

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：20104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20042

研究課題名（和文）アスリートはなぜ風邪をひきやすいのか 運動ストレスによる口腔内の免疫応答の理解

研究課題名（英文）Why the athletes catch a cold easy for? Understanding the immune response in the mouth due to exercise stress

研究代表者

丸山 洋介（Maruyama, Yosuke）

名寄市立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：50748910

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ハーフマラソンによる運動ストレスによって誘導される口腔内のストレス応答について、唾液のプロテオーム解析を行う事でその一端を明らかにした。唾液タンパク質の定量プロテオーム解析ではcystatin S(CST4)、Kallikrein 1(KLK1)とImmunoglobulin Kappa(IGK)が抑制因子として同定した。CST4やKLK1は抗菌活性有すると考えられ、IGKはIgAの補助マーカーとして報告されている。またハーフマラソン2時間後のIGHA1とCST4、IGKに相関があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動ストレスの研究で唾液は血液中ホルモン量や身体疲労の程度を測る指標として用いられる事がほとんどである。本研究ではハーフマラソン前後の唾液を詳細に解析する事で、運動ストレスにおける口腔内の局所的なストレス応答の一端を明らかにした。解析の結果から、ハーフマラソン程度の運動においても、局所的な免疫の抑制が誘導されていると考えられた。また、同定されたCST4は身体的なストレス以外に精神的なストレスでも変化する事が報告されている。精神的なストレス時のCST4の変化はIGHA1の変化とは異なっている事から、IGHA1とCST4を解析する事で人のストレス状態の把握に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Half marathon(HM) affected salivary secretion amount and IGH A1 secretio. In addition, CST4 and KLK1 were suppressed 2h and 4h post HM, IGK was suppressed in post 2h HM. CST4 and IGK were correlated with IGH A1 post 2h HM. Since CST4, KLK1, and IGH are presumed to have antimicrobial activity, it is assumed that immune activity is decreased in the oral cavity after HM. Furthermore, CST4 and IGK were correlation with IGH A1 post 2h HM. The CST4 were regulated with mental stress as same as IGH A1, the IGK were considered to supplementary marker for IGH A1. Our findings of this study can be applied to health management of recreation runner and people who engage in high to middle intensity physical activities in daily life.

研究分野：運動生理学

キーワード：運動ストレス 局所ストレス応答 唾液 プロテオーム 口腔

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

長期的な負荷の高い運動やマラソンやトライアスロンなどの一過的に高い負荷のかかる運動を行うと、一時的に免疫が抑制される。高強度な運動を行った後に起こる一時的な免疫抑制現象はオープンウィンドウ現象と呼ばれ、オープンウィンドウ状態では、一過的に免疫が抑制される結果、上気道感染症に罹患するリスクが高くなる。免疫の抑制状態では、体内リンパ球数の減少、CD4、CD8T 細胞の減少、口腔内の唾液量や唾液中 IgA (SIgA) やディフェンシンなどの抗菌性タンパクが減少する事が報告されている。これらの現象は運動ストレスによって交感神経が活性化され、IL-10 が誘導され、炎症性サイトカインが抑制される結果、免疫抑制が起こる事が示唆されている。

これまでの知見から上気道感染症に罹患するリスクが高まる原因は、体内の免疫抑制と共に、病原菌の認識機構が運動ストレスにより調節(乱される)される事によって、病原菌に対する初期応答が適切に誘導されず、免疫応答を正常に誘導できない事も要因ではないかと考えた。そこで強度の運動ストレスによって、病原菌やウイルスの認識と抵抗性の誘導機構が抑制(もしくは乱される)される事で感染が起こると仮説をたてた。

### 2. 研究の目的

強度の運動ストレスによる体内の免疫抑制は身体的疲労や神経系シグナルの活性化によって誘導される。結果として日常的に強度のトレーニングを行うアスリートや、マラソンなど一過的に過度な運動ストレスに晒される運動を行うと、上気道感染症に罹患する危険性が高まる。これまでの研究では、病原菌やウイルスが感染する初期段階について知見が乏しく、運動ストレスによって病原体の感染初期の認識機構やシグナル伝達がどのように調節されるかについて不明な部分が多い。本研究では病原菌やウイルスの感染の最前線である口腔に着目して、運動前後の口腔粘膜のトランスクリプトーム解析と唾液中のタンパク質のプロテオーム解析を行う事で、運動ストレスによって調節される免疫応答の初期段階を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)強度の高い運動を行った際の口腔粘膜における転写因子を網羅的に解析し、運動によって特異的に変化する候補因子を同定する。

(2)強度の高い運動を行った際の口腔内の唾液のプロテオーム解析を行い運動によって特異的に変化する候補因子を同定する。

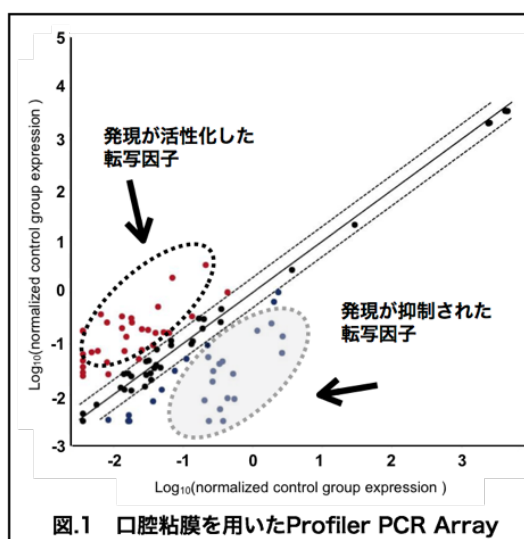
### 4. 研究成果

#### (1)ハーフマラソン前後の口腔粘膜を用いた Profiler PCR Array

ハーフマラソンの1時間前と2時間後の口腔粘膜をサンプリングして Qiagen 社の Profiler PCR Array を用いて免疫応答に関与する代表的な転写因子の発現解析を行った。結果、マラソン前と後を比較すると、発現が活性化された遺伝子が11、抑制された遺伝子が59あった。活性化した因子では NF $\kappa$ B シグナルに関与する因子やアポトーシスに関与する因子があり、抑制された因子には TLR に関与する因子が含まれていた(図.1)。

#### (2)ハーフマラソン前後の唾液の定量プロテオーム解析

ハーフマラソンの1時間前と2時間後の唾液をサンプリングしてプロテオーム解析を行った。結果4089個の因子を同定する事ができた。また Salivary Protein Wiki に記載されている唾液タンパクと比較したところ1024因子が共通していた。唾液由来と考えられる因子の中でペプチド数が1以上であり、ハーフマラソン前と比較して  $P < 0.05$  の因子が6個ありその中でも0.7倍以下、1.5倍以上変化した因子は4つ同定する事ができた(図.2)。



(3) ウェスタンブロッティングによる運動群と非運動群の解析

iTRAQ による解析で有意差のあった因子について、運動群でハーフマラソン前、ハーフマラソン後2時間と4時間後について、非運動群ではサンプリングの1<sup>st</sup>、2<sup>nd</sup>と3<sup>rd</sup>について解析を行った。結果、運動群においてハーフマラソン後2時間ではCST4 ( $p < 0.05$ )、KLK1 ( $p < 0.05$ )とIGK ( $p < 0.05$ )がハーフマラソン前と比較して抑制されていた。ハーフマラソン後4時間ではCST4 ( $p < 0.01$ )とKLK1 ( $p < 0.05$ )が抑制されていた。一方、非運動群では変化がなかった(図. 3)。

(4) IGHA1 と CST4、KLK 1 の相関

運動における免疫状態や、ストレス状態を示すマーカーである IGHA1 と本研究で同定された因子について相関関係を検証した。結果 CST4 ( $P=0.048$ ,  $r=0.221$ )とIGK ( $P=0.041$ ,  $r=0.247$ )がハーフマラソン後2時間で相関関係が示唆された(図. 4)。

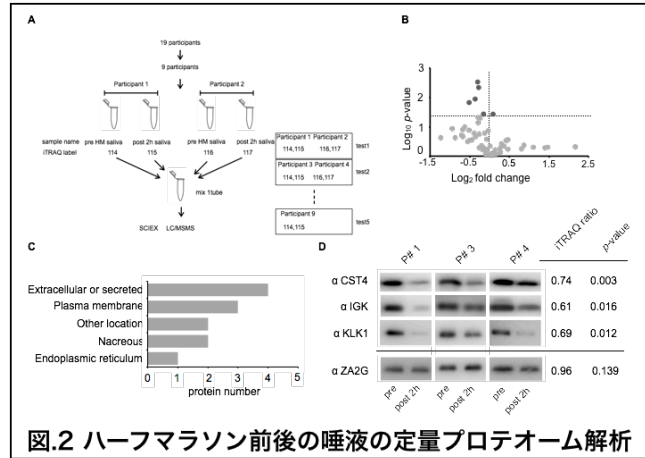


図.2 ハーフマラソン前後の唾液の定量プロテオーム解析

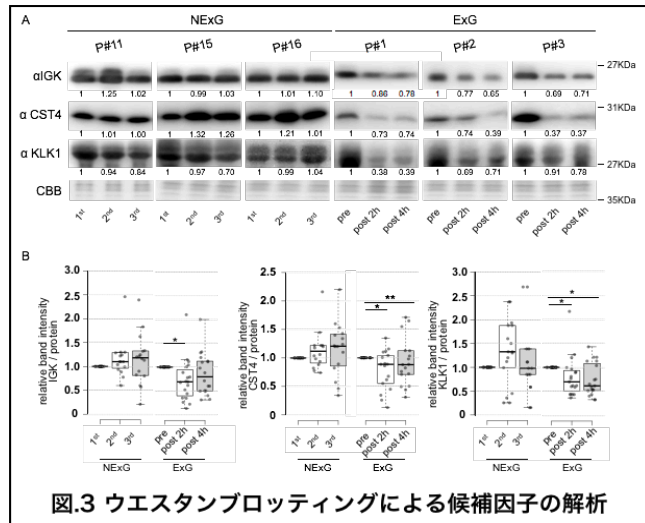


図.3 ウェスタンブロッティングによる候補因子の解析

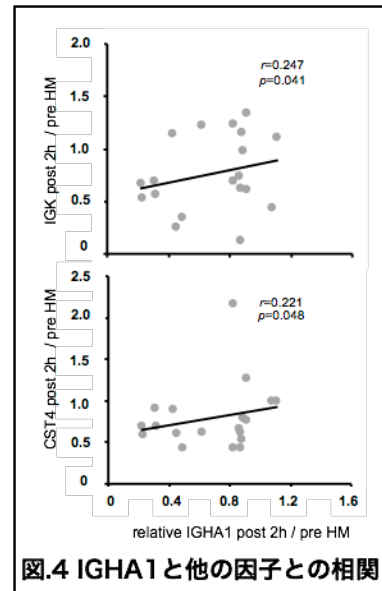


図.4 IGHA1 と他の因子との相関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山洋介, 森仁志
2. 発表標題 open window状態における唾液タンパク質の定量分析
3. 学会等名 29回 運動生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山 洋介
2. 発表標題 強度運動ストレス時の口腔内応答の理解
3. 学会等名 運動生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山洋介, 田邊宏基, 安藤清一, 関朋昭
2. 発表標題 アスリートはなぜ風邪をひきやすいのか 運動ストレスにより口腔内粘膜で誘導される転写因子の解析
3. 学会等名 北海道体育学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------