

共感性を高める運動効果を成すエクソソーム miRNA を介した筋-島皮質連関の解明

島 孟 留*

THE POTENTIAL CONTRIBUTION OF EXOSOMAL miR-486a-3p SECRETION WITH LIGHT-INTENSITY EXERCISE INTERVENTION ON ENHANCING EMPATHIC BEHAVIOR IN MICE

Takeru Shima

Key words: exercise, exosome, helping behavior, miR-486a-3p.

緒 言

観察者が対象者と同様の情動を抱く「共感性」は、向社会的行動と関連し、人間関係の構築に必要な機能である。共感性はヒトに限らず、他の哺乳類種でも観察され、げっ歯類では共感性を反映する指標として救助行動がある。共感性を高めるアプローチを考えるうえでは、小動物における試験の活用が有用と考えられる。

共感性を高める方法の 1 つに、運動がある⁹⁾。これまでに、神経可塑性にかかわる脳由来神経栄養因子 (BDNF) が、オキシトシンと同様に共感性に関連すると報告されており¹⁾、低強度運動介入は、健康なマウスの島皮質 *Bdnf* mRNA 発現を高めるとともに救助行動を促進する⁹⁾。しかし、この運動効果のメカニズムはいまだ詳細に明らかではないため、この動物モデルを用いた更なる研究が必要である。

脳機能に及ぶ運動効果は、脳内のみで完結するわけではなく、運動によって増加する「Exerkine」

といった、末梢器官から分泌される生化学的因子によっても制御される⁵⁾。近年、直径40～160 nm の細胞外小胞であるエクソソームが、運動効果において重要な役割を果たすと報告されている。さまざまな器官から分泌されるエクソソームには、miRNA が含まれており、miRNA は mRNA 上の相補的な配列に結合して mRNA の分解または翻訳阻害をもたらす²⁾。運動に伴い骨格筋から分泌されるエクソソーム miRNA は、末梢器官の機能のみならず、脳機能をも高めることが示唆されている⁸⁾。したがって、脳機能に対する運動効果を解明するためには、骨格筋など末梢器官と脳のコミュニケーションを探ることが不可欠である。

これまでに、共感性を高める低強度運動効果には、島皮質における *Bdnf* mRNA 発現とともに miR-486a-3p の増加がかかわる可能性が報告されている⁹⁾。しかし、骨格筋など末梢器官由来の miR-486a-3p が、低強度運動による共感性向上効果に寄与しているかどうかは不明である。そこで本研究では、低強度運動介入による健康なマウス

* 群馬大学共同教育学部保健体育講座 Department of Health and Physical Education, Cooperative Faculty of Education, Gunma University, Maebashi, Japan.

の救助行動への影響とともに、骨格筋など末梢器官由来エクソソーム miR-486a-3p の変化を評価した。

方 法

A. 実験動物

本研究には、8 週齢の C57BL/6J マウス（日本 SLC 株式会社，日本）を用いた。なお本研究は、群馬大学動物実験委員会の承認を得て行われた（承認番号：24-013）。

B. 運動介入

1 週間の予備飼育後、マウスを安静群（運動なし）と運動群に分けた。運動群のマウスには、強制回転かご（FWS-1505，有限会社メルクエスト，日本）を用いて低強度運動を 4 週間課した。運動 1 週目には、3.0～7.0 m/分の速度で 1 日30分間、週 5 日の頻度でマウスに運動を課した。運動 2～4 週目には、7.0 m/分の速度で 1 日30分間、週 5 日の頻度で課した。

C. 救助行動試験

運動介入の 4 週目と併行して、先行研究⁹⁾に基づいて、マウスの救助行動を評価した。安全地帯にいるマウスが回転ドアを開けることで、水で満たされたゾーンにいるマウスを安全地帯へ逃れさせる試験を 1 回/日、5 日間課した。1 回当たり最大 3 分間（180秒）とし、3 分間経過しても回転ドアを開けなければ、その時点でその日の試験を終了とした。試験 5 日目のドアを開けるまでの時間が短いほど、共感性が高いと評価した。

D. 組織の採取

救助行動試験が終了した 2 日後、マウスから脳や血液、腓腹筋、褐色脂肪組織、肝臓を採取した。その後、脳を、Invitrogen™ RNeasy Lysis Buffer（Thermo Fisher Scientific 社，米国）に浸潤させ、その翌日に島皮質を採取した。血液は、抗凝固剤として EDTA-2K を用いて採取し、血漿を分離した。血漿、腓腹筋、褐色脂肪組織、肝臓をエクソソームの抽出と分析のために用いた。

E. RNA およびエクソソーム miRNA の抽出

RNeasy Mini Kit および miRNeasy Micro Kit（Qiagen 社，米国）を用いて、島皮質から total RNA および miRNA を抽出した。マウスから採取

した腓腹筋、褐色脂肪組織および肝臓を、エクソソーム除去 FBS (EXO-FBSHI-50A-1, SBI 社, 米国) および Pen-Strep-Glutamine (Gibco-Thermo Fisher Scientific 社) を添加した DMEM (10% FBS, 1 % Pen-Strep-Glutamine) 中で、37℃、5 % CO₂ に設定したインキュベーターに 24 時間安置した。その後、22 μm フィルターでろ過した DMEM 液を回収し、Exo-Prep (HBM-EXP-C25, HansaBioMed Life Sciences 社, エストニア) を用いてエクソソームを沈殿させた。血漿エクソソームも Exo-Prep (HBM-EXP-B5, HansaBioMed Life Sciences 社) を用いて沈殿させた。沈殿処理後、miRNeasy Micro Kit (Qiagen 社) を用いて miRNA を抽出した。

F. リアルタイム PCR

島皮質から抽出した total RNA を用いて cDNA を合成した後、各々のプライマー、PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix を用いて、StepOne Plus Real-Time PCR 96-well system (Thermo Fisher Scientific 社) で mRNA 発現を評価した。本研究で使用したプライマー配列は以下のとおりである。ΔΔCT 法を用いて各 mRNA 発現を算出し、β-actin mRNA 発現で標準化した。

Pten: TGGCGGAACCTTGCAATCCTCAGT, and
TCCCGTCGTGTGGGTCCTGA,
Bdnf: GATGAGGACCAGAAGGTTTCG, and
GATTGGGTAGTTCGGCATTG,
Trkb: TGACGAGTTTGTCCAGGAGA, and
TTGCTGCTCTCATTGAGGC,
Creb1: TCAGCCGGGTACTACCATTC, and
TCTCTTGCTGCTTCCCTGTT,
Fndc5: AGAAGAAGGATGTGCGGATG, and
TCTTGAAGAGCACAGGCTCA,
β-actin: TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG, and
TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT

島皮質および、血漿、腓腹筋、褐色脂肪組織、肝臓由来エクソソームから抽出した miRNA を Taqman™ MicroRNA Reverse Transcription Kit と Taqman™ MicroRNA Assay を用いて cDNA に逆転写した (miR-486a-3p: 0020931, U6 snRNA: 001973, Thermo Fisher Scientific 社)。その後、cDNA、Taqman™ MicroRNA Assay、Taqman™ Fast Advanced Master Mix を用いて、StepOne Plus Real-

Time PCR system で miR-486a-3p 発現を評価した。 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法を用いて算出し、U6 snRNA 発現で標準化した。

G. 統計解析

データを平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、統計解析には Prism version 10 (有限会社 MDF, 日本) を用いた。解析にあたってまず、データの分布の正規性を確認したうえで、対応のない t 検定もしくは Mann-Whitney 検定で運動群と安静群を比較した。相関分析についてもデータ分布の正規性を検証し、ピアソンの相関係数もしくはスピアマンの相関係数を用いた。統計的有意性は $P < 0.05$ と定義した。なお、有意水準を 5 % 未満に設定した。

結 果

A. 低強度運動による救助行動、島皮質内 miR-486a-3p および末梢器官由来エクソソーム miR-486a-3p の変化とそれらの関係

運動群のマウスは、安静群のマウスと比較して、ドアを開けるまでの時間が有意に短かった (図 1 A)。島皮質の miR-486a-3p 発現は、運動群のマウスにおいて、安静群のマウスよりも有意に高く (図 1 B)、救助行動との相関傾向を示した (図 2 A)。更に、運動群のマウスでは、血漿中エク

ソソーム miR-486a-3p 発現が、安静群のマウスよりも有意に高かった (図 1 C)。血漿中エクソソーム miR-486a-3p 発現は、島皮質の miR-486a-3p 発現と正の相関傾向を示した (図 2 B)。一方で、腓腹筋由来エクソソーム miR-486a-3p 発現に有意な差はなかった (図 1 D)。これは肝臓由来エクソソーム miR-486a-3p 発現においても同様であった (図 1 F)。しかしながら、褐色脂肪組織由来エクソソーム miR-486a-3p 発現は、運動群のマウスにおいて安静群のマウスよりも有意に高かった (図 1 E)。血漿エクソソーム miR-486a-3p 発現は、腓腹筋、褐色脂肪組織、肝臓いずれのエクソソーム miR-486a-3p 発現とも有意な相関を示さなかったものの、褐色脂肪組織由来 miR-486a-3p との間には中程度の関連が認められた (図 2 C-E)。

B. 低強度運動による島皮質内 mRNA の変化

運動群のマウスでは、安静群のマウスと比較して島皮質の *Pten* mRNA 発現が有意に低かった (図 3 A)。更に、島皮質 *Bdnf* mRNA 発現は、運動群のマウスにおいて安静群のマウスよりも有意に高かった (図 3 B)。一方で、島皮質 *Trkb*、*Creb1*、*Fndc5* mRNA 発現には、運動による変化がみられなかった (図 3 C-E)。

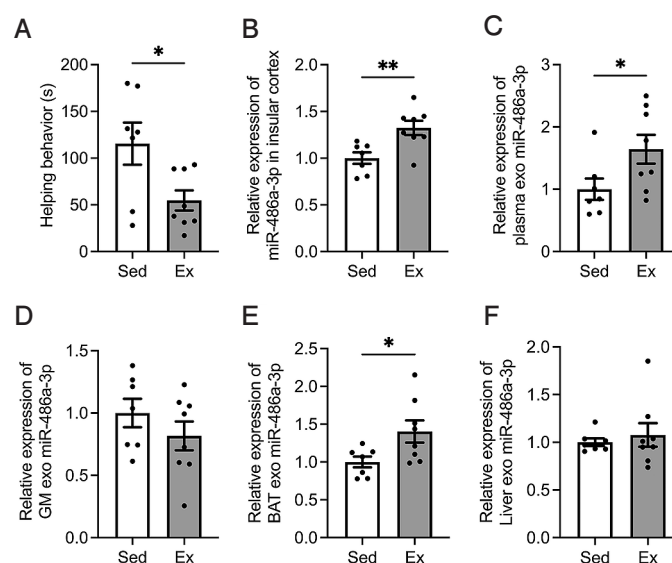


図 1. 低強度運動による救助行動、島皮質内 miR-486a-3p および末梢器官由来エクソソーム miR-486a-3p の変化

Fig.1. Effect of light intensity exercise on door-opening behavior (A), miR-486a-3p in insular cortex (B), exo miR-486a-3p in plasma (C), GM-derived exo miR-486a-3p (D), BAT-derived exo miR-486a-3p (E), liver-derived exo miR-486a-3p (F).

Sed; sedentary mice, Ex; exercised mice, exo; exosomal, GM; gastrocnemius muscle, BAT; brown adipose tissue. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. (A), (B), (C), (D), and (E) were analyzed by unpaired t-test, (F) was analyzed by Mann-Whitney t-test, n = 7 mice for Sed group, n = 8 mice for Ex group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sed.

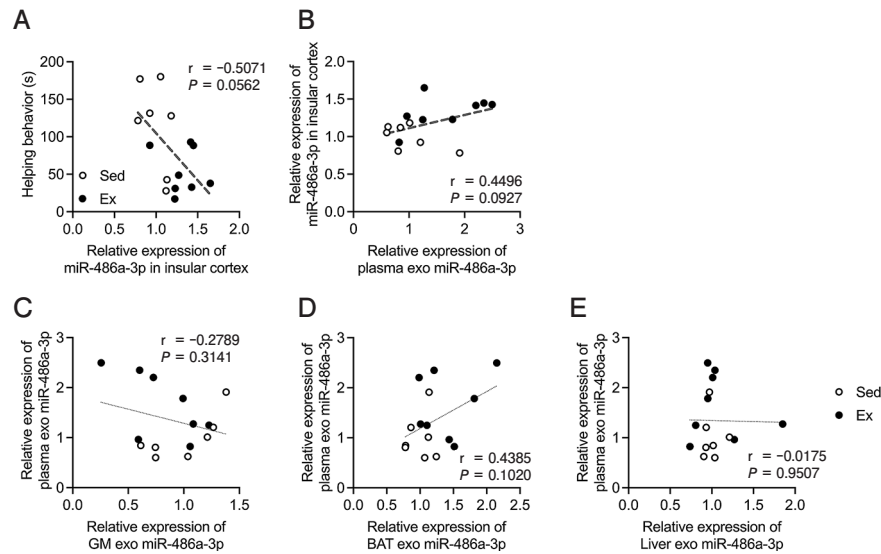


図2. 救助行動や島皮質内 miR-486a-3p、末梢器官由来エクソソーム miR-486a-3p の関係

Fig.2. The correlations between miR-486a-3p in the insular cortex and door-opening behavior (A). The dashed line in the scatter diagram indicates a correlation trend. The correlations between exo miR-486a-3p in plasma and miR-486a-3p in the insular cortex (B). The dashed line in the scatter diagram indicates a correlation trend. The correlations of exo miR-486a-3p in plasma with exo miR-486a-3p from GM (C), BAT (D), and liver (E). (A) was analyzed by Spearman correlation. (B), (C), (D), and (E) were analyzed by Pearson correlation. exo; exosomal, GM; gastrocnemius muscle, BAT; brown adipose tissue.

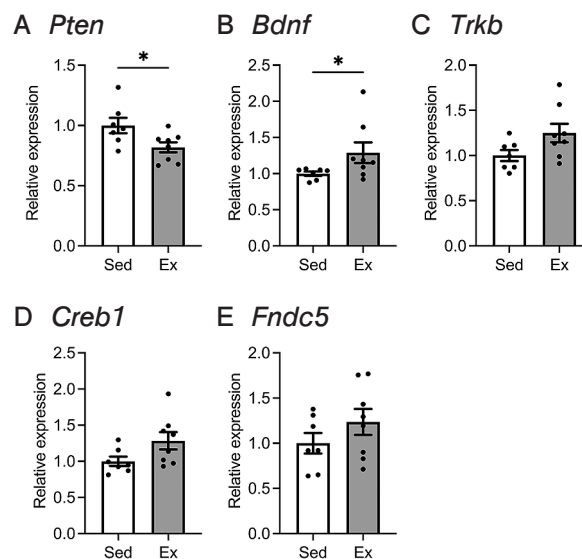


図3. 低強度運動による島皮質内 mRNA の変化

Fig.3. Effect of light-intensity exercise on mRNA levels of *Pten* (A), *Bdnf* (B), *Trkb* (C), *Creb1* (D), *Fndc5* (E) in the insular cortex. Sedentary group was normalized as 100%. Sed; sedentary mice, Ex; exercised mice. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. (A), (C), (D), and (E) were analyzed by unpaired t-test, (B) was analyzed by Mann-Whitney t-test, $n = 7$ mice for Sed group, $n = 8$ mice for Ex group. * $P < 0.05$ vs Sed. ** $P < 0.01$ vs Sed.

考 察

本研究では、低強度運動が促進する救助行動に、骨格筋など末梢器官由来のエクソソーム miR-486a-3p がかわる可能性を検討した。その結果、運動群のマウスでは安静群のマウスに比べて、島皮質 miR-486a-3p、血漿中および褐色脂肪組織由

来のエクソソーム miR-486a-3p が有意に高い値を示した。一方で、腓腹筋や肝臓由来のエクソソーム miR-486a-3p に有意な変化はなかった。

本研究の結果 (図1A) から、低強度運動による救助行動の促進が再確認された⁹⁾。このことは、低強度運動が共感性を高めるうえで有用であることを示唆している。更に、低強度運動により島皮

質での miR-486a-3p 増加が確認され、これは救助行動と関連する傾向がみられた (図 1 B, 2 A)。運動による血中エクソソーム miR-486 の増加はこれまでに報告されており⁶⁾、今回の運動でも血漿中エクソソーム miR-486a-3p の有意な増加が確認された (図 1 C)。更に、血漿中エクソソーム miR-486a-3p 発現は島皮質の miR-486a-3p 発現と相関傾向を示し (図 2 B)、血漿中エクソソーム miR-486a-3p の増加が島皮質 miR-486a-3p 発現の増加に寄与している可能性が示された。

低強度運動介入は、褐色脂肪組織由来のエクソソーム miR-486a-3p を有意に増加させた (図 1 E)。運動は、さまざまな臓器のエクソソーム分泌プロファイルに影響を及ぼすことが示されている。褐色脂肪組織もエクソソームを分泌し、これは心臓に対する運動効果を媒介する可能性が示されている¹⁰⁾。本研究の知見は、運動が脳機能へ及ぼす効果に褐色脂肪組織が寄与している可能性を示すものである。しかしながら、褐色脂肪組織由来のエクソソーム miR-486a-3p は、血漿中のそれと中程度の関連を示すものの統計的に有意な関係ではない (図 2 D)。したがって、褐色脂肪組織の寄与を検証する更なる研究が必要である。また、島皮質への miR-486a-3p の局所投与が、低強度運動様の効果をもたらすかどうかといった検証が、褐色脂肪組織-島皮質間クロストークの有無を明らかにするうえで必須であるため、現在、前部および後部島皮質への miR-486a-3p mimic 局所投与効果の検証を進めている。

一方で、腓腹筋および肝臓由来のエクソソーム miR-486a-3p は運動による有意な変化を示さず (図 1 D, F)、血漿中エクソソーム miR-486a-3p との相関もなかった (図 2 C, E)。しかしながら、本研究では腓腹筋の検証にとどまっているため、筋線維タイプごとの検証など更なる研究が不可欠である。加えて、各器官特異的な miR-486a-3p 発現の制御によって、救助行動を高める運動効果が左右されるかといった研究も必要である。この点については現在、器官特異的に miR-486a-3p を増幅・抑制させるアデノ随伴ウイルス (AAV) 作成を進めている。

本研究での低強度運動介入は、島皮質における

miR-486a-3p 発現の増加とともに *Pten* mRNA 発現の減少をもたらした (図 3 A)。更に、運動介入は島皮質における *Bdnf* mRNA 発現を有意に増加させた (図 3 B)。miR-486a-3p は *Pten* mRNA の抑制因子として報告されており⁷⁾、PTEN 発現のノックダウンは脳内 BDNF 発現の増加にかかわる⁴⁾。一方で、miR-486a-3p は *Fndc5* の制御因子としても想定されており、FND5 は BDNF 発現を増強する³⁾。しかしながら本研究では、島皮質の *Fndc5* mRNA は、運動により変化しなかった (図 3 E)。そのため、本研究での低強度運動による *Bdnf* mRNA 発現の増加は、miR-486a-3p/PTEN/BDNF 経路を介して生じた可能性が考えられる。

総 括

本研究では、主たる目的であった筋-島皮質連関を確認できなかったものの、褐色脂肪組織由来のエクソソーム miR-486a-3p が低強度運動介入による共感性の向上に寄与する可能性を見いだした。これらの知見は、共感性を制御する新たなアプローチを発展させる基盤的情報となりうる。

謝 辞

本研究は、公益財団法人明治安田厚生事業団研究助成を受けて行われた。また、本研究の遂行に協力いただいた群馬大学共同教育学部保健体育専攻運動生理学研究室のメンバーに感謝する。

参 考 文 献

- 1) Asadi E, et al. (2021): Quality of early-life maternal care predicts empathy-like behavior in adult male rats: linking empathy to BDNF gene expression in associated brain regions. *Brain Res*, **1767**, 147568.
- 2) Bartel DP. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- 3) Belviranli M, et al. (2018): Exercise training protects against aging-induced cognitive dysfunction via activation of the hippocampal PGC-1 α /FND5/BDNF pathway. *Neuromolecular Med*, **20**, 386-400.
- 4) Chen L, et al. (2021): *Pten* is a key intrinsic factor regulating raphe 5-HT neuronal plasticity and depressive behaviors in mice. *Transl Psychiatry*, **11**, 186.
- 5) Chow LS, et al. (2022): Exerkines in health, resilience and disease. *Nat Rev Endocrinol*, **18**, 273-289.
- 6) Hou Z, et al. (2019): Longterm Exercise-Derived

- Exosomal miR-342-5p: a novel exerkine for cardioprotection. *Circ Res*, **124**, 1386-1400.
- 7) Li D, et al. (2015): MiR-486 regulates lactation and targets the PTEN gene in cow mammary glands. *PLoS One*, **10**, e0118284.
 - 8) Nederveen JP, et al. (2021): Extracellular vesicles and exosomes: insights from exercise science. *Front Physiol*, **11**, 604274.
 - 9) Shima T, et al. (2022): Four weeks of light-intensity exercise enhances empathic behavior in mice: the possible involvement of BDNF. *Brain Res*, **1787**, 147920.
 - 10) Zhao H, et al. (2022): Small extracellular vesicles from brown adipose tissue mediate exercise cardioprotection. *Circ Res*, **130**, 1490-1506.