

## 不活動が脳に与える影響の基礎的検討 —脳由来神経栄養因子 BDNF に着目して—

相原正博 (PT)<sup>1)</sup>, 萩原宏毅 (MD)<sup>1)2)3)</sup>

<sup>1)</sup> 帝京科学大学医療科学部理学療法学科

<sup>2)</sup> 帝京大学脳神経内科

<sup>3)</sup> 帝京科学大学大学院理工学研究科バイオサイエンス  
専攻医療科学分野

キーワード：脳由来神経栄養因子 BDNF, 廃用性筋萎縮, 再荷重

### はじめに

本邦は高齢化率、高齢化速度とも世界一であり、不活動となる高齢者は増加する一途である。運動療法は、骨格筋の肥大、筋持久力の改善などを目的に実施するが、脳機能も改善させる効果があることは多くの報告がある。しかし、運動による脳機能への効果を忠実に反映するバイオマーカーは未だ確立されておらず、客観的指標に乏しい中で運動介入が行われているのが実情である。脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: 以下、BDNF) は神経栄養因子のひとつで、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の作用が知られている<sup>1)</sup>。この BDNF は、大脳、海馬のみならず骨格筋からも分泌される。疾患との関連では、認知症やうつ病患者における血中 BDNF 量が健常者と比較して低いことが報告されている。これらの知見により、BDNF が脳機能に重要な役割を果たしていることが考えられる。最近になって、実験動物やヒトにおいて、運動により BDNF が増加することが報告されている<sup>2)3)</sup>。たとえば、ラットにおいて車輪付きケージを用いた自発的運動負荷後、BDNF 量が自発的運動負荷と正の相関を示し、運動負荷によって BDNF 量が増加することが報告されている。また、ヒトにおいて、有酸素運動後 BDNF レベルが改善したことや、神経筋疾患患者に対して運動トレーニングを実施すると、BDNF が活性化し身体的能力が改善した報告がある。一方で、不活動の病態における BDNF の動態や、不活動に対する運動介入による BDNF への影響はほとんど検討されていない。今回、我々は、この BDNF が不活動によって低下し、運動介入によって増加するのではないかと推測し、BDNF が運動を反映した脳機能のバイオマーカーとなるのではないかと仮説を立てた。それを検証するため、不活動状態およびそれに対して運動介入を行った際の BDNF の変動を検討することを目的とした。

### 方 法

#### 1. 不活動モデルマウスの作製と実験群

実験には 9 週齢の C57BL/6 系マウスを使用した。不活動のモデルマウス作成にはギプス固定法を用いた。実験群は、通常飼育した対照群 (以下、Co 群)、ギプス固定による不活動群 (以下、CI 群)、不活動後、通常飼育にて再荷重を 1 日間行う群 (以下、RL1 群) と 14 日間行う群 (以下、RL14 群)、運動介入を行う群 (以下、Ex 群) に分類した。ギプス固定法は、一側後肢を膝関節伸展、足関節底屈位にギプス包帯で固定し、2 週間不動化した。循環障害を防ぐため、ギプスは週 2 回取りかえた<sup>4)</sup>。RL 群は、筋萎縮誘発後にギプス包帯を除去し、通常飼育を 2 週間行うことで再荷重を行った。Ex 群は、運動介入としてトレッドミル運動を 2 週間を行った。本研究は、帝京科学大学の動物実験委員会の承認 (承認番号 18C039, 18C052) を得たうえで、実験動物取扱ガイドラインにしたがって飼育、解析、組織の採取を行った。

#### 2. トレッドミル運動のプロトコル

トレッドミル運動は、TREAT-NMD の標準作業手順書 (SOPs) (DMD\_M.2.1.003)<sup>5)</sup> にしたがって実施した。具体的には、Ex 群のマウスに対して週 2 回、(1) トレッドミル上で安静 2 分間、(2) 4 m/min でトレッドミル走行 2 分間、(3) 8 m/min でトレッドミル走行 3 分間、(4) 12 m/min でトレッドミル走行 30 分間<sup>6)</sup> のスケジュールにて、トレッドミル装置 (PanaLab, LE8709) を用いてトレッドミル運動を実施した。

#### 3. マルチプレックスサスペンションアレイ解析

Co 群、CI 群、RL 群 1 日、RL 群 14 日、Ex 群 14 日マウスから採血後に血清を調製し<sup>7)</sup>、BDNF の血中濃度をマルチプレックスサスペンションアレイ解析 (Merck Millipore, Milliplex MAP Mouse Panel) にて定量化した<sup>8)</sup>。

#### 4. マイクロアレイ解析

骨格筋中の BDNF に関連する遺伝子の発現量について、マイクロアレイ法を用いて解析した。Co, CI, RL1, RL14, Ex14 の腓腹筋を単離し、筋から RNA を抽出し、cDNA の合成とラベリング、増幅を行った。次にハイブリダイゼーションを実施し、スキャニングを行うことにより mRNA の発現量を分析した。解析として、Co の発現量に対する CI, RL1, RL14, Ex14 の発現量の比を fold change として求め<sup>9)</sup>、順に Co vs CI, Co vs RL1, Co vs RL14, Co vs Ex14 とした。

#### 5. 統計解析

統計解析は、各群間の各測定結果を Mann-Whitney U 検定を用いて、群間比較を行った。検定において有意水準 5% とした。

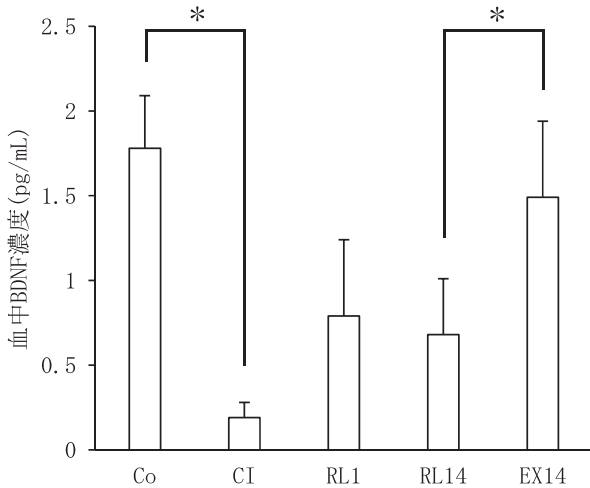


図 各群における血中 BDNF 濃度

マルチプレックスサスペンションアレイ解析で測定した BDNF 濃度 (pg/mL) を示す。CI 群 (不活動群) では、Co 群と比較して BDNF 血中濃度が有意に減少した ( $p < 0.05$ )。再荷重により血中 BDNF 濃度は増加し、運動介入 14 日後にはさらに増加した。運動介入 14 日後 (Ex14 群) の血中 BDNF 濃度は、不活動後通常飼育による再荷重 14 日後 (RL14 群) と比較して有意に高い血中 BDNF 濃度を示した ( $p < 0.05$ ) (\* :  $p < 0.05$ )

## 結 果

血中 BDNF 濃度は、ギプス固定による不活動モデルである CI 群では、Co 群と比較して有意に減少した ( $p < 0.05$ )。再荷重により血中 BDNF 濃度は増加し、運動介入 14 日後にはさらに増加した。運動介入 14 日後 (Ex14 群) の血中 BDNF 濃度は、不活動後通常飼育による再荷重 14 日後 (RL14 群) と比較して有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ) (図)。骨格筋中の BDNF の mRNA の発現量は、Co 群と比較して、CI 群で 0.73 倍、RL1 群で 0.68 倍、RL14 群で 0.39 倍、Ex 群で 0.80 倍であり、筋萎縮誘発から再荷重期間中にかけて発現量は低下した。

## 考 察

本研究課題では、ギプス固定法にて不活動のモデルマウスを作成し、BDNF の不活動状態およびそれに対して運動介入を行った際の変動を検討した。その結果、血中 BDNF 濃度は CI 群で低下した。その後の再荷重により血中 BDNF 濃度は上昇し、さらに RL14 群と Ex 群を比較すると Ex 群で有意に BDNF 濃度が高値を示した。以上の結果は、BDNF が不活動によって低下し、運動介入によって増加するのではないかという我々の仮説を支持するものといえる。また、Ex 群が RL14 群より BDNF が高値であったことは、以前より報告されている運動により BDNF が増加するという事に矛盾しないと考える。

骨格筋中 BDNF mRNA の発現は、CI 群、RL 群、Ex 群で変動を示したが、血中とは動態が異なった。すなわち、筋萎縮誘発により低下し、再荷重期間中も低下し 14 日で約 0.4 倍ともっとも低下した。最近 BDNF は、

脳から分泌される神経栄養因子としてのみならず、骨格筋から分泌されるホルモン様因子とされるマイオカインのひとつとしても注目されている<sup>10)</sup>。今回の血中と骨格筋中の BDNF の動態が異なることが示唆された結果も、脳から分泌され血中より全身に作用する BDNF と骨格筋より分泌され全身に作用する BDNF があるとすると説明可能と考える。

近年、運動と BDNF を関連づけた検討が多く報告されている。しかし、不活動の状態における BDNF の動態や、それに対する運動介入が BDNF に与える影響の検討はほとんどされていない。今回の研究により、BDNF は不活動によって減少し運動介入によって増加しており、活動量を反映している可能性が示唆された。また、血中と骨格筋で動態が異なることが明らかになった。

本研究の限界として、今回は野生型マウスの運動介入については検討していない。野生型マウスの運動後は従来報告されているようにさらに BDNF が高値を示すかを検討し、今回の結果が一貫するかの確認を行いたい。また今後の課題として、BDNF が運動の効果を反映した脳機能のバイオマーカーとなりうるか否か以下のような詳細な検討をさらに進めていきたい。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。また、今回は不活動、再荷重および運動介入の状態での、骨格筋中、血液中の BDNF 量の動態を解析したが、これに脳での検討を加えることで BDNF の多様な機能の解明を進めていきたい。さらに、今後の臨床応用への展開を念頭に、運動の種類、負荷の程度での違いが BDNF の動態に及ぼす影響の検討を進めていきたい。

## 利益相反

本研究課題に関連して、開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) Binder DK, Scharfman HE: Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 2004; 22: 123-131.
- 2) Neeper SA, Gomez-Pinilla F, *et al.*: Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res*. 1996; 726: 49-56.
- 3) Rasmussen P, Brassard P, *et al.*: Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol*. 2009; 94: 1062-1069.
- 4) Aihara M, Hirose N, *et al.*: A new model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a hook-and-loop fastener in mice. *J Phys Ther Sci*. 2017; 29: 1779-1783.
- 5) Grange RW: Use of treadmill and wheel exercise to assess dystrophic state. 2015.
- 6) Radley-Crabb H, Terrill J, *et al.*: A single 30 min treadmill exercise session is suitable for 'proof-of concept studies' in adult mdx mice: a comparison of the early consequences of two different treadmill protocols. *Neuromuscul Disord*. 2012; 22: 170-182.
- 7) Katsuta W, Aihara M, *et al.*: Changes in oxidative stress

- severity and antioxidant potential during muscle atrophy and reloading in mice. *J Phys Ther Sci*. 2018; 30: 42-46.
- 8) Djoba Siawaya JF, Roberts T, *et al.*: An evaluation of commercial fluorescent bead-based luminex cytokine assays. *PLoS One*. 2008; 3: e2535.
- 9) Hagiwara H, Saito F, *et al.*: Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances myogenesis by coordinating muscle regulatory factors and myogenic repressors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 414: 826-831.
- 10) Pedersen BK, Pedersen M, *et al.*: Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. *Exp Physiol*. 2009; 94: 1153-1160.

## 発表実績

### 学会発表 (予定)

- 1) 相原正博, 廣瀬 昇, 齊藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅: 不活動が脳由来神経栄養因子 BDNF に与える影響の検討. 日本筋学会第 5 回学術集会. 令和元年 8 月 2 日 (金) ~ 3 日 (土)
- 2) 相原正博, 廣瀬 昇, 齊藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅: 不活動および運動介入時の骨格筋と血中の脳由来神経栄養因子 BDNF の動態. 第 24 回日本基礎理学療法学会学術大会. 令和元年 11 月 30 日 (土) ~ 12 月 1 日 (日)