

論文の内容の要旨

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

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。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。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。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ないとは言えず、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。

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。骨格筋は食後の血糖取り込みの 70-80%を担っており、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。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。

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。HFD 群のマウスは14週齢の時点で耐糖能障害、インスリン抵抗性を呈していた。骨格筋の微小循環異常を評価するため二光子顕微鏡を用いた生体イメージングを行った。ウレタンの腹腔内投与によりマウスを麻酔した後、蛍光色素を尾静脈より注射して微小循環を可視化した。10 μm 以下の微小血管の血流を観察したところ、赤血球速度は HFD 群マウスの骨格筋微小循環で低下しており、HFD 群マウス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 を用いた生体イメージングを行った。HFD 群マウスの骨格筋微小循環では、血流に一致して LOX-1 のシグナルを認め、低酸素状態であることが示された。さらに、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。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 ($P<0.05$)。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、肥満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。

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。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ところ、HFD 群では $F4/80^+CD11b^+$ のマクロファージが ND 群に比べて増加 ($P<0.01$) しており、さらに $F4/80^+CD11b^+CD11c^{high}$ の M1 様マクロファージ、 $F4/80^+CD11b^+MGL^{high}$ の M2 様マクロファージが増加 ($P<0.01$) していた。また、 $CD11b^+LY6G^+$ の好中球、 $CD11b^+Ly6C^+$ 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。HFD 群マウスの骨格筋では、免疫細胞の浸潤により炎症病態が引き起こされていると考えられた。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い、インスリン刺激時の蛍光性 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) の取り込みをフローサイトメトリーで評価した。HFD 群マウス由来の PEC は C2C12 筋管細胞の糖取り込みを亢進させたが、LPS (10ng/mL) で刺激した HFD 群由来の PEC は糖取り込み能を亢進させなかった。腹腔滲出性マクロファージは骨格筋のインスリン抵抗性を引き起こさなかったが、骨格筋中に存在するマクロファージの性質は異なる可能性があり、今後検討していく必要がある。次に、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、マクロファージの遊走、浸潤に関わるケモカインについて骨格筋の遺伝子発現を定量 PCR で解析した。HFD 群マウスの骨格筋では *Ccl2* の発現が亢進していた ($P<0.05$)。低酸素により骨格筋細胞の *Ccl2* 遺伝子の発現が亢進するかを検討するため、C2C12 筋管細胞を低酸素 (1% O_2) 環境下で培養し定量 PCR で遺伝子発現を解析したところ、低酸素環境下では C2C12 筋管細胞の *Ccl2* 遺伝子の発現が低下した。これより、骨格筋の *Ccl2* 遺伝子の発現亢進に寄与しているのは骨格筋間質に増加している免疫細胞ではないかと考えられた。CCL2 がマクロファージの集積に寄与しているかを調べるため、抗 CCL2 抗体を HFD 群マウスに投与し、骨格筋中の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析したところ骨格筋中のマクロファージは減少した。脂肪組織同様、骨格筋においても CCL2 がマクロファージの浸潤に関与していることが分かった。

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) により骨髄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。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・パラデー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。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 Ccl2 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。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。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。本研究において、低酸素環境下で培養したC2C12細胞のCcl2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。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。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。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。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を期待される。