

M13609

平成25年度 修士学位論文

一過性運動に対する海馬の生理的応答

-MMPsとIGF-Iシグナル伝達に着目して-

首都大学東京大学院

人間健康科学研究科 人間健康科学専攻

ヘルスプロモーションサイエンス学域

川上 将史

修士学位論文

一過性運動に対する海馬の生理的応答
—MMPs と IGF-I シグナル伝達に着目して—

平成 26 年 1 月 8 日 提出

首都大学東京大学院

人間健康科学研究科 博士前期課程 人間健康科学

専攻

ヘルスプロモーションサイエンス学域

学修番号：11899604

氏名：川上 将史

(指導教員名：北 一郎 教授)

要旨

近年、長期間運動が海馬神経機能を高めることが明らかにされてきている。しかし、一過性運動が海馬の生理的応答に及ぼす影響を検討した研究は少なく、また、その分子機構は未だ解明されていない。海馬神経機能を高めるものとして、海馬細胞外環境の調節に重要な役割を担っているマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP-9、MMP-2)、多様な神経保護作用を有するインスリン様成長因子-1 (IGF-I) が知られており、神経活動の活性化により MMP-9 の酵素活性の上昇、血中 IGF-I の脳内移行促進がみられることが報告されている。これまでの研究から、一過性運動が海馬の神経活動を高めることが明らかにされているため、一過性運動は MMP や IGF-I シグナル伝達を活性化させる可能性が考えられる。そこで本研究では、一過性運動が海馬 MMP および IGF-I シグナル伝達に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

実験では、Wistar 系雄性ラットに異なる運動強度 (コントロール群 : 0 m/min、低強度群 : 10 m/min、高強度群 : 25 m/min) の一過性トレッドミル走運動 (30 分間) を行わせ、運動終了の直後、および 6、12、24 時間後に海馬を採取した。研究課題 1 では MMP-9 および MMP-2 の酵素活性とその内因性阻害物質 TIMP-1 (Tissue inhibitors of metalloproteinases-1) タンパク発現を、研究課題 2 では IGF-I シグナル伝達の主要なリン酸化酵素である Akt (Protein kinase B) と Erk1/2 (Extracellular signal regulated kinases 1/2) の活性応答を検討した。

実験の結果、研究課題 1 では、低強度の一過性運動終了から 12 時間後

に海馬 MMP-9 の酵素活性が有意に上昇することが明らかになった。しかし、海馬 MMP-2 の酵素活性、海馬 TIMP-1 タンパク発現に関しては、全てのタイムポイントで運動条件による差異はみられなかった。これらのことは、一過性の低強度運動は海馬 MMP-9 の酵素活性を有意に上昇させるが、高強度運動では海馬 MMP-9 酵素活性にあまり影響しないことを示している。先行研究より、高強度運動ではなく低強度運動が神経新生を促進させること、また、MMP-9 が神経新生に関与していることが明らかにされつつあることを考慮すると、長期的運動による海馬神経新生促進の分子基盤のひとつに一過性運動による MMP-9 酵素活性の増加が関与しており、また、その効果は運動強度によって異なる可能性が考えられる。

研究課題 2 では、一過性運動直後において、低強度群と高強度群だけでなく運動を行っていないコントロール群でも活性型のリン酸化 Erk1/2 発現が増加した。また、一過性運動による活性型のリン酸化 Akt 発現の変動はみられなかった。リン酸化 Erk1/2 発現の結果は、ラットをトレッドミルに乗せるという実験操作自体が刺激となってしまったことによるものかもしれない。また、Akt リン酸化に関しては、先行研究より刺激提示の 1~2 時間後に促進するという報告もみられることから、本実験で設定したサンプリングポイントでは Akt リン酸化の変動を捉えることができなかった可能性が考えられる。さらに、一過性運動が IGF-I を介して Erk1/2 と Akt リン酸化を増加させることを明らかにするためには、IGF-I 受容体が活性化していることを示す必要もある。これらのことから、一過性運動による Erk1/2 と Akt の活性応答を検討するためには実験デザインを改善し、さらに検討する必要があると考えられる。

本研究の結果から、一過性運動により海馬 MMP-9 の酵素活性が高まる
ことが明らかとなった。この結果は、運動による海馬神経機能の向上に、
MMP-9 酵素活性を介した細胞外環境の調節が関与している可能性を示唆
する。一方、一過性運動が IGF-I シグナル伝達に及ぼす影響を解明するた
めには実験デザインを改善し、さらに検討する必要があると考えられる。

目次

第1章 諸言.....	3
第2章 研究の背景.....	6
第1節 海馬の構造・機能.....	6
第2節 運動による海馬機能向上の分子機構.....	7
2.1 長期間運動による海馬機能向上の分子機構.....	7
2.2 一過性運動による海馬神経活動の活性化.....	9
第3節 MMP-9.....	11
3.1 MMP-9 とは?.....	11
3.2 MMP-9 と運動.....	12
第4節 IGF-I シグナル伝達.....	14
4.1 IGF-I シグナル伝達とは.....	14
4.2 IGF-I シグナル伝達と運動.....	15
第5節 測定手法.....	17
5.1 ゲル酵素電気泳動法 Gel Zymography.....	17
第3章 実験的検討.....	18
研究課題1 一過性運動に対する海馬の MMP-9 活性応答.....	18
1. 目的.....	18
2. 方法.....	19
3. 結果.....	28
4. 考察.....	30

研究課題 2 一過性運動に対する海馬 IGF-I シグナル伝達の活性応答

39

1. 目的.....	39
2. 方法.....	39
3. 結果.....	41
4. 考察.....	42
第4章 総合討論	50
引用文献.....	54

第1章 諸言

運動は、筋・骨格系や、呼吸・循環系の機能を向上させる。さらに近年の神経科学研究により、運動は脳にも有益な効果をもたらすことが明らかとなった。特に、記憶・学習の中心的役割を担う海馬では、神経機能が運動によって高まることが、数多くの先行研究により明らかにされている (van Praag et al., 1999; Erickson et al., 2010; Chaddock et al., 2010; Trejo et al., 2008; Berchtold et al., 2010)。これらの研究では、実験動物に長期間（数週間～数ヶ月）の走運動を行わせ、それによって生じる構造的・機能的な変化から、運動が海馬神経機能に与える影響を検証している。一方、一過性運動が海馬内でどのような生理的応答を引き起こすかはほとんど明らかにされておらず、運動がどのようなメカニズムを介して海馬の神経機能を高めているのか、そのメカニズムの解明が進展しない一因となっている。これまでいくつかの先行研究により、一過性運動が海馬の神経活動を活性化させることが明らかにされている。神経活動の活性化は様々な生理的応答をひき起こすトリガーになることから (Bell and Hardingham, 2011)、一過性運動は海馬の神経活動の活性化を介して、多様な生理的応答を引き起こしている可能性が高い。本研究では、その神経活動の活性化が引き起こす生理的応答の中で、特に海馬神経機能の維持・向上のために重要な役割を担っているマトリックスメタロプロテナーゼ-9 (Matrix Metalloproteinase-9, MMP-9) と血液中インスリン様成長因子-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-I) が引き起こすシグナル伝達に着目した。

海馬の神経機能を維持するためには細胞外プロテアーゼによる調節が必須であり、その主要なプロテアーゼのひとつに MMP-9 がある (Wright et al., 2007)。この MMP-9 の酵素活性は神経活動の活性化により高まることから (Szklarczyk et al., 2002)、一過性運動は神経活動の活性化を介して海馬 MMP-9 の酵素活性を上昇させる可能性が高い。しかしながら、これまで運動による海馬神経機能の向上に関わる分子機構として細胞外環境の調節に着目した研究は非常に少なく、上記の仮説を検証した報告もない。運動は海馬において神経細胞の新生を促進するが、新たに生まれる神経細胞が分化・成熟しその機能を発現するためには細胞外環境のリモデリングが必須となる。この細胞外環境のリモデリングに MMP-9 が重要な役割を担っていることから、一過性運動による MMP-9 の活性応答が明らかになれば、その知見は運動が海馬の構造的変化をひき起こす分子機構を新たな視点から検討するための基盤になるだろう。

近年、IGF-I が神経活動の活性化により脳内に移行して作用することが明らかとなった (Nishijima et al., 2010)。IGF-I は多様な神経保護作用を有しており、運動による海馬神経機能の向上に重要であることが知られている。実際に、長期間運動が血液中から海馬への IGF-I 供給を介して、Akt (protein kinase B) や Erk1/2 (Extracellular signal regulated kinases 1/2) を活性化させ、海馬神経機能を高めることが報告されている (Trejo et al., 2001; Ding et al., 2006)。しかしながら、この IGF-I シグナル伝達でさえ、一過性運動によって活性応答がどのように応答するかは明らかにされていない。

そこで本研究では、一過性運動が海馬 MMP-9 や IGF-I シグナル伝達に

及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。なお、海馬の神経活動は運動強度に依存して活性化することが報告されている (Lee et al., 2003)。また、神経活動の活性化から MMP-9 の酵素活性が上昇するまでには 12~24 時間が必要であることが報告されている (Nagy et al., 2007)。これらのことから、MMP-9 や IGF-I シグナル伝達の活性応答も運動強度や運動終了後の時間経過によって異なる可能性があり、本目的を達成するためには、運動強度と運動終了後の経時的変化を考慮する必要がある。そこで、Wistar 系雄性ラットに異なる運動強度 (コントロール群 : 0 m/min、低強度群 : 10 m/min、高強度群 : 25 m/min) で 30 分間の一過性トレッドミル走運動を行わせ、運動終了直後、および運動終了から 6、12、24 時間後に海馬を摘出し、MMP-9 酵素活性 (研究課題 1) と、IGF-I シグナル伝達の主要なリン酸化酵素である Akt、Erk1/2 の活性応答 (研究課題 2) を検討した。

第2章 研究の背景

第1節 海馬の構造・機能

海馬は Giulio Cesare Aranzi によって初めて名づけられた脳部位であり、大脳皮質の内側側頭葉に両側性に位置している。海馬は歯状回（顆粒細胞層）とアンモン角（CA1～CA3; 錐体細胞層）と海馬台（錐体細胞層）の三つの主要部位から構成される（Miyashita, 2004; Yau et al., 2010）。

1953年、てんかん発作の治療のために、海馬を外科的に取り除いた H.M が新しく物事を記憶できなくなったことで、海馬が記憶の形成に関与していることが知られるようになった（Scoville and Milner, 1957; Zola-Morgan et al., 1986）。さらに、海馬損傷の程度が記憶障害の重症度と関連することが明らかとなった（Zola-Morgan et al., 1986）。海馬依存性の記憶としては、エピソード記憶、陳述記憶、文脈記憶、空間認知記憶が挙げられる（McEwen et al., 2002）。また海馬を障害すると恐怖条件下で不安を感じなくなることが報告されており、情動との関与も示唆されている（McNaughton and Gray, 2000）。

海馬の機能は老化や精神疾患と関係づけられている。老化、うつ病、慢性ストレスやPTSD（心的外傷後ストレス障害）は海馬が萎縮し、海馬機能の障害が生じることにより引き起こされることが報告されている

（Miller and O'Callaghan, 2005; Fink, 2011; Freeman et al., 2006; Acheson et al., 2011）。また、アルツハイマー病の患者で海馬の萎縮がみられることから、海馬の機能低下がアルツハイマー病の原因のひとつであ

る可能性が考えられている。

以上より、海馬はヒトが生活をしていく上で中心的な役割を担う記憶や情動に関与しており、その神経機能を維持することは健全な生活に不可欠な要因であると考えられる。しかしながら、海馬の機能を向上させる分子機構の全容は未だ解明しておらず、海馬の機能に対する研究の促進が望まれている。

第2節 運動による海馬機能向上の分子機構

2.1 長期間運動による海馬機能向上の分子機構

長期間運動は海馬依存的な学習と記憶を向上させることが報告されている。高齢者が週に3日の運動を1年間おこなった結果、海馬の体積が増加し、海馬依存的な空間認知機能が向上したことが報告されている (Erickson et al., 2010)。また、9~10歳の小児は高強度の運動をおこなうことで、海馬の体積が増大し、海馬依存的な記憶課題の成績が向上することが報告されている (Chaddock et al., 2010)。このように、長期間運動が海馬に構造的な変化(肥大)をもたらし、その神経機能を向上させることがヒトを対象とした研究からも明らかとなり、運動が海馬に及ぼす効果は益々注目を集めている。

運動が海馬の機能を向上させる要因についての報告は数多く存在する。齧歯類の海馬では、運動は脳由来神経栄養因子 (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF)、インスリン様成長因子 (Insulin-Like Growth Factor-1, IGF-I) の増加を介して空間認知機能を向上させること

が示されている (Trejo et al., 2008; Berchtold et al., 2010)。BDNFは神経細胞の発生・成長・再生を促進させる栄養因子であり、海馬依存的な機能の向上に関与することが報告されている。近年、Berchtold et al. (2010)は齧歯類の実験で、3週間の自発運動がBDNF発現を増加させたことを報告している。さらに、そのBDNFのタンパクレベルは空間認知機能を示す放射状迷路課題¹の改善と相関関係がみられた。したがって、運動によるBDNFの増加は神経新生を増加させ、空間認知機能を向上させることが示唆される (Foster et al., 2011)。また、IGF-Iは神経新生、血管新生、アポトーシスの制御、グルコース代謝、神経伝達物質の合成と放出のために重要であり、BDNFと同様に運動が誘発する認知機能向上の分子機構に重要な役割を果たしている (Ding et al., 2006)。近年の研究では、Trejo et al. (2008)は肝臓におけるIGF-I産生が阻害されたLIDマウスを用いて、IGF-Iと空間認知機能との関係性を検討する実験をおこない、IGF-Iの阻害はモリス水迷路課題の成績を低下させ、神経新生を減少することを明らかにした。モリス水迷路の成績と神経新生の減少は低強度の運動をおこなっても改善しなかった。しかしながら、そのLIDマウスに皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプを用いてIGF-Iを投与するとモリス水迷路の成績が上昇し、神経新生が増加した。したがって、神経新生と空間認知機能がIGF-Iに依存していることが明らかとなった。

¹ 放射状迷路

採餌行動を利用した迷路課題で、海馬依存的な空間作業記憶および参照記憶を評価することができる。(田熊ら, 2007)。

以上のことより、運動は BDNF、IGF-I の増加を介して神経新生などの構造的変化を引き起こし、それにより海馬神経機能を向上させることが示唆される。現在、運動による海馬機能向上の分子機構が明らかとなってきたが、運動が海馬機能を向上させる詳細な分子機構は複雑で、未解明な部分も多い。さらに、運動が海馬機能に与える影響を解明するためには、長期間運動だけでなく一過性運動の影響にも着目して検討することが有用と考えられるが、一過性運動による海馬の生理的応答を検討した研究が非常に少ない。長期間運動は言い換えれば、一過性運動の繰り返しである。そのため、長期間運動による海馬神経機能の向上は、一過性運動が繰り返し海馬を刺激することによって適応した結果だと考えられる。このことは、一過性運動による海馬の生理的応答を明らかにすることが、長期間運動が海馬神経機能を高める分子機構の解明に貢献することを示唆する。またそれだけでなく、長期間運動が神経機能を向上させる最適な運動条件を見つけ出す手掛かりになるかもしれない。

2.2 一過性運動による海馬神経活動の活性化

一過性運動は、海馬のグルコース代謝 (Matsui et al., 2011)、セロトニンやドーパミンなどの神経伝達物質の放出 (Gomez-Merino et al., 2001 ; Goekint et al., 2012)、BDNF 発現 (Soya et al., 2007)、c-Fos 発現 (Lee et al., 2003)、局所脳血流動態 (Nishijima et al., 2012) などに影響することが明らかになっている。これらの先行研究のうち、c-Fos 発現と局所脳血流の増加は神経活動の指標として知られている。Lee et al. (2003) はラ

ットに3条件の運動強度（8 m/min、14 m/min、22 m/min）で30分間のトレッドミル走運動をさせ、運動終了後の c-Fos 陽性細胞の数を検討したところ、運動強度依存的に海馬 CA1、CA3、歯状回の全ての部位で c-Fos 発現が高まることを明らかにした。また、Nishijima et al.（2012）はラットに2時間の低強度トレッドミル走運動（10 m/min）を課し、運動中に神経活動に依存した海馬局所脳血流量の増加を明らかにしている。

以上のことより、一過性運動が海馬の神経活動を高めることが複数の先行研究により示されている（Lee et al., 2003; Nishijima et al., 2012）。この神経活動の活性化は様々な生理的応答を引き起こすトリガーとなることが知られており（Bell and Hardingham, 2011）、その一つとして BDNF 発現の増加が挙げられる（Lu B. 2003）。神経活動の活性化がカルシウムイオンの流入や TrkB シグナル伝達の活性化を引き起こす。つづいて、CREB の活性化を誘発し、BDNF 発現が増加するという分子機構が示唆されている（Lu B. 2003; Ding et al., 2011）。さらに、セロトニン、ドーパミンなどの神経伝達物質の放出増加も神経活動の活性化を反映するものであり、グリコーゲン分解も神経活動が活性化し、エネルギー消費が増加した結果だと考えられる。これらのことから、上記で示した生理応答は神経活動によって引き起こされる生理応答の一部であり、他にも多くの生理応答が運動で引き起こされている可能性が極めて高く、一過性運動の神経活動の活性化は一過性運動によって生じる生理的応答の根源である可能性が示唆される。本研究では、その生理応答の中でも MMP-9 の活性増加と IGF-I シグナル伝達に着目する。

第3節 MMP-9

3.1 MMP-9 とは？

神経細胞の機能を維持するためには、神経細胞をとりまく細胞外環境の調節が重要となる。この細胞外環境マトリックスの再構築と維持はタンパク質分解酵素ファミリーである MMPs (Matrix Metalloproteinases) によって調節されている (Stamenkovic I, 2003)。MMP-9 の酵素活性は脳虚血 (Asahi et al., 2000)、てんかん発作 (Szklarczyk et al., 2002) により上昇することが明らかとなっている。MMP-9 酵素活性が過剰に高まると虚血やてんかん発作が重篤化することから、MMP-9 の阻害剤が虚血、てんかん治療薬になる可能性も示唆されている (Kim and Lee, 2013; Mizoguchi et al., 2011)。また MMP-9 の特異的阻害剤がアルツハイマー病の治療に役立つことも示唆されている (Mizoguchi et al., 2009)。これらのことより、MMP-9 の阻害が様々な治療に役立つ可能性が考えられる。

しかしながら、MMP-9 は海馬の機能を向上させるために重要な細胞外プロテアーゼであり、その活性を阻害すれば良いというわけでは必ずしもない。齧歯類の実験では、行動学的手法によって MMP-9 と海馬機能の関連性が示されている。Nagy et al. (2006) は、MMP-9 ノックアウトマウスの海馬依存的な文脈性恐怖条件付けテスト²の学習成績が低下したこと

² 文脈性恐怖条件付けテスト

海馬依存性の学習能力を評価する行動テストのひとつ。動物は箱の中に入れられ、足に電気ショックを受ける。すると動物はその箱が危険である

を報告している。さらに、Nagy et al. (2007) はラットにおいて海馬依存的な機能を示す受動的回避学習³課題後のMMP-9活性の経時変化を検討した結果、海馬のMMP-9酵素活性は12時間後で有意に上昇し、24時間後まで活性が高い状態が維持された。またMMP-9を阻害すると、受動的回避学習に障害が生じた。したがって、MMP-9は海馬依存的な機能に関与し、MMP-9酵素活性の増加が海馬の機能向上に関わることが示唆されている。さらに、MMP-9活性は神経活動の活性化直後ではなく、一定時間経過後に上昇するという時間的特性が示唆される。

以上のことより、病理学的な研究では、過剰なMMP-9活性の抑制はてんかん発作やアルツハイマー病などの治療に役立ち、行動学手法を用いた研究では適度なMMP-9活性の上昇が海馬機能を向上させることが示唆されている。これらのことから、MMP-9は海馬の機能に対して非常に重要な役割を担っていることが示唆される。しかしながら、運動がMMP-9活性に及ぼす影響についてはほとんど解明されていない。

3.2 MMP-9と運動

ことを覚え、再び同じ箱の中に入れると、すくみという防御的反応を示すようになる。すくみ反応を呈した時間から学習能力を評価することができ、海馬を破壊するとすくみ反応時間が減少する (Kitamura et al., 2009)。

³ 受動的回避学習

動物が一度経験した嫌悪刺激（電気刺激）に対して示す回避行動を記憶の指標とする海馬依存的な学習課題である（田熊ら, 2007）。

長期間運動が MMP-9 に及ぼす影響については幾つかの報告がある。Chaudhry et al. (2010) は、ラットに中大脳動脈閉塞による脳梗塞を誘発すると皮質における MMP-9 酵素活性が上昇し、アポトーシスが促進されるが、3 週間の高強度トレッドミル走運動を行わせたラットではその応答が抑制されることを報告している。更に MMP-9 を阻害した群でも、アポトーシスが抑制された。これらのことから、長期間運動が脳虚血 による MMP-9 酵素活性の上昇を抑制し、抗アポトーシス作用を発揮することを明らかにした。また MMP-9 の酵素活性は、MMP-9 の内因性抑制物質である TIMP-1 (Tissue inhibitors of metalloproteinases-1) により調節されている。皮質において、その TIMP-1 タンパク発現が長期間運動により増加することが報告されている (Guo et al., 2008)。これらのことから、皮質だけでなく海馬でも長期間運動が MMP-9 活性や TIMP-1 発現に影響を及ぼすことが考えられる。

その MMP-9 の酵素活性は神経活動の活性化により高まることが報告されている。Szklarczyk et al. (2002) はラットにグルタミン酸受容体の作動薬であるカイニン酸を腹腔内投与し、MMP-9 の経時変化 (0、2、6、24 時間後に計測) を検討した結果、海馬の MMP-9 酵素活性が 24 時間後に上昇がみられた。これらのことから、神経活動の活性化が MMP-9 活性を調節していることが示唆される。一過性運動は海馬の神経活動を高めることから (Lee et al., 2003; Nishijima et al., 2012)、一過性運動により海馬の神経活動が活性化し、MMP-9 活性が上昇することが考えられる。一方、TIMP-1 の mRNA 発現もカイニン酸投与により増加することが報告されている (Jourquin et al., 2005)。そのため、一過性運動が TIMP-1 タン

パク発現を増加させ、MMP-9 の酵素活性を抑制する可能性も否定できない。

以上のことから、運動が MMP-9 を介して海馬機能を向上させることが示唆される。しかし、運動と MMP-9 の関係についての研究は非常に数が少なく、一過性運動が MMP-9 活性を上昇させるかどうかも未解決のままとなっている。これまでは、運動が海馬機能を向上させる要因として、神経新生といった細胞の変化のみが着目されてきた。これに対し、もし MMP-9 が運動による海馬機能向上に関与していることが示唆されれば、運動が海馬機能を向上させる分子機構の解明に、細胞だけでなくより細胞外環境に着目することも重要であることを示すことができる。また、他の細胞外タンパク質や分子の関与も示唆され、新たな研究の展開につながることを期待される。

第 4 節 IGF-I シグナル伝達

4.1 IGF-I シグナル伝達とは

IGF-I は主に肝臓で産生されるが、脳（海馬）を含む多くの組織でも局所的に産生され、自己分泌・傍分泌的に作用する。IGF-I が IGF-I 受容体と結びつくと、IGF-I 受容体はチロシンリン酸化され、その下流で Akt (protein kinase B) や Erk 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) がリン酸化する。IGF-I は神経新生、血管新生、アポトーシスの制御、グルコース代謝、神経伝達物質の合成と放出など、脳神経系に対する作用があり、認知機能にも関わっている。更には、IGF-I は脳損傷、糖尿病、加齢による脳機能障害の場合でも認知機能を支えていることが明らかになっ

ている (Aberg et al., 2006; O' Kusky and Ye, 2012)。その IGF-I シグナル伝達経路の下流で活性化する主要なリン酸化酵素が Akt と Erk 1/2 である。Akt は代謝と増殖、細胞生存、成長を含む多くの細胞内プロセスを制御しており、認知機能に関与することも明らかになっている (Hers et al., 2011; Bruel-Jungerman et al., 2009)。Erk 1/2 も細胞増殖と分化の過程に肝要な役割を担っており、記憶と学習の機能と重要な関連があることも明らかになっている (Peng et al., 2010)。

以上のことから、IGF-I シグナル伝達は病理学的な研究では、脳損傷、糖尿病、加齢による脳機能障害時の認知機能を支えており、神経新生など様々な構造的変化を介して海馬神経機能の維持・向上に貢献していることが示唆される。さらには、IGF-I は運動による認知機能向上の分子機構に重要な役割を果たしていることが知られている。

4.2 IGF-I シグナル伝達と運動

長期間運動がIGF-Iシグナル伝達に及ぼす影響を示した研究は数多く存在する。近年の研究では、Ding et al. (2006) がIGF-I受容体阻害が運動によるモリス水迷路課題の成績向上を阻害することを明らかにし、Trejo et al. (2008) が運動による神経新生の促進、および海馬依存性の空間記憶・学習の向上がIGF-Iの増加を介して調節されていることを明らかにしている。これらのことから、IGF-I-IGF-I受容体のシグナル伝達が運動による神経新生の促進などの構造的変化を引き起こし、海馬神経機能を向上させることが示唆される。そのIGF-Iシグナル伝達の下流にあるAktとErk1/2のリン酸化は長期間運動により促進し、Aktが運動による認知機能向上に

関与していることが報告されている。Ding et al. (2011) は1週間の自発運動により海馬AktとErk1/2のリン酸化が増加したことを明らかにしている。さらに、Bruehl-Jungerman et al. (2009) はAktのシグナル伝達が運動による海馬歯状回の神経新生や長期増強 (long-term potentiation, LTP) に関与していることを明らかにした。10日間の自発運動による海馬歯状回のリン酸化Akt発現、細胞の生存数、およびLTPの上昇がAktの上流にあるPI3Kを阻害することで抑制された。これらのことから、長期間運動による海馬機能向上にAktやErk1/2が関与していることが示唆される。

更に近年、神経活動の活性化により血液中IGF-Iが脳内に移行して作用することが示されている。Nishijima et al., (2010) は血液中のIGF-Iは神経活動が活性化した脳部位へ移行するのかどうかを検証するため、ラット動脈にヒト組換えIGF-Iを投与し、活性化させた脳部位でこれらが増加するのかどうか調べた。麻酔下でラット小脳脚を電気刺激、体性感覚野（バレル皮質）を対側ヒゲ刺激したのち、小脳、バレル皮質におけるヒト組換えIGF-I濃度を測定した。その結果、電気刺激によって小脳におけるヒト組換えIGF-Iが有意に増加することが認められた。バレル皮質では、チロシン残基がリン酸化されたIGF-I受容体は増加しており、刺激部位においてIGF-I作用が亢進していることが確認された。これらのことから、神経活動が活性化した脳部位では、IGF-Iが増加することやそのIGF-Iは脳内で産生されたものではなく血液から供給されていることが示された。

以上のことから、IGF-I や Akt、Erk 1/2 は運動による認知機能向上の分子機構に重要な役割を果たしていることが明らかであるが、この長期間運動による海馬神経機能の向上に関わる主要な分子機構である IGF-I シグナ

ル伝達にもかかわらず、一過性運動によってどのように活性応答を示すかは明らかにされていない。血液中 IGF-I が神経活動の活性化により脳内に移行して作用すること (Nishijima et al., 2010) や、一過性運動が海馬神経活動を活性化させること (Lee et al., 2003; Nishijima et al., 2012) から、一過性運動により IGF-I シグナル伝達が活性化される可能性が高い。

第 5 節 測定手法

5.1 ゲル酵素電気泳動法 Gel Zymography

刺激に対する MMP-9 の生理応答を検討するため、MMP-9 タンパクの発現量ではなく、その酵素活性の変化を検討する必要があり、その解析方法として Gel Zymography がある。Gel Zymography はゼラチンなどの基質を含む SDS ポリアクリルアミドゲル上でサンプルを電気泳動した後に、ゲルを緩衝液中でインキュベートする。これにより、基質分解活性を含む試料ではゲルが消化されることを利用した検出方法である。この方法の利点は分子量により特定のタンパク質を分離し、酵素活性を定量できる点である (Kupai et al., 2010)。そこで本研究では、この Gel Zymography を用いて、一過性運動後の海馬 MMP-9 活性応答を解析することとした。

第3章 実験的検討

研究課題 1 一過性運動に対する海馬の MMP-9 活性応答

1. 目的

一過性運動は海馬の神経活動を高め (Lee et al., 2003)、さらに神経活動の活性化は MMP-9 の酵素活性を増加させることが明らかにされている (Szklaarczyk et al., 2002)。すなわち、これらのことは一過性運動が海馬 MMP-9 の酵素活性を増加させる可能性を示唆する。けれども、一過性運動が海馬 MMP-9 の酵素活性を増加させるか否かは明らかになっていない。なお、MMP-9 の酵素活性は神経活動の活性化を誘発する刺激から 12~24 時間後に上昇することが報告されているため (Nagy et al., 2007)、運動による MMP-9 の活性応答を検討する際にも運動終了後からサンプリングまでの時間を考慮する必要がある。一過性運動は運動強度依存的に神経活動を高めることも報告されている (Lee et al., 2003)。神経活動の高まりの程度が MMP-9 の活性応答に影響することが考えられるため、運動強度も考慮する必要がある。そこで研究課題 1 では、運動による海馬 MMP-9 の活性応答を運動の強度および運動終了後からの経時的変化と運動強度に着目して検討する。また、MMP-9 の内因性抑制物質である TIMP-1 のタンパク発現応答と MMP-9 と同様にゼラチンを基質とする細胞外プロテアーゼである MMP-2 (Matrix Metalloproteinase-2, MMP-2) の活性応答も検討する。

2. 方法

(1) 実験動物

実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本エスエルシー）を用いた。ラットは 1 ケージに 3~4 匹ずつ入れ、12 時間の明暗サイクル（5 時 点灯、17 時 消灯）で、温度 24℃、湿度 50 % に常時維持した飼育室にて飼育した。水と食餌（F-2、フナバシファーム）は自由摂取とした。実験は全て、首都大学東京南大沢キャンパスの研究安全倫理委員会の承認の下、動物実験管理規定の規則に従い実施した。

(2) 安静時 MMP-9、MMP-2 酵素活性、TIMP-1 タンパク発現の経時的変化

一過性運動実験を実施するに先立ち、海馬をサンプリングする時刻の違いが安静時の MMP-9、MMP-2 酵素活性、および TIMP-1 タンパク発現に影響するかどうかを検討した。8 週齢から飼育を始め、7 日間の予備飼育を行った。予備飼育後、本実験での海馬サンプリングポイントとして 9 時、15 時、21 時に海馬を採取した（9 時 n=6、15 時 n=5、21 時 n=5）。

(3) 一過性トレッドミル走運動テスト

8 週齢から飼育を始め、3~7 日間の予備飼育を行った。まずトレッドミル走運動に馴化されるために、全てのラットに走行トレーニングを行わせた（表 1）。電気刺激を受けることなく安定してトレッドミル走運動が行えるように、段階的に速度を上げ、時間を延長しながらトレッ

ドミル走運動を行わせた。最終的に全てのラットが 25 m/min の速度で 30 分間のトレッドミル走運動を行えるようになった。最後のトレッドミル走速度の影響を除くため、3 日間の安静期間を設けた後、一過性トレッドミル走運動テストを行った。ラットをトレッドミル上に移動させてから 10 分間の安静の後、30 分間の一過性トレッドミル走運動を課した (図 1)。神経活動の高まりの程度が MMP-9 の活性応答に影響することが考えられることから、運動強度依存的 (8~22 m/min) な海馬 c-Fos 発現の増加を明らかにした先行研究を基準に (Lee et al., 2003)、低強度運動は 10 m/min、高強度運動は 25 m/min とした。コントロール群は、トレッドミル上に置くだけ (0 m/min) とした。神経活動の活性化を誘引する刺激の 12~24 時間後に MMP-9 酵素活性が上昇することから (Nagy et al., 2007)、サンプリングポイントはトレッドミル走運動の直後、および 6、12、24 時間後とした。そのサンプリング時刻は 9 時 (運動直後、24 時間後)、15 時 (6 時間後)、21 時 (12 時間後) とした。

(4) サンプル処理

海馬摘出

各サンプリングポイントにおいてラットに過剰量のペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg BW) を腹腔内投与し、冷却した生理食塩水 (0.9% NaCl) を左心室から全身に灌流した。灌流後、直ちに脳を摘出し、氷冷したガラスプレート上で海馬を分画した。分画した海馬は直ちに液体窒素を用いて凍結し、以降の解析まで -80℃で冷凍保存した。

海馬ホモジナイズおよび総タンパク濃度の定量

海馬片側に対して 500 μ l の Lysis buffer (20 mM Tris-Hcl (pH 7.6)、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂、1 % Triton X-100、1 % Glycerol、500 μ M PMSF) を添加し、マイクロマルチミクサーを用いて氷上で攪拌・粉碎した。10,000 rpm、4°Cで 10 分間遠心分離し、上清を回収した。上清の 100 μ l を Western blot 用として取り分け、プロテアーゼ阻害剤 (cOmplete mini, Roche) 入りの Lysis buffer を 200 μ l 添加した。残りの上清は、Gel Zymography に用いた。

各サンプル中の総タンパク濃度は、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc) を用いて定量した。上清を 0.1 M PBS で 30 倍希釈した各試料と BCA Regent を 96 ウェルプレート内で混合し、室温で 30 分静置した後、マイクロプレートリーダー (Spectra MR, DYNEX Technologies Inc) を用いて 562 nm における吸光度を測定した。濃度 0、0.025、0.125、0.25、0.5、0.75、1、1.5 mg/ml のウシ血清アルブミンを標準液として検量線を作成し、これを基準に各上清の総タンパク濃度を算出した。

(5) MMP-9、MMP-2 酵素活性の定量 (Gel Zymography)

MMP-9、MMP-2 酵素活性は Gel Zymography により定量した。まず、上清から MMP-9 および MMP-2 を抽出するため、タンパク 1 mg を含む上清と 50 % Gelatin-Sepharose 4B (GE Healthcare) 100 μ l を混合し、4°Cで 24 時間インキュベートした。500 \times g、4°Cで 2 分間遠心分離

し、不要な上澄みを除去した。MMP-9 および MMP-2 と結合したセファロースビーズを含む沈殿物を Working Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂、0.05 % Brij 35) で 3 回洗浄した後、Elution Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂、0.05 % Brij 35、10 % DMSO) 100 μ l を添加した。4°C で 2 時間静かに混合し、MMP-9 および MMP-2 を溶出した。この溶出液 20 μ l と Laemmli Buffer 10 μ l を混合し、電気泳動用の試料とした。なお、MMP-9 の酵素活性を失活させないために、Laemmli Buffer には還元剤を加えず、試料の煮沸も行わなかった。

この調整した 30 μ l の試料に対して SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動) を行うことによってタンパク質を分離した。SDS-PAGE には 0.1 % ゼラチン含有の 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルを使用し、ミニトランスブロット® セル (BIO-RAD) を用いて 125V で 2 時間の電気泳動を行った。分子量マーカータには Precision Plus Protein™ Standard (BIO-RAD) を使用した。電気泳動後のゲルを 2.5 % Triton X-100 で 30 分間の洗浄を 2 回行うことで SDS を除去し、MMP-9 の立体構造を復元した。ゲルを Novex Developing Buffer (Invitrogen) に浸し、37°C で 48 時間インキュベートすることにより、MMP-9 によるゼラチン分解 (酵素消化) を行わせた。ゲルを蒸留水で 3 回洗浄し、染色液 (Brilliant Blue、Sigma-Aldrich) によりゲルに含まれるタンパク質 (ゼラチン) を染色した。脱色液 (10 % メタノール、7 % 酢酸) で 3 回洗浄した。ゲルをスキャナー (CanoScan LiDE 600F、Canon) を用いて

スキャンし、Image J (NIH) を用いて MMP-9、MMP-2 の酵素消化によって現れるバンドの光学的密度を求めた。

(6) Gel Zymography の妥当性の確認

本実験が、当研究室において Gel Zymography を用いる初めての機会であったため、本実験のサンプル解析を行うに先立ち、Gel Zymography により MMP-9 酵素活性が検出できるか否かを検討した。カイニン酸の腹腔内投与から 24 時間後に海馬 MMP-9 の酵素活性が上昇することが報告されているため (Szklarczyk et al., 2002)、生理食塩水もしくはカイニン酸 (10 mg/kg・BW) をラットの腹腔内に投与し、投与 24 時間後に海馬を採取した (n=2)。上述の方法を用いて海馬 MMP-9、MMP-2 の酵素活性を検出することに加え、ゲルをプロテアーゼ阻害剤 (0.05M EDTA) を含む Novex Developing Buffer (Invitrogen) に浸すことで酵素消化を阻害し、Gel zymography で検出されたバンドが MMP-9、MMP-2 の作用によるものか否かも確認した。

(7) TIMP-1 タンパク発現の定量 (Western blot)

MMP-9 の内因性阻害物質である TIMP-1 のタンパク発現は Western blot により検出・定量した。タンパク上清と蒸留水ならびに 0.1 % 2-Mercaptoethanol を含む Laemmli sample buffer (BIO-RAD) を混合し、溶液中の最終タンパク質量が 20 μ g となるようにサンプルを調整した。サンプルをヒートブロック (TOHO) を用いて 100°C で 10 分間加熱し、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。SDS-PAGE には 16 %ポ

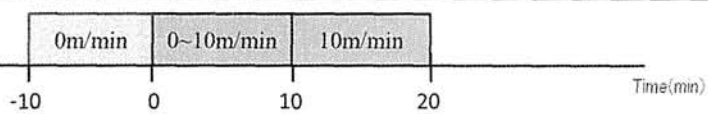
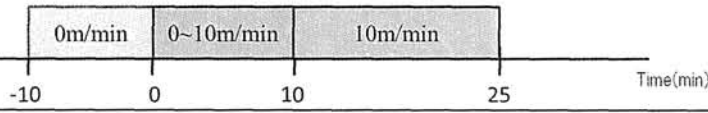
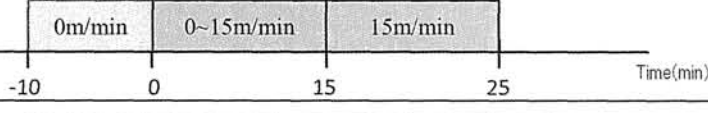
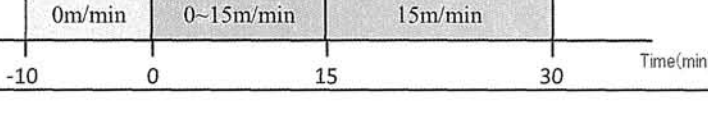
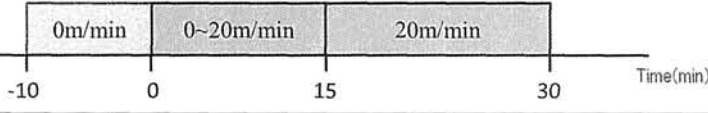
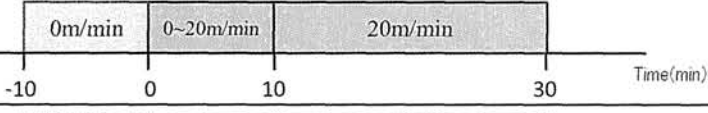
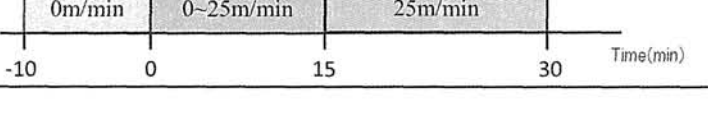
リアクリルアミドゲルを使用し、0.06 A で 1 時間、続いて 0.1A で 2 時間の電気泳動を行った。分子量マーカーには Precision Plus Protein™ Standard (BIO-RAD) を用いた。続いて、100V、80 分通電し、ポリアクリルアミドゲルからタンパク質を PVNF 膜(孔径 0.2 μm、BIO-RAD) 上に転写した。PVNF 膜は直ちにブロッキング溶液 (5 % BSA、0.05 % Tween-20 in TBS) に 1 時間浸した後、5 % BSA を含む TBS-T (0.05 % Tween-20 in TBS) に 1 次抗体 (抗 TIMP-1 抗体、1:500、Sigma-Aldrich ; 抗 GAPDH 抗体、1:1000、Trevigen) を加え、4℃で一晩反応させた。GAPDH は内部標準として検出した。反応終了後、TBS-T で 20 分間洗浄した。続いて、5 % スキムミルクを含む TBS-T に 2 次抗体 (HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体、1:1000、GE Healthcare) を加え、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、TBS-T で 20 分間洗浄した。洗浄終了後、Western Lightning®PLUS-ECL (PerkinElmer) に 2 分間反応させ、ImageQuant LAS 4000mini (GE healthcare) を用いてゲルを撮像した。Western blot で検出されたバンドの光学的密度は、Image J (NIH) を用いて定量した。TIMP-1 タンパク発現を検出後、Re-probing を行い、GAPDH タンパク発現を検出した。バンド検出後の PVNF 膜を Stripping buffer (1.5 M Tris-Hcl, 10 % SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol, pH 6.8) に 60℃で 1 時間浸すことで、PVNF 膜から抗体を剥がした。その後はブロッキング溶液に反応させる作業から上記と同様の工程を行った。

(8) 統計解析

MMP-9 および MMP-2 の酵素活性、および TIMP-1 発現量は、コン

トロール群 (0 m/min) に対する増加率 (%) で示し、結果は全て平均±標準誤差で示した。サンプリングポイントごとに運動強度を独立変数とする一要因分散分析を行い、有意性が認められた場合は多重比較 (Tukey) を行った。統計的有意水準は全て 5 %以下とした。

表 1: 走行トレーニングのスケジュール

スケジュール	Training	
1日目		
2日目		
3日目		
4日目		
5日目	Rest	
6日目		
7日目		
8日目		
9日目	Rest	
10日目	Rest	
11日目	Rest	
12日目	本実験	

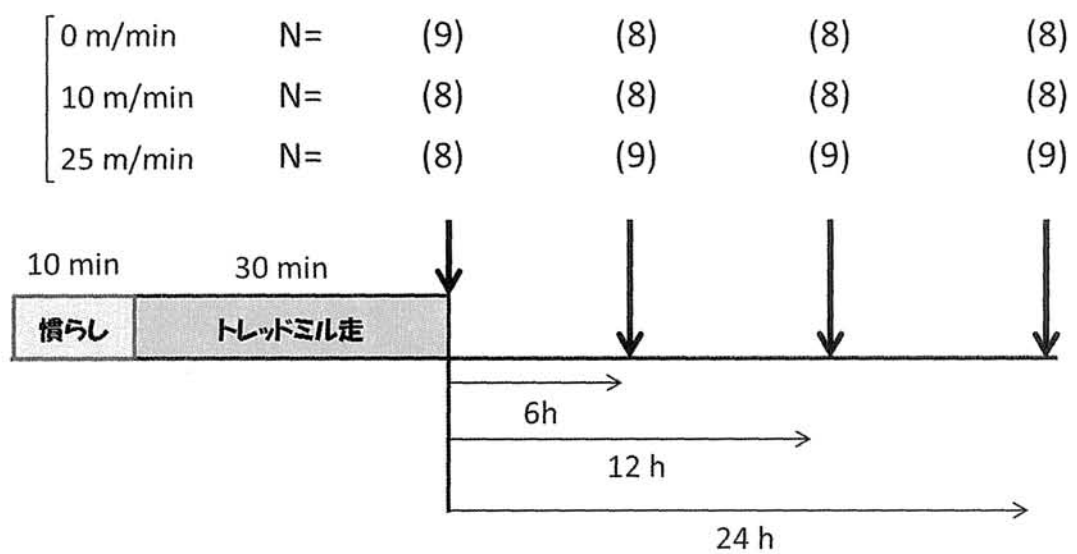


図 1: 研究課題 1 のデザイン

ラットをトレッドミル上に移動させてから 10 分間の安静後 (慣らし)、各運動強度で 30 分間の一過性トレッドミル走運動を課した。そのトレッドミル走運動の直後、および 6、12、24 時間後に海馬を摘出した。カッコ内の数字は、各ポイントにおけるラットの個体数を示す。

3. 結果

Gel Zymography の妥当性の確認

図 2 に、生理食塩水、またはカイニン酸を投与したラットの海馬を用いて Gel Zymography を行った結果（典型例）を示した。安静時（生理食塩水投与後）のラット海馬を試料として用いても MMP-9 および MMP-2 の酵素消化によって生じるバンドが検出できること、さらにカイニン酸投与による MMP-9 酵素活性の増加を再現できることが確認された（図 2-A）。インキュベーション時にプロテアーゼ阻害剤を入れ、酵素消化を阻害すると、海馬 MMP-9、MMP-2 の酵素活性は全く検出されなかった（図 2-B）。

安静時 MMP-9、MMP-2 酵素活性、TIMP-1 タンパク発現の経時的変化

図 3 に、各サンプリング時刻における安静時ラット海馬の MMP-9、MMP-2 酵素活性、および TIMP-1 タンパク発現の変化を示した。安静時ラットにおいて、海馬を摘出した各タイムポイント（9 時、15 時、21 時）の間には海馬の MMP-9（図 3-B）、MMP-2 酵素活性（図 3-C）、TIMP-1 タンパク発現量（図 3-D）に統計的有意差は認められなかった。

一過性トレッドミル運動後の MMP-9 酵素活性の変化

図 4 に、一過性トレッドミル運動が海馬 MMP-9 酵素活性に及ぼす影響を示した。一過性トレッドミル走運動の直後（図 4-A）および 6 時間後（図 4-B）においては、MMP-9 酵素活性に運動条件による差異は認められなかった。一方、12 時間後において、低強度群（10 m/min）の MMP-9 酵素活性はコントロール群（0 m/min）に比べて有意に高い値を示し（ $p < 0.05$ 、

図 4-C)、高強度群 (25 m/min) ではコントロール群に比べて高い値を示す傾向にあった ($p < 0.1$)。24 時間後では、海馬 MMP-9 の酵素活性に運動条件による差異は認められなかった (図 4-D)。

一過性トレッドミル運動後の MMP-2 酵素活性の変化

図 5 に、一過性トレッドミル運動が MMP-2 酵素活性に及ぼす影響を示した。全てのタイムポイントで、コントロール群と低強度群、高強度群の間には海馬 MMP-2 の酵素活性に統計的有意差は認められなかった。

一過性トレッドミル運動後の TIMP-1 タンパク発現量の変化

図 6 に、一過性トレッドミル運動が TIMP-1 タンパク発現に及ぼす影響を示した。全てのタイムポイントで、コントロール群と低強度群、高強度群の間には海馬 TIMP-1 のタンパク発現量に統計的有意差は認められなかった。

4. 考察

本研究が当研究室において Gel Zymography を用いる初めての機会であったため、本実験のサンプル解析を行うに先立ち、Gel Zymography により MMP-9 酵素活性が検出できるか否か、その妥当性を検討した。実験開始当初、海馬抽出液をそのまま Gel Zymography に供していたが、その場合は安静時の MMP-9 酵素活性を検出することができなかった。しかし、ゼラチンセファロースを用いて海馬抽出液を精製・濃縮することにより、安静ラットの海馬 MMP-9 および MMP-2 の酵素活性を検出することに成功した。さらに、カイニン酸投与が海馬 MMP-9 の酵素活性を増加させること (Szkłarczyk et al., 2002)、その活性増加が MMPs の非特異的阻害剤である EDTA を反応液に加えることで完全に阻害されることを確認した。これらの結果から、本実験で用いた Gel Zymography は MMP-9、MMP-2 酵素活性を解析するために妥当な方法であることが示された。

本実験では、4つのサンプリングポイントで運動強度を要因とした3群を設定した。さらに各群で8-9匹のラットを用いたため、ラットの総数は100匹となる。この100匹から得られた全ての測定結果を直接比較することが理想であるが、ウェスタン・ブロットィング法と同様に、Gel Zymography も、「同一ゲル上に泳動したサンプルでのみ、サンプル間の測定値を直接比較することができる」という原則がある。本実験で Gel Zymography を行うために用いた装置では、同一ゲルに10サンプルしか泳動することができないため、複数枚のゲルを使って解析することを避けることはできない。これは多くの生化学実験で生じるジレンマであるが、

どうしても複数枚のゲルが必要となる場合は、「一解析に用いるゲル数を最小限にする」という注意が必要となる。そこで本実験では、運動が海馬 MMP-9 酵素活性に及ぼす影響は、各タイムポイントで運動強度を独立変数とする一要因分散分析により解析・検討することで、一解析に使用するゲル枚数を最小化した。しかしながら、この解析・検討を行うためには、「安静時の MMP-9 酵素活性が、サンプリング時刻が異なっても一定である」ことが前提となる。

そこで、海馬をサンプリングする時刻の違いにより安静時の MMP-9、MMP-2 酵素活性、および TIMP-1 タンパク発現が変化するか否か検討した。実験では、9 時、15 時、および 21 時に、安静条件下でラット海馬を採取した。この時刻はそれぞれ、本実験の運動直後（および 24 時間後）、6 時間後、そして 12 時間後に一致する。実験の結果、安静ラットの海馬 MMP-9 および MMP-2 酵素活性、そして TIMP-1 タンパク発現量は、サンプリング時刻が異なっても一定であることが確認された。従って、一過性運動実験の結果においても、コントロール群の MMP-9 および MMP-2 酵素活性、TIMP-1 タンパク発現はサンプリングポイントが異なっても変化しておらず、各サンプリングポイントにおける統計解析により明らかになった結果は、運動強度の要因により生じたと解釈することができる。

本研究により初めて、低強度の一過性運動を行った 12 時間後に海馬 MMP-9 酵素活性が増加し、24 時間後には安静レベルに戻ることが明らかになった。この結果は、低強度運動が一過性の MMP-9 酵素活性の増加を引き起こし、それによって海馬の神経機能になんらかの影響を及ぼしていることを示唆している。MMP-9 が海馬の細胞外環境の調節に果たす生理

的機能としては大きく、細胞外環境のリモデリングとシグナル伝達の惹起の2つに分けられる。後者に関しては、MMP-9は不活性型の pro-BDNF から活性型 BDNF への成熟を促し、BDNF の作用発現に寄与していることが明らかにされている (Hwang et al., 2005)。では、一過性運動後の海馬 MMP-9 の活性増加は、BDNF の産生に関与しているのだろうか？ Soya et al. (2007) は、30 分間の低強度 (15 m/min) 一過性トレッドミル走運動の6時間後で BDNF タンパク発現が増加することを報告している。本研究では、一過性運動の6時間後においては MMP-9 酵素活性の増加は確認されなかった。そのため、この一過性運動後の BDNF 増加に MMP-9 の活性化は関与していない可能性が考えられる。一方、一過性運動により活性化した MMP-9 が海馬細胞外環境のリモデリングに関与するか否かは、現時点で十分な知見が報告されているわけではないが、その可能性は高く、今後の新たな検討課題として取り組む価値は高いと考えられる。

一過性運動が運動強度依存的に海馬の神経活動が高めることから、低強度よりも高強度の一過性運動の方が海馬 MMP-9 の酵素活性が上昇するという仮説のもと実験を行った。しかしながら、本実験では、運動強度依存的な海馬 MMP-9 活性の上昇はみられなかった。これは高強度運動により MMP-9 の内因性抑制因子である TIMP-1 が増加したことにより MMP-9 活性増加が抑制されたと考え、その TIMP-1 タンパク発現を解析したが、一過性運動後の各サンプリングポイントで、海馬 TIMP-1 のタンパク発現量に変化は認められなかった。この結果は、運動強度が MMP-9 酵素活性に与える影響に TIMP-1 が関与していない可能性を示唆する。高強度の一

過性運動により MMP-9 活性が上昇しなかったその分子機構の解明は今後の課題である。

また、本研究では MMP-9 と同様にゼラチン分解酵素である MMP-2 の酵素活性を測定したが、一過性運動終了後の各サンプリングポイントで、海馬 MMP-2 の酵素活性に変化は認められなかった。Mizoguchi et al.

(2010) は MMP-2 KO マウスと MMP-9 KO マウスを用いて、MMP-2 ではなく、MMP-9 が海馬依存性の記憶・学習に関与することを明らかにしている。これらのことから、海馬の MMP-2 酵素活性は一過性運動によって変動せず、運動による海馬機能向上には作用していない可能性が示唆される。

以上より、低強度の一過性運動が海馬 TIMP-1 タンパク発現や MMP-2 酵素活性ではなく、海馬 MMP-9 活性を上昇させることが明らかとなった。この結果から、「低強度運動が MMP-9 を介して細胞外環境の構造的変化を引き起こし、海馬神経機能に影響を与える」という新たな仮説を導くことができた。今後は、この仮説を検証することが求められる。

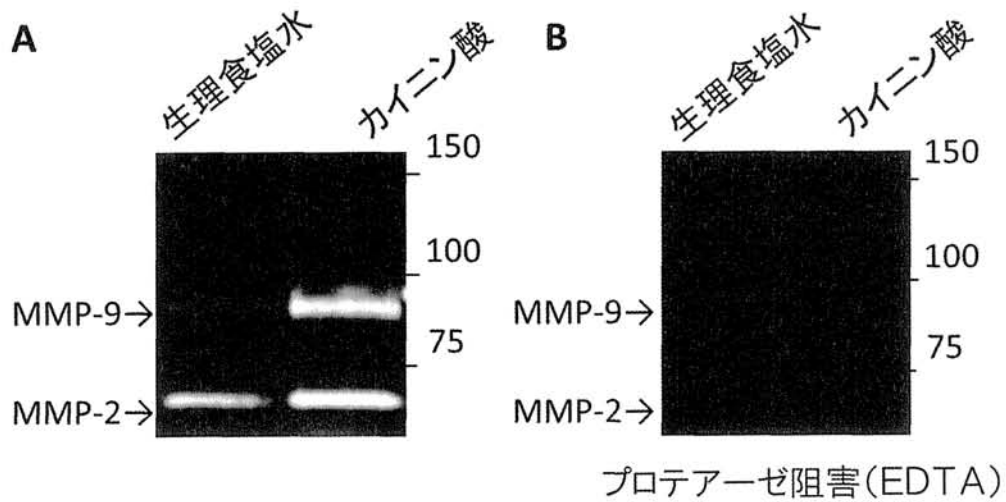


図 2 : Gel Zymography の妥当性の検討

(A) 生理食塩水もしくはカイニン酸 (10 mg/kg · BW) をラットの腹腔内に投与し、投与 24 時間後に採取した海馬の MMP-9 酵素活性を Gel Zymography により測定した。安静時 (生理食塩水投与後) においても MMP-9 酵素活性が検出できること、カイニン酸投与により MMP-9 酵素活性が増加することが確認された。(B) Gel Zymography のインキュベーション時にプロテアーゼ阻害剤を入れ酵素消化を阻害することにより、MMP-9 および MMP-2 のバンドは消失した。

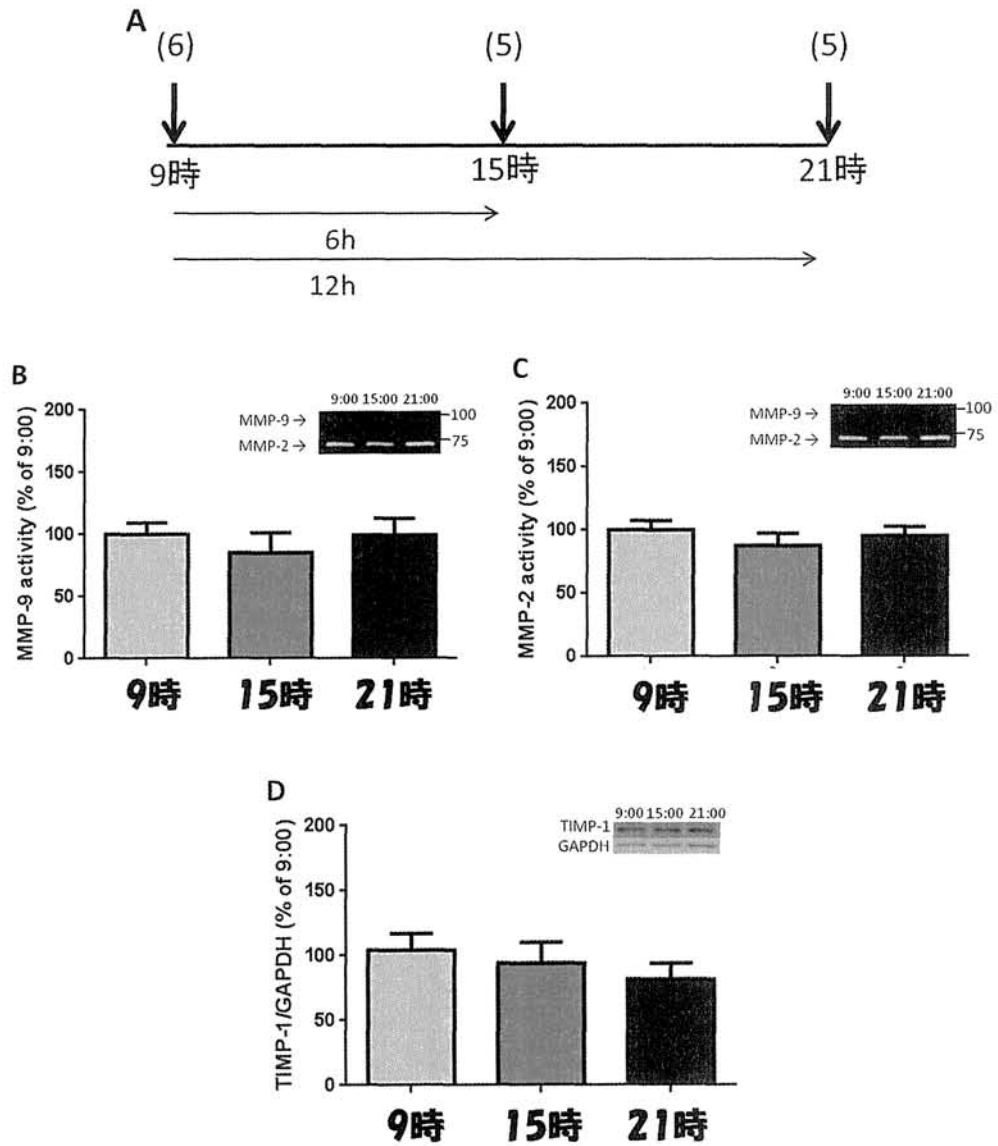


図 3: サンプルングする時刻の違いが安静時ラット海馬の MMP-9、MMP2

酵素活性、および TIMP-1 タンパク発現に及ぼす影響

各測定結果は、9 時群の値を 100%とした相対値で示した。(A) 実験デザイン。カッコ内の数字は、各ポイントにおけるラットの個体数を示す。

(B) MMP-9 酵素活性、(C) MMP-2 酵素活性、(D) TIMP-1 タンパク発現量、Mean±S.E

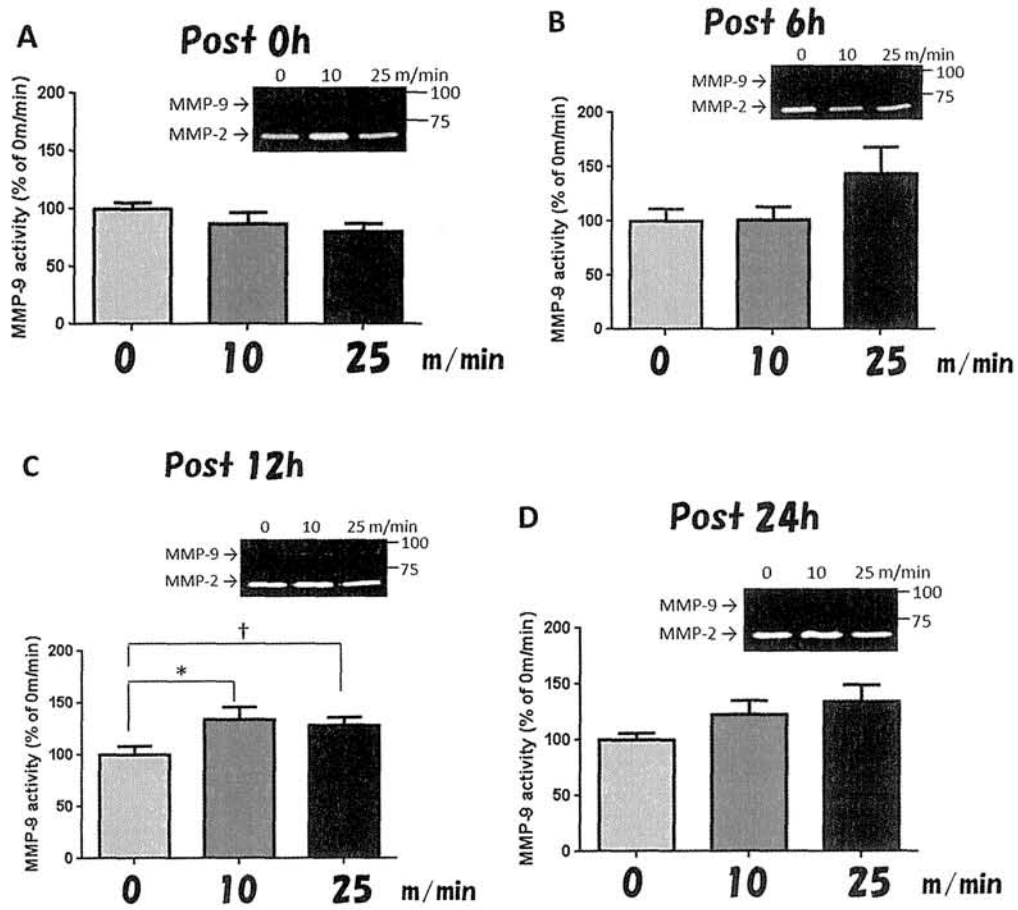


図 4：一過性トレッドミル走運動が MMP-9 酵素活性に及ぼす影響

MMP-9 の酵素活性の変化は、コントロール群 (0 m/min) の値を 100% とした相対値で示した。(A) 運動終了直後、(B) 運動終了から 6 時間後、(C) 運動終了から 12 時間後、(D) 運動終了から 24 時間後、Mean±S.E ;

†p<0.1、 *p<0.05

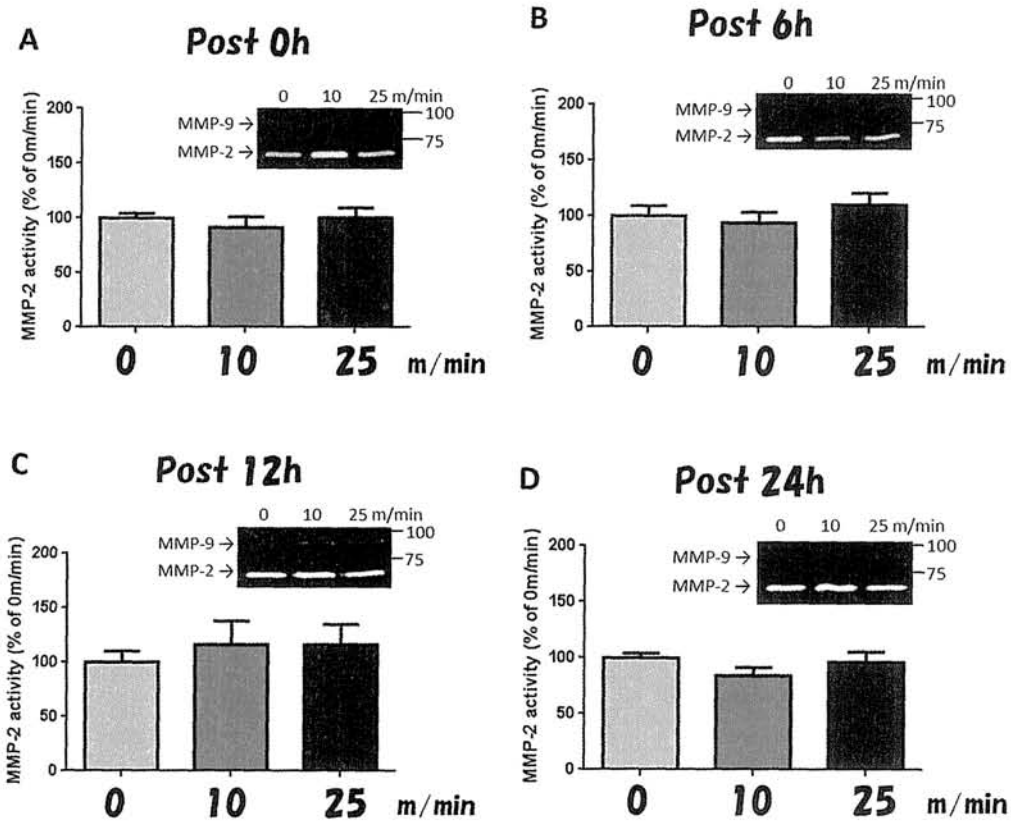


図5：一過性トレッドミル走運動がMMP-2酵素活性に及ぼす影響

MMP-2の酵素活性の変化は、コントロール群(0 m/min)の値を100%とした相対値で示した。(A)運動終了直後、(B)運動終了から6時間後、(C)運動終了から12時間後、(D)運動終了から24時間後、Mean±S.E

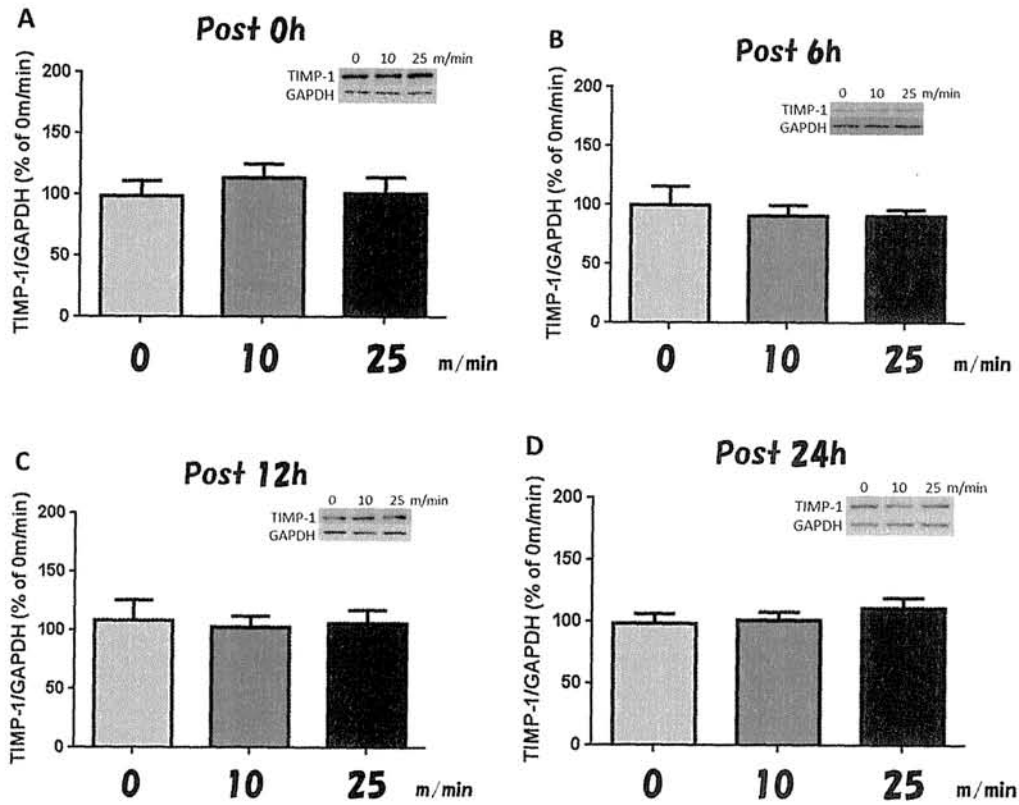


図6：一過性トレッドミル走運動がTIMP-1タンパク発現量に及ぼす影響
TIMP-1タンパク発現量は、コントロール群(0 m/min)の値を100%とした相対値で示した。(A)運動終了直後、(B)運動終了から6時間後、(C)運動終了から12時間後、(D)運動終了から24時間後、Mean±S.E

研究課題 2 一過性運動に対する海馬 IGF-I シグナル伝達の活性応答

1. 目的

神経活動の活性化によって血液中 IGF-I が脳内に移行して作用すること (Nishijima et al., 2010) や、海馬で IGF-I の下流に存在する Akt リン酸化と Erk1/2 リン酸化が増加することが報告されている (Shacka et al 2007; Crespo-Biel et al., 2007) 。そこで研究課題 2 では、一過性運動が海馬の Akt リン酸化、Erk1/2 リン酸化を増加させると仮説を立て、検証する。

2. 方法

(1) 試料

研究課題 1 と同様のタンパク上清を用いた。

(2) Akt、リン酸化 Akt、Erk、リン酸化 Erk 発現の定量 (Western blot)

Akt、リン酸化 Akt、Erk、リン酸化 Erk の発現量は Western blot により検出・定量した。タンパク上清と Lysis buffer ならびに Sample buffer (2.5 mM Tris、16 % Glycerol、10 % SDS、0.8 mM Bromophenol blue) を混合して溶液中のタンパク質量が約 22 μ g となるように調整したものを沸騰したお湯に浸して 5 分間加熱した。SDS-PAGE には 8 %ポリアクリルアミドゲルを使用し、ナイアガラ電気泳動装置 (日本エイドー) を用いてゲル 1 枚に対して 40 mA で 2 時間の電気泳動を行った。分子量マーカにはプレステインドタンパク質マーカー (ナカライテスク) を使用した。

トランスブロット®セル (BIO-RAD) を用いて 220 mA で 6 時間 (または 440 mA で 3 時間) 通電し、ポリアクリルアミドゲルからタンパク質を PVDF 膜 (孔径 0.45 μm 、Millipore) 上に転写した。転写終了後の PVDF 膜を TBS に 1 分間振盪した。ブロッキング溶液 (3 % BSA, 0.1 % Tween-20 in TBS) に PVDF 膜を 30~60 分間反応させた。つづいて、3 % BSA を含む TBS-T (0.1 % Tween-20 in TBS) に一次抗体 (抗 Akt 抗体、1:1000、Cell signaling ; 抗リン酸化 Akt Ser473 抗体、1:1000、Cell signaling ; 抗 Erk 1/2 抗体、1:1000、Cell signaling; 抗リン酸化 Erk1/2 抗体、1:1000、Cell signaling ; 抗 β -actin 抗体、1:20000、Sigma-Aldrich) を加え、4°C で一晩反応させた。 β -actin は内部標準として検出した。反応終了後、TBS-T で 1 時間洗浄した。つづいて、0.2 % スキムミルクを含む TBS-T に 2 次抗体 (HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体、1:12500、GE Healthcare ; HRP 結合抗マウス IgG 抗体、1:12500、GE Healthcare) を加え、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、TBS-T で 1 時間洗浄した。洗浄終了後、PVDF 膜を検出試薬である Western Lightning®PLUS-ECL (PerkinElmer) に 1 分間浸した。余分な検出試薬を取り除き、PVDF 膜を X 線フィルム (富士フィルム) に 1 秒から 1 時間感光させた。感光後に X 線フィルムを現像液と定着液に各々 1 分間ずつ浸すことで現像した。Western blot で検出されたバンドの光学的密度は、Image J を用いて検出した。各々のタンパク発現を示したバンドの光学的密度を求めた。また必要に応じて、Re-probing を行った。バンド検出後の PVDF 膜を Stripping buffer (1 M Glycine、2.5 M NaCl、pH 2.8) に 10 分間振盪することで、PVDF 膜から抗体を剥がした。その後はブロッキング溶液に反応させる作業から上記と同様の工

程を行った。

(3) 統計解析

Erk1/2 と Akt のリン酸化は総 Erk1/2 (Akt) 発現量に対するリン酸化 Erk1/2 (Akt) 発現量を求めた後、一過性トレッドミル走運動終了直後におけるコントロール群 (0m/min) の値を 100%とした相対値で示し、結果は全て平均±標準誤差で示した。運動強度と時間を独立変数とする二要因分散分析を行い、有意性が認められた場合は、多重比較 (Tukey) を行った。統計的有意水準は全て 5%以下とした。

3. 結果

一過性トレッドミル運動後の Akt リン酸化の変化

図 7 に、一過性トレッドミル運動が Akt リン酸化に及ぼす影響を示した。海馬 Akt Ser473 部位のリン酸化に運動強度要因[F(2, 88) = 0.1748, P=0.8399]とタイムポイント要因[F(3, 88) = 1.262, P=0.2923]の主効果は認められず、交互作用も認められなかった[F(6, 88) = 0.03413, P=0.9998]。

一過性トレッドミル運動後の Erk1 リン酸化の変化

図 8 に、一過性トレッドミル運動が Erk1 リン酸化に及ぼす影響を示した。二要因の分散分析を行った結果、タイムポイント要因にのみ主効果が認められた[F(3, 87) = 18.76, P<0.0001]。多重比較検定を行った結果、運動終了直後に比べ、6 時間後ではコントロール群 (p<0.05)、低強度群

($p < 0.01$)、高強度群 ($p < 0.05$) で有意に低い値を示した。12 時間後においては、低強度群 ($p < 0.01$) で運動終了直後と比べ有意に低い値を示した。24 時間後においては、コントロール群 ($p < 0.05$)、低強度群 ($p < 0.001$) で運動終了直後と比べ有意に低い値を示した。

一過性トレッドミル運動後の Erk2 リン酸化の変化

図 9 に、一過性トレッドミル運動が Erk2 リン酸化に及ぼす影響を示した。二要因の分散分析を行った結果、タイムポイント要因にのみ主効果が認められた [$F(3, 88) = 26.71, P < 0.0001$]。多重比較検定を行った結果、運動終了直後に比べ、6 時間後ではコントロール群 ($p < 0.0001$)、低強度群 ($p < 0.01$)、高強度群 ($p < 0.05$) で有意に低い値を示した。12 時間後においては、コントロール群 ($p < 0.001$)、低強度群 ($p < 0.01$) で運動終了直後と比べ有意に低い値を示した。24 時間後においては、コントロール群 ($p < 0.0001$)、低強度群 ($p < 0.01$) で運動終了直後と比べ有意に低い値を示した。

4. 考察

研究課題 1 では各タイムポイントで運動強度を独立変数とする一要因分散分析により解析を行ったため、時間の要因をあわせて検討することができなかった。これは、研究課題 1 では、同一ゲルに 10 サンプルしか泳動することができなかったためである。そこで研究課題 2 では、運動強度と時間の二要因を合わせて検討するために、多量のサンプル (30 サンプル) を同一ゲルで解析できるナイアガラ電気泳動装置を用いてウェスタン・ブ

ロットティングを行った。これにより、一解析に用いるゲル数を軽減できたため、研究課題 2 では二要因分散分析（運動強度×時間）により統計解析を行った。

Erk1/2 では低強度、高強度の一過性運動直後に Erk1/2 のリン酸化が増加し、その増加量は低強度群でわずかに大きい傾向がみられた。しかし、同サンプリングポイントでトレッドミルに乗せただけのコントロール群でも Erk1/2 のリン酸化が増加した。この結果は、ラットをトレッドミルに乗せるという実験操作自体が Erk のリン酸化を引き起こす刺激になってしまった可能性を示唆しており、それによって運動の影響が覆い隠されてしまったかもしれない。これらの結果から、運動の有無による Erk1/2 リン酸化に差異がみられなかったが、実験デザインを工夫することで一過性運動が Erk1/2 のリン酸化に及ぼす影響を検討できる可能性が考えられる。運動直後でコントロール群の Erk1/2 リン酸化を増加させた原因には、本実験の運動トレーニングが恐怖条件付け刺激に似ていたことで生じた可能性が考えられる。Sananbenesi et al. (2002) は、海馬の神経活動を高めることが明らかになっている恐怖条件付け刺激により海馬の Erk1/2 リン酸化が増加することを報告している。その恐怖条件付けとは、一度、刺激呈示箱の中に入れられ足に電気ショックを受けた動物はその箱が危険であることを覚えるため、その後同じ箱に入れられる恐怖反応(すくみなど)を引き起こすという特性を利用した、海馬の学習・記憶能を評価する行動実験である。本実験では、全てのラットに本実験前にトレッドミル走運動トレーニングを行わせており、トレーニング期間中は電気ショックを与えることもある。もしかしたら、コントロール群のラットにおいても、運動

トレーニングによりトレッドミル装置が危険であることを覚え、本実験においてトレッドミル装置に置かれたことでトレーニング時の電気ショックの記憶を想起し、その記憶想起の結果として Erk1/2 リン酸化の増加が引き起こされた可能性が考えられる。さらに、Sananbenesi et al. (2002) は、その恐怖条件付け刺激による海馬 Erk 1/2 のリン酸化応答を検討し、恐怖条件付け刺激終了から 30 分～1 時間後で海馬 Erk1/2 リン酸化が増加し、3 時間後には安静時レベルに戻ることも報告している。これらのことから、運動終了直後から 6 時間後の間に Erk1/2 リン酸化が増加し、6 時間後には安静時レベルまで戻っていた可能性が高い。

一方、一過性運動による Akt リン酸化はみられなかった。この原因にはサンプリングポイントと、解析した Akt のリン酸化部位が適切でなかった可能性が考えられる。Lin et al. (2003) は、恐怖条件付け刺激終了から 1～2 時間後で扁桃体基底外側核の Akt リン酸化が上昇し、2 時間半後には安静時レベルに戻ることを明らかにしている。これらのことから、Erk1/2 と同様に運動終了直後から 6 時間後の間に Akt リン酸化が増加し、そして安静時レベルまで戻った可能性が高い。また、Akt は Ser473 と Thr308 の 2 つのリン酸化部位が存在しており、Akt は Thr308 のリン酸化により活性化され、Ser473 のリン酸化により活性を高めることや特異性を決めることが示唆されており、Thr308 と Ser473 は各々独立の調節機構を有していることが明らかになっている (Hers et al., 2011)。したがって、Akt 活性応答を検討するためには Akt Thr308 と Ser473 のリン酸化を検討することが必要である。本実験では、Akt Ser473 のリン酸化を解析したが、2 週間の自発運動が海馬 Akt Thr308 のリン酸化を増加させるが、Akt

Ser473 のリン酸化に差異がみられないこと (Chen and Russo-Neustadt, 2005) や、6 時間の自発運動終了直後では Akt Thr308 リン酸化が増加することが報告されていることから (Chen and Russo-Neustadt, 2009)、一過性運動終了後では Akt Ser473 ではなく、Akt Thr308 リン酸化が増加する可能性が高い。これらのことから、Akt 活性を検討するためには本研究の解析対象とした Akt Ser473 だけでなく、Thr308 のリン酸化も検討する必要がある。

本研究で検討した Erk 1/2 と Akt は IGF-I シグナル伝達経路だけで制御されているのではなく、インスリンや BDNF、カルシウムなど他の因子にも調節されている。このことから、IGF-I – IGF-I 受容体のシグナル伝達経路がリン酸化 Akt と Erk1/2 発現を増加させたことを確認するためには IGF-I 受容体のチロシンリン酸化を検討する必要がある。そのため、海馬培養細胞でチロシンリン酸化 IGF-I 受容体発現を検出できることが確認されている抗体を使用し、ウェスタン・ブロッティング法により一過性運動後の IGF-I 受容体チロシンリン酸化の測定を試みた。しかし残念ながら、チロシンリン酸化 IGF-I 受容体発現を検出できなかった。その原因には、海馬をホモジナイズする時に用いる Lysis buffer の組成が影響していることが考えられた。今後 IGF-I 受容体のチロシンリン酸化を解析するためには、新たにラット海馬をサンプリングし、適切な Lysis buffer を用いてホモジナイズする必要がある。

以上のことから、一過性運動後の Erk 1/2 と Akt の検討には、運動トレーニングとサンプリングポイントの改善、Akt Thr308 による Akt リン酸化の測定、IGF-I 受容体チロシンリン酸化の測定が必要であると考えられ

る。運動トレーニングの改善では、本実験を行う前の数日間、ラットをトレッドミル装置に移動させ、危険な場所ではないことを覚えさせることで、トレッドミル装置に対する恐怖刺激を出来る限り取り除くことができるだろう。タイムポイントの改善では、Erk1/2 リン酸化と Akt リン酸化が増加していることが推測される運動終了後から 30 分後、1 時間後、2 時間後のサンプリングポイントを設定する。さらに、トレッドミル装置に乗せる前のラットから海馬をサンプリングすることにより、運動開始前 (pre) の Erk1/2 および Akt リン酸化レベルを確認することも、上述の 2 つの問題を解決するために有効であると考えられる。Akt Thr308 による Akt リン酸化の測定では、Akt Ser473 だけでなく、Thr308 のリン酸化も測定し、Akt リン酸化を検討する。IGF-I 受容体チロシンリン酸化の測定では、Lysis buffer を変更することにより、チロシンリン酸化 IGF-I 受容体発現の検出・定量を試みる。これらのように実験デザインを改善し、必要な測定項目を追加することで、本研究では検討できなかった一過性運動が IGF-I シグナル伝達に及ぼす影響を検討できると考えられる。

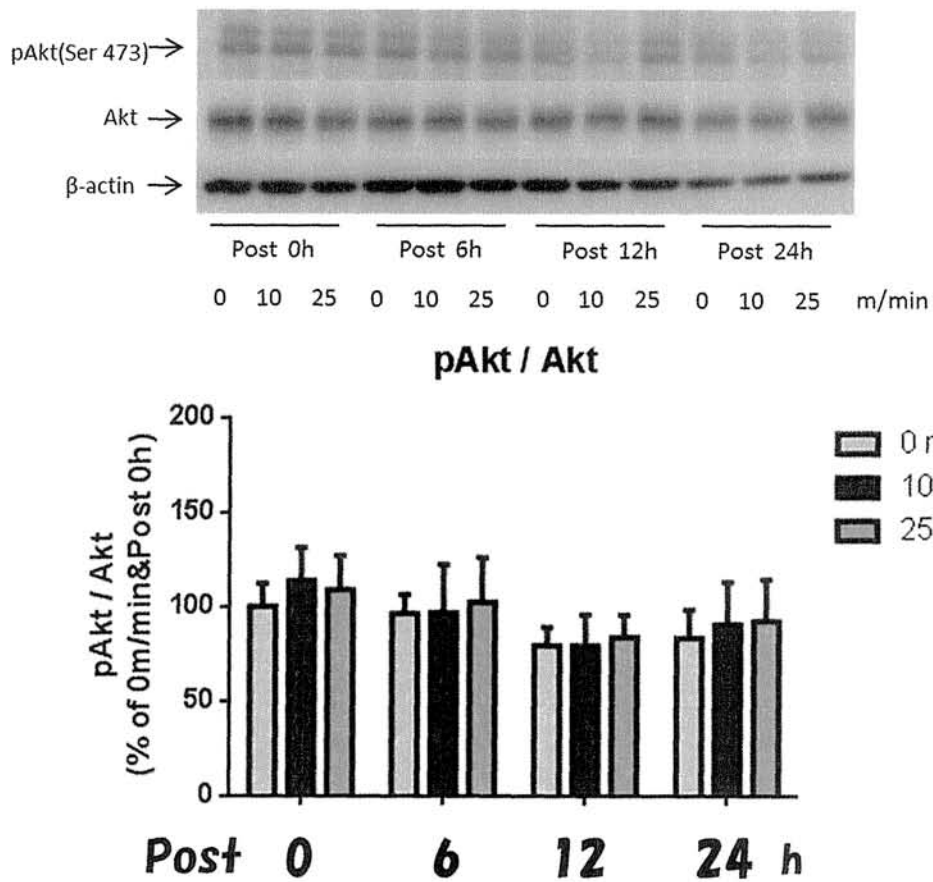


図 7: 一過性トレッドミル走運動が Akt リン酸化に及ぼす影響

上記のデータは、総 Akt 発現量に対するリン酸化 Akt 発現量の割合を求めた後、一過性トレッドミル走運動終了直後におけるコントロール群 (0m/min) の値を 100%とした相対値で示した。Mean±S.E

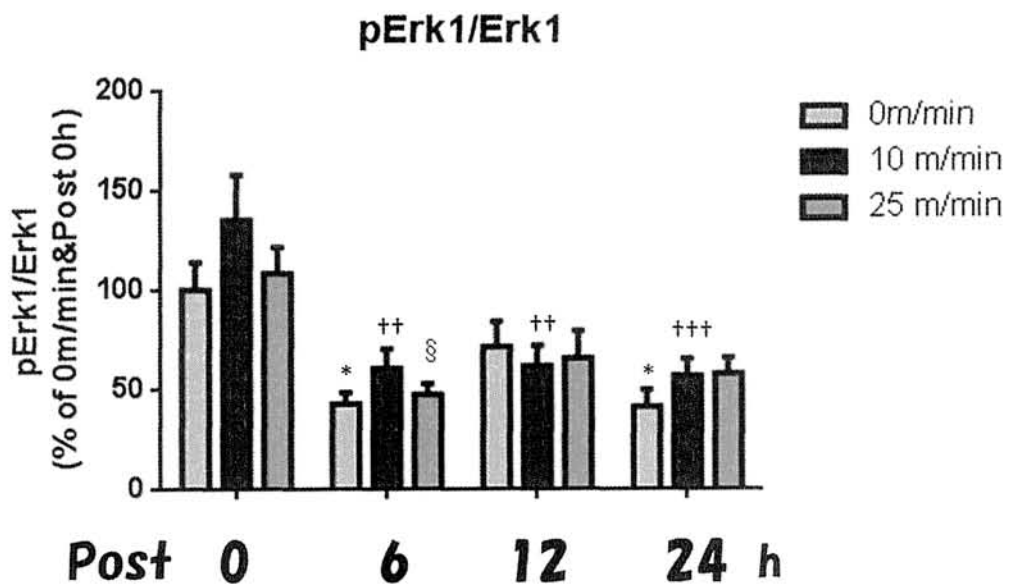
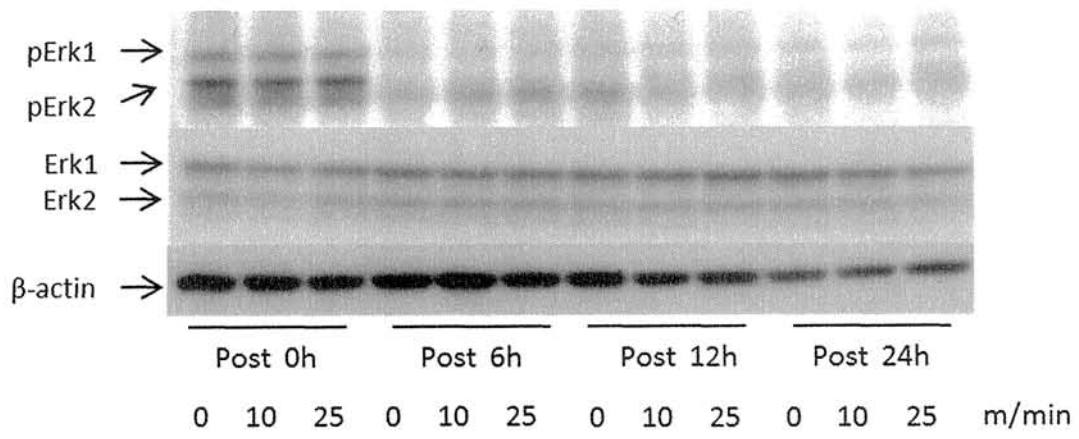


図 8: 一過性トレッドミル走運動が Erk1 リン酸化に及ぼす影響

上記のデータは、総 Erk1 発現量に対するリン酸化 Erk1 発現量の割合を求めた後、一過性トレッドミル走運動終了直後におけるコントロール群 (0 m/min) の値を 100 %とした相対値で示した。Mean±S.E、* ; vs. 0 m/min at Post 0 h、† ; vs. 10 m/min at Post 0 h、§ ; vs. 25 m/min vs at Post 0 h、* P < 0.05、† P < 0.05、†† P < 0.01、††† P < 0.001、§P < 0.05

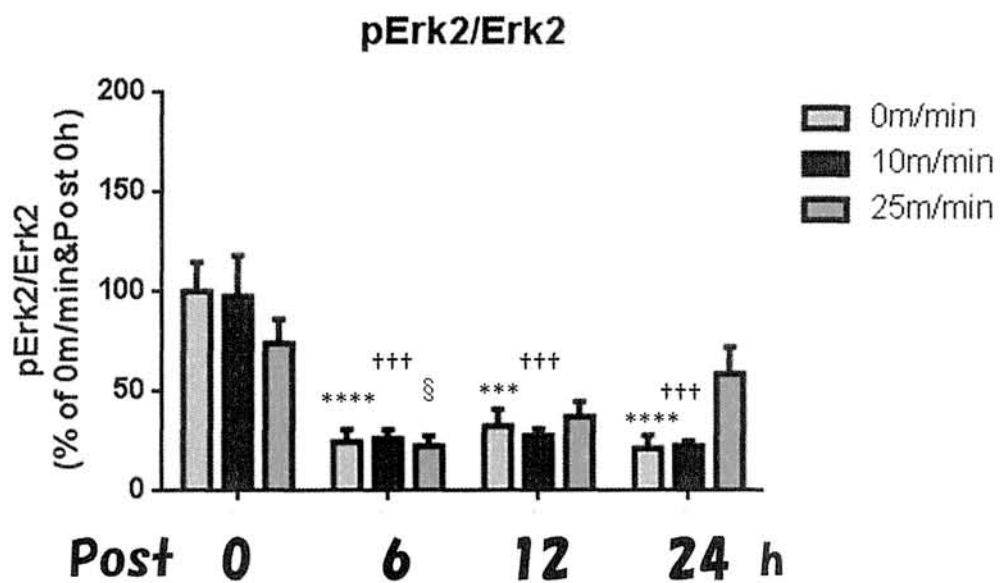
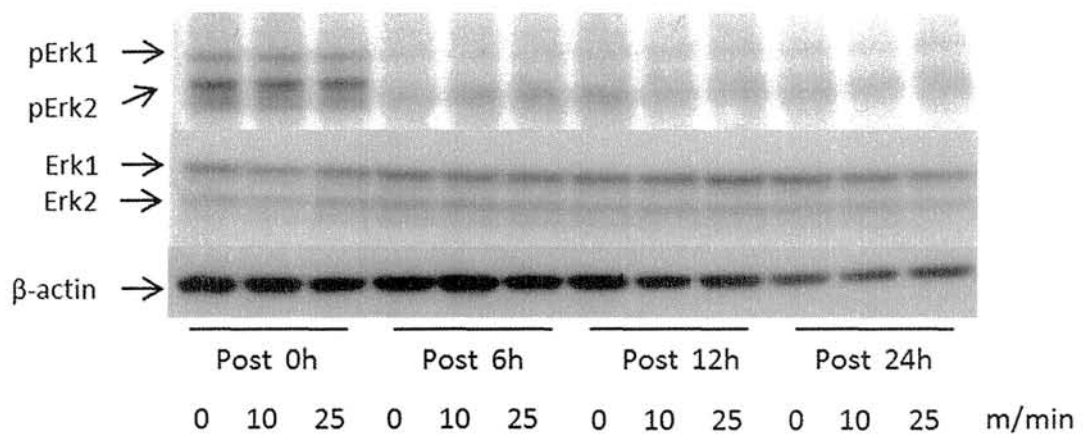


図9: 一過性トレッドミル走運動が Erk2 リン酸化に及ぼす影響

上記のデータは、総 Erk2 発現量に対するリン酸化 Erk2 発現量の割合を求めた後、一過性トレッドミル走運動終了直後におけるコントロール群 (0 m/min) の値を 100 %とした相対値で示した。Mean±S.E、* ; vs. 0 m/min at Post 0 h、†; vs. 10 m/min at Post 0 h、§; vs. 25 m/min vs at Post 0 h、*** P < 0.001、**** P < 0.0001、††† P < 0.001、§P < 0.05

第4章 総合討論

長期間運動が海馬神経機能を高めることが明らかにされているものの、その分子機構の全容は未だ解明されていない。その一因として、一過性運動が海馬の生理的応答に及ぼす影響を検討した研究が数少ないことが挙げられる。そこで本研究では、運動が海馬神経機能を高める分子機構を新たな視点から検討することを目指し、一過性運動が海馬の神経活動を高めること (Lee et al., 2003; Nishijima et al., 2012) に着目した。神経活動の活性化は、MMP-9 酵素活性を上昇させること (Szklarczyk et al., 2002) や、IGF-I の作用を引き起こすトリガーになる (Trejo et al., 2001; Ding et al., 2006; Nishijima et al., 2010)。しかしながら、一過性運動後に MMP-9 や IGF-I シグナル伝達がどのような活性応答を示すかは明らかにされていない。そこで本研究では、一過性運動が海馬 MMP-9 や IGF-I シグナル伝達に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

研究課題 1 では、海馬 MMP-9 の酵素活性が一過性の低強度運動終了から 12 時間後に有意に上昇することが明らかになった。その MMP-9 酵素活性の増加は細胞外環境のリモデリングの機能を果たしている可能性が考えられる。これまで多くの先行研究が、運動が海馬における神経細胞の新生を促進することを明らかにしている。神経新生とは、細胞増殖に加え、新生細胞の分化・遊走・成熟という複数の過程からなる生理現象である。ここで注目すべきは、新たな細胞を増やし、新生した神経細胞を既存の神経ネットワークに動員するためには、そのための空間的スペースを確保する必要があることである。そして実際、MMP-9 がこの神経新生という特徴

的な細胞外環境のリモデリングに関わることも明らかにされつつある。もしかしたら、長期的な運動が海馬神経新生を促進する分子基盤のひとつに、一過性運動による MMP-9 酵素活性の増加が関与しているのかもしれない。この仮説は今後、MMP-9 阻害薬を投与しながらラットに長期間の運動を行わせ、神経新生を評価・解析することで検証することができるであろう。このように、一過性運動が MMP-9 の酵素活性を高めることが明らかになることは、長期間運動が海馬の神経新生を促進する分子基盤の解明につながる新たな視点を与えることにつながる。これはまさに、一過性運動が海馬の生理応答に及ぼす影響を検討することの意義を示していると言える。

さらに、これまで運動が海馬機能を向上させる分子機構として、神経新生 (van Praag et al., 1999) といった細胞の変化のみが着目されており、運動による海馬神経機能の向上に関わる分子機構として細胞外環境の調節に着目した研究は非常に少ない。これに対し本研究の結果は、一過性運動が海馬 MMP-9 活性を増加させたことで、運動が海馬機能を向上させる分子機構の解明に、細胞だけでなくより細胞外環境に着目することも重要であることを示唆している。特に、長期間運動によって活性が増加することが報告されている細胞外プロテアーゼ tissue-type plasminogen activator (tPA) (Ding et al., 2011) など他の細胞外タンパク質や分子が運動による海馬機能向上に関与している可能性も考えられ、新たな研究の展開につながることを期待される。

研究課題 2 では、研究課題 1 と同様のサンプルを用いて、IGF-I シグナル伝達の主要なリン酸化酵素である Akt と Erk 1/2 の活性応答を検討した。Erk1/2 では、一過性運動直後のサンプリングポイントで、低強度群と高強

度群だけでなく、運動を行っていないコントロール群でも Erk1/2 リン酸化が増加した。この結果は、ラットをトレッドミルに乗せるという実験操作自体が Erk1/2 のリン酸化を引き起こす刺激となってしまった可能性を示唆する。また、一過性運動による Akt リン酸化の変動は認められなかった。しかし、この結果は本実験で設定したサンプリングポイントでは Akt リン酸化の変動を捉えることができなかつたとも考えられる。これらの結果から、一過性運動が Erk1/2 や Akt のリン酸化を変動させるか否かは明らかにならなかつた。その主原因にはサンプリングポイントが適切ではなかつたことが挙げられるため、サンプリングポイントを変更することで IGF-I シグナル伝達の活性応答を検討できる可能性が高い。さらに、一過性運動が IGF-I を介して Erk1/2 と Akt リン酸化を増加させることを明らかにするためには、IGF-I 受容体が活性化していることを示す必要もある。これらのことから、一過性運動による Erk1/2 と Akt の活性応答を検討するためには実験デザインを改善し、さらに検討する必要があると考えられる。

謝辞

本修士論文を作成するにあたり、実験の手順から論文の書き方まで手厚いご指導を頂きました北 一郎先生、西島 壮先生に心より御礼申し上げます。休学を含む博士前期課程の3年間、行動生理学研究室で研究生活を送れたことをとても誇りに思います。さらに、ご多忙の中、副査としてご指導頂きました藤井 宣晴先生、樋口 貴広先生、研究課題1の Gel Zymography のプロトコールを御教授頂きました名古屋大学 環境医学研究所 溝口 博之助教、研究課題2の実験全般をご指導頂きました東京大学 動物細胞制御学研究室 高橋 伸一郎准教授、尾添 淳文博士研究員に厚く御礼申し上げます。

諸先生方、院生室の皆様のおかげで、充実した研究生活を送ることができ、本研究を成し遂げることができました。このような環境で学ぶことができたことを非常に幸せに感じています。今後は、新しい環境に移りますが、13号館で積み重ねてきた経験を糧に、努力していきたいと思えます。

最後に、本研究に多大な貢献を残した実験動物たちに深く感謝すると共に、心からご冥福をお祈りいたします。

平成 26 年 1 月 8 日

川上将史

引用文献

- 田熊 一敞, 永井 拓, 山田 清文. (2007). 学習・記憶行動の評価法. 日薬理誌. 130:112~116
- Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J. (2006). Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal*. 6:53-80.
- Acheson DT, Gresack JE, Risbrough VB. (2011). Hippocampal dysfunction effects on context memory: Possible etiology for posttraumatic stress disorder. *Neuropharmacology*. [Epub ahead of print]
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH. (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab*. 20:1681-9.
- Bell KF, Hardingham GE. (2011). The influence of synaptic activity on neuronal health. *Curr Opin Neurobiol*. 21:299-305
- Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. (2010). Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*. 167:588-97..
- Bruel-Jungerman E, Veyrac A, Dufour F, Horwood J, Laroche S, Davis S. (2009). Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PLoS One*. 4:e7901
- Chaddock L, Erickson KI, Prakash RS, Kim JS, Voss MW, Vanpatter M,

- Pontifex MB, Raine LB, Konkell A, Hillman CH, Cohen NJ, Kramer AF. (2010). A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in preadolescent children. *Brain Res.* 1358:172-83.
- Chaudhry K, Rogers R, Guo M, Lai Q, Goel G, Liebelt B, Ji X, Curry A, Carranza A, Jimenez DF, Ding Y. (2010). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) activation in exercise-reduced neuronal apoptosis after stroke. *Neurosci Lett.* 474:109-14
- Chen MJ, Russo-Neustadt AA. (2005). Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res.* 135:181-93
- Chen MJ, Russo-Neustadt AA. (2009). Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent. *Hippocampus.* 19:962-72
- Crespo-Biel N, Canudas AM, Camins A, Pallàs M. (2007). Kainate induces AKT, ERK and cdk5/GSK3beta pathway deregulation, phosphorylates tau protein in mouse hippocampus. *Neurochem Int.* 50(2):435-42.

- Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F. (2006). Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience*. 140:823-33.
- Ding Q, Ying Z, Gómez-Pinilla F. (2011). Exercise influences hippocampal plasticity by modulating brain-derived neurotrophic factor processing. *Neuroscience*. 192:773-80.
- 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. (2010). Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:3017-22.
- Fink G. (2011). Stress controversies: post-traumatic stress disorder, hippocampal volume, gastroduodenal ulceration. *J Neuroendocrinol*. 23:107-17.
- Foster PP, Rosenblatt KP, Kuljiš RO. (2011). Exercise-induced cognitive plasticity, implications for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front Neurol*. 2:28.
- Freeman T, Kimbrell T, Booe L, Myers M, Cardwell D, Lindquist DM, Hart J, Komoroski RA. (2006). Evidence of resilience: neuroimaging in former prisoners of war. *Psychiatry Res*. 146:59-64.
- Goekint M, Bos I, Heyman E, Meeusen R, Michotte Y, Sarre S. (2012). Acute running stimulates hippocampal dopaminergic neurotransmission in rats, but has no influence on brain-derived

neurotrophic factor. *J Appl Physiol* (1985). 2012 112(4):535-41

Gomez-Merino D, Béquet F, Berthelot M, Chennaoui M, Guezennec CY. (2001). Site-dependent effects of an acute intensive exercise on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in rat brain. *Neurosci Lett*. 301(2):143-6.

Guo M, Cox B, Mahale S, Davis W, Carranza A, Hayes K, Sprague S, Jimenez D, Ding Y. (2008). Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke. *Neuroscience*. 151:340-51.

Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*. 23:1515-27.

Hwang JJ, Park MH, Choi SY, Koh JY. (2005). Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases. *J Biol Chem*. 280:11995-2001.

Jourquin J, Tremblay E, Bernard A, Charton G, Chaillan FA, Marchetti E, Roman FS, Soloway PD, Dive V, Yiotakis A, Khrestchatsky M, Rivera S. *Eur J Neurosci*. (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) modulates neuronal death, axonal plasticity, and learning and memory. *Nov*;22:2569-78.

Kim SJ, Lee SR. (2013). Protective effect of melatonin against transient global cerebral ischemia-induced neuronal cell damage via inhibition of matrix metalloproteinase-9. *Life Sci*.

- Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, Sekiguchi M, Sugiyama H, Inokuchi K. (2009). Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell*. 139:814-27.
- Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. (2010). Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 61:205-9.
- Lee TH, Jang MH, Shin MC, Lim BV, Kim YP, Kim H, Choi HH, Lee KS, Kim EH, Kim CJ. (2003) Dependence of rat hippocampal c-Fos expression on intensity and duration of exercise. *Life Sci*. 72:1421-36.
- Lin CH, Yeh SH, Leu TH, Chang WC, Wang ST, Gean PW. (2003). Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J Neurosci*. 23:1574-9.
- Lu B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*. 10:86-98
- Matsui T, Soya S, Okamoto M, Ichitani Y, Kawanaka K, Soya H. (2011) Brain glycogen decreases during prolonged exercise. *J Physiol* 589:3383-93

- McEwen BS, Magarinos AM, Reagan LP. (2002). Structural plasticity and tianeptine: cellular and molecular targets *Eur Psychiatry*. 17 Suppl 3:318-30.
- McNaughton N, Gray JA. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord*. 61:161-76.
- Miller DB, O'Callaghan JP. (2005). Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res Rev*. 4:123-40.
- Miyashita Y. (2004). Cognitive memory: cellular and network machineries and their top-down control. *Science* 306:435-440.
- Mizoguchi H, Takuma K, Fukuzaki E, Ibi D, Someya E, Akazawa KH, Alkam T, Tsunekawa H, Mouri A, Noda Y, Nabeshima T, Yamada K. (2009). Matrix metalloproteinase-9 inhibition improves amyloid beta-mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 331:14-22.
- Mizoguchi H, Ibi D, Takuma K, Toth E, Sato J, Itohara S, Nabeshima T, Yamada K. (2010). Alterations of emotional and cognitive behaviors in matrix metalloproteinase-2 and -9-deficient mice. *The Open Behavioral Science Journal*. 4:19-25
- Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M, Ibi D, Someya E, Koike H, Kamei H, Nabeshima T, Itohara S, Takuma K, Sawada M, Sato J, Yamada K. (2011). Matrix Metalloproteinase-9 Contributes to Kindled Seizure Development in Pentylentetrazole-Treated Mice by Converting Pro-BDNF to Mature BDNF in the Hippocampus. *J Neurosci*. 31:12963-12971.
- Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, Balcerzyk M, Okulski P, Dzwonek J, Costa

- RM, Silva AJ, Kaczmarek L, Huntley GW. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal latephase long-term potentiation and memory. *J Neurosci* 26:1923–1934.
- Nagy V, Bozdagi O, Huntley GW (2007). The extracellular protease matrix metalloproteinase-9 is activated by inhibitory avoidance learning and required for longterm memory. *Learn Mem* 14:655–664.
- Nishijima T, Piriz J, Duflot S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, Verdugo JM, Leroy F, Soya H, Nuñez A, Torres-Aleman I. (2010). Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron*. 2010 67(5):834-46
- Nishijima T, Okamoto M, Matsui T, Kita I, Soya H. (2012). Hippocampal functional hyperemia mediated by NMDA receptor/NO signaling in rats during mild exercise. *J Appl Physiol* (1985). 112(1):197-203.
- O'Kusky J, Ye P. (2012). Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Front Neuroendocrinol*. 33:230-51
- Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B. (2010). ERK in learning and memory: A review of recent research. *Int J Mol Sci*. 11:222-32
- Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. (2002). Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1, and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: interactions between Erk-1/2 and Elk-1. *Mol Cell Neurosci*. 21:463-76.

- Scoville WB, Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 20:11-21.
- Shacka JJ, Lu J, Xie ZL, Uchiyama Y, Roth KA, Zhang J. (2007). Kainic acid induces early and transient autophagic stress in mouse hippocampus. *Neurosci Lett*. 414:57-60.
- Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K, Saito T. (2007). Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res*. 58:341-8.
- Stamenkovic I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 200:448-64.
- Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD, Kaczmarek L (2002). Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* 22:920–930.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 21:1628-34.
- Trejo JL, Llorens-Martín MV, Torres-Alemán I. (2008). 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*. 37:402-11.
- Yau SY, Lau BW, So KF. (2010). Adult hippocampal neurogenesis: a possible way how physical exercise counteracts stress. *Cell*

Transplant. 20:99-111.

Van Praag H, Christie B R, Sejnowski T J, Gage F. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:13427–13431.

Wright JW, Brown TE, Harding JW. (2007). Inhibition of hippocampal matrix metalloproteinase-3 and -9 disrupts spatial memory. *Neural Plast.* 2007:73813.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci.* 6:2950-67.

