

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591052

研究課題名（和文） 生体内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開発

研究課題名（英文） *In vivo* molecular imaging analysis of pathophysiology in metabolic syndrome

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

研究成果の概要（和文）：生活習慣病である肥満やメタボリックシンドロームには、単に脂肪細胞の肥大だけではなく、慢性炎症が深く関与している。我々は、生体組織を蛍光染色して共焦点顕微鏡で観察する「生体分子イメージング法」を開発した。この手法により、生きた状態の動物組織内の様々な細胞（脂肪細胞、血管細胞、免疫系細胞など）の相互作用を観察できるようになった。肥満した動物の脂肪組織では、脂肪細胞の分化と血管新生が同時に起きており、これには、免疫系細胞である CD8 陽性 T 細胞がマクロファージに働きかけて脂肪組織に浸潤させ、慢性炎症を引き起こしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Metabolic syndrome is a major risk factor of cardiovascular disease and one of the leading causes of death. In adipose tissue of an obese animal, an experimental disease model of human metabolic syndrome, differentiation and hypertrophy of adipose cells as well as chronic inflammation takes place and plays critical role in the pathogenesis. We developed an “*in vivo* molecular imaging technique”, where we could distinguish various types of cells, such as adipose cells, vascular endothelial cells and blood cells including immunocytes, and observe cell-to-cell interactions in adipose tissues of a living animal. We found that large number of CD8+ effector T cells infiltrated into obese adipose and contributed to the macrophage recruitment, which culminated in chronic inflammation in obese tissue. We also clearly showed that “*in vivo* molecular imaging technique” is a powerful tool to analyze complex cellular interactions in various types of human disease models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：メタボリックシンドローム、生体分子イメージング、共焦点顕微鏡、慢性炎症、免疫

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、近年、心筋梗塞や脳卒中など動脈硬化性疾患の重大な

リスク要因として注目されている。肥満した脂肪組織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ている。しかし、肥満における脂肪組織の役割は未だ不明な点が多く、肥満した脂肪組織がどのようにして、全身疾患であるメタボリックシンドロームを引き起こすのか、その分子機構は不明である。

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のみならず、さらに悪性腫瘍も、慢性炎症を基礎として発症することが明らかになってきた。メタボリックシンドロームでは、遺伝的素因に加えて、過食による内臓肥満・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。すなわち、三大疾病される脳卒中、心筋梗塞、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の治療には、病態の理解とともに、感染症に対する有効な薬剤（抗生物質など）が開発され、目覚ましい効果を上げてきた。しかし、慢性炎症を基盤とする上記三大疾病を含む慢性疾患に対しては、慢性炎症の病態が不明であるため、特に進行した重症症例に対しては有効な治療法が限られており、依然として高い有病率と高い死亡率が問題となっている。

3. 研究の方法

本研究に先立つ研究で、我々は「生体組織イメージング法」と呼ばれる手法を開発した。この方法では、「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。具体的には、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、生きたまま様々な細胞を区別して蛍光標識を行う。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する。この手法により、我々は、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、我々の手法により、組織再構築（リモデリング）の時間的・空間的な詳細が可視化された。

4. 研究成果

(1) 肥満脂肪組織における生体分子イメージングの開発

脂肪組織は、長年、脂肪を蓄積するのみの「何もしない臓器」と考えられてきたが、近年の研究で、様々な病気を引き起こす「活発

な代謝臓器」であることが明らかになってきた。特に、近年の食生活の欧米化や運動不足、ストレスに伴う肥満・メタボリックシンドロームの蔓延により、脂肪細胞の内臓臓器としての機能が、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。肥満脂肪組織に炎症性マクロファージが浸潤していることを報告した Weisberg らを初めとして、肥満脂肪組織における慢性炎症の存在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には慢性炎症が深く関与していると信じられるに至っている。しかし、従来の固定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。

(2) 肥満した脂肪組織リモデリング

肥満の動物モデルの脂肪組織では、多くの脂肪細胞は肥大していたが、加えて分化・増殖した小型脂肪細胞が新たに出現していた。さらに、小型脂肪細胞分化と共存して、血管新生像（血管網より枝分かれした新生血管の断端）が観察され、その周囲には活性化マクロファージの浸潤が認められた。我々は、この細胞集団を「adipo/angiogenic cell clusters」と名付け、メタボリックシンドロームにおける脂肪組織の慢性炎症像を反映している可能性を指摘した。

(3) 生体内の脂肪組織を可視化する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、その詳細な機序を解明すべく、肥満組織における炎症性の細胞動態を可視化することに成功した。すなわち、動脈硬化のように血管が主な傷害の場になり、炎症性変化が観察される病態だけでなく、悪性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できた。

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が可能になり、さらに、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も可能となっている。

(4) 肥満脂肪組織における慢性炎症

我々は、生体内分子イメージング手法を用いて、ヒト肥満のモデル動物(ob/ob マウス、高脂肪食負荷肥満モデル動物)において、白色脂肪組織内の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明らかにした。肥満脂肪組織中では血流が間歇的に低下し、低酸素状態であることも確認された。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ることも明らかになった。すなわち、動脈硬化病変で見られる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となっていることが示された。本イメージングでは、生体内における単一血小板も可視化されており、血栓形成の詳細を観察することも可能となった。これらの可視化技術により、肥満内臓脂肪組織の微小血管において、炎症性変化が実際に起きていることが明らかになった。

(5) 肥満の病態における CD8 陽性 T 細胞の重要性 — 「肥満の病態における最初のトリガーは何か？」

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 細胞の増加と、それに反して、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た。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、骨髄由来の単球をマクロファージに分化させ、さらに、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。このことは、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は、CD8 陽性 T 細胞の浸潤であることを示唆する。このように、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、さらにメタボリックシンドロームや糖尿病の病態を引き起こしている可能性が示唆された。

(6) 血小板機能の生体イメージング

世界各国で死因の上位を占める心血管イベントの多くは、血管の動脈硬化性変化と動脈血栓による閉塞を基盤としている。例えば、血栓性疾患（アテローム血栓症）では慢性炎症病態を基盤とする動脈硬化巣の形成と、それに引き続いて起こる、粥腫（アテローム）の破綻と血栓形成が病態の中心である。破綻部位においては、血小板が活性化され、血小板血栓を形成するとともに、凝固系も病態に関与する。しかし、動脈硬化巣の破綻と血栓閉塞は、偶発的かつ急速に進行する病態であり、実験的にこれらを ex vivo, in vitro で再現し観察することは不可能であった。実際に、これらの一連の過程には血小板のみならず、各種炎症性細胞、血管内皮細胞とその障害、局所の血流動態（血流とずり応力）が関与する。アテローム血栓症は、このように多種類の細胞からなる複雑病変であり、その相互作用によるダイナミックな動態が病態の本質である。我々は、この複雑系を「生体分子イメージング」により生体内で観察することに成功した。

血小板を FITC-Dextran 及び anti-CD41、anti-GPIb 抗体によりラベルして観察すると、定常状態においては、流速の比較的早い細動脈や静脈では、血管壁近傍にそって血小板が流れているのが観察される。一方、流速の遅い毛細血管のレベルでは、血小板は血管内皮と相互作用して、rolling しながら流動と停止を繰り返して流れている様子が観察された。さらに、レーザー照射により血管を傷害すると、損傷部位に血栓が形成され、生体内において単一の血小板像を可視化しながら、複数の血小板による血栓形成のメカニズムの詳細も可視化することに成功した。

我々の血栓形成モデルでは、まず、レーザー照射により活性酸素の産生され、損傷された血管内皮に血小板が付着する。その後順次、血小板はその数を増やし積み上がり、血管内腔は狭小化し、血流も遅くなる。その後、赤血球や白血球も巻き込んだ混合血栓が形成され血管は閉塞する。本モデルで明らかになったことは、血栓形成の全過程は非常に速く、数十秒であったことである。レーザー照射後に順次血栓形成に寄与した血小板数をカウントすることにより、血栓形成能を定量することも可能である。その結果は、従来の頸動脈に対する塩化鉄傷害モデルにおいて報告されている血栓による閉塞時間ともよく相関し、生体内の血小板による血栓形成を鋭敏に反映しているものと考えられる。

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1件) 査読有り

① CD8⁺ 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.

[学会発表] (計2件)

① In Vivo Molecular Imaging Reveals Multi-cellular Kinetics of Developing Thrombus

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Yamashita H, Nagai R

第75回日本循環器学会総会・学術集会 2011.3.18-20. 横浜

② Adipose Tissue Remodeling and Malfunctioning in Obesity Based on Chronic Inflammation and Abnormal Local Immunity

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Yamashita H, Nagai R

第75回日本循環器学会総会・学術集会 2011.3.18-20. 横浜

[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
特になし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

杉浦 清了 (SUGIURA SEIRYO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任教授

研究者番号: 10272551

藤田 英雄 (FUJITA HIDEO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号: 70327336

加藤 昌義 (KATOU MASAYOSHI)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号: 40306345

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号: