

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 23 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：23791016

研究課題名（和文） 生体イメージングによるメタボリックシンドロームの病態と新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文） In vivo imaging revealed molecular mechanisms of metabolic syndrome and novel biomarkers

研究代表者

長崎 実佳 (NAGASAKI MIKA)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70456135

研究成果の概要（和文）：

慢性炎症という病態は、生体内における細胞間ネットワークの破綻が本態と考えられ、単一の臓器や細胞種の異常から全てを説明することはできない。その為、従来の単一培養細胞を用いた遺伝子からのアプローチでは、細胞ネットワークのメカニズムを明らかにすることは難しかった。申請者は、近年ニポウ式レーザー共焦点顕微鏡、さらに二光子レゾナンス顕微鏡を生体に応用し、「生体内で細胞を”みて””知る”」生体内分子イメージング手法を開発し、メタボリックシンドロームにおいて、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事を明らかにしてきた。その過程で、LPA（リゾホスファチジン酸）の生合成酵素であるオートタキシンが、脂肪組織における脂肪細胞分化と肥大に関わることを、オートタキシンヘテロノックアウトマウス、トランスジェニック過剰発現マウスを用いて証明した。

これらの研究過程において、生体イメージング手法を積極的に取り入れ、分子生物学とのすりあわせを行うことで生体内の多様な病態メカニズムを明らかにしている。血栓形成の過程には血小板だけでなく、各種炎症性細胞（マクロファージ・リンパ球）や血管内皮細胞とその障害、局所の血流動態が関わっている。このような多細胞からなる複雑病変とそのダイナミクスが病態の本質であるが、今まで生体内で検討する手法は存在しなかった。長崎らのイメージング手法では単一血小板をはじめ生体内で可視化することに成功しており、血栓形成過程における多細胞のダイナミクスが明らかになっている。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the underlying mechanisms of metabolic diseases based on chronic inflammation, it is vital to examine the multi-cellular kinetics in living animals. Therefore, we developed in vivo imaging technique based on single- and multi-photon microscopy, and we assessed dynamic immune and inflammatory cellular interplay in diseased conditions. Using this technique, we visualized cell kinetics in metabolic organs including adipose tissue. We also developed FACS analysis methods of metabolic organs, and we identified a novel B cell subset that is abundant in adipose tissue. Adipose B cells also exhibited unique surface phenotypes, distinct from those of known regulatory B cell subsets. Our findings indicate that adipose B cells are a naturally occurring regulatory B cell subset that is essential for negative regulation of diet-induced adipose inflammation and maintenance of homeostasis within adipose tissue, and that B cell dysfunction pivotally contributes to the progression of inflammatory and fibrotic processes.

It is known that in obesity adipose tissue expands through both adipocyte hypertrophy and hyperplasia, and that inflammation is induced within visceral adipose tissue. The underlying mechanism that controls these dynamic changes is still not well understood, however. We found that autotaxin (ATX) is an adipose-derived, secreted enzyme that contributes to adipose expansion and inflammation. ATX^{+/-} and adipocyte specific ATX knockout mice fed a high-fat diet exhibited smaller body weight gains than control mice

fed the same diet. Preadipocytes from ATX+/- mice showed less capacity to proliferate and differentiate into adipocytes than those from ATX+/+ mice. In addition, adipose inflammation was ameliorated by ATX haploinsufficiency. Despite its contribution to adipose obesity, ATX expression was downregulated in obese adipose tissue in mice. Similarly, serum ATX levels were reduced in obese human subjects and were independently correlated with obesity. Taken together, our results establish ATX as an adipose-derived, secreted enzyme that is downregulated in obesity but is centrally involved in mediating adipose obesity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：①共焦点顕微鏡 ②メタボリック症候群 ③免疫異常 ④リモデリング ⑤脂肪組織

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。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。

2. 研究の目的

慢性炎症という病態は、生体内における細胞間ネットワークの破綻が本態と考えられ、単一の臓器や細胞種の異常から全てを説明することはできない。その為、従来の単一培養細胞を用いた遺伝子からのアプローチでは、細胞ネットワークのメカニズムを明らかにすることは難しかった。申請者は、近年ニポウ式レーザー共焦点顕微鏡、さらに二光子レゾナンス顕微鏡を生体に応用し、「生体内で細胞を”みて”知る”」生体内分子イメージング手法を開発し、メタボリックシンドロームにおいて、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事を明らかにしてきた (Nishimura, Nagasaki et al, 2007 Diabetes, 2008 J Clin Invest, 2009 Nat Med)。その過程で、LPAの(リゾホスファチジン酸)の生合成酵素であるオートタキシンが、脂肪組織における脂肪細胞分化と肥大に関わることを、オートタキシンヘテロノックアウトマウス、トランスジ

ェニック過剰発現マウスを用いて証明した(論文査読中)。

一方、近年、肥満した脂肪組織には炎症性マクロファージやT細胞が浸潤し、脂肪組織の肥満に伴う炎症と、インスリン抵抗性を惹起しているという報告が、複数のグループから行われた (Nishimura, Nagasaki et al 2009 Nat Med, etc.)。脂肪組織には骨髄由来の活性化した、T細胞、マクロファージ、NK細胞が浸潤するが、遊走および賦活化について、その詳細なメカニズムは分かってない。我々は食事由来の脂質から由来する脂質メディエーターが、直接これらの免疫細胞を賦活化する可能性について検討を行い、肥満にともなう免疫異常の関与を明らかにする計画である。

臨床的には、日本では腹囲を主にメタボリックシンドロームの診断基準としているが、臨床的な根拠に乏しくしばしば議論となっている。人種的に見ても、日本人は、「やせていても糖尿病を発症する確率が高い」ことが知られており、同じ肥満の間にも脂肪組織機能に大きな差があることが示唆される。そこで、「脂肪組織の機能異常を非侵襲的に診断する」ことが心血管イベントのよりよい予測因子になるという仮説の元、本研究では新たな脂肪組織の機能測定法の確立も試みる。実際、今までの検討で、メタボリックシンドロームの患者では、オートタキシンの血清レベルが低下することがマウス・ヒトにおいて示されており、メタボリックシンドロームの診断能力はアディポネクチンにも匹敵している。本研究ではこれらの臨床研究を推し進め、ヒトにおけるメタボリックシンドロームの新たなバイオマーカーの検索を行う。

3. 研究の方法

生体内の免疫細胞の動態を可視化する上で、従来、イメージング技術の開発に際して、プローブの開発（薬学的アプローチ）、光学系の改善（光学的アプローチ）、病態動物での検討（医学的アプローチ）のそれぞれが独立して行われてきた。しかし、本研究では、これらを統合し、生体分子イメージング技術を軸として、全く新しい、高速・深部・高解像度イメージング技術を開発した。長波長プローブ・多光子励起による深部イメージング、遺伝子改変動物による遺伝子発現の可視化といった「要素・周辺技術の開発」、と「生体による技術評価」を繰り返し、今まで可視化されることのなかった深部実質臓器（動脈、膵頭など）における慢性炎症下での細胞動態・連関を明らかにし、慢性炎症病態の本質に迫っていく。

従来、組織形態の検討には、切片標本と通常の光学顕微鏡が用いられてきたが、切片標本から三次元的な血管・実質細胞・間質の細胞の位置関係、および生体内での細胞動態を捉えることは困難であった。しかし、申請者の生体内イメージング手法では、脂肪組織を例に取っても、組織の詳細な細胞構築や生体内の細胞動態が可視化可能である。申請者はメタボリックシンドロームの病態解明を目指して、肥満脂肪組織がいかにより再構築するかを可視化してきた (Nishimura, Nagasaki et al, 2007 Diabetes)。すなわち、肥満脂肪組織における脂肪細胞分化、マクロファージの集積に代表される慢性炎症、血管新生、が手に取るように可視化されており、従来の手法とは一線を画しているといえる。さらに、近年、特に肥満における免疫異常についてイメージングからアプローチを行い、特にCD8陽性Tリンパ球が肥満に伴う異常な免疫・炎症性細胞ネットワークの引き金となっている事を明らかにしている (Nishimura, Nagasaki et al, 2009 Nature Medicine)。

生体での病態下での細胞連関・情報伝達異常をより明らかにするためには、深部の光イメージング、及び、形態と機能と組み合わせたイメージングは必須である。光学系については、レゾナンス高速スキャニングマルチカラー共焦点に、フェムトセカンドレーザーを組み合わせ、二光子励起・深部の高速イメージングを行う。この、「マルチカラー・高速・高解像度・深部・二光子イメージング」と新たな生体機能プローブとあわせ、遺伝子機能を光により評価可能な遺伝子改変動物の作成を行う。

上記で開発した生体イメージング手法を、各種病態モデル動物・遺伝子改変動物に適応して、慢性炎症を背景とする病態部位の局所における炎症性・免疫細胞の動態と、その賦活化・活性化・遊走の可視化を行う。すなわち、各種炎症性・免疫細胞と実質細胞の相互

作用、病態下の臓器機能異常における細胞連関の役割をより明らかにする。血管内皮細胞・炎症細胞・血小板・筋細胞・脂肪細胞等をそれぞれ特異的にラベルし生体内観察することにより、肥満組織や動脈硬化巣における複数の細胞連関を可視化する。これらを、全身の脂質生合成酵素およびGPCRをはじめとする脂質受容体に欠損・異常を来たす遺伝子改変動物と組み合わせて、これらの遺伝子改変がいかにより全身の表現系（耐糖能の変化等）に影響を来たすかを、臓器・組織・細胞レベル、それぞれについて検証を行う。これらの結果をふまえて、複雑脂質や脂質メディエーターがいかにより生体内において局所免疫を賦活化し、脂肪組織炎症と病態を引き起こしているかを明らかにする。さらに、受容体の結晶構造解析から得られた阻害剤を用いて、生体への介入実験を行い、新規治療法の開発につなげる。

最近の研究で、修飾脂質が脂質メディエーターとして多様な作用を持つ事が明らかになってきている。リン脂質は血管内皮機能障害を来たし、平滑筋を遊走・増殖し、動脈硬化を促進する。申請者らは、検診受診者 (n=1400人/year) の血清に対し、各種リン脂質と生合成酵素、アディポネクチンを測定し、各種リン脂質と生合成酵素、アディポネクチンを測定し、LPA生合成酵素であるオートタキシンの値が内臓肥満・メタボリックシンドロームと強い相関を持つことを明らかにした。メタボリックシンドロームの診断に際して、オートタキシンはアディポネクチンと同等の診断能力を持つことが示されている。さらに修飾脂質の一つであるリゾリン脂質はインスリン抵抗性と相関を持つ事も明らかになっている。本研究では、これらの知見を踏まえて、オートタキシンの生体での機能、リゾリン脂質の生体内での作用について解析を行い、新たなメタボリックシンドロームのバイオマーカーとしての位置づけを行う。臨床的には、検診受診者に対し検診項目として従来の各種画像検索に加え、血清脂質（総リン脂質、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン）、オートタキシン抗原量（脂質生合成酵素）、総・高分子量アディポネクチンを測定し、メタボリックシンドロームやインスリン抵抗性の発症へのリン脂質・脂質生合成異常の関与を明らかにする。

4. 研究成果

我々は、一光子共焦点・二光子レーザー顕微鏡による「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」を開発し、生活習慣病態への形態学的アプローチを行ってきた。メタボリックシンドロームの病態解明を目指して、肥満脂肪組織の再構築過程を観察し、肥満動物において、脂肪細胞分化、

血管新生、マクロファージの集積が空間的に共存して生じ、リモデリングを形成していることを示した。また、肥満脂肪組織において CD8 陽性 T 細胞が浸潤し、炎症性マクロファージの浸潤を引き起こし、脂肪組織炎症と糖尿病病態を悪化させていることを示している。さらに、脂肪組織、特に皮下脂肪には B 細胞が多数存在しており、IL-10 を発現し、脂肪組織の炎症に関わっていた。以上より、脂肪組織の中では、間質に多数存在する免疫細胞・炎症性細胞が相互作用し、病態を形成していると考えられた。

我々は、さらに研究対象を脳・心血管病の原因である血栓症へと広げ、生体内で単一血小板を可視化し、血小板動態や機能を解析した。我々は、レーザー傷害による ROS 産生を伴う血栓形成モデルと生体イメージングを組み合わせて、血小板機能に異常を来す各種遺伝子改変動物における血栓形成過程を観察し、生体内での血小板機能との関係を明らかにしている。

さらに、レーザー傷害による活性酸素産生モデルを用いて、一過性の平滑筋収縮を可視化した。収縮はカルシウムブロッカーにより著明に抑制された。一方、亜硝酸薬では定常状態の血管径が増加している他、活性酸素に対する反応が減弱していた。アンジオテンシン II 拮抗薬でも収縮は有意に抑制された。〈BR〉活性酸素、NO は初期には血管内皮下、内膜下、に限局して産生されていた。その後、多くは細胞間隙を通じて、一部は細胞内を伝播することが、蛍光インディケーターにより確かめられた。予想に反して NO は平滑筋収縮に伴うむしろ増加しており、平滑筋収縮時には活性酸素と拮抗して働いていることが示唆された。

検診では、オートタキシン (ATX) と Body Mass Index (BMI)、腹囲、血清アディポネクチン等に強い相関を認め、ATX は肥満者・MS 患者で有意に低下していた。多変量解析でも ATX は BMI などによって説明され、ATX は慢性炎症を基盤とする MS の良いマーカーとなり得ると考えられた。

ATX の生体内での作用機序の解析を行ったところ、脂肪組織、特に前駆脂肪細胞では ATX が高発現となっており、脂肪組織から分泌される ATX が血清 ATX を規定している可能性が示唆された。肥満個体において ATX 発現は低下する一方、in vitro では ATX は PPAR γ と作用し、前駆脂肪細胞の増殖・分化にかかわっていた。さらに、ATX は脂肪細胞の増殖と肥大に関与していた。

以上より、血清リン脂質とその生合成酵素は新規の MS に対する有用なバイオマーカーとなるだけでなく、新しい抗肥満・抗糖尿病治療の標的ともなり得ると考えられた。

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)

In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling.

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich B, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R. Blood. 2012 ;119(8):e45-56.

Adipose tissue remodeling associated with chronic inflammation and abnormal local immunity in obesity visualized by in vivo molecular imaging method

Nishimura S, Nagasaki M, Sugita J. Inflammation and Regeneration, 2012, 32(4), 165-170.

[学会発表] (計 26 件)

2013. 3. 15-17. 横浜第 77 回日本循環器学会 学術集会

Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation Associated with Obesity (Featured Reserach Session)

Nisimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Yamashita H, Komuro I, Nagai R Autotaxin Contributes to the Adipose Tissue Expansion and Inflammation in Diet-induced-obesity in Mice

Nagasaki M, Nishimura S, Manabe I, Uno K, Yamashita H, Nagai R, Komuro I Malfunction and Infiltration of Inflammatory Monocytes in Skeletal Muscle from Obese Mice

Sugita J, Nishimura S, Nagasaki M, Nagai R, Komuro i

2013. 2. 22-23 東京 糖尿病・肥満動物学会 生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織における免疫・炎症細胞のクロストーク
西村智, 長崎実佳, 真鍋一郎, 江藤浩之, 門脇孝, 永井良三, 小室一成

2013. 2. 8. 東京 システム疾患生命科学による先端医療技術開発 シンポジウム
二光子生体分子イメージングによる生活習慣病の病態解明

西村 智、長崎 実佳、小室 一成、永井 良三
脂質生合成酵素オートタキシンはメタボリックシンドローム病態に寄与する
長崎 実佳、西村 智、小室 一成、永井 良三

2013. 1. 28-30. 姫路 第33回レーザー学会年次大会
生体二光子分子イメージングによる生活習慣病病態解析
西村 智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2012. 12. 5-7. 第20回日本血管生物医学学会学術集会 徳島 招待講演
Symposium Metabolic Syndrome and Obesity
In vivo multi-photon molecular imaging technique visualizes immune cell cross-talks in metabolic diseases
Nishimura S, Nagasaki M

2012. 10. 27-31. Melbourne, Australia, HAA 2012 Annual Scientific Meeting
APSTH symposium (Invited)
In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling in vivo
Nishimura S, Nagasaki M, Eto K

Discoid platelet aggregations visualized by in vivo molecular imaging, and contribution of inflammatory cytokines
Nishimura S, Nagasaki M, Nagai R

2012. 10. 21-22. Phuket, The Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases Committee (APSAVD)
In vivo multi-photon molecular imaging technique visualizes parenchymal and interstitial cell cross-talks in adult metabolic and thrombotic disease, (YIA finalist)
Nishimura S, Nagasaki M

2012. 10. 6-10. 9 Nice, MLTD 2012 22nd International Congress on Thrombosis
Discoid platelet aggregations visualized by in vivo molecular imaging, and contribution of inflammatory cytokines
Nishimura S, Nagasaki M, Nagai R

2012. 9. 16-9. 22. Manchester, European Microscopy Congress 2012
In vivo multi-photon molecular imaging visualizes inflammatory and immune cell cross-talks in adult common disease

Nishimura S, Nagasaki M

2012. 8. 26-28 京都 バイオイメージング学会
生体二光子イメージングでみる生活習慣病における免疫・炎症性細胞のクロストーク
西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2012. 8. 26-28 京都 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry
In vivo multi-photon molecular imaging technique visualizes parenchymal and interstitial cell cross-talks in adult common and chronic inflammatory disease (Best Picture Awards)
Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Nagai R

2012. 7. 19-20. 福岡 第44回日本動脈硬化学会 総会・学術集会
パネルディスカッション 2「メタボリックシンドローム最新情報-腸管免疫と慢性炎症-」
生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織における免疫・炎症細胞・腸管のクロストーク
西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2012. 7. 5-7. 6. 福岡 炎症再生医学会 生体分子イメージングでみる生活習慣病における免疫・炎症細胞のクロストーク
西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2012. 6. 26 横浜 第12回日本抗加齢医学会総会 シンポジウム「百聞は一見に如かず -基礎・臨床領域におけるイメージングの最前線-」
生体分子イメージングでみる生活習慣病における免疫・炎症細胞の相互作用
西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2012. 6. 14 横浜 第11回再生医療学会総会
パネルディスカッション 再生医療に貢献する技術
生体分子イメージングでみる免疫・炎症・再生細胞のクロストーク
西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2012. 5. 24. 浜松 分子イメージング学会第7回学術集会
生体二光子イメージングでみる生活習慣病における免疫・炎症細胞のクロストーク

(最優秀賞)

西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2012. 5. 17-19. 横浜 第55回日本糖尿病学会年次学術集会

生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織における免疫・炎症細胞のクロストーク

西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2012. 5. 14-16. つくば 日本顕微鏡学会第68回学術講演会

生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織における免疫・炎症細胞のクロストーク

西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

写真コンクール

生体分子イメージングでみる肥満と血栓形成過程

西村智、長崎実佳

2012. 4. 19 Chicago, ATVB session 2012, Kenneth M. Brinkhous Young Investigator Prize in Thrombosis Finalist

Discoid Platelet Aggregations Visualized by In Vivo Molecular Imaging without Endothelium Disruption, and Contribution of Inflammatory Cytokine, Ros, and Integrin Signaling

Nishimura S, Nagasaki M, Nagai R

2012. 4. 9-11. The 1st Annual International Meeting of The Society of Molecular Imaging, Bangkok

In vivo multi-photon molecular imaging technique reveals inflammatory and immune cell cross-talks in adult common disease (Best Presentation Awardy)

Nishimura S, Nagasaki M

2012. 4. 3. Focus on Microscopy 2012, Singapore

In vivo multi-photon molecular imaging technique reveals inflammatory cell cross-talks in adult common diseases

Nishimura S, Nagasaki M

[図書] (計1件)

Medical Science Digest,

2012 38(4) 141-142.

生体二光子イメージングによる慢性炎症下の病態解析：生活習慣病の病態解明を目指して

西村 智, 長崎実佳

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長崎 実佳 (NAGASAKI MIKA)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70456135

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし