

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04012

研究課題名(和文) エピジェネティック修飾による運動適応機構の解明

研究課題名(英文) Exploring the mechanism of adaptation to exercise through epigenetic modification

研究代表者

檜垣 靖樹 (Higaki, Yasuki)

福岡大学・スポーツ科学部・教授

研究者番号：10228702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主に動物研究及びヒト研究を展開し、1)動物のギプス固定モデルを用いて、筋萎縮時の一酸化窒素シグナルがエピジェネティックな修飾を介して調節されていること、2)動物の運動トレーニングモデルを用いて、運動による抗不安作用の脳内分子機構として、海馬背側部および腹側部における一酸化窒素合成酵素のエピジェネティックな遺伝子修飾が関与していること、3)ヒト研究において、慢性腎臓病に対する運動療法として肝線維化のマーカーであるFIB-4指標の有用性を明らかにした。特に、一酸化窒素合成酵素のDNAメチル化は、様々な生体内状況で修飾を受けていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人類の進化は、継承されるDNA情報を基にしているが、エピジェネティクスは変わらないものに微修正を加えるものである。人生100年時代を迎え、健康な時間をいかに持続させるか、が問われており、身体活動・運動の記憶が細胞に組み込まれ、長期にわたり作用することが明らかとなれば、様々なライフステージにおける運動の意義を再認識することができる。本研究の成果は、それらの一端を構築するためのエビデンスである。今後、記憶された分子機構の解明がさらに進むことで、適時的な身体活動・運動の実践、適量・適強度の活動内容の提示など、新しい視点からの提案に期待が寄せられる。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation may play an important role in regulating gene expression in skeletal muscle and brain tissue to adapt to physical training and inactivity. Our study contributes to a better understanding of the maintenance of skeletal muscle mass and prevention of muscle atrophy by epigenetic mechanisms via the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) / nitric oxide (NO) pathway, and beneficial effects of running exercise on mood regulation may be controlled by alterations in epigenetic mechanisms, especially in the ventral hippocampus. In a 6-year longitudinal study, we showed that liver fibrosis could be a useful indicator for the prevalence of CKD, even within a relatively healthy population, although liver fibrosis was not an independent risk factor. Further studies are needed to determine whether an epigenetic modification is involved in a process of liver fibrosis. Finally, our study showed that the changes in nNOS DNA methylation patterns observed in various tissues.

研究分野：運動生理学

キーワード：エピジェネティクス 一酸化窒素合成酵素

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、消化・吸収した糖の約70%以上を取り込む主要な組織である。骨格筋の糖処理機構の優れた点は、インスリン刺激とは独立したメカニズムにより糖を取り込む能力を備えていることである。我々は、骨格筋インスリン受容体やインスリン受容体基質を欠損させても運動刺激による糖取り込み亢進を観察した (Higaki *et al.*, *J Clin Invest*, 1999; *J Biol Chem*, 1999)。驚くべきことに、インスリン刺激とは独立したメカニズムとして考えられてきた運動による糖取り込み機序にインスリンシグナル下流の Akt のリン酸化が関与することが明らかとなり、骨格筋糖代謝シグナルの多様性を示す根拠となった。悪役とされる活性酸素種も同様に Akt のリン酸化を引き起こすことから、良役とされる運動刺激と悪役とされる活性酸素種が同じ分子を介するというパラドックスがなぜ起こるのか、活性酸素種の代表である NO と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の研究を進めた。その結果、筋収縮刺激による酸化ストレスは悪役ではなく良役であり、骨格筋で産生される活性酸素種は、良役と悪役の二面性を持つことを報告した (Higaki *et al.*, *Diabetes*, 2001; *Exer Nutri Environ Stress*, 2005; *Am J Physiol*, 2008)。そこで我々は、これらの現象が骨格筋に特異的であるか、それらのタンパク質発現はどのように調節されているか、探索する研究に着手した。

我々は、これまで活性酸素種の糖取り込み亢進に係るシグナル伝達系を明らかにしてきた。しかしながら、酸化ストレスによる生体影響は、脳組織・肝臓・腎臓など多岐にわたる。そのためまず、酸化ストレスと全身組織の運動適応について検討を進めた。その結果、特筆すべき事実として、活性酸素種の適応現象が海馬(空間的記憶や情動的記憶を司る)で認められた。すなわち、活性酸素種の代表である NO を産生する合成酵素 (NOS; nitric oxide synthase) は、海馬において加齢に伴い増加するが、豊かな環境(遊び道具を豊富に配置した飼育状態; おそらく身体活動量の増加が関与している)により減少した (Tomiga & Higaki *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2016)。さらに、高脂肪食摂取により増加した海馬の NOS の増加は、自発的運動トレーニングの併用により抑制されることを初めて明らかにした (Tomiga & Higaki *et al.* *Nitric Oxide*, 2017)。しかしながら、これらの核内発現制御機構については不明なままであった。

DNA のメチル化および脱メチル化は、エピジェネティクスと呼ばれる DNA 配列の違い(遺伝子多型など)を伴わずに遺伝子発現を調節する核内制御機構の一つである。同じ DNA 配列でもメチル化されると眠る遺伝子、脱メチル化されると働く遺伝子に制御される。我々は、糖尿病発症に係わる遺伝子多型解析より、同一の体質を有していても肥満や環境要因(身体活動や栄養摂取)でリスクが異なることから (Hishida & Higaki *et al.*, *Endocr J*, 2013; Hara & Higaki *et al.*, *J Epidemiol*, 2012)、後天的な遺伝子発現制御機構であるエピジェネティクスの関与を推測した。

## 2. 研究の目的

以上の背景より本研究では以下の目的を

研究 1. 骨格筋量調節機序における活性酸素腫関連遺伝子発現がエピジェネティックに制御されているかどうかを明らかにする。

研究 2. 運動による抗うつ・不安機序における活性酸素腫関連遺伝子発現がエピジェネティックに制御されているかどうかを明らかにする。

研究 3. 慢性腎臓病 (CKD) に対する運動療法のエビデンス構築を目指し、腎臓機能低下者に対する運動介入の効果と、他の疾患や末梢血サンプルを用いた腎臓機能レベルを反映する指標を探索する。

## 3. 研究の方法

研究 1. C57BL/6 マウスを用い、片脚ギプス固定を施し下肢の筋萎縮を誘導した。被験筋はヒラメ筋、長趾伸筋とし、これらの組織において神経型 NOS (nNOS) のタンパク質および遺伝子発現、DNA メチル化レベルを、ウェスタンブロット法、リアルタイム PCR 法、パイロシーケンス法により評価した。さらに C57BL/6 マウス骨格筋(腓腹筋)より単離した筋幹細胞を用いて骨格筋の初代培養実験系を構築し、骨格筋増殖・分化過程における nNOS の役割および DNA メチル化による発現調節機序を評価した。

研究 2. C57BL/6 マウスを回転ホイール付き運動ケージにおいて 11 日間飼育し、運動トレーニングモデルを作製した。屠殺前に高架式十字迷路試験により不安様行動を評価した。海馬組織を摘出し、nNOS のタンパク質、遺伝子発現、DNA メチル化レベルを評価し、不安様行動との関連について検討を行った。

研究 3. 比較的健康な中・高齢者を対象とした後ろ向き横断研究(試験 1, n=806)および 6 年間の縦断研究(試験 2, n=380)において、他の疾患および末梢血サンプルより腎臓機能レベルを反映する指標の探索を実施した。

#### 4. 研究成果

研究 1. 1 週間の片脚ギプス固定は、遅筋優位であるヒラメ筋において顕著な筋萎縮（筋重量および筋線維横断面積の減少）を惹き起こした。さらにヒラメ筋の nNOS タンパク質および遺伝子発現レベルはギプス固定により低下しており、さらに DNA メチル化レベルは上昇していたことから、筋萎縮時の NO シグナル調節はエピジェネティックな変化が関与している可能性が示唆された (Fig. 1)。次いで、筋量調節の根幹を担う筋幹細胞を用いた検討を行った。筋幹細胞を分化させると、Myogenine といった筋分化マーカーの増加、Pax7 といった筋幹細胞マーカーの減少が認められ、本研究における基礎的な実験系の確立が確認された。この時、nNOS の遺伝子発現およびタンパク質発現を評価したところ、筋幹細胞の分化過程において著増することを見出した。一方で、筋幹細胞の分化前後において nNOS をコードする *Nos1* 遺伝子の DNA メチル化レベルには差は認められなかった。以上の結果から、不活動による筋萎縮時にエピジェネティクスが関与することを明らかにした。同時に、骨格筋組織および筋幹細胞、あるいは萎縮および分化・増殖過程では、nNOS を制御する遺伝子発現調節機構は異なる可能性が示唆された。

研究 2. 比較的短期間の 11 日間の運動トレーニングは、抗不安作用を発揮することを明らかにした。海馬は長軸方向に機能的な違いを有することが知られている。そのため、海馬背側部および腹側部における nNOS のエピジェネティックな変化を評価した。不安様行動の減少と一致して、運動トレーニング群の特に腹側海馬では、nNOS タンパク質および遺伝子発現の減少が認められた。やはりこれと一致して腹側海馬においてのみ *Nos1* 平均 DNA メチル化レベルは上昇しており、DNA メチル化レベルの間に負の相関関係が認められた (Fig.2)。以上の結果から、短期間の運動トレーニングも気分の改善に有効であること、さらにその脳内分子機構として、海馬腹側部のエピジェネティックな nNOS の制御が背景にあることを明らかにした。

研究 3. 全対象者の Fibrosis-4 (FIB-4) インデックスを用いて肝線維化レベルを、推定糸球体濾過量 (eGFR) を用いて腎機能を評価した。全対象者を FIB-4 スコアの四分位（低から高）に基づき 4 群に分類し、試験 1 の Jonckheere-Terpstra トレンドテストでは、eGFR は最低群から最高群へ有意に減少した ( $p < 0.001$ )。研究 2 の Kaplan-Meier 生存曲線では、CKD ステージ 3-5 の累積有病率は、第 3 四分位が他の四分位より高いことが示された。以上の結果から、肝線維化レベルは独立した危険因子ではないものの、比較的健康的な集団内において、肝線維化が CKD の有病率の指標として有用であることが明らかとなった。

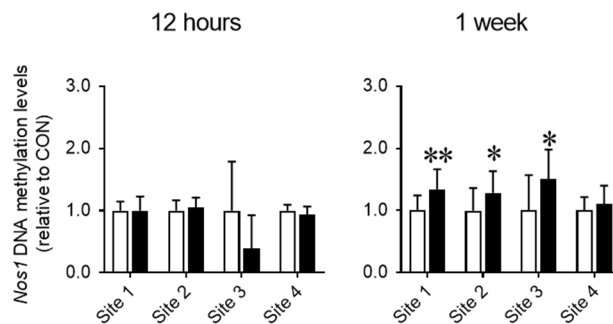


Fig. 1. *Nos1* DNA methylation levels in Sol muscle after 12 hours and 1 week cast immobilization. White and black bars indicate control (CON) and immobilized group, respectively. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ . All data are the mean  $\pm$  SD.

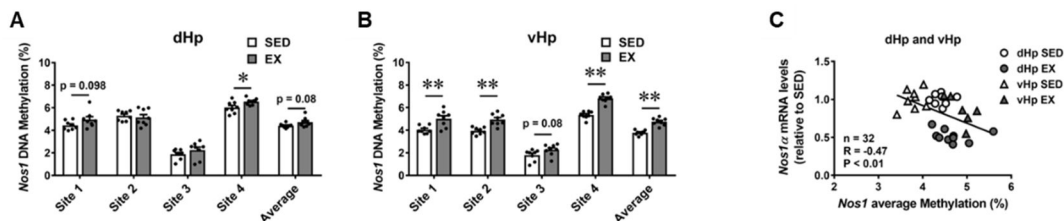


Fig. 2. *Nos1* DNA methylation levels in dorsal (dHp, A) and ventral hippocampus (vHp, B). The *Nos1* mRNA levels are correlated with DNA methylation levels (C). \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ . The dot plot represents individual data points. Lines in the scatter plots show significant correlations (Pearson's product-moment correlations test). All data are the mean  $\pm$  SE.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 4件）

1. 著者名 Tomiga Y, Sakai K, Ra SG, Kusano M, Ito A, Uehara Y, Takahashi H, Kawanaka K, Soejima H, Higaki Y	4. 巻 35
2. 論文標題 Short term running exercise alters DNA methylation patterns in neuronal nitric oxide synthase and brain derived neurotrophic factor genes in the mouse hippocampus and reduces anxiety like behaviors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100630R	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 Kotoku K, Michishita R, Matsuda T, Kawakami S, Morito N, Uehara Y, Higaki Y	4. 巻 18
2. 論文標題 The Association between Decreased Kidney Function and FIB-4 Index Value, as Indirect Liver Fibrosis Indicator, in Middle-Aged and Older Subjects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 6980 ~ 6980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18136980	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 Tomiga Y, Yoshimura S, Ra SG, Takahashi Y, Goto R, Kugimoto I, Uehara Y, Kawanaka K, Higaki Y	4. 巻 69(5)
2. 論文標題 Anxiety-like behaviors and hippocampal nNOS in response to diet-induced obesity combined with exercise	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 711-722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-019-00686-5	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 Tomiga Y, Ito A, Sudo M, Ando S, Eshima H, Sakai K, Nakashima S, Uehara Y, Tanaka H, Soejima H, Higaki Y	4. 巻 597
2. 論文標題 One week, but not 12 hours, of cast immobilization alters promotor DNA methylation patterns in the nNOS gene in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 5145 ~ 5159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP277019	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 檜垣靖樹	4. 巻 72
2. 論文標題 エビジェネティクス概論ー身体活動とエピゲノム変化の意義ー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 体育の科学	6. 最初と最後の頁 805-811
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 無
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 富賀裕貴、檜垣靖樹	4. 巻 72
2. 論文標題 運動による抗不安効果を担う海馬のDNAメチル化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 体育の科学	6. 最初と最後の頁 830-836
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 無
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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 草野雅貴，坂井一哉，富賀裕貴，北嶋康雄，伊藤愛，川中健太郎，中島志穂子，上原吉就，檜垣靖樹
2. 発表標題 骨格筋幹細胞の分化段階における神経型一酸化窒素合成酵素発現パターンの検討
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安野 哲彦、神徳 和子、川上 翔太郎、藤見 幹太、升谷 耕介、檜垣 靖樹
2. 発表標題 慢性腎臓病患者における運動強度と腎血流
3. 学会等名 第12回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 檜垣靖樹
2. 発表標題 運動療法指導の基礎と応用 - スロージョギング -
3. 学会等名 第56回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富賀裕貴，坂井一哉，羅成圭，草野雅貴，伊藤愛，上原吉就，高橋宏和，川中健太郎，檜垣靖樹
2. 発表標題 短期間運動による不安様行動の減少と海馬神経型一酸化窒素合成酵素のDNAメチル化パターンの変化
3. 学会等名 第28回西日本肥満研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富賀裕貴，坂井一哉，伊藤愛，羅成圭，上原吉就，川中健太郎，檜垣靖樹
2. 発表標題 短期間の走運動は海馬BDNFのDNAメチル化レベルを低下させる
3. 学会等名 日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富賀 裕貴， 坂井 一哉， 中島 志穂子， 上原吉就， 川中健太郎， 檜垣 靖樹
2. 発表標題 運動やイノシン酸が海馬の神経型一酸化窒素合成酵素発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本体力医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井 一哉, 富賀 裕貴, 中島 志穂子, 檜垣 靖樹
2. 発表標題 運動やイノシン酸がマウスの大脳および小脳における神経型一酸化窒素合成酵素発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本体力医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	道下 竜馬  (Michishita Ryoma)  (10632028)	福岡大学・スポーツ科学部・准教授   (37111)	
研究分担者	富賀 裕貴  (Tomiga Yuki)  (50826394)	佐賀大学・医学部・助教   (17201)	
研究分担者	上原 吉就  (Uehara Yoshinari)  (70373149)	福岡大学・スポーツ科学部・教授   (37111)	
研究分担者	安野 哲彦  (Yasuno Tetsuhiko)  (80551994)	福岡大学・医学部・准教授   (37111)	

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