

トピックス

生体内分子イメージング手法でみる肥満脂肪組織

—慢性炎症、脂肪組織リモデリング、血管機能異常—

西村 智

東京大学循環器内科

はじめに

脂肪組織は長年「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、さまざま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。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、肥満に伴う脂肪組織の再構築(リモデリング)と機能異常に注目してイメージング手法を用いて検討している。本稿ではわれわれが最近開発した、「生きたままの個体で細胞をみて知る」、生体内分子イメージングを用いて得た、肥満に関する知見について概説する。

1. 「生組織イメージング」でみる肥満脂肪組織リモデリング

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。肥満とは白色脂肪組織が増加する事であるが、脂肪細胞が大きくなる(肥大)だけでなく、数も増え(増殖、脂肪細胞分化)、その際に、血管新生が必須であることが示唆されている。さらに慢性炎症を背景として、肥満した内臓脂肪組織にマクロファージが浸潤することが最近示された。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し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、従来の切片標本を用いた観察では、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不明であり、生体内の動態も明らかではなかった(図1A)。そこでわれわれは、「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1B-D)。

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。本手法を用いて、三次元的な組織構築が可視化された(図1B,C)。

本手法を用いて、肥満に伴う脂肪組織リモデリングを検討した¹⁾。白色脂肪組織では、痩せ型マウス(図1)と比較すると、肥満型では肥大脂肪細胞とともに新たに分化した小型脂肪細胞を認めた(図1)。この細胞は、BrdU取り込み陽性、PerilipinA陽性から、分化・増殖した脂肪細胞であると考えられた。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、血管新生と脂肪細胞分化が空間的に共存していた。われわれは、この細胞集団を“Adipo-/angiogenic cell clusters”と名づけた。興味深いことにこのclustersは内臓白色脂肪組織に特異的に認められ、皮下脂肪組織・褐色脂肪組織では観察されなかった。さらに、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、血管内皮・活性化マクロファージ・脂肪細胞の局所での相互作用が内臓肥満の形成(脂肪細胞分化)に重要で、肥満に伴う組織リモデリングを引き起こしていると考えられた。脂肪細胞・炎症性マクロファージ・血管内皮細胞による細胞連関ネットワークを形成するサイトカインの一つであるVEGFを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

Obese adipose tissue visualized by invivo imaging

Satoshi Nishimura

Department of Cardiovasculay Medicine, The University of Tokyo

制され内臓肥満が改善するとともに、全身のインスリン抵抗性病態が改善された。実際に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も明らかになった。

一方、高齢の肥満脂肪組織では、壊死した脂肪細胞と、それを貪食するマクロファージからなる、“Crown Like Structures”も認められた。一部ではコラーゲンの増生や線維芽細胞の集積といった「線維化像」も認め、炎症の終末期像とも考えられた。

2. 生体内分子イメージング手法の開発

従来、さまざまな病態に対する実験的アプローチとして、細胞レベル (*in vitro*)・個体レベル (*in vivo*)それぞれが独立した実験系により評価されてきた。この両者を結びつけるためには、「個体で細胞をみる」ことが重要であると考え、われわれは「生体内分子イメージング手法」を開発した。

内臓肥満に伴い脂肪組織内の血管構築および機能変化が生じ、インスリン抵抗性や動脈硬化といった病態形成に寄与すると考えられるものの、今まで脂肪組織内の血管構築や微小循環といった細胞動態を明らかにする手法が存在せず、肥満病態における血管機能の意義は不明であった。先述したような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り、生体内の脂肪組織を可視化することの重要性がうかがえる。

従来、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

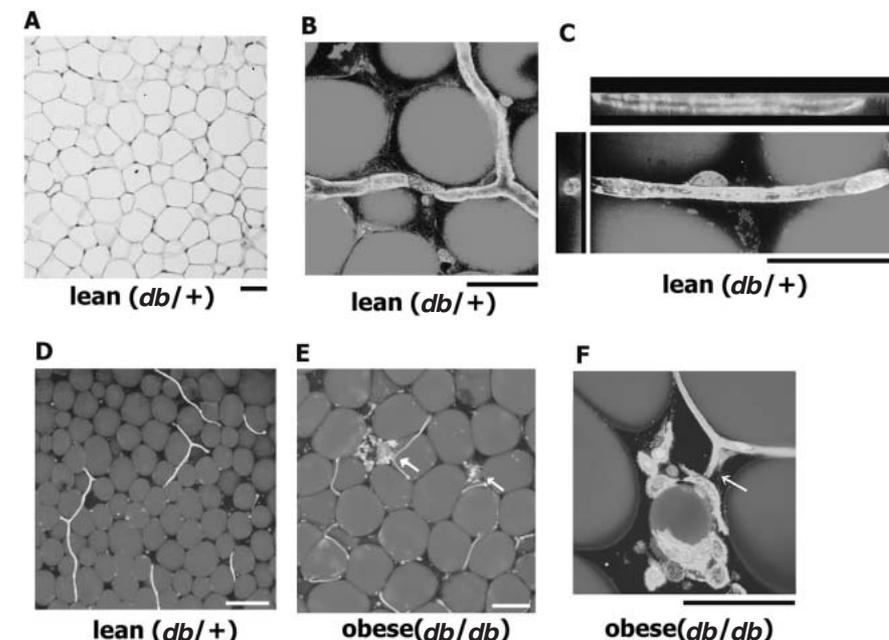


図1 生組織イメージング手法でみる脂肪組織

A：従来の白色脂肪組織切片標本，正常動物 (*db/+*マウス)。血管構築など詳細な構造は不明である。

B-D：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。脂肪組織の詳細な組織構築が三次元的に明瞭に描出されている。

E-F：8週齢の肥満動物 (*db/db*)脂肪組織。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。

流・細胞動態観察を可能にする観察システムを開発した。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とら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。われわれは、本手法を生体内脂肪組織に適用し、生体内での肥満に伴う炎症性の細胞動態を可視化した²⁾。

イメージング手法を概説する。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(図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を用いたが、高速スキミングレーザー共焦点でも同様の画像取得が可能であった。

3. 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。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(図2c, d)。初期の動脈硬化病変

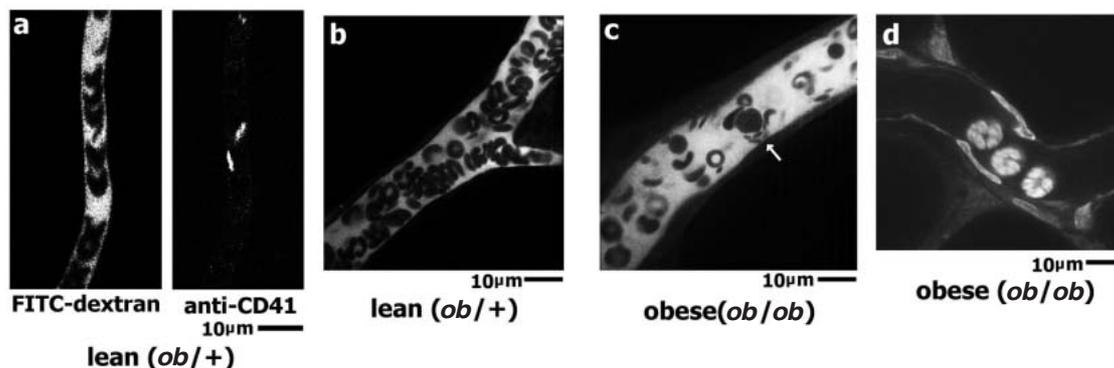


図2 共焦点顕微鏡を用いたマルチカラー生体内分子イメージング

a: 正常動物 (*ob/+*マウス) 脂肪組織中毛細血管での血流イメージ。血管内を変形して流れる血球と血小板が明瞭に描出されている。FITCデキストラン及び抗CD41抗体の同時観察。

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。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。

と同様に、肥満脂肪組織においても白血球と血管内皮の異常な相互作用が認められ、白血球の血管壁への付着には活性化血小板の付着も伴っていた。さらに、肥満脂肪組織中では血流が間歇的に低下し、低酸素も認められた。

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あうものであった。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お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ICAM1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できた。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えると考えられた。

おわりに

われわれの生体内分子イメージング手法では、立体的な微細構造を生体内で明瞭に描出するとともに、組織・細胞の機能や動態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た。

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**(2): 710-721.