

生体内組織イメージングでみる内臓肥満に伴う 脂肪組織リモデリングと機能異常

西村 智

要 旨：メタボリックシンドロームの病態形成には、慢性炎症に伴う脂肪組織リモデリングと組織機能異常が重要である。われわれは新たに生体内分子イメージング手法を開発し、肥満に伴い脂肪細胞分化・血管新生が空間的に共存して生ずることを明らかにした。さらに、肥満脂肪組織内では血管内皮・マクロファージ・血小板の相互の活性化、接着分子の発現増加が肥満に伴う慢性炎症を増幅し組織機能異常を起こしていた。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 589-593)

Key words: metabolic syndrome, adipogenesis, inflammation, angiogenesis

はじめに

心筋梗塞や脳血管疾患などの動脈硬化性疾患のリスク要因として、内臓肥満とインスリン抵抗性を基礎とするメタボリックシンドロームが注目されている。近年、内臓肥満が体内に慢性炎症を引き起こし、全身のインスリン抵抗性・糖尿病や動脈硬化を引き起こすことが明らかになった¹⁾。その結果、肥満において内臓脂肪組織にマクロファージが浸潤し²⁾、さらに、肥満に伴って脂肪組織に脂肪細胞分化とともに血管新生が生ずることが示された。このように、内臓肥満は慢性炎症に伴い脂肪組織の再構築をもたらすが、これを、われわれは動脈硬化病変にならって、“脂肪組織リモデリング”と呼んでいる。リモデリングした脂肪組織は、組織機能異常から全身のインスリン抵抗性をもたらす動脈硬化病変を進展させ心血管イベントを引き起こすと考えられる。しかし、これらを生体内で証明する良い観察手法が存在せず、肥満に伴う生体内での脂肪組織自体の形態的・機能的変化については今までよく分かっていなかった。脂肪組織は脂肪細胞のみで規定されるものではない。脂肪組織の実に半分は間質細胞で構成されており、多くの血管内皮細胞・免疫細胞(マクロファージなど)が含まれている。実際に、糖尿病病態におけるインスリン抵抗性に血管内皮機能異常が関与

すること、浸潤したマクロファージがTNF α などの炎症性サイトカインを高発現し慢性炎症を増幅することなどから脂肪組織間質の重要性が注目されている。脂肪組織内には毛細血管網が発達し、多くの血球成分(白血球・血小板)も含まれ、生体内では血管内皮と相互作用を起こしている。肥満病態では、これらの複数の細胞種の異常な相互連関により引き起こされる機能障害が重要であると考えられる。われわれは、メタボリックシンドロームの病態解明を目指して、新たに生体内分子イメージング手法を開発し、生体内の脂肪組織構築に加えて微小循環における細胞動態や血管機能の可視化に成功した。さらに、異常な細胞間相互作用そのものが抗肥満治療の新規標的となり得ることも明らかにした。

体外生組織イメージングでみる 脂肪組織リモデリング

従来、脂肪組織の形態の検討には、切片標本と通常の光学顕微鏡が用いられてきた。しかし、肥大した脂肪細胞を多く含む肥満動物では、脂肪組織は脆弱であり、切片の作成がアーティファクトの原因となることがしばしばあった。また、切片標本から三次元的な血管・脂肪細胞・間質の細胞の位置関係を捉えることも困難であった(Fig. 1A)。そこでわれわれは、脂肪細胞

東京大学循環器内科

2007年12月11日受付 2008年1月21日受理

分化、マクロファージの集積に代表される慢性炎症、血管新生が生体内でどのような関連性をもって起きるかを明らかにするために、固定・切片作成を要しないレーザー共焦点顕微鏡を用いた生組織イメージング手法を新たに開発した³⁾。

本手法を用いて肥満動物モデルの白色脂肪組織(精巣上体脂肪)を検討したところ、痩せ型マウス(db/+)の脂肪組織の生組織イメージング画像では、円形の脂肪細胞とそれを取り巻く血管網が、立体的に、かつ明瞭に描出された(Fig. 1B, C)。通常の切片標本と比べて、脂肪細胞が円形を保っていることが特徴的である。8週齢の肥満型マウス(db/db)を用いた検討では、多くの脂肪細胞は肥大していたが、血管新生像を伴う分化した比較的小型の脂肪細胞の出現を認めた(Fig. 1D-F)。小型の脂肪細胞の周囲には血管の枝分かれとともに多数のレクチン陽性の細胞の集積を伴っていた。小型脂肪細胞は、BrdUの取り込み、PerilipinAの染色性が陽性であることから、分化・増殖した脂肪細胞であると考えられた。さらに、肥満型マウスでは、小型脂肪細胞分化の部位に一致して、血管の枝分かれを認め(Fig. 1F)、肥満脂肪組織において血管新生と脂肪細胞分化が空間的に共存していることが示された。われわれはこの細胞集団を“adipo-/angiogenic cell clusters”と名づけた。同部位ではVEGFを含むサイトカイン・活性酸素の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た。一方、完成した肥満後期では脂肪細胞壊死とマクロファージの貪食像(従来から指摘されている、いわゆる“Crown Like Structures”)も認められ、脂肪細胞の分化・壊死の両者にマクロファージの浸潤が重要であると示唆された。肥満の形成に伴う血管新生をVEGF中和抗体によりブロックしたところ、内臓肥満に伴う脂肪細胞数の増加が抑制され、全身のインスリン抵抗性病態が改善した。すなわち、実際に異常な細胞連関そのものが、新規肥満治療のターゲットにもなり得ることが明らかになった³⁾。

生体内分子イメージング手法の開発

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、血流や細胞動態といった生体内のダイナミックな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が非常に有用であることは先に述べたとおりである。不可逆的な組織学的変化に先行する、初期の炎症

性変化を捉えるためにも、生体内イメージング手法は最適である。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を背景として、われわれは新たに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脂肪組織の血流・細胞動態観察を可能にする観察システムを開発した⁴⁾。時間・空間解像度も従来の手法より飛躍的に改善し、細胞内小器官レベルでの解析が可能となっている。生体内で、炎症の起点である血管透過性亢進・炎症性細胞浸潤の最前線となるのは微小血管である。しかし、これまでは技術的に実時間的に生体内微小血管内の細胞動態を詳細に観察するのは困難であったが、われわれの分子イメージング手法ではこれらが明瞭に可視化・評価された。

本手法を概説する。麻酔下のマウスに蛍光色素を静脈全身投与し、腹膜を切開し、精巣上体白色脂肪組織を露出する。観察部位を生理食塩水により湿潤した後、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。血流は蛍光標識デキストランを全身投与することにより可視化され、一方、白血球はアクリジンオレンジを用いた核染色により可視化し、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も可能となった(Fig. 2)。光学系としては、高速の画像取得が可能なスピニングディスク方式のレーザー共焦点顕微鏡とEMCCDを用いた。

本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、さまざまな実質臓器に応用可能であり、臓器血流・細胞動態を観察・定量することが可能になった(Fig. 3)。また、血管に対してレーザー照射を行い、微小血栓形成を誘発させることも可能であり、活性化血小板の凝集と血栓形成が生体内で可視化され、新たな血栓形成の実験モデルにもなり得ると考えられた。

生体内分子イメージングでみる肥満脂肪組織における炎症像

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。われわれは本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

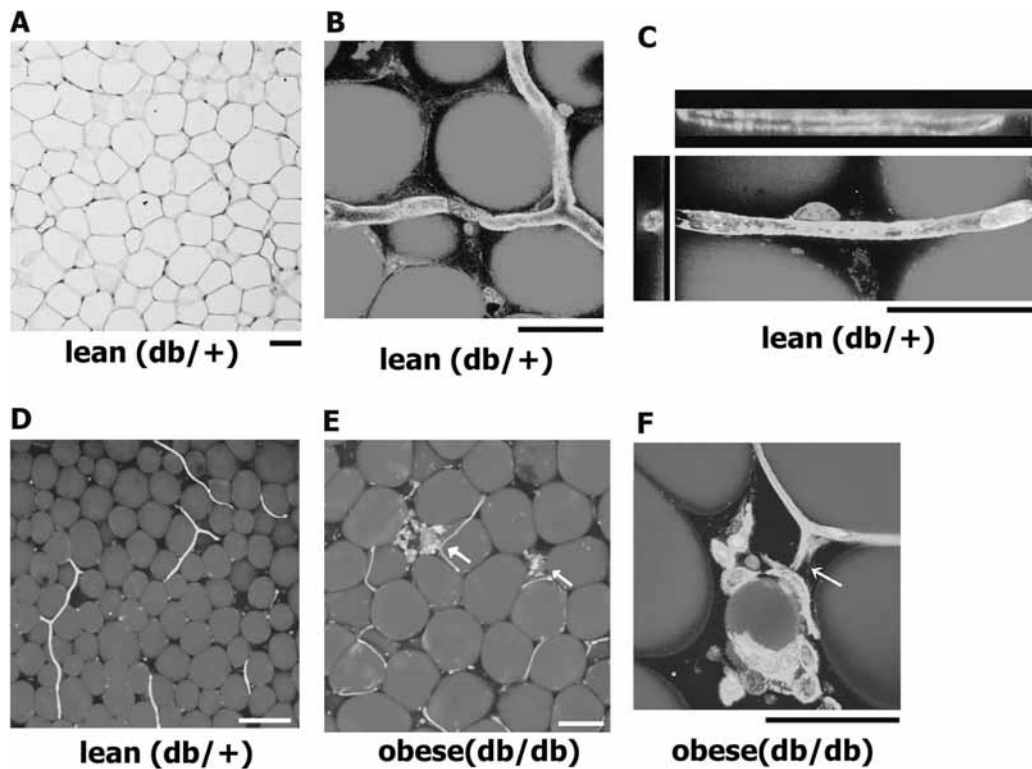


Figure 1 Adipose tissue remodeling revealed by living tissue imaging method (*ex vivo*). Epididymal fat pads from lean (db/+, A–D) and obese (db/db, E, F) animals were visualized by the conventional (A) and living tissue imaging methods (B–F). Notice the existence of adipo-/ angiogenic cell clusters in obese animals, including differentiating small adipocytes and angiogenesis (E, F, arrows). Bars: 100 μm .

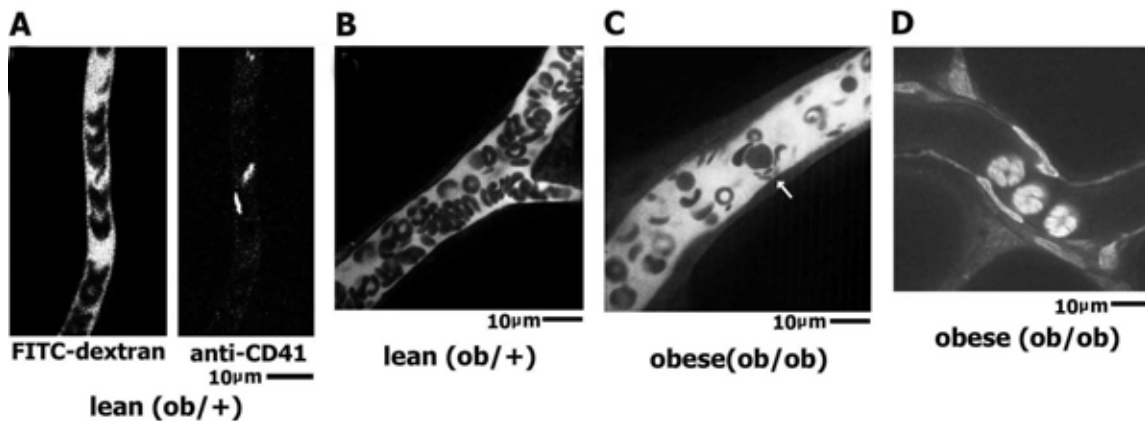


Figure 2 Inflammatory cell dynamics in visceral obesity visualized *in vivo* imaging. The erythrocyte, leukocyte, and platelet cell dynamics can be visualized with high time and spatial resolutions in adipose tissue from lean ob/+ (A, B) and obese ob/ob (D) mice by the *in vivo* molecular imaging method. Note the firmly adhered leukocytes and platelets in the vascular wall in obese mice post-capillary venules (C, arrow), and rolling leukocytes (D), thus suggesting the inflammatory status in obese adipose tissue. Scale bars represent 10 μm .

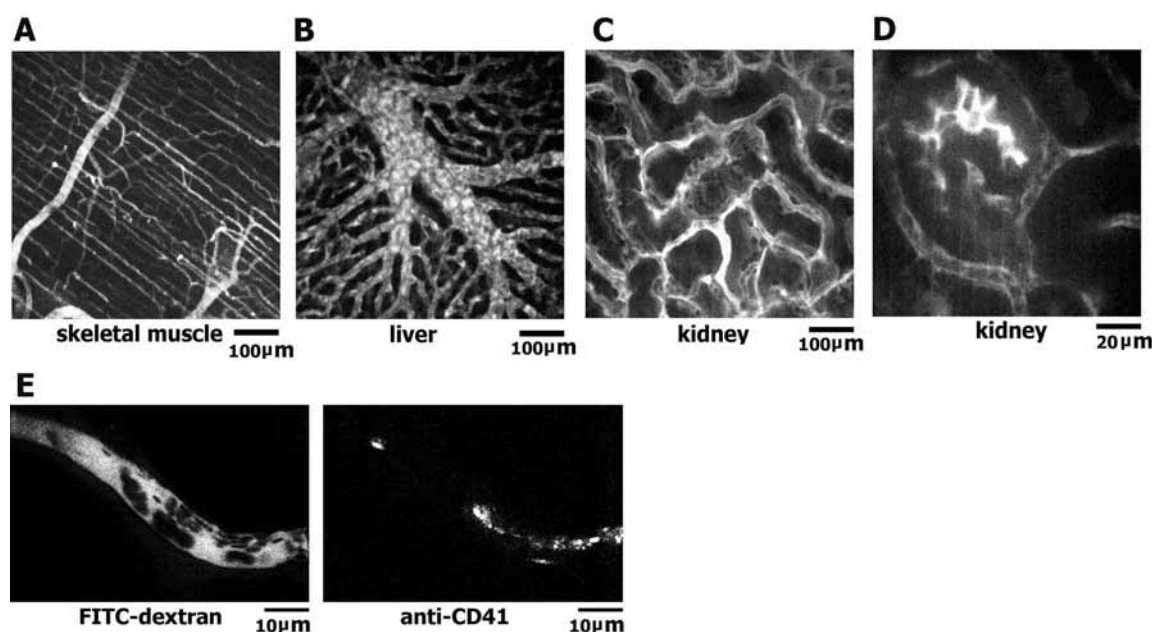


Figure 3 Application of *in vivo* imaging to other organs. FITC-dextran injection visualized blood flow in other organs including skeletal muscle (A), liver (B), kidney (C), and glomerulus (D). Thrombus formation can be performed by laser injury (E) with FITC-dextran and anti-CD41 injection. Scale bars represent 100 μm (A–C), 20 μm (D), and 10 μm (E).

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。肥満動物(ob/ob)の白色脂肪組織内微小循環の観察では、肥満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た(**Fig. 2C, D**)。さらに、肥満脂肪組織中では血流が間歇的に低下し、低酸素も認められた。さらに、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⁴⁾。

背景にある分子生物学的機構を明らかにするためにRT-PCR法およびフローサイトメトリーを用いて表面マーカーを解析した。肥満脂肪組織内では、血管内皮細胞およびマクロファージの両者が形質転換・活性化を起こしており、接着分子(ICAM1, P-selectin, L-selectin, PECAM1)の発現が増加していた。さらに、肥満脂肪組織局所での血小板の活性化(P-selectin発現血小板の増加、単球血小板複合体の増加)を伴い、分子イメージング手法の結果とよく合うものであった。また、血管内皮機能障害を反映して、肥満脂肪組織では血管内皮透過性亢進も認められた。これらの異常な血管内皮・白血球の相互作用は、ob/obマウスだけでなく高脂肪食負荷肥満マウスの内臓脂肪組織でも認められた。しかし、皮下脂肪・骨格筋では認められず、内臓

脂肪特異的に炎症性の細胞動態の変化が起きていることが示唆された。さらに、発現の増加していた接着分子の一つであるICAM 1の中和抗体を投与することにより、急性期における異常な細胞間相互作用を減少させるとともに、慢性期では脂肪組織リモデリングそのものを抑制することが出来た。肥満病態における異常な細胞間ネットワークを形成する接着分子が、抗肥満治療の新規治療標的の一つとなり得ると考えられた。

文 献

- 1) Xu H, Barnes GT, Yang Q et al: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 2003, **112**: 1821–1830.
- 2) Weisberg SP, McCann D, Desai M et al: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003, **112**: 1796–1808.
- 3) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M et al: Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*, 2007, **56**: 1517–1526.
- 4) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M et al: In vivo imaging revealed local cell dynamics in obese adipose tissue inflammation. *J Clin Invest*, 2008, **118**: 710–721.

Adipose Tissue Remodeling and Malfunctioning in Visceral Obesity Revealed by *in vivo* Imaging

Satoshi Nishimura

Department of Cardiovascular Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Key words: metabolic syndrome, adipogenesis, inflammation, angiogenesis

Metabolic syndrome is a major cause of cardiovascular disease, and obese visceral adipose tissue remodeling and malfunction plays a central role. Adipose tissue contains multiple cell types including adipocytes, macrophages, and endothelial cells, and their interaction is important in pathological conditions. To elucidate the underlying mechanisms, we developed *ex vivo*, and *in vivo* adipose tissue imaging techniques that enabled us to evaluate the precise three-dimensional structures and cell dynamics. We found close spatial and temporal interrelationships between angiogenesis and adipogenesis, and both were augmented in obesity. VEGF-antibody inhibited not only angiogenesis but also the formation of adipogenesis in obesity. In obesity, close interactions of activated platelets, leukocytes, and endothelial cells in the vessel walls of adipose tissue were also observed. The activating status of the macrophages that infiltrated the adipose tissue was altered, and the expression of adhesion molecules in adipose tissue increased in the macrophages as well as in endothelial cells. Platelets were activated locally in obesity, and the vascular permeability was also increased. These findings demonstrate that obese adipose tissue can be considered as a site of inflammation and that activation of the leukocyte adhesion cascade is crucial for initiation and progression of inflammatory changes in obese adipose tissue.

(J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 589–593)