

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 29 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650410

研究課題名(和文)運動誘発性筋損傷時の炎症反応および酸化ストレスに及ぼす免疫細胞の作用

研究課題名(英文)Effects of immune cells on inflammatory responses and oxidative stress in the exercise-induced muscle damage

研究代表者

鈴木 克彦 (Suzuki, Katsuhiko)

早稲田大学・スポーツ科学学術院・教授

研究者番号：80344597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：運動は筋損傷を引き起こすが、その機序は十分に解明されていない。そこで本研究では、抗好中球抗体を用いた好中球浸潤抑制モデルとクロドロン酸リポソームを用いたマクロファージ除去モデルを応用し、マウスにおける疲労困憊運動誘導性の急性筋損傷における好中球およびマクロファージの関与を検討した。抗好中球抗体投与により疲労困憊運動24時間後の腓腹筋においてLy-6G positive cellsが抑制され、クロドロン酸リポソーム投与により疲労困憊運動後に腓腹筋組織に浸潤するマクロファージが減少し、炎症性サイトカインの産生による炎症反応も抑制されたため、好中球、マクロファージが筋損傷に関与することが証明された。

研究成果の概要(英文)：Although exercise induces muscle damage, the underlying mechanisms are not fully understood. The present study examined the involvement of neutrophils and macrophages in the exhaustive exercise-induced acute muscle damage in mice by application of the inhibitory neutrophil migration model and macrophage depletion model. The administration of anti-neutrophil antibody inhibited the infiltration of Ly-6G positive cells (neutrophils) in the gastrocnemius, and the administration of clodronate liposome reduced the infiltration of F4/80 positive cells (macrophages) and related inflammatory reactions. Therefore, it was demonstrated that neutrophils and macrophages are involved in the exercise-induced muscle damage.

研究分野：健康・スポーツ科学

科研費の分科・細目：スポーツ科学

キーワード：筋損傷 好中球 単球 マクロファージ 接着分子 サイトカイン MCP-1 炎症

1. 研究開始当初の背景

適度な運動は健康の維持・増進に有効であるが、激運動は筋損傷を引き起こす。当研究室ではヒトを対象とした検討において筋傷害マーカーである血中クレアチンキナーゼが増加することを報告している。しかし、ヒトを対象とした研究では採取できるサンプルが限られており、実際に骨格筋組織でどのような組織傷害や炎症反応が生じているかを確認することは難しい。ラットやマウスなどの実験動物を用いた研究では、激運動のモデルとして疲労困憊運動が用いられている。しかしながら、疲労困憊運動誘導性の筋損傷の発症メカニズムは炎症性サイトカイン以外にはまだ十分に解明されていない。好中球およびマクロファージは炎症部位に浸潤し、炎症性サイトカインの産生を介して組織傷害や炎症反応に関与している。実際に、複数の筋損傷モデルにおいて好中球およびマクロファージが骨格筋に侵襲していると報告されている。

2. 研究の目的

N. Dumont らは後肢懸垂後の再接地誘導性の筋損傷において好中球を除去することにより筋損傷が軽減すると報告している (N. Dumont, 2008)。F.X. Pizza らも好中球の除去により電気刺激による機械的筋収縮誘導性の筋損傷が抑制されると報告している (F.X. Pizza, 2004)。一方、クロドロン酸リポソームを用いたマクロファージ除去モデルにおいても、カルディオトキシン誘導性の筋損傷が抑制されたと報告されている (M. Summan, 2006)。このように、様々な筋損傷モデルにおいて、好中球およびマクロファージが筋損傷に関与していることが証明されている。したがって、疲労困憊運動誘導性筋損傷においても、骨格筋に浸潤した好中球やマクロファージによる炎症性サイトカインや活性酸素の産生を介して炎症反応が引き起こされている可能性がある。ヒトを対象とした研究と異なり、動物実験ではより詳細に疾患の病態機序を検討することができるが、好中球やマクロファージの役割を検討できるモデル動物も開発されている。そこで本研究では、抗好中球抗体 (1A8) を用いた好中球浸潤抑制モデルおよびクロドロン酸リポソームを用いたマクロファージ除去モデルを応用し、疲労困憊運動誘導性の急性筋損傷における好中球およびマクロファージの関与を検討した。

3. 研究の方法

10 週齢の C57BL/6J 雄マウスを実験に用いた。まず好中球浸潤抑制モデルでは、無作為に安静群 (n=10)、安静 + 抗好中球抗体投与群 (n=10)、疲労困憊運動群 (n=10)、疲労困憊運動 + 抗好中球抗体投与群 (n=10) の 4 群に分けた。好中球抗体投与群には、麻酔下にてマウス 1 匹あたり 0.5 μ g の抗好中球抗体 (1A8) を、抗好中球抗体非投与群には 0.5 μ g の

コントロール抗体 (2A3) を腹腔内投与した。次にマクロファージ除去モデルでは、無作為に安静群 (n=8)、安静 + マクロファージ除去群 (n=8)、疲労困憊運動群 (n=8)、疲労困憊運動 + マクロファージ除去群 (n=8) の 4 群に分けた。麻酔下にてマクロファージ除去群にはマウス 1 匹あたり 150 μ l の Clophosome-A (TM)-Clodronate Liposomes を、マクロファージ非除去群には 150 μ l の Plain Control Liposomes for Clophosome-A を腹腔内投与した。好中球浸潤抑制モデルでは投与 24 時間後に、マクロファージ除去モデルでは投与 48 時間後に、小動物用トレッドミルを用いて疲労困憊走行を負荷した。走行は傾斜 7% の条件下において 10m/min で 15min、15m/min で 15min、20m/min で 15min 走行させた後、24m/min でトレッドミル走行を維持し、電気刺激を 5 回与えても走行を維持できないマウスを疲労困憊状態と判定した。血中の白血球数と各種接着分子などをフローサイトメーターで解析し、筋損傷マーカーと腓腹筋の組織学的評価および real-time quantitative PCR を用いた各種炎症指標の測定を行った。

4. 研究成果

血中の筋傷害マーカーである CK および LDH は疲労困憊運動直後に有意に増加したが、抗好中球抗体投与により有意な低値を示した。よって好中球が筋損傷に関与している可能性が示された。

疲労困憊運動直後に血中の好中球数の増加と接着分子の CD62L の発現強度の増強を認めた。疲労困憊運動 24 時間後には CD62L の発現強度が減少し、好中球が骨髄予備プールから動員されて可能性が考えられた。CD107a は好中球活性化マーカーで、特に脱顆粒マーカーとして使用されているが、運動直後および 24 時間後に CD107a を発現している好中球数が増加することが確認された。したがって、疲労困憊運動により血中好中球機能が亢進したと考えられた。

また疲労困憊運動後に腓腹筋において好中球特異的マーカーである Ly-6G positive cells の増加が確認され、好中球の浸潤が示されたが、抗好中球抗体投与により疲労困憊運動 24 時間後の腓腹筋において Ly-6G positive cells が抑制されることが確認された。また、本研究では疲労困憊運動 24 時間後に腓腹筋組織において筋形成膜の損傷、炎症細胞浸潤、間質の増加といった筋損傷の所見が確認されたが、抗好中球抗体投与によりこれらの筋損傷の所見が抑制されることが示された。したがって、骨格筋に浸潤した好中球が疲労困憊運動誘導性の筋損傷に関与していると考えられた。

本研究では腓腹筋におけ TNF- α および IL-6 mRNA は疲労困憊運動により有意に増加したが、抗好中球抗体投与により TNF- α および IL-6 mRNA の増加が抑制されることが示された。したがって、好中球が疲労困憊運動誘

導性の筋損傷における炎症反応に関与していると考えられた。

またマクロファージ枯渇モデルにおいても、クロドロン酸リポゾーム投与により腓腹筋内のマクロファージ特異的マーカーである F4/80 positive cells が減少することが示され、マクロファージが炎症反応を介して疲労困憊運動誘導性筋損傷に関与していることが示された。さらに、M1 マクロファージ特異的マーカーである CD11c mRNA が疲労困憊運動後に増加することも示された。したがって、疲労困憊運動後に腓腹筋に浸潤する M1 マクロファージによる炎症反応を介して筋損傷が引き起こされている可能性が考えられた。一方、抗好中球抗体投与により F4/80 positive cells および CD11c mRNA 発現が抑制されることが示され、疲労困憊運動後の MCP-1 mRNA 発現も抑制されることが確認された。したがって、好中球が MCP-1 を産生し、それを介してマクロファージの浸潤に関与している可能性が考えられた。そこで、MCP-1、Ly-6G、ジストロフィンの 3 重染色を用いて好中球による MCP-1 の産生を介したマクロファージの浸潤について検討した。MCP-1 positive neutrophils は疲労困憊運動後に有意に増加したが、抗好中球抗体投与によって有意な低値を示した。したがって、疲労困憊運動後に腓腹筋に浸潤した好中球による MCP-1 の産生を介してマクロファージの浸潤が促進されていると考えられた。

マクロファージは M1 型、M2 型という 2 種類が存在していることが報告されている (S. Gordon, 2005)。M1 マクロファージは炎症を促進する TNF- α などのサイトカインを分泌するのに対し、M2 マクロファージは炎症を抑制する IL-10 や IL-1ra などのサイトカインを分泌する (A. Mantovani, 2002)。近年、筋傷害早期には M1 マクロファージの浸潤が増加し炎症を誘導するのに対し、筋傷害後期には M2 マクロファージが浸潤し組織の再生に関与していることが明らかにされている (L. Arnold, 2007)。本研究では、疲労困憊運動後に M1 マクロファージの特異的マーカーである CD11c 発現の増加が確認された。一方で M2 マクロファージの特異的マーカーである CD163 発現は疲労困憊運動による影響は認められなかった。したがって、本研究における疲労困憊運動後のマクロファージの浸潤の増加は、M1 マクロファージの浸潤が増加しているものと考えられる。

MCP-1 はマクロファージを組織浸潤させるケモカインであり、マクロファージの誘導を介して炎症反応に関与している。本研究では、筋組織における MCP-1 mRNA の発現が疲労困憊運動により増加することが示された。したがって、疲労困憊運動誘導性の筋傷害には MCP-1 の産生を介してマクロファージの浸潤が誘導されたと考えられる。先行研究では、クロドロン酸リポゾームによるマクロファージの除去はカルディオトキシン

誘導性の筋損傷において MCP-1 の産生を抑制したと報告されている (M. Summan, 2006)。しかしながら本研究では、疲労困憊運動による MCP-1 の産生はマクロファージ除去による影響が認められなかった。MCP-1 は筋損傷時に筋細胞、好中球や T 細胞などの免疫細胞からも産生されるが (Tidball, 2005)、疲労困憊運動誘導性筋損傷時における MCP-1 の産生細胞については今度の検討が必要である。

疲労困憊運動は筋損傷を誘導すると報告されている (M. Malaguti, 2009. K.C. Huang, 2013)。本研究では、血中の筋損傷マーカーである CK および LDH は疲労困憊運動による主効果が認められたが、マクロファージ除去の主効果および疲労困憊運動とマクロファージ除去の相互作用は認められなかった。しかしながら本研究では、疲労困憊運動 24 時間後に腓腹筋において筋損傷所見である筋形成膜の損傷、炎症細胞浸潤、間質の増加が確認された。加えて、マクロファージの除去によりこれらの筋損傷の所見が抑制されることが示された。細胞質内の IgG は筋膜の損傷を示すが (B. Deng, 2012)、本研究において IgG positive cells は疲労困憊運動により増加することが示された。しかしながら、マクロファージ除去により IgG positive cells が抑制されることが示された。近年、マクロファージの除去はカルディオトキシン誘導性筋損傷を抑制することが示されている (M. Summan, 2006)。したがって、本研究においても腓腹筋に浸潤したマクロファージが疲労困憊運動誘導性筋損傷に関与したと考えられる。

本研究では腓腹筋における炎症反応を炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6、IL-1 β によって検討した。先行研究において、後肢懸垂後の再接地誘導性筋損傷時にはこれらの炎症性サイトカインの産生が増加すると報告されている (B. Deng, 2012)。また、マクロファージを除去することによりカルディオトキシン誘導性筋損傷時の TNF- α の産生が抑制されたと報告されている (M. Summan, 2006)。本研究では TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA は疲労困憊運動により有意に増加した。またマクロファージの除去により IL-6 および IL-1 β mRNA の増加が抑制されることが示された。したがって、マクロファージが疲労困憊運動誘導性の筋損傷における炎症反応に関与したと考えられる。

以上のように、本研究より疲労困憊運動後に筋組織に浸潤する M1 マクロファージが炎症性サイトカインの産生による炎症反応を介して疲労困憊運動誘導性筋損傷に関与していると考えられる。好中球はマクロファージの浸潤を仲介して疲労困憊運動誘導性筋損傷に関与していると考えられた。なお、本研究の成果は、今後学会および投稿論文として発表する予定である。

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 1 件)

〔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
早稲田大学 研究者データベース
https://www.wnp7.waseda.jp/Rdb/app/ip/ipi0211.html?lang_kbn=0&kensaku_no=2134

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 克彦(早稲田大学スポーツ科学学術院・教授)

研究者番号：80344597

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：