

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11359

研究課題名(和文) 不活動が脳由来神経栄養因子 BDNFに及ぼす影響と運動介入効果の基礎的検討

研究課題名(英文) Effects of inactivity and exercise intervention on brain-derived neurotrophic factor BDNF

研究代表者

萩原 宏毅 (HAGIWARA, HIROKI)

帝京科学大学・医療科学部・教授

研究者番号：80276732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは本研究課題で、不活動による廃用性筋萎縮を誘発したモデルマウスに対してトレッドミルにて運動介入を行い、血液、骨格筋、脳における脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) の動態を経時的に比較検討した。その結果、BDNFは、血中、骨格筋、脳の全てにおいて不活動で減少し、通常歩行再開により増加、運動介入でさらに増加した。BDNFの変動の大きさは、血中>骨格筋>脳の順であり、脳での変動が一番小さかった。この結果より、BDNFは活動量を反映して変動していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、実験動物やヒトにおいて、脳由来神経栄養因子 BDNFが運動により増加することが報告されている。一方、廃用性筋萎縮状態における BDNFについてはほとんど検討されていなかった。本研究により、マウスにおいて BDNFは不活動で減少し、運動介入で増加することが明らかになった。今回の知見は、体を動かさないと脳機能は低下し、運動により改善するという臨床での経験則に矛盾しない。不活動により認知機能が低下することを予防するため、リハビリテーションで運動介入を行うことの有用性を示すエビデンスに繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research project examined the dynamics of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in blood, skeletal muscle, and brain in a mouse model of disuse muscle atrophy induced by cast immobilization. The effects of treadmill exercise intervention on BDNF were also evaluated. The results showed that BDNF decreased in blood, skeletal muscle, and brain during inactivity, increased during resumption of walking, and further increased during exercise intervention. These results indicate that changes in BDNF reflect the amount of activity.

研究分野：筋生物学

キーワード：不活動 脳由来神経栄養因子 BDNF 運動介入 トレッドミル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 不活動により骨格筋では廃用性に筋萎縮が起こり、さまざまな日常生活動作 ADL の低下を引き起こす。これに対して、運動療法が日々のリハビリテーションで実践されている。運動は、筋力を保ち ADL を維持するために重要であるばかりでなく、脳機能も改善させる効果があることが知られている。

(2) 脳機能を反映した生理的活性因子の代表的なものに、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, 以下 BDNF) がある。BDNF は、NGF (nerve growth factor)、NT-3、NT-4/5 などの神経成長因子ファミリーの一員で、神経細胞の生存維持、神経突起の伸長促進、神経伝達物質の合成促進などを行い、神経細胞の維持・成長・分化を促し、長期記憶に重要な役割を果たしている。さらに、情動のコントロール、摂食行動の抑制、糖代謝への関与など多彩な機能を持つことが報告されている。最近になって、BDNF は骨格筋からも分泌されていることが報告され、骨格筋から分泌されホルモン様に作用する「マイオカイン」の 1 つとみなされるようになった。しかし、その動態や機能は十分解明されていない。

(3) 近年、実験動物やヒトにおいて、BDNF が運動により増加することが多数報告されている。その機序の 1 つとして、運動によって MAP キナーゼ系や Akt 系経路が活性化され、BDNF の発現が促進されることが示されている。一方、廃用性筋萎縮状態における BDNF の動態についてはほとんど検討されていない。私たちは、不活動状態ではこれらのシグナル伝達経路の不活性化が起こり、BDNF 発現量が低下するのではないかと予測した。さらに、不活動に対して運動介入を行うことによって BDNF は回復するのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究課題では、廃用性筋萎縮モデルマウスを用いて、不活動から運動介入の過程で BDNF の血中、骨格筋および脳における変動について検討することにより、上記仮説を検証することを目的とした。具体的には、(1) 不活動による廃用性筋萎縮状態では BDNF はどうなるのか(2) それに対して運動介入を行うと BDNF はどう変化するのかということを検明することを研究の目的とした。

今回の検討で、不活動や再荷重、運動介入の過程において、BDNF の動態が連動することを明らかにすることができれば、リハビリテーションの介入効果の判定などを客観的な指標に基づいて実施する可能性を開く意義があると考えた。

3. 研究の方法

(1) 10 週齢雄 C57/BL6 マウスを、通常飼育を行う対照群 (Control: 以下 Co 群)、ギプス固定を用いて筋萎縮を誘発したギプス固定群 (Cast Immobilization: 以下 CI 群)、筋萎縮誘発後にギプス固定を除去し、通常飼育とした再荷重群 (Reloading: 以下 RL 群)、筋萎縮誘発後にギプス固定を除去し、トレッドミル運動を行った運動群 (以下 Ex 群) の 4 群に分けた。

(2) 筋萎縮誘発は、従来から行われているギプス固定法にて行った (CI 群、RL 群、Ex 群)。筋萎縮誘発は膝関節伸展、足関節底屈位にて実施し、2 週間の固定期間を設けた。マウスは、前肢と一側後肢を用いてケージ内を移動し、餌と水は自由に摂取できるようにした。飼育中に浮腫や緩みが生じた際には、その都度巻き直しを行った。

(3) 再荷重は、ギプス固定による 2 週間の筋萎縮誘発後にギプスを除去し、処置側の下肢を再接地させ通常飼育することで再荷重とした。再荷重期間は 2 週間とした (RL 群)。

(4) 運動介入は、ギプスを除去後にトレッドミル装置 (LE8709、PanLab) を用いて、TREAT-NMD の標準作業手順書 (SOPs) (DMD_M.2.1.003) のプロトコール (文献①) に準拠して週 2 回 2 週間行った (Ex 群)。

(5) 実験期間終了後に、各群のマウスより前脛骨筋、下腿三頭筋、脳を単離した。また、採血し血清を調製した。筋湿重量計測を実施し、凍結横断切片を作成した。骨格筋 HE 染色にて組織学的解析を実施した。

(6) 血中、骨格筋、脳における BDNF の発現量を計測した。血中の BDNF 濃度は、マルチプレックスサスペンションアレイ解析 (R&D Systems 製 Luminex Assay) (外部受託) にて測定した。骨格筋中の BDNF は、Western Blot 法によるタンパク質発現量とマイクロアレイ法による遺伝子発現量を解析した。脳の BDNF については、ELISA 法 (Mature BDNF Rapid™ ELISA Kit (BEK-2211-1P, biosensis®) を使用)、Western Blot 法、マイクロアレイ法による解析を行った。

4. 研究成果

(1) 野生型 C57BL6 マウスに対して、ギプス固定法にて筋萎縮誘発を行った。下腿三頭筋の筋湿重量は、Co 群に比べて CI 群で有意に減少し、RL 群で有意に回復した (* $p < 0.05$)。さらに Ex 群でも CI 群に比べて有意な回復を示した (* $p < 0.05$) (図 1)。

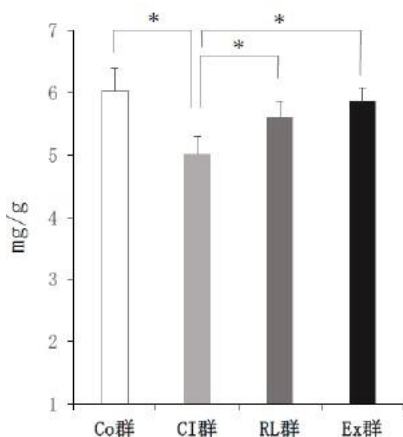


図 1 下腿三頭筋の筋湿重量/体重比

(2) 下腿三頭筋の H&E 染色を行った結果、Co 群と比較して CI 群では筋線維の大小不同があり、骨格筋の萎縮が観察された。CI 群と RL 群および Ex 群を比較すると、骨格筋の筋線維は拡大しており、筋萎縮の改善がみられた。RL 群と比べて、Ex 群での骨格筋の肥大は明らかではなかった。また、マクロファージや好中球などの炎症細胞浸潤、細胞質間の拡大、壊死線維や中心核は認められなかった (図 2)。

下腿三頭筋の筋線維断面積の分布は、Co 群と比較して CI 群でより筋線維断面積の小さい方への変移がみられた。RL 群と Ex 群で筋線維断面積の大きい方への変移がみられた。

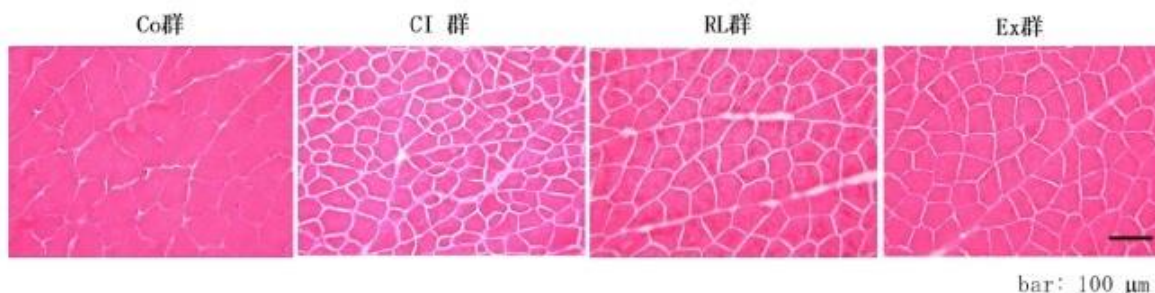


図 2 下腿三頭筋の HE 染色

(3) 血中 BDNF は、Co 群と比較して CI 群で有意に減少していた (* $p < 0.05$)。また、RL 群と比較して Ex 群で有意に増加していた (* $p < 0.05$) (図 3 左)。

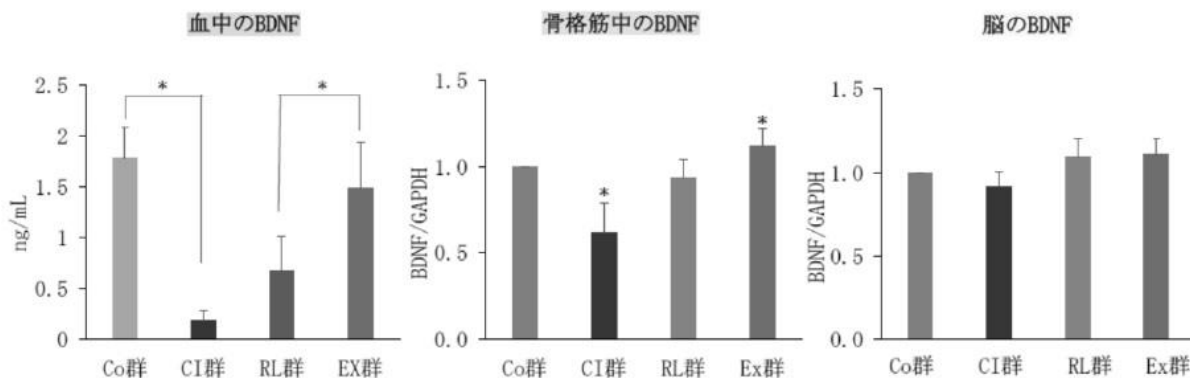


図 3 各群における血中、骨格筋中、脳の BDNF 発現量

(4) 骨格筋中 BDNF は、Western Blot 法の結果から、骨格筋中の BDNF は Co 群と比較して CI 群で有意に減少していた(*p <0.05)。また、RL 群と比較して Ex 群で有意に増加していた(*p <0.05) (図 3 中)。

マイクロアレイ法にて骨格筋 BDNF mRNA の発現量は、Co 群と比較して RL 群で約 0.4 倍に減少し、Ex 群で Co 群と同程度まで発現が回復した。

(5) 脳の BDNF 発現量は、ELISA 法では、Co 群に比べて CI 群で減少して、RL 群で回復し、Ex 群ではさらに有意な増加を示した(*p <0.05)。

Western Blot 法では、Co 群に比べて CI 群で減少して、RL 群で回復、Ex 群ではさらに増加する傾向はあったが、有意差はみられなかった(*p <0.05) (図 3 右)。

マイクロアレイ法による脳 BDNF mRNA の発現量は、Co 群と比較して RL 群、Ex 群とも変動はみられなかった。

(6) 成果の位置づけとインパクト、今後の展望

本研究課題の結果をまとめると、

① マウスモデルにギプス固定による廃用性筋萎縮を誘発し、その後再荷重やトレッドミルによる運動介入を行い、この過程における血中、骨格筋中および脳における BDNF の動態を検討した。2 週間のギプス固定による不動化は、廃用性筋萎縮を誘発し筋湿重量を減少させ、2 週間の運動介入により筋萎縮は回復した。

② BDNF は血中、骨格筋、脳いずれにおいても不活動によって減少し、再荷重、運動介入によって増加した。このように、廃用性筋萎縮から運動介入の過程で、BDNF が変動することから、BDNF は活動量を反映していると考えられた。

③ 血中、骨格筋、脳で変動の程度に違いがあり、血中で変動が大きく、脳では一番変動が小さかった。この結果は、年齢の影響や、各組織で BDNF は異なる機序で発現が制御されていることを反映していると考えた。

今回の知見は、体を動かさないと脳機能は低下し、運動により改善するという臨床での経験則に矛盾しない。不活動によって認知機能が低下することを予防するため、リハビリテーションで運動介入を行うことの有効性を支持する結果と考えられる。また、BDNF が脳機能に対する不活動の影響と運動療法の効果を反映する客観的な指標となる可能性が示唆された。

今後は、不活動による筋萎縮から再荷重あるいは運動療法介入過程における BDNF 変化の詳細な時系列の動態を明らかにしたい。特に筋萎縮のどの時期から BDNF が低下するのか明らかにすることは、介入開始時期を決める臨床的にも有用な手がかりになると考える。

<引用文献>

- ① Use of treadmill and wheel exercise to assess dystrophic state. Grange RW. TREAT-NMD. SOP (ID) Number DMD_M.2.1.003, Version 1.0. Last reviewed May 23rd, 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 三樹あずさ, 相原正博, 萩原宏毅	4. 巻 4
2. 論文標題 不活動が脳のBDNFに及ぼす影響と運動介入及び機能性食品摂取の効果の基礎的検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 国際エクササイズサイエンス学会誌	6. 最初と最後の頁 4-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 相原正博, 三樹あずさ, 斉藤史明, 萩原宏毅	4. 巻 3
2. 論文標題 廃用性筋萎縮の病態と運動介入が脳由来神経栄養因子BDNFに及ぼす影響の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 国際エクササイズサイエンス学会誌	6. 最初と最後の頁 7-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda M, Taniguchi-Ikeda M, Kato T, Shinkai Y, Tanaka S, Hagiwara H, Sasaki N, Masaki T, Matsumura K, Sonoo M, Kurahashi H, Saito F	4. 巻 18
2. 論文標題 Unexpected Mutations by CRISPR-Cas9 CTG Repeat Excision in Myotonic Dystrophy and Use of CRISPR Interference as an Alternative Approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular therapy. Methods & clinical development	6. 最初と最後の頁 131-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2020.05.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 相原正博, 斉藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅	4. 巻 2(1)
2. 論文標題 廃用性筋萎縮の病態と再荷重の過程における骨格筋と筋内血管の応答	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 国際エクササイズサイエンス学会誌	6. 最初と最後の頁 16-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 萩原宏毅
2. 発表標題 理学療法臨床につなげるための基礎研究
3. 学会等名 第118回 理学療法科学学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相原正博, 三樹あずさ, 萩原宏毅
2. 発表標題 廃用性筋萎縮の病態および運動介入時におけるLeukemia inhibitory factorの変動
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三樹あずさ, 相原正博, 萩原宏毅
2. 発表標題 廃用性筋萎縮に対する運動介入が脳における脳由来神経栄養因子BDNFと線維芽細胞増殖因子FGF2に及ぼす影響のマウスモデルを用いた検討
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相原正博, 三樹あずさ, 斉藤史明, 萩原宏毅
2. 発表標題 廃用性筋萎縮に対する運動療法のバイオマーカーの検討 - 脳由来神経栄養因子BDNFに着目して -
3. 学会等名 第7回日本サルコペニア・フレイル学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相原正博, 三樹あずさ, 斉藤史明, 萩原宏毅
2. 発表標題 廃用性筋萎縮および運動介入が脳, 血中, 骨格筋の脳由来神経栄養因子BDNFに及ぼす影響の基礎的検討
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相原正博, 三樹あずさ, 斉藤史明, 萩原宏毅
2. 発表標題 廃用性筋萎縮に対する運動介入が血中および骨格筋中の脳由来神経栄養因子BDNFに与える影響の検討
3. 学会等名 第 6回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斉藤史明, 池田美樹, 池田真理子, 加藤武馬, 新海保子, 田中園子, 萩原宏毅, 佐々木直道, 真先敏弘, 松村喜一郎, 倉橋浩樹, 園生雅弘
2. 発表標題 CRISPR/Cas9による筋強直性ジストロフィーのCTGリピート除去に伴う遺伝子変異とCRISPR interference法の有用性に関する検討
3. 学会等名 第 6回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相原正博, 廣瀬昇, 斉藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅
2. 発表標題 不活動や運動介入が脳由来神経栄養因子BDNFに与える影響
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相原正博, 斉藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅
2. 発表標題 廃用性筋萎縮に対する運動介入が脳由来神経栄養因子BDNFに与える影響の基礎的検討
3. 学会等名 第 6回日本サルコペニア・フレイル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相原正博, 廣瀬昇, 斉藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅
2. 発表標題 不活動が脳由来神経栄養因子BDNFに与える影響の検討
3. 学会等名 第 5回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相原正博, 斉藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅
2. 発表標題 廃用性筋萎縮と再荷重の過程における骨格筋内MMPsの動態と筋内血管への影響
3. 学会等名 第104回 理学療法科学学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hagiwara H, Aihara M, Hirose N, Masaki T, Matsumura K, Saito F
2. 発表標題 Changes in matrix metalloprotease during muscle atrophy and reloading in the mouse disuse model
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京科学大学 教員詳細 萩原宏毅
<http://www.ntu.ac.jp/research/kyoin/iryout/hagiwara.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	斉藤 史明 (SAITO FUMIAKI) (40286993)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	
研究分担者	廣瀬 昇 (HIROSE NOBORU) (60460391)	帝京科学大学・医療科学部・准教授 (33501)	
研究分担者	相原 正博 (AIHARA MASAHIRO) (90736472)	帝京科学大学・医療科学部・講師 (33501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------