

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11506

研究課題名（和文）習慣的な身体運動による脳の保護作用の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of protective effects of physical activity for brain functions

研究代表者

新井 秀明（Arai, Hideaki）

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：60313160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：身体運動は加齢に伴う様々な脳の疾患を予防することが知られている。脳の血管では血管内皮細胞同士が強く結合して血液脳関門（BBB）を形成する。加齢や脳の疾患に伴ってこのBBBのバリア機能が低下することが知られており、身体運動が脳の疾患を予防に効果があるメカニズムのひとつはBBBのバリア機能の維持である可能性がある。骨格筋からはホルモン様の作用を持つマイオカインと総称される物質が分泌され、その内のひとつの受容体はBBBに発現している。本研究ではマウスを用いてこの受容体を活性化したところ、BBBの機能を阻害する分子が減少することが明らかとなった。現在この分子のターゲット分子の挙動を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた日本において高齢期の健康を維持することは喫緊の課題である。認知症などの脳の疾患は、高齢期のQOLを著しく低下させ、介護医療費を押し上げるため社会経済的にも極めて大きな問題である。生活習慣を改善することで加齢にともなう脳機能の低下を予防できれば、社会に与える影響が大きく、また、関連する産業は潜在的に非常に大きな価値を生み出すといえる。本研究で得られた知見は、身体活動を増やすことで得られる脳機能の保護作用の分子メカニズムのひとつが明らかになる端緒となる知見であるといえる。この研究の進展により、身体活動による脳機能の維持をより効果的に行うための生活習慣を開発することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Physical activity shows protective effects to prevent age-related diseases or cognitive decline of the brain. In the vascular system of the brain, brain endothelial cells form tight junctions sealing blood vessels, generally known as blood-brain barrier (BBB). The barrier functions of the BBB decreases with advanced age and/or brain diseases especially in neurodegenerative diseases. The beneficial effects of physical activity on brain health might be related to the maintenance of the barrier functions of the BBB.

Skeletal muscles secrete hormone-like substances collectively known as myokines. We activated one of the receptors of myokines in mice and found that activation of this receptor resulted in decrease of a molecule which is known to downregulate BBB barrier function. We are currently investigating the changes of target pathway of this molecule using cultured endothelial cells, especially related to inflammation and regulated cell death, both of which likely disrupt BBB.

研究分野：健康科学

キーワード：血液脳関門 加齢 老化 身体活動 骨格筋 マイオカイン 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

身体活動を習慣的に行うことは加齢にともなうさまざまな脳の病気を予防する効果を持つ。この効果はヒトを対象とした疫学的研究から指示されているだけでなく、疾患モデルマウスを用いた実験的な研究からも証明されつつあり、この効果を仲介する分子群が急速に同定されつつある。ここで注目すべきなのは、身体活動によって予防できる脳の病気は多様でその原因となる遺伝子変異などはそれぞれの病気で異なる点である。身体活動はどちらかといえば個別の病気の原因となる部分に限定的に影響してその病気を防ぐというよりは、さまざまな病気で共通して起こってくる何らかの脳の変化を改善する可能性が高いといえる。

加齢にともなう増えてくる脳の病気を考える上で、「脳の血管の老化」という現象が非常に重要である。脳の血管は末梢の血管とは異なり血液の成分が神経細胞に直接接触することができないメカニズムが存在している。これは血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) と呼ばれている。BBB は血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトから構成され、血液に直接接触する血管内皮細胞が細胞同士で強固に結合しタイトジャンクション (TJ) という構造をつくっている。BBB は TJ を代表としたバリア構造によって血液成分と脳実質を分けるバリア機能を持つ。加齢にともなう増えてくるさまざまな病気や機能の低下と並行して BBB のバリア機能が低下することが分かってきており (Nation *et al. Nat. Med.* 2019, Montagne *et al. Neuron* 2015)、BBB のバリア機能の低下が脳の血管の老化の実体である。

BBB の形成と機能の維持にはさまざまな因子が関与するが、とりわけ脳毛細血管内皮細胞のグルコース輸送体 1 (Glucose transporter 1: GLUT1) が極めて重要な働きを持つことが知られている (Winkler *et al. Nat. Neurosci.* 2015)。

身体活動は骨格筋の活動をともなうが、骨格筋からはホルモン様の物質が分泌されマイオカインと総称される。マイオカインは身体活動の健康増進効果を仲介する分子であり、その受容体とともに創薬のターゲットとなっている。研究代表者らは、さまざまなマイオカインの中に BBB のバリア機能を維持する効果を持つものがあり、その作用によって加齢にともなう増える脳の病気全般に対して保護的な影響をもたらすのではないかと、という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

マイオカインのひとつである物質 M は特定の受容体 R を活性化するが、この受容体 R は BBB の血管内皮細胞に発現が認められるという報告がある。R のアゴニストである物質 A をマウスに投与し、脳の海馬・小脳・大脳皮質における GLUT1 とその制御因子の挙動を検討した。

## 3. 研究の方法

オス C57BL/6Jc1 マウス (7 週齢) をもちいて、エサに物質 A を混ぜることにより摂取させた。コントロール群、物質 A 摂取群、いずれも  $n = 8$  とした。コントロール群には MF (飼育用) 粉末飼料 (オリエンタル酵母) を与え、物質 A 摂取群には MF (飼育用) 粉末飼料に 100 g あたり 30 mg の物質 A を混ぜた飼料を与えた。4 週間後に頸椎脱臼により sacrifice し、海馬、小脳、大脳皮質を摘出した。タンパク質解析用サンプルは液体窒素で凍結し解析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。RNA 解析用サンプルは RNAlater (Invitrogen) に浸し 4 日 overnight で保存した後、解析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

タンパク質解析は、サンプルを RIPA バッファーでバイオマッシャー (ニッピ) により機械的にホモジナイズし、15,000 rpm、10 分の遠心をおこない上清をウエスタンブロットで解析した。得られたバンドの定量は ImageJ を用いて行った。RNA は PureLink RNA mini kit を用いて生成した。qPCR については、TaqMan アッセイにより 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。

## 4. 研究成果

GLUT1 は *Slc2a1* 遺伝子にコードされ、さまざまな因子によりタンパク質、mRNA のレベルで制御される。本研究では GLUT1 の機能と発現を調節する因子である X に注目した。X は GLUT1 の機能を阻害し、また *Slc2a1* 遺伝子の発現を抑制することが分かっている。受容体 R のアゴニストである物質 A を 4 週間摂取させた際の海馬、小脳、大脳皮質での *Slc2a1* および X の mRNA の変化を図 1 に示す。

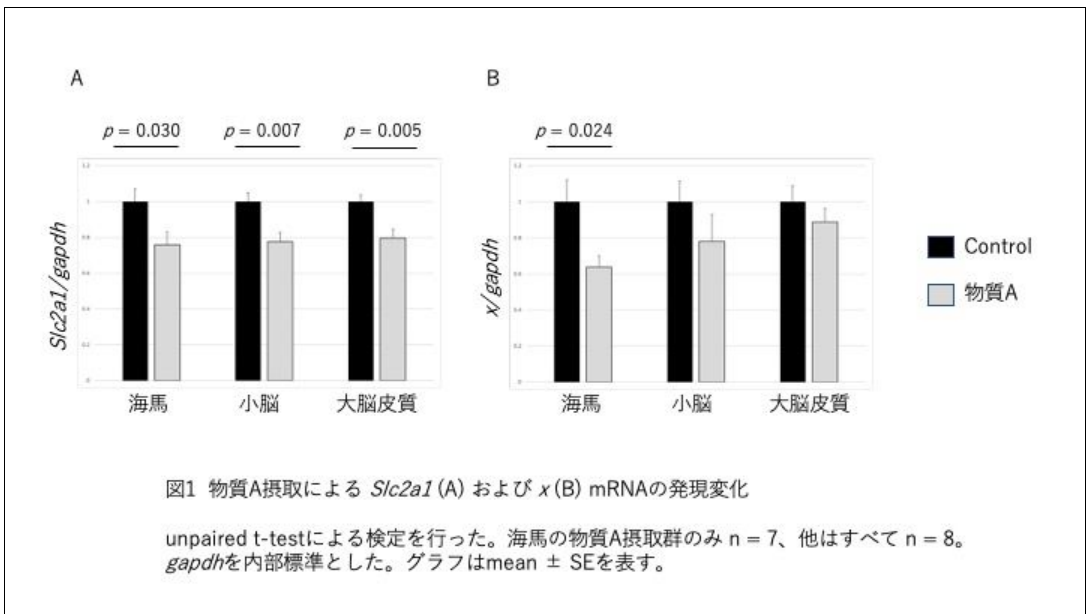


図1 物質A摂取による *Slc2a1* (A) および *x* (B) mRNAの発現変化

unpaired t-testによる検定を行った。海馬の物質A摂取群のみ n = 7、他はすべて n = 8。  
*gapdh*を内部標準とした。グラフはmean ± SEを表す。

物質 A 摂取により、海馬、小脳、大脳皮質の 3 つの領域の全てで *Slc2a1* 遺伝子の発現が有意に減少した (A)。一方で、物質 A 摂取により小脳、大脳皮質の領域では有意な変化ではなかったが *x* 遺伝子の発現が減少する傾向が見られた。物質 A 摂取により海馬領域では *x* 遺伝子の発現が有意に減少した (B)。

物質 A 摂取により海馬での *x* 遺伝子の発現が有意に減少したため、X タンパク質の発現の変化をウエスタンブロットにより解析した (図 2)。

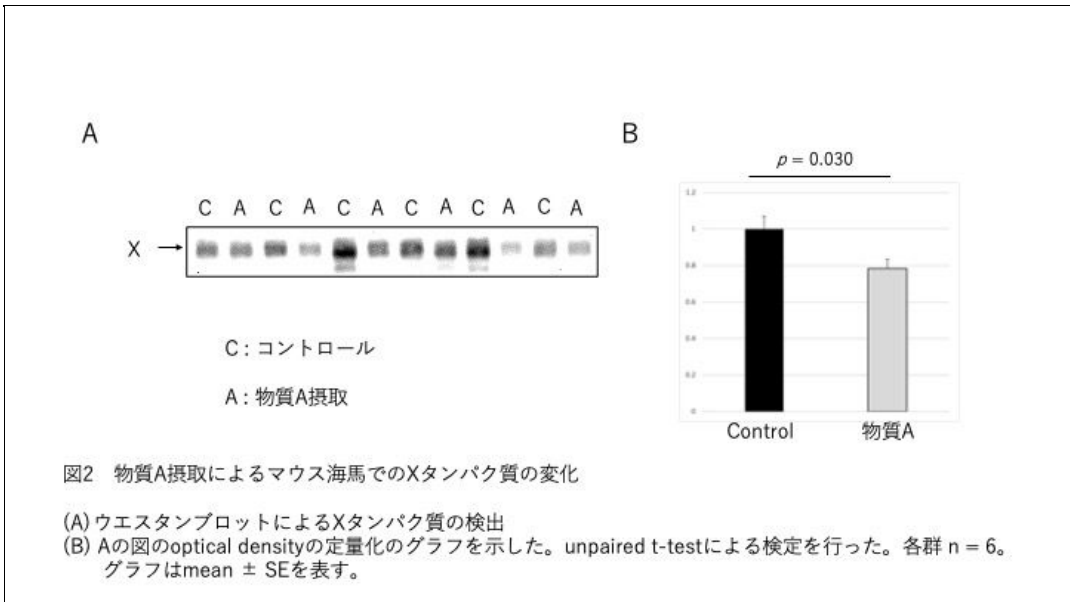


図2 物質A摂取によるマウス海馬でのXタンパク質の変化

(A) ウエスタンブロットによるXタンパク質の検出

(B) Aの図のoptical densityの定量化のグラフを示した。unpaired t-testによる検定を行った。各群 n = 6。  
 グラフはmean ± SEを表す。

海馬における X タンパク質の発現は個体差が大きいものの (A)、物質 A 摂取により X タンパク質の発現量は有意に減少した。

以上のように、物質 A 摂取により脳の海馬領域で X がタンパク質レベルでも mRNA のレベルでも減少するという結果が得られた。X タンパク質が減少しても物質 A 摂取により海馬領域でも *Slc2a1* 遺伝子が減少したことから、物質 A 摂取は *Slc2a1* 遺伝子の mRNA の抑制よりも GLUT1 タンパク質の機能を阻害することが予想できたが、GLUT1 のウエスタンブロットからはそのタンパク質量の変化に明確な変化は観察されなかった。これに関してはウエスタンブロットの検出効率をあげることで結果を確定させる必要があり現在検討中である。

以上の研究と並行して、物質 A が BBB に与える影響について in vitro の実験系を用いて評価

する実験系の構築を模索した。In vitro の BBB の評価の実験系として経内皮電気抵抗 (Transendothelial Electrical Resistance: TEER) が広く用いられている。BBB のバリア機能が高ければ TEER は高い値を示す。この実験系を構築する目的で hCMEC/D3 細胞を購入した。この細胞はヒト由来の脳毛細血管内皮細胞であり BBB 研究に多用されている細胞株である。しかしながら実際にこの細胞を用いて TEER の測定を行うと、ほとんどバリア機能が検出できなかった。この分野の研究に詳しい研究者に相談したところ、この細胞株ではタイトな BBB が形成されず TEER の研究には不向きであるという指摘を受けた。現在、この実験系に関しては初代培養を用いた実験系に変更する方向で実験条件を検討しているところである。

また、X タンパク質は NLRP3 インフラマソームと呼ばれる酵素複合体を活性化し自然免疫によるサイトカインの分泌に関与することが分かっている。炎症性サイトカインは血管内皮細胞に作用して BBB の構造と機能を低下させることが知られている。物質 A はこの経路からも BBB の機能を調節していると予想できるため、研究代表者はこの方向からの解析も進めている。

<参考文献>

Nation D A *et al.* Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat. Med.*25: 270-276, 2019

Montagne A *et al.* Blood -brain breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 85: 296-302, 2015

Winkler E A *et al.* GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer 's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat. Neurosci.* 18: 521-530, 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	柳原 大  (Yanagihara Dai)  (90252725)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授    (12601)	

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