

生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織と慢性炎症、 血管機能異常、血栓形成

西村 智

要 旨：我々は、生体内の組織構築・細胞動態を可視化する、「生体内分子イメージング手法」を新たに開発し、メタボリックシンドロームへの脂肪組織リモデリングと機能異常の関与を明らかにした。肥満した内臓脂肪では、脂肪細胞分化・血管新生が空間的に共存して生じており、脂肪組織の微小循環では血管内皮・マクロファージ・血小板の相互の活性化と接着分子の発現増加が観察された。イメージング手法により、まさに肥満した脂肪組織が炎症の場であることが示された。

(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 53-58)

Key words: in vivo imaging, obesity, metabolic syndrome, angiogenesis, adipogenesis

はじめに なぜ生体イメージングなのか？

分子生物学的手法を用いた病態解析は、個々の遺伝子機能の *in vitro* 解析から始まり、遺伝子改変動物を用いた各遺伝子の *in vivo* での解析へと発展してきた。細胞レベルでは主に培養細胞を用いた単一種の細胞が用いられ網羅的な解析がなされている。しかし、慢性炎症を基盤とする動脈硬化・糖尿病・腫瘍等の病態では、多細胞からなる組織の構造・機能変化を本態とすることから、従来の方法では本質に迫ることが難しい。例えば「比較的正常に近い機能破綻」であるメタボリックシンドロームでは、単一培養細胞(脂肪細胞)の異常から個体全体の異常を説明することはできない。一方、個体レベルの検討では遺伝子改変動物が主に用いられるものの、複雑なフィードバック機構により支配されているため、得られた表現型がどのような細胞間相互作用・組織間相互作用によってもたらされるかも不明であった。そして、今までに得られた両者(個体と細胞)のレベルの知見を結びつ

ける解析技術の開発が必要とされ、分子イメージング手法が近年注目されるようになった。我々は、個体における組織・細胞・細胞内小器官レベルでの分子イメージング手法を新たに確立し、「個体で細胞をみる」ことにより、今までに細胞内で得られた知見と個体全体の表現系の情報を結びつけることを可能にした。本稿では、特に、肥満に伴う脂肪組織の機能異常・再構築に焦点をあてて、分子イメージング手法の有用性及び得られた知見について説明する。

肥満に伴う脂肪組織リモデリングと血管新生

近年、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。しかし、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。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、その分子機構は不明である。なぜなら、従来の切片標本を用いた

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い「光の利用と物質材料・生命機能」研究員

2008年12月2日受理

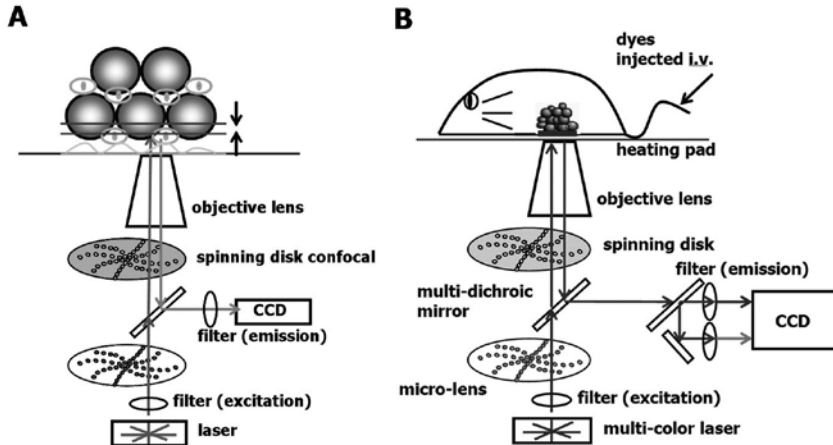


Figure 1 Schematic diagram of imaging method. Schematic diagram of imaging method *ex vivo* (A), and *in vivo* (B). The details of experimental setup and methods are shown in references 1) and 2).

Partially reproduced from *J Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**(6): 589–593.

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明らかではなかった。そこで、我々はメタボリックシンドロームの病態解明を目指し、新たな組織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(Fig. 1)。

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(Fig. 1A)。手法について概説する。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た。従来の切片標本を用いた検討では不明であった詳細な組織構築が三次元的に可視化された(Fig. 2)。本手法を用いて、肥満に伴う脂肪組織リモデリングの詳細を検討した。

肥満動物モデルの内臓脂肪組織では、多くの脂肪細胞は肥大していたが、加えて新たに分化・増殖した小型脂肪細胞が新たに出現していた(Fig. 2)¹⁾。これらの小型脂肪細胞は、ペリリピン染色性・BrdU 取り込みともに陽性であり、分化・増殖した脂肪細胞であることが示された。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浸潤を認めた。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 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、MCP-1 や TNF- α 、といった炎症性サイトカイン産生、さらに、活性酸素の産生もこの cell clusters では増加しており、肥満に伴う「炎症のたまり場」であることが示された。

生体内分子イメージング手法の確立

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、我々は先に述べたような組織再構築がいかに生体内で起きるかを明らかにすべく、生体内の脂肪組織イメージング手法を開発した。そして、肥満した脂肪組織内の微小血管で炎症性変化が起きていること、特に、活性化マクロファージが肥満脂肪組織に浸潤していく過程を明らかにした²⁾。

我々が新たに開発した「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(横河電機 CSU)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を行なった(Fig. 1B, Fig. 3)。

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・露出した。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った。観察中はヒーティングプレートを用いて体温 37 度を保った。本手法は一光子励起のため、臓器表面から 100 ミクロン程度の限界はあるものの、多くの組織で細胞構築・血流が明瞭に観察可能であり、今後、様々な臓器へイ

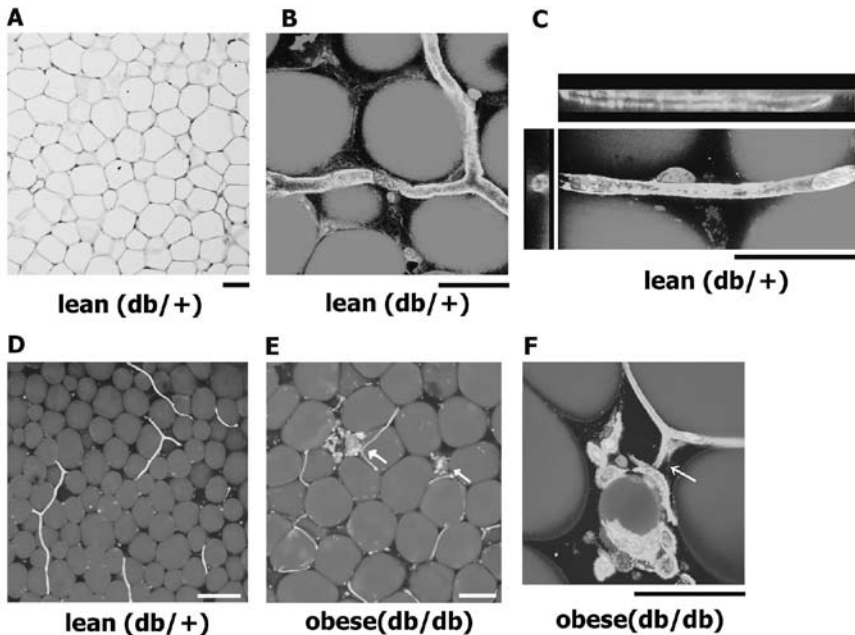


Figure 2 Adipose tissue remodeling revealed by living tissue imaging method (ex vivo). Epididymal fat pads from lean (db / +, A-D), and obese (db / db, E, F) animals were visualized by conventional (A), and living tissue imaging method (B-F). Please note the existence of adipo / angiogenic cell clusters in obese animals including differentiating small adipocyte and angiogenesis (E, F, arrows). Bars: 100 μ m. Reproduction from J Jpn Coll Angiol, 2007, 47(6): 589–593.

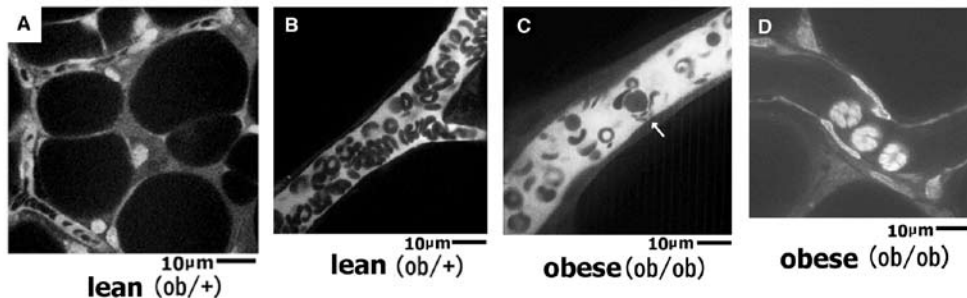


Figure 3 Inflammatory cell dynamics in visceral obesity visualized by in vivo imaging. Multicellular dynamics including adipocyte, endothelial cells, and blood cells can be visualized with high time and spatial resolutions in adipose tissue from lean ob/+ (A, B) and obese ob/ob (C, D) mice by in vivo molecular imaging method. Note the firmly adhered leukocyte and platelets in 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 μ m. Partially reproduction from J Jpn Coll Angiol, 2007, 47(6): 589–593.

メージング手法が適応可能であると考えられる。

血流及び血管構築は蛍光物質 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。デキストランは血管外に漏出することはなく、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まで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た。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(後述, Fig. 4)。

肥満に伴う炎症性細胞動態と血管機能異常

我々は生体内イメージング手法を用いて、脂肪組織内の微小血管で炎症性変化・細胞動態が起きていることを示した(Fig. 3)²⁾。つまり、肥満動物の白色脂肪組織の微小循環を観察し、細静脈において血管壁への白血球の

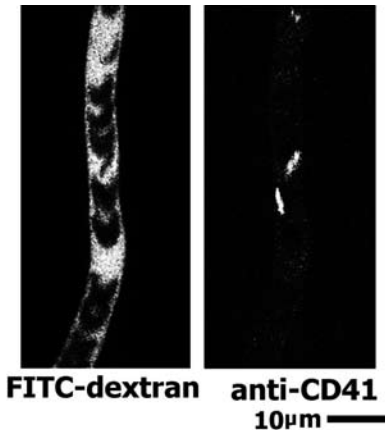


Figure 4 Cellular dynamics in microcirculation by in vivo imaging. The multi-cellular dynamics (erythrocyte, leukocyte, and platelet) in microcirculation can be visualized with high time and spatial resolutions. Platelets can be specifically visualized using fluorescent anti-CD41 antibody. Scale bars represent 10 µm. Partially reproduction from J Jpn Coll Angiol, 2007, 47(6): 589-593.

rolling・adhesion といった炎症性の細胞動態を確認した。さらに、肥満脂肪組織中では血流が間歇的に低下し、低酸素状態であり、脂肪組織の機能異常が認められた。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おり、血小板の関与も示唆された。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。FACS を用いた解析では、肥満した脂肪組織において白血球・血管内皮の活性化と、接着分子発現の増加を確認した。これらの結果は、肥満脂肪組織がまさに炎症の場であることをはじめて明確に示したとも言える。

なお、これらの肥満した内臓の脂肪組織で認められた異常な血管内皮・白血球・血小板の相互作用は、肥満した個体でも皮下脂肪・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された。

CD8 陽性 T 細胞の重要性

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

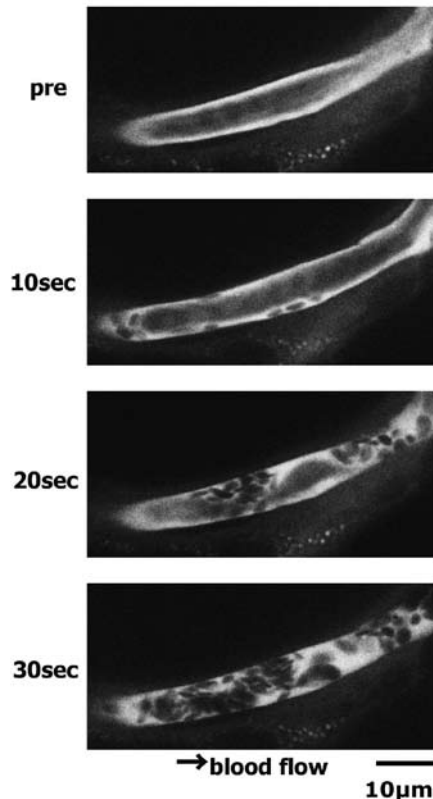


Figure 5 Thrombus formation visualized by in vivo imaging. Developing thrombus and single platelet kinetics can be visualized by in vivo imaging using laser injury to endothelium.

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³⁾。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 T 細胞は骨髄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。

血小板動態の可視化

我々の共焦点レーザー顕微鏡を用いた生体内分子イメージング手法では、長時間・空間解像度ゆえに、生体内の単一血小板の形態・動態が可視化され、多くの知見が得られた(**Fig. 4**)。血小板は、生体外に取り出すことなく、血小板特異的な蛍光標識抗 CD41 抗体を用いて生体内で染色した。血小板は体外では活性化しやすい細胞であり、体外での処理を省けるメリットは大きい。これらの染色と、上記のイメージング手法を組み合わせることにより、はじめて単一の血小板が生体内で明瞭に捉えられた。血栓・凝固・及びその破綻過程も可視化され、血小板に関する研究分野においてきわめてインパクトの高い手法である。

まず、定常状態においては、細動脈・静脈では血管壁近傍にそって血小板は運動していた。流速の遅い毛細血管のレベルでは、血小板は「stop and go」を繰り返しており、血管内皮と断続的に相互作用していた。さらに、血流によって rolling しながら流れているさまも可視化された。

また、レーザー照射を用いて血栓形成過程における、血小板動態・機能も明らかになった(**Fig. 5**)⁴⁾。血管内皮細胞に傷害が生じると、定常状態で内皮細胞と相互作用し「stop and go」していた血小板が、血管壁に強固に接着し、さらに積み上がって数を増やしていき(pile up)血栓が発達していった。pile up された血小板により血管径は狭小化し、流速が低下し、最終的には血栓閉塞に至った。今後、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や、iPS・ES 細胞から誘導した血小板の動態を生体内で観察することで、遺伝子と生体内での血小板機能の関係の検討、各種抗血小板薬等の薬効判定にも有用と考えられた。

結 語

我々が開発した、生体イメージング手法とそれにより得られた肥満脂肪組織及び血小板動態に関する知見について概説した。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ることで、各種病態の上流にある分子機構・シグナルの解明を進めていきたい。

文 献

- 1) 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.
- 2) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M et al: In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest*, 2008, **118**: 710–721.
- 3) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M et al: CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*, 2009, **15**: 914–920.
- 4) Nishimura S, Takizawa H, Takayama N et al: Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo. *J Clin Invest*, 2010, **120**: 179–190.

Obese Adipose Tissue Remodeling, Inflammatory Cellular Dynamics, Vascular Malfunction, and Platelet Kinetics in Thrombosis Visualized by in vivo Molecular Imaging Method

Satoshi Nishimura

¹Department of Cardiovascular Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

²Translational System Biology and Medicine Initiative, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

³PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Tokyo, Japan

Key words: in vivo imaging, obesity, metabolic syndrome, angiogenesis, adipogenesis

Metabolic syndrome is a major risk factor of cardiovascular events, and obese visceral adipose tissue remodeling and malfunctioning based on chronic inflammation plays a central role. To assess dynamic multi-cellular interplay, a novel ex vivo and in vivo adipose tissue imaging method was developed. We found close spatial and temporal interrelationships between angiogenesis and adipogenesis, and both were augmented in obese adipose. In addition, we also found increased leukocyte-platelet-endothelial cell interactions in the microcirculation of obese visceral adipose tissue that were indicative of activation of the leukocyte adhesion cascade, a hallmark of inflammation. Platelets were also activated locally in obese visceral adipose tissue, and upregulated expression of adhesion molecules on macrophages and endothelial cells suggests their increased interactions contribute to local activation of inflammatory processes within obese visceral adipose tissue. Interestingly, the heightened leukocyte-endothelial interactions were not observed in subcutaneous fat pads in the same mice. Our results clearly demonstrated the power of our imaging technique to analyze complex cellular interplays in vivo and to evaluate new therapeutic interventions against them. Results also indicate that visceral adipose tissue obesity is an inflammatory disease. (J Jpn Coll Angiol, 2010, **50**: 53–58)