

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12570

研究課題名(和文)運動療法による中枢神経系退行抑制におけるエピジェネティック制御の解明

研究課題名(英文)Analyses of epigenetics regulation in preventive exercise for neurodegeneration

研究代表者

前島 洋(Maejima, Hiroshi)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：60314746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：老化と運動が神経栄養因子(BDNF, NT4)とその受容体(TrkB, p75)の発現、エピジェネティクス制御におけるヒストンアセチル基転移酵素(HAT)、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)活性に与える影響について老化促進モデルマウスSAMP1とそのコントロールマウスSAMR1を対象に検証した。4週間の走行運動は、老化要因に関わらず新規物体認識試験における認知機能の改善をもたらすと同時に、海馬におけるBDNFの発現を増強し、アポトーシスシグナルに関わるp75の発現を減少させた。更に運動はエピジェネティクス制御において重要なヒストンアセチル化に関わるHATおよびHDACの酵素活性を増強した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者を対象とする運動療法は、運動機能のみならず認知症をはじめとする中枢神経系の退行に対して、幅広くその進行を抑制し、予防効果を有することが注目されている。老齢モデルマウスを対象に運動介入による脳におけるシナプス受容体、脳由来神経因子等の遺伝子発現とそれを制御する酵素活性について検証することにより、運動療法に伴う脳における可塑的遺伝子発現の修飾に関わる機構の解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study was to assess the interactive effects of exercise and aging on cognitive function, expression of neurotrophins (BDNF and neurotrophin-4) and their receptors (tyrosine receptor kinase B and p75), and epigenetic regulations, including the activity of HATs and HDACs in the hippocampus. We used the senescence-accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) and prone 1 (SAMP1) lines. Mice in the exercise groups exercised on a treadmill. Exercise for 4 weeks improved cognitive function, accompanied by an increase in BDNF expression and a decrease in p75 transcription in both SAMR1 and SAMP1. The exercise regimen activated both HAT and HDAC in the hippocampus. Therefore, the present study reveals that despite accelerated senescence, long-term exercise improved cognitive function, upregulated the expression of BDNF, and downregulated p75, a receptor involved in apoptotic signaling, accompanying the modulation epigenetic markers.

研究分野：理学療法学

キーワード：神経栄養因子 運動 老化 海馬 認知機能

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者を対象とする運動療法の可能性として、運動機能のみならず認知症をはじめとする中枢神経系の退行に対して、幅広くその進行を抑制し、予防効果を有することが注目されている。その論拠として、運動は中枢神経系、特に海馬において BDNF の発現を増強し、中枢神経系の保護作用を強化すると考えられている。しかし、運動がどのようにして海馬における BDNF 発現を増強するのか、その機構については十分に理解されていない。

そこで、BDNF の遺伝子発現が運動によりどのように修飾されているのか、遺伝子発現修飾におけるエピジェネティック制御について解明することは、その発現制御解明の糸口として極めて有効と考えられる。代表的なエピジェネティクス制御としてヒストンの修飾と DNA 転写領域の修飾に分けられる。遺伝子情報を包含する DNA は細胞核内においてコイル状にヒストン蛋白に巻きつき、コンパクトに折りたたまれている。遺伝子発現においてはこのコイルが緩み、紐解かれることにより、転写を担う因子の転写領域へのアクセスを容易にし、転写を進行させる。このとき、ヒストンのアセチル化はこの緩みを増強し、転写を促進させる。また、転写領域の DNA においてもその領域のシトシンのメチル化により転写は抑制され、脱メチル化により促進される。運動が BDNF 遺伝子発現におけるこれらのエピジェネティック制御にどのような影響を与えるのかは未着手のままである

## 2. 研究の目的

本研究では、老齡モデルおよびそのコントロールマウスを対象にトレッドミルを用いた運動介入による海馬における上記の BDNF および NMDA 受容体サブユニット遺伝子発現に関わるヒストンのアセチル化・脱アセチル化活性を示す酵素であるヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の活性について定量的に検証することにより、運動療法に伴う海馬における BDNF を取り巻く遺伝子発現修飾の機構解明について明らかとすることを当初の目的とした。

このため具体的には、(1) 成体マウスを対象とする海馬 BDNF 発現の増強を惹起する運動プログラムの確立、(2) 同運動プログラムを用いた老化促進モデルマウス (Senescence accelerated model mouse) SAMP とそのコントロールマウスである SAMR1 を対象とする、海馬 BDNF 発現とエピジェネティクスマーカーに対する老化と運動の相互作用に関する検証を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究1. 成体マウスを対象とする海馬 BDNF 発現の増強を惹起する運動条件の確立 (予備的実験)

これまでの成体マウスも用いた著者らの先行研究において、2 週間の中程度のトレッドミル走行により、大脳皮質、海馬における BDNF 発現の増強は確認されなかった。一方、低レベルの GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニストの投与による中枢神経の抑止性後シナプス電位 (IPSP) 抑制下における同様の運動は大脳皮質 BDNF 発現を 2-3 倍に増強することを確認してきた。一方、このとき海馬における BDNF 発現の増強は確認されなかった。これらの所見を手がかりに、海馬における BDNF 発現を増強する運動条件を模索するため、介入期間を 4 週間に延長したトレッドミル走行に加え、先行研究に基づく GABA<sub>A</sub> 受容体の軽度阻害の相乗による海馬 BDNF 発現への影響を検証し、再現的な海馬 BDNF 発現増強を保証する運動とその条件を模索した。

#### 対象

介入開始時において 12 週齢の雌性 ICR マウス 40 匹を使用した。トレッドミル走行、GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニスト bicuculline 投与の有無による 2 要因に基づき、コントロール群 (Saline, Sedentary) 運動群 (Saline, Exercise) Bic 群 (Bicuculline, Sedentary) Bic&運動群 (Bicuculline&Exercise) の 4 群に群分けした (各 n=10)。

#### 運動介入

マウス用トレッドミルへの適応の後、週 5 日 4 週間の走行運動を行った。走行は 6m/分より 11 分間で漸増的に 15m/分に強度を増加させ、その後、50 分間の走行を行った。

#### GABA<sub>A</sub> 受容体の阻害

先行研究を参考に投与群に対して運動介入開始 30 分前に GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニストである bicuculline 0.25mg/kg を投与した。非投与群に対しては同容量の生理的食塩水を投与した。

#### 行動評価

約 4 週間の介入終了時における運動機能評価として、Rotarod test による平衡機能、wire-hang test における筋耐久性を評価した。認知機能試験として新規物体認識試験 (Novel object recognition test, NOR) を実施した。

#### 組織採取

最終介入の後、全脳を摘出の後、海馬、大脳皮質運動関連領域を採取し、液体窒素で凍結固定後、ディープフリーザー (-80 °) で保存した。その後、定量的 PCR 法による mRNA 抽出の前処理として RNAlater (Applied Biosystems, 米国) 内に沈下し、4 ° で保存した。

定量的 PCR 法による神経栄養因子とその受容体の mRNA 発現の定量

採取した組織より RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, オランダ) を使用し、総 RNA を抽出した。抽出総 RNA に対して High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて逆転写処理を行い、cDNA を合成した。続いてリアルタイム PCR システム (Real Time PCR System Step One Plus, ABI, USA) を用いて、Taqman® Gene Expression Master Mix と各蛋白のプライマーとして Taqman® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) を用いて増幅し、内部標準遺伝子として  $\beta$ -actin を用いて比較 Ct 法 (Ct 法) に基づき標的蛋白の Ct 値を計測した。標的遺伝子として、BDNF とその受容体の発現を定量した。

ELIS 法による蛋白発現と酵素活性の定量

採取した組織を破砕し、Minute total protein extraction kit (Invert Biotechnologies, Inc. USA) を用いて蛋白抽出を行い、総蛋白量を分光光度計 (Nanodrop) を用いて計測した。BDNF 蛋白量を BDNF E-maxR kit (Promega, USA) を用いて定量し、総蛋白量で序すことにより標準化した。

併せて、エピジェネティクスマーカーとして、特にヒストンアセチル化に焦点を当て、ヒストンアセチル化を促進する HAT 活性 (Total HAT) および脱アセチル化を促進する HDAC 活性 (HDACs1-11) について、Epiquick TM HAT Activity/Inhibition Assay kit, Epigenase TM HDAC Activity/Inhibition Assay kit (EpiGentek, NY, USA) を用いて定量解析を行った。

## (2) 研究 2 . SAMP1 とそのコントロールマウス SAMR1 を対象とする、海馬 BDNF 発現とエピジェネティクスマーカーに対する老化と運動の相互作用に関する検証

研究 1 における運動条件により海馬 BDNF の mRNA および蛋白レベルでの運動による発現増強が検証されたことに基づき、老化促進モデルマウス SAMP1 とそのコントロールマウス SAMR1 を用いた走行運動介入を行った。

対象

介入開始時 13 ヶ月齢の SAM マウスを老化と運動の 2 要因により 4 群に群分けして用いた。即ち、SAMR1 安静群 (R1-Sed)、SAMR1 運動群 (R1-Ex, n=6)、SAMP1 安静群 (P1-Sed, n=8)、SAMP1 運動群 (P1-Ex, n=7) の 4 群を用いた。

運動介入

マウス用トレッドミルへの適応の後、週 5 日 4 週間の走行運動を行った。走行は 6m/分より 11 分間で漸増的に 15m/分に強度を増加

させ、その後、50 分間の走行を行った。

行動評価

約 4 週間の介入終了時における認知機能評価として新規物体認識試験 (Novel object recognition test, NOR) を実施した。計測フィールドへの適応の後、2 つの同一オブジェクトに対する探索行動を 10 分間録画し、1 時間後に片方のオブジェクトを新規オブジェクトへ変更した際の 5 分間の探索行動を録画した。新規オブジェクトに対する指向性を定量評価した。

組織採取

最終介入の後、全脳を摘出し、海馬を採取し、研究 1 の方法に従い凍結保存した。

定量的 PCR 法による遺伝子発現

研究 1 と同様の方法で海馬サンプルより mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法による標的遺伝子の発現を定量した。標的遺伝子として、神経栄養因子 BDNF、NT-4、両神経栄養因子に共通する受容体である TrkB、p75、更にグルタミン酸作動性シナプス受容体である NMDA 受容体 NR1 サブユニット、NR2 サブユニットの発現を定量した。

ELIS 法による蛋白発現と酵素活性の定量

研究 1 における ELISA 法の方法に従い BDNF、TrkB、p75 の蛋白発現量を定量評価した。

更にエピジェネティクス制御におけるヒストンアセチル化修飾に関わる HAT および HDAC の活性について、研究 1 と同様の手法で定量した。

統計解析

老化と運動の 2 要因に基づき、2 元配置分散分析法により主効果とその交互作用について統計解析を行った。交互作用が確認された場合には post-hoc 試験として多重比較を行った。

## 4 . 研究成果

### (1) 研究 1 . 成体マウスを対象とする海馬 BDNF 発現の増強を惹起する運動条件の確立 (予備的実験)

行動評価

運動機能評価として Rotarod test における運動介入の主効果が認められ ( $p < 0.01$ ) 走行運動による平衡機能の改善が確認された。一方、Wire-hang test における bicuculline 投与の主効果が認められ ( $p < 0.05$ )、GABA<sub>A</sub> 受容体阻害による Wire-hang test における耐久時間の低下が認められた。

認知機能評価として、NOR における何れの主効果も確認されなかった。

**定量的 PCR 法による遺伝子発現**

海馬 BDNF の mRNA 発現において、運動の主効果 ( $p < 0.05$ ) が認められ、運動による BDNF mRNA 発現増強が確認された。TrkB については何れの主効果も認められなかった。

一方、大脳皮質運動関連領域における BDNF mRNA については、bicuculline 投与による主効果が認められ ( $p < 0.01$ )、GABA<sub>A</sub> 受容体阻害により BDNF mRNA 発現が減少することが確認された。TrkB mRNA 発現における主効果は認められなかった。

**蛋白発現と酵素活性**

海馬における蛋白 BDNF の発現量について、運動による主効果が認められ ( $p < 0.01$ )、運動による BDNF 蛋白の発現増強が確認された。

同様に大脳皮質における蛋白 BDNF についても運動による主効果が認められ、運動による BDNF 蛋白の発現増強が確認された。

海馬においてエピジェネティクスマーカーである HAT の活性レベルについて、運動による主効果が認められ ( $p < 0.05$ )、運動による HAT 活性の増強が確認された。一方 HDAC 活性レベルについては、bicuculline 投与による主効果が認められ ( $p < 0.01$ )、GABA<sub>A</sub> 受容体阻害による HDAC 活性の増強が確認された。

以上、研究 1 を総括すると、設定した運動強度、期間のトレッドミル走行により海馬における BDNF は mRNA および蛋白レベルの何れにおいて発現増強が確認された。更に、エピジェネティクス制御としてヒストンアセチル化と遺伝子発現を促進する HAT の活性も運動により増強することが確認された。

一方、期待されていた長期的な GABA<sub>A</sub> 受容体の阻害による運動依存的な BDNF 発現を増強する相乗所見は確認されず、むしろ発現低下が生じる脳領域が確認された。

**(2) 研究 2 . SAMP1 とそのコントロールマウス SAMR1 を対象とする、海馬 BDNF 発現とエピジェネティクスマーカーに対する老化と運動の相互作用に関する検証**

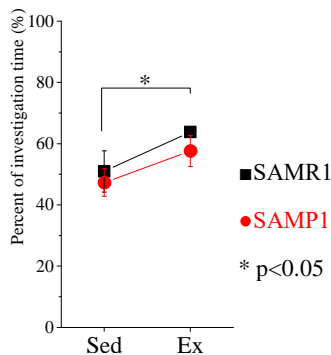


図 1 . 新規物体認識試験 (NOR)

**行動評価**

認知機能評価である NOR の所見において運動による主効果が認められ ( $p < 0.05$ )、運動による新規物体認知機能の改善が確認された (図 1)。

**定量的 PCR 法による遺伝子発現**

海馬における BDNF mRNA の発現について、主効果が認められ ( $p < 0.01$ )、運動による BDNF mRNA 発現増強が確認された (図 2 A)。NT4 mRNA についても運動の主効果 ( $p < 0.01$ ) と相互作用が認められ、SAMP1 において特異的に運動による発現増強が確認された (図 2 B)。受容体 TrkB については老化の主効果が認められ ( $p < 0.01$ )、老化による発現低下が

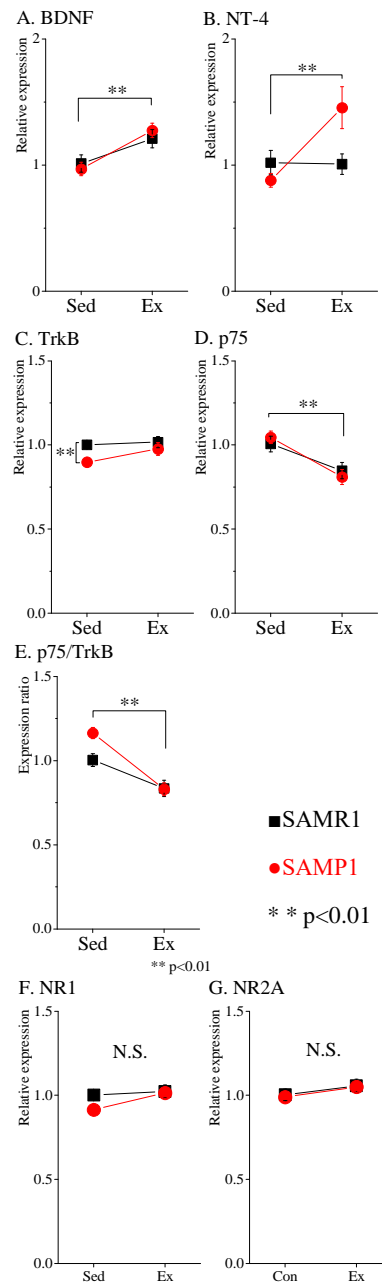


図 2 mRNA 発現量

確認された (図 2 C)。P75 mRNA については、

運動の主効果が認められ ( $p < 0.01$ ) 運動による発現減少が確認された (図 2 D)。P75/TrkB の発現比について検討したところ、運動による主効果が確認され、運動による p75/TrkB 発現比の低下が確認された (図 2 E)。NMDA 受容体サブユニット (NR1, NR2A) の mRNA については何れの主効果も認められなかった (図 2 F、2 G)。

#### 蛋白発現と酵素活性

海馬における BDNF 蛋白レベルについて運動の主効果が認められ ( $p < 0.05$ ) 運動による蛋白 BDNF 発現の増強が確認された (図 3 A)。

p75 蛋白レベルについて、老化による主効果が認められ ( $p < 0.001$ ) 老化による p75 蛋白の発現増強が確認された (図 3 D)。P75/TrkB 蛋白発現比においても同様の主効果が認められ ( $p < 0.001$ ) 老化による P75/TrkB 蛋白発現比の増加が確認された (図 3 E)。

海馬におけるエピジェネティクスマーカーである HAT 活性について、運動による主効果が確認され ( $p < 0.05$ ) HAT 活性は運動に

より増強されることが認められた (図 4 A)、更に HDAC 活性についても運動による主効果が認められ ( $p < 0.01$ ) 運動により HDAC 活性が増強することが確認された (図 4 B)。

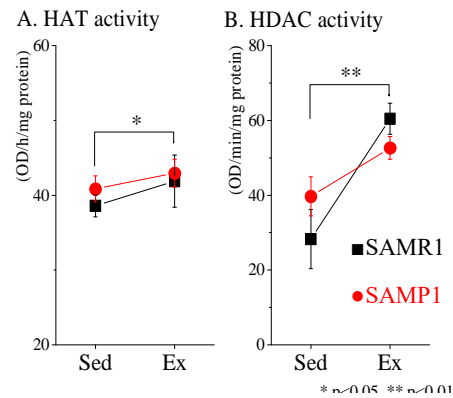


図 4 . 酵素活性

以上、研究 2 を総括すると、4 週間の走行運動により、認知機能の改善とともに、BDNF 発現は mRNA および蛋白レベルの何れにおいても運動により増強され、老化による影響は確認されなかった。

一方、BDNF 受容体の発現比として、アポトーシス等を惹起する下降シグナルを有す p75 mRNA 発現比が運動により減少することが明らかとなった。

ヒストンアセチル化を増強する HAT および脱アセチル化を促す HDAC が共に運動により活性化されることが確認された。このことから、運動によりヒストンアセチル化に関わる酵素活性が修飾される一歩で、運動依存的な BDNF 遺伝子発現の修飾において、DNA メチル化をはじめとするヒストンアセチル化以外の制御が主要なエピジェネティクス制御として関わっている可能性も示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- Inoue T., Ninuma S., Hayashi M., Okuda A., Asaka T., Maejima H. Effects of long-term exercise and low-level inhibition of GABAergic synapses on motor control and the expression of BDNF in the motor-related cortex. *Neurological Research*, 査読有, 2018, 40(1), pp18-25. DOI: 10.1080/01616412.2017.1382801.
- Maejima H., Kanemura N., Kokubun T., Murata K., Takayanagi L. Exercise enhances cognitive function and neurotrophin expression in the hippocampus accompanied by changes in epigenetic

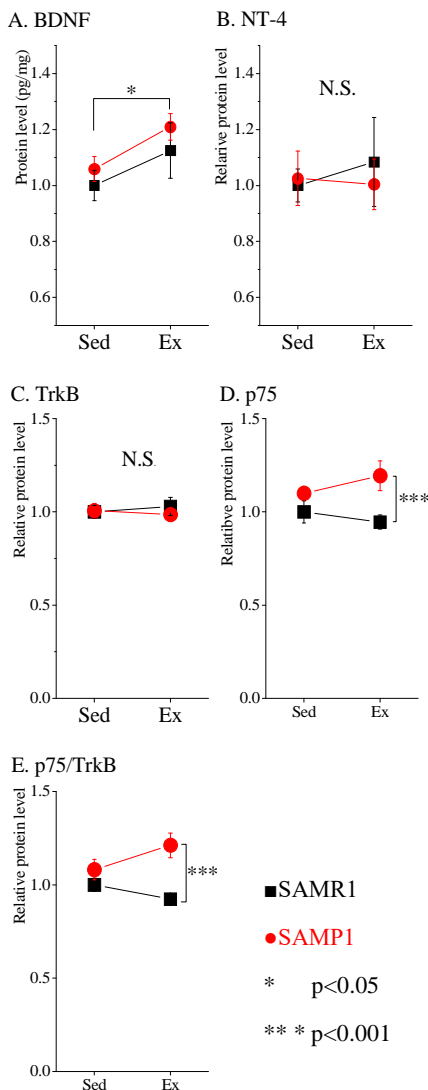


図 3 . 蛋白発現

programming in senescence-accelerated mice. Neuroscience Letters, 査読有, 2018, 665, pp67-73.

DOI: 10.1016/j.neulet.2017.11.023.

- 3 ) Maejima H., Ninuma S., Okuda A., Inoue T., Hayashi M. Exercise and low-level GABAA receptor inhibition modulate locomotor activity and the expression of BDNF accompanied by changes in epigenetic regulation in the hippocampus. Neuroscience Letters, 査読有, 2018, 685, pp18-23.  
DOI: 10.1016/j.neulet.2018.07.009.
- 4 ) Li X., Inoue T., Hayashi M., Maejima H. Exercise enhances the expression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus accompanied by epigenetic alternations in senescence-accelerated mice prone 8. Neuroscience letters , 査読有, 2019, 706, pp176-181. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.05031

〔学会発表〕(計8件)

- 1 ) Maejima H., Kitahara M., Hayashi M., Inoue T., Li X. Site-specific modulation of BDNF expression in the brain following chronic GABA<sub>A</sub> receptor inhibition. FENS Forum 2018, Berlin, Germany, 2018. 7.
- 2 ) Inoue T., Nunuma N., Hayashi M., Okuda A., Asaka T., Maejima H. Low-level inhibition of GABA<sub>A</sub> receptor and motor exercise modulate BDNF expression in the motor related cortex. The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Kobe, 2018. 7.
- 3 ) Maejima H., Ninuma S., Okuda A., Inoue T., Hayashi M., Exercise combined with low-level GABA<sub>A</sub> receptor inhibition modulates the expression of BDNF in the hippocampus accompanied by changes in epigenetic regulation. The Society for Neuroscience 46th Annual Meeting (Neuroscience 2017). Washington, DC, 2017.11.
- 4 ) Inoue T., Ninuma S., Hayashi M., Okuda A., Asaka T., Maejima H. Effects of long-term exercise combined with low-level inhibition of GABAergic synapses on motor control and the expression of BDNF in the motor cortex. The 3rd FHS International Conference. Sapporo, 2017. 7.
- 5 ) Maejima H., Kanemura N., Kokubun T., Murata K., Takayanagi K. Effects of aging and treadmill exercise on cognitive function and the expression of BDNF in the hippocampus. Experimental Biology 2017, Chicago, IL. 2017. 4.
- 6 ) Takahashi K., Maejima H., Ikuta G., Mani H., Asaka T. Exercise combined with

low-level GABA<sub>A</sub> receptor inhibition up-regulates the expression of neurotrophins in the motor cortex. Experimental Biology 2017, Chicago, IL. 2017. 4.

- 7 ) Maejima H., Takahashi K., Ikuta G. Inhibition of GABAergic synapses up-regulate the expression of neurotrophins and NMDA receptor subunits in the motor cortex. Neuroscience 2016, The 39th annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Yokohama, 2016. 7.
- 8 ) Maejima H., Kanemura N. Inhibition of GABAergic synapses removes exercise-induced expression of neurotrophins in the motor cortex. The Society for Neuroscience 44th Annual Meeting (Neuroscience 2015). Chicago, IL. 2015.10.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

前島 洋 (Maejima Hiroshi)  
北海道大学・保健科学研究院・教授  
研究者番号：60314746

### (2)研究分担者

齊藤 展士 (Saito Hiroshi)  
北海道大学・保健科学研究院・助教  
研究者番号：60301917

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

金村 尚彦 (Kanemura Naohiko)  
国分 貴徳 (Kokubun Takanori)  
村田 健児 (Murata Kenji)  
高柳 清美 (Takayanagi Kiyomi)  
井上 貴博 (Inoue Takahiro)  
奥田 茜 (Okuda Akane)  
新沼 柊太 (Ninuma Shuta)  
林 聖隆 (Hayashi Masataka)  
高橋 和馬 (Takahashi Kazuma)