

遊びによる脳の活性化のしくみ

名古屋大学 理学研究科
上田（石原） 奈津実

はじめに

「遊び道具や仲間の多い豊かな環境で育ったラットでは胡弓がよく発達する」というデータが1960年代に米国の Rosenzweig らによって最初に報告され、大きな反響を呼んだ。その後多くの研究者がこの現象の解析を行った結果、遊びによる適度な運動や感覚刺激が、転写制御因子、神経栄養因子、ストレス蛋白質、エピジェネティック制御因子などの量的・質的变化を伴う複雑なメカニズムにより、神経細胞数、シナプス結合数、グリア細胞数が増加し、ストレスや疾患への抵抗性が高まること断片的にわかってきたが、全容の解明には程遠い状況にある。この現象はストレスへの適応の一種ともいえるが、中心的な分子メカニズムを強化できればアルツハイマー病や血管性などの認知症、うつ病などに対する新規予防法や治療法の開発につながり得る。また、リハビリテーション、スポーツ医学、介護等への応用も期待される。そこで本研究では神経細胞が遊びに伴う活性化に応じて機能や形態を変化させるしくみを分子レベルで調べることを目的とする。

遊びによる神経新生促進効果には主に海馬歯状回での脳由来神経栄養因子 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) の発現が必須であるが、神経新生に依存しない脳機能改善効果は胡弓のどの部位のどのニューロンあるいはグリアの活動が関与するのか、BDNF 以外の因子がどの程度関与するのか、などが依然として不明である。そこで、神経活動がモニターできるように、神経細胞の活動に応じて GFP (クラゲの蛍光蛋白質) で光るように遺伝子を改変したマウスを用いて遊び後に神経活動依存的に BDNF を発現する神経細胞と放出部位を同定するとともに、BDNF の主要な受容体 TrkB (チロシンキナーゼ) の発現パターンと活性化状態 (自己リン酸化) も解析した。

方法

Arc 遺伝子のプロモーター制御下で分解阻進型蛍光蛋白質 dVenus が発現するトランスジェニックマウス (*Arc-dVenus* トランスジェニックマウス) を岐阜大学大学院医学系研究科高次神経形態学の山口瞬教授より分与して頂いた。オスの *Arc-dVenus* トランスジェニックマウ

スとメスの C57B/6 マウスを交配し、同腹、同性、同生育環境のオスの *Arc-dVenus* トランスジェニックマウスを得た。飼育環境は 8:00~20:00 を明期とする明暗サイクルで、室温は $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ に維持した。水および飼料は自由摂取とした。本実験は名古屋大学動物実験委員会の承認を得て行った。実験目的を達することができる範囲において、できる限り実験に供する実験動物の個体数を少なくすることに配慮した。また、すべての処置において、動物愛護管理法及び飼養保管基準における苦痛の軽減に係る規定を踏まえ、科学上の利用に必要な限度において、できる限りその実験動物に苦痛を与えない方法を取るよう配慮した。

同腹、同性、同生育環境の 9~14 週齢、オスの *Arc-dVenus* トランスジェニックマウス 8 匹を用意した。同腹、同性、同生育環境の雄の *Arc-dVenus* トランスジェニックマウスを対照群と遊び群に分け、ケージ (縦 30 x 横 17 x 高さ 12 cm) に入れた。遊びを行えるケージにはランニングホイールを設置し、3 日間飼育した。明暗サイクルは飼育環境と同じ条件とした。また、すべての手順は、名古屋大学の動物実験委員会のガイドラインに従って行った。これらの処理後、マウスの体重 (g) の 10 倍量 (ml) の 5 mg/ml ネブタール (大日本住友製薬) を腹腔注射して麻酔をかけ 4% paraformaldehyde/0.1 M PB を用いて灌流固定を行った。脳を取り出し、同液にて 4 時間の浸漬固定を行なった後 15% Sucrose/0.1 M PB、30% Sucrose/0.1 M PB に置換して 12 時間以上 4°C にて振盪した。厚さ 50 μm 傍矢状面ないしは冠状面で薄切した脳組織切片を作製した。8% normal goat serum (Gemini Bio-Products)、2% BSA (SIGMA)、0.1% Triton-X/PBS でブロッキング処理を行った。1 次抗体反応は Rabbit 抗 TrkB 抗体、Rabbit 抗 Phospho-TrkB 抗体 (Skirball Institute of Biomolecular Medicine の Moses V. Chao 博士より分与) を用いた。2 次抗体は Alexa Fluor 594 で標識された抗 rabbit IgG 抗体 (1:1000, Molecular Probes) を使用した。免疫蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, OLYMPUS) もしくは HS オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ9000, KEYENCE) を用いて撮影した。対物レンズは 60X Plan-APO (N.A. 1.4) (OLYMPUS) 油浸レンズと 100X Plan-APO (N.A. 1.4) (OLYMPUS) もし

くは4X Plan-APO (N.A. 0.2) (Nikon)を使用した。

結果

体重変化、脳重量変化

遊び促進処理前のマウスの体重は、コントロール群が 20.38 ± 0.239 g (n = 4)、遊びを促進した群が 20.38 ± 0.287 g (n = 4) であり、両群間で有意差は認められなかった。また、3日間の遊び促進処理後のマウスの体重は、コントロール群が 20.38 ± 0.145 g (n = 4)、遊び促進処理群が 20.68 ± 0.373 g (n = 4) であり、両群間で有意差は認められなかった。脳重量は、コントロール群が 0.4520 ± 0.01143 g (n = 4)、遊び促進処理群が 0.4455 ± 0.00826 g (n = 4) であり、両群間で有意差は認められなかった。

遊び促進により誘導される神経活動領域

本研究では、Arc プロモーターの下流で分解産物を含む改変緑色蛍光蛋白GFP (Green Fluorescent Protein)を発現させるレポーターマウスを使用しており、可塑的な変化が起こり易い脳の領域でレポーターの強い発現が時空間的に同定できる。そこで、遊びの促進によって活動が亢進した脳領域を Venous シグナルを指標とし、500 μm おきに脳組織切片を観察し、Venous シグナルの検出される領域を同定した。結果、海馬において、遊び促進群の Venous シグナルはコントロール群に比べて最も強く検出できた (図1)。

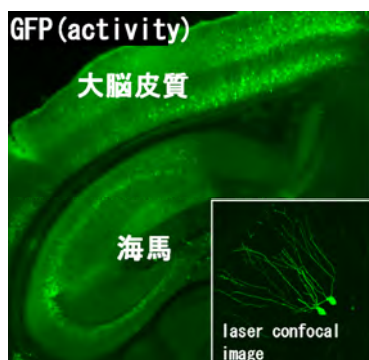


図1：遊び中のマウスで活動中の神経細胞(緑)

また、大脳皮質領域 (特に、感覚野、視覚野) においても、Venous シグナルはコントロール群に比べて強く検出できた (図1)。

遊び促進により誘導される TrkB (チロシンキナーゼ) の発現パターンと活性化状態 (自己リン酸化)

遊びに伴う運動促進による神経新生促進効果には主に海馬歯状回での脳由来神経栄養因子 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) の発現が必須であるが、神経新生に依存しない脳機能調節効果においては、BDNF がどの程度関与するのかなどが依然として不明な

点が多い。そこで、遊び促進処理により神経活動が亢進したニューロンにおいて、BDNF シグナルの関与が認められるか否かを評価するため、BDNF の主要な受容体 TrkB の発現と活性化状態 (自己リン酸化) を解析した。500 μm おきに脳組織切片を作製し、TrkB 抗体と Phospho-TrkB 抗体を用いて免疫染色を施した。結果、海馬の神経活動の亢進したニューロンにおいて、遊び促進群の TrkB シグナル、Phospho-TrkB 受容体シグナルはコントロール群に比べて強く検出された。この結果は、BDNF シグナルが神経活動の亢進したニューロンにおいて働いていることを示唆する。

今後の課題

本研究では、遊び促進による神経活動依存的に海馬領域において、BDNF の主要な受容体である TrkB 活性化状態 (自己リン酸化) を検出した。TrkB は種々のシグナル伝達機構を開始することが知られているため、下流分子の探索が必要である。今後は、当該領域の DNA マイクロアレイ、ショットガン・プロテオミクスにより、遊びの促進依存的に発現量が変動する遺伝子、蛋白質を系統的に同定する必要があり現在進行中である。これらの中には神経保護、神経栄養効果、気分改善効果を持つ分子が含まれる可能性があり、健康寿命の延長やクオリティ・オブ・ライフ向上に貢献する研究につながることを期待される。

謝辞

本研究課題を実施するにあたり、多大な研究助成を賜りました公益財団法人中山隼雄科学技術文化財団に深く感謝申し上げます。本研究は、名古屋大学理学研究科生命理学専攻木下専教授のもとで行った研究であります。また、Arc-dVenus トランスジェニックマウスを分与頂きました岐阜大学大学院医学系研究科高次神経神経学部の山口瞬教授、Rabbit 抗 TrkB 抗体と Rabbit 抗 Phospho-TrkB 抗体を分与頂きました Skirball Institute of Biomolecular Medicine の Moses V. Chao 博士、TrkB 受容体に関してご助言を頂きました (独) 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門小島正己研究グループ長、SPF 動物施設の利用に対して多大な理解と協力を頂きました、名古屋大学環境医学研究所の佐藤純佳教授、技官の伊藤麻里子氏、森ララミ氏に心より御礼申し上げます。