

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350901

研究課題名(和文) 運動による筋の質・量の変化におけるマクロファージ中心仮説

研究課題名(英文) Macrophage hypothesis for exercise-induced muscle qualitative and quantitative changes-

研究代表者

池田 真一 (IKEDA, Shin-ichi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50534898

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)：運動はメタボリックシンドロームや2型糖尿病などの生活習慣病に対して極めて有用な予防・治療手段である。しかし、その分子機序は大部分が明らかではない。私は筋損傷を伴わない、持続的な走運動後に骨格筋内に抗炎症性マクロファージが集積しており、それが筋インスリン感受性増加に関わることを明らかにした。このマクロファージの集積に筋常在性マクロファージが産生・分泌するケモカイン(炎症細胞誘引物質)によって生じ、集積した抗炎症性マクロファージがインターロイキン6を産生し、それが骨格筋細胞に作用することで糖輸送担体であるGLUT4の発現を増加させることで筋インスリン感受性亢進が生じることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Exercise is powerful tool for preventing metabolic syndrome and/or type 2 diabetes in human and rodents. However, the molecular mechanisms are largely unknown. I found that anti-inflammatory macrophages were recruited into skeletal muscle after a single bout of exercise, which regulates insulin sensitivity in skeletal muscle. Resident macrophages produced and secreted chemokines which were major contributor to recruit macrophage into skeletal muscle. Recruited macrophages produced interleukine-6 and it increased GLUT4 expression in skeletal muscle cells. This is underlying mechanism of exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：マクロファージ 運動 インスリン感受性 インターロイキン6 GLUT4

1. 研究開始当初の背景

運動はメタボリックシンドロームや2型糖尿病などの生活習慣病に対して非常に有効な予防・治療法である。運動による骨格筋インスリン感受性亢進は上述の予防・治療効果の根底にある現象であるが、その分子機序のほとんどが明らかにされておらず、AMPKなどの分子の関与が報告されているが、部分的な関与のみであったり、controversialな結果も報告されており、コンセンサスを得られるには至っていない。

研究代表者はマウスを用いた検討によって、一過性走運動後の骨格筋ではマクロファージ数が増加していること、そのマクロファージは抗炎症性のフェノタイプを示すM2マクロファージであること、さらにはマクロファージ枯渇マウスでは一過性走運動後に認められる骨格筋インスリン感受性亢進が認められなかった。この事実は、運動によって骨格筋で増加するM2マクロファージが筋インスリン感受性を制御している可能性を示唆しているが、M2マクロファージがどのように増えているのか？(常在マクロファージが増殖しているのか？血中の単球がリクルートされ分化・成熟しているのか？)また、M2マクロファージはどのように骨格筋のインスリン感受性を調節しているのかが不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、運動によって骨格筋内で増加するM2マクロファージに関して、どのように増えているのか？およびどのように骨格筋インスリン感受性を調節しているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

運動後の骨格筋・血中で増加するサイトカイン・ケモカインの網羅的解析および中和実験

C57BL6Jに一過性走運動(20m/min, 90分)を施し、運動終了0, 1, 3, 12, 24時間後に骨格筋(腓腹筋)および血液を採取した。骨格筋は等張スクロースバッファー中でホモジナイスし上清を回収し、血液からは血清を得た。これらを Milliplex mouse cytokine/chemokine panel を用いてサイトカイン・ケモカインの量を網羅的に解析した。また、本解析によって見出された運動によって増加したサイトカイン・ケモカインが運動後のマクロファージ増加・インスリン感受性亢進に関与するかどうかを明らかにするために、一過性走運動30分前にそれらに対する中和抗体を尾静脈注射により投与し、運動後の骨格筋インスリン感受性ならびに筋内マクロファージ数の検証を行った。

運動後のサイトカイン・ケモカイン産生を担う細胞の同定

運動や筋収縮はサイトカインなどの分泌タンパク質を産生・分泌することが知られているが、それが筋細胞が産生・分泌しているのか、それともマクロファージなどのほかの細胞によるのかは明らかではない。そこで、一過性走運動をC57BL6Jマウスに施し、運動終了0, 1, 3, 6時間後に下肢骨格筋を摘出し凍結切片を作成し、各サイトカイン・ケモカインの局在を検証した。

IL-6による筋インスリン感受性制御機構の解明

この検討から、IL-6が運動による筋インスリン感受性亢進に関与することが示唆された。そこで、IL-6がどのように筋インスリン感受性を亢進するのかを明らかにするために、C57BL6Jマウスに recombinant IL-6 を尾静脈注射により投与し、投与直後、1, 3, 6, 12, 24時間後にヒラメ筋、足底筋を摘出し、インスリン刺激時のインスリンシグナル経路、糖輸送担体の発現量を検証した。また、IL-6の投与量を10ng/mlから10pg/mlまで変化させ、上記の検討を同様に行った。さらに同様の検討を骨格筋細胞株C2C12でも行った。

基底膜リモデリングの可能性

骨格筋にリクルートされた単球がM2マクロファージへ分化・成熟することで筋インスリン感受性を調節している可能性がある。解剖学的には、骨格筋細胞とマクロファージとは細胞外マトリックスからなる基底膜によって隔てられており、2者の相互作用は基底膜を介して行われているのではないかと考えた。そこで、運動によって基底膜構成分子パターンが変化するかを見極めるため、細胞外マトリックスの分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼの発現が運動によって変化するかどうかを検証した。

4. 研究成果

運動後の骨格筋・血中で増加するサイトカイン・ケモカインの網羅的解析および中和実験

C57BL6Jマウスに一過性走運動を施し、運動終了0, 1, 3, 12, 24時間後に骨格筋(腓腹筋)および血液を採取し、32種類のサイトカイン・ケモカインの量を検証した。筋・血清ともに増加が認められたものには interleukin-6 (IL-6)、macrophage chemoattractive protein-1 (MCP-1)、chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) とが見出され、いずれも筋中の増加が血清中の増加に先んじていた。また、筋中のみで量

が増加していたものには interleukin-1b, ingerleukin-10, interleukin-15, vascular endothelial growth factor, macrophage colony stimulation factor (M-CSF)があった。このうち、血中で量が増加した IL-6, MCP-1, CXCL1 に関して、運動による筋インスリン感受性亢進における役割を検証するために、運動前にこれらに対する中和抗体を尾静脈注射により投与し、その後一過性運動を施し運動終了 24 時間後の筋インスリン感受性ならびにマクロファージ数のカウントを行った。IL-6 の中和抗体を投与すると、運動終了 24 時間後において、骨格筋内マクロファージ数はコントロール IgG 投与群と同様に増加していたが、筋インスリン感受性亢進はほぼ完全に抑制されていた。また、MCP-1, CXCL1 の中和抗体を投与したマウスでは、運動終了 24 時間後のマクロファージの増加、筋インスリン感受性亢進の両方が生じなかった。

運動後のサイトカイン・ケモカイン産生を担う細胞の同定

IL-6, MCP-1, CXCL1 に関して骨格筋組織内のどの細胞が産生しているのかを検証するために、運動終了後の筋から凍結切片を作成し、免疫組織染色に供した。MCP-1, CXCL1 に関しては運動終了直後から 3 時間までの間に、マクロファージを含む非骨格筋細胞に限局して発現が認められた。また、IL-6 に関しては、骨格筋、非骨格筋細胞のどちらにも発現は認められたが、非骨格筋細胞でのシグナルのほうが強かった。

IL-6 による筋インスリン感受性制御機構の解明

の結果から、IL-6 は一過性走運動後のマクロファージのリクルートには関与しないが、筋インスリン感受性調節には重要なはたらきをしていると考えられる。IL-6 中和抗体またはコントロール IgG を投与した C57BL6J マウスに一過性走運動を施し、筋インスリン感受性亢進が認められる運動終了 24 時間後に ex vivo でインスリン刺激をし、インスリンシグナルの活性を検証したところ、運動も抗体投与もインスリンシグナルの活性には影響を与えていなかった。骨格筋においてインスリン刺激時の糖輸送は GLUT4 によって行われる。そこで次に、GLUT4 の発現量について検証を行ったところ、運動による GLUT4 発現量の増加が IL-6 中和抗体の投与によってほぼ完全に抑制された。リコンビナント IL-6 の尾静脈注射による単回投与は、遅筋であるヒラメ筋、速筋である足底筋のどちらにおいても GLUT4 の発現量を増加させたが、ある濃度を超えると、この増加は認められなくなった。また、骨格筋細胞株である C2C12 に IL-6 処理をすると、短時間・低濃

度のときに GLUT4 の発現増加が認められた。

基底膜リモデリングの可能性

一過性走運動後に腓腹筋を継時的にサンプリングし、MMP の発現量を Western blotting にて検討した。その結果、MMP-2 および MMP-9 の発現量が一過性走運動によって増加しており、このことは運動後に細胞外マトリックスのリモデリングが生じている可能性を示唆するものであり、そのことが骨格筋の微小環境にどのように影響するのかが今後明らかにしていく必要がある。

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 9 件)

1. **Shin-ichi Ikeda**, Yoshifumi Tamura, Saori Kakehi, Kageumi Takeno, Yoshio Fujitani, Ryuzo Kawamori and Hirotaka Watada: Exercise-induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle, *Biochem Biophys Res Commun*, In press
2. Saori Kakehi, Yoshifumi Tamura, Kageumi Takeno, Yuko Sakurai, Minako Kawaguchi, Takashi Watanabe, Takashi Funayama, Fumihiko Sato, **Shin-ichi Ikeda**, Akio Kanazawa, Yoshio Fujitani, Ryuzo Kawamori, and Hirotaka Watada: Increased intramyocellular lipid/impaired insulin sensitivity is associated with altered lipid metabolic genes in muscle of high responders to a high fat diet, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016 Jan 1;310(1):E32-40
3. Natsumi Tasaki, Takeo Minematsu, **Shin-ichi Ikeda**, Yuko Mugita, Gojiro Nakagami and Hiromi Sanada: Telogen elongation in the hair cycle of

- ob/ob mice, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015 Aug 4:1-6.
4. Gojiro Nakagami, Takeo Minematsu, Tomohiro Morohoshi, Takumi Yamane, Toshiki Kanazawa, Lijuan Huang, Mayumi Asada, Takashi Nagase, **Shin-ichi Ikeda**, Tsukasa Ikeda and Hiromi Sanada: *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signaling molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone induces matrix metalloproteinase 9 expression via the AP1 pathway in rat fibroblasts, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015 Jun 22:1-5.
 5. Takahiro Watanabe, Yoshifumi Tamura, Saori Kakehi, Takashi Funayama, Amalia Gastaldelli, Kageumi Takeno, Minako Kawaguchi, Risako Yamamoto, Fumihiko Sato, **Shin-ichi Ikeda**, Hikari Taka, Tsutomu Fujimura, Yoshio Fujitani, Ryuzo Kawamori and Hirotaka Watada: Effects of sitagliptin on ectopic fat contents and glucose metabolism in type 2 diabetic patients with fatty liver, *J Diabetes Investig*, Mar;6(2):164-72, 2015 doi: 10.1111/jdi.12262
 6. Dong-mei Zheng, Zehua Bian, Norihiko Furuya, Mitsue Takeda-Ezaki, Juan Alejandro Oliva Trejo, Katsuyuki Takahashi, Yuka Hiraoka, Reiko Mineki, Hikari Taka, **Shin-ichi Ikeda**, Masaaki Komatsu, Tsutomu Fujimura, Takashi Ueno and Junji Ezaki, A treadmill exercise reactivates the signaling of the mammalian target of rapamycin (mTor) in the skeletal muscles of starved mice, *Biochem Biophys Res Commun*, Jan 2;456(1):519-26, 2015 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.118
 7. Minako Kawaguchi, Yoshifumi Tamura, Saori Kakehi, Kageumi Takeno, Yuko Sakurai, Takahiro Watanabe, Takashi Funayama, Fumihiko Sato, **Shin-ichi Ikeda**, Yuji Ogura, Norio Saga, Hisashi Naito, Yoshio Fujitani, Akio Kanazawa, Ryuzo Kawamori, and Hirotaka Watada: Association between expression of FABPpm in skeletal muscle and insulin sensitivity in intramyocellular-lipid-accumulated non-obese men, *J Clin Endocrinol Metab*, Sep;99(9):3343-52, 2014 doi: 10.1210/jc.2014-1896
 8. Norihiko Furuya, **Shin-Ichi Ikeda**, Shigeto Sato, Sanae Soma, Junji Ezaki, Juan Alejandro Oliva Trejo, Mitsue Takeda-Ezaki, Tsutomu Fujimura, Eri Arikawa-Hirasawa, Norihiro Tada, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Eiki Kominami, Nobutaka Hattori and Takashi Ueno: PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to the proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation, *Autophagy*, Apr 1;10(4): 631-641, 2014
 9. **Shin-ichi Ikeda**, Yoshifumi Tamura, Saori Kakehi, Kageumi Takeno, Minako Kawaguchi, Takahiro Watanabe, Fumihiko Sato, Takeshi Ogihara, Akiko Kanazawa, Yoshio

Fujitani, Ryuzo Kawamori, Hiroataka Watada: Exercise-induced enhancement of insulin sensitivity is associated with accumulation of M2-polarized macrophages in mouse skeletal muscle, *Biochem Biophys Res Commun* 441: 36-41, 2013

〔学会発表〕(計 14 件)

池田真一、峰松健夫、真田弘美：アシル基長の異なるアシルホモセリンラクトンの ob/ob マウスに対する発毛効果の比較検討、第 20 回日本臨床毛髪学会学術集会、2015 年 12 月 5 日、高知

峰松健夫、**池田真一**、真田弘美：アシルホモセリンラクトン (AHL) とミノキシジル投与によるマウス背部毛包の NOTCH1 経路および β -catenin/LEF1 経路の活性化、第 20 回日本臨床毛髪学会学術集会、2015 年 12 月 5 日、高知

池田真一、峰松健夫、仲上豪二郎、真田弘美：低濃度 AHL による筋線維芽細胞への分化は mTOR 経路の活性化を介して生じる、第 45 回日本創傷治癒学会、2015 年 11 月 30 日、東京

麦田裕子、峰松健夫、**池田真一**、仲上豪二郎、真田弘美：アシル基の鎖長の異なるアシルホモセリンラクトンが角化細胞遊走に及ぼす影響、第 45 回日本創傷治癒学会、2015 年 11 月 30 日、東京

北村言、峰松健夫、**池田真一**、仲上豪二郎、真田弘美：創傷治癒過程におけるペルオキシダーゼ活性の継時的変化、第 45 回日本創傷治癒学会、2015 年 11 月 30 日、東京

Shin-ichi Ikeda, Yoshifumi Tamura, Saori Kakehi, Ryuzo Kawamori and Hiroataka Watada: Exercise-induced transient increase in IL-6 stimulates GLUT4 expression and enhances insulin sensitivity in mouse skeletal muscle, 2nd Inaugural International Academy of Sportology, Tokyo, 2015

禰屋光男、峰松健夫、松林武生、中村真理子、**池田真一**、後藤大地、土肥美智子。スキンプロテイング法を利用した高強度運動時の局所的筋動態の評価。第 70 回日本体力医学会。和歌山県和歌山市、2015/9/18-20

池田真一、峰松健夫、仲上豪二郎、真田弘美：緑膿菌由来低分子化合物 Acyl homoserine lactone は novel PKC の切断・活性化を介して皮膚繊維芽細胞のアポトーシスを誘導する、第 44 回日本創傷治癒学会、2014 年 12 月、宮城

峰松健夫、仲上豪二郎、池田真一、真田弘美：ニトロセルロースメンブレンの貼付による皮膚バリア機能の変化 - スキンプロテイング法の原理解明に向けて、第 44 回日本創傷治癒学会、2014 年 12 月、宮城

池田真一、峰松健夫、仲上豪二郎、真田弘美：緑膿菌由来低分子化合物 Acyl homoserine lactone により活性化される皮膚角化細胞内シグナル経路の探索、第 19 回日本臨床毛髪学会、2014 年 11 月、岡山

峰松健夫、田崎なつみ、**池田真一**、真田弘美。スキンプロテイング法によるマウス背部皮膚の毛包タンパク質の検出。第 19 回日本臨床毛髪学会学術集会、2014 年 11 月、岡山

池田真一、田村好史、寛佐織、河盛隆造、綿

田裕孝：運動後に増加する IL-6 は筋 GLUT4 発現増加を介してインスリン感受性を亢進する、第 69 回日本体力医学会大会、2014 年 9 月、長崎

池田真一、田村好史、笈佐織、河盛隆造、綿田裕孝：運動による筋インスリン感受性亢進におけるマクロファージの関与、第 68 回日本体力医学会大会、2013 年 9 月、ワークショップ、東京

竹野景海、田村好史、川口美奈子、渡邊隆宏、船山崇、櫻井裕子、佐藤文彦、山本理紗子、金孟奎、笈佐織、**池田真一**、島田和典、藤谷与士夫、代田浩之、河盛隆造、綿田裕孝：肥満者における、肝臓、骨格筋のインスリン抵抗性の臨床的意義とその原因探索、第 33 回日本肥満学会、2013 年 10 月、京都

〔図書〕(計 1 件)

看護理工学 (共著) 東京大学出版会 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 真一 (IKEDA, Shin-ichi)

東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50534898

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：