

2010年度 修士論文

クルクミンはダウンヒル運動後のマウスの
骨格筋における NADPH-oxidase および
MCP-1 の遺伝子発現を抑制する

Curcumin suppresses NADPH-oxidase and
MCP-1 mRNA expression in skeletal muscle
of mice following downhill running

早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科
スポーツ科学専攻 スポーツ医科学研究領域

5009A025-9

加藤 孝基

Kato, Koki

研究指導教員： 鈴木 克彦 准教授

目次

1) 緒言	1
2) 方法	4
2-1) 実験動物と飼育条件	
2-2) ダウンヒル走行運動負荷	
2-3) クルクミン投与	
2-4) 採血および筋組織採取	
2-5) クレアチンキナーゼ活性	
2-6) real-time quantitative PCR	
2-7) タンパク質濃度測定	
2-8) Hydrogen peroxide 濃度測定	
2-9) 統計処理	
3) 結果	8
4) 考察	21
5) 結論	24
6) 謝辞	25
7) 参考文献	26
8) おわりに－今後の展望－	31

1) 緒言

生体には損傷に対する防御機構が存在し、組織の恒常性を保っている。骨格筋においても、運動や圧迫ストレス、外傷に伴う組織の損傷が引き起こされると、組織を再生する機構がはたらく。しかしながら、過度な運動により防御機構のバランスが崩れると、組織再生の遅れ、機能障害などを引き起こす。ダウンヒル運動などにみられる伸張性筋収縮は、筋繊維の過剰な損傷や炎症反応を伴うことが知られている [1, 2]。これまでに実験動物を用いた研究より、ダウンヒル運動は炎症性サイトカインおよび活性酸素の産生を伴うことが報告されている [3, 4]。近年、これらの炎症反応には好中球やマクロファージなどの免疫細胞が関与していることが明らかになった [5]。

骨格筋損傷後の炎症反応は、損傷した骨格筋組織での tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生により惹起される。実際に、マウス前脛骨筋のカルディオトキシシン誘発性筋損傷直後に、組織内で TNF- α と IL-1 β の遺伝子発現が増加することが報告されている [6]。また、ラットを用いた研究では、ダウンヒル運動直後に外側広筋および腓腹筋で TNF- α の遺伝子発現が増加することが報告されている [7]。さらに、運動 24 時間後にマウス腓腹筋の IL-1 β タンパク質濃度が増加することが報告されている [8]。また、骨格筋損傷時には、組織内に好中球、マクロファージなどの白血球が浸潤することが知られている [9]。白血球の浸潤は、TNF- α や IL-1 β により E セレクチンなどの細胞接着分子の発現が増加し、IL-8、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 などのケモカインが損傷後に増加することで誘導される [6, 10, 11]。最も早く組織に浸潤する白血球は好中球である。実際に、ダウンヒル誘導性筋損傷 45 分後に損傷部位に浸潤

することが報告されている [9]。ケモカインで誘導された好中球は活性化され、損傷組織に浸潤し貪食を行う [12]。また、筋損傷時には、MCP-1 の作用によりマクロファージの浸潤が誘導されることが知られている [13, 14]。組織に浸潤したマクロファージは、損傷部位の貪食を行うだけでなく、炎症の鎮静化と筋サテライト細胞を含む筋幹細胞の活性化も引き起こすことが考えられている [15]。一方で、好中球やマクロファージの形質膜に存在し、酸化酵素としてはたらく NADPH-oxidase により活性酸素が産生される [16, 17]。NADPH-oxidase は、好中球やマクロファージが貪食を行った際に活性化され、電子供与体として酸素を1電子還元してスーパーオキシド ($\cdot O_2^-$) を産生する [18]。また、生成された $\cdot O_2^-$ は、過酸化水素 (hydrogen peroxide: H_2O_2) に代謝される。実際に、2時間のダウンヒル運動後、ラットの腓腹筋およびヒラメ筋の H_2O_2 濃度が上昇することが報告されている [7]。また、 H_2O_2 は NF- κ B などのシグナル伝達経路を活性化し、それらの伝達経路は IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインを誘導することが報告されている [19]。生体には、運動および骨格筋損傷により生じた活性酸素を生成する系と消去する系が存在しバランスを保っているが、活性酸素生成系が消去系の能力を超えると酸化ストレス状態となり、デオキシリボ核酸 (DNA)、細胞膜などの脂質およびタンパク質を傷害し、細胞死を引き起こすことが考えられる [20]。また、過剰な活性酸素により運動パフォーマンスが低下することも知られている [21]。

天然ウコンの主成分であるクルクミンは様々な疾患モデルにおいて抗炎症作用を示すことが明らかにされている [22, 23]。クルクミンの作用機序について、これまでに NF- κ B の活性を抑制することが報告されている [24, 25]。したがって、NF- κ B シグナル伝達経路の活性抑制を介して TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインを抑制すると考えられる。また、クルクミンは

H₂O₂ などの活性酸素の産生を阻害することが報告されている [26]。クルクミンは抗炎症作用および抗酸化作用を示すことから、筋損傷を伴う運動においても炎症状態を抑制する可能性が考えられる。実際に、マウスを用いた動物実験で、クルクミン投与によりダウンヒル運動誘発性筋損傷後の骨格筋の IL-1 β 、IL-6、TNF- α タンパク質濃度が減少することが報告されている [8]。しかしながら、クルクミン摂取によるダウンヒル運動時の筋組織での炎症反応抑制の作用機序に関しては十分に解明されていない。クルクミンは、phorbol myristate acetate (PMA) 誘導性 MCP-1 の産生を抑制することが報告されている [27]。したがって、クルクミンによる筋損傷時の炎症反応の改善には、マクロファージ浸潤の抑制が関与している可能性が考えられる。さらに、クルクミンの抗酸化作用から好中球やマクロファージの活性酸素産生が抑制される可能性も考えられる。

そこで、本研究では、高吸収のクルクミンを経口で単回投与し、マウスのダウンヒル走行運動誘導性筋損傷後の骨格筋組織の炎症反応、酸化ストレスおよび免疫細胞浸潤に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

2) 方法

1. 実験動物と飼育条件

本実験では 10 週齢の C57B/6J 雄マウス (紀和実験動物研究所, Wakayama, Japan)を用いた。室温 21℃、湿度 35%、21:00-9:00 を暗期に 9:00-21:00 を明期に設定した飼育室において、ゲージ内で飼育した。MF (オリエンタル酵母, Tokyo, Japan)の飼料を使用し、飲水は水道水を用い、ともに自由摂取とした。マウスは、無作為に安静 +クルクミン非投与群 (n=12)、安静 +クルクミン投与群 (n=12)、運動 +クルクミン非投与群 (n=14)、運動 +クルクミン投与群 (n=14)の 4 群に分けた。

なお、本実験は早稲田大学動物実験委員会の承認を得て行った (10K001)。

2. ダウンヒル走行運動負荷

ダウンヒル走行運動負荷には、小動物用運動負荷装置 KN-73トレッド・ミル (夏目製作所, Tokyo, Japan)を用いた。まず運動開始から 12.5-17.5m/min, 傾斜 -14°の条件で 15 分間ウォーミングアップを負荷した。その後、速度 22m/min, 傾斜 -14°の条件で 135 分間ダウンヒル走行運動を行い、合計 150 分間の走行運動を負荷した。

3. クルクミン投与

運動 +クルクミン投与群には運動終了直後に麻酔下にてマウス1匹あたりクルクミン成分 3mg を含む PBS 溶液を 200 μ l 経口投与した。運動 +クルクミン非投与群には運動終了直後に麻酔下 PBS を 200 μ l 経口投与した。なお、経口投与にはマウス用ゾンデ (夏目製作所, Tokyo, Japan)を使用した。また、安静群も同様の方法で投与した。麻酔は実験

小動物用ガス麻酔システム (DSファーマバイオメディカル, Osaka, Japan) を使用して、イソフルランフォーレン吸入麻酔液 (アボットジャパン, Tokyo, Japan)を用いた。麻酔は、流速 0.8L/min、濃度 4.0%に設定した。

4. 採血および筋組織採取

クルクミン投与 24 時間後に解剖を行った。イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈から血液をヘパリン処理された真空採血管 (TERUMO, Tokyo, Japan)に採取した。プレ麻酔時は、流速 0.8L/min、濃度 4.0%に設定し、維持麻酔時は、流速 0.8L/min、濃度 1.0%に設定した。採取した血液は、2,600xG、10 分間の条件で遠心を行い、上清の血漿成分を分離し、-80℃の冷凍庫にて保存した。

また、両脚から腓腹筋を摘出した。摘出した腓腹筋は、RNA later (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)に浸して液体窒素で凍結させた後、-80℃の冷凍庫にて保存した。

5. クレアチンキナーゼ活性

血漿中のクレアチンキナーゼ活性は長浜ライフサイエンスラボラトリーに依頼して測定した。

6. real-time quantitative PCR

腓腹筋の Total RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands, USA)および RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Venlo, Netherlands, USA)を用いて抽出した。その後 Nano Drop system (Nano Drop Technologies, Wilmington, Delaware, USA)を用いて RNA 濃度を測定した。Total mRNA は、High Capacity cDNA Reverse

Transcription kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)を用いて、逆転写反応によりcDNAを作製した。作製したcDNAは、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)を用いて Fast real-time PCR 7500 装置 (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)によりPCRを行った。PCR条件は、95℃で10分間cDNAを変性させた後に、1サイクル95℃で15秒間、60℃で1分間の条件で、40サイクル繰り返した。構成的に発現する遺伝子として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を使用した。標的遺伝子および内因性遺伝子として使用したプライマーはTable 1に示した。

7. タンパク質濃度測定

腓腹筋は Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER) with Protease inhibitor (Thermo, Rockford, Illinois, USA)溶液でホモジナイズした後、10,000xG、10分間の条件で遠心操作を行い上清のタンパク質を分離した。タンパク濃度は BCA Protein Assay (Thermo, Rockford, Illinois, USA)を用いて測定した。

腓腹筋内の TNF- α タンパク質濃度は Mouse TNF- α ELISA kit (R&D systems, Mckinley, Minnesota, USA)、IL-6 タンパク質濃度は Mouse IL-6 ELISA kit (R&D systems, Mckinley, Minnesota, USA)、MCP-1 タンパク質濃度は Mouse MCP-1 ELISA kit (R&D systems, Mckinley, Minnesota, USA)を用いて測定した。MPO タンパク質濃度は、Mouse MPO ELISA kit (Hycult biotech, Uden, Netherland)を用いて測定した。なお、吸光度の測定には VERSA Max microplate reader

(Molecular Devices, California, USA)を使用した。

8. H₂O₂ 濃度測定

腓腹筋内の H₂O₂ 濃度は SensoLyte ADHP hydrogen peroxide assay kit (Fremount, California, USA)を用いて測定した。なお、蛍光強度の測定には FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Offenburg, Germany)を使用した。

9. 統計処理

結果は、平均値+標準誤差で表した。運動およびクルクミン投与を要因とした測定項目の変化については、二元配置分散分析を行い、優位水準は5%未満とした。Post hoc テストは Turkey's test の検定を行い、優位水準は5%未満とした。

全ての分析は SPSS V.17 を用いて行った。

3) 結果

ダウンヒル運動およびクルクミン投与による血漿中のクレアチンキナーゼ活性の変化

血漿中のクレアチンキナーゼ活性はダウンヒル運動による影響がみられた [an effect of downhill exercise : $F=10.7$, $P<0.01$., curcumin: $F=0.007$, n.s., and exercise x curcumin interaction: $F=0.65$, n.s.]. また、クルクミン非投与群においてクレアチンキナーゼ活性はダウンヒル運動によって増加する傾向がみられた ($P=0.088$)。しかしながら、ダウンヒル運動群において、クレアチンキナーゼ活性についてはクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (Fig. 1)。

ダウンヒル運動およびクルクミン投与による骨格筋組織の炎症性サイトカインのタンパク質濃度の変化

筋組織中の TNF- α のタンパク質濃度はダウンヒル運動およびクルクミン投与による影響はみられなかった [an effect of downhill exercise : $F=1.59$, n.s., curcumin: $F=0.56$, n.s., and exercise x curcumin interaction: $F=2.17$, n.s.]. 一方、クルクミン非投与群においても、TNF- α のタンパク質濃度はダウンヒル運動による有意な変化はみられなかった。加えて、ダウンヒル運動群において、TNF- α のタンパク質濃度はクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (Fig. 2A)。

また、筋組織中の IL-6 のタンパク質濃度はダウンヒル運動およびクルクミン投与による影響はみられなかった [an effect of downhill exercise : $F=0.01$ n.s., curcumin: $F=0.01$, n.s., and exercise x curcumin interaction: $F=0.005$, n.s.]. また、クルクミン非投与群において IL-6 のタンパク質濃度はダウンヒル運動による有意な変化はみられなかった。加え

て、ダウンヒル運動群において、IL-6 のタンパク質濃度についてはクルクミン投与によって有意な変化はみられなかった (Fig. 2B)。

ダウンヒル運動およびクルクミン投与による骨格筋組織の炎症性サイトカインの遺伝子発現の変化

筋組織中の TNF- α の遺伝子発現はダウンヒル運動およびクルクミン投与による影響はみられなかった [an effect of downhill exercise : F=0.29, n.s., curcumin: F=0.28, n.s., and exercise x curcumin interaction: F=0.08, n.s.]。また、クルクミン非投与群において TNF- α の遺伝子発現はダウンヒル運動による有意な変化はみられなかった。加えて、ダウンヒル運動群において、TNF- α の遺伝子発現についてはクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (Fig. 3A)。

一方、筋組織中の IL-6 の遺伝子発現量はダウンヒル運動およびクルクミン投与の影響はみられなかった [an effect of downhill exercise : F=2.28, n.s., curcumin: F=4.16, n.s., and exercise x curcumin interaction: F=0.08, n.s.]。また、クルクミン非投与群において IL-6 の遺伝子発現はダウンヒル運動による有意な変化はみられなかった。加えて、ダウンヒル運動群において、IL-6 の遺伝子発現についてはクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (Fig. 3B)。

筋組織中の IL-1 β の遺伝子発現はダウンヒル運動およびクルクミン投与の影響はみられなかった [an effect of downhill exercise : F=0.01, n.s., curcumin: F=0.44, n.s., and exercise x curcumin interaction: F=2.47, n.s.]。また、クルクミン非投与群において IL-1 β の遺伝子発現はダウンヒル運動による有意な影響はみられなかった。加えて、ダウンヒル運動群において、IL-1 β の遺伝子発現についてはクルクミン投与による有意

な変化はみられなかった (Fig. 3C)。

加えて、筋組織中の IL-12 の遺伝子発現はダウンヒル運動およびクルクミン投与による影響はみられなかった [an effect of downhill exercise : $F=0.40$, n.s., curcumin: $F=0.00$, n.s., and exercise x curcumin interaction: $F=0.04$, n.s.]。また、クルクミン非投与群において IL-12 の遺伝子発現はダウンヒル運動による有意な変化はみられなかった。加えて、ダウンヒル運動群において、IL-12 の遺伝子発現についてはクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (Fig. 3D)。

ダウンヒル運動およびクルクミン投与による骨格筋組織の H_2O_2 濃度および NADPH-oxidase 遺伝子発現の変化

筋組織中の H_2O_2 濃度はダウンヒル運動およびクルクミン投与の影響はみられなかった [an effect of downhill exercise : $F=3.56$, n.s., curcumin: $F=2.74$, n.s., and exercise x curcumin interaction: $F=2.47$, n.s.]。また、クルクミン非投与群において H_2O_2 濃度はダウンヒル運動によって有意に増加した ($P<0.01$)。しかしながら、ダウンヒル運動群において H_2O_2 濃度はクルクミン投与によって有意に減少した ($P<0.01$, Fig. 4A)。

筋組織中の NADPH-oxidase の遺伝子発現量はダウンヒル運動による影響がみられた [an effect of downhill exercise : $F=8.74$, $P<0.01$, curcumin: $F=1.49$, n.s., and exercise x curcumin interaction: $F=5.95$, $P<0.05$]。また、クルクミン非投与群において NADPH-oxidase の遺伝子発現量はダウンヒル運動によって有意に増加した ($P<0.01$)。しかしながら、ダウンヒル運動群において、NADPH-oxidase の遺伝子発現量はクルクミン投与によって有意に減少した ($P<0.05$, Fig. 4B)。

ダウンヒル運動およびクルクミン投与による骨格筋組織のMPO濃度の変化

筋組織中のMPOのタンパク質濃度はクルクミン投与による影響がみられた [an effect of downhill exercise : $F=0.18$, n.s., curcumin: $F=7.32$, $P<0.01$, and exercise x curcumin interaction: $F=3.57$, n.s.]。また、クルクミン非投与群においてMPOのタンパク質濃度についてはダウンヒル運動によって有意な変化はみられなかった。しかしながら、ダウンヒル運動群において、MPOのタンパク質濃度はクルクミン投与によって有意に増加した ($P<0.01$, Fig. 5)。

ダウンヒル運動およびクルクミン投与による骨格筋組織のMCP-1タンパク質濃度およびMCP-1の遺伝子発現の変化

筋組織中のMCP-1のタンパク質濃度はダウンヒル運動による影響がみられた [an effect of downhill exercise : $F=10.71$, $P<0.01$, curcumin: $F=0.79$, n.s., and exercise x curcumin interaction: $F=0.85$, n.s.]。また、クルクミン非投与群においてMCP-1のタンパク質濃度はダウンヒル運動によって有意に増加した ($P<0.01$)。しかしながら、ダウンヒル運動群において、MCP-1のタンパク質濃度についてはクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (Fig. 6A)。

また、筋組織中のMCP-1の遺伝子発現はダウンヒル運動およびクルクミン投与による影響がみられた [an effect of downhill exercise : $F=19.30$, $P<0.01$, curcumin: $F=4.60$, $P<0.05$, and exercise x curcumin interaction: $F=2.87$, n.s.]。一方、クルクミン非投与群においてMCP-1の遺伝子発現はダウンヒル運動によって有意に増加した ($P<0.01$)。しかしながら、ダウンヒル運動群において、MCP-1の遺伝子

発現はクルクミン投与によって有意に減少した ($P < 0.01$, Fig. 6B)。

さらに、筋組織中の F4/80 の遺伝子発現はダウンヒル運動およびクルクミン投与による影響がみられた [an effect of downhill exercise : $F = 12.15$, n.s., curcumin: $F = 3.15$, n.s., and exercise x curcumin interaction: $F = 5.17$, n.s.]. また、クルクミン非投与群において F4/80 の遺伝子発現はダウンヒル運動によって有意に増加した ($P < 0.01$)。しかしながら、ダウンヒル運動群において、F4/80 の遺伝子発現はクルクミン投与によって有意に減少した ($P < 0.01$, Fig. 7A)。

Table 1 Primer sequences for real-time RT-PCR analysis

gene	forward	reverse
GAPDH	TGAAGCAGGCATCTGAGGG	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG
TNF-α	CCTCCCTCTCATCAGTTCTA	ACTTGGTGGTTTGCTACGAC
IL-6	TAGTCCTTCCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-1β	CTGGAGAGTGTGGATCCCAAG	GGAAGACACGGATTCCATGGTG
IL-12	GGAGCACGGCAGCAGAATA	AACTTGAGGGGAGAAGTAGGAATGG
NADPH oxidase	TTGGGTCAGCACTGGCTCTG	TGGCGGTGTGCAGTGCTATC
MCP-1	CTTCTGGGCCTGCTGTTCA	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
F4/80	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

TNF :tumor necrosis factor

IL :interleukin

NADPH oxidase :nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

MCP-1 :monocyte chemotactic protein-1

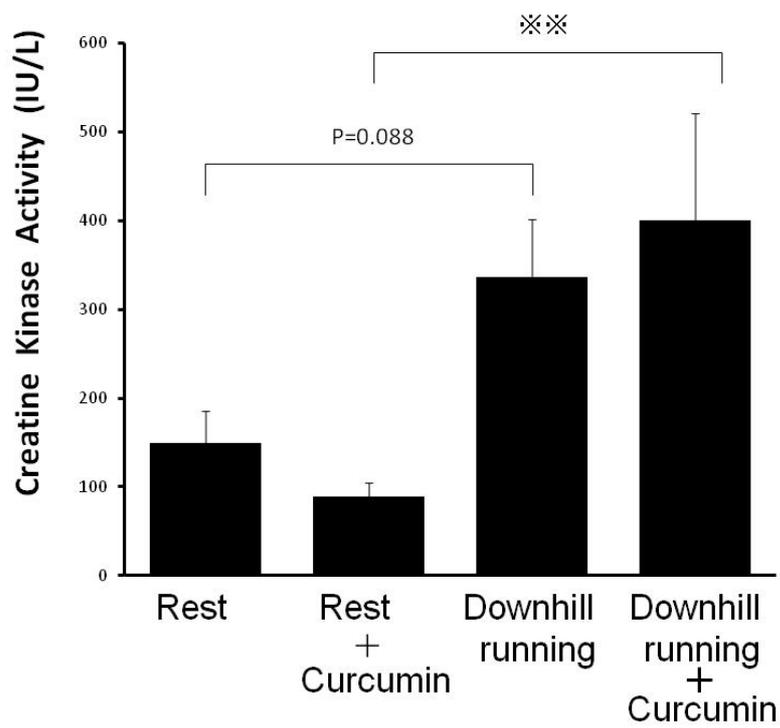


Fig.1 Effects of downhill running and curcumin administration on plasma creatin kinase activity. The values are the means + SEM.

** P<0.01

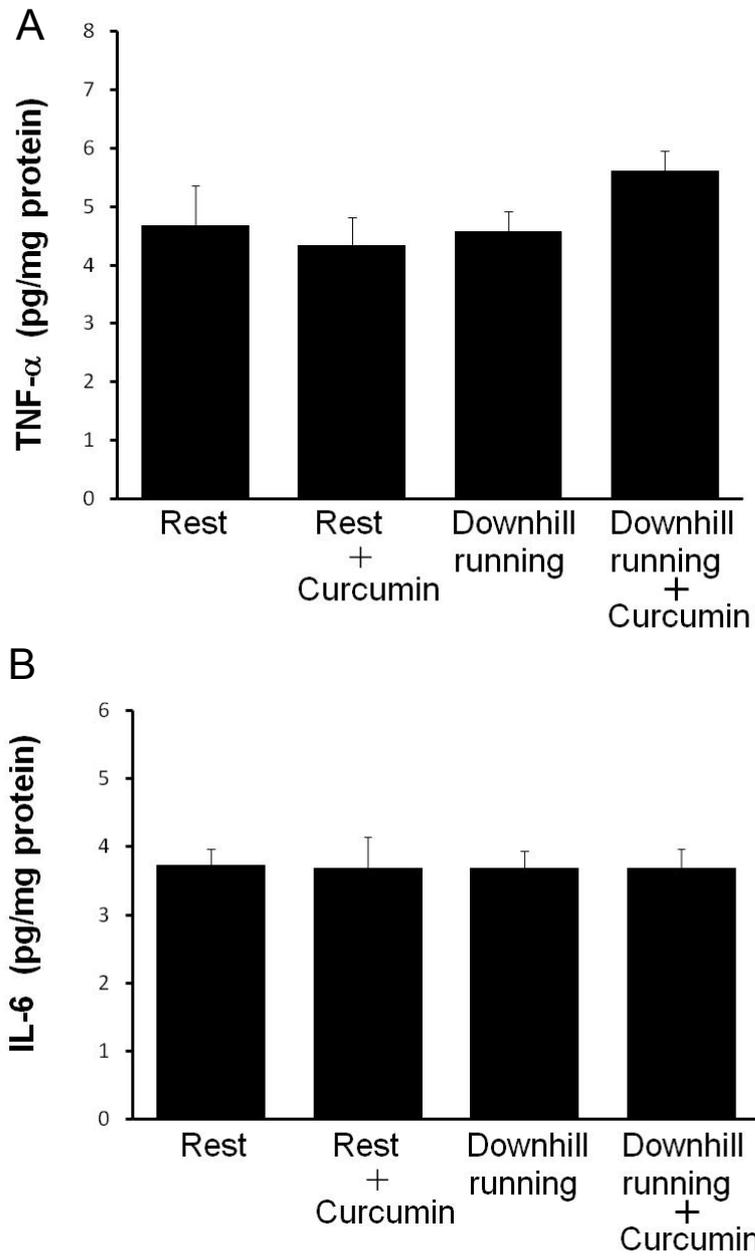


Fig.2 Effects of downhill running and curcumin administration on TNF- α (A) and IL-6 (B) protein concentrations in gastrocnemius muscle of mice. The values are the means+SEM.

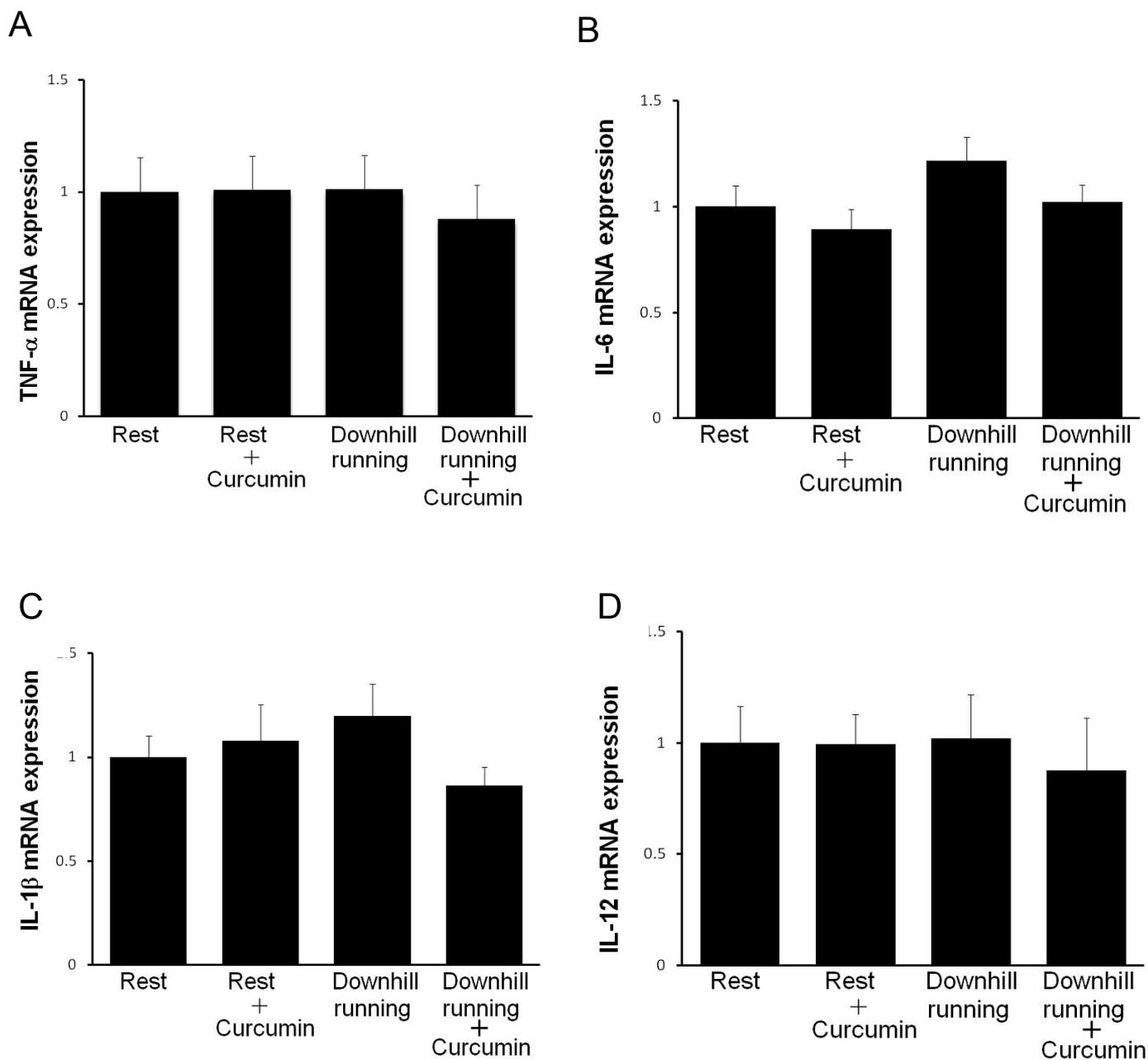


Fig.3 Effects of downhill running and curcumin administration on TNF- α (A) , IL-6 (B) , IL-1 β (C) , and IL-12 (D) mRNA expressions in gastrocnemius muscle of mice. The values are the means \pm SEM.

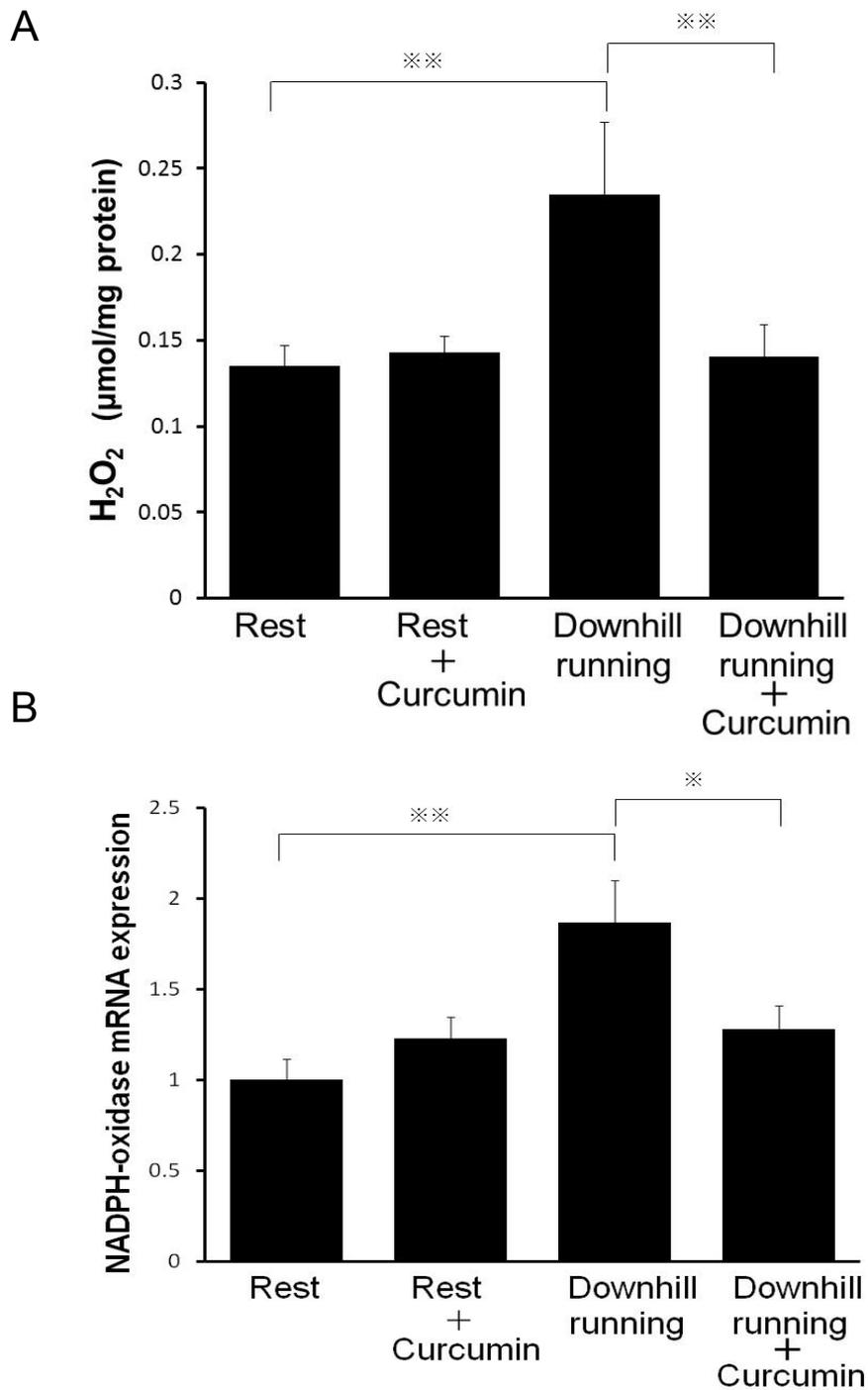


Fig4 Effects of downhill running and curcumin administration on H₂O₂ concentration (A) and NADPH-oxidase mRNA expression (B) in gastrocnemius muscle of mice. The values are the means+SEM. * P<0.05 and ** P<0.01

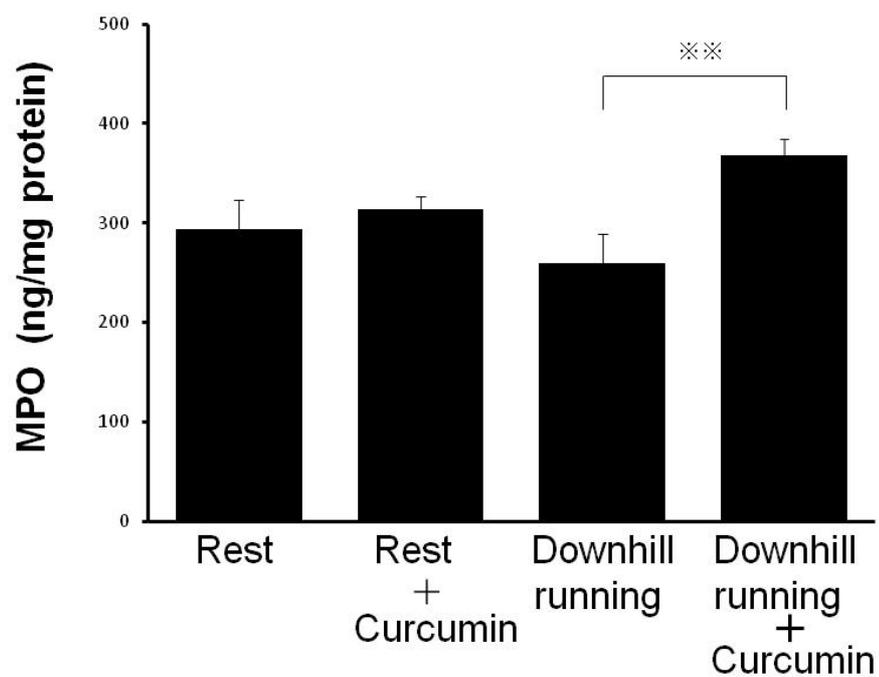


Fig.5 Effects of downhill running and curcumin administration on MPO protein concentration in gastrocnemius muscle of mice. The values are the means+SEM. ** P<0.05

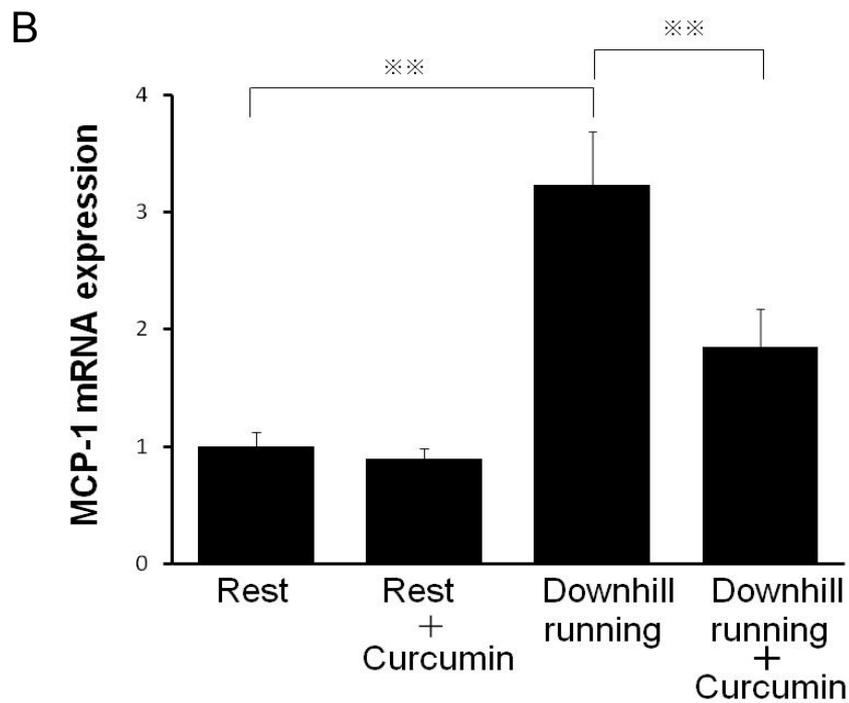
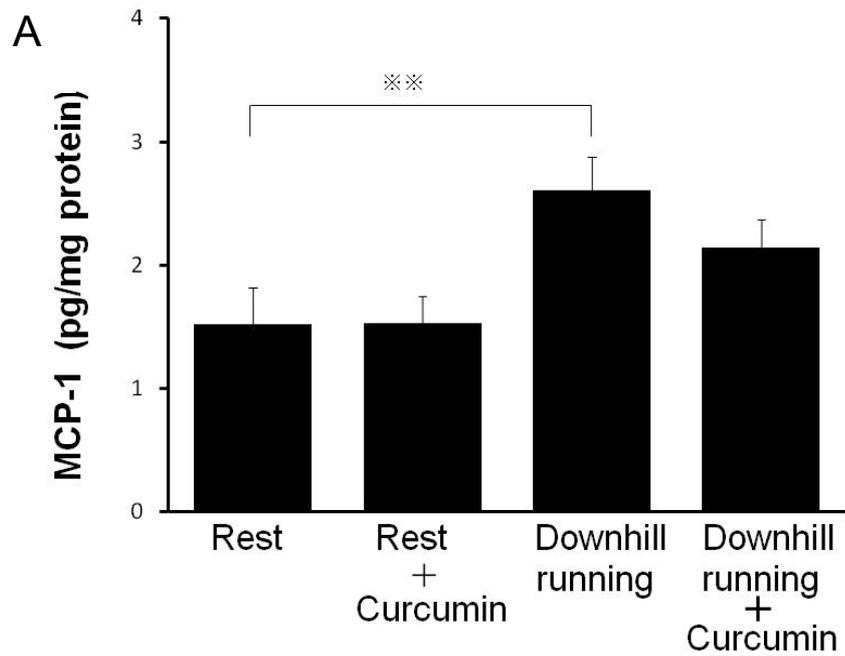


Fig.6 Effects of downhill running and curcumin administration on MCP-1 protein concentration (A) and mRNA expression (B) in gastrocnemius muscle of mice. The values are the means + SEM. ** P<0.05

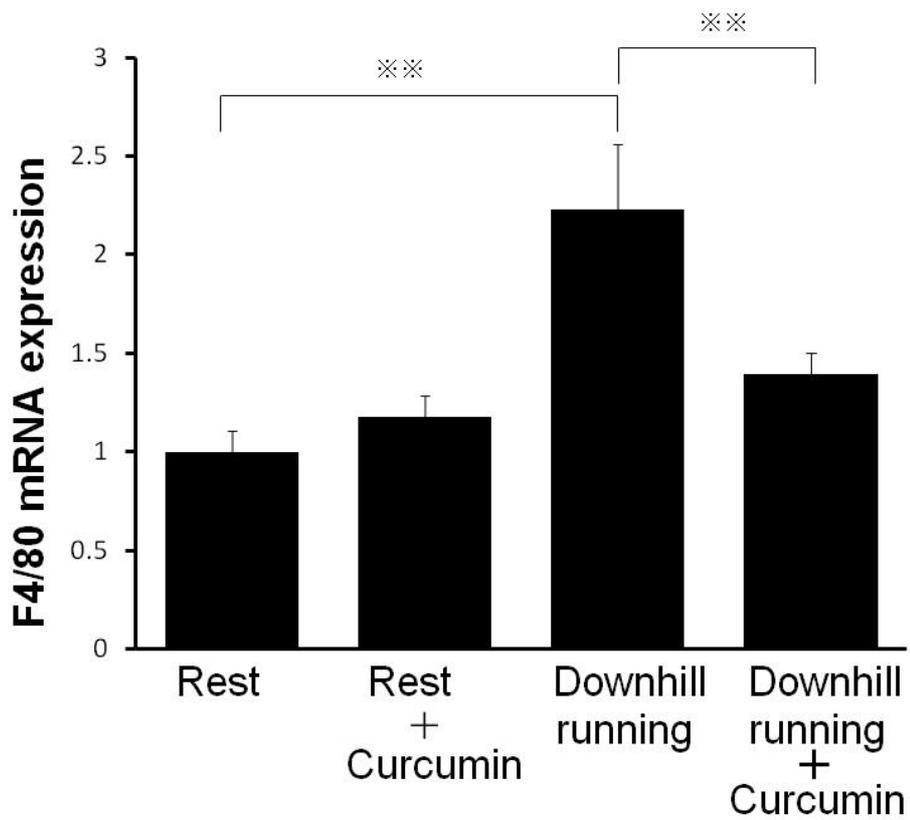


Fig.7 Effects of downhill running and curcumin administration on F4/80 mRNA expression in gastrocnemius muscle of mice. The values are the means+SEM.

* P<0.05 and ** P<0.01

4) 考察

本研究の結果より、ダウンヒル運動によって血漿クレアチンキナーゼ活性が上昇し、筋損傷を誘導できたことが確認できた。しかしながら、クルクミン投与によるダウンヒル運動後の血漿クレアチンキナーゼ活性は、少なくとも1日目では変化しなかった。また、ダウンヒル運動後のマウス腓腹筋のTNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-12の遺伝子発現量、TNF- α 、IL-6のタンパク質濃度は、変化しないことが明らかになった。しかしながら、筋組織でのH₂O₂e濃度およびNADPH-oxidase遺伝子発現はダウンヒル運動により増加し、クルクミン投与により減少することが明らかになった。また、マクロファージの浸潤を特異的に誘導するMCP-1遺伝子発現およびマクロファージの浸潤を示すF4/80遺伝子発現がダウンヒル運動により増加し、クルクミン投与により減少することも明らかになった。一方で、好中球の浸潤を示すマーカーであるMPO濃度はダウンヒル運動の影響を受けないことが示唆された。白血球は活性酸素を産生することが知られていることから、クルクミン投与によるダウンヒル運動後のH₂O₂濃度およびNADPH-oxidase遺伝子発現抑制は、マクロファージの浸潤抑制が関与している可能性が考えられる。今回の実験では運動直後にクルクミンを投与し1日目にクレアチンキナーゼ活性を検討したため、効果が生じるのに作用時間が不十分であった可能性も考えられ、運動負荷前にクルクミンを投与した場合の筋損傷予防効果について今後検討する必要がある。

これまでに、激しい運動後のサイトカインの変動については、数多く報告がされている。ヒトや実験動物を対象にした研究において、マラソンレースやダウンヒル運動後に炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加することが報告されている [7, 9, 28, 29]。一方で、ダウンヒル運動後にTNF- α 、IL-1 β 、IL-12の遺伝子発現が変化しなかったことも報告されている [30]。

本研究では、ダウンヒル運動 24 時間後においてマウス骨格筋の炎症性サイトカインの遺伝子発現は変化しなかった。ダウンヒル運動後の炎症性サイトカインの変動は、動物の種類、運動条件、運動後の時間経過によって結果に差異が生じる可能性が考えられる。

活性酸素は、運動後に筋組織で増加することが知られている。筋損傷をともなう運動では、浸潤した免疫細胞による NADPH-oxidase の活性によりスーパーオキシドが産生され、さらに H_2O_2 が生成される [21]。ラットを用いた研究では、120 分のダウンヒル運動 24 時間後に骨格筋組織での H_2O_2 濃度が増加したことが報告されている [7]。本研究では、ダウンヒル運動 24 時間後にマウスの腓腹筋において H_2O_2 濃度および NADPH-oxidase の遺伝子発現が増加した。一方で、クルクミン投与によってダウンヒル運動後の H_2O_2 濃度および NADPH-oxidase 遺伝子発現は有意に抑制された。本研究の結果から、クルクミン投与によりダウンヒル運動後の酸化ストレス状態が軽減する可能性が示唆された。TNF- α は、*in vitro* において NADPH-oxidase 産生を促進することが明らかにされている [17, 31]。クルクミンは NF- κ B の活性を抑制することからも、クルクミンの示す抗炎症作用として、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現抑制が関与すると考えられる。しかしながら、本研究では炎症性サイトカインがダウンヒル運動により有意に増加しなかった。したがって、好中球およびマクロファージ由来の活性酸素を、細胞浸潤の抑制を介して制御したものと考えられる。

MPO は、好中球が活性化すると、食胞内あるいは細胞外に放出される。MPO のタンパク質濃度は、激しい運動による好中球の脱顆粒に伴い増加することが知られている [32, 33]。本研究では、ダウンヒル運動 24 時間後のマウス骨格筋の MPO 濃度は変化しないことが明らかになった。好

中球は損傷後 1 時間以内に組織に浸潤し始めることが知られている。実際に、筋損傷を伴う運動後の MPO 濃度を検討した研究は、多くが運動直後および 1 時間後に上昇したことを示している。本研究で測定したダウンヒル運動 24 時間後には、好中球の次に浸潤するマクロファージによって貪食された可能性が考えられる。これについては、運動直後から数時間後の MPO の変動や組織学的検討を行い明らかにする必要がある。また、クルクミン投与によりダウンヒル運動 24 時間後の MPO の濃度が増加したが、その要因としてマクロファージとの関連が考えられる。マクロファージは好中球を貪食することが知られている。したがって、クルクミン投与によりマクロファージの浸潤が抑制されたため、貪食されずに組織に残る好中球が増加した可能性が考えられる。

マクロファージは、筋損傷を伴う運動後 1 日以内に、損傷組織に浸潤することが知られている [5]。組織へのマクロファージの浸潤は、NF- κ B シグナル伝達経路を介した MCP-1 などのケモカインの産生により誘導される [13, 14]。また、浸潤したマクロファージは、TNF- α 、IL-1 β などのサイトカインを産生することが知られている [34]。ダウンヒル運動を用いた研究では、90 分間の走行運動 24 時間後および 48 時間後において、マウス腓腹筋のマクロファージの浸潤が増加することが報告されている [35]。本研究より、ダウンヒル運動 24 時間後にマクロファージが筋組織に浸潤する可能性が示唆された。一方で、クルクミンはダウンヒル運動後のマクロファージの浸潤を抑制する可能性が示唆された。これまでに、糖尿病ラットを用いた研究で、MCP-1 の血中濃度がクルクミン投与により抑制されることが報告されている [36]。本研究においても、クルクミンは F4/80 発現同様に、筋組織の MCP-1 発現を減少させることが示された。したがって、クルクミンによるマクロファージ浸潤の抑制には骨格筋の MCP-1 産生の抑制が関与

する可能性が示唆された。浸潤した好中球やマクロファージは活性酸素を産生することが知られている [37]。NADPH-oxidase は好中球やマクロファージの形質膜に存在し、好中球やマクロファージが貪食を行った際に活性化される。本研究においてマクロファージが筋組織に浸潤する可能性が示唆された。したがって、ダウンヒル運動による NADPH-oxidase の遺伝子発現の増加は、マクロファージの浸潤による可能性が示唆される。また、クルクミンは F4/80 発現同様に、ダウンヒル運動後の H_2O_2 濃度および NADPH-oxidase 遺伝子発現を減少させた。したがって、クルクミン投与によるダウンヒル運動後の H_2O_2 濃度および NADPH-oxidase 遺伝子発現の減少は、マクロファージの浸潤抑制が関与している可能性が考えられる。

5) 結論

クルクミン投与はダウンヒル運動後の H_2O_2 濃度および NADPH-oxidase 遺伝子発現を抑制した。また、クルクミン投与はダウンヒル運動後の MCP-1 および F4/80 遺伝子発現を抑制した。したがって、クルクミン投与はマクロファージの浸潤抑制を介して、活性酸素産生を抑制する可能性が示唆された。

6) 謝辞

本稿の作成にあたり、御懇篤な御指導ならびに激励を賜りました本研究所の鈴木克彦准教授に深甚なる謝意を表します。本研究所入学当初から本稿提出に至るまで、免疫学を学んで間もない浅学非才な私に、多くの助言や暖かい御指導をしていただきました。ここに心から御礼申し上げます。

また、副査として御指導いただきました坂本静男先生、福林徹先生にも厚く御礼申し上げます。

実験計画、実験手法、論文作成に至るまで懇切丁寧に御指導して頂きました予防医学研究室博士課程の川西範明氏に心より御礼申し上げます。また、本稿作成や大学院生活を様々な面から支えて下さった予防医学研究室の皆様深く感謝致します。

セラバリューズ株式会社の大塚喜彦様には、クルクミンの提供から研究における助言など様々な面で御協力して頂きましたこと厚く御礼申し上げます。

最後に、本稿作成のための大学院生活を物心両面から支えてくださった両親に心より感謝致します。

7) 参考文献

- 1) Nosaka K, Newton M. Concentric or eccentric training effect on eccentric exercise-induced muscle damage. *Med Sci Sports Exerc.* 34(1):63-69. 2002.
- 2) Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev.* 11:64-85. 2005.
- 3) Thompson D, Bailey DM, Hill J, Hurst T, Powell JR, Williams C. Prolonged vitamin C supplementation and recovery from eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol.* Jun;92(1-2):133-138. 2004.
- 4) Peake JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev.* 8:49-100. 2002.
- 5) Tidball JG, Wehling-Henricks M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol.* 578(Pt 1):327-336. 2007.
- 6) Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, Borsellino G, Rizzuto E, Nicoletti C, Wannenes F, Battistini L, Rosenthal N, Molinaro M, Musarò A. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *FASEB J.* 21(7):1393-1402. 2007.
- 7) Liao P, Zhou J, Ji LL, Zhang Y. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298(3):R599-607 2010.
- 8) Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Zielinski MR, Groschwitz CM, Brown AS, Gangemi JD, Ghaffar A, Mayer EP.

- Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292(6):R2168-2173. 2007.
- 9) Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 265: R166-172. 1993.
- 10) Shephard RJ. Adhesion molecules, catecholamines and leucocyte redistribution during and following exercise. *Sports Med* 33(4):261-284. 2003.
- 11) Belcastro AN, Arthur GD, Albisser TA, Raj DA. Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. *J Appl Physiol*. 80: 1331-1335. 1996.
- 12) Lowe DA, Warren GL, Ingalls CP, Boorstein DB, Armstrong RB. Muscle function and protein metabolism after initiation of eccentric contraction-induced injury. *J Appl Physiol*. 79(4):1260-1270. 1995.
- 13) Warren GL, Hulderman T, Mishra D, Gao X, Millecchia L, O'Farrell L, Kuziel WA, Simeonova PP. Chemokine receptor CCR2 involvement in skeletal muscle regeneration. *FASEB J*. 19(3):413-415. 2005.
- 14) Shin WS, Szuba A, Rockson SG. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis*. 160(1):91-102. 2002.
- 15) Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res*. 314(17):3232-3244. 2008.

- 16) Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87(1):245-313. 2007.
- 17) Li JM, Fan LM, Christie MR, Shah AM. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol Cell Biol.* 25(6):2320-2330. 2005.
- 18) Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1):47-95. 2002.
- 19) Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18(49):6853-6866. 1999.
- 20) Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 25(2):218-224. 1993.
- 21) Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88:1243-1276; 2008.
- 22) Sikora E, Scapagnini G, Barbagallo M. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immun Ageing.* Jan 17;7(1):1. 2010
- 23) Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 595:105-25. Review. 2007.
- 24) Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem* 270: 24995-25000, 1995.
- 25) Han SS, Keum YS, Seo HJ, Surh YJ. Curcumin suppresses activation of NF-kappaB and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells. *J Biochem Mol Biol* 35: 337-342, 2002.

- 26) Biswas SK, McClure D, Jimenez LA, Megson IL, Rahman I. Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxid Redox Signal*. 7(1-2):32-41.7: 32-41, 2005.
- 27) Lim JH, Kwon TK. Curcumin inhibits phorbol myristate acetate (PMA)-induced MCP-1 expression by inhibiting ERK and NF-kappaB transcriptional activity. *Food Chem Toxicol*. 48(1):47-52. 2010.
- 28) Peake JM, Suzuki K, Hordern M, Wilson G, Nosaka K, Coombes JS. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. *Eur J Appl Physiol*. 95(5-6):514-521. 2005.
- 29) Hamada K, Vannier E, Sacheck JM, Witsell AL, Roubenoff R. Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. *FASEB J*. 19(2):264-266. 2005.
- 30) Buford TW, Cooke MB, Shelmadine BD, Hudson GM, Redd L, Willoughby DS. Effects of eccentric treadmill exercise on inflammatory gene expression in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*. 34(4):745-753. 2009.
- 31) Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB. PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res*. 17;90(9):1012-1019. 2002.
- 32) Kokot K, Schaefer RM, Teschner M, Gilge U, Plass R, Heidland A. Activation of leukocytes during prolonged physical exercise. *Adv Exp Med Biol*. 240:57-63. 1988.
- 33) Morozov VI, Tsyplenkov PV, Golberg ND, Kalinski MI. The effects of high-intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats. *Eur J Appl*

- Physiol.* 97(6):716-722. 2006.
- 34) Tidball JG. Interactions between muscle and the immune system during modified musculoskeletal loading. *Clin Orthop Relat Res.*(403 Suppl):S100-109. 2002.
- 35) Tsivitse SK, McLoughlin TJ, Peterson JM, Mylona E, McGregor SJ, Pizza FX. Downhill running in rats: influence on neutrophils, macrophages, and MyoD+ cells in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 90(5-6):633-638. 2003.
- 36) Jain SK, Rains J, Croad J, Larson B, Jones K. Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF-alpha, IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in diabetic rats. *Antioxid Redox Signal.* 11(2):241-249. 2009.
- 37) Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med.* 166(12 Pt 2):S4-8. 2002.

8) おわりにー今後の展望ー

本研究では、クルクミンの及ぼす影響を炎症性サイトカイン、酸化ストレス、免疫細胞浸潤の観点から検討した。しかしながら、クルクミン投与によるダウンヒル運動後の筋組織の分解および再生機構への影響、さらにはパフォーマンスへの影響についての検討は行っていない。

近年、クルクミンは筋委縮や加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）の発症を抑制することが示唆された（Almdari N et al. 2009）。筋委縮およびサルコペニアの発症には、TNF- α などの炎症性サイトカインが重要な役割を示す可能性が示唆されている（Goodman MN et al. 1991）。TNF- α は筋のタンパク質分解に関与していることが知られており、TNF- α 抗体の投与により筋委縮を抑制したこと（Costelli P et al. 1993）からも、TNF- α が筋のタンパク質分解を促進することが考えられる。実際に、TNF- α は、筋タンパク質分解作用を有しているユビキチン・プロテアソーム経路の活性に関与していることが明らかになった（Li YP et al. 1999）。ユビキチン・プロテアソーム系路は、筋損傷を伴う激しい運動後においても筋タンパク質分解を引き起こすため、筋修復を遅延する要因とされる（Li YP et al. 2003）。したがって、クルクミンは激しい運動後の筋タンパク質の分解にも、NF- κ B の抑制を介して関与している可能性が考えられる。今後は、TNF- α などの炎症性サイトカインが増加するダウンヒル運動モデルを用いて、クルクミン摂取による運動後の筋修復への関与を検討する必要がある。

また、これまでに活性酸素と運動パフォーマンスの関係は数多くの研究により検討されている（Powers SK et al. 2008）。適度な筋肉中の活性酸素は運動パフォーマンスを向上させるが、激運動時の活性酸素の過剰な増加はパフォーマンス低下をもたらすことが知られている（Reid MB et

al. 1993)。実際に、筋組織での過剰な H_2O_2 により、筋収縮能力が低下することや (Oba T et al. 1996)、活性酸素は運動誘発性の筋疲労に関与することも報告されている (Gandevia SC et al. 2008)。したがって、抗酸化作用を示す薬物およびサプリメントの摂取により、激運動時の運動パフォーマンスが改善する可能性が考えられる。これまでに、抗酸化作用を示す N-acetylcysteine、ビタミン C およびビタミン E などの薬物、サプリメント投与による活性酸素産生抑制を介したパフォーマンスへの影響が検討されてきた。しかしながら、実際には、スポーツ選手へのサプリメント補給による活性酸素産生の影響は明確にされていない。6 週間のビタミン E の投与は、ウルトラマラソンのランナーでは筋損傷への影響が無いことが示され (Mastaloudis A et al. 2006)、生体に害を及ぼすとされる脂質膜の過酸化にも影響しないことが報告されている (Leeuwengurgh C et al. 2001)。また、ビタミン C 投与による激運動後の筋損傷の抑制についても数多く検討されているが (Peak JM et al. 2003)、明確な効果はみられず、1000mg 以上の投与では逆にその回復を阻害するという結果が報告されている (Close GL et al. 2005)。

近年、Davis JM らにより、クルクミン投与がマウスのダウンヒル運動のパフォーマンスを向上させることが報告された (Davis JM et al. 2007)。その要因として、本研究で得られた、クルクミンのダウンヒル運動後の抗酸化作用が関与している可能性が考えられる。クルクミン投与によるダウンヒル運動後の筋組織の酸化ストレス状態とパフォーマンスとの関係について、更なる検討が必要である。