

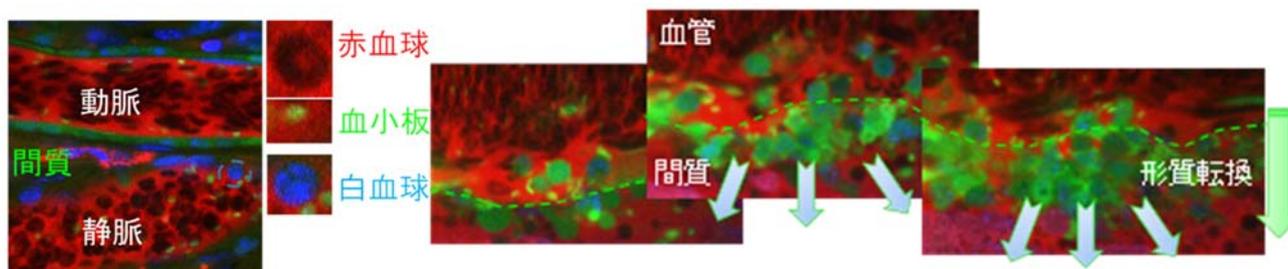
Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	自治医科大学分子病態研究部(教授) 東京大学循環器内科・TSBMI、JST さきがけ(兼務)
氏 名	西村 智
研究テーマ	二光子生体分子イメージングを用いた 慢性炎症を背景とする生活習慣病の病態解明

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

生体内の組織では複数の細胞同士が常に相互作用しており、その破綻が疾患といえる。これらのクロストークを生体内で評価するために、我々は、独自に「生体内で細胞動態をみて、働きを知る」「生体分子イメージング手法」を開発した。本助成では、本手法を用いて、血管傷害に伴う血管平滑筋応答とリモデリング過程、さらに、血栓形成過程をまず明らかにした。二光子顕微鏡を用いて生体内の定常的な細胞動態を高時間空間解像で可視化するだけでなく、光化学反応を用いた血栓形成・ストレス応答を観察し、分子機序を明らかにした。たとえば、血管内皮の特異的傷害により炎症反応が惹起され、白血球が形質転換を起こしつつ遊走する様子も捉えられている(下図)。



炎症とともに血管から間質に移行する白血球と形質転換(青:核、緑:CAG-GFP、赤:血流)

他にも、本手法により腸管膜および大腿動脈において、レーザー傷害による活性酸素産生モデルを用いて、一過性の平滑筋収縮を可視化し血管平滑筋の評価系を作製した。また、脂肪組織を対象とした研究では、本手法を用いて肥満に伴う炎症過程を明らかにしている。CD8 陽性 T 細胞は正に、制御性 B 細胞は負に炎症を制御し、マクロファージ浸潤とそれに伴うインスリン抵抗性を引き起こしており、これらの異常な免疫賦活化の機序を明らかにした。

我々の開発した生体イメージングは、生理機能・病態破綻をリアルタイム・非侵襲的にとらえており、今後、多くの動脈硬化を含む多くの研究領域において重要な役割を果たすと考えられる。

Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	自治医科大学分子病態研究部(教授) 東京大学循環器内科・TSBMI、JST さきがけ(兼務)
氏 名	西村 智
研究テーマ	二光子生体分子イメージングを用いた 慢性炎症を背景とする生活習慣病の病態解明

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

生体内の血栓形成過程の可視化

80年の一生に、ほぼ1回しかおきない心血管イベントを理解するにはどうすればいいのだろうか。どのように生体の血栓イベントは予測できるか。一つの答えは、生体で血栓を誘発し、形成過程を観察することである。我々は二光子顕微鏡によるバイオイメージングと、血栓形成を促す光操作技術を生かし、生体での血栓過程にアプローチした。前頁図は我々が開発した「生体イメージング二光子可視化システム」により観察した、末梢血管での血球動態である。単一血小板が明確に同定されている。マルチカラーイメージングでは、生体内で複数の細胞種を染め分けて同定するとともに、機能プローブを組み合わせ、形態と機能の同時観察が可能である。これらの手法を応用し、生体末梢血管による心血管イベントリスク予測が可能になると考えられた。

我々は、レーザー傷害によるROS産生を伴う血栓形成モデルと、上記の生体イメージングを組み合わせ、最初に血栓形成を高速共焦点で観察した。我々のモデルでは楕円形を伴った血小板のみが血栓形成しており、一方、血管内皮の構築は保たれていた。炎症性サイトカインのノックアウトマウス、キメラマウスの解析の結果、TNF- α をはじめとする炎症性サイトカインが、ROS刺激下でのvWF因子の血管内皮表面への表出に関わっていることが明らかになった。さらに、IL-1、IL-6等の因子も血栓性を促進しており、これらの炎症性サイトカインは血管内皮に作用し、インテグリンシグナルと協同して、血栓の安定化に寄与していた。従来、炎症と血栓については多様な報告によりその関連が示唆されていたが、本解析により血栓形成過程のうち、血管内皮における炎症性サイトカインのシグナリングが血栓形成に関わっていることが示された(Nishimura et al, 2008 JCI, Nishimura & Takizawa et al, 2010 JCI, Nishimura et al, 2012 Blood)。このモデルは後述のとおり、iPS細胞由来人工血小板の機能解析にも有効である。

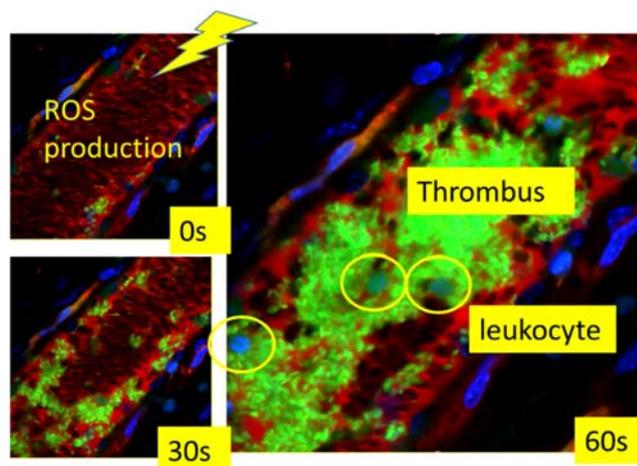


図 生体内における血栓形成過程

レーザー照射により誘発された微小血栓の形成過程。生体イメージングとレーザー傷害を組み合わせることにより、精巣表面の静脈で、血栓を誘発し、血栓形成に寄与する単一血小板を可視化している。レーザー照射に伴う血栓形成に注目されたい。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

iPS 由来人工血小板の体内イメージング

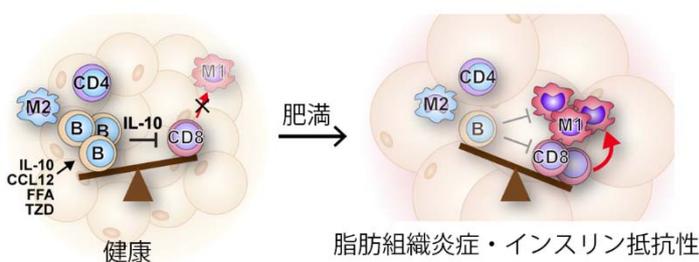
近年の、多能性幹細胞 (ES, iPS) の研究の進歩により、細胞療法を含む再生医学での広い範囲での臨床応用が期待されている。しかし、これらの幹細胞を用いた基礎研究を臨床現場に繋げるためには、in vitro での知見をヒトを対象とした研究に応用する前に、実際に試験管内で作成した細胞が、実際の個体 (マウス及び大動物) の中でどのように機能しているか、どのように病変に働くかを明らかにすることは必須である。しかし、今までこれら iPS 由来の分化誘導細胞の体内での細胞動態を検討する手法は存在しなかった。

我々は、京都大学 iPS 細胞研究所江藤教授チームとの共同研究の結果、iPS 細胞を誘導するのに必要な山中因子の中の c-Myc の発現をコントロールすることにより、飛躍的かつ効率的に、ヒト iPS 由来の人工血小板を作成する手法を確立しており、光イメージングの一つの出口応用とかがえている (Takayama & Nishimura et al 2010 JEM, Nakamura Nishimura Eto et al 2014 Cell Stem Cell)。

我々は生体イメージングを用いて、不死化した iPS 細胞由来巨核球株から得られたヒト iPS 血小板の体内動態の可視化を行っている。観察に用いた免疫不全マウス (NOG マウス) の体内では、iPS 由来人工血小板の細胞動態が捉えられている。さらに、iPS 由来血小板がマウス体内を循環しているだけでなく、レーザー傷害により誘発された血栓形成部位においてはホスト血小板と iPS 由来血小板が相互作用しながら血栓を形成するさまが観察された。つまり、「人工血小板は体内を循環し、血栓も作る」ことが光により証明されたわけである。このように、本イメージ手法は iPS 分化誘導細胞を用いた細胞療法の臨床応用に向けて、安全性・有用性を評価する上できわめて有用性が高い手法とかがえている。

脂肪組織に内在する制御性B細胞の抗炎症作用

我々は、さらに生体分子イメージング手法を脂肪組織に応用し、初期の炎症過程を明瞭に可視化し、肥満脂肪組織が炎症の場であることを直接証明してきたが、さらに、その過程では、脂肪組織に CD8 陽性 T 細胞が浸潤していることを可視化・証明した。本研究ではさらにそれだけでなく、脂肪組織には多くの制御性 B 細胞が多量に存在していることが明らかになった。この B 細胞 (脂肪 Breg) は通常の B1、B2 細胞とは表面マーカーの発現が異なり、新たなサブセットの細胞であることが示された。サイトカイン産生能の検討では、脂肪 Breg は IL-10 を無刺激でも高発現していた。これは、今まで報告されている制御性 B 細胞とは異なっている点であり、脂肪 Breg の特異な形質を示している。B 細胞特異的 IL-10 欠損マウスを作成したところ、脂肪組織の炎症が惹起されインスリン抵抗性が増悪していた。つまり、脂肪 Breg は脂肪組織の炎症を負に制御していることが示された。この脂肪 Breg は皮下脂肪に特に多く存在しており、皮下脂肪の間質の 30% を占めている。そして、この B 細胞は肥満個体では質的・量的、ともに減少していた。肥満個体における脂肪組織炎症およびインスリン抵抗性の一部は、脂肪 Breg の減少によって説明されると考えられた。この知見はマウスのみならず、ヒトにおいても認められた。皮下脂肪組織の中の B 細胞マーカーおよび IL-10 の発現は、肥満したヒトにおいて減少していた。脂肪 Breg の機能は種差を超えて適応されると考えられた (Nishimura et al, 2013 Cell Metabolism)。



図：免疫細胞による脂肪組織炎症制御メカニズム

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

オートタキシン(脂質生合成酵素)と肥満表現形

近年、さらにリン脂質、とくに LPA の生合成酵素のオートタキシン(ATX,ENPP2)の生体内の作用を明らかにしている。我々はまず、検診受診者に対し、一般の検診項目に加え、網羅的に各種血清修飾脂質、リゾホスファチジン酸の生合成酵素であるオートタキシン血清抗原量を測定し、メタボリックシンドロームやインスリン抵抗性の発症へのリン脂質・脂質生合成系の異常の関与を臨床・基礎両面から明らかにした。検診では、オートタキシンと Body Mass Index (BMI)、腹囲、血清アディポネクチン等に強い相関を認め、オートタキシンは肥満者・メタボリックシンドローム患者で有意に低下していた。多変量解析でもオートタキシンは BMI などによって説明され、オートタキシンは慢性炎症を基盤とするメタボリックシンドロームの良いマーカーとなり得ると考えられた。さらに、オートタキシンの生体での作用機序の解析を行うために、オートタキシンヘテロノックアウトマウス、オーバーエクスプレッションマウス、脂肪細胞特異的欠損マウスの作成を行った。その結果、脂肪組織、特に前駆脂肪細胞ではオートタキシンが高発現となっており、脂肪組織から分泌されるオートタキシンが血清レベルを規定している可能性が示唆された。以上より、血清リン脂質とその生合成酵素は新規のメタボリックシンドロームに対する有用なバイオマーカーとなるだけでなく、新しい抗肥満・抗糖尿病治療の標的ともなり得ると考えられた(Nishimura et al, 2014 Diabetes)。

さらに我々は、 $\beta 1$ チュープリンおよび Paxillin 蛋白の血栓形成への関与(2014 Thromb J, 2014 Eur J Haematol)、Mincle の脂肪肝への関与(2014 Nat Comm)、Stabilin2 の癌転移への関与(2012 PNAS)、を明らかにしている。

Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	自治医科大学分子病態研究部(教授) 東京大学循環器内科・TSBMI、JST さきがけ(兼務)
氏 名	西村智

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 国内外雑誌を問わない。 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, Fujita K, Koike T, Harimoto K, Dohda T, Watanabe A, Okita K, Takahashi N, Sawaguchi A, Yamanaka S, Nakauchi H, <u>Nishimura S</u> , Eto K Cell Stem Cell , 2014 in publication.
2	Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation <u>Nishimura S</u> , Manabe I, Takaki S, Nagaskai M, Ostu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I, Kadowaki T, Nagai R Cell Metabolism . 2013, 18, 759-766.
3	TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. Kunishima S, <u>Nishimura S</u> , Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. Eur J Haematol . 2013 in publication.
4	Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis Hirose Y, Saijou E, Sugano Y, Takeshita F, <u>Nishimura S</u> , Nonaka H, Chen Y-R, Sekine K, Kido T, Nakamura T, Kato S, Kanke T, Nakamura K, Nagai R, Ochiya T, Miyajima A PNAS 2012, 109(11):4263-8.
5	In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. <u>Nishimura S</u> , Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich B, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R. Blood . 2012 ;119(8):e45-56.
	次頁へつづく

② <論文 PDF 添付なし>

1	ENPP2 contributes to adipose Tissue expansion and insulin resistance in diet-induced obesity Nishimura S , Nagasaki M, Okudaira S, Aoki J, Ohmori T, Ohkawa R, Nakamura K, Igarashi K, Yamashita H, Eto K, Uno K, Hayashi N, Kadowaki T, Komuro I, Yatomi Y, Nagai R <i>Diabetes</i> , 2014 in publications
2	Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S , Manabe I, Matsuda T, Kimura K, Inoue H, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y <i>Nat Commun</i> , 2014 in publication
3	Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. Sakata A, Ohmori T, Nishimura S , Suzuki H, Madoiwa S, Mimuro J, Kario K, Sakata Y. <i>Thromb J</i> . 2014 12(1):1.

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2014. 11. 27	分子生物学会 第 37 回日本分子生物学会年会 分子生物学の発展に貢献する次世代バイオイメージング技術の最前線 ワークショップ 0978)非線形顕微鏡と定量化手法による仮説抽出:機能形 態融合型イメージングを目指して ○西村 智
2		
3		
4		
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	該当なし	
2		
3		
4		