

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700842
 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） Macrophages are associated with exercise-induced increase in insulin sensitivity
 研究代表者
 池田 真一（Ikeda Shin-ichi）
 順天堂大学・医学研究科・博士研究員
 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、その分子機序は明らかではない。申請者は運動後の骨格筋には M2 マクロファージと呼ばれる抗炎症性のマクロファージが多数集積していること、マクロファージを枯渇させたマウスでは上記の集積ならびに筋インスリン感受性亢進が起こらないことから、M2 マクロファージが運動による筋インスリン感受性亢進にかかわる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Exercise is a powerful tool to enhance insulin sensitivity in skeletal muscle, however, the precise mechanisms are largely unknown. We hypothesized that macrophages, especially anti-inflammatory M 2 macrophages, are associated with increase in muscle insulin sensitivity after exercise. A single bout of treadmill running increased number of M2 macrophages in skeletal muscle in PBS-ex group. On the other hand, in CL-ex group, number of M2 macrophages were not increased after exercise. Concomitant with change of M2 macrophages, insulin-stimulated 2-DG uptake was increased 24 h after a single bout of exercise in PBS-ex group, however, CL-ex group were not. From these results, we concluded that M2 macrophages are involved in exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：代謝内分泌学

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

運動は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り、臨床現場においても積極的に利用されている。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかではない。メカニズムの一つとして、運動

が筋インスリン感受性を亢進することが考えられており、多くの研究者が運動による筋インスリン感受性亢進メカニズムを明らかにしようと研究を進めているが、いまだ明らかではない部分が多い。

インスリンの効きが悪くなる状態、すなわ

ちインスリン抵抗性において、脂肪組織におけるマクロファージによる炎症がその原因であることが多くの研究から明らかにされつつある。その一方で、炎症を抑制するタイプのマクロファージである M2 マクロファージは、インスリン感受性を正に制御する可能性が考えられている。肥満に伴い、脂肪組織内の M2 マクロファージは減少し、炎症を惹起する M1 マクロファージが増えることが知られており、また、M2 への成熟に必要な転写因子を欠損させたマウスでは筋、肝でのインスリン抵抗性が認められた。

2. 研究の目的

上記の先行研究から、運動による筋インスリン感受性亢進に、マクロファージ、とくに抗炎症性マクロファージである M2 マクロファージが関与していると仮説し、その検証を本研究の第一の目的とし、その関与が確認できた場合、さらに詳細なメカニズムの探索を行う。

3. 研究の方法

C57BL6J マウスを対象に一過性トレッドミル走 (20m/min, 90min) を施し、運動終了 24 時間後に *ex vivo incubation* 法にてインスリン感受性を測定すると、運動による筋インスリン感受性亢進が再現性良く測定できるため、この時間で様々な測定を行うこととした。

運動終了 24 時間後に、下肢筋から凍結切片を作成し、F4/80⁺CD11c⁺細胞 (M1 マクロファージ) の染色、ならびに F4/80⁺CD163⁺細胞 (M2 マクロファージ) の染色を行い、その数をカウントした。

次に、マウスから全身のマクロファージを枯渇させるために clodronate liposome (CL) をマウスに投与し、投与 1 日後に一過性トレッドミル走を施し、その 24 時間後に筋を摘出し、*ex vivo incubation* 法にてインスリン感受性の測定、ならびに M1/M2 マクロファージの染色・カウントを行った。また、CL 投与群、非投与群において、インスリン刺激時における様々なシグナル経路 (インスリンシグナル、MAPK、PKC 等) の変化を Western blotting により検討し、また、運動による筋インスリン感受性亢進にかかわるシグナル経路を探索するために、*ex vivo incubation* 中に様々な阻害剤を培地中に添加し、筋インス

リン感受性亢進が抑制されるものの探索を行った。

さらに、マクロファージの誘因、活性化には様々なサイトカイン、ケモカインが関与することから、一過性トレッドミル走後の筋を継時的に摘出し、運動前後で筋内においてその量が変化するサイトカイン、ケモカインを Milliplex を用いて網羅的に解析した。また、同様のことを血清においても行った。

4. 研究成果

20m/m, 90 分の一過性トレッドミル走により、その 24 時間後の骨格筋において、インスリン感受性の亢進、ならびに F4/80⁺CD163⁺細胞、すなわち M2 マクロファージ数が増加していた。この際、F4/80⁺CD11c⁺細胞、すなわち M1 マクロファージは運動前後において確認されなかった。

CL 投与により、全身のマクロファージを枯渇させたマウスに上記と同様の一過性トレッドミル走を施し、その 24 時間後にインスリン感受性を測定すると、運動による効果が認められず (図 1)、M2 マクロファージの筋への集積も認められなかった。

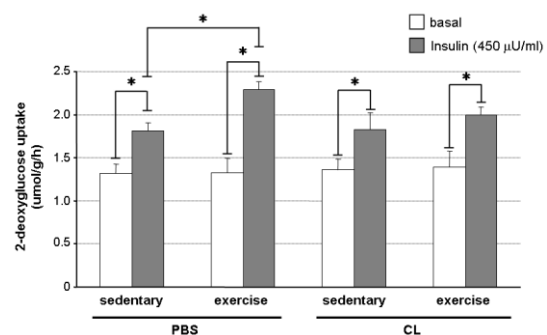


図 1

CL 投与・非投与群のどちらの群においても運動の前後でインスリンシグナルである Akt や AS160 のリン酸化の増強は認められず、また、AMPK のリン酸化レベルにも差は認められなかった (図 2)。さらに、インスリン刺激時の糖輸送体である GLUT4 の発現量に関しては、CL 投与・非投与群のどちらにおいても運動によってその発現量は増加した。これらのことから、運動による筋インスリン感受性亢進には、GLUT4 の発現量や、インスリンシグナル、AMPK シグナルの増強とは異なるメカニズムによって起こっていることが示唆された。

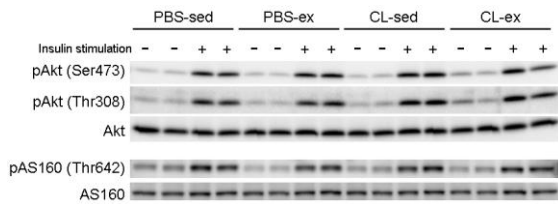


図 2

また、様々な阻害剤を添加した培地を用いて *ex vivo* incubation 法でインスリン刺激時における 2-DG 取り込み量の測定を行った結果、classical PKC の阻害剤である Go6976 により、運動による筋インスリン感受性亢進がキャンセルされた (図 3)。また、classical PKC の中でも β , γ は骨格筋にはほとんど発現しておらず、 α は豊富に発現していたことから、インスリン刺激時における PKC α を介したシグナルが運動による筋インスリン感受性亢進にかかわることが示唆された。

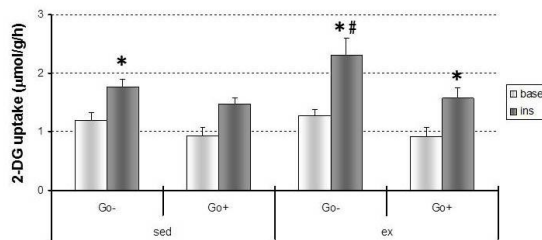


図 3

運動後の筋、ならびに血中におけるサイトカイン・ケモカイン量を網羅的に測定したところ、筋中において、M-CSF, IL-6, IL-10, IL-15, VEGF, MCP-1, KC の増加が認められた。これらのうち、M-CSF と IL-10 に関してはマクロファージの M2 subtype への成熟に関与することが報告されている。そこで、運動後の M-CSF 受容体のリン酸化レベルを検証したところ、運動前後においてそのリン酸化レベルに変化が認められなかったことから、少なくとも M-CSF は運動後の筋内における M2 マクロファージへの成熟への関与しないものと考えられる。また、血中においては IL-6, IL-15, VEGF, MCP-1, KC といったサイトカイン、ケモカイン量が増加しており、この中でも特に IL-6, MCP-1, KC の増加の割合が非常に大きかった。そこで、これらのサイトカイン・ケモカインに対する抗体を一過性運動の 30 分前に尾静脈より投与し、運動終了 24 時間後に *ex vivo* incubation 法にてインスリ

ン刺激時の 2-DG 取り込み量を測定したところ、すべて中和抗体の投与によって運動によるインスリン感受性亢進が抑制された (図 4)。ケモカインである MCP-1, KC の中和によって運動による筋インスリン感受性がキャンセルされたことから、マクロファージなどの面積細胞の誘引が運動後に引き起こされていることが考えられる。

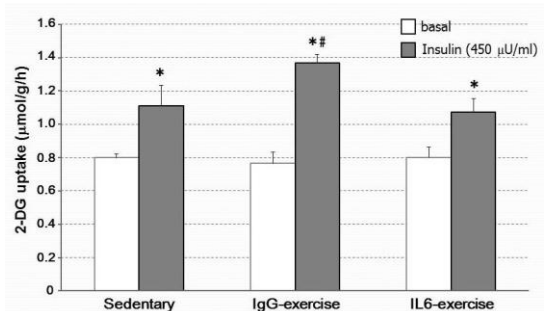


図 4

以上の結果から、運動は骨格筋におけるサイトカイン・ケモカインの産生を増加させ、それにより、筋への M2 マクロファージ集積が増加し、筋インスリン感受性亢進につながっていると考えられる。

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 1 件)

Association of macrophage with exercise-induced enhancement of insulin sensitivity in skeletal muscle, Shin-ichi Ikeda, Yosifumi Tamura and Hirotaka Watada, JPFSM, Vol2, No3, 2013

[学会発表] (計 7 件)

1. 池田 真一、田村 好史、笥 佐織、河盛 隆造、綿田 裕孝：運動後の筋インスリン感受性亢進に関与するサイトカイン等の探索、第 66 回日本体力医学会、2012 年 9 月、ポスター
2. 池田 真一、田村 好史、笥 佐織、河盛 隆造、綿田 裕孝：一過性運動後に認められる筋インスリン感受性亢進にはマクロファージが必須である、第 61 回日本体質医学会、2011 年 10 月、口頭
3. 池田 真一、田村 好史、笥 佐織、河盛 隆造、綿田 裕孝：一過性運動後に

- 認められる筋インスリン感受性亢進にはマクロファージが必須である、第 65 回日本体力医学会, 2011 年 9 月, 口頭
4. 笥 佐織、田村 好史、櫻井裕子、竹野景海、川口美奈子、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, 2011 年 9 月, 口頭
 5. 池田 真一：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 3 回分子骨格筋代謝研究会（招待講演）、2011 年 6 月、口頭
 6. **Shin-ichi Ikeda**, Yoshifumi Tamura, Saori Kakehi et al : Macrophages are necessary for exercise-induced enhancement of insulin sensitivity in skeletal muscle, American Diabetes Association 71st scientific sessions San Diego (US), June, 27, 2011, Poster（査読あり）
 7. Saori Kakehi, Yoshifumi Tamura, Yuko Sakurai, **Shin-ichi Ikeda** et al: Changes in intramyocellular lipid accumulation and Insulin sensitivity after High-Fat Loading are associated with transcriptional response in human skeletal muscle. American Diabetes Association 71st scientific sessions San Diego (US), 2011, Poster（査読あり）

〔図書〕（計 1 件）

インターロイキン 6 は、L 細胞と α 細胞からの GLP-1 分泌を介して、インスリン分泌を増加させる 池田真一、田村好史、綿田裕孝、DIABETES UPDATE, Vol11, No1, 15-16, 2012

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・博士研究員
研究者番号：50534898