

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700777

研究課題名(和文) 運動が腸管免疫の変化に及ぼす影響～抗菌ペプチドによる検討～

研究課題名(英文) Effect of exercise on gut immunity by the antibacterial peptide.

研究代表者

谷村 祐子 (Tanimura, Yuko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90551458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)： 抗菌ペプチド(マウスにおけるcryptdin)は、腸管内に分泌される物質として自然免疫の中心を担う。本研究は急性及び継続的な運動がcryptdinに及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。一過性運動において、cryptdinは炎症性マーカーとともに増加傾向にあった。一方で、自発ホイール運動しているマウスに対するDSS腸炎の発症は、炎症性マーカーとcryptdinは増加させた。以上のことから運動によるcryptdinの変化が炎症性マーカーに影響を与えることを示唆した。

研究成果の概要(英文)： Mouse Paneth cell defensins, termed cryptdins, plays a central role in innate immunity as a substance that is secreted into the intestinal tract. The purpose of this study was to examine the effects of acute exercise and chronic exercise on the cryptdin. In acute exercise, cryptdin was tended to increase with increasing inflammatory markers. On the other hand, DSS colitis in voluntary wheel running mice were increased both cryptdin and inflammatory markers. Consequently, we suggested that a change in cryptdin by exercise affects the inflammatory markers.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学，スポーツ生化学

キーワード：抗菌ペプチド 腸管免疫 運動

## 1. 研究開始当初の背景

トライアスロンやマラソンなどの激運動は、腹痛・下痢・血便などの様々な消化器疾患を誘起する一方で、適切な運動は大腸がんを抑制すると言われている (Peters *et al.*, Gut, 2001). こうした知見は疫学的なものが多く、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。

本研究で着目する defensin は、腸粘膜上皮細胞、特に陰窩に存在するパネート細胞から刺激により腸管内に分泌される抗菌ペプチドであり、自然免疫応答の中心的役割を果たしている

運動と defensin に関しては、上気道感染症に対する効果の検証として運動前後の唾液 defensin を検討して、運動後に増加することが報告されている (Davison G *et al.*, Eur J Appl Physiol., 2009). しかしながら、この 1 報のみであり、腸における defensin の検討は報告されていない。

以上のことから、本研究は運動が免疫に与える影響を自然免疫における感染防御の主要役となりうる defensin に着目して、運動による defensin の変化と他の免疫マーカーとの関連性や疾患に対する影響を検討することによって、運動が免疫に与える影響におけるメカニズム解明への可能性を提示する

## 2. 研究の目的

本研究は、急性及び継続的な運動が小腸の抗菌ペプチド defensin に及ぼす影響について明らかにすることを目的とする。尚、マウスにおける  $\alpha$ -defensin は cryptdin である。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗菌ペプチド発現の小腸の局在

8 週齢の雄性 c57BL/6 マウスを用いた。体重測定後、無処置・処置群に分けた。処置群のマウスに腸に対する虚血再灌流処置を行った (上腸間膜動脈の結紮による虚血 30 分と結紮解除による再灌流 60 分)。処置後、小腸遠位、中間位、近位を各々 6 cm 採取し、cryptdin-4 (マウスにおける  $\alpha$ -defensin) の発現量を RT-PCR 法にて測定した。

### (2) 拘束ストレスによる小腸 cryptdin-4 の変化

8 週齢の雄性 Balb/c マウスを用いた。体重

でコントロール群と拘束群に分けた。拘束群は 4 日間連続で 9:00-13:00 に 50ml シリンジチューブを用いて、チューブ内の長さが 6 cm になるようにし、拘束した。解剖は小腸遠位部を用いて、cryptdin-4 の発現を測定した。

### (3) 加齢と運動トレーニングによる cryptdin-4 の変化

8 週齢、 $15 \pm 1$  か月齢の c57BL/6 雄性マウスを用いた。8 週齢を若齢群とし  $15 \pm 1$  か月齢を加齢群とした。運動群にはトレッドミル走行運動を週 3 回、4 週間行った。運動強度及び時間は徐々に増加させ、後半 2 週間は 20m/min 30 分の運動を実施した。解剖は最終トレーニングより 2 日後に小腸遠位部を摘出して cryptdin-4 の発現を RT-PCR 法にて測定した。

### (4) 一過性運動による cryptdin-4 の経時的変化と腸管免疫、腸内細菌の変化

8 週齢の Balb/c 雄性マウスを用いた。マウスを 4 群に分け、安静時群、運動直後群、運動 3 時間後群、運動 6 時間後群に分けた。運動はトレッドミル装置を用い、30m/min、60 分を行った。解剖は小腸遠位部を用いて、cryptdin-4 の発現を測定した。さらに小腸洗浄液 (PBS で腸管を洗い出した液) で IgA を測定した。また腸管免疫に関する因子として、 $\beta$ -defensin-4, toll like receptor4 (TLR4), polymeric Ig receptor (pIgR),  $\alpha$ -chain, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), 腸のタイトジャンクションの指標となる ZO-1 を測定した。

### (5) 自発ホイール運動が DSS (Dextran Sulfate Sodium) 腸炎に与える影響

6 週齢の Balb/c 雄性マウスを用いた。ランニングホールをケージ内に入れて 4 か月間飼育する自発性ランニング運動群とケージ内に何も入れないコントロール群に分けた。腸炎を発症させるために解剖 1 週間前に 4 日間 2.5% の DSS 溶液を自由飲水させた。3 日間の回復期間を設けた。解剖は大腸の cryptdin-4 の発現を測定した。また腸管免疫に関する因子として、TNF $\alpha$ , KC,  $\beta$ -defensin-4 を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 抗菌ペプチド発現の小腸の局在

小腸 cryptdin-4 の発現は無処置群より処置群で有意に低く、中間位及び遠位部分で処置群が有意に低いことが示された (図 1)

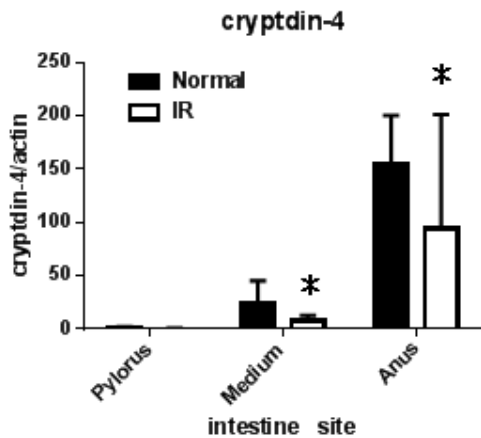


図1 抗菌ペプチド発現の小腸の局在  
IR:虚血再灌流  
\* $p < 0.05$  vs Normal : 同一部位での比較

この結果から、小腸遠位部が最も cryptdin-4 の発現量が高く、部位においてはおよそ刺激時の反応性は変わらないものと考えられる。

以上のことから、本研究課題には小腸遠位部を用いて実験を行った。

### (2) 拘束ストレスによる小腸 cryptdin-4 の変化

小腸 cryptdin-4 の発現は拘束ストレスによって有意に低下した。拘束ストレスは、免疫系をコルチゾール増加によって、抑制させる作用がある。免疫抑制が続いたある程度続いた場合、cryptdin-4 は低下することが示唆された。

### (3) 加齢と運動トレーニングによる cryptdin-4 の変化

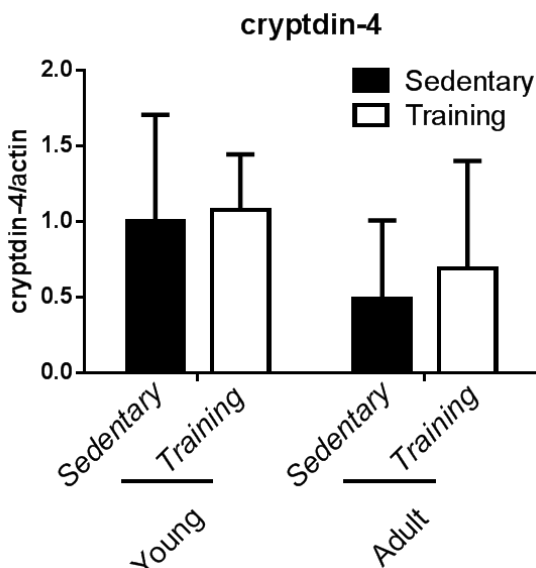


図2 加齢と運動トレーニングによる cryptdin4 の変化

小腸 cryptdin-4 の発現は二元配置分散分析において加齢群において若齢群よりもその発現は有意に低下したものの、トレーニングによる影響は認められなかった(図2)

加齢は、免疫を低下させる。慢性的な免疫低下の状態は cryptdin-4 を低下させようと推察される。

一方で本実験でのトレーニングプロトコルでは、加齢による cryptdin-4 の低下を抑制することは出来なかった。

### (4) 一過性運動による cryptdin-4 の経時的変化と腸管免疫、腸内細菌の変化

小腸 cryptdin-4 は一過性高強度運動によって、統計学的な変動は認められなかった(図3)

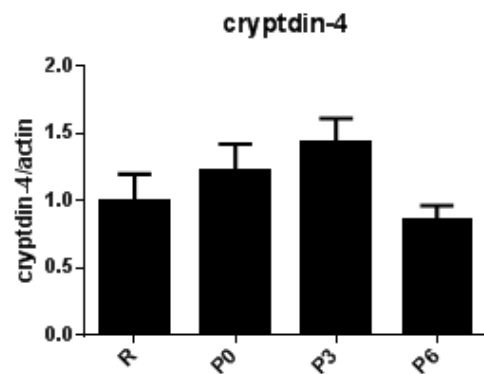


図3 一過性高強度運動による cryptdin4 の変化

一方で一過性運動においては運動終了6時間後に TLR4, pIgR,  $\beta$ -defensin-3, ZO-1 の発現は安静時と比較して減少した。運動終了3時間後に TNF $\alpha$ ,  $\alpha$ -chain が増加した。

これらのことから、一過性運動後に遺伝子レベルにおいては消化管粘膜においても、免疫抑制作用が生じる可能性が示唆された。しかしながら、小腸洗浄液 IgA は運動3,6時間後に安静時よりも増加した。消化管粘膜においてもタンパクレベルでの検証が必要である。

一方で小腸陰窩で発現する cryptdin-4 と同じ抗菌ペプチドであり、粘膜に発現している  $\beta$ -defensin-3 は挙動が異なった。

### (5) 自発ホイール運動が DSS (Dextran Sulfate Sodium) 腸炎に与える影響

本モデル(DSS 腸炎)は、先行研究において自発ホイール運動による消化管の炎症が抑制されるモデルであった。

DSS の投与は cryptdin-4 を増加させる。本研究においても、CON 群と比較して Run 群で有意な増加認められた(図4)。

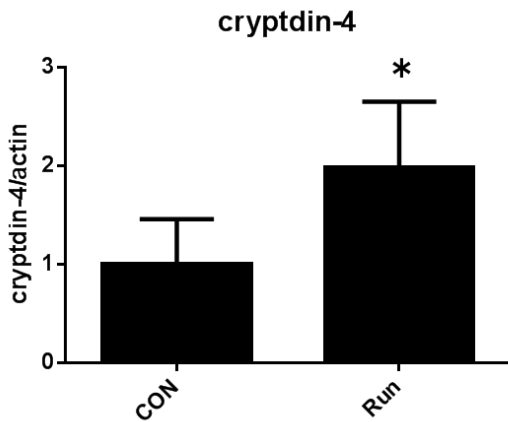


図4 長期間ホイールランニング運動後のDSS処置に対するcryptdin-4の変化  
\* $p < 0.05$  vs CON

$\beta$ -defensin-3 は、自発ホイール運動後のDSS処置に対して、変化を与えなかった。しかし、炎症マーカーであるTNF $\alpha$ 、KCは増加した。本研究ではDSS投与期間、自発ホイール運動を継続して行った。このため、循環系が亢進して、Run群の炎症マーカーが増加したのではないかと考える。実際に、体重減少及び肉眼的所見ではRun群の方がDSS腸炎の症状が重篤であった。

以上のことから、cryptdin-4は運動の刺激によつての変動が小さいものであると示唆された。しかしながら、持続的な刺激や変化(加齢のような)ものに対しては変化するものと考えられる。

炎症に対して、cryptdin-4が単球からのTNF $\alpha$ 、KC分泌能を促進させるとの報告があるため、本研究においてもそれらを支持した結果になったと思われる。

運動トレーニングにおいては、運動トレーニングがDSS腸炎を制御する実験プロトコルの上で再度、cryptdin-4の発現を検証したいと考える。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

Yuko Tanimura, Wataru Aoi, Tomohisa Takagi, Yuji Naito, Toshikazu Yoshikawa.

The effect of exercise training on gastrointestinal tract in aged mice.

10<sup>th</sup> International Sports Exercise Immunology symposium, 2011(Oxford, England)

谷村祐子, 青井渉, 水島かつら, 内藤裕二, 吉川敏一

一過性運動における盲腸内容物中の腸内細菌叢の変化  
第68回日本体力医学会大会, 2013.(東京, 日本)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

谷村 祐子 (Yuko Tanimura)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 90551458