〔課程-2〕

審査の結果の要旨

氏名　杉田　純一

本研究は肥満動物の骨格筋のインスリン抵抗性を引き起こす炎症について、C57BL/6J マウスに高脂肪食負荷を与えた肥満モデルを用いて二光子顕微鏡による生体観察及びサイトメトリー技術により検討し、下記の結果を得ている。

1. マウス骨格筋を二光子顕微鏡で観察するに当たり、蛍光色素投与量のコントロール及びフェムト秒パルスレーザーの励起波長の最適化、フィルターの適正化、光電子倍増管の感度の調整を行った。これにより、マウス骨格筋深部の観察においても蛍光のクロストークのない適正な画像の取得が可能になった。
2. 二光子顕微鏡を用いてマウス骨格筋微小循環を観察した。高脂肪食負荷マウスの微小循環は普通食マウスと比較すると血流が低下しており、低酸素状態であることが示唆された。次に、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ところ、高脂肪食負荷マウスの微小循環血流においてシグナルが認められ、低酸素状態が引き起こされていることが分かった。活性酸素種インディケーターである DCFDA を用いたところ、高脂肪食負荷マウスの骨格筋間質中にシグナルの増強が認められ、活性酸素種産生が亢進していることが分かった。また、FITC-デキストランにより高脂肪食負荷マウスでは血管透過性が亢進していることが分かった。以上から、高脂肪食負荷マウスの骨格筋では慢性的な低酸素状態から酸化ストレスが生じ、血管透過性の亢進がおき、炎症病態を形成していることが示唆された。
3. 骨格筋中の免疫細胞をサイトメトリーにより解析し、高脂肪食負荷マウスの骨格筋では $CD11b^{+}CD11c^{high}F4/80^{+}$ の M1 様マクロファージを始めとして、$CD11^{+}MGL^{high}F4/80^{+}$ の M2 様マクロファージ、T 細胞や $CD11b^{+}Ly6G^{+}$ の好中球、$CD11b^{+}Ly6C^{+}$ の炎症性単球が増加していることを示した。高脂肪食負荷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ことを示した。
4. マクロファージの、骨格筋のインスリン抵抗性に対する影響を調べるため、腹腔滲出性マクロファージと C2C12 筋管細胞の共培養を行い、インスリン刺激時の 2-NBDG の取り込みをサイトメトリーにより解析した。高脂肪食負荷マウス由来のマクロファージは糖取り込みを改善したが、LPS 刺激時のマクロファージは糖取り込みに影響を及ぼさなかった。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。

5.　　マクロファージの遊走・浸潤に関わるケモカイン遺伝子を定量PCRで調べたところ、高脂肪食負荷マウスの骨格筋では*Ccl2*の遺伝子発現が亢進していた。抗CCL2抗体を高脂肪食負荷マウスに投与したところ脂肪組織同様、骨格筋中のマクロファージ数は減少した。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。

6.　　高脂肪食負荷マウスの骨格筋が慢性的な低酸素状態にあることから、1%O_2の低酸素環境下でC2C12筋管細胞を培養したところ*Ccl2*の遺伝子発現は低下した。これより、骨格筋の*Ccl2*遺伝子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。

　　以上、本論文は肥満時の骨格筋において慢性的な低酸素状態から酸化ストレス、血管透過性亢進が引き起こされており、骨格筋間質には免疫細胞が増加していること、CCL2がマクロファージの集積に重要であることを明らかにした。本研究は骨格筋の炎症病態の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。