

筑波大学

博士（医学）学位論文

継続的運動は Kupffer 細胞の貪食能向上により
Endotoxin に対する生体クリアランス増大と
炎症応答の低下を誘導する

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

小峰 昇一

要旨

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) の発症や進展には腸内細菌由来の endotoxin が重要な役割を演じる。一方、生体の Kupffer 細胞 (KCs) による endotoxin の処理能力も重要な要因である。NAFLD の予防と治療には運動実践が有用であるが、その詳細な分子メカニズムは十分に解明されていない。そこで今回は、運動負荷が KCs の表現形質に与える影響を検討するために、endotoxin に対する生体クリアランスと炎症応答の観点より解析した。また、運動による KCs 表現形質の変化についてステロイドホルモンの変動の観点より検討した。

In vivo 実験では、野生型マウス 8 週齢を安静群と中強度の運動群 (週 5 回を 3 ヶ月間、漸増負荷 10-18 m/分, 50 分/日) に分けた。運動負荷の最終日の翌日に endotoxin (0.01 $\mu\text{g/g}$ body weight) を尾静脈投与し、同部位から経時的に血漿 endotoxin 濃度と炎症性サイトカイン濃度 (TNF- α と IL-6) を測定した。KCs の latex beads 貪食能と貪食に関与する表面タンパク質 (CD68, MARCO, SR-A) の発現レベルを解析した。さらに、ステロイドホルモン (DHEA, testosterone, corticosterone, estradiol) とアディポカイン (leptin, adiponectin) 濃度を測定した。

In vitro 実験では、マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) に対してステロイドホルモンを添加し、latex beads 貪食能と endotoxin 刺激に対する炎症応答シグナル分子 (NF κ B-p65) の発現に及ぼす影響を検討した。

In vivo 実験では、endotoxin の血中濃度-時間曲線下面積 (area under the curve : AUC) は、安静群に比して運動群では有意に減少した (AUC : 32.0 ± 2.0 vs. 24.5

± 1.4 EU/ml, $P < 0.05$) . Endotoxin 投与 1.5 時間後の TNF- α , IL-6 濃度は, 運動群では安静群に比して低値を示した (TNF- α : 19.5 ± 5.2 vs. 11.0 ± 3.6 , IL-6: 14.5 ± 0.9 vs. 10.6 ± 0.6 ng/ml, $P < 0.05$) . 運動負荷は endotoxin に対する生体クリアランスの増大と炎症応答を低下させた. マクロファージの除去を施したマウスでは, 運動負荷によるこれらの効果は消失した. KCs の latex beads 貪食能は運動群において増加した (MFI: $+20.8 \pm 4.5\%$, $P < 0.05$) . また, 運動群において CD68, MARCO, SR-A の発現レベルは有意に増加した (CD68: $+25.6 \pm 1.1\%$, MARCO: $+18.0 \pm 1.1\%$, SR-A: $+14.8 \pm 3\%$, $P < 0.05$) . 各種ステロイドホルモンの血中濃度の変動を測定した結果, DHEA のみが運動群で増加した (3.5 ± 1.1 vs. 6.8 ± 1.2 ng/ml, $P < 0.05$) . *In vitro* 実験では, RAW264.7 に DHEA (濃度 10 ng/ml) を添加すると, latex beads 貪食能は増大し (MFI: $+15.2 \pm 1.7\%$, $P < 0.05$) , endotoxin 刺激による炎症応答シグナル分子 NF κ B-p65 のリン酸化は有意に抑制された ($-25.0 \pm 4.1\%$, $P < 0.05$) .

中強度運動の継続は DHEA の産生増加を介して, KCs の貪食能向上による endotoxin に対する生体クリアランスの増大と炎症応答の低下を誘導した. 運動実践による NAFLD の改善には, KCs 表現形質の変化が介在している可能性がある.

目次

第 1 章 緒言.....	1
非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)	1
Kupffer 細胞.....	2
NAFLD 治療の現状.....	3
NAFLD と運動療法.....	3
ステロイドホルモンと食食能.....	4
目的	4
第 2 章 方法.....	5
実験プロトコル	5
標本のサンプリング.....	6
肝臓からの非実質細胞分画の分離調製と異物食食の解析.....	6
免疫組織化学.....	7
生体の endotoxin クリアランスの測定	8
サイトカイン, ステロイドホルモンとアディポカインの測定.....	8
細胞実験.....	9
統計解析.....	10
第 3 章 結果.....	11
体重と体組成の変化.....	11
Kupffer 細胞数の変化.....	11

Kupffer 細胞の異物貪食能の変化	16
Kupffer 細胞の表面タンパク質の変化	16
生体の endotoxin クリアランスの変化	19
Endotoxin 投与後の血中サイトカイン濃度の推移	21
血中ステロイドホルモンの変化	23
血中アディポカイン濃度の変化	23
DHEA がマクロファージの貪食能に与える影響	26
DHEA がマクロファージの炎症応答に与える影響	26
第 4 章 考察	29
第 5 章 結語	33
第 6 章 引用文献	34
第 7 章 謝辞	41

第 1 章

緒言

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)

食習慣の欧米化と慢性的運動不足により肥満人口は増加の一途をたどる。最近の人間ドック全国集計成績では肝機能異常を有する成人の頻度が急増しているが¹、この背景には非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) の増加が大きく関わる。NAFLD の有病率は欧米諸国で 20-40%、アジア諸国で 12-30%、日本において 9-30%とされ、世界的に患者数が多い。NAFLD の一部は非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) に進展する。NASH は進行性であり、世界的に有病率は 3-5%と推定され、肝硬変、肝発癌に至る。

NAFLD の発症と進展には、Two hit hypothesis が古くより提唱されてきた。これは、脂肪が肝臓へ蓄積し (1st hit)、その後サイトカインの放出やインスリン抵抗性などの肝細胞傷害性因子が加わり (2nd hit)、肝実質の炎症とともに病態が進展するものである。一方、近年はインスリン抵抗性、アディポカイン、酸化ストレス、腸内細菌など複数の要因が同時に並行して、肝臓に障害を与える多重並行ヒット仮説 (multiple parallel hits hypothesis) が提唱されている²。NAFLD はその背景因子として、メタボリックシンドロームの各症状 (肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧) を有することが多い。肝臓は、腸管由来の門脈血流によ

り栄養される臓器であり，腸内細菌や，腸内細菌代謝物等の因子により強い影響を受ける．そのため，NAFLD の発症メカニズムの一つには，腸内細菌関連分子である endotoxin が重要な役割を演じると考えられている³．NASH 患者では腸管上皮の脆弱化による透過性の亢進により endotoxin が門脈に容易に流入し高 endotoxin 血症をきたす⁴．過剰の endotoxin は肝臓のマクロファージである Kupffer 細胞（KCs）に認識，貪食され，自然免疫反応の亢進による炎症応答を増大させ，その結果，肝臓の脂肪化や線維化が進展し NASH に至ると考えられている．このように KCs による生体の endotoxin 処理能力は NAFLD の発症と進展に影響する重要な病態因子であると考えられる．

Kupffer 細胞

KCs は肝臓常在性のマクロファージであり全身のマクロファージの約 80%を占める⁵．自然免疫応答のファーストステップである KCs は，有害な外来性物質（Endotoxin など）の貪食作用を営んでいる^{6,7}．この貪食作用はホルモンやサイトカインの影響を受けることが知られている⁸．NAFLD においては，ヒトと動物モデルの両者において KCs 貪食能の低下が報告されており^{9,10,11}，NAFLD の肝病変の進展に伴い貪食能は低下する⁹．当研究室で作成したヒトに類似した NASH 自然発症モデルマウス，*p62:Nrf2* 二重欠損マウスにおいては¹²，KCs 貪食能の低下とそれによる高 endotoxin 血症，KCs の炎症応答の活性化により，肝臓における慢性的炎症障害が生じている．このように KCs の貪食作用の異常は，endotoxin の生体クリアランスの低下，過剰の endotoxin による KCs の炎症応答

の活性化とそれによる炎症性サイトカインの産生増加を引き起こし、炎症性障害を蔓延させ、NAFLDの増悪とNASHへの進展に関与すると推測される。

NAFLD 治療の現状

日常臨床の現場においては、近年増加の一途をたどるNAFLDの予防と治療が重要な医療課題である。しかしながら、NAFLDの予防と治療には、食事療法と運動療法以外にコンセンサスが得られた治療は未だない。さらに、食事療法に比較して、運動療法の有用性とその改善効果の分子メカニズムに関するエビデンスは少ない。

NAFLD と運動療法

NAFLDにおける運動療法の有効性の評価を目的にメタ解析が行われ¹³、運動療法は単独で対照に比較して肝脂肪蓄積の改善に有用であることが報告されている。また、本学で開催された中年肥満男性を対象とした運動療法の臨床試験の結果においても、中高強度の身体活動の増加は、肥満者における肝脂肪蓄積を減少させ、炎症・酸化ストレス病態を改善した¹⁴。さらに、中年肥満男性を対象とした中強度、高強度の有酸素運動 vs.レジスタンス運動のランダム化比較試験においても、高強度運動は、肝の脂肪蓄積と弾性度（硬度）の改善に優れていた。高強度の有酸素運動によりKCsの異物貪食作用が改善していた¹⁵。このように運動療法が誘導するNAFLDの改善効果の背景には、その病態下において低下していたKCsの機能回復が介在する可能性がある。

ステロイドホルモンと貪食能

動物モデルにおける一過性運動は、ステロイドホルモンの体内動態に影響を及ぼし^{16,17}、KCsの latex beads 貪食能を増大させることが報告されている¹⁶。このことより、運動実践はステロイドホルモンの体内動態の変化を介して、endotoxinの生体クリアランスと炎症応答などKCsの表現形質を修飾し、NAFLDの改善を誘導している可能性を示唆している。しかし、運動実践がKCsに与える影響や分子メカニズムの詳細は未だ十分に解明されていない。

目的

そこで本研究では、野生型マウスを用いて、中強度の運動負荷の継続がKCsの表現形質、特に、異物貪食能力、endotoxinに対する生体クリアランスと炎症応答に与える影響について検討した。さらに、細胞実験において、運動負荷により誘導されるステロイドホルモンの変動がKCsの貪食能力とendotoxinに対する炎症応答に与える影響についても検討した。

第 2 章

方法

実験プロトコル

7週齢の C57/BL6J マウスを Charles River Japan (Kanagawa, Japan)から購入した。マウスは 12 時間毎の明暗サイクル, 22.5 ± 1.4 °C ,湿度 $55.6 \pm 4.0\%$ で飼育した。固形飼料と水分は自由摂取とした。1 週間の予備飼育後, マウスを 3 ヶ月の安静群 (3moR), 3 ヶ月の運動群 (3moTr) の 2 つのグループに分けた。運動群では小動物用トレッドミル MK-680 (Muromachi Kikai) を用いて運動負荷を行った。運動群では運動負荷に順応させるため, 3 日間のトレッドミルに対する適応期間を設けた。初日は 5 m/min を 10 分, 10 m/min を 10 分を行った。その後の 2 日間は 10 m/min を 10 分, 15 m/min を 10 分の計 20 分負荷し, 運動環境に慣れさせた。運動負荷は漸増負荷で行った。すなわち, 10 m/min, 12 m/min, 14 m/min, 16 m/min の負荷を各 5 分間ずつ行い, 残りの 30 分では 18 m/min の負荷を行い, 合計 50 分間, 週に 5 日の頻度で走行させた。さらに, 3moR と 3moTr のそれぞれの群において, マクロファージ除去群を設けるために, Clophosome®-A (FormuMax Scientific) を $8 \mu\text{L/g}$ body weight の容量にて安静群と運動群に投与した (安静群, Lipo3moR ; 運動群, Lipo3moTr)。3moTr の群では運動負荷終了の直後に投与した。すべての動物実験は筑波大学における動物実験委員会の承認を得て, 筑波大学動物実験取扱規定, 動物の愛護及び管理に関する法律, 実験動物の飼育及び保管ならびに苦痛の軽減に関する基準に準拠して行った。

標本のサンプリング

運動負荷の終了から 24 時間後にペントバルビタール (50 mg/kg body weight) を腹腔内に投与した。体重, 肝臓, 精巣上体脂肪, 骨格筋 (ヒラメ筋, 腓腹筋, 足底筋, 前脛骨筋) の湿重量の測定と標本のサンプリングを行った。血液は腹部大静脈より採取し, 4000 rpm で 15 分間遠心し, 上清を冷凍保存した。全身骨格筋量の測定に関しては, 麻酔下のマウスをポリスチレンフォームのベッドに乗せ, 実験動物用 X 線 CT 装置 Latheta (LCT-200, Hitachi Aloka Medical) による画像解析により骨格筋, 内臓脂肪, 皮下脂肪重量を推定した。血清標本は-80°C で保管した。

肝臓からの非実質細胞分画の分離調製と異物貪食の解析

KCs の貪食能を解析するために, 運動負荷の終了から 1 日後に肝臓より非実質細胞分画を分離調製した。すなわち, 麻酔下で Liver Perfusion Medium (Gibco) にて 4 分間, コラゲナーゼ Type4 (Worthington Biochemical), トリプシンインヒビター (Wako Chemical), HEPES (Dojindo) を含んだ DMEM にて 10 分間灌流した。生体から肝臓を摘出し, Hepatocyte Wash Medium (Gibco) 内で各細胞を単離した。肝実質細胞を取り除く目的で 30 g で 2 分間の遠心分離を行った。得られた上清に対して, さらに 400 g で 8 分間の遠心分離を行い, 沈殿物を回収し, KCs が含まれている非実質細胞分画を得た。本分画をフローサイトメトリー解析のサンプルとした。

KCs 細胞の異物貪食能はフローサイトメトリーにて解析した。Latex beads

(Invitrogen, FluoSpheres®, 1.0 µm beads diameter, carboxylate-modified)を 0.57 µl/g body weight 量で尾静脈から投与し, 5分後に KCs を単離した. その後, KCs の表面マーカーである F4/80 陽性細胞における latex beads を貪食した KCs の割合と, latex beads の蛍光強度を測定した.

KCs の異物貪食に関与する表面タンパク分子 (CD68, macrophage receptor with collagenous structure; MARCO, macrophage class A scavenger receptors; SR-A) の発現レベルはフローサイトメトリーにて解析した. 解析に用いた抗体は APC-conjugated anti-F4/80 (17-4801-82, eBioscience), PerCP/Cy5.5-conjugated anti-CD68 (137010, BioLegend), MARCO (MCA1849, Bio-Rad) と SR-A (AF1797, R&D Systems) を用いた. MARCO と SR-A は 2 次抗体として Alexa Fluor 488 (Invitrogen) を用いた. 蛍光強度の測定には Gallios フローサイトメーター (Beckman Coulter) を用いた. データ解析には Kaluza 解析ソフト (ver. 1.2, Beckman Coulter) を使用した.

免疫組織化学

肝組織を採取し PBS で洗浄した後, 4%パラホルムアルデヒドに浸し, 24 時間後に 70%エチルアルコールで脱水した後に, パラフィンに包埋した. 肝組織は 3 µm 厚のスライスにした. その後, キシレンとエタノールを用いて脱パラフィンを行い, 90°C の HistoVT One (Nacalai Tesque) に 20 分間浸し抗原賦活化を行った. 内因性ペルオキシダーゼの不活化は, 3% H₂O₂ with methanol を用いて行い, その後 DAKO wash buffer で洗浄した. ブロッキングは Blocking One Histo (Nacalai

Tesque) で 20 分間インキュベートした。その後 PBS で希釈した F4/80 anti-body (HM1066, Hycult Biotechnology) を 4°C でオーバーナイトした。翌日洗浄を行い、ビオチン化ラット抗体に 30 分浸した。洗浄後に, VECTASTAIN UNIVERSAL Elite ABC kit (Vector Laboratories Burlingame) を用いて染色を行った。マイヤーヘマトキシリンで対比染色を行なった。スライドは蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence Japan) を用いて観察した。

生体の **endotoxin** クリアランスの測定

運動負荷の終了から 24 時間後に、尾静脈より endotoxin (*E. coli* O111: B4, Sigma- Aldrich) を 0.01 $\mu\text{g/g}$ body weight の容量で投与した。Endotoxin 投与前(Pre), 投与後 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 時間のタイムポイントでヘパリン採血をおこなった。各々のサンプルは即座に 4°C, 4000 rpm で 15 分間遠心し、得られた血漿は使用するまで -80°C で保管した。血漿中 endotoxin 濃度の測定には LAL pyrochrome reagent in Glucashield buffer (Associates of Cape Cod) を用いた。赤みを取り除くために PyroColor Diazo Reagents kit (Associates of Cape Cod) を使用し、540 μm の波長で測定した。吸光度の測定は iMark Absorbance Microplate Reader (BioRad Laboratories) を用いておこなった。

サイトカイン、ステロイドホルモンとアディポカインの測定

サイトカイン (TNF- α , IL-6, and IL-10) の血漿濃度は Multiplex bead analysis system (Bio-Rad Laboratories) を用いて行った。Testosterone (ADI-900-065, ENZO

Life Sciences), estradiol (ES180S-100, Cal Biotech), corticosterone (501320, Cayman Chemical Company), DHEA (DI-900-093, ENZO Life Sciences), leptin (M1305, Morinaga Institute of Biological Science), adiponectin (MRP300, R&D Systems) の血清濃度は、それぞれ測定キットを用いて測定した。

細胞実験

マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) を 10%ウシ胎児血清 (FBS), penicillin (50 U/ml), ストレプトマイシン (50 mg/ml) を含んだハイグルコース DMEM (Nacalai Tesque) で 5% CO₂, 湿度 95%, 37°C の環境で培養した。

貪食能を解析するために、 2.5×10^5 個の RAW264.7 を 6 well プレートに播種し、24 時間のインキュベーション後、それぞれの解析を行った。貪食能に関しては、細胞に異なる濃度の DHEA (TCI) を添加し、それぞれの濃度を 0, 1.0, 5.0, 10.0 ng/ml となるよう DMSO で希釈し、12 時間培養した。Latex beads を 0.66 μ l/ml の濃度になるように添加し、12 時間培養した。その後、蛍光顕微鏡で撮影する細胞サンプルは 4%パラホルムアルデヒドで固定し撮影を行った。フローサイトメトリー分析に用いる細胞は、ディッシュ上で 2 回洗浄し、セルスクレーパーで採取した。さらに、それらのサンプルを 2 回遠心分離 (4000 rpm, 3 分間) により洗浄した。その直後に細胞内にある latex beads の蛍光強度をフローサイトメトリーにて解析した。

Endotoxin に対する炎症応答を解析するために、RAW264.7 を播種し 24 時間のインキュベーション後に DHEA (10.0 ng/ml with DMSO) を添加した。さらに、

24 時間後に endotoxin (100 ng/ml) を添加し, 1 時間インキュベートした. 細胞を PBS で洗浄し, protease inhibitor cocktail と phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) を含んだ SDS buffer で溶解し, サンプルを -80°C で保存した.

細胞のライセートは BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Scientific Pierce) を用いて定量し, lysis buffer でタンパク濃度を均一にした. 泳動ゲル 1 well 当たり 10 µg のタンパク量になるよう調整し, 電気泳動を行った. 泳動したタンパク質をニトロセルロース膜に転写し, Blocking One P (Nacalai Tesque) によりブロッキングを 1 時間行った. β -Actin (SC-1616, Santa Cruz), I κ B (SC-371, Santa Cruz), NF κ B-p65 (C22B4, Cell Signaling Technology), phospho-NF κ B-p65 (93H1, Cell Signaling Technology) のそれぞれの 1 次抗体は Signal Enhancer HIKARI for Western Blotting and ELISA (Nacalai Tesque) で希釈し, 4°C で一晩中浸した. 次いで, それぞれに対応した 2 次抗体を室温で 2 時間浸し, 洗浄して Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque) で化学発光させた. 発光検出には ChemiDoc XRS + system chemiluminescence imager (Bio-Rad) を用い, 解析は Image Lab software (Bio-Rad) を使用した.

統計解析

統計解析パッケージは IBM SPSS ver. 21 を使用し, 結果はすべて平均値 \pm 標準誤差で示した. 有意水準は 5%未満で統計学的有意と判断した. 2 グループ間の比較には Mann-Whitney の U 検定を, 2 グループ以上のデータには Kruskal-Wallis の一元配置分散分析を用いた.

第 3 章

結果

体重と体組成の変化

3ヶ月の運動負荷が体重, 肝重量, 精巣上体脂肪の重量に及ぼす影響を図1に示した. すべての項目において, 3moR と 3moTr の間に有意な差は認められなかった. また, 後肢骨格筋重量においても両群の間に差は認められなかった(図2). さらに, 小動物用 CT により, 体組成の変化を解析した(図3). 全身骨格筋重量に差は認められなかった(図3a). 一方, 内臓脂肪重量と皮下脂肪重量に関しては, 3moR に比して 3moTr で有意に低値を示した(図3b, c).

Kupffer 細胞数の変化

運動が Kupffer 細胞 (KCs) 数に及ぼす影響を検討した(図4). 肝臓の免疫組織化学染色において, KCs の表面マーカーである F4/80 陽性細胞の数は, 3moR と 3moTr の2群の比較では差異は認められなかった(図4a). 一方, Lipo3moR において, F4/80 陽性細胞は消失していた. また, 分離調製した肝臓の非実質細胞分画のフローサイトメトリーによる解析においても, F4/80 陽性細胞の比率は 3moR と 3moTr の2群の比較では差異は認められず, Lipo3moR では低値を示した(図4b).

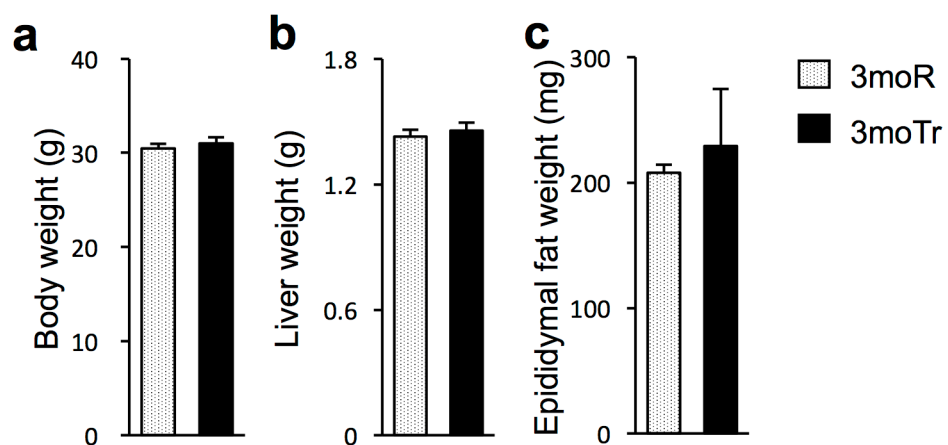


図 1. 体重，肝重量，精巣上体脂肪量の変化

(a) 体重. (b) 肝重量. (c) 精巣上体脂肪重量. すべての群は n = 8 で行い，
 平均値 ± 標準誤差で表示した.

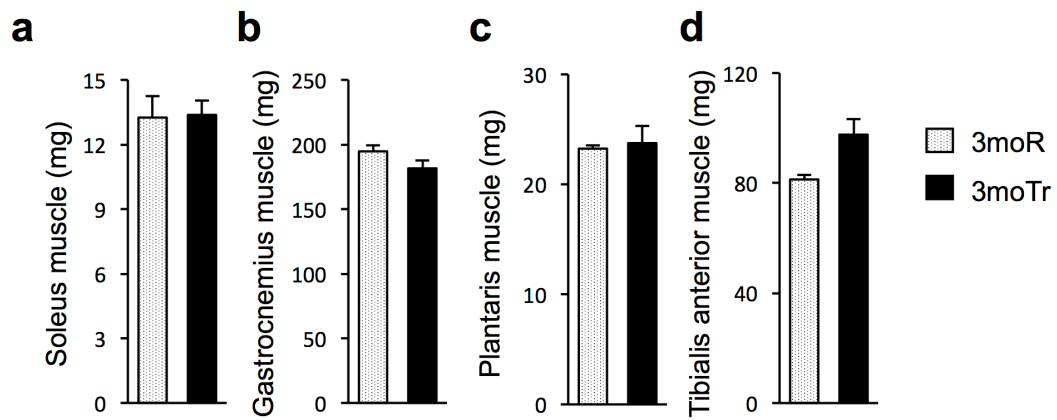


図 2. 後肢骨格筋重量の変化

(a) ヒラメ筋. (b) 腓腹筋. (c) 足底筋. (d) 前脛骨筋. すべての群は $n = 8$ で行い, 平均値 \pm 標準誤差で表示した.

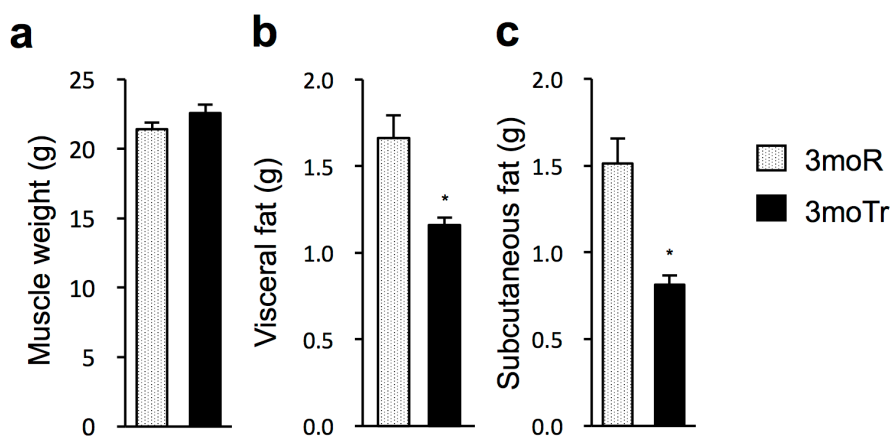


図 3. 体組成の変化

(a) 骨格筋重量. (b) 内臓脂肪重量. (c) 皮下脂肪重量. 小動物用 CT により解析した. すべての群は $n = 8$ で行い, 平均値 \pm 標準誤差で表示した. *; $P < 0.05$.

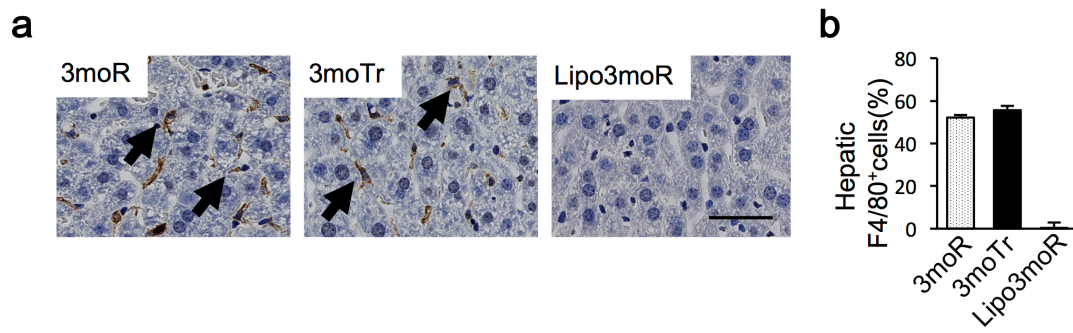


図 4. Kupffer 細胞数の変化

(a) 矢印は F4/80 陽性細胞. スケールバーは 50 μm で表示した. (b) F4/80 陽性細胞の割合. フローサイトメトリーによる解析. すべての群は $n=8$ で行い, 平均値 \pm 標準誤差で表示した.

Kupffer 細胞の異物貪食能の変化

3 ヶ月の運動負荷が KCs 数に影響を及ぼさないことが明らかになった。そこで、KCs 異物貪食能を解析する目的で、フローサイトメトリーにより、F4/80 陽性細胞における latex beads の取り込み量と蛍光強度を評価した。ヒストグラムにおいて、latex beads が入った細胞を示す右側のピークの蛍光強度は増大した (図 5a)。また、全 KCs における latex beads を取り込んだ KCs 細胞の割合は 3moR に比して 3moTr では有意な増加を認めた (図 5b)。さらに、KCs が取り込んだ latex beads の蛍光強度 (Mean fluorescence intensity: MFI) を比較すると、3moR に比して 3moTr で有意な差が認められた (図 5c)。

Kupffer 細胞の表面タンパク質の変化

Kupffer 細胞貪食能に差が認められたことから、KCs の貪食能に関与する表面タンパク質をフローサイトメトリーにて解析した。KCs の CD68 陽性細胞数は 3moR に比して 3moTr において有意に増加した (図 6a)。また、KCs の貪食能に関与する表面分子の MARCO と SR-A の蛍光強度と陽性細胞率も同様に 3moR に比し 3moTr で高値を示した (図 6b, c)。

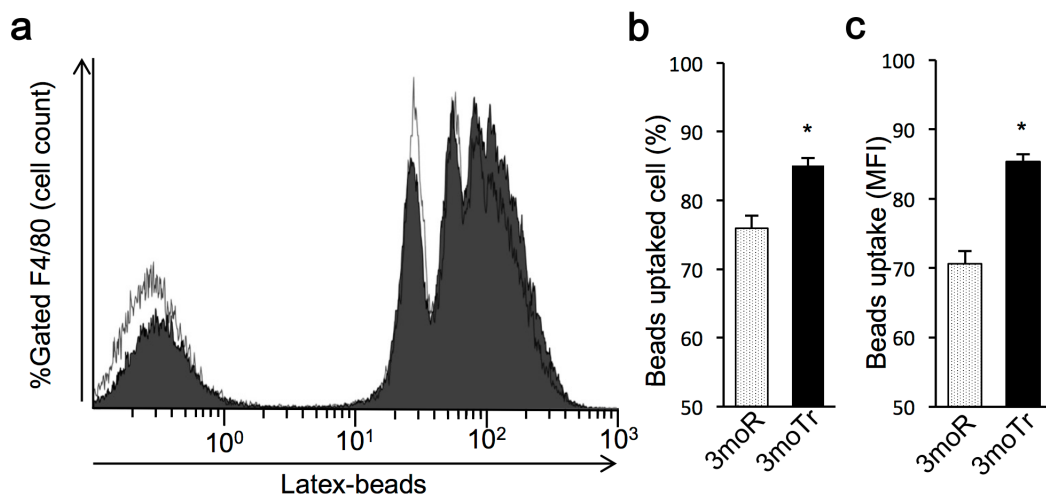


図 5. Kupffer 細胞の異物貪食能の変化

(a) F4/80 陽性細胞 (Kupffer 細胞) の latex beads 貪食能. (b) Latex beads を貪食した細胞の比率. (c) Latex beads を貪食した細胞の平均蛍光強度 (MFI). フローサイトメトリーによる解析. すべての群は $n=8$ で行い, 平均値 \pm 標準誤差で表示した. *; $P < 0.05$.

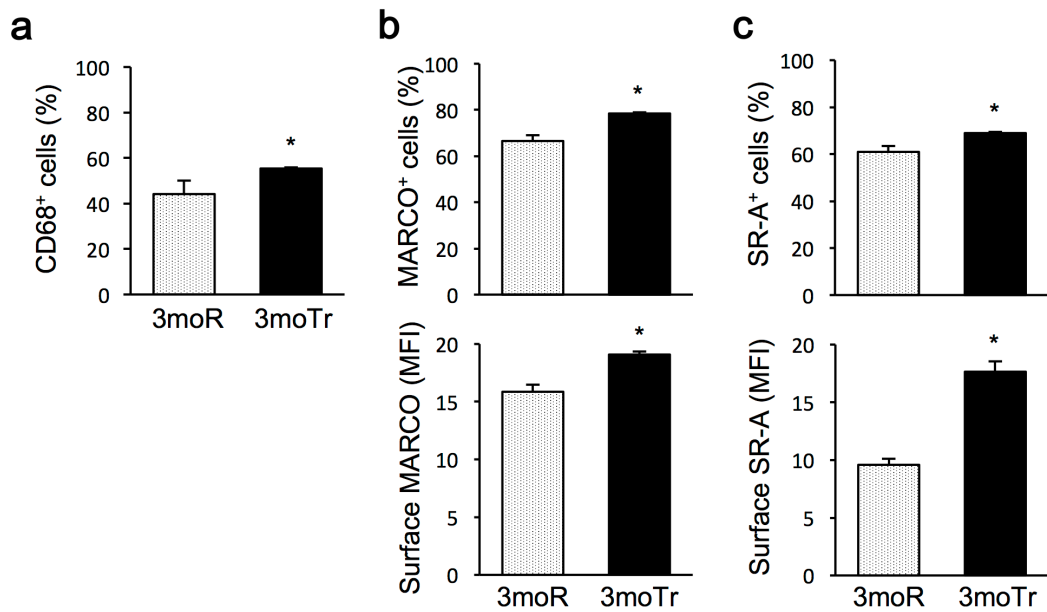


図 6. Kupffer 細胞の表面タンパク質の変化

(a) CD68 陽性細胞の割合. (b) MARCO 陽性細胞の比率と平均蛍光強度 (MFI).

(c) SR-A 陽性細胞の比率と MFI. すべての群は n = 8 で行い, 平均値 ± 標準

誤差で表示した. *; $P < 0.05$.

生体の endotoxin クリアランスの変化

Kupffer 細胞の異物貪食能が増大したことから、3 ヶ月の運動負荷が生体の endotoxin クリアランスに与える影響を解析した。まず、最終運動負荷の直後における門脈中 endotoxin 濃度は3 ヶ月の運動負荷による変化を認められなかった (図 7a)。運動負荷の終了から 24 時間後に、endotoxin を投与し、その後の血中 endotoxin 濃度の経時的推移を示した (図 7b)。Endotoxin 投与を行うと、3moR において 1.5 時間でピークが形成され、その後漸減した。一方、3moTr では、3moR と同様に 1.5 時間時点において endotoxin 濃度のピークが形成されたが、3moR に比して endotoxin のピーク値は有意に低下した。一方、Lipo3moR と Lipo3moTr における endotoxin 濃度のピーク値は 3moR と 3moTr に比べ高値を示した。それぞれの群における endotoxin 濃度の曲線下面積 (AUC) は 3moR に比して 3moTr で有意に低値を示し、Lipo3moR と Lipo3moTr では高値を示した (図 7c)。これらの結果より、3 ヶ月の運動負荷は生体の endotoxin クリアランスを増大させた。

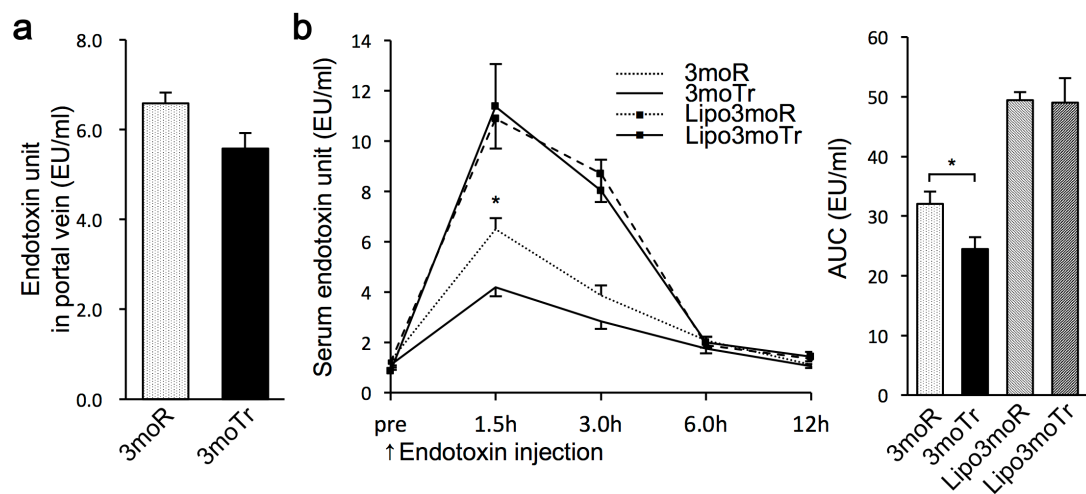


図 7. 門脈中 endotoxin 濃度と生体の endotoxin クリアランスの変化

(a) 門脈 endotoxin 濃度. 測定は最終の運動負荷の終了直後に実施した. (b) 末梢血中 endotoxin 濃度の推移とその曲線下面積. すべての群は $n = 8$ で行い, 平均値 \pm 標準誤差で表示した. *; $P < 0.05$.

Endotoxin 投与後の血中サイトカイン濃度の推移

Endotoxin 投与後の末梢血中サイトカイン濃度の推移を図 8 に示した。3moR 群においては、endotoxin 投与後 1.5 時間時点で TNF- α 、IL-6 濃度はピークを形成し、その後漸減した。一方、3moTr も同様に 1.5 時間時点でピークを形成するが、TNF- α と IL-6 のピーク値は 3moR に比して有意に低値となった。また、Lipo3moR と Lipo3moTr におけるサイトカイン濃度は 3moR と 3moTr に比して低値を示した。それぞれの群における炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6 濃度の AUC は 3moR に比して 3moTr で有意に低値を示し、Lipo3moR と Lipo3moTr では低値を示した。これらの結果より、3 ヶ月の運動負荷は endotoxin に対する炎症応答を低下させた。一方、IL-10 に関しては、endotoxin 投与後 1.5 時間でピークとなるが、運動効果は認められなかった。マクロファージを除去すると、非除去群に比して除去群では IL-10 のピーク値は低値を示した。

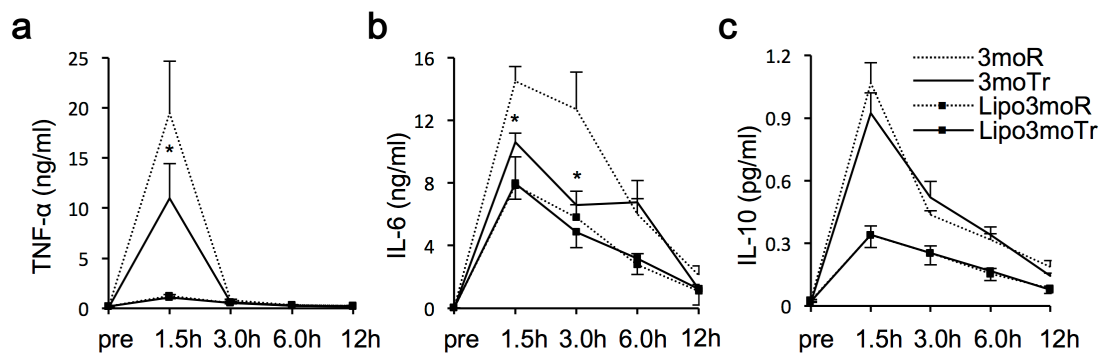


図 8. Endotoxin 投与後の末梢血中サイトカイン濃度の推移

(a) TNF- α . (b) IL-6. (c) IL-10. すべての群は $n = 8$ で行い, 平均値 \pm 標準誤差で表示した. *; $P < 0.05$.

血中ステロイドホルモンの変化

運動負荷による各種ステロイドホルモンの血中変動について解析を行った (図 8)。すべての群において, testosterone, estradiol, corticosterone の濃度は有意な差を認められなかった (図 9a-c)。一方, DHEA 濃度は 3moR に比して 3moTr で有意に高値となった (図 9d)。

血中アディポカイン濃度の変化

図 3b において, 内臓脂肪重量が低下していた。このことから, 3 ヶ月の運動負荷が血中の leptin と adiponectin 濃度に及ぼす影響を解析した (図 10)。Leptin と adiponectin いずれの項目も, 3moR に比して 3moTr で有意に低値を示した。

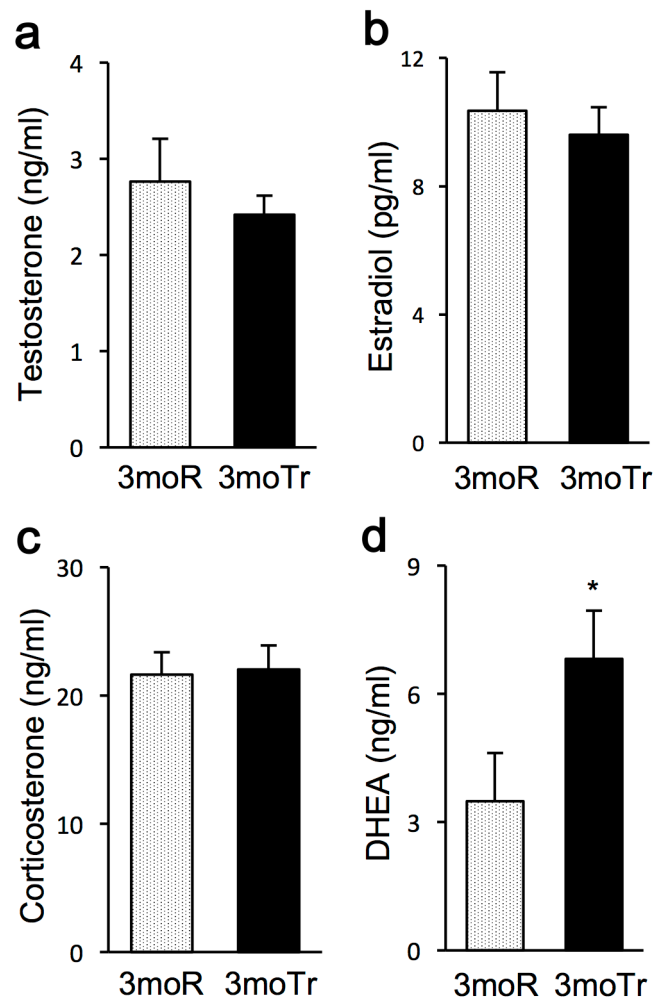


図 9. 末梢血中ステロイドホルモン濃度の変化

(a) Testosterone. (b) Estradiol. (c) Corticosterone. (d) DHEA.

すべての群は $n = 8$ で行い、平均値 \pm 標準誤差で表示した。* ; $P < 0.05$.

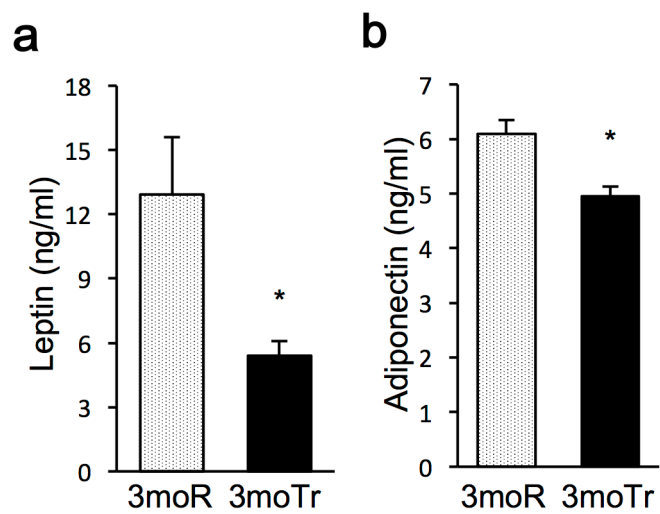


図 10. 末梢血中アディポカイン濃度の変化

(a) Leptin. (b) Adiponectin.

すべての群は $n = 8$ で行い，平均値 \pm 標準誤差で表示した。*; $P < 0.05$.

DHEA がマクロファージの貪食能に与える影響

生体において、血中 DHEA 濃度は増加していた (図 9d)。そこで、DHEA がマクロファージ様細胞 (RAW264.7) の貪食能に及ぼす影響を解析した。RAW264.7 に DHEA を添加すると、細胞に取り込まれた latex beads 量の増大を確認できた (図 11a)。また、フローサイトメトリーによる解析においても、latex beads の MFI は濃度依存的に増大し、DMSO に比して 10 ng/ml の濃度で有意に高値となった。

DHEA がマクロファージの炎症応答に与える影響

RAW264.7 に endotoxin (100 ng/ml) を添加し 60 分後に引き起こされる NFκB-p65 のリン酸化と IκB の分解は、endotoxin を添加することで亢進した。DHEA (10 ng/ml) を添加すると、IκB の分解に差は認められなかった。一方、DHEA 非添加群に比して DHEA 添加群において NFκB-p65 のリン酸化が有意に抑制されていた (図 12)。

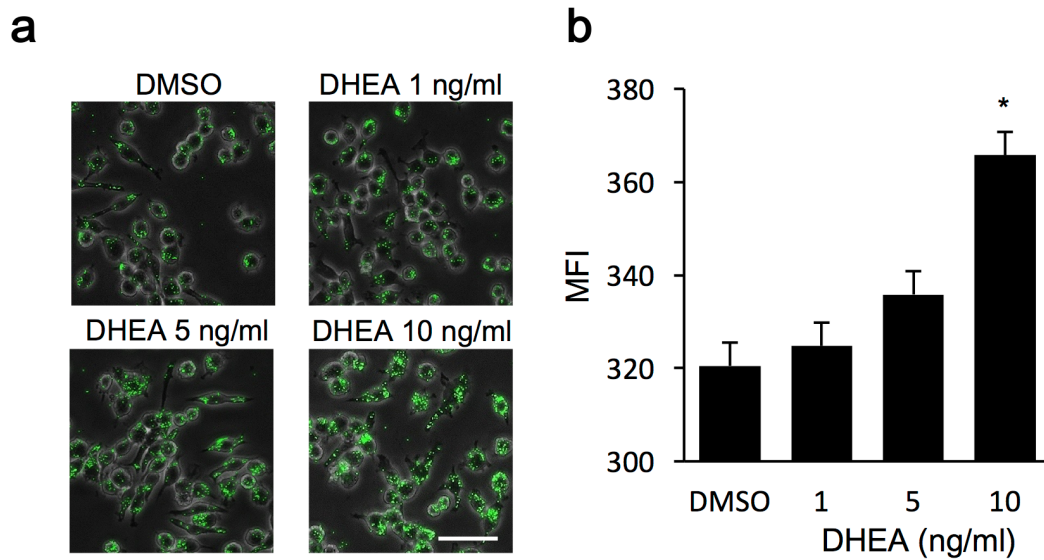


図 11. DHEA がマクロファージ RAW264.7 細胞の貪食能に与える変化

(a) Latex beads 貪食能. 緑色が latex beads. スケールバーは 50 μm で表示した.

(b) Latex beads の平均蛍光強度 (MFI). フローサイトメトリーにて解析した.

すべての群は $n=6$ で行い, 平均値 \pm 標準誤差で表示した. *; $P < 0.05$.

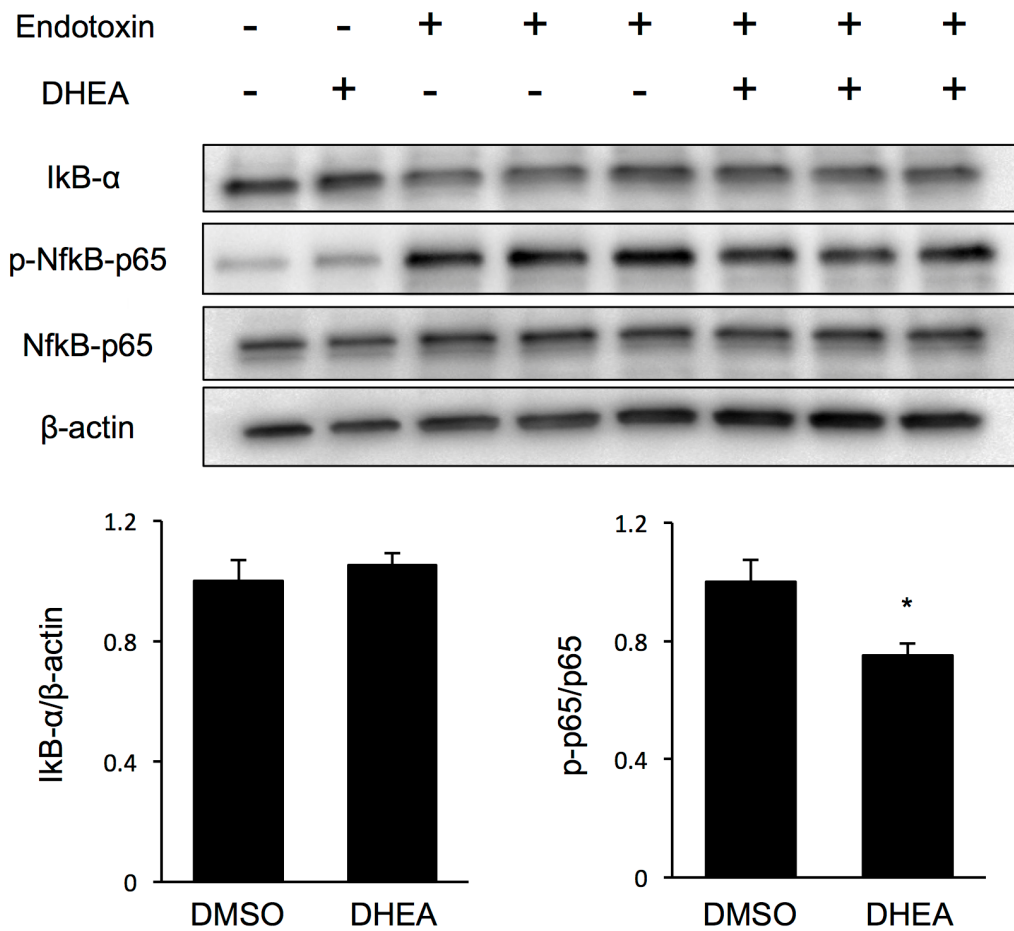


図 12. DHEA がマクロファージ (RAW264.7) の炎症応答に与える変化

Endotoxin 刺激による炎症応答シグナル分子の変化. Endotoxin (100 μ g/ml)を添加し, 1時間後に解析した. すべての群は n = 3 で行い, 平均値 \pm 標準誤差で表示した. *; $P < 0.05$.

第 4 章

考察

本研究の成果は、3 ヶ月にわたる中強度の運動負荷が、門脈中 endotoxin 濃度、KCs 数に影響を与えることなく、1) KCs による蛍光 latex beads の取り込み量を増加させたこと、異物貪食能を増大させ、外因性に投与した endotoxin の生体クリアランスを増大させた点、また、2) Endotoxin の刺激による炎症性サイトカイン濃度の上昇を軽減し、炎症応答を抑制した点である。これらの運動効果は KCs を除去したマウスにおいて消失したことより、運動負荷による KCs の表現形質の変化であると考えられた。

本研究に用いた運動プログラムは傾斜 0%、10-18 m/min までの漸増負荷を 50 分間、週に 5 日施すもので、中強度の運動負荷に該当する¹⁸。肥満や生活習慣病の患者や動物モデルに対する予防や治療に多く用いられる運動強度に相当するものである^{19,14}。本研究において、中強度の運動負荷の継続は門脈血中 endotoxin 濃度を変化させずに (図 3a)、KCs の latex beads 取り込み量の増大と endotoxin クリアランスを増大させた (図 3b)。KCs 貪食能と運動実践について報告した論文は少ない。Yano らは F344 ラットに傾斜 15%、21 m/min で 60 分間の一過性の高強度運動を行なうと、門脈中 endotoxin 濃度の上昇に伴う KCs の latex beads 取り込み能の増大が認められたと報告している¹⁶。一方、*in vitro* において、endotoxin 刺激は KCs 貪食能を変化させることが知られている²⁰。本研究において、中強度の運動負荷が KCs 貪食能を向上させた背景には、門脈中 endotoxin 濃度の上昇以外の要因が介在する可能性が示唆された。

中強度の運動負荷を継続すると、KCs における初期の latex beads 取り込み能力（投与 5 min 時点）は増大した（図 5）。貪食能が増大した背景には、KCs 表面の CD68 やスカベンジャー受容体の増大が考えられる（図 6）。KCs における CD68 陽性細胞は latex beads 貪食能が強い細胞集団であり²⁰、また、スカベンジャー受容体（MARCO, SR-A）は貪食や endotoxin クリアランスに関与する^{21,22}。中強度の運動負荷の継続により KCs のこれらの表面分子が増加した結果、KCs 貪食能の増大を生み出し、endotoxin 投与後の末梢血 endotoxin 濃度のピーク値に差異を生じたものと推測される。継続的な運動がカーボンクリアランスの増大に寄与するという報告も存在し²¹、我々の結果と照らし合わせると、この結果は KCs の異物貪食能増大による結果であると推測される。

中強度の運動負荷が endotoxin 刺激による生体の炎症応答に与える影響について検討した。Endotoxin 投与により、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6、抗炎症性サイトカインである IL-10 の末梢血濃度は、投与後 1.5 時間でピーク値となった（図 7）。一方、運動負荷は endotoxin による炎症応答を低下させ、TNF- α 、IL-6 濃度の増加を軽減させた（図 7a, b）。KCs 貪食能の増大より、生体内を循環する endotoxin 量が早期に減少した結果、炎症応答の低下が生じたものと推測される。一方、運動負荷が endotoxin クリアランスを増大したにも関わらず、IL-10 に関しては変化が認められなかった（図 7c）。最大心拍出量が 40-60%となるような複合運動を行ったヒトの単球において、endotoxin を投与すると安静群の IL-10 分泌量に比して、運動群において増大する報告もある²³。今後の詳細な検討が必要である。

Endotoxin 濃度の増加がないことにも関わらず、中強度の運動負荷が KCs の表

現形質を変化させた因子について検討を行った。異物貪食能に影響を与えることが報告されているステロイドホルモン^{24,25,26}の末梢血濃度について測定した結果、運動負荷により DHEA 濃度は上昇を認めたが、estradiol, testosterone, corticosterone の変化は認められなかった。運動よりこれらのホルモンが変動することが知られているが、本研究では差が認められなかった (図 9)。この背景には、サンプリング時間が運動直後ではなく、最終の運動負荷の終了より 24 時間後であることが起因している可能性がある。末梢血濃度の増加が認められた DHEA に関しては、加齢により DHEA/S 濃度は低下するものの²⁷、運動により血中 DHEA/S 濃度は増加することが報告されている²⁸。DHEA/S の半減期は 7-22 時間であり、他のホルモンより比較的長く、運動を継続することで血中濃度が増加したものと推測される²⁹。In vivo において、DHEA を投与し血中濃度を高めた後に endotoxin を投与するとマウス生存率が向上するとともに、TNF- α の分泌量が抑制されることが報告されている³⁰。このことより、運動負荷が血中 DHEA 濃度の増加を引き起こし、endotoxin 刺激に対する KCs の炎症応答を低下させている可能性が示唆される。

DHEA による KCs の表現形質の変化について *in vitro* において検討した。マクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いた実験において、運動負荷後の末梢血濃度 (図 9d) に近い濃度の DHEA を添加すると、latex beads に対する貪食能は濃度依存的に増大し (図 11)、endotoxin 刺激による NF κ B-p65 のリン酸化は抑制された (図 12)。これらの結果より、*in vivo* における血中 DHEA/S 濃度の増加による KCs の異物貪食能の増大と炎症応答の低下を誘導する可能性が、*in vitro* においても実証された。先行研究においても、ヒト単球に DHEA 類似体である EPI を

添加するとマラリアに感染した赤血球（リング）の貪食が増大すること³¹、また、RAW264.7にDHEAを添加することでendotoxin刺激によるTNF- α の分泌を抑制することが報告されている³²。これらの報告は本研究の結果を支持するものである。

アディポカインはマクロファージ貪食能を増大させることが報告されている^{33,34}。すなわち、炎症性アディポカインであるleptinや抗炎症性アディポカインであるadiponectinはマクロファージの貪食能を増大させることが報告されている^{33,34}。本研究において、血中leptinとadiponectinの濃度は、3moTrは3moRに比して低下していた（図10）。本結果は先行研究と一致する^{35,36}。これらのことから、3ヶ月の運動負荷が及ぼすKCs貪食能の増大には、アディポカインの増加による影響は考えにくいことが推察された。

我が国では肥満人口の増大のもとにNAFLD患者が急増している。NAFLDの予防や治療には、食事や運動療法以外にエビデンスの得られた有効な方法は報告されていない。NAFLD患者では血中endotoxin濃度の上昇⁴、KCs貪食能の低下⁹、自然免疫応答の亢進³⁷などの病的状態が存在する。NAFLDの肝脂肪化や線維化の肝病態とDHEA濃度の両者の間には負の相関がある³⁸。一方、我々の最近の報告では、運動実践は、KCs貪食能の増大や免疫炎症応答の低下を介してNAFLDの肝病変を改善させることを報告した¹⁵。本研究の結果は、運動実践がNAFLD患者のマネジメントに有用であることの分子メカニズムの一つを説明するものであると考えられた。

第 5 章

結語

マウスにおける中強度の運動負荷の3ヶ月にわたる継続は、Kupffer 細胞貪食能を向上させることにより生体の endotoxin クリアランスを増大させ、また、炎症応答の低下を誘導した。その背景には、運動負荷による DHEA 産生の増大が介在するものと考えられた。

第 6 章

引用文献

- 1 Imamura, Y. *et al.* Increasing prevalence of diabetes mellitus in association with fatty liver in a Japanese population. *J Gastroenterol* **49**, 1406-1413 (2014).
- 2 Tilg, H. & Moschen, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **52**, 1836-1846 (2010).
- 3 Schnabl, B. & Brenner, D. A. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology* **146**, 1513-1524 (2014).
- 4 Wigg, A. J. *et al.* The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* **48**, 206-211 (2001).
- 5 Bouwens, L., Baekeland, M., De Zanger, R. & Wisse, E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* **6**, 718-722 (1986).
- 6 Mathison, J. C. & Ulevitch, R. J. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol*

- 123**, 2133-2143 (1979).
- 7 Smedsrod, B. *et al.* Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* **35**, 1509-1516 (1994).
- 8 Imajo, K. *et al.* Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell metab* **16**, 44-54 (2012).
- 9 Iijima, H. *et al.* Decrease in accumulation of ultrasound contrast microbubbles in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* **37**, 722-730 (2007).
- 10 Cheong, H. *et al.* Phagocytic function of Kupffer cells in mouse nonalcoholic fatty liver disease models: Evaluation with superparamagnetic iron oxide. *J Magn Reson Imaging* **41**, 1218-1227 (2015).
- 11 Tsujimoto, T. K., H. *et al.* Decreased phagocytic activity of Kupffer cells in a rat nonalcoholic steatohepatitis model. *World J Gastroenterol.* **14**, 6036 (2008).
- 12 Akiyama, K. *et al.* Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously leads to development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* **60**, 761A (2014).
- 13 Keating, S. E., Hackett, D. A., George, J. & Johnson, N. A. Exercise and

- non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J hepatol* **57**, 157-166 (2012).
- 14 Oh, S. *et al.* Moderate to vigorous physical activity volume is an important factor for managing nonalcoholic fatty liver disease: a retrospective study. *Hepatology* **61**, 1205-1215 (2015).
- 15 Oh, S. *et al.* High-Intensity Aerobic Exercise Improves Both Hepatic Fat Content and Stiffness in Sedentary Obese Men with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep* **7**, 43029 (2017).
- 16 Yano, H., Kinoshita, S. & Kira, S. Effects of acute moderate exercise on the phagocytosis of Kupffer cells in rats. *Acta physiologica Scandinavica* **182**, 151-160 (2004).
- 17 Howlett, T. A. Hormonal responses to exercise and training: a short review. *Clin endocrinol* **26**, 723-742 (1987).
- 18 Schefer, V. & Talan, M. I. Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Exp Gerontol* **31**, 387-392 (1996).

- 19 Kawanishi, N., Niihara, H., Mizokami, T., Yano, H. & Suzuki, K. Exercise training attenuates adipose tissue fibrosis in diet-induced obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* **440**, 774-779 (2013).
- 20 Kinoshita, M. *et al.* Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J Hepatol* **53**, 903-910 (2010).
- 21 Areschoug, T. & Gordon, S. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* **11**, 1160-1169 (2009).
- 22 Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M. & Raetz, C. R. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* **352**, 342-344 (1991).
- 23 Ortega, E., Bote, M. E., Giraldo, E. & Garcia, J. J. Aquatic exercise improves the monocyte pro- and anti-inflammatory cytokine production balance in fibromyalgia patients. *Scand J Med Sci Sports* **22**, 104-112 (2012).
- 24 Chao, T. C., Phuangsab, A., Van Alten, P. J. & Walter, R. J. Steroid sex hormones and macrophage function: regulation of chemiluminescence and phagocytosis. *Am J Reprod Immunol* **35**, 106-113 (1996).

- 25 Liu, Y. *et al.* Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol* **162**, 3639-3646 (1999).
- 26 Bongiovanni, B. *et al.* Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **95**, 562-569 (2015).
- 27 Ingram, D. K., Nakamura, E., Smucny, D., Roth, G. S. & Lane, M. A. Strategy for identifying biomarkers of aging in long-lived species. *Exp Gerontol* **36**, 1025-1034 (2001).
- 28 Tremblay, M. S., Copeland, J. L. & Van Helder, W. Effect of training status and exercise mode on endogenous steroid hormones in men. *J Appl Physiol* **96**, 531-539 (2004).
- 29 Rabe, T. *et al.* Dehydroepiandrosterone and its Sulfate Joint Statement by the German Society for Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine (DGGEF) and the German Professional Association of Gynecologists (BVF). *J Reproduktionsmed. Endokrinol* **12**, 318-341 (2015).
- 30 Danenberg, H. D., Alpert, G., Lustig, S. & Ben-Nathan, D.

- Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 2275-2279 (1992).
- 31 Ayi, K. *et al.* 16alpha-bromoepiandrosterone, an antimalarial analogue of the hormone dehydroepiandrosterone, enhances phagocytosis of ring stage parasitized erythrocytes: a novel mechanism for antimalarial activity. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3180-3184 (2002).
- 32 Ben-Nathan, D., Padgett, D. A. & Loria, R. M. Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. *J Med Microbiol* **48**, 425-431 (1999).
- 33 Mancuso, P. *et al.* Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *J Immunol* **168**, 4018-4024 (2002).
- 34 Yokota, T. *et al.* Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* **96**, 1723-1732 (2000).
- 35 He, C. *et al.* Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle

- glucose homeostasis. *Nature* **481**, 511-515 (2012).
- 36 Gollisch, K. S. *et al.* Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E495-504 (2009).
- 37 Sharifnia, T. *et al.* Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **309**, G270-278 (2015).
- 38 Charlton, M. *et al.* Low circulating levels of dehydroepiandrosterone in histologically advanced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **47**, 484-492 (2008).

第 7 章

謝辞

本研究の遂行にあたり，懇切なるご指導，ご鞭撻を賜りました筑波大学医学医療系 臨床医学域 医療科学 正田純一教授に心より厚く御礼申し上げます。また，研究を遂行するにあたり，懇切丁寧にご助言下さった筑波大学医学医療系 生命医科学域 蕨栄治講師に深く感謝致します。

本論文の作成にあたり，丁寧なご校閲とご指導ならびに，研究生活を支えてくださった筑波大学 医学医療系技術室 技術専門職員 木内美紀氏，筑波大学附属病院 つくばスポーツ医学・健康科学センター 呉世昶博士，筑波大学附属病院 歯科口腔外科 内田文彦病院講師，疾患制御医学専攻 博士課程 秋山健太郎氏，志田隆史氏をはじめとする，分子スポーツ医学研究室の皆様並びに歯科口腔外科研究室の皆様心より感謝申し上げます。研究生活において，公私ともに支えてくださり，かけがえのない時間を共有し合った友人，先輩，後輩に厚く御礼申し上げます。

最後に，今日まで学生生活を支え，見守り応援してくれた家族に心より感謝申し上げます。研究の糧となったすべての実験動物に対し，深い感謝と追悼の意を表します。