

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19750

研究課題名（和文）運動に伴う骨格筋-脳の臓器連関を制御する分子としての骨格筋AMPキナーゼの可能性

研究課題名（英文）Role of skeletal muscle AMPK in exercise-induced enhancement of brain functions

研究代表者

林 達也（Hayashi, Tatsuya）

京都大学・人間・環境学研究科・教授

研究者番号：00314211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨格筋特異的にAMPK活性が抑制されるAMPK-DNマウスを用いて、運動介入後に行動解析（オープンフィールド試験・高架式十字迷路試験・Y迷路試験・バーンズ迷路試験・強制水泳試験）を実施した。その結果、骨格筋AMPKが自発行動量・不安様行動・空間学習に関与している可能性が示された。また、生化学解析の結果、骨格筋AMPKが、脳機能調節に関与するマイオカインの発現を制御すること、海馬の成長因子・シナプス分子の発現に関与することが示唆された。以上の結果より、骨格筋AMPKがマイオカイン発現および海馬の可塑性を調節することにより、脳機能制御に寄与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動は、学習能力や情動制御に関与していることが知られているが、その分子機序に関しては未だ不明点が多く残されている。また、骨格筋が学習能力・うつ様行動の調節に関与することが報告されている一方、不安様行動に対する骨格筋の寄与は不明であった。本研究では、骨格筋AMPKが運動の抗不安効果ならびに海馬の遺伝子発現調節に関与している可能性が示された。したがって、本研究結果は、運動による脳機能亢進の新規分子機序を示すとともに、骨格筋による不安様行動調節の可能性を示唆した点で学術的意義を有する。本研究により得られた基礎的知見は、脳の健康増進を目的とした新規運動療法の確立に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, behavioral analyses (open field test, elevated plus maze test, Y-maze test, Barnes maze test, and forced swim test) were conducted after exercise intervention using wild type and AMPK-DN mice, in which AMPK activity is suppressed specifically in skeletal muscle. The present results indicated that skeletal muscle AMPK is involved in the spontaneous locomotor activity, anxiety-like behavior, and spatial learning. In addition, biochemical analyses revealed that skeletal muscle AMPK regulates the expression of myokines that are involved in the regulation of brain functions, and the expression of growth factors and synaptic molecules in the hippocampus. These results suggest that skeletal muscle AMPK may contribute to the regulation of brain function by regulating myokine expression and hippocampal plasticity.

研究分野：運動生理学

キーワード：運動 骨格筋 脳 臓器連関 AMPキナーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

運動は骨格筋機能を向上させるだけでなく、学習機能の改善や認知症・うつ病の予防に寄与し得ることが明らかとなっている。しかしながら、その詳細な分子機序は明らかでない。近年、骨格筋由来の液性因子(マイオカインおよび代謝産物)が血液を介して脳に作用し、学習能力や情動に影響を及ぼすことが報告されている(Moon et al., Cell Metab, 2016; Agudelo et al., Cell, 2014)。運動により活性化する骨格筋 AMP キナーゼ(AMPK)は、学習・情動に関わる液性因子の発現・分泌を制御することが示唆されていることから、運動による脳機能亢進に重要な役割を果たしている可能性がある。しかしながら、骨格筋 AMPK が脳機能調節に関与する直接的なエビデンスは存在しない。

### 2. 研究の目的

本研究では、骨格筋 AMPK が脳機能調節に関与する可能性を検証するとともに、その分子機序を探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. マウスの作出

骨格筋 AMPK 活性が阻害されるモデルとして、骨格筋特異的に AMPK $\alpha$ 1 ドミナントネガティブ変異体を発現する(AMPK-DN)マウスを用いた(Miura et al., Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009)。雄性の AMPK-DN マウスと雌性の野生型(WT)マウスを交配し、実験に用いる AMPK-DN ならびに WT マウスを作出した。

#### 3-2. 運動介入

8-10 週齢にて AMPK-DN ならびに WT マウスを wheel running あり(自発性運動群)・なし(非運動群)の各条件に振り分けた。3-4 週間の介入期間後、行動解析ならびに生化学解析を実施した。

#### 3-3. 除神経手術

2-4 月齢の WT ならびに AMPK-DN マウスの片脚の坐骨神経を切除して骨格筋不活動を誘導した。反対脚には偽手術を施してコントロールとした。手術から 7 日後、骨格筋をサンプリングし、生化学解析を実施した。

#### 3-4. 行動解析

自発行動量ならびに不安様行動を評価するために、オープンフィールド試験・高架式十字迷路試験を実施した。うつ様行動の評価には強制水泳試験を用いた。作業記憶の評価には Y 迷路試験を、空間学習・記憶の評価にはバーンズ迷路試験を用いた。

#### 3-5. 生化学解析

足底筋およびヒラメ筋におけるマイオカイン発現量、海馬における成長因子・最初期遺伝子・シナプス分子の発現を検討するために、real-time PCR により遺伝子発現量、western blotting によりタンパク質発現量を評価した。

### 4. 研究成果

#### 4-1. AMPK-DN マウスの骨格筋特異性の検証

本研究に用いる AMPK-DN マウスの妥当性を確認するために、ドミナントネガティブ変異体の発現特異性を検討した。Western blotting により、WT ならびに AMPK-DN マウスの脳、肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、ヒラメ筋、足底筋における AMPK $\alpha$  の発現量を評価した。その結果、AMPK-DN マウスの骨格筋にて選択的に AMPK $\alpha$  の顕著な増加が観察された。また、AMPK の下流標的である acetyl-CoA carboxylase の Ser79 のリン酸化に関しても、AMPK-DN マウスの骨格筋でのみ低下が観察された。以上より、AMPK-DN マウスにてドミナントネガティブ変異体が骨格筋特異的に発現誘導されていることが示唆された。

#### 4-2. AMPK-DN マウスは自発運動量の顕著な低下を示さなかった。

先行研究により骨格筋 AMPK $\alpha$  欠損マウスでは、ランニングホイールでの自発運動量の顕著な減少が報告されており、そのことにより運動介入の結果の解釈が困難であることが示唆されている(Fentz et al., Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015)。AMPK-DN マウスにおいてもう

ランニングホイールでの自発運動量に影響が出ている可能性を検討するために、WT および AMPK-DN マウスを、ランニングホールを設置したケージにて個別飼育し、運動量を 4 週間測定した (n = 8-9)。その結果、AMPK-DN マウスでは自発運動量の有意な減少は確認されなかった。したがって、本研究における生理学・生化学解析での差は、運動量の違いによるものではないことが示唆される。

#### 4-3 . 骨格筋 AMPK がマイオカイン発現量に及ぼす影響の検討

運動介入終了後、ヒラメ筋ならびに足底筋を用いて、脳機能との関連が報告されているマイオカインの遺伝子発現量を測定した (n = 8-11)。その結果、fibronectin type III domain containing 5 (*Fndc5*) の発現量が AMPK-DN マウスにて低下していることが確認された。また、Cathepsin B (*Ctsb*) に関しては、野生型で運動による有意な増加が観察された一方で、AMPK-DN マウスにおいては運動による増加が消失していた。以上より、脳機能に関わるマイオカインの内、*Fndc5* および *Ctsb* の発現制御に関して、骨格筋 AMPK が寄与していることが示唆された。

また、骨格筋の不活動によるマイオカイン発現量変化における AMPK の関与を検討するため、野生型ならびに AMPK-DN マウスに除神経手術を施し、7 日後の足底筋におけるマイオカインの遺伝子発現量を測定した (n = 8-12)。その結果、除神経脚では偽手術脚に比して、*Fndc5* の有意な低下、*Ctsb* の有意な増加が観察されたが、遺伝子型による影響は観察されなかった。以上より、タイムコースなどの詳細な検証が必要であるものの、除神経による脳機能関連マイオカインの発現応答には、骨格筋 AMPK は関与していないことが示唆された。

#### 4-4 . 骨格筋 AMPK の抑制が自発行動量・情動に及ぼす影響の検討

骨格筋 AMPK が脳機能に関与する可能性を検討するために、野生型および AMPK-DN マウスに運動介入を施した後、行動解析を実施した (n = 11-32)。

オープンフィールド試験においては、AMPK-DN マウスでのみ運動介入により自発行動量の増加が観察された。一方、不安様行動の指標である中心領域での滞在時間に関しては、両遺伝子型において運動による増加が観察され、骨格筋 AMPK の抑制による影響は検出されなかった。

高架式十字迷路試験では、オープンアーム滞在時間に関しては統計学的な有意差は検出されなかったものの、運動によるクローズドアーム滞在時間の減少傾向と、中心領域滞在時間の有意な増加が WT のみで観察されたことから、骨格筋 AMPK は運動による抗不安効果に関与していることが示唆された。また、非運動群間の比較にて、AMPK-DN マウスはオープンアーム侵入回数が有意に増加していることも確認されており、運動負荷のない状態での情動制御にも骨格筋 AMPK が関与している可能性が示された。

一方、強制水泳試験に関しては、骨格筋 AMPK の抑制による顕著な影響は観察されなかった。

#### 4-5 . 骨格筋 AMPK の抑制が学習機能に及ぼす影響の検討

骨格筋 AMPK は、CTSB を介して学習機能に関与することが先行研究により示唆されているものの (Moon et al., Cell Metab, 2016) 直接的なエビデンスは存在しない。そこで、Y 迷路試験によりワーキングメモリー、バーンズ迷路試験により空間学習能力を評価した。

Y 迷路試験において、ワーキングメモリーの指標である自発的交替行動率を評価したところ、遺伝子型ならびに運動による影響は観察されなかった。

バーンズ迷路に関しては、4 日間の訓練試行における標的ホールまでの到達時間・距離、エラー数に関しては、顕著な差は観察されなかった。最後の訓練試行から 24 時間後のプロープ試行においても、標的ホール周辺での滞在時間に統計学的な有意差は検出されなかった。一方、AMPK-DN マウスでは標的ホールまでの到達時間・距離が有意に増加していた。したがって、骨格筋 AMPK の抑制により、軽微な学習能力の低下が生じた可能性がある。本実験の課題として、運動による学習・記憶能力の亢進が検出できなかったことがあげられる。この原因として、課題の難易度が適切でなかった可能性があるため、訓練試行の実施回数などを最適化し、再検討する必要がある。

#### 4-6 . 骨格筋 AMPK の抑制が視床下部の遺伝子発現に及ぼす影響の検討

4 週間の運動介入後のサンプルを用いて、情動制御に関係する視床下部の解析を実施した。高架式十字迷路試験で観察された不安様行動の変化に関する分子機序を探索するために、視床下部の遺伝子発現量を検討した (n = 8-11)。情動に関わるニューロペプチドとして *Crh*、*Trh*、*Avp*、神経活動マーカーとして *Fos*、成長因子として *Bdnf* の遺伝子発現量を測定したが、どの遺伝子に関しても運動ならびに遺伝子型による顕著な影響は観察されなかった。

#### 4-7 . 骨格筋 AMPK の抑制が海馬の遺伝子発現に及ぼす影響の検討

情動ならびに学習に関わる海馬の解析を実施した。はじめに運動介入を施していない WT ならびに AMPK-DN マウスの解析を実施したところ、AMPK-DN マウスにて興奮性ならびに抑制性シナプス分子の発現増加が観察された。運動介入および行動解析後のサンプルでは、WT マウスで観察される運動による *Bdnf* 遺伝子発現量の増加は、AMPK-DN マウスでは見られなかった。したがって、骨格筋 AMPK はシナプス分子の発現制御に関与しているとともに、運動による *Bdnf* の増加に寄与している可能性が示された。

以上より、骨格筋 AMPK は、マイオカイン発現量を制御するとともに、海馬の栄養因子・シナプス分子の発現を調整することが示唆された。また、行動解析では自発行動量・不安様行動・学習能力の制御に関与している可能性が示された。一方で、それらの現象の因果関係に関しては、今後より詳細な検証が必要である。

本研究成果は、運動および骨格筋-中枢臓器連関による脳機能調節の新規分子機序を示唆する点で学術的意義を有する。また、本研究により得られた基礎的知見は、脳の健康増進を目的とした新規運動療法の確立に寄与することが期待される。

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 3件）

1. 著者名 Yokokawa Takumi, Sasaki Shohei, Sase Kohei, Yoshii Naomi, Yasuda Jun, Hayashi Tatsuya, Fujita Satoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Association of serum brain-derived neurotrophic factor with hepatic enzymes, AST/ALT ratio, and FIB-4 index in middle-aged and older women	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0273056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0273056	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 Yokokawa Takumi, Kido Kohei, Sato Koji, Hayashi Tatsuya, Fujita Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Altered expression of synaptic proteins and adhesion molecules in the hippocampus and cortex following the onset of diabetes in nonobese diabetic mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15673	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 Egawa Tatsuro, Ogawa Takeshi, Yokokawa Takumi, Kido Kohei, Iyama Ryota, Zhao Haiyu, Kurogi Eriko, Goto Katsumasa, Hayashi Tatsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Glycative stress inhibits hypertrophy and impairs cell membrane integrity in overloaded mouse skeletal muscle	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcsm.13444	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 Suzuki Shinichiro, Hayashi Tatsuya, Egawa Tatsuro	4. 巻 684
2. 論文標題 Advanced glycation end products inhibit proliferation and primary cilia formation of myoblasts through receptor for advanced glycation end products pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149141 ~ 149141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.149141	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎主基、横川拓海、江川達郎、井山涼太、林達也、井上和生.
2. 発表標題 成熟骨格筋におけるインスリン様成長因子1の欠損が 骨格筋量および関連シグナル応答に及ぼす影響
3. 学会等名 第38回 日本体力医学会近畿地方会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 江川達郎、小川岳史、木戸康平、横川拓海、後藤勝正、林達也.
2. 発表標題 終末糖化産物AGEsによるマウス骨格筋細胞膜脆弱化の誘導
3. 学会等名 第69回日本宇宙航空環境医学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江川達郎、小川岳史、木戸康平、横川拓海、後藤勝正、林達也.
2. 発表標題 Possible involvement of methylglyoxal as a new exercise-resistance factor
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江川達郎
2. 発表標題 糖化と健康:糖化を意識する
3. 学会等名 マジェクト健美食プロジェクト「糖化予防と健康生活」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 趙海宇、林達也、江川達郎.
2. 発表標題 AGEsによるマウス単離骨格筋のタンパク質恒常性分子機構への影響解明
3. 学会等名 第62回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>林達也研究室 website  <a href="http://www.hayashilab.org/">http://www.hayashilab.org/</a></p>
--

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	江川 達郎  (Egawa Tatsuro)  (00722331)	京都大学・人間・環境学研究科・助教    (14301)	
研究分担者	横川 拓海  (Yokokawa Takumi)  (80844323)	京都大学・農学研究科・助教    (14301)	

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
---------	---------