

低強度運動時の海馬神経活性化のリアルタイム解析とドーパミン調節系の関与—ファイバーフォトメトリーを用いた検討—

平賀 大一^{*,**} 征矢 英昭^{*,***}

REAL-TIME MONITORING OF HIPPOCAMPAL NEURONAL ACTIVITY DURING LIGHT EXERCISE AND POSSIBLE INVOLVEMENT OF DOPAMINERGIC SYSTEM: USING *IN VIVO* FIBER PHOTOMETRY

Taichi Hiraga and Hideaki Soya

Key words: light exercise, hippocampus, dopamine, fiber photometry.

緒 言

多くの研究から運動が海馬を刺激し、学習・記憶の向上に寄与することが明らかになってきた¹⁰⁾。超高齢化が世界的に進行するなか、認知症対策の有力候補としても注目を集めている。筆者の所属する研究室からは、ストレスなく習慣化しやすい低強度の運動でも、中・高強度運動に匹敵するほど海馬が活性化され^{4,8)}、神経新生や記憶パフォーマンスが向上することがわかっており^{5,6)}、ヒトを対象とした研究からもこの有益性は支持されている⁹⁾。一方、「なぜ運動で海馬の細胞が活性化するのか？」という根本的な問いは方法論的な困難性もあり未解決のままである。運動中の海馬神経細胞の活動を評価するには、動物でも死後脳での組織化学染色が限界であり、侵襲性を伴う解析が不可能なヒトではなおさらである。生体下では血流量や代謝産物から間接的に海馬活動を推定する

画期的な試みもされてきたが⁷⁾、神経細胞の興奮そのものを正確にとらえるのは難しい。電気生理学も体動ノイズを伴うダイナミックな運動とは相性が悪い。

そのようななか、脳神経科学の分野ではファイバーフォトメトリーという最新の *in vivo* イメージング技術が台頭してきた²⁾。これは神経活動を蛍光へ変換することで評価する手法である。神経細胞の興奮はカルシウムイオン濃度の上昇を伴う。これに着目し、カルシウムイオンと結合すると蛍光強度が増加する蛍光プローブ・GCaMP (ジーキャンブ) を関心領域の神経細胞に発現させ、光ファイバーを介してその蛍光の変化を記録することで、神経活動をリアルタイムで評価することが可能となる。これを導入することで、ダイナミックな運動中の海馬の神経活動を詳細にとらえることができるかもしれない。更に、運動中の海馬ではドーパミン (DA) の増加が低強度運動でも生

* 筑波大学体育系運動生化学研究室

** 筑波大学大学院人間総合科学学術院人間総合科学研究群体育科学学位プログラム

*** 筑波大学体育系ヒューマン・ハイ・パフォーマンス先端研究センター (ARIHHP) スポーツ神経科学部門

Laboratory of Exercise Biochemistry and Neuroendocrinology, Institute of Health and Sport Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan.

Doctoral program in Physical Education, Graduate School of Comprehensive Human Science, Health and Sports Science, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan.

Department of Sports Neuroscience, Advanced Research Initiative for Human High Performance (ARIHHP), Institute of Health and Sport Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan.

じることが *in vivo* マイクロダイアリスを用いた検討から明らかとなり³⁾、運動による海馬活性化を支える脳内機構としての関連が示唆された。これにファイバーフォトメトリーを組み合わせることで、DA と海馬神経活動との関連を詳細に検討することが可能となるかもしれない。そこで本研究では、ファイバーフォトメトリーを導入し、運動中の海馬神経活動をリアルタイムに記録しながら DA の関与を検討することで、運動による海馬活性化の作用機序の一端を解明することを当初の目的とした。

方 法

A. 被験動物

実験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実施された（承認番号：23-379, 24-362）。Long-Evans ラット（雄性、実験開始時 9～10週齢, $n = 5$ ）を用い、1週間の予備飼育を行った。

B. GCaMP 投与および光ファイバーカニューラ留置手術

イソフルラン麻酔下でラットの頭部をステレオタキシク装置に固定し、右海馬背側部 CA1 に GCaMP の発現を促すアデノ随伴ウイルス (AAV1-CaMK II α -GCaMP6f, #100834-AAV1, Addgene, USA) を 1.0 μ L 投与した。その後、1週間ほど空けて再度手術を行い、径 400～600 μ m の光ファイバーカニューラ (TeleFic-10-600, バイオリサーチセンター, 日本または CFM15L10, Thorlabs, USA) を右海馬背側部 CA1 の直上に挿入し、歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。座標は Bregma から後方へ 3.7 mm、右に 2.75 mm、深さ 3.3 mm (投与)・2.95 mm (カニューラ留置) とした。

C. 走行学習

手術から 1 週間以上の回復期間を設け、トレッドミル (KN-73, 夏目製作所, 日本) で走行学習を 7 回実施した。1 日最大 30 分、週 5 日の頻度で、速度は 5 m/min から 25 m/min まで段階的に増加させ、電気刺激を用いなくても走行するように学習させた。

D. 走行試験

走行学習終了後、2 日以上空けて走行試験を実

施した。光ファイバーケーブル (MAF3L1, Thorlabs) を使用し、ラットの光ファイバーカニューラをファイバーフォトメトリーシステム (R810, RWD, 中国) へ接続し、トレッドミル上で 10 分以上安静にさせた。GCaMP シグナルが安定している 1 分間をベースラインとして確認した後、30 分間の一過性低強度運動 (12.5～15 m/min) を開始した。運動終了後、10 分以上安静にした後、ホームケージに戻した。1 匹につき 2～3 回の走行試験を繰り返し実施した。

E. ファイバーフォトメトリー

RWD 社製ファイバーフォトメトリーシステムを用いて GCaMP シグナルの記録・解析を行った。GCaMP 依存的な蛍光を励起する 470 nm 光と GCaMP 非依存的な蛍光を励起する 410 nm 光を、光ファイバーカニューラを通じて右海馬背側部 CA1 へ入射した。収集された蛍光シグナルは記録用アプリケーション (Multichannel Fiber Photometry Software, RWD) で記録・可視化した。GCaMP シグナルは、470 nm 励起による GCaMP 特異的な蛍光 (F) から 410 nm 励起による GCaMP 非依存的な蛍光で差し引くことで算出した (ΔF)。この処理により、体動ノイズや血流変動に伴うシグナル減衰を補正した。最終的に、 ΔF をベースラインの中央値で除し ($\Delta F/F$)、更に Z スコア化したデータを解析に用いた。

F. 免疫組織化学染色

実験終了後に灌流固定により採取した脳から前額断切片を作成した。切片には、DAPI (細胞の核)、GFP (GCaMP)、GAD67 (GABA 作動性神経細胞) の蛍光免疫組織化学染色を実施し、GCaMP 発現および光ファイバーカニューラ留置の妥当性を評価した。

G. 統計解析

GCaMP シグナルのピーク値の比較には paired *t*-test を適用した。有意水準は 5% とした。

結 果

A. 海馬背側部 CA1 における GCaMP の発現

図 1 に海馬背側部における DAPI, GFP (GCaMP)、GAD67 の蛍光免疫組織化学染色の画像を示した。CA1 における錐体細胞層 (stratum pyramidale;

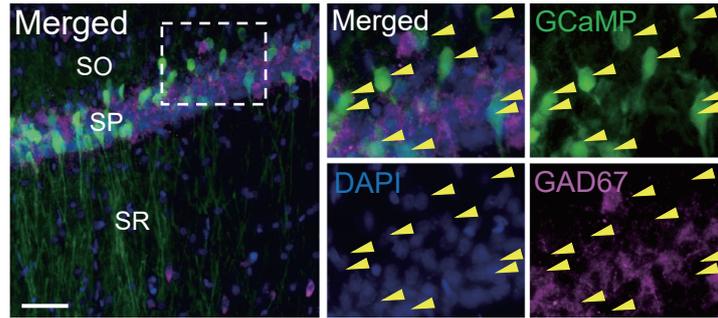


図1. 海馬背側部 CA1における GCaMP の発現
Fig.1. GCaMP expression in the dorsal CA1 neurons.

Representative triple-fluorescence image of GCaMP (green), DAPI (blue), and GAD67 (inhibitory neuron marker: magenta) in the dorsal CA1. Yellow arrowheads represents GCaMP-positive cells. Scale bars show 50 μ m. SO; stratum oriens, SP; stratum pyramidale, SR; stratum radiatum.

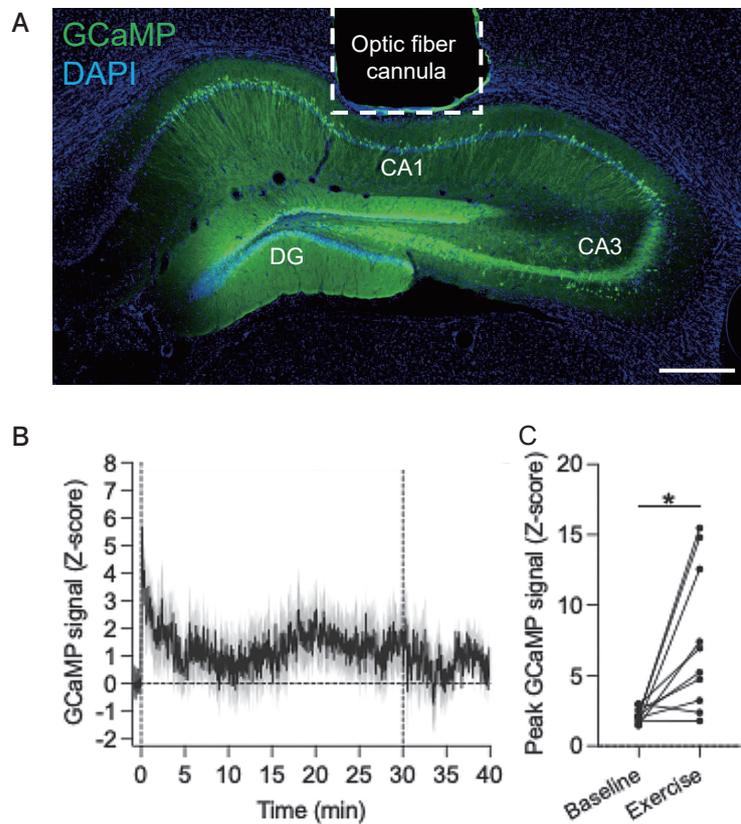


図2. 低強度運動による海馬背側部 CA1における GCaMP シグナルの変化
Fig.2. GCaMP signal from dorsal CA1 during light-intensity running.

A: Representative GCaMP and DAPI fluorescence image showing the position of optic fiber cannula in the dorsal hippocampus. Scale bars show 500 μ m. B: Average GCaMP signal from dorsal CA1 during light-intensity running. C: Peak GCaMP signal before and during light-intensity running. All data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs Baseline. n = 10 from 4 rats.

SP) の神経細胞に GCaMP が発現していることを確認した。また、GCaMP と GAD67の二重陽性細胞が見られなかったことから、GCaMP の発現が興奮性の神経細胞にのみ及んでいたことを確認した。

B. 一過性低強度運動における海馬背側部 CA1の GCaMP シグナルの変化

図2に30分の一過性低強度運動における海馬背側部 CA1の GCaMP シグナルの変化を示した。運動中において GCaMP シグナルの平均値が増加す

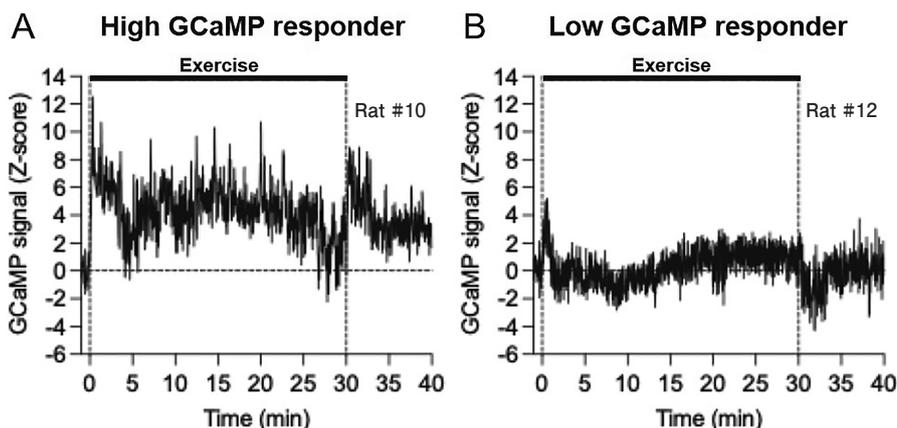


図3. 低強度運動中の GCaMP シグナルの個体差

Fig.3. Typical examples of GCaMP signal from dorsal CA1 during light-intensity running. Typical examples of high GCaMP responder (A) and low GCaMP responder (B).

る傾向が確認された (図 2 B)。運動前と運動中における GCaMP シグナルのピーク値を比較すると、運動中における有意な増加が確認された (paired t -test, $t_{(9)} = 3.18$, $P < 0.05$; 図 2 C)。また、運動中に GCaMP シグナルが増加し続けるラット (high GCaMP responders: $n = 2$) と、運動の開始時にのみ GCaMP シグナルが増加するラット (low GCaMP responders: $n = 2$) がみられた (図 3)。なお、光ファイバーカニューラの直下に GCaMP の発現が不十分 (組織の損傷) であったラットは、運動による GCaMP シグナルの増加が見られなかった ($n = 1$)。このラットは解析から除外した。

考 察

本研究では、ファイバーフォトメトリーを導入し、運動中の海馬神経活動をリアルタイム記録しながら DA の関与を検討することで、運動による海馬活性化の作用機序の一端を解明することを目的として実験を開始した。初めに、ラットの海馬背側部 CA1 の神経細胞に GCaMP が発現するかどうかを確認した。先行研究を参考に¹⁾、本研究では海馬の主要な記憶回路を構成する CA1 の錐体細胞は興奮性神経細胞であることから、興奮性神経細胞特異的に GCaMP 発現を促すプロモーターをもつ AAV (AAV1-CaMK II α -GCaMP6f) を採用した。これをラットの海馬背側部 CA1 に投与し、十分な期間 (3 週間以上) を待ち、免疫組織化学染色によりその局在を確認したところ、海馬背側部 CA1 の錐体細胞層特異的な GCaMP の発現が確

認できた (図 1)。

続いて、GCaMP の発現を促す AAV 投与と光ファイバー留置を海馬背側部 CA1 にて実施したラットを用い、低強度運動中の海馬背側部 CA1 の神経活動を記録した。すると、運動中に GCaMP シグナルが増加する傾向が確認され (図 2 B)、シグナルのピーク値は運動前と比較して運動中で増加した (図 2 C)。これらの結果は、神経活動マーカーである *c-fos* mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーション⁸⁾ や c-Fos タンパク質の免疫組織化学染色⁴⁾ によって確認された低強度運動による海馬神経細胞の活性化を支持する結果である。一方、GCaMP シグナルの増加には個体間でばらつきがみられた。実験後に採取した脳から切片を作製し、GCaMP の発現や光ファイバーカニューラの挿入位置を確認したところ、low GCaMP responders は GCaMP の発現が弱かったり、光ファイバーカニューラと発現領域が遠かったりする傾向がみられた。また、GCaMP の発現が不十分であった 1 個体は運動によるシグナル増加が見られなかった。これらのことから、GCaMP 発現および光ファイバーカニューラ留置の精度によってシグナル検出効率が左右された可能性が高いが、運動に対する反応性に個体差が存在する可能性も詳細に検討する必要がある。

本研究では、実験遂行に予想以上に時間を要したことや技術的課題から、当初計画していた運動強度やサブ領域 (歯状回と CA3) の比較、DA の関与について本格的な検討に至れなかった。第一

に、GCaMPの発現にはAAVを介した遺伝子導入と遺伝子組換え実験設備が必須であり、AAV導入にあたっては遺伝子組換え実験の申請も含め、セットアップに時間を要した。また、GCaMPは発現が見られない脳領域・細胞種が存在することから、いくつかの先行研究を参考にAAVコンストラクトを慎重に選定する必要があり、発現の確認にも一定期間（1か月ほど）待つ必要があった。更に、数 μm ほどの海馬CA1の錐体細胞層に光ファイバーカニューラを精度よく挿入することができる座標検討が必要であり、検討後もGCaMPシグナルが綺麗に検出できるhigh GCaMP respondersは50%に満たなかった。加えて、ラットに光ファイバーケーブルを接続する都合でトレッドミルの上蓋を開放する必要があり、自発的な走行を拒む傾向にある中・高強度運動ではレーン脱走対策を含め工夫が必要であった。現在、こうした技術的課題を克服しながら研究が進展しており、運動による海馬神経細胞の活性化とその調節系としてのDAの関与を検討している。

総 括

ファイバーフォトメトリーを用いることで、海馬背側部CA1の神経細胞の活動を記録することに成功し、低強度運動中における神経細胞の活性化が示唆された。実験遂行に予想以上に時間を要したことや技術的課題により、運動強度・サブ領域の比較や海馬神経活動に対するDAの関与に関する検討には至れなかった。今後、実験条件を修正しながら本研究を継続することで、運動中の海馬神経活動動態の詳細なプロフィールとその調節機構を明らかにできると期待される。

謝 辞

本研究の実施にあたり助成を賜りました公益財団法人

明治安田厚生事業団に深く感謝申し上げます。また、実験にご協力いただきました筑波大学運動生化学研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。更に、実験手法に関してご助言をいただきました筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構(IIIS)の征矢晋吾助教に深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Gobbo F, et al. (2022): Neuronal signature of spatial decision-making during navigation by freely moving rats by using calcium imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **119**, e2212152119.
- 2) Gunaydin LA, et al. (2014): Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*, **157**, 1535-1551.
- 3) Hiraga T, et al. (2024): Light-exercise-induced dopaminergic and noradrenergic stimulation in the dorsal hippocampus: using a rat physiological exercise model. *FASEB J*, **38**, e70215.
- 4) Hiraga T, et al. (2025): Very-light-intensity exercise as minimal intensity threshold for activating dorsal hippocampal neurons: evidence from rat physiological exercise model. *Biochem Biophys Res Commun*, **746**, 151243.
- 5) Inoue K, et al. (2015): Long-term mild, rather than intense, exercise enhances adult hippocampal neurogenesis and greatly changes the transcriptomic profile of the hippocampus. *PLoS One*, **10**, e0128720.
- 6) Inoue K, et al. (2015): Long-term mild exercise training enhances hippocampus-dependent memory in rats. *Int J Sports Med*, **36**, 280-285.
- 7) Nishijima T, et al. (2012): Hippocampal functional hyperemia mediated by NMDA receptor/NO signaling in rats during mild exercise. *J Appl Physiol*, **112**, 197-203.
- 8) Soya H, et al. (2007): BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 961-967.
- 9) Suwabe K, et al. (2018): Rapid stimulation of human dentate gyrus function with acute mild exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **115**, 10487-10492.
- 10) Voss MW, et al. (2019): Exercise and hippocampal memory systems. *Trends Cogn Sci*, **23**, 318-333.