

機関番号： 11301

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20300226

研究課題名（和文） 運動に伴う免疫系の変動のメカニズムとその意義に関する研究

研究課題名（英文） Mechanisms and significance of alterations in the immune system induced by exercise stress

研究代表者

永富 良一 (NAGATOMI RYOICHI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号： 20208028

研究成果の概要（和文）：運動やストレスに伴う腸管防御的 HSP70 の発現増強は副腎皮質ホルモンと TLR による腸内細菌認識の双方に依存していることを明らかにした。逆に腸管 TLR による腸内細菌認識は免疫担当細胞非依存的に腸管運動を抑制するとともに損傷骨格筋の回復過程に強く影響し、筋力トレーニングの効果が腸内環境に依存する可能性が示唆された。一方、骨格筋線維は収縮時に免疫系非依存的にサイトカイン IL-6 およびケモカイン CXCL1,5 を分泌すること、IL-6 分泌はグリコーゲン減少条件においてカルシニューリン、NFATc1 を介して促進的調節が行われていることを *in vitro* で明らかにした。また *in vivo* でも骨格筋収縮にともないケモカイン CXCL5 の転写レベルが増加するものの、蛋白レベルでの増加は筋損傷時だけであり、epigenetic な調節の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Stress enhanced gut protective HSP70 expression at colon epithelia was found to be mediated both by TLR recognition of commensal bacteria and stress-induced glucocorticoid. Alternatively, stimulation of intestinal smooth muscle TLR reduces intestinal motility, and the absence of TLR stimulation by commensal bacteria greatly affects repair process of damaged skeletal muscle. Secondly, skeletal muscle cells per se were found to secrete cytokine IL-6 and chemokines CXCL1,5 upon electrically stimulated contraction. Under reduced intracellular glycogen level, contracting myotubes effectively produces IL-6 depending on calcineurin activated NFATc1 translocation into nucleus. Muscle contraction induces production of CXCL5 mRNA *in vivo*, but CXCL5 protein was only detected when muscle damage was induced.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：体力科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学（スポーツ免疫学）

キーワード：腸管免疫、腸内細菌、骨格筋、ケモカイン、運動

1. 研究開始当初の背景

スポーツにともない上気道炎リスクの変化や腸管刺激症状などが起こる。一方スポーツなどにより身体活動を増加させると炎症指標である血中 CRP は低下する。このように運動やスポーツは免疫系や炎症に少なからず影響を与えている。しかしなぜ変化が起こるのかはほとんど明らかになっていない。運動の前後では血中の免疫担当細胞である白血球およびその分画、サイトカインや炎症性蛋白なども条件によって大きく変動する。しかし好中球数など大きく臨床的標準値から逸脱する一部の指標を除き、サイトカインや炎症性蛋白の変動は統計的に有意であっても臨床的には正常範囲内である。このような変化にどのような意義があるのか、また変化のメカニズムについてもまだ不明な点が多い。

われわれはこれまで主に免疫系の運動やストレスに伴う変化のメカニズムを追求してきた。運動やストレス下では自律神経内分泌系の変化が免疫担当細胞の体内分布に影響することを示してきた。特に免疫系の最前線にある腸管免疫に注目し運動・ストレス時に起こる変化のメカニズムを追求してきた。腸管粘膜上皮内のリンパ球は糖質コルチコイド依存的に胸腺依存性サブセットの減少が起こり、分布が変化しない胸腺非依存性サブセットも機能的には抑制がみられることを明らかにしてきた。また運動にともない産生される糖質コルチコイドにより CD4 リンパ球上のケモカイン受容体 CXCR4 が増加すること、受容体の増加は血流中の循環リンパ球の減少につながることをつきとめている。すなわち運動やストレス時の免疫担当細胞の変化は自律神経系や内分泌系に依存し、分布の変化と機能的な変化が起こることを明らかにしてきた。しかしその意義は不明である。

一方、骨格筋で IL-6 が産生されることはよく知られている。動静脈較差の実験結果から、産生された IL-6 が肝臓に働き糖新生を促している可能性が指摘されている。しかしその後、免疫系外の組織では骨格筋のみならず骨芽細胞なども IL-6 を分泌することがあり、なぜ分泌されるかは未だに明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 免疫系の最前線である腸管の防御機能が運動やストレス時にどのような影響を受けるか明らかにすること。逆に腸管免疫系の変化が運動機能の主役である骨格筋にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを第一の目的とした。

①小腸・大腸において食物に接する上皮は物理化学的なストレスに常に暴露され

ながら消化吸収を行っている。上皮細胞はこのような環境にあって機能を維持するために、常に増殖・分化成熟・脱落のプロセスを繰り返し更新されている。さらに大腸上皮は過酷な環境においての機能を維持するために常時熱ショック蛋白を発現して上皮機能を維持している。熱ショック蛋白の発現には自然免疫系のパターン認識分子の一つである Toll-like-receptor (TLR) 4 による腸内細菌の LPS の認識が必要である。運動やストレス下では HSP70 系の発現が増強する。運動やストレスにおける HSP70 系発現のメカニズムを明らかにする。

②腸内細菌の自然免疫系による認識が腸管上皮の防御および機能の維持に必要であれば、それが損なわれたときに腸管機能がどのような影響を受けるかを明らかにする。

③腸内細菌の自然免疫系による認識が腸管上皮の防御および機能の維持に必要であれば、それが損なわれたときに腸内細菌の食物からの栄養素供給を必要とする運動機能の中核である骨格筋組織の適応能力に変化を来すか否かを明らかにする。粘膜免疫がトレーニング効果の一つでもある骨格筋の損傷からの回復過程に影響を及ぼすか否かを検討する。

(2) 骨格筋収縮に伴い分泌される免疫調節因子サイトカインやケモカインを網羅的遺伝子解析で明らかにし、それらがどのようなメカニズムで産生されるかを明らかにすること。

①サイトカイン産生に対する骨格筋収縮の役割を明確にするために電気刺激に応答して収縮する培養筋細胞を用いて、どのようなサイトカインが産生されるのか、また収縮の条件と環境がサイトカイン産生に影響する要因を明らかにする。

②電気刺激により強縮させた腓腹筋におけるサイトカインの発現パターンを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腸管上皮に対する運動・ストレスの影響

① ストレッサーとして副腎皮質ホルモン Corticosterone の血中濃度が 5 倍以上増加する 2 時間の拘束ストレスを用いた。腸内細菌の除去は抗生物質カクテルを毎日 1 週間ゾンデにより経口投与を行うことに加えて、1 週間飲水ボトルの水を抗生物質カクテル溶液に置換した。腸内細菌除去マウスには腸内細菌構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) をゾンデを使用し 1 週間経口投与も行った。腸内細菌は新鮮な糞便を採取し好気性菌・嫌気

性菌をそれぞれ同定、定量した。大腸上皮の HSP70 の発現を免疫組織染色および Western Blotting で局在評価および半定量を行うことにより腸管防御能の指標とした。副腎皮質ホルモン遮断薬として RU486 を投与し、下垂体・副腎皮質系ストレス応答の効果を確認した。腸内細菌の認識に関わる受容体として TLR2,4、腸管上皮間の tight junction の構成蛋白 ZO-1 の局在を免疫組織染色・発現レベルを Western Blotting にて評価した。また LPS が対応する受容体 TLR4 に到達しているか否かを確認するために、蛍光ラベルした LPS を結紮した腸管内に注射針で投与し、拘束ストレスの効果を確認した。

- ② 自然免疫系の応答の第一歩となる LPS を認識する TLR4 が小腸・大腸いずれも腸管固有筋層での豊富な発現がみられたことから、腸管の運動機能に対する LPS の影響を検討した。摘出小腸をマグヌス管に設置、寒流益虫で両端をストレインゲージに連結し、ムスカリン受容体刺激在ベタネコールで律動的収縮を誘導したときの LPS 投与の効果を検討した。TLR4 ノックアウトマウスから摘出した小腸でも同様の実験を行った。また腸管平滑筋の TLR4 を介した反応であることを確認するために腸管内において平滑筋以外に TLR4 を発現するマクロファージをクロドロネートを用いて除去し、LPS の腸管収縮応答に対する影響を検討した。
 - ③ 粘膜免疫の腸内細菌の認識がトレーニング効果に及ぼす影響を腸内細菌除去による損傷骨格筋の回復過程の観察により検討した。腸内細菌除去は 1) a) と同様のプロトコールで実施した。骨格筋損傷はマウスの片側の腓腹筋に蛇毒 cardiotoxin を投与し、損傷前、損傷後 1、3、5、7、10、14、21 日目の体重、健側および損傷側の腓腹筋重量、腓腹筋の組織標本を作製し、腸内細菌除去の効果を確認した。同様の検討を腸内細菌除去マウスに LPS を投与した場合および TLR4 ノックアウトマウスにおいて行った。
- (2) 骨格筋収縮にともなうサイトカインの産生とそのメカニズムの検討
- ① 培養筋芽細胞 C2C12 をコンフルエントになるまで増殖させ血清除去により分化誘導を行ったのちに持続的パルス電気刺激を開始することにより電気刺激に応じて収縮する高度分化型培養筋細胞を作成する。高度分化誘

導後に電気刺激を行わない状態の筋細胞と、電気刺激開始後 2 時間以上経過した細胞から蛋白・mRNA を抽出し、mRNA の網羅的解析を行った結果、炎症性サイトカイン IL-6 とケモカイン CXCL1 および CXCL5 の収縮に伴う発現増強が認められたことから、これらの発現に関わる細胞条件および細胞内シグナル伝達分子の解析を行った。

- ② マウス後肢運動計を用い麻酔下のマウスの腓腹筋を電気刺激により強縮させ、強縮と同時に電動モーターにより固定した足趾を強制的に背屈させ伸長性収縮を行わせた場合と、単に短縮性収縮を行わせた場合の腓腹筋における IL-6 および CXCL1 あるいは CXCL5 の発現を RT-PCR、免疫組織染色で評価するとともに、組織学的に CXCL1,5 がケモカインとして浸潤細胞の動員に関与しているか否かを検討した。
4. 研究成果
- (1) 腸管上皮に対する運動・ストレスの影響
- ① 拘束ストレス後の大腸上皮の HSP70 の増加がみられた。RU486 の投与は HSP70 の発現を減弱させたことから副腎皮質ホルモン Corticosterone がストレス下における HSP70 の発現に関与していることが明らかになった。一方、腸内細菌の除去は同様に HSP70 の発現を減弱させ、LPS 投与により回復することから、HSP70 の発現には TLR4 による腸内細菌の認識も必要であることがわかった。Corticosterone は上皮細胞間のタイトジャンクション蛋白の発現を減弱させ、上皮間の物質輸送が促進させる結果、腸内細菌の LPS などが粘膜固有層に侵入しやすくなり、同部にある TLR4 を刺激する結果 HSP70 の発現が増強される可能性が示唆された。
 - ② 自然免疫系の応答の第一歩となる LPS を認識する TLR4 が小腸・大腸いずれも腸管固有筋層での豊富な発現がみられたことから、腸管の運動機能に対する LPS の影響を検討した。LPS 投与は TLR4 を発現するマクロファージを除去してもなお腸管の収縮運動を減弱させた。TLR4 ノックアウトマウスでは減弱効果はみられず、TLR4 を介して減弱が起きたことが明らかになった。
 - ③ 腸内細菌を除去した状態で筋損傷が起こると、その再生修復が著しく遅延すること、特に成熟過程が遅延し、筋線維径が回復しなくなることが明

らかになった。この効果は LPS 投与により解消されることも明らかになった。

(2) 骨格筋収縮にともなうサイトカインの産生とそのメカニズムの検討

① 電気刺激に応じて収縮する高度分化型培養筋細胞 C2C12 を電気刺激し、収縮を行わせると未刺激の細胞と比較して mRNA レベルが高くなるサイトカインは IL-6、またケモカインは CXCL1,5 であった。IL-6 は電気刺激時の培養液中のブドウ糖濃度を高くすると mRNA、蛋白いずれも減少した。またグリコーゲン分解を促進するピルビン酸濃度を高くすると著しく増加した。またサイクロスポリンによりカルシニューリンを阻害すると IL-6 産生は抑制されカルシニューリンによる NFATc1 の核内移行が必要であることが明らかになった。

② 電気刺激による 60 回の反復筋収縮後 24 時間までのマウス腓腹筋の解析を行ったところ短縮性収縮では組織学的に筋組織の損傷は認められなかったが、伸長性収縮では筋組織の広範な損傷が認められた。CXCL5mRNA は損傷の有無に関わらず検出され、伸長性、短縮性収縮においていずれの時間でも明らかな差異は認められなかった。しかし免疫組織学的に CXCL5 の評価を行ったところ、伸長性収縮では骨格筋間質に 3~6 時間をピークに CXCL5 が検出された。好中球浸潤はこの時点では顕著ではなかった。以上の結果は骨格筋はケモカイン産生を行うが、機能的なケモカイン産生には epigenetic な制御が関与している可能性が強く示唆された。

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 1 件)

1. Matsuo, K., Zhang, X., Ono, Y. & Nagatomi, R. Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid. *Brain Behav Immun* **23**, 108-115, 2009 (査読有).

[学会発表] (計 5 件)

1. 松生香里、藤田基生、田畑泉、永富良一、骨格筋の損傷・再生過程における *Lactobacillus casei* 摂取の効果、日本体力医学会、2010 年 9 月 17 日、千葉県市川市

2. Kaori Matsuo, Motoo Fujita, Ryoichi Nagatomi, Commensal bacteria are required for the regeneration of damaged skeletal muscle, *Experimental Biology* 2010, 2010.4.26, Anaheim, CA, USA

3. 永富良一、Elimination of commensal bacteria delays the recovery of damaged skeletal muscle, *International Society of Exercise & Immunology*, 2009 年 9 月 21 日、ドイツ・チュービンゲン

4. 藤田基生、LPS 刺激による腸管蠕動・腸管平滑筋の機能変化、日本体力医学会、2009 年 9 月 19 日、新潟

5. 松生香里、ストレスによる大腸上皮 HSP70 発現と蠕動運動の影響、日本体力医学会、平成 20 年 9 月 18 日、別府

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永富 良一 (NAGATOMI RYOICHI)
東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号： 20208028

(2) 研究分担者

神崎 展 (KANZAKI MAKOTO)
東北大学・大学院医工学研究科・准教授

研究者番号： 10272262

(3) 連携研究者

()

研究者番号：