

機関番号 : 12601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790865

研究課題名 (和文)

光イメージングによる肥満脂肪組織における慢性炎症・免疫異常の解明

研究課題名 (英文)

In vivo imaging reveals inflammatory and immune processes of adipose tissue obesity.

研究代表者

西村 智 (NISHIMURA SATOSHI)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号 : 80456136

研究成果の概要 (和文) :

最近の研究では、各種生活習慣病 (肥満、メタボリックシンドロームなど) の背景には、慢性炎症を基盤とした異常な細胞間相互作用が生体内で生じていることが明らかになってきた。我々は、「生体内で細胞をみて、働きを知る」「生体分子イメージング手法」を独自に開発し、脂肪組織の肥満に伴うリモデリングを検討した。肥満脂肪組織では、脂肪細胞分化・血管新生が空間的に共存して生じており、さらに、肥満脂肪組織の微小循環では炎症性の細胞動態が認められた。また、脂肪組織の間質には多くのリンパ球が存在し、CD8 陽性 T 細胞はマクロファージを肥満脂肪組織に浸潤させ肥満脂肪組織炎症を増幅していた。我々の開発した生体イメージングは、従来の手法ではアプローチできなかった細胞間相互作用を生体内で直接可視化することで、多くの研究領域において今後重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要 (英文) :

Metabolic syndrome is a major risk factor of cardiovascular events, and obese visceral adipose tissue remodeling and malfunctioning based on chronic inflammation and local immunological changes plays a central role. To assess dynamic interplay between multiple cell-types in obese adipose, a visualization technique in vivo was therefore developed. In vivo imaging revealed close spatial and temporal interrelationships between angiogenesis and adipogenesis in obese adipose, and these inflammatory cell clusters included inflammatory “M1” macrophages). Increased leukocyte-platelet-endothelial cell interactions in the microcirculation of obese adipose were also observed, a hallmark of inflammation. The activation of platelet and increased adhesion molecule contribute to the inflammatory cellular dynamics, such as “rolling and adhesion” of leukocyte and platelet. We also found that large numbers of CD8+ effector T cells infiltrated into obese adipose. The infiltration by CD8+ T cells preceded the accumulation of macrophages, and immunological and genetic depletion of CD8+ T cells reduced macrophage infiltration and adipose tissue inflammation, and ameliorated systemic insulin resistance. CD8+ T cells contribute to the macrophage recruitment in obese adipose tissue, and adipose tissues inflammation in obesity. This imaging technique can be applied to many diseases including thrombosis. Our results clearly demonstrated the power of our imaging technique to analyze complex cellular interplays in vivo and to evaluate new therapeutic interventions against them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：肥満、脂肪組織、メタボリックシンドローム、慢性炎症

### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳卒中など動脈硬化性疾患の重大なリスク要因として、内臓肥満とインスリン抵抗性を基礎とするメタボリックシンドロームが注目されている。肥満に伴い蓄積した内臓脂肪は多様なアディポサイトカインを分泌する等、インスリン抵抗性や動脈硬化の発症に必須の役割を担っていると考えられる。しかし、脂肪組織の肥満における役割は必ずしも明らかではなく、脂肪組織が臓器としてどのように機能異常を起こすのか、その分子機構はよく分かっていない。

### 2. 研究の目的

最近の研究により、心筋梗塞や脳卒中などの原因となるメタボリックシンドロームや動脈硬化、さらに悪性腫瘍は慢性炎症を本態とすることが明らかになってきた。例えば、メタボリックシンドロームでは、遺伝子素因に加えて、内臓肥満・加齢・喫煙などの外的誘因が加わって、全身・局所に持続的かつ低レベルの慢性炎症が持続し、様々な病態を形成している。つまり、三大疾病の元となる生活習慣病や悪性腫瘍の根底には慢性炎症が介在していると考えられる。感染症に代表される急性炎症に関しては病態の理解とともに、感染症に対する特効薬（抗生物質）が開発され、一定の治療成績を上げてきた。しかし、慢性炎症を基盤とする慢性疾患に関しては、慢性炎症の病態が不明であることから特効薬が存在せず、依然として多くの有病患者と高い死亡率を生ずる要因となっている。

我々は、独自に開発した「生体分子イメージング手法」を、脂肪組織に適用し、メタボリックシンドロームの病態にアプローチを行ってきた。我々の開発したイメージングは、従来の手法ではアプローチできなかった細胞間相互作用を生体内で直接可視化するものであり、多くの研究領域において今後重要な役割を果たすと考えられる。

### 3. 研究の方法

本稿では我々は開発した「生体分子イメージング」手法について概説する。我々はまず、「脂肪組織をよりよくみるために」、レーザー共焦点顕微鏡を用いて、生きたままの組織をそのまま染色する、「生組織イメージング手法」を開発した。手法としては、脂肪組織をマウスより取り出し、未固定のまま細かく切り出し、蛍光色素の入った培養液中でインキュベートし、生きたまま蛍光標識を行う。脂肪細胞は蛍光標識された脂肪酸で、血管内皮は蛍光標識レクチンで、核はヘキストで染色し、肥満に伴う脂肪組織リモデリングの詳細を明らかにした。通常の固定した組織切片標本では、脂肪組織は白く抜けた脂質と、細胞質・核の集合体として漠然としか組織構築が捉えられなかったが、我々の手法では組織構築の詳細が可視化された。

新たに開発した「生体内分子イメージング手法」を概説する。高速レーザー共焦点顕微鏡を用いて、血流の方向と平行にごく狭い断面に焦点を合わせて画像取得し、血管内を變形しながら流れる赤血球・白血球・血小板に各々フォーカスを合わせて観察が可能となった。血管内の細胞動態を明らかにするためには高速な画像取得が必須だが、我々は主に多数のピンホールを有する円盤を高速回転させて画像を取得するニポウ式の共焦点ユニット（横河電機 CSU X1）及びレゾナンス型高速共焦点システム（Nikon A1R）を用いることにより、高速イメージングを行っている。なお、我々のシステムでは、空間解像度は回折限界（光を用いて観察する際に、理論上、最大で得られる解像度が決まっていること）に既に達している。また、我々は高速スキヤニングレーザー共焦点を用いて、多色マルチカラー撮影にも成功している他、二光子による画像取得にも成功している。

### 4. 研究成果

**肥満脂肪組織における生体分子イメージング**

## グの意義

動脈硬化・心血管疾患の原因として、末梢組織（骨格筋・脂肪組織）の機能異常が重要であると考えられるようになった。特に、脂肪組織は、長年、脂肪を蓄積するのみの「何もしない臓器」と考えられてきた。近年のライフスタイルの変化（食生活の欧米化）に伴う肥満・メタボリックシンドロームの蔓延により、脂肪組織は、様々な病気を引き起こす「活発な代謝臓器」として一躍、注目を浴びるようになった。内臓脂肪はアディポサイトカインを分泌することからも、肥満に伴うインスリン抵抗性や動脈硬化の発症に必須の役割を担っていると考えられる。しかし、脂肪組織の肥満における役割は必ずしも明らかではなく、脂肪組織が臓器としてどのように機能異常を起こすのか、その分子機構は十分解明されているとは言えない。Weisbergらによる肥満脂肪組織に炎症性マクロファージが浸潤の報告を初めとして、肥満脂肪組織における慢性炎症の関わりについては複数のグループが報告しており、現在では肥満脂肪組織のリモデリングの背景に慢性炎症が存在することは明らかと考えられている。しかし、従来の切片標本を用いた組織観察では、脂肪組織における血管や組織間質に存在する細胞群の三次元的構造の詳細は観察不能であり、生体内の細胞動態も不明であった。我々はメタボリックシンドロームの病態解明を目指し、新たに開発したイメージング手法を用いて、肥満に伴う脂肪組織の再構築（リモデリング）と機能異常を検討した。

## 生体内の脂肪組織の可視化 生体分子イメージングの開発

従来、肥満に伴って脂肪組織内で慢性炎症が起きていることが示唆されていたが、その詳細な機序は不明であった。そこで、我々は本イメージング手法を生体に応用し「生きた動物の体内を手取るように可視化すること」に成功し、肥満組織において炎症性の細胞動態が生じていることを可視化手法により明確に示した。

動脈硬化のように血管が主な傷害の場になる病態だけでなく、腫瘍やメタボリックシンドロームにおいても、血流や血管機能といった生体内のダイナミックな変化、組織学的変化に先行する初期の炎症性変化を捉えることが可能な生体内分子イメージング技術は非常に有用である。従来の生体内観察では、透過光による観察が容易な腸間膜の微小循環を用いた研究が主に行われてきたが、近年の光学観察系・蛍光プローブの開発により、蛍光物質をトレーサーとして、透過光観察が不可能な厚みを有する実質臓器の血流観察も可能になった。時間・空間解像度も飛躍的に改善し、細胞内小器官レベルでの解析が可能となっている。

## 肥満脂肪組織と慢性炎症

我々は生体内分子イメージング手法を肥満内臓脂肪組織に応用することにより、脂肪組織内の微小血管で炎症性変化が起きていることを明らかにした。すなわち、肥満動物（ob/ob マウス、高脂肪食負荷肥満モデル動物）の白色脂肪組織内微小循環の観察で、細静脈において血管壁への白血球の rolling・adhesion が有意に増加していることをイメージングにより示した。肥満脂肪組織中では血流が間歇的に低下し、低酸素状態である事も確認された。また、白血球の血管壁への付着には活性化血小板の付着が伴っていた。すなわち、動脈硬化病変で知られているような炎症性の細胞動態が、肥満した脂肪組織の微小循環でも認められ、肥満脂肪組織そのものが炎症の場であることが示された。本イメージングでは単一血小板も生体内で捉えられており、血栓形成の詳細を可視化することも可能である。

## CD8 陽性T細胞の重要性 肥満病態の最も初期のトリガーは何か？

我々は、分子イメージング及びFACSを用いた解析から、脂肪組織の間質に多くのリンパ球が存在することも明らかにした。痩せ形マウスでも間質細胞の約10%はT細胞であり、肥満に伴ってその数は増加する。T細胞サブセットの解析では、肥満に伴い、CD8陽性T細胞の増加、CD4陽性T細胞・制御性T細胞の減少が認められた。このように脂肪組織局所においてはマクロファージやT細胞をはじめとする多様な細胞が相互作用し、メタボリックシンドロームの病態を形成していると考えられる。我々はさらに、CD8ノックアウトマウスおよび中和抗体を用いた検討、及び、複数の細胞種を用いたin vitroでの共培養の実験を行い、肥満脂肪組織におけるCD8陽性T細胞の役割を明らかにしている。すなわち、肥満脂肪組織ではCD8陽性T細胞がポリクローナルに活性化しており、このCD8陽性T細胞は骨髄由来の単球からマクロファージへの分化、および、マクロファージの肥満脂肪組織への遊走・活性化を促進していた。つまり、肥満脂肪組織における炎症性マクロファージ浸潤の初期のトリガーがCD8陽性T細胞の浸潤であることが示唆された。異常な肥満脂肪組織における局所免疫が、全身及び肥満脂肪組織の炎症、さらに糖尿病病態を引き起こしていることが示された。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計13件）

1. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced

glucose uptake by skeletal muscle.

Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, **Nishimura S**, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. *Cell Metab.* 2011;13(3):294-307. (査読有り)

2 Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells.

Takayama N, **Nishimura S**, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. *Journal of Experimental Medicine*, 2010; 207(13):2817-2830 (査読有り)

3. Involvement of CaV3.1 T-type calcium channels in cell proliferation in mouse preadipocytes.

Oguri A, Tanaka T, Iida H, Meguro K, Takano H, Oonuma H, **Nishimura S**, Morita T, Yamasoba T, Nagai R, Nakajima T. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298(6):C1414-23.. (査読有り)

4. Adipose tissue remodeling and chronic inflammation in obesity visualized by in vivo molecular imaging method

**Nishimura S**, Nagasaki M. *Journal of Biorheology*, 2010, Volume 24, Number 1, 11-15. (査読有り)

5. Essential in vivo roles of the c-type lectin receptor CLEC-2: Embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, **Nishimura S**, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y. *J Biol Chem.* 2010 285(32):24494-507 (査読有り)

6. Structural Heterogeneity in the Ventricular Wall Plays a Significant

Role in the Initiation of Stretch-Induced Arrhythmias in Perfused Rabbit Right Ventricular Tissues and Whole Heart Preparations

Seo K, Inagaki M, **Nishimura S**, Hidaka I, Sugimachi M, Hisada T, Sugiura S. *Circ Res*, 2010, 106, 176-184. (査読有り)

7. Lnk/Sh2b3 regulates integrin alpha-IIb-beta3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus *in vivo*

**Nishimura S\***, Takizawa H\*, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K. (\*same contribution) *J Clin Invest.*, 2010, 120(1): 179-190. (査読有り)

8. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload

Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, **Nishimura S**, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway S, Nagai R. *J Clin Invest.*, 2010, 120(1): 254-265. (査読有り)

9. A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth in vivo.

Yagi N, Manabe I, Tottori T, Ishihara A, Ogata F, Kim JH, **Nishimura S**, Fujiu K, Oishi Y, Itaka K, Kato Y, Yamauchi M, Nagai R. *Cancer Res.* 2009 15;69(16):6531-8. (査読有り)

10. Adipose Tissue Inflammation in Obesity and Metabolic Syndrome

**Nishimura S**, Manabe I, Nagai R. *Discovery Medicine* 2009, vol 8, no 41, 55-60. (査読無し)

11. CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity

**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. *Nature Medicine*, 2009, 15:8, 914-920. (査読有り)

12. Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, **Nishimura S**, Manabe I, Gonda K,

Yoshimura K.  
IFATS Series: FGF-2-induced HGF Secretion  
By Adipose-Derived Stromal Cells Inhibits  
Post-Injury Fibrogenesis Through A  
JNK-Dependent Mechanism.  
Stem Cells, 2009;28:238-249. (査読有り)

**13. Nishimura S\***, Nagasaki M\*, Manabe I,  
Kadowaki T, Nagai R.

(\* These two authors contributed equally  
to this work)

Obese adipose tissue remodeling,  
malfunctioning, and chronic inflammation  
visualized by in vivo molecular imaging  
Inflammation and Regeneration, 2009,  
29(2), 126-130. (査読無し)

[学会発表] (計 112 件)

1. 2010.12.7-10. 神戸 第 33 回日本分子生  
物学会年会・第 83 回日本生化学会大会  
BMB2010

ワークショップ「生体 4D イメージングによ  
る細胞ダイナミクス研究の最前線」

生体二光子 4D イメージングによる生活習慣  
病病態解析:慢性炎症を背景とする実質と間  
質のクロストーク (招待講演)

In vivo two-photo 4D imaging reveals  
parenchymal and interstitial cell  
cross-talks in chronic inflammatory  
disease

**西村智**、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永  
井良三

2. 2010.10.31-11.3. The 11<sup>th</sup> International  
Congress of the Immunology of Diabetes  
Society

In vivo imaging reveals inflammatory  
processes in adipose tissue  
microcirculation: parenchymal and stromal  
cell cross talks (Symposium, invited)

**Nishimura S**, Nagasaki M, Manabe I, Eto K,  
Nagai R

その他

[図書] (計 35 件)

1. 最新医学 最新医学社 66 巻 10 号「分子  
イメージングの最先端」生体分子イメージング  
手法でみる血栓形成過程と血小板機能

**西村智**、長崎実佳

2. Annual Review 血液 2011 中外医学社  
168-173pp.

生体分子イメージングでみる慢性炎症を背  
景とした血栓形成過程と血小板機能

**西村智**

その他

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: 血栓形成を抑制する作用を有する組  
成物

発明者: 江藤浩之, 西村智, 中内啓光, 岩倉洋  
一郎

権利者: 江藤浩之 40%, 西村智 40%, 中内啓光  
10%, 岩倉洋一郎 10%

種類: 特許

番号: 出願済審査中

出願年月日: 2010 年 8 月 12 日

国内外の別: 国内特許

2. 名称: 生体イメージングによる血小板機能  
評価システム

発明者: 西村智

権利者: 西村智 100%

種類: 特許

番号: 出願済審査中

出願年月日: 2010 年 6 月 1 日

国内外の別: 国内特許

○取得状況 (計 0 件)

該当無し

[その他]

**ホームページ等**

<http://www.invivoimaging.net/>

**受賞歴**

2010.12.1-2. 東京 第 16 回武田科学振興財  
団生命科学シンポジウム Excellent Poster  
Award

2010.6.3-4. 埼玉 平成 22 年度日本バイオ  
レオロジー学会論文賞

2010.3.6. 京都 日本循環器学会第 19 回八  
木賞

2010.2.26-27. 東京 第 33 回日本微小循環学  
会総会 Young Investigator Award 最優秀  
賞

2010.1.18. 東京 日本顕微鏡学会バイオメ  
ディカルニューマイクロスコープ分科会平  
成 21 年度講演会 最優秀演題

2009.12.6. サンディエゴ Olympus  
BioScapes Digital Imaging Competition,  
Honorable Mention Award

2009.11.27. 京都 第 19 回日本循環薬理学  
会 Young Investigator's Award

2009.7.3-4. 金沢 第 17 回マクロファージ分  
子細胞生物学国際シンポジウム Young  
Investigator's Award

2009.6.2-4. 名古屋 第 61 回日本細胞生物  
学会大会 若手優秀発表賞

2009. 4. 14 東京 平成 21 年度 文部科学大臣  
表彰 若手科学者賞

#### マスコミ発表

2011. 02. 28. 日刊工業新聞第一面  
血管内部を瞬時観察 東大がシステム マウスの血栓も確認

2010. 12. 4. NHK 教育 TV サイエンス ZERO  
「バイオイメージングが医療を変える」

2010. 6. 3. Medical Tribune  
第 47 回臨床分子医学会 機能的な血小板を分化誘導

2009. 12. 24. Nature アジアパシフィック  
脂肪細胞をめぐる分子レベルのメタボ研究

2009. 12. 24. 日経産業新聞  
iPS 細胞由来血小板 血管内の動き追跡 東大 再生医療で品質確認

2009. 9. 24. 技術評論社 知りたい！サイエンスシリーズ 光る生き物—ここまで進んだバイオイメージング技術— 「光る細胞が教えてくれること」

2009. 9. Digital Medicine no.42, p17, 東京大学  
メタボを引き起こす T リンパ球作用を発見

2009. 7. 27. 朝日新聞  
メタボ原因 内臓脂肪の炎症 免疫調整の薬で治療の可能性も 東大グループが解明

2009. 7. 27. 読売新聞  
「メタボ症候群」リンパ球が原因 治療薬開発に道 東大グループ解明

2009. 7. 27. 東京新聞  
メタボ発症引き金発見 T リンパ球脂肪に炎症起こす 東大、治療薬開発にも期待

2009. 7. 27. 毎日新聞  
メタボの仕組みを解明 東大マウス実験 免疫細胞が炎症誘発

2009. 7. 27. 日本経済新聞  
メタボ元凶の炎症 リンパ球が関与 東大、予防薬実現に道

2009. 7. 29. 産経新聞  
メタボ→生活習慣病の原因 T リンパ球 東大研究グループ解明

2009. 7. 27. 時事通信  
メタボ引き起こす仕組み解明＝リンパ球、脂肪炎症に関与—治療薬開発にも期待・東大

2009. 7. 27. Biotechnology Japan  
東京大学、肥満で CD8 陽性 T リンパ球が起こす内臓脂肪の炎症が耐糖能障害やインスリン抵抗性につながることを発見

2009. 7. 27. 日経 Health Online  
東大の研究グループがメタボ症候群の発症メカニズムを解明  
免疫の司令塔 T リンパ球が、内臓脂肪での“炎症”に関与

2009. 7. 27. Medical Tribune MT pro  
免疫系の司令塔がメタボリックシンドロームでも重要な役割

「T 細胞が脂肪組織の炎症を惹起」と東大循環器内科グループ

2009. 7. 30. 財経新聞

メタボ引き起こす仕組み解明＝リンパ球、脂肪炎症に関与—治療薬開発にも期待・東大

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西村 智 (NISHIMURA SATOSHI)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：80456136

##### (2) 研究分担者

該当無し

##### (3) 連携研究者

該当無し