、24 時間後に 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後脳を摘出した。40 μ m の薄切切片を作成し、免疫組織化学的に海馬における新生細胞を同定した。免疫染色がうまくいかなかった例もあり、サンプル数が少ない影響もあると思われるが、現在のところ運動の有無による短期記憶能力や不安傾向に差は認められていない。海馬の新生細胞数においても有意な差は認められていない。

< 引用文献 >

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232: 331-356 (1973).

Ito M, Kano M. Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex. *Neurosci Lett.* 33: 253-258 (1981).

Ikegaya, Y. Ishizaka, Y. Matsuki, N. BDNF attenuates hippocampal LTD via activation of phospholipase C: implications for a vertical shift in the frequency-response curve of synaptic plasticity. *Eur J Neurosci.* 16: 145-148 (2002)

Mamounas, L. A. Altar, C. A. Blue, M. E. Kaplan, D. R. Tessarollo, L. Lyons, W. E. BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. *J Neurosci.* 20: 771-782 (2000)

Messaoudi, E. Ying, S. W. Kanhema, T. Croll, S. D. Bramham, C. R. Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *J Neurosci.* 22: 7453-7461

(2002)

Patterson, S. L. Abe, T. Deuel, T. A. Martin, K. C. Rose, J. C. Kandel, E. R. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16: 1137-1145 (1996)

Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373: 109 (1995)

Molteni R, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci.* 16: 1107-1116 (2002)

van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 13427-13431 (1999)

Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30: 464-472 (2007)

Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nat Neurosci.* 9: 526-533 (2006)

Kitamura, T. Mishina, M. Sugiyama, H. Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Neurosci Res.* 47: 55-63 (2003)

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6件)

NISHIWAKI M., KURIYAMA A., IKEGAMI Y., NAKASHIMA N. and MATSUMOTO N. Pilot Crossover Study: Effects of an Intervention Using an Activity Monitor With Computerized Game Functions on Physical Activity and Body Composition. *J. Physiol. Anthropol.* 査読有, 33:35 (2014)

NISHIWAKI M., KUROBE K., KIUCHI A., NAKAMURA T. & MATSUMOTO N. Sex Differences in Flexibility-Arterial Stiffness Relationship and Its Application for Diagnosis of Arterial Stiffening: A Cross-Sectional Observational Study. *PLoS ONE*, 査読有, 9(11): e113646. doi:10.1371/journal.pone. 0113646 (2014)

宮路 茜, 西脇 雅人, 濱田 有香, 松本 直幸 身体活動基準 2013 をより短時間で充足するための新しい歩行方法の検討 体力科学、査読有、62: 383-390 (2013)

西脇 雅人, 中嶋 名菜, 池上 由美, 川上 諒子, 黒部 一道, 松本 直幸 活動量計と Twitter を併用した生活介入が身体活動量に与える影響 - 無作為割り付け介入試験 - 体力科学、査読有、62: 293-302 (2013)

松本 直幸, 黒部 一道, 西脇 雅人, 林 直亨 生活活動量増進を促す身体活動量マップの作成とその地域振興への利用 SSF スポーツ政策研究, 査読無, 2: 72-78 (2013)

YAMADA H., INOKAWA H., MATSUMOTO N., UEDA Y., ENOMOTO K. & KIMURA M. Coding of the Long-Term Value of Multiple Future Rewards in the Primate Striatum. 査読有, J. Neurophysiol. 109: 1140-1151 (2013)

〔学会発表〕(計 7 件)

西脇 雅人・米村 春香・黒部 一道・松本 直幸 4 週間の定期的な静的ストレッチトレーニングは中年男性の動脈ステイフネスを低下させるか 体力医学会 2014年9月 長崎大学(長崎)

黒部 一道・甲阪 絢佳・荻田 太・松本 直幸 異なる3タイプの有酸素性運動がグルコース摂取後の代謝応答に及ぼす影響 体力医学会 2014年9月 長崎大学(長崎)

ENOMOTO K., MATSUMOTO N., HARUNO M. & KIMURA M. Heterogeneous reward signals of midbrain dopamine neurons in over-trained monkeys. 神経科学学会 2014年9月 パシフィコ横浜(横浜)

ENOMOTO K., MATSUMOTO N. & KIMURA M. Dopamine neurons evolve to signal future rewards expected across blocks of multiple choices when monkeys are overtrained. 北米神経科学学会 2013年11月 San Diego (USA)

西脇 雅人・黒部 一道・木内 敦詞・中村 友浩・松本 直幸 体の柔軟性と動脈ステイフネスは交絡因子の影響を除いた上でも関連するか -横断的研究- 体力医学会 2013年9月 日本教育会館(東京)

黒部 一道・中尾 沙織・西脇 雅人・松本 直幸 コーヒー摂取と間欠的運動の組み合わせが脂質代謝に及ぼす影響 体力医学会 2013年9月 日本教育会館(東京)

ENOMOTO K., MATSUMOTO N. & KIMURA M. Midbrain Dopamine Neuron Signals Supra-Long Term, Minimum-Discounted Future Rewards in Over-Trained Monkeys. 神経科学学会 2013年6月 京都国際会館(京都) 〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:

権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
松本 直幸 (MATSUMOTO Naoyuki)
熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号:
00252726

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: