

平成 30 年 4 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01627

研究課題名(和文) 糖尿病によるマクロファージ炎症反応亢進機構と運動効果：ヘキソサミン代謝経路の役割

研究課題名(英文) Ameliorating Effect of Exercise on Diabetes-Related Inflammation: A Possible Role for Macrophage Hexosamine Biosynthetic Pathway

研究代表者

白土 健 (SHIRATO, Ken)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：60559384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高血糖による炎症反応亢進と運動の改善効果の分子メカニズムを明らかにするため、マクロファージ(M ϕ)の炎症性応答を調節するToll様受容体(TLR)シグナルとヘキソサミン代謝経路のクロストークを解析した。その結果、1)ヘキソサミン代謝経路はO-結合型N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾を介してM ϕ のTLRシグナルと炎症性応答をむしろ抑制していること、2)2型糖尿病マウスのM ϕ の炎症性応答能はむしろ低下し、感染防御機能の低下が示唆されること、3)この反応にはO-GlcNAc修飾は寄与していないこと、4)運動にはM ϕ の炎症性応答能を高めて感染防御機能を高める効果があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate molecular mechanisms underlying ameliorating effects of exercise on diabetes-related inflammation, we examined crosstalk between the Toll-like receptor (TLR) signaling and hexosamine biosynthetic pathway in macrophages. We obtained the following insights: 1) the hexosamine biosynthetic pathway suppressed rather than promoted the macrophage TLR signaling and pro-inflammatory responses via O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification; 2) type 2 diabetic mice showed reduced rather than exacerbated macrophage pro-inflammatory responses, suggesting that type 2 diabetes impaired capability to protect the host from infection; 3) O-GlcNAc modification did not contribute to the diabetes-related suppression of macrophage pro-inflammatory responses; 4) exercise improved macrophage pro-inflammatory responses, which suggested that exercise is beneficial to host defense against infection.

研究分野：健康・スポーツ科学

キーワード：2型糖尿病、炎症、Toll様受容体、シグナル伝達、ヘキソサミン代謝経路、O-結合型N-アセチルグルコサミン、感染防御、運動

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では、運動不足や栄養過多による内臓脂肪性肥満とそれに伴う糖尿病の罹患率が増加の一途を辿っている。しかし、糖尿病を完治するための治療法は現在まで確立されておらず、高血糖の状態が続くと、網膜症・腎症・神経障害などの合併症が発症する。さらに、糖尿病患者は健常者と比べて感染に対する抵抗力が低いため、敗血症に対するリスクも高い。これら糖尿病合併症は、患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、医療費負担の増大の一因にもなっており、その予防法の確立は喫緊の課題である。

敗血症は、感染刺激に伴って免疫細胞から産生・分泌された炎症性サイトカインによる全身性炎症反応症候群である。リポ多糖 (LPS) によるマクロファージ (M) の炎症性応答は高血糖により増悪することが示唆されているが、その分子メカニズムはまだ十分に解明されていない。この点を明らかにすることは、糖尿病患者の敗血症のリスクを軽減し、QOL を高める上で、予防医学や健康科学の立場から見ても極めて重要である。

生体内の細胞が高血糖に曝されると、グルコース代謝の一経路であるヘキソサミン代謝経路の活性が高まる。その結果、細胞内のウリジン-2-リン酸-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) レベルが上昇すると、シグナル伝達タンパク質や転写因子の O-結合型 GlcNAc (O-GlcNAc: 糖鎖修飾の一種) レベルも高まる。近年、NF- κ B が O-GlcNAc 修飾を受けると、その転写活性が高まることが報告され、高血糖による M の炎症性応答亢進への関与が推測される。

一方、ヘキソサミン代謝経路の活性に及ぼす運動の影響が近年明らかになってきた。例えば、水泳トレーニングを负荷したマウスの心筋では、ヘキソサミン代謝経路の律速酵素であるグルタミン:フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ (GFAT) の発現量の低下と、それに伴う O-GlcNAc レベルの低下が認められた。従って、運動には、M のヘキソサミン代謝経路の活性も直接調節して、高血糖による炎症性応答亢進を改善できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、M の LPS による炎症性応答を惹起する Toll 様受容体 (TLR) シグナルと O-GlcNAc 修飾を調節するヘキソサミン代謝経路のクロストークを解析し、高血糖による炎症性応答亢進と運動の抗炎症効果 (改善効果) の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

12 週齢雄性 C57BL/6J マウスを正常マウスとして用いた。13-14 週齢雄性 *db/db* マウスと *db/+* マウスをそれぞれ 2 型糖尿病モデル

マウスとその対照マウスとして用いた。本研究は、杏林大学動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号: 187)。

(2) M の採取

マウスの腹腔内に 4.05% チオグリコレート培地を 2 mL 投与した。投与 4 日後、マウスを炭酸ガス吸引により安楽死させた後、腹腔細胞を無菌的に採取した。細胞をプラスチックディッシュで 1 時間培養した後、浮遊細胞を除き、付着性細胞を腹腔滲出性 M (PEM) として実験に用いた。

(3) M の炎症性応答の解析

PEM またはマウス M 細胞株 RAW264.7 を LPS (100 ng/mL) で刺激した後、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-18) の mRNA レベルおよび TLR シグナル伝達分子 (I κ B、p65) のタンパク質レベルとリン酸化レベルを、それぞれリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法で分析した。

(4) M の O-GlcNAc レベルとその機能解析

タンパク質 O-GlcNAc レベルとこれを調節する転移酵素 OGT と分解酵素 OGA および GFAT の発現レベルは、リアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法で分析した。M の炎症性応答における O-GlcNAc の役割を明らかにするため、PEM を OGT 阻害剤 BADGP または OGA 阻害剤 PUGNAc で培養し、O-GlcNAc レベルを予め低下または増加させた条件下で炎症性応答を解析した。加えて、RAW264.7 細胞に OGT siRNA を導入して O-GlcNAc レベルを低下させた条件下で同様の解析を行った。

(5) 運動プロトコール

4 週齢雄性 C57BL/6J マウスを対照 (SC) 群および自発性運動 (VE) 群に分けて、8 週間飼育した。VE 群は回転カゴ (直径 14 cm; 幅 6 cm) 付ケージで飼育し、SC 群は通常ケージで飼育した。回転カゴへのアクセスは 24 時間可能とし、いずれの群も自由摂餌とした。M の採取は運動停止 24 時間後に行った。

4. 研究成果

(1) M の炎症性応答における O-GlcNAc の役割

PEM を BADGP で培養し、OGT の活性および O-GlcNAc レベルを低下させると、LPS 刺激による IL-6 と TNF- α の mRNA 発現誘導が有意に増強された^{1, 2)}。RAW264.7 細胞に OGT siRNA を導入し、その発現および O-GlcNAc レベルを低下させたときも、同様の結果が得られた (図 1 A)。さらに、LPS 刺激後 6 時間以降に起こる I κ B の分解と p65 のリン酸化も、O-GlcNAc レベルの低下によって有意に増強された (図 1 B)。以上の結果から、M の O-GlcNAc は、TLR シグナルを阻害することによって、むしろ炎症性応答を抑制していることが示唆された。

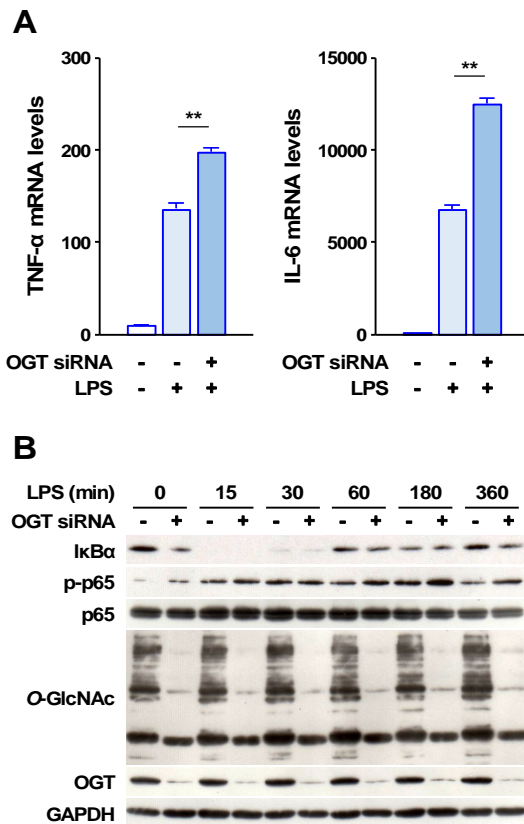


図1. LPS 刺激による RAW264.7 細胞の炎症性サイトカインの mRNA 発現誘導(A)および TLR シグナル伝達活性化(B)に対する OGT ノックダウンの影響. 平均値±標準誤差 (n = 3). **P < 0.01.

(2) M の炎症性応答に及ぼす高血糖の影響と O-GlcNAc の役割

PEM のタンパク質 O-GlcNAc レベルは、*db1+*マウスよりも *db1/db* マウスの方が有意に高かった^{1, 2)}。一方、LPS 刺激による TNF-α の mRNA 発現誘導は、*db1+*マウスよりも *db1/db* マウスの方が有意に低かった^{1, 2)}。しかし、正常マウスの PEM を PUGNAc で培養して O-GlcNAc レベルを増加させても、LPS 刺激による TNF-α の mRNA 発現誘導を抑制できなかった (図 2 A)。さらに、PEM を高グルコース培養して O-GlcNAc レベルを増加させたときも、同様の結果が得られた (図 2 B)。以上の結果から、1) *db1/db* マウスで観察された M の炎症性応答低下には、タンパク質 O-GlcNAc レベルの増加は関係していないこと、2) M はヘキソサミン代謝経路の活性およびタンパク質 O-GlcNAc の基礎レベルが高いため、正常血糖レベルでも炎症性応答に対して抑制効果をもつ一方、この抑制効果は高血糖でそれ以上は増強されることが示唆された。

(3) M の O-GlcNAc レベルと炎症性応答に及ぼす運動の影響

PEM のタンパク質 O-GlcNAc レベルは、SC 群よりも VE 群の方が明らかに低かった^{1, 2)}。

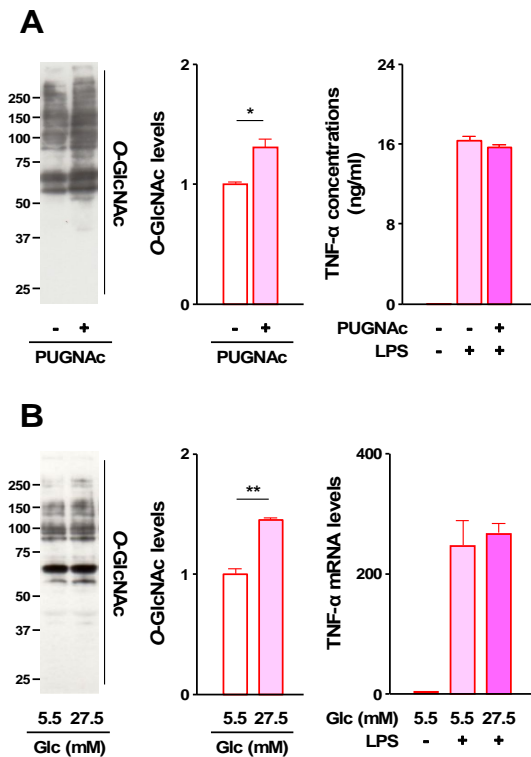


図2. LPS 刺激による PEMΦ の TNF-α mRNA 発現誘導に対する PUGNAc の影響(A)および LPS 刺激による RAW264.7 細胞の TNF-α mRNA 発現誘導に対する高グルコース培養の影響(B). 平均値±標準誤差 (n = 3-6). *P < 0.05, **P < 0.01.

しかし、GFAT および OGT の mRNA とタンパク質のレベルは、いずれも二群間で差はなかった^{1, 2)}。加えて、LPS 刺激による TNF-α mRNA レベルの増加も二群間で差がなかった^{1, 2)}。

1) PEM のタンパク質 O-GlcNAc レベルを運動がどのように低下させるのか、2) 運動による O-GlcNAc レベルの低下によって炎症性応答が増強されないのはなぜかについては、今後も引き続き検討を進めたい。

一方、LPS 刺激による IL-1 および IL-18 の mRNA レベルの増加も二群間で差がなかったが、これらの分泌量は、いずれも SC 群よりも VE 群の方が有意に高かった²⁾。pro-IL-1 および pro-IL-18 の切断と分泌を調節するプロカスペーゼ-1 のタンパク質レベルも、SC 群よりも VE 群の方が有意に高かった²⁾。以上の結果から、習慣的運動は、LPS 刺激に対する M のインフラマソームの活性化を促進させることで、生体感染防御機能を高める働きがあることが示唆された。

< 引用文献 >

白土 健, 木崎節子: 運動による慢性炎症性代謝疾患改善効果: マクロファージのグルコース代謝経路に着目して. 第 28 回研究助成業績集 (公益財団法人中富健康科学振興財団), 平成 29 年版: 1-4, 2017.

白土 健, 今泉和彦, 木崎節子: 2 型糖尿病マウスにおける慢性炎症反応に対する運動の効果とメカニズム - マクロファージの O-結合型 N-アセチルグルコサミンに着目して - . 第 32 回 (2015 年度) 若手研究者のための健康科学研究助成成果報告書 (公益財団法人明治安田厚生事業団), 32: 75-80, 2017.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Shirato, K., Sato, S., Imaizumi, K., Sakurai, T., Ogasawara, J., Oh-ishi, S., Ohno, H., and Kizaki, T.: Regular exercise improves inflammatory responses by resident or recruited macrophages against bacterial pathogens. *Macrophage (Houst)*, 4: e1533, 2017. (招待有, 査読有)
DOI: 10.14800/macrophage.1533

Shirato, K., Imaizumi, K., Sakurai, T., Ogasawara, J., Ohno, H., and Kizaki, T.: Regular voluntary exercise potentiates interleukin-1 and interleukin-18 secretion by increasing caspase-1 expression in macrophages. *Mediators Inflamm.*, 2017: 9290416, 2017. (査読有)
DOI: 10.1155/2017/9290416

Shirato, K., Takanari, J., Sakurai, T., Ogasawara, J., Imaizumi, K., Ohno, H., and Kizaki, T.: Enzyme-treated asparagus extract prevents hydrogen peroxide-induced pro-inflammatory responses by suppressing p65 nuclear translocation in skin L929 fibroblasts. *Nat. Prod. Commun.*, 11: 1883-1888, 2016. (査読有)

Shirato, K., Takanari, J., Ogasawara, J., Sakurai, T., Imaizumi, K., Ohno, H., and Kizaki, T.: Enzyme-treated asparagus extract attenuates hydrogen peroxide-induced matrix metalloproteinase-9 expression in murine skin fibroblast L929 cells. *Nat. Prod. Commun.*, 11: 677-680, 2016. (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: インスリンによるマクロファージの脂質合成促進作用と習慣的運動の効果. 第 88 回日本衛生学会学術総会, 東京, 2018 年 3 月.

白土 健, 小宇田智子, 高成 準, 三栖 菜奈美, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: ETAS は紫外線による正常ヒト皮膚線維芽細胞の

NF- B 核内移行を抑制する. 第 88 回日本衛生学会学術総会, 東京, 2018 年 3 月.

白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: インスリンによるマクロファージ泡沫化亢進のメカニズム. 第 90 回日本生化学会大会, 神戸市, 2017 年 12 月.

白土 健, 櫻井拓也, 木本紀代子, 大野秀樹, 木崎節子: マクロファージの泡沫化に対するインスリンの影響と習慣的運動の効果. 第 46 回杏林医学会総会, 三鷹市, 2017 年 11 月.

Shirato, K., Sakurai, T., Ogasawara, J., Imaizumi, K., Ohno, H., and Kizaki, T.: O-linked N-acetylglucosamine but not high glucose suppresses macrophage inflammatory responses. RIKEN International Symposium "Systems Glycobiology and Beyond Toward a bridge between fundamental research and applied science", Wako, November 2017.

白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: マクロファージのインスリン感受性に及ぼす自発性運動の効果とその生理的意義. 第 72 回日本体力医学会大会, 松山市, 2017 年 9 月.

Shirato, K., Takanari, J., Misu, M., Koda, T., Sakurai, T., Ogasawara, J., Ishibashi, Y., Imaizumi, K., Ohno, H., and Kizaki, T.: Enzyme-treated asparagus extract has suppressive effect on ultraviolet-B radiation-induced NF- B nuclear translocation in normal human dermal fibroblasts. The 25th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (ICNIM2017), Sapporo, July 2017.

白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 石橋義永, 大石修司, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: 習慣的運動によるマウス炎症性マクロファージの IL-1 と IL-18 分泌亢進のメカニズム. 第 87 回日本衛生学会学術総会, 宮崎市, 2017 年 3 月.

白土 健, 高成 準, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 石橋義永, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: 酸化ストレスによる皮膚線維芽細胞の炎症性応答に対する ETAS の予防効果. 第 87 回日本衛生学会学術総会, 宮崎市, 2017 年 3 月.

白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 木本紀代子, 大野秀樹, 木崎節子: マウス炎症性マクロファージのサイトカイン分泌能に及ぼす習慣的自発性運動の効果. 第 45 回杏林医学会総会, 三鷹市, 2016 年 11 月.

白土 健, 高成 準, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: 酵素処理アスパラガス抽出物はH₂O₂による皮膚線維芽細胞株 L929 の p65 核内移行を抑制することにより炎症性応答を軽減する. 第 89 回日本生化学会大会, 仙台市, 2016 年 9 月.

白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 大石修司, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: マウスマクロファージのインフラマソーム依存性サイトカイン分泌は自発性走運動により増強される. 第 71 回日本体力医学会大会, 盛岡市, 2016 年 9 月. Shirato, K., Takanari, J., Sakurai, T., Ogasawara, J., Ishibashi, Y., Imaizumi, K., Ohno, H., and Kizaki, T.: Suppressive effects of enzyme-treated asparagus extract on hydrogen peroxide-stimulated inflammatory responses in murine L929 skin fibroblasts. The 24th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (ICNIM2016), Sapporo, July 2016.

白土 健, 高成 準, 小笠原準悦, 櫻井拓也, 石橋義永, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: 酸化ストレスによる皮膚線維芽細胞の MMP 発現誘導に対する ETAS の効果. 第 86 回日本衛生学会学術総会, 旭川市, 2016 年 5 月.

白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 今泉和彦, 谷口直之, 大野秀樹, 木崎節子: マクロファージの O-結合型 N-アセチルグルコサミン修飾調節機構に及ぼす運動トレーニングの影響. 第 88 回日本生化学会大会, 神戸市, 2015 年 12 月.

白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 楊 國昌, 大野秀樹, 木崎節子: 加齢性慢性炎症性疾患に対する運動効果: マクロファージ時計遺伝子をプローブとして. 第 44

回杏林医学会総会, 三鷹市, 2015 年 11 月.

白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 石橋義永, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: マウス腹腔マクロファージの O-結合型 N-アセチルグルコサミン修飾に及ぼす自発性走運動の影響. 第 70 回日本体力医学会大会, 和歌山市, 2015 年 9 月.

Shirato, K., Sakurai, T., Ogasawara, J., Ishibashi, Y., Kato, H., Izawa, T., Ohira, Y., Imaizumi, K., Ohno, H., and Kizaki, T.: Voluntary exercise reduces O-linked N-acetylglucosamine levels in murine macrophages. The 16th International Biochemistry of Exercise Conference (IBEC2015), Sao Paulo, Brazil, September 2015.

Shirato, K., Takanari, J., Ogasawara, J., Sakurai, T., Ishibashi, Y., Imaizumi, K., Ohno, H., and Kizaki, T.: Enzyme-treated asparagus extract attenuates hydrogen peroxide-induced matrix metalloproteinase-9 expression in murine dermal fibroblast L929. The 23rd International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (ICNIM2015), Sapporo, July 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白土 健 (SHIRATO, Ken)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号: 6 0 5 5 9 3 8 4

(2) 連携研究者

木崎節子 (KIZAKI, Takako)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号: 0 0 3 2 2 4 4 6