

疲労困憊運動誘導性腎傷害に対する好中球およびマクロファージの関与

スポーツ医科学研究領域

5012A057-9 溝上翼

研究指導教員：鈴木克彦

【目的】

適度な運動は健康の維持・増進に有効であるが、激運動は骨格筋や腎臓などの組織傷害を引き起こす。当研究室でもヒトを対象とした検討において、デュアスロン競技後に血中の腎傷害マーカーであるクレアチニンが増加すること、尿中に蛋白や尿細管上皮細胞および円柱、さらに様々なサイトカインなどが増加することを報告している。しかしながら、疲労困憊運動誘導性の腎傷害の発症メカニズムはまだ解明されていない。

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腎傷害や炎症反応に関与している。実際に、虚血・再灌流誘導性の腎傷害において好中球の浸潤を抑制することにより腎傷害が軽減すると報告されている。一方、クロドロン酸リポゾームを用いたマクロファージ除去モデルにおいても、虚血・再灌流誘導性の腎傷害が抑制されたと報告されている。

疲労困憊運動誘導性の腎傷害時には、腎臓への炎症細胞の浸潤が認められており、好中球やマクロファージなどが浸潤していると考えられる。したがって、疲労困憊運動による急性腎傷害においても、腎臓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。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ゾ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腎傷害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。

【方法】

実験①では 10 週齢の C57B/6J 雄マウスを無作為に安静群、安静+マクロファージ除去群、疲労困憊

運動群、疲労困憊運動+マクロファージ除去群の 4 群に分けた。マクロファージ除去群には 150 μ l の Clodronate Liposomes を腹腔内投与し、マクロファージ除去モデルを作製した。

実験②では 10 週齢の C57B/6J 雄マウスを無作為に安静群、安静+抗好中球抗体投与群、疲労困憊運動群、疲労困憊運動+抗好中球抗体投与群の 4 群に分けた。好中球抗体投与群には、0.5 μ g の抗好中球抗体 (1A8)を腹腔内投与し、好中球浸潤抑制モデルを作製した。

疲労困憊運動群、疲労困憊運動+マクロファージ除去群、疲労困憊運動+抗好中球抗体投与群には、傾斜 7%の条件下において 10m/min で 15 分、15m/min で 15 分、20m/min で 15 分走行させた後、24m/min でトレッド・ミル走行を負荷した。疲労困憊運動 24 時間後に解剖を行い腎臓を採取した。腎臓の組織学的評価として、HE 染色、F4/80, Ly-6G および KIM-1 の免疫染色、Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)染色を行った。また、腎臓から RNA を抽出した後、遺伝子発現を real-time PCR を用いて定量した。

【結果①】

疲労困憊に至るまでの走行時間は、疲労困憊運動群では 161.0 分 $\pm$ 14.2 分、疲労困憊運動+マクロファージ除去群では 187.7 $\pm$ 13.8 分であった。しかしながら、両群間に有意差は認められなかった。

腎内マクロファージはマクロファージ特異的なマーカーである F4/80 の mRNA 発現および免疫染色で評価した。また、安静群と比較して疲労困憊運動群では有意な高値を示した。一方、疲労困憊運動群と比較して疲労困憊運動+マクロファージ除去群では有意な低値を示した。実際に、腎内の F4/80 を免疫染色することにより、安静群と比較して疲労困

働運動群では F4/80 発現の増加が確認された。一方、疲労困憊運動群と比較して疲労困憊運動+マクロファージ除去群では F4/80 発現の減少が確認された。

腎傷害は HE 染色, KIM-1 染色, TUNEL 染色で評価した。HE 染色により安静群と比較して疲労困憊運動群では、腎傷害の所見である炎症細胞の浸潤、糸球体の腫大、尿細管の拡張が確認された。一方、疲労困憊運動群と比較して、疲労困憊運動+マクロファージ除去群では免疫細胞の浸潤、糸球体の腫大、尿細管の拡張といった腎傷害の程度が抑制された。さらに、KIM-1 および TUNEL 染色においても、安静群と比較して運動群では有意な高値を示した。一方、疲労困憊運動群と比較して、疲労困憊運動+マクロファージ除去群では有意な低値を示した。

腎内炎症性サイトカインの評価は、TNF- α , IL-6, IL-1 β の mRNA 発現で評価した。TNF- α , IL-6 の mRNA 発現は、安静群と比較して運動群では有意な高値を示した。一方、TNF- α , IL-6 の mRNA 発現は疲労困憊運動群と比較して、疲労困憊運動+マクロファージ除去群では有意な低値を示した。L-1 β の mRNA においては疲労困憊運動およびマクロファージ除去による影響は認められなかった。

【結果②】

疲労困憊に至るまでの走行時間は、疲労困憊運動群では 320.3 分 $\pm$ 11.2 分、疲労困憊運動+抗好中球抗体投与群では 331.3 $\pm$ 13.2 分であった。しかしながら、両群間で有意差は認められなかった。

疲労困憊運動 24 時間後における腎内好中球は、好中球特異的なマーカーである Ly-6G の mRNA 発現および免疫染色で評価した。腎内 Ly-6G の mRNA 発現は、安静群と比較して疲労困憊運動群では有意な高値を示した。一方、疲労困憊運動群と比較して疲労困憊運動+抗好中球抗体投与群では有意な低値を示した。実際に、腎内の Ly-6G を免疫染色することにより、安静群と比較して疲労困憊運動群では Ly-6G 発現が増加することが確認された。一方、疲労困憊運動群と比較して疲労困憊運動+抗好中球抗体投与群では Ly-6G の減少が確認された。

腎傷害は HE, KIM-1, TUNEL 染色で評価した。HE 染色により安静群と比較して疲労困憊運動群では、腎傷害の所見である炎症細胞の浸潤、糸球体の腫大、

尿細管の拡張が確認された。一方、疲労困憊運動群と比較して、疲労困憊運動+抗好中球抗体投与群では免疫細胞の浸潤、糸球体の腫大、尿細管の拡張といった腎傷害の程度が抑制された。さらに、KIM-1 および TUNEL 染色においても、安静群と比較して運動群では有意な高値を示した。一方、疲労困憊運動群と比較して、疲労困憊運動+マクロファージ除去群では有意な低値を示した。

腎内炎症性サイトカインの評価は、TNF- α , IL-6, IL-1 β の mRNA 発現で評価した。TNF- α , IL-6 の mRNA 発現は、安静群と比較して運動群では有意な高値を示した。一方、TNF- α , IL-6 の mRNA 発現は疲労困憊運動群と比較して、疲労困憊運動+抗好中球抗体投与群では有意な低値を示した。L-1 β の mRNA においては疲労困憊運動および抗好中球抗体投与による影響は認められなかった。

【考察】

本研究では、疲労困憊運動により腎臓で炎症細胞の浸潤、糸球体の腫大、尿細管の拡張が確認されただけでなく、KIM-1 発現の増加や尿管細胞のアポトーシスが確認され、腎傷害が起きていると考えられる。一方、これらの腎傷害所見は、マクロファージ除去および抗好中球抗体投与により抑制された。また、本研究では、TNF- α , IL-6, IL-1 β の mRNA 発現を用いて腎組織の炎症反応を検討したが、疲労困憊運動により TNF- α , IL-6, IL-1 β の mRNA 発現が増加することが確認され、腎臓において炎症反応が起きたと考えられる。一方、TNF- α , IL-6, IL-1 β mRNA 発現はマクロファージ除去および抗好中球抗体投与により抑制された。したがって、疲労困憊運動誘導性の腎傷害時における炎症反応には、マクロファージおよび好中球が関与しうると考えられる。

疲労困憊運動誘導性の腎傷害は、疲労困憊運動後に好中球およびマクロファージが腎臓に浸潤し、浸潤した好中球およびマクロファージによる炎症性サイトカインの産生を介して引き起こされると考えられる。

【結論】疲労困憊運動誘導性腎傷害には好中球およびマクロファージが関与している。