

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650440

研究課題名(和文)レジスタンス運動が血液中の単球およびNK細胞に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of resistance exercise to NK cell and monocyte in the blood

研究代表者

新井 淑弘(Arai, Yoshihiro)

群馬大学・教育学部・教授

研究者番号：00302448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はレジスタンス運動が末梢血中のNK細胞活性や単球活性化因子等に及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。レジスタンス・エクササイズは、全身の筋肉を使えるように、アンクル、リストウエイトを用いてデザインした運動を行わせた。被験者を無作為に運動トレーニング群と対照群に分け実験を行った。運動負荷後NK細胞活性についてはオープンウィンドウ状態が観察された。また、運動トレーニングによりその現象は低減することが示された。さらに、単球活性化因子についても検討を行い、運動負荷による影響について、いくつかの知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify that the effects of resistance exercise to NK cell activity and monocyte activating factor in the blood. Resistance exercise, so that it can be used the muscles of the whole body, was to perform the exercise that was designed using the ankle and the list weights. In this experiment, the subjects were divided randomly into two groups with the control group and exercise training group. Open window state was observed for the NK cell activity after exercise load. Also, the phenomenon has been shown to be reduced by exercise training. Furthermore, we studied also monocyte activating factor, the effects of exercise, and get some knowledge.

研究分野：健康科学

キーワード：レジスタンスエクササイズ 免疫 NK細胞活性

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫学の発展に伴い、運動負荷が生体防御系に及ぼす影響に関する研究が急速に進んでいる。最近の報告では、マウスのリンパ系細胞の加齢による増殖能低下は継続的な自由運動によって軽減できることが明らかにされ、運動負荷が加齢によるリンパ球の機能低下を抑制することが示唆されている。また、疫学調査では運動習慣のある人は運動習慣の無い人に比べ、ある種の癌の発生率が低くなることが示され、運動が免疫機能を高める一因子であることが示されている。逆に、過度な運動が原因で免疫力が低下することを示唆するデータも見られる。

運動と免疫機能に関する研究は、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)についてが、国内・外で多く行われ、他の免疫系の細胞に比べ、実験結果の一致が見られている。それによると、NK細胞は運動負荷を行うと血液中の細胞数が増加するが、細胞1個あたりのNK活性は変化しないこと、高強度の運動を長時間負荷すると血液中のNK細胞活性は低下することなどが明らかにされており、運動による生体防御機能の増強や、抑制の原因の一つと考えられている。

また、単球は貪食機能を持つ細胞で、末梢血中の白血球の約3~8%を占める。単球は種々の走化因子に反応して様々な組織に遊走し、そこでマクロファージに分化して細胞障害活性や貪食機能などの免疫機能を発揮する。これらの機能は初期生体防御系の一部をにない、感染時の早い時期に重要な働きをする。さらに、抗原の処理と提示を行い、リンパ球系に働きかける。このように、単球は自然免疫系の重要な構成要素であると同時に、獲得免疫系でも欠かすことのできない役割を果たしている。

しかし、ヒトに対する運動負荷が血液中の単球に及ぼす影響に関しての詳細は明らかにされていない。特に、走化性、接着性、障害活性、貪食、サイトカインの分泌能などの機能に関しては、実験方法が煩雑で、費用もかかることなどから、あまり研究が行われておらず、さらに、加齢の影響をあわせて検討している研究はほとんどない。

現在まで我々は、生活習慣や健康状態に関する調査と血液中のNK細胞活性や単球数の測定を合わせて行い、生活習慣と血液中NK細胞活性や単球数との関係について検討してきた。そこでは、食事回数や喫煙などいくつかの生活習慣と単球およびNK細胞活性との関係を指摘することができた。

一方、レジスタンス運動とは、筋力、筋肥大、筋持久力などを向上させるため、バーベル、ダンベルによる重力やゴムの弾性力、また腕立て伏せのような自分の体重を負荷にし、

筋に抵抗負荷をかけておこなう運動であり、近年行われた研究ではトレーニング(レジスタンストレーニング)の効果として、高齢者の筋量の増加、筋肥大による筋力の増大などが報告されている(Fiatarone et al. 1990; Charette et al. 1991; 久野, 2000; 久野・坂戸 2004)。また、レジスタンストレーニングは、腰椎および大腿骨頸部における骨密度を増加させるなど、高齢社会が目指す健康づくりにとって望ましい効果が報告されている(Menkes et al. 1993)。

以前はアスリートを中心に注目されていたレジスタンス・エクササイズであるが、上記のように、最近では現代の高齢社会において積極的に健康を増進し、疾病を予防する「一次予防」策として、レジスタンス・エクササイズは導入、実施されている。また高齢者の転倒骨折予防策として、レジスタンストレーニングは重要視されている。そして高齢者に対しての有効性を強調されるだけでなく、若いときからの筋力作りや筋力維持を目的として、また骨粗しょう症予防対策としてのレジスタンストレーニングは見直され、普及しつつある。

2. 研究の目的

単球に関する研究は実験動物を用いた研究や、マクロファージに分化した後の状態での研究が多く、ヒトに関する知見、特に末梢血中で単球として存在している時の運動負荷との関係を見た研究は少ない。そのような中で、本研究ではヒトを対象に運動負荷を行い、血液中の単球やNK細胞についてその状態変化や活性化因子の解析を行い、運動が免疫系細胞に及ぼす影響について検討を行うことに研究の特色がある。

運動による単球の機能変化については、未解明なことの多い課題であり、今後の発展が期待できる。特に単球は生体防御系の中でも、初期防御系で重要な働きを持つ細胞であり、様々な疾患に関係しているため、生理的状態での制御機構の解明は重要課題と考えられる。

本研究では、上記のような運動効果以外に、免疫系に及ぼす影響を明らかにしていくもので、免疫力の増強など、レジスタンス運動を老化予防の一つのツールと考える場合の新しい機能開発につながると考えられる。

そこで本研究はレジスタンス・エクササイズ(1回の運動負荷)の前後でのNK細胞活性や単球の活性化因子等の解析を行い、レジスタンス・エクササイズがNK細胞活性および単球に及ぼす影響について検討を行うことを目的とした。さらに、レジスタンス・エクササイズを継続(レジスタンス・トレーニング)した場合に、血液中のNK細胞活性や単球活性化因子がどのように変化するかについて検

討を行った。

3. 研究の方法

本研究ではレジスタンス運動が末梢血中の単球およびNK細胞に及ぼす影響を明らかにするために、レジスタンス運動の負荷(1回の運動負荷)前後で採血を行い、血液中のNK細胞活性と単球数測定およびそれらの細胞および血清中の活性化因子の解析を行った。また、レジスタンス運動をトレーニングとして行った場合についても、その前後で同様の測定を行い、継続的負荷の影響についても検討した。今回は実験の初期段階であるため、運動習慣のない健康な若年男性を被験者として採用した。

被験者は当大学に所属する学生から、運動部に属さない学生を20人募集し、学内研究倫理審査専門委員会の基本方針に従い、調査・実験を実施した。調査・実験に先立って、各被験者に測定の趣旨、内容、スケジュール、採血に伴い起こりうる危険やトラブル等、調査・実験に伴う副作用、データの利用などを説明の上、書面による同意を得た。

1回のレジスタンス運動によるNK細胞活性等の変化を検証するために、運動習慣のない被験者に1時間の運動負荷を行い、その前後および30分後に採血および測定を行った。また、被験者は無作為に対照群(C群:N=10)およびトレーニング群(T群:N=10)の2群に分けた。トレーニング期間は8週間として、その前後で運動負荷実験と採血・測定を行った。運動負荷実験の当日は被験者には全員同じ時間帯(12:00~12:30)に同じメニューの昼食を摂らせ、その約2時間後に採血を行った。また昼食前には問診表により健康状態のチェックを行い、被験者の現在の体調を把握した上で実験に参加させた。採血前には自動血圧計(インテリヤンス血圧計Omron社製)を用いて血圧および脈拍数の測定、そして形態測定として身長、体重、BMI、および体脂肪率(インピーダンス法:体内脂肪計TANITA社製)測定を行った。また、運動時には被験者全員にスポーツ心拍計(POLAR社製)を着用させ、運動中の心拍数を測定した。

レジスタンス・エクササイズは、調節式リスト・アングルウエイト(TOEI社製)を着用し、体幹部、下肢と上肢の運動メニューを組み合わせ、全身の筋肉を効率的に使えるようにデザインした。負荷値に関しては各被験者の筋力に合わせた強度で行うため、自覚的運動強度スケール(RPE: Rating of Perceived Exertion)(Borg, 1970)をもとに、1セット10回の運動が「Hard(きつい)」と感じられる程度の負荷をかけられるよう被験者一人一人の負荷値を決めた。

運動負荷は各部位の運動を10回ずつ、サーキット形式で1時間行い、採血はその運動負荷

の前、直後および運動終了後30分の3時点で行い、血球計数検査、各種生化学検査およびNK細胞活性等の検査を行った。

また、実験開始日から終了日まで毎日、自己記入式の生活状況・健康調査表を記入してもらい、実験期間中、各被験者の健康状態や体調、生活状態の変化を把握した。

【参考文献】

1. Charette, S.L.: Muscle hypertrophy response to resistance training in older women. *J. Appl. Physiol.*, 70: 1912-1916, 1991.
2. Fiatarone, M.A.: High-intensity strength training in nonagenarians. Effects on skeletal muscle. *JAMA*, 263(22): 3029-34, 1990.
3. 久野譜也: 元気に歩くための筋肉の鍛え方. 岡田守彦ほか編 高齢者の生活機能増進法—地域システムと具体的ガイドライン—. NAP:東京, 46-55, 2000.
4. Menkes, A.: Strength training increase regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. *J. Appl. Physiol.*, 74(5): 2478-1485, 1993.
5. Borg, G. A.: Perceived exertion as an indicator of somatic stress. *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine*, 2(3): 92-98, 1970.

4. 研究の成果

(1) レジスタンス運動の負荷強度について一回のレジスタンス運動中の心拍数の変化の典型的な一例をFig. 1に示した。運動前では60拍/分~80拍/分程度で変動し、安定した状態が維持されていた。運動開始直後から、心拍数は80拍/分~140拍/分程度での変動を繰り返した、中程度の負荷強度によるインターバル運動であることが確認できた。

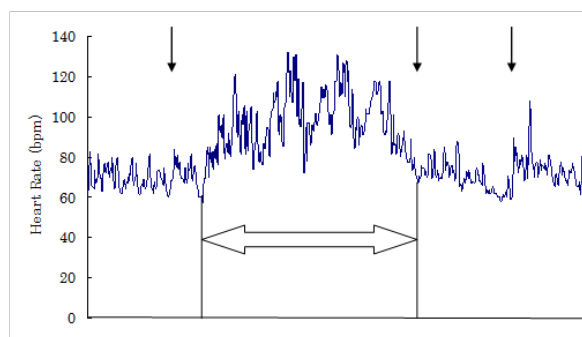


Fig.1 An example of change in HR during exercise () in a male subject

() Blood sampling points

(2) レジスタンス運動がNK細胞活性に及ぼす影響について

Fig.2 にトレーニング期間前に行った、1時間のレジスタンス運動前 (Pre-ex)、終了直後 (Post-ex)、終了後30分 (30min post-ex) の3時点におけるNK細胞活性の結果を示した。運動実施前ではNK細胞活性値の平均は、45%程度で、先行研究で示されている標準値の範囲内であった。また、運動直後でも、NK細胞活性はPre-exと差は観られなかった。しかし、30min Post-exではその値は30%程度まで低下していることが明らかとなった。

このことより、今回行った1時間のレジスタンス運動は、心拍数の変化から見てインターバルが取られた、中程度の運動強度であり、また、NK細胞活性の変化から、免疫機能に対して、オープンウィンドウ状態をもたらす運動であったと考えられる。

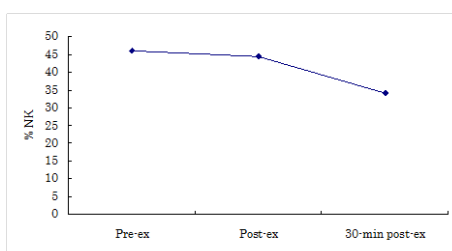


Fig.2 Change in NK cell activity in the blood $P < 0.01$ pre-ex vs post-ex, post-ex vs 30min post-ex

さらに、レジスタンス運動を8週間継続して行った運動トレーニング期間の後に、1時間のレジスタンス運動を行い、運動前 (Pre-ex)、終了直後 (Post-ex)、終了後30分 (30min post-ex) の3時点で採血を行い、NK細胞活性の測定を行った。そこではNK細胞活性はPre-exとPost-ex、Post-exと30min Post-ex、Pre-exと30min Post-exのいずれにおいても有意な差は観察できなかった。

また、8週間のレジスタンストレーニングは一過性のレジスタンス運動による白血球数の増加を促進することが明らかとなった。

このことより、8週間のレジスタンス運動によるトレーニングは、1時間のレジスタンス・エクササイズ後に見られるオープンウィンドウ状態を軽減、もしくは出現させなくする効果があることが示唆された。すなわち、8週間の継続したレジスタンス運動によるトレーニング効果として、免疫系を強化する可能性が示唆された。

(3) レジスタンス運動が単球 (マクロファージ) の活性化因子に及ぼす影響

ここでは、レジスタンス運動が末梢血中の単球の分化や組織への付着性、マクロファージへの分化に及ぼす影響を検討するための、バイオアッセイ系の確立を行った。

細胞はヒト由来の白血球系の細胞株である

THP-1を使用した。理化学研究所細胞バンクより提供された凍結細胞株 (JCRB細胞バンク THP-1 Lot. 07122011) を保存液を除去した後に、増殖培地 RPMA1640 (Gibco; 11875-093) 中でFBSを20%添加して培養を行った。その後、十分に増殖活性が高まった状態を確認してから、血清濃度を下げて分化実験に使用した。

形態観察には位相差顕微鏡 (Nikon ECLIPSE TE2000-U) を使用した。また、細胞数の計測には、セルカウンター (Invitrogen COUNTESS) を使用した。また、CD36抗体陽性細胞の検出には本学医学部ゲノムリソースセンターに設置されているフローサイトメータ (BD FACSverse) を使用した。

【PMA添加による細胞増殖抑制と付着性の獲得】

Fig.3は培地中にPMAを1.0ng/ml添加した時のTHP-1細胞の形態変化を位相差顕微鏡で観察した写真である。PMAを添加していないときに比べ、細胞増殖が抑えられて、ディッシュの底面に付着する細胞が見え始めている。

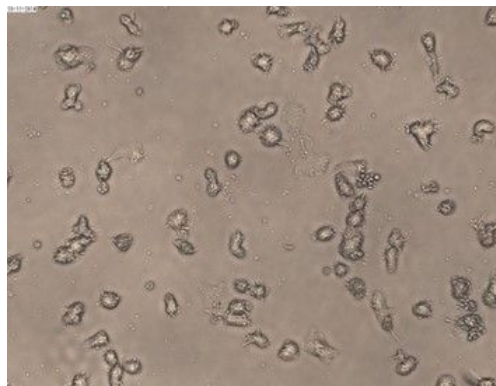


Fig.3 培地中にPMAを1.0ng/ml添加した時のTHP-1細胞の形態変化

Fig.4は培地中にPMAを2.0ng/ml添加した時のTHP-1細胞の形態変化を位相差顕微鏡で観察した写真である。PMAを1.0ng/ml加えた時よりも多くの細胞がディッシュ底面に付着しているのが観察できる。

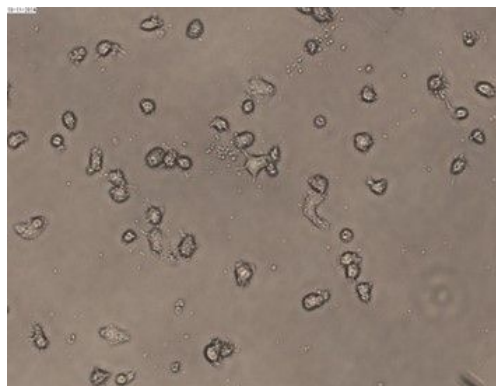


Fig. 4 培地中に PMA を 2.0ng/ml 添加した時の THP-1 細胞の形態変化

Fig. 5 は培地中に PMA を 10.0ng/ml 添加した時の THP-1 細胞の形態変化を位相差顕微鏡で観察した写真である。PMA を 1.0ng/ml、2.0ng/ml 加えた時よりも多くの細胞がディッシュ底面に付着しているのが観察できる。

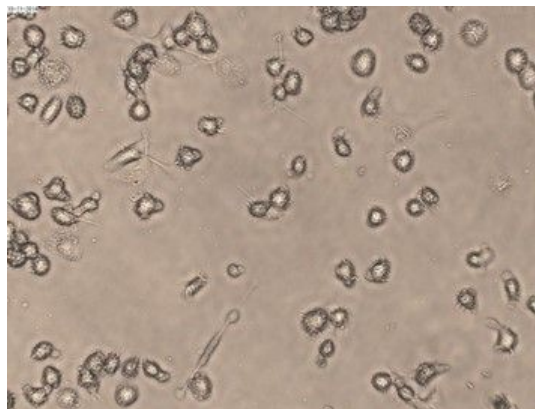


Fig. 5 培地中に PMA を 10.0ng/ml 添加した時の THP-1 細胞の形態変化

Fig.6 に 50ng/ml までの範囲で PMA を培地中に添加した時の細胞の付着性をまとめた。細胞増殖活性は、PMA 濃度が 0.5ng/ml から低下し始めて、2.0ng/ml でほとんど増殖しなくなった。

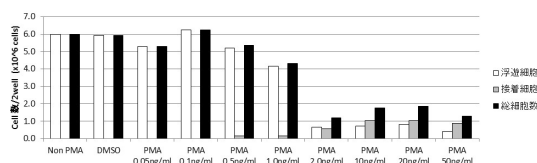


Fig.6 浮遊細胞数、接着細胞および総細胞数

また、Fig.7 に総細胞に対する浮遊細胞と接着細胞の割合を示した。接着細胞は PMA 濃度 0.5ng/ml から見え始めて、PMA 濃度が高くなるほど細胞の付着率は増加することが明らかとなった。

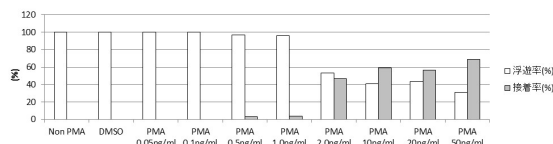


Fig.7 総細胞数に対する浮遊細胞と接着細胞の割合比較

これらの結果より、THP-1 細胞は PMA の濃度に依存して、増殖抑制と、付着性が獲得されることが明らかとなった。すなわち、PMA 濃度に依存して、分化が進むことが明らかとなった。

【CD36 発現解析】

Fig.8 に PMA 添加濃度との違いによる CD36 陽性率の FACS 解析の結果を示した。これは、細胞を回収し、固定した後に FACSverse で CD36 発現量を解析した結果である。グラフは右に行くほど CD36 の発現量が多い細胞で縦軸は細胞数のカウント値を示している。ポイント 3 (P3) より右側の領域を CD36 陽性細胞としたときの、CD36 陽性細胞の割合と細胞のディッシュ底面への接着率を Fig.9 に示した。

CD36 陽性率は PMA 濃度が 2.0ng/ml をピークに徐々に低下することが明らかとなった。また、細胞付着性は濃度依存的に増加することが明らかとなった。

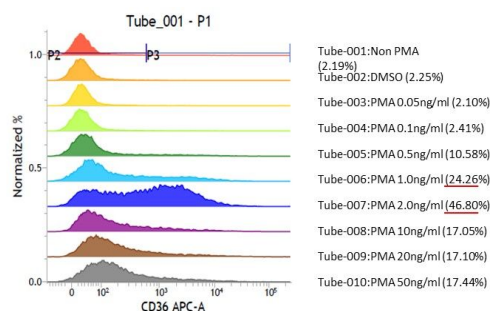


Fig.8 PMA 添加濃度と CD36 の発現

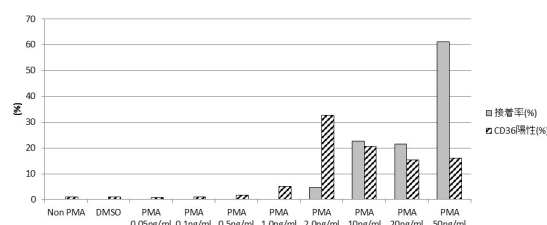


Fig.9 PMA 濃度の違いによる CD36 発現と細胞の付着率

これらの結果から、THP-1 細胞は単球・マクロファージ活性化因子のバイオアッセイ系として有用であることが明らかとなった。

そこで、本研究では THP-1 細胞の培養液中にレジスタンスエクササイズを行う前と行った後、運動終了後 30 分の血漿を添加して、単球活性化因子、マクロファージ活性化因子の存在についての実験を行い、いくつかの結果を得ることができた。

【参考文献】

1. Visfatin contributes to the differentiation of monocytes into macrophages through the differential regulation of inflammatory cytokines in THP-1 cells. Mi Ran Yun a,b, Jeong Mi Seo a, Hyun Young Park a, Cellular

- Signalling 26 (2014) 705–715,
2. Differential Roles of the Protein Corona in the Cellular Uptake of Nanoporous Polymer Particles by Monocyte and Macrophage Cell Lines Yan Yan, Katelyn T. Gause, Marloes M. J. Kamphuis, and Frank Caruso, American Chemical Society VOL. 7 ' NO. 12 ' 10960–10970 ' 2013

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

金子伊樹、高橋珠実、新井淑弘、習慣的なレジスタンス運動は一過性運動による白血球数の増加を促進する、第 66 回日本体育学会総会、2015 年 8 月 25 日～27 日、東京、国士舘大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新井 淑弘 (Arai, Yoshihiro)

群馬大学・教育学部・教授

研究番号：00302448