

# 過去の運動習慣が将来のうつ・不安を予防する メカニズムの解明

佐賀大学 富賀裕貴  
(共同研究者) 福岡大学 檜垣靖樹  
佐賀大学 高橋宏和

## Effects of Past-Exercise Training on Mood-Related Behaviors and Epigenetic Modification in Mice

by

Yuki Tomiga

*Faculty of Medicine, Saga University*

Yasuki Higaki

*Faculty of Sports and health science, Fukuoka University*

Hirokazu Takahashi

*Liver Center, Saga University Hospital*

### ABSTRACT

Regular exercise is effective treatment for the improvement of mental illness. However, the duration of exercise effects and the impact on future mood-related behaviors, such as anxiety and depression, remain unclear. Therefore, we determined the long-term impacts of regular exercise on mood behaviors after cessation of exercise. Moreover, we focused on epigenetics, which is one of the mechanisms for the regulation of gene expression independent of DNA sequences, in hippocampal BDNF as its underlying mechanisms. Anxiety-like behaviors as a mood-related behaviors were measured by Elevated Plus Maze test. After 4 weeks of exercise training, the anxiolytic effects were lasting after 2 weeks of exercise cessation. Meanwhile, after 4 weeks of

exercise cessation, anxiety-like behaviors were increased on the contrary. In contrast to our hypothesis, hippocampal *Bdnf* mRNA and DNA methylation levels were unchanged after 2 and 4 weeks of exercise cessation. These results suggest that the beneficial effects on mood-related behaviors after cessation of exercise are maintained in the short term. However, over a more extended withdrawal period, they can lead to an increase in anxiety.

キーワード

運動, 過去の運動, 海馬, エピジェネティクス, 脳由来神経栄養因子

Keyword

Exercise, past-exercise, hippocampus, epigenetics, Brain-derived neurotrophic factor

## 要 旨

定期的な運動がうつ・不安の改善に効果的であることはよく知られている。しかしながら、その効果の持続期間や、将来のうつ・不安を予防するののかについては不明な点が多い。本研究では、動物を対象に4週間の運動トレーニングを実施させ、運動停止期間後の気分行動を定量した。さらに、その海馬内分子メカニズムとして脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) のエピジェネティックな変化に着目した検討を行った。気分行動の評価は、不安様行動の計測によく用いられる高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験を用いた。高架式十字迷路試験の結果、抗不安様行動の指標の一つであるオープンアームでの移動距離は、運動トレーニング停止2週間後においても高値を示していた。一方で、運動トレーニング停止4週間後ではオープンアームでの移動距離が、コントロール群に比べ有意に減少していた。オープンフィールド試験における中心エリアへの侵入回数は、運動トレーニング停止2および4週間後において群間差は認められなかった。*Bdnf* の mRNA レベル、エピジェネティクスの一つである DNA メチル化レベルは変化していなかった。本研究結果から、運動による抗不安効

果は短期的には維持される一方で、離脱期間が長期にわたるとむしろ不安が増加することが明らかとなった。またその分子背景には、今回解析した領域における海馬 *Bdnf* のエピジェネティックな制御機構は関与していない可能性が示唆された。

## 緒 言

うつや不安は世界的な健康問題の一つであり、その予防・治療策の構築は重要な課題である。疫学調査からは、定期的な運動は、将来のうつ予防に効果的であることが示されている。逆に運動習慣がない場合、将来的なうつ発症リスクが44%増加する<sup>1)</sup>。興味深いことに、薬物療法に比べ、同期間の運動介入を受けたうつ病患者は、介入終了6か月後の時点で、うつ病の再発率が低いことが報告されている<sup>2)</sup>。すなわち運動療法には、薬物治療とは異なるうつ・不安の持続的な抑制効果が存在する可能性が示唆されている。

古くから「昔とった杵柄」という言葉があるように、過去に獲得した技能や特徴が年月を経ても衰えないことは、経験的にもよく知られている。近年のスポーツ科学分野においても“マッスルメモリー”という用語に代表されるように、運動の記憶が骨格筋に刻み込まれている可能性が明らか<sup>3)</sup>。実際にトレーニング後に得ら

れる筋力向上・筋肥大効果は、事前トレーニングを行っていない者に比べ、行っていた者の方が高い<sup>4)</sup>。このメカニズムとして、エピジェネティクスという遺伝子発現調節機構が関与している可能性が示唆されている。エピジェネティクスは「DNA塩基配列によらない遺伝子発現調節機構」と定義される。代表的なエピジェネティクスであるDNAメチル化は、遺伝子発現を抑制する制御機構であり、逆にメチル化が取り除かれると遺伝子発現が促進される。一卵性双生児を対象とした研究から、一度刻まれたこのDNAメチル化パターンは、容易には変化しないことが知られている<sup>5)</sup>。

脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) は、運動により海馬で誘導される重要な栄養因子の一つである。ヒトでは、血中BDNF DNAメチル化レベルが精神疾患のバイオマーカーとなり得ることが示唆されている<sup>6)</sup>。本研究は、運動により脳に刻まれた海馬BDNF DNAメチル化レベルの変化が、運動中断後も継続的に維持されることで、うつ・不安発症の予防に寄与しているという仮説を立てた。本研究の目的は、過去の運動経験によるうつ・不安予防効果がどの程度の期間維持されるのか、またその背景にある海馬でのエピジェネティックな分子基盤を明らかにすることを目的とした。

## 1. 研究方法

### 1. 1 実験動物及び運動トレーニング

実験動物には7週齢のC57BL/6J雄性マウスを用いた。マウスは、室温 ( $23.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ )、および湿度 ( $50.4 \pm 1.9\%$ ) が維持されている12時間の明暗サイクルに設定された佐賀大学総合分析実験センター飼育室で飼育した。標準固形資料と水は自由に摂取させた。すべての実験は、佐賀大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

運動 (EX) 群は回転ホイールが設置されたケージ内で飼育し、4週間の自発走行運動を実施させた。安静 (SED) 群は、回転ホイールの設置していない同サイズのケージ内で飼育した。運動トレーニングから4週間後に安静群と同様のケージに戻し、運動停止後2 (SED:n=7, Ex:n=8)、または4週間 (SED:n=7, Ex:n=7)、CON群と同様に通常通り飼育した (図1)。最終的に、体重は、飼育開始前および屠殺前に測定された。

### 1. 2 行動テスト

気分行動はオープンフィールド試験 (Open field test: OFT) および、高架式十字迷路試験 (Elevated plus maze: EPM) により評価した。マウスをオープンフィールド ( $40 \times 40 \times 15\text{cm}$ ) の中心エリアに投入した後、マウスを5分間自由に行動させた。EPM装置はオープンなアーム ( $30 \times 5\text{cm}$ ) と

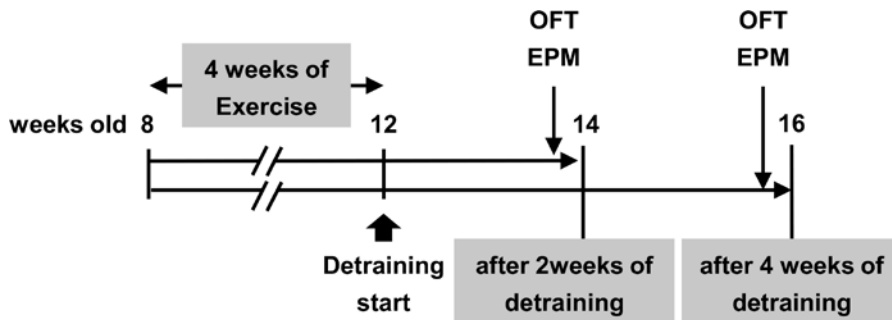


図1 実験の概要  
OFT: Open filed test, EPM: Elevated plus maze.

クローズドなアーム (30×5×15cm) から構成されており、地上から40cmの位置に設置された。マウスをオープンアーム方向に向け、センターエリアに投入した後、5分間自由に行動させた。全ての行動テストは、ビデオカメラと動物行動トラッキングシステム Smart 3.0 software (Panlab, Barcelona, Spain) により記録した。OFTにおける中心エリアへの侵入回数 (center entries), EPMにおけるオープンアーム上での移動距離割合 (percentage of open/total arm distance) ならびにマウスが静止している時間 (resting time) を定量化した。試験はOFT, EPMの順で、屠殺2日前に実施された。行動テストに対する馴化の影響を避けるため、OFT, EPMは、介入後のみ実施した。

### 1. 3 検体採取

行動テストの翌日、イソフルラン麻酔下においてマウスを安楽死させた後、海馬組織を採取し、RNA安定化剤に4℃で24時間浸漬させた。RNA安定化剤を除去した後、実験に使用するまで-80℃で保存した。

### 1. 4 リアルタイムRT-PCR法

Total RNA 溶液は、FastGene RNA basic Kit (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて抽出し、濃度および純度はNanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) により評価した。Total RNAは、PrimerScript RT Master Mix (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いて逆転写し、SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) を使用し、QuantStudio 3 real-time PCR system により *Bdnf* (Forward: TGGCCCTGCGGAGGCTAAGT, Reverse: AGGGTGCTTCCGAGCCTTCCT) および *Gapdh* (Forward: AACGACCCCTTCATTGAC, Reverse: TCCACGACATACTCAGCAC) のmRNA発現量を評価した。

### 1. 5 パイロシーケンス法

ゲノムDNAは、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) を用いて抽出した。その後DNAは、EpiTect Bisulphite Kit 48 (Qiagen) によりバイサルファイト処理された。バイサルファイトDNAの増幅には、TaKaRa EpiTaq HS for bisulphite-treated DNA (Takara Bio) および *Bdnf* プライマーを使用した (Forward: TAGGATTGGAAGTGAAAATATTTATAAAGT; reverse: CCTTCAACCAAACTCCATTTAATCT)。DNAメチル化レベルは、PyroMark Q96 ID pyrosequencer を用いて定量化した (sequencing primer: AGAGGAGGTATTATATGATAG)。

### 1. 6 統計

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析には、GraphPad Prism 7を使用した。SED群とEX群の比較には対応のないt検定を使用し、有意水準は5%とした。

## 2. 結果

4週間の運動トレーニングを実施した後、運動停止から2、または4週間の体重を評価した。運動停止2、または4週間後の体重は、安静群と比較して、違いは認められなかった (図2A and B)。

運動停止2週間後において、OFTにより評価した中心エリアへの侵入回数は安静群と運動群の間に差は認められなかった (図3A)。EPMにより評価したオープンアームでの移動距離割合は、安静群と比較し、運動群で有意に増加していた (図3B)。EPM試験中の安静時間は、2群間で差は認められなかった (図3C)。一方運動停止4週間後群では、OFTにおける中心エリア侵入回数は2群間で差がなかったものの (図4A)、EPMにより評価したオープンアームでの移動距離割合は、運動群において減少していた (図4B)。運動停止2週間後と同様、EPM試験中の安静時間には、群間

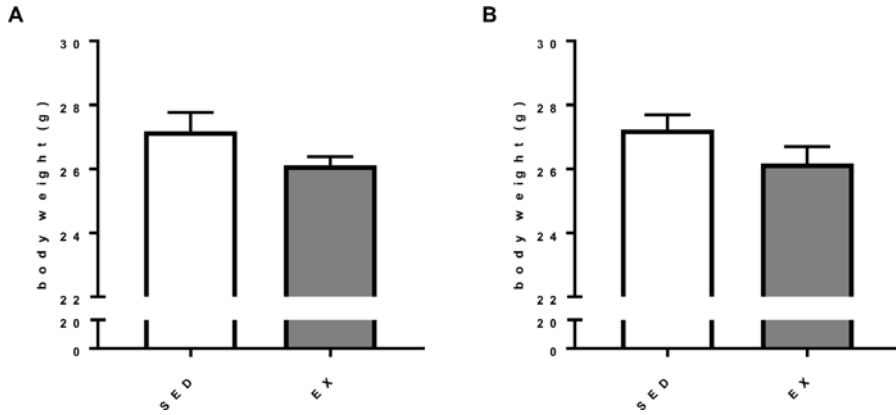


図2 運動停止2週間後(A)および4週間後(B)の体重. 平均±標準誤差.  
SED: sedentary, EX: exercise.

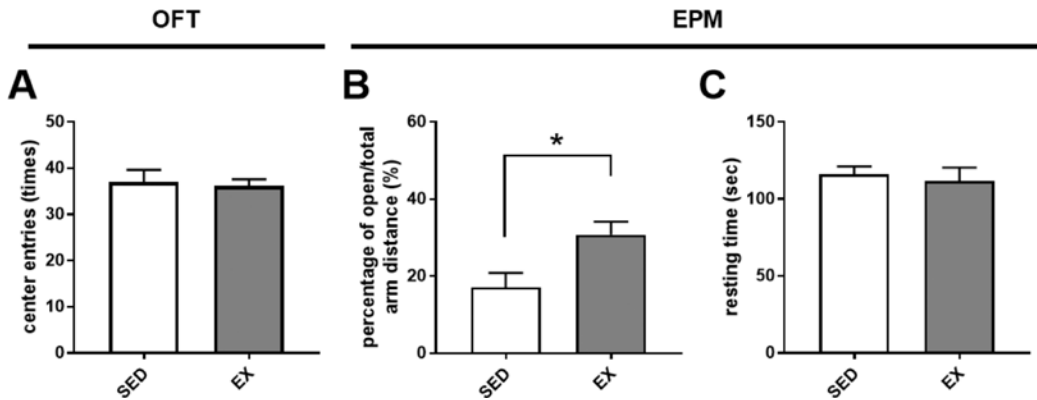


図3 2週間の運動停止が行動テストに及ぼす影響. (A) OFTによる中心エリアへの侵入回数, (B) EPMによるオープンアーム移動距離割合および (C) 安静時間. \*:P < 0.05. 平均±標準誤差  
SED: sedentary, EX: exercise. OFT: Open filed test, EPM: Elevated plus maze.

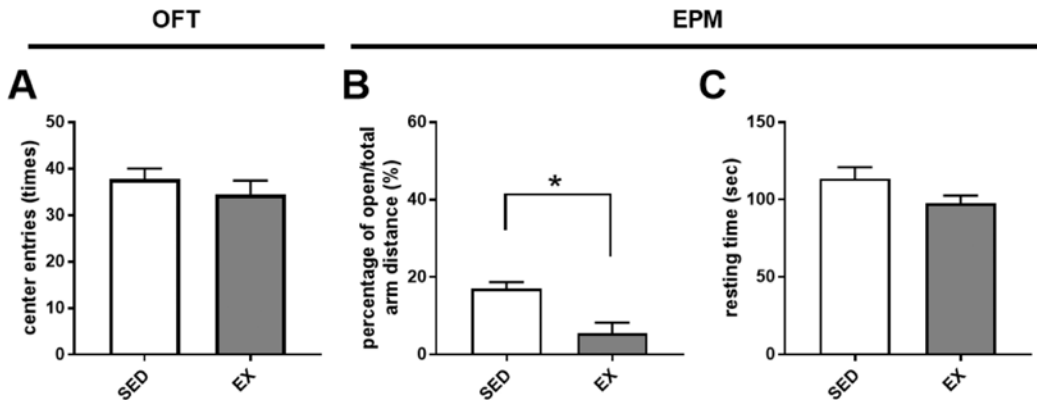


図4 4週間の運動停止が行動テストに及ぼす影響. (A) OFTによる中心エリアへの侵入回数, (B) EPMによるオープンアーム移動距離割合および (C) 安静時間. 平均±標準誤差  
SED: sedentary, EX: exercise. \*:P < 0.05. OFT: Open filed test, EPM: Elevated plus maze.

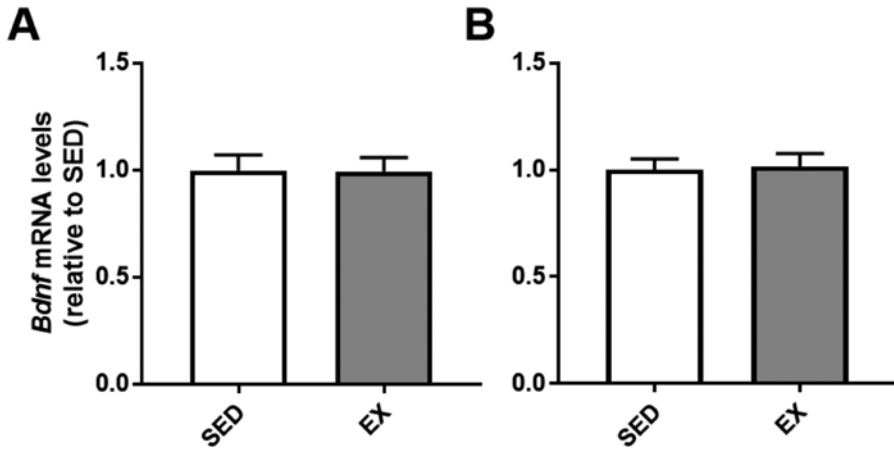


図5 運動停止2週間後 (A) および4週間後 (B) の海馬*Bdnf* mRNA発現量. 平均±標準誤差  
SED: sedentary, EX: exercise.

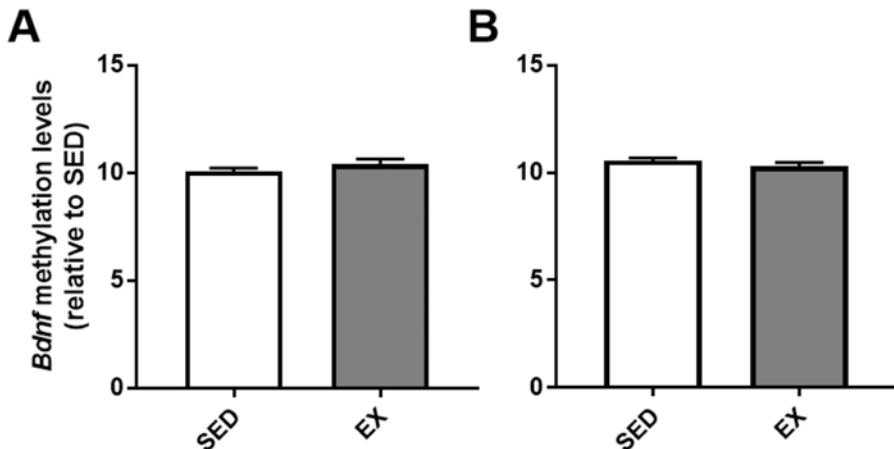


図6 運動停止2週間後 (A) および4週間後 (B) の海馬*Bdnf* DNAメチル化レベル. 平均±標準誤差  
SED: sedentary, EX: exercise.

差はなかった (図4C)。以上の行動テストの結果から、運動停止後2週間までは運動による抗不安効果が残存しているが、運動停止4週間後には逆に負のリバウンド効果をもたらすことが示唆された。

次に、海馬における *Bdnf* mRNA 発現量を評価した。その結果、運動停止2、または4週間後のどちらにおいても、運動による影響は観察されなかった (図5A and B)。神経活動依存的に活性化することが既に報告されている *Bdnf* promoter IV 領域のDNAメチル化レベルをパイロシークエンス法で評価した。遺伝子発現量の結果と同様に、

*Bdnf* promoter IV DNAメチル化レベルは、運動停止2、または4週間後のどちらにおいても、運動による影響は観察されなかった (図6A and B)。

### 3. 考 察

本研究の結果、運動停止後、短期的には運動の抗不安効果が維持され、一定期間が経過すると逆に負のリバウンド効果をもたらすことが明らかになった。このような現象の背景において、海馬内 *Bdnf* 遺伝子発現制御機構は、関与していない可能性が示唆された。

我々の先行研究も含め、動物を用いた回転ホ

イール運動では、体重減少効果が得られることが既に示されている<sup>7)</sup>。本研究の結果、運動停止2週間後の段階で、このような体重減少効果は認められなかった。そのため、本研究で明らかとなった、不安様行動に対する運動停止2週間後のポジティブな、運動停止4週間後のネガティブな効果は、少なくとも運動による体重の変動に依存していない可能性が示唆された。

本研究から、運動停止2週間後では抗不安効果が認められた一方で、運動停止4週間後では、逆に不安様行動が惹起されている可能性が示唆された。先行研究では、マウスにおいて8週間の運動トレーニング後、8週間の運動停止期間を設けた場合、EPMにより評価した不安様行動が増加すること、さらに海馬神経新生が部分的に障害されることを示している<sup>8,9)</sup>。本研究では、4週間の運動に対し、2および4週間の停止期間を設けた。したがって、運動及び停止期間の比は、2.0および1.0となる。本研究の結果より運動及び停止期間の比が2.0である場合は、運動による抗不安効果が維持されていた(図2B)。一方で本研究あるいは先行研究の結果から、運動及び停止期間の比が1.0である場合には、不安様行動の増加や、神経新生の低下が示されている<sup>8,9)</sup>。以上の結果から、少なくとも事前の運動トレーニング期間と同程度、あるいはそれを超える非運動期間が経過した場合、運動による気分行動への効果は負の方向に制御される可能性が示された。しかしながらヒトにおいては、運動療法によるうつ病の再発率は、薬物療法や薬物と運動の複合療法に比べて低いことが報告されている<sup>2)</sup>。また、過去の運動経験は、骨格筋においてはエピジェネティックに記憶されていることが知られており<sup>3)</sup>、筋力向上や筋肥大といった効果は、事前トレーニングを行っていない者に比べ、行っていた者の方が高い<sup>4)</sup>。そのため、再トレーニング後にはより短期間の運動で抗うつ・不安効果が得られる可能性があるが、この

点についてはさらなる研究が必要である。

運動停止2週間後の抗不安効果の維持において、海馬*Bdnf*遺伝子とその発現制御の関与を検討した。その結果、*Bdnf* mRNAレベルは、運動停止2および4週間後のどちらにおいても群間での差は認められなかった。海馬での*Bdnf*遺伝子発現の増加は、運動による脳機能の維持・増進に重要であることは既によく知られている<sup>10)</sup>。*Bdnf*はいくつかのスプライシングバリエントがあり、神経活動依存的にはpromotor IおよびIVから転写されるバリエントが報告されている。運動による海馬での*Bdnf*スプライシングバリエント発現には違いがあり、4週間の運動では*Bdnf* promotor Iのみ10、11日間の比較的短期間の運動では*Bdnf* promotor IおよびIVの両方が誘導されることが報告されている<sup>7)</sup>。本研究では、共通のcoding領域の*Bdnf*遺伝子発現レベルを定量していることから、運動停止後の海馬*Bdnf*発現は、スプライシングバリエントごとに異なる可能性がある。

*Bdnf*遺伝子発現の結果と一致して、運動停止後の*Bdnf* DNAメチル化レベルは非運動群と同等であった。本研究で解析した*Bdnf* promotor IVのCpG領域は、ヒトとマウスでの相同性が96%であることに加え、その血中BDNF DNAメチル化レベルが精神疾患のバイオマーカーとなり得ることが示唆されている<sup>6)</sup>。また我々は以前、本解析領域の*Bdnf* DNAメチル化レベルは、11日間の運動により海馬で低下することを報告した<sup>7)</sup>。そのため、少なくとも4週間の運動を実施した後、2週間の運動停止期間をおいた時点で、運動11日後に観察される海馬*Bdnf*低メチル化パターンは消去されていると考えられる。したがって、運動停止2週間後に維持されていた抗不安効果は、*Bdnf* coding領域の遺伝子発現、およびpromotor IV領域のDNAメチル化は関与していない可能性が示唆された。*Bdnf*にはいくつかのスプライシングバリエントや、promotor上には複数のCpG領

域が存在することから、異なるスプライシングバリエーションおよびCpG領域が関与しているかどうかはさらなる研究が必要である。また、DNA修飾だけでなく、アセチル化をはじめとするヒストン修飾も、重要なエピジェネティック修飾の一つである。最近の先行研究では、*Bdnf* promoter IやIVの誘導の一部に、ヒストンH3のアセチル化や、H3K4メチル化が関与していることが明らかにされた<sup>11)</sup>。そのため、運動および運動停止後に海馬に刻まれる運動効果の背景には、DNA修飾ではなくヒストン修飾が関与している可能性がある。

#### 4. 結 論

本研究の結果、4週間の定期的な運動による抗不安効果は、運動停止2週間後まで維持され、運動停止4週間後には逆に不安様行動を誘発することが明らかとなった。その海馬内での分子的な背景には、*Bdnf*とそのエピジェネティックな制御機構は関与していない可能性が示唆された。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり研究助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また実験の遂行にあたり多大なご協力いただきました佐賀大学医学部肝臓・糖尿病・内分泌内科 技術補佐員 高野阿希子氏に深く感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Harvey S. B. et al., Exercise and the prevention of depression: results of the HUNT Cohort Study., *American Journal of Psychiatry*, **175**, 28–36 (2018)
- 2) Babyak M. et al., Exercise treatment for major depression: maintenance of therapeutic benefit at 10 months., *Psychosomatic Medicine*, **62**, 633–638 (2000)
- 3) Sharples A. P., Stewart C. E., Seaborne R. A., Does skeletal muscle have an ‘epi’ -memory? The role of epigenetics in nutritional programming, metabolic disease, aging and exercise., *Aging Cell*, **15**, 603–616 (2016)
- 4) Staron R. S. et al., Strength and skeletal muscle adaptations in heavy-resistance-trained women after detraining and retraining., *Journal of Applied Physiology*, **70**, 631–640 (1991)
- 5) Fraga M. F. et al., Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 10604–10609 (2005)
- 6) Kundakovic M. et al., DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 6807–6813 (2015)
- 7) Tomiga Y. et al., 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., *The FASEB Journal*, **35**, e21767 (2021)
- 8) Nishijima T. et al., Cessation of voluntary wheel running increases anxiety-like behavior and impairs adult hippocampal neurogenesis in mice., *Behavioural Brain Research*, **245**, 34–41 (2013)
- 9) Nishijima T., Kamidozono Y., Ishiizumi A., Amemiya S., Kita I., Negative rebound in hippocampal neurogenesis following exercise cessation., *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **312**, R347–R357 (2017)
- 10) Cotman C. W., Berchtold N. C., Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity., *Trends in Neurosciences*, **25**, 295–301 (2002)
- 11) Li C. et al., Leptin regulates exon-specific transcription of the *Bdnf* gene via epigenetic modifications mediated by an AKT/p300 HAT cascade., *Molecular Psychiatry*, **26**, 3701–3722 (2021)