

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500700

研究課題名（和文）細菌・ウイルス感染と運動パフォーマンス低下との関連性についての応用研究

研究課題名（英文）Applied research on the relationship between bacterial/viral infections and reduction of exercise performance

研究代表者

矢野 博己 (YANO HIROMI)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：20248272

研究成果の概要（和文）：細菌・ウイルスに対する感染防御機能は、疲労困憊運動によって抑制をうけること、その一方で、身体活動性は免疫による感染防御機能によって抑制をうけることが示された。運動による免疫抑制は、運動後の骨格筋を中心とした炎症を最小限に抑える生体防御反応であり、逆に免疫発動による運動制御は、運動エネルギーを節約し、感染防御にそのエネルギーを優先的に供給する生体防御反応であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have shown that protection against bacterial and/or viral infections is inhibited by an intense exercise, and physical activity is inhibited by the immune defense function after infection. Immunosuppression due to the intense exercise is a reasonable reaction defense to minimize the inflammation with a focus on skeletal muscle after exercise. On the other hand, the regulation of physical activity by the immune function saves energy consumption, and that is a system that gives higher priority to energy use for immune reaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：病原体関連分子、TLRs、疲労困憊運動、自発運動、マウス

1. 研究開始当初の背景

アスリートだって風邪をひく。Nieman の「J-カーブモデル」(1994)や Pedersen の「オープンウインドウ説」(1994)（運動免疫学二大学説）からすれば、アスリートほど風邪をひきやすい、ことになる。しかし、風邪をひけば感染初期からパフォーマンスが低下するというのが常識であろうが、何故パフォーマンスが低下するのかのメカニズムは

正直言ってわかっていない。

2. 研究の目的

実際の感染症は、様々な細菌やウイルスによって引き起こされることから、それぞれの病原体関連分子を認識する Toll 様受容体 (TLRs) の反応性について検討し、身体活動性との関連性を明らかにすることを目的とした。

さらに、TLRs による認識とその後の反応性が身体活動性にどのように影響し、そのメカニズムにはどのようなメディエーターが関与するのかを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物には、主として C3H/HeN 雄性マウス (10 週齢前後) を使用した。

(2) 病原体関連分子

用いた細菌関連分子は、TLR4 によって認識されるグラム陰性細菌多糖体 [リポポリサッカライド: LPS (*E.coli* 由来)]、TLR2 に認識される細菌関連分子としては、グラム陽性菌タンパク質 [ペプチドグリカン: PGN (*S.aureus* 由来)] を用いた。さらに、TLR5 に認識される鞭毛タンパク質 (フラジェリン: FG) は、サルモネラ菌 (*S.enterica* 由来) を使用した。

さらにウイルス関連分子を用いた検討で使用したのは、TLR3 に認識されるウイルス RNA [二本鎖 RNA アナログ:

polyriboinosinic: polyribocytidylic acid (PolyI:C)]、TLR7/TLR8 に認識されるウイルス RNA [一本鎖 RNA アナログ: イミダゾキノリン (imidazoquinoline) 系 R-848]、および TLR9 に認識されるウイルス DNA アナログ (CpGDNA: ODN1826) の 3 種とした。

(3) 疲労困憊運動時の TLRs を介した免疫応答

マウスは疲労困憊運動群: EX、及び非運動群: N-EX に分け、トレッドミルによる疲労困憊運動、または安静約 60 分間を負荷した。疲労困憊運動直後、イソフルラン麻酔下で、細菌およびウイルス関連分子を 1~10mg/kg それぞれ静注し、経時的採血を行い、血液を採取した。また、同条件下で、 β 遮断剤プロプラノロール 10mg/kg(ip) 処理を行ったマウスも使用した。

(4) 自発運動量に及ぼす TLRs を介した免疫応答の影響

回転ケージ内で予備飼育したマウスに、それぞれ 0~10 mg/kg になるよう、細菌およびウイルス関連分子を滅菌済み生理食塩水に溶き、眼窩静脈叢から投与 (イソフルラン麻酔下) した。回転ケージを用いた自発運動量の測定を経時的に実施した。測定は、60 分間ごとに自動測定システムを用いて行った。なお投与時刻は、非活動期の 13:00 前後とし、明暗サイクルは、8:00-20:00 明期の 12 時間サイクルとした。

(5) 血中サイトカイン動態の測定

細菌およびウイルス関連分子は、マウスの

眼窩静脈叢から投与し、投与後 1、3、6、24 時間後に採血を実施した。採血は、眼窩静脈叢から行った (イソフルラン麻酔下)。測定項目は、NF- κ B 関連サイトカイン (炎症性サイトカイン) として、TNF- α 、また Type I インターフェロン (抗ウイルス性サイトカイン) として IFN- α /IFN- β をそれぞれ ELISA 法にて測定した。

(6) TLRs の細胞機能解析

培養実験には、主としてマウスマクロファージ細胞株 RAW264 を用いた。種々の病原体関連分子刺激による TLRs 発現の変化、および TLRs の病原体分子との親和性をフローサイトメトリー法により、また TLRs 遺伝子発現の変化を RT-PCR 法で評価した。さらに ELISA 法を用いて、TLRs を介したサイトカイン産生を評価した。

(7) 腸管、肝、肺、脾の TLRs 発現とサイトカイン産生能の評価

腸管 (結腸部)、肝、肺、脾を無菌的に摘出し、RNA を抽出した。逆転写反応後、cDNA をリアルタイム PCR 法によって増幅し、定量化を図った。用いたプライマーは、TLRs (TLR2,3,4,5,7,8,9)、TNF- α 、IFN- β およびハウスキーピング遺伝子としての GAPDH とした。また一部の組織は、クライオスタットにて凍結切片を作成し、抗 TLRs 抗体による免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 運動時の免疫応答

高い強度の運動や疲労困憊運動など過酷な運動負荷は一過性の免疫抑制を引き起こすとされている。1994 年 Bente Pedersen (デンマーク) によって提唱された「オープンウインドウ説」は運動免疫学 2 大仮説の 1 つとしてこれまで多くの研究成果に支持されてきた (David Nieman (アメリカ) の「J-カーブモデル」とともに)。実際に、自然免疫を代表する好中球、マクロファージ、NK 細胞いずれの働きも激運動によって低下したとする報告もなされている。さらに動物実験モデルでは、ヘルペスウイルスやインフルエンザウイルスによる感染悪化、さらには致死が増加するとの報告も複数の研究室から出されている。近年、この激運動と免疫抑制のメカニズムが明らかとなりつつある。

大腸菌細胞外膜を構成する内毒素 LPS は、自然免疫応答を強く惹起することでよく知られている。この LPS は免疫細胞を主とした細胞表面に発現した TLR4 を介して認識される。その後、細胞内シグナル伝達を介して NF- κ B の核内移行を促し、種々の遺伝子発現が誘導され、さらにこの情報を元にサイトカインやケモカインなどの合成、そして分泌が

開始される。しかし、この免疫応答も疲労困憊運動を負荷した後では、著しく抑制されることが報告されてきた。我々は、アドレナリンβ受容体の特異的に阻害することで、激運動による免疫低下を抑制できることを明らかにした(図1)。運動による免疫抑制因子として、アドレナリンやノルアドレナリンといったカテコラミンと、副腎皮質ホルモン(グルココルチコイド)の可能性が指摘されてきたが、どうやらカテコラミンの影響が大きい様である。

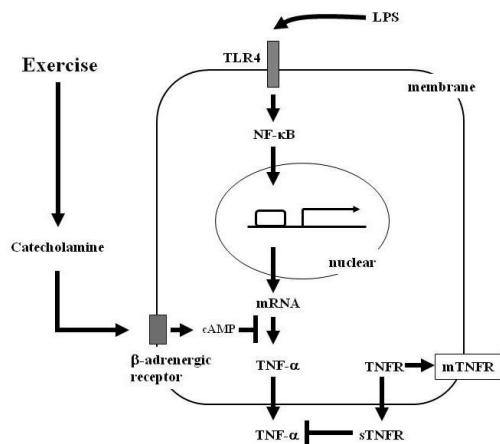


図1 運動によるLPSに対するTNF-α抑制機構

さらに、一本鎖RNA(ssRNA)を認識するTLR7を介して生じるTNF-α産生が運動で抑制されることから、この現象はウイルス感染の場合にもあてはまる可能性が示唆されている。カテコラミンは細胞膜上α-およびβ-アドレナリン受容体に結合し、このホルモン受容体複合体はGタンパク質を介してアデニール酸シクラーゼを活性化、その結果、ATP由来のcAMPはプロテインキナーゼAをリン酸化し活性型に変化させる。この機構にはNF-κB抑制を介した系とNF-κB非依存性の抑制機構が知られており、運動がどちらか、あるいは両方の作用により抑制されるのかは不明であった。今回、我々(2010)はTNF-α mRNAを抑制することなく、運動によるTNF-α抑制が生じていることを明らかにし、この結果からは、運動によるカテコラミンを介したTNF-α産生抑制機構はNF-κB非依存性の抑制機構の可能性が有力となっている。すなわち、遺伝子発現以降の翻訳過程での抑制が示唆されたのである。この反応は中等度以下の運動強度では生じない。さらに、ウイルス感染モデルとしてTLR7/8のアゴニストであるイミダゾキノリン(imidazoquinoline)系R-848を用いた実験でも、疲労困憊運動によるカテコラミンを介したTNF-α産生抑制が示された。

エキセントリック運動に代表される骨格筋の過剰な伸展張力発揮の繰り返しは、筋線

維に微細な損傷を生じさせる。局所的なメカニカルストレスが招く構造的破壊と考えられるが、白血球の浸潤とともに、活性酸素産生、筋タンパク質の分解、サイトカインや成長因子の生成、組織修復が時系列的に生じる。遅発性筋肉痛といった不定愁訴を経験することも事実である。実は、過酷な運動負荷によって生じる一過性の免疫機能の抑制はこれらと深くかかわっていると考えることができる。運動直後の筋線維の構造的破壊は、免疫細胞にとって炎症を引き起こす格好の因子である。仮に疲労困憊運動後に炎症性サイトカインの産生抑制がもし引き起こされないとすれば、過激な炎症状態が筋肉各所で引き起こされ、我々の生命は危険極まりない痛みと、発熱と、浮腫に見舞われるであろう。これをカテコラミン分泌という中枢制御でコントロールされているとするならば、運動する我々動物にとって非常によくできたシステムであると言わざるを得ない。さらに、この制御が翻訳以降の抑制によって引き起こされることを考慮れば、その回復は遺伝子発現抑制と比較して短期的な(まさしく一過性のオープンウィンドウ状態)反応であり、回復を速やかに促し、破壊された筋肉の修復を再会させる反応へとシフトしやすくなるものと考えられる。

運動がもたらす生命維持に必要な優先順位を中枢が序列化した結果、免疫機能は一時的に後回しにされたと考えられることができる。実に合目的な反応であり、そこには近年注目される休養と運動免疫の関係性が垣間見られるのである。すなわち、よりクリーンな環境を激運動後に確保する休養法こそがオープンウィンドウ時に対する必要不可欠な休養行動であるとの考え方である。

一方で自然免疫機能の補償作用が全く存在しないわけではない。実際には激運動後のマクロファージ貪食能の亢進、好中球やNK細胞数の動員などが知られており、個々の機能低下を補償する仕組みがある程度働くことも明らかである。驚くことに、これらは巧妙に仕組みられた機構によって働いていることに気がつく。マクロファージは炎症性サイトカインを主として産生するが、激運動時にはこの作用は抑制され、貪食作用のみが亢進する。骨格筋由来とされるIL-6は運動で急増するが、増加した好中球の活性化とともに、抗炎症作用を発揮して過剰な全身性の炎症を制御している。さらに、NK細胞数の増加もカテコラミンによる作用と考えられており、NK細胞はその顆粒に含まれる細胞膜に小孔をあけるパーフォリンやセリンプロテアーゼ系でミトコンドリア由来のアポトーシスを誘導するグランザイムを用いて速やかに感染細胞や癌化細胞を死滅へと誘導する。正しくは自殺を促すという解釈がよいの

かもしれない。運動時の自然免疫による生体防御を中枢制御の観点から整理することで、驚異の生体機能に驚かされる。

(2) 感染防御と身体活動性 (図 2)

私たちは、細菌やウイルス感染時には様々な不定愁訴を訴えるが、こうした発熱、下痢、悪寒、痛みなどとともに身体活動性の著しい低下 (sickness behavior) も経験する。身体活動性の低下がどのように発症するかについての理解はいまだ乏しい。

LPS は TLR4 を介して NF- κ B の核内移行を促す。その後、種々の遺伝子発現を惹起する。こうした経路を介した炎症など種々の免疫反応の結果、いわゆる身体活動性の低下が表現型として出現することになる。TLR4 突然変異型 (C3H/HeJ) マウスの場合、野生型 (C3H/HeN) マウスと比較すると、LPS 投与による身体活動性の低下が出現しなくなる。明らかに TLR4 を介して LPS 誘導性の身体活動低下を引き起こされることを示しているのであるが、その下流に位置する炎症性サイトカインを中和抗体や阻害剤でブロックしてもこの反応が認められた。TLR4 認識後、LPS シグナルは何を介して身体活動性の低下をひきおこすかは依然不明である。我々が見出したのは、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX) によって誘導されるプロスタグランジン (prostaglandin: PG) E₂ の作用である。LPS によって亢進する PGE₂ 産生は TLR4 変異マウスでは有意に抑制される。さらに COX 阻害剤であるインドメタシン (indomethacin: IM) を前処理した野生型マウスでも、IM 濃度依存的に身体活動性の低下が改善されるようになる。しかし完全には抑制できないことから、身体活動性の低下は複合的な要因によるものと考えられるが、その中の 1 要因である可能性は大である。PGE₂ は EP₂ および EP₄ 受容体を介して中枢性の痛みを増強させると考えられており、TLR4 を介した身体活動性の低下も、最終的にはこうした中枢神経制御によるものかもしれない。

一方で、実際には LPS のみが細菌感染時の身体活動性の低下に関与する訳ではない。非常に巧妙にできた身体活動性と微生物認識との関係が近年知られるようになってきた。グラム陰性菌のひとつであるサルモネラ菌感染モデル実験から、生菌と死菌では生体の認識機構が異なるのである。LPS はグラム陰性菌細胞外膜の構成成分ではあるが、サルモネラ生菌の感染認識は LPS ではなく、鞭毛を構成するたんぱく質、フラジェリンであることが示された。こうした生菌の場合、LPS 活性中心であるリピッド A は構造的に細胞破壊が生じない限り TLR4 と直接接することはできない。したがって、生菌の場合に

は初期感染を認識するのはフラジェリンであり、この認識には TLR5 が主たる TLRs として機能している。

我々が感染症と診断される場合の多くは、実際には風邪などを代表とするウイルス感染による場合が多い。当然のことながらウイルス関連分子の認識機構と身体活動性についても理解する必要がある。二本鎖 RNA (dsRNA) のアナログとして、polyriboinosinic: polyribocytidylic acid (poly I:C) を、TLR7/TLR8 に認識されるウー一本鎖 RNA (ssRNA) のアナログとして R-848 を用いた実験結果では、身体活動性の低下が確認された。このように poly I:C は TLR3 に、R-848 は TLR7/8 に認識されることから、TLR3、TLR7/8 を介したウイルス感染による身体活動性の低下も今回明らかとなった。

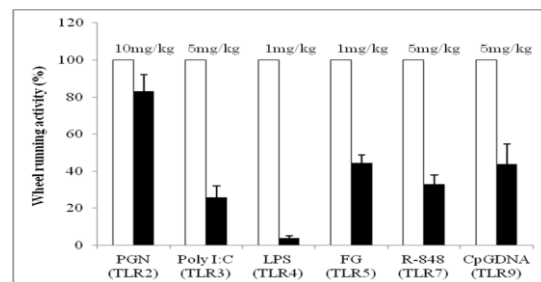


図 2 TLRs を介した身体活動性の変化

今回我々が明らかにした運動と免疫に関する種々の現象を基に、その生理学的解釈についての言及をさらに深めることで、生体の活動性と局所での免疫応答の関連がよりいっそう明らかになるものと期待される。今後、スポーツ選手のコンディショニングに資する免疫分野からのアプローチ研究への発展が必要となるであろう。

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 5 件)

① Uchida M, Oyanagi E, Kremenik MJ, Sasaki J, Yano H: Interferon-beta, but not tumor necrosis factor- α , production in response to poly I:C is maintained despite exhaustive exercise in mice. The Journal of Physiological Sciences, 査読有, 62, 2012, 59-62.

DOI: 10.1007/s12576-011-0177-4

② Yano H, Uchida M, Nakai R, Kawanishi N, Kato Y, Kremenik MJ, Shiva D: Exhaustive exercise reduces TNF- α and IFN- α production in response to R-848 via toll-like receptor 7 in mice. European Journal of Applied Physiology, 査読有,

110, 2010, 797-803.

DOI: 10.1007/s00421-010-1560-1

- ③ Tanaka Y, Kawanishi N, Shiva D, Tsutsumi N, Uchida M, Kitamura H, Kato Y, **Yano H** : Exhaustive exercise reduces tumor necrosis factor- α production in response to lipopolysaccharide in mice. *NeuroImmunoModulation*, 査読有, 17, 2010, 279-286.
DOI: 10.1159/000290044

〔学会発表〕 (計 20 件)

- ① **矢野博己** : 筋損傷後の炎症・修復過程におけるマクロファージ走化性と分化の関連性. 第 68 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2011 年 11 月 12 日, 島根大学教育学部 (島根県)
- ② **矢野博己** : オープンウィンドウ回復時の身体活動性. 第 66 回日本体力医学会大会, 2011 年 9 月 18 日, 海峡メッセ下関 (山口県)
- ③ Kitamura H : Moderate exercise training do not improve LPS-induced TNF- α reduction after exhaustive exercise. The 10th International Society of Exercise and Immunology (ISEI) Symposium, 2011 年 7 月 12 日, University of Oxford (UK)
- ④ **矢野博己** : 医, 食, 運動: 健康で長生きするために健康をもとめて —免疫学がおしえてくれた運動の不思議—. おかやまバイオアクティブ研究会 第 39 回シンポジウム (招待講演), 2011 年 6 月 10 日, 川崎医科大学 (岡山県)
- ⑤ **矢野博己** : シンポジウム「自然免疫と感染防御—Toll like receptor を介した免疫応答と運動—」. 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, 2011 年 3 月 30 日, 東日本震災のため誌上発表
- ⑥ **矢野博己** : オープンウィンドウ学説の解明—TNF- α を指標として—. 第 66 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2010 年 11 月 21 日, 徳島大学 (徳島県)
- ⑦ **矢野博己** : LPS 誘導性 TNF- α 産生は疲労困憊運動によって抑制される. 第 65 回日本体力医学会大会, 2010 年 9 月 18 日, 千葉商科大学 (千葉県)
- ⑧ **矢野博己** : 教育講演「運動免疫学から個体差を考える」. 第 65 回日本体力医学会大会, 2010 年 9 月 17 日, 千葉商科大学 (千葉県)
- ⑨ **矢野博己** : シンポジウム「細菌およびウイルスモデルに対する免疫応答と運動」. 第 65 回日本体力医学会大会, 2010 年 9 月 17 日, 千葉商科大学 (千葉県)
- ⑩ **Yano H** : The response of voluntary physical activity to R-848 via TLR7 in mice. 57th Annual Meeting of The American College of Sports Medicine, 2010 年 6 月 4

日, Baltimore (USA)

- ⑪ **Yano H** : Exhaustive exercise reduces TNF- α and IFN- γ production in response to R-848 via toll-like receptor 7 in mice. 9th Symposium of the International Society of Exercise and immunology, 2009 年 9 月 22 日, Tübingen (Germany)
- ⑫ **Yano H** : The response of voluntary physical activity via TLR3 and TLR7/8 in mice. 56th Annual Meeting of The American College of Sports Medicine, 2009 年 5 月 27 日, Seattle (USA)

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 宮村実晴 (編) **矢野博己** 他: 真興交易 (株) 医書出版部, 運動生理学のニューエビデンス, 2010, 442-450.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 博己 (YANO HIROMI)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授
研究者番号: 20248272

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: