

運動による慢性炎症性代謝疾患改善効果：マクロファージのグルコース代謝経路に着目して

杏林大学 医学部衛生学公衆衛生学教室 助教

白土健

杏林大学 医学部衛生学公衆衛生学教室 教授

木崎節子

要旨

グルコース代謝の副経路であるヘキソサミン経路は、糖鎖修飾のドナー基質となるウリジン二リン酸 *N*-アセチルグルコサミンを合成する。高血糖によるヘキソサミン経路の代謝量増加は、糖鎖修飾の一種である *O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) 修飾を亢進させる。近年、炎症性サイトカインの発現を調節する転写因子 NF- κ B は、*O*-GlcNAc 修飾を受けると活性が高まることが報告された。本研究は、全身性慢性炎症に対する運動の抑制効果のメカニズムを明らかにするため、マクロファージの炎症性応答に及ぼす高血糖の影響とヘキソサミン経路の役割、および運動の効果を検討した。その結果、1) マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベルは、*db/+*マウスよりも *db/db* マウスの方が有意に高いが、TNF- α mRNA レベルは有意な差がないこと、2) リポ多糖 (LPS) による TNF- α mRNA レベルの増加は、*db/+*マウスよりも *db/db* マウスの方がむしろ有意に低く、正常マウスのマクロファージの LPS による TNF- α mRNA レベルの増加は、*O*-GlcNAc 阻害剤により有意に増強されること、3) マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベルは、習慣的自発性運動により有意に低下することを明らかにした。以上より、高血糖によるヘキソサミン経路の代謝量増加は、マクロファージの炎症性応答を誘導せず、むしろ LPS に対する炎症性応答を抑制して感染防御能を低下させること、および運動はこれを改善する可能性が示唆された。

背景及び目的

肥満者に認められる全身性慢性炎症は、2型糖尿病の発症に深く関わっていると考えられている。実際に、肥大した脂肪組織に集積したマクロファージは、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) などの炎症性サイトカインを分泌し、脂肪細胞のインスリン感受性を低下させる¹⁾。

高血糖に曝された細胞内では、グルコース代謝の副経路であるヘキソサミン経路の活性とその代謝産物であるウリジン二リン酸 *N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) のレベルが高まる。その結果、タンパク質翻訳修飾の一種である *O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) 修飾も亢進する。炎症性サイトカインの発現を調節する転写因子 NF- κ B は、*O*-GlcNAc 修飾を受けると、その活性が高まることが近年明らかにされた²⁾。

一方、マウスに水泳トレーニングを負荷すると、心筋細胞において、ヘキソサミン経路の律速酵素であるグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ (GFAT) の発現レベルおよびタンパク質の *O*-GlcNAc レベルが低下した³⁾。これらの結果から、運動はヘキソサミン経路の活性を抑制し、炎症反応を軽減する可能性が示唆される。

本研究では、マクロファージの炎症性応答に対する高血糖の影響とヘキソサミン経路の役割、および運動の効果とメカニズムを明らかにすることを目的とした。

方法

13-14 週齢雄性 *db/db* マウスと *db/+* マウスを 2 型糖尿病モデルマウスとその対照マウスとして用いた。12 週齢雄性 C57BL/6J マウスを正常マウスとして用いた。各マウスの腹腔内に 4.05% チオグリコレート培地を 2 ml 投与した。投与 4 日後、マウスを炭酸ガス吸引により安楽死させた後、腹腔細胞を無菌的に採取した。細胞をプラスチックディッシュで 1 時間培養した後、浮遊細胞を除き、付着性細胞を腹腔滲出性マクロファージとして実験に用いた。タンパク質の *O*-GlcNAc レベルと *O*-GlcNAc 修飾調節酵素 (OGT および GFAT) のタンパク質レベルをウェスタンブロット法で分析し、TNF- α の mRNA レベルをリアルタイム PCR 法で解析した。さらに、自発性運動の効果を検討するため、4 週齢雄性 C57BL/6J マウスを対照 (SC) 群および自発性運動 (VE) 群に分けて、8 週間飼育した。VE 群は回転カゴ付ケージで飼育し、SC 群は通常ケージで飼育した。回転カゴへのアクセスは 24 時間可能とし、いずれの群も自由摂餌とした。マクロファージの採取は運動停止 24 時間後に行った。データは平均値±標準誤差で示した。統計解析は一元配置分散分析で行い、事後解析は Bonferroni 法で行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

1. マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc および TNF- α mRNA のレベルに及ぼす高血糖の影響

マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベルは、*db/+* マウスよりも *db/db* マウスの方が有意に高かった (図 1A)。TNF- α mRNA レベルは、未刺激時では *db/+* マウスと *db/db* マウスとの間で有意な差はなかったが、リポ多糖 (LPS) 刺激 6 時間後では *db/+* マウスよりも *db/db* マウスの方が有意に低かった (図 1B)。

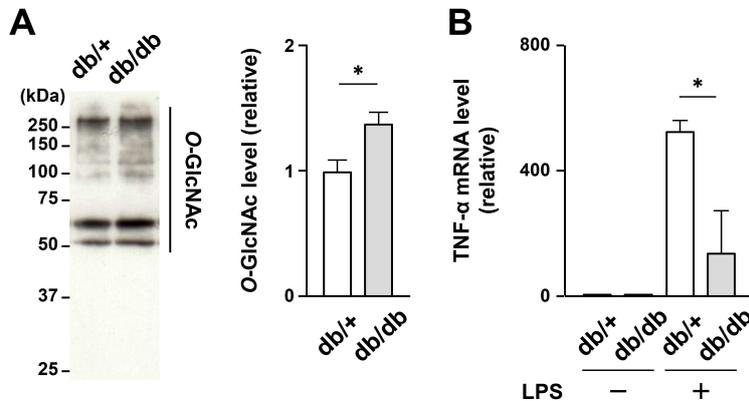


図 1 マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc および TNF- α mRNA のレベルに及ぼす高血糖の影響

(A) *db/+* マウスおよび *db/db* マウスの腹腔滲出性マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベル。平均値±標準誤差 ($n = 6$)。* $P < 0.05$ 。(B) *db/+* マウスおよび *db/db* マウスの腹腔滲出性マクロファージの TNF- α mRNA レベル。マクロファージを 100 ng/ml リポ多糖 (LPS) で 6 時間刺激した。平均値±標準誤差 ($n = 4$)。* $P < 0.05$ 。

2. LPS 刺激によるマクロファージの TNF- α mRNA レベルの増加に及ぼす *O*-GlcNAc 阻害剤の影響

正常マウスのマクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベルは、*O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) の阻害剤 BADGP により有意に低下した (図 2A)。一方、LPS 刺激による TNF- α mRNA レベルの増加は、BADGP により有意に増強した (図 2B)。

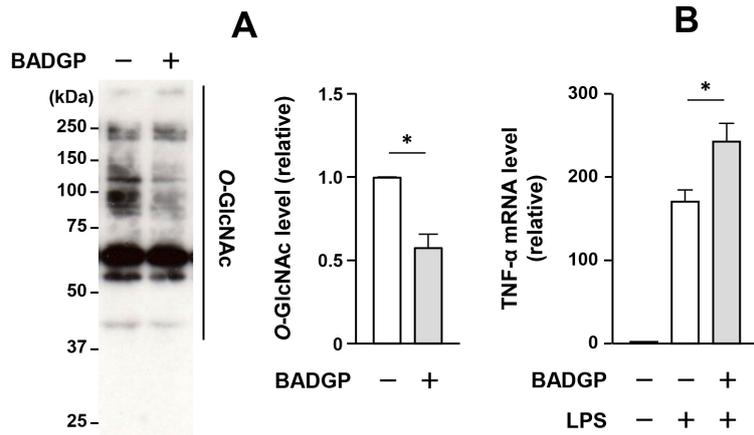


図2 LPS 刺激によるマクロファージの TNF- α mRNA レベルの増加に及ぼす *O*-GlcNAc 阻害剤の影響

(A) 正常マウスの腹腔滲出性マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベル. マクロファージを *O*-GlcNAc 転移酵素阻害剤 BADGP (5 mM) で 8 時間処理した. 平均値±標準誤差 ($n = 3$). * $P < 0.05$. (B) 正常マウスの腹腔滲出性マクロファージの TNF- α mRNA レベル. マクロファージを 5 mM BADGP で 8 時間処理した後, 100 ng/ml リポ多糖 (LPS) で 6 時間刺激した. 平均値±標準誤差 ($n = 6$). * $P < 0.05$.

3. マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc および TNF- α mRNA のレベルに及ぼす自発性運動の効果

マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベルは, SC 群よりも VE 群の方が有意に低かった (図 3A). *O*-GlcNAc 修飾調節酵素のタンパク質レベルは, いずれも二群間で有意な差はなかった (図 3B). TNF- α mRNA レベルは, 未刺激時および LPS 刺激時いずれも, 二群間で有意な差はなかった (図 3C).

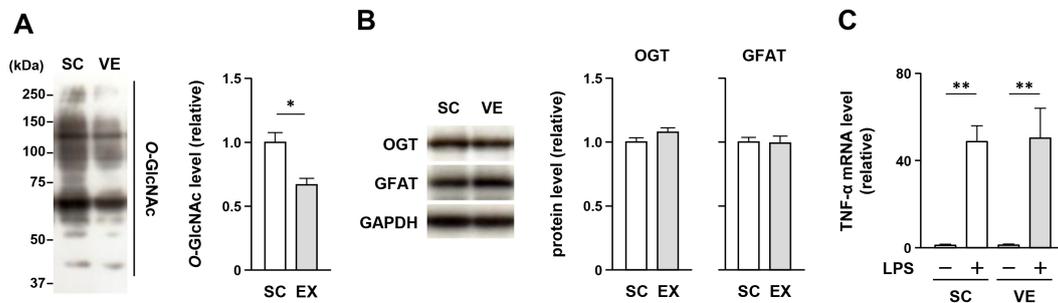


図3 マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc および TNF- α mRNA のレベルに及ぼす自発性運動の効果

(A) 対照群マウスおよび自発性運動群マウスの腹腔滲出性マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベル. (B) 対照群マウスおよび自発性運動群マウスの腹腔滲出性マクロファージの *O*-GlcNAc 修飾調節酵素のタンパク質レベル. (C) 対照群マウスおよび自発性運動群マウスの腹腔滲出性マクロファージの TNF- α mRNA レベル. マクロファージを 100 ng/ml リポ多糖 (LPS) で 6 時間刺激した. 平均値±標準誤差 ($n = 4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

考察

db/db マウスから採取した腹腔滲出性マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベルは、*db/+* マウスよりも高かった。しかし、未刺激時の TNF- α mRNA レベルは、*db/db* マウスと *db/+* マウスとの間で差がなかったことから、腹腔滲出性のマクロファージは、高血糖による炎症性応答を引き起こさないと考えられる。NF- κ B は、*O*-GlcNAc 修飾が亢進すると、その活性が高まることが報告されているが、先行研究では、HEK 293T 細胞を用いている²⁾。従って、NF- κ B の活性に対する *O*-GlcNAc 修飾の影響は、マクロファージと他の細胞種との間で大きく異なる可能性が推定される。

一方、2型糖尿病は、易感染性の原因としても知られている。LPS に対するマクロファージの炎症性応答の惹起は、感染防御に不可欠な生理応答である。2型糖尿病マウスの腹腔滲出性マクロファージは、LPS による TNF- α mRNA 発現誘導が抑制されていた。逆に、正常マウスの腹腔滲出性マクロファージの *O*-GlcNAc レベルを OGT 阻害剤で抑制すると、LPS による TNF- α mRNA 発現誘導は増強された。*O*-GlcNAc は、主にセリン/スレオニン残基に対して付加されることから、リン酸化と拮抗することでも知られている⁴⁾。これらの結果から、高血糖に伴うマクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベルの亢進は、LPS によるシグナル伝達系の活性化と炎症性サイトカインの産生誘導を抑制することにより、生体感染防御能を減弱させていると考えられる。

8週間にわたる自発性運動により、腹腔滲出性マクロファージのタンパク質 *O*-GlcNAc レベルは低下した。しかし、*O*-GlcNAc 修飾調節酵素のタンパク質レベルは、いずれも自発性運動の影響を受けなかった。今後、細胞内の UDP-GlcNAc レベルも分析を進めていく必要がある。さらに、*O*-GlcNAc レベルが低下している条件下で LPS 刺激をしても、TNF- α mRNA 発現誘導は増強されなかった。加えて、私達は、LPS 刺激による NF- κ B および mitogen-activated kinase のリン酸化も、自発性運動による影響を受けないことを明らかにしている⁵⁾。自発性運動による *O*-GlcNAc レベルの低下作用が、なぜこれらのシグナル伝達系に対して影響を及ぼさないのかは、現在までに明らかにすることができなかったが、今後も引き続き、各シグナル伝達タンパク質や転写因子の *O*-GlcNAc レベルの分析を進めていく。

参考文献

- 1) De Taeye BM, Novitskaya T, McGuinness OP, Gleaves L, Medda M, Covington JW, Vaughan DE. Macrophage TNF- α contributes to insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293(3): E713-E725, 2007.
- 2) Allison DF, Wamsley JJ, Kumar M, Li D, Gray LG, Hart GW, Jones DR, Mayo MW. Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF- κ B acetylation and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(42): 16888-16893, 2012.
- 3) Belke DD. Swim-exercised mice show a decreased level of protein *O*-GlcNAcylation and expression of *O*-GlcNAc transferase in heart. *J Appl Physiol (1985).* 111(1): 157-162, 2011.
- 4) Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(1): E17-E28, 2008.
- 5) Shirato K, Imaizumi K, Sakurai T, Ogasawara J, Ohno H, Kizaki T. Regular voluntary exercise potentiates interleukin-1 β and interleukin-18 secretion by increasing caspase-1 expression in murine macrophages. *Mediators Inflamm.* 2017: 9290416, 2017.