

運動トレーニングが自然免疫に及ぼす影響

和洋女子大学 北村 裕美

Effect of Exercise Training on Innate Immunity in Rat

by

Hiroki Kitamura

Exercise Physiology Laboratory,

Wayo Women's University

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) play an important role in the recognition of a specific pattern of microbial components and lead to activation of innate immunity. The purpose of this study was to examine the effect of exercise training on mRNA expression of TLR2 and TLR4 in rat tissues. Female F344 rats were divided into a sedentary (S) group and a training (T) group. At the first week, training rats ran at 15-21 m/min, 15-30 min/day, for 5 days/week. From the second to the fourth week, training rats ran at 21 m/min, 30 min/day, for 5 days/week. We assessed TLR2 and TLR4 mRNA expression in the lung, the liver, the spleen and the soleus muscle using real-time RT-PCR. Although thymic atrophy and the extension of exhaustion time were detectable, the basal levels of stress hormone (catecholamine and corticosterone) were unchanged by exercise training. TLR2 mRNA expression in the lung tended to be lower in the T group than in the S group, but there were no statistically significant differences. Similarly, TLR4 mRNA expression was not significantly different between the S and T groups. These findings suggest that mild exercise training might not affect TLR2 and TLR4 mRNA expression in the lung, the liver, the spleen and the muscle tissue.

要 旨

本研究では、運動トレーニングが組織中 Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4 mRNA 発現におよぼす影響について検討した。7週齢の F344 雌ラットは Sedentary 群と Training 群に分け、Training 群には1日30分、週5日、4週間のトレッドミル走を負荷した。その後、組織中 TLR2 および TLR4 mRNA 発現を real-time RT-PCR 法にて評価した。今回用いた運動トレーニングは胸腺を萎縮させたが、ストレスホルモン濃度には影響しなかった。TLR2 mRNA 発現は、肺では Training 群が Sedentary 群よりも低値傾向を示したが ($p=0.057$)、ほかの組織同様、有意な差はみられなかった。TLR4 mRNA 発現には運動トレーニングの影響はみられなかった。以上のことから、マイルドな運動トレーニングは TLR2 および TLR4 mRNA 発現には影響しない可能性が示唆された。

緒 言

免疫系は、病原体が生体に侵入するとそれらの病原体をすみやかに識別し排除するシステムであり、哺乳類では大きく自然免疫と獲得免疫に分けることができる。獲得免疫では、抗原特異性を持つ受容体が T 細胞や B 細胞表面に発現し、ほとんどの未知の外来抗原に対処する。一方、自然免疫は病原体を排除する非特異的な免疫作用として知られてきたが、近年病原体を特異的に認識し、免疫系を活性化することが明らかになってきた。すなわち、病原体に特異的な共通の構成成分を認識する Toll-like receptors (TLRs: Toll 様受容体) が感染防御に重要な役割を果たしているのである^{1,2,3)}。

TLRs はヒトでは 11 種類、マウスでは 13 種類存在することが明らかになっている^{2,4)}。例えば、TLR4 はグラム陰性菌の細胞壁成分である

Lipopolysaccharide (LPS) を認識する受容体である^{5,6)}。TLR4 やそのコレセプターである CD14 や MD-2 に LPS が結合すると、adaptor protein myeloid differentiation factor 88 (MyD88) は受容体の Toll/IL-1 receptor (TIR) ドメインにリクルートされ、下流のシグナルカスケードを誘導し、炎症性サイトカイン産生を誘導する⁷⁾。TLR2 は TLR1 や TLR6 とヘテロダイマーを形成し、グラム陽性菌の細胞壁に存在するペプチドグリカンや様々な細胞のリポタンパク質を認識し、細胞内サイトカイン応答を増大させる^{8,9)}。

急性運動と TLRs の関係について、高強度運動は単球上の TLR2 や TLR4 発現を変化させると報告されている^{10,11,12,13)}。また運動トレーニングは自然免疫担当細胞である樹状細胞やマクロファージの機能を調節することが明らかにされた^{14,15)}。したがって、運動トレーニングが病原体の初期認識を担う TLRs を調節することが予想される。

近年、レジスタンストレーニングやレジスタンスと持久性トレーニングの組み合わせにおいて、単球や CD14 陽性細胞上の TLRs 発現は低下することが示唆されている^{16,17)}。しかしながら、持久性トレーニングが血液以外の組織での TLRs 発現におよぼす影響については明らかではない。

そこで本研究では、持久的な運動トレーニングが自然免疫に影響するかどうかを明らかにすることを目的として、ラットを対象に組織中 TLR2 および TLR4 mRNA 発現に注目して検討した。

1. 方 法

1.1 実験動物

7週齢の F344 雌ラット ($n=20$, 日本チャールズリバー) は個別ケージにて飼育し、餌 (NMF 固形飼料, オリエンタル酵母工業) や水は自由摂取とした。ラットは Sedentary 群 (S; $n=10$) と Training 群 (T; $n=10$) に分けた。

本実験は、和洋女子大学動物実験規程および動物実験施設利用に関する細則に従い、和洋女子大学動物を対象とする研究に関する倫理委員会の承認を得て実施した。

1.2 運動トレーニング

T群には持久性トレーニングとして、小動物用トレッドミル (KN-73, 夏目製作所) を用いた4週間の走行トレーニングを負荷した。トレーニング1週目は15%傾斜, 速度15-21m/min, 15-30分として週5日, 2週目以降は15%傾斜, 速度21m/min, 30分として週5日実施した。その後, 安静状態にて麻酔下で血液および組織を摘出した。血液は遠心分離後血漿を分注し, 組織は液体窒素で凍結し, それぞれ測定まで-80℃で保存した。

1.3 RNA抽出

肝臓, 肺, 脾臓, およびヒラメ筋中のtotal RNAはISOGEN (ニッポンジーン) を用いて抽出した。1mlのISOGENをサンプルに加えてホモジナイズし, chloroformを添加後, 12,000×g (4℃) で15分間遠心分離した。その上清にisopropanolを加え, 再び12,000×g (4℃) で15分間遠心分離した。抽出したRNAは70% ethanolで洗浄し, 7,500×g (4℃) で5分間遠心分離した後, RNase-free水で溶解した。RNA濃度はQubit Fluorometer (Invitrogen) を用いて測定した。

1.4 Real-time RT-PCR

Total RNAはQuantiTect Rev. Transcription Kit (QIAGEN) を用いて逆転写し, cDNAを合成した。Real-time PCRはQuanti Fast SYBR Green PCR kit (QIAGEN) の使用説明書に従って, MasterCycler ep realplex2 (Eppendorf) を用いて行った。PCRプログラムは, 95℃ 5分の後, 95℃ 10秒, 60℃ 30秒, 40サイクルであった。

特異的な塩基配列の増幅を確認するため, 測定ごとに融解曲線の解析を行った。遺伝子発現は, ハウスキーピング遺伝子であるGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) によって標準化した。使用した特異的PCRプライマーは以下のとおりである。GAPDH, 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3', 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA3'; TLR2, 5'-AGCAGGATTCCCTATTGGGTGGAG-3', 5'-ATGATCCATTTGCCCGGAAC-3'; TLR4, 5'-CCGCTCTGGCATCATCTTCA-3', 5'-CCCACTCGAGGTAGGTGTTTCTG-3'

1.5 HPLC

血漿アドレナリン, ノルアドレナリン, およびドーパミン濃度はエスアールエルに受託し, the automated High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 法により測定した。

1.6 ELISA

血漿コルチコステロン濃度は, Corticosterone ELISA kit (ASSAYPRO) の使用説明書の手順に従って測定した。

1.7 運動時間

運動トレーニング効果を評価するため, ラットには, 疲労困憊に達するまで速度漸増法にてトレッドミル走を負荷し, その時間を計測した。

1.8 統計処理

データは平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。2群間の差の検定は対応のないt検定をSPSS Statistics 19.0 (IBM) を用いて行った。有意確率は5%未満とした。

2. 結果

運動トレーニング後の体重は, T群とS群

との間に有意な違いはなかった ($162 \pm 2g$, T vs $166 \pm 2g$, S). 体重 $1g$ あたりの組織重量について, 胸腺は S 群よりも T 群の方が有意に低値を示した ($1.10 \pm 0.03mg/g$, T vs $1.24 \pm 0.04mg/g$, S; $p < 0.05$). しかし, 心臓 ($3.0 \pm 0.0mg/g$, T vs $2.8 \pm 0.1mg/g$, S) や副腎 ($0.16 \pm 0.02mg/g$, T vs $0.10 \pm 0.00mg/g$, S), ヒラメ筋 ($0.40 \pm 0.00mg/g$, T vs $0.38 \pm 0.02mg/g$, S) は T 群が高値を示すものの両群間に有意な差はみられなかった.

疲労困憊に達するまでの運動時間には, T 群が S 群よりも有意に長かった ($178 \pm 11min$, T vs $119 \pm 7min$, S; $p < 0.01$).

ストレスホルモンであるカテコールアミンについて, 血漿アドレナリン, ノルアドレナリン, およびドーパミン濃度は, いずれも両群間に有意な差はなかった (表 1). また, 血漿コルチコステロン濃度も, 両群間に有意な差はみられなかった (表 1).

表 1 Effect of exercise training on plasma stress hormone concentration

	Sedentary	Training
Adrenaline, pg/ml	$2,397 \pm 328$	$2,648 \pm 582$
Noradrenaline, pg/ml	513 ± 128	349 ± 46
Dopamine, pg/ml	46 ± 12	35 ± 2
Corticosterone, ng/ml	925 ± 177	696 ± 128

Values are means \pm SEM. n=4-5 per group

T 群の TLR2 mRNA 発現は, 肺では低値傾向を示したが ($p=0.057$), 有意な差はみられなかった (図 1). また肝臓や脾臓, ヒラメ筋においても, S 群と T 群との間に有意な差はみられなかった (図 1). TLR4 mRNA 発現では, 肺や肝臓, 脾臓, ヒラメ筋のいずれの組織においても, 運動トレーニングによる影響はみられなかった (図 2).

3. 考 察

本研究では, 運動トレーニングが自然免疫に影響するかどうかについて明らかにするため, 4 週間の走行トレーニング後の組織中 TLR2 および TLR4 mRNA 発現を検討した. TLRs は, マクロ

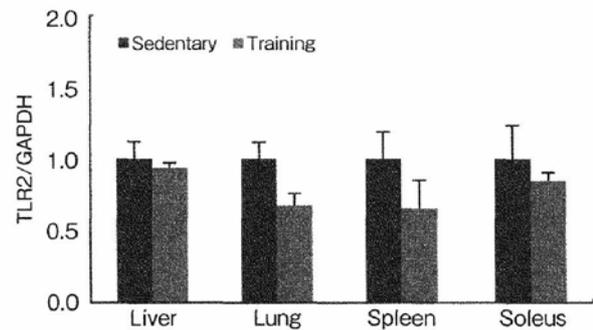


図 1 Effect of exercise training on TLR2 mRNA expression in the liver, the lung, the spleen and the soleus muscle. Values are means \pm SEM.

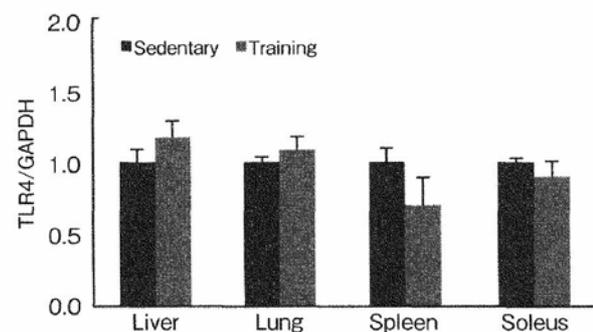


図 2 Effect of exercise training on TLR4 mRNA expression in the liver, the lung, the spleen and the soleus muscle. Values are means \pm SEM.

ファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞だけでなく, 骨格筋などにも発現している¹⁸⁾. そこで, 組織マクロファージが常在する肝臓, 肺, 脾臓に加えて, ヒラメ筋を対象組織とした.

本研究において, 肺の TLR2 mRNA 発現は運動トレーニングにより低下傾向を示すものの, 有意な変化ではなかった (図 1). TLR2 は, 急性運動後にその発現が低下することや好中球貪食能に部分的に関与している可能性が示唆されている^{10, 19)}. しかし Pannacci らが, マクロファージ TLR2 発現は 4 週間の遊泳運動では変化しなかったと報告し²⁰⁾, Stewart らも 12 週間のレジスタンストレーニングは CD14 陽性細胞の TLR2 発現に影響しないと報告しており¹⁷⁾, 今回の結果はこれらの先行研究と一致していた.

TLR4 については, 急性運動により単球上の発現は低下するとの報告が多くなされている^{10, 11, 13)}. 運動トレーニングにおいても, 高齢女性の単球 TLR4 mRNA 発現は対照群に比べて, レ

ジスタンストレーニング群で低下することやレジスタンスと持久性トレーニングの組み合わせは、身体活動量の低かった若年者、高齢者ともにCD14陽性細胞のTLR4発現を低下させることが報告されている^{16, 17)}。しかしながら、本研究ではTLR4 mRNA発現はいずれの組織においても変化しなかった。この結果は運動様式の違いが影響している可能性が考えられる。先行研究では、トレーニング後に筋力が増加しているが、本研究における持久性トレーニングでは、疲労困憊に達するまでの運動時間は延伸したものの、ヒラメ筋の湿重量は変化しなかった。すなわち、筋量への影響がないマイルドなトレーニングであったものと思われる。マウス腹腔マクロファージのTLR4 mRNA発現は、安静群と比較して遊泳運動群ではトレーニング1週目が最も高く、3週目まで有意な高値を示すが、4週目では差がみられないという興味深い報告がある²⁰⁾。すなわち、4週間の遊泳運動では、本研究結果と同じく、TLR4発現は変化していない。これらのことから、TLR4発現は運動様式や運動期間により、その応答が異なると考えられる。

カテコールアミンやコルチコステロンのようなストレスホルモンは、炎症性サイトカイン産生を抑制する免疫調節作用を持つ²¹⁾。アドレナリンはTLR4 mRNA発現を変化させないとの報告があるが²²⁾、グルココルチコイドはTLR2やTLR4発現を抑制するとの報告がなされている^{23, 24)}。本研究では、血漿コルチコステロン濃度の有意な変化はみられておらず、それゆえにTLR2やTLR4発現が変化しなかったのかもしれない。

TLR2やTLR4は、肥満によるインスリン抵抗性の調節に重要な役割を果たしていると考えられている^{25, 26, 27)}。肥満者に対する減量を目的とした12週間の運動療法は、骨格筋中TLR4発現を低下させ、炎症性サイトカイン発現を抑制すること(12週間の食事療法ではこれらの有意な

変化は確認されていない)が報告されており²⁸⁾、運動によるTLRsの発現調節機構の解明がさらに進展することが期待される。

4週間のマイルドな運動トレーニングは、組織中のTLR2およびTLR4発現に影響しない可能性が示唆された。しかしながら、他のTLRsが運動トレーニングにより変化するかどうかは不明である。また、TLRs発現がどのような分子機序により調節されているかも解明されておらず、今回とは異なる運動様式や運動期間において、TLRs発現が変化する可能性も否定できない。それゆえに、今後はその分子機序解明のための検討が必要である。

4. 結 論

マイルドな運動トレーニングは、肺、肝臓、脾臓、およびヒラメ筋中のTLR2およびTLR4 mRNA発現に影響しない可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また、実験に協力いただいた和洋女子大学梅津裕香氏、石田千晶氏、ご討論いただいた川崎医療福祉大学准教授矢野博己先生、和洋女子大学教授湊久美子先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Medzhitov R., Toll-like receptors and innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, 1(2) 135-145(2001)
- 2) Akira S, Takeda K, Toll-like receptor signaling, *Nat. Rev. Immunol.*, 4(7) 499-511(2004)
- 3) Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F., A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(2) 588-593(1998)
- 4) Leulier F., Lemaitre B., Toll-like receptors--taking

- an evolutionary approach, *Nat. Rev. Genet.*, **9**(3) 165-178(2008)
- 5) Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B., Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, *Science*, **282**(5396) 2085-2088(1998)
 - 6) Qureshi S.T., Larivière L., Leveque G., Clermont S., Moore K.J., Gros P., Malo D., Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4), *J. Exp. Med.*, **189**(4) 615-625(1999)
 - 7) Zuany-Amorim C., Hastewell J., Walker C., Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**(10) 797-807(2002)
 - 8) Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S., Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components, *Immunity*, **11**(4) 443-451(1999)
 - 9) Aliprantis A.O., Yang R.B., Mark M.R., Suggett S., Devaux B., Radolf J.D., Klimpel G.R., Godowski P., Zychlinsky A., Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2, *Science*, **285**(5428) 736-739(1999)
 - 10) Lancaster G.I., Khan Q., Drysdale P., Wallace F., Jeukendrup A.E., Drayson M.T., Gleeson M., The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans, *J. Physiol.*, **563**(3) 945-955(2005)
 - 11) Simpson R.J., McFarlin B.K., McSporran C., Spielmann G., Hartaigh B, Guy K, Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans, *Brain Behav. Immun.*, **23**(2) 232-239(2009)
 - 12) Booth S., Florida-James G.D., McFarlin B.K., Spielmann G., O'Connor D.P., Simpson R.J., The impact of acute strenuous exercise on TLR2, TLR4 and HLA.DR expression on human blood monocytes induced by autologous serum, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **110**(6) 1259-1268(2010)
 - 13) Oliveira M., Gleeson M., The influence of prolonged cycling on monocyte Toll-like receptor 2 and 4 expression in healthy men, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **109**(2) 251-257(2010)
 - 14) Chiang L.M., Chen Y.J., Chiang J., Lai L.Y., Chen Y.Y., Liao H.F., Modulation of dendritic cells by endurance training, *Int. J. Sports Med.*, **28**(9) 798-803(2007)
 - 15) Chen M.F., Chen H.I., Jen C.J., Exercise training upregulates macrophage MKP-1 and affects immune responses in mice, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **42**(12) 2173-2179(2010)
 - 16) Flynn M.G., McFarlin B.K., Phillips M.D., Stewart L.K., Timmerman K.L., Toll-like receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-Training elderly women, *J. Appl. Physiol.*, **95**(5) 1833-1842(2003)
 - 17) Stewart L.K., Flynn M.G., Campbell W.W., Craig B.A., Robinson J.P., McFarlin B.K., Timmerman K.L., Coen P.M., Felker J., Talbert E., Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4, *Brain Behav. Immun.*, **19**(5) 389-397(2005)
 - 18) Nishimura M., Naito S., Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(5) 886-892(2005)
 - 19) Giraldo E., Martin-Cordero L., Garcia J.J., Gerhmann M., Multhoff G., Ortega E., Exercise-induced extracellular 72 kDa heat shock protein (Hsp72) stimulates neutrophil phagocytic and fungicidal capacities via TLR-2, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **108**(2) 217-225(2010)
 - 20) Pannacci M., Lucini V., Colleoni F., Martucci C., Grosso S., Sacerdote P., Scaglione F., Panax ginseng C.A. Mayer G115 modulates pro-inflammatory cytokine production in mice throughout the increase of macrophage toll-like receptor 4 expression during physical stress, *Brain Behav. Immun.*, **20**(6) 546-551(2006)
 - 21) Elenkov I.J., Chrousos G.P., Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **966**, 290-303(2002)
 - 22) Rough J., Engdahl R., Opperman K., Yerrum S., Monroy M.A., Daly JM, Beta2 adrenoreceptor blockade attenuates the hyperinflammatory response induced by traumatic injury, *Surgery*, **145**(2) 235-242(2009)
 - 23) Jin X., Qin Q., Tu L., Qu J., Glucocorticoids inhibit the innate immune system of human corneal fibroblast through their suppression of toll-like

- receptors, *Mol. Vis.*, 15, 2435-2441 (2009)
- 24) Broering R., Montag M., Jiang M., Lu M., Sowa J.P., Kleinehr K., Gerken G., Schlaak J.F., Corticosteroids shift the Toll-like receptor response pattern of primary-isolated murine liver cells from an inflammatory to an anti-inflammatory state, *Int. Immunol.*, 23(9) 537-544(2011)
- 25) Tsukumo D.M., Carvalho-Filho M.A., Carnevali J.B., Prada P.O., Hirabara S.M., Schenka A.A., Araújo E.P., Vassallo J., Curi R., Velloso L.A., Saad M.J., Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance, *Diabetes*, 56(8) 1986-1998(2007)
- 26) Poggi M., Bastelica D., Gual P, Iglesias M.A., Gremeaux T., Knauf C., Peiretti F., Verdier M., Juhan-Vague I., Tanti J.F., Burcelin R., Alessi M.C., C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet, *Diabetologia*, 50(6) 1267-1276 (2007)
- 27) Caricilli A.M., Nascimento P.H., Pauli J.R., Tsukumo D.M., Velloso L.A., Carnevali J.B., Saad M.J., Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet, *J. Endocrinol.*, 199(3) 399-406(2008)
- 28) Lambert C.P., Wright N.R., Finck B.N., Villareal D.T., Exercise but not diet-induced weight loss decreases skeletal muscle inflammatory gene expression in frail obese elderly persons, *J. Appl. Physiol.*, 105(2) 473-478(2008)