

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700702

研究課題名（和文）

運動によるインスリン感受性亢進における筋-マクロファージ間コミュニケーション

研究課題名（英文）

The mechanism of exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity

研究代表者

池田真一（IKEDA SHIN-ICHI）

順天堂大学・医学(系)研究科・研究員

研究者番号：50534898

研究成果の概要（和文）：

運動は筋インスリン感受性を亢進することで、メタボリックシンドロームや2型糖尿病の予防・治療に極めて有効であるが、その分子メカニズムは明らかにされていない。我々は、運動により骨格筋内の抗炎症性マクロファージである M2 マクロファージ数が増加し、これにより、筋インスリン感受性の亢進が起こっていると仮説した。C57BL6J マウスに一過的トレッドミル走を施すと、骨格筋内の M2 マクロファージ数は増加し、これに伴い筋インスリン感受性の亢進も認められた。しかしながら、運動前に全身のマクロファージを枯渇させる薬剤であるクロドロネートリポソームを投与すると、運動後に認められた M2 マクロファージ数の増加、筋インスリン感受性亢進の両方が起こらなかった。このとき、いくつかのシグナル伝達経路の活性化を検討したところ、インスリンシグナル（Akt-AS160）や AMPK 経路は運動やクロドロネートリポソームによる変化は認められず、PKC 経路が運動により活性化されており、この活性化はクロドロネートリポソームにより抑制された。これらのことから、運動による筋インスリン感受性亢進は、M2 マクロファージが PKC 経路を介して引き起こしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Type 2 diabetes and obesity are characterized by insulin resistance in skeletal muscle. It has been well demonstrated that exercise increase insulin sensitivity in skeletal muscle. However, it remains still unclear how a single bout exercise enhance subsequent insulin sensitivity. Recently, it has been reported that macrophages, at least partly, regulate insulin sensitivity in several insulin target organs. We, therefore, hypothesized that macrophages are involved in the mechanisms of exercise-induced enhancement of insulin sensitivity in skeletal muscle. To test this hypothesis, we injected saline (SAL) or clodronate liposome (CL), a macrophage suppressor, to C57BL6J mice. Then, mice were subjected to a single bout of treadmill running. Twenty-four hour after exercise, we measured ex-vivo insulin-stimulated 2-deoxy glucose (DG) uptake in skeletal muscle. We observed that a single bout exercise enhanced macrophage accumulation and insulin-stimulated 2-DG uptake in plantaris muscle in SAL group. However, CL treatment completely abolished these changes. We also observed that phosphorylation state of Akt, AS160 and AMPK were not changed by CL treatment. From these results, we conclude that macrophages are involved in the mechanisms of exercise-induced enhancement of insulin sensitivity in skeletal muscle, independent of Akt and AMPK phosphorylation states.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：運動、インスリン感受性、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの病態にはインスリン抵抗性が深く関与しており、インスリン抵抗性の発症機序やその治療法について、現在までに数々の研究が行われてきた。インスリン感受性臓器のなかで、特に、特に体重の50%を占める骨格筋は、インスリン抵抗性改善のための重要な治療標的であり、運動は骨格筋のインスリン感受性を改善させる最も有用な治療手段である。そのため、現在までに運動がインスリン感受性を増加させる分子機序の解明を目指した研究が数多くなされ、その結果、運動によるAMPキナーゼの活性化が、その中心を担っていると考えられてきた。

しかし、AMPキナーゼの活性化だけでは運動がインスリン感受性を亢進するメカニズムのすべてを説明することが出来ないため、異なるメカニズムの存在が想定されてきたが、その後、それに関する研究はほとんど進展を見せていなかった。

この点に関して、近年マクロファージ(Mφ)がインスリン感受性に与える影響について明らかになりつつあり大変注目を集めている。MφはM1とM2と呼ばれる集団に大別することが出来る。M1 Mφは炎症の惹起、損傷した組織の除去を担い、M2 Mφは、M1とは逆に、炎症の終結・抑制ならびに、組織の修復に関与している。最近、肥満に伴い増殖・活性化したM1 Mφがインスリン抵抗性のイニシエーターであることが明らかにされた。その一方で、骨格筋、肝臓においてM2Mφが正常なインスリン感受性を維持していることが報告された。この研究結果を受けて、我々は筋インスリン感受性亢進が引き起こされる強度の一過的運動後の骨格筋組織を分析したところ、M2 Mφ様の細胞が多数集積することが再現性を持って確認された。この事象から、運動による骨格筋インスリン

感受性亢進において、M2Mφが関与する可能性が推測される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動によって骨格筋内のM2マクロファージ数が増加するかどうか、またそのことが、筋インスリン感受性亢進に関与するかどうかを検討することである。また、上記の仮説が正しかった場合、M2マクロファージがどのような分子機序によってインスリン感受性亢進を引き起こしているのかについても検討を行う。

3. 研究の方法

C57BL6Jマウスに20m/分、90分間の一過的トレッドミル走を施し、運動終了24時間後にヒラメ筋、足底筋、腓腹筋を摘出し、凍結切片を作成した。凍結切片上で、抗F4/80抗体、抗CD11c抗体による二重染色でM1マクロファージを、抗F4/80抗体、抗CD206抗体による二重染色でM2マクロファージを視覚化し、その数を運動前後で比較した。

マクロファージの枯渇には、マクロファージを枯渇させる薬剤であるクロドロネートリポソーム(CL)を腹腔内投与することで行った。

C57BL6Jマウスに20m/分、90分間の一過的トレッドミル走を施し、運動終了24時間後に足底筋を摘出し、ex vivo incubation法にて、筋インスリン感受性を測定し、運動の有無、CL投与の有無による影響を比較検討した。

また、インスリン刺激後の筋から、ホモジネートを作成し、Western blotting法にてAkt, AS160, AMPK, MAPK PKC等のリン酸化状態の検討を行った。

さらに、運動を施したマウスから足底筋を摘出し、ex vivo incubation法にてインスリン感受性を測定する際に、培地に様々な阻害剤を加え、運動によるインスリン感受性増加が抑制されるかどうか検討した。

4. 研究成果

20m/分、90 分間の一過的トレッドミル走により、骨格筋内における M2 マクロファージ数は増加した。また、M1 マクロファージに関しては、運動前後に関わらず、骨格筋内には存在しなかった。

また、運動による骨格筋内の M2 マクロファージ数の増加は、運動前に CL を投与すると起こらなかった。

次に、20m/分、90 分間の一過的トレッドミル走の 24 時間後に、*ex vivo incubation* 法にて足底筋のインスリン感受性を測定すると、非運動群に比べてインスリン感受性が亢進していた。しかしながら、運動前に CL を投与すると、運動によるインスリン感受性亢進が起こらなかった。これらのことから、運動後に骨格筋内に増加する M2 マクロファージがインスリン感受性に関与することが示唆された。

また、運動/非運動群、CL 投与/非投与群間でインスリン刺激時の Akt, AS160, AMPK, MAPK のリン酸化状態に変化は認められなかった。PKC のリン酸化は、運動群で非運動群に比べて高く、この増加は、運動前に CL を投与することで起こらなかった。さらに、運動後のマウスから足底筋を摘出し *ex vivo incubation* 法にてインスリン感受性を測定する際に、培地に PKC の阻害剤である Go6983, Go6976 を添加しておくこと、運動によるインスリン感受性亢進が認められなくなった。

以上のことから、運動による筋インスリン感受性の亢進は、M2 マクロファージが、PKC 経路を介して調節している可能性が示唆された。

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 1 件)

Sakurai Y, Tamura Y, Takeno K, Kumashiro N, Sato F, Kakehi S, Ikeda S, Katamoto S, Ogura Y, Saga N, Naito H, Fujitani Y, Hirose T, Kawamori R, Watada H, "Determinants of intramyocellular lipid accumulation after dietary fat loading in non-obese men", *J Diabetes Invest*, In press

[学会発表] (計 15 件)

- ・池田真一、田村好史、笈佐織、河盛隆造、綿田裕孝、筋サイズ並びに筋糖代謝に対する PKC δ の関与の検討、第 65 回日本体力医学会大会、ポスター、2010 年 9 月
- ・田村好史、櫻井裕子、竹野景海、笈佐織、池田

真一、川口美奈子、渡邊隆宏、佐藤文彦、河盛隆造、綿田裕孝：異所性脂肪蓄積とインスリン抵抗性。Advans 研究会、口頭、12 月

・古屋徳彦、池田真一、江崎淳二、小松雅明、木南英紀、上野隆、骨格筋萎縮過程におけるオートファジーの役割、特定領域「タンパク質分解」班会議、口頭、11 月

・笈 佐織、田村 好史、池田 真一、綿田 裕孝、河盛 隆造：脂肪負荷感受性の規定因子の解明、第 65 回日本体力医学会、ポスター、2010 年 9 月

・Norihiro Furuya, Shin-ichi Ikeda, Junji Ezaki, Masaaki Komatsu, Eiki Kominami, Takashi Ueno : Autophagy is involved in slow skeletal muscle atrophy, 第 62 回日本細胞生物学会大会、口頭、2010、5 月

・櫻井裕子、田村好史、竹野景海、熊代尚紀、佐藤文彦、池田真一、笈佐織、形本静夫、内藤久士、小倉裕司、佐賀典生、弘世貴久、綿田裕孝、河盛隆造：ヒトにおける高脂肪食負荷が骨格筋細胞内脂質蓄積とインスリン感受性に与える影響とその規定因子の解明。第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、口頭、5 月

・池田 真一、田村 好史、笈 佐織、綿田 裕孝、河盛 隆造：第 64 回日本体力医学会、廃用性筋萎縮に対する PKC δ の関与の検討、ポスター、2009. 9. 20

・笈 佐織、田村 好史、池田 真一、綿田 裕孝、河盛 隆造：第 64 回日本体力医学会、筋インスリン抵抗性に対する高脂肪食と身体活動量の作用、ポスター、2009. 9. 19

・田村 好史、櫻井 裕子、笈 佐織、池田 真一、佐賀 典生、小倉 裕司、内藤 久士、綿田 裕孝、河盛 隆造：第 64 回日本体力医学会、ヒトにおける高脂肪食負荷が、骨格筋細胞内脂質蓄積とインスリン抵抗性発症に与える影響とその規定因子、口頭、2009. 9. 18

・櫻井裕子、田村好史、竹野景海、熊代尚記、池田真一、笈佐織、綿田裕孝、河盛隆造：ヒトにおける高脂肪食負荷が、骨格筋細胞内脂質蓄積とインスリン抵抗性発症に与える影響とその規定因子、第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 大阪府大阪市(日本)、2009, p. S-161

・田村好史、櫻井裕子、竹野景海、熊代尚記、池田真一、笈佐織、綿田裕孝、河盛隆造：ヒトにおける高脂肪食負荷が、骨格筋細胞内脂質蓄積とインスリン抵抗性発症に与える影響とその規定因子。第 59 回日本体質医学会総会 東京都千代田区(日本)、日本体質医学会、2009

・Sakurai Y, Tamura Y, Takeno K, Kumashiro N, Sato F, Ikeda S, Kakehi S, Katamoto S, Naito H, Saga N, Ogura Y, Hirose T, Fujitani Y, Watada H: Susceptible Factors for Intramyocellular Lipid Accumulation by Dietary Fat Loading in Non-Obese Men. American Diabetes Association 70th Scientific sessions. 2010 Orlando

- Tamura Y, Sakurai Y, Takeno K, Kumashiro N, **Ikeda S**, Kakehi S, Watada H, Kawamori R: Effects of high fat diet on intramyocellular lipid and insulin resistance. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan, 2009
- Sakurai Y, Tamura Y, Takeno K, Kumashiro N, **Ikeda S**, Kakehi S, Watada H, Kawamori R: Effects of high fat diet on intramyocellular lipid and insulin resistance. The First Asia-Pacific Conference on Health Promotion and Education, Chiba, Japan, 2009
- Tamura Y, Sakurai Y, Takeno K, Kakehi S, **Ikeda S**, Sato F, Hirose T, Watada H, Kawamori R.: Diabetes and Exercise: Intramyocellular Lipid Accumulation and Insulin Sensitivity. In *The 15th Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus Jeju* (Korea), 2009, p. 84-85

[図書] (計 2 件)

- 生化学若い研究者の会 (共著)、光るクラゲがノーベル賞をとった理由、日本評論者
- **池田真一**、田村好史、綿田裕孝、肝インスリン抵抗性発症における PGC-1 α の意義、科学評論者

[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)
 順天堂大学・医学研究科・PD
 研究者番号：50534898