

平成 27 年度 博士論文

低強度運動による海馬機能の向上とその分子機構  
: 網羅的遺伝子発現解析を用いた検討

筑波大学大学院博士後期課程

人間総合科学研究科

体育科学専攻 運動生化学研究室

井上 恒志郎

# 目次

目次 .....	i
List of Tables .....	v
List of Figures .....	vi
List of Appendices .....	vii
略語と用語説明 .....	viii
関連論文 .....	x
第 I 章 緒言 .....	1
第 II 章 先行研究 .....	5
1. 運動と脳 .....	5
2. 海馬 .....	6
2-1. 海馬の構造 .....	6
2-2. 海馬の機能 .....	7
3. 成体海馬神経新生 (AHN, adult hippocampal neurogenesis) ....	8
3-1. AHN とは? .....	8
3-2. 新生細胞の成熟過程 .....	9
3-3. 新生細胞の成熟段階の評価 .....	12
4. 運動と海馬 .....	13
4-1. 運動で高まる AHN と空間学習記憶能力 .....	13
4-2. 運動による AHN 促進の調節因子 .....	14
5. ストレスと海馬 .....	15
6. 我々の研究: 運動強度と海馬の適応 .....	15
7. Omics 解析: マイクロアレイ .....	17
第 III 章 研究目的と課題 .....	20
第 IV 章 研究課題 1-1: 6 週間モデルの確立-ストレスレベルの検討-.....	22

1. 目的 .....	22
2. 方法 .....	23
2-1. 被験動物および飼育条件 .....	23
2-2. 予備飼育およびグルーピング .....	23
2-3. 走行学習と走運動トレーニング .....	24
2-4. サンプルング .....	24
2-5. クエン酸合成酵素 (CS, citrate synthase) 活性の測定 .....	24
2-6. 血漿コルチコステロン (CORT, corticosterone) の測定 .....	26
2-7. 統計処理 .....	27
3. 結果 .....	28
3-1. ヒラメ筋 CS 活性 .....	28
3-2. 血漿 CORT 濃度 .....	29
3-3. 副腎および胸腺湿重量 .....	29
4. 考察 .....	29
5. 小括 .....	31
<b>第 V 章 研究課題 1-2 : 6 週間モデルの確立-AHN の確認 - .....</b>	<b>32</b>
1. 目的 .....	32
2. 方法 .....	33
2-1. 被験動物および飼育条件 .....	33
2-2. 予備飼育およびグルーピング .....	33
2-3. 走行学習と走運動トレーニング .....	33
2-4. 脳組織切片の作成 .....	34
2-5. 海馬歯状回 (DG, dentate gyrus) 体積の算出 .....	35
2-6. 新生細胞およびその成熟段階の評価 .....	36
2-7. 細胞数の推定方法 .....	40
2-8. 統計処理 .....	41
3. 結果 .....	42
3-1. 海馬 DG 体積 .....	42
3-2. 新生細胞数の変化 .....	42

4. 考察 .....	43
5. 小括 .....	45
<b>第 VI 章 研究課題 1-3 : 海馬の機能向上に有効な運動強度の解明 .....</b>	<b>46</b>
1. 目的 .....	46
2. 方法 .....	46
2-1. 被験動物および飼育条件 .....	46
2-2. 予備飼育およびグルーピング .....	47
2-3. 走行学習と走運動トレーニング .....	47
2-4. 空間学習記憶能力の評価 : モリス水迷路 (MWM) .....	47
2-5. 統計処理 .....	49
3. 結果 .....	49
3-1. MWM の成績 : 場所学習逃避訓練 .....	49
3-2. MWM の成績 : プロブテスト .....	49
4. 考察 .....	51
5. 小括 .....	52
<b>第 VII 章 研究課題 2 : 低強度運動で高まる海馬機能の分子機構の検討 .....</b>	<b>54</b>
1. 目的 .....	54
2. 方法 .....	55
2-1. 被験動物および飼育条件 .....	55
2-2. 予備飼育およびグルーピング .....	55
2-3. 走行学習と走運動トレーニング .....	55
2-4. 海馬の摘出 .....	55
2-5. 均質化 (ホモジナイズ) .....	56
2-6. 海馬 RNA の抽出 .....	57
2-7. RNA の濃度測定と性状確認 .....	57
2-8. ホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動 .....	58
2-9. RT-PCR .....	59
2-10. 海馬遺伝子発現の網羅的解析 : マイクロアレイ .....	61
2-11. RT-PCR によるマイクロアレイデータの再現性の確認 .....	63

2 - 12. IPA.....	63
3. 結果.....	64
3 - 1. RNA の分解およびコンタミネーションの有無.....	64
3 - 2. 海馬遺伝子発現の変化：マイクロアレイ.....	65
3 - 3. マイクロアレイデータの再現性の検討.....	66
3 - 4. ネットワーク解析：IPA.....	66
4. 考察.....	70
5. 小括.....	76
第 VIII 章 総合討論.....	78
第 IX 章 総括.....	93
謝辞.....	96
参考文献.....	97
Supplemental Tables.....	118
Appendices.....	137

## List of Tables

表 1	MWM における遊泳距離および速度の変化 .....	50
表 2	RT-PCR で使用したプライマーと PCR 反応のサイクル数 .....	60
表 3	抽出した RNA の OD 比と内部標準の電気泳動の結果 .....	65

### Supplemental Tables

表 S1	走行学習と走運動トレーニングのプロトコル .....	118
表 S2	ME で同定された遺伝子の IPA による分類 .....	121
表 S3	IE で同定された遺伝子の IPA による分類 .....	130

## List of Figures

図 1	海馬の構造と神経回路.....	6
図 2	新生細胞の成熟過程とその評価に使用されるマーカー.....	10
図 3	新生細胞が既存の神経回路に組み込まれる様子.....	11
図 4	DNA マイクロアレイの原理（2色法）.....	18
図 5	異なる強度の走運動トレーニングによる筋 CS 活性とストレス指標の変化.....	28
図 6	海馬 DG 体積の算出方法.....	36
図 7	陽性細胞の総数の推定方法.....	41
図 8	異なる強度の走運動トレーニングによる DG 体積と AHN の変化.....	43
図 9	異なる強度の走運動トレーニングが MWM 成績に及ぼす影響：遊泳時間の 変化.....	50
図 10	海馬組織からの RNA 抽出と抽出方法の妥当性の検討.....	56
図 11	マイクロアレイの解析手順.....	61
図 12	Total RNA および内部標準の電気泳動画像.....	64
図 13	各運動強度で変化が見られた遺伝子の数.....	66
図 14	RT-PCR によるマイクロアレイ結果の再現性の確認.....	67
図 15	IPA による ME の遺伝子ネットワーク解析の結果.....	68
図 16	IPA による IE の遺伝子ネットワーク解析の結果.....	69
図 17	低強度運動で高まる空間記憶の推定機構.....	85

## List of Appendices

<b>Appendix 1</b>	異なる強度の走運動トレーニングによる筋 CS 活性とストレス指標 の変化（研究課題 1-1） .....	137
<b>Appendix 2</b>	異なる強度の走運動トレーニングによる AHN の変化（研究課題 1-2） ..	138
<b>Appendix 3</b>	MWM の場所学習逃避訓練の結果（研究課題 1-3） .....	139
<b>Appendix 5</b>	MWM のプローブテストの結果（研究課題 1-3） .....	140



## 略語と用語説明

- **AD: Alzheimer's disease**

アルツハイマー型認知症. アミロイド B 斑の形成や大脳皮質の萎縮, 神経原線維変化を伴う進行性の認知障害. 主に成人期に発症し, 近似記憶の障害や人格の変化を伴う.

- **AHN: adult hippocampus neurogenesis**

成体海馬神経新生. 海馬歯状回で一生涯に渡って生じている新しい神経細胞の産生.

- **BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine**

ブロモデオキシウリジン. チミジンの同族体. 細胞周期の S 期に DNA 内に取り込まれ, 免疫組織化学法により検出が可能. 細胞の増殖や生存の評価に用いられる.

- **CA: cornu ammonis**

アンモン角. 海馬の亜領域の一つ. 錐体細胞から成る.

- **cDNA: complementary DNA**

相補的 DNA. mRNA をもとに逆転写酵素を用いて合成された DNA.

- **DG: dentate gyrus**

歯状回. 海馬の亜領域の一つ. 顆粒細胞から成る.

- **GAS: general adaptation syndrome**

汎適応症候群. 生体が様々なストレス環境に暴露された際に, そのストレッサーに適応しようとして起る生体変化. 慢性ストレス時には, 副腎の肥大や胸腺の萎縮, 高グル

コルチコイド血漿がみられる。

- **GCL: granular cell layer**

顆粒細胞層。DG 領域にみられる顆粒細胞から成る細胞層。

- **IPA: Ingenuity Pathway Analysis**

マイクロアレイやプロテオミクス等の実験で得たデータをもとに、生物学的機能の解釈やパスウェイ解析を行うソフトウェア。

- **LT: lactate threshold**

乳酸性作業閾値。漸増負荷運動時に、血中乳酸が急激に増加するポイント。

- **MWM: Morris water maze**

モリス水迷路。実験動物における最も典型的な空間学習記憶テストの一つ。場所学習逃避訓練とプローブテストにより構成される。

- **PCL: pyramidal cell layer**

錐体細胞層。CA 領域にみられる錐体細胞から成る細胞層。

- **SGZ: subgranular zone**

顆粒細胞下帯。顆粒細胞層と歯状回門の間に位置する帯状の領域。前駆細胞が存在し、新たな神経の産生が起る。

## 関連論文

本研究は次の原著論文にまとめられている。

1. **Inoue K, Hanaoka Y, Nishijima T, Okamoto M, Chang H, Saito T and Soya H.** Long-term mild exercise training enhances hippocampus-dependent memory in rats. *Int J Sports Med* 36: 280-285. 2015. DOI: 10.1055/s-0034-1390465 【研究課題 1-1, 1-3】
2. **Inoue K, Okamoto M, Shibato J, Lee MC, Matsui T, Rakwal R and Soya H.** Long-term mild, rather than intense, exercise enhances adult hippocampal neurogenesis and greatly changes the transcriptomic profile of the hippocampus. *Plos One* 10: e0128720. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0128720 【研究課題 1-2, 2】

## 第 I 章 緒言

運動は、骨や筋、血管といった末梢組織のみならず、脳にも作用する(Soya *et al.*, 2011). 数ある脳部位のなかでも、大脳辺縁系に属する海馬は可塑性が高い脳部位として知られ、ヒト(Erickson *et al.*, 2011)およびラットやマウスといった実験動物(Fordyce *et al.*, 1991; van Praag *et al.*, 1999a)で運動による海馬機能の向上が報告されている。特に実験動物では、運動が海馬依存の空間学習記憶能力を高めることが数多く報告され(Alaei *et al.*, 2007; Ang *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009; Ni *et al.*, 2011; Uysal *et al.*, 2005; van Praag *et al.*, 1999a), その神経基盤や分子機構の研究が精力的に行われている。

運動による海馬機能の向上を担う一因として、成体海馬神経新生 (AHN, adult hippocampal neurogenesis) があげられる。AHNとは、海馬の歯状回において一生涯を通じて新しい神経細胞が産生される現象であり、新生細胞が4～6週間かけて成熟し、既存の神経回路に組み込まれ、新規の神経回路が形成されることで海馬機能が向上すると考えられている(Aimone *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2008). 近年の研究によって、運動がAHNを促進し、これをガンマ線照射で抑制すると、運動時にみられる海馬機能の向上が消失することが明らかになっている(Clark *et al.*, 2008). またその背景として、運動で誘導される脳由来神経栄養因子 (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) (Cotman *et al.*, 2002; Neeper *et al.*, 1996)やインスリン様成長因子 I (IGF1, insulin-like growth factor 1) (Trejo *et al.*, 2008), 血管内皮成長因子 (VEGF, vascular endothelial growth factor) (Fabel *et al.*, 2003)といった因子の関与が報告されている。これらの因子以外にも、

運動はグルココルチコイド (GC, glucocorticoid) (Chang *et al.*, 2008)や Wnt(Okamoto *et al.*, 2011), グルタミン酸塩(Choi *et al.*, 2011; Vasuta *et al.*, 2007), サイトカイン(Vukovic *et al.*, 2012),  $\beta$  エンドルフィン(Koehl *et al.*, 2008)など, 様々な因子を介して AHN を高めることが報告されている. このように, 運動は AHN を促進することで海馬の機能を高め, その背景には非常に多くの因子の関与が想定されている. しかし, これらの先行研究では, 回転ホイールによる自発運動モデルが多用され, 運動処方への橋渡しを考える上で重要な運動条件, 特に運動強度に即した研究が不足している. そのため, 海馬機能の向上に適した運動強度やその背景となる分子機構は未だ明らかになっていない.

一方, 我々は, 運動条件のコントロールが可能なトレッドミルを用いて, 異なる強度の運動が海馬の神経活動や AHN に与える影響を検討してきた. 運動強度は, 乳酸性作業閾値 (LT, lactate threshold) 以上では, ストレスホルモンの一つである腎皮質刺激ホルモン (ACTH, adrenocorticotrophic hormone) の分泌が促進されることから, LT 未満の運動をストレスフリーの低強度運動, LT を越える運動を生体にストレスがかかる高強度運動と定義している (Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007a). 先行研究において, 低強度運動でも海馬の神経活動は活性化され (Soya *et al.*, 2007b), 高強度ではなく, 低強度で行う 2 週間の走運動トレーニングが AHN を促進することを報告している (Okamoto *et al.*, 2012). 以上のことから, AHN を促進する低強度の運動が海馬機能の向上に適した運動強度になる可能性が高いものの, 新生細胞が機能的な神経細胞に成熟するのに要する 4 ~ 6 週間の期間 (Aimone *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2008) を踏まえると, そのためのトレーニング期間は 2 週間ではなく, 6 週間程度必要と考えられる. さらに, そ

の背景にある機構の解明のためには、1つの因子に絞った解析ではなく、全因子の網羅的な解析とそれらの因子間にある相互関係や階層性の検討が必要と考えられる。

近年、遺伝子やタンパク質の発現変化を網羅的に解析する技術が格段に飛躍し、得られた情報から調節機構の全容を体系的・系統的に理解しようとする試みが行われている（児玉ら，2005）。既に運動と海馬の研究にも応用されており（Chen *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2006b; Kohman *et al.*, 2011; Stranahan *et al.*, 2010），なかでも遺伝子発現の網羅的解析が可能なマイクロアレイは運動に伴う海馬適応の背景にある機構を推定する上で有用なツールといわれている（Hunsberger *et al.*, 2007; Valor *et al.*, 2012）。近年では、マイクロアレイで得られた情報を基に、各因子間の相互作用や階層性を予測するソフトウェア（i.e. IPA, Ingenuity Pathway Analysis）も開発され、重要な因子の抽出やその因子を中心とした分子機構の予測に役立っている（Burger *et al.*, 2008）。このように、マイクロアレイに代表される遺伝子発現の網羅的解析とその情報を統合するためのソフトウェアを併用することで、運動にともなうAHNの適応を包括的な視野からとらえ、重要な機構の予測が可能になる。

そこで本研究では、トレーニング期間が6週間の新たな実験モデルにおいて、高強度（>LT）との比較から、海馬機能に対する低強度（<LT）運動トレーニングの有用性を検証する（**研究課題1**）とともに、マイクロアレイとIPAを用いた海馬遺伝子発現の網羅的解析を行うことで、その背景にある分子機構を推定することとした（**研究課題2**）。なお研究課題1では、6週間の異なる強度の走運動トレーニングがストレスレベル（**研究課題1-1**）およびAHN（**研究課題1-2**）に与える影響を確認した上で、海馬

機能への運動効果を検証することとした（研究課題 1 - 3）。

## 第 II 章 先行研究

### 1. 運動と脳

“Brains and Brawn, One and the Same ; 脳と筋は同じもの (Nicholas Wade, 2004 in New York Times)”という言葉に象徴されるように、運動は骨や筋などの運動器系のみならず、脳にも作用し、神経の可塑性を高め、認知機能を改善することが多数報告されている。ヒトでは、一過性および長期の運動による脳高次機能の改善が確認されており、この効果は若齢者から高齢者に至るまで、幅広い年代の対象者に奏効する。例えば、一過性運動による実行機能の向上は広く知られており (Hillman *et al.*, 2003; Kamijo *et al.*, 2007), 我々も、低～中強度の一過性運動が若齢者や高齢者の実行機能を向上することを報告している (Byun *et al.*, 2014; Hyodo *et al.*, 2012; Yanagisawa *et al.*, 2010)。一方、長期の運動効果を報告した疫学調査では、日常的に運動を実施し身体活動レベルが高いヒトほど、脳高次機能が高いレベルに維持・増進されていることが明らかになっている。若齢者では、持久的運動能力が高いほど、算術能力や読解能力が高く (Hillman *et al.*, 2008), 高齢者では、身体活動レベルを高く保つほど、認知症やうつ症の発症 (Bachman *et al.*, 1993; Friedenber, 2003), 記憶力の低下 (Petersen *et al.*, 1992; Small, 2001) といった加齢に伴う脳高次機能の低下を抑制することが分かっている (Laurin *et al.*, 2001; Lytle *et al.*, 2004; Yoshitake *et al.*, 1995)。運動の介入研究でも、ウォーキングやジョギングといった有酸素運動が高齢者の海馬や前頭前野の機能を改善することが報告されている (Erickson *et al.*, 2011; Harada *et al.*, 2004; Kramer *et al.*, 1999)。このように、ヒトを対象とした研究では、運動が認知機能の維持・回復・機能



促進に有効であるという知見が多く報告されている。一方，実験動物でも脳高次機能に対する運動効果は確認されており，特に海馬という脳部位に対する効果が注目されている。

## 2. 海馬

### 2-1. 海馬の構造

海馬は，側頭葉の内側に折りたたまれて存在する大脳辺縁系の主要な構造の1つであり，解剖学的にいくつかの領域に分けられる。一般的に，**図1 A, B**に示したアンモン角（CA, cornu ammonis），齒状回（DG, dentate gyrus），海馬体（subiculum）

を合わせて海馬体（hippocampal formation）という。狭義には，CAを海馬と定義することもあるが，本研究では広義の意味で海馬体を海馬（hippocampus）と定義する。各領域はそれぞれを構成する主要な細胞が異なっており，CA領域には錐体細胞からなる細胞層（PCL, pyramidal cell layer），DG領域には顆粒細胞から成る細胞層（GCL,

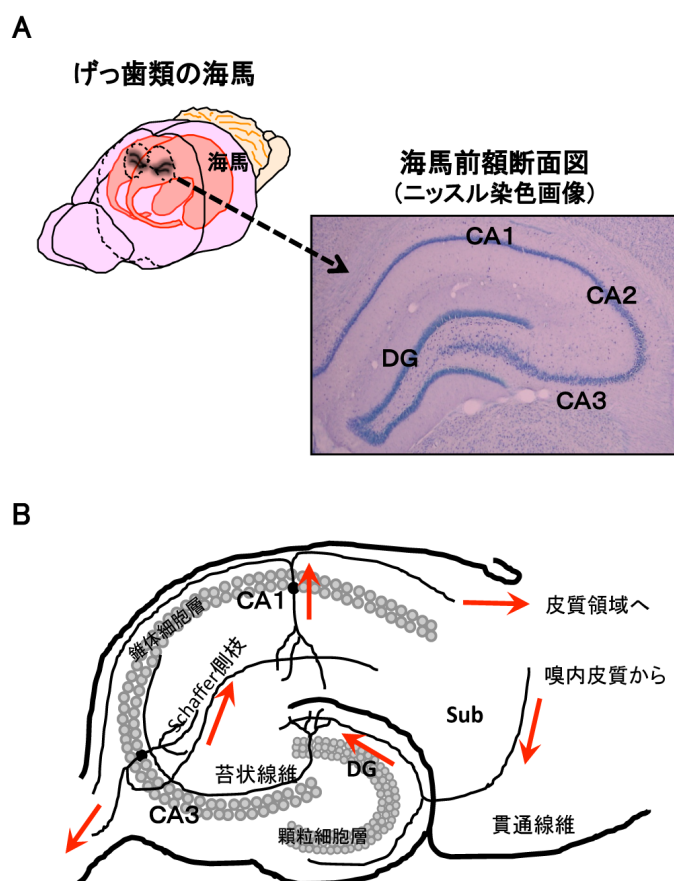


図1 海馬の構造と神経回路

げっ歯類における海馬の3次元的位置づけ（A）と神経回路（B）の模式図を示した。赤の矢印は情報が流れる方向を示す。CA；アンモン角，DG；齒状回，Sub；海馬体

granular cell layer) が広がっている。CA 領域は細胞の大きさや形から構造的にさらに 3 つに分類され、背側の小錐体細胞領域を CA 1, それに続く大錐体細胞領域を CA 2 ~ 3 と区別する。海馬の信号伝達は、3 つの興奮性シナプスを介した回路 (DG → CA 3 → CA 1) に単純化される。はじめに DG が嗅内皮質 (entorhinal cortex) からの信号を受けると、信号は苔状線維 (mossy fibers) を介して CA 3 に伝達される。CA 3 は Schaffer 側枝 (Schaffer collaterals) を通じて信号を CA 1 に送り、CA 1 は大脳皮質に信号を送る。このように、海馬は細胞構造の異なる 3 領域を持ち、それぞれの領域が適切な情報伝達を行うことで、海馬機能が正常に働く。

## 2 - 2 . 海馬の機能

海馬は記憶を司る脳領域として知られており、海馬の人工的な切除や神経精神疾患に伴う萎縮は痴呆や健忘といった重篤な記憶障害を引き起こす。例えば、てんかん患者に治療のために行われた両側海馬体を含む脳領域の切除は、てんかん症状こそ軽減させるものの、新規記憶の形成に障害を与える (順行性健忘) (若林光一, 2007)。また、アルツハイマー型認知症やうつ症を患った神経精神疾患患者では海馬体積の著しい減少がみられ、海馬体積が小さい患者ほど記憶力が低いこと、つまり海馬体積を大きく保つことが記憶力を高く保つ上で重要であることが確認されている (Petersen *et al.*, 2000; Van Petten, 2004)。実験動物でも、海馬が学習や記憶の座であることが放射状迷路 (Mizuno *et al.*, 2000) や Y 字迷路 (Conrad *et al.*, 1999)、モリス水迷路 (MWM, Morris water maze) (Morris, 1984) といった空間学習記憶課題を用いて確かめられている。なかでも、1984 年に Morris ら (Morris, 1984) によって開発された MWM は、神経行動科学の分

野で特に古くから用いられている記憶学習のテストである。新しい記憶が脳に刻まれるには、獲得（学習）、保持、想起という3つの過程をたどる。MWMテストは、記憶の獲得(学習)の能力を評価する場所学習逃避訓練と、記憶の保持・想起の能力を評価するプローブテストで構成される。場所学習逃避訓練では、円形の白濁させたプールに透明のプラットフォームを設置・固定し、そこに被験動物を入れ、被験動物がプラットフォームに逃避するまでの時間や距離から記憶の獲得（学習）能力を評価する。通常、この訓練を繰り返すことで、被験動物は四方に配置された環境手がかりを頼りに、プラットフォームの位置を学習し、逃避に要する時間や距離が短縮する。一方、プローブテストでは、プラットフォームを取り除いたプールに被験動物をプールに入れ、プラットフォームが設置していた四分円内を泳いでいる時間や距離を測定する。遊泳総時間または総距離に対し、四分円内に滞在していた時間や距離の割合から、記憶の保持・想起能力を評価する。海馬が記憶を司ることは、この部位の損傷や病変が MWM の両課題の成績を低下させ(Cho *et al.*, 1999; Riedel *et al.*, 1999), その低下率が損傷度合いに依存するという報告(Moser *et al.*, 1993)から明らかである。特に、海馬 DG でみられる成体海馬神経新生 (AHN, adult hippocampal neurogenesis) という現象は記憶形成との強い関連が想定されており, AHN を高めることが海馬機能の向上につながると考えられている(Duan *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2008; Yau *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2008).

### 3. 成体海馬神経新生 (AHN, adult hippocampal neurogenesis)

#### 3-1. AHN とは？

AHN とは、海馬 DG と嗅球で確認されている現象で、この2領域では成

熟した個体でも新たな神経細胞が産生される。AHN は 1965 年に Altman らによって初めて報告され(Altman *et al.*, 1965), それまでの神経科学における通説—成体脳では, 既存の神経細胞の数は一生涯にわたって変化せず, 残存する神経細胞間で新たな神経ネットワーク (シナプス結合) を形成することで, その可塑性が保たれる (Ramon y Cajal, 1928) —を覆す大発見であった。しかし, 当時は正確な新生細胞数の同定が困難であったことから, 多くの神経科学者が AHN の存在に否定的であった。その後, 新生細胞を簡便かつ正確に標識可能なレトロウィルスやブロモデオキシウリジン (BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine) のモノクローナル抗体が開発され, 検証が進むと, AHN の存在を支持する知見が次々に報告され(Gratzner, 1982), Altman らの研究の正当性が認められるようになった。現在では, 実験動物のみならずヒトでも海馬 DG や嗅球で AHN が起ることが確認されている(Altman *et al.*, 1967; Eriksson *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 1984, 1983; Kaplan *et al.*, 1977; Kornack *et al.*, 1999; Kuhn *et al.*, 1996).

### 3 - 2 . 新生細胞の成熟過程

AHN は海馬 DG 顆粒細胞下帯 (SGZ; subgranular zone) の前駆細胞に端を発し, 神経前駆細胞から分化した新生細胞は, 増殖・分化・生存 (組込み) という 3 つの過程を経て成熟神経細胞に成長する (図 2) (Duan *et al.*, 2008; Ehniger *et al.*, 2008; Kempermann *et al.*, 2004). 前駆細胞のなかでも初期の細胞を Type1 Cell といい, Type1 Cell は Type2 Cell を経て, Type 3 Cell に成長する。Type2 Cell は最も増殖能が高く, 新生細胞の大部分はこの時期に産生される(Ehniger *et al.*, 2008; Filippov *et al.*, 2003).

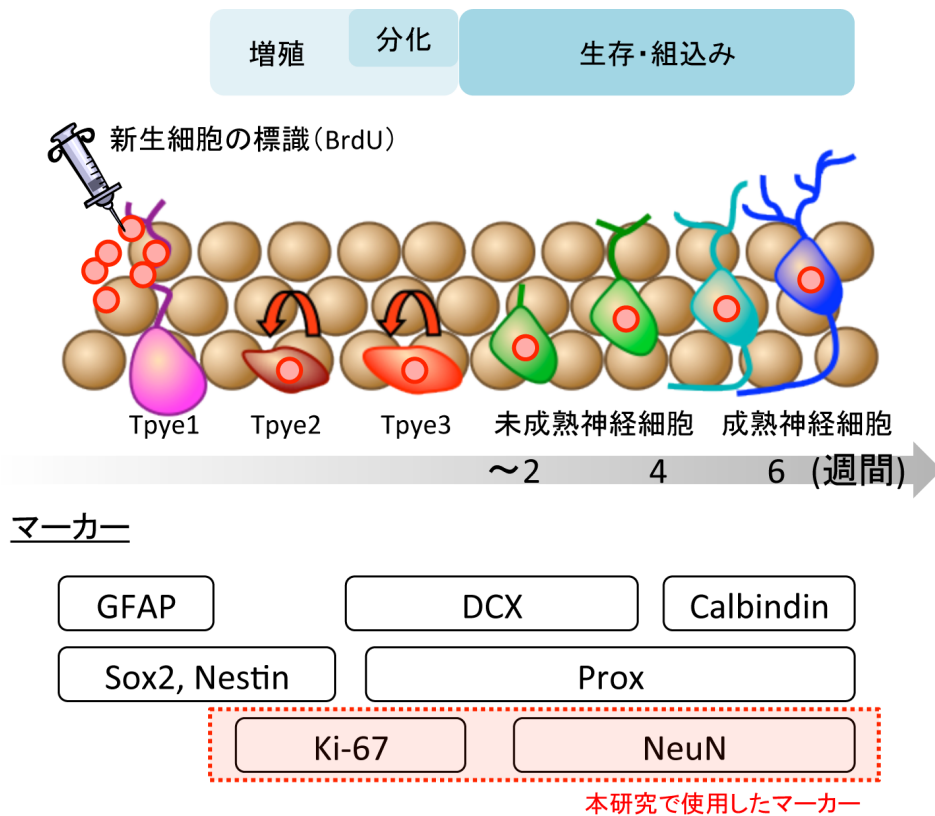


図2 新生細胞の成熟過程とその評価に使用されるマーカー

新生細胞が増殖してから成熟神経細胞に成長する様子と各段階を評価するためのマーカーを示した。新生細胞は、増殖、分化、生存（組み込み）という成熟過程を経て成熟神経細胞に成長する。新生細胞のマーカーである BrdU（プロモデオキシウリジン）と各成熟段階で特異的に発現するマーカーを組み合わせ免疫組織化学染色を行うことで、新生細胞の成熟段階の評価が可能である。本研究では、増殖（Ki-67<sup>+</sup>）細胞、生存（BrdU<sup>+</sup>）細胞、新生成熟神経（BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>）細胞の3つを同定し、細胞数の変化を検討した。

Type 3 Cell は神経芽細胞（neuroblast）ともいわれ、この時期から徐々に増殖能が低下し、神経細胞またはそれ以外の細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア）への系譜決定（分化）が行われる。神経に分化した新生細胞は、その後、未成熟神経細胞へ成長し、同時に、GCL への遊走をはじめめる。未成熟神経細胞は、次第に既存の神経回路へ取込まれるものの、その大半がアポトーシスにより死滅し(Biebl *et al.*, 2000), 生き残った細胞のみが、成熟神経細胞に成熟する。このように新生細胞が生まれてから神経細胞へ分化・成熟し、既存の回路に組込まれるまでには4～6週間の期間が必要であるといわれている(Ge *et al.*, 2008; Zhao *et al.*,

2008) (図 2, 3). 新しく産生され 4 ~ 6 週間かけて成熟した神経細胞は、可塑性に富んだ樹状突起棘を持ち、他の神経細胞と比べ長期増強 (LTP, long-term potentiation) がより強力に誘発されやすいといった特徴がある (Ge *et al.*, 2007; Snyder *et al.*, 2009; Toni *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2006). 海馬依存の行動テストでは、これら新しい神経細胞が優先的に活性化されることも分かっている (Duan *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2008; Kee *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008). このように、新しく産生された細胞のうち、神経へと分化・成熟し、既存の神経回路に組み込まれた細胞が記憶形成において重要な役割を担っている。そのため、AHN を評価する際には、新しく生まれた細胞の成熟段階ごとに数の変化を検討する必要がある。

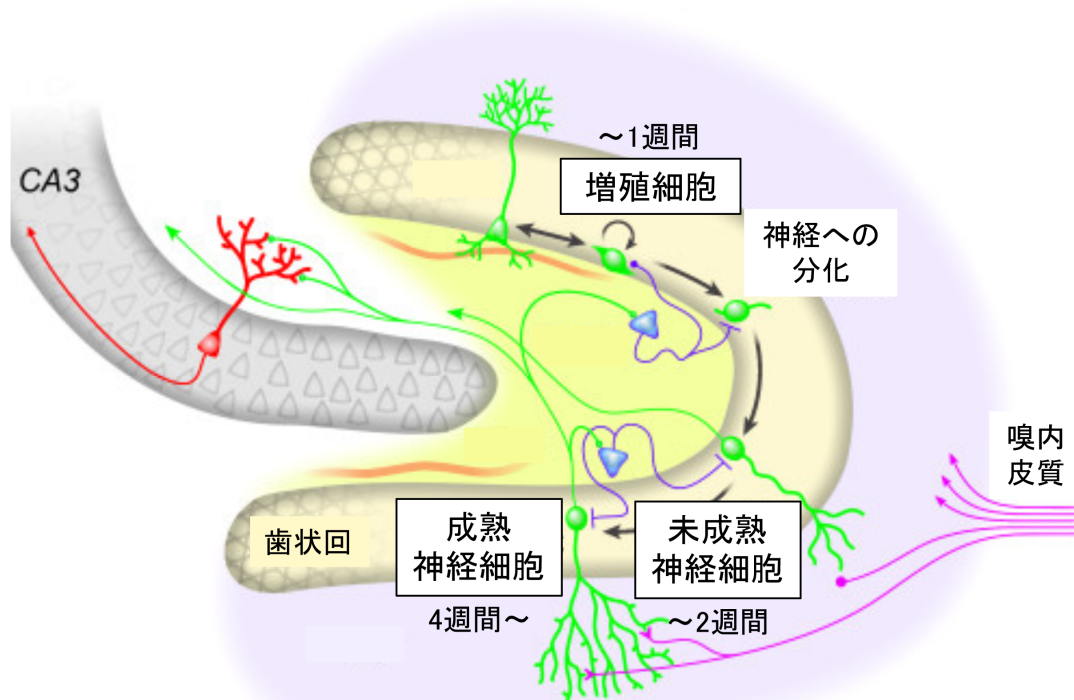


図 3 新生細胞が既存の神経回路に組み込まれる様子

新生細胞が増殖してから成熟神経細胞に成長し、既存の神経回路に組み込まれる様子を示した。新生細胞は約 4 週間の成熟期間を経て、嗅内皮質や CA3 領域と新たな神経ネットワークを形成する。新生細胞が既存の神経ネットワークに新たに付加されることで、海馬機能が高まると考えられている。

### 3 - 3 . 新生細胞の成熟段階の評価

新生細胞の成熟段階は、あらかじめ新生細胞に取り込ませておいた BrdU の経時的変化を BrdU 特異的抗体で追跡する方法（パルスチェイス分析）と、各成熟段階の神経細胞やグリア細胞で発現する特異的なタンパク質や転写因子を抗体で標識する方法を併用することで評価できる(von Bohlen Und Halbach, 2007). パルスチェイス分析では、BrdU 投与のタイミングを調節することで、主に増殖と生存の識別が可能である。例えば、長期の運動トレーニングに伴う増殖能の変化を検討する場合には、トレーニング後、サンプリングの直前に BrdU を投与する。一方、どの程度の新生細胞がトレーニング後も生存したかを検討する場合には、トレーニングの前にあらかじめ BrdU 投与を行っておく必要がある。このように、BrdU で評価できるのは新生細胞の増殖と生存のみであり、新しく生まれた細胞がどの成熟段階にあり、どの細胞に分化したのかを判断することはできない。そこで、各成熟段階で特異的に発現する遺伝子やタンパク質をマーカーとして利用し、抗体を用いて同定する。現在、広く使用されているマーカーを **図 2** に示した(Duan *et al.*, 2008; Ehninger *et al.*, 2008). 例えば、NeuN は成熟神経細胞の代表的なマーカーとして知られており、BrdU と NeuN の両方で陽性反応を示した細胞は、新しく産生された細胞のなかで、成熟神経細胞まで成長した細胞と見なすことができる。一方、未成熟神経細胞のマーカーである DCX と BrdU に陽性反応を示した細胞は、新しく産生され、神経へと分化したものの、未だ未成熟段階にある細胞と見なすことができる。このように、様々なマーカーの組み合わせによって、新生細胞の成熟段階の評価が可能であり、AHN を検討する場合には、研究目的に沿ったマーカーの選択が必要となる。

## 4. 運動と海馬

### 4-1. 運動で高まる AHN と空間学習記憶能力

先行研究において、運動は AHN を促進し、海馬機能を高めることが数多く報告されている。運動による AHN の促進は、1999 年に van Praag らによって初めて報告され(van Praag *et al.*, 1999b), その後も多くの研究で確認されている。2005 年には、高齢動物でも運動に伴う AHN の促進が確認され(van Praag *et al.*, 2005), 運動が一生涯を通じて AHN の促進に有効であることが示された。一方、運動による海馬機能の向上は、AHN に対する運動効果が報告される以前に既に確認されており(Fordyce *et al.*, 1991; Fordyce *et al.*, 1993), 運動による MWM の成績向上が数多く報告されている。トレーニングの期間に着目すると、1 週間の比較的短期の運動トレーニングで MWM 成績が向上するという報告も存在するが(Ding *et al.*, 2006a; Vaynman *et al.*, 2004), 4 週間以上の長期運動トレーニングで MWM の成績向上を報告している研究が多い(Alaei *et al.*, 2007; Ang *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009; Ni *et al.*, 2011; Uysal *et al.*, 2005; van Praag *et al.*, 1999a). 4 週間という期間は新生細胞が成熟し、既存の神経回路に組み込まれるまでの期間と一致する(Ge *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). また、運動によって新しく生まれた神経細胞が既存の神経回路に組み込まれ、刺激応答性を獲得するまでには 5 週間程度の期間が必要であるという報告もある(Clark *et al.*, 2012; Clark *et al.*, 2009). 興味深いことに、Clark ら(2008)は、長期(>5 週間)の運動トレーニングで促進される AHN をガンマ線照射で抑制すると、運動による MWM 成績の向上が抑制されることを報告している(Clark *et al.*, 2008). 海馬機能に対する AHN の役



割については未だ不明な点もあるが(Duan *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2008; Yau *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2008), 以上のことは, 長期の運動トレーニングによる AHN の促進が海馬機能の向上に寄与している可能性を示す.

#### 4 - 2 . 運動による AHN 促進の調節因子

運動による AHN の促進には, 様々な因子の関与が報告されている. 例えば, BDNF や神経成長因子 (NGF, nerve growth factor) (Neeper *et al.*, 1996), IGF1(Trejo *et al.*, 2008), VEGF(Fabel *et al.*, 2003)といった成長因子が有名である. 運動により脳内での分泌が高まる BDNF は新生細胞の増殖・分化・生存を高める効果があり, AHN の促進に一役買っている (Cotman *et al.*, 2002; Neeper *et al.*, 1996). BDNF と同様に, 運動により脳内の発現が高まる NGF も新生細胞の生存に関わる (Neeper *et al.*, 1996). 脳内で産生される物質のみならず, 運動は IGF1(Trejo *et al.*, 2008)や VEGF(Sodero *et al.*, 2011)といった末梢由来因子の脳内への取り込みを増加させることで, 新生細胞の増殖・神経分化・生存を高め, AHN を促進する. 成長因子以外にも, 各種神経伝達物質(アセチルコリン(Ho *et al.*, 2009), グルタミン酸(Choi *et al.*, 2011; Vasuta *et al.*, 2007)) やモルフォゲンの一つである Wnt3a(Okamoto *et al.*, 2011), サイトカイン(Vukovic *et al.*, 2012),  $\beta$  エンドルフィン(Koehl *et al.*, 2008)など, 様々な因子が運動による AHN 促進の仲介因子として報告されている. このように, 精力的な検討によって, 運動による AHN の促進が様々な因子により調節されていることが明らかになったものの, これまでの研究では運動処方への橋渡しを行う上で重要な運動条件に即した分子機構の検討が行われていない.

## 5. ストレスと海馬

運動が AHN を促進し、海馬機能を高める一方、生体への慢性的なストレス負荷は、海馬の構造や機能に悪影響を及ぼす。生体が慢性的にストレスに暴露されると、副腎の肥大や胸腺の萎縮が起こる。さらに、副腎皮質からの GC 分泌が過剰になり、高 GC 血漿が引き起こされる。これらの兆候は、汎適応症候群 (GAS, general adaptation syndrome) に陥った個体にみられる典型的な症状であり、1936 年に Selye によって報告された (Selye, 1936)。GC は非常に強力な異化作用を持っており、慢性高濃度化した GC は、血液を介して海馬に作用する (McEwen *et al.*, 1992)。海馬が長期間 GC にさらされると、神経細胞の死滅促進や樹状突起の萎縮 (Sapolsky, 1985; Woolley *et al.*, 1990)、AHN の抑制 (Gould *et al.*, 1992; Mirescu *et al.*, 2006)、そして海馬機能の低下が起る (Conrad, 2010)。なお GC のなかでも、霊長類の場合ではコルチゾール (cortisol)、ラットやマウスではコルチコステロン (CORT, corticosterone) の生理作用が高い。興味深いことに、運動も条件によってはストレスとなる。例えば、長時間の高強度運動への暴露は血漿 GC 濃度を高める (Chennaoui *et al.*, 2002; Coleman *et al.*, 1998)。また、高強度の運動を長期間実施したラットでは、GAS の兆候と AHN の抑制が確認させている (Naylor *et al.*, 2005)。このように、慢性的なストレスは海馬の適応において負の作用を示し、運動も条件次第ではストレスとなることから、海馬に対する運動効果を検討する際には、運動条件に基づく検討が必要である。

## 6. 我々の研究：運動強度と海馬の適応

海馬機能に対する運動効果の検討が運動条件に即して行われていない理

由の一つに、先行研究では回転ホイールが多用されていた点が挙げられる (van Praag *et al.*, 1999a). 回転ホイールは、運動の実施を実験動物の自発性に委ねるため、実験者にかかる時間的負担が少ないものの、運動の強度や時間など、運動効果を左右する重要な要素 (条件) を規定できない。一方、トレッドミル運動は実験動物を強制的に運動させるため、手間はかかるものの目的に応じた運動条件の設定が可能になる。我々は、このトレッドミルを用いて、運動強度に着目し、海馬の可塑性を高める運動強度の探索を行ってきた。運動強度は、LTを境に、LTを超える強度の運動では代表的なストレスホルモンの1つであるACTHの血中濃度が上昇することから (Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007a), LT以上を運動ストレスを伴う高強度運動、LT未満をストレスフリーの低強度と定義している。これまでに、LTを境に異なる強度の運動が海馬の可塑性に与える影響を検討し、一過性および2週間の運動トレーニングモデルで、いずれも低強度運動の有用性を確認している。一過性モデルでは、LT未満の低強度運動であっても海馬の神経活動は十分に活性化されることを明らかにしている (Soya *et al.*, 2007a). トレーニングモデルでは、2週間の低強度運動がAHNを促進する一方、高強度運動ではその効果がないこと、さらに、低強度運動によるAHNの促進が海馬で産生されるアンドロゲン (男性ホルモンの一つ) を介することを報告した (Okamoto *et al.*, 2012). AHNが海馬機能の向上を担う一因と考えられていること、そして新生細胞の成熟には4~6週間の期間が必要であること (3-2. 新生細胞の成熟過程を参照) を踏まえると、海馬機能の向上には、ストレス反応の亢進を伴う高強度 (>LT) ではなく、ストレスフリーの低強度 (<LT) で行う4週間以上の運動トレーニングが有効となる可能性が高い (仮説)。またその背景として、アンドロゲンの関与

が一部想定されるものの、機構の全容解明のためには、これまでに報告されている因子を含めた全因子の網羅的検討が必要である。

## 7. Omics 解析：マイクロアレイ

近年、遺伝子やタンパク質の発現を網羅的に分析し、その情報から調節機構の全容を体系的・系統的に理解しようとする試みが行われている（児玉ら，2005）。この種の解析のことをオミックス（Omics）解析といい、解析法の一つにマイクロアレイが挙げられる（Valor *et al.*, 2012）。マイクロアレイは、一度に複数の遺伝子の発現変化を同定できる手法であり、既に運動による海馬適応の機構解明にも使用されている（Molteni *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2001）。1995年の開発当時は、一度に同定可能な遺伝子数が48個と極めて少なかった（Schena *et al.*, 1995）。しかし、現在では技術革新が進み、一度に数万個にもおよぶ遺伝子発現の検討が可能になった。マイクロアレイは、4種類の塩基（アデニン，グアニン，シトシン，チミン）が互いに相補性のある塩基同士と水素結合するという性質を利用した技術である。水素結合には、温度の上昇で離れ、冷却によって再び相補的配列を持つ別のDNA鎖と再結合するという性質がある。このように、相補的な塩基対と結合し2本鎖を形成することをハイブリダイゼーションという。マイクロアレイのチップ上には塩基配列が明らかになっているオリゴヌクレオチド（20塩基対，またはそれ以下の長さの短いヌクレオチドの配列）やcDNA（mRNAと相補的な塩基配列を持つDNA）といったプローブが数万種類配置されている（Conlon *et al.*, 1991; Schena *et al.*, 1995）。このチップ上に、あらかじめ異なる蛍光色素で標識しておいた2種のmRNAを滴下し、競合的にハイブリダイゼーションさせることで、両者の蛍光強度の差から

各遺伝子の発現の違いを比較することができる(2色法, 図4). 近年では, マイクロアレイで得られた情報を統合的に理解するための技術開発も進んでいる. その一つとして米国インジェヌイティシステムズ社が開発したIPAが挙げられる. IPAの使用により, 過去の論文をベースに, 実験で同定された各遺伝子の機能に基づく分類や遺伝子間のつながり(ネットワーク)の形成が可能になる. また, 単に機能分類やネットワーク形成を行う

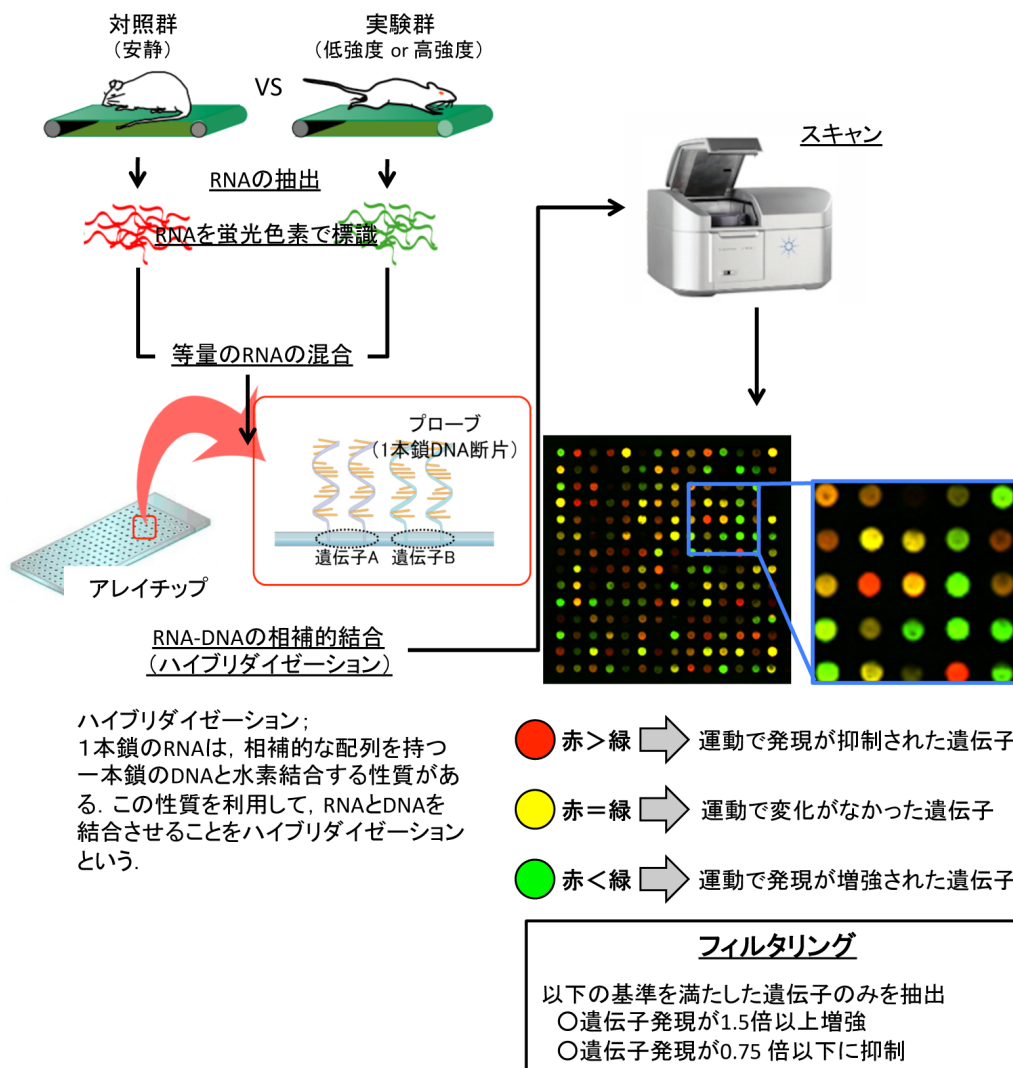


図4 DNA マイクロアレイの原理 (2色法)

マイクロアレイの2色法の原理を示した. 2色法では, 実験群と対照群の mRNA を異なる蛍光色素で標識し, それらを混ぜ合わせて, マイクロアレイチップ上に滴下する. 各群の RNA をチップ上のプローブと競合的に結合 (ハイブリダイゼーション) させ, 両群の蛍光色素の蛍光強度の差異から, 対照群に対し運動群で遺伝子発現が何倍に増強または抑制されたのかを評価する.

だけではなく、その実験ではどのような機能を持った遺伝子ネットワークが最も大きな変動をみせたのか、順位付けを行うこともできる。その実験条件において重要な遺伝子ネットワークが分かり、各遺伝子間の階層性の把握が可能になれば、マイクロアレイで得られたデータをベースにした主要機構や因子の推定が可能になる(Funk *et al.*, 2011)。このように、マイクロアレイと IPA の併用は、遺伝子発現の変化から全因子の動きを包括的にとらえ、重要となる因子や機構のスクリーニングを行う上で大きな力を発揮する。

## 第 III 章 研究目的と課題

### 研究目的

本研究は、6週間のトレーニングモデルを用いて、運動ストレスを伴う高強度 (>LT) 運動ではなく、ストレスフリーの低強度 (<LT) 運動が海馬機能を高めるという仮説を検証し、マイクロアレイおよび IPA を用いた遺伝子発現の網羅的解析によってその分子機構を推定することとした。

### 研究課題

本研究の目的を達成するために以下の2つの研究課題を設定した。

#### 【研究課題1】海馬機能を高める運動強度の解明

##### 研究課題1-1：6週間モデルの確立-ストレスレベルの検討-

運動は AHN を促進する。AHN において、新生細胞が海馬の機能向上を支える機能的な神経細胞に成熟するには4～6週間の期間が必要である。そこで本研究では、LTを基準とした強度設定（低強度；<LT，高強度；>LT）に加え、トレーニング期間が6週間の新たな実験モデルを作成する。本研究課題では、異なる強度で6週間走運動トレーニングを行うことが生体にとってどの程度のストレスとなるかを、トレーニング後のストレス指標（副腎・胸腺湿重量，血漿 CORT 濃度）の変化から検討する。

##### 研究課題1-2：6週間モデルの確立-AHNの確認-

我々は、先行研究において、高強度ではなく、低強度で行う2週間の走運動トレーニングが AHN を促進することを明らかにしている。そこで本研究

課題では、海馬機能の向上を支える重要な現象の一つである AHN について、6 週間モデルでも、2 週間モデルと同様に、低強度運動でのみ AHN が促進されるか否か、前提条件の確認を行う。

### **研究課題 1-3 : 海馬の機能向上に有効な運動強度の解明**

本研究課題では、研究課題 1-1, 1-2 で確立した 6 週間モデルを用いて、6 週間の低強度運動トレーニングが海馬機能を向上させる一方、高強度運動ではその効果が消失するという仮説を検証する。仮説が正しければ、安静群と比較して、低強度群でのみ海馬の空間学習記憶能力を評価する MWM の成績が向上するはずである。

### **【研究課題 2】低強度運動で高まる海馬機能の分子機構の検討**

研究課題 1 と同様の 6 週間の走運動モデルで、海馬遺伝子発現の網羅的解析を行い、高強度との比較から、低強度運動で高まる海馬機能の分子機構を検討する。遺伝子発現の網羅的解析にはマイクロアレイを用いる。各運動条件で同定された遺伝子をさらに IPA で解析することで、低強度運動による AHN 促進に重要と思われる因子や分子機構を推定する。



## 第 IV 章 研究課題 1-1 :

### 6 週間モデルの確立-ストレスレベルの検討-

本研究は、筑波大学動物実験指針に基づき、動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

#### 1. 目的

我々は、2 週間の運動トレーニングモデルを用いて、高強度 (>LT) ではなく、低強度 (<LT) の運動が海馬神経新生を高める上で有効であることを報告している(Okamoto *et al.*, 2012). しかし、海馬で新しく生まれた神経細胞が海馬機能の向上に寄与する成熟神経細胞に成長するまでは 4 ~ 6 週間の期間を要する(Aimone *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2008). そのため、AHN の促進に基づく海馬機能の向上を見込むためには、6 週間程度の期間が必要と考えられる。そこで研究課題 1 では、強度条件 (低強度 : <LT, 高強度 : >LT) に加えて、トレーニング期間が 6 週間の新たな実験モデルを確立し (研究課題 1-1, 1-2), その上で、海馬機能に対する運動効果を検証することとした (研究課題 1-3)。

6 週間モデルの新たな確立に向け、研究課題 1-1 では、本研究の基盤となるストレスレベルの違いを検討する。実験では、異なる強度の 6 週間の走運動トレーニングによるストレス指標 (胸腺および副腎重量, 血漿 CORT 濃度) の変化を検討する。先行研究において、LT 未満の運動がストレスフリーである一方、LT 以上ではストレス反応が惹起され(Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007a), LT 以上の高強度運動を長期に渡って継続すると、慢性的にストレス反応が亢進され、副腎の肥大や胸腺の萎縮, 高 CORT 血漿といった

GAS の症状を示すことが報告されている (Buuck *et al.*, 1971; Kawashima *et al.*, 2004; Naylor *et al.*, 2005; Perhonen *et al.*, 1995). そこで本研究課題では, 6 週間の高強度 (>LT) 運動は慢性的なストレス反応の亢進とそれに伴う GAS を示す一方, 低強度 (<LT) 運動ではこれらの変化がみられないという作業仮説を立て, 検証することとした.

## 2. 方法

### 2-1. 被験動物および飼育条件

実験には 11 週齢 (体重 250~320 g) の Wistar 系雄性ラット (SLC, 日本) を用いた. 飼育環境は, 7:00~19:00 を明期とした明暗サイクルで, 室温  $22 \pm 1$  °C, 湿度  $60 \pm 10\%$  に調節した. 飼料には動物用固形飼料 (MF, オリエンタル酵母, 日本), 飲料水には蒸留水を用い, とともに 24 時間自由摂取させた. 飼育期間中は毎日 18:00 から 1 日 1 回の体重測定とハンドリングを行い, 運動トレーニングは 14:00~21:00 の間に実施した.

### 2-2. 予備飼育およびグルーピング

搬入後, 輸送に伴うストレスを解消し, ラットを飼育環境に慣れさせるために 7 日間の予備飼育を行った. 我々は, この予備飼育によりラットが飼育環境に適応することを確認している (井上ら, 2011). 7 日目の時点で体重が均等になるようにラットを安静 (CONT, control) 群, 低強度 (ME, mild exercise) 群, 高強度 (IE, intense exercise) 群の 3 群 (各群 n=7) に分けた.

### 2-3. 走行学習と走運動トレーニング

走行学習と走運動トレーニングには小動物用トレッドミル (KN-73, 夏目製作所, 日本) を用いた。予備飼育後, ラットに1~2週間の走行学習を含む計6週間の走運動トレーニングを行わせた。1回の運動は60分とし, 週5回の頻度で合計31回行った。詳細なトレーニングメニューは表 S1 に示した。トレッドミル走速度は, ME 群では1週間かけて 15 m/min まで, IE 群では2週間かけて 40 m/min まで徐々に増加させ, その後のトレーニング期間ではこの速度を上限にトレーニングを施行した。

### 2-4. サンプルリング

最後の走運動トレーニングから2日目の朝に, ラットを断頭により屠殺した。断頭後, 即座に体幹血の採取と副腎・胸腺の摘出を行った。血液には凝固を防ぐために少量のエチレンジアミン四酢酸ナトリウム (EDTA・2Na) を添加し, 遠心分離 (3000 rpm×10 min) を行い血漿成分のみを分離した。血漿はホルモンの測定まで-30°Cで冷凍保存した。副腎と胸腺は開腹および開胸の後, ピンセットで摘出し, 上皿電子天秤 (HM-200, エー・アンド・デイ, 日本) を用いて湿重量を測定した。また, トレーニングの指標となる骨格筋クエン酸合成酵素 (CS 活性, citrate synthase activity) を測定するために, 後肢からヒラメ筋を摘出し, 液体窒素で瞬間凍結させ, CS 活性の測定まで-80°Cで保存した。

### 2-5. クエン酸合成酵素 (CS, citrate synthase) 活性の測定

CS 活性は, Srere (1969) の方法 (Srere, 1969) に基づき, 以下の手順で測定した。

1) 筋のホモジナイズ

- A) 摘出した筋を試験管内に入れ、そこに筋重量の 19 倍量のホモジナイズバッファーを (175 mM KCL, 2.0 mM EDTA, pH 7.4) 加えた.
- B) 湿潤した筋サンプルを氷冷しながら、ポリトロンホモイナイザー (PT2000, Kinematica, Sitzerland) で粉碎し、ミトコンドリア膜を破壊した.
- C) ホモジナイズ後、1.5 ml チューブへ分注し、液体窒素で瞬間凍結させ、その後の測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した.
- D) より厳密にミトコンドリア膜の破壊を行う為に液体窒素による凍結と氷冷下での解凍 (15~20 分) を 3 度繰り返した.

2) 酵素活性の測定

- A) 筋サンプルを氷冷しながら解凍した.
- B) 解凍している間に 1.5 ml チューブに 0.1 ml 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, 0.6 ml Tris buffer, 0.1 ml acetyl-CoA を加え、反応液 A を作成した.
- C) 新しい 1.5 ml チューブに筋サンプルを移し、20ml の 100 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) を加えた (ホモジネイト溶液).
- D) 100 ml のホモジネイト溶液を反応液 A へ加えた.
- E) 転倒混和し、 $30^{\circ}\text{C}$ で 3 分間インキュベートした.
- F) 3 分後、溶液を分光高度計 (UV-1200, 島津製作所, 日本) のセルに入れ 450 nm のフィルターで吸光度を測定した. 測定は 30 秒間隔で 5 回行った.
- G) 測定後、セルにオキサロ酢酸を 0.1 ml ずつ加え、酵素活性を再測定した (30 秒間隔 $\times$ 7 回).

### 3) タンパク質濃度測定

酵素活性をタンパク質濃度で補正する為に、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質とする BCA キット (Pierce Biotechnology Inc, USA) で筋タンパク質濃度の測定を行った。手順は以下の通りである。

- A) ホモジナイズした筋サンプルを純水で 50 倍に希釈した。
- B) BCA キットの A 液と B 液を 50:1 の割合で混和し、1.5 ml のチューブに 0.95 ml ずつ分注した。
- C) B の混合液に A を 50 ml ずつ加えた。
- D) アルブミンスタンダード液を純水で 6 種類のタンパク質濃度 (0, 25, 50, 100, 200, 400 ml/ml) に希釈し、BCA 試薬と各濃度のアルブミンスタンダード溶液を 50:1 の割合で混和した。
- E) スタンダードを含む全てのサンプルを 60°C で 30 分間インキュベートし、その後、室温で 10 分間放置した。
- F) 562 nm のフィルターに設定した分光光度計を用いてスタンダードとサンプルの吸光度を測定した。
- G) スタンダードサンプルで得られた吸光度を基に検量線を作成し、この検量線を基に各サンプルのタンパク質濃度を求めた。

### 2-6. 血漿コルチコステロン (CORT, corticosterone) の測定

血漿 CORT 濃度の測定には、放射性免疫測定法 (radio immunoassay; RIA) の一つである Dextran-coated charcoal 法を用いた。この方法は、抗体と結合した抗原はチャコール (dextran-coated charcoal) に吸着されず、結合していないものは吸着されるという原理に基づいている。標識ホルモンには [<sup>3</sup>H]-コルチコステロン (NET399, PerkinElmer, USA)、抗体には

抗コルチコステロン抗体（FKA-420，コスモバイオ，日本）を用いた．手順は以下の通りである．

- A) 血漿サンプル 20  $\mu$ l をエタノールと混ぜ，タンパク質を分解した．
- B) 遠心分離機（800 g $\times$ 10 min, 4  $^{\circ}$ C）にかけ，固体成分（結合型）と液体成分（遊離型）を分離させた．
- C) 液体成分である上澄み液を 100  $\mu$ l 取り出し，エタノールが完全に蒸発するまで乾燥させた．
- D) C に緩衝液（0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 % Gelatin, 0.2 % Sodium Azide, pH = 7.4）を 500  $\mu$ l 加えた．
- E) D に 200 倍に希釈した抗コルチコステロン抗体 100  $\mu$ l を加えた．
- F) E に緩衝液で希釈した [<sup>3</sup>H]-コルチコステロンを 100  $\mu$ l 加えた．
- G) 37  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした後，さらに 4  $^{\circ}$ C で約 16 時間インキュベートした．
- H) 16 時間後，チャコール溶液（charcoal suspension solution: 0.025 % Dextran T70, 0.25 % charcoal）を 500  $\mu$ l 加えた．
- I) 遠心分離（1,500 g $\times$ 15 min, 4  $^{\circ}$ C）によって分離された上清 600  $\mu$ l を液体シンチレーション用溶媒（ACS II, Amersham, UK）4 ml をバイアル内で混和した．

液体シンチレーションカウンター（LS6000, Beckman, USA）で比放射活性を測定した．最終検出濃度は，スタンダードカーブを基に算出し，1 サンプルあたり 2 回の平均値で示した．

## 2 - 7 . 統計処理

データはすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示した．統計処理は，SPSS 統計パッ

ケージ (SPSS Inc., Chicago) を用いて, 一元配置分散分析の後, *post-hoc* テスト (Fisher's PLSD) を行った. 有意水準は 5% とした.

### 3. 結果

#### 3-1. ヒラメ筋 CS 活性

図 5 A に, 各群のタンパク質あたりのヒラメ筋 CS 活性の変化を示した. ヒラメ筋 CS 活性は, CONT 群と比較して, 両運動群で有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ ). 一方, 各運動群の間に統計的な有意差は確認されなかった.

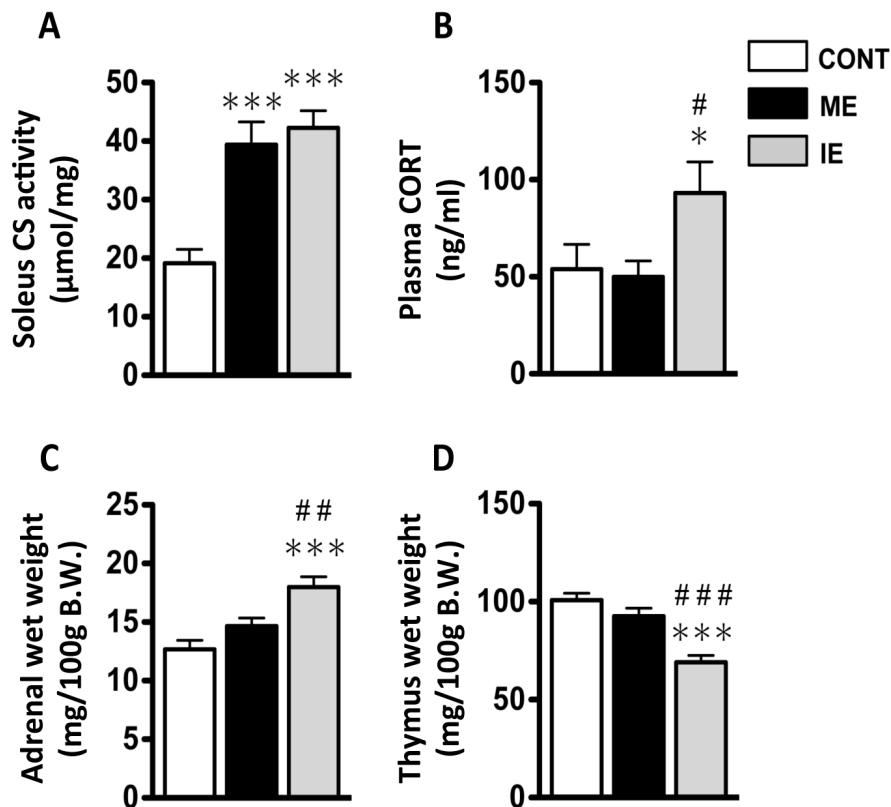


図 5 異なる強度の走運動トレーニングによる筋 CS 活性とストレス指標の変化

Effects of ME or IE on (A) markers of mitochondrial mass (soleus CS activity) and stress related parameters, such as (B) plasma corticosterone, (C) adrenal wet weight and (D) thymus wet weight. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=7$ ). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  compared to sedentary control (CONT) rats. #,  $P < 0.05$ ; ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.001$  compared to ME rats. Data were analyzed using a one-way ANOVA, followed by Fisher's PLSD comparisons *post-hoc* test.

### 3 - 2 . 血漿 CORT 濃度

各群の安静時血漿 CORT 濃度の変化を図 5 B に示した。その結果, CONT 群と ME 群と比較して, IE 群で血漿 CORT 濃度の有意な上昇が確認された ( $p<0.05$ )。一方, CONT 群と ME 群の間に統計的有意差は認められなかった。

### 3 - 3 . 副腎および胸腺湿重量

各群の副腎および胸腺湿重量の変化を図 5 C, D に示した。CONT 群および ME 群と比較して, IE 群では副腎湿重量の有意な増加と胸腺湿重量の有意な減少が確認された ( $p<0.05$ )。なお, 血漿 CORT 濃度と同様に, 両値ともに CONT 群と ME 群の間に統計的な有意差は認められなかった。

## 4 . 考察

研究課題 1-1 では, 6 週間モデルの確立に向けた第一段階として, 異なる強度の走運動トレーニングがストレス反応に与える影響を検討した。運動強度は, LT(約 20 m/min)を基準に, 低強度運動 (ME; <LT)を 15 m/min, 高強度運動 (IE; >LT)を 40 m/min に設定した。ストレス反応への影響は, 血漿 CORT 濃度, および副腎・胸腺湿重量の変化から検討した。両運動群においてトレーニングが適切に行われた否かは, トレーニングの指標となるヒラメ筋 CS 活性から評価した。なお先行研究を基に, 本研究課題では, “IE でのみ慢性的にストレス反応が亢進され, GAS 症状 (副腎の肥大, 胸腺の萎縮, 高 CORT 血漿) が現れる” という仮説を立てた。

本研究の IE で設定した 40 m/min の走速度は, 先行研究 (Okamoto *et al.*, 2012; Soya *et al.*, 2007b) の IE で設定した 25-28 m/min よりも速く, 強度



が高い。40 m/min に設定した理由の一つに、6 週間の長期トレーニングによる LT の上昇、すなわち持久的運動能力の向上があげられる。Carvalho ら (2005) は、ラットを LT 強度以上で 4 週間トレーニングさせると、LT の出現ポイントが高強度側に移行し、24 m/min 付近まで高められることを報告している (Carvalho *et al.*, 2005)。我々は、LT (20 m/min) 未満の運動ではストレス反応が亢進されない一方、LT 以上の運動では運動の実施自体が生体にとってストレスになることを報告している (Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007a) が、Carvalho ら (2005) の研究を踏まえると、IE の走速度を 25-28 m/min に設定した場合、6 週間のトレーニング終盤では強度が LT 以下になる可能性がある。そこで本研究では、IE の走速度を 40 m/min に設定し、たとえ持久力が向上したとしても、6 週間のトレーニング期間を通じて慢性的に運動ストレスが負荷し続けられるモデルづくりを行った。

本研究の結果、ヒラメ筋 CS 活性は運動強度に関係なく、両運動群で CONT 群と比較して高地を示すことが明らかになった (図 5 A)。CS 活性は、ミトコンドリア含量の変化を間接的に反映する指標であり、持久的運動トレーニングが筋 CS 活性を高めることから、トレーニングの指標としても用いられている (Spina *et al.*, 1996)。このことから、ME 群と IE 群の両運動群におけるヒラメ筋 CS 活性の上昇は、両運動群のラットが適切にトレーニングされたことを示している。

続いて、ストレス関連の指標を検討したところ、IE 群では安静時の高 CORT 血漿、副腎の肥大、胸腺の萎縮がみられる一方 (図 5 B-D)、ME 群ではこれらの変化は認められなかった。IE でみられた変化は、長期にわたるストレス (Sutanto *et al.*, 1994) または高強度運動ストレス (Kawashima *et al.*, 2004) への暴露によって生じる変化と一致し、GAS と呼ばれる症状に

陥った個体にみられる典型的なストレス兆候である(Selye, 1936). したがって, 本研究課題で得られた結果は, 6週間の高強度 (>LT) 運動が慢性的なストレス反応の亢進を引き起こす一方で, 低強度 (<LT) 運動はストレスフリーであることを示しており, 仮説と一致する. 以上のことから, 本研究で新たに確立した6週間の走運動トレーニングモデルが LT を境にストレスレベルの異なる実験モデルとなることが確認された.

## 5. 小括

異なる強度の6週間の走運動トレーニングがラットのトレーニング指標(ヒラメ筋 CS 活性) およびストレス指標(血漿 CORT 濃度, 副腎・胸腺湿重量) に与える影響を検討したところ, 以下の知見を得た.

- 1) CS 活性は運動強度に関係なく運動トレーニングで有意に向上した.
- 2) IE 群では安静時の高 CORT 血漿, 副腎の肥大, 胸腺の萎縮といった典型的なストレス兆候が確認された. 一方, ME 群ではこれらの兆候は認められなかった.

以上の結果から, 今回新たに作成した6週間モデルは LT を境にストレスレベルが異なる実験モデルであることが明らかになった.

## 第 V 章 研究課題 1 - 2 :

### 6 週間モデルの確立-AHN の確認-

#### 1. 目的

研究課題 1-1 により, 今回新たに作成した 6 週間モデルがストレスレベルの異なる実験モデルであることが明らかになった. 続いて本研究課題では, 海馬機能に対する運動効果を検証する上で, その前提条件となる AHN の確認を行う.

海馬の DG では, 一生涯を通じて新しい神経細胞が産生される. この現象を AHN といい, AHN は海馬の機能向上への貢献が想定されている (Aimone *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2008). 前述のとおり, 我々は, 2 週間の低強度 (<LT) 運動トレーニングが AHN を促進する一方, 高強度 (>LT) 運動では AHN に変化がみられないことを報告している (Okamoto *et al.*, 2012). しかし, 2 週間モデルで得られた結果がトレーニング期間の異なる 6 週間モデルでも同様かどうかは確認の必要がある. なぜなら, 長期間のトレーニングを行った場合にはトレーニング適応を考慮しなければならないからである. ラットを高強度 (>LT) 運動で長期間トレーニングした場合, トレーニング初期ではストレス反応の亢進が著しいものの, 徐々にその運動強度に順化し, トレーニング終盤ではストレス適応が起こることがわかっている (Buuck *et al.*, 1971). ストレス適応が起れば, AHN 抑制因子の一つである CORT (Mirescu *et al.*, 2006) の慢性的な分泌亢進がおさまりに, 高強度運動でも AHN が促進される可能性がある. しかしながら, 本研究の 6 週間モデルでは, 高強度運動が安静時 CORT 濃度を有意に上昇させること, すなわち, 高強度運動に対するストレス適応が未だ完了していないことを

研究課題 1-1 で明らかにしている。

そこで本研究課題では，“6 週間モデルでも 2 週間モデルと同様に，低強度 (<LT) 運動では AHN が促進される一方，高強度 (>LT) 運動ではその効果がみられない”という仮説を立てた。6 週間のトレーニング期間は，AHN において，新生細胞が海馬機能の向上を支える機能的な神経細胞に成熟するのに要する 4～6 週間の期間と一致する(Duan *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008)。したがって，本仮説は AHN を増殖細胞数の変化からだけではなく，新生細胞のうち，トレーニング後も生存した細胞（生存細胞）とその生存細胞のうち神経細胞に分化成熟した細胞（新成熟神経細胞）の数の変化から検証することとした。

## 2. 方法

### 2-1. 被験動物および飼育条件

研究課題 1-1 と同様の被験動物および飼育条件で実験を行った。

### 2-2. 予備飼育およびグルーピング

7 日間の予備飼育の後，ラットを体重が均等になるように CONT 群，ME 群，IE 群の 3 群（各群 n=7）に分けた。

### 2-3. 走行学習と走運動トレーニング

走行学習と走運動トレーニングは研究課題 1-1 に準ずる。新生細胞の標識を行うために，走行学習初期の 3 日間に BrdU（5-bromo-2'-deoxyuridine, Nacalai Tesque, 日本）を腹腔内投与した。投与は運動の 1 時間前に 1 日 1 回だけ行い，投与量は 100 mg/kg BW とした。

## 2 - 4 . 脳組織切片の作成

免疫組織化学染色法を用いて脳切片上の BrdU 陽性 DNA や組織細胞内のタンパク質を標識し可視化するためには、標識する DNA やタンパク質の構造を保持し、抗原性を維持するための固定処理が必要である。固定法には、組織を直接固定液に漬ける浸漬固定法と生体灌流法の 2 種類が存在する。一般に脳のような巨大組織では固定液が浸潤しにくく、浸漬固定では固定があまくなるため、灌流固定が用いられる。したがって、本研究では生体灌流固定法を用いた。

生体灌流法では、まずラットにペントバルビタール麻酔（ソムノペンチル注射液，共立製薬株式会社，日本）を施し，深麻酔下で胸部を切開した。露出させた心臓の左心房から注射針を刺し，大動脈に管を挿入した。血液凝固を抑えるためにその管から抗血液凝固剤であるヘパリン 50  $\mu$ l（ノボ・ヘパリン注 1000，持田製薬，日本）を注入し，続いて 0.9%濃度の生理食塩水を灌流した。灌流にはペリスタポンプ（PST-350，旭テクノグラス，日本）を利用し，十分に血液成分を取り除いた。その後，氷冷した固定液（4% paraformaldehyde, PFA）100  $\mu$ l を灌流し，脳を摘出した。取り出した脳は固定液に 24 時間浸漬し，後固定をおこなった。凍結切片作成の際，組織中に水分が残留している場合には氷晶が生じ，切片を傷つける恐れがある。そこで，後固定後，脳は 24 時間以上 20%スクロース水に浸され，完全に脱水された。脱水はスクロース溶液内で脳が完全に底に沈むまで行った。脱水後，脳はドライアイスで凍結し， $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

凍結組織切片作成装置（クリオスタット，HM505E, Microm, Germany）を用い， $-80^{\circ}\text{C}$ で保存された脳組織から厚さ 50  $\mu\text{m}$  の前額断切片を作成し

た．海馬 DG の吻側から鼻側にかけての 500  $\mu\text{m}$  間隔の連続切片（ラット 1 個体あたり 10～12 枚）を免疫組織化学染色法により染色し，新生細胞および成熟した新生細胞（新生成熟神経細胞）を同定した．その後，切片をスライドガラスに並べ，封入剤で保存した．

## 2 - 5 . 海馬歯状回 (DG, dentate gyrus) 体積の算出

海馬 DG 体積の算出には，吻側から鼻側にかけての連続切片の内，10 枚に 1 枚の合計 10～12 枚の切片を用いた．DG は Nissl 染色により同定し，光学顕微鏡 (BZ-8000, Keyence, 日本) を用いて画像の取り込みを行った．取得した画像から，画像解析ソフト Image J を用いて DG (SGZ+GCL) の面積 ( $\text{mm}^2$ ) を測定し，Cavalieri's estimation method (Pakkenberg *et al.*, 1988) を基に，面積と切片の厚さの積から総 DG 体積を算出した (図 6) ．

Nissl 染色の手順を以下に示した．

- A) 神経細胞核の染色 : Toruidinblue トルインジンブルー溶液に 15 分間反応させた．
- B) 純粋で 10～15 秒間すすいだ．
- C) 70% エタノール水溶液に 2 分間反応させた．
- D) 96% エタノール水溶液に 2 分間反応させた．
- E) 100% エタノール水溶液に 2 分間反応させた．
- F) 100% エタノール水溶液に 2 分間反応させた．
- G) 脱水 : 100% キシレン溶液に 2 分間反応させた．
- H) 脱水 : 100% キシレン溶液に 2 分間反応させた．
- I) 封入 : 非水溶性封入剤 (マウントクイック, 大道産業株式会社, 日本) を用いて，切片を封入した．

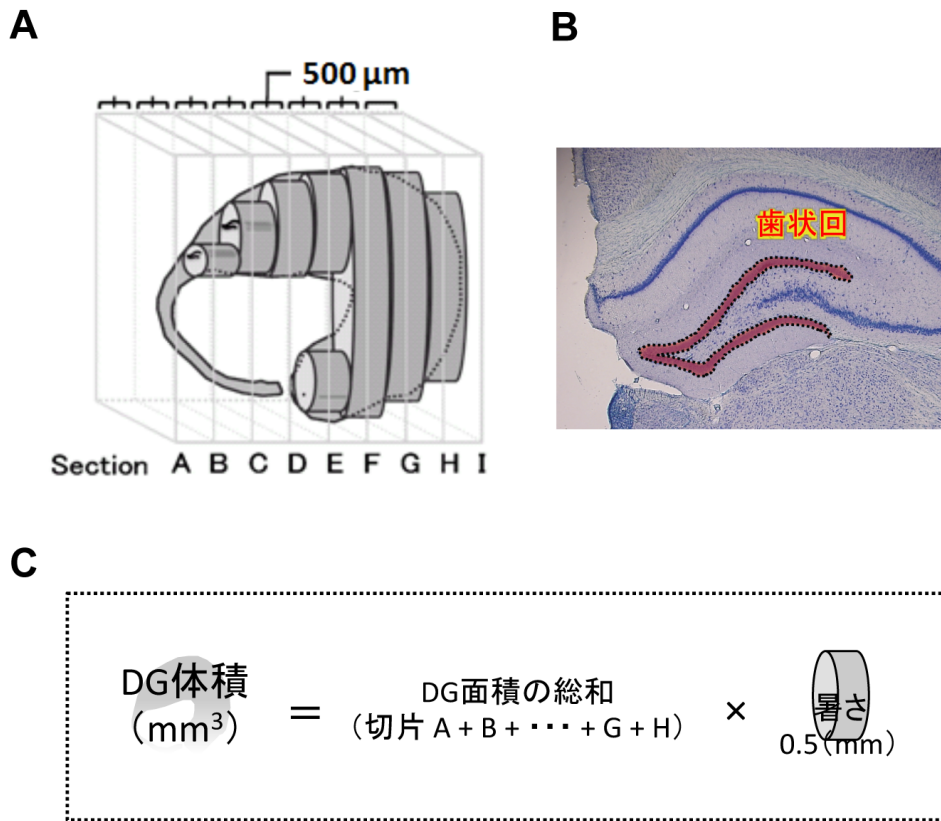


図6 海馬 DG 体積の算出方法

- A. 海馬前額断切片の作成：1枚当たり 50  $\mu\text{m}$  で海馬前額断切片を作成し、そのなかから 10 枚に 1 枚ずつ取り出し (10~12 枚/個体)、Nissl 染色を行った。
- B. Nissl 染色と表面積の算出：海馬歯状回 (dentate gyrus) を Nissl 染色で染め、染色された領域は Image J で撮影し、表面積を算出した。
- C. 海馬 DG 体積の算出：DG 表面積の総和と切片の厚さ (50  $\mu\text{m}$ ) の積によって、海馬 DG の総体積を算出した (Cavalieri's estimation method)。

## 2-6. 新生細胞およびその成熟段階の評価

本研究では、免疫組織化学染色法により神経新生の評価を行った。免疫組織化学染色法とは抗原抗体反応を利用して組織上で目的とする DNA やタンパク質を標識し、可視化する方法である。可視化には、抗原に結合する抗体にマーカーとなる酵素や蛍光物質などを標識し、そのマーカーと反応させることで抗体付着部を発色させるという方法がとられる。本実験では、生存細胞および新生成熟神経細胞の評価に蛍光抗体法を用い、増殖細胞の評価には酵素抗体法を用いた。

## 蛍光抗体法

本実験では、生存細胞を BrdU で評価した。BrdU の同定には、一次抗体としてラット抗 BrdU 抗体 (Rat anti-BrdU, AbD Serotec, USA), 二次抗体に Cy3 接合ロバ抗ラット IgG 抗体 (Cy3 Donkey Anti-Rat IgG, Jackson Immuno Research, USA) を用い、赤色に蛍光標識させて可視化した。また成熟神経細胞の同定には、一次抗体にマウス抗 NeuN 抗体 (Mouse Anti-Neuronal Nuclei monoclonal antibody, Chemicon, Germany) を用い、二次抗体 AMCA (青白色) または Alexa Fluor 488 (緑色) 接合ロバ抗マウス IgG 抗体 (AMCA or Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Mouse IgG) で蛍光標識し、可視化した。これにより、生存 (BrdU<sup>+</sup>) 細胞を赤色、新生成熟 (BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>) 細胞を赤色 + 青白色 or 緑色で同定した。

蛍光抗体法の手順を以下に示した。

### 1) 一次抗体反応

A) PB (0.1 M phosphate buffer) で洗浄した。5 分間×2 回

B) PB-T (1 % Triton-X and 1 % BSA in 0.1 M phosphate buffer) で洗浄した。5 分間×3 回

C) DNA 二重鎖の切断: 2 M HCl に 45°C で 30 分間反応させた。

D) PB-T で洗浄した。10 分間×3 回

E) 非特異的結合の除去 (ブロッキング): 2 % NDS/PB-T (2 % normal donkey serum in PB-T) に室温で 30 分間反応させた。

F) 一次抗体を 2 % NDS/PB-T で希釈し (希釈倍率; 抗 BrdU 抗体: 500 倍, 抗 NeuN 抗体: 500 倍), 2 時間の室温でのインキュベート後, 4 °C で 48 時間反応させた。

### 2) 二次抗体反応と視覚化



- A) PB-T で洗浄した． 10 分間×3 回
- B) 蛍光標識された二次抗体を 2 % NDS/PB-T で希釈し（希釈倍率；  
Cy3 : 500 倍， AMCA : 500 倍）， 4 °C で 24 時間反応させた． なお，  
反応中は遮光した．
- C) PB-T で洗浄した． 10 分間×2 回
- D) PB で洗浄した． 5 分間×2 回
- E) スライドガラスに貼り付け， 封入した．

#### 酵素抗体法（ABC 法）

本実験では，増殖細胞の評価に Ki-67 の抗体を使用した．核タンパク質である Ki-67 は細胞休止期を除くすべての細胞周期で発現する内因性の細胞増殖マーカーとして用いられる．なお，可視化には免疫組織化学染色のなかでも感度がよいとされるアビジン・ビオチン複合体（Avidin biotin complex, ABC）法を用いた．ABC 法は糖タンパクであるアビジンがビオチンと強力に結合する特性を利用したもので，ビオチンにマーカーとなる酵素を標識し，アビジンにその標識ビオチンを多数結合させることで酵素のシグナルを増強させる方法である．本実験では，グルコースオキシダーゼ（glucose oxidase）を標識酵素として用いて，ジアミノベンチジン（DAB, diaminobenzidine）と過酸化水素を基質として DAB を赤茶色に発色させた．Ki-67 の同定には，一次抗体としてウサギ抗 Ki-67 抗体（Rabbit anti-Ki-67, Abcam）を用い，Vectastatin ABC キット（Vector Laboratories, USA）で可視化した．以下に染色の手順を示す．

#### 1) 一次抗体反応

- A) PB (0.1 M phosphate buffer) で洗浄した． 5 分間×2 回

B) PB-T ( 1 % Triton-X in 0.1 M phosphate buffer) で洗淨した. 5 分間  
× 3 回

C) 内因性ペルオキシダーゼの除去 : 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MetOH に 30 分間反応  
させた.

D) PB-T で洗淨した. 5 分間× 3 回

E) 非特異的結合の除去 (ブロッキング) : 2 % normal goat serum (NGS)  
で 30 分間反応させた.

F) 一次抗体を希釈し, 4 °C で 24 時間反応させた. 抗 Ki67 抗体は 2 % NGS  
で 1000 倍に希釈した.

## 2) ABC 法による視覚化

A) PB-T で洗淨した. 5 分間× 3 回

B) ビオチン化二次抗体 ( 3 -drops NGS and 1 -drop biotinylated  
antibody in 10 ml PB-T) に 90 分間反応させた.

C) PB-T で洗淨した. 5 分間× 3 回

D) ABC 液に 90 分間反応させた.

E) PB-T で洗淨した. 5 分間× 2 回

F) 0.1 M acetate buffer に 5 分間反応させた.

G) DAB 液を作成した.

- ・ milliQ 25 ml に DAB 12.5 mg を溶解させた.

- ・ milliQ 25 ml に glucose 200 mg, ammonium chloride 40 mg を溶  
解し, DAB 溶解液に加えた.

- ・ DAB 溶解液に glucose oxidase を 5 µl 加えた.

H) DAB 液に 8 ~ 15 分間反応させた.

I) 0.1 M acetate buffer に 5 分間反応させた.

J) PB-T で洗淨した． 5 分間×2 回

K) PB で洗淨した． 10 分間×2 回

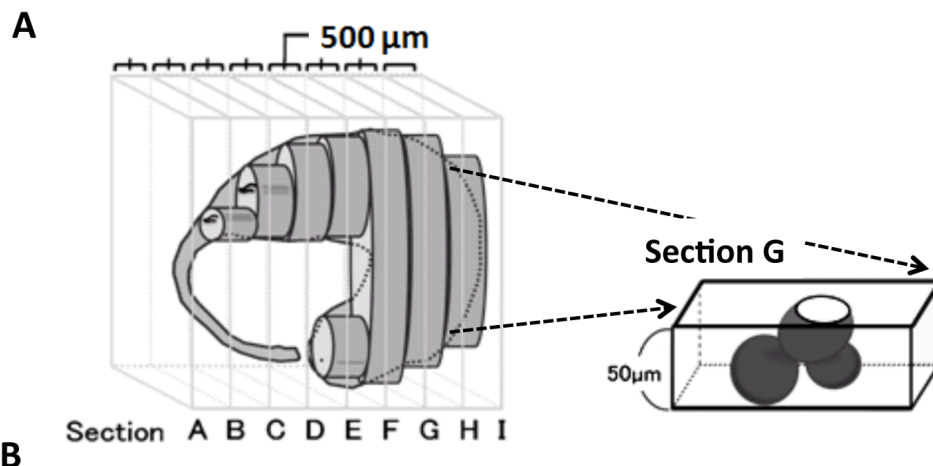
L) スライドガラスに貼り付け乾燥させた．

### 3) Nissl 染色との二重染色

海馬 DG を同定するために Nissl 染色を施した（手順は 2-5．海馬歯状回体積の算出を参照）．

## 2-7. 細胞数の推定方法

本研究では，6 週間のトレーニング後も生存した新生細胞（生存細胞）を BrdU で同定し，BrdU に染まった細胞のうち神経細胞のマーカである NeuN にも染まった細胞を新生成熟神経細胞として同定した．また，増殖細胞は内因性のマーカである Ki-67 を用いて同定した．これら細胞数の計測には，Llorens-Martin ら（2006）の方法(Llorens-Martin *et al.*, 2006) を応用した．細胞数のカウントは，光学顕微鏡（DMRB, Laica, Germany）を用いて，400 倍で行い，焦点深度を 50  $\mu\text{m}$  ずつ変化させながらおこなった．海馬 DG の吻側から尾側にかけての 500  $\mu\text{m}$  間隔の連続切片（ラット 1 個体あたり 10~12 枚）を用いて，海馬 DG 顆粒細胞下帯（SGZ）と顆粒細胞層（GCL）内の新生細胞（BrdU<sup>+</sup>）数を測定した．さらに，RGB フィルターを用いて DG 内の新生成熟細胞（BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>）を測定した．また，細胞増殖能（Ki-67 陽性細胞）は明視野で測定した．海馬 DG における各新生細胞の総数は，各切片から算出した平均陽性細胞密度（体積に占める細胞数）と海馬 DG 総体積の積から推定した．測定法および細胞数の推定法の詳細を図 7 に示した．



### DGの細胞総数

各切片から算出した平均陽性細胞数密度×(体積あたりの細胞数)×海馬総体積

#### ・平均陽性細胞密度の算出

切片 各切片の陽性細胞数(個) ÷ 各切片の体積(mm<sup>3</sup>) = 平均陽性細胞密度(個/mm<sup>3</sup>)

A	:	A'(個)	/	A''(mm <sup>3</sup> )	=	A(個/mm <sup>3</sup> )
B	:	B'(個)	/	B''(mm <sup>3</sup> )	=	B(個/mm <sup>3</sup> )
C	:	C'(個)	/	C''(mm <sup>3</sup> )	=	C(個/mm <sup>3</sup> )
H	:	H'(個)	/	H''(mm <sup>3</sup> )	=	H(個/mm <sup>3</sup> )

平均陽性細胞密度を算出

図7 陽性細胞の総数の推定方法

- 神経細胞のカウント：各抗体で染色された細胞は、切片の厚さを考慮し、随時ピンツトを変えながらカウントした。
- 陽性細胞数の推定：各切片当りに含まれる陽性細胞数の密度を算出し、その値と海馬体積の積から、総陽性細胞数を算出した。

## 2-8. 統計処理

データはすべて平均値±標準誤差で示した。すべての結果について、一元配置の分散分析で統計解析を行った。統計処理には、SPSS 統計パッケージ (SPSS Inc., Chicago) を用い、*Fisher's PLSD* を *post-hoc* テストで使用した。有意水準は5%とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 海馬 DG 体積

6週間のトレッドミル走運動トレーニングによる海馬 DG 体積の変化を **図 8 B** に示した。海馬 DG 体積は CONT 群と比較して、ME 群および IE 群の両方で有意な増加が確認された。ME 群と IE 群の間には有意差は認められなかった。

#### 3-2. 新生細胞数の変化

神経新生の内、Ki-67 および BrdU 陽性細胞数、BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>細胞数の結果を **図 8 A, C-E** に示した。

##### 1) Ki-67 陽性細胞数 (**図 8 A, C**)

Ki-67 陽性細胞数は、CONT 群と比較して ME 群および IE 群の両運動群で有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。一方、ME 群と IE 群との間に統計的な有意差は認められなかった。

##### 2) BrdU 陽性細胞数 (**図 8 A, D**)

BrdU 陽性細胞数は CONT 群に比べ ME 群では有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。一方、IE 群と CONT 群および ME 群の間に統計的な有意差は認められなかった。

##### 3) BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>細胞数 (**図 8 A, E**)

BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>細胞数は、BrdU<sup>+</sup>陽性細胞数と同様の変化を示し、CONT 群と比較して ME 群では有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。一方、IE 群とその他の群 (CONT 群, ME 群) との間には統計的な有意差は認められなかった。

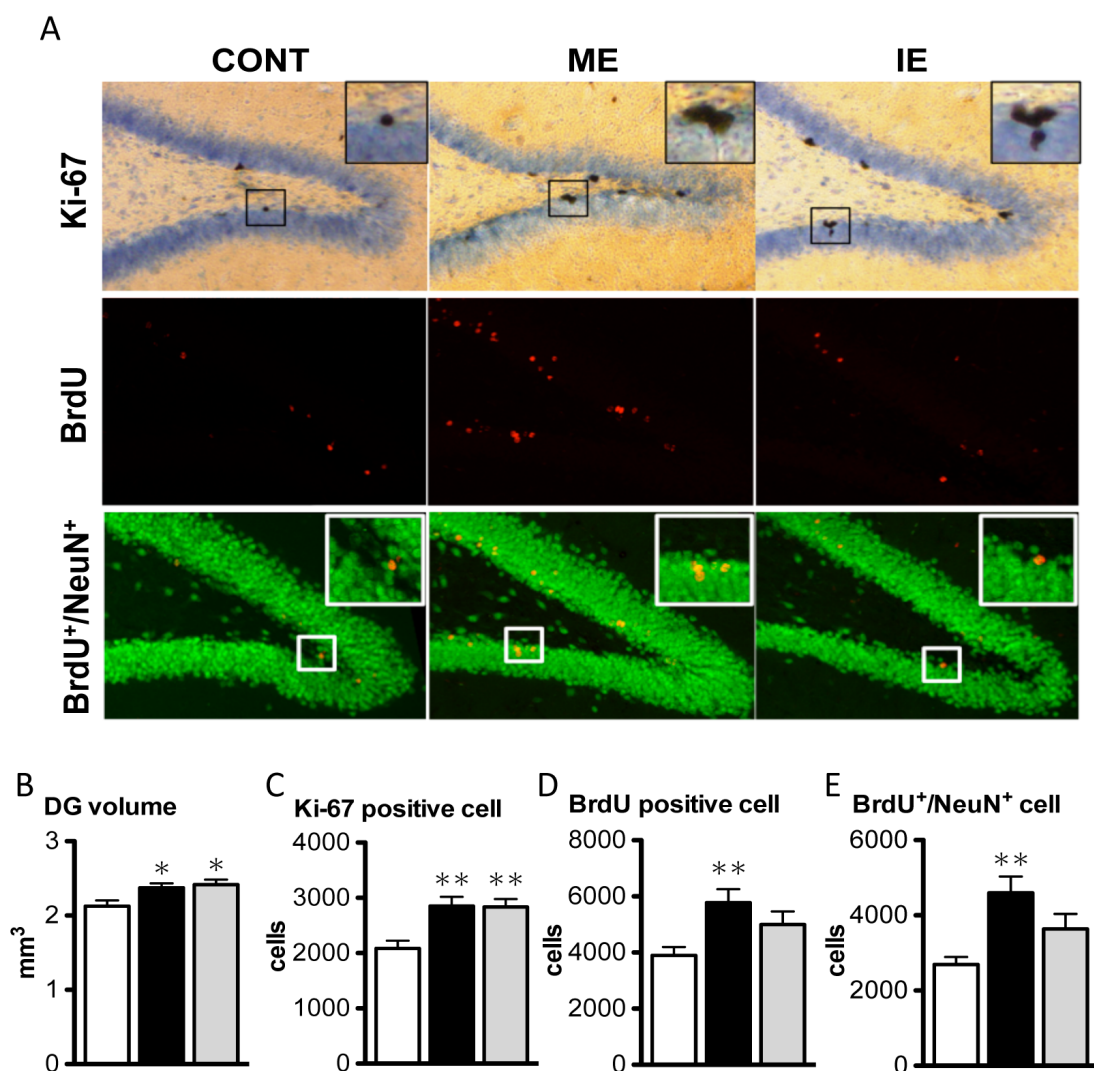


図 8 異なる強度の走運動トレーニングによる DG 体積と AHN の変化

Representative photograph of the dentate gyrus (DG) from each group single-stained for Ki-67 (brown), or double-stained for BrdU (red) and NeuN (green) (A). Effects of mild exercise (ME) or intense exercise (IE) on hippocampal DG volume (B), the number of Ki-67<sup>+</sup> cells (marker of neuronal progenitor proliferation) (C), BrdU positive cells (marker of cell survival) (D) and BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> cells (marker of newly generate matured neurons) (E). Values are expressed as mean  $\pm$  SE (n=7). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  compared to sedentary control (CONT) rats. Data were analyzed using a one-way ANOVA, followed by Fisher's PLSD comparison *post-hoc* tests.

#### 4. 考察

本研究課題では、海馬機能に対する低強度運動の効果を検証するための前提条件として、6週間モデルにおけるAHNの確認を行った。仮説は、先

行研究の2週間モデルと同様に、6週間モデルでも、高強度 (>LT) ではなく、低強度 (<LT) の走運動トレーニングが AHN を向上するとした。AHN は Ki-67<sup>+</sup> (増殖) 細胞, BrdU<sup>+</sup> (生存) 細胞, BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> (新生成熟神経) 細胞の数の変化から評価した。

本研究の結果、海馬 DG 体積と増殖 (Ki-67<sup>+</sup>) 細胞数は強度に関係なく、運動で有意な増加が認められた (図 8 A-C)。これにより、海馬 DG の肥大や新しい細胞の産生は強度の違いに関係なく、運動で促進されることが明らかとなった。しかし、DG において Ki-67 で同定された細胞は未成熟であり、未だ神経細胞としての機能を持たない。また、たとえ多くの細胞が新生されたとしても、その後の生存の段階ではその大部分が死滅してしまうため (Kempermann *et al.*, 2006)、海馬機能との関連を考慮した場合、細胞増殖の評価だけでは不十分である (Ehninger *et al.*, 2008; Jessberger *et al.*, 2003)。そこで、本研究では新生細胞のマーカーである BrdU をトレーニング初期に投与することで、新生した細胞のうち、トレーニング後も生存していた細胞 (BrdU<sup>+</sup>細胞) を全てカウントし、さらにそのなかで機能的な細胞まで成熟した細胞 (BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>細胞) がどの程度存在するかを評価した。

その結果、CONT 群と比較して、ME 群でのみ生存細胞 (BrdU<sup>+</sup>) と新生成熟神経細胞 (BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>) の数が有意に増加することを確認した (図 8 A, D-E)。増殖 (Ki-67<sup>+</sup>) 細胞数は、強度に関係なく両運動群で同等の増加が認められたことから (図 8 A, C)、IE では、増殖した細胞のうち、神経へと分化する細胞の割合が減少したか、増殖した細胞の多くがその後の生存の段階で死滅した可能性がある。対照的に、ME では増殖後も高い割合で生存が維持され、生存した細胞が6週間かけて成熟神経細胞へと成長

することで新生成熟神経細胞数が増加したと考えられる。これらの結果は、2週間の異なる強度の運動トレーニングが AHN に与える影響を検討した研究(Okamoto *et al.*, 2012)の結果と一致し、AHN の促進には、ME でも十分であるという知見を支持する。さらに、成熟神経細胞が海馬機能の向上に関わること(Aimone *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2008)を踏まえると、本結果は ME が海馬機能を向上させる可能性が高いことを示唆している。

## 5. 小括

6週間の異なる強度の走運動トレーニングが AHN に及ぼす影響を検討したところ、以下の知見を得た。

- 1) 増殖 (Ki-67<sup>+</sup>) 細胞数は強度に関係なく、運動で有意な増加が認められた。
- 2) 生存 (BrdU<sup>+</sup>) 細胞と新生成熟神経 (BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>) 細胞の数は ME 群でのみ有意な増加が認められ、IE 群では有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、海馬機能に対する運動効果を検証する上で前提条件となる AHN の変化について、6週間モデルでも、AHN における新生細胞の成熟の促進には LT 未満の低強度運動トレーニングが適しており、LT を超える高強度運動トレーニングでは低強度運動でみられる効果が消失することが明らかになった。



## 第 VI 章 研究課題 1 - 3 :

### 海馬の機能向上に有効な運動強度の解明

#### 1. 目的

研究課題 1-1 において、LT を境にストレスレベルが異なる 6 週間の走運動トレーニングモデルの作成に成功し、研究課題 1-2 では、同モデルにおける AHN の変化を検討し、高強度 (>LT) ではなく、低強度 (<LT) で行う 6 週間の走運動トレーニングが新生成熟神経細胞の数を増加させることを明らかにした。新生成熟神経細胞は、他の神経細胞と比較して、高い電气的感受性を持ち(Jessberger *et al.*, 2003)、海馬が司る学習や記憶能力は、新生成熟神経細胞が既存の神経回路に組込まれることで高まると考えられている(Duan *et al.*, 2008)。したがって、海馬機能向上の担い手である新生成熟神経細胞を増加させる低強度 (<LT) 運動は空間学習記憶能力を高める可能性が高い。一方、新生成熟神経細胞数の増加がみられない高強度運動では、この効果が消失することが予想される。

そこで本研究課題では、この仮説を検証するために、異なる強度の走運動トレーニングが海馬機能に与える影響を検討する。なお海馬機能の評価には、MWM テストを用いることとした。MWM テストは、海馬が司る空間学習記憶能力を評価するテストの一つである（先行研究：2-2. 海馬の機能，pp7-8 を参照）。

#### 2. 方法

##### 2-1. 被験動物および飼育条件

研究課題 1 と同様の被験動物および飼育条件で実験を行った。

## 2-2. 予備飼育およびグルーピング

7日間の予備飼育の後，ラットを体重が均等になるように CONT 群，ME 群，IE 群の 3 群（各群 n=10-11）に分けた．

## 2-3. 走行学習と走運動トレーニング

走行学習と走運動トレーニングは研究課題 1-1 に準ずる．

## 2-4. 空間学習記憶能力の評価：モリス水迷路（MWM）

本研究では，海馬空間学習記憶能力の評価に MWM テストを用いた．MWM は，実験動物（特に，ラットやマウスといった齧歯類）の空間学習記憶能力を評価する典型的な実験手法の一つであり，行動神経科学の分野で広く使用されている (Fordyce *et al.*, 1991; Fordyce *et al.*, 1993; Morris, 1984; Moser *et al.*, 1998; van Praag *et al.*, 1999a; Vaynman *et al.*, 2004)．このテストは，主に記憶の獲得（学習）能力を評価する場所学習逃避訓練と，記憶の保持・想起能力を評価するプローブテストの 2 つで構成される．場所学習逃避訓練では，水温が一定に保たれたプールで実験動物を遊泳させ，プールの四方に配置された幾何学模様の手がかり（目印）を頼りに，水面下に設置された不可視のプラットフォームに逃避するまでの時間や距離，遊泳速度を測定する．一方，プローブテストでは，プラットフォームが取り除かれたプールに被験動物を入れ，四分円のうち，場所学習逃避訓練でプラットフォームが設置されていた領域を泳いでいる時間や距離の割合とその時の遊泳速度を測定する．以下に本研究の詳細を示した．

### 1) 実験環境および装置

本研究では、直径 150 cm、高さ 45 cm の黒色塩化ビニール製の水迷路プール (Bio Research Center, 日本)、直径 12 cm、高さ 21 cm の円形透明の亚克力製プラットフォームを使用した。水はプラットフォームより 1cm 上の高さまで満たし、水温を  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  に保った。プラットフォームを不可視化するために、プールに溶解した白色のポスターカラーを加え、水を白濁させた。ラットの遊泳は、ビデオカメラ (HCC-600, Flovel, 日本) で撮影し、パーソナルコンピュータと水迷路専用解析ソフト (5C67-AC5, Panlab, Spain) で行動解析を行った。

## 2) 場所学習逃避訓練

1 日に 2 回の逃避訓練を 4 日間連続で行った。訓練期間中、プラットフォームは一定の位置に固定した。それぞれの試行では、ラットは 4 箇所のスタート地点からランダムな順序で、水迷路の外壁に顔を向けて投入された。1 回の試行はラットの全身が完全にプラットフォームに乗るまで行い、それまでにかかった時間 (秒) と遊泳軌跡を記録した。逃避に成功したラットは、プラットフォーム上で 15 秒間待機させ、タオルで濡れた身体をしっかりと拭いた後に、飼育ケージに戻した。1 回の試行時間は最大で 120 秒間とし、この時間以内にプラットフォームにたどり着かなかったラットは、実験者の補助でプラットフォームまで誘導し、15 秒間待機させた。2 回目の試行は 15 分間の安静の後に行った。遊泳軌跡から、逃避にかかった距離と平均遊泳速度を求めた。

## 3) プローブテスト

最後 (4 日目) の場所学習逃避訓練から 24 時間後に、プールからプラットフォームを取り除き、プローブテストを行った。ラットを水迷路の中央から投入し、60 秒間遊泳させた。その間の遊泳軌跡をビデオカメラで撮影

し、記録した。記録した遊泳パターンから、場所学習逃避訓練時にプラットフォームがあった四分円内を遊泳した累積時間（秒）と距離（cm）、遊泳速度（cm/秒）を算出した。

## 2 - 5 . 統計処理

データはすべて平均値±標準誤差で示した。場所学習逃避訓練で得られた学習曲線（時間，距離，遊泳速度）は群（3群）×日（4日）の2要因分散分析で，プローブテスト（潜時，潜伏距離，遊泳速度）の結果は一元配置の分散分析で統計解析を行った。統計処理には，SPSS 統計パッケージ（SPSS Inc., Chicago）を用い，*Bonferroni* または *Fisher's PLSD* を *post-hoc* テストで使用した。有意水準は5%とした。

## 3 . 結果

### 3 - 1 . MWM の成績：場所学習逃避訓練

場所学習逃避訓練の結果のうち，逃避時間を図 9 A，それ以外の測定項目（逃避距離，遊泳速度）を表 1 に示した。全ての群において学習を重ねるごとに逃避時間と距離の有意な短縮が認められた ( $p<0.05$ )。しかし，全ての項目について群間での有意差は認められなかった。

### 3 - 2 . MWM の成績：プローブテスト

プローブテストのうち，プラットフォームがあった四分円内を遊泳した累積時間の総遊泳時間に対する割合を図 9 B に示した。それ以外の測定項目（累積遊泳距離，遊泳速度）は表 1 に記載した。累積遊泳距離と遊泳速

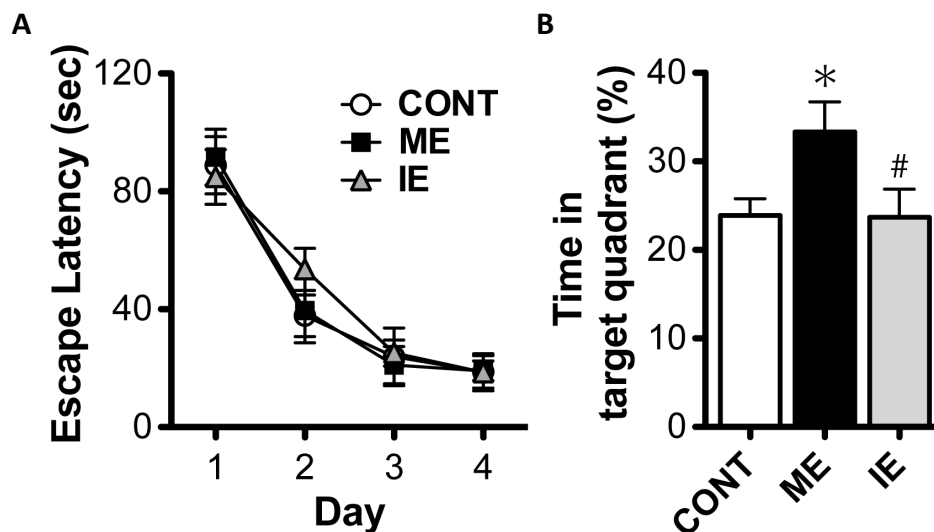


図 9 異なる強度の走運動トレーニングが MWM 成績に及ぼす影響: 遊泳時間の変化

Effects of ME or IE on (A) learning curves for MWM tests and (B) 48 h post-training probe tests, respectively. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (CONT: n=10, ME: n=10, IE: n=9). \*,  $P < 0.05$  compared to sedentary control (CONT) rats. #,  $P < 0.05$  compared to ME rats. Learning and probe data were analyzed using a two- or one-way ANOVA, followed by Bonferroni's or Fisher's PLSD comparisons *post-hoc* tests.

表 1 MWM における遊泳距離および速度の変化

Group	Spatial Learning				Spatial Memory
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Probe trial
<b>Path (cm)</b>					
CONT	1725.8 $\pm$ 192.8	872.3 $\pm$ 140.3	436.4 $\pm$ 109.9	399.2 $\pm$ 120.7	393.6 $\pm$ 40.5
ME	1890.1 $\pm$ 210.6	967.6 $\pm$ 257.3	513.6 $\pm$ 130.7	474.4 $\pm$ 86.0	533.2 $\pm$ 50.5
IE	1802.8 $\pm$ 192.9	1383.2 $\pm$ 177.0	713.9 $\pm$ 133.5	452.5 $\pm$ 135.3	393.3 $\pm$ 60.8
<b>Velocity (cm/s)</b>					
CONT	20.5 $\pm$ 1.36	24.8 $\pm$ 1.62	21.8 $\pm$ 1.24	21.4 $\pm$ 0.73	24.8 $\pm$ 1.13
ME	21.2 $\pm$ 0.86	26.3 $\pm$ 1.37	25.1 $\pm$ 1.30	24.1 $\pm$ 0.83	28.0 $\pm$ 1.00
IE	21.0 $\pm$ 0.87	27.0 $\pm$ 0.84	27.2 $\pm$ 1.94	24.7 $\pm$ 1.32	26.6 $\pm$ 1.55

CONT: control (n=10), ME: mild exercise (n=10), IE: intense exercise (n=9). Path: swim distance to goal in case of training or total swim distance in target quadrant in case of probe trial, Velocity: mean swim speed during task. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

度はいずれの群間においても有意差は認められなかった。一方、累積時間の割合は、CONT 群および IE 群と比較して、ME 群で有意な上昇が確認さ

れ ( $p < 0.05$ ), CONT 群と IE 群には, 統計的な差は認められなかった.

#### 4. 考察

本研究課題は, LT を境に異なる強度の走運動トレーニングが海馬の司る空間学習記憶能力に与える影響を検討した. 空間学習記憶能力は MWM を用いて評価した. MWM では, 場所学習逃避訓練により記憶の獲得 (学習) 能力, プローブテストにより記憶の保持・想起能力を評価した.

本研究の結果, ME 群で記憶の保持・想起能力の有意な向上が認められ, この改善は IE 群では認められなかった (図 9 B). 一方, 記憶の獲得 (学習) 能力には各群間に有意差は認められなかった (図 9 A). 以上のことから, 海馬機能を高めるには高強度 ( $> LT$ ) ではなく, 低強度 ( $< LT$ ) で行う運動トレーニングが効果的であり, 低強度運動は特に記憶の保持・想起能力を向上させることが明らかとなった. 本研究と同様にトレッドミルを用いて海馬機能に対する運動効果を検討した研究では, MWM の成績が低強度 (8-17 m/min,  $< LT$ ) 運動では改善される一方 (Alaei *et al.*, 2008; Uysal *et al.*, 2005), 高強度 (23.5~25 m/min,  $> LT$ ) 運動では低下すること (Aguiar *et al.*, 2010) が示されている. 本研究では, IE 群において MWM の成績低下こそみられなかったが, 低強度運動で海馬機能が向上するという点では過去の知見と一致する.

しかし, 低強度運動は記憶の獲得能力には影響を及ぼさなかった (図 9 A). 運動による海馬機能の向上を報告している研究では, 運動が MWM の場所学習逃避訓練とプローブテストの両方の成績を改善することが数多く示されている (Liu *et al.*, 2009; Uysal *et al.*, 2005; van Praag *et al.*, 1999a). 一方で, 本研究と同様に, 運動が記憶の保持・想起能力のみを改善するこ

とを報告した研究も存在する(Aguiar *et al.*, 2010; Hoveida *et al.*, 2011; Marlatt *et al.*, 2012). 興味深いことに, 運動で促進される AHN をガンマ線照射で抑制すると, 運動による場所学習逃避訓練の成績改善は維持されるものの, プローブテストの成績改善は消失することが報告されている(Clark *et al.*, 2008). つまりこの報告から, 運動により促進される AHN は, 海馬機能のなかでも特に記憶の保持・想起能力の改善に強く関与している可能性が高い. 研究課題 1-2 において, 6 週間の ME によって新生成熟神経(BrdU+/NeuN+)細胞数の増加が起こり, IE ではその効果が消失することを確認している(図 8 A, E). この変化が本研究課題におけるプローブテストの成績変化と一致すること(図 9 B)を踏まえると, 6 週間の ME によって増加した新生成熟神経細胞が記憶の保持・能力の向上に寄与していると考えられる. 今後は, Clark ら(2008)の研究と同様に, ガンマ線照射を用いた AHN 抑制実験を行うことでこの仮説を検証する必要があるであろう.

## 5. 小括

6 週間の異なる強度の走運動トレーニングが海馬空間学習記憶能力に及ぼす影響を評価したところ, 以下の知見を得た.

- 1) 記憶の獲得(学習)能力を評価する場所学習逃避訓練ではいずれの群間にも有意差は認められなかった.
- 2) CONT 群と比較して, ME 群で記憶の保持・想起能力を評価するプローブテストの有意な成績向上が認められ, この変化は IE 群では認められなかった.

以上の結果から、海馬機能の向上には LT 未満の低強度運動が適しており、その効果は特に記憶の保持・想起能力に強く現れること、また LT を超える高強度運動では低強度でみられた運動効果が消失することが明らかになった。



## 第 VII 章 研究課題 2 :

### 低強度運動で高まる海馬機能の分子機構の検討

#### 1. 目的

近年、単一の因子のみの定量を行うウェスタンブロットティングや PCR といった手法に代わって、遺伝子やタンパク質の発現変化を網羅的に解析し、その情報を基に、生命現象の背景にある複雑な機構をシステムティックに解釈しようとする試みが加速している（児玉ら，2005）。

数ある解析方法のなかでも、遺伝子発現の網羅的解析が可能なマイクロアレイはその主流となっており (Valor *et al.*, 2012)、運動で高まる海馬機能の機構解明において強力なツールとなっている (Hunsberger *et al.*, 2007; Molteni *et al.*, 2002; Stranahan *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2001)。例えば、運動が BDNF および BDNF の下流に位置する遺伝子群の発現を高めることを報告した Molteni ら (2002)、Tong ら (2001) の研究は有名であり (Molteni *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2001)、この研究を契機に多くの研究で BDNF が着目されるようになった。さらに近年では、マイクロアレイで同定された遺伝子を基にネットワーク解析を行い、重要となる因子や機構の統計的推定を行う IPA といったソフトウェアも開発され（先行研究：7. Omics 解析：マイクロアレイ，pp.17-19 を参照）、運動による海馬適応の機構をより包括的な視点から解明していこうとする動きが活発化している (Funk *et al.*, 2011)。しかし、これらの先行研究では運動条件の調節が難しい自発運動が用いられており、運動処方への橋渡しを考える上で重要な運動条件に即した分子機構の検討が行われていない。

この問題解決に向け、本研究の研究課題 1 では、運動条件の調節が可能

なトレッドミルを用い海馬の機能促進に有効な運動強度の探索を行った。その結果、ストレスフリーの6週間の低強度 (<LT) 運動が AHN や空間記憶を高める一方、慢性的なストレス反応の亢進を伴う高強度 (>LT) 運動ではこれらの運動効果が消失することを明らかにした。そこで本研究課題では、この6週間の走運動トレーニングモデルを用いて、マイクロアレイによる海馬遺伝子発現の網羅的解析と、IPA による各運動条件 (強度) で重要となる遺伝子の絞り込みを行い、低強度運動で高まる AHN および海馬機能の分子機構を推定することとした。

## 2. 方法

### 2-1. 被験動物および飼育条件

研究課題 1-1 と同様の被験動物および飼育条件で実験を行った。

### 2-2. 予備飼育およびグルーピング

7日間の予備飼育の後、ラットを体重が均等になるように CONT 群, ME 群, IE 群の3群 (各群 n=5) に分けた。

### 2-3. 走行学習と走運動トレーニング

走行学習と走運動トレーニングは、研究課題 1-1 に準ずる。

### 2-4. 海馬の摘出

最終トレーニングから2日後、ラットは断頭により屠殺し、脳を摘出した。摘出した脳から、Hirano ら (2008) (Hirano *et al.*, 2008)の方法に従い、海馬を分画した。海馬は液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。

## 2-5. 均質化 (ホモジナイズ)

凍結海馬の均質化には、乳鉢と乳棒を用いた。乳鉢と乳棒はあらかじめ液体窒素で十分に冷やし、温まらないうちに海馬をすばやく粉砕した (図 10)。粉砕は海馬組織が十分に粉末化するまでおこない、2 ml チューブで保存した。

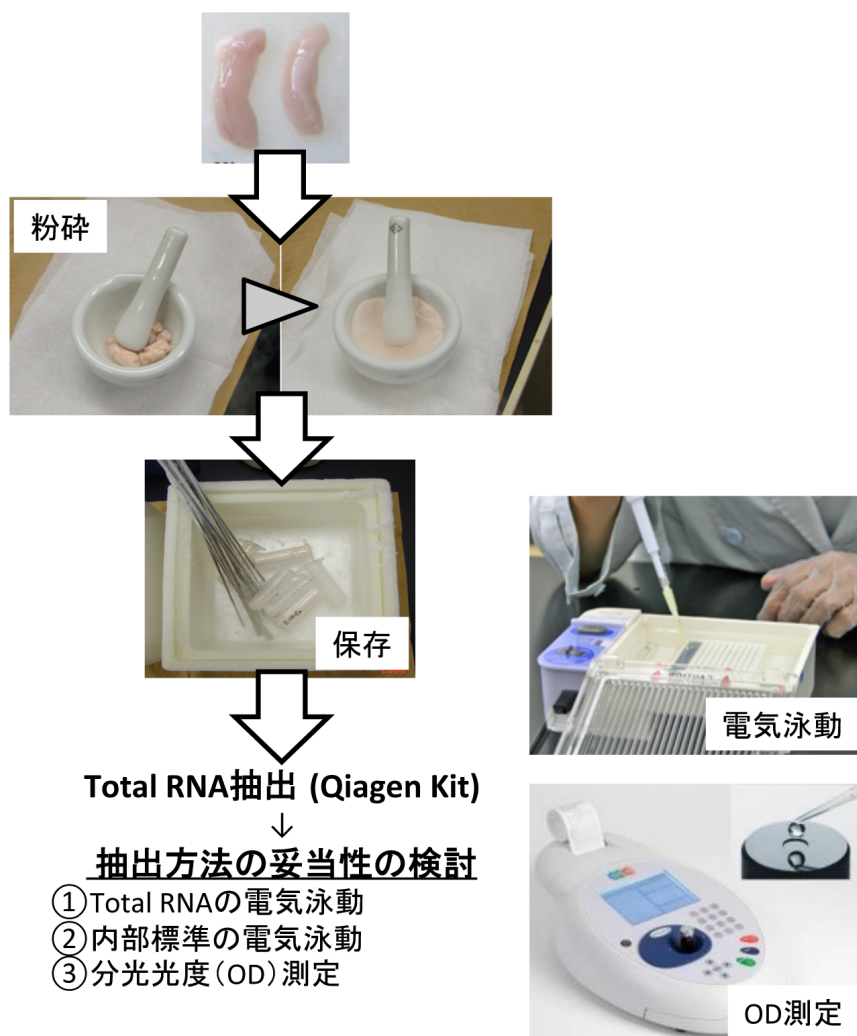


図 10 海馬組織からの RNA 抽出と抽出方法の妥当性の検討

海馬組織の凍結粉砕には乳鉢と乳棒を用いた。すべての作業を液体窒素下で行い、粉砕後の海馬はチューブにて $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。粉砕した海馬から一部を取り出し、Qiagen の RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出した。その後、total RNA および内部標準 (GAPDH,  $\beta$  アクチン) の電気泳動と、分光光度 (OD) 測定を行い、抽出した RNA に分解や不純物の混和がないかどうか確かめた。

## 2 - 6 . 海馬 RNA の抽出

50-60 g 程度の海馬サンプルを新たな 2 ml チューブ取り出し， QIAGEN RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) を用いて RNA を抽出した． RNA 抽出の手順は QIAGEN 社が示した下記の手順で行った．

- A) 海馬組織の溶解：海馬に 1000  $\mu$ l の QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, USA) を加え， 攪拌し， 5 分間室温においた．
- B) RNA の精製：A に 200  $\mu$ l のクロロホルムを加え， 攪拌し， 5 分間室温においた． RNA が含まれている上清を 600  $\mu$ l とり， 同量のエタノールと混和し， RNA を精製した．
- C) RNA の分離：B の混和液をキットに付属しているカラムに通し， RNA をフィルターに吸着させた．
- D) DNA の分解：フィルターに吸着された RNA 以外のデオキシリボ核酸 (DNA, deoxyribonucleic acid) を分解・除去するために， フィルターに 20  $\mu$ l の RNase-free DNase I (Stratagene, USA) を添加し， 15 分室温においた．
- E) RNA の洗浄：キットに付属している 2 種類の Wash Buffer を用いて， 計 4 回の RNA 洗浄を行った．
- F) RNA の再溶解：フィルターに RNase-free の滅菌水 30-50  $\mu$ l を注ぎ， RNA を溶解させ， 遠心分離により 1.5ml チューブに落とした． 取得した RNA は分解されやすいため， すぐに氷冷し， その後， すぐに RNA 濃度の測定を行った．

## 2 - 7 . RNA の濃度測定と性状確認

抽出した RNA の濃度は， 分光測定器 (NanoPhotometer, Implen,

Germany) で測定した。また RNA が適正な状態で抽出されたか否かを、分解およびコンタミネーションの有無から確認した。RNA の分解は、total RNA のホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動と内部標準 (GAPDH,  $\beta$  アクチン) の RT-PCR により確かめた。一方、タンパク質や塩といった不純物のコンタミネーションの有無は、分光測定器 (NanoPhotometer, 同上) による OD 比の測定 (タンパク質 ; 260:280, 塩 ; 260:230) から判定した。

## 2-8. ホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動

Total RNA のホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動の手順を下記に示した。

- A) 電気泳動用 RNA サンプルの調整 : 1000ng の total RNA に Formaldehyde 1.7  $\mu$ l, Formamide 5.0  $\mu$ l, ローディングバッファー (1M MOPS, 3M NaOAc, 500 mM EDTA, pH 7.0) 2.0  $\mu$ l を加え、最終溶液量が 10  $\mu$ l となるように水で調整した。
- B) 熱処理 : A を 65°C で 10 分間温め、Dye Buffer (タカラバイオ株式会社, 日本) を加えた。
- C) 電気泳動用バッファーの作成 : ローディングバッファー 100 ml に 37% Formaldehyde 20 ml を加え、最終溶液量が 1000 ml になるように水で調整した。
- D) 電気泳動用ゲルの作成 : アガロース (Nacalai Tesque, 日本) 0.6g に ローディングバッファー 5 ml, 37% Formaldehyde 900  $\mu$ l, 水 43.5 ml を加え、1 分間のオートクレーブでアガロースを溶解させた。人肌程度まで冷ました後、型に入れて泳動用のゲルを作成した。
- E) RNA の電気泳動 : 電気泳動には Mupid-ex 電気泳動システム (Advance,

日本) を用い, C, D で作成したゲルとバッファー中で RNA の泳動を行った. 泳動は 50 V で計 45 分間 (15 分間×3 回) 行った. 泳動後, 蒸留水でゲルを洗浄した.

F) ゲルの染色: ゲルを染色液 (0.1 mg ethidium bromide in 200 ml water) に浸し, 10 分間染色した.

G) 可視化: UV-トランスイルミネイター (LAS-4000 mini, Fujifilm Life Science, 日本) で可視化, 撮影した.

## 2 - 9 . RT-PCR

内部標準 (GAPDH,  $\beta$  アクチン) の RT-PCR の手順を以下に示した.

A) cDNA の合成: cDNA の作成には AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene, USA; Agilent Technologies, USA) を用いた. 海馬から抽出した 1000 ng の RNA に反応液 (First strand master mix 10.0  $\mu$ l, oligo primer 3.0  $\mu$ l, AffinityScript RT-Rnase Block enzyme mixture 1.0  $\mu$ l) を加え, 滅菌水で総溶液量が 20.0  $\mu$ l となるように調整し, 軽く混和した.

B) PCR による cDNA の増幅: サーマルサイクラー (C1000, Bio-Rad Laboratories, USA) を用い, 25°C で 5 分間, 42°C で 5 分間, 55°C で 40 分間, 95°C で 5 分間という反応条件で cDNA を増幅した.

C) 増幅した cDNA に滅菌水 30  $\mu$ l を加えて, 総量 50  $\mu$ l とした.

D) RT-PCR 用反応液の作成: Emerald Amp PCR Master Mix (Takara Shuzo, 日本) を用いて, RT-PCR 反应用の混合液 12  $\mu$ l を作成した. 混合液 12  $\mu$ l 中の組成は, cDNA 0.6  $\mu$ l, primer 50 pmols, Emerald Amp PCR Master Mix (2×premix) 6.0  $\mu$ l となるように調節した. そ

の際に使用した GAPDH と  $\beta$  アクチンのプライマー塩基配列は表 2 に示した.

表 2 RT-PCR で使用したプライマーと PCR 反応のサイクル数

Accession (Gene)	Description	Forward Primer Nucleotide sequence (5'-3')	Reverse Primer Nucleotide sequence (5'-3')	Product size (bp)	Cycle
NM_031810	<i>Defb1</i>	TGGGAGTCTCACGTCCTCTC	CCTGCAACAGTTGGGCTTAT	251	36
NM_021841	<i>Gabra6</i>	CCAATCTCCAGTCCCAGAAA	GGTTGAATCCTGCAAATGCT	318	32
NM_031511	<i>Igf2</i>	GCTGACCTCATTCCCGATA	AAGACCAACATCGACTTCC	309	32
NM_053896	<i>Aldh1a2</i>	ACAAGGCTCTCATGGTGTCC	AAGGAGGCCTGGTGATAGGT	253	26
NM_017178	<i>Bmp2</i>	GTTTGGCCTGAAGCAGAGAC	TGTTCCCGAAAAATCTGGAG	288	30
NM_017244	<i>Crabp2</i>	AAGAGAAAGCCACCTTGCTG	TGTTCCGCACACCATTTTGT	312	32
NM_012969	<i>Irs1</i>	CACCCAGTTTTTCGACACCT	CTTGTTCCAGCCTCGCTATCC	349	30
NM_012681	<i>Ttr</i>	ATGGTCAAAGTCCTGGATGC	GTTCTGGGGGTTACTGACGA	345	26
NM_153737	<i>Sostdc1</i>	GAGGAGGCTACGGAACAAAGTA	AGTCTTCCACGCAATCAAATCT	331	30
NM_012675	<i>Tnf</i>	GAGGTCAACCTGCCCAAGTA	GGCCACTACTTCAGCGTCTC	282	36
NM_016993	<i>Bcl2</i>	AAGGGGGAAACACCAGAATC	AGCCCCTCTGTGACAGCTTA	259	30
NM_021772	<i>Cdkl3</i>	AAAGGAGACGTCCCAGACCT	TCGTACACGTGTGTCTGCAA	341	30
NM_017009	<i>Gfap</i>	GCTTCCTGGAACAGCAAAAC	ACACAGCCAGGTTGTTCTCC	252	24
NM_021772	<i>Gapdh</i>	TCCCTCAAGATTGTGACGAA	AGATCCACAACGGATACATT	341	26
NM_017009	<i>b-actin</i>	CCTGTATGCCTCTGGTCGTA	CCATCTCTTGCTCGAAGTCT	252	26

E) RT-PCR : サーマルサイクラー (C1000, 同上) で D 溶液の RT-PCR を行った. 97°C で 5 分間の加熱を行った後, 95°C で 45 秒間, 55°C で 45 秒間, 72°C で 1 分間の反応を 1 サイクルとして, 26 サイクルの反応を実施し, GAPDH および  $\beta$  アクチンを増幅した.

F) 増幅後, 72°C で 10 分間加熱し, 増幅した遺伝子を安定化させた.

G) 10 分の安定化が終了した後, F にローディングバッファー 2  $\mu$ l を加え, よく混合した. そのなかから 10  $\mu$ l を取り, 1.8 %アガロースゲル (Nacalai Tesque, 日本) の溝に垂らした.

H) 電気泳動 : 電気泳動には Mupid-ex 電気泳動システム (Advance, 同上) を用い, バッファーには希釈した TAE バッファーを使用した. 泳動は 100 V で 20~30 分間行った.

I) ゲルの染色 : ゲルを染色液 (0.08 mg ethidium bromide in 200 ml

1×TAE buffer) に浸し, 10 分間染色した.

J) 可視化と撮影: UV-トランスイルミネーター (LAS-4000 mini, 同上) で各遺伝子を可視化し, バンドを撮影した.

## 2-10. 海馬遺伝子発現の網羅的解析: マイクロアレイ

本実験では, 海馬遺伝子発現を網羅的に解析するために Rat 44K whole genome oligo DNA microarray chip (G4131F, Agilent Technologies, USA) を使用した. 以下にその手順を示した (図 12).

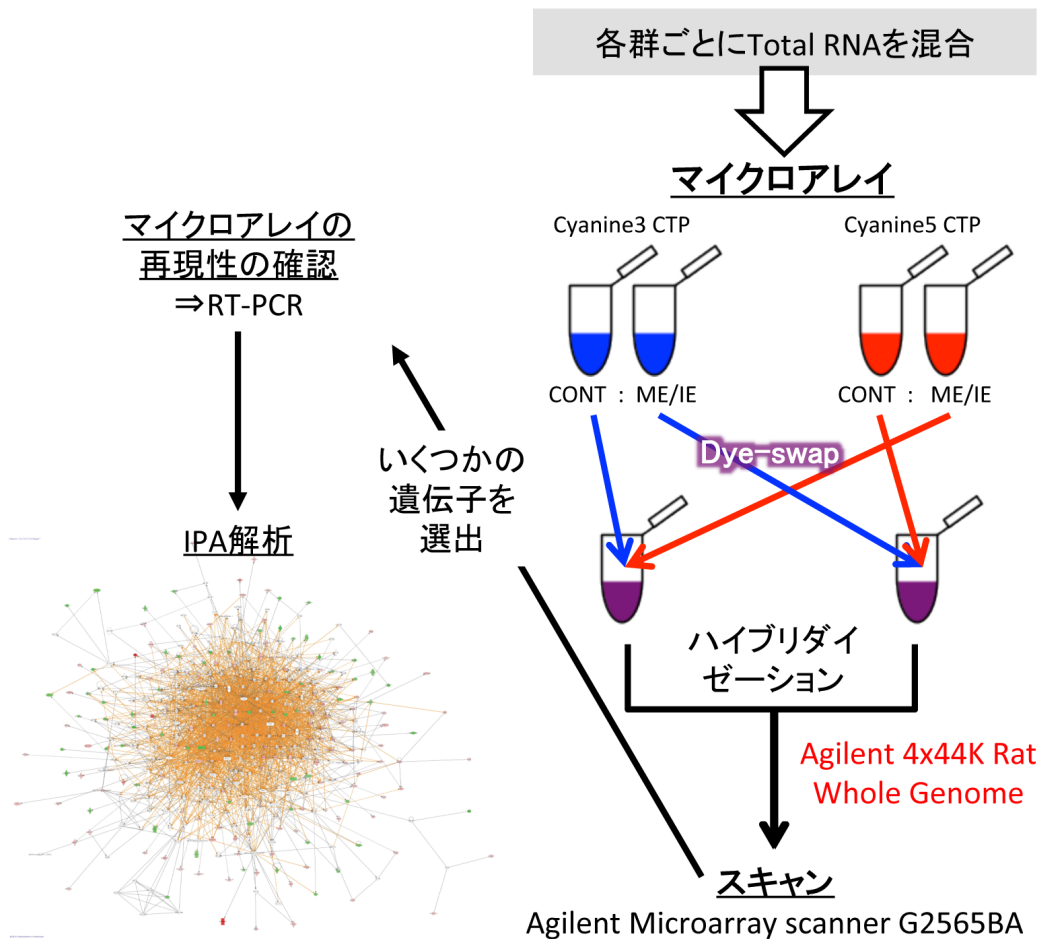


図 11 マイクロアレイの解析手順

抽出した RNA に問題がなければ, 各個体から同量の RNA を取り出し, 群ごとに混合する. RNA を Cy3 または Cy5 で蛍光標識し, Dye-swap 法に基づき, ハイブリダイゼーションを行う. ハイブリダイゼーション後, スキャナを用いてデータを取得する. 得られたデータの再現性の確認のため, RT-PCR を行い, その後, IPA 解析を実施した.



- A) RNA の混和 : 各個体の海馬サンプルから抽出した RNA (n=5, 1000 ng/1 個体) を群ごとに混和した.
- B) RNA の標識 : 混和した各群の RNA から 1000 ng の RNA を取り出した. その後, CONT 群と運動 (ME, IE) 群の RNA を Cy3 または Cy5 の色素で標識した. 標識には, Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, USA) を用いた.
- C) ハイブリダイゼーション : 蛍光標識された CONT 群と運動 (ME, IE) 群の RNA を混和し, 同一のマイクロアレイチップ上に滴下した. 滴下後, チップ上に配置されている 60 塩基対のプローブと RNA をハイブリダイズ (結合) させ, cDNA を形成させた. その後, プローブと結合していない RNA を洗い流すため, チップを十分に洗浄した. ハイブリダイゼーションと洗浄の条件は製造者のプロトコルに準じた.
- D) スキャン : ハイブリダイズしたマイクロアレイチップを Agilent Microarray scanner G2565 BA でスキャンした. スキャン時には, 全プローブの Cy3 および Cy5 の発色強度をドットイメージとして取込んだ. CONT 群を基準に, 2 色の蛍光色素の発色強度の違いから各運動群における遺伝子発現の変化を検討した (2 色法). 発色強度の違いは Agilent Feature Extraction software を用いて数値化した.
- E) Dye-swap : RNA の Cy 色素による標識過程では, 染色にむらが生じることがあり, それに依存して検出の精度が落ちる可能性がある. 本研究では Dye-swap という方法 (Altman, 2005; Martin-Magniette *et al.*, 2005; Rosenzweig *et al.*, 2004) を採用し, 染色むらによる実験誤差を最小にするよう努めた. この方法では, B で行った RNA の標識について, CONT 群および運動 (ME, IE) 群の色素を逆転させ, その後の

ハイブリダイゼーション (C) とスキャン (D) を行った。

F) データの正規化 : Dye-swap で得られたデータの正規化には LOWESS

(locally weighted linear regression) を用いた。Cy3 と Cy5 の蛍光強度を対数変換し、エラー率を 1 % としてデータの正規化を行った。

G) データの取得 : 正規化されたデータを基に、遺伝子リストを作成した。

なお、遺伝子リストは CONT 群を基準として、各運動群で遺伝子発現が 1.5 倍以上増強された遺伝子および 0.75 倍以下に抑制された遺伝子のみを抽出した。

## 2 - 11. RT-PCR によるマイクロアレイデータの再現性の確認

マイクロアレイ結果の再現性を確認するために、CONT 群との比較で ME および IE 群で特に変化の大きかった遺伝子または海馬の可塑性に関わることが報告されている遺伝子 13 個を選出し、RT-PCR によりそれらの遺伝子発現の変化を再検討した。詳細は 2-9 の RT-PCR の章に準ずる。なお、各遺伝子のプライマーを表 2 に示した。

## 2 - 12. IPA

各運動条件で変化が見られた遺伝子の機能分類およびネットワーク解析を IPA (Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) を用いて行った。マイクロアレイで同定された遺伝子について、運動条件別に IPA にアップロードした。アップロードした遺伝子は、Ingenuity Systems が過去の論文を基に開発した Ingenuity Knowledge Base と照会され、生理機能別に分類された。同時に、各遺伝子間のつながり (ネットワーク) が予測され、統計的 ( $p < 0.05$ , right-tailed Fisher's exact test) に重要と思われるネットワー

ク順にランク付けされた。本研究課題では、IPA で構築されたネットワークのなかから、過去の論文において空間学習記憶や AHN に関係することが報告されている遺伝子に着目し、運動強度の違いが異なる海馬適応を生じさせる仕組み（分子機構）を推定することとした。

### 3. 結果

#### 3-1. RNA の分解およびコンタミネーションの有無

Total RNA の電気泳動と内部標準（GAPDH,  $\beta$  アクチン）の RT-PCR の結果を図 12 と表 3 に示した。なお図 12 には、各群の典型例のみを示した。Total RNA の電気泳動では、すべての個体で 18S と 28S のリボソーム RNA バンドが確認された（図 12A）。また内部標準の RT-PCR では、すべての個体で GAPDH と  $\beta$ -Actin の遺伝子発現（バンド）が確認され、群間で発現に違いは認められなかった（図 12B, 表 3）。分光光度計による吸光度測定では、RNA の純度指標となる 260:280 と 260:230 の波長比において、いずれの群でも基準値である 1.8 を超えていた（表 3）。

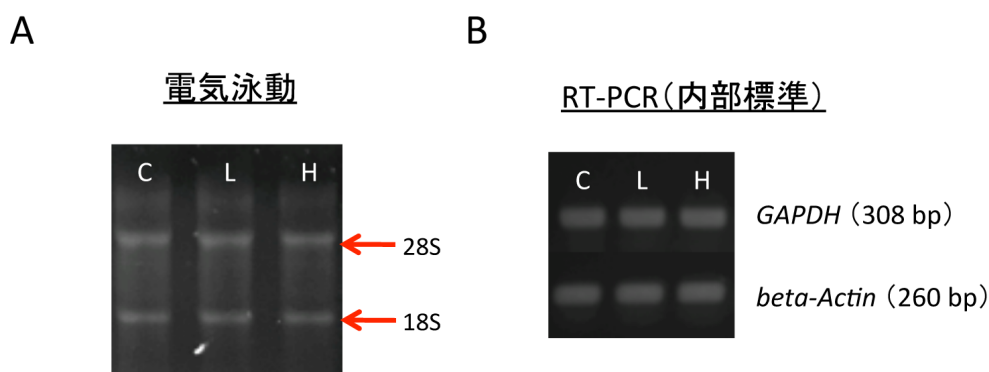


図 12 Total RNA および内部標準の電気泳動画像

- A. Total RNA の電気泳動：18S と 28S のバンドは RNA に分解が起っていないことを示す。
- B. 内部標準（GAPDH と  $\beta$  アクチン）の RT-PCR：各群でみられる均一のバンドは全ての群の RNA に分解が起っていないことを示す。

表 3 抽出した RNA の OD 比と内部標準の電気泳動の結果

Quality Control Measurement	CONT	ME	IE
Total RNA (ng/ul)	321.2 ± 26.1	337.6 ± 36.9	299.6 ± 21.1
260: 280	1.98 ± 0.04	1.98 ± 0.04	1.96 ± 0.05
260: 230	2.20 ± 0.08	2.21 ± 0.03	2.28 ± 0.17
<b>Internal Control (RT-PCR)</b>			
GAPDH (A.U.)	10.41 ± 0.28	10.27 ± 0.24	10.72 ± 0.31
beta-Actin (A.U.)	11.44 ± 0.50	11.44 ± 0.48	10.91 ± 0.39

RNA was purified from each hippocampal tissue sample using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) (n=5). Then, each parameter was analyzed with agarose gel or spectrophotometrically. Total RNA: yield of total RNA from hippocampal tissue, 260:280 or 260:230: ratio of the spectrophotometric absorbance at 260 (nucleic acid) to 280 (protein) or 230 (salt and solvents) nm wavelengths, Internal Control (RT-PCR) of GAPDH and beta-Actin: measure of the signal intensities for the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-Actin. Values are expressed as mean ± SEM. Data were analyzed using a one-way ANOVA.

### 3 - 2 . 海馬遺伝子発現の変化：マイクロアレイ

CONT 群と比較して、ME 群や IE 群で発現が 1.5 倍以上に増強、または 0.75 倍以下に抑制された遺伝子の数の変化を図 13 に示した。マイクロアレイチップ上に配置された遺伝子 41090 個のうち、ME または IE でのみ変化が見られた遺伝子は、それぞれ 563 個と 374 個であった (図 13A)。両群でともに変化がみられた遺伝子は 41 個であった (図 13A)。増強または抑制された遺伝子に分類したところ (図 13B, C)、ME でのみ発現が増強された遺伝子は 306 個、抑制された遺伝子は 268 個であった。一方、IE でのみ発現が増強された遺伝子は 163 個、抑制された遺伝子は 222 個であった。両群ともに発現が増強された遺伝子は 12 個、抑制された遺伝子は 18 個であった。これらの遺伝子のなかに、BDNF や IGF1 など、過去の研究で運動による海馬可塑性の向上に関わることが報告されている遺伝子は含まれていなかった。

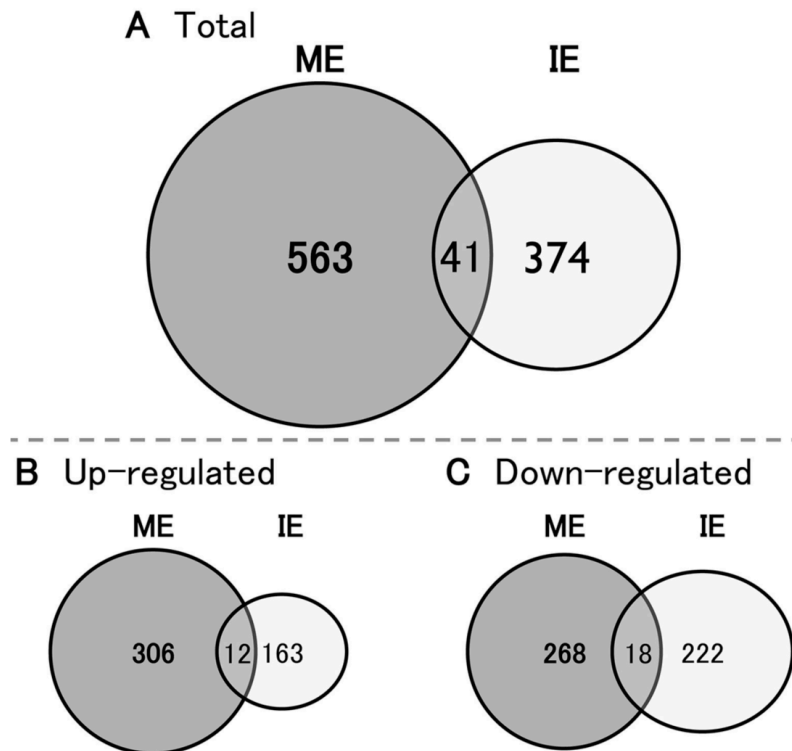


図 13 各運動強度で変化が見られた遺伝子の数

The total number of genes modified by ME (gray circles) and IE (white circles) (A), or up- (B) and down- (C) regulated genes in each condition are shown as Venn diagrams. The number in each circle indicates the selection of genes from the total microarray datasets within a defined fold range of greater than 1.5-fold and less than 0.75-fold versus sedentary (CONT).

### 3-3. マイクロアレイデータの再現性の検討

マイクロアレイで確認された遺伝子発現の再現性を確かめるために、選出した 13 個の遺伝子について RT-PCR を行った (図 14)。同一の遺伝子について 2 回の RT-PCR を行った結果、全ての遺伝子で RT-PCR とマイクロアレイの結果が一致した。

### 3-4. ネットワーク解析：IPA

マイクロアレイにより同定された遺伝子を運動強度別に IPA にアップロードしたところ、ME 群では 231 個 (増強：129 個，抑制：102 個)，IE 群では 166 個 (増強：78 個，抑制：88 個) の遺伝子が生理的機能の分かって

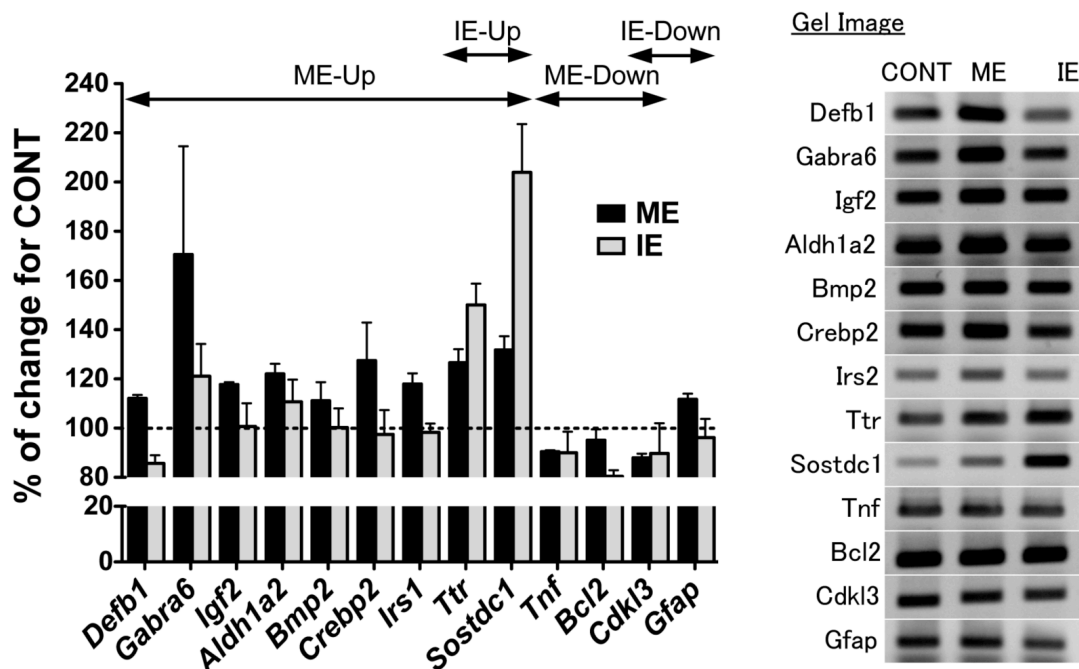
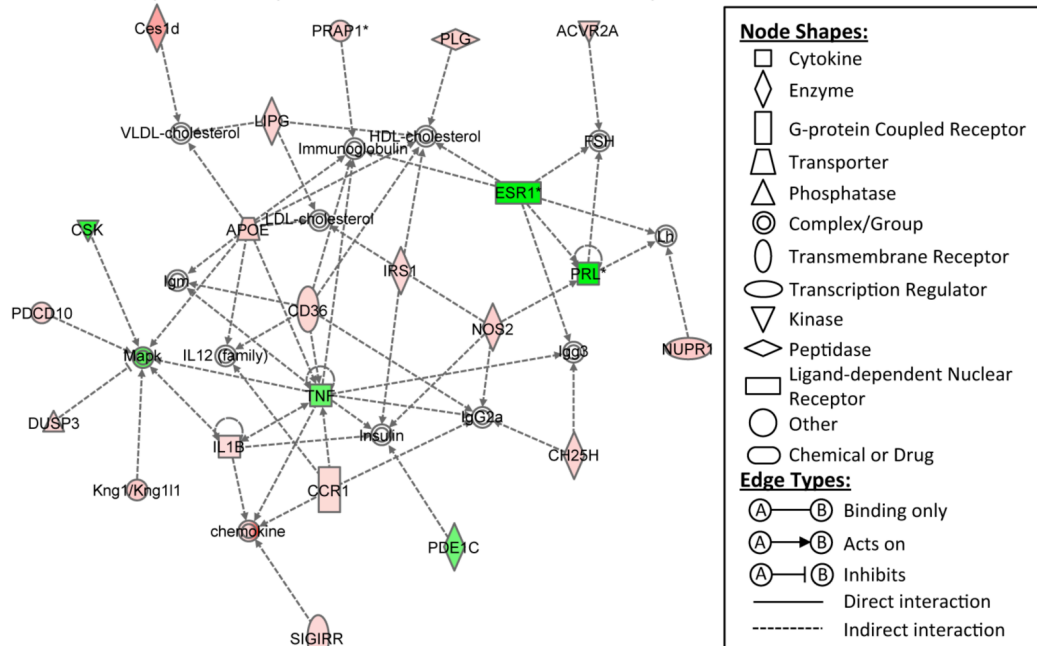


図 14 RT-PCR によるマイクロアレイ結果の再現性の確認

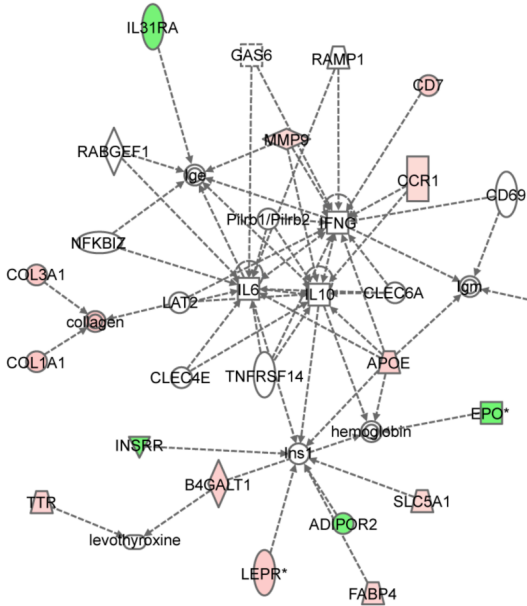
Semi-quantitative RT-PCR validation of genes up- or down-regulated with ME or IE in the hippocampus. Each column indicates ME (black columns) or IE (gray columns), respectively. For each gene, the expression change is represented as the fold change in ME or IE relative to CONT. RT-PCR was performed as described in the Methods and the primers are detailed in **Table 2**. Gel images on right-side show the PCR product bands stained with ethidium bromide.

いる既知の遺伝子として分類された。これらの遺伝子を表 **S2** (ME) および表 **S3** (IE) に示した。その他の遺伝子は、機能が明らかではない未知の遺伝子であり、IPA 解析から除外された。IPA によるネットワーク解析の結果を図 **15** (ME), 図 **16** (IE) に示した。図には、各群でスコアが高かった上位 3 つのネットワークを示した。図 **15** の第 1 位 (図 **15A**, Score = 41) と第 2 位 (図 **15B**, Score = 26) のネットワークより、ME ではタンパク質の合成や脂質代謝, 分子輸送, 炎症/免疫反応に関わる遺伝子に変化がみられることが明らかとなった。炎症/免疫反応と関連する遺伝子は、第 3 位のネットワーク (図 **15C**, Score = 12) にも含まれていた。一方、図 **16** の第 1 位 (図 **16A**, Score = 31) と第 3 位 (図 **16C**, Score = 8) の遺

### A Protein Synthesis, Lipid Metabolism, Molecular Transport



### B Protein Synthesis, Humoral Immune Response, Endocrine System Development and Function



### C Hematological System Development and Function, Inflammatory Response, Tissue Morphology

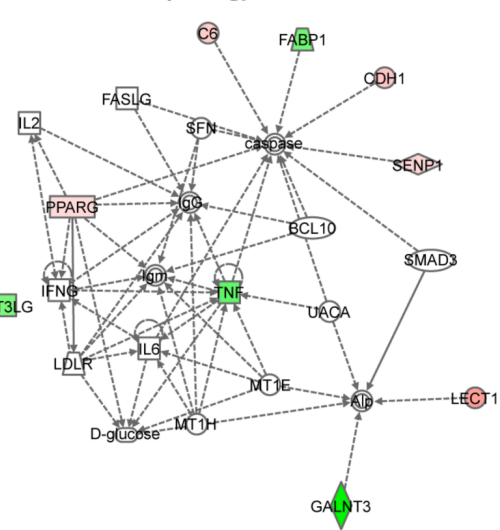
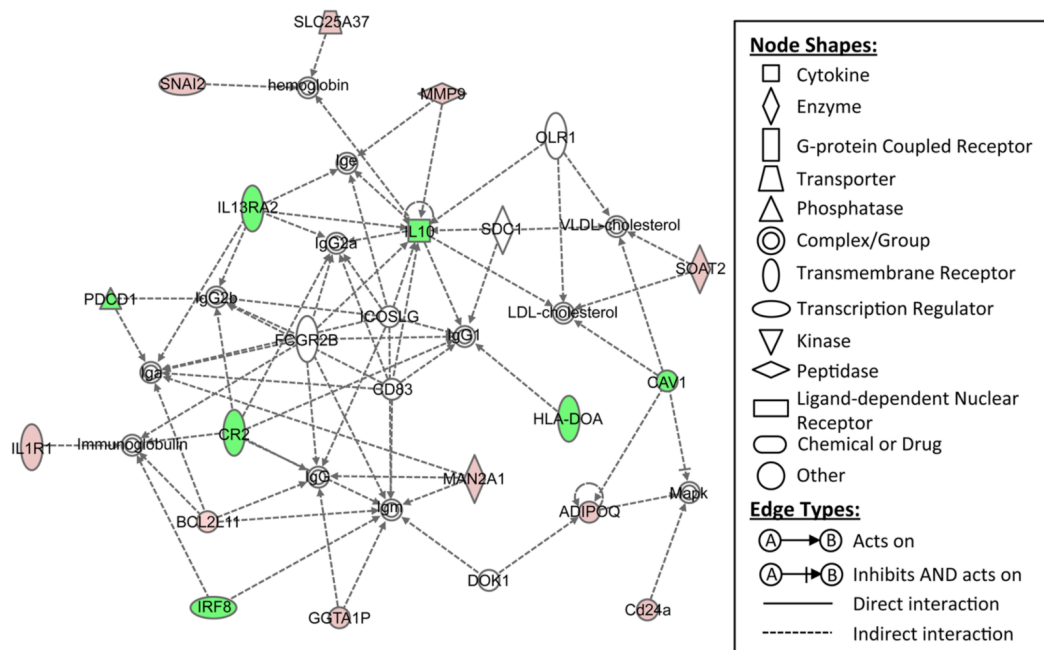


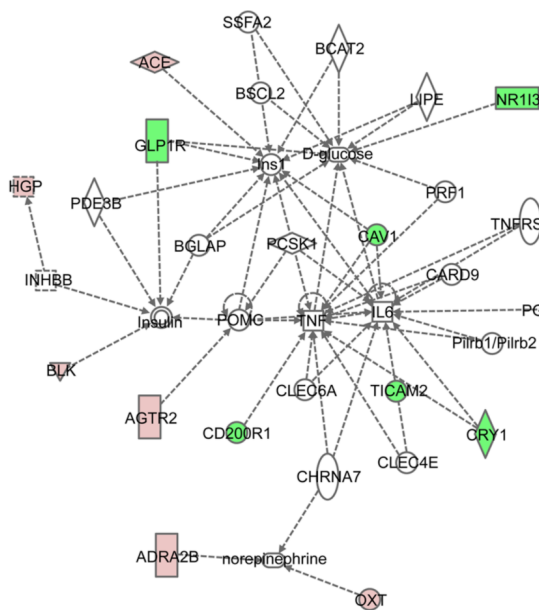
図 15 IPA による ME の遺伝子ネットワーク解析の結果

Network analyses of the genes whose expression was modified with ME vs CONT are shown. Major functions of the networks are indicated in A (1<sup>st</sup> network), B (2<sup>nd</sup> network) and C (3<sup>rd</sup> network). The score is the negative log of the *p* value and signifies the possibility of network-eligible genes within a network being clustered together as a result of chance. The biological relationship between two genes is represented as an edge (line), which is supported by at least one reference from the literature or a textbook. The intensity of the node color indicates the degree of up- (red) or down- (green) regulation. Nodes are displayed using various shapes that represent the functional class of the gene product.

### A Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Cellular Development



### B Carbohydrate Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry



### C Protein Synthesis, Molecular Transport, Endocrine System Development and Function

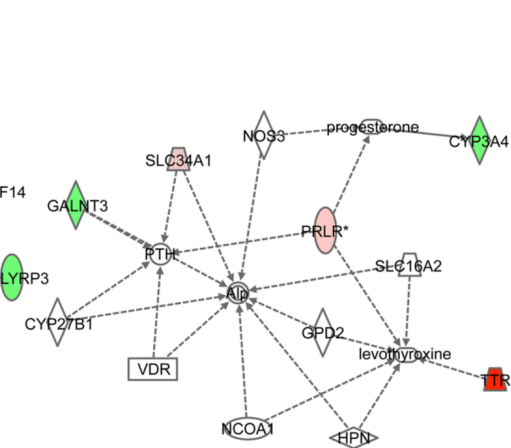


図 16 IPA による IE の遺伝子ネットワーク解析の結果

Network analyses of the genes whose expression was modified with IE vs CONT are shown. Major functions of the networks are indicated in A (1<sup>st</sup> network), B (2<sup>nd</sup> network) and C (3<sup>rd</sup> network). Details are as indicated in Figure 15.

伝子ネットワークから、IE がタンパク質の合成や分子輸送、細胞の成長、免疫反応に関わる遺伝子を変化させることが明らかとなった。



#### 4. 考察

本研究課題では、研究課題 1 で確立した 6 週間の走運動トレーニングモデルを用いて、高強度運動との比較から、低強度運動で高まる海馬機能の分子機構を推定した。実験では、各運動強度で発現が変化する海馬遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析し、変化がみられた遺伝子について IPA によるネットワーク解析を行い、各条件で重要と思われる機構を推定した。

本研究では、マイクロアレイを行う前に、海馬からの RNA 抽出が上手くいったか否かを、total RNA の電気泳動と内部標準 (GAPDH と  $\beta$ -Actin) の RT-PCR, OD (230nm, 260nm, 280nm) 測定により確認した。電気泳動では、すべての個体で 18S と 28S のリボソーム RNA バンドが確認され、内部標準の RT-PCR では、各群において GAPDH と  $\beta$ -Actin の発現に差がみられないことを確かめた (図 12A, B, 表 3)。また OD 測定では、260:280 と 260:230 の OD 比が、いずれの群においても基準値となる 1.8 を上回ることを確かめた (表 3)。以上の結果は、海馬から抽出した RNA に塩やタンパク質などの混入がなく、抽出過程で RNA の分解が起っていないことを示しており、海馬から適切な状態で RNA が抽出されたことを示している。

この RNA を用いてマイクロアレイを行ったところ、ME では 563 個、IE では 374 個の遺伝子が各運動強度特異的に変化し、41 個の遺伝子は両群でともに変化することが確認された (図 13)。この結果は、ME が海馬神経のより大きな可塑的变化を引き起こし、それが IE とは独立した機構や因子によって調節されていることを示唆する。興味深いことに、両運動群で同定された遺伝子のなかに、運動時の海馬適応で重要と考えられている BDNF

や IGF1, VEGF (Fabel *et al.*, 2003; Marlatt *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2011; Trejo *et al.*, 2001; Trejo *et al.*, 2008)は含まれていなかった。その理由は明らかではないものの、本研究における海馬摘出のタイミングやマイクロアレイの技術的な側面を踏まえると、妥当な結果と考えられる。例えば、本研究では、運動による一過性の影響を排除し、慢性的な運動トレーニングの効果をみるために、最後の運動トレーニングから2日後に海馬を採取した。運動トレーニング後の海馬 BDNF 合成能の変化を経時的に検討した研究では、トレーニング終了から2時間後までは BDNF 遺伝子およびタンパク質発現が高まり、2日後にはもとのレベルに戻ることが示されている(Huang *et al.*, 2006)。この知見から、我々が海馬摘出を行ったタイミング(トレーニング終了2日後)において BDNF 発現に変化がみられなかったことは、妥当な結果と考えられる。また、遺伝子発現の解析を行うマイクロアレイは海馬で合成される因子の変化を検討する技術である。これまでの研究から、IGF1 や VEGF は末梢で合成され、血液を介して海馬に移行、そして作用することが分かっている(Fabel *et al.*, 2003; Trejo *et al.*, 2008)。そのため、これらの末梢由来の因子がマイクロアレイで同定されなかった点も妥当と考えられる。

BDNF や IGF1 といった運動時の海馬適応に重要と考えられてきた因子がマイクロアレイで同定されなかったことは、新たな機構が ME による AHN の促進や海馬機能の向上に寄与している可能性を示唆する。そこで、本研究のマイクロアレイで同定された遺伝子について IPA によるネットワーク解析を行った。その結果、ME はタンパク質の合成や脂質代謝、分子の輸送、炎症反応に関わる遺伝子群を(図 15)、IE はタンパク質の合成、細胞の成長、分子の輸送、免疫反応に関わる遺伝子群を調節することが明らか

かになった (図 16). 我々は, 低強度運動でのみ海馬機能が向上する背景の一つとして, 低強度と高強度の運動で AHN に対する効果が異なること, すなわち低強度運動でのみ AHN が促進されることを確認している (研究課題 1-2). そこで本研究課題では, IPA により構成された上位 3 つのネットワークのなかから, 現在までに AHN への関与が報告されている遺伝子に着目し, 重要となる因子および機構の絞り込みを行った. それら AHN 関連の遺伝子について, 以下に機能ごとの考察を示す.

#### 1) タンパク質の合成と細胞の成長

ME の第 1-2 位 (図 15A, B), IE の第 1 位 (図 16A) のネットワークから, ME と IE がタンパク質合成に関わる遺伝子群を変化させることが明らかになった. また, IE の第 1 位のネットワークは細胞の成長にも関わることを示された (図 16A). タンパク質合成 (翻訳) は, AHN において新しい細胞がつくられ, 成長・成熟していく上で非常に重要なプロセスであり, AHN を高めるにはタンパク質合成が促進される必要がある. それぞれのネットワークに含まれる遺伝子の変化に着目すると, タンパク質合成は ME では促進され, 一方, IE では抑制されていると考えられる. ME でのタンパク質合成促進は, ME が IRS1 の発現を増強すること (図 15A) から予想される. 通常 IRS1 は, インスリンや IGF1 といった上流因子の入力により活性化され, 下流の PI3K/Akt 経路や MAPK/ERK 経路を介してタンパク質合成 (翻訳促進) および細胞の成長を促進する (Folli *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 2004). 本研究では, インスリンや IGF1 は同定されなかったが, ME による IGF2 発現の増強 (図 14, 表 S2) と MAPK 発現の抑制 (図 15A) を確認している. IGF2 も IRS1 を刺激する上流因子の一つであることから (Bracko *et al.*, 2012), ME は IGF2→IRS1→

PI3K/Akt という経路を介してタンパク質合成を高めている可能性が高い。興味深いことに、近年 IGF2 は海馬機能を高める因子として注目が集まっており、新生細胞の増殖・生存の促進など、AHN にも関係することが確認されている (Bracko *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011)。一方、IE におけるタンパク質合成の抑制は、CAV1 遺伝子の発現抑制が予測される (図 16B, C)。CAV1 は、細胞膜の脂質に富んだ領域 (脂質ラフト) を形づくる構造タンパク質の一つであり (Lisanti *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1999)、神経伝達物質 (e.g. NMDAR, APMAR) や神経栄養因子 (BDNF など) の受容体を介したシグナル伝達が上手く機能する上で重要な因子である (Besshoh *et al.*, 2005; Bilderback *et al.*, 1999; Head *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2004)。BDNF のシグナル伝達はタンパク質合成や細胞の成長に不可欠な機構であり (Binder, 2007; Manadas *et al.*, 2009)、CAV1 発現の抑制によりこの経路が破綻すればタンパク質合成や細胞の成長が低下すると考えられる。また、CAV1 はタンパク質合成に関わる IRS1 の増強効果を持つことも報告されており (Yamamoto *et al.*, 1998)、IE における CAV1 の抑制は IRS1 の抑制、すなわちタンパク質合成の低下を引き起こす可能性が高い。以上のように、ME では IGF2 やその下流の IRS1 の発現増強を介してタンパク質の合成が促進され、一方 IE では CAV1 の抑制を引き金にタンパク質合成が抑制されると考えられる。新生細胞の成長、成熟課程では、タンパク質合成 (翻訳) の促進が基盤となることから、IGF2 や IRS1 は ME で高まる AHN および海馬機能の機構を考える上で特に重要な因子といえる。

## 2) 脂質代謝と分子の輸送

ME の第 1 位のネットワークより、ME は脂質代謝と関連する遺伝子群を変化させることが明らかとなり (図 15A)、IE ではこれらの遺伝子に変化

はみられなかった。ME で変化がみられた脂質代謝関連遺伝子のなかでも、ME によって発現が増強された APOE と CD36 は、ME による AHN の促進と関連が強いと考えられる。APOE は脳でコレステロールの輸送を担う (Pfrieger, 2003)。脳には全身に含まれるコレステロールの約 25% が存在し (Vance *et al.*, 2005)、細胞レベルでは、50~90% のコレステロールが細胞膜に分布する (Lange *et al.*, 1989)。脳内のコレステロールは、主にアストロサイトで合成されており (Vance *et al.*, 2005)、海馬では、APOE によってアストロサイトから神経にコレステロールが輸送される (Pfrieger, 2003)。興味深いことに、海馬の神経ではコレステロールを基に細胞の成長に必要な各種ステロイドホルモンが合成されている (Kimoto *et al.*, 2001)。数あるステロイドホルモンのなかでも、男性ホルモンの一つであるアンドロゲンは、低強度 (<LT) 運動によって海馬での合成が高められ、さらに低強度運動による AHN の促進に関与していることが明らかになっている (Okamoto *et al.*, 2012)。これらの報告を踏まえると、ME で遺伝子発現が高まった APOE は、低強度運動によるアンドロゲンを介した AHN の促進において、その基盤となるコレステロールの神経への輸送を担っていると考えられる。一方、CD36 は脂肪酸の輸送に関わっている。脂肪酸は内分泌性または傍分泌性の AHN 調節因子と考えられており (Knobloch *et al.*, 2013)、脂肪酸の合成阻害が運動による海馬機能の向上と AHN の促進を抑制することが報告されている (Chorna *et al.*, 2013)。海馬における CD36 の役割には未だ不明な点が多いものの、ME で発現が増強された CD36 が脂肪酸の輸送を促し、AHN や海馬機能の促進をもたらしている可能性も十分に考えられる。以上をまとめると、低強度運動で変化がみられる脂質代謝関連遺伝子のうち、遺伝子発現の増強がみられた APOE や CD36 は、コレス

テロールや脂肪酸の輸送を介して間接的に AHN の促進に寄与していると考えられる。

### 3) 炎症および免疫反応

脳は炎症や免疫反応とは独立した組織だと考えられてきた。しかし、近年、海馬の炎症反応がミクログリアやアストロサイトから分泌される各種サイトカインやプロスタグランジン、神経栄養因子によって巧みに調節されていることが明らかになってきた(Yirmiya *et al.*, 2011)。本研究では、両運動群において炎症および免疫反応に関わる遺伝子群の変化を明らかにした(図 15, 16)。それらのなかで、AHN や海馬機能とも関連する遺伝子は、ME では IL1B と TNF (図 15A, C)，IE では IL10, IL1R1 (図 16A) が挙げられる。炎症性サイトカインの IL1B は、海馬機能と逆 U 字の関係があり、記憶力は IL1B が過度に活性化または完全に抑制された場合には低下し、適度に活性化された場合には向上する(Goshen *et al.*, 2007)。AHN との関係でも、慢性的な IL1B の活性化が AHN を抑制することが確認されている(Wu *et al.*, 2012)。IL1B と同様に炎症性サイトカインに分類される TNF と IL1R1 は、AHN や海馬機能に対して一様に負の作用を示す(Golan *et al.*, 2004; Keohane *et al.*, 2010)。一方、抗炎症性サイトカインに分類される IL10 は炎症を抑制する作用をもつ。本研究の ME では、IL1B が増強され、TNF が抑制された。一方 IE では、IL10 が抑制され、IL1R1 が増強された。これらのことは、ME における炎症反応の適度な活性化と、IE における炎症反応の過剰な活性化を示唆し、この炎症反応の違いが運動強度で異なる AHN や海馬機能の適応をもたらした可能性が高い。特に、低強度運動では IL1B の増強や TNF の抑制を介した軽度な炎症反応の亢進によって AHN の促進や空間記憶の向上が起っている可能性がある。また IE

でも、IL10の抑制とIL1R1の増強に伴う過度な炎症反応が抑えられるよう運動時間や頻度を調節すれば、AHNや海馬機能が向上すると考えられる。

## 5. 小括

異なる強度の走運動トレーニングが海馬の遺伝子発現に及ぼす影響をマイクロアレイで網羅的に検討し、変化がみられた遺伝子のIPAによるネットワーク解析を行った結果、以下の知見を得た。

- 1) IE群(415個)に比べ、ME群(604個)ではより多くの遺伝子に発現の変化がみられ、両群で共通して変化がみられた遺伝子は41個のみであった。
- 2) 両群ともに、運動による海馬の神経可塑性向上への関与が報告されている因子(e.g. BDNF, IGF1)に変化はみられなかった。
- 3) MEで変化がみられた遺伝子は、主にタンパク質の合成や脂質代謝、分子の輸送、炎症反応と関連する一方、MEで変化がみられた遺伝子はタンパク質の合成、細胞の成長、分子の輸送、免疫反応に関わることで明らかになった。
- 4) MEは、AHNの促進において重要となるタンパク質合成の促進(増強: IGF2, IRS1)、コレステロールや脂肪酸の輸送(増強: APOE, CD36)、軽度の炎症反応の促進(増強: IL1B, 抑制: TNF)をもたらす遺伝子を変化させた。
- 5) IEではMEで同定された遺伝子に変化は認められず、AHNに対する負の作用が予想されるタンパク質合成の低下(抑制: CAV1)や過剰な炎症反応の亢進(増強: IL1R1, 抑制: IL10)を引き起こす遺伝子

を変化させた。

以上の結果から、低強度運動では AHN および空間記憶の促進を担う新たな候補として、タンパク質合成の促進（増強：IGF2, IRS1）、コレステロールや脂肪酸の輸送（増強：APOE, CD36）、軽度な炎症反応の促進（増強：IL1B, 抑制：TNF）と関連する遺伝子が同定された。



## 第 VIII 章 総合討論

運動は骨格筋のみならず，脳にも作用する(Soya *et al.*, 2011). 数ある脳部位のなかでも，運動は辺縁系に属する海馬に作用し，海馬が司る学習・記憶機能を高める(Alaei *et al.*, 2007; Ang *et al.*, 2006; Uysal *et al.*, 2005; van Praag *et al.*, 1999a). またその背景として，BDNF や IGF1 といった様々な因子を介した AHN 促進の関与が想定されている(Clark *et al.*, 2008; Cotman *et al.*, 2002; Trejo *et al.*, 2008). しかし，これらの研究では，運動条件（強度や時間，頻度）の調節が難しい自発的回転ホイールが用いられており，運動処方への橋渡しを行う上で重要な運動条件に即した研究がなされていない．そのため，海馬の機能を高める運動条件とその分子機構は明らかではない．

近年我々は，運動条件のコントロールが可能なトレッドミルを用いて，海馬の可塑性を高める運動条件の探索に力を入れている．運動強度に着目し，LT 未満をストレスフリーの低強度，LT 以上をストレス反応の亢進を伴う高強度の運動と定義した上で(Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007a), 海馬に対する運動効果の違いを検討してきた．これまでに，低強度でも海馬の神経活動は十分に活性化され(Soya *et al.*, 2007b), 高強度ではなく，低強度で行う 2 週間の運動トレーニングが AHN を促進することを明らかにしている(Okamoto *et al.*, 2012). さらに，低強度運動誘発の AHN を担う一因として，海馬で産生されるアンドロゲンの関与も報告している(Okamoto *et al.*, 2012). AHN は海馬機能の向上を担う一因と考えられていることから(Aimone *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008), LT 未満の低強度が海馬機能を高める可能性がある．またその背景にある分子機構は，技

術革新が進むマイクロアレイ(Valor *et al.*, 2012)やその解析ソフト (IPA)を用いることで、アンドロゲンを含めた全因子の網羅的な検討と主要機構の推定が可能になる。そこで本研究では、高強度運動との比較から海馬機能に対する低強度運動の有用性を明らかにし、その分子機構をマイクロアレイおよび IPA を用いて推定することとした。

### 海馬機能の向上に有効な運動強度の探索

AHN において、新生細胞が海馬機能の向上に寄与する成熟神経細胞に成長までには 4 ~ 6 週間の期間が必要である(Duan *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2008; Jessberger *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008)。そのため、AHN に対する低強度(<LT)運動の効果を明らかにした 2 週間のモデル(Okamoto *et al.*, 2012)では、海馬機能を高めるにはトレーニング期間が不十分と考えられる。事実、2 ~ 4 週間の運動では海馬機能の評価に用いられる MWM の成績が変化しないことが報告されており(李, 2003)、トレーニング期間は 4 週間より長期が望ましいと考えられる。そこで本研究では、トレーニング期間を 6 週間に設定した。

6 週間の新たなトレーニングモデルを確立するにあたり、研究課題 1-1 では、LT を境に異なる強度の 6 週間の走運動トレーニングがストレス反応に及ぼす影響を、典型的なストレス指標である血漿 CORT 濃度と副腎・胸腺湿重量の変化から検討した。その結果、高強度(>LT)運動でのみ汎適応症候群の兆候(高 CORT 血漿、副腎の肥大、胸腺の萎縮)が確認され、これらの変化は低強度(<LT)運動ではみられなかった(図 5)。本研究では、最後の運動トレーニングが終了してから 1 日の安静期間においてサンプリングを実施した。この安静期間は一過的な運動の影響を排除するのに

十分な期間(Piehl, 1974)であることから、本研究課題で得られた結果は慢性的なトレーニング効果を反映している。したがって、研究課題 1-1 では、6 週間の低強度 (<LT) 運動がストレスフリーである一方、高強度 (>LT) 運動では慢性的にストレス反応が亢進されることが明らかになった。本研究では、このストレスレベルが異なる 6 週間モデルを用いて以後の全ての実験を行った。

研究課題 1-2 では、海馬機能に対する低強度運動の有用性を検証する上で前提条件となる AHN の変化を 6 週間モデルで検討した。実験では、6 週間モデルでも、我々の先行研究(Okamoto *et al.*, 2012)と同様に、低強度 (<LT) 運動が AHN を促進する一方、高強度 (>LT) 運動ではその効果が消失するか、確認を行った。AHN に対する運動効果の違いを増殖 (Ki-67+) 細胞、生存 (BrdU+) 細胞、新生成熟神経 (BrdU+ /NeuN+) 細胞に分けて検討したところ、運動強度に関係なく増殖細胞が増加する一方、生存および新生成熟神経細胞は低強度 (<LT) 運動でのみ増加することが明らかになった (図 8)。これらの結果は、我々が 2 週間モデルで AHN を検討した先行研究の結果(Okamoto *et al.*, 2012)と一致する。増殖細胞は自己分裂能を持った細胞であり(Aimone *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008)、これが両運動群で増加したことは、運動が強度に関係なく新しい細胞の産生を促進することを示している。しかし、増殖細胞は神経細胞としては未発達の細胞であり、海馬機能との関連が乏しい。そのため、海馬の機能向上を考える場合には、増殖細胞のうち、神経に分化し、神経細胞として成熟した細胞 (新生成熟神経細胞) を増加させることが重要と考えられる。本研究課題で新生成熟神経細胞の増加がみられたのは低強度運動のみであるため、新生細胞の成熟過程全体を通じた AHN の促進には低強度

( $<LT$ ) 運動が効果的であると結論づけられる。この結果は、海馬機能に対する低強度 ( $<LT$ ) 運動の有用性を検証する上での前提条件が満たされたこと、すなわち、低強度 ( $<LT$ ) 運動によって海馬機能が向上する可能性を示唆している。

この仮説を検証するために、研究課題 1-3 では、異なる強度の走運動トレーニングがモリス水迷路 (MWM) のテスト成績に及ぼす影響を検討した。MWM は海馬が司る空間学習記憶能力を評価するテストであり、場所学習逃避訓練の成績から記憶の獲得 (学習) 能力、プローブテストの成績から記憶の保持・想起能力の評価を行う (D'Hooge *et al.*, 2001; Vorhees *et al.*, 2006)。本研究の結果、場所学習逃避訓練では、安静、低強度 ( $<LT$ ) および高強度 ( $>LT$ ) のすべての群で学習に伴う成績の向上 ( $p<0.05$ ) が確認されたものの、各群間に有意差は認められなかった (図 9, 表 2)。この結果は、各群ともすべての個体が訓練を通してプラットフォームの位置を適切に学習したものの、運動が記憶の獲得 (学習) 能力に影響を及ぼさなかったことを示している。一方、プローブテストでは、安静群と比較して、低強度運動群でのみ有意な成績の向上 ( $p<0.05$ ) が認められた (図 9, 表 2)。具体的には、高強度および安静群におけるターゲットゾーンでの滞在時間の割合が約 24%であったのに対し、低強度運動群では約 33%であった (図 9 B)。場所学習逃避訓練ではいずれの群も同程度の学習到達度であったことから、この結果は、低強度運動が場所学習逃避訓練で得た学習効果をより長期間持続させること、つまり、記憶の保持能力を高めることを示している。記憶の獲得 (学習) 能力に対する低強度運動の効果がみられなかった理由は定かではないが、我々の低強度運動モデルと同程度の走速度でトレーニングした実験動物では、やはり記憶の獲得ではなく保持が向上

することが報告されている (Alaei *et al.*, 2008; Hoveida *et al.*, 2011; Marlatt *et al.*, 2012). これらの研究を踏まえると、低強度 (<LT) 運動は記憶の獲得に比べ、保持に対する効果が強いことが考えられる。また、運動で高まる AHN が記憶の保持能力の向上に必須であるとする報告 (Clark *et al.*, 2008; Rhodes *et al.*, 2003) は、本研究課題で明らかにした低強度運動による記憶の保持能力の向上が研究課題 1-2 で確認した新生成熟神経細胞の増加に依存するという可能性を示唆する。

以上のことから、研究課題 1 において、記憶の保持能力を高める運動条件として、ストレスフリーの 6 週間の低強度 (<LT) 運動の有用性が確認され、その背景には同運動条件で高まる AHN の関与が示唆された。

#### **低強度運動で高まる海馬機能の分子機構の推定：高強度との比較**

研究課題 2 では、低強度の運動で高まる空間記憶の分子機構を推定するために、異なる強度の運動が海馬遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析し、各群で統計的に変化が著しかった遺伝子群 (ネットワーク) のなかから AHN と関連する因子や機構を抽出した。なお、海馬遺伝子発現の網羅的解析にはマイクロアレイを用い、マイクロアレイで同定した遺伝子のネットワーク解析には IPA を用いた。

マイクロアレイで信頼性の高い結果を得るためには、組織から適切な状態で RNA を抽出することが必須条件である (Burgess, 2001; Duggan *et al.*, 1999). もし海馬の均質化 (ホモジナイズ) の時点で RNA に分解が起ったり、RNA 抽出の時点で塩やタンパク質といった不純物が混ざってしまうと、マイクロアレイの検出感度が低下し、全遺伝子の正確な解析が困難になる。そこで本研究課題では、total RNA の電気泳動と内部標準 (GAPDH,  $\beta$  A

クチン)の RT-PCT, 光学密度 (OD, Opitical Densitiy) 測定を行い, RNA の分解とコンタミネーションの有無を確認することで, 海馬からの RNA 抽出が上手くいったかどうかを確かめた. その結果, すべての個体の total RNA で 18S と 28S リボソーム RNA の存在と内部標準の均一な発現を確認した (図 12, 表 3). また, 260:280 と 260:230 の OD 比はいずれも基準値の 1.8 を超えていた (表 3). これらの結果は, 抽出した RNA に分解や不純物のコンタミネーションがみられず, マイクロアレイ解析への使用が可能であることを示している (Hirano *et al.*, 2008; Masuo *et al.*, 2009).

この RNA を用いてマイクロアレイによる海馬遺伝子発現の網羅的解析を行った結果, 低強度運動 (604 個) は高強度運動 (415 個) と比べて多くの遺伝子発現を変化させ, それらの遺伝子のうち 93% (563 個) の遺伝子が低強度運動特異的に変化することが明らかになった (図 13). この結果は, 低強度運動が海馬神経のより大きな可塑的变化を引き起こし, それが高強度運動とは独立した機構や因子によって調節されていることを示唆す興味深い知見である. 我々の先行研究 (Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007a) と本研究の研究課題 1-1 において, LT 未満の低強度運動はストレスフリーである一方, LT 以上の高強度運動はストレスホルモンの分泌促進を伴う運動ストレスモデルであることを確認している (図 5). したがって, 運動強度に依存してマイクロアレイで同定された遺伝子数に違いがみられた背景には, ストレスの有無が関係している可能性が高い.

興味深いことに, 両群で同定された遺伝子のなかに, 運動による海馬の神経適応への関与が報告されている BDNF や IGF1, VEGF (Fabel *et al.*, 2003; Marlatt *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2011; Trejo *et al.*, 2001; Trejo *et al.*, 2008) は含まれていなかった. これには, 本研究において海馬のサン

プリングを最終トレーニングの2日後に行ったことと、マイクロアレイで解析可能なのは海馬で合成される因子のみであるということの2つが関係していると考えられる。例えば、BDNFの遺伝子発現は運動によって一過的に高まるものの、2日後には元のレベルにまで低下する(Huang *et al.*, 2006)。また、IGF1やVEGFは主に末梢で合成され、血液を介して海馬に作用する(Fabel *et al.*, 2003; Trejo *et al.*, 2001; Trejo *et al.*, 2008)。これらの報告を踏まえると、本研究でBDNFやIGF1が同定されなかったのは当然の結果といえ、むしろ妥当性が高い結果と考えるべきである。しかし、BDNFやIGF1が低強度運動による海馬の可塑性の調節に関与していないと結論づけることはできない。なぜなら、本研究の低強度運動では、IGF1の下流に位置するIRS1(Myers *et al.*, 1993)の発現増強を確認しており(図15)、これが低強度運動によるIGF1作用の増強を示唆しているからである。今後は運動直後からの遺伝子発現の変化や末梢由来の物質も定量可能な解析方法(e.g.プロテオミクス)の導入などが必要と思われる。

続いて、マイクロアレイのデータを基にIPAを用いて、各群で変化が著しかった遺伝子ネットワークを統計的( $p < 0.05$ )に解析した。IPAの結果、低強度運動はタンパク質の合成や脂質代謝、分子の輸送、炎症反応に関わる遺伝子群を変化させ(図15)、一方、高強度運動はタンパク質の合成、細胞の成長、分子の輸送、免疫反応に関わる遺伝子群を変化させることが明らかになった(図16)。本研究では、海馬機能の向上を担う一因としてAHNに着目しているため(研究課題1-2)、これらの遺伝子のなかからAHNと関連がある遺伝子を抽出した。その結果、低強度運動によるAHNの促進に関わる因子として、タンパク質合成の促進(増強:IGF2, IRS1)、コレステロールや脂肪酸の輸送(増強:APOE, CD36)、軽度の炎症反応の

促進（増強：IL1B, 抑制：TNF）に関わる遺伝子が候補にあがった（図 15）。一方、高強度運動では、運動による AHN 促進効果を消去させる因子として、タンパク質合成の低下（抑制：CAV1）や過剰な炎症反応の亢進（増強：IL1R1, 抑制：IL10）を引き起こす遺伝子が候補にあがった（図 16）。なお、各遺伝子の AHN 調節における詳細な役割は研究課題 2 の考察（pp.72-76）に示している。本章では、得られた結果を基に、AHN に焦点を当てて低強度運動で高まる記憶保持・想起能力の分子機構を推定した（図 17）。

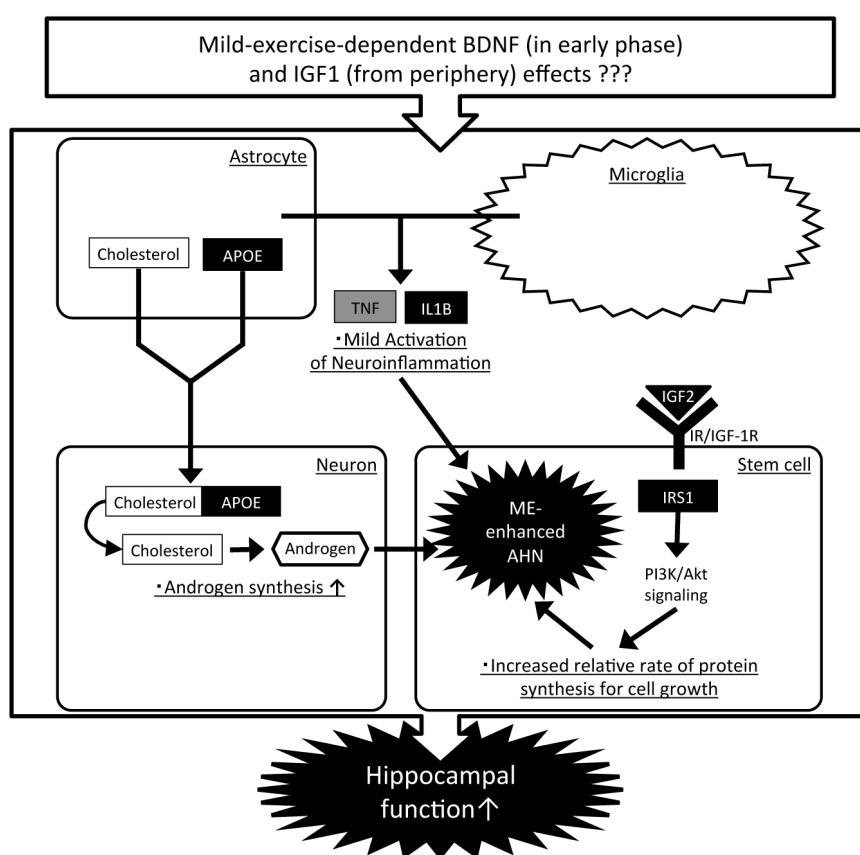


図 17 低強度運動で高まる空間記憶の推定機構

Genes regulated by ME mapped to the pre-existing signaling pathway based on IPA-modified gene networks and previous literature. The names of up-regulated genes are written in white characters on a black background, those of down-regulated genes are written in black characters on a gray background, and those of unaltered genes are written in black characters on a white background. The genes and pathways related to lipid metabolism (cholesterol-trafficking), protein synthesis and inflammatory response that were up-regulated by ME might be a key to the process of enhancing hippocampal function through increased AHN.



低強度運動による AHN 促進の調節因子には、遺伝子発現の増強が確認された IGF2 や IRS1, APOE, CD36, IL1B と、抑制が確認された TNF が候補にあがった (図 15). IRS1 はインスリンや IGF1, IGF2 によって活性化され、下流の経路 (PI3K/Akt 経路や MAPK/ERK 経路) を介してタンパク質合成を促進し、細胞の生存を高める作用を持つ (Bracko *et al.*, 2012; Folli *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 2004). 本研究課題では、低強度運動による IGF2 遺伝子の発現増強 (図 14, 表 S2) と MAPK 遺伝子の抑制 (図 15A) を確認しているため、低強度運動は IGF2-IRS1-PI3K/Akt の経路を介して、新生細胞の成長および生存に不可欠なタンパク質合成を促進している可能性がある. CD36 の海馬内での役割は未だ明らかではないものの、APOE はアストロサイトで合成されるコレステロール (Vance *et al.*, 2005) を神経に輸送する (Pfrieger, 2003). 神経ではコレステロールから細胞の成長促進効果を持つさまざまなステロイドホルモンが合成されており (Kimoto *et al.*, 2001), なかでも低強度運動は男性ホルモンの一つであるアンドロゲンの合成を高め、それを介して AHN を促進する (Okamoto *et al.*, 2012). したがって、低強度運動による APOE 遺伝子発現の増強 (図 15A) は、神経へのコレステロール輸送を高めることで、間接的にアンドロゲン作用を増強し、AHN を促進していると考えられる. また、炎症性サイトカインに属する IL1B や TNF は主にミクログリアやアストロサイトから分泌される. 海馬の神経可塑性と炎症反応の間には逆 U 字の関係があり、海馬の神経可塑性や機能は炎症反応が過度に活性化または抑制された場合には低下し、軽度に活性化された場合には促進する (Yirmiya *et al.*, 2011). 低強度運動で IL1B が増強され (図 15A), TNF が抑制された (図 15A, C) ことは、低強度運動が炎症反応の軽度な活性化を引き起こし、それを介し

て AHN の促進や記憶保持・想起の増強が起っている可能性を示す。

以上のように、研究課題 2 において、①タンパク質合成の促進をもたらす IGF2-IRS1-PI3K/Akt 経路の活性化や、②神経へのコレステロール輸送を高める APOE の増強、③炎症反応の軽度な活性化を引き起こす IL1B の増強および TNF の抑制が低強度運動による AHN を介した海馬機能の向上を担う新たな機構として想定された。

### 低強度運動の何が海馬の可塑性変化をもたらしたか？

我々が運動を遂行するためには、身体を動かし、さらに身体を動かす上で必要なエネルギーの確保が必須になる。これらの役割を担っているのが、骨格筋や心臓、肺といった器官であり、運動の実行は骨格筋の収縮弛緩や心拍・呼吸数の増加によって支えられている。骨格筋の収縮弛緩や心拍・呼吸数の増加といった各器官の活動量の増加は、それが刺激となり、各器官の適応および機能改善を引き起こし、結果的に、身体能力の向上をもたらす。このように、骨格筋や心臓、肺では、運動に伴う活動量の増加がその後の適応および機能改善を引き起こすトリガーとなることが容易に想像できる。一方、記憶という一見すると運動とは無縁の現象を司る海馬が運動によって影響を受け、変化することは想像しがたい。しかし、運動による海馬の適応を考える場合にも、やはり“活動”の変化が重要なカギとなる。海馬での“活動”とは、すなわち“神経活動”のことであり、先行研究では、運動がグルタミン酸受容体の一つである NMDA 型受容体を介して海馬の神経活動を高めること、そして、それが LT 未満の低強度運動でも誘発されることが報告されている (Lee *et al.*, 2003; Nishijima *et al.*, 2012; Nishijima *et al.*, 2006; Soya *et al.*, 2007b)。海馬では、NMDA 型受容体を

介して神経活動が亢進されると、神経の可塑性向上に関わる様々な遺伝子  
が変化する(Li *et al.*, 2011). さらに、神経活動の亢進が新生細胞の神経へ  
の分化を促進することも報告されている(Babu *et al.*, 2009; Deisseroth *et al.*,  
2004). このように、神経活動の亢進が海馬の神経適応の基盤となっ  
ており、本研究で明らかにした低強度運動特異的な AHN の促進や海馬機能の  
向上、そして遺伝子発現の変化も、低強度運動による海馬神経活動の亢進  
がトリガーになっている可能性が高い。

では、一体なぜ運動によって海馬が活性化するのでろうか？海馬には場  
所細胞と呼ばれる特殊な細胞が存在する。O'keefe ら (1971) によって発見  
された場所細胞には、動物が特定の場所に達したとき、それに反応して特  
定の細胞が活性化するという性質がある(O'Keefe *et al.*, 1971). 場所細胞が  
集まって形成された地図を“認知地図：cognitive map”といい、認知地図  
によって動物が動き回る環境全体がカバーされていると考えられている  
(O'Keefe, 1979; Tolman, 1948). 近年では、記憶における場所細胞の貢献  
も示唆されており、例えば、動物を新奇環境に暴露すると場所細胞の活性  
化がみられ、その数日～数ヶ月後に同じ環境に戻すと、新奇環境で活性化  
のみられた細胞が再び活性化する(Frank *et al.*, 2004; Thompson *et al.*,  
1990; Ziv *et al.*, 2013). 運動は場所の変化を伴う活動であり、運動を成立  
させるためにはその変化を記憶する必要がある。屋外でのランニングを一  
例に挙げると、周囲の環境変化から現在自分がどこを走っているのかを正  
しく理解し、その道筋を記憶しておかなければ、自宅へ戻ることができな  
い。これは実験室においてラットがトレッドミル走を行う場合も同様で、  
電極に触れずに走行を続けるためには、現在の自分の位置を正しく把握す  
るとともに、どの位置で走りを維持するべきかを記憶しておかなければな

らない。このように、海馬には“場所を認知し、それを記憶する”という機能が備わっており、運動時には、運動そのものが正しく遂行させるために海馬が活性化しているのかもしれない。そして、この活性化の増大が引き金となって海馬神経の可塑的な変化が起こり、結果的に機能改善がもたらされると考えられる。

### 本研究の意義と今後の課題

本研究は、過去の自発的回転ホイールを用いた研究(van Praag *et al.*, 1999a)とは異なり、LTを基準に運動強度を規定した上で、海馬機能に対する運動効果の検証とその背景にある機構の推定を行った初めての研究である。

研究課題1において、慢性的なストレス反応の亢進を伴う高強度(>LT)運動ではなく、ストレスフリーの低強度(<LT)運動で海馬機能が向上することを報告した。一般的に、ヒトを対象とした研究では、認知機能(Hyodo *et al.*, 2012; Kamijo *et al.*, 2007; Yanagisawa *et al.*, 2010)や海馬機能(Erickson *et al.*, 2011)の向上には中強度(LT付近)領域の運動が有効とする見方が強い。一方、本研究の結果は、低強度運動でも十分に効果が期待できることを示す興味深い知見である。LT未満の低強度運動は、LT以上の中～高強度の運動とは異なり、ストレス反応が惹起されない軽い運動である(Saito *et al.*, 2004; Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007a)。そのため、健常成人のみならず、子どもや高齢者、さらにはアルツハイマー病(AD, alzheimer's disease)を有する認知症患者のように体力レベルが低い対象者でも取り組むことができる。我々の低強度運動モデルと近似する運動条件では、運動がADに伴う記憶障害の悪化を抑制することが既に報告されて

おり(Hoveida *et al.*, 2011), これらの対象者に対する低強度運動の効果は十分に期待できる。一方, 高強度運動でみられた慢性的なストレス反応の亢進とそれに伴う高 CORT 血漿は(図 5 B), 海馬の神経適応において負の作用を示し(Conrad, 2010; Mirescu *et al.*, 2006), AD を加速させる一因とも考えられている(Rothman *et al.*, 2010)。本研究の高強度運動において, 低強度運動でみられた海馬機能に対する運動効果が消去されたように, いずれの対象者でも長期の高強度運動トレーニングによって海馬機能を高めるのは難しく, 反対に, 機能低下を引き起こす可能性が高いと考えられる。このように, 本研究で得られた結果は, ヒトの運動処方や臨床において低強度運動の有用性を示唆する極めて重要な知見といえる。

しかし, 本研究をヒトの運動処方や臨床に繋げるためには, より様々な運動条件において, 海馬機能に対する低強度運動の有用性を検討していく必要がある。例えば, 本研究の低強度運動(15 m/min)は, 約 20 m/min に存在するラットの LT(Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007a)を基準にすると, 中強度運動の約 75%負荷に相当し, 今後はより低い運動強度で手軽に海馬機能を高めることができないか, 検討の余地がある。加えて, これまで主流とされてきた中強度運動との比較から, 低強度運動が中強度運動に匹敵する海馬機能の向上効果を持つかも検討の必要がある。また本研究では, 強度以外の運動条件は両運動群で統一し, 時間は 60 分/回, 頻度は 5 回/週, 期間は 6 週間とした。そのため, 時間, 頻度, 強度の積から算出される運動の量が両運動条件で異なっており, この違いが海馬機能に対する運動効果の差異を生んだ可能性がある。もし高強度運動でも 1 回の運動時間を減らし, 低強度運動と同様の運動量にするなど, 条件を工夫すれば, 慢性的な高 CORT 血漿が解消され, AHN や海馬機能が高められるかもしれない。

これを裏付けるように、短時間で高い仕事量の確保が可能な間欠的高強度運動では、慢性的な高 CORT 血漿がみられず、海馬機能が向上することが明らかになっている (Lee *et al.*, 2012). さらに、ヒトへの応用を考える場合には、運動条件以外にも、どのような対象者に低強度運動が有効か、運動経験や体力レベルが異なる個体に対して低強度運動の有用性を検証しておく必要がある。本研究では、11 週齢に至るまで安静生活を送ってきたラットに対して低強度運動を施した結果、海馬機能の向上を認めた (図 9)。言い換えれば、11 週齢にして初めて低強度運動を経験したラットで海馬機能の向上を確認した。そのため、本研究からでは、低強度で運動を行うことと初めて運動を経験することのどちらが海馬機能の向上に重要か不明である。そこで、今後はあらかじめ運動トレーニングされた個体とされていない個体において低強度運動の効果を検証するといった実験が必要になると考えられる。以上のように、本研究をヒトへ橋渡しするためには、まだまだ解決すべき課題が山積しており、今後は本研究を足がかりとしたより詳細な研究が必要である。

一方、研究課題 2 では、低強度運動がタンパク質合成の促進やコレステロールの輸送、軽度の炎症反応の促進と関連する遺伝子群を変化させるとを明らかにした (図 15)。さらに、AHN との関連で遺伝子の絞り込みを行ったところ、BDNF や IGF1, VEGF といったこれまでに想定されてきた因子ではなく、IGF2-IRS1-PI3K/Akt 経路, APOE, IL1B, TNF といった新たな因子が低強度運動による AHN および海馬機能の促進に寄与する可能性を見出した (図 17)。先行研究において、PI3K/Akt 経路は運動による AHN の促進と LTP の増強に関わることが報告されている (Bruel-Jungerman *et al.*, 2009)。一般的に、PI3K/Akt 経路の上流因子としては、BDNF (Huang *et*

*al.*, 2006)や IGF1 (Trejo *et al.*, 2008)が有名である。しかし本研究では、両因子とも同定されず、代わりに IGF2 の発現増強が確認された。近年、IGF2 も PI3K/Akt 経路の上流に位置し (Bracko *et al.*, 2012), AHN の調節や海馬機能の向上に寄与することが明らかになっている (Bracko *et al.*, 2012; Welberg, 2011)。そのため、低強度運動では IGF2-IRS1-PI3K/Akt 経路を介して AHN や海馬機能の向上がもたらされている可能性が高い。一方、APOE や IL1B, TNF が運動による海馬神経可塑の向上に関わることを示した報告はなく、本研究によって初めてその可能性が示唆された。これら IGF2-IRS1-PI3K/Akt 経路, APOE, IL1B, TNF は、今後、低強度運動で高まる AHN および海馬機能の分子機構を詳細に検討していく上で、新たな標的となる。まずは、これらの因子や機構が低強度運動による AHN の促進に関与するか、遺伝子改変動物や特異的阻害剤を用いた実験を行い、両者の因果関係を解明することが大きな課題となる。

## 第 IX 章 総括

本研究では、LT を基準に、異なる強度の 6 週間の走運動トレーニングがラットのストレス反応および AHN に与える影響を確認した上で、海馬機能に対する低強度（LT 未満）運動の有用性を検証し、その分子機構を海馬遺伝子発現の網羅的变化から推定した。本研究により、以下の知見を得た。

### 【研究課題 1】海馬機能を高める運動強度の解明

#### 研究課題 1-1：6 週間モデルの確立-ストレスレベルの検討-

LT を基準に、異なる強度の 6 週間の走運動トレーニングがラットのストレス反応に及ぼす影響を確認した。その結果、高強度（>LT）運動群では典型的なストレス兆候（副腎の肥大、胸腺の萎縮、安静時の高 CORT 血漿）が確認されたものの、低強度（<LT）運動群ではこれらの兆候は認められなかった。これにより、LT を基準に、6 週間の高強度運動は慢性的なストレス反応の亢進を伴う一方、低強度運動はストレスフリーであることが明らかになった。

#### 研究課題 1-2：6 週間モデルの確立-AHN の確認-

先行研究において、2 週間の低強度（<LT）運動が海馬機能の向上を担う AHN を促進する一方、高強度（>LT）運動ではその効果が消失することが確認されている。そこで本研究では、6 週間モデルでも同様の結果が得られるか確認したところ、低強度運動群でのみ、新生細胞の生存（BrdU<sup>+</sup>細胞）や成熟（BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>細胞）の促進がみられ、これらの変化は高強度運動群では明らかではなかった。この結果は 2 週間モデ



ルの結果と一致し、海馬機能の向上を担う AHN の促進には、低強度運動が有効であることを示している。

### **研究課題 1-3 : 海馬の機能向上に有効な運動条件の解明**

研究課題 1-2 に基づき、低強度 (<LT) 運動が海馬の機能を高めるのに対し、高強度 (>LT) 運動ではこの運動効果が消失するという仮説を検証した。両運動群において、記憶獲得 (学習) の課題成績に変化はみられなかったものの、記憶保持・想起の課題成績は低強度運動群で有意に高く、高強度運動群では変化が認められなかった。これらの結果は、海馬の機能向上には、高強度運動ではなく、低強度が有効であり、低強度運動では特に記憶の保持や想起が増強されることを示している。

以上、6 週間のトレーニングモデルを用いて、ラットでは、ストレスフリーの低強度 (<LT) 運動が AHN および空間記憶を高める一方、慢性的なストレス反応の亢進を伴う高強度 (>LT) 運動ではその効果が消失することを明らかにした。この結果は、海馬の神経可塑性および機能の向上には、高強度ではなく、低強度の運動で十分であることを示し、さらに、低強度運動による記憶の保持・想起能力の向上が AHN の促進を介していることを示唆する。

### **【研究課題 2】低強度運動で高まる海馬機能の分子機構の検討**

研究課題 1 と同様の 6 週間モデルで海馬遺伝子発現の網羅的解析を行い、高強度 (>LT) 運動との比較から、低強度 (<LT) 運動により高まる AHN および海馬機能の分子機構を推定した。各運動条件で変化がみら

れた海馬遺伝子の網羅的解析にはマイクロアレイを用い、そのデータを基に IPA によって、各群で変化が著しいネットワークの統計解析を行った。その結果、両群ともに BDNF や IGF1 など、運動と海馬の研究で過去に報告されてきた因子は同定されなかった。代わりに、低強度運動はタンパク質の合成や脂質代謝、分子の輸送、炎症反応と関連する遺伝子群に変化を与え、一方、高強度運動はタンパク質の合成、細胞の成長、分子の輸送、免疫反応に関わる遺伝子群に変化を与えることが明らかになった。さらに AHN との関連で詳細に検討したところ、①タンパク質合成の促進をもたらす IGF2-IRS1-PI3K/Akt 経路の活性化や、②神経へのコレステロール輸送を高める APOE の増強、③炎症反応の軽度な活性化を引き起こす IL1B の増強および TNF の抑制が低強度運動による AHN を介した空間記憶の向上を担う新たな機構として想定された (図 17)。

研究課題 2 によって、低強度運動による海馬神経可塑性の向上を担う新たな因子・機構として、①IGF2-IRS1-PI3K/Akt 経路、②APOE、③IL1B および TNF の 3 つが想定された。これら新たな候補は、今後、なぜ海馬機能の向上には高強度運動ではなく、低強度運動が有効なのか、そのメカニズムを詳細に検討していく上で足がかりになる。また、今後海馬機能を高める最適な運動条件を探っていく際にも、その標的となる可能性が高い。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり，終始懇篤なご指導とご高閲を賜りました征矢英昭教授に対し，深く感謝の意を表します．誠にありがとうございました．また，本研究に際し，適宜実験のご協力やご助言を頂きました筑波大学体育系 Rakwal Randeep 教授，岡本正洋助教，松井崇助教，ならびに柴藤順子氏，イミンチョル氏をはじめとする筑波大学運動生化学研究室の皆様にご心からお礼を申し上げます．

最後に，研究の糧となるすべての実験動物に対し，深い感謝と追悼の意を表します．

## 参考文献

**Aguiar AS, Boemer G, Rial D, Cordova FM, Mancini G, Walz R, de Bem AF, Latini A, Leal RB, Pinho RA, Prediger RD.** High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. *Neuroscience* 171: 1216-1227, 2010.

**Aimone JB, Deng W, Gage FH.** Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends Cogn Sci* 14: 325-337, 2010.

**Alaei H, Moloudi R, Sarkaki AR.** Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *J Bodyw Mov Ther* 12: 72-75, 2008.

**Alaei H, Moloudi R, Sarkaki AR, Azizi-Malekabadi H, Hanninen O.** Daily running promotes spatial learning and memory in rats. *J Sports Sci Med* 6: 429-433, 2007.

**Altman J, Das GD.** Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335, 1965.

**Altman J, Das GD.** Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214: 1098-1101, 1967.

**Altman N.** Replication, variation and normalisation in microarray experiments. *Appl Bioinformatics* 4: 33-44, 2005.

**Ang ET, Dawe GS, Wong PT, Moochhala S, Ng YK.** Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res* 1113: 186-193, 2006.

**Babu H, Ramirez-Rodriguez G, Fabel K, Bischofberger J, Kempermann G.** Synaptic network activity induces neuronal

differentiation of adult hippocampal precursor cells through BDNF signaling. *Front Neurosci* 3: 49, 2009.

**Bachman DL, Wolf PA, Linn RT, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, White LR, D'Agostino RB.** Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study. *Neurology* 43: 515-519, 1993.

**Besshoh S, Bawa D, Teves L, Wallace MC, Gurd JW.** Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem* 93: 186-194, 2005.

**Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG.** Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291: 17-20, 2000.

**Bilderback TR, Gazula VR, Lisanti MP, Dobrowsky RT.** Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* 274: 257-263, 1999.

**Binder DK.** Neurotrophins in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163: 371-397, 2007.

**Bracko O, Singer T, Aigner S, Knobloch M, Winner B, Ray J, Clemenson GD, Suh H, Couillard-Despres S, Aigner L, Gage FH, Jessberger S.** Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 32: 3376-3387, 2012.

**Bruel-Jungerman E, Veyrac A, Dufour F, Horwood J, Laroche S, Davis S.** Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PLoS One* 4, 2009.

**Burger C, Lopez MC, Baker HV, Mandel RJ, Muzyczka N.**

Genome-wide analysis of aging and learning-related genes in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem* 89: 379-396, 2008.

**Burgess JK.** Gene expression studies using microarrays. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 321-328, 2001.

**Buuck RJ, Tharp GD.** Effect of chronic exercise on adrenocortical function and structure in the rat. *J Appl Physiol* 31: 880-883, 1971.

**Byun K, Hyodo K, Suwabe K, Ochi G, Sakairi Y, Kato M, Dan I, Soya H.** Positive effect of acute mild exercise on executive function via arousal-related prefrontal activations: an fNIRS study. *Neuroimage* 98: 336-345, 2014.

**Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FA.** Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 140: 409-413, 2005.

**Chang YT, Chen YC, Wu CW, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Kuo YM.** Glucocorticoid signaling and exercise-induced downregulation of the mineralocorticoid receptor in the induction of adult mouse dentate neurogenesis by treadmill running. *Psychoneuroendocrinology* 33: 1173-1182, 2008.

**Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, Blitzler RD, Alberini CM.** A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 469: 491-497, 2011.

**Chen WQ, Diao WF, Viidik A, Skalicky M, Hoyer H, Lubec G.** Modulation of the hippocampal protein machinery in voluntary and treadmill exercising rats. *Biochim Biophys Acta* 1784: 555-562, 2008.

**Chennaoui M, Gomez Merino D, Lesage J, Drogou C, Guezennec CY.** Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. *Acta Physiol Scand* 175:

113-121, 2002.

**Cho YH, Friedman E, Silva AJ.** Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behav Brain Res* 98: 77-87, 1999.

**Choi JH, Yoo KY, Lee CH, Yi SS, Yoo DY, Seong JK, Yoon YS, Hwang IK, Won MH.** Effects of treadmill exercise combined with MK 801 treatment on neuroblast differentiation in the dentate gyrus in rats. *Cell Mol Neurobiol* 31: 285-292, 2011.

**Chorna NE, Santos-Soto IJ, Carballeira NM, Morales JL, de la Nuez J, Catala-Valentin A, Chorny AP, Vazquez-Montes A, De Ortiz SP.** Fatty Acid synthase as a factor required for exercise-induced cognitive enhancement and dentate gyrus cellular proliferation. *PLoS One* 8: e77845, 2013.

**Clark PJ, Bhattacharya TK, Miller DS, Kohman RA, DeYoung EK, Rhodes JS.** New neurons generated from running are broadly recruited into neuronal activation associated with three different hippocampus-involved tasks. *Hippocampus* 22: 1860-1867, 2012.

**Clark PJ, Brzezinska WJ, Puchalski EK, Krone DA, Rhodes JS.** Functional analysis of neurovascular adaptations to exercise in the dentate gyrus of young adult mice associated with cognitive gain. *Hippocampus* 19: 937-950, 2009.

**Clark PJ, Brzezinska WJ, Thomas MW, Ryzhenko NA, Toshkov SA, Rhodes JS.** Intact neurogenesis is required for benefits of exercise on spatial memory but not motor performance or contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Neuroscience* 155: 1048-1058, 2008.

**Coleman MA, Garland T, Jr., Marler CA, Newton SS, Swallow JG, Carter PA.** Glucocorticoid response to forced exercise in laboratory house mice (*Mus domesticus*). *Physiol Behav* 63: 279-285, 1998.

**Conlon JM, Youson JH, Whittaker J.** Structure and receptor-binding activity of insulin from a holostean fish, the bowfin (*Amia calva*). *Biochem J* 276: 261-264, 1991.

**Conrad CD.** A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34: 742-755, 2010.

**Conrad CD, Lupien SJ, McEwen BS.** Support for a bimodal role for type II adrenal steroid receptors in spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 72: 39-46, 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.

**D'Hooge R, De Deyn PP.** Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36: 60-90, 2001.

**Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC.** Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42: 535-552, 2004.

**Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F.** Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 140: 823-833, 2006a.

**Ding Q, Vaynman S, Souda P, Whitelegge JP, Gomez-Pinilla F.** Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis. *Eur J Neurosci* 24: 1265-1276, 2006b.

**Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H.** Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 18: 108-115, 2008.



**Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM.** Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21: 10-14, 1999.

**Ehninger D, Kempermann G.** Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 331: 243-250, 2008.

**Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF.** Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 3017-3022, 2011.

**Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH.** Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317, 1998.

**Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD.** VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18: 2803-2812, 2003.

**Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G.** Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23: 373-382, 2003.

**Folli F, Bonfanti L, Renard E, Kahn CR, Merighi A.** Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. *J Neurosci* 14: 6412-6422, 1994.

**Fordyce DE, Farrar RP.** Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. *Behav Brain Res* 46: 123-133, 1991.

**Fordyce DE, Wehner JM.** Physical activity enhances spatial learning

performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Res* 619: 111-119, 1993.

**Frank LM, Stanley GB, Brown EN.** Hippocampal plasticity across multiple days of exposure to novel environments. *J Neurosci* 24: 7681-7689, 2004.

**Friedenberg RM.** Dementia: one of the greatest fears of aging. *Radiology* 229: 632-635, 2003.

**Funk JA, Gohlke J, Kraft AD, McPherson CA, Collins JB, Jean Harry G.** Voluntary exercise protects hippocampal neurons from trimethyltin injury: possible role of interleukin-6 to modulate tumor necrosis factor receptor-mediated neurotoxicity. *Brain Behav Immun* 25: 1063-1077, 2011.

**Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H.** A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54: 559-566, 2007.

**Ge SY, Sailor KA, Ming GL, Song HJ.** Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol* 586: 3759-3765, 2008.

**Golan H, Levav T, Mendelsohn A, Huleihel M.** Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function. *Cereb Cortex* 14: 97-105, 2004.

**Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, Renbaum P, Zalstein Y, Ben-Hur T, Levy-Lahad E, Yirmiya R.** A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology* 32: 1106-1115, 2007.

**Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, Mcewen BS.** Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 12: 3642-3650, 1992.

**Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG.** Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10910-10917, 2001.

**Gratzner HG.** Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475, 1982.

**Harada T, Okagawa S, Kubota K.** Jogging improved performance of a behavioral branching task: implications for prefrontal activation. *Neurosci Res* 49: 325-337, 2004.

**Head BP, Patel HH, Tsutsumi YM, Hu Y, Mejia T, Mora RC, Insel PA, Roth DM, Drummond JC, Patel PM.** Caveolin-1 expression is essential for N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Src and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and protection of primary neurons from ischemic cell death. *FASEB J* 22: 828-840, 2008.

**Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF.** Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci* 9: 58-65, 2008.

**Hillman CH, Snook EM, Jerome GJ.** Acute cardiovascular exercise and executive control function. *Int J Psychophysiol* 48: 307-314, 2003.

**Hirano M, Rakwal R, Shibato J, Sawa H, Nagashima K, Ogawa Y, Yoshida Y, Iwahashi H, Niki E, Masuo Y.** Proteomics- and transcriptomics-based screening of differentially expressed proteins and genes in brain of Wig rat: a model for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) research. *J Proteome Res* 7: 2471-2489, 2008.

**Ho NF, Han SP, Dawe GS.** Effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis in cholinergic lesioned mice. *BMC Neurosci* 10, 2009.

**Huang AM, Jen CJ, Chen HF, Yu L, Kuo YM, Chen HI.** Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic

factor. *J Neural Transm* 113: 803-811, 2006.

**Hunsberger JG, Newton SS, Bennett AH, Duman CH, Russell DS, Salton SR, Duman RS.** Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF. *Nat Med* 13: 1476-1482, 2007.

**Hyodo K, Dan I, Suwabe K, Kyutoku Y, Yamada Y, Akahori M, Byun K, Kato M, Soya H.** Acute moderate exercise enhances compensatory brain activation in older adults. *Neurobiol Aging* 33: 2621-2632, 2012.

**Jessberger S, Kempermann G.** Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18: 2707-2712, 2003.

**Kamijo K, Nishihira Y, Higashiura T, Kuroiwa K.** The interactive effect of exercise intensity and task difficulty on human cognitive processing. *Int J Psychophysiol* 65: 114-121, 2007.

**Kaplan MS, Bell DH.** Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4: 1429-1441, 1984.

**Kaplan MS, Bell DH.** Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Exp Brain Res* 52: 1-5, 1983.

**Kaplan MS, Hinds JW.** Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092-1094, 1977.

**Kawashima H, Saito T, Yoshizato H, Fujikawa T, Sato Y, McEwen BS, Soya H.** Endurance treadmill training in rats alters CRH activity in the hypothalamic paraventricular nucleus at rest and during acute running according to its period. *Life Sci* 76: 763-774, 2004.

**Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW.** Preferential

incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* 10: 355-362, 2007.

**Kempermann G, Chesler EJ, Lu L, Williams RW, Gage FH.** Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 780-785, 2006.

**Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G.** Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27: 447-452, 2004.

**Keohane A, Ryan S, Maloney E, Sullivan AM, Nolan YM.** Tumour necrosis factor-alpha impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells: Role of Hes1. *Mol Cell Neurosci* 43: 127-135, 2010.

**Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, Makino J, Tamura H, Hojo Y, Takata N, Kawato S.** Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. *Endocrinology* 142: 3578-3589, 2001.

**Knobloch M, Braun SMG, Zurkirchen L, von Schoultz C, Zamboni N, Arauzo-Bravo MJ, Kovacs WJ, Karalay O, Suter U, Machado RAC, Roccio M, Lutolf MP, Semenkovich CF, Jessberger S.** Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature* 493: 226-230, 2013.

**Koehl M, Meerlo P, Gonzales D, Rontal A, Turek FW, Abrous DN.** Exercise-induced promotion of hippocampal cell proliferation requires beta-endorphin. *FASEB J* 22: 2253-2262, 2008.

**Kohman RA, Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Kelley KW, Dantzer R, Rhodes JS.** Voluntary Wheel Running Reverses Age-Induced Changes in Hippocampal Gene Expression. *PLoS One* 6: e22654, 2011.

**Kornack DR, Rakic P.** Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5768-5773, 1999.

**Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A.** Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400: 418-419, 1999.

**Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH.** Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16: 2027-2033, 1996.

**Lange Y, Swaisgood MH, Ramos BV, Steck TL.** Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 264: 3786-3793, 1989.

**Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K.** Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol* 58: 498-504, 2001.

**Lee MC, Okamoto M, Liu YF, Inoue K, Matsui T, Nogami H, Soya H.** Voluntary resistance running with short distance enhances spatial memory related to hippocampal BDNF signaling. *J Appl Physiol* 113: 1260-1266, 2012.

**Lee TH, Jang MH, Shin MC, Lim BV, Kim YP, Kim H, Choi HH, Lee KS, Kim EH, Kim CJ.** Dependence of rat hippocampal c-Fos expression on intensity and duration of exercise. *Life Sci* 72: 1421-1436, 2003.

**Li C, Dong S, Wang H, Hu Y.** Microarray analysis of gene expression changes in the brains of NR2B-induced memory-enhanced mice. *Neuroscience* 197: 121-131, 2011.

**Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M.** Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* 4: 231-235, 1994.

**Liu YF, Chen HI, Wu CL, Kuo YM, Yu L, Huang AM, Wu FS, Chuang JI, Jen CJ.** Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol* 587: 3221-3231, 2009.

**Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL.** Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus* 16: 480-490, 2006.

**Lytle ME, Vander Bilt J, Pandav RS, Dodge HH, Ganguli M.** Exercise level and cognitive decline: the MoVIES project. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18: 57-64, 2004.

**Manadas B, Santos AR, Szabadfi K, Gomes JR, Garbis SD, Fountoulakis M, Duarte CB.** BDNF-induced changes in the expression of the translation machinery in hippocampal neurons: protein levels and dendritic mRNA. *J Proteome Res* 8: 4536-4552, 2009.

**Marlatt MW, Potter MC, Lucassen PJ, van Praag H.** Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis and BDNF levels in female C57Bl/6J mice. *Dev Neurobiol* 72: 943-952, 2012.

**Martin-Magniette ML, Aubert J, Cabannes E, Daudin JJ.** Evaluation of the gene-specific dye bias in cDNA microarray experiments. *Bioinformatics* 21: 1995-2000, 2005.

**Masuo Y, Imai T, Shibato J, Hirano M, Jones OA, Maguire ML, Satoh K, Kikuchi S, Rakwal R.** Omic analyses unravels global molecular changes in the brain and liver of a rat model for chronic Sake (Japanese alcoholic beverage) intake. *Electrophoresis* 30: 1259-1275, 2009.

**McEwen BS, Gould EA, Sakai RR.** The vulnerability of the hippocampus to protective and destructive effects of glucocorticoids in relation to stress.

Br J Psychiatry Suppl 160: 18-24, 1992.

**Mirescu C, Gould E.** Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16: 233-238, 2006.

**Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T.** Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J Neurosci* 20: 7116-7121, 2000.

**Molteni R, Ying Z, Gomez-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.

**Morris R.** Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60, 1984.

**Moser E, Moser MB, Andersen P.** Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13: 3916-3925, 1993.

**Murray PS, Holmes PV.** An overview of brain-derived neurotrophic factor and implications for excitotoxic vulnerability in the hippocampus. *Int J Pept* 2011: 654085, 2011.

**Myers MG, Jr., Sun XJ, Cheatham B, Jachna BR, Glasheen EM, Backer JM, White MF.** IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology* 132: 1421-1430, 1993.

**Naylor AS, Persson AI, Eriksson PS, Jonsdottir IH, Thorlin T.** Extended voluntary running inhibits exercise-induced adult hippocampal progenitor proliferation in the spontaneously hypertensive rat. *J Neurophysiol* 93: 2406-2414, 2005.

**Ni H, Li C, Feng X, Cen JN.** Effects of Forced Running Exercise on



Cognitive Function and Its Relation to Zinc Homeostasis-Related Gene Expression in Rat Hippocampus. *Biol Trace Elem Res* 142: 704-712, 2011.

**Nishijima T, Okamoto M, Matsui T, Kita I, Soya H.** Hippocampal functional hyperemia mediated by NMDA receptor/NO signaling in rats during mild exercise. *J Appl Physiol* 112: 197-203, 2012.

**Nishijima T, Soya H.** Evidence of functional hyperemia in the rat hippocampus during mild treadmill running. *Neurosci Res* 54: 186-191, 2006.

**O'Keefe J.** A review of the hippocampal place cells. *Prog Neurobiol* 13: 419-439, 1979.

**O'Keefe J, Dostrovsky J.** The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34: 171-175, 1971.

**Okamoto M, Hojo Y, Inoue K, Matsui T, Kawato S, McEwen BS, Soya H.** Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 13100-13105.

**Okamoto M, Inoue K, Iwamura H, Terashima K, Soya H, Asashima M, Kuwabara T.** Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis. *FASEB J* 25: 3570-3582, 2011.

**Pakkenberg B, Gundersen HJ.** Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *J Microsc* 150: 1-20, 1988.

**Perhonen M, Takala T, Huttunen P, Leppaluoto J.** Stress hormones after prolonged physical training in normo- and hypobaric conditions in rats. *Int J Sports Med* 16: 73-77, 1995.

**Petersen RC, Jack CR, Jr., Xu YC, Waring SC, O'Brien PC, Smith**

**GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Boeve BF, Kokmen E.** Memory and MRI-based hippocampal volumes in aging and AD. *Neurology* 54: 581-587, 2000.

**Petersen RC, Smith G, Kokmen E, Ivnik RJ, Tangalos EG.** Memory function in normal aging. *Neurology* 42: 396-401, 1992.

**Pfriegeer FW.** Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays* 25: 72-78, 2003.

**Piehl K.** Time course for refilling of glycogen stores in human muscle fibres following exercise-induced glycogen depletion. *Acta Physiol Scand* 90: 297-302, 1974.

**Rhodes JS, van Praag H, Jeffrey S, Girard I, Mitchell GS, Garland T, Jr., Gage FH.** Exercise increases hippocampal neurogenesis to high levels but does not improve spatial learning in mice bred for increased voluntary wheel running. *Behav Neurosci* 117: 1006-1016, 2003.

**Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG.** Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2: 898-905, 1999.

**Rosenzweig BA, Pine PS, Domon OE, Morris SM, Chen JJ, Sistare FD.** Dye bias correction in dual-labeled cDNA microarray gene expression measurements. *Environ Health Perspect* 112: 480-487, 2004.

**Rothman SM, Mattson MP.** Adverse stress, hippocampal networks, and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 12: 56-70, 2010.

**Saito T, Soya H.** Delineation of responsive AVP-containing neurons to running stress in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R484-R490, 2004.

**Sapolsky RM.** A mechanism for glucocorticoid toxicity in the

hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *J Neurosci* 5: 1228-1232, 1985.

**Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO.** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470, 1995.

**Selye H.** A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32, 1936.

**Small SA.** Age-related memory decline: current concepts and future directions. *Arch Neurol* 58: 360-364, 2001.

**Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP.** Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304, 1999.

**Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Cameron HA.** Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci* 29: 14484-14495, 2009.

**Sodero AO, Weissmann C, Ledesma MD, Dotti CG.** Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro. *Neurobiol Aging* 32: 1043-1053, 2011.

**Soya H.** Stress response to exercise and its hypothalamic regulation: role of arginine-vasopressin. In: Nose H, Gisolfi CV, Imaizumi K, (Ed.), *Exercise, Nutrition and Environmental Stress*. Mich, USA: Cooper Publishing Group. pp. 21-37. 2001.

**Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K, Saito T.** Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res* 58: 341-348, 2007a.

**Soya H, Nakamura T, Deocaris CC, Kimpara A, Iimura M, Fujikawa T, Chang H, McEwen BS, Nishijima T.** BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 961-967, 2007b.

**Soya H, Okamoto M, Matsui T, Lee M, Inoue K, Soya S, Nishikawa S, Fujikawa T, Chang H, Nishijima T.** Brain activation via exercise. Exercise conditions leading to neuronal activation & hippocampal neurogenesis. *J Exerc Nutr Biochem* 15: 1-10, 2011.

**Spina RJ, Chi MM, Hopkins MG, Nemeth PM, Lowry OH, Holloszy JO.** Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *J Appl Physiol* 80: 2250-2254, 1996.

**Srere PA.** Citrate synthase. In: Lowenstein JM. (Ed.), *Methods in Enzymology*, pp. 3-11. 1969.

**Stranahan AM, Lee K, Becker KG, Zhang Y, Maudsley S, Martin B, Cutler RG, Mattson MP.** Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of memory by running in aged mice. *Neurobiol Aging* 31: 1937-1949, 2010.

**Sutanto W, Dekloet ER.** The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena. *Lab Anim* 28: 293-306, 1994.

**Suzuki S, Numakawa T, Shimazu K, Koshimizu H, Hara T, Hatanaka H, Mei L, Lu B, Kojima M.** BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *J Cell Biol* 167: 1205-1215, 2004.

**Thompson LT, Best PJ.** Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats. *Brain Res* 509: 299-308, 1990.

**Tolman EC.** Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev* 55: 189-208,

1948.

**Tong L, Shen H, Perreau VM, Balazs R, Cotman CW.** Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* 8: 1046-1056, 2001.

**Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF.** Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11: 901-907, 2008.

**Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I.** Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21: 1628-1634, 2001.

**Trejo JL, Llorens-Martin MV, Torres-Aleman I.** The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 37: 402-411, 2008.

**Uysal N, Tugyan K, Kayatekin BM, Acikgoz O, Bagriyanik HA, Gonenc S, Ozdemir D, Aksu I, Topcu A, Semin I.** The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett* 383: 241-245, 2005.

**Valor LM, Barco A.** Hippocampal gene profiling: Toward a systems biology of the hippocampus. *Hippocampus* 22: 929-941, 2012.

**Van Petten C.** Relationship between hippocampal volume and memory ability in healthy individuals across the lifespan: review and meta-analysis. *Neuropsychologia* 42: 1394-1413, 2004.

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

**van Praag H, Kempermann G, Gage FH.** Running increases cell

proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2: 266-270, 1999b.

**van Praag H, Shubert T, Zhao CM, Gage FH.** Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25: 8680-8685, 2005.

**Vance JE, Hayashi H, Karten B.** Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol* 16: 193-212, 2005.

**Vasuta C, Caunt C, James R, Samadi S, Schibuk E, Kannangara T, Titterness AK, Christie BR.** Effects of exercise on NMDA receptor subunit contributions to bidirectional synaptic plasticity in the mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 17: 1201-1208, 2007.

**Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F.** Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 20: 2580-2590, 2004.

**von Bohlen Und Halbach O.** Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329: 409-420, 2007.

**Vorhees CV, Williams MT.** Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1: 848-858, 2006.

**Vukovic J, Colditz MJ, Blackmore DG, Ruitenberg MJ, Bartlett PF.** Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J Neurosci* 32: 6435-6443, 2012.

**Welberg L.** Memory: A growing role for IGF2. *Nat Rev Neurosci* 12: 122, 2011.

**Woolley CS, Gould E, Mcewen BS.** Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 531: 225-231, 1990.

**Wu MD, Hein AM, Moravan MJ, Shaftel SS, Olschowka JA, O'Banion MK.** Adult murine hippocampal neurogenesis is inhibited by sustained IL-1beta and not rescued by voluntary running. *Brain Behav Immun* 26: 292-300, 2012.

**Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MG, Jr., Ishikawa Y.** Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 273: 26962-26968, 1998.

**Yanagisawa H, Dan I, Tsuzuki D, Kato M, Okamoto M, Kyutoku Y, Soya H.** Acute moderate exercise elicits increased dorsolateral prefrontal activation and improves cognitive performance with Stroop test. *Neuroimage* 50: 1702-1710, 2010.

**Yau SY, So KF.** Adult neurogenesis and dendritic remodeling in hippocampal plasticity: which one is more important? *Cell Transplant* 23: 471-479, 2014.

**Yirmiya R, Goshen I.** Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun* 25: 181-213, 2011.

**Yoshitake T, Kiyohara Y, Kato I, Ohmura T, Iwamoto H, Nakayama K, Ohmori S, Nomiya K, Kawano H, Ueda K, et al.** Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Neurology* 45: 1161-1168, 1995.

**Zhao C, Deng W, Gage FH.** Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645-660, 2008.

**Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH.** Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26: 3-11, 2006.

**Zheng WH, Quirion R.** Comparative signaling pathways of insulin-like

growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival. *J Neurochem* 89: 844-852, 2004.

**Ziv Y, Burns LD, Cocker ED, Hamel EO, Ghosh KK, Kitch LJ, El Gamal A, Schnitzer MJ.** Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes. *Nat Neurosci* 16: 264-266, 2013.

李鉉進. 異なる強度や期間のトレッドミル走運動がラットの空間学習能と海馬の神経栄養因子 (BDNF) 発現に及ぼす影響. 平成 15 年度筑波大学大学院修士論文, 2003.

井上恒志郎, 岡本正洋, イミンチョル, 松井崇, 町田正直, 石倉恵介, 武田哲子, 大森肇, 麻見直美, 武政徹, 坂入洋右, 征矢英昭. 騒音を伴うネガティブブラック環境における実験動物実験の適応性: 1 週間の予備飼育の有用性. 筑波大学体育科学系紀要 第 34 巻: pp. 45-52, 2011.

児玉龍彦, 仁科博道. システム生物医学入門-生命を遺伝子・タンパク質・細胞の統合ネットワークとして捉える次世代バイオロジー-. 羊土社, 東京, 2005.

若林孝一. 学習, 記憶, 健忘. In: 佐藤敬, 泉井亮, 若林孝一, 飛鳥井望 (訳), ピネルバイオサイコロジー 脳-心と行動の神経科学. 東京: 西村書店. pp. 205-224. 2007.



## Supplemental Tables

表 S1 走行学習と走運動トレーニングのプロトコル

Week	Day	CONT	ME	IE
1	1	Sedentary	0-15 min: 5 m/min	0-15 min: 5 m/min
			15-30 min: 10 m/min	15-30 min: 10 m/min
	2	Sedentary	0-20 min: 5 m/min	0-20 min: 5 m/min
			20-40 min: 10 m/min	20-40 min: 10 m/min
			40-60 min: 15 m/min	40-60 min: 15 m/min
	3	Rest		
	4	Sedentary	0-30 min: 10 m/min	0-20 min: 10 m/min
30-60 min: 15 m/min			20-40 min: 15 m/min	
			40-60 min: 20 m/min	
5	Sedentary	0-20 min: 10 m/min	0-20 min: 15 m/min	
		20-60 min: 15 m/min	20-40 min: 20 m/min	
			40-60 min: 25 m/min	
6	Sedentary	0-10 min: 10 m/min	0-10 min: 15 m/min	
		10-60 min: 15 m/min	10-20 min: 20 m/min	
			20-40 min: 25 m/min	
			40-60 min: 30 m/min	
7	Rest			
2	8-9	Sedentary	0-5 min: 10 m/min	0-10 min: 15 m/min
			5-60 min: 15 m/min	10-20 min: 20 m/min
				20-40 min: 25 m/min
				40-60 min: 30 m/min
	10	Rest		
11-13	Sedentary	0-5 min: 10 m/min	0-10 min: 15 m/min	
		5-60 min: 15 m/min	10-20 min: 20 m/min	
			20-40 min: 25 m/min	
			40-55 min: 30 m/min	
			55-60 min: 35 m/min	
14	Rest			
3	15-16	Sedentary	0-5 min: 10 m/min	0-5 min: 15 m/min
			5-60 min: 15 m/min	5-15 min: 20 m/min
				15-30 min: 25 m/min
				30-45 min: 30 m/min
			45-60 min: 35 m/min	
17	Rest			
18-20	Sedentary	0-5 min: 10 m/min	0-5 min: 15 m/min	
		5-60 min: 15 m/min	5-15 min: 20 m/min	
			15-30 min: 25 m/min	
			30-45 min: 30 m/min	
			45-60 min: 35 m/min	
21	Rest			
4	22-23	Sedentary	0-5 min: 10 m/min	0-5 min: 15 m/min
			5-60 min: 15 m/min	5-15 min: 20 m/min
				15-30 min: 25 m/min
				30-45 min: 30 m/min

			45-55 min: 35 m/min
			55-60 min: 40 m/min
	24	Rest	
	25-26	Sedentary	0-5 min: 10 m/min 5-60 min: 15 m/min
			0-5 min: 15 m/min 5-15 min: 20 m/min 15-25 min: 25 m/min 25-40 min: 30 m/min 40-50 min: 35 m/min 50-60 min: 40 m/min
	27	Sedentary	0-5 min: 10 m/min 5-60 min: 15 m/min
			0-5 min: 15 m/min 5-15 min: 20 m/min 15-25 min: 25 m/min 25-35 min: 30 m/min 35-45 min: 35 m/min 45-60 min: 40 m/min
	28	Rest	
5	29	Sedentary	0-5 min: 10 m/min 5-60 min: 15 m/min
			0-5 min: 15 m/min 5-15 min: 20 m/min 15-25 min: 25 m/min 25-35 min: 30 m/min 35-45 min: 35 m/min 45-60 min: 40 m/min
	30	Sedentary	0-5 min: 10 m/min 5-60 min: 15 m/min
			0-5 min: 15 m/min 5-10 min: 20 m/min 10-20 min: 25 m/min 20-30 min: 30 m/min 30-40 min: 35 m/min 40-60 min: 40 m/min
	31	Rest	
	32	Sedentary	0-5 min: 10 m/min 5-60 min: 15 m/min
			0-5 min: 15 m/min 5-10 min: 20 m/min 10-20 min: 25 m/min 20-30 min: 30 m/min 30-40 min: 35 m/min 40-60 min: 40 m/min
	33-34	Sedentary	0-5 min: 10 m/min 5-60 min: 15 m/min
			0-5 min: 15 m/min 5-10 min: 20 m/min 10-15 min: 25 m/min 15-25 min: 30 m/min 25-35 min: 35 m/min 35-60 min: 40 m/min
	35	Rest	
6	36-37	Sedentary	0-5 min: 10 m/min 5-60 min: 15 m/min
			0-5 min: 15 m/min 5-10 min: 20 m/min 10-15 min: 25 m/min 15-20 min: 30 m/min 20-30 min: 35 m/min 30-60 min: 40 m/min
	38	Rest	
	39-40	Sedentary	0-5 min: 10 m/min 5-60 min: 15 m/min
			0-5 min: 15 m/min 5-10 min: 20 m/min 10-15 min: 25 m/min 15-20 min: 30 m/min

		20-25 min: 35 m/min
		25-60 min: 40 m/min
41	Sedentary	0-5 min: 10 m/min
		5-60 min: 15 m/min
		0-2.5 min: 15 m/min
		2.5-5 min: 20 m/min
		5-10 min: 25 m/min
		10-15 min: 30 m/min
		15-20 min: 35 m/min
		20-60 min: 40 m/min
42	Rest	

CONT: sedentary control, ME: mild exercise, IE: intense exercise, m/min: meters per minute

表 S2 ME で同定された遺伝子の IPA による分類

Gene Symbol	Gene Name	Fold	Location	Type
Up-regulated				
Defb1	defensin beta 1	7.74	Extracellular Space	Other
GABRA6	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 6	6.87	Plasma Membrane	Ion Channel
CXCL13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	5.79	Extracellular Space	Cytokine
LECT1	leukocyte cell derived chemotaxin 1	3.84	Extracellular Space	Other
Ces1d	carboxylesterase 1D	3.65	Cytoplasm	Enzyme
PLA2R1	phospholipase A2 receptor 1, 180kDa	2.55	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
PTGDS	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)	2.54	Cytoplasm	Enzyme
NTNG1	netrin G1	2.49	Extracellular Space	Other
THBS2	thrombospondin 2	2.49	Extracellular Space	Other
Vom2r53	vomer nasal 2 receptor, 53	2.48	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	2.47	Extracellular Space	Growth Factor
OGN	osteo glycin	2.47	Extracellular Space	Growth Factor
BTN3A2		2.46	Other	Other
TSSK2	testis-specific serine kinase 2	2.45	Cytoplasm	Kinase
FGF5	fibroblast growth factor 5	2.37	Extracellular Space	Growth Factor
COL1A2	collagen, type I, alpha 2	2.32	Extracellular Space	Other
BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	2.31	Nucleus	Transcription Regulator
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	2.30	Plasma Membrane	Kinase
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	2.29	Extracellular Space	Other
POLD4	polymerase (DNA-directed), delta 4, accessory subunit	2.29	Nucleus	Enzyme
ESM1	endothelial cell-specific molecule 1	2.24	Extracellular Space	Growth Factor
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	2.23	Plasma Membrane	Other
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	2.22	Extracellular Space	Other
ADAM28	ADAM metalloproteinase domain 28	2.20	Plasma Membrane	Peptidase

Olf907	olfactory receptor 907	2.20	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
MYH13	myosin, heavy chain 13, skeletal muscle	2.19	Cytoplasm	Other
FOXC2	--	2.18	Other	Other
SEPHS1	selenophosphate synthetase 1	2.18	Other	Enzyme
CXCR6	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	2.14	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
MAGT1	magnesium transporter 1	2.14	Plasma Membrane	Enzyme
LEPR	leptin receptor	2.13	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
NUPR1	nuclear protein, transcriptional regulator, 1	2.13	Nucleus	Transcription Regulator
C1QTNF3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3	2.11	Extracellular Space	Other
ATP11B	ATPase, class VI, type 11B	2.10	Plasma Membrane	Transporter
Kngr1/Kngr11	kininogen 1	2.07	Extracellular Space	Other
Olf907	olfactory receptor 907	2.07	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
ASGR1	asialoglycoprotein receptor 1	2.06	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	2.06	Extracellular Space	Other
AS3MT	arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase	2.05	Cytoplasm	Enzyme
C6	complement component 6	2.04	Extracellular Space	Other
CCL19	--	2.04	Other	Other
ATP4A	ATPase, H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> exchanging, alpha polypeptide	2.03	Plasma Membrane	Transporter
SLC25A20	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine transporter), member 20	2.01	Cytoplasm	Transporter
B4GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 1	2.00	Cytoplasm	Enzyme
CD7	CD7 molecule	2.00	Plasma Membrane	Other
INMT	indolethylamine N-methyltransferase	1.99	Cytoplasm	Enzyme
Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14	1.98	Cytoplasm	Enzyme
HOXC11	homeobox C11	1.98	Nucleus	Other
AIDA	axin interactor, dorsalization associated	1.97	Cytoplasm	Other
C1S	complement component 1, s subcomponent	1.96	Extracellular Space	Peptidase
FAP	fibroblast activation protein, alpha	1.96	Cytoplasm	Peptidase
PRRX2	paired related homeobox 2	1.96	Nucleus	Transcription

				Regulator
Adam24	a disintegrin and metalloproteinase domain 24 (testes 1)	1.95	Other	Peptidase
APOE	apolipoprotein E	1.94	Extracellular Space	Transporter
CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	1.94	Cytoplasm	Enzyme
CLSPN	claspin	1.93	Nucleus	Other
OR5T3	olfactory receptor, family 5, subfamily T, member 3	1.93	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
PRKG1	protein kinase, cGMP-dependent, type I	1.93	Cytoplasm	Kinase
NOS2	nitric oxide synthase 2, inducible	1.92	Cytoplasm	Enzyme
PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	1.91	Extracellular Space	Peptidase
ZKSCAN4	zinc finger with KRAB and SCAN domains 4	1.91	Nucleus	Transcription Regulator
ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	1.90	Cytoplasm	Enzyme
Olf392/Olf395	--	1.88	Other	Other
PRAP1	proline-rich acidic protein 1	1.88	Plasma Membrane	Other
SERPIND1	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1	1.88	Extracellular Space	Other
TTR	transthyretin	1.88	Extracellular Space	Transporter
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	1.87	Extracellular Space	Other
LIPG	lipase, endothelial	1.87	Extracellular Space	Enzyme
MDP1	magnesium-dependent phosphatase 1	1.87	Other	Phosphatase
PLG	plasminogen	1.87	Extracellular Space	Peptidase
ITPKC	inositol-trisphosphate 3-kinase C	1.86	Cytoplasm	Kinase
Olf1138	olfactory receptor 1138	1.84	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
CELA3B	chymotrypsin-like elastase family, member 3B	1.83	Other	Peptidase
NID2	nidogen 2 (osteonidogen)	1.81	Extracellular Space	Other
Olf107	olfactory receptor 107	1.81	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
FMOD	fibromodulin	1.80	Extracellular Space	Other
HECW1	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	1.79	Cytoplasm	Enzyme

FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	1.78	Cytoplasm	Transporter
SLC6A13	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 13	1.78	Plasma Membrane	Transporter
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	1.74	Cytoplasm	Enzyme
SYNM	synemin, intermediate filament protein	1.74	Cytoplasm	Other
SLC5A1	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	1.73	Plasma Membrane	Transporter
TFAP2A	transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)	1.73	Nucleus	Transcription Regulator
BMP2	bone morphogenetic protein 2	1.72	Extracellular Space	Growth Factor
DHRS7C	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7C	1.72	Cytoplasm	Enzyme
ACVR2A	activin A receptor, type II A	1.71	Plasma Membrane	Kinase
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	1.70	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
CD300C	CD300c molecule	1.70	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
CELA1	chymotrypsin-like elastase family, member 1	1.70	Extracellular Space	Peptidase
SNTB1	syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 1)	1.70	Plasma Membrane	Other
TDRD9	tudor domain containing 9	1.70	Cytoplasm	Other
HORMAD2	--	1.68	Other	Other
ITGA8	integrin, alpha 8	1.68	Plasma Membrane	Other
Prl3d1	prolactin family 3, subfamily d, member 1	1.68	Extracellular Space	Other
CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2	1.67	Cytoplasm	Transporter
DUSP3	dual specificity phosphatase 3	1.67	Cytoplasm	Phosphatase
PDCD10	programmed cell death 10	1.67	Cytoplasm	Other
SLC13A3	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3	1.67	Plasma Membrane	Transporter
OR51I2	olfactory receptor, family 51, subfamily I, member 2	1.66	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
PPP1R17	protein phosphatase 1, regulatory subunit 17	1.65	Cytoplasm	Other
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	1.63	Cytoplasm	Enzyme
KL	klotho	1.63	Extracellular Space	Enzyme
MTUS1	microtubule associated tumor suppressor 1	1.63	Other	Other

OSR1	odd-skipped related 1 (Drosophila)	1.63	Nucleus	Other
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	1.63	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
PCOLCE	procollagen C-endopeptidase enhancer	1.62	Extracellular Space	Other
SOSTDC1	sclerostin domain containing 1	1.62	Extracellular Space	Other
RDH16	retinol dehydrogenase 16 (all-trans)	1.61	Cytoplasm	Enzyme
RPL39L	ribosomal protein L39-like	1.61	Other	Other
SIGIRR	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	1.61	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
Olf1167	olfactory receptor 1167	1.60	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
TPM2	tropomyosin 2 (beta)	1.60	Cytoplasm	Other
SENP1	--	1.58	Other	Other
CLDN4	claudin 4	1.57	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	1.57	Extracellular Space	Peptidase
BRCA1	breast cancer 1, early onset	1.56	Nucleus	Transcription Regulator
CGN	cingulin	1.56	Plasma Membrane	Other
IRS1	insulin receptor substrate 1	1.56	Cytoplasm	Enzyme
CBLN1	cerebellin 1 precursor	1.55	Cytoplasm	Other
CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1	1.53	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
PTPRQ	protein tyrosine phosphatase, receptor type, Q	1.53	Other	Other
Olf1317/Olf1318	olfactory receptor 1318	1.51	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
SLC12A7	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 7	1.51	Plasma Membrane	Transporter
MED13L	--	1.50	Other	Other
MNAT1	MNAT CDK-activating kinase assembly factor 1	1.48	Nucleus	Other
FMO3	flavin containing monooxygenase 3	1.47	Cytoplasm	Enzyme
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	1.45	Nucleus	Ligand-dependent Nuclear Receptor
SLC5A5	solute carrier family 5 (sodium/iodide cotransporter), member 5	1.45	Plasma Membrane	Transporter
IL1B	interleukin 1, beta	1.43	Extracellular Space	Cytokine
Down-regulated				



OR4N4	olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 4	-1.43	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
SCARA5	scavenger receptor class A, member 5 (putative)	-1.43	Cytoplasm	Other
CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	-1.45	Nucleus	Transcription Regulator
Olf250	olfactory receptor 250	-1.45	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	-1.47	Cytoplasm	Enzyme
EMP2	epithelial membrane protein 2	-1.47	Plasma Membrane	Other
SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	-1.47	Cytoplasm	Enzyme
MCM10	minichromosome maintenance complex component 10	-1.49	Nucleus	Other
Olf652	olfactory receptor 652	-1.49	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
RDH14	retinol dehydrogenase 14 (all-trans/9-cis/11-cis)	-1.49	Cytoplasm	Enzyme
ARRDC4	--	-1.52	Other	Other
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-1.54	Cytoplasm	Transporter
IFNA16	interferon, alpha 16	-1.54	Extracellular Space	Cytokine
KIF18B	--	-1.54	Other	Other
OR10W1	olfactory receptor, family 10, subfamily W, member 1	-1.54	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
NTSR1	neurotensin receptor 1 (high affinity)	-1.56	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
LYVE1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	-1.59	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
NR5A1	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	-1.59	Nucleus	Ligand-dependent Nuclear Receptor
CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	-1.61	Cytoplasm	Enzyme
FLT3LG	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	-1.61	Extracellular Space	Cytokine
NKX2-6	NK2 homeobox 6	-1.61	Nucleus	Transcription Regulator
Nppb	natriuretic peptide type B	-1.61	Other	Other
Olf593	olfactory receptor 593	-1.61	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf1184	olfactory receptor 1184	-1.61	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf1186	olfactory receptor 1186	-1.61	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf1298	olfactory receptor 1298	-1.61	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
SLC6A18	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 18	-1.61	Plasma Membrane	Transporter

ADIPOR2	adiponectin receptor 2	-1.64	Plasma Membrane	Other
CERS2	ceramide synthase 2	-1.64	Nucleus	Transcription Regulator
KCTD11	potassium channel tetramerization domain containing 11	-1.64	Cytoplasm	Other
MTMR4	myotubularin related protein 4	-1.64	Cytoplasm	Phosphatase
OR10P1	olfactory receptor, family 10, subfamily P, member 1	-1.64	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
OR7E5P	--	-1.64	Other	Other
POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2, accessory subunit	-1.64	Nucleus	Enzyme
CLDN6	claudin 6	-1.67	Plasma Membrane	Other
CTRB2	chymotrypsinogen B2	-1.67	Cytoplasm	Peptidase
ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	-1.67	Nucleus	Transcription Regulator
GREM2	gremlin 2, DAN family BMP antagonist	-1.67	Extracellular Space	Other
IL31RA	interleukin 31 receptor A	-1.67	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
INSRR	insulin receptor-related receptor	-1.67	Plasma Membrane	Kinase
Olf1220	olfactory receptor 1220	-1.67	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
ZP2	--	-1.67	Other	Other
GPR31	G protein-coupled receptor 31	-1.70	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
PDE1C	phosphodiesterase 1C, calmodulin-dependent 70kDa	-1.70	Cytoplasm	Enzyme
PLA2G2A	--	-1.70	Other	Other
SETBP1	SET binding protein 1	-1.70	Nucleus	Other
SGPP2	sphingosine-1-phosphate phosphatase 2	-1.70	Cytoplasm	Phosphatase
EPO	erythropoietin	-1.72	Extracellular Space	Cytokine
FABP1	fatty acid binding protein 1, liver	-1.72	Cytoplasm	Transporter
HOGA1	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1	-1.72	Cytoplasm	Enzyme
IRX3	--	-1.72	Other	Other
MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	-1.72	Extracellular Space	Peptidase
Olf630	olfactory receptor 630	-1.72	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
OR6K3	--	-1.72	Other	Other
HGF	hepatocyte growth factor (hepatopoietin A; scatter factor)	-1.75	Extracellular Space	Growth Factor

HMGCL	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA lyase	-1.75	Cytoplasm	Enzyme
Olf517	olfactory receptor 517	-1.75	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf862	olfactory receptor 862	-1.75	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	-1.75	Plasma Membrane	Phosphatase
TPO	thyroid peroxidase	-1.75	Plasma Membrane	Enzyme
MLANA	melan-A	-1.79	Plasma Membrane	Other
Olf624	olfactory receptor 624	-1.79	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
SDS	serine dehydratase	-1.79	Cytoplasm	Enzyme
Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	-1.79	Other	Other
UBD	ubiquitin D	-1.79	Nucleus	Other
NUBP1	nucleotide binding protein 1	-1.82	Cytoplasm	Other
SLC22A7	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	-1.82	Plasma Membrane	Transporter
TNF	tumor necrosis factor	-1.82	Extracellular Space	Cytokine
HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	-1.85	Cytoplasm	Enzyme
MAML1	mastermind-like 1 (Drosophila)	-1.85	Nucleus	Transcription Regulator
Olf1218	olfactory receptor 1218	-1.85	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf1080	--	-1.85	Other	Other
TMPRSS5	transmembrane protease, serine 5	-1.85	Plasma Membrane	Peptidase
Art2a-ps/Art2b	--	-1.89	Other	Other
Ces1c	carboxylesterase 1C	-1.89	Extracellular Space	Other
CPB2	carboxypeptidase B2 (plasma)	-1.89	Extracellular Space	Peptidase
DDX11/DDX12P	--	-1.89	Other	Other
MAPK15	mitogen-activated protein kinase 15	-1.89	Cytoplasm	Kinase
Olf1057/Olf1062	olfactory receptor 1057	-1.89	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
SLCO2A1	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	-1.89	Plasma Membrane	Transporter
CD177	CD177 molecule	-1.92	Cytoplasm	Other
Olf1109	olfactory receptor 1109	-1.92	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf1461	olfactory receptor 1461	-1.92	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor

SAMD8	sterile alpha motif domain containing 8	-1.92	Cytoplasm	Other
SPINK1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	-1.92	Extracellular Space	Other
CSN3	casein kappa	-1.96	Extracellular Space	Other
Olf398	olfactory receptor 398	-1.96	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
VSX2	visual system homeobox 2	-2.00	Nucleus	Transcription Regulator
Olf868	olfactory receptor 868	-2.04	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Adh6a	alcohol dehydrogenase 6A (class V)	-2.13	Other	Other
CSK	c-src tyrosine kinase	-2.13	Cytoplasm	Kinase
PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	-2.13	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
A2M	alpha-2-macroglobulin	-2.17	Extracellular Space	Transporter
LRP1B	--	-2.17	Other	Other
Ly6a	--	-2.22	Other	Other
ESR1	estrogen receptor 1	-2.27	Nucleus	Ligand-dependent Nuclear Receptor
FERMT1	fermitin family member 1	-2.27	Plasma Membrane	Other
PRL	prolactin	-2.27	Extracellular Space	Cytokine
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	-2.33	Cytoplasm	Enzyme
BMP5	bone morphogenetic protein 5	-2.33	Extracellular Space	Growth Factor
GALNT3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	-2.33	Cytoplasm	Enzyme
EXT1	exostosin glycosyltransferase 1	-2.70	Cytoplasm	Enzyme

The first two columns present the Gene symbol and Gene name. The 3th column, Fold, shows the fold change in ME compared with CONT. The last two columns, Location and Type, contain the location and type of gene product.

表 S3 IE で同定された遺伝子の IPA による分類

Gene Symbol	Gene Name	Fold	Location	Type
Up-regulated				
SOSTDC1	sclerostin domain containing 1	6.78	Extracellular Space	Other
TTR	transthyretin	5.71	Extracellular Space	Transporter
MFRP	membrane frizzled-related protein	4.55	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
TMEM27	transmembrane protein 27	4.23	Plasma Membrane	Other
Agtr1b	angiotensin II receptor, type 1b	2.29	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf517	olfactory receptor 517	2.27	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
ROBO2	roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila)	2.26	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
UBASH3A	--	2.25	Other	Other
INVS	inversin	2.24	Nucleus	Transcription Regulator
SNX17	sorting nexin 17	2.13	Cytoplasm	Transporter
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	2.12	Extracellular Space	Cytokine
GART	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase	2.12	Cytoplasm	Enzyme
ADIPOQ	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	2.06	Extracellular Space	Other
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	2.06	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
ST6GAL1	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	2.04	Cytoplasm	Enzyme
ASIP	agouti signaling protein	2.02	Extracellular Space	Other
KCNK2	potassium channel, subfamily K, member 2	2.01	Plasma Membrane	Ion Channel
MAN2A1	mannosidase, alpha, class 2A, member 1	2.01	Cytoplasm	Enzyme
BLK	B lymphoid tyrosine kinase	2.00	Cytoplasm	Kinase
DNAH11	dynein, axonemal, heavy chain 11	2.00	Cytoplasm	Enzyme
SGCZ	sarcoglycan, zeta	1.99	Plasma Membrane	Other
EXT1	exostosin glycosyltransferase 1	1.98	Cytoplasm	Enzyme
SOX6	SRY (sex determining	1.98	Nucleus	Transcription

	region Y)-box 6			Regulator
Ly6a	--	1.96	Other	Other
Olf922	olfactory receptor 922	1.96	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
NPHS1	nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)	1.94	Plasma Membrane	Other
AGTR2	angiotensin II receptor, type 2	1.93	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
PRLR	prolactin receptor	1.93	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
LAMC2	laminin, gamma 2	1.92	Extracellular Space	Other
Cyp2b19	--	1.91	Other	Other
NCR1	natural cytotoxicity triggering receptor 1	1.89	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	1.89	Nucleus	Other
ENPEP	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	1.88	Plasma Membrane	Peptidase
Olf654	olfactory receptor 654	1.87	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
SGOL2	--	1.87	Other	Other
OTX2	orthodenticle homeobox 2	1.86	Nucleus	Transcription Regulator
IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	1.85	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
PAK1IP1	PAK1 interacting protein 1	1.85	Nucleus	Other
LDLRAD3	low density lipoprotein receptor class A domain containing 3	1.84	Plasma Membrane	Other
MYOZ2	--	1.84	Other	Other
SRP54	signal recognition particle 54kDa	1.81	Cytoplasm	Other
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	1.80	Cytoplasm	Other
TNNT3	troponin T type 3 (skeletal, fast)	1.80	Cytoplasm	Other
TBX1	T-box 1	1.78	Nucleus	Transcription Regulator
OSBPL2	oxysterol binding protein-like 2	1.77	Cytoplasm	Other
SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	1.77	Cytoplasm	Enzyme
ACE	angiotensin I converting enzyme	1.74	Plasma Membrane	Peptidase
EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	1.73	Cytoplasm	Enzyme
IGSF9	immunoglobulin superfamily, member 9	1.73	Plasma Membrane	Other
ACHE	--	1.71	Other	Other
Mug1/Mug2	murinoglobulin 1	1.71	Extracellular	Transporter

			Space	
Cd24a	CD24a antigen	1.69	Plasma Membrane	Other
STEAP1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	1.69	Plasma Membrane	Transporter
TREML2	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2	1.69	Plasma Membrane	Other
POSTN	periostin, osteoblast specific factor	1.68	Extracellular Space	Other
ADRA2B	adrenoceptor alpha 2B	1.66	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
SLC25A37	solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37	1.64	Cytoplasm	Other
TMEM163	transmembrane protein 163	1.64	Cytoplasm	Other
GLE1	GLE1 RNA export mediator	1.60	Nucleus	Other
FBN2	fibrillin 2	1.59	Extracellular Space	Other
SOAT2	sterol O-acyltransferase 2	1.58	Cytoplasm	Enzyme
SORD	sorbitol dehydrogenase	1.58	Cytoplasm	Enzyme
VWA7	von Willebrand factor A domain containing 7	1.57	Other	Other
HORMAD2	--	1.56	Other	Other
TCP1	t-complex 1	1.56	Cytoplasm	Other
DPH3	diphthamide biosynthesis 3	1.55	Cytoplasm	Other
OXT	oxytocin/neurophysin I prepropeptide	1.55	Extracellular Space	Other
Prl3d1	prolactin family 3, subfamily d, member 1	1.54	Extracellular Space	Other
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	1.52	Cytoplasm	Other
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	1.52	Extracellular Space	Growth Factor
PALLD	--	1.52	Other	Other
SIX3	SIX homeobox 3	1.51	Nucleus	Transcription Regulator
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	1.50	Extracellular Space	Peptidase
GGTA1P	--	1.47	Other	Other
LAMA2	laminin, alpha 2	1.47	Extracellular Space	Other
SGCD	sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	1.46	Cytoplasm	Other
SLC34A1	solute carrier family 34 (type II sodium/phosphate cotransporter), member 1	1.44	Plasma Membrane	Transporter

SNAI2	--	1.43	Other	Other
<b>Down-regulated</b>				
ABCA12	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12	-1.45	Plasma Membrane	Transporter
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	-1.45	Nucleus	Transporter
AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	-1.47	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	-1.47	Cytoplasm	Enzyme
GTF2A1	general transcription factor IIA, 1, 19/37kDa	-1.47	Cytoplasm	Transcription Regulator
IRF8	interferon regulatory factor 8	-1.47	Nucleus	Transcription Regulator
LDB2	LIM domain binding 2	-1.47	Nucleus	Transcription Regulator
KCNE4	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	-1.49	Plasma Membrane	Ion Channel
PDCD1	programmed cell death 1	-1.49	Plasma Membrane	Phosphatase
SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	-1.49	Plasma Membrane	Transporter
PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2	-1.52	Other	Other
CTNNA3	catenin (cadherin-associated protein), alpha 3	-1.54	Plasma Membrane	Other
CR2	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2	-1.56	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
FERMT1	fermitin family member 1	-1.56	Plasma Membrane	Other
IL10	interleukin 10	-1.56	Extracellular Space	Cytokine
CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	-1.59	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
OPRL1	opiate receptor-like 1	-1.59	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
TEX12	testis expressed 12	-1.59	Nucleus	Other
TICAM2	toll-like receptor adaptor molecule 2	-1.59	Plasma Membrane	Other
ASIC3	acid-sensing (proton-gated) ion channel 3	-1.61	Plasma Membrane	Ion Channel
GDF15	growth differentiation factor 15	-1.61	Extracellular Space	Growth Factor
HDAC4	histone deacetylase 4	-1.61	Nucleus	Transcription Regulator
OR4C3	olfactory receptor, family 4,	-1.61	Plasma	G-protein



	subfamily C, member 3		Membrane	coupled Receptor
IDO2	indoleamine 2,3-dioxygenase 2	-1.64	Cytoplasm	Enzyme
CKM	creatine kinase, muscle	-1.67	Cytoplasm	Kinase
FZD6	frizzled family receptor 6	-1.67	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
IRX1	iroquois homeobox 1	-1.67	Nucleus	Transcription Regulator
Olf619	olfactory receptor 619	-1.67	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
ARRDC4	--	-1.70	Other	Other
Olf478	olfactory receptor 478	-1.70	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf862	olfactory receptor 862	-1.70	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf1095/Olf141	--	-1.70	Other	Other
OR5C1	olfactory receptor, family 5, subfamily C, member 1	-1.70	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
SLC36A2	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2	-1.70	Plasma Membrane	Transporter
EN2	engrailed homeobox 2	-1.72	Nucleus	Transcription Regulator
Olf1461	olfactory receptor 1461	-1.72	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf1271/Olf142	olfactory receptor 1271	-1.72	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
TEX11	testis expressed 11	-1.72	Nucleus	Other
HS6ST3	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3	-1.75	Other	Enzyme
ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	-1.75	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
KNSTRN	kinetochore-localized astrin/SPAG5 binding protein	-1.75	Other	Other
Olf398	olfactory receptor 398	-1.75	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
Olf1323	olfactory receptor 1323	-1.75	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
PGLYRP3	peptidoglycan recognition protein 3	-1.75	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
PTH1H	parathyroid hormone-like	-1.75	Extracellular	Other

	hormone		Space	
SPINK1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	-1.75	Extracellular Space	Other
CYSLTR1	cysteinyl leukotriene receptor 1	-1.79	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
OR1L8	olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 8	-1.79	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
CD200R1	CD200 receptor 1	-1.82	Plasma Membrane	Other
CD300C	CD300c molecule	-1.82	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
GLP1R	glucagon-like peptide 1 receptor	-1.82	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	-1.82	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
SLC13A1	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporter), member 1	-1.82	Plasma Membrane	Transporter
CHRNA6	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 6 (neuronal)	-1.85	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	-1.85	Cytoplasm	Enzyme
Olf250	olfactory receptor 250	-1.85	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
OR4A15	olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 15	-1.85	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
PLSCR4	phospholipid scramblase 4	-1.85	Plasma Membrane	Enzyme
FGB	fibrinogen beta chain	-1.89	Extracellular Space	Other
KLK1	kallikrein 1	-1.89	Nucleus	Peptidase
OR1B1	olfactory receptor, family 1, subfamily B, member 1	-1.89	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
RNPC3	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3	-1.89	Nucleus	Other
LCT	lactase	-1.92	Plasma Membrane	Enzyme
MOK	MOK protein kinase	-1.96	Plasma Membrane	Kinase
Olf630	olfactory receptor 630	-1.96	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
ADSL	adenylosuccinate lyase	-2.00	Cytoplasm	Enzyme
AIDA	axin interactor, dorsalization associated	-2.00	Cytoplasm	Other
IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2	-2.00	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor

MTHFS	5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase)	-2.04	Cytoplasm	Enzyme
SERPINC1	serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	-2.08	Extracellular Space	Enzyme
CHRNA1	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)	-2.13	Plasma Membrane	Transmembrane Receptor
SERPINB5	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	-2.13	Extracellular Space	Other
ALKBH3	alkB, alkylation repair homolog 3 (E. coli)	-2.17	Nucleus	Enzyme
Olf58	olfactory receptor 859	-2.17	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
PLA2G2A	--	-2.17	Other	Other
WNT6	wingless-type MMTV integration site family, member 6	-2.17	Extracellular Space	Other
Olf473	olfactory receptor 473	-2.27	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
COL9A1	collagen, type IX, alpha 1	-2.33	Extracellular Space	Other
GUCY2D	guanylate cyclase 2D, membrane (retina-specific)	-2.33	Plasma Membrane	Kinase
NR1I3	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	-2.38	Nucleus	Ligand-dependent Nuclear Receptor
CRY1	cryptochrome 1 (photolyase-like)	-2.44	Nucleus	Enzyme
OR8G2	olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 2	-2.44	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
GALNT3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	-2.50	Cytoplasm	Enzyme
PTGFRN	prostaglandin F2 receptor inhibitor	-2.56	Plasma Membrane	Other
Olf1427	olfactory receptor 1427	-2.63	Plasma Membrane	G-protein coupled Receptor
CDKL3	cyclin-dependent kinase-like 3	-2.70	Cytoplasm	Kinase
GFAP	glial fibrillary acidic protein	-3.03	Cytoplasm	Other
MMP27	matrix metalloproteinase 27	-3.70	Other	Peptidase

The first two columns present the Gene symbol and Gene name. The 3th column, Fold, shows the fold change in ME compared with CONT. The last two columns, Location and Type, contain the location and type of gene product.

## Appendices

### Appendix 1 異なる強度の走運動トレーニングによる筋 CS 活性とストレス指標の変化 (研究課題 1-1)

Soleus CS activity ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	CONT	ME	IE
1	24.36	46.16	54.69
2	23.66	30.89	46.51
3	11.79	31.91	43.02
4	24.24		40.95
5	10.52	39.94	32.91
6	15.35	54.60	32.55
7	23.99	32.84	45.16
Mean $\pm$ SEM	19.2 $\pm$ 2.4	39.4 $\pm$ 3.9	42.3 $\pm$ 2.9

Plasma CORT (ng/ml)	CONT	ME	IE
1	7.50	44.98	62.26
2	33.14	28.58	50.59
3	64.42	22.03	66.39
4	116.42	39.43	109.66
5	40.69	77.04	67.93
6	62.94	65.79	160.80
7	52.62	71.99	134.73
Mean $\pm$ SEM	54.0 $\pm$ 12.8	50.0 $\pm$ 8.2	93.2 $\pm$ 16.0

Adrenal Weight (mg/100g B.W.)	CONT	ME	IE
1	13.38	12.95	18.60
2	11.89	14.91	17.85
3	10.92	15.09	18.10
4	12.58	12.09	21.73
5	16.89	16.86	15.62
6	11.00	16.89	19.25
7	12.13	13.82	14.83
Mean $\pm$ SEM	12.7 $\pm$ 0.8	14.7 $\pm$ 0.7	18.0 $\pm$ 0.9

Thymus Weight (mg/100g B.W.)	CONT	ME	IE
1	107.36	107.16	66.01
2	101.36	91.87	82.81
3	91.20	93.80	78.78
4	110.98	98.94	59.22
5	87.17	91.03	64.22
6	109.18	70.48	73.41
7	98.58	94.22	58.65
Mean $\pm$ SEM	100.8 $\pm$ 3.5	92.5 $\pm$ 4.2	69.0 $\pm$ 3.6

**Appendix 2** 異なる強度の走運動トレーニングによる AHN の変化（研究課題 1 - 2）

DG volume (mm <sup>3</sup> )	CONT	ME	IE
1	1.82	2.34	2.41
2	1.91	2.24	2.37
3	2.22	2.18	2.53
4	2.25	2.60	2.41
5	2.12	2.46	2.15
6	2.15	2.53	2.63
7	2.42	2.28	2.25
Mean±SEM	2.13±0.08	2.37±0.06	2.39±0.06

Ki-67 <sup>+</sup> cells (cells)	CONT	ME	IE
1	2376.11	3804.23	3245.50
2	1802.41	2543.61	2662.24
3	2235.71	2858.11	3286.03
4	1980.29	2811.90	2463.00
5	2690.45	2765.51	2521.73
6	1634.75	2662.29	2824.65
7	1872.18	2523.22	2193.82
Mean±SEM	2084.6±139.1	2852.7±165.8	2742.4±153.5

BrdU <sup>+</sup> cells (cells)	CONT	ME	IE
1	4627.21	5037.71	5159.09
2	3501.07	4374.64	3756.38
3	4499.05	4989.76	3625.79
4	3828.65	7991.14	5403.64
5	2969.85	5119.94	6696.47
6	2961.87	6894.74	5339.61
7	4902.47	6017.43	7426.08
Mean±SEM	3898.6±300.9	5775.1±482.4	5343.9±527.2

BrdU <sup>+</sup> /NeuN <sup>+</sup> cells (cells)	CONT	ME	IE
1	3075.67	3627.43	3872.61
2	2329.27	3553.97	2826.93
3	3317.48	3842.10	2205.02
4	2137.01	6642.63	4175.94
5	2429.72	4055.93	4963.40
6	2212.07	5549.18	3776.41
7	3338.71	4893.92	3975.91
Mean±SEM	2691.4±200.9	4595.0±438.3	3685.2±342.6

Appendix 3 MWM の場所学習逃避訓練の結果 (研究課題 1 - 3)

Spatial Learning	CONT				ME				IE			
	Day1	Day2	Day3	Day4	Day1	Day2	Day3	Day4	Day1	Day2	Day3	Day4
<b>Latency (sec)</b>												
1	37.2	15.7	7.7	6.2	103.6	116.1	5.7	20.2	77.6	34.7	4.2	6.7
2	82.6	11.2	11.2	6.7	50.7	22.2	41.7	28.2	17.7	82.1	43.7	8.2
3	120	80.6	108.1	36.7	120	75.1	69.6	11.2	91.1	60.2	27.2	11.7
4	110	48.7	36.7	4.7	112	31.7	14.7	13.2	91.2	21.7	19.2	63.7
5	110	42.7	14.2	10.2	120	14.7	23.7	5.7	105.6	74.2	10.2	12.7
6	62.1	22.2	12.7	23.3	92.1	20.7	11.7	38.2	116.1	40.2	31.7	6.2
7	120	12.2	22.7	6.2	96.6	32.2	11.2	27.7	93.6	36.7	39.7	32.7
8	47.7	43.7	7.7	9.2	57.2	17.2	13.7	26.2	90.1	55.2	18.7	8.2
9	87.6	44.7	12.7	57.2	120	4.2	8.2	9.7	81.1	77.2	31.7	17.7
10	111.1	56.2	5.2	27.25	44.2	61.6	10.2	10.7				
Mean	88.83	37.79	23.89	18.77	91.64	39.57	21.04	19.10	84.90	53.58	25.14	18.64
SEM	9.69	7.06	9.80	5.49	9.49	10.93	6.31	3.35	9.25	7.15	4.39	6.27
<b>Path (cm)</b>												
1	820.5	426	197.65	163.25	1611.95	2876.2	131	464.55	2006.3	823.75	64.55	174.35
2	1714.25	281	312.45	154.05	1156.5	579	1023.5	738.95	420.4	1884.55	1213.8	203.25
3	1409.1	948.1	1216.75	504.25	2220.9	1218.35	1422.6	266.35	2108.55	1465.8	652.65	247.15
4	2481.55	1168.25	903.3	105.45	2252.75	728.65	355.55	342.95	1665.45	483.7	430.8	1278.1
5	1774.85	1031.35	346.35	225.45	2945.3	457.3	713.85	143.55	2374.6	2089.95	353.4	370.2
6	1373.85	624.55	293.95	561.75	1872.8	611	310.95	1005.5	2249.4	1153.1	958.45	146.85
7	1924.1	296.15	414.8	134.4	2044.2	951.15	338.35	664.85	2020	1162.2	1203.6	971.5
8	938.65	1114.4	188.2	195.05	1173.9	349.75	275.2	590.05	1776.8	1489.2	561.05	168.6
9	2153.9	1243.1	355.9	1341.05	2669.9	153.9	231.8	277	1603.95	1896.3	986.9	512.85
10	2667.45	1589.9	134.25	607.25	952.95	1750.85	332.8	250.45				
Mean	1725.82	872.28	436.36	399.20	1890.12	967.62	513.56	474.42	1802.83	1383.17	713.91	452.54
SEM	192.83	140.31	109.93	120.73	210.64	257.31	130.74	85.70	192.88	177.01	133.49	135.25
<b>Velocity (cm/s)</b>												
1	18.5	27.85	22.45	24.8	15.45	24.75	21.3	23.5	25.05	25.35	15.4	27.55
2	22.45	25	22.55	22.95	23.1	28.15	25.7	25.75	21.1	24.7	27.35	24.75
3	11.8	11.5	11.3	16.5	18.5	17.3	19.4	21.35	23.1	24.5	24.1	19.4
4	22.95	23.95	24.6	21.75	20.4	22.95	24.5	23.7	18.7	25.35	22.3	21.15
5	21.3	23.95	24.3	21	24.5	29	29.9	24.95	22.55	28.75	34.05	28.6
6	18.4	26.6	20.65	23.15	20.65	29.5	24	25.7	19.4	29	31.25	24.45
7	16.05	23.8	21.3	19.6	22.5	29.8	29.85	25.7	16.2	31.55	30.2	28.75
8	25.1	26.1	23.9	20.65	20.9	22.7	19.4	19.6	21.35	28.55	28.2	19.35
9	24.6	28.8	23.5	23.15	22.2	31.45	27.45	28.75	21.9	25	32.1	28.65
10	24.15	30	23.75	20.8	24.1	27.55	29.4	22.25				
Mean	20.53	24.76	21.83	21.44	21.23	26.32	25.09	24.13	21.04	26.97	27.22	24.74
SEM	1.36	1.62	1.24	0.73	0.86	1.37	1.30	0.83	0.87	0.84	1.94	1.32

Appendix 4 MWM のプローブテストの結果（研究課題 1-3）

Spatial Memory	CONT	ME	IE
<b>Time in target quadrant (%)</b>			
1	11.16	16.92	22.74
2	13.74	13.38	14.94
3	14.34	18.54	4.56
4	20.34	37.08	6.18
5	14.4	17.16	15.54
6	17.64	17.16	14.1
7	18.96	20.34	13.8
8	11.7	20.94	18.84
9	11.58	18.36	17.16
10	9.54	20.16	
Mean	14.34	20.00	14.21
SEM	11.63	36.70	29.22
<b>Path (cm)</b>			
1	4.947	6.6792	11.0246
2	5.649	6.2975	7.752
3	4.216	7.6874	1.9608
4	8.398	8.5398	2.3247
5	10.2393	14.8336	7.336
6	8.3394	6.3726	4.6008
7	8.534	7.7275	6.6297
8	5.67	11.1878	8.5554
9	5.56	9.1234	8.806
10	4.0425	10.4185	
Mean	6.56	8.89	6.55
SEM	0.68	0.84	1.01
<b>Velocity (cm/s)</b>			
1	25.5	25.3	27.7
2	26.9	27.5	28.5
3	15.5	26.6	22.8
4	26	25.8	18.9
5	27.9	25.4	28
6	24.6	24.7	21.6
7	25.1	27.5	28.7
8	25.2	33.8	29.4
9	27.8	31.9	34
10	23.1	31.1	
Mean	24.76	27.96	26.62
SEM	1.13	1.00	1.55