

脳由来神経栄養因子 BDNF の心臓における発現と低酸素病態下での機能

森島 真幸^{a),b)}・藤田 崇史^{b)}・小野 克重^{b)}

a) 近畿大学農学部食品栄養学科 〒631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204

b) 大分大学医学部病態生理学講座 〒879-5593 大分県由布市医大ヶ丘 1-1

Functional role and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the heart exposed to hypoxia

Masaki MORISHIMA^{a),b)}, Takafumi FUJITA^{b)}, and Katsushige ONO^{b)}

a) Faculty of Agriculture, Kindai University, 3327-204 Nakamachi, Nara, Nara 631-8505, Japan

b) Department of Pathophysiology, Oita University School of Medicine, 1-1 Idaigaoka Yufu, Oita 879-5593, Japan.

Synopsis

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), conditionally secreted at active synapse through the stimulation of the tropomyosin-related kinase receptor B (TrkB) receptors, plays an important role in neuronal development, survival, and function. BDNF/TrkB signaling is reportedly essential for organ development or normal contractility in the mammalian heart. However, the expression patterns of BDNF/TrkB and their pathophysiologic roles are poorly understood in the heart. Here we report that BDNF/TrkB signaling is associated with cardiac automaticity in normal and hypoxic conditions. Expressions of BDNF and its receptor TrkB mRNAs in the atrium and the ventricle were abundant, which was approximately a half of those in brainstem or hippocampus, in an age-dependent manner. In hypoxic condition at 3 h (1%, O₂), expression of BDNF mRNA was transiently activated in neonatal

rat cardiomyocytes ($126 \pm 7\%$), whereas this action was reduced ($52 \pm 2\%$) at prolonged hypoxia (24 h). Reduction of the cellular automaticity, viability, and T-type Ca^{2+} channel expression by hypoxia were observed concomitantly with the inactivation of the BDNF/TrkB signal. Our data provide the first evidence that BDNF/TrkB signaling contributes to cardiac dysfunction under acute and prolonged hypoxia.

Keywords: Heart, BDNF, TrkB, hypoxia, T-type Ca^{2+} channel

1. 緒言

虚血性心疾患は、現在わが国の成人の死因の上位に位置する重要な疾患である。近年、経皮的血管形成術をはじめとした侵襲的治療法の開発が進み、急性期の救命率は著明に改善されている¹⁾。しかし、同法による治療では長期的な予後を改善することは困難であるため、様々な薬物療法が検討され研究が進んでいるが、未だ予後を改善する有効な治療法の開発には至っていない²⁾。一方、虚血性心疾患に対する再生医療の研究とその臨床応用は、近年著しい進展を遂げてはいるが、障害をうけた心筋細胞の完全な再建には至っておらず臓器再生へ見通しは現時点では得られていない。

脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor; BDNF) は脳内で産生分泌される神経栄養因子であり、脳内での産生が低下するとうつ病の原因となることが知られている^{4),5)}。以前の研究から、うつ病気質は動脈硬化や虚血性心疾患の危険因子の一つとして提唱されている^{6),7)}。Okadaらの研究によると、虚血性心疾患患者の血清中の BDNF 濃度は健常者に比べて有意に低く、その低下は糖尿病や高血圧などの既知の危険因子とは独立した因子である⁸⁾。また、心筋梗塞後には血中 BDNF 濃度は増加すること、更に BDNF のノックアウトマウスのホモ接合体 (BDNF^{-/-}) は、胎児期に心不全を起こして死亡することも明らかとなっている^{9),10)}。このため、BDNF が心血管系に対して何らかの病態生理学的な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、BDNF の心臓における発現動態やその機能についてはほとんど知られていない。そこで我々は、BDNF の正常心筋と病態下

心筋、特に虚血性心疾患モデルとしての低酸素下心筋における機能に注目した。

近年、BDNF は中枢神経組織だけでなく末梢組織でも発現が認められている^{11),12)}。しかし、その発現局在は組織により異なり、肝臓、腎臓、精巣には発現しないが、心臓や骨格筋組織の血管に比較的豊富に発現するとされる¹¹⁾。特に、冠動脈や毛細血管でその発現は多く確認されており、また血管内皮細胞や平滑筋細胞、骨格筋細胞にも豊富であり、血管収縮や血管新生、さらに代謝の制御にも働いていることが明らかとなった¹¹⁾。一方、BDNF の受容体である Tropomyosin-related kinase receptor B (TrkB) も、肺や冠動脈や毛細血管に多く局在しており、BDNF と同様に静脈での明らかな発現は認められていない¹²⁾。これらの所見から、BDNF/TrkB シグナルは、末梢の循環系組織、血管やその周囲において産生・分泌され、内皮細胞、平滑筋細胞などの増殖や分化・成熟、生存を制御する重要な栄養因子として機能する可能性が示唆される。しかしながら、病態下における中枢性の BDNF/TrkB シグナルと、末梢組織局所における同シグナルの病態生理学的意義についての見解は一致しておらず、心筋における機能についての研究報告は数少ない。そこで、本研究では、週齢の異なるラットの心臓組織 (心房、心室) における BDNF とその受容体 TrkB 発現量を測定し、心臓における発現動態を確認した。さらに、ラット心筋細胞を単離し、低酸素環境下で培養した際の BDNF 及び TrkB 発現の変化とその生理学作用についての解析を行った。

2. 材料及び方法

(1) *In vivo* 実験

雄性 Wistar ラット (Kyudo, Saga, Japan) を以下の日齢、週齢で飼育し実験に使用した。一定期間飼育した後、新生獣ラット(生後 1、3、6 日齢)、及び成獣ラット(3、6、11、24 週齢)の脳(脳幹、海馬)と心臓(心房、心室)を麻酔下で採取した。BDNF や T 型 Ca²⁺チャネル (Cav3.1, Cav3.2) の発現量は、各組織から Total RNA を抽出し、Real-time PCR 法により定量した。具体的には、TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Sci. Carlsbad, CA)を用いて抽出した Total RNA (500 ng)から Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Molecular System Inc, Alameda, CA)を用いて cDNA を合成し、BDNF, Cav3.1, Cav3.2 mRNA の発現解析を行った。使用したプライマーは、下記のとおりである。

Rat BDNF (GeneBank accession no. M61175, 5'-AGCGCGAATGTGTTAGTGGT-3' and 5'-GCAATTGTTGCCTCTTTTCT-3'), rat Cav3.1 (CACNA1G; GenBank accession no. AF027984; 5'-TCTCTAGGGCTATAGGCG-3' and 5'-GGAGATTTTGCAGGAGCTAT-3'), rat Cav3.2 (CACNA1H; GenBank accession no. AF290213; 5'-GGCGAAGAAGGCAAAGCTGA-3' and 5'-GCGTGACACTGGGCATGTT-3'), rat Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; GenBank accession no. M17701; 5'-GCCATCAACGACCCCTTCAT-3' and 5'-TTACACCCATCACAAACAT-3')

Real-time PCR は、Light Cycler system (Roche)を用いた。得られた Cycle Point (CP)値を用いた相対定量により各遺伝子発現量を算出した。Internal control には、GAPDH を使用した。

TrkB タンパク発現解析実験は採取した組織からタンパク抽出を行い、Western blot 法を用いて定量した。具体的には、液体窒素で組織を凍結粉砕し、RIPA Lysis buffer に加えてソニケーションした。氷中で静置後遠心分離を行い、上清を採取しタンパク質濃度を BCA 法にて測定した。30 µg のタンパク質を 10% SDS-PAGE にて分離した。電気泳動後、PVDF 膜に転写し、5% non-fat milk-TBST にてブロッキングした。4 °C にて一次抗体反応(1:200; anti-TrkB antibody, 1:500; anti-GAPDH antibody, santacruz, USA)を行い、TBST で洗浄後 HRP 標識二次抗体 anti-rabbit IgG conjugated antibody (1:2000; American Qualex, CA, USA)で 1 時間室温にて反応させ ECL prime chemiluminescence reagent (GE ヘルスケア, WI, USA)によりシグナルを検出した。得られたシグナルは、Image J 1.51 (NIH)を用いて定量化を行った。

実験データは、平均値 ± 標準偏差で表した(n = 4)。実験グループ間の統計解析は、Sigma plot ver.13.0 により一元配置分散分析 (One-Way ANOVA)を行い有意差 (p<0.05)が得られた場合に、各グループ間の多重検定 (Tukey test)を行った。

(2) *In vitro* 実験

生後 1~3 日の新生獣ラットから心臓を摘出し心室筋をコラゲナーゼで処理した後、心室筋細胞を単離した¹⁴⁾。その後、Thermo

社のマルチガスインキュベーターを用いて酸素濃度を1%に設定し、一定時間（1、3、6、24時間）培養した後、前述の *In vivo* 実験と同様の方法で遺伝子解析、タンパク発現解析実験を行った。細胞の生存率の解析は、Promega 社の CellTiter96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay を用いた。具体的には、96well のプレートに単離心筋細胞を 1.0×10^5 個播種し、一定時間培養後に塩化コバルト $100 \mu\text{M}$ を添加して低酸素環境を擬似再現した¹⁵⁾。塩化コバルト添加の3、6、24時間後に吸光度を測定し、生存細胞数を評価した。さらに、細胞の形態は、蛍光免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。心筋細胞の自動拍動観察は、キーエンスの蛍光顕微鏡（37°C、5% CO₂ 培養下）で観察し動画撮影を用いた。

実験データは、平均値 ± 標準偏差で表した ($n = 5$)。実験グループ間の統計解析は、Sigma plot ver.13.0 により一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) を行い有意差 ($p < 0.05$) が得られた場合に、各グループ間の多重検定 (Tukey test) を行った。また、時間依存性の検定には反復測定分散分析 (One-Way repeated measures ANOVA) を行った。

3. 結果

(1) BDNF の心臓における発現動態

-*In vivo* 実験-

通常飼育を行った Wistar ラットの心房、心室、脳幹、海馬を週齢ごとに採取し各組織における BDNF の mRNA 発現量を測定したところ、各週齢を通じて、脳（脳幹、海馬）でより豊富に発現していることが確認された。一方、心臓における発現は、最も BDNF

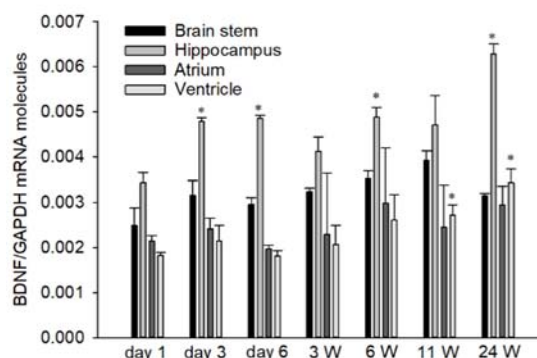


Fig 1. Quantitative analysis of BDNF mRNA expression. Data were displayed as the BDNF mRNA molecules in brain stem, hippocampus, atrium, and ventricle quantified by real-time PCR. Representative data were calculated by $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ and normalized to GAPDH. Data were expressed as mean \pm SD ($n = 4$). * $p < 0.05$, compared with the day 1 groups analyzed by One-way repeated measures ANOVA with post hoc test

発現量が多いとされる海馬に対し、心房、心室でそれぞれ 50%程度存在し、その発現は週齢に依存して増加することが明らかとなった (Fig. 1)。また、BDNF の受容体である TrkB のタンパク発現量を Western blot 法により定量したところ、TrkB タンパクは BDNF 発現量と同様に海馬で最も多く発現しており、3 週齢時点での海馬に対する心房での発現量 47%、心室での発現量 30%程度であることが判明した (Fig. 2)。よって BDNF とその受容体 TrkB は脳だけでなく、心臓（心房、心室）にも多く発現し、BDNF/TrkB シグナルは心臓に対して何らかの作用を発揮する可能性が示唆される。

2) 低酸素刺激による BDNF 発現量の変化

-*In vitro* 実験-

In vivo 実験により、成獣 Wistar ラットの心臓（心房、心室）において、BDNF 及び

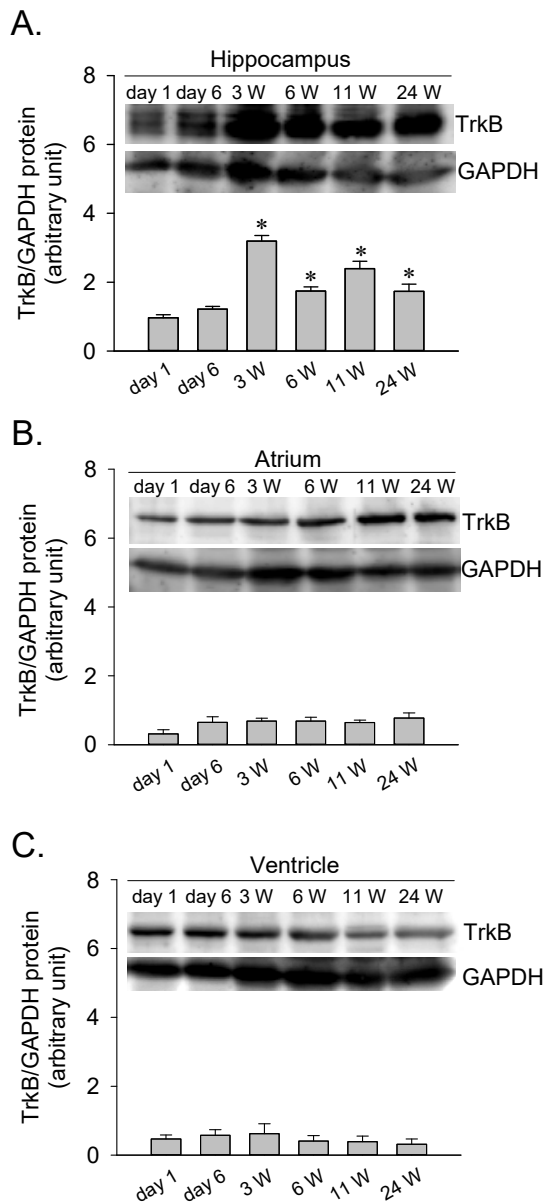


Fig 2. Western blot analysis of TrkB proteins in normal Wistar rats. The level of TrkB protein expression in hippocampus (A), atrium (B), and ventricle (C) determined by density of blotted bands in each upper panels. Data were expressed as mean \pm SD (n = 4). *p < 0.05, compared with the day 1 groups analyzed by One-way repeated measures ANOVA with post hoc

TrkB は比較的豊富に発現することが判明

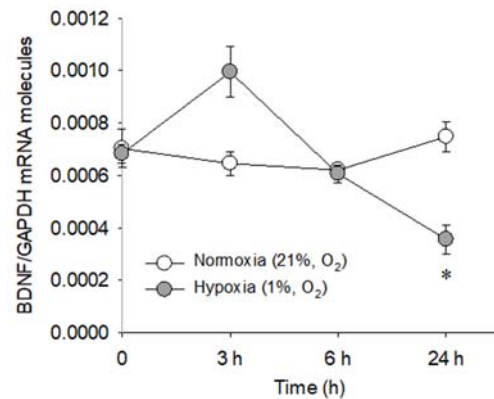


Fig 3. Changes in the level of BDNF mRNA in neonatal rat cardiomyocytes exposed to hypoxia. Time course of BDNF mRNA expression in normoxia (21%, O₂) or hypoxia (1%, O₂) myocytes determined by real-time PCR. Representative data were calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ and normalized to GAPDH. Data were expressed as mean \pm SD. (n=5). *p < 0.05, compared with the normoxia groups analyzed by One-way repeated measures ANOVA with post hoc test.

した。これは、自律神経を介した BDNF 発現量の増加を伴う変化である可能性も考えられる。このため、心筋細胞局所においても BDNF、及び TrkB が、どの程度発現しているか詳細に検討した。生後 3 日以内の仔ラットの心臓から、心筋細胞を単離し、低酸素環境下 (1%, O₂) にて培養を行った際の BDNF 発現量の変化を測定した。低酸素環境下で心筋細胞を培養すると、3 時間後に BDNF mRNA 発現量は通常培養群に比べて増加傾向を示した (p=0.07)。しかし、6 時間後には、3 時間時にみられた一時的な BDNF mRNA 発現の増加は消失し、通常培養群の発現レベルと同等となった。さらに、低酸素環境下での培養 24 時間後には BDNF の有意な発現減少が認められた (Fig. 3)。次に、初代培養ラット心筋細胞への低酸素刺激による BDNF 発現増加が、心筋細

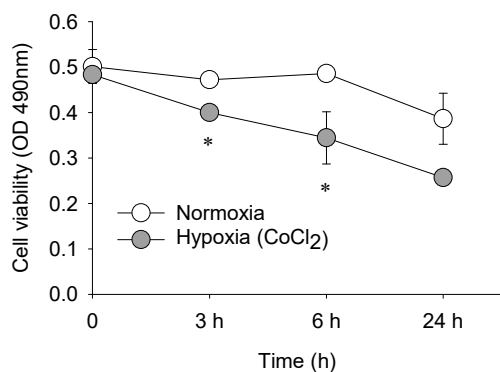


Fig 4. Time-dependent changes of cell proliferation was evaluated for 3-24 hours with 100 μ M CoCl_2 (chemically mimicked hypoxia). Data were expressed as mean \pm SD ($n=5$). * $p < 0.05$ compared with those with vehicle (normoxia) analyzed by One-way repeated measures ANOVA with post hoc test. Three independent experiments were performed.

胞の生存率にどのような影響を及ぼすかについて検討した。低酸素培養環境は塩化コバルト(100 μ M)を細胞培養液に添加することにより疑似的に再現した。通常培養あるいは低酸素環境下で 3-6 時間培養した心筋細胞は、形態学的な変化は認められなかったが (data not shown)、細胞の生存率は低酸素環境下 3 時間、6 時間後に有意に減少した ($p < 0.05$)。しかし、BDNF 発現量が有意に低下していた 24 時間後では、細胞生存率は通常培養群と比較してやや減少していたものの、有意な変化は認められなかった(Fig. 4)。以上の結果から、低酸素環境下で心筋細胞を培養すると、3-6 時間後に心筋細胞の生存率は著しく減少するが、この変化は BDNF 発現量の増加が認められた時相と一致しないことがわかった。よって、低酸素刺激により発現が亢進した BDNF は、心筋細胞の生存率の減少に対する保護作用ではなく、心筋細胞の機能に影響を与える他の因子に対して何らかの作用を示す可能性

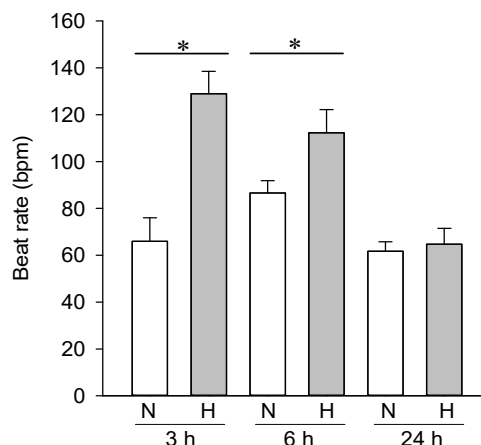


Fig 5. Spontaneous beating rate of cardiomyocytes 3-24 hours after application of vehicle (N) or CoCl_2 (100 μ M) (H). Data are expressed as the means \pm SD. * $p < 0.05$ compared with the vehicle group ($n=10$).

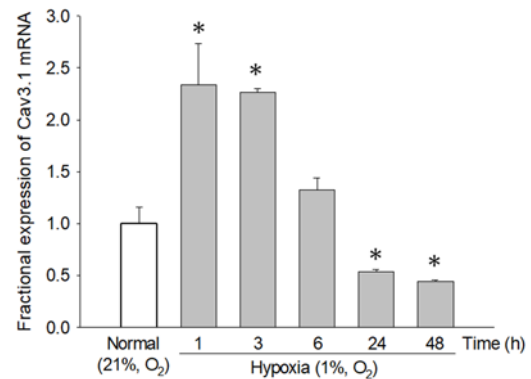
が示唆された。そこで我々は、低酸素環境下における心筋細胞の自動能の制御に BDNF が関与するという仮説を立て、自動拍動能と心筋細胞に発現するイオンチャネル発現に対する検討を行った。心筋細胞の自動拍動は、細胞の培養環境と同様の条件(37°C, CO_2 5%)にて記録し、取得した動画の画像解析により評価した。通常培養環境下における心筋細胞では規則的な拍動が観察されたが、塩化コバルトを投与した疑似低酸素環境下では 3 時間後に不規則で速い拍動が認められた。さらに多数例による解析を行ったところ、心筋細胞の自動拍動回数は、低酸素刺激 3 時間、6 時間後に有意に増加することが判明した (Fig. 5)。心筋細胞の自動能は、心筋細胞膜に存在する T 型 Ca^{2+} チャネル(Cav3.1, Cav3.2)による制御を受けており、病態心ではその発現が増加することが知られている¹⁵⁾。そこで我々

は、低酸素環境下で培養した心筋細胞の自動拍動の異常は、T型 Ca^{2+} チャネル(Cav3.1、Cav3.2)の発現異常によるものではないかと考えた。低酸素環境下 (1%, O_2) で1-48時間培養した心筋細胞におけるT型 Ca^{2+} チャネル (Cav3.1、Cav3.2) mRNA 発現量は1-3時間で顕著に増加し、その後有意に減少することがわかった。低酸素環境下におけるCav3.1、及びCav3.2 mRNA 発現の増減は、BDNF 発現量の変化と類似していた。

4. 考 察

本研究により、BDNF 及びその受容体TrkBは、心臓においても比較的豊富に発現し、脳組織と同様に週齢に依存して制御されることがわかった。脳海馬での研究によると、BDNFはその受容体であるTrkBに結合し、細胞内シグナル分子 (MAPK, PI3K, PLC など) を介して、神経細胞の成長や分化、シナプスの可塑性を強化し、学習や記憶、認知機能を改善させる^{5), 17)}。実際に、アルツハイマー病の患者の脳海馬ではBDNF発現量が低下し、血漿レベルにおいても低下していることが報告されている¹⁸⁾。また、うつ病患者では、血清BDNF濃度が低下しており、自発運動や抗うつ薬の投与によりそれらは改善する¹⁹⁾。一方、健常人においても、運動によって血中BDNF濃度が増加することが報告されている^{20), 21)}。これらのことから、我々の研究でみられた週齢に依存した脳海馬におけるBDNF、及びTrkB発現量の増加は、ラットの成長に伴う身体活動量の増加を反映したものであると考えられた。また、身体活動量の増加により脳で増加したBDNFは液性因子として、全身循環により血液を介して末梢組織である

A. Cav3.1 mRNA



B. Cav3.2 mRNA

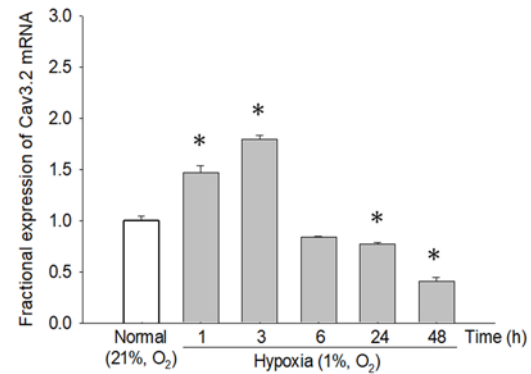


Fig. 6. Changes in the level of Cav3.1 and Cav3.2 mRNA in neonatal rat cardiomyocytes exposed to hypoxia. The time course of Cav3.1 (A) and Cav3.2 (B) mRNA expression in normoxia or hypoxic (1%, O_2) myocytes. Representative data were calculated by $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ and normalized to GAPDH. Data were expressed as mean \pm SD. (n=6). *p < 0.05, compared with the normoxia groups analyzed by One-way repeated measures ANOVA with post hoc test.

心臓 (心房・心室) に豊富に発現するTrkBに作用する可能性が示唆される。その一方でBDNFは、脳から放出される液性因子としての作用だけでなく、心臓においても産生分泌されている可能性も示された。Matthewsらは、運動後の骨格筋でBDNFの遺伝子発現およびタンパク発現が増加する

ことを報告している²²⁾。さらに、細胞を用いた詳細な検討により、BDNF は骨格筋から分泌されるマイオカインである可能性を示した。また、Fukushima らは心不全患者では、血清 BDNF 濃度が低下しており、運動耐容能の低下に BDNF が関与することを報告し、心不全に伴う骨格筋障害に BDNF が関与する可能性を示した²³⁾。心不全患者における BDNF 低下の詳細な分子機序については現在のところ不明であるが、過去の研究や我々の実験結果から、BDNF は骨格筋だけでなく心筋にも豊富に発現し、組織に対して何らかの生理作用を発揮している可能性が示唆されている。今後は、ミトコンドリアの豊富な組織である骨格筋や心筋に多く発現する BDNF がどのような作用で生理学的意義を発揮するかを解明するため、BDNF の持つ筋収縮制御や心筋自動能制御に対する詳細な検討が待たれる。

虚血性心疾患や肺高血圧症患者の血中 BDNF 濃度は健常者に比べて有意に低値を示すことが知られている²⁴⁾。そこで我々は、BDNF は細胞が低酸素に曝露された際に発現が変動する栄養因子であると考えた。本研究では、ラット心筋細胞を低酸素環境下で培養すると、一過性に BDNF mRNA 発現は増加し、その後低酸素環境が継続すると著しく低下することを発見した。急性期における BDNF の発現増加は、細胞が低酸素に曝露された際の生体防御反応であり、細胞分化シグナルの一つであると考えられている³⁾。例えば、急性低酸素曝露による肺高血圧症では、血管平滑筋細胞のカルシウム感受性が亢進するため、細胞内カルシウムや活性酸素種による障害を最小限にし、細胞機能を維持するために BDNF の産生を増

加させる^{2),3)}。一方、低酸素曝露の慢性期では BDNF 発現が低下し、組織や細胞は不可逆性の変化をきたす。慢性肺疾患や心不全患者では血中 BDNF 濃度が低下しており、障害を受けた細胞の修復や再建は困難であるが、低酸素曝露が慢性期に移行する過程で、組織の BDNF の発現の増加が維持されれば肺血管や心筋での虚血に伴うリモデリングが抑制され、BDNF は臓器保護因子として機能することが期待される²³⁾。さらに本研究では、BDNF mRNA 発現の増減に連動して、心筋細胞の自動拍動やそれを制御する T 型 Ca^{2+} チャネル (Cav3.1, Cav3.2) mRNA 発現は変化することも見出した。T 型 Ca^{2+} チャネルは、肥大心など病態下の心筋において発現が増大することで心臓の電気活動に異常をきたすイオンチャネルである²⁵⁾。Wan らは、肺高血圧症モデル動物の肺動脈平滑筋細胞において、L 型 Ca^{2+} チャネル-Cav1.2 及び、T 型 Ca^{2+} チャネル-Cav3.2 の発現が増加することを報告している²⁶⁾。また、Chevalier らは Cav3.1 遺伝子欠損マウスでは、低酸素曝露による肺高血圧症の病態形成が抑制されることも報告している²⁷⁾。以上の所見は、L 型、及び T 型 Ca^{2+} チャネルの発現増加は肺高血圧症の原因である肺動脈平滑筋の収縮やリモデリングの亢進に関与することを示唆している。これらの結果と今回の我々の研究成果から、心筋細胞が低酸素に曝されると細胞内 Ca^{2+} ハンドリング異常が生じその結果、T 型 Ca^{2+} チャネルがリモデリングを生じるという病態心筋の新制御機構が明らかとなった。低酸素環境下では心筋細胞内で BDNF の発現が増加し、それにより T 型 Ca^{2+} チャネルの発現が増大することで自動能を増加させた可能性

が推察される。BDNF と T 型 Ca^{2+} チャンネルの転写制御機序については不明であるが、今後 BDNF 遺伝子のノックダウンや過剰発現実験を行うなどして再確認する必要がある。

心臓特異的に TrkB 遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウスでは、心臓組織における BDNF/TrkB シグナルの異常をきたし、同シグナルが正常に働かなければ心臓は規則的に収縮・弛緩を繰り返すことはできないことを Feng らは報告している²⁸⁾。また、BDNF は細胞が低酸素曝露された際に発現が増加し、低酸素誘導因子(Hif1- α)の転写活性化を介して細胞分化やアポトーシス関連遺伝子の発現を制御することも知られている²⁹⁾。心臓における BDNF/TrkB シグナルの作用については、研究報告は少ないものの、同シグナルは低酸素曝露によるストレス負荷時に活性化され心臓の自動能制御に重要なチャンネルの発現制御を担う可能性が示唆されており、BDNF を介した心筋の電気生理学的変化について今後の詳細な検討が期待される。

BDNF は今後、様々な疾患のサロゲートマーカーとして臨床的に評価されるかもしれない。循環器領域では心臓における病態生理学的意義を解明することによって、BDNF が虚血性心疾患の際の心筋の低酸素状態を反映する診断マーカーとなる可能性が期待される。さらに、BDNF 活性や BDNF 濃度を増加させる薬剤、すなわち選択的セロトニントランスポーター阻害薬 (SSRI) が動脈硬化や心筋梗塞に対する治療薬として臨床応用される可能性も考えられる。また、中枢神経系に対する作用だけでなく、心臓組織からのストレスシグナルによって上

位の中枢シグナルが活性化し、全身循環を介して末梢の病態生理に連関するという新しいメカニズムの存在も示唆される。抑うつ状態やストレス環境下では脳内、及び血中 BDNF が低下するが、SSRI は、脳シナプスに存在するモノアミン受容体や TrkB 受容体を刺激し脳細胞内における BDNF の合成を促進させる。この作用により、注意覚醒能力や活動意欲が向上し、認知症の改善にもつながるとされる^{4), 19)}。また近年、認知症に対して予防効果のある食品として、カマンベールチーズやうこんに含まれるクルクミン、また赤ワインに含まれるレスベラトロールなどが注目されている。これらの食品や食品成分の摂取は、海馬や血中 BDNF 濃度の増加を伴って認知症を改善させることが知られている^{30), 31), 32)}。従って、これまで作用が明らかでなかった既知の栄養素の新たな生理機能の一端を担う分子として BDNF は今後、益々注目されるものと思われる。本研究の進展により、運動などの生活習慣や食習慣の改善を含むこれまで考えられなかった未知の因子と BDNF の関連が明らかにされ、創薬ターゲットとしての BDNF 研究の新展開が期待される。

6. 謝 辞

本研究は、JSPS 科研費 15K08179 の助成を受け遂行しました。

7. 要 約

本研究では、脳由来神経栄養因子 BDNF の心臓における発現動態と低酸素刺激による発現変化について解析した。正常ラットの心臓(心房・心室)では、BDNF 及び TrkB は比較的豊富に発現することがわかった。

さらに、心筋細胞を低酸素環境下で培養すると BDNF/TrkB シグナルは活性化し心筋の自動拍動数や T 型 Ca^{2+} チャンネルの発現を変化させることが判明した。以上の結果より、BDNF 及び TrkB は心筋で豊富に発現し、その発現は病態下で調節を受けることが明らかとなった。

8. 引用文献

- 1) Levy BI, Heusch G, Camici PG. (2019) The many faces of myocardial ishaemia and angina. *Cardiovasc. Res.*, 115: 1460-1470.
- 2) Pries AR, Badimon L, Pries AR, Badimon L, Bugiardini R, Camici PG, Dorobantu M, Duncker DJ, Escaned J, Koller A, Piek JJ, de Wit C. (2015) Coronary vascular regulation, remodelling, and collateralization: mechanisms and clinical implications on behalf of the working group on coronary pathophysiology and microcirculation. *Eur. Heart. J.*, 36: 3134-3146.
- 3) Heusch G. (2016) The coronary circulation as a target of cardioprotection. *Circ. Res.*, 118: 1643-1658.
- 4) Groves JO. (2007) Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol. Psychiatry.*, 12 1079-1088.
- 5) Lewin GR and Barde YA. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Ann. Rev. Neurosci.*, 19: 289-317.
- 6) Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P. (2013) BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, 14: 401-416.
- 7) Rivelli S, Jiang W. (2007) Depression and ischemic heart disease: what have we learned from clinical trials? *Curr. Opin. Cardiol.*, 22:286-291.
- 8) Okada S, Yokoyama M, Toko H, Tateno K, Moriya J, Shimizu I, Nojima A, Ito T, Yoshida Y, Kobayashi Y, Katagiri H, Minamino T, Komuro I. (2012) Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infraction via a central nervous system-mediated pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 32: 1902-1909.
- 9) Lorgis L, Amoueux S, de Maistre E, Sicard P, Bejot Y, Zeller M, Vergely C, Sequeira-Le Grand A, Lagrost AC, Berchoud J, Cottin Y, Rochette L. (2010) Serum brain-derived neurotrophic factor and platelet activation evaluated by soluble P-selectin and soluble CD-40 ligand in patients with acute myocardial infraction. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 24: 525-530.
- 10) Donovan MJ, Lin MI, Wiegen P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S, and Hempstead BL. (2000) Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*, 127: 4531-4540.
- 11) Donovan MJ, Miranda R, Kraemer R, McCaffrey T, Tessorollo L, Mahadeo D, Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L, Toran-Allerand C, Hajjar D, Hempstead BL. (1995) Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells:

- regulation of expression in response to injury. *Am. J. Pathol.*, 147: 309-324.
- 12) Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, Hempstead BL. (1996) Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat. Genet.*, 14: 210-213.
- 13) Wang Y, Morishima M, Zheng M, Uchino T, Mannen K, Takahashi A, Nakaya Y, Komuro I, Ono K. (2007) Transcription factors Csx/Nkx2.5 and GATA4 distinctly regulate expression of Ca²⁺ channels in neonatal rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 42: 1045-1053.
- 14) Morishima M, Wang Y, Akiyoshi Y, Miyamoto S, Ono K. (2009) Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, attenuates T-type Ca²⁺ channel expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 609: 105-112.
- 15) Del Toro R, Levitsky KL, Lopez-Bameo J, Chiara MD. (2003) Induction of T-type calcium channel gene expression by chronic hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 278: 22316-22324.
- 16) Cribbs LL. (2010) T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. *Channels.*, 4:447-452.
- 17) Kaplan DR, Miller FD. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10: 381-391.
- 18) Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorf A, Richartz E, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. (2006) Stage-dependent BDNF serum concentration in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.*, 113: 1217-1224.
- 19) Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. (2002) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res.*, 109: 143-148.
- 20) Ferris LT, Williams JS, Shen CL. (2007) The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 39: 728-734.
- 21) Seifert T, Brassard P, Wissenberg M, Rasmussen P, Nordby P, Stanllknecht B, Adser H, Jakobsen AH, Pilegaard H, Nielsen HB, Secher NH. (2010) Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 298: R372-377.
- 22) Matthews VB, Astrom MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerstrom T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA. (2009) Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia.*, 52: 1409-1418.
- 23) Fukushima A, Kinugawa S, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Yokota T, Matsushima S, Takada S, Kadoguchi T, Oba K, Okita K, Tsutsui H. (2015) Serum brain-derived neurotrophic factor level predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. *J. Card. Fail.*, 21: 300-306.

- 24) Helan M, Aravamudan B, Hartman WR, Thompson MA, Johnson BD, Pabelick CM, Prakash YS. (2014) BDNF secretion by human pulmonary artery endothelial cells in response to hypoxia. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 68: 89-97.
- 25) Takebayashi S, Li Y, Kaku T, Inagaki S, Hashimoto Y, Kimura K, Miyamoto S, Hadama T, Ono K. (2006) Remodeling excitation-contraction coupling of hypertrophied ventricular myocytes is dependent on T-type calcium channels expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345: 766-773.
- 26) Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Voiriot G, Smith KA, Tang H, Ayon RJ, Choudhury MSR, Ko EA, Wang J, Wang C, Makino A, Yuan JXJ. (2013) Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 305: L154-L164.
- 27) Chevalier M, Gilbert G, Roux E, Lory P, Marthan R, Savineau JP, Quignard JF. (2014) T-type calcium channels are involved in hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 103: 597-606.
- 28) Feng N, Huke S, Zhu G, Tocchetti CG, Shi S, Aiba T, Kaludercic N, Hoover DB, Beck SE, Mankowski JL, Tomaselli GF, Bers DM, Kass DA. (2015) Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112: 1880-1885.
- 29) Gao Y, Jing M, Ge R, Lang L. (2016) Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by BDNF protects retinoblastoma cells against chemotherapy-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.*, 414: 77-84.
- 30) Suzuki T, Kojima N, Osuka Y, Tokui Y, Takasugi S, Kawashima A, Yamaji T, Hosoi E, Won CW, Kim H. (2019) The Effects of Mold-Fermented Cheese on Brain-Derived Neurotrophic Factor in Community-Dwelling Older Japanese Women With Mild Cognitive Impairment: A Randomized, Controlled, Crossover Trial. *JAMDA.*, 20: 1509-1514.
- 31) Huang Z, Zhong XM, Li ZY, Feng CR, Pan AJ, Mao QQ. (2011) Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. *Neuroscience Letters.*, 493: 145-148.
- 32) Ali SH, Madhana RM, Athira K.V., Kasala ER, Bodduluru LN, Pitta S, Mahareddy JR, Lahkar M. (2015) Resveratrol ameliorates depressive-like behavior in repeated corticosterone-induced depression in mice. *Steroids.*, 101: 37-42.