

生体内分子イメージングでみる 細胞動態と組織再構築

Multi-cellular Kinetics and Tissue Remodeling Visualized by in vivo Molecular Imaging

西村 智
Satoshi Nishimura

^a 東京大学循環器内科・ナノテク人材育成ユニット 特任助教・
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

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の再構築（リモデリング）とそれに伴う機能異常が重要である。我々は生体内分子イメージング手法を新たに開発し、脂肪組織に応用し、肥満脂肪組織では、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示した。また、生体内観察を用いて、肥満した脂肪組織では慢性炎症を基盤として微小循環において異常な血管内皮・白血球・血小板の相互作用が生じている事を明らかにした。すなわち、肥満脂肪組織が慢性炎症の場であることをはじめて可視化し生体内で証明した。生体内分子イメージングを用いた細胞動態・組織再構築の検討は、今後の研究展開において必須と考えられた。

キーワード：生体イメージング、炎症、肥満、脂肪組織

1. なぜ生体イメージングなのか？

現在の血管・代謝研究の主流は依然、分子生物学にある。分子生物学は個々の遺伝子機能の *in vitro* での解析から始まり、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。しかし、個体レベルでの検討では、あくまでも複雑なフィードバック機構により制御された遺伝子変化の最終的な結果を捉えるにとどまっていることが多く、生体内における細胞動態、組織の機能や再構築の詳細は不明であった。我々は、「生体内で細胞をみて、働きを知る」ことのできる「生体内分子イメージング」を開発し、これらの研究における限界点へアプローチを重ねてきた。本稿では、メタボリックシンドローム、肥満、糖尿病といった代謝性疾患に対し、イメージング手法を適応した結果、得られた知見を紹介する。

^a 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
TEL: 03-5800-5139; FAX: 03-5800-5139
E-mail: snishi-ky@umin.ac.jp
2008年9月26日受付

2. 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。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、その分子機構はよく分かっていない。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（図1, 2）。

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（図1A）。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。

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（図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」であることが示唆された。一方、VEGF中和抗体により血管新生を阻害したところ、脂肪組織内の血管新生のみならず小型脂肪細胞分化の出現を抑制し、内臓肥満と全身のインスリン抵抗性の改善が観察された。肥満脂肪組織における異常な細胞連関そのものが抗肥満治療の標的となることが示された。

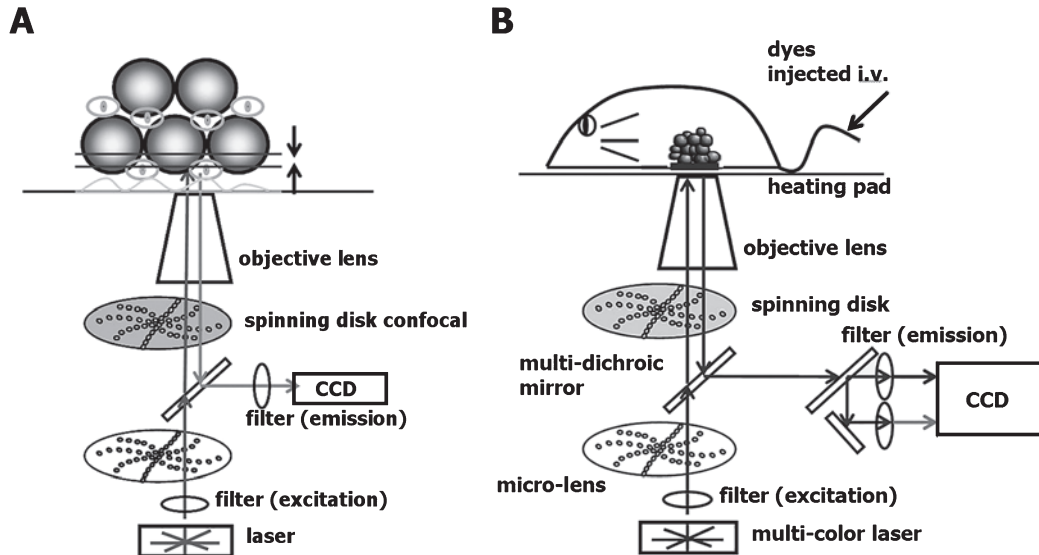


図1 レーザー共焦点顕微鏡による脂肪組織の体外 (A), 体内 (B) イメージング. A: 未固定の生脂肪組織を用いたイメージング (図2に使用), 及び, B: 生きたマウスの体内の脂肪組織イメージングシステム (図3に使用). 詳細については文献1, 2を参照.

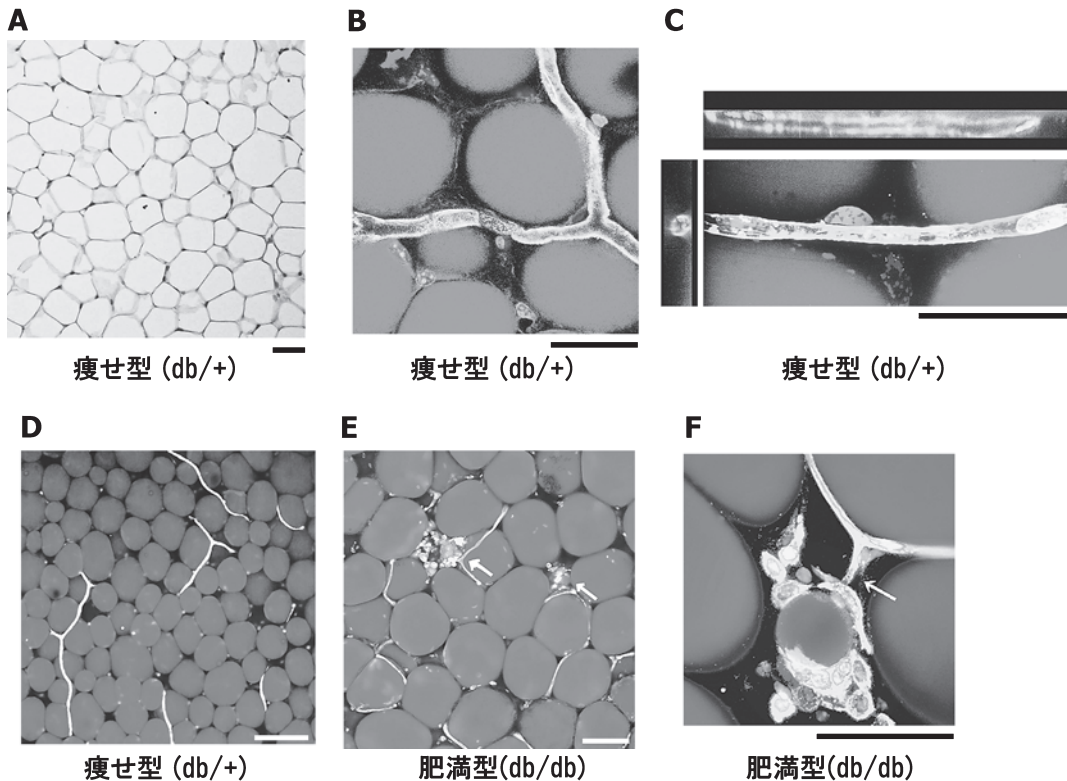


図2 生組織イメージング手法による脂肪組織リモデリングの可視化. a: 従来の白色脂肪組織の固定切片標本, 正常痩せ型マウス (db/+). 血管構築など詳細な構造は不明である. b, c: 新たに開発した生組織イメージング手法によりとらえた, 8週齢痩せ型マウス (db/+) の白色脂肪組織像. 詳細な組織構築が三次元的に明瞭に描出されている. d-f: 8週齢の痩せ型 (db/+) および肥満動物 (db/db) 脂肪組織. 肥満動物では, 肥大した脂肪細胞とともに小型脂肪細胞分化と血管新生 (矢印) を認める.

3. 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, 我々は本生体内分子イメージング手法を肥満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, また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⁾.

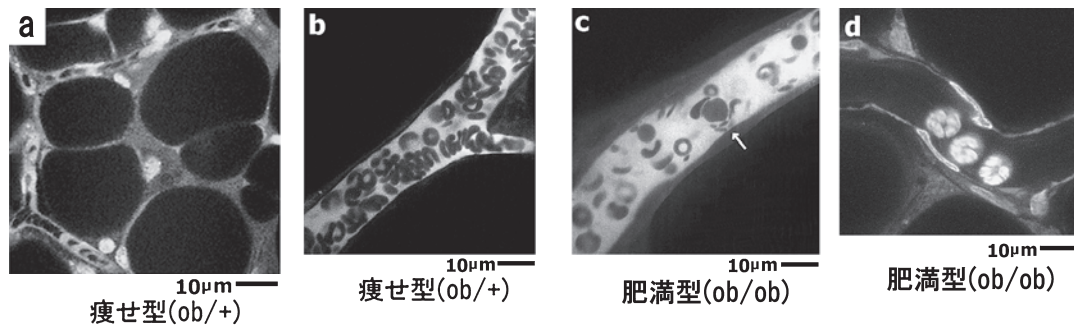


図3 共焦点顕微鏡を用いたマルチカラー生体内分子イメージング。a: 正常動物 (ob/+) 脂肪組織中毛細血管での血流イメージ。血管内を變形して流れる血球、及び脂肪細胞が明瞭に描出されている。デキストランとアクリジンオレンジの同時観察。b: 正常動物 (ob/+ マウス) 及び c: 肥満動物 (ob/ob マウス) 脂肪組織における細静脈の血流イメージ。FITC デキストランにより可視化。肥満動物で血管壁への白血球・血小板の付着を認める (図 c 中矢印)。d: 肥満動物 (ob/ob マウス) における白血球の rolling。アクリジンオレンジにより可視化。

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、血管内を變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が可能となった (図 1B, 3)。

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) を用いることにより、高速イメージングを行っている。検出系としては、冷却高速 CCD カメラを用いている。我々のシステムでは、空間解像度は回折限界に既に達しており、撮影時間も 1 フレーム 5 msec 程度であり、長時間・空間解像度かつマルチカラーでの生体イメージングに成功していると言える。

方法について概説する (図 1B)。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。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變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も可能となった。

4. 肥満に伴う炎症性細胞動態と血管機能異常

我々は本手法を用いて、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 (図 3)²⁾。肥満動物の白色脂肪組織内微小循環の観察では、細静脈において血管壁への白血球の rolling・adhesion といった炎症性の細胞動態が有意に増加していた。さらに、肥満脂肪組織中では血流が間歇的に低下し、低酸素状態であった。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。このように、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た訳である。また、肥満脂肪組織がまさに炎症の場であることをはじめに明確に示したとも言える。

これらの炎症性の細胞動態の背景にある分子生物学的機構を明らかにするために接着分子の発現を解析したところ、肥満脂肪組織内では、血管内皮細胞及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、両者の接着分子 (ICAM1, P-selectin, L-selectin, PECAM1) の発現が増加していた。さらに血小板も肥満脂肪組織局所で活性化していた。肥満内臓脂肪組織における異常な血管内皮・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おきていることが示された。

文 献

- 1) Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Hosoya, Y., Yamashita, H., Fujita, H., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R. and Sugiura, S.: Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells and blood vessels. *Diabetes.*, 56, 1517–1526 (2007)
- 2) Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowai, T., Nagai, R. and Sugiura, S.: In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 118(2), 710–721 (2008)