

令和 3 年 4 月 18 日現在

機関番号：32610  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K10856  
研究課題名(和文) 糖尿病による動脈硬化亢進機構と運動効果：マクロファージのインスリンシグナルの役割  
研究課題名(英文) Effects of exercise on atherosclerosis progression by diabetes: a possible role for macrophage insulin receptor  
研究代表者  
白土 健 (Shirato, Ken)  
杏林大学・医学部・学内講師  
研究者番号：60559384  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：初年度は、動脈硬化に対する高インスリン血症の増悪作用のメカニズムを明らかにするため、マクロファージのインスリン受容体シグナル伝達系と脂質代謝調節機構のクロストークを解析したが、少なくともマウス腹腔滲出マクロファージでは両者の間には明確な関係性がなかった。そのため、次年度以降は、運動の抗炎症効果のメカニズムを明らかにするため、マクロファージのインスリン受容体シグナル伝達系と抗炎症性M2型フェノタイプ極性化のクロストークに対する習慣的運動の効果を解析し、インターロイキン-4によるマウス腹腔滲出マクロファージのM2型フェノタイプ極性化に対するインスリンの増強作用を運動が促進することを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、メタボリックシンドロームの予防と改善において重要な役割を果たしているマクロファージの抗炎症性M2型フェノタイプへの分化誘導に対して、インスリン刺激が増強効果を及ぼし、この増強効果を習慣的運動が促進することを明らかにした点にある。その社会的意義は、生活習慣病に対する運動の予防効果の科学的根拠の一端を明らかにすることで、運動の健康増進における有用性を立証した点にある。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism underlying atherosclerosis progression by hyperinsulinemia, we analyzed the crosstalk between insulin receptor signaling and regulatory machinery of lipid metabolism in macrophages. However, no association was observed at least in murine peritoneal exudate macrophages. Therefore, to clarify the mechanism underlying the anti-inflammatory effects of exercise, we next analyzed the effects of habitual exercise on the crosstalk between insulin receptor signaling and anti-inflammatory M2-type phenotypic polarization in macrophages. It was found that exercise promotes the enhancing effects of insulin on interleukin-4-induced M2-type phenotypic polarization of murine peritoneal exudate macrophages.

研究分野：衛生学

キーワード：マクロファージ インスリン受容体 インスリン 脂肪滴 M2型マクロファージ シグナル伝達 習慣的運動 マウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では、運動不足による内臓脂肪性肥満と、それに伴う2型糖尿病の有病率が増加の一途を辿っている。厚生労働省の平成28年国民健康・栄養調査により、糖尿病の有病者と予備群の人口はいずれも1,000万人を超え、それぞれ成人人口の12%以上を占めていることがわかった。2型糖尿病は、致死率の高い虚血性心疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の発症リスクを高める。さらに、動脈硬化性疾患は身体・精神障害などの後遺症を残すため、患者のQOLを著しく低下させる。しかし、2型糖尿病を完治するための治療法は未だ確立されておらず、患者の寿命とQOLを維持・増進させるためには、動脈硬化性疾患の発症リスク増加の原因究明と、その科学的根拠を基にした予防法の確立が喫緊の課題となっている。

動脈硬化の発症には、本来は病原性微生物の貪食と分解を担う免疫細胞であるマクロファージが、血管内壁において酸化低密度リポタンパク質(ox-LDL)を取込み、脂質を蓄積して形成される泡沫細胞が深く関わっている。マクロファージは、CD36を始めとするスカベンジャー受容体を介して血中のox-LDLや脂肪酸を取込み、細胞内で遊離したコレステロールは、脂肪酸とエステル結合してコレステロールエステルとなって脂肪滴内に貯蔵される。従って、マクロファージの脂質の取込みとエステル化を抑制することは動脈硬化の予防に繋がる。

一方、2型糖尿病は、内臓脂肪のインスリン感受性が低下することで高血糖を発症するため、その代償作用として高インスリン血症が引き起こされる。インスリンは骨格筋細胞に作用すると、CD36を細胞質から細胞膜へ移行させて脂質の取込みを促す。加えて、脂肪細胞や肝細胞に作用すると、各種の脂肪酸・コレステロール合成酵素の発現調節を担う転写因子群の発現を高め脂質の合成を促す。しかし、マクロファージの脂質の取込みと合成調節機構に対してインスリンがどのように作用するかは不明である。この問いを明らかにすることは、2型糖尿病による動脈硬化性疾患の発症リスク増加の原因を究明する上で極めて重要である。

有酸素運動は交感神経系を活性化して脂肪分解を促すため、習慣的運動は内臓脂肪性肥満や2型糖尿病の予防・改善に有効であることが広く知られている。また、脂肪分解に伴う血中の中性脂肪やLDLの濃度低下が、虚血性心疾患に対する習慣的運動の予防効果に寄与していると考えられている。さらに、運動には、単に内臓脂肪の分解を促して生活習慣病を予防・改善するだけでなく、骨格筋のインスリン受容体シグナルタンパク質やグルコース輸送担体の発現を増加させることで、インスリン感受性を高める効果も報告されている。しかし、マクロファージのインスリン受容体シグナル伝達系に対する習慣的運動の効果は明らかになっていない。この点を解明することにより、2型糖尿病患者の動脈硬化性疾患の発症予防に対する科学的根拠に基づいた運動処方の確立が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、マクロファージのインスリン受容体シグナル伝達系と脂質代謝調節機構のクロストークに対する習慣的運動の効果を解析することにより、動脈硬化に対する高インスリン血症の増悪作用と運動の予防効果の分子メカニズムを解明し、2型糖尿病患者の動脈硬化性疾患の発症を予防するために有効な運動処方を確立することである。

## 3. 研究の方法

### (1) マクロファージの泡沫化および脂質代謝調節系に対するインスリンの影響の解析

初年度は、マクロファージのインスリン受容体シグナル伝達系と脂質代謝調節機構のクロストークを明らかにするため、8~12週齢雄性C57BL/6Jマウスから採取した腹腔渗出性マクロファージ(peritoneal exudate MΦ: PEMΦ)および腹腔常在性マクロファージ(peritoneal resident MΦ: PRMΦ)を用いて、ox-LDL取込みによる脂肪滴の形成および各種の脂質合成調節因子のタンパク質・リン酸化レベルに対するインスリンの影響を検討した。脂肪滴の形成は、PEMΦまたはPRMΦを50 μg/ml ox-LDLを含む培養液で24時間培養した後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定して、ナイルレッド蛍光染色法で観察した。インスリン受容体シグナル伝達因子および脂質合成調節因子のタンパク質・リン酸化レベルは、PEMΦまたはPRMΦを1~5 nMの生理的濃度のインスリンで1~3時間刺激した後、全タンパク質を抽出して、ウェスタンブロット法で分析した。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: 189, 2018)。

### (2) マクロファージのM2型フェノタイプ極性化に対するインスリンの影響の解析

次年度は、マクロファージのインスリン受容体シグナル伝達系と抗炎症性M2型フェノタイプ極性化のクロストークを明らかにするため、8~12週齢雄性C57BL/6Jマウスから採取したPEMΦを用いて、インターロイキン-4(IL-4)によるM2型マクロファージ分化マーカー遺伝子のmRNA発現誘導および転写因子STAT6のリン酸化と核内移行に対するインスリンの影響を検討した。M2型マクロファージ分化マーカー遺伝子のmRNA発現誘導は、PEMΦを10 nMインスリンで3時間刺激してから10 ng/ml IL-4で9時間刺激した後、RNAを抽出して、リアルタイムRT-PCR法で分析した。STAT6のリン酸化と核内移行は、IL-4刺激30分後に細胞質

および核タンパク質を抽出して、ウェスタンブロット法でそれぞれ分析した。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：189, 2019）。

### （3）インスリンによるマクロファージの M2 型フェノタイプ極性化の増強作用に対する習慣的運動の効果の解析

最終年度は、マクロファージのインスリン受容体シグナル伝達系と抗炎症性 M2 型フェノタイプ極性化のクロストークに対する習慣的運動の効果을明らかにするため、4 週齢雄性 C57BL/6J マウスを対照群と自発運動群に分けて 10 週間飼育した後、採取した PEMΦ を用いて、IL-4 による M2 型マクロファージ分化マーカー遺伝子の mRNA 発現誘導および転写因子 STAT6 のリン酸化と核内移行に対するインスリンの影響を検討した。M2 型マクロファージ分化マーカー遺伝子の mRNA 発現誘導は、PEMΦ を 10 nM インスリンで 3 時間刺激してから 10 ng/ml IL-4 で 6 時間刺激した後、RNA を抽出して、リアルタイム RT-PCR 法で分析した。STAT6 のリン酸化と核内移行は、IL-4 刺激 30 分後に細胞質および核タンパク質を抽出して、ウェスタンブロット法でそれぞれ分析した。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：189, 2020）。

## 4. 研究成果

### （1）マクロファージの泡沫化および脂質代謝調節系に対するインスリンの影響

PEMΦ は ox-LDL を溶解した培養液で培養しても、脂肪滴の形成そのものが引き起こされなかった。さらに、PEMΦ はインスリン刺激に反応して Akt のリン酸化が亢進したが、それに伴う脂肪滴の形成も認められなかった。一方、PRMΦ は ox-LDL を溶解した培養液で培養すると、脂肪滴の形成が引き起こされた。PRMΦ もインスリンに反応して Akt のリン酸化が亢進したが、インスリン単独刺激では脂肪滴の形成は認められなかった。Akt によって活性化され、遊離脂肪酸と遊離コレステロールの各合成酵素の発現をそれぞれ調節する働きをもつ転写因子ステロイド調節配列結合タンパク質（SREBP）のアイソフォーム 1 と 2 のタンパク質レベルは、インスリン刺激による変化を示さなかったが、Akt によってリン酸化され、脂質の de novo 合成を触媒する ATP クエン酸シターゼ（ACLY）のリン酸化レベルは、インスリン刺激によって有意に増加した。しかし、ox-LDL の取込みによる脂肪滴の形成に対してインスリン刺激は増強作用を及ぼさなかった。以上の結果から、PEMΦ は ox-LDL 取込みやインスリン刺激による脂肪滴の形成そのものが起こらず、PRMΦ は ox-LDL 取込みによる脂肪滴の形成が引き起こされるが、インスリンによる増強作用が認められないことから、少なくとも腹腔マクロファージではインスリン受容体シグナル伝達系と脂質代謝調節機構との間には明確な関係性がないことが示唆された。

### （2）マクロファージの M2 型フェノタイプ極性化に対するインスリンの影響

IL-4 による PEMΦ の Arg1、Mgl2、Retnla の mRNA 発現誘導は、インスリン刺激によって有意に増強された。さらに、この増強作用は、STAT6 阻害剤によってほぼ消失したことから、インスリンは STAT6 の転写活性を促進していると推定される。一方、インスリン刺激によって、IL-4 による STAT6 のリン酸化亢進は影響を受けなかったが、その核内移行は増強された。以上の結果から、PEMΦ はインスリン刺激に反応して、IL-4 による抗炎症性 M2 型フェノタイプへの分化誘導が増強され、そのメカニズムには STAT6 の核内移行の促進が関与していることが示唆された。

### （3）インスリンによるマクロファージの M2 型フェノタイプ極性化の増強作用に対する習慣的運動の効果

IL-4 による PEMΦ の Arg1 および Mgl2 の mRNA 発現誘導に対するインスリンの増強作用は、自発運動群の方が対照群よりも有意に大きかった。IL-4 による STAT6 のリン酸化亢進に対しては、両群共にインスリンによる増強作用が認められなかった。さらに、IL-4 による STAT6 の核内移行に対するインスリンの増強作用も両群間で差がなかった。インスリンは STAT6 の核内移行を増強し、習慣的運動は STAT6 の転写活性を促進させると推察される。一方、インスリンによる Akt のリン酸化亢進は両群共に同程度引き起こされたことから、特に自発運動群で強く認められた M2 型マクロファージ分化マーカー遺伝子の mRNA 発現誘導に対するインスリンの増強作用には、Akt を介さないシグナル伝達が関与していると推定される。以上の結果から、習慣的運動は、抗炎症性 M2 型フェノタイプへの分化誘導に対するインスリンの増強作用を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shirato K, Kizaki T	4. 巻 7
2. 論文標題 SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e06187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2021.e06187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 白土 健, 木崎節子	4. 巻 8
2. 論文標題 マクロファージのインスリン受容体の生理・病理的役割：習慣的運動の効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患	6. 最初と最後の頁 105-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 白土 健, 木崎節子	4. 巻 34
2. 論文標題 2型糖尿病におけるマクロファージインスリン受容体の役割：運動とのクロストーク	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 1140-1144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 白土 健, 木崎節子	4. 巻 8
2. 論文標題 マクロファージインスリンシグナルを介した全身性慢性炎症と運動効果の解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患	6. 最初と最後の頁 86-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirato K, Koda T, Takanari J, Sakurai T, Ogasawara J, Imaizumi K, Ohno H, Kizaki T	4. 巻 2018
2. 論文標題 Anti-inflammatory effect of ETAS(R)50 by inhibiting nuclear factor- B p65 nuclear import in ultraviolet-B-irradiated normal human dermal fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 5072986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/5072986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirato K, Koda T, Takanari J, Ogasawara J, Sakurai T, Ohno H, Kizaki T	4. 巻 2018
2. 論文標題 ETAS(R)50 attenuates ultraviolet-B-induced interleukin-6 expression by suppressing Akt phosphorylation in normal human dermal fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 1547120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/1547120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirato K, Takanari J, Koda T, Sakurai T, Ogasawara J, Ohno H, Kizaki T	4. 巻 23
2. 論文標題 A standardized extract of Asparagus officinalis stem prevents reduction in heat shock protein 70 expression in ultraviolet-B-irradiated normal human dermal fibroblasts: an in vitro study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Health and Preventive Medicine	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12199-018-0730-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 白土 健, 木崎節子
2. 発表標題 習慣的運動はインスリンによるM2型マクロファージ極性化の増強を惹起する
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会 (鹿児島市)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白土 健, 木崎節子
2. 発表標題 SARS-CoV-2スパイクタンパク質によるマウスマクロファージの炎症性応答とメカニズム
3. 学会等名 第27回日本免疫毒性学会学術年会(東京)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白土 健, 木崎節子
2. 発表標題 SARS-CoV-2スパイクタンパク質はTLR4シグナルを介してマクロファージを活性化する
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会(富山市)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shirato K, Koda T, Takanari J, Ogasawara J, Sakurai T, Ohno H, Kizaki T
2. 発表標題 ETAS(R) attenuates UV-B irradiation-induced IL-6 expression by suppressing Akt phosphorylation in normal human dermal fibroblasts
3. 学会等名 The 27th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (ICNIM2019) (Sapporo, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白土 健, 木崎節子
2. 発表標題 マクロファージにおけるO-結合型N-アセチルグルコサミン修飾と炎症性応答のクロストークの解析
3. 学会等名 第48回杏林医学会総会(三鷹市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白土 健, 木崎節子
2. 発表標題 マクロファージの炎症性応答におけるヘキソサミン経路の役割
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会 (盛岡市)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shirato K, Takanari J, Koda T, Sakurai T, Ogasawara J, Ohno H, Kizaki T
2. 発表標題 ETAS(R)50 prevents ultraviolet-B irradiation-induced reduction in heat shock protein 70 expression in normal human dermal fibroblasts
3. 学会等名 The 26th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (ICNIM2018) (Sapporo, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白土 健, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子
2. 発表標題 マクロファージToll様受容体シグナル伝達における内因性O-結合型N-アセチルグルコサミンの役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (京都市)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白土 健, 櫻井拓也, 木本紀代子, 大野秀樹, 木崎節子
2. 発表標題 マクロファージの炎症性応答におけるO-結合型N-アセチルグルコサミンの役割
3. 学会等名 第47回杏林医学会総会 (三鷹市)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白土 健, 小宇田智子, 高成 準, 小笠原準悦, 櫻井拓也, 大野秀樹, 木崎節子
2. 発表標題 EASは紫外線による皮膚線維芽細胞のAktリン酸化を抑制してIL-6発現誘導を軽減する
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会 (名古屋市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白土 健, 高成 準, 小宇田智子, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 大野秀樹, 木崎節子
2. 発表標題 紫外線による皮膚線維芽細胞のHSP70発現低下に対するEASの予防効果
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会 (名古屋市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shirato K, Ogasawara J, Sakurai T, Imaizumi K, Ohno H, Kizaki T
2. 発表標題 The role for O-linked N-acetylglucosamine cycling in macrophage Toll-like receptor signaling
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Kobe, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------