

若年期の運動不足が成年期以降の 認知機能低下をもたらすエピジェネティック機構の解明

筑波大学 土橋 祥平
(共同研究者) 同 松井 崇
順天堂大学 吉原 利典

The Epigenetic Mechanisms of Physical Inactivity During Young Periods on Cognitive Dysfunction in Adulthood

by

Shohei Dobashi, Takashi Matsui
*Institute of Health and Sport Sciences,
University of Tsukuba*
Toshinori Yoshihara
*Graduate School of Health and Sports Science,
Juntendo University*

ABSTRACT

Regular physical activity in early life is linked to lifelong cognitive health, whereas the effects of early-life physical inactivity on future cognitive function remain unknown. In this study, we examined the hypothesis that physical inactivity during childhood affects DNA methylation in the hippocampus, which is retained over time and leads to cognitive decline in adulthood. Four-week-old male Wistar rats were divided into two groups: a control group (CON) and a physical inactivity group (IN). Rats in the IN group were housed in narrow cages with approximately half of the usual floor space to restrict their movement for 8 weeks until 12 weeks of age. After this period, all the rats were housed in standard-sized cages until 20 weeks of

age. The object location task (OLT) was used to assess cognitive function at 19 weeks old. The dorsal hippocampus was collected immediately after the activity restriction intervention (12 weeks old) and 8 weeks after the intervention ended (20 weeks old) for analysis of genome-wide DNA methylation levels (RRBS), RNA-seq, and protein expression levels. The IN group's physical activity decreased to about one-quarter that of the CON group between 4-12 weeks of age. In contrast, there were no significant differences in body weight or food intake throughout the experimental period. The IN group showed poor OLT performance and an increased expression of myelination-related genes and proteins in the hippocampus. However, the expression of these genes was not associated with the changes in DNA methylation induced by early-life physical inactivity. Instead, they are linked to DNA hypomethylation observed only in adulthood. These findings demonstrate that physical inactivity during the young period leads to cognitive decline in adulthood. This may be due to the dysregulation of myelination-related gene expression associated with DNA hypomethylation, a delayed consequence of physical inactivity in childhood.

キーワード

運動不足, 海馬, DNA メチル化, RNA-seq, 認知機能

Keyword

physical inactivity, hippocampus, DNA methylation, RNA-seq, cognitive function

要 旨

本研究の目的は、若年期の運動不足が海馬におけるDNAメチル化状態に変化を及ぼし、成年期の認知機能低下を招くかどうかを検証することであった。ラットを4週齢時に、通常飼育(CON)群と床面積が通常の半分程度の狭いケージで飼育することで活動制限を行う(IN)群に分け、12週齢まで飼育した。12週齢以降は活動制限を解除し、20週齢に至るまで両群通常サイズのケージで飼育を行い、物体位置認識試験を実施した。IN群での物体位置認識試験の成績不良とともに、海馬においてミエリン化に関わる遺伝子とタンパク質の発現が増大した。一方、これらの遺伝子発現は、若年期の運動不足によって誘発されたDNAメチ

ル化が成年期まで保持されたものではなく、成年期にのみ観察されるDNA低メチル化と関連していた。若年期の運動不足は遅発的なDNAの低メチル化とそれに連動したミエリン化関連遺伝子の発現調節障害とともに将来の認知機能低下を招く可能性が示唆された。

緒 言

認知症の患者数は世界中で増加の一途を辿っており、早急に解決すべき健康課題の一つである。認知症の発症メカニズムは未だ十分に解明されていないものの、運動不足がその大きな危険因子として指摘されている¹⁾。マウスを対象に、活動可能範囲を制限した狭小ケージ内で長期間飼育すると、海馬において神経新生に関わる脳由来神経栄

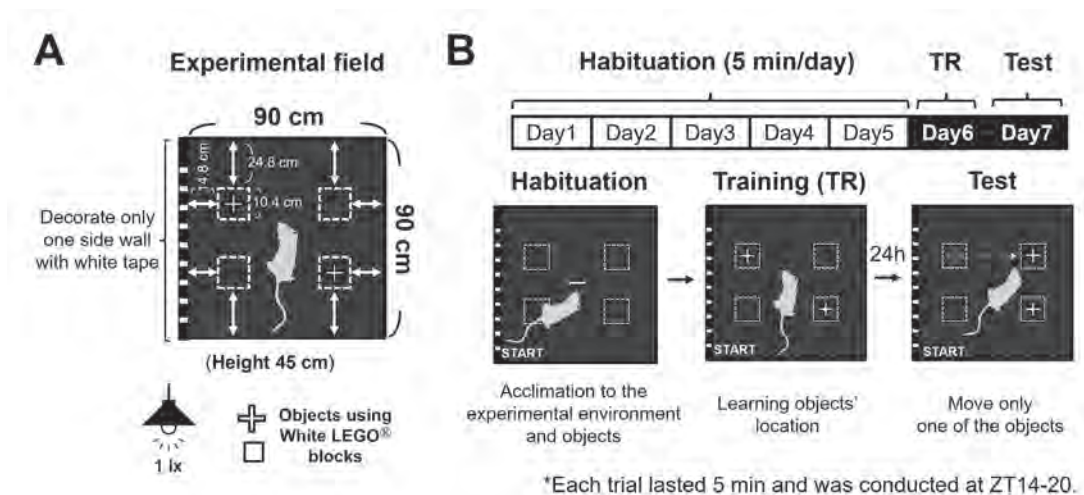


図2 物体位置認識試験の概要. 試験環境(A) および試験スケジュール(B)
ZT: zeitgeber time

1. 2 認知機能評価

空間記憶機能を司る行動試験として, 物体位置認識試験 (object location task: OLT) を用いた. (図2)⁵⁾ 本研究では, 黒色のプラスチック段ボールでオープンフィールド (長さ90 cm × 幅90 cm × 高さ45 cm) を自作した (図2A). 試験に先駆け, オブジェクト (長さ12.8 cm × 幅1.6 cm × 高さ2.2 cm) の白いレゴ®ブロック) をフィールド中央に固定し, 照明を1ルクス未満にした環境下でラットを1日当たり5分間, 5日間連続で行い試験環境への環境馴化を図った (図2B). その後, 環境馴化の際に用いたオブジェクトと同様の白いレゴ®ブロックで構成された十字型の立体オブジェクト (長さ6.5 cm × 幅6.5 cm × 高さ16 cm) を2個作成し, フィールド上の対角上にそれぞれ設置した上で, ラットをフィールド内で5分間自由に行動させた (トレーニング試行). その24時間後に, 片方のオブジェクトの位置を移動させ, 同様にラットをフィールド内に5分間自由に行動させた (テスト試行). OLTは18週齢後半から環境馴化を開始し, 19週齢時後半にテスト試行を実施した.

探索行動中の様子はビデオカメラにより記録した. 先行研究の方法に則り, 動画をコンピュータ上で視認し, 各オブジェクトの末端から2 cm以内に侵入した時間 (探索時間) をコンピュータ上のストップウォッチで記録した⁶⁾. 位置を変更したオブジェクトの探索時間を2種類のオブジェクト両方の探索時間の和で除したものを物体の識別率 (Discrimination index: DI) として算出した⁵⁾. また, 先行研究の基準⁷⁾に従い, トレーニング試行時点でDIが30%未満または70%以上のラット, あるいはトレーニング試行, テスト試行のいずれかで総探索時間が3秒間を下回っていたラットは解析対象から除外した.

1. 3 検体採取

8週間の活動制限介入直後 (12週齢) および活動制限解除8週間後 (20週齢) に, ラットを12時間の食餌制限下で5% イソフルランにより麻酔をかけて安楽死させ, 海馬組織と血液を採取した. 海馬は背側部と腹側部に分類し, 液体窒素で急速凍結した. 血液はヘパリンの入った真空採血管に採取し, 冷却下で遠心分離 (3,000 rpm, 10分間)

を行い、血漿を回収した。いずれの検体もその後の分析まで-80℃で保存した。なお、海馬は背側部が主に空間記憶を司り、腹側部が主に情動を司ることが指摘されていることから、本研究の生化学分析は海馬背側部を中心に実施した。

1. 4 血漿コルチコステロン濃度

血漿中のコルチコステロン濃度は、Corticosterone EIA Kit (YK240, 矢内原研究所, 静岡, 日本) を用いて定量した。

1. 5 RNA-seq

成年期 (20 週齢) のラットから回収した海馬背側部中の Total RNA を RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) により抽出した。その後、Bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いて RNA の品質を確認し、ライブラリー作成および濃度調製を行った上で、NextSeq500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) (Illumina) を用いて、NextSeq500 システム (Illumina) での次世代シーケンス解析を行った。シーケンスは 36 基ずつのペアエンドリードで行った。シーケンス後、FASTQ ファイルをエクスポートし、CLC Genomics Workbench 21.0.3 ソフトウェア (QIAGEN) で品質確認を行った上で Transcripts per million (TPM) を取得し群間比較に用いた。各遺伝子の TPM について、対応のない t 検定を用いて群間比較し、偽発見率を調整した上で $p < 0.01$ の遺伝子を発現変動遺伝子 (DEGs) として抽出した。さらに Metascape を用いて DEGs の機能的エンリッチメント解析を行った⁸⁾。

1. 6 タンパク質発現解析

凍結された海馬サンプルに、プロテアーゼ阻害剤を含んだ RIPA バッファー (ナカライテスク, 京都, 日本) 下でホモジナイズしタンパクを抽出した。得られたタンパク質濃度は $2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ にな

るよう、4X Bolt™ LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) と 10X Sampling Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific) を用いて調整した。その後、全てのサンプルを 70℃ で 10 分間加熱し、分析まで -80℃ で保管した。調製したサンプルをアクリルアミドゲルに各レーンあたり等量のサンプル ($10\text{--}15 \mu\text{g}$) を投入した上で電気泳動を行い、セミドライ法を用いて PVDF メンブレンに転写した。転写後は、EveryBlot ブロッキングバッファー (Bio-Rad) で 20 分間室温ブロッキングを行った後、Tris-Buffered Saline with Tween[®] 20 (TBS-T) で希釈した 1 次抗体を添加し、4℃ で一晩反応させた。用いた抗体は、MBP (1:1000, Medical & Biological Laboratories, PD004), MAG (1:2000, Proteintech, 14386-1-AP), Amyloid β (1:1000, Proteintech, 25524-1-AP), BDNF (1:1000, Abcam, ab108319), NeuN (1:1000, Proteintech, 26975-1-AP), GFAP (1:1000, Proteintech, 16825-1-AP), Synaptophysin (1:1000, Proteintech, 17785-1-AP), GAPDH (1:1000, Cell Signaling Technologies, 97166) であった。反応後、2 次抗体を添加して 1 時間室温で反応させ化学発光試薬を用いて発光させ、標的タンパク質を検出した。各タンパク質発現レベルはローディングコントロールとして検出した GAPDH の発現レベルの相対量として算出し、CON 群の平均値で正規化した。

1. 7 DNA メチル化解析

若年期 (12 週齢) と成年期 (20 週齢) のラットから両方から採取した海馬背側部を対象に、Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) を用いてゲノムワイドな DNA メチル化状態の評価を行った。海馬背側部のゲノム DNA を QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。Zymo-Seq RRBS Library Kit (Zymo Research) を用いて、CpG リッチな領域を濃縮し、ライブラリーを調整した。その後、NovaSeq6000

システムでのシーケンスを行った。シーケシングで得られたデータからRパッケージである methylKit を用いてリードカウントを正規化し、ロジスティック回帰分析で群間比較を行った。その結果、群間のメチル化率の差が25 % 以上かつ調整後p値が0.01未満の領域を変動メチル化領域として抽出した。

1. 8 統計分析

RNA-seqとRRBS以外のデータは平均値±標準偏差で示した。体重と摂餌量の推移は、群と時間経過を要因とした二元配置分散分析で解析した。ケージ内活動量、血漿コルチコステロン濃度、ならびに各タンパク質発現レベルの比較には、対応

のないt検定を行った。OLTの成績変化については、対応のあるt検定を行った。有意水準は危険率5%未満とした。

2. 研究結果

活動制限期間中の活動期の身体活動量はCON群と比較してIN群は約4分の1程度まで減少したが(図3A)、活動制限解除後の身体活動量に群間の差は認められなかった(図3B)。非活動期(明期)の身体活動量は研究期間を通して群間の違いは認められなかった。また研究期間中は体重および摂餌量のいずれも群間の有意差は検出されなかった(図3C, D)。さらに活動制限介入直後(12週齢)、および介入終了8週間後(20週齢)後のい

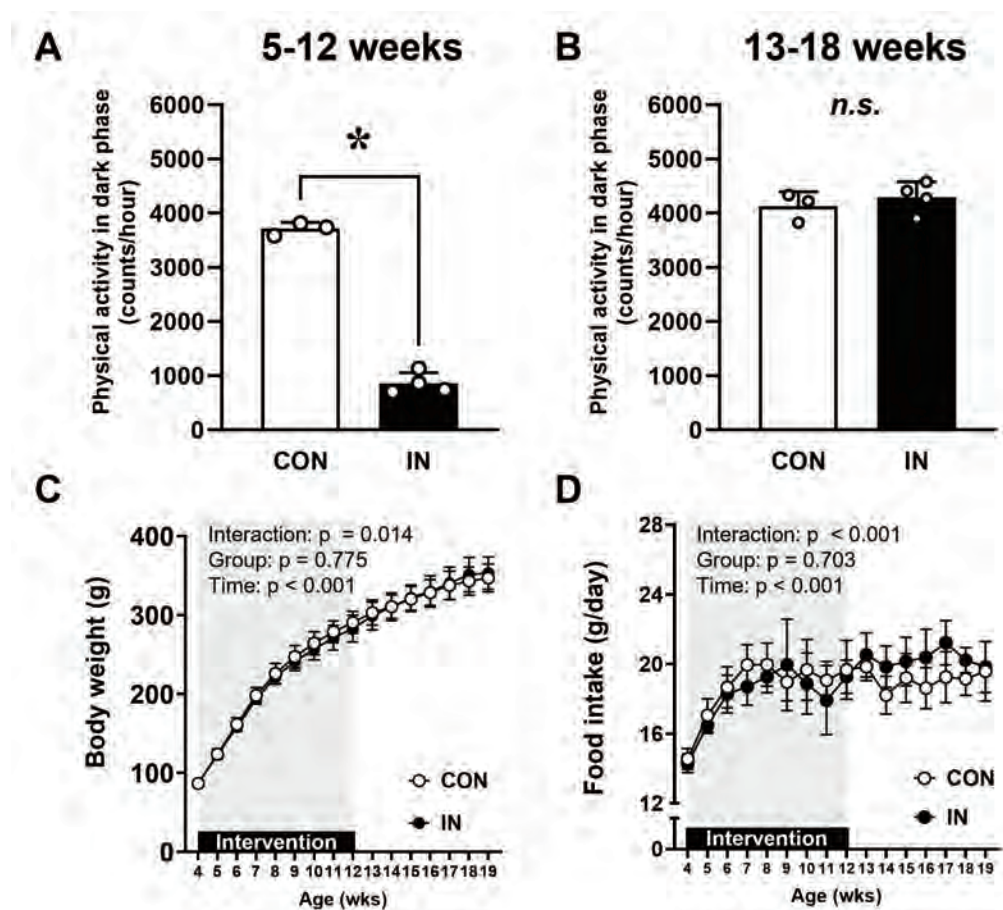


図3 活動制限中 (A) および活動制限解除後 (B) における活動期(暗期)の身体活動量および飼育期間中の体重 (C) と摂餌量 (D) の推移. 平均値±標準偏差

*p < 0.05. n.s. not significant

ずれも血漿コルチコステロン濃度について群間の有意差は観察されなかった。

活動制限介入終了7週間後の19週齢時後半に評価したOLTの識別率については、CON群では、トレーニング試行時と比較してテスト試行時に於いて有意な増大が観察された一方で、IN群では有意差は観察されなかった(図4)。

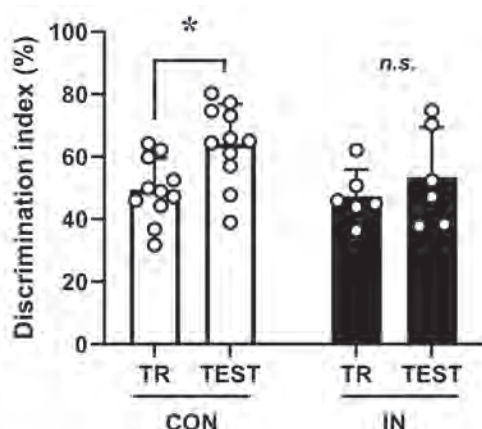


図4 物体位置認識試験の識別率
平均値±標準偏差。* $p < 0.05$ 。

次に、OLTを実施したラットから採取した海馬背側部を対象にRNA-seqを行った。その結果、

CON群と比較してIN群で95種類の遺伝子発現が有意に増大し、20種類の遺伝子発現が有意に減少していることが示された。機能的エンリッチメント解析を行った結果、「ミエリン化 (myelination)」に関わる遺伝子群が顕著に増大していることが観察された。

RNA-seqの結果をもとに海馬におけるミエリン関連タンパク質 (MBP, MAG) の発現レベルを評価したところ、どちらもCON群と比較してIN群で有意な高値を示した(図5)。またアルツハイマー型認知症の発症に関連することが知られているアミロイド β のタンパク質発現レベルも同様にIN群で有意に増大していた。一方で、認知機能に関与することが知られているBDNFや、成熟ニューロン (NeuN)、グリア線維性酸性蛋白 (GFAP)、シナプス小胞膜タンパク質 (Synaptophysin) のタンパク質発現レベルはいずれも群間の有意差は認められなかった。

本研究では、ミエリン化に関わる遺伝子発現が増大し、タンパク質発現もそれに符合していたことから、活動制限介入直後の若年期 (12週齢) と介入終了8週間後の成年初期 (20週齢) に共通して生じていたDNA低メチル化領域と成年期にお

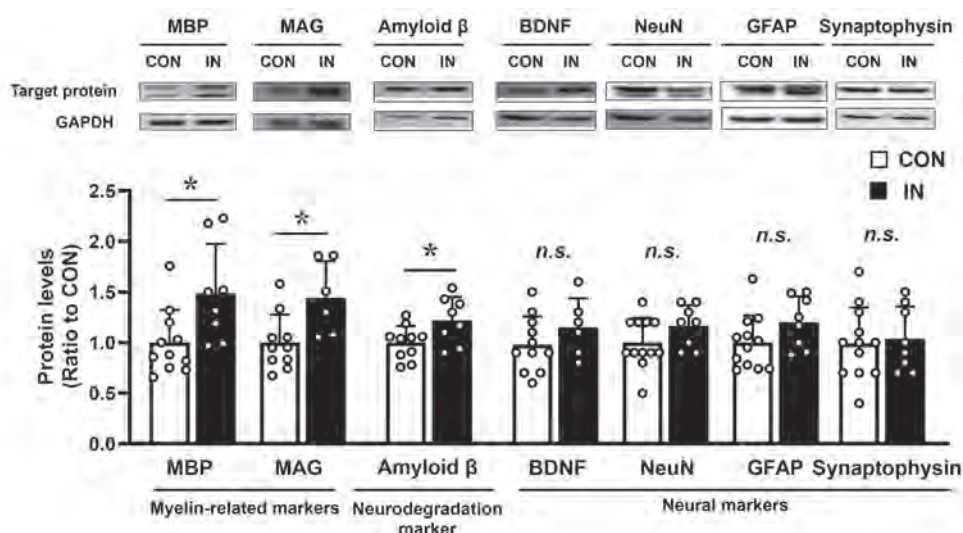


図5 20週齢の海馬サンプルにおけるタンパク質発現レベル
平均値±標準偏差。* $p < 0.05$

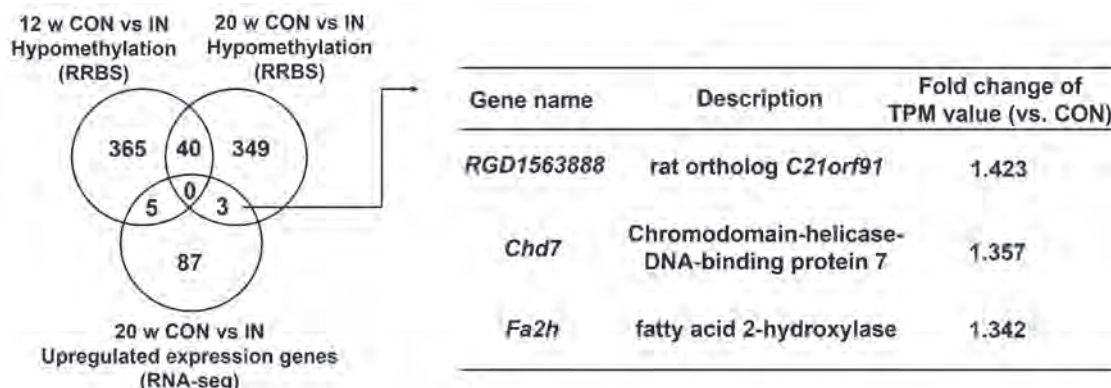


図6 若年期の活動制限によるDNAメチル化の低下に連動して増大する遺伝子の抽出
RRBS, reduced representation bisulfite sequencing. TPM, transcripts per million.

いて増大した遺伝子発現の関連を検討する統合解析を実施した。RRBSの結果、12週齢ではCON群と比較してIN群で411の遺伝子領域のメチル化が減少し、20週齢では393の遺伝子領域のメチル化の減少が観察された。また、12週齢と20週齢で共通して低メチル化状態が観察された領域数は40であった。しかし、RNA-seqで増大が確認された遺伝子の中にこれら40の遺伝子領域の低メチル化と連動したものは存在しなかった(図6)。一方で、成年期のみにおいてIN群による低メチル化が観察された遺伝子領域に連動して発現が増大していた遺伝子が3種類抽出された(*RGD1563888*, *Chd7*, *Fa2h*)。これらの遺伝子はいずれもミエリン化やミエリンの機能に関わる遺伝子であった。

3. 考 察

本研究の結果、活動制限介入を行った若年期にのみ身体活動量が減少したが、活動制限解除の身体活動量や体重、摂食量、ならびに生体に対するストレス応答のバイオマーカーとして知られる血漿コルチコステロン濃度にも群間の違いは認められなかった。これは狭小ケージによる飼育モデルを活用した先行研究^{2, 4)}と同様の結果を示しており、本研究で用いた活動制限が過度な生理的負担

を強いることなく、若年期にのみ運動不足である状態を創出できたものと考えられる。

本研究では活動制限を解除してから8週間後において、IN群でOLTの成績不良が観察された。これは若年期の運動不足の影響が長期にわたり残存し、将来の認知機能低下を招く可能性を示唆する結果であると考えられる。この分子機構に迫るため、RNA-seqを行った結果、IN群では「ミエリン化」に関わる遺伝子発現が増大し、ミエリンのタンパク質発現レベルも増大していた。一般的にはミエリンは加齢などにより消失(脱髄)することで神経信号の伝達機能が低下し、これが認知機能の悪化につながるものと考えられている。しかし最近の研究では、ミエリンの脱髄が進行する前段階でミエリンの肥大が生じ、その段階で認知機能低下が生じていることが報告されている⁹⁾。本研究では組織免疫染色などでミエリン径を直接評価していないものの、ミエリンが過剰に肥大していた可能性が考えられる。また、ミエリンの機能不全がアミロイドβの沈着を増大させることも確認されているが¹⁰⁾、本研究でも同様にIN群でアミロイドβが増大していた。しかし、先行研究²⁾で指摘されているようなBDNFの遺伝子・タンパク質発現変化は本研究では認められなかった。以上のことから、若年期の運動不足は成年期におけ

るミエリンの制御不良に伴う肥大とアミロイド β の増大を介して認知機能低下を引き起こしている可能性が示唆される。

本研究ではさらにゲノムワイドなDNAメチル化解析 (RRBS) を行い, RNA-seqで変化が認められた遺伝子と照合する統合解析を行った。本研究では, 若年期の活動制限によりDNAメチル化状態に変化が生じ, それは成年期になるまで保持されることで遺伝子発現の変化をもたらすものと予想していたが, その予想に反して成年期まで保持されたDNAメチル化領域と関連して変動していた遺伝子は認められなかった。しかしながら, 成年期においてのみIN群で低メチル化状態が観察された遺伝子領域と連動して発現が増大していた遺伝子はいずれもミエリン化やミエリンの機能に関わる遺伝子であった (*RGDI563888*, *Chd7*, *Fa2h*)。特に*RGDI563888* 遺伝子を過剰発現させると, 軸索に関連しない箇所で集積するような, いわゆる機能的ではないミエリンが増大することが報告されている¹¹⁾ことから, IN群で増大していたミエリンは機能不良に陥っていた可能性があり, IN群での認知機能の悪化と符合する。以上のことから, IN群で観察された認知機能低下のメカニズムに, DNA低メチル化を発端としたミエリン制御異常が関与している可能性が示唆された。

興味深いことに, 若年期の運動不足の影響が即座にDNAメチル化に変動を及ぼしてそれが長期間保持されることで成年期の遺伝子発現に影響を及ぼすのではなく, 加齢変化と相まって遅延して生じる可能性が示唆された。しかしながら, このような変化が生じた原因やその意義については現時点では不明である。エピジェネティクス修飾にはDNAメチル化以外にもヒストン修飾やmicroRNAによる発現調節機構も存在しており, これらの変化が, 成年期におけるDNAメチル化や遺伝子発現に影響を及ぼした可能性は否定でき

ない。今後はこれらの分子機構にも着目しながら, ライフステージに応じたエピジェネティクス機構にも着目していく必要がある。一方で, 活動制限を解除し, 身体活動量が回復してもなおこのような変化が生じたことから, 若年期の運動不足の負の影響は少なくとも日常的な身体活動では相殺することが出来ない可能性が示唆される。今後は, 若年期の活動制限介入後に積極的に運動介入を行うなど, 若年期の運動不足による認知機能低下への対抗策を検討していく必要がある。

4. 結 論

若年期の活動制限は成年期の認知機能低下を招くことが明らかとなった。その背景となる分子機構には, 活動制限解除後に遅延して生じるミエリン関連遺伝子のDNAメチル化レベルの低下と遺伝子・タンパク質発現の増大が関与している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。また本研究の遺伝子発現網羅解析にあたり多大にご協力いただきました筑波大学医学医療系スポーツ医学研究室菅澤威仁助教に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) World Health Organization. Global status report on physical activity 2022., World Health Organization, Geneva (2022)
- 2) Kim J., Park J., Mikami T. Regular Low-Intensity Exercise Prevents Cognitive Decline and a Depressive-Like State Induced by Physical Inactivity in Mice: A New Physical Inactivity Experiment Model., *Frontiers in Behavioral Neuroscience.*, **16**, 866405 (2022)
- 3) Gomez-Pinilla F. et al. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging

- mechanisms of epigenetic regulation., *European Journal of Neuroscience.*, **33**, 383-390(2011)
- 4) Yoshihara T. et al. Long-term physical inactivity exacerbates hindlimb unloading-induced muscle atrophy in young rat soleus muscle., *Journal of Applied Physiology.*, **130**, 1214-1225(2021)
 - 5) Takahashi Y., Sawa K., Okada T. The diurnal variation of performance of the novel location recognition task in male rats., *Behavioral Brain Research.*, **256**, 488-493(2013)
 - 6) Koizumi H. et al. Preventive role of regular low-intensity exercise during adolescence in schizophrenia model mice with abnormal behaviors., *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **534**, 610-616(2021)
 - 7) Vogel-Ciernia A., Wood M.A. Examining object location and object recognition memory in mice., *Current Protocols in Neuroscience.*, **69**, 8-31(2014)
 - 8) Zhou Y. et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets., *Nature Communications.*, **10**, 1523
 - 9) McNamara N.B. et al. Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity., *Nature.*, **613**, 120-129(2023)
 - 10) Depp C. et al. Myelin dysfunction drives amyloid- β deposition in models of Alzheimer' s disease., *Nature.*, **618**, 349-357(2023)
 - 11) Reiche L. et al. C21orf91 Regulates Oligodendroglial Precursor Cell Fate—A Switch in the Glial Lineage? *Frontiers in Cellular Neuroscience.*, **15**, 653075(2021)