

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500878

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームによる身体活動低下へのマクロファージ走化と分化の関与

研究課題名(英文)The influence of macrophage differentiation on decreasing physical activity in metabolic syndrome

研究代表者

矢野 博己(YANO, HIROMI)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：20248272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームによる身体活動低下要因をマクロファージ分化によるものと仮説し、本研究では、in vitroモデルを用いて、筋損傷局所に侵入するマクロファージの走化性におよぼす分化の影響を調べた。その結果、メタボリックシンドロームで増加するM1マクロファージの細胞走化性は消失し、逆にM2マクロファージでは高い走化性を示した。M1マクロファージのケモカインレセプター発現は弱く、接着性とともにF-アクチン発現が高かった。以上の結果から、メタボリックシンドロームによるマクロファージのM1型への分化は、損傷を受けた筋細胞に向かう走化性の低下を伴っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify that our hypothesis is that the decreasing physical activity in metabolic syndrome might be induced by macrophage differentiation, we investigated the effect of macrophage differentiation on the chemotactic activity to invade local damaged muscle using in vitro models of muscle injury. Although the chemotactic activity of M1 macrophages disappeared completely, M2 cells exhibited accelerated chemotactic activity toward damaged muscle cells. These results suggest that the metabolic syndrome-induced reduction of physical activity depend on the differentiation of M1 type of macrophages, which show a decrease in chemotaxis towards damaged myocytes.

研究分野：運動免疫学

キーワード：Taxiscan M1マクロファージ M2マクロファージ 筋損傷モデル C2C12細胞 J774細胞 MCP-1 CCR2

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームとは、「過食」や「運動不足」などが主な原因で、その運動不足の理由は、車の利用、コンピュータの利用、歩かない、座ったままの仕事が増えたなどとされているが、そうであろうか。身体内部環境そのものが運動しにくい環境に変化してしまっていることが原因ではないのだろうか。近年、肥満や糖尿病に伴う慢性炎症性疾患が明らかとなり、この原因に炎症型マクロファージ (M1) の組織への大量浸潤があげられている。運動後、損傷を受けた骨格筋の修復過程でマクロファージは、筋の再構築、すなわち分化・増殖に貢献する。マクロファージの損傷筋局所へのすみやかな移動 (走化) は、再構築を急ぐ骨格筋にとって必要不可欠と考えられる。しかし、M1 化したマクロファージは走化性の低いタイプのマクロファージである可能性から、M1 の増加した肥満患者にとって、運動後の骨格筋修復は著しく遅延し、慢性炎症は、骨格筋の不活動を伴い、結果としてさらなる運動不足、さらなる肥満の悪化を招く負のスパイラルを生じてしまっていると仮説できる。

2. 研究の目的

筋損傷と筋修復については広く研究されてきた。そして多くの論文が報告されている。その中には筋損傷後の免疫細胞の集積が修復に関係するとの内容もある (Tidball, 2005; Summan et al., 2006; Lu et al., 2011a)。確かに筋修復は壊れた筋肉へのマクロファージ細胞の数と関係している (Contreres-Shannon et al., 2007; Shireman et al., 2007)。マクロファージは損傷骨格筋局所に速やかに浸潤、集積し、そして筋肉の修復と再生に重要な働きをもたらす。ケモカイン受容体 2 (CCR2) とそのリガンドである単球遊走タンパク 1 (MCP-1) は炎症局所にマクロファージを誘導することが明らかとなっている (Ito et al., 2008; Valga et al., 2008)。しかしながらこのマクロファージが損傷骨格筋へ遊走する細胞学的生物学的理由は完全には明らかとなっていない。マクロファージ集積の増大は主に二つの方法から検討されている。すなわち免疫組織学的評価 (組織に集積したマクロファージを評価する方法) (Shireman et al., 2006; Kleveta et al., 2012) と、Boyden チャンバー法による走化性の評価 (Boyden, 1962) またはその改良法であった。この二つの方法は壊れた骨格筋へのマクロファージの水平移動を速度や方向性で評価するには困難かつ不可能であった。一方、別の方法として TAXIScan は詳細に骨格筋へのマクロファージの遊走を評価できる。なぜならば水平面の細胞移動を評価できるからである (Nitta et al., 2007; Ito et al., 2008)。もちろん、最近の研究ではマクロファージの走化性を TAXIScan で評価することは行われてきたが (Terashima et al., 2005; Nishino et al., 2007)、損傷骨格筋細

胞への走化性の評価はこれまで行われていない。

近年、メタボリックシンドロームに関する因子が、慢性炎症性疾患を誘導することが示されている。これは炎症型マクロファージの蓄積と抗炎症型マクロファージの減少が脂肪組織で観察されることを意味している (Luneng et al., 2007; Kawanishi et al., 2010)。ゆえにマクロファージの表現型もこの走化性に影響している可能性がある。異なる機能を持つ数種類のマクロファージはすでに知られている (Martinez et al., 2008)。筋肉では障害や細胞死は通常炎症細胞の集積と組織の修復を伴うまたマクロファージの走化性が抗炎症マクロファージ機能を誘導するグルドコルチコイドによって引き起こされることも報告されている (Ortega et al., 1997; Varga et al., 2008; Okutsu et al., 2008)。したがってグルコルチコイドが運動後の骨格筋収縮過程におけるマクロファージの走化性に貢献している可能性が考えられる。一方、炎症型マクロファージへの分化を強く誘導するリポポリサッカライド (LPS) もまたマクロファージの運動性に影響する (Kreveta et al., 2012)。近年、マクロファージの表現型のスイッチングは、CCR2 欠損マウスで観察されないことが報告され (Lumeng et al., 2007) このことはマクロファージの変化に MCP1/CCR2 経路が関係している事を示している。しかし、これらの研究もまたマクロファージの走化性の評価に Boyden チャンバー法を用いたのみで、さらにターゲット細胞は骨格筋細胞でもない。したがって我々の知る範囲では、マクロファージの分化が走化性に及ぼす影響についての研究は行われていない。

本研究では損傷骨格筋のマクロファージ走化性に及ぼす影響をマクロファージの動画解析モデルで検証することにした。さらにマクロファージの分化が骨格筋細胞への走化性に影響するかどうかも検討した。

3. 研究の方法

(1) 用いた試薬

LPS (*Escherichia coli* O55:B5) とデキサメタゾン (DEX) は Sigma 社製を用いた。

(2) 細胞培養

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞とマウスマクロファージ細胞株 J774 細胞は理研細胞バンクより購入した。これらの細胞は、ペニシリンとストレプトマイシンを含む 10% FCS-DMEM 培地で、37 5%CO₂ 環境下での培養を行った。

C2C12 細胞は、パッセージ 2~10 を使用した。C2C12 死細胞は、液体窒素で 60 秒間の凍結、その後 37 度で 3 分間の融解を 5 回繰り返して作成し、C2C12 生細胞と混ぜ合わせた (C2C12 生細胞:C2C12 死細胞 = 1:0.5)。これを損傷骨格筋モデルとした。J774 細胞は 100 ng/ml の LPS、もしくは 200 nM の

DEX で 24 時間刺激した。

(3) TAXIScan を使用した走化性の測定

J774 細胞の走化性は TAXIScan を用いて測定した。(Kanegasaki et al.,2003; Nitta et al.,2007; Ito et al.,2008)。J774 細胞は走化性を測定する水平型のチャンネルの片方のコンパートメントに注入した。そして測定位置にセットした後、反対側のコンパートメントに C2C12 細胞を注入した。J774 細胞の走化性は 37 で 3 分毎に 6 時間記録し、走化性経路は TAXIScanAnalyzer2 ソフトウェアを用いて解析した。解析は走化性を示した細胞をディスプレイ上でクリックすることによってトレースし、それぞれのパラメーターの平均値を計算した。速度は $\mu\text{m}/\text{sec}$ で表示した。方向性はラジアンで表示した。データは三名の独立した観察者が行った。

(4) フローサイトメトリー法

J774 細胞の分化に及ぼす LPS と DEX の評価は、細胞表面の TLR4, CD11c, CCR2 と F-アクチンの強度をフローサイトメトリー法で行った。細胞は FcR ブロッカーで 30 分間処理し、その後 PE 標識抗 TLR4 抗体、FITC 標識抗 CD11c 抗体、及びアイソタイプコントロール、抗 CCR2 抗体とその二次抗体 (ALEXA488 抗体) で染色した。F-アクチンはファロイジンで染色した。フローサイトメトリー法による解析には、FACSCalibur™ を使用し、ソフトウェアには CellQuest™ を使用した。

(5) 組織学的形態学的解析

マクロファージの F-アクチン分布を調べるため、カバーガラス状の浸潤細胞をパラポルムアルデヒドで固定し、その後ファロイジンと Hoechst33342 で F-アクチンと核を染色した。その画像は、蛍光顕微鏡下で観察した。細胞形態と細胞面積の評価は、同様のサンプルで、解析ソフトウェア Image J を使用し、最適化楕円法で最大縦横比から計算した。

(6) 接着性の評価

細胞接着性を測定するため、J774 細胞は、非処理のプラスチックプレートに播種し、37 で 60 分間培養した (Varga et al., 2008)。非接着細胞を除去した後、残った細胞をグルタルアルデヒド固定し洗浄後、200 mM のホウ酸を含む 0.5% クリスタルバイオレットで染色した。さらに洗浄後、10% 酢酸を加え溶解した後、OD560nm の波長で測定を行った。

(7) MCP-1 の測定

C2C12 細胞の生細胞死細胞及び混合細胞の培養上清を回収し、マウス JE/MCP-1 ELISA キットを用いて MCP-1 分泌量を測定した。MCP-1 の測定下限値は、2 pg/ml であった。

(8) 統計処理

データは平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計学的処理は SPSS 15.0 Windows 版を使用した。データの解析には一元配置、もしくは二元配置の分散分析 (ANOVA) を用いた。ポ

ストホック検定には、Tukey または Bonferroni テストを使用した。有意水準は 5%未満とした。

4. 研究成果

(1) マクロファージ輸送活性におよぼす C2C12 細胞の影響

J774 細胞の走化性は移動速度と方向性から評価した(図 1)。C2C12 細胞数 8,000 個の時、J774 細胞の移動速度はわずかではあるが、有意に低下したが、J774 細胞の移動速度に対する C2C12 細胞数の影響はほとんどなかった ($F_{(5,214)}=2.531$, $p < 0.05$, 図 1 A)。一方 C2C12 細胞への J774 細胞の方向性は C2C12 細胞数に強く影響されていた。最も高い J774 細胞の方向性が観察されたのは、C2C12 細胞が 2,000 個の時であった。 ($F_{(5,214)}=7.511$, $p < 0.01$, 図 1 B)。さらに本研究では、生死 C2C12 細胞の J774 細胞走化性への影響も検討した。J774 細胞の速度は C2C12 細胞の生死及び混合細胞によってほとんど影響されなかったが ($F_{(4,387)}=3.184$, $p < 0.05$, 図 1 C)、方向性は生 C2C12 細胞で増加した。この変化は死細胞では観察されなかった。興味深いことに J774 細胞の最も高い方向性は生死 C2C12 細胞を 1:0.5 (2,000 個 : 1,000 個) の時に観察された ($F_{(4,387)}=17.687$, $p < 0.01$, 図 1 D)。

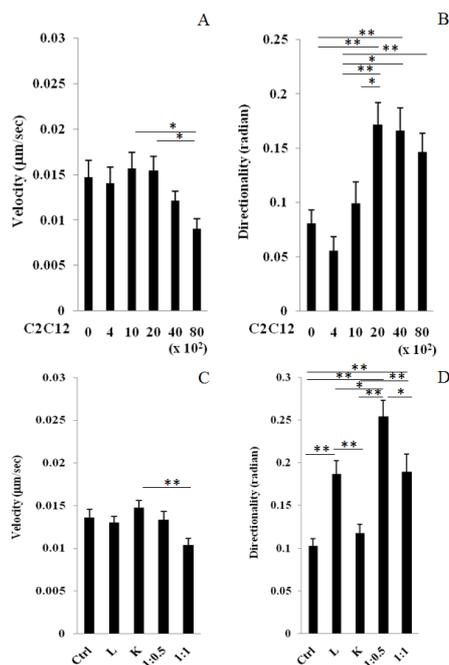


図 1 マクロファージの走化性に及ぼす C2C12 細胞の性質

J774 細胞の走化性は速度(図 1 の A と C)と方向性(図 1 の B と D)で評価した。J774 細胞の走化性に及ぼす C2C12 細胞の細胞数の影響は A と B に示してある。また C2C12 生死細胞の影響は C と D に示してある。Ctrl はコントロール細胞,L は C2C12 生細胞,K は C2C12 死細胞,1:0.5 と 1:1 は生死細胞の混合条件。* $p < 0.05$ 及び** $p < 0.01$ 。

(2) J774 細胞の機能及び形態に及ぼす LPS と DEX の影響

LPS と DEX の刺激後に TLR4 と CD11c の発現を J774 細胞で検討した。(TLR4; $F_{(2,15)}=122.5$, $p<0.01$, CD11c; $F_{(2,15)}=103.6$, $p<0.01$). DEX 処理は J774 細胞の TLR4 及び CD11c 発現に影響しなかったけれども、LPS 処理の場合、両方とも対照条件、及び DEX 条件と比べて有意に高かった ($p<0.01$, 図 2A-D)。マクロファージのマーカーである F4/80 発現は、どの細胞でも違いはなかった。さらに細胞の接着性の違いについても観察を行った ($F_{(2,21)}=26.325$, $p<0.01$, 図 2E)。

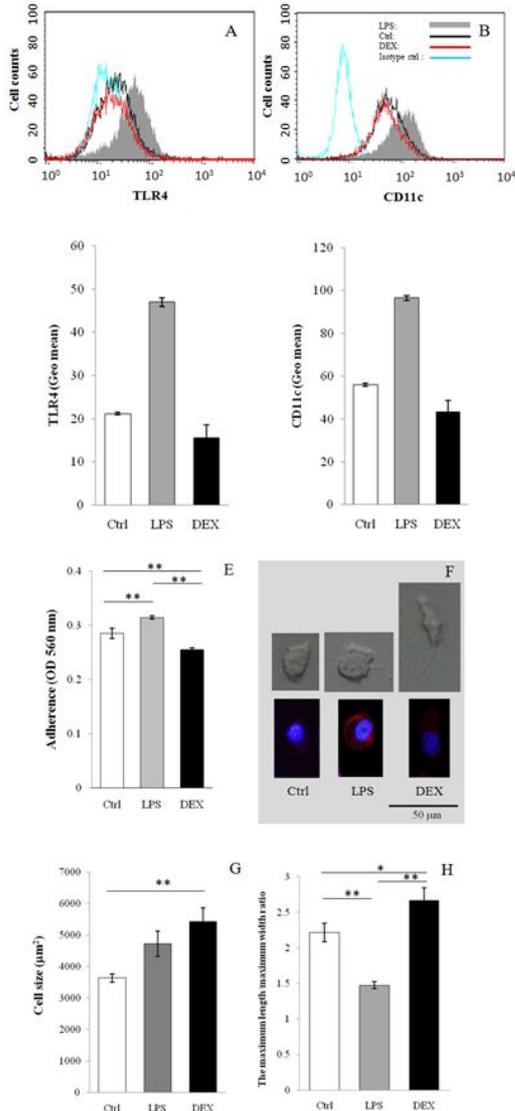


図 2 J774 細胞の LPS 及び DEX 処理した後の細胞表面 TLR4 と CD11c 発現および細胞接着性と形態の変化

ティピカルデータ(A と B)と平均蛍光強度(C と D)を示した。TLR4 発現は A と C, CD11c は B と D に示した。LPS 及び DEX 処理による J774 細胞の接着性については E に示した。F-アクチンの蛍光イメージと形態の例を F に示した。赤は F-アクチン、青は核染色を表す。スケールバー=50µm (F)。LPS と DEX 処理による形態(G は細胞面積, H は縦長度)の変化を示した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

LPS で処理した細胞の接着性は、コントロール細胞より有意に高かった ($p<0.01$)。一方 DEX 処理細胞では、他の条件に比べて有意に低かった ($p<0.01$)。加えて LPS 処理細胞では、F-アクチンに結合したファロイジンによる細胞膜周辺の染色が増強していたが、DEX 処理細胞では、J774 細胞の縦軸方向に直線的な染色が確認された(図 2F)。また形態学的違いも観察された(図 2F)。LPS または DEX 処理による J774 細胞形態の変化は細胞の面積で観察され ($F_{(2,238)}=8.658$, $p<0.01$, 図 2G)、さらに細胞の縦方向への伸びでも観察された ($F_{(2,238)}=16.196$, $p<0.01$, 図 2H)。細胞のサイズは DEX 処理で有意に増加し ($p<0.01$ 対コントロール, 図 2G)、加えて C2C12 細胞に向かって縦長方向への細胞の伸びが観察された。これはコントロール及び LPS 処理細胞と比べて有意に高かった。 ($p<0.05$ 対コントロール, $p<0.01$ 対 LPS, 図 2H)。一方 LPS 処理細胞では、細胞の円形化が観察され、コントロールと比較して縦長比は有意に低かった ($p<0.01$, 図 2H)。

(3) 走化性に及ぼすマクロファージ分化の影響

無刺激の J774 細胞では、損傷骨格筋細胞への有意な走化性が観察されたが、LPS 処理細胞では、走化性が完全に消失していた。一方で、DEX 処理した細胞では、損傷骨格筋細胞への走化性が促進されていた。J774 細胞に対するこれらの影響と、C2C12 細胞に対する J774 細胞の走化性については、二元配置の ANOVA で評価した。J774 細胞の移動速度は LPS 及び DEX 刺激で有意に変化し、C2C12 細胞の有無では差がなかった。また相互作用にも差がなかった(図 3A)。J774 細胞の方向性は、細胞分化の影響を受け C2C12 細胞のあるなしによる影響も観察された。さらにその相互作用にも有意な差が観察された(図 3B)。

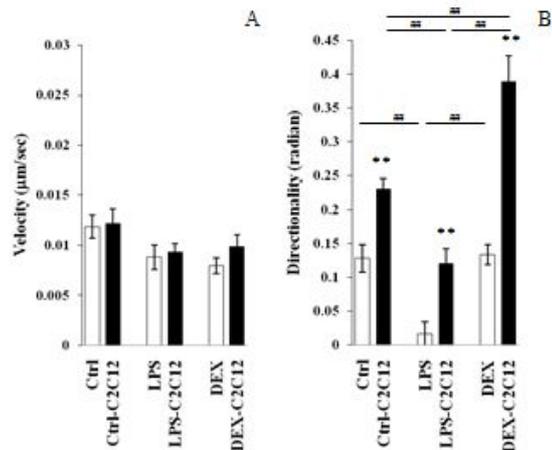


図 3 C2C12 細胞へのマクロファージ走化性
白バーはターゲット細胞なしを表し、黒バーはターゲット細胞 C2C12 細胞 (1:0.5) を表す。
$p<0.01$, * $p<0.01$, ** $p<0.01$ 。

(4) C2C12 細胞による MCP1 産生と J774 細胞の F-アクチン及び CCR2 の発現

C2C12 細胞からの MCP-1 放出について図 4A に示した。C2C12 死細胞培養上清の MCP-1 は測定感度以下であった。しかしながら C2C12 生死細胞のその濃度は C2C12 生細胞よりも高かった。(p<0.01)。コントロール細胞と DEX 細胞の F-アクチン発現の違いは観察されなかったが、LPS 処理では有意な F-アクチンの増加が観察された(図 4B)。DEX 処理したマクロファージの CCR2 発現はコントロール細胞及び LPS 処理細胞と比べて有意に高かった($F_{(2,20)}=31.4$, p<0.01, 図 4C)。さらにマクロファージの分化度を評価するために、サブポピュレーションの細胞パーセンテージを調べた(図 4D)。低 F-アクチン高 CCR2 ポピュレーションは、主に DEX 処理したマクロファージで観察された(図 4E)、が高 F-アクチン高 CCR2 ポピュレーションは、LPS マクロファージで観察された(図 4E)。このように C2C12 細胞への低走化性を示した LPS 処理マクロファージは、高 F-アクチン低 CCR2 ポピュレーションと同様に高 F-アクチン高 CCR2 細胞も含んでいた。

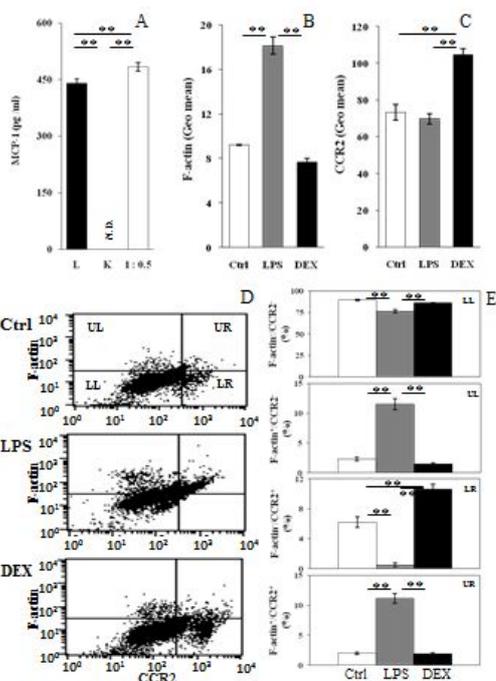


図 4 MCP-1 産生と J774 細胞の F-アクチンと CCR2 発現に及ぼす C2C12 生死細胞の影響

MCP-1 濃度は 24 時間処理後の培養上清。
p<0.01, ND は測定感度以下を示す。F-アクチン (B)と CCR2 (C) を示した。p<0.01。
DEX と LPS 処理によるマクロファージの細胞表面マーカーの違いは四分劃法で (D) 表し、その割合は%で示した(E)。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Uchida, M., Oyanagi, E., Kawanishi, N., Iemitsu, M., Miyachi, M., Kremenik, M.J., Yano, H.: Exhaustive exercise increases TNF- α production in response to flagellin via up-regulation of toll-like receptor 5 in large intestine of mice. Immunol. Lett., 査読有, 158 (1-2): pp. 151-158, 2014.
DOI: 10.1016/j.imlet.2013.12.021.

Uchida, M., Oyanagi, E., Miyachi, M., Yamauchi, A., Yano, H.: Relationship between macrophage differentiation and the chemotactic activity toward damaged myoblast cells. J. Immunol. Methods, 査読有, 393 (1-2): pp.61-69, 2013.
DOI: 10.1016/j.jim.2013.04.007.

Yano, H., Uchida, M., Oyanagi, E., Kawanishi, N., Shiva, D., Kitamura, H.: The suppression of tumor necrosis factor- α production in response to pathogen stimulation by strenuous exercise and the underlying mechanisms. J. Physical Fitness Sports Med., 査読有, 1 (4): pp. 654-653, 2012.
DOI: 10.7600/jpfsm.1.645

[学会発表](計 7 件)

Yano, H., : Real-time imaging of macrophage chemotaxis toward damaged muscle cells is PI3K-dependent. 61th Annual Meeting of The American College of Sports Medicine, 2014 年 5 月 29 日 Orlando (USA)

Yano, H., : Relationship between macrophage differentiation and the chemotactic activity toward damaged muscle cells. The 11th International Society of Exercise and Immunology (ISEI) Symposium, 2013 年 9 月 10, Newcastle (Australia)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢野 博己 (YANO, Hiromi)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授
研究者番号: 20248272

(2)研究分担者

(3)連携研究者