

2014年度 修士論文

**顆粒球に注目した運動トレーニングによる
肥満マウスの慢性炎症抑制メカニズムの検討**

早稲田大学 大学院スポーツ科学研究科

スポーツ科学専攻 スポーツ医科学研究領域

5013A050-1

新原 弘之

研究指導教員： 鈴木 克彦 教授

目次

【緒言】	3
【方法】	6
【結果】	10
【考察】	20
【結論】	23
【参考文献】	25

【緒言】

我が国では、食生活の欧米化に伴う脂質摂取量の増加および身体活動量の低下に伴いメタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）の患者が急増している(1)。メタボリックシンドロームは、主に内臓脂肪組織における慢性炎症に起因すると考えられている動脈硬化のような慢性炎症性疾患や癌の病因となり、他にもさまざまな合併症を併発し、その末期には生活の質を著しく低下させることから、運動や栄養による予防、改善などの対策が重要視されている(2,3)。メタボリックシンドロームの発症には全身性の軽微な慢性炎症(systemic low-grade chronic inflammation)が関与することが知られているが、肥満患者ではマクロファージのフェノタイプのスイッチング（M1 マクロファージ、M2 マクロファージ）が引き起こされること、サイトカインや活性酸素などの炎症性メディエーターの血中濃度が健常者と比べ高値を示すこと、また血中の好中球数が増加することも明らかにされている(4,5,6)。近年、慢性炎症性疾患の発症には脂肪組織や肝臓などの組織局所の炎症が重要視されており、組織常在性の好中球やマクロファージなどの免疫細胞が interleukin1- β (IL-1 β) や tumor necrosis factor- α (TNF- α)などのさまざまな炎症性サイトカインや活性酸素を産生することで全身性の炎症や酸化ストレスを誘導することが明らかにされている(7)。実際に、高脂肪食餌によって誘導された肥満マウスの脂肪組織においては、脂肪細胞の肥大化だけでなく、マクロファージの浸潤などの組織学的変化が観察される(8)。最近の研究で、T細胞は脂肪組織の炎症の進展において重要な役割を果たすことが示された(9,10)。なかでも CD8⁺T細胞は脂肪組織に炎症性マクロファージを浸潤させる単球走化性因子である monocyte chemotactic proteins (MCPs)、およびマクロファージが産生する炎症性タンパク質である macrophage

inflammatory proteins (MIPs)などのさまざまな遊走因子を産生することにより、脂肪組織へのマクロファージ浸潤を誘導することが明らかにされている(11,12)。CD8 に対する特異的抗体を投与した肥満マウスでは、M1 マクロファージの浸潤および脂肪組織の炎症が減少することが報告されている(9)。したがって、肥満に伴う組織局所の炎症状態亢進にはさまざまな免疫細胞が相互に作用することによって誘導されることから、これらの炎症性細胞浸潤の抑制に焦点を当てた治療法の開発が重要視されている(13)。

一方、肥満患者に対する運動トレーニングはサイトカインおよび活性酸素などの炎症性メディエーターの血中濃度を低下させることや、白血球のサブタイプを変化させることが報告されている(6,14)。しかしながら、運動トレーニングによる組織局所の炎症状態の改善およびその機序に関しては十分に解明されていなかった。近年、運動トレーニングは肥満マウスにおける脂肪組織や肝臓の慢性炎症を予防することが報告された(15)。加えて、運動トレーニングは肥満マウスの脂肪組織特異的にCD8⁺T 細胞と炎症性マクロファージの浸潤を抑制することが、フローサイトメトリー法および免疫組織染色法を用いた研究により明らかにされてきた(16)。

さらに、CD8⁺T 細胞に加えて好中球や好酸球などの顆粒球が炎症性マクロファージの浸潤を制御することが近年報告されている(17,18)。好中球は抗原提示細胞を活性化させることにより、慢性炎症を促進することが報告されている(19,20,21)。また、肥満マウスの脂肪組織においては好中球の浸潤が増加し、脂肪組織内でケモカインやサイトカインを産生し、マクロファージの浸潤を誘導することで慢性炎症が引き起こされることが報告されている(22)。一方、好中球のプロテアーゼであるエラスター

ぜはさまざまな疾患において炎症反応を促進することが報告されており(23)、肥満マウスにおいてエラスターゼを欠損させるとインスリン感受性の改善や、脂肪組織における好中球やマクロファージを減少させることで、肝臓などの臓器の炎症を改善することが報告されている(17)。しかしながら、食餌誘発性肥満マウスの脂肪組織において運動トレーニングが好中球の浸潤を変化させるか否かは明らかにされていない。そこで、本研究では、脂肪組織内における脂肪細胞以外の細胞群である間質血管細胞分画(stromal vascular fraction : SVF)を採取し、好中球、マクロファージの動態変化と相互作用についてフローサイトメトリー法を用いて解析することによって、食餌誘発性肥満マウスにおける運動トレーニングによる炎症改善メカニズムを検討することを目的とした。

【方法】

1. 実験動物と飼育条件

本実験では生後 4 週齢の C57BL/6J 雄マウス(紀和実験動物研究所, Wakayama, Japan)を 20 週齢になるまでの 16 週間飼育した。室温 21℃、湿度 35%、9:00-21:00 を明期に 21:00-9:00 を暗期に設定した飼育室において 1 ケージに 4 匹のマウスを飼育した。マウスは、無作為に安静＋通常食(normal diet: ND)群(n=15)、安静＋高脂肪食(high-fat diet: HFD)群(n=15)、運動トレーニング＋ND 群(n=15)、運動トレーニング＋HFD(n=15)の 4 群に分けた。なお、本実験は早稲田大学動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号: 2013-A019)。HFD は脂質 60%、タンパク質 20%、炭水化物 20%(D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)、ND は脂質 10%、タンパク質 20%、炭水化物 70%(D12450B; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)の組成の固形飼料を使用した。飲水は水道水を用いた。餌及び、飲水は全ての群で自由摂取とした。動物は毎週秤量した。

2. 運動トレーニング

マウスは生後 4 週から小動物用運動負荷装置 5 KN-73トレッドミル(夏目製作所, Tokyo, Japan)を用いて運動トレーニングを 16 週間負荷した。運動トレーニング群のマウスには 60 分/日、5 回/週、トレッドミル走行を負荷した。走行速度は、最初の 4 週間は 15m/分、残りの 12 週間は 20m/分に設定した。有害なストレスを避けるために、トレッドミルセッション中に電気ショックは使用しなかった。

3. 採血および脂肪、脾臓組織の採取

最後の運動トレーニングが終了した 3 日後に解剖を行った。イソフルラン(アボットジャパン, Tokyo, Japan)吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈から注射針にて血液をヘパリン処理真空採血管(TERUMO, Tokyo, Japan)に採取した。麻酔は、導入時は流速 0.8L/分、濃度 2.0% に設定し、維持麻酔時は流速 0.8L/分、濃度 1.0% に設定した。また、頸椎脱臼の後、精巣上体脂肪組織、脾臓組織を摘出した。精巣上体脂肪組織は秤量した。摘出した脂肪組織の一部は、液体窒素で凍結させた後、-80℃の冷凍庫にて保存した。

4. 脂肪組織から SVF 細胞の単離

SVF 細胞は、精巣上体脂肪組織から単離した。脂肪組織をハサミで切り刻み、ヘパリン 1 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含有する生理食塩水 10mL に添加した。懸濁液を 5 分間遠心分離し、脂肪組織の浮遊片を採取し、Tyrode's buffer を 12.5mL (137mM の NaCl、5.4mM の KCl、1.8mM の CaCl_2 を、0.5mM の MgCl_2 、0.33mM の NaH_2PO_4 、5mM の HEPES、5mM の glucose)、および 2mg/mL の collagenase type 2 (Worthington, Lakewood, NJ, USA)、10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 12.5mL 加えた混合物を 37℃で 20 分間振盪した。その後サンプルを 70 μm の EASY strainer を通して濾過し、5 分間 800g で遠心分離した。SVF 細胞を含むペレットを 2mL の RED BLOOD CELL LYSING BUFFER (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 中に再懸濁し、40 μm の EASY strainer を通して濾過した。そして単離した SVF 細胞を染色バッファー (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) で 2 回染色し、Scepter

Handheld Automated Cell Counter (Millipore Corporation, MA, USA)を用いて計測した。

5. 脾臓細胞の単離

脾臓をマウスから取り出し、シリンジバレルを用いて 70 μ m の EASY strainer を通して押し出した。押し出した細胞懸濁液を 5 分間 800g で遠心分離し、細胞ペレットを 2mL の RED BLOOD CELL LYSING BUFFER (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 中に再懸濁し、そして 40 μ m の EASY strainer を通して濾過した。細胞は染色バッファー (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) で 2 回染色し、Scepter Handheld Automated Cell Counter (Millipore Corporation, MA, USA)を用いて計測した。

6. フローサイトメトリーによる分析

単離した SVF 細胞と脾臓細胞 (1 サンプル当たり 2.5×10^5 個の細胞) は Fc-blocker (eBioscience, San Diego, USA) を加えて 20 分静置し、anti-CD11b, anti-F4/80, anti-Ly-6G (eBioscience, San Diego, USA)と混合し 20 分静置した。フローサイトメトリーは Guava EasyCyte™ 6HT (Millipore Corporation, MA, USA)と InCyte software (Millipore Corporation, MA, USA) を使用して解析した。CD11b⁺, F4/80⁺をマクロファージ、CD11b⁺, Ly-6G⁺を好中球とした。

7. 統計処理

結果は平均値+標準誤差 (SEM) で表した。測定項目の変化については二元配置分散分析を行い、有意水準は 5%未満とした。交互作用が認められた場合には、Post hoc テストとして Bonferroni の検定を行い、有意

水準は 5% 未満とした。なお、全ての分析には SPSS V.19 を用いた。

【結果】

1. 体重

16 週目において、HFD+安静群は ND+安静群及び HFD+運動トレーニング群と比較して有意な高値を示した。また HFD+運動トレーニング群は ND+運動トレーニング群と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$) (Fig. 1)。

2. 脂肪組織重量

運動と食餌の相互作用は認められなかった。しかしながら食餌による主効果が認められ、HFD 群は ND 群と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。また運動による主効果が認められ、運動トレーニング群は安静群と比較して有意な低値を示した ($p<0.05$) (Fig. 2)。

3. 脂肪組織 1g あたりの SVF 細胞数

HFD によって有意な高値を示した ($p<0.01$)。また、HFD 群において運動トレーニング群は安静群と比較して有意な低値を示した ($p<0.01$) (Fig. 3)。

4. 脂肪組織中の好中球の評価

SVF 細胞中における好中球 ($CD11b^+$, $Ly-6G^+$ cells) の構成比率及び絶対数、共に HFD によって有意な高値を示し ($p<0.01$)、運動トレーニングによって有意な低値を示した ($p<0.01$)。また構成比率では、ND 群において運動トレーニング群は安静群と比較して有意な高値を示した ($p<0.01$) (Fig. 4)。

5. 脂肪組織中のマクロファージの評価

SVF 細胞中におけるマクロファージ ($CD11b^+$, $F4/80^+$ cells) の構成比率及び絶対数は、共に HFD によって有意な高値を示し ($p<0.01$)、運動トレーニングによって有意な低値を示した ($p<0.01$) (Fig. 5)。

6. 血中の好中球の評価

血中における好中球 ($CD11b^+$, $Ly-6G^+$ cells) の構成比率及び絶対数は、HFD によって有意な低値を示し ($p<0.01$)、運動トレーニングによって有意な高値を示した。 ($p<0.01$) (Fig. 6)。

7. 血中の単球の評価

血中における単球 ($CD11b^+$, $F4/80^+$ cells) の構成比率及び絶対数は、いずれの群間においても有意な変化は認められなかった (Fig. 7)。

8. 脾臓の好中球の評価

脾臓中における好中球 ($CD11b^+$, $Ly-6G^+$ cells) の構成比率は、運動と食事の相互作用は認められなかった。しかしながら運動による主効果が認められ、運動トレーニング群は安静群と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。絶対数においてはどの群間においても有意な変化は認められなかった (Fig. 8)。

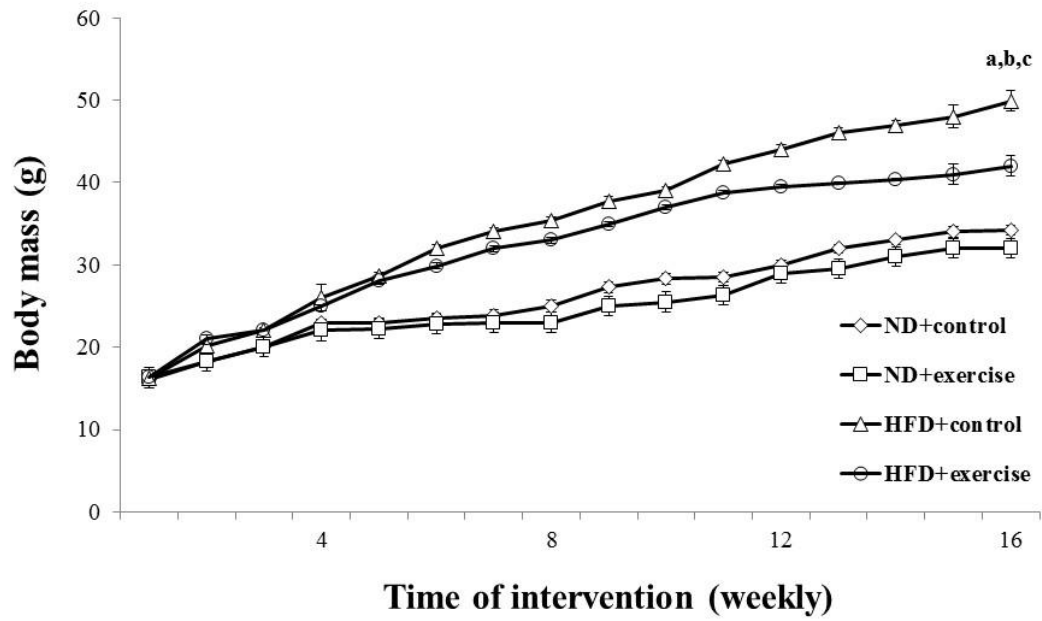


Fig. 1. Body mass between the normal diet (ND) and high-fat diet (HFD) groups in sedentary and exercise mice. Values represent means $\pm$ SEM. Analyses were performed using 2-way ANOVA for multiple comparisons with Bonferroni adjustments. a:HFD+control vs HFD+exercise, b:HFD+control vs ND+control, c: HFD+exercise vs ND+exercise. a,b,c $P < 0.05$.

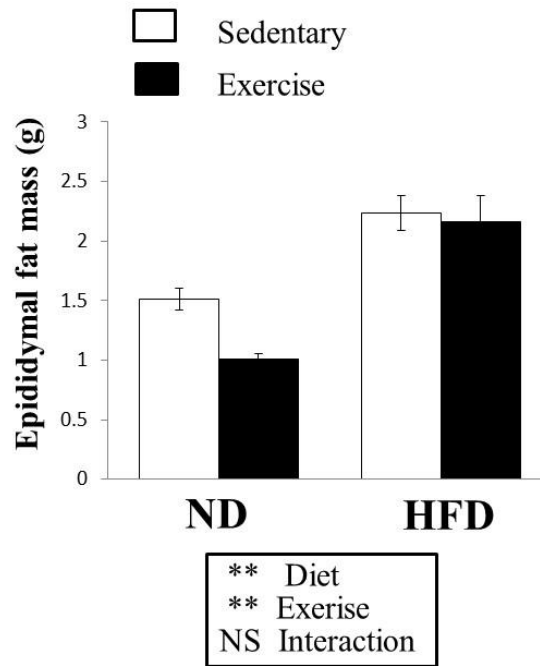


Fig. 2. The comparison of epididymal adipose tissue mass between the normal diet (ND) and high-fat diet (HFD) groups in sedentary and exercise mice. Values represent means $\pm$ SEM. Analyses were performed using 2-way ANOVA for multiple comparisons with Bonferroni adjustments. ** $P < 0.01$. NS: not significant.

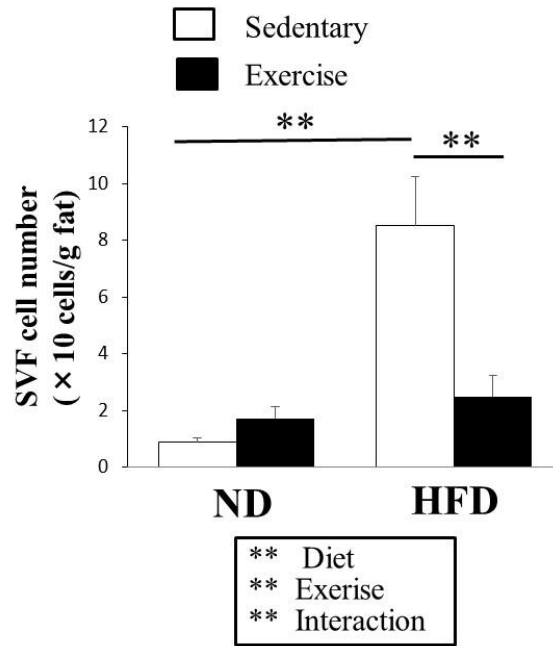


Fig. 3. The comparison of the stromal vascular fraction (SVF) cell number between the normal diet (ND) and high-fat diet (HFD) groups in sedentary and exercise mice. Values represent means $\pm$ SEM. Analyses were performed using 2-way ANOVA for multiple comparisons with Bonferroni adjustments. ** $P < 0.01$.

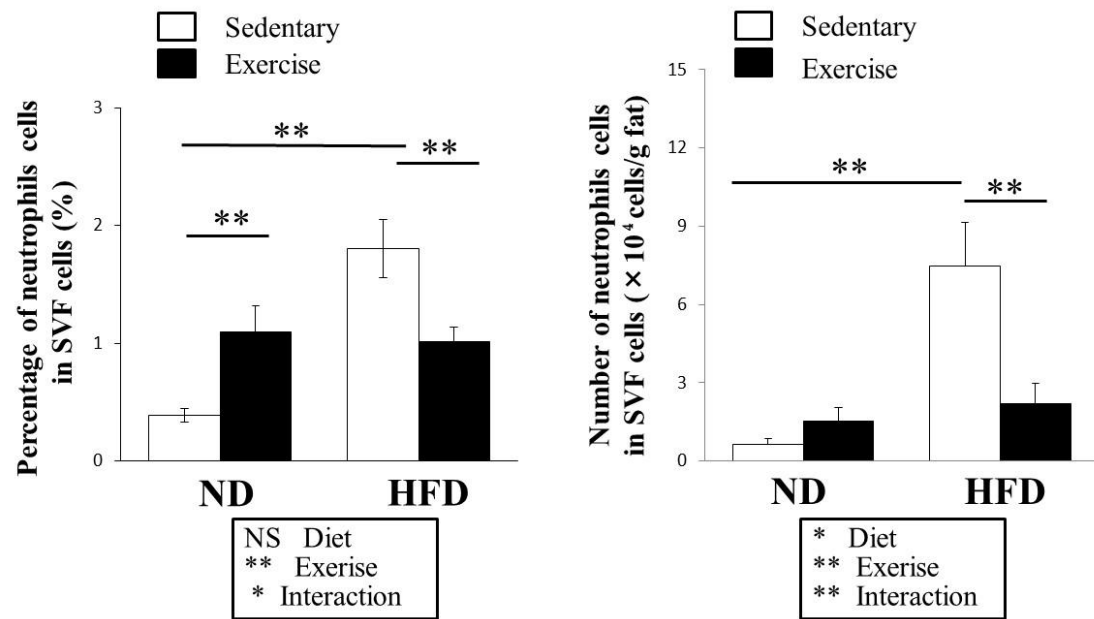


Fig. 4. Effect of exercise training on the infiltration of neutrophils into the visceral adipose tissue between the normal diet (ND) and high-fat diet (HFD) groups in sedentary and exercise mice. (A) Percentage of CD11b⁺, Ly-6G⁺ neutrophils in SVF cells. (B) Number of CD11b⁺, Ly-6G⁺ neutrophils in SVF cells per gram of epididymal adipose tissue. Values represent means $\pm$ SEM. Analyses were performed using 2-way ANOVA for multiple comparisons with Bonferroni adjustments. ** P < 0.01. NS: not significant.

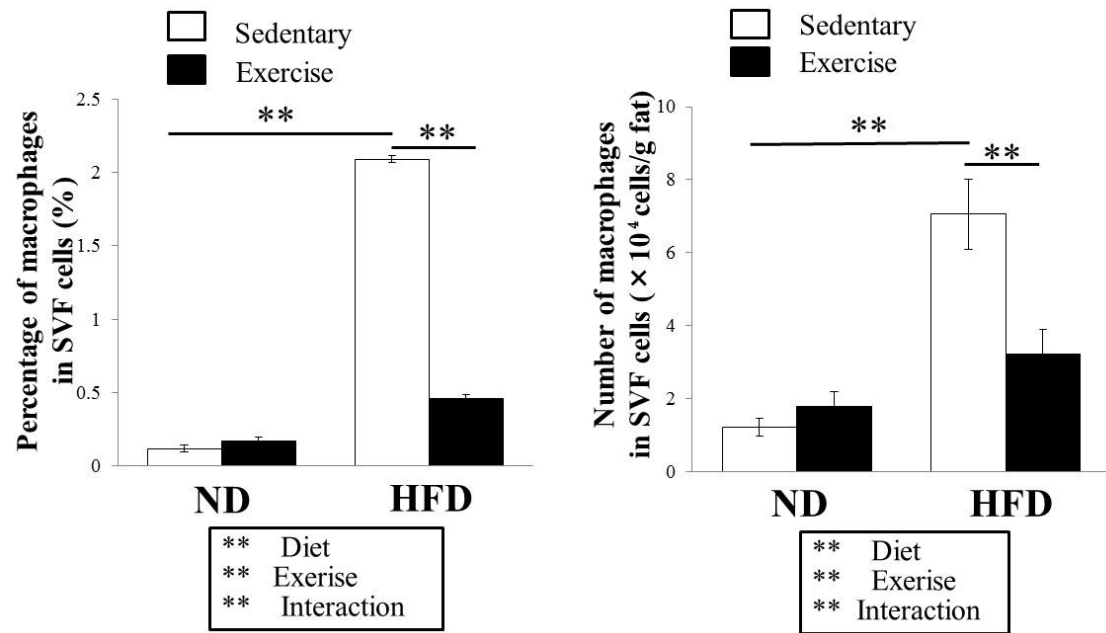


Fig. 5. Effect of exercise training on the infiltration of macrophages into the visceral adipose tissue between the normal diet (ND) and high-fat diet (HFD) groups in sedentary and exercise mice. (A) Percentage of CD11b⁺, F4/80⁺ macrophages in SVF cells. (B) The number of CD11b⁺, F4/80⁺ macrophages in SVF cells per gram of epididymal adipose tissue. Values represent means $\pm$ SEM. Analyses were performed using 2-way ANOVA for multiple comparisons with Bonferroni adjustments. ** $P < 0.01$

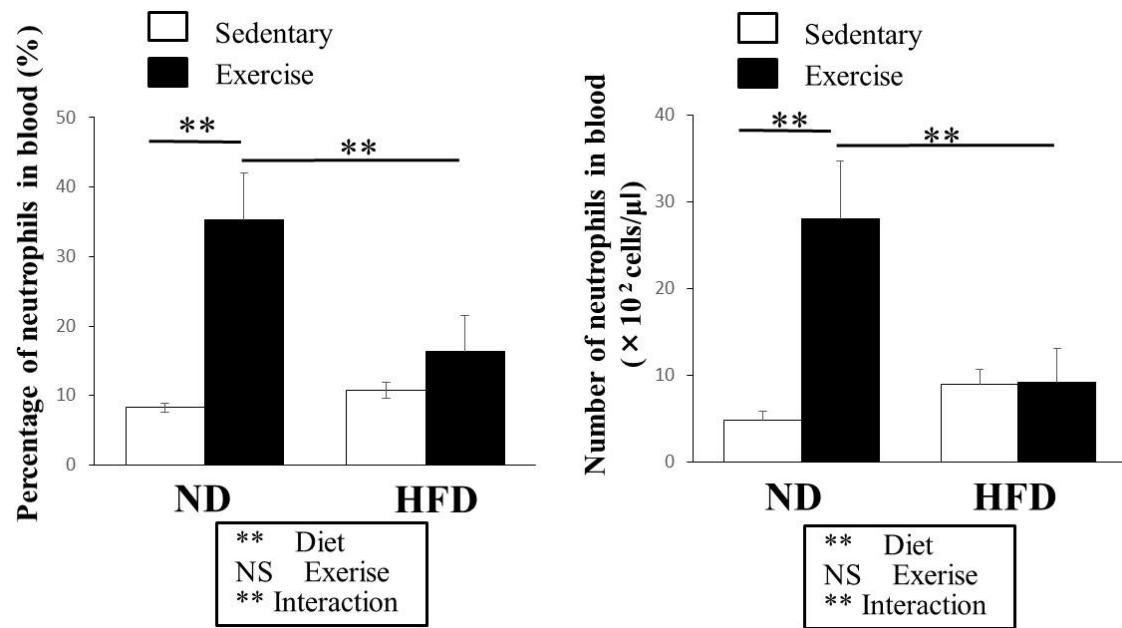


Fig. 6. Effect of exercise training on the neutrophils in blood between the normal diet (ND) and high-fat diet (HFD) groups in sedentary and exercise mice. (A) Percentage of CD11b⁺, Ly-6G⁺ neutrophils in blood. (B) The number of CD11b⁺, Ly-6G⁺ neutrophils in blood. Values represent means $\pm$ SEM. Analyses were performed using 2-way ANOVA for multiple comparisons with Bonferroni adjustments. ** $P < 0.01$. NS: not significant.

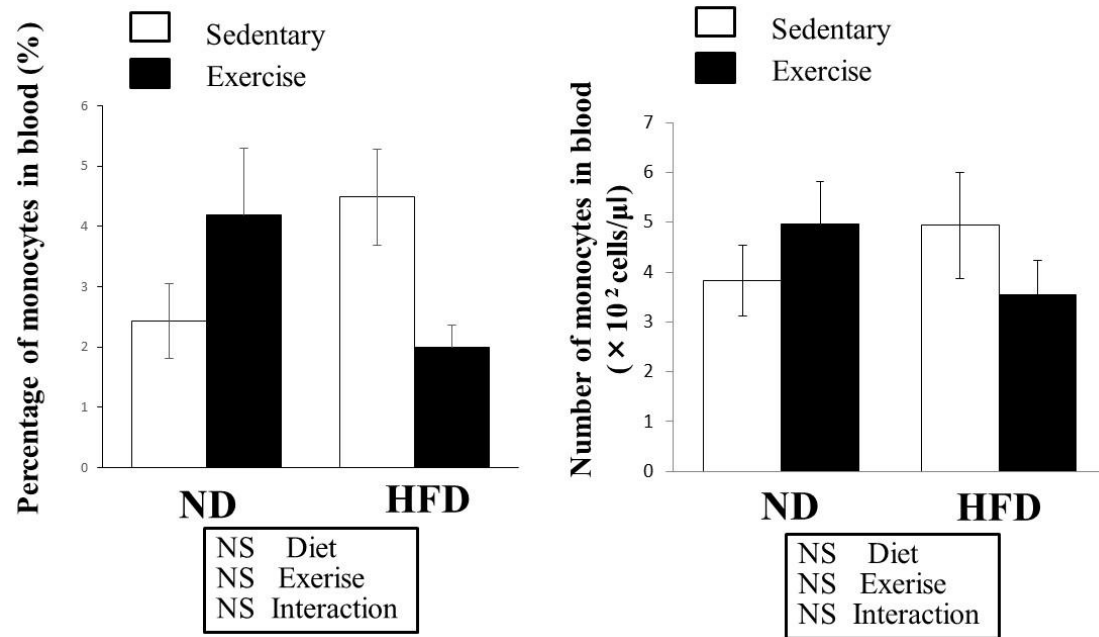


Fig. 7. Effect of exercise training on the percentage of CD11b⁺, F4/80⁺ monocytes in blood between the normal diet (ND) and high-fat diets (HFD) groups in sedentary and exercise mice. (A) Percentage of CD11b⁺, F4/80⁺ macrophages in blood. (B) The number of CD11b⁺, F4/80⁺ macrophages in blood. Values represent means $\pm$ SEM. Analyses were performed using 2-way ANOVA for multiple comparisons with Bonferroni adjustments NS: not significant.

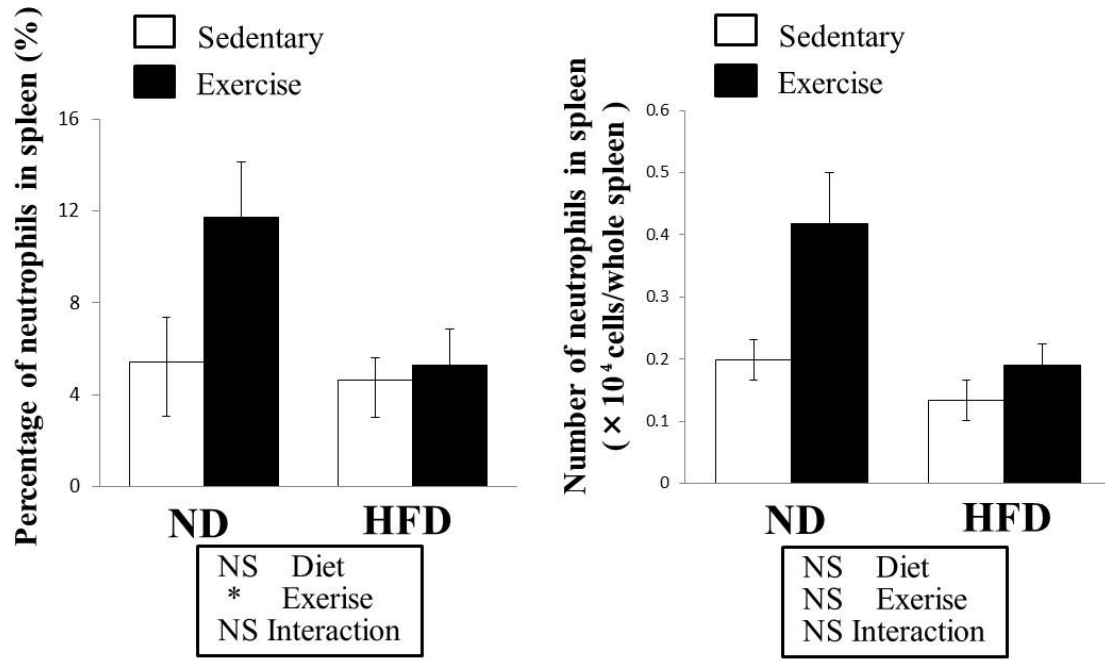


Fig. 8. Effect of exercise training on the percentage of neutrophils into the spleen between the normal diet (ND) and high-fat dies (HFD) groups in sedentary and exercise mice. (A) Percentage of CD11b⁺, Ly-6G⁺ neutrophils in splenocytes. (B) Number of CD11b⁺, Ly-6G⁺ neutrophils in splenocytes. Values represent means $\pm$ SEM. Analyses were performed using 2-way ANOVA for multiple comparisons with Bonferroni adjustments. * P < 0.05. NS: not significant

【考察】

肥満によって引き起こされる脂肪組織の慢性炎症は、2 型糖尿病、動脈硬化症および非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)などの慢性炎症性疾患の病因となることが知られている。我々はこれまでに、運動トレーニングは食餌誘導性肥満マウスの脂肪組織の炎症状態を抑制することを報告してきた(8,15)。さらに、食事誘発性の NASH 病態マウスを用いた我々の研究により、運動トレーニングは肝臓の炎症状態、肝障害および肝線維化などの病態所見を改善するなど慢性炎症の予防効果を示すことを報告してきた(24)。このメカニズムは、運動トレーニングが CD8⁺T 細胞の浸潤を抑制し monocyte chemotactic protein-1(MCP-1)などのマクロファージの走化性因子の産生を抑制することで脂肪組織などへのマクロファージの浸潤を抑制することが関与することも報告してきた(16)。

近年、肥満に伴うマクロファージの組織浸潤に関しては T 細胞以外にも好中球や好酸球などの顆粒球によって制御されることが解明され、好中球由来のプロテアーゼであるエラスターゼはさまざまな疾患において炎症反応を促進することが報告されている(23)。肥満に伴う脂肪組織の慢性炎症にも好中球が重要な役割を果たすことが知られており、肥満マウスにおいて好中球エラスターゼを欠損させるとインスリン感受性の改善や、好中球やマクロファージの浸潤を減少させることで、脂肪組織などの臓器の炎症を改善することが報告されている(17)。しかしながら、運動トレーニングによる肥満マウスの脂肪組織における炎症抑制メカニズムに、好中球がどのように関与するかは明らかにされていない。そこで本研究では、食餌誘発性肥満マウスを用いて、運動トレーニングが血液、脂肪組織及び脾臓における好中球、マクロファージの動態変化と相互作用に及ぼす影響について検討した。

肥満時には脂肪組織において好中球、マクロファージの浸潤が観察される(8,22)。脂肪組織などの組織局所に局在する好中球やマクロファージなどの免疫細胞は IL-1 β や TNF- α といったさまざまな炎症性サイトカインや活性酸素を産生することで、局所性および全身性の慢性炎症や酸化ストレスを誘導することが明らかにされている(7)。本研究では血液および脂肪組織における好中球、マクロファージの構成比率及び絶対数をフローサイトメトリー法により分析した。この現象から高脂肪食によって脂肪組織中の好中球の構成比率及び絶対数が増加し、運動トレーニングにより減少することが示された。したがって、運動トレーニングにより脂肪組織への好中球の浸潤を抑制することで脂肪組織の炎症を抑制できる可能性が示された。またマクロファージにおいても高脂肪食によって脂肪組織中の構成比率及び絶対数は増加し、運動トレーニングにより減少することが示された。この現象は食餌誘発性肥満マウスに運動トレーニングを負荷した先行研究同様であり、運動トレーニングにより脂肪組織へのマクロファージの浸潤を抑制することが示された(16)。先行研究において、好中球エラスターゼを欠損させたマウスに高脂肪食を投与しても脂肪組織の好中球やマクロファージが増加せず、組織炎症が少ないことから、高脂肪食餌を投与したマウスの脂肪組織内好中球がケモカインやサイトカインを放出してマクロファージの浸潤を促進し、慢性炎症を引き起こす可能性が報告されている(16)。よって本研究においても、脂肪組織内においてマクロファージが増加したのは、好中球の浸潤が原因である可能性が示唆された。さらに、運動トレーニングによって脂肪組織内のマクロファージが減少したのは、運動トレーニングによって脂肪組織内への好中球浸潤が抑制されたことが要因である可能性が示唆された。

また血液中の好中球、単球の構成比率及び絶対数をフローサイトメトリー法で分析したところ、脂肪組織とは異なり HFD によって増加せず、運動トレーニングによって減少しなかった。これは肥満による炎症により、血中の好中球、単球が脂肪組織などに浸潤したからと考えられる。

また脾臓組織における好中球の構成比率及び絶多数をフローサイトメトリー法により分析した。その結果、高脂肪食及び運動トレーニングによる変化は認められなかった。本研究と同様に、食餌誘発性肥満マウスにおける運動トレーニングを行った研究において、脾臓組織における $CD8^+T$ 細胞誘導性マクロファージの構成比率は変化しないことが示されている (16)。以上のことから、運動トレーニングによる好中球のマクロファージ誘導の抑制は脂肪組織特異的である可能性が示唆された。

【結 論】

本研究では、食餌誘発性肥満マウスの脂肪組織において長期間の高脂肪食により好中球、マクロファージが増加し、運動トレーニングにより減少することが示された。よって、食餌誘発性肥満マウスの脂肪組織における炎症には好中球、マクロファージが関与しており、運動トレーニングはそれらの炎症細胞浸潤を抑制することにより脂肪組織の炎症を改善している可能性が考えられる。

【謝 辞】

本稿の作成にあたり、御懇篤な御指導ならびに激励を賜りました鈴木克彦先生、実験計画、実験手法、論文作成に至るまで懇切丁寧に御指導して頂きました川西範明さん、溝上翼さん、矢田光一さんをはじめとする予防医学研究室の先輩方、関係者の方々に厚く感謝申し上げます。

【引用文献】

- 1 健康・栄養情報研究会,国民栄養の現状,第一出版,2000;29-120
- 2 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.* 2003;112:1821–1830.
- 3 Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.*2004;25:4–7.
- 4 Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117:175–184.
- 5 Wellen KE, Hotamisligil GS. *J Clin. Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest.* 2005;115:1111-1119.
- 6 Johannsen NM, Priest EL, Dixit VD, Earnest CP, Blair SN, Church TS. Association of white blood cell subfraction concentration with fitness and fatness. *Br J Sports Med.* 2010;44:588-593.
- 7 Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2011;121:2111-2117.
- 8 Kawanishi N, Niihara H, Mizokami T, Yano H, Suzuki K. Exercise training attenuates adipose tissue fibrosis in diet-induced obese mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;440:774-779.
- 9 Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes.* 2002;51:1319–1336.

- 10 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.* 2009;15:914-920.
- 11 Ruah ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes.* 2008;32:451–463.
- 12 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.* 2006;116:1494–1505.
- 13 Kurokawa J, Nagano H, Ohara O, Kubota N, Kadowaki T, Arai S, Miyazaki T. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:12072-12077.
- 14 Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 5;11:607-615.
- 15 Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev.* 2010;16:105-118.
- 16 Kawanishi N, Mizokami T, Yano H, Suzuki K. Exercise attenuates M1

- macrophages and CD8⁺ T cells in adipose tissue of obese mice. *Med Sci Sports Exerc.* 2013;45:1684-1693.
- 17 Talukdar S, Oh da Y, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB, Olefsky JM. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med.* 2012;18:1407-1412.
- 18 Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science.* 2011;332:243-247.
- 19 Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:519–531.
- 20 Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:173–182.
- 21 Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010; 33:657–670.
- 22 Elgazar–Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R. Neutrophils transiently infiltrate intra–abdominal fat early in the course of high–fat feeding. *J Lipid Res.* 2008;49:1894–1903.
- 23 Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:541–550.
- 24 Kawanishi N, Yano H, Mizokami T, Takahashi M, Oyanagi E, Suzuki K. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced obesity in mice. *Brain Behav*

Immun. 2012;26:931-941.