

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461356

研究課題名(和文) 生体分子イメージングを用いた代謝疾患における免疫細胞賦活化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of immune cell activation mechanism in metabolic diseases using in vivo imaging

研究代表者

長崎 実佳 (Nagasaki, Mika)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：70456135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、脂肪組織を炎症にかたむける初期の因子として、オートタキシン(ATX、ENPP2)を同定した(2014年 Diabetes)。また、ガングリオシドGM3(d18:1-h24:1)が、メタボリック症候群スクリーニングの最良候補となることを見出した(2015年 PLoS One)。さらに、アディポネクチンが、脂肪肝や骨折発症の予測因子となりうることを、2016年学会にて発表を行った。新たな造血過程を、生体骨髄イメージングにより明らかにした(2015 J Cell Biology)。2016年度以降は、大型動物イメージングに特化したシステム開発と実証を目指しているところである。

研究成果の概要(英文)：Using in vivo imaging technique, we show that nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (ENPP2, autotaxin) is an adipose-derived, secreted enzyme that controls adipose expansion, brown adipose tissue function, and energy expenditure. Our result also suggest ENPP2 could be a useful therapeutic target for the treatment of metabolic disease (2014 Diabetes). We identified GM3(d18:1-h24:1) as the best candidate for metabolic screening, proving to be significantly correlated with intima-media thickness, used for the detection of atherosclerotic disease in humans, and a number of metabolic disease risk factors including autotaxin, LDL-c and homeostatic model assessment insulin resistance (HOMA-IR) (2015 PLoS One). Moreover, we presented serum adiponectin measurements in Periodic Health Checks can predict the incidence of arteriosclerosis progressions, and FL, independent of obesity.

研究分野：メタボリックシンドローム

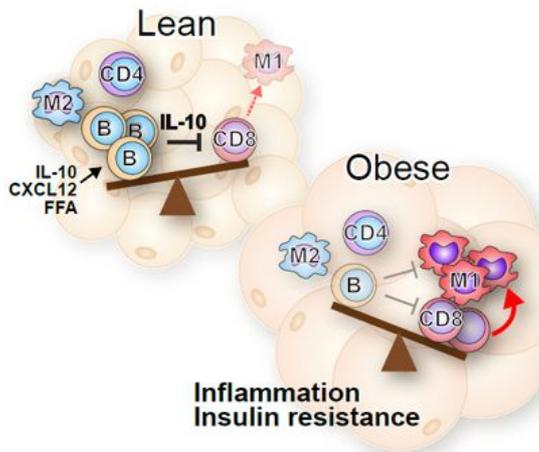
キーワード：メタボリックシンドローム 生体分子イメージング 脂肪組織 炎症

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。

従来、免疫学は、胸腺・骨髄・リンパ節・脾臓といった、“免疫系臓器”のみが着目され、研究がすすめられてきた。しかし、近年の研究により、末梢、特に、代謝臓器における免疫系の細胞の重要性が明らかになってきている。たとえば、脂肪組織の間質には多数の免疫系細胞が存在し、肥満においてはCD8陽性T細胞およびマクロファージが、慢性炎症を引き起こし、メタボリック症候群発症の契機となることがわかってきた(下図)。

申請者らが確立した生体イメージング手法を、各種、病態モデル動物(肥満、動脈硬化、免疫不全、炎症モデル)・遺伝子改変動物に適用して、局所の臓器における炎症性・免疫細胞の動態と、その賦活化・活性化・遊走といった病態を可視化する。また、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などが、いかに生体内において局所免疫を賦活化し、脂肪組織炎症などの病態を引き起こしているかを明らかにする。



脂肪組織における免疫細胞のクロストーク
脂肪細胞のみならず、免疫細胞 B細胞、T細胞(CD8・CD4)、M1・M2マクロファージの多様なバランスによって、脂肪組織の炎症がコントロールされ、全身の病態が規定されている。

肥満では慢性炎症から、インスリン抵抗性が引き起こされ、メタボリック症候群が発症する。

2. 研究の目的

申請者らが確立した「生体分子イメージング手法」を用い、各種、病態モデル動物(肥満、動脈硬化、免疫不全、炎症モデル)・遺伝子改変動物の、局所の臓器における炎症性・免疫細胞の動態と、その賦活化・活性化・遊走といった病態を可視化する。また、局所免疫を賦活化する因子を、PCR アレイ実験によるスクリーニングや、培養細胞に、複雑脂質や脂質メディエーターを投与することにより、明らかにする。

最終的には、従来の免疫学パラダイムをこえて、脂肪組織・骨格筋をはじめとする代謝臓器の炎症性疾患(慢性炎症を基盤とするメタボリック症候群、生活習慣病を含む)に対し、抗炎症アプローチを行うことにより、低侵襲性治療の可能性を見出していきたいと考えている。

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再構築するかを可視化してきた(Nishimura, Nagasaki et al, 2007 Diabetes, 2008 JCI)。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、IL10産生B細胞が減少することを明らかにしている(Nishimura, Nagasaki et al, 2009 Nature Medicine, 2013 Cell

Metab.)。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、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 (Nishimura, Nagasaki et al, 2012 Blood)。

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ン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用い、免疫細胞 (T, B 細胞・マクロファージなど) の代謝性疾患における役割、免疫細胞の賦活化機構を、生体内、特に骨格筋や脂肪組織などの代謝臓器を観察することにより明らかにする。さらに、生体イメージング観察系を発展させ、複数の細胞連関を可視化し、単一細胞レベルでのシグナル解析を行う。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、生体内で観察することにより、試験管内での遺伝子解析ではなく「生体内での真の遺伝子機能」「細胞ネットワーク」を生体内で直接みることにより、恒常性を維持している生体ネットワークの本質が明らかになると思われる。

可視化により得られた結果を踏まえ、臓器破綻のメカニズムを明らかにし、免疫細胞賦活化因子のスクリーニングを行い、新規治療の開発につなげる。PCR アレイ等による免疫賦活化因子のスクリーニング、培養細胞を用いたメカニズムの解析、また、ヒトにおけるマススケールデータベースを活用し、ヒトに治療適応可能であるかを明らかにしていく。

臨床的 (ヒト) 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 (PETCT、MRI、エコー) に加え、血清脂質、脂質生合成酵素 (ENPP2 等)、アディポネクチン定量を行う他、内臓脂肪面積、体積、皮下脂肪面積、体積、筋肉量の計測も行い、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。現在、当院コンピュータ画像診断学予防医学講座にて、ヒトデータベースが構築され、日々、更新されている (受診者 2600 名/年)。

候補として得られた免疫賦活化因子 (サイトカイン・ケモカイン・脂質等) を、ヒト血

清において、ハイスループットの計測を行い、マススケール臨床データベースの結果とあわせることで、新たな臨床マーカーおよび治療標的を明らかにする。

4. 研究成果

我々は、心血管疾患の重大なリスク要因となる、高脂肪食に伴うメタボリックシンドローム (MS) の病態改善を目指して、代謝疾患における免疫細胞賦活化機構を解明することを目的とし、研究を行っている。

現在まで、生体分子イメージング手法を応用し、食事由来脂質の全身性の影響、肥満に伴う脂肪組織の機能的変化、特に脂肪組織免疫細胞の異常と局所免疫の賦活化を明らかにしてきた。

たとえば、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こしている。さらに、脂肪組織に内在する制御性 B 細胞の役割を明らかにしている。さらに、我々は、脂肪組織を炎症にかたむける初期の因子として、修飾脂質であるリゾリン脂質の一つ、リゾホスファチジン酸 (LPA) の生合成酵素であるオートタキシン (ATX, ENPP2) を同定した。

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 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 (Nishimura, Nagasaki et al, 2014 Diabetes)。

本研究では、代謝疾患をはじめとする、生命現象を蛍光二光子顕微鏡を用い高速・高解像度で手に取るように可視化する「生体二光子分子イメージングシステム」を独自に開発している。現在、達成している生体内部で秒 30 コマの時間解像度、回折限界の空間解像度、4 色フルカラーは世界にも類をみないものであり、圧倒的に得られる情報量が多い。生体観察は生体をリアルタイムで三次元的に把握できる情報量の多さがアドバンテージとしてあげられ、代謝性疾患も非常によいイメージングの適応になる。この手法を、各種病態モデル・遺伝子改変動物、および血栓モデ

ル動物に適応して、生理学的病態部位の局所における細胞動態・ネットワークの可視化を行い、生体システムへの理解につなげた。新たな造血過程を生体骨髄イメージングにより明らかにしており、第二著者として *J Cell Biology* 誌へ論文がアクセプトされた (2015年)。

代謝疾患における新規バイオマーカーの検索を目指し、検診でのデータベースを利用し、血清ガングリオシド (GM) 3 とメタボリックシンドローム (MetS) との関連性を検討した。被験者 125 名を内臓脂肪蓄積 (VFA)、高血糖、脂質異常などの MetS 危険因子の有無で分け、その GM3 分子種を定量して群間で比較した。被験者のうち 23 名に GM3 分子種を認め、そのうち 8 名では VFA と MetS が顕著であり、高血糖と脂質異常の存在が確認できた。全 GM3 分子種はスフィンゴイド塩基、スフィンゴシン (d18:1 (4)) で構成され、GM3 分子種が上昇していた 8 名中 6 名ではヒドロキシル化セラミド部分が含まれていた。肥満、2 型糖尿病、MetS、アテローム性動脈硬化症および高血圧に関連した数種の臨床的健康変数を用いて単変量・多変量線形回帰分析を行った。GM3 (d18:1-h24:1) は、内臓中膜複合体厚とオートタキシン、LDL-c および HOMA-IR を含む MetS 危険因子と有意に関連しており、MetS スクリーニングの最良の候補であることを明らかにした (Veillon L, Nagasaki et al, 2015 PLoS One)。

さらに、脂肪組織から分泌されるアディポネクチン (Adi) が、低値であれば脂肪肝発症の、高値であれば将来の骨折発症の予測因子となりうることを、検診受診者のデータベースより明らかにし、2016 年学会にて発表を行った。2008 年から当院コンピュータ画像診断学予防医学講座の健診を受診した連続 4600 名 (男性 2800、女性 1800、平均 56 才) に総・高分子量 Adi 測定を行い、臨床パラメータ、画像所見 (エコー・CT・MRI・PET/CT) とイベントリスクとの関連を、新たに開発した解析プラットフォームによる、統計・数理・情報工学的アプローチを用いて、Adi 測定の意義を検討した。

受診に伴い得られた 500 以上のパラメータは、主成分分析ではほぼ数個の因子により説明された。男性では加齢・インスリン抵抗性・肥満に加え、腎機能障害も説明因子を構成する上位の要因であったのに対し、女性では Adi 値・出産経験回数・血清リン・カルシウム値が加わり、臨床意義に大きな違いが認められた。Adi は肥満度とは独立し、メタボリックシンドロームおよび頸動脈肥厚と関連を示した。新たに「高 Adi 値集団から新規骨折が高率に認められる」「頸動脈肥厚と記憶力低下に相関がある」といった傾向も明らかになった。さら、将来的な脂肪肝発症を予測する測定項目として、男性では喫煙、女性では Adi が挙げられた。総 Adi と高分子量 Adi は高い相関を持ち、臨床的意義はほぼ同一で

あった。

総括すると、Adi 低値は、将来的な脂肪肝発症や骨折イベントに寄与し予後予測に有用であると考えられ、現在は、さらにデータ数を蓄積して、解析を継続しているところである。

以上より、生体イメージングを代謝調節機能イメージングにまで拡張、トランスレーショナルへの展開をおこなった。生体イメージング手法では、時間・空間解像度の高い画像解析が可能になり、アプローチが難しかった生活習慣病をはじめとする慢性疾患でも、病態形成機構が明らかになっている。一方で、ヒト臨床診断につなげるためにはまだギャップが存在する。マウスだけでなく大型動物でのイメージング知見も不可欠であり、代謝・免疫調節機構の可視化は多くの改善が望まれている。特に、観察動物サイズが一定以上大きくなると、従来のイメージングシステムでは十分な画像が得られないことも多いため、連携研究者の西村智とともに、大型動物イメージングに特化したシステム開発と実証を行った。

レーザーを用いた一光子共焦点・二光子顕微鏡観察、さらに、マクロイメージャーを用いた蛍光・発光・反射光同時観察を組み合わせたイメージングシステムを開発した。生体で解像度を追求するために、ステッピング・サーボモータ・ピエゾ素子を組み合わせ、検体の積極的な動的制御を行い、一細胞の長時間追従をおこなった。特に、4K/8K CMOS センサを用いて、解像度 300nm、時間解像度 60fps、4 色イメージングを達成した。同時に、手術現場での使用なども考慮にいて、最小化した手持ち型の顕微鏡も開発した。ヒトでの光診断で不可欠な低侵襲性を担保しつつ、解像度を顕微鏡レベルで達成した。低侵襲の利点を生かすと、日常活動下での蛍光情報を引き出せる。自由摂食の下で全身の代謝臓器が応答するのか、肥満に伴う脂肪組織での慢性炎症はどのように形成されるのかといった疑問を明らかにすることができる。また、脂肪細胞それぞれの細胞内カルシウム濃度が独立して Flickering する様も捉えられている。標準化、再現性の向上など課題も多く残されているが、今後の展開が期待できる技術と考えられる。

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 3 件)

1. Identification of Ganglioside GM3 Molecular Species in Human Serum Associated with Risk Factors of Metabolic Syndrome.

Veillon L, Go S, Matsuyama W, Suzuki A, Nagasaki M, Yatomi Y, Inokuchi J.

PLoS One. 2015 : 10(6):e0129645.

2、IL-1 induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs.

Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, Ohmori T, Manabe I, Italiano JE Jr, Ryu T, Takayama N, Komuro I, Kadowaki T, Eto K, Nagai R.

J Cell Biol. 2015 : 209(3):453-66.

3、ENPP2 contributes to adipose tissue expansion and insulin resistance in diet-induced obesity.

Nishimura S, Nagasaki M, Okudaira S, Aoki J, Ohmori T, Ohkawa R, Nakamura K, Igarashi K, Yamashita H, Eto K, Uno K, Hayashi N, Kadowaki T, Komuro I, Yatomi Y, Nagai R.
Diabetes. 2014 : 63(12):4154-64.

〔学会発表〕(計9件)

1、2016年03月18日～2016年03月20日 第80回日本循環器学会

「仙台国際センター(宮城県・仙台市)」

Low Adiponectin Level Predict Progression of Fatty Liver Disease and Future Bone Fracture Events

長崎実佳、高本偉碩、林直人、小室一成、西村智

2、2016年01月29日～2016年01月30日 第44回日本総合健診医学会

「京王プラザホテル(東京都・新宿区)」

検診受診者におけるトータルアディポネクチン測定の意義

長崎実佳、西村智、高本偉碩、小室一成、林直人

3、2016年01月29日～2016年01月30日 第44回日本総合健診医学会

「京王プラザホテル(東京都・新宿区)」

正確な予後判定と介入指導を目指した多次元健診データへの情報工学アプローチ

西村智、長崎実佳

4、2015年04月24日～2015年04月26日 第79回日本循環器学会

「大阪国際会議場(大阪府・大阪市)」

Serum Adiponectin Measurements in Periodic Health Checks can Predict Arteriosclerosis and Fatty Liver Diseases Progressions

長崎実佳、高本偉碩、宇野漢成、林直人、小室一成、西村智

5、2015年04月10日～2015年04月12日 第112回日本内科学会

「みやこめっせ(京都府・京都市)」

検診受診者におけるアディポネクチンとメタボリックシンドローム、脂肪肝の関連

高本偉碩、長崎実佳、西村智、宇野漢成、林直人、門脇孝

6、2014年09月05日～2014年09月07日 第54回臨床科学学会

「東京大学本郷キャンパス(東京都・文京区)」

スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジルコリンの血中動態の検討

大川 龍之介、蔵野 信、岸本 達也、松山直人、長崎実佳、宇野 漢成、林 直人、大久保 滋夫、池田 均、戸塚 実、矢富 裕

7、2014年09月04日～2014年09月05日 第55回日本人間ドック学会学術大会

「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」

検診患者におけるアディポネクチン測定の有用性

長崎実佳、西村智、宇野漢成、林直人

8、2014年06月06日～2014年06月07日 第56回日本脂質生化学会

「近畿大学東大阪キャンパス(大阪府・東大阪市)」

オートタキシンは脂肪細胞分化を制御しメタボリック症候群に寄与する

西村智、長崎実佳、矢富 裕、永井 良三

9、2014年04月24日～2014年04月26日 第87回日本内分泌学会

「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」

アディポネクチン高値は甲状腺結節のリスクを上昇させる

森 典子、水口 悠貴、長崎 実佳、林 直人、宇野 漢成、渡辺 大輔、安藤 孝、森本 聡、市原 淳弘

〔図書〕(計0件)

〔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
なし

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・特任研究員
研究者番号: 70456135

(2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

西村 智 (NISHIMURA, Satoshi)

自治医科大学・分子病態治療研究センタ

ー・教授

研究者番号：80456136

(4)研究協力者

該当なし