

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591298

研究課題名(和文) 生体分子イメージングによるメタボリックシンドロームの病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation in the pathogenesis of metabolic syndrome with in vivo molecular imaging

研究代表者

山下 尋史 (Yamashita, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50323572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：肥満脂肪組織では、CD8陽性T細胞が浸潤していることを既に報告したが、本研究においては、制御性B細胞が多量に存在することが明らかになった。このB細胞(脂肪Breg)は通常のB1、B2細胞とは表面マーカーの発現が異なり、新たなサブセットの細胞であった。サイトカイン産生能の検討では、脂肪BregはIL-10を無刺激でも高発現している点で今まで報告されている制御性B細胞とは異なり、脂肪Bregの特異な形質を示している。B細胞特異的IL-10欠損マウスを作成したところ、脂肪組織の炎症が惹起されインスリン抵抗性が増悪していた。即ち、脂肪Bregは脂肪組織の炎症を抑制的に制御することが示された。

研究成果の概要(英文)：Obesity is known to induce local inflammation within adipose tissue that contributes to systemic metabolic abnormalities. We investigated the underlying mechanisms that modulate adipose inflammation. We identified Breg cells that produce interleukin-10 constitutively within adipose tissue. B cell-specific IL10 deletion enhanced adipose inflammation and insulin resistance in diet-induced obese mice, whereas adoptive transfer of adipose tissue Breg cells ameliorated those effects. Adipose environmental factors, including CXCL12 and free fatty acids, support Breg cell function, and Breg cell fraction and function were reduced in adipose tissue from obese mice and humans. Our findings indicate that adipose tissue Breg cells maintain homeostasis within adipose tissue and that Breg cell dysfunction contributes pivotally to the progression of adipose tissue inflammation in obesity and may play significant roles in the pathogenesis of metabolic syndrome.

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：メタボリックシンドローム 生体分子イメージング 慢性炎症 肥満 制御性B細胞 インターロイキン
10

1. 研究開始当初の背景

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全ての根源は慢性炎症と考えられる。しかし、慢性炎症の病態が不明であることから病態に対する特效薬が存在せず、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。慢性炎症には複数の細胞種が関与する細胞動態・ネットワークの異常と、組織の再構築が基盤にあると考えられる。

従来の分子生物学的手法を用いた病態解析は、試験管内での個々の遺伝子機能の解析(In vitro)から始まり、遺伝子改変動物を用いた各遺伝子の表現型の解析(In vivo)へと発展してきた。しかし、慢性炎症を基盤とする生活習慣病においては、多細胞からなる組織の構造・機能変化を本態とすることから、従来の方法では本質に迫ることが難しかった。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの病態理解のためには、慢性炎症に伴う生体内での細胞動態の異常、特に免疫細胞の局所での生体内応答について、直接画像化して知見を得ることは必須である。このために、高速レーザー共焦点顕微鏡を生体に応用し、生体組織を生きたまま蛍光染色して観察できる生体内分子イメージング手法を開発した。我々は、すでに、メタボリックシンドロームでは、肥満内臓脂肪の局所で慢性炎症を背景に異常な細胞間相互作用が生じていることを明らかにした。肥満した脂肪組織や腸管では、M1 マクロファージ、CD8 陽性 T 細胞といった炎症性細胞が賦活化されて、脂肪組織炎症と糖尿病病態を起していることを報告した。

本研究の目的は、慢性炎症を背景とした各種疾患(肥満、糖尿病、動脈硬化)において、過食・肥満・高血糖・加齢といったストレスがいかに細胞ネットワーク・情報伝達の破綻と臓器機能異常、炎症病態を来すかを可視化し、その本態を明らかにすることである。このために、生体分子イメージング手法を脂肪組織に応用し、炎症過程を明瞭に可視化し、肥満脂肪組織においてマクロファージ、T 細

胞、B 細胞などの炎症細胞の組織における局在と相互作用に注目した。

従来の研究では、B 細胞の中には免疫を負に制御するサブセットが存在することが明らかになっている。これらは主にインターロイキン 10(IL-10)を発現し、特異なサブセットを形成している。ただし、これらはすべて刺激下に IL-10 を発現する細胞であり、恒常的に IL-10 を発現するサブセットは見つっていない。また、脂肪組織には多数の免疫細胞が存在し、複雑な細胞間相互作用のもとに、脂肪組織の炎症が規定されている。2011 年には Winer らが、脂肪組織には IgG を産生する B 細胞が存在し、炎症を惹起していると報告した。しかし、脂肪組織に制御性 B 細胞が存在するかは明らかになっていない。本研究では、脂肪組織に制御性 B 細胞が存在し、炎症を負に制御している可能性に注目した。

3. 研究の方法

本研究で用いた生組織イメージング手法を概説する。通常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。しかし、この手法では、脂肪組織を固定しないため、アーティファクトなしで、生きたままの状態でも可視化することができる。脂肪細胞のみならず、細胞外マトリックス、血管構築が三次元的に可視化される。白血球、赤血球、血小板、血管内皮、マクロファージ、T 細胞、B 細胞を特異的に染色することにより、マルチカラーでそれぞれの細胞を特異的に可視化することが可能である。その結果、肥満脂肪組織において炎症過程がおきていることを直接可視化し、その局在と相互作用を検討することができる。

4. 研究成果

マルチカラーのフローサイトメトリーで解析したところ、内臓脂肪の間質の 7-10%、皮下脂肪の間質の 30%程度は、CD19、CD45R 陽性の成熟 B 細胞であった。この脂肪組織 B 細胞は IL-10 を高発現しており、および、培養時には高濃度に IL-10 を放出していた。発現レベルは、他の細胞種、M2 マクロファージや制御性 T 細胞よりも高かった。一方、脂肪組織 B 細胞は、他の組織(脾臓など)から単離された B 細胞よりも IL-10 の発現レベルは高かった。これらの B 細胞はいわゆる B1 細胞などとは表面マーカーの発現が全く異なっており、新しいサブセットであることが示唆された。

さらに脂肪組織 B 細胞の産生する IL-10 の意義を明らかにするために、B 細胞特異的に IL-10 を欠損しているキメラマウスを作成したところ、脂肪組織の炎症が増悪している他、M1 マクロファージの集積、CD8 陽性 T 細胞の活性化が認められた。また、全身のインスリン抵抗性は増悪していた。実際に、CD8 陽性 T 細胞と B 細胞を共培養すると、T 細胞の活性化が抑えられており、B 細胞には抗炎症作用があることが明らかになった。さらに、脂肪組織および全身に B 細胞を移植する実験でも同様の抗炎症作用が確認された。以上より、脂肪組織 B 細胞由来の IL-10 が炎症を規定していることが明らかになった。

他の抗炎症作用をもつ B 細胞と異なり、脂肪組織 B 細胞は恒常的に IL-10 を発現している。発現を助けている脂肪組織の組織環境を明らかにするために、*in vitro* での検討を行ったところ、LPS の他、IL-10、遊離脂肪酸(パルミチン酸)、CXCL-12 リガンドによっても脂肪組織 B 細胞は生存率を伸ばし、IL-10 の発現を増やしていた。脂肪組織 B 細胞は *IL-10ra Cxcr4* を発現し、これらのファクターで活性化していると考えられた。実際に、CXCL12 を脂肪組織に *in vivo* で投与すると、B 細胞の集積が確認された。これらの結果は、以下の雑誌論文 2 . において発表された。

結論：肥満した脂肪組織には、IL-10 を恒常的に発現している**制御性 B 細胞**、および、炎症を引き起こす CD8 陽性 T 細胞が存在する。これらの免疫・炎症性細胞を制御すると、インスリン抵抗性が改善したことから、これらの炎症細胞が、メタボリックシンドロームの病態形成に重要な役割を果たし、治療の新たな標的になる可能性が示された。

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 2 件)

1. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich BG, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R. *In vivo* imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine

and integrin signaling. *Blood* 2012; 119: e45-56. PMID 22096246.

2. Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I, Kadowaki T, Nagai R. Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation. *Cell Metab* 2013; [Epub ahead of print] PMID: 24209772.

[学会発表](計 6 件)

2013.3.15-17. 第 77 回日本循環器学会学術集会(横浜)

1. Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Yamashita H, Komuro I, Nagai R. Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation Associated with Obesity (Featured Reserach Session)
2. Nagasaki M, Nishimura S, Manabe I, Uno K, Yamashita H, Nagai R, Komuro I. Autotaxin Contributes to the Adipose Tissue Expansion and Inflammation in Diet-induced-obesity in Mice.

2012.3.16-18. 第 76 回日本循環器学会学術集会(福岡)

1. Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Yamashita H, Nagai R. Adipose Tissue Remodeling and Malfunctioning in Obesity Associated with Chronic Inflammation and Local Immunity.
2. Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Yamashita H, Nagai R. *In Vivo* Imaging Visualizes Discoid Platelet Aggregations without Endothelium Disruption and Contribution of Inflammatory Cytokine and Integrin Signaling.

2011.8.3-4. 第 75 回日本循環器学会学術集会(横浜)

1. Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Yamashita H, Nagai R. Adipose Tissue Remodeling and Malfunctioning in Obesity Based on Chronic Inflammation and Abnormal Local Immunity.

2. Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Yamashita H, Nagai R. In Vivo Molecular Imaging Reveals Multi-cellular Kinetics of Developing Thrombus. (Featured Research Session)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 尋史 ()

東京大学医学部附属病院循環器内科講師

研究者番号：50323572

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：