

博士論文

論文題目 肥満時の骨格筋における慢性炎症病態の研究

氏 名 杉田 純一

目次

要旨	2
序文	3
方法	17
結果	27
考察	47
引用文献	53
謝辞	63

要旨

骨格筋は、生体内においてインスリン刺激による最大の糖取り込み器官である。肥満の脂肪組織にはマクロファージが集積し、慢性炎症を起こしていることが知られているが、骨格筋で炎症が起きているかは明らかにされていなかった。生体イメージングを用いた解析により肥満マウスの骨格筋では血流障害から低酸素状態が引き起こされ、間質中に活性酸素種の産生が亢進していることが示された。肥満マウスの骨格筋にはM1型のマクロファージが増加しており、CCL2の阻害により浸潤が抑制された。以上から、肥満の骨格筋では低灌流や活性酸素を介した炎症性マクロファージの集積により、慢性炎症過程が増幅されていると考えられた。

序文

2型糖尿病は世界で最も多い慢性の代謝疾患の一つである。生活習慣の変化による身体活動の低下、肥満の増加に伴い患者数は増え続けており、今や2.5億人以上の人が罹患していると言われ、その治療法について研究の重要性が増している（1）。日本において糖尿病が強く疑われる成人は約950万人に上ると報告され、さらに増加傾向にある（2）。肥満は糖尿病の主要な原因であり、脂肪組織の増加、骨格筋における糖の取込みの障害といった末梢組織におけるインスリン抵抗性と深く関わっている（3、4）。肥満に伴う異常により、心血管系疾患や、脳卒中、悪性腫瘍といった他の疾患の罹患リスクも増大する。これらの疾患への効果的な治療は十分にされているとは言えず、肥満や2型糖尿病の病態メカニズムを解明しその効果的な予防法や治療法を開発することは、上記の疾患群の予防のためにも非常に重要である。

肥満に伴う慢性炎症の重要性

現在、肥満に伴う組織の慢性炎症はインスリン感受性の低下の主な原因であると理解されている（5、6）。およそ一世紀前には既に炎症と糖尿病の関係について示唆されていた（7）が、炎症がインスリン抵抗性の発症において重要な役割を果たしていることが証明されたのはつい最近のことである。およそ20年前に炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）の投与により血清グルコース濃度の上昇が観察され、高血糖はサイトカインの過剰産生によって増悪するという報告がされた（8）。最初に肥満により脂肪組織に炎症が起こる

という概念を打ち立てた研究 (9) は、肥満した齧歯類ではTNF- α が上昇しており、TNF- α の中和によりインスリン抵抗性が改善したというものである。炎症の過程とインスリン抵抗性の機序については、TNF- α からIKK- β やNF- κ Bの活性化につながるシグナル経路が肥満及びインスリン抵抗性の状態では活性化されていることが示されている (10、11)。炎症経路の活性化は脂肪 (12、13)、肝臓 (14)、骨格筋 (15、16) といったインスリンの標的組織において観察されており、炎症は全身のインスリン抵抗性の病態に深く関わっていることが示唆されている。

マクロファージは肥満による炎症において中心的な役割を果たす

組織における炎症の原因を明らかにすることになった重要な発見は、肥満マウス及びヒトの脂肪組織には多くのマクロファージが浸潤しているという発見である。この脂肪組織マクロファージは、肥満脂肪組織中の細胞の40%を占める。脂肪組織中のマクロファージと炎症についての関係は広く研究されており、マクロファージが全身のインスリン抵抗性及び耐糖能異常、メタボリックシンドロームや2型糖尿病の発症において重要な役割を果たしていることが示されている (17)。肥満状態において、脂肪組織マクロファージの炎症経路が活性化されており、TNF- α やインターロイキン-1 β (IL-1 β) といった様々なサイトカインが分泌される。これらのサイトカインは局所でパラクリンに作用するか、もしくは、脂肪組織から漏れだし全身に作用し、脂肪細胞、肝細胞、骨格筋細胞といったインスリン標的細胞においてインスリン感受性を低下させる。

脂肪組織は過剰なカロリーの貯蔵場所として機能するだけでなく、脂肪酸やアディポカインを産生して全身に影響を及ぼす。脂肪組織における炎症は脂肪組織からの分泌因子を変化させる。同じ脂肪組織でも内臓脂肪組織と皮下脂肪組織ではその性質が異なることが分かっている。内臓脂肪組織の増大は皮下脂肪組織に比べてインスリン感受性に大きな悪影響を及ぼしている（18）が、皮下脂肪組織の増大はむしろ有益だとさえ報告されている（19）。皮下脂肪組織と比較すると、肥満時に内臓脂肪組織はより多くの炎症性マクロファージを集積し、より多くの炎症性サイトカインを分泌するため、内臓脂肪組織の方が代謝に悪影響を及ぼすと言われている（20）。一方で、皮下脂肪組織がインスリン感受性を促進する物質の分泌源となっているかどうかは明らかではない。内臓脂肪組織と皮下脂肪組織のもう一つの違いは、内臓脂肪組織では分解されて生じる遊離脂肪酸が直接肝臓へ達するのに対して、皮下脂肪組織由来の遊離脂肪酸は末梢循環に入ることである。内臓脂肪組織からの肝臓への遊離脂肪酸輸送は、内臓脂肪組織量が増えるに従って増える（21）。内臓脂肪組織の増加は肝臓におけるインスリン抵抗性の発症に重要である可能性が言われている。

マクロファージが脂肪組織に呼び寄せられることが、肥満によって引き起こされる炎症及びインスリン抵抗性の初期のイベントである。一般的に、過剰な栄養によって脂肪細胞から単球走化性タンパク質-1（MCP-1またはCCL2）といったケモカインや、ロイコトリエンB4（LTB4）のような生理活性物質が分泌され、単球が脂肪組織に引き寄せられ、マクロファージに分化していく。いったん炎症性マクロファージが脂肪組織に浸潤すると、マクロファージ自身がケモカインを産生し、マクロファージをさらに引き寄せるという炎症の循環が形作

られる (22) 。CCL2はマクロファージ上のC-Cケモカイン受容体2 (CCR2) と結合し、マクロファージの遊走を引き起こす。

このように、肥満における慢性炎症は、発赤、発熱、腫脹、疼痛、組織の機能不全を五徴とする古典的な急性炎症とは異なり、過剰な栄養がトリガーとなり、代謝に関わる脂肪細胞の変化によって惹起される。細胞内の代謝シグナルが活性化されることで低レベルの炎症性サイトカイン、ケモカインが誘導され、免疫細胞が浸潤することで組織環境が炎症性に変化し、この炎症状態が慢性的で寛解しないことが特徴である。

マクロファージの亜集団

マクロファージは骨髄由来細胞を特定の成長因子で処理したin vitroの実験から生じた概念を基に分類されている。M1マクロファージ (classically activated macrophages: CAMs) はin vitroにおいて骨髄由来血液細胞を顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) 添加で培養したときに誘導される。M2マクロファージ (alternatively activated macrophages: AAMs) は、骨髄由来細胞顆粒球コロニー刺激因子 (M-CSF) とIL-4添加下で培養したときに誘導される。M1マクロファージは炎症性サイトカインを分泌するのに対して、M2マクロファージは抗炎症性サイトカインを分泌する (23) 。

組織中のマクロファージは局所の環境変化に対して極性を変化させる。In vivoでは、脂肪組織中のマクロファージはM1のような炎症状態からM2のような非炎症状態までの幅広いスペクトラムを持っている。M1、M2様の細胞集団は共にF4/80、CD11bの細胞表面抗原を発現しておりM1様マクロファージはさらに

CD11cを発現している（24、25）。肥満時に、脂肪組織に集積するマクロファージはCD11c陽性のM1型と考えられているのに対して、常在性のマクロファージは非炎症性でCD11c陰性のM2型である。肥満時には、M1型マクロファージは、脂肪組織内で泡沫様の形態をとる（26）。肥満時には、脂肪組織中に呼び寄せられた単球のうち90%以上がCD11c陽性のマクロファージになる。しかし、常在性のM2型のCD11c陰性マクロファージの源は依然として明らかになっていない。非常に稀な頻度で脂肪組織中に入り込み増殖しているか、単球以外の細胞種から増殖している可能性があると言われている（26）。

脂肪組織中のマクロファージの極性がインスリン抵抗性と良く相関することが多くの研究で確かめられている（27、28）。脂肪組織マクロファージの表現型は固定のものではなく、可変のものである。例えば、高脂肪食から普通食に切り替えたり（29）、マウスに ω 3脂肪酸（30）やチアゾリジン薬（31）を投与したりすると、M1型からM2型へと切り替わり、インスリン感受性が増すという報告がされている。これらの研究から、脂肪組織ではM1型マクロファージはインスリン抵抗性を引き起こす炎症性であるのに対して、M2型マクロファージはインスリン感受性の維持及び組織の恒常性の維持に寄与していると考えられる。

インスリン抵抗性における他の免疫細胞の役割

脂肪組織にはマクロファージ以外にも多数の免疫細胞が浸潤しており、インスリン抵抗性に関与していることが明らかにされている。肥満及びインスリン抵抗性の状態においてこれらの免疫細胞が相互に作用し合い制御していると考

えられる。インスリン抵抗性におけるそれぞれの正確な役割はまだ完全には明らかにされていないが、これらの免疫細胞は脂肪組織マクロファージのリクルート、極性、活性化状態を変化させることで効果を発揮し、M1型マクロファージがインスリン抵抗性に影響する最終的なエフェクター細胞と考えられる。

脂肪組織のT細胞は肥満による炎症に関与しており、脂肪組織マクロファージの数や活性化状態に関与している（32）。ヘルパーT細胞はCD4の表面抗原を発現し、炎症性サイトカインを産生するTh1細胞と抗炎症性サイトカインを産生するTh2細胞とに分類される（33）。CD8を細胞表面抗原として発現しているT細胞はエフェクター、もしくは、細胞障害性T細胞と呼ばれ、炎症性サイトカインを分泌する。肥満脂肪組織中ではCD8陽性T細胞が増加し、マクロファージをリクルートし、活性化することが報告されている（34）。

B細胞もまた高脂肪食により肥満したマウスの内蔵脂肪組織に集積する。B細胞のリクルートはT細胞の活性化を引き起こし、マクロファージをM1型の極性にシフトさせ、インスリン抵抗性を引き起こす。また、B細胞は病的なIgG自己抗体を産生し全身的な影響を及ぼす（35）。

骨格筋における炎症

脂肪組織炎症過程と比較すると、他の臓器で炎症病態がどのようにインスリン抵抗性に寄与しているのかはあまり調べられていない。特に、骨格筋はインスリン刺激時の血糖取り込みの70-80%を担っており（36）、骨格筋におけるインスリン抵抗性は肥満及び2型糖尿病における耐糖能や高血糖に大きな影響を与える。

前述のように脂肪組織へのマクロファージ浸潤において重要な因子として CCL2が挙げられる。一方、骨格筋においては、急性傷害モデルでCCL2の発現が増加しマクロファージが集積することが報告されている（37）が、慢性の肥満病態においてCCL2の発現が亢進しているかは明らかではない。

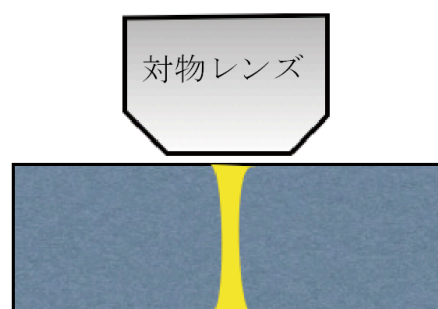
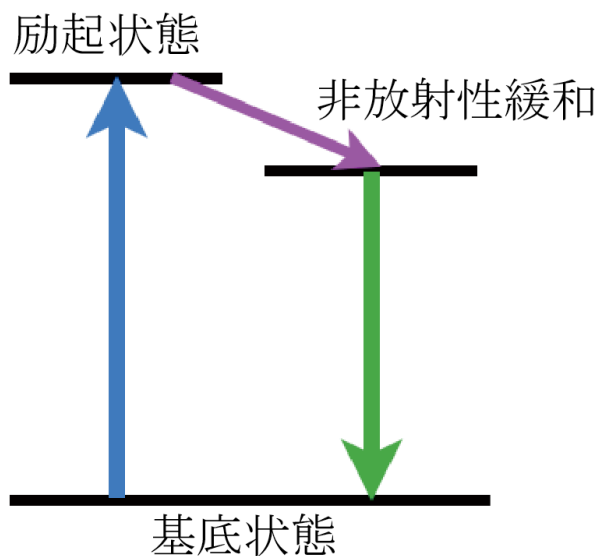
二光子顕微鏡による生体イメージング

二光子顕微鏡の特徴は、二個の光子を蛍光分子に同時に当てることにより励起させる点にある（図1）。通常の共焦点顕微鏡による光子一個対蛍光分子一個による一対一反応に比べて、複数の光子による励起は極めて起こりにくい現象であるが、光子密度を非常に高くすれば非線形的に起こりうる。二光子励起の現象は、顕微鏡光学系の中では光が一点に凝集される焦点のみで起こりうる。1930年頃に二光子の吸収が起こることが理論的に提唱され（38）、1961年に実験的に初めて観測された（39）。この現象を利用して1990年には二光子顕微鏡が開発された（40）。そして、チタンサファイアレーザーが使われるようになって（41）からは実験に際してレーザーを取り扱う専門家を必要としなくなり、一般に広く使われるようになり、二光子顕微鏡は生体組織の低侵襲蛍光顕微鏡のゴールドスタンダードとして認識されるようになった。実際に、高容量の画像データを取り扱うソフトウェア、また、それを解析するソフトウェア、蛍光色素やレポーターマウスといった技術の進歩によって、二光子顕微鏡はより使いやすい機器となっている。

二光子顕微鏡の一番の利点は励起が焦点面のみで起こることである（図1）。観察標本の他の部位には比較的無害な赤外光が照射されるのみである。褪色や

光毒性といった作用が完全に防がれるわけではないが、共焦点顕微鏡と違い、励起は画像を取得している部位でのみしか起こらない。また、焦点平面のみでしか励起が起こらないため、共焦点顕微鏡のようなピンホールは不要で、高い分解能を得ることができる（表 1）。二番目の利点としては、励起に使われる波長が長波長であることである。光の散乱は波長のべき乗に反比例する。赤外光はほとんど散乱・吸収を起こさずに生体組織を通過できるため、二光子顕微鏡では共焦点顕微鏡で観察できる深さよりもさらに深い部位を観察することができる（図 2、3）。

A 一光子励起



B 二光子励起

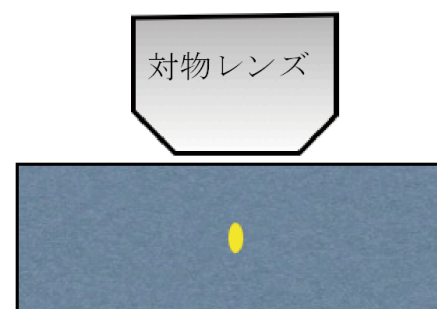
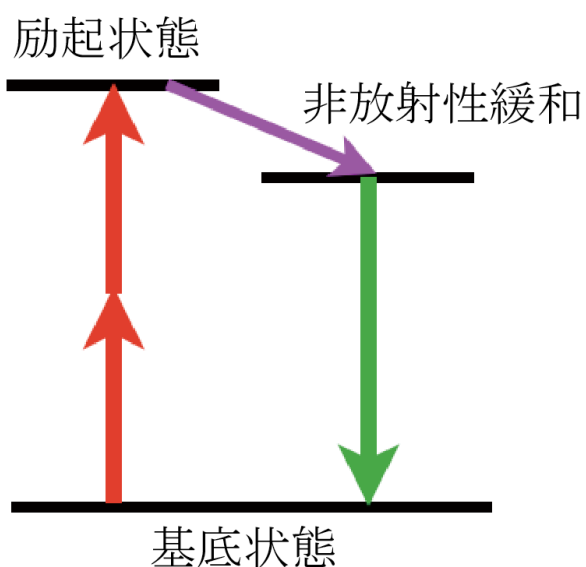


図1 (A) 一光子励起。蛍光分子中の電子が基底状態から励起状態（青色矢印）に励起されたのち、非放射性緩和過程に入り、直ちにエネルギーを失う。次に、励起光よりも長い波長で蛍光が放出され（ストークスシフト）、電子は基底状態に戻る（緑色矢印）。励起は一光子により起こるため、レーザーの光路全体に渡り蛍光が放出される（黄色部分）。(B) 二光子励起。チタンサファイアレーザー中の近赤外二光子が同時に吸収されることで蛍光が励起される（赤色矢印）。光の放出過程は一光子励起と同様である。蛍光の発光効率励起光の平均パワーの2乗に比例しており、蛍光は焦点のみで起こる（黄色部分）。

表 1 共焦点顕微鏡と二光子顕微鏡の違い

	三次元分解能	時間分解能	組織透過性	組織侵襲性
共焦点顕微鏡	ピンホールを用いて $1\mu\text{m}$ 以下の分解能を得る	リゾナントミラーまたはスピニングディスクを使用して 30fps	散乱光のため $100\mu\text{m}$ 以下	励起光の波長が短いため高く、照射される組織全体に及ぶ
二光子顕微鏡	$1\mu\text{m}$ 以下の分解能を得るが共焦点顕微鏡よりわずかに劣る	リゾナントミラーを使用して 30fps	組織によるが数百 μm 程度	励起光の波長が長いため侵襲は少なく焦点面のみ

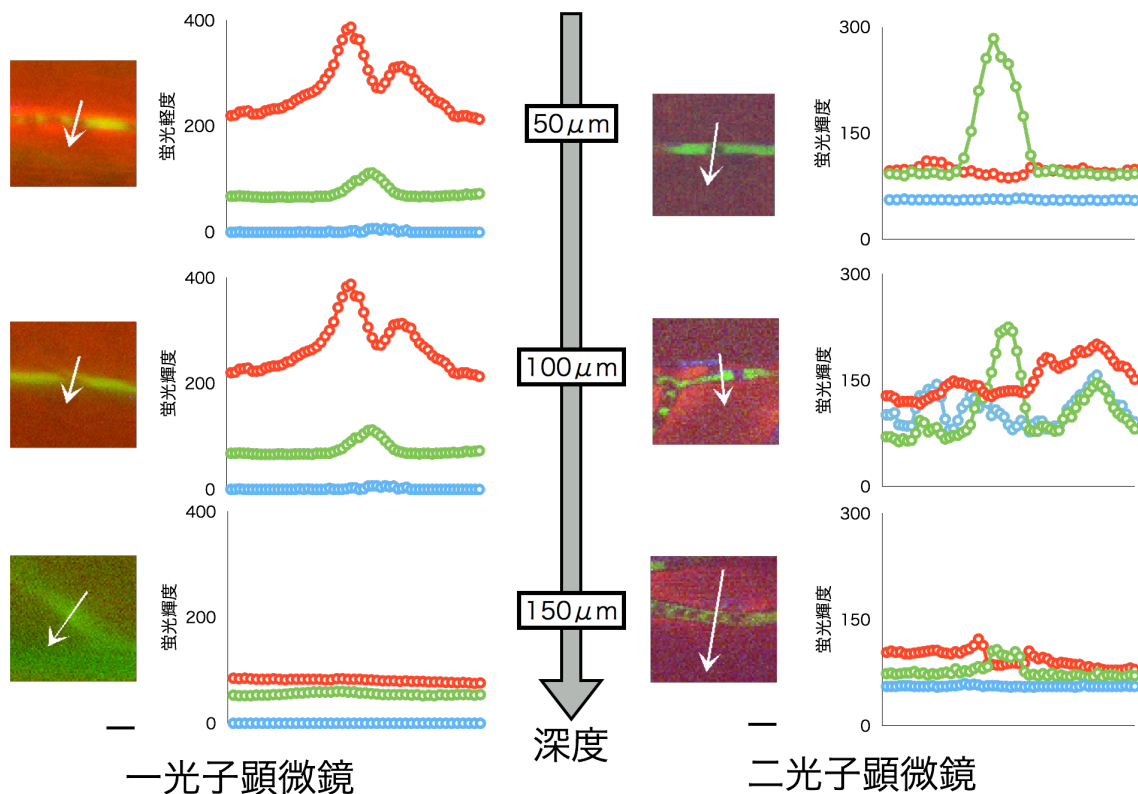


図2 一光子励起顕微鏡及び二光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングの比較。骨格筋表面からの距離を中央に示す。矢印の断面における各色の蛍光強度をグラフに示す。一光子励起顕微鏡では100 μm の深さで血球の境界が不明瞭となるが、二光子励起顕微鏡では150 μm の深さにおいても明瞭に血球の像を捉えることができた。(赤：テトラメチルローダミン、青：ヘキスト33342、緑：FITC-デキストラン、スケールバー：10 μm)

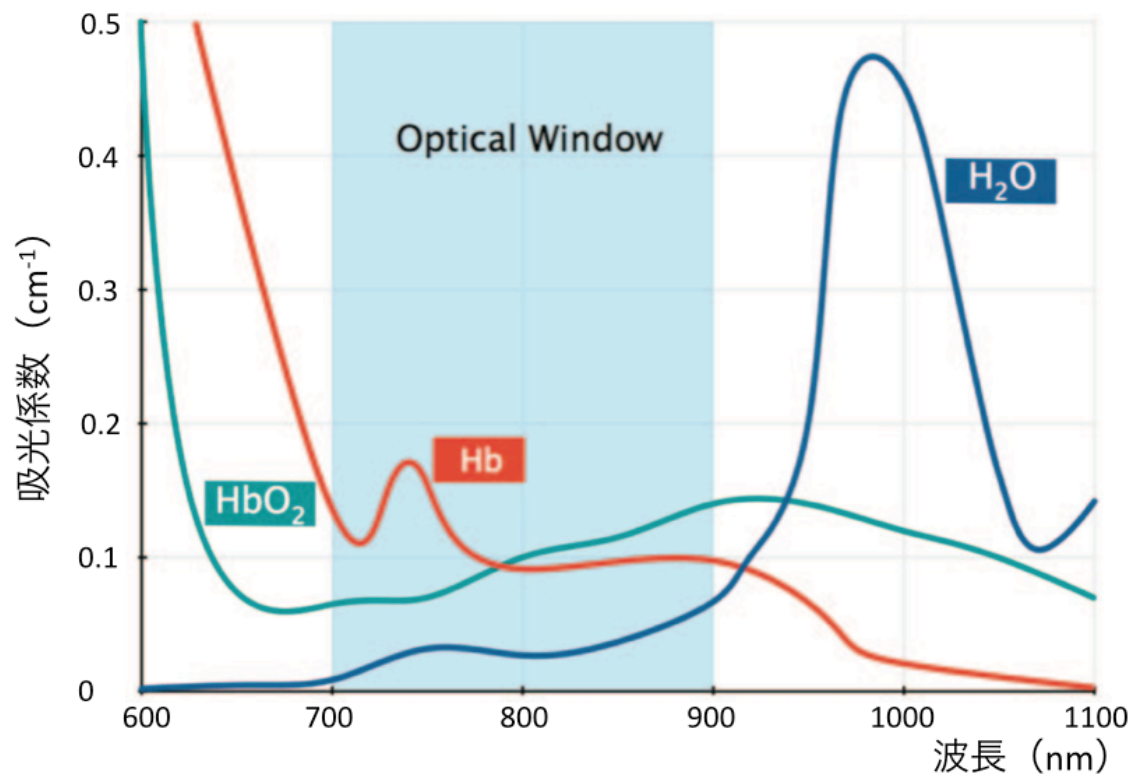


図3 ヘモグロビン (Hb) および水 (H₂O) の光吸収スペクトル。生体組織中ではHbおよびH₂Oが主に光を吸収する。700nmと900nmの間の「光の窓 (Optical Window)」では光子の吸収がほとんど起きない。生体組織はこの波長に対しては光学的に透明であると考えられている。

骨格筋における微小循環

毛細血管床は、ホルモンや生理活性分子、シグナル分子に加えて酸素や基質、代謝物の、血液と組織の間の交換を担うため、非常に大きな表面積を持つ。すべての臓器の微小血管床の中で骨格筋の血管床が最も大きく、特に運動中は、酸素、糖、乳酸、脂肪酸の交換の大部分を担う。

血管床へのアクセスは赤血球と血漿では異なる。微小循環中では赤血球と血漿は血管内皮表面と異なる方法で相互作用しており、異なる速度で移動しているため、全身のヘマトクリットは45%であるのに対して微小循環中のヘマトクリットは15%程度しかない (42)。また、微小血管中で輸送される分子は、赤血球（酸素）と血漿（糖、乳酸、インスリン）では異なる。

骨格筋における毛細血管の制御機構を発見し、1920年にノーベル賞を受賞したクロークは、

- ・骨格筋内の酸素分圧は血管から離れるのに従い下がる
- ・安静時の骨格筋では、ほとんどの血管に赤血球の流れはなく、収縮しているか虚脱している
- ・収縮時に増加する代謝要求に応え、血管から骨格筋内への酸素の拡散距離を減らすため、多くの血管がリクルートされ、赤血球の流れを作り出すことを提唱した (43、44)。クロークは、死後数日経過した骨格筋の血管を墨汁で還流することで流れのある血管の数を評価した。このとき、墨汁が漏れないように複数の血管を縛っており、生理的条件下よりも強い圧がかかっている。墨汁は還流を弱くすると詰まりやすく、還流を強くすると血管のリクルートメントに関わらず流れやすくなり、実験条件に左右されることが問題点であった。

その後、様々な方法で骨格筋の血流について研究が行われており、1-メチルキサンチン（1-MX）を使った測定（45）、コントラストエコーによる測定（46）が行われている。1-MXは毛細血管上のキサンチンオキシダーゼによって代謝される。骨格筋を還流し動静脈の1-MXの代謝を見ることで血流量を評価することができる。コントラストエコーは、不活性ガスのマイクロバブルを静脈注射することで反響シグナルを得る方法で、マイクロバブルは赤血球より小さいため血流に影響を与えない。

二光子顕微鏡による生体イメージングでは、in vivoで骨格筋内の血流、すなわち、赤血球の流れを三次元的に高い空間時間分解能で解析することが可能である。これまでに、骨格筋血流を二光子顕微鏡によるイメージングで解析した報告はない。

これまでの生体イメージングでは、肥満マウスの脂肪組織の微小循環において白血球、血管内皮細胞、血小板の相互作用が亢進していることが明らかにされ、内臓脂肪組織における炎症プロセスが解析されている（47）。

本研究では、二光子顕微鏡による生体観察およびサイトメトリー技術を用いて、肥満マウス骨格筋における慢性炎症病態について検討した。特に、炎症により免疫細胞が骨格筋に集積する機序について検討した。

方法

マウス

4週齢のC57BL/6Jマウスを日本クレア株式会社より購入し、普通食（6%脂肪分、オリエンタル酵母工業）、または、高脂肪食（32%脂肪分）を自由に摂取できる環境で12時間毎の明暗周期下で飼育した。雄のマウスを実験に使用した。全ての実験は動物実験委員会の承認（医-P13-038）を受け、東京大学の動物実験ガイドラインを遵守して行った。

インスリン負荷試験、ブドウ糖負荷試験

インスリン負荷試験では3.5時間の絶食の後1U/kgのインスリンを腹腔内投与し、0、20、40、60、80、100、120分後の血糖を測定した。ブドウ糖負荷試験では16時間の絶食の後2g/kgのブドウ糖を腹腔内投与し、0、20、40、60、80、100、120分後の血糖を測定し、血糖曲線下面積（area under the curve : AUC）で評価した。

フローサイトメトリーによる免疫細胞の解析

マウスにウレタン（1.5g/kg）を腹腔内投与し十分に麻酔を効かせた後、開胸し大動脈及び肺動脈を切断し胸腔内の血液を回収した。脾臓は切り出した後、PBSを加えて細胞を回収した。また、大腿四頭筋、皮下脂肪組織、精巣上体脂肪組織を切り出し、ハサミで細かく切り刻んだ後、ヘパリンを加えて遠心して血球細胞を取り除いた。その後、コラゲナーゼ（Worthington, CLS-2,

LS004176) を加えて37℃で、30分間インキュベートした。10%ウシ胎児血清、50unit/mLペニシリン、50 μ g/mLストレプトマイシン添加Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を加え、70 μ mのセルストレーナーを用いて粗大な細胞塊を取り除いた。赤血球は溶血剤 (BD PharmLyse, 555899) を加えて取り除いた。抗CD16/CD32抗体を用いてブロッキングを行った後、抗体を加え、4℃で40分間反応させた。用いた抗体は次の通りである。

抗CD3e抗体 (145-2C11, BD Pharmingen)、抗CD4抗体 (RM4-5, eBioscience)、抗CD8a抗体 (53-6.7, BD Pharmingen)、抗CD11b抗体 (M1/70, eBioscience)、抗CD11c抗体 (HL3, BD Pharmingen)、抗CD19抗体 (6D5, BioLegend)、抗CD31抗体 (390, eBioscience)、抗CD45抗体 (30-F11, BioLegend)、抗CD45R抗体 (RA3-6B2, BioLegend)、抗MGL抗体 (ER-MP23, Serotec)、抗F4/80抗体 (BM8, Caltag)、抗Ly6C抗体 (AL-21, BD Pharmingen)、抗Ly6G抗体 (1A8, BioLegend)、抗IFN- γ 抗体 (XMGI.2, BD Pharmingen)、抗TNF- α 抗体 (MP6-XT22, BioLegend)、抗IL-1 β 抗体 (NJTEN3, eBioscience)。

細胞内サイトカインはCytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution kit (BD Pharmingen) を使用して解析した。IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β を染色する前に、マクロファージの細胞表面マーカー (F4/80-Alexa488、CD11b-RPE、CD11c-APC-Cy7) を染色し、室温で1x Cytofix solutionにより細胞を20分間固定した。0.1%のTriton X-100 (648464, Calbiochem) を添加した1x Cytoperm solution中に10分間細胞を懸濁することで細胞の透過性を高めてから、再度Cytofixにて10分間固定した。次に、IFN- γ -PB、TNF- α -PE-Cy7、IL-1 β -PE-Cy7により氷上で40分間染色した。

FACSCanto™ IIを用いてデータを取得し、FlowJo (Treestar) にて解析を行った。それぞれの細胞数は生細胞に対しての割合で評価した。

C2C12細胞の培養

マウス骨格筋由来の筋芽細胞株であるC2C12筋芽細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) を10cmディッシュに900cells/cm²の密度で播種し、10%FBS、1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液及び3mMのl-glutamineを添加したDMEM (4500mg/dL) 中で培養した。37℃、5%CO₂下のインキュベーターで維持した。コンフルエントに達した時点で、培養液を2%のウマ血清添加のDMEM (4500mg/dL) から成る分化培養液に替え、分化7-10日後に実験に使用した。

C2C12細胞と腹腔滲出性マクロファージの共培養

4%チオグリコレート2mLをマウスへ腹腔内投与し3-4日後にマウスを頸椎脱臼した。70%エタノールでマウスを消毒した後、4℃に冷やした1.2%FBS入りPBSを腹部に注入し、腹腔内細胞を回収した。回収した細胞をC2C12細胞との割合が1:1になるように5.0x10⁵/wellの割合でトランズウェル (Sigma) のインサート上に播種した。腹腔滲出性マクロファージは0.4 μm径の孔を持つポリカーボネート製のインサート上で、C2C12分化細胞は下のウェルで培養した。

2-NBDGによる糖取り込み能の評価

C2C12細胞糖取り込み能の評価は蛍光性のD-グルコース類似体である2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG、和光純薬工業)を用いて測定した。6ウェル上のC2C12細胞に100nMのインスリン及び60 μ Mの2-NBDGを加え1時間培養した。その後、細胞を冷PBSにより2回洗浄し、トリプシン処理を行って細胞を剥がしてバッファー (3%FBS添加PBS) に懸濁した。蛍光強度はフローサイトメトリーのFITCチャンネルにより計測した。

定量PCR

骨格筋組織は、TRIzol (Invitrogen) にて溶解した後、フェノール・クロロホルム抽出法によってtotal RNAを抽出した。培養細胞は、培養皿から培養上清を除去した後RLTバッファーを加えてセルスクレーパーを用いて細胞を回収し、RNeasy kitを用いてマニュアル通りにtotal RNAを精製した。total RNAをDNase I にて処理した後、SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いてcDNAに逆転写した後、FastStart SYBR Green Master (Roche) を用いて定量PCRを行った。用いたプライマーは以下の通りである。

Cc12 forward : GAAGGAATGGGTCCAGACAT

Cc12 reverse : ACGGGTCAACTTCACATTCA

Cc14 forward : CTCCCACTTCCTGCTGTTTC

Cc14 reverse : GAGGAGGCCTCTCCTGAAGT

Cc15 forward : ATATGGCTCGGACACCACTC

Cc15 reverse : CCACTTCTTCTCTGGGTTGG

Cc17 forward : AAGATCCCCAAGAGGAATCTCAAG

Ccl17 reverse : CAGACTTCCATGCCCTTCTTTG

Ccl18 forward : GGGTGCTGAAAAGCTACGAG

Ccl18 reverse : TTCCAGCTTTGGCTGTCTCT

Tnfa forward : CAACCTCCTCTCTGCCGTCAA

Tnfa reverse : TGA CTCCAAAGTAGACCTGCCC

Vegfa forward : CTTTTCGTCCAACTTCTGGGC

Vegfa reverse : ATCGGTTTGTCTCCTGCGG

IP-10 forward : AAGTGCTGCCGTCATTTTCT

IP-10 reverse : CATTCTTTTTCATCGTGGCA

IL-6 forward : CAAGTCGGAGGCTTAATTACACATG

IL-6 reverse : ATTGCCATTGCACAACTCTTTTCT

IL-10 forward : CTGGACAACATACTGCTAACCG

IL-10 reverse : GGGCATCACTTCTACCAGGTAA

Nox1 forward : GGGATGACCATAAGGGGAGT

Nox1 reverse : CACTCCAGGAAGGAAATGGA

Nox4 forward : GGATCACAGAAGGTCCCTAGCAG

Nox4 reverse : GCGGCTACATGCACACCTGAGAA

Cybb forward : CCCTTTGGTACAGCCAGTGAAGAT

Cybb reverse : CAATCCCGGCTCCCACTAACATCA

Actb forward : CCTCCCTGGAGAAGAGCTATG

Actb reverse : TTACGGATGTCAACGTCACAC

内因性コントロールとして β -actin を使用し、 $\Delta\Delta$ Ct法によりサンプル間の mRNA の発現を比較した。PCR は ABI7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて行った。

抗CCL2抗体の投与

免疫細胞のリクルートに対する CCL2 の寄与を検討するため、マウスに抗 CCL2 抗体 (clone 2H5, BioLegend)、コントロールとして IgG アイソタイプ (BioLegend) を腹腔内投与した。Day0 に 200 μ g/body、Day2 に 100 μ g/body、Day4 に 100 μ g/body 投与し、Day5 にフローサイトメトリーによる解析を行った。

二光子顕微鏡によるマウス骨格筋の微小循環の観察

骨格筋の微小循環を観察するため、二光子顕微鏡による生体イメージングを行った (図 4)。C57BL/6J マウスにウレタン (1g/kg) を腹腔内投与し麻酔を十分に効かせた後、骨格筋組織を傷つけないように注意しながら後肢の皮膚を切開、骨格筋を露出させ、倒立顕微鏡上の 37°C に保たれたヒーティングパッドにマウスを置き、観察を行った。FITC デキストラン (5mg/kg)、ヘキスト 33342 (10mg/kg)、テトラメチルローダミン (5mg/kg) をマウスの尾静脈より静注することで、各臓器を観察することができた (図 5)。本研究では大腿四頭筋の微小循環内の細胞動態及び血流を可視化し、普通食マウスと高脂肪食負荷肥満マウスで比較を行った。

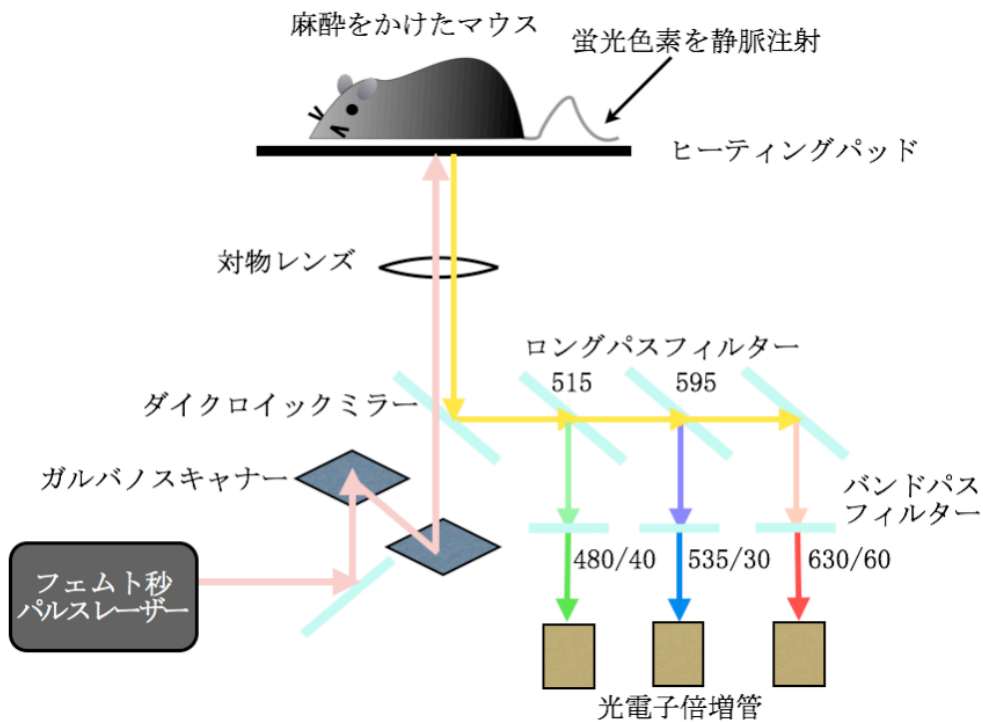
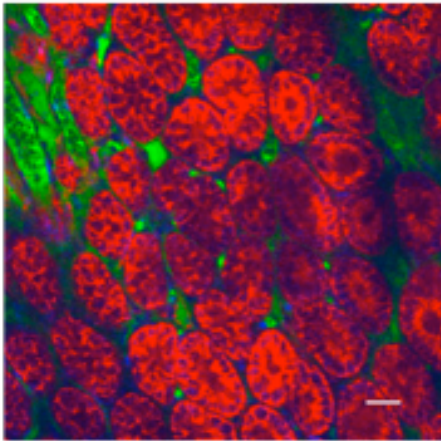
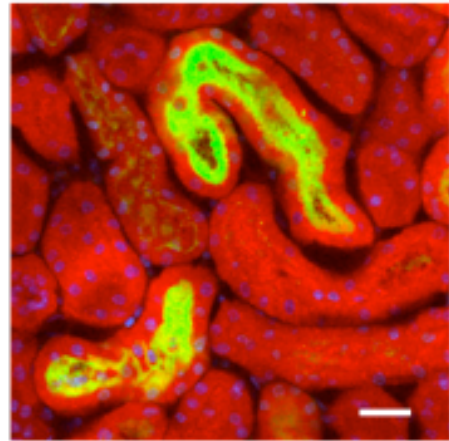


図4 二光子顕微鏡によるマウス観察の模式図。マウスに蛍光色素を静脈注射し麻酔する。骨格筋を観察するための観察窓を設け、体温を下げないようにヒーティングパッドの上に静置する。近赤外光のパルスレーザーでマウス組織中の蛍光色素を励起する。得られた蛍光はロングパスフィルター及びバンドパスフィルターにより光電子倍增管へ分光される。光源にはフェムト秒パルス近赤外線レーザーが使用され、 10^{-15} 秒という極短時間にエネルギーを圧縮することで、高い光子密度を得ている。

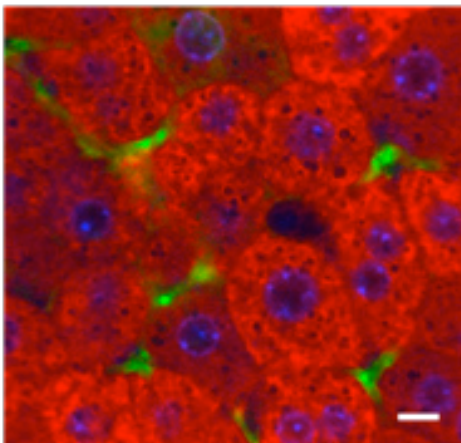
A



B



C



D

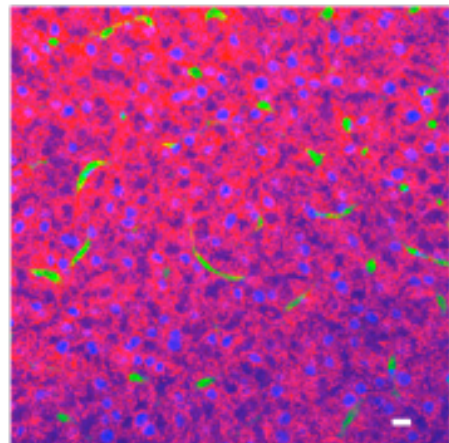


図5 二光子顕微鏡によるイメージングの例。小腸 (A)、腎臓 (B)、肝臓 (C)、脾臓 (D)。(赤：テトラメチルローダミン、緑：FITC-デキストラン、青：ヘキスト33342、スケールバー10 μ m)

血管透過性の定量化

骨格筋微小循環の血管透過性を評価するため、FITCデキストラン（分子量4k, 10k, 20k, 70k, 150kダルトン）を尾静脈より静注し、10分後に大腿四頭筋内の微小循環の画像を取得した。NIS-Elements（Nikon）を用いて画像の解析を行い、間質と血管内腔の蛍光強度の比を計算し、蛍光色素の漏出の程度を評価した。 $\text{（間質の蛍光強度）} / \text{（血管内腔の蛍光強度）}$ を血管透過性として定義した。

骨格筋間質中の活性酸素種の評価

骨格筋中の活性酸素種の産生を評価するためジクロロフルオレセインジアセテート（DCFDA、Molecular Probes、30mg/kg）をマウスの尾静脈より静注し、10分後に大腿四頭筋を観察した。テキサスレッドデキストラン（5mg/kg）によって血管内腔を、ヘキスト33342により核を描出した。DCFDAは励起光により蛍光が増大してしまうため、観察範囲を決める際には低出力のレーザーを用い、画像取得時にはレーザー強度を最大にして照射した直後の画像を解析に用いた。DCFDAの蛍光強度を活性酸素種の産生の程度として評価した。

骨格筋中の低酸素の検出

骨格筋中の低酸素状態を評価するため、低酸素プローブLOX-1（SCIVAX Corp.）を用いた。LOX-1は低酸素状態になると赤色のリン光を発する。マウスの尾静脈より10mg/kgのLOX-1を静注し、870nmの波長で励起し画像を取得した。同時に血流をFITCデキストラン、核をヘキスト33342により染色した。

統計学的解析

全てのデータは平均±標準誤差（mean ± SEM）で示した。2群間の比較はStudentのt検定を用いた。経時的データ及び3群間以上の統計解析はBonferroni法による多重比較により行った。全ての検定においてp値<0.05を統計学的に有意であるとした。

結果

高脂肪食負荷マウスの骨格筋微小循環は障害され炎症を引き起こす

C57BL/6Jマウスを4週齢より普通食（ND）群と高脂肪食（HFD）群に分けた。高脂肪食を10週投与した時点で耐糖能障害、インスリン抵抗性を呈していることを確認した（図6、ND群、HFD群共にn=5）。

次に、二光子顕微鏡を用いた生体イメージングを行った。ウレタンを腹腔内投与してマウスを麻酔した後、蛍光色素を尾静脈より静注し、骨格筋における微小循環を観察した（図7）。10 μ m以下の微小血管の赤血球速度を観察したところ、赤血球速度はHFD群の骨格筋微小循環で低下しており、（図8、P<0.01、ND群、HFD群共にn=5）、HFD群の骨格筋は低酸素状態にあることが示唆された。

HFD群マウスの骨格筋が低酸素状態であることを確認するため、低酸素プローブであるLOX-1を用いて生体イメージングを行った（図9、ND群、HFD群共にn=3）。HFD群マウスでは、骨格筋血流と一致してLOX-1のリン光が認められ、低酸素状態にあることが示された。

さらに、炎症を惹起する原因として、低酸素ストレスにより骨格筋中の活性酸素産生が亢進しているかを調べるため、活性酸素種インジケーターであるDCFDAを投与することで、マウス骨格筋間質中の活性酸素種を評価した（図10、ND群、HFD群共にn=7）。DCFDAは活性酸素種存在下で517-527nmの波長の緑色の蛍光を発する。HFD群マウスの骨格筋間質中の蛍光強度が有意に増強していることが確認された（図10、P<0.05）。

HFD群マウスの骨格筋が低酸素状態にあり活性酸素の産生が亢進していることから、微小循環の血管透過性に影響を与えているかを調べるため、分子量の

異なるFITC-デキストラン（4k、10k、20k、70k、150kダルトン）を用いて骨格筋微小循環の血管透過性を評価した。HFD群マウスの骨格筋では20k、70k、150kダルトンのFITC-デキストランを投与した時に有意に血管透過性の亢進が認められ（図11、各分子量のND群、HFD群共にn=5）、HFD群マウスの骨格筋では炎症が引き起こされていることが示唆された。

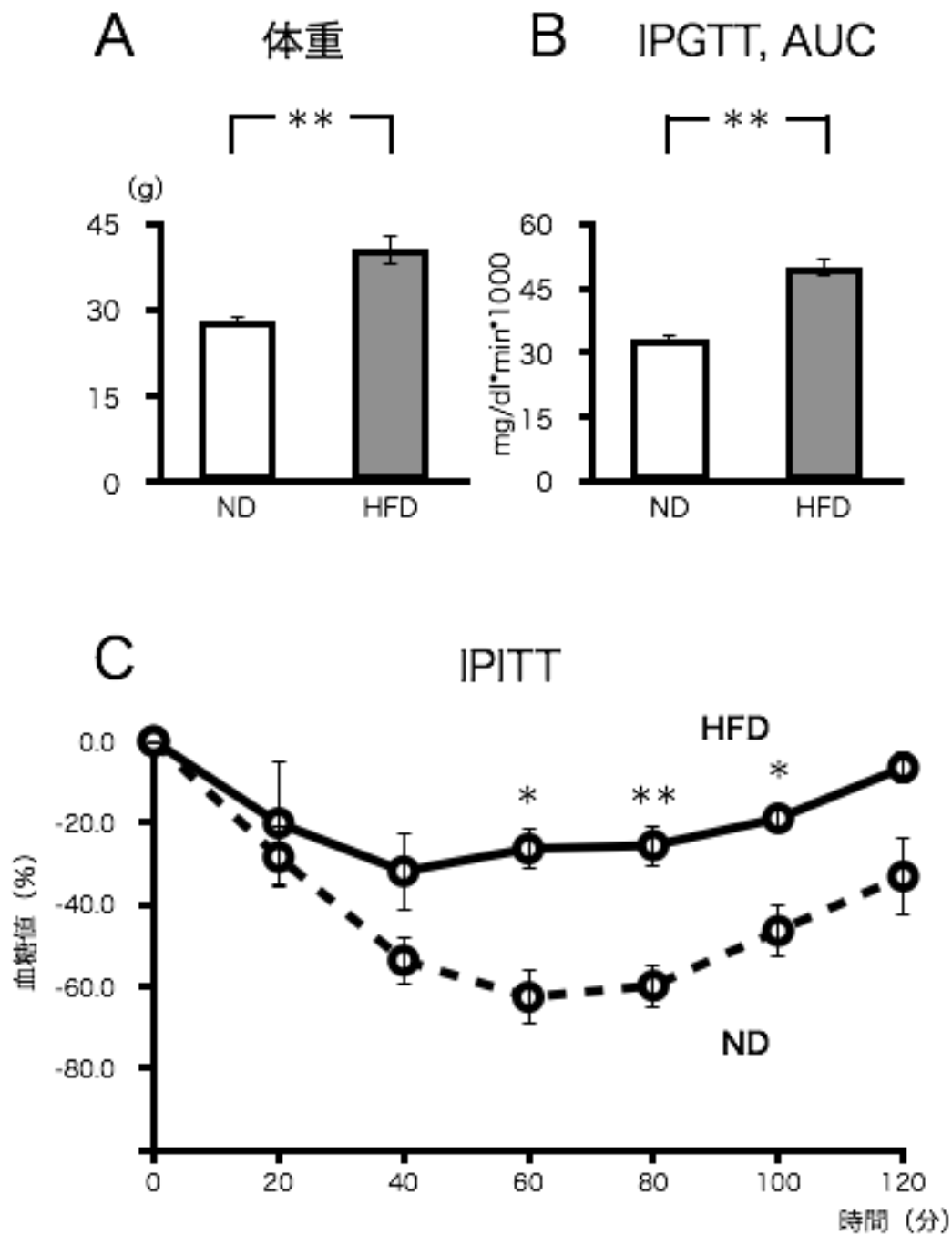


図6 体重、ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験の結果。4週齢のC57BL/6Jマウスを普通食 (ND) 及び高脂肪食 (HFD) 投与群に分け10週後の体重 (A) を測定し、糖負荷試験 (B) 及びインスリン負荷試験 (C) を行った。糖負荷試験は0、20、40、60、80、100、120分後の血糖のAUC (area under the curve) の値を示す。インスリン負荷試験は0分の時点での血糖と比較して0、20、40、60、80、100、120分後の血糖の変化率を示す。14週齢のHFD群では体重が増加し、耐糖能障害、インスリン抵抗性を示した。(ND、HFDのそれぞれの群でn=5、* : p<0.05、** : p<0.01)

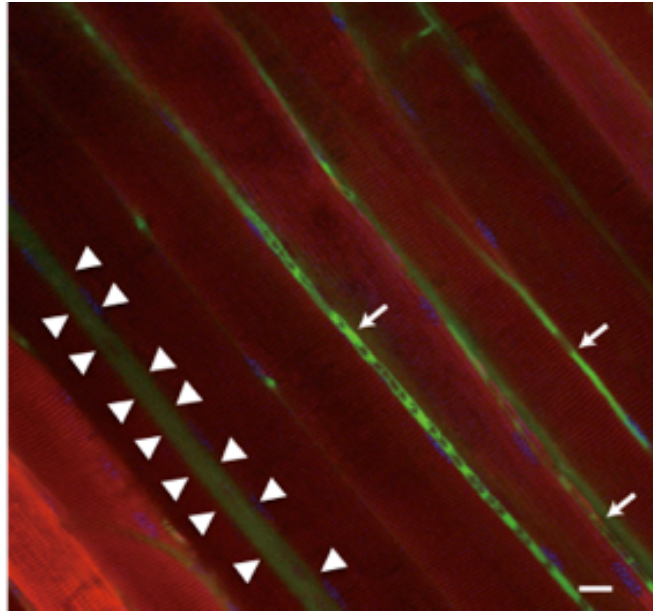


図7 骨格筋微小循環の二光子顕微鏡像。テトラメチルローダミンにより骨格筋が赤く染色され、ヘキスト33342により核が青く染色されている。FITC-デキストランにより血管内腔（▽ 矢印）が描出され、内腔には染色されていない像として赤血球が確認される。血管より漏出したFITC-デキストランにより間質（△三角）が描出される。（赤：テトラメチルローダミン、青：ヘキスト33342、緑：FITCデキストラン、スケールバー10 μ m）

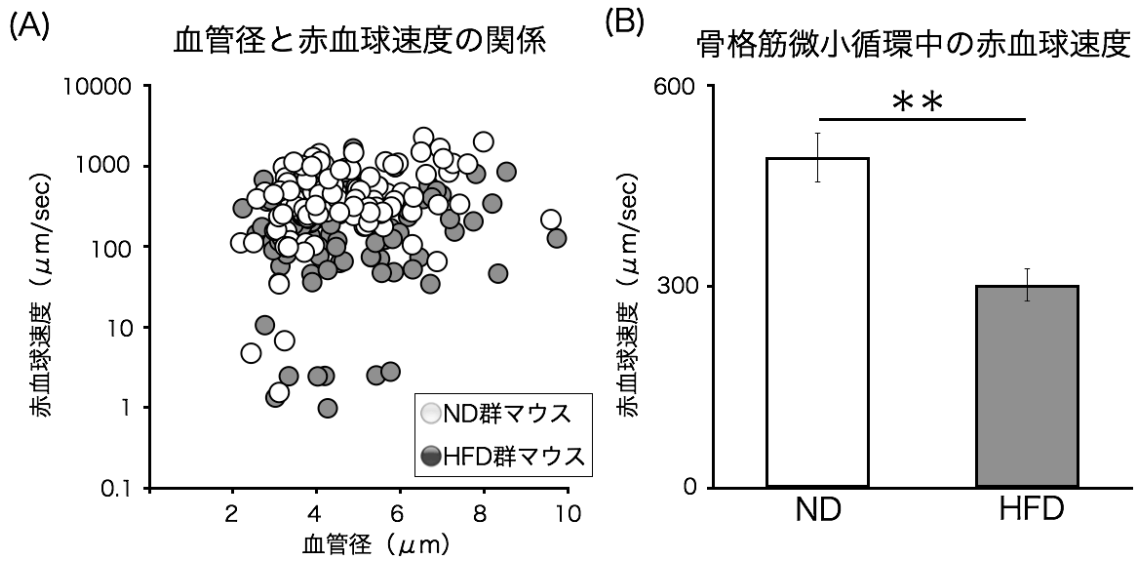


図8 FITCデキストラン(分子量70kダルトン)を静注後、骨格筋毛細血管を観察した。(A) ND群マウス(白丸)とHFD群マウス(黒丸)の赤血球速度と血管径の関係を解析した(n=5, 1匹につき25本の血管を解析、それぞれの群につき計125本の血管の結果)。(B) 骨格筋毛細血管($<10\mu\text{m}$)中の赤血球速度はHFD群マウスにおいて有意に遅い(** $P<0.01$)。

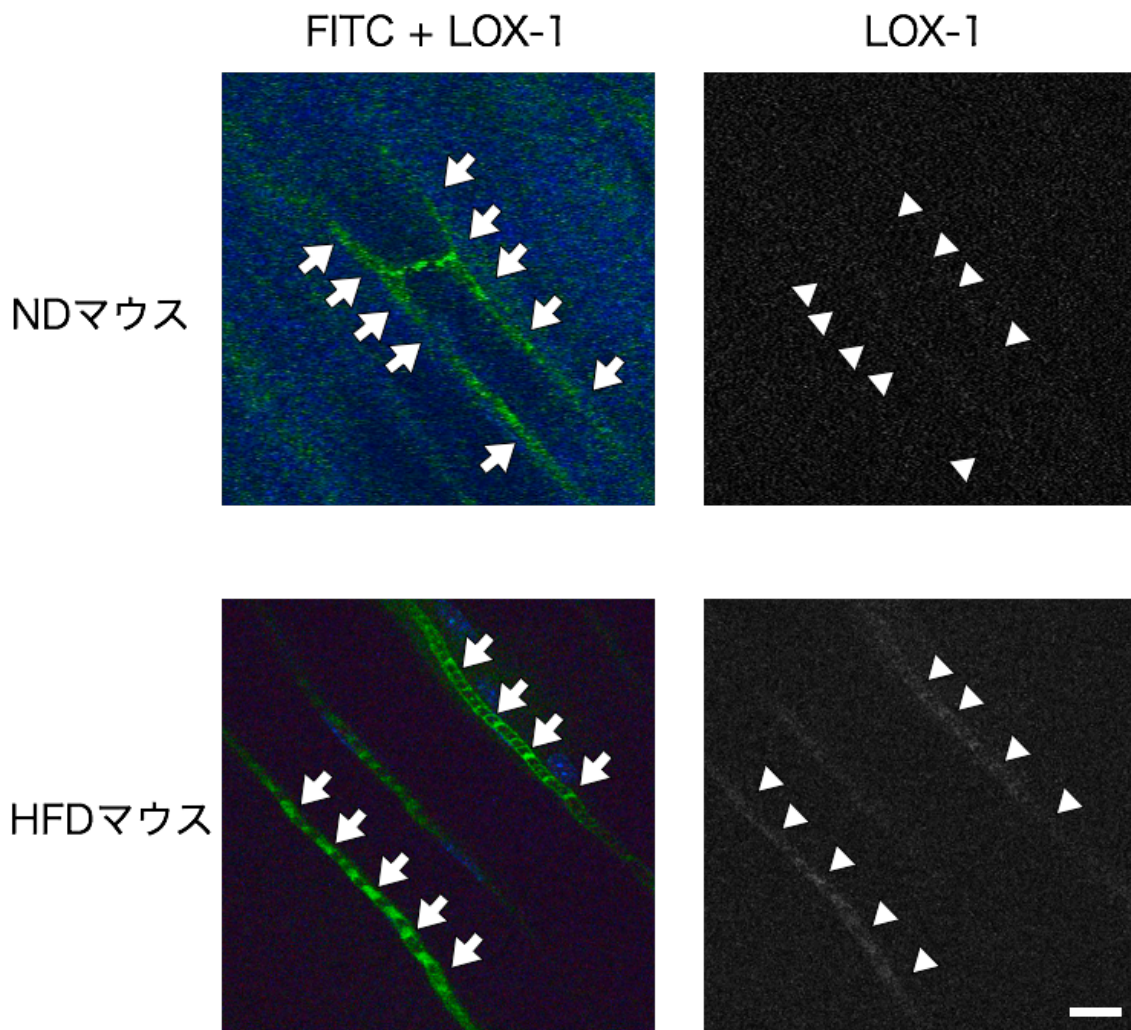


図9 骨格筋微小循環中のLOX-1を用いた低酸素イメージング。ND群マウスとHFD群マウスで比較した。HFD群マウスの骨格筋では、血流（ \blacktriangleleft 矢印）に一致したLOX-1のシグナル（ \triangle 三角）を認め、低酸素状態であることが示された。（それぞれの群でn=3、図は代表的イメージ、緑：FITC-デキストラン、青：ヘキスト33342、赤：LOX-1、スケールバー10 μ m）

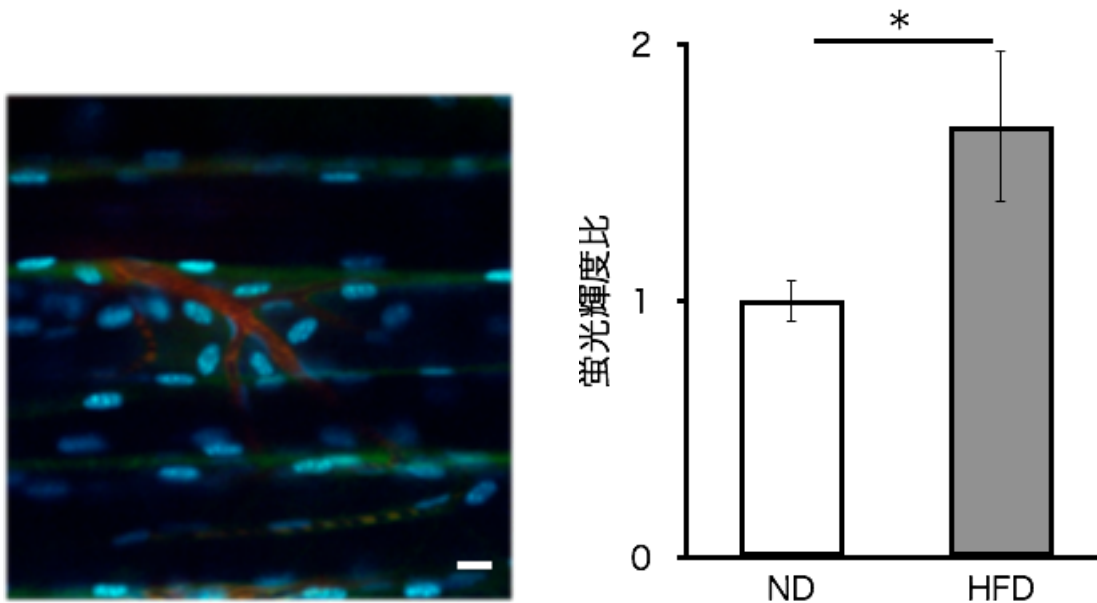


図10 マウス骨格筋間質の活性酸素種の産生の程度を評価した。マウスの尾静脈より蛍光色素を静脈注射し、二光子顕微鏡で骨格筋組織を観察した（赤：テキサスレッドデキストラン、青：ヘキスト33342、緑：DCFDA、スケールバー：10 μ m）。テキサスレッドデキストランにより血管内腔が赤く、ヘキスト33342によって核が青く染色されている。DCFDAは活性酸素種存在下で緑色の蛍光を発するが、骨格筋の間質に緑色のシグナルを得た。ND群マウスとHFD群マウスの骨格筋組織を比較すると、HFD群マウスにおいて骨格筋間質の蛍光強度の増強が認められ、活性酸素種の産生が亢進していることが分かった（ $P < 0.05$ 、それぞれの群で $n = 7$ 、1匹につき10箇所を評価、計70箇所ずつ、* $P < 0.05$ ）

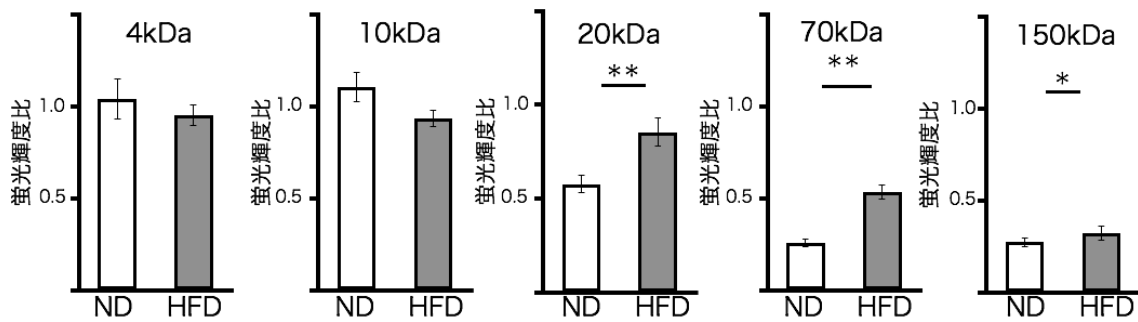
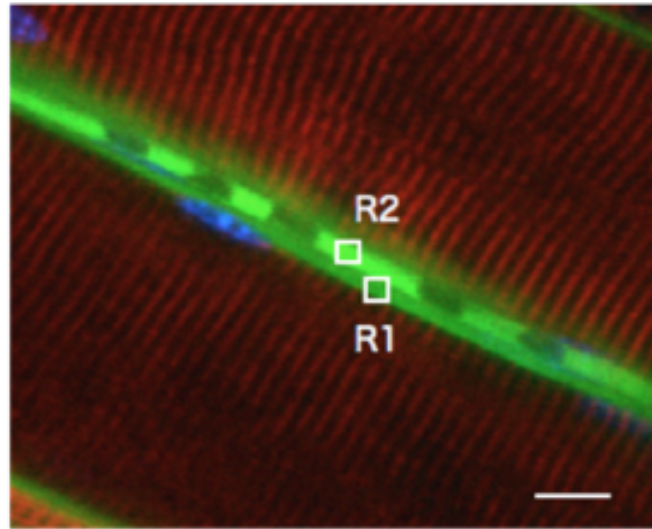


図11 マウス骨格筋微小循環の血管透過性を評価した。マウス尾静脈よりFITCデキストラン（分子量4k、10k、20k、70k、150kダルトン）を投与し、骨格筋毛細血管内腔（R2）及び骨格筋間質（R1）を可視化した。骨格筋毛細血管内腔（R2）と骨格筋間質（R1）の蛍光強度の比（R1/R2）を取ることで、血管内腔から間質への蛍光物質の漏出の程度を評価した。HFD群マウスの微小循環では、20k及び70k、150kダルトンのFITCデキストランを投与したときにND群マウスより血管透過性が亢進していた。

（マウス1匹につき5カ所の視野で評価、それぞれの群でn=5、計25カ所で評価、緑：FITC-デキストラン、赤：テトラメチルローダミン、青：ヘキスト33342、スケールバー：10 μ m、*P<0.05、**P<0.01）

高脂肪食負荷マウスの骨格筋では免疫細胞が増加している

HFD群マウスの骨格筋の炎症病態に寄与する免疫細胞を調べるため、骨格筋のフローサイトメトリーを行った（図12）。22週齢のND群とHFD群のマウスの骨格筋中の免疫細胞の割合を比較した。HFD群マウスの骨格筋中ではCD11b⁺F4/80⁺のマクロファージが増加（ $p < 0.01$ ）しており、さらにCD11c^{high}のM1様マクロファージ、MGL^{high}のM2様マクロファージにおいても増加（ $p < 0.01$ ）を認めた。また、CD11b⁺Ly6G⁺の好中球やCD11b⁺Ly6C⁺の炎症性単球、CD3陽性のT細胞、CD4陽性、CD8陽性のT細胞においても増加（ $p < 0.05$ ）を認めた。B細胞は有意ではないものの増加の傾向を認めた（図13A、ND群、HFD群共に $n=10$ ）。マクロファージ全体に対するM1様、M2様マクロファージの割合の変化をND群マウスとHFD群マウスで比較すると、M1様マクロファージの割合の増加がM2様マクロファージの割合の増加よりも大きいことが分かった（図13B、M1様マクロファージ：ND4.0%→HFD6.2%、M2様マクロファージ：ND13.7%→HFD14.9%）。

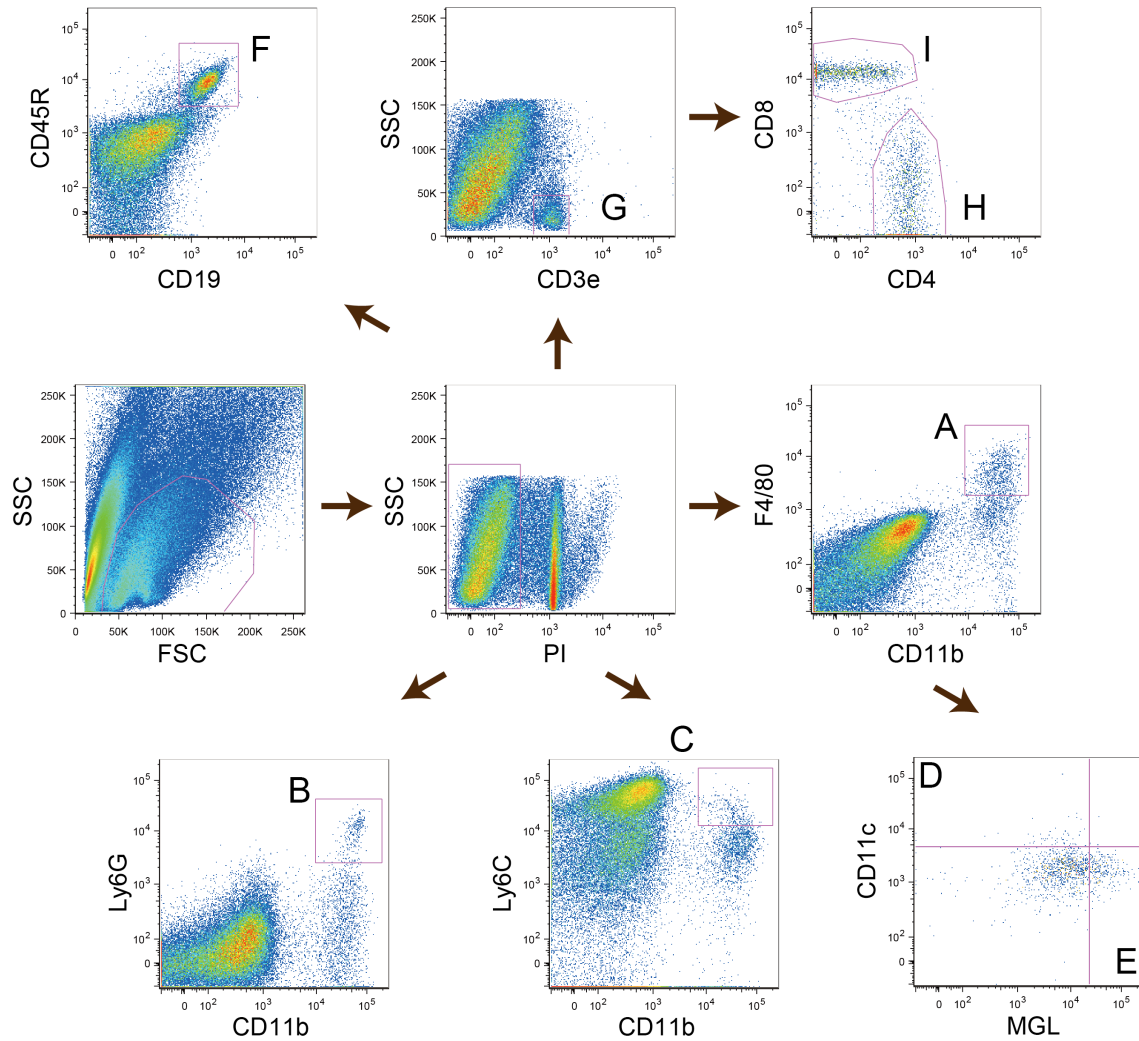
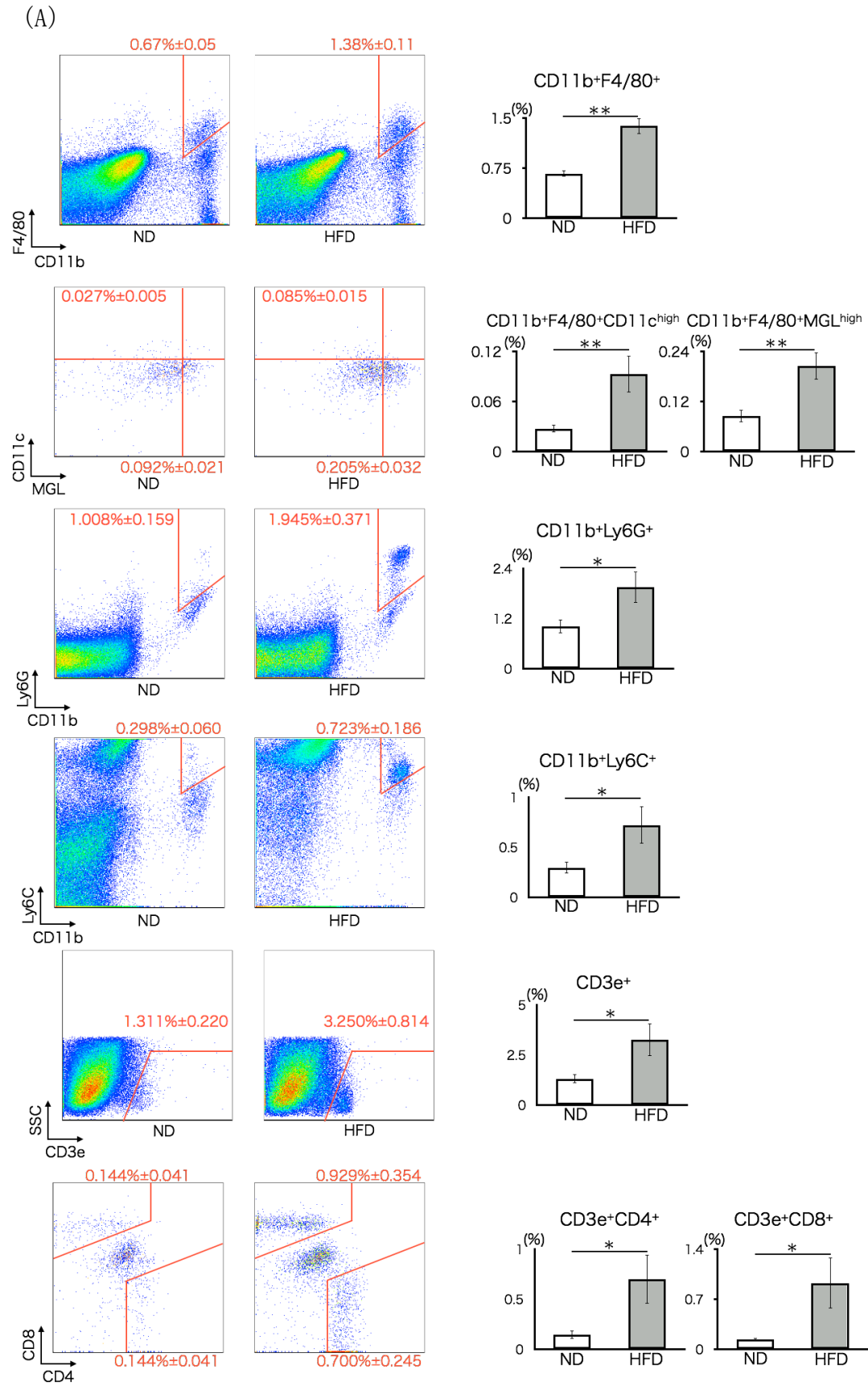


図12 フローサイトメトリーによる骨格筋からの単球/マクロファージ、B細胞、T細胞の分離。マウス骨格筋を単細胞にした後、FSC、SSCで血液細胞をゲートし、Propidium iodide (PI) 染色で死細胞を除去した。マクロファージはCD11b⁺F4/80⁺の分画 (A) に、好中球はCD11b⁺Ly6G⁺の分画 (B) に、炎症性単球はCD11b⁺Ly6C⁺の分画 (C) に分けられた。マクロファージはさらにCD11b⁺F4/80⁺CD11c^{high}のM1様マクロファージ (D)、CD11b⁺F4/80⁺MGL⁺のM2様マクロファージ (E) に分けられた。B細胞はCD19⁺CD45R⁺の分画 (F) に分けられた。T細胞はCD3e⁺の分画に含まれ、さらにCD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺T細胞に分けられた。



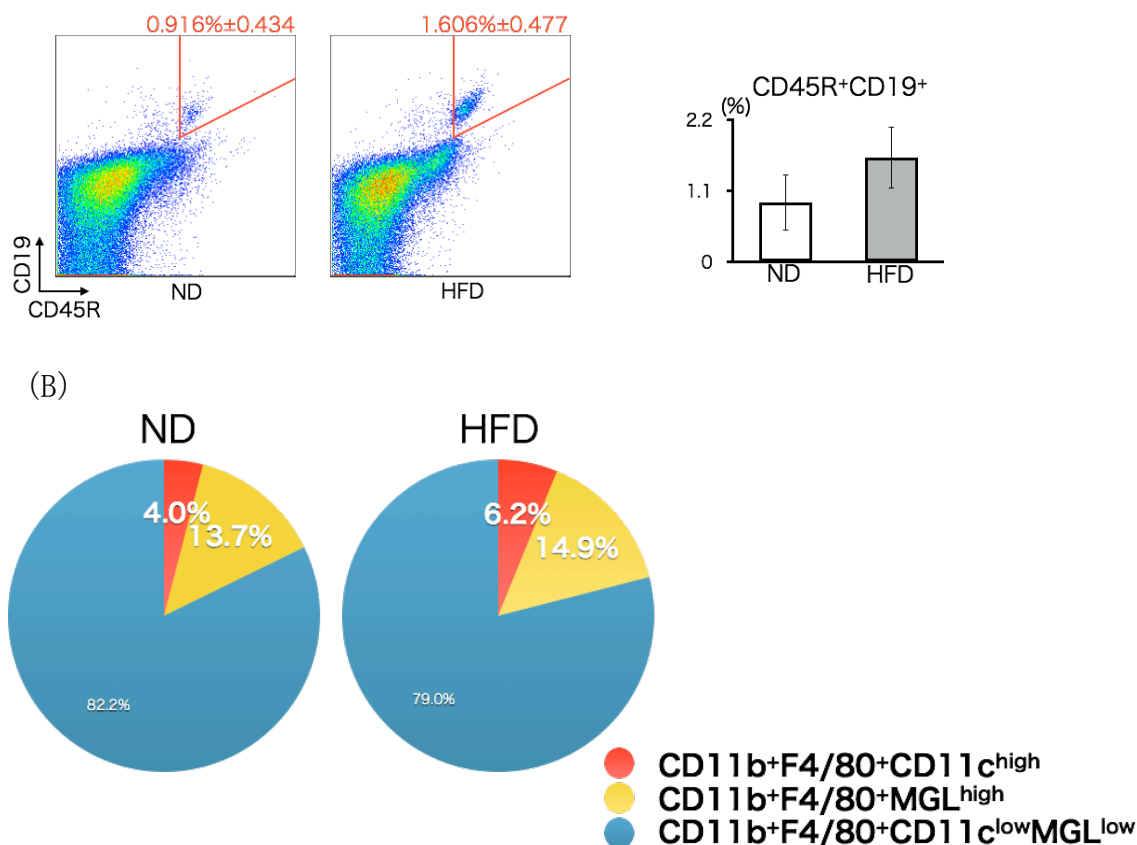


図13 (A) 骨格筋中の免疫細胞の解析。22週齢のND群及びHFD群マウスそれぞれの骨格筋中の免疫細胞をフローサイトメトリーにより解析した（ND群、HFD群それぞれn=10、図は代表的データ）。HFD群マウスの骨格筋中ではCD11b⁺F4/80⁺のマクロファージ、CD11c^{high}のM1様のマクロファージ及びMGL^{high}のM2様のマクロファージが増加していた（ $p < 0.01$ ）。CD11b⁺Ly6G⁺の好中球、CD11b⁺Ly6C⁺の炎症性単球及びT細胞においても有意な増加を認めた。（* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ ）(B) CD11b⁺F4/80⁺マクロファージ全体におけるM1様、M2様マクロファージの割合の変化。ND群マウスとHFD群マウスを比較すると、M1様マクロファージの割合の増加がM2様マクロファージよりも大きいことが分かった。

高脂肪食負荷マウスの腹腔滲出性マクロファージはC2C12筋管細胞の糖取り込みを亢進させる

マクロファージの、骨格筋細胞のインスリン抵抗性への寄与を検討するため、腹腔滲出性マクロファージ (PEC) と C2C12 筋管細胞の共培養を行った。PEC は 90% 以上が CD11b 陽性細胞であり、LPS 刺激により IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインを産生した (図14、ND群、HFD群共にn=4)。ND群マウス及びHFD群マウスのPECを採取し、共培養前にLPSで刺激する群と刺激しない群に分けた。C2C12細胞に対して 1 : 1 の比率になるようにトランズウェルのインサート上にPECを撒き、ウェル上の分化したC2C12筋管細胞と24時間共培養を行った。その後、インスリン100nMで刺激し、2-NBDGの取り込みをフローサイトメトリーで評価した。LPS刺激を行わなかったHFD群マウスのPECとの共培養のとき、他の群よりC2C12細胞の糖の取り込みが改善した (図15、各群においてn=6ずつ)。

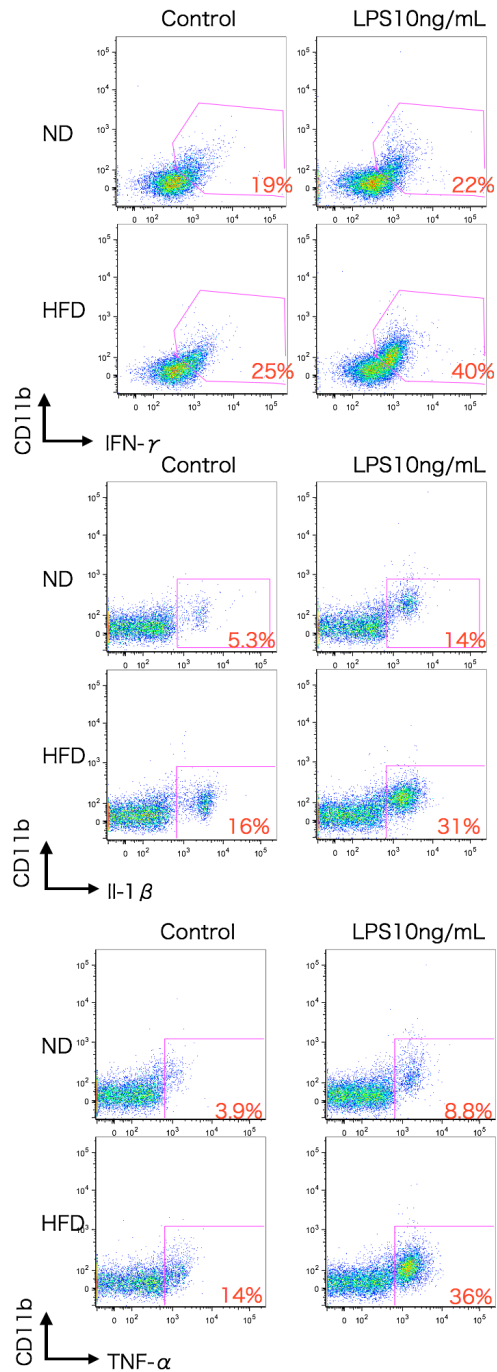


図14 腹腔滲出性マクロファージ（PEC）の細胞内サイトカイン染色による解析。マウスに4%チオグリコレート2mLを腹腔内投与し4日後に腹腔内の細胞を回収し、フローサイトメトリーによりIFN- γ 、IL1- β 、TNF- α といった炎症性サイトカイン陽性細胞の割合を評価した。ND群マウスとHFD群マウス由来の腹腔滲出性マクロファージを、無刺激群及びLPS10ng/mLを添加して12時間培養した群に分けて比較した。LPS刺激によりIFN- γ 、IL1- β 、TNF- α の産生が増加する。HFD群由来のマクロファージは無刺激でもND群由来のマクロファージをLPS刺激した群より炎症性サイトカイン陽性細胞の割合が高かった。（n=4、図は代表的データ）

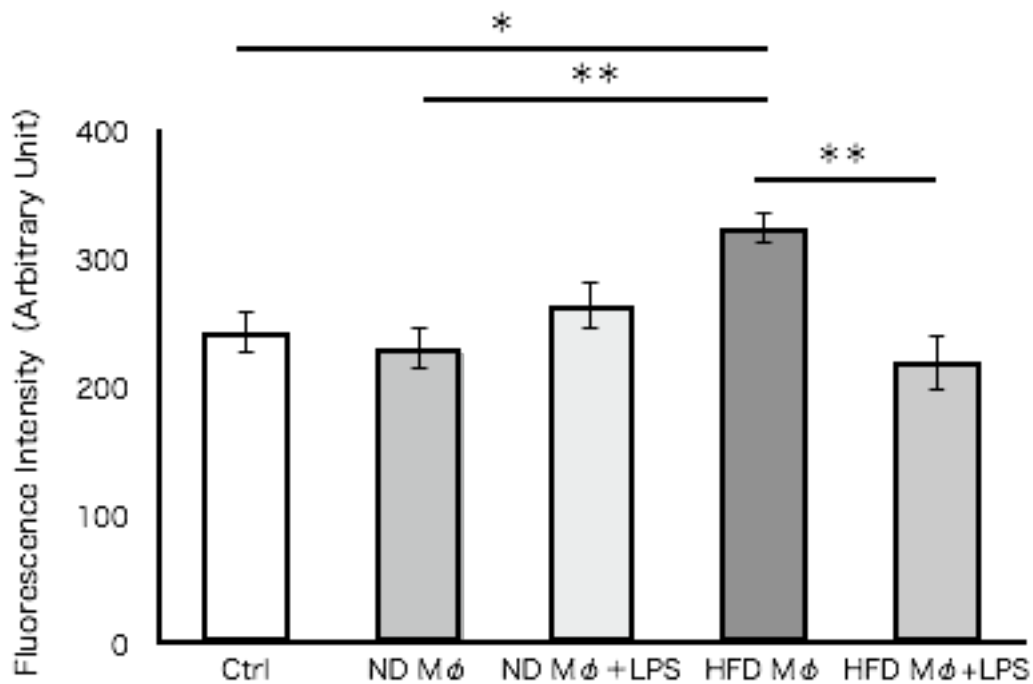


図15 C2C12筋管細胞と腹腔滲出性マクロファージの共培養後のC2C12筋管細胞の糖取り込み能の比較。マクロファージ (Mφ) が骨格筋細胞の糖取り込みに影響するかを調べるため、分化させたC2C12筋管細胞と腹腔滲出性マクロファージをトランズウェルで24時間共培養した後、インスリン100nM刺激下で2-NBDGの取り込み量をフローサイトメトリーで評価した。腹腔滲出性マクロファージはND群マウスとHFD群マウスからそれぞれ採取した。また、LPS (10ng/mL) 刺激したMφと無刺激のMφに分けた。結果、HFD群マウス由来の腹腔滲出性マクロファージはC2C12筋管細胞の糖取り込みを亢進させた ($p < 0.05$, vs control)。しかし、LPSで刺激した腹腔滲出性マクロファージでは糖取り込みの改善は見られなかった。(それぞれの群で $n=6$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)

高脂肪食負荷マウスの骨格筋ではCCL2の発現が亢進している

HFD群マウスの骨格筋にマクロファージが集積するメカニズムを調べるため、マクロファージ集積に関わるケモカインの遺伝子発現を解析した。14週齢のHFD群マウスの骨格筋では*Ccl2*の発現が亢進していた（図16、ND群n=6、HFD群n=5、 $P<0.05$ ）。次に、低酸素刺激が*Ccl2*の発現の亢進の原因となっているかを調べるため、分化させたC2C12筋管細胞を低酸素（1%O₂）条件下で24時間培養し、mRNAの発現を調べた。低酸素条件下では血管新生に関わる*Vegfa*のmRNA発現が亢進した（図17、各群n=6、 $p<0.01$ ）が、*Ccl2*のmRNA発現は逆に低下した（ $p<0.05$ ）。HFD群の骨格筋において*Ccl2*のmRNA発現が上昇しているのは骨格筋の間質細胞が原因となっている可能性が示唆された。

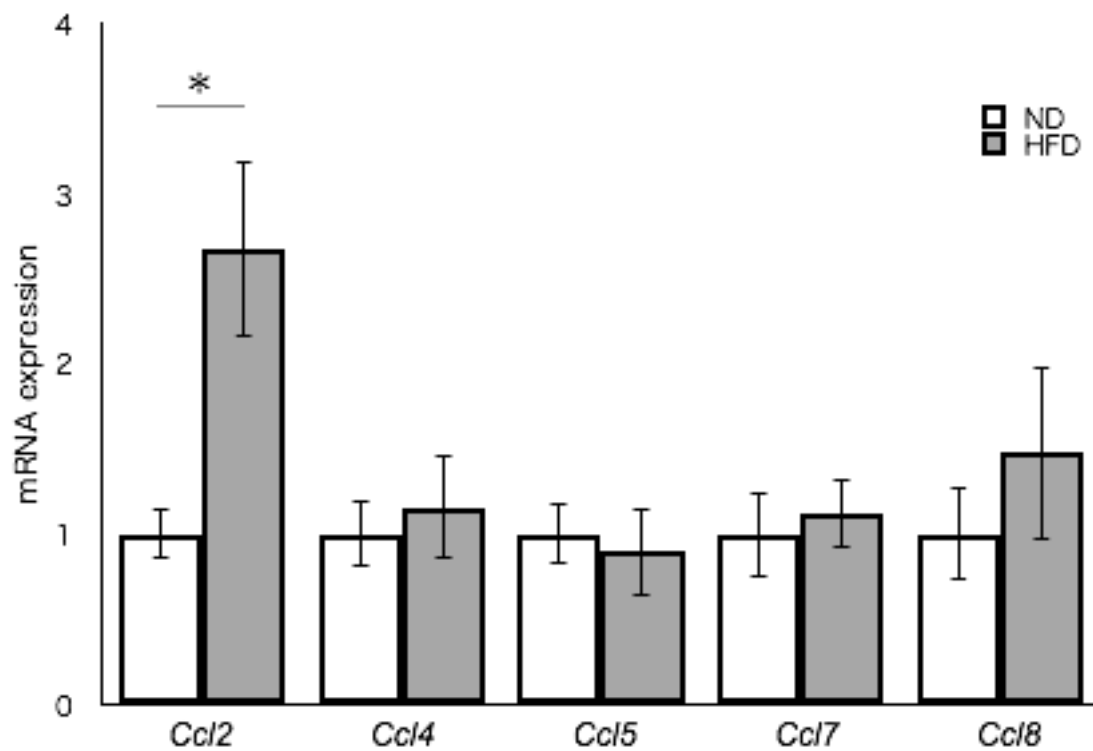


図16 ND群マウスとHFD群マウスの大腿四頭筋のケモカイン遺伝子発現の比較。ND群マウスとHFD群マウスの大腿四頭筋からmRNAを抽出し、定量PCRによりmRNA発現量を比較した。HFD群マウスでは*Ccl2*のmRNA発現が亢進していた ($p < 0.05$)。(ND群マウス 6 匹、HFD群マウス 5 匹で比較、* $p < 0.05$)

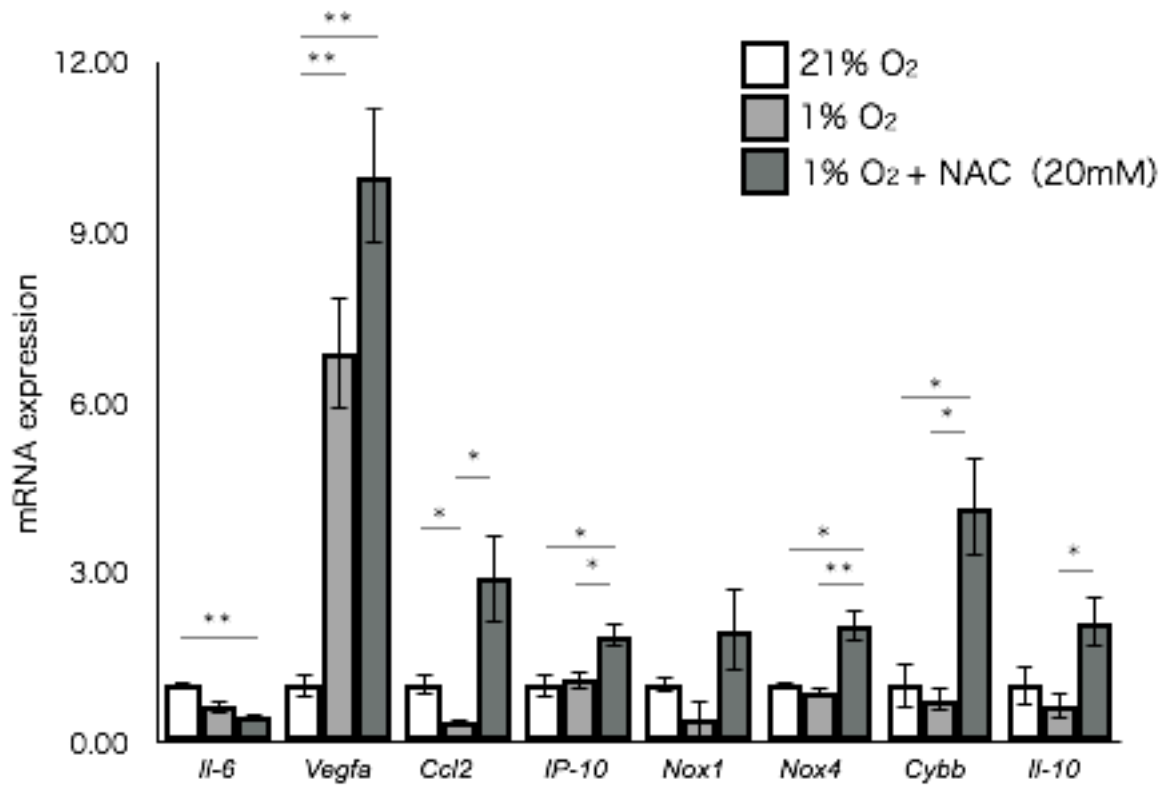


図17 C2C12細胞を分化させた後、通常酸素（21%O₂）条件下の群、低酸素（1%O₂）条件下の群、低酸素（1%O₂）条件下でn-アセチルシステイン（NAC）20mMを添加した群に分け、24時間培養後にC2C12細胞を回収し、mRNA発現を比較した。低酸素条件下で培養したC2C12細胞では*Ccl2*のmRNA発現が低下していた（ $P < 0.05$ ）。（それぞれの群で $n = 6$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ ）

CCL2は骨格筋へのマクロファージの集積に関与している

CCL2が骨格筋におけるマクロファージの集積に関与しているかを調べるため、HFD群マウスに抗CCL2抗体を投与して、骨格筋中のマクロファージをフローサイトメトリーにより解析した。抗CCL2抗体の投与により脂肪組織と同様に骨格筋でもマクロファージが減少した（図18、骨格筋：それぞれの群でn=7、皮下脂肪組織：それぞれの群でn=4、精巢上体脂肪組織：それぞれの群でn=3、脾臓：それぞれの群でn=3、末梢血：それぞれの群でn=7、 $p<0.05$ ）。脾臓及び末梢血中ではマクロファージの有意な減少は認められなかった。

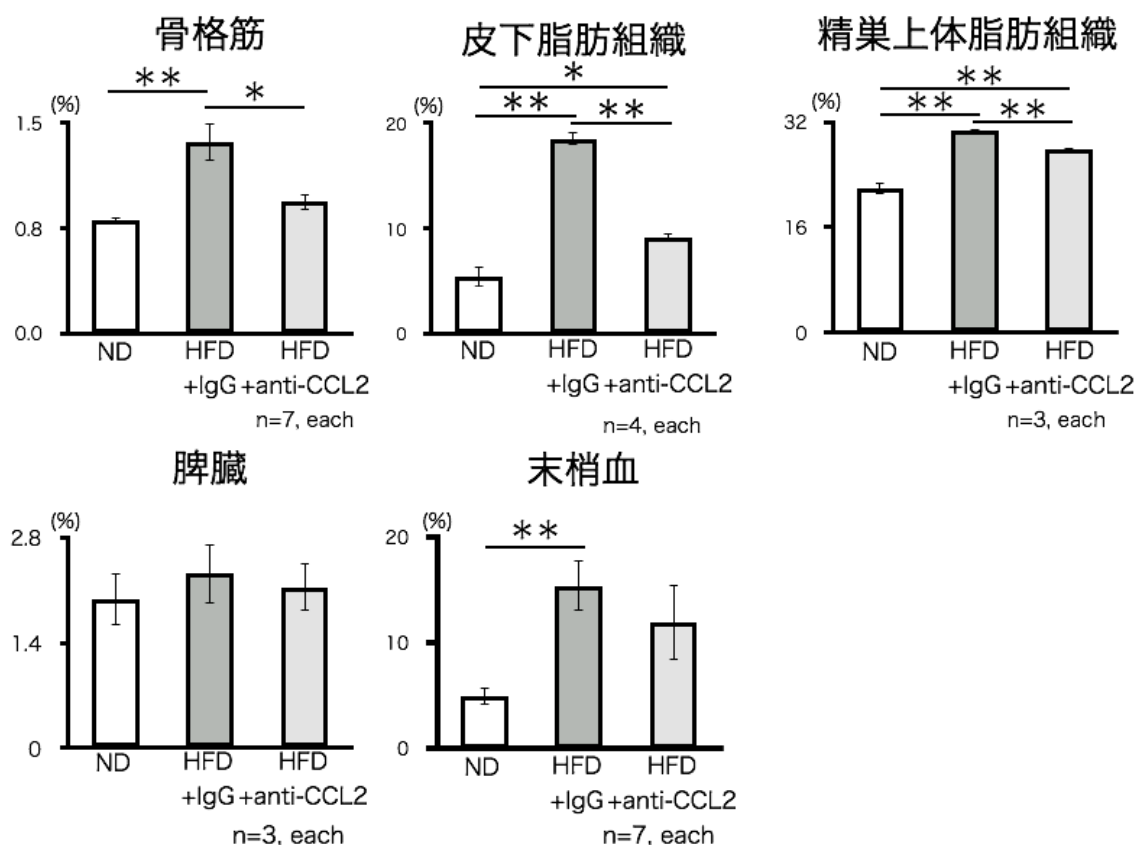


図18 抗CCL2抗体投与の結果。抗CCL2抗体をday 0 に200 μ g、day 2 に100 μ g、day 4 に100 μ gだけHFD群マウスに腹腔内投与した。コントロールとしてIgG isotypeを用いた。抗CCL2抗体の投与により骨格筋、皮下脂肪組織、内臓脂肪である精巣上体脂肪組織中のマクロファージは減少した。(骨格筋：それぞれの群でn=7、皮下脂肪組織：それぞれの群でn=4、精巣上体脂肪組織：それぞれの群でn=3、脾臓：それぞれの群でn=3、末梢血：それぞれの群でn=7、* p<0.05、** p<0.01)

考察

本研究により高脂肪食負荷マウスの骨格筋では、微小循環の血流低下により慢性的な低酸素状態が引き起こされ、骨格筋間質の活性酸素産生が亢進していることが分かった。また、骨格筋の間質細胞として、マクロファージや好中球、炎症性単球、T細胞といった免疫細胞が増加していることが分かった。マクロファージの集積機序としては、骨格筋中の*Ccl2*の遺伝子発現が増加していることが一因として考えられ、脂肪組織と同様、高脂肪食負荷時には骨格筋においても慢性炎症病態が形成されていると考えられた。

二光子顕微鏡による生体イメージングにより従来の手法では可視化できなかった骨格筋深部の血流を明瞭に捉えることができた。骨格筋微小循環の血流を生体で観察することによって、以前の報告（44）と異なり安静時にも骨格筋微小循環の血管は虚脱しておらず赤血球の流れがあることが分かった。また、骨格筋の間質機能に対する生体分子イメージングによるアプローチは今まで行われておらず、DCFDAを用いた実験により初めて骨格筋間質の活性酸素種の産生を評価することができた。従来の*in vitro*の実験手法では単一細胞の動態を解析することは可能であったが、人工的な環境下での細胞挙動しか見ることができなかった。また、*in vivo*の免疫組織標本や細胞計測法では、ある一時点での組織環境や細胞集団の静的状態を解析することができたが、その置かれている組織環境中での単一細胞の動態を見ることはできない。本研究において二光子顕微鏡を用いて初めて骨格筋深部の血流中の赤血球動態を一細胞レベルで解析することができた。そして、固定切片では評価することのできない間質の機能を、生きたまま組織を観察することで、初めて解析することに成功した。

炎症性単球が遊走するメカニズムとしては、炎症性単球上に発現するCCR2に結合するCCL2 (MCP-1)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (MCP-2) により骨髓から血中へ単球がリクルートされることが知られている (48)。血中の炎症性単球は接着分子の発現を介して、組織へ浸潤する。活性酸素は血管内皮細胞でバイベル・パラデ小体に直接作用してP-セレクチンの分泌を誘導し、NF- κ Bを介する転写調節によってICAM-1 (Intracellular adhesion molecule-1)、VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) といった細胞接着分子の発現を誘導することで、炎症性単球の血中から組織の浸潤を促す (49)。また、CCL4、CCL5をリガンドとするCCR5は炎症時に組織中のマクロファージの生存に関わっているとされている。本研究においては、高脂肪食負荷マウスの骨格筋では*Ccl12*のmRNA発現が亢進していることから、骨格筋へのマクロファージ集積にはCCL2が主に関与していると考え、抗CCL2抗体による抑制実験を行った。

近年、低酸素応答と炎症とが非常に密接な関係にあることが明らかになっている (50)。低酸素下では低酸素誘導因子 (HIF) 及びNF- κ Bの活性が上昇し炎症性サイトカインの産生が増加する (51)。低酸素はまたミトコンドリアにおける活性酸素の産生を増加させ、産生された活性酸素によって、さらにHIF及びNF- κ Bが活性化されることが知られている (52)。本研究において、低酸素環境下で培養したC2C12細胞の*Ccl12*遺伝子発現が低下し、抗CCL2抗体の全身投与により骨格筋へのマクロファージ集積が抑制されたことから、骨格筋間質中にCCL2を産生する間質細胞が存在することが推定される。高脂肪食負荷マウスでは間質の免疫細胞が増加しており、どの免疫細胞の寄与が大きいかは今後検討する必要がある。

肥満時の脂肪組織ではCCL2の発現が亢進し、マクロファージの増加に関与していることが示されており、CCL2の阻害により脂肪組織の炎症が改善することが示されている (53)。肝臓においても、CCL2による免疫細胞の誘導が慢性肝障害を引き起こし肝臓の繊維化に関与していることが示されており、免疫細胞の浸潤を抑えることで炎症が改善することが報告されている (54)。本研究において骨格筋中にM1様マクロファージが増加していることが示され、抗CCL2抗体投与による阻害実験により骨格筋においてもマクロファージ浸潤の改善が認められた。他の臓器同様マクロファージの浸潤過程を明らかにし、浸潤を抑制することができれば炎症を改善する治療につながると考えられる。

以前の報告により、脂肪細胞とマクロファージの共培養の系において、マクロファージからのTNF- α の産生が脂肪細胞を炎症性に変化させ、逆に、TNF- α の刺激による脂肪細胞からの遊離脂肪酸の放出がマクロファージのTNF- α の産生を亢進させるという悪循環が形成されることが言われている (55)。本研究で行った腹腔滲出性マクロファージとC2C12筋管細胞の共培養の系では、予想に反して高脂肪食負荷マウス由来のマクロファージはC2C12筋管細胞の糖取り込みを亢進させた。TLR4のリガンドであるLPS刺激時にはそのような作用がなかったことから、マクロファージは高脂肪食負荷時に骨格筋のインスリン抵抗性を改善する方向に働こうとするが、TLR4を刺激する飽和脂肪酸が過剰にある高脂肪食負荷の状態ではその作用が発揮できないと推測される。LPS刺激時のマクロファージとの共培養時にはC2C12筋管細胞の糖取り込みに変化はなかったが、腹腔滲出性マクロファージと骨格筋間質のマクロファージの性質が異なる可能性がある。本研究においては、容易に採取できるマクロファージとして

腹腔滲出性マクロファージを用いて共培養の実験を行ったが、今後は骨格筋間質に存在するマクロファージが骨格筋の糖取り込みに対して影響を与えていないかどうか検討していく必要がある。

蛍光標識グルコースアナログである2-NBDGは単一細胞へのグルコース取り込み測定に有用である (56)。 ^{14}C -2-デオキシ-D-グルコース、 ^{18}F -フルオロ-2-デオキシ-D-グルコース、 ^{14}C 、または、 ^3H -3-O-メチル-D-グルコースといった放射性同位体を使用した糖取り込みの測定方法よりも安全で取り扱いやすく、単一の生細胞での評価が可能である。2-NBDGは糖輸送単体 (GLUT) を介して細胞内に取り込まれた後、C-6部位がリン酸化され蛍光性の代謝産物、2-NBDG 6-phosphateとなる。その後、分解されると非蛍光性となる。したがって、2-NBDGを用いたアッセイから得られる蛍光輝度は2-NBDG 6-phosphateの生成と分解の平衡の結果であり、細胞の糖取り込み活性を反映する (57)。また、2-NBDGは細胞内カルシウム濃度やpH、膜電位を測定する他の蛍光試薬や細胞表面抗原に対する蛍光抗体と併用することが可能である。本研究ではフローサイトメトリーにより2-NBDGの蛍光輝度を測定し、C2C12筋管細胞の糖取り込み能を評価した。今回用いた系は簡便に細胞の糖取り込み能を評価することが可能であり、今後グルコース取り込みを標的とした創薬研究への活用が期待される。

本研究の限界としては以下の点が挙げられる。第一に、二光子顕微鏡による生体イメージングの限界である。皮膚による光の散乱のため、観察の際には皮膚を切開して観察臓器を露出する必要がある、骨格筋を観察するために行う外科的操作により血流が止まる可能性がある。また、麻酔による低体温や低血圧により骨格筋微小循環への血流が減少する可能性がある。本研究においては安

静時の骨格筋血流を検討したが、運動時の骨格筋血流を評価するためにトレッドミル運動負荷を与えた後に骨格筋血流を観察しようとする、外科的手技や麻酔による影響のため運動負荷による差の評価が困難である。さらに、炎症を評価する際には観察に伴う光毒性による影響を常に考慮に入れる必要がある。本研究においてはペントバルビタール、イソフルラン、バルビツレート、ケタミンといった麻酔と比較すると微小循環への影響が最も少ないウレタンによる麻酔を採用した。外科的な侵襲的操作は最低限にして、生理食塩水により臓器を乾燥させないようにし、生理的な状態に近い条件を維持しながら観察するように注意した。また、麻酔の効いた状態ではマウスは体温を維持できないので、ヒートステージやランプで温めた。さらに、光毒性の影響を最小限にするため観察の際には同一視野での長期の観察を避け、不必要にレーザー強度を上げないようにした。第二に、本研究において高脂肪食負荷マウスではフローサイトメトリーにより骨格筋間質に免疫細胞が増加していることは示されたが、その各々の細胞の役割については不明のままである。特に、M1様マクロファージが増加していることが示されたもののM2様マクロファージも有意に増加しており、その増加の機序や抗炎症性作用の程度は不明である。CD4陽性及びCD8陽性T細胞においても増加を認めたが、炎症性であるか抗炎症性であるか、機能は明らかでない。今後、骨格筋組織における慢性炎症病態において各々の細胞がどのように寄与しているのかを検討していく必要がある。第三に、骨格筋とマクロファージの共培養の系において、腹腔滲出性マクロファージを用いて検討したが、in vivoの状況を反映していない可能性がある。腹腔滲出性マクロファージは採取が容易で実験に用いるのに十分な量を採取できる反面、必ずしも炎症

性マクロファージではないという報告（58）もあり、本来なら骨格筋からマクロファージをソーティングして実験に用いるべきである。しかし、骨格筋からのマクロファージのソーティングは技術的に困難であり、今後の検討課題である。

本研究で得た知見をもとに、今後肥満時に起きる骨格筋の微小循環障害の原因の解明、さらに、間質における活性酸素産生を抑制する治療、炎症性細胞の浸潤の抑制を目標にした治療を研究することで、骨格筋における炎症を改善しインスリン抵抗性の改善につながることが期待される。

引用文献

1. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ, Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 87, 4-14 (2010)
2. 厚生労働省, 平成24年国民健康・栄養調査結果の概要、1-32 (2013)
3. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840-846(2006)
4. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B, Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17, 4-12(2006)
5. Heilbronn LK, Campbell LV, Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* 14, 1225-1230 (2008)
6. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM, Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118, 2992-3002 (2008)
7. Williamson RT, On the treatment of glycosuria and diabetes mellitus with sodium salicylate, *BMJ* 1, 760-762 (1901)
8. Feingold KR, Soued M, Stavrakis I, Gavini LA, Donahue ME, Huang BJ, Moser AH, Guller R, Grunfeld C, Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia. *J Clin Invest* 83, 1116-1121 (1989)

9. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM, Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259, 87-91 (1993)
10. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB, The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(κ)B kinase- β . Nature 396, 77-80 (1998)
11. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE, Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . Science 293, 1673-1677 (2001)
12. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest 112, 1821-1830 (2003)
13. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr, Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 112, 1796-1808 (2003)
14. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE, Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. Nat Med 11, 183-190 (2005)
15. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G, Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in

diacylglycerol, protein kinase C and $I\kappa B-\alpha$. Diabetes 51, 2005-2011 (2002)

16 . Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM, Increased P85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. Diabetes 54, 2351-2359 (2005)

17 . Olefsky JM, Glass CK, Macrophages, inflammation and insulin resistance. Annu Rev Physiol 72, 219-246 (2010)

18 . Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Matsuda M, Mahankali S, Santini E, DeFronzo RA, Ferrannini E, Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 87, 5098-5103 (2002)

19 . Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR, Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. Cell Metab 7, 410-420 (2008)

20 . O'Rourke RW, Metcalf MD, White AE, Madala A, Winters BR, Maizlin II, Jobe BA, Roberts CT Jr, Slifka MK, Marks DL, Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN- γ in inflammation in human adipose tissue. Int J Obes (Lond) 33, 978-990 (2009)

21 . Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD, Splanchnic lipolysis in human obesity. J Clin Invest 113, 1582-1588 (2004)

- 22 . Olefsky JM, Glass CK, Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72, 219–246 (2010)
23. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K, Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immuno* 11, 85–97 (2011)
- 24 . Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR, Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 16–23 (2007)
25. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM, A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282, 35279–35292 (2007)
26. Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR, Núñez V, Fuentes L, Montaner D, Ishikawa K, Camacho A, Barbarroja N, O’Rahilly S, Sethi JK, Dopazo J, Orešič M, Ricote M, Vidal-Puig A, Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 60, 797–809 (2011)
27. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K, Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58, 2574–2582 (2009)

28. Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG, Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab* 8, 301-309 (2008)
29. Li P, Lu M, Nguyen MT, Bae EJ, Chapman J, Feng D, Hawkins M, Pessin JE, Sears DD, Nguyen AK, Amidi A, Watkins SM, Nguyen U, Olefsky JM, Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *J Biol Chem* 285, 15333-15345 (2010)
30. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM, GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, 687-698 (2010)
31. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G, PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6, 137-143 (2007)
32. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D, Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15, 930-939 (2009)

33. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357 (1986).
34. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R, CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15, 914-920 (2009)
35. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson MG, Alonso MN, Leong HX, Glassford A, Caimol M, Kenkel JA, Tedder TF, McLaughlin T, Miklos DB, Dosch HM, Engleman EG, B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17, 610-617 (2011)
36. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP, The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30, 1000-1007 (1981)
37. Lu H, Huang D, Ransohoff RM, Zhou L, Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *The FASEB journal* 25(10), 3344-3355 (2011)

38. Goppert M, Über die Wahrscheinlichkeit des Zusammenwirkens zweier Lichtquanten in einem Elementarakt. *Naturwissenschaften* 17, 932-932 (1929)
39. Kaiser W, Garrett CGB, Two-photon excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$, *Phys Rev Lett* 7, 229-231 (1961)
40. Denk W, Strickler JH, Webb WW, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76 (1990)
41. Curley PF, Ferguson AI, Actively mode-locked Ti:sapphire laser producing transform-limited pulses of 150-fs duration. *Opt Lett* 16, 1016-1018 (1991)
42. Klitzman B, Duling BR, Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 237, H481-H490 (1979)
43. Krogh A, The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol* 52, 409-415 (1919)
44. Krogh A, The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation. *J Physiol* 52, 457-474 (1919)
45. Rattigan S, Appleby GJ, Miller KA, Steen JT, Dora KA, Colquhoun EQ, Clark MG, Serotonin inhibition of 1-methylxanthine metabolism parallels its vasoconstrictor activity and inhibition of oxygen uptake in perfused rat hindlimb. *Acta Physiol Scand* 161, 161-169 (1997)

46. Clark MG, Rattigan S, Barrett EJ, Vincent MA, Point: There is capillary recruitment in active skeletal muscle during exercise. *J Appl Physiol* 104, 889- 891 (2008)
47. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S, In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest* 118, 710-721 (2008)
48. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF, Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117, 902-909 (2007)
49. Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY, Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res* 84, 516-524 (1999)
50. Eltzschig HK, Carmeliet P, Hypoxia and Inflammation. *N Engl J Med* 364, 656-665 (2011)
51. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT, Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 18154-18159 (2006)

52. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT, Role of oxidants in NF- κ B activation and TNF- α gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 165, 1013-21 (2000)
53. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M, MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116(6), 1494-1505 (2006)
54. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F, Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 61(3), 416-426 (2012)
55. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y, A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(10), 2062-2068 (2005)
56. Yamada K, Nakata M, Horimoto N, Saito M, Matsuoka H, Inagaki N, Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 275(29), 22278-22283 (2000)

57. Yoshioka K, Saito M, Oh KB, Nemoto Y, Matsuoka H, Natsume M, Abe H, Intracellular fate of 2-NBDG, a fluorescent probe for glucose uptake activity, in *Escherichia coli* cells. *Biosci Biotech Biochem* 60(11), 1899–1901 (1996)
58. Seki S, Osada S, Ono S, Aosasa S, Habu Y, Nishikage T, Mochizuki H, Hiraide H, Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. *Infect Immun* 66(11), 5286–94 (1998)

謝辞

本研究を実施するにあたり、その機会と多大なご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授 小室一成先生に深く感謝致します。

また、本研究の立案、遂行にあたり実験指導および実験方針に対する御助言を頂きました自治医科大学学長 永井良三先生、自治医科大学分子病態研究部教授 西村智先生に心より御礼申し上げます。

そして、日々の実験生活において多くの御支援を頂いた東京大学大学院医学系研究科循環器内科 307 研究室第2実験室の皆様心より感謝致します。