



生体分子イメージング手法でみる肥満脂肪組織における慢性炎症・免疫異常

1. 緒言 なぜ生体イメージングなのか

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存在すると考えられる。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、感染症に対する特效薬(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。

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。本稿では、我々の生体イメージングより明らかになった、肥満脂肪組織の再構築(リモデリング)と炎症性・免疫細胞の関わりについての知見を紹介したい。

2. 肥満と慢性炎症 生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織

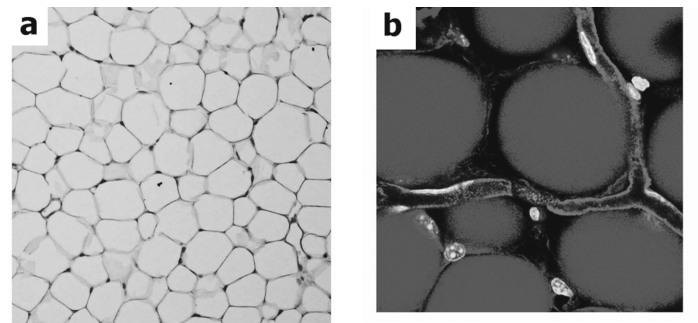
2-1. 肥満脂肪組織における生体分子イメージングの意義 動脈硬化・心血管疾患の原因として、末梢組織(骨格

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への炎症性マクロファージの浸潤の報告¹⁾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²⁾。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。

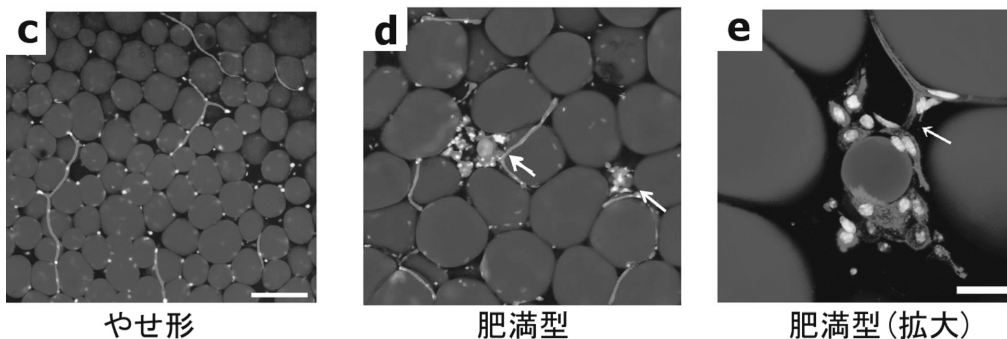
2-2. 「生組織イメージング」でみる肥満脂肪組織リモデリング

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。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³⁾。

肥満動物モデルでは、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(図1e)³⁾。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」と名付けた。同部位ではVEGF産生亢進といった細胞間シグナルと機能異常が認められ、MCP-1やTNF- α といった炎症性サイトカイン産生、さらに、活性酸素の産生も増加しており、肥満に伴う「炎症のたまり場」であることが示唆された。



従来の脂肪組織イメージング 新たな生体分子イメージング



やせ形

肥満型

肥満型(拡大)

図1 生体分子イメージングでみる肥満に伴う脂肪組織のリモデリング

やせ型 (a-c) と肥満型 (d, e) のマウスの内臓脂肪組織の比較。

a, c, d が弱拡大, b, e が強拡大像。従来の脂肪組織イメージング (a) では分からなかった組織の詳細な構築が新規生体分子イメージング (b) では明らかになっている。

実験手法詳細については本文中参照。

スケールバー c: 100 μ m, e: 20 μ m, 白矢印: 血管新生像。

2-3. 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」に成功した (図2)⁴⁾。

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。

2-4. 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, 高脂肪食負荷モデル動物) 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⁴⁾。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 (図3)。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。

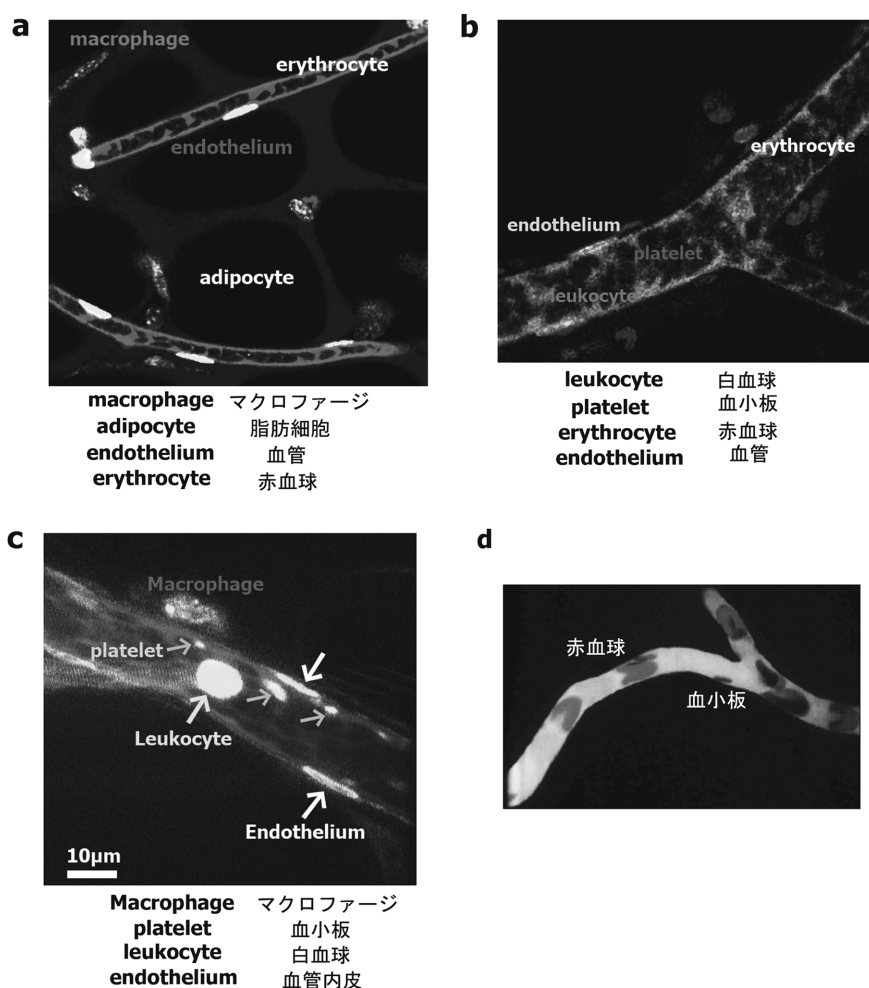


図2 「生体イメージング」でみる体内の細胞動態

「生体イメージング」では手取るように脂肪組織微小循環における生体内の各種細胞の動きが分かる。

実験手法詳細については本文中参照。

白血球，赤血球，血小板，血管内皮，マクロファージを特異的に染色し，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。

(a-c) one shot, (d) 連続画像。

2-5. 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⁵⁾．さらに Winer らは T 細胞を標的とした免疫療法によりマウスの肥満が改善することを示している⁶⁾．また，脂肪組織

にはマスト細胞や制御性 T 細胞といった特有の細胞が存在し，局所免疫や脂肪組織炎症をコントロールし，肥満に伴うインスリン抵抗性に寄与していることも明らかになった^{7,8)}．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

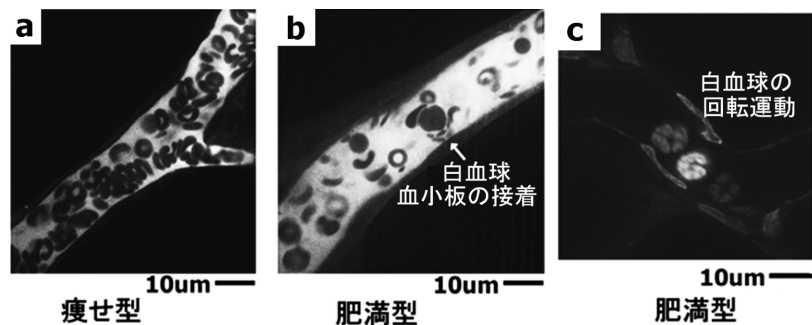


図3 「生体内の分子イメージング」でみる肥満脂肪組織における慢性炎症
肥満脂肪組織の微小循環では、痩せ型(a)に比べて、肥満型(b, c)では白血球・血小板の回転運動や接着といった、「炎症の初期像」が観察された。

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細胞は骨髓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。

2-6. 脂肪組織イメージング手法

本稿では我々が開発した「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、血管内を変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することが可能となった。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、我々は高速スキャ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。

検体の準備としては、麻酔下のマウスに蛍光色素を静脈全身投与し、観察部位を切開・露出する。観察部位を生理食塩水により湿潤した後、観察窓を設け、マウスを倒立顕微鏡上のチャンバーにおいて蛍光観察を行う。観察中はヒーティングプレートを用いて体温37度を保つ。本手法により臓器表面から50ミクロン程度であれば細胞構築・血流が明瞭に観察可能である。血流は、蛍光物質FITCデキストランを尾静脈から全身投与することによりネガティブイメージで可視化される。分子量150,000のデキストランは血管外に漏出することはない、血管内にとどまり血球成分を可視化する。我々の観察では直径3ミクロン程度の毛細血管網を変形しながら流れる血球成分が明瞭に可視化された。一方、白血球はアクリジンオレンジ及びローダミンを静脈投与し体内で核染色することで可視化される。さらに、細胞表面マーカーに応じた蛍光標識抗体を用いることにより、特定細胞集団を生体内でも標識することが可能である。例えば、血小板に特異的な蛍光標識抗CD41抗体を全身投与することにより単一血小板も生体内ではじめて可視化されている。血管内皮に対しては、血管内皮表面の糖鎖に特異的に結合する蛍光標識レクチンを用いることで、生体内で血管系を明瞭に描出することが可能である。我々は、マウスでは血管内皮に特異性の高いisolectin GS-IB4を用いている。今後、このほかに細胞内カルシウム、

膜電位, pH, ROS, などの各種インディケーターを使用することにより, 細胞動態と機能を結びつけて生体イメージングすることも可能になると思われる。

本分子イメージング手法は脂肪組織だけでなく, 骨格筋・肝臓・腎臓(糸球体を含む)など, さまざま実質臓器に応用可能であり, 臓器血流・細胞動態を観察・定量することも可能になっている。

3. 血小板機能の可視化

我々の手法では生体内の単一血小板を可視化することも可能である。血小板を FITC-Dextran 及び anti-CD41 抗体により可視化したところ, 定常状態においては, 細動脈・静脈では血管壁近傍で血小板は運動していた。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「stop and go」を繰り返しており, 血流によって rolling しながら流れているさまが可視化された。さらに, レーザー照射による血栓形成と生体イメージングを組み合わせることで, 生体内の血栓形成過程を単一血小板レベルで捉えることに成功し, 各種遺伝子改変や抗血小板薬の効果を検討することも可能となった⁹⁾。

4. 次世代のイメージング 深部を照らす機能イメージング

我々は主にニポウ式レーザー共焦点, 一光子励起の組み合わせで画像取得を行ってきた。しかし, 深部臓器・臓器内部の構造に関しては可視化できず, 遺伝子機能も不明であった。生体の各種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, 形態と機能とを組み合わせた深部の光イメージングが今後必要になると考えられる。例えば, 遺伝子改変動物を用いた遺伝子機能の光による解析を, 二光子フェムト秒レーザーと高速スキャン共焦点システムで行うというものであり, 今後の光学機器の開発・改良が望まれる。

5. ま と め

我々の生体分子イメージング手法では, 立体的な微細構造・細胞動態を生体内で明瞭に描出し, 組織・細胞の形態や機能を直接観察することができるという優位性がある。本手法により, 肥満に伴う脂肪組織の再構築(リモデリング)と機能異常, 慢性炎症の関与が可視化され, その機構が明らかになった。肥満脂肪組織では CD8 陽性 T 細胞や炎症性マクロファージを中心として, 異常な細胞ネットワークを形成し, 機能異常を来していることが示された。

また, 血栓形成過程における各種細胞動態といった素過程が明らかになった。今後は, 各種機能プローブや遺伝子改変動物と組み合わせて研究を進め, これらの背景にある分子生物学的メカニズムを明らかにしていきたい。

- 1) Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., & Ferrante, A.W. (2003) *J. Clin. Invest.*, 112, 1796–1808.
- 2) Hotamisligil, G.S. (2006) *Nature*, 444 (7121), 860–867.
- 3) Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Hosoya, Y., Yamashita, H., Fujita, H., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., & Sugiura, S. (2007) *Diabetes*, 56, 1517–1526.
- 4) Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., & Sugiura, S. (2008) *J. Clin. Invest.*, 118, 710–721.
- 5) 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. (2009) *Nature Medicine*, 15, 914–920.
- 6) Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielinski, J., Mastronardi, F., Maezawa, Y., Drucker, D.J., Engleman, E., Winer, D., Dosch, H.M. (2009) *Nature Medicine*, 15, 921–929.
- 7) Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clement, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z., Doria, A., Libby, P., Blumberg, R.S., Kahn, B.B., Hotamisligil, G.S., & Shi, G.P. (2009) *Nature Medicine*, 15, 940–945.
- 8) Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., & Mathis, D. (2009) *Nature Medicine*, 15, 930–939.
- 9) 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. (2010) *J. Clin. Invest.*, 120, 179–190.

西村 智^{1,2,3}, 長崎 実佳^{1,4}

¹ 東京大学医学系研究科循環器内科,

² 東京大学システム疾患生命科学による
先端医療技術開発拠点 特任助教,

³ 科学技術振興機構さきがけ

「光の利用と物質材料・生命機能」研究員,

⁴ 東京大学コンピュータ画像診断学/予防医学講座)

In vivo imaging reveals chronic inflammation and abnormal local immunity in obese adipose tissue

Satoshi Nishimura^{1,2,3} and Mika Nagasaki^{1,4} (¹Department of Cardiovascular Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8655, Japan, ²Translational Systems Biology and Medicine Initiative, ³PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Tokyo, Japan, ⁴Computational Diagnostic Radiology and Preventive Medicine, The University of Tokyo, Japan)