

平成21年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390183

研究課題名（和文） 習慣的な自発運動の肺炎予防効果に関する実験的研究

研究課題名（英文） Studies on the prevention of pneumonia by habitual voluntary exercise

研究代表者

竹内 亨（TAKEUCHI TORU）

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00188161

研究成果の概要：

回転車を用いた長期間自発運動を行えるマウス実験システムを確立し、マウスを24週間飼育し、以下の結果を得た。

- (1) マウスは1日平均5.6km 走行した。
- (2) 運動群は非運動群より摂食量は多かったが、内臓脂肪量は少なかった。
- (3) 肺の遺伝子発現解析で、運動群は非運動群より構造タンパク並びに細胞外抗酸化酵素遺伝子の発現が高く、サーファクタント関連タンパク・細胞内抗酸化酵素・殺菌関連タンパクの遺伝子発現が低かった。

習慣的な自発運動は肺の遺伝子発現を変容させることが明らかになり、宿主の肺炎感受性や肺機能を修飾する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度	7,600,000	0	7,600,000
2007年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	14,600,000	2,100,000	16,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：習慣的運動、自発運動、肺、肺炎、遺伝子発現、自然免疫、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

習慣的な運動は健康保持増進に必須である。運動により確実に負荷のかかる臓器に肺があるが、習慣的な運動が肺の分子にどのような影響を及ぼすかを検討した研究は全くない。一方高齢化の進展に伴い、肺炎を含む呼吸器疾患の増加が予想される。

習慣的な運動が肺にどのような変化を引き起こすのか、肺炎予防や肺機能の維持に有

効かを分子レベルで解析する必要があると考え、本研究を企画した。

2. 研究の目的

マウスに強制運動ではなく、精神的・身体的負担の少ない自発運動を行わせ、肺炎予防に関与すると考えられる遺伝子群の発現にどのような変化が生じるかを検討する。解析遺伝子は、病原体認識に関わる遺伝子群、殺

菌に関わる遺伝子群、酸化ストレスの防御修復に関わる遺伝子群並びに肺機能に関与する遺伝子群とした。

高齢者の肺炎予防の観点から、高齢者肺炎の起炎菌で難治性の肺炎を引き起こす薬剤耐性緑膿菌の発生機構についても検討した。

3. 研究の方法

既に得ていた 10 週間の水泳運動を負荷したラットの肺（液体窒素凍結後 -80°C で保存したもの）を用い、Trizol で mRNA を抽出し oligo-dT を用い cDNA を合成後、Real Time PCR で Toll Like Receptors (TLR) 並びに抗酸化酵素群の遺伝子発現を解析できるか検討した。mRNA を用い、DNA アレイ解析も行った。

販売され入手できる回転車付きケージ（6 面金属製で床が金属網状、図 1 右）でマウスを飼育し、体重、摂食量、運動量を測定した。20 週間の飼育後肺を採取し、液体窒素で凍結後 -80°C で保存した。同時に内臓脂肪、筋肉、心臓等を採取し、凍結保存した。回転車の付いていないケージ（6 面金属製で床が金属網状、図 1 左）で飼育したマウスを非運動群とした。

金属製の網床ケージで飼育したマウスは、通常のプラスチックの床に木屑を敷き詰めたケージで飼育したマウスに比べ体重が軽かったため、通常のプラスチックケージに回転車を設置できるように改良した（図 2）。改良ケージを用いマウス（A/J マウス、6 週齢、雌）を飼育し、体重、摂食量、運動量を測定した。非運動群マウスは、運動群と居住容積が同じになるよう金属製の隔壁を挿入したプラスチックケージで飼育した。24 週間の飼育後、臓器を採取し前述の方法で凍結保存した。採取した肺から Trizol を用い mRNA を抽出し oligo-dT を用い cDNA を合成後、Real Time PCR で、TLR 群 (Tlr1, 2, 3, 4, 9)、抗酸化酵素群 (Sod1, 2, 3, Cat, Gpx1)、活性酸素産生酵素群 (Cyba (p22phox)、Ncf1 (p47phox)、Nos1, 2, 3)、surfactant タンパク関連遺伝子群 (Sftpa1, Sftpb, c, d, Abca3, Cebpa)、がん抑制遺伝子群 (Cdkn1a, 2a, Rb1, Trp53)、DNA 修復酵素 (Ogg1)、Hmox1 (hemeoxygenase-1)、構造タンパク {Actb (β -actin)、Eln (elastin)} の遺伝子発現を定量的に解析した。mRNA を用い DNA アレイ解析も行った。マウスは運動群、非運動群 8 匹ずつで実験を開始したが、給餌トラブルにより遺伝子発現解析を行ったのは運動群 8 匹、非運動群 6 匹である。

遺伝子発現については、Gapdh の発現量で解析遺伝子の発現量を補正し、非運動群の発現を 1 とした場合、運動群では発現が何倍増加したかを示した。なお Gapdh 並びに群間比較を行った遺伝子については、Real Time PCR 終了後電気泳動を行い、PCR 産物が単一であ

ることを確認した。

飼育週齢に伴う摂食量並びに体重の群間比較は二元配置の分散分析で、卵巣周囲脂肪量並びに遺伝子発現の群間比較は t 検定で解析した。 $p < 0.05$ は*、 $p < 0.01$ は**で表示した。

薬剤耐性菌研究については、緑膿菌 (ATCC27853) を ethylmethanesulfonate (EMS), N-methyl-N-nitrosourea (MNU), 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU), 1,6-dinitropyrene (DNP) に暴露し、rifampicin (Rif) 並びに ciprofloxacin (CPFX) 耐性緑膿菌が発生するか否かを検討した。耐性菌並びに親株から DNA を抽出し、Rif 耐性菌については rpoB 遺伝子、CPFX 耐性菌については gyrA 遺伝子の塩基配列を解析し、遺伝子変異が発生しているか検討した。

4. 研究成果

液体窒素凍結後 -80°C で保存したラット肺から DNA アレイ解析が可能な mRNA を抽出できること、その mRNA を用い Real Time PCR で解析可能な cDNA を合成できることを確認した。

金属製の網床ケージ（図 1）で飼育したマウスは、通常のプラスチック製の床に木屑を敷き詰めたケージで飼育したマウスに比べ、低体重の傾向があったため、回転車をプラスチックケージに装着できるように改良した（図 2）。プラスチックケージで運動したマウスは金属網床ケージで運動したマウスよりも有意に体重が重く、プラスチックケージの方が負担が少ないと考えられたため、以後プラスチックケージでマウスを飼育した。



図 1. 金属製網床ケージ。左: 非運動群用ケージ。右: 運動群用回転車付きケージ。



図 2. プラスチック製回転車付きケージ。

運動群マウスは専ら夜間に走行し、実験期間中1日平均5.6km走行した(図3)。運動群マウスは非運動群マウスよりも摂食量は有意に多かった(図4)。体重は運動群マウスが非運動群マウスより低値であったが、有意差は認めなかった(図5)。卵巣周囲の内臓脂肪量は運動群が有意に少なかった(図6)。

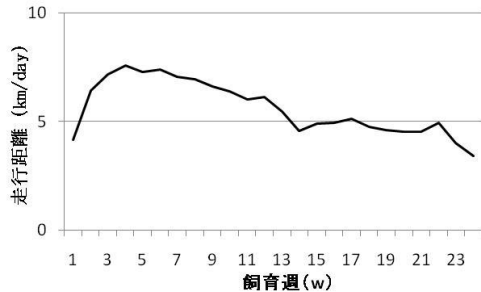


図3. 運動群の走行距離と飼育週の関係。

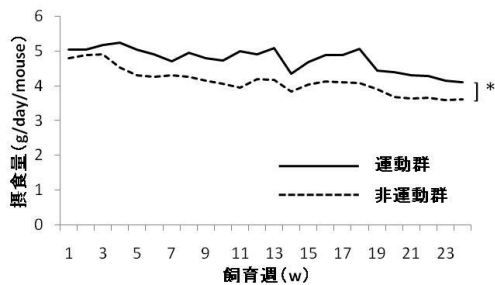


図4. 摂食量と飼育週の関係。

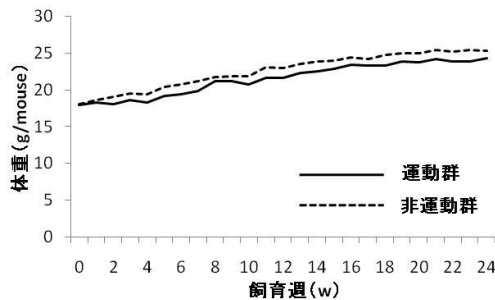


図5. 体重と飼育週の関係。0は運動開始前の各群マウスの体重。

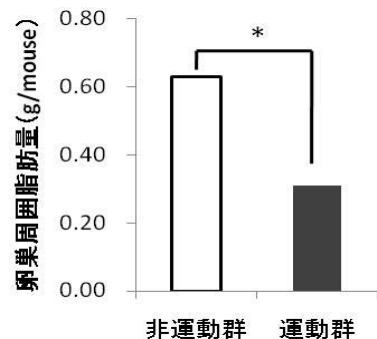


図6. 運動群と非運動群の内臓脂肪量。

習慣的な自発運動が病原体認識能に影響を与えるか否かを検討するため、運動群と非

運動群のTLR遺伝子群の発現を検討した。塩基配列情報が得られたマウスTlr1, 2, 3, 4, 9の発現を検討した結果、いずれの分子においても両群間に有意な差を認めなかった(図7)。

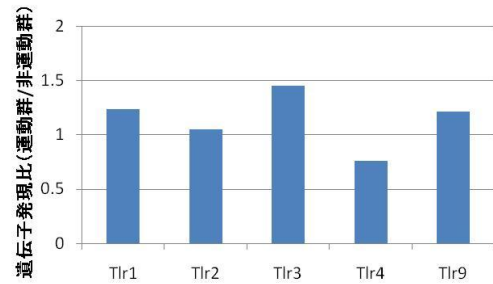


図7. 運動によるTLR関連遺伝子の発現変化。

殺菌に関与する活性酸素/窒素種(O₂・、NO[•])を産生するタンパクの遺伝子発現を解析した。いずれの分子も運動群で発現が低下していた(図8)。なおiNOS(Nos2)並びにnNOS(Nos1)については肺での発現が低く、解析出来なかった。

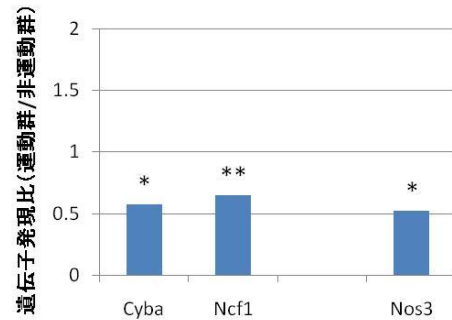


図8. 運動による殺菌関連遺伝子の発現変化。

活性酸素種消去系酵素の発現を検討したところ、細胞内の活性酸素種消去系酵素であるSod1(CuZn-SOD), Sod2(Mn-SOD), Gpx1の発現は運動群で低下し、細胞外酵素であるSod3(EC-SOD)の発現は運動群で増加していた。Catについては運動による影響を認めなかった(図9)。Hmox1やOgg1の発現には運動の影響を認めなかった。

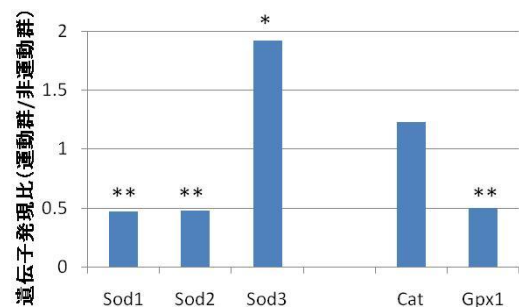


図9. 運動による活性酸素消去系遺伝子の発現変動。

細胞内の構造タンパクである Actb (β -actin) 並びに細胞外の構造タンパクである Eln (elastin) は運動で有意に発現が増加した (図 10)。

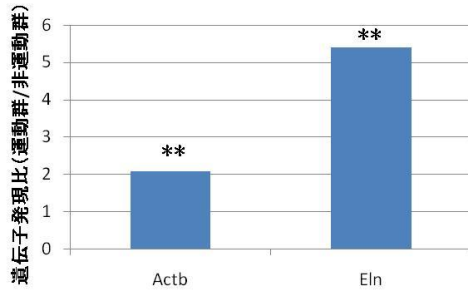


図 10. 運動による構造タンパク遺伝子の発現変動。

Surfactant タンパク関連遺伝子の発現は Cebpa を除いて運動群で有意に低下していた (図 11)。Cebpa の発現についても、運動群は非運動群の 0.78 ($p=0.14$) であった。

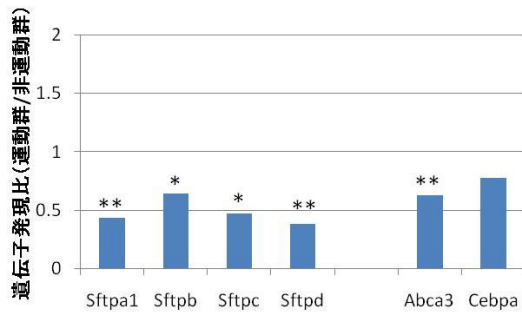


図 11. 運動による surfactant タンパク関連遺伝子の発現変動。

がん抑制遺伝子の発現については、運動群で Cdkn1a (p21) 並びに Trp53 (p53) の発現が低下していたが、Cdkn2a (p16) 並びに Rb1 (Rb) の発現には差を認めなかった (図 12)。

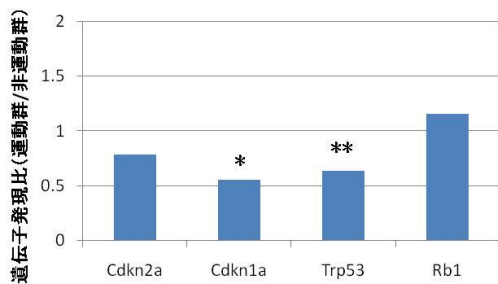


図 12. 運動によるがん抑制遺伝子の発現変動。

緑膿菌を EMS, MNU に暴露することにより、Rif 並びに CPFX 耐性菌の出現頻度が有意に増加した。Rif 耐性緑膿菌には Rif 耐性結核菌で検出されるアミノ酸置換が発生していた。CPFX 耐性菌では、患者から分離される CPFX

耐性緑膿菌と同じ変異が gyrA 遺伝子に発生していた。BCNU に暴露した緑膿菌では Rif 耐性菌の発生頻度が有意に増加した。CPFX 耐性菌の頻度も増加したが、実験回数が少なく有意な増加とは結論できていない。DNP に暴露した緑膿菌でも Rif 並びに CPFX 耐性菌の出現頻度は増加したが、有意性については BCNU 同様結論を下せていない。

本研究により、マウスに負担をかけず長期間自発運動を負荷する実験システムを確立することができた。マウスが専ら夜間運動すること、1日の走行距離が 5.6km に達すること、運動により摂食量は増えるが体重は低下傾向を示し、内臓脂肪量が減少することが明らかになった。これらの結果は、本実験システムにより負荷される運動が、マウスの健康に影響を与えるに十分な負荷になっていることを示すと考えられる。

習慣的な自発運動を行うことで肺の遺伝子発現に変化が生じることが明らかになった。運動が、肺機能に関与する surfactant タンパク関連遺伝子や構造タンパク遺伝子の発現を修飾することから、習慣的な自発運動が肺機能や肺炎感受性に対し影響を与えることが予測された。これらの遺伝子発現変動の原因として、運動に伴う呼吸数や換気量の増加による機械的負荷の増加を推察している。

高齢者の肺炎並びに尿路感染症の重要な起炎菌である薬剤耐性緑膿菌の発生に環境変異原や抗がん剤が関与することが明らかになり、新たな耐性菌発生制御対策が必要であることが示唆された。

本研究を行うことで数々の新しい知見を得ることができた。本課題を採択して頂いたことを心から感謝申し上げます。今回の運動実験結果の再現性の検討、解析遺伝子の追加、遺伝子発現変動が何を意味するか並びに肺の健康度や肺炎感受性との関連性についての考察、変異原物質による薬剤耐性菌発生に対する定量的解析等、現在さらに研究を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

- Okamoto A, Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Chiba N, Maeda A, Fukunaga T, Miyawaki S, Matsuguchi T. Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice European Journal of Oral Sciences. 2009;117:238-247. 査

- 読有り
- ② Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, Ohnishi T. JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2009;24(3):398-410. 査読有り
 - ③ Takumi S, Komatsu M, Aoyama K, Watanabe K, Takeuchi T. Oxygen induces mutation in a strict anaerobe, *Prevotella melaninogenica*. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(10):1857-62. 査読有り
 - ④ 竹内亨: 運動による健康保持増進. 鹿児島県医師会報, 73-74, 平成20年5月号. 査読無し
 - ⑤ Yaomura T, Tsuboi N, Urahama Y, Hobo A, Sugimoto K, Miyoshi J, Matsuguchi T, Reiji K, Matsuo S, Yuzawa Y. Serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, regulates renal cell apoptosis in ischaemia/reperfusion injury. *Nephrology (Carlton).* 2008;13(5):397-404. 査読有り
 - ⑥ Kusumoto M, Xu B, Shi M, Matsuyama T, Aoyama K, Takeuchi T. Expression of chemokine receptor CCR4 and its ligands (CCL17 and CCL22) in murine contact hypersensitivity. *J Interferon Cytokine Res.* 2007;27(11):901-10. 査読有り
 - ⑦ Nong Q, Komatsu M, Izumo K, Indo HP, Xu B, Aoyama K, Majima HJ, Horiuchi M, Morimoto K, Takeuchi T. Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR-induced cytogenotoxicity. *Free Radic Res.* 2007;41(12):1326-37. 査読有り
 - ⑧ Xu B, Aoyama K, Kusumoto M, Matsuzawa A, Butcher EC, Michie SA, Matsuyama T, Takeuchi T. Lack of lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 enhances allergic airway inflammation in mice. *Int Immunol.* 2007;19(6):775-84. 査読有り
 - ⑨ Owatari S, Akune S, Komatsu M, Ikeda R, Firth SD, Che XF, Yamamoto M, Tsujikawa K, Kitazono M, Ishizawa T, Takeuchi T, Aikou T, Mercer JF, Akiyama S, Furukawa T. Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer. *Cancer Res.* 2007;67(10):4860-8. Erratum in: *Cancer Res.* 2007;67(13):6528. 査読有り
 - ⑩ Komatsu M, Furukawa T, Ikeda R, Takumi S, Nong Q, Aoyama K, Akiyama S, Keppler D, Takeuchi T. Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Toxicol Sci.* 2007;97(2):407-16. 査読有り
 - ⑪ Chiba N, Masuda A, Yoshikai Y, Matsuguchi T. Ceramide inhibits LPS-induced production of IL-5, IL-10, and IL-13 from mast cells. *J Cell Physiol.* 2007;213(1):126-36. 査読有り
 - ⑫ Shi M, Wang X, Yamanaka T, Ogita F, Nakatani K, Takeuchi T. Effects of Anaerobic Exercise and Aerobic Exercise on Biomarkers of Oxidative Stress. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 2007;12:202-208. 査読有り
 - ⑬ Masuda A, Hashimoto K, Yokoi T, Doi T, Kodama T, Kume H, Ohno K, Matsuguchi T. Essential role of GATA transcriptional factors in the activation of mast cells. *J Immunol.* 2007;178(1):360-8. 査読有り
 - ⑭ Bandow K, Nishikawa Y, Ohnishi T, Kakimoto K, Soejima K, Iwabuchi S, Kuroe K, Matsuguchi T. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1beta expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. *J Cell Physiol.* 2007;211(2):392-8. 査読有り
 - ⑮ Matsugo S, Sasai M, Shinmori H, Yasui F, Takeuchi M, Takeuchi T. Generation of a novel fluorescent product, monochlorofluorescein from dichlorofluorescein by photo-irradiation. *Free Radic Res.* 2006;40(9):959-65. 査読有り
 - ⑯ Arima Y, Nishigori C, Takeuchi T, Oka S, Morimoto K, Utani A, Miyachi Y. 4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicol Sci.* 2006;91(2):382-92. 査読有り
 - ⑰ Ohnishi T, Kakimoto K, Bandow K, Lowenstein CJ, Daikuhara Y, Matsuguchi T. Mature hepatocyte growth factor/scatter factor on the surface of human granulocytes is released by a mechanism involving activated factor Xa. *J Immunol.* 2006;176(11):6945-53. 査読有り

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① 出雲公子、堀内正久、川口博明、竹下温子、青山公治、竹内亨. 自発運動が肺がん発症に与える影響: 化学発がんモデルマウスを用いた検討. 第 79 回日本衛生学会. 平成 21 年 3 月 30 日, 東京
- ② 竹下温子、堀内正久、出雲公子、青山公治、竹内亨. 長期の習慣的な運動が血中アミノ酸に与える影響. 第 79 回日本衛生学会. 平成 21 年 3 月 30 日, 東京
- ③ 宮原恵祢子、内匠正太、宮之原弘晃、西順一郎、吉家清貴、小田紘、小松正治、青山公治、堀内正久、竹内亨. 変異原物質による薬剤耐性菌の誘発に関する研究. 第 79 回日本衛生学会. 平成 21 年 3 月 30 日, 東京
- ④ 堀内正久、出雲公子、川口博明、青山公治、竹内亨. 習慣的運動が発がんに影響を与えるか? : 回転車付きケージと肺がん易発症マウスを用いた評価モデルの確立 第 2 報. 第 6 回日本予防医学会, 平成 20 年 11 月 29 日, 東京
- ⑤ 米澤千花、出雲公子、坂東健二郎、小松正治、青山公治、堀内正久、松口徹也、竹内亨. 習慣的運動による遺伝子発現の変動. 第 78 回日本衛生学会, 平成 20 年 3 月 31 日, 熊本
- ⑥ Nishie M, Takumi S, Miyanohara H, Nishi J, Yoshiie K, Oda h, Komatsu M, Aoyama K, Horiuchi M, Kishi F, Takeuchi M, Takeuchi T. Environmental mutagens as a possible cause for the emergence of drug resistant bacteria. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens/36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 平成 19 年 11 月 29 日, 北九州
- ⑦ 堀内正久、出雲公子、川口博明、小松正治、青山公治、竹内亨. 習慣的運動が癌の発症に影響を与えるか? : 回転車付きケージと肺癌易発症マウスを用いた評価、モデルの確立. 第 5 回日本予防医学会, 平成 19 年 11 月 24 日, 鹿児島
- ⑧ 出雲公子、小松正治、青山公治、坂東健二郎、堀内正久、松口徹也、竹内亨. 抗老化サプリメント、Dehydroepiandrosterone (DHEA) の安全性に関する研究. 第 77 回日本衛生学会, 平成 19 年 3 月 26 日, 大阪

〔図書〕(計 3 件)

- ① 青山公治、竹内亨、古野純典: 森林と運動療法, 森本・宮崎・平野編: 森林医学, 75-91, 朝倉書店, 東京, 2006
- ② 竹内亨: 環境保健, 産業衛生, 岸・古野・小泉・大前編: New 予防医学・公衆衛生学改訂第 2 版, 240-246, 288, 南江堂, 京

都, 2006

- ③ 竹内亨: 酸素高感受性生体システム(嫌気性菌)における酸化ストレス(分担), 吉川編: 酸化ストレス-フリーラジカル医学生物学の最前線 ver. 2, 59-62, 別冊医学のあゆみ, 医歯薬出版, 東京, 2006

〔その他〕

研究成果一部を以下のサイトに掲載した。
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/%7Eei-sei001/Research%20project.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 亨 (TAKEUCHI TORU)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 00188161

(2) 研究分担者

松口 徹也 (MATSUGUCHI TETSUYA)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 10303629

堀内 正久 (HORIUCHI MASAHISA)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 50264403

青山 公治 (AOYAMA KOUJI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号: 70117472

小松 正治 (KOMATSU MASAHARU)
鹿児島大学・水産学部・助教
研究者番号: 30325815

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

出雲 公子 (IZUMO KIMIKO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・大学院学生
研究者番号: なし

宮原 恵祢子 (MIYAHARA EMIKO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・大学院学生
研究者番号: なし