

第35回 シスメックス学術セミナー／質疑応答

2. 生体分子イメージングによる生活習慣病病態の解析

西村 智

【東京座長・浅野】 西村先生、どうもありがとうございました。動態画像は、自分があたかも生体中に入っているような感じを与えてくれました。また、先生のご講演は、脂肪組織の炎症と糖尿病や肥満の関連について、大きな示唆を与えてくださったのではないかと大変興味を持ちました。それでは、会場からの質問を待っている間に私の方から一つよろしいでしょうか。脂肪組織と炎症との関係では、何がトリガーとなっているのでしょうか。

【西村】 もちろん何が最初のトリガーかを見つけるのは非常に難しく、絵に描いたような話をすれば、例えば脂肪組織が肥満すると肥大してきます。肥大した脂肪組織がそれ以上栄養を蓄え込めない状態になると、炎症性サイトカインのスイッチが入って、MCP-1あるいはTNF- α を発現して、アディポネクチンの発現が落ちてきます。その結果、マクロファージなどが游走されて集まってきて、脂肪組織の中にマクロファージが浸潤することによって炎症が非常に悪くなる、という説明をされることが多いかと思います。しかし、脂肪組織の中を眺めて、例えばMCP-1あるいはTNF- α といった炎症性サイトカインの発現を見ると、実は脂肪組織の関与はそれほど大きくありません。それ以外のマクロファージやリンパ球の方が、ケモカイン、サイトカインを出すプロフェッショナルな細胞ですから、RT-PCRで見ても発現量はより多いのです。そういう意味では、われわれは、脂肪組織におけるトリガーを引くのは、実は免疫系の細胞ではないかと考えています。免疫系の細胞のフェノタイプが変わり、例えばM2からM1にスイッチングすることによって、脂肪組織の中にまずケモカインが増えて、その後、脂肪組織にたくさん細胞が集まることによってサイトカインが増えて、このような脂肪組織のリモデリングが起きて、その結果、糖尿病の状態が起きると考えています。

【東京座長・浅野】 原因と結果という関係ではなくて、そのプロセスで脂肪組織の中にも炎症が起こっているという解釈ですね。

【西村】 一連のプロセスが全体としてそのまま進行するような形ですので、一断面を切って、例えばMCP-1のノックアウトマウスを作ったらどうかという解析はもちろんできるのですが、それが答えだとはなかなか考えづらいです。実際、様々なノックアウトマウスの解析結果の報告などを見ても、それほどクリアカットではありません。従って、より単因子のものが関与しており、その結果、炎症が増幅される。これはメタボに限らず、血栓のイベントについても、動脈硬化についても同じだと思いますが、実質細胞だけではなくて間質細胞が大事で、そこにクロストークがあって、それらが一体となってサイトカインストームのような形で起きると考えています。

【東京座長・浅野】 それに関連してもう一つよろしいでしょうか。通常、慢性炎症というと、どちらかといえば線維化が、老化には脂肪化かとすぐに考えてしまいがちですが、どちらに向かわせるかのスイッチはどのように決まるのでしょうか。血管内皮細胞も脂肪組織も、同じ間葉系幹細胞から出てきますので、そのスイッチは興味のあるところですが…。

【西村】 ファイブロblastも脂肪組織の中に非常にたくさんあって、形質転換も起きます。例えば年を取った方、特に老化が進んだ方の高度な肥満の場合には、脂肪組織や間質細胞がファイibroblastやリンパ球に置き換わってマクロファージがあまりないような、いわゆる線維化の非常に進んだフェーズがあります。そういうフェーズではインスリン抵抗性はむしろ良く、糖尿病の状態が改善

しています。従って、線維化がどれぐらい合目的かということとはなかなか難しい面があるかと思えます。ただ、線維化が起きることによって、炎症の状態はむしろ和らげられて、脂肪組織が炎症を少しレゾリューションするようなフェーズがあることが分かります。

しかし、線維芽細胞はマーカーがなかったりして詳細な解析が進められておらず、今までマクロファージだけに注目した研究が多かったのですが、最近リンパ球などに注目した研究がシフトしています。それだけではなく、今後はファイブロブラストや血管内皮などの相互作用に研究がシフトしていくのではないかと思います。その結果、さらに細胞の中の細胞連関だけではなく、臓器連関も非常に重要になるのではないかと考えています。

【東京座長・浅野】 ありがとうございます。東京会場からご質問はありますでしょうか。

【講師・後藤】 大変面白いというか、エキサイティングな画像をありがとうございました。私たちの世代にとっては「ミクロの決死圏」のような感じで、昔、血管の中に宇宙船のようなものが入って中を見るという映画があったのですが、先生のご講演はそのような感じだと思いました。

先生は、色々なことが明らかになりましたとおっしゃったのですが、最後の浅野先生とのディスカッションを聞いていると、やはり明らかになったことはそんなに多くはないように感じました。恐らく、血栓ができるときに、先生のモデルでレーザー刺激をすると、内皮細胞にヴォン・ヴィレブランド因子が出てきて、血小板も活性化されます。その中には活性酸素が寄与して、TNF- α も寄与するだろうということは想定されたのですが、活性酸素が内皮細胞のヴォン・ヴィレブランド因子の発現に及ぼす影響は、血栓形成における寄与として最終的に何パーセントなのか、血小板細胞側の活性化がどのぐらいの寄与かということは、なかなか難しいと感じます。最終的に1対1対応にしていくところがサイエンスだと考えると、先生が今、浅野先生のご質問にお答えになっていたように、これ

からもう少しシステムの、相互連関的に考えていくと、非常にきれいな画像だったのですが、1対1対応の事象としてはあまり何も分からないのかなという感じでも見ていたのですが、いかがでしょうか。

【西村】 なかなか難しいところもあると思いますが、まず、われわれのモデルが特徴的なのは、血栓ができるまでが非常に短いタイムスパンであるということです。レーザー照射を行ってから血栓ができるまで、20秒ぐらいしかありません。従って、いわゆる転写因子などが動いて、何かの発現に関わるような時間はないわけです。従って、ヴォン・ヴィレブランド因子についても、PCRの解析なども行っていますが、レーザー照射によって変わることはありません。ただ、実際には機能的に、いわゆるmobilizationなどが起きますので、そういう意味で血管内皮への表出が起きます。

われわれがこの実験を始めたときに、特にこの生体イメージングを立ち上げて血栓を眺めてみたとき、最初は非常にクリアカットにものが分かれるのかと思って実験してみたのですが、そうではありませんでした。例えば、凝固系や線溶系に関して、それぞれモジュレートするような薬剤を投与してみると、全体として一団となって、いわゆる血小板の活性化と凝固、線溶がすべて同時に起こるのです。従って、何か一断面を切るような薬を使っても完全に切れることはなく、ほとんどが同時並行なのですが、全部を足すとそれなりに相乗的になります。ただ、GP1bなどでは完全に切れるので、そうするとGP1b依存性なのかなと思っています。そのため、このような解析をすることでまず大事なのは、ノックアウトではどうかとか、薬剤の効果はどうかということもありますが、普通の正常な血栓がいかにできるかということをもう一度考え直すことだと思います。

また、先ほどtwo-stage theoryの話をしました。本当はあのように簡単には切れません。ずり応力といっても、実際には血管の中でずり応力が高いところもあれば低いところもあって非常にまちまちです。それが血管ネットワークを作っている

ので非常に複雑です。そういう意味で言うと、通常の血栓の成り立ちは、今まで試験管中で再現されてきたことから作られた理論ではなく、生体に立ち戻って解析することが本来必要になると思います。ノックアウトマウスの解析は、ある程度の情報量が得られますが、ただ、ある物質がないというだけですので、大体リーサルでないということで、完全にスペアされています。そういう意味で、ノックアウトマウスの解析などを行っても、なかなかすべてが見えてきません。従って、例えば遺伝子の働きが光によって見えるといった形の、より直接的に生体の中で起きている事象をとらえるような技術がまず必要ではないかと思えます。そのためには、発生工学がもう少し進歩し、光学機器ももう少し進歩していかなければなりません。従って、このフィールドはまだまだ始まったばかりかと思えます。

【講師・後藤】 ありがとうございます。われわれは、1対1対応でAならばBであることが分かれば、分かったと思えますが、生命体はAならばBである、CならばDであるという条件が多すぎて、全体像としてさっとは見えてもその中の相互連関を最終的に理解するまでにはまだまだ時間がかかるのかなということが、先生のお答えを聞いてよく分かりました。ありがとうございました。

【東京座長・浅野】 後藤先生、どうもありがとうございました。神戸会場から質問があるようです。神戸会場の村田先生、よろしくお願いします。

【神戸座長・村田】 西村先生、大変美しい絵の入った講演をありがとうございました。

一つご質問したいのは、shearのレベルで、血小板の変形の状況が違うというお話をされて、low shearの場合には非常にはっきりとしたアクティベーションで変形するのですが、high shearの場合にはディスコイドを保ったまま、血小板がそのまま保っているといったスライドが出ていたと思うのですが、これはメカニズムとしてはどのようにお考えでしょうか。例えば、low shearの場合は

非常に局所の刺激の物質の濃度が高くなって、いわゆる血小板の生化学的な活性化が強くなると思うのですが、一方でhigh shearの場合はGP1bとヴォン・ヴィレブランド・ファクターのインタラクションだけでその接着が行われているということで、1bから入るシグナリングが非常に弱いからディスコイドのままを保っているのでしょうか。あるいは、時間がたてばhigh shearの場合も血小板の形態が変わってくるのか、そのあたりを教えてくださいませんか。

【西村】 先ほど私はtwo-stage theoryについてお示しました。私から言うまでもないと思いますが、ご存じのとおり、その基になっているデータのほとんどが*in vitro*のフローアッセイで、生体からの情報ではありません。*in vitro*のアッセイで、例えばコラーゲンコートあるいはヴォン・ヴィレブランド・ファクターでコートしたもので血小板の接着がどれくらいできるかということで、それに対して先ほどのtwo-stage theoryが言われています。しかし、生体の中で見てみると、私は実際にはもう少し違った考えを持っていて、ずり応力の変化そのものの方が重要ではないかと思えることが多いのです。例えば、血小板が活性化しているわれわれのモデルで、どういうところで血栓ができやすいかということ、血流が必ず変わるような、例えば血管が枝分かれしている根元などで非常にたくさん血栓ができているのをよく目にします。従って、これは川の流れと一緒にだと思えますが、このような流速の変化あるいはずり応力の変化が、もう少し重要なのではないかと思います。

実際には、そこに対して、より $a \cdot 2b / \beta \cdot 3$ がlowの方では重要であり、そしてヴォン・ヴィレブランド・ファクターの方がhighの方では重要であるということが、いわゆるフローチャンバーのアッセイから言われていたのですが、先ほど後藤先生にも言われたように、生体で見るとそこまでクリアカットには区別できません。ノックアウトの解析などを行ってもそこまできれいには別れないため、やはり実際の生体はもう少し境界が曖昧ではないかと思えます。そこにはずり応力の変化や、病態

によっては先ほどお示したように multicellular (多細胞性) のファクターがあって、単球あるいは白血球の関与が重要ではないかと思えます。

【神戸座長・村田】 ありがとうございます。マイクを東京会場に戻しますので、よろしくをお願いします。

【東京座長・浅野】 それでは東京会場から一つ質問がありますので紹介させていただきます。「血小板が最初に付着、凝集する場所となる内皮細胞の寿命、疲弊、変性は、先行する要因とはならないのでしょうか。時に、感染性病原体、ウイルスやマイコプラズマはいかがでしょうか」という質問です。内皮細胞の変化が最初の要因にならないかということです。西村先生、よろしくをお願いします。

【西村】 今回私がお示したのは、あくまでもショートタームの実験です。実験をし始めて20秒ぐらいでまず血栓ができて、その後、5分、10分経過していくとフィブリネットが出てきて、血栓が安定化してくるモデルです。従って、血管内皮のフェノタイプを直接見ることはできませんが、例えばレーザー照射をもう少し広範に行って血栓を作らせ、血管内皮を回収すると、血管内皮のセレクチンファミリーなど接着分子の増加が見られます。従って、血栓ができることによって、血管内皮のフェノタイプが変わり、inflamedな状態になってより病態を来しやすくなります。やはり、白血球のアドヒージョン（接着）のところに必ず血小板の付着が見られるということは今まで経験したところでした。従って、このような活性化血小板があることによって、白血球が集まってきて、白血球と血小板が相互作用して病態を起こすというのが、動脈硬化も然り、メタボリックシンドロームも然り、血栓症も然りということだと思います。

【東京座長・浅野】 もう一つだけ最後の質問ですが、iPSの凝集のところですが、初めて見たのですが、赤く見えて、ほかの血小板との相互作用とおっしゃいましたが、あれ自身が凝集したり、接着し合ったりしているとは見受けられなかったのですが、その辺の機能はどう解釈なさっているのでしょうか。iPS細胞に本当に凝集能があるのか、接着能があるのかという質問です。

【西村】 iPS由来の人工血小板は、それだけで血小板凝集を起こすこともできますし、活性化もします。ただ、まだ少し分からないところもあり、作ったものはヒト由来の細胞で、実験しているのは免疫不全とは言え、マウスです。そのため、ヒトとマウスの交差反応性があるため、あのようなホストの血小板との相互作用があるのだと思いますが、注意深く見ていくと、iPS由来で作った人工血小板はそれ自体が血管壁に付着することもあるし、あるいはホストの血小板と相互作用することもあり、また血小板同士が付着することもあります。従って、マウスの中においても血小板として十分機能し得るので、ヒトにおいても機能し得るのではないかと考えて、将来的な臨床応用性も含めて、現在検討しているところです。

【東京座長・浅野】 どうもありがとうございました。まだまだ質問のある方もいらっしゃると思いますが、時間となりましたので、このあたりで終了させていただきます。西村先生、素晴らしいお話をどうもありがとうございました。

【後日ご回答をいただいた質問】

【質問】 再生不良性貧血の場合、造血細胞は減り脂肪細胞は増加しますが、このモデルにおけるマウスでの血管および血液動態の観察は行われましたでしょうか。生活習慣病での肥満細胞と間質系の炎症反応とは異なる状態でしょうか。

【回答】 残念ながら再生不良貧血モデルについては未検討です。ただし、肥満脂肪細胞の炎症性の変化は、他の疾患モデルでも共通の機構があると推察されます。

【質問】 ROS発生にフェムト秒レーザーを用いたかと思えます。大森教授（分子科学研究所）がアト秒レーザーの構築に成功し米国物理学会の会員になられています。もしアト秒レーザーを先生の装置と組み合わせることができれば、もっとゆっくりした時間分解でのROS発生や血栓の発生が観察できるようになるのでしょうか。

（日本臨床ウイルス学会誌「臨床とウイルス」39巻5号265頁（左側中央あたり）にそのことを書かせていただいております。）

【回答】 ROSの発生については、一光子励起で実験をしています。二光子の場合、レーザーパワーをあげると、組織に不可逆的な熱傷害が出てしまうため、光科学反応によるROS産生には不向きと考えています。ただし、今の光学システムであれば、C-MOS高速カメラを使えば、1000fpsぐらいまでの観察は一光子で可能です。

【質問】

- 1) 細胞レベル、組織レベルの映像の手法に必要な材料は何でしょうか。
- 2) 遺伝子変異動物のイメージングについて
(1) 認知症の場合はどのように取り組まれるのでしょうか。

私共は、 β -アシロイド \times tauなど複数の遺伝子変異のモデルマウスを扱っています。

- (2) がん転移のイメージングにどのように取り組まれますでしょうか。

【回答】

- 1) 必要なのは生体で動くプローブ、GFPなどによる遺伝子改変動物、生体で動く抗体、といったところ。光学系としては高速スキャンの可能な共焦点システムが必要になります。
- 2) Thy1プロモーターによる脳のイメージングで既に他施設で観察がされていると思います。ただし、残念ながら私の自験はありません。

癌については皮下腫瘍モデルでイメージングが可能です。転移については、例えば頭蓋骨のイメージングが骨転移のイメージとして適応可能です。同様に肝転移など内臓への転移であればイメージング可能です。

【質問】 低血圧、非糖尿病、非動脈硬化、喫煙なし、軽度高脂血症で、動脈解離（脾動脈上部消化管動脈、解離は11.9mm）になった場合として考えられる原因は何でしょうか。

【回答】 動脈解離については、マウスモデルがありますが、病変が深部のために生体イメージングの適応ではありません。リスクファクターが無く、動脈硬化などが進行する原因については、まだ本態は不明であると思います。

【質問】 巨核球が血小板を放出するイメージングを示していただきましたが、このイメージングのタイムコースはリアルタイムでしょうか、また、ビデオのコマで短縮したものでしょうか。巨核球はどの程度のタイムで血小板を放出しているのでしょうか。

【回答】 このイメージングは一コマ撮影1分のものを、毎秒7コマで再現しており、420倍の圧縮になります。巨核球は30分程度のタイムで血小板を放出しています。

【質問】 抗がん剤でがん治療を行い、がん部の縮小の効果は出ているのですが、血小板低下のため（輸血するほどではありませんが）、決められた日程での抗がん剤治療を勧められない場合があります。血小板の数値を正常化し、抗がん剤治療を勧められるような良い方法はありますか。

【回答】 巨核球の成熟および血小板の放出を促す因子は、TPO/SCFといったものしか同定されていません。TPOの効果も骨髄レベルの観察ではそれほど切れ味が良くないという印象です。巨核球の分化については未解明の部分が多く、今後の研究の展開が期待できます。その結果、TPOに次ぐような、臨床製剤が可能になると思います。