

骨組織・骨髄内の2光子励起ライブイメージング

——その方法論と免疫学・生命科学研究への応用

In vivo imaging of bone tissues and bone marrows

——The methodology and its applications for studying immunology and biosciences



石井 優

Masaru Ishii

大阪大学免疫学フロンティア研究センター生体イメージング

◎硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部は従来、生きたままでの観察がきわめて困難であると考えられていた。実際にこれまで骨や骨髄の研究では、固定して摘出した骨をカルシウムキレート剤に1週間ほど漬け込んで脱灰して薄切したり、未脱灰の骨組織を硬質の剃刀で切片にしたりして観察していた。この従来法でも骨内の細胞・組織の“形態”や“分子発現”(免疫染色による)を解析することはできたが、決定的な情報が欠落していた。それは細胞の“動き”である。細胞の“動き”を観察するためには、生きた細胞を生きた組織のなかで観察する必要がある。さらに、骨髄腔のように血管床を介した豊富な循環血流を保ったまま、そこで流入・流出する細胞の動きをとらえることが重要な組織では、“摘出して生かした骨組織”ではなく、“生きた個体のなかの骨組織”を観察する必要がある。著者は最近、2光子励起顕微鏡を駆使して、マウスを生かしたまま骨組織内を観察するイメージング法を立ち上げた。この方法を用いることによって、骨組織のリモデリングにかかわる破骨細胞や骨芽細胞、骨髄内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きた動きをリアルタイムで観察することが可能となった。本稿では、これを用いて明らかにした破骨細胞動態に関する著者の最近の研究成果の紹介に加え、この方法論の実際や、その免疫学・生命科学研究における今後の応用と発展性について概説する。



骨組織、骨髄、2光子励起顕微鏡、生体イメージング

「百聞は一見に如かず(Seeing is believing)」というように、“見る”ことはヒトの五感のなかでも特別な存在感を示しており、視覚に訴える“イメージング”研究の成果には強い説得力がある。近年の顕微鏡・レーザー技術の長足の進歩によりライフサイエンス分野でのイメージング研究が急速に展開しているが、とくに、組織深部の観察が可能で光毒性が少なく、生きた組織の観察に適した“2光子励起イメージング”の登場により、個体・組織を生かしたまま、生きた細胞の動態を観察することが可能となってきた。

本稿ではとくに著者が最近立ち上げた、生きた

個体での骨組織・骨髄内の2光子励起イメージングについて、その方法論と今後の応用について解説する。

なぜ“2光子励起イメージング”なのか

2光子励起顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡観察(共焦点レーザー顕微鏡も含む)で用いる励起光の半分のエネルギー(=2倍の波長)をもったレーザー光を用い、短いパルス状に放出したもの(超短パルスレーザー)を励起光源としている。パルス状の光子は焦点面で一点に集められ、密度が高い状態となる。その結果、2光子励起(=通常1光子励

起)では光子1個で励起する蛍光分子を光子2個分で励起すること]が起こりうる。2光子励起顕微鏡の特徴として以下の2点があげられる。

① 高いz軸解像度：フォーカス平面のみでしか励起が起こらない[その他のz軸平面では(通常の励起に必要な半分のエネルギーの)光子が当たっているものの励起には至らない]。

② 高い組織透過性：励起光として通常の半分のエネルギー(2倍の波長)の近赤外光(通常は波長が780~1,000 nm)を用いるため、組織の深部まで光を到達させることができる(※注：波長が長いほど障害物を越えていきやすい。テレビのリモコンなどに使われている赤外線は障子やガラスを通過するが、紫外線は紙1枚で容易にカットできる)。

固定した組織・臓器は薄切してプレパラートにすれば、あらゆる断面を観察することができるが(物理的スライス)、生きた丸ごとの組織の内部を観察するには2光子励起顕微鏡を用いて、深部組織でz軸平面を変えて観察することがきわめて有用である(光学的スライス)。このため、生きた組織の観察手段として2光子励起顕微鏡が近年、国内外で多用されつつある。たとえば、動物の脳や内分泌腺など臓器・組織を摘出して(=個体は sacrifice して)、培養液中で生かしながら2光子励起観察されてきた(“tissue-explant” two-photon imaging とよぶ)。

“生体(=intravital)” 2光子励起観察のメリット

免疫系はとくに細胞の動きが重要なシステムである。好中球やマクロファージなどの抗原提示細胞や細胞性免疫を担うリンパ球が感染局所や全身をくまなく遊走し、リンパ組織間内の微小環境で会合し、たがいに信号を伝達することにより免疫機能が維持されている。これら細胞遊走は時空間的に精緻にコントロールされており、各細胞が適切な場所に適切な時間に存在しなければ、機能を十分に発揮できない。これら免疫系における統率された細胞遊走システムは、神経系での固定した軸索システム(“hard-wired”)と比較して“soft-wired”と形容される。

このようなシステムの解析のため、2光子励起観察をさらに一歩進めて、実験動物を生かしたまま顕微鏡に載せて注目する組織を観察する“intravital two-photon microscopy(生体2光子励起顕微鏡観察)”の手法が2002年ごろより海外の複数の研究者によって開発された^{1,2)}。この方法論では、注目する組織のみならず、個体自体が生きており全身の血流や代謝が保たれた状態で観察できるため、きわめて多くの情報が得られる。

著者はとくに骨組織・骨髓腔内の“intravital” imagingに取り組んだ^{3,4)}。この方法では骨髓腔内を流れる豊富な血流が保たれているため、骨組織に定着している細胞の動きのみならず、血管から骨髓内へ細胞が流入したり逆に血中へ灌流していく様子を観察することができる。さらには薬剤を尾静脈などから全身投与すると、血流を通して速やかに観察部位に到達させることができる。このような長所から著者は骨の tissue explant imaging では intravital imaging を行っているが、そもそも骨のように血流が豊富な組織は取り出した状態で生かして観察することはかなり難しい。

骨組織・骨髓内の生体イメージングの実際

骨基質に含まれるリン酸カルシウム結晶は励起光を容易に散乱させるため、2光子励起に用いる近赤外線レーザーを用いても深部まで到達させることは難しい。現在の近赤外線レーザーでは軟部組織であれば表面から800~1,000 μm まで到達が可能であるが、骨組織の場合は150~200 μm が限界である。このため著者らは、骨基質が薄くて骨表面から骨髓腔まで80~120 μm で到達できるマウスの頭頂骨をイメージングに用いた(図1)。

また、骨組織・骨髓内細胞のイメージングに関しては、その蛍光標識の方法にも難点があった。2光子励起イメージングを含めて、あらゆる蛍光イメージングでは、見たい対象物を蛍光標識する必要があるが、リンパ球のイメージングなどの intravital imaging では、あるマウスから細胞を取り出して *ex vivo* (生体外)で蛍光ラベル(細胞透過性の蛍光色素が各種存在する)して、これを別のマウスに adoptive transfer すると、リンパ節内に蛍光ラベルしたリンパ球が多数観察される。しかし、

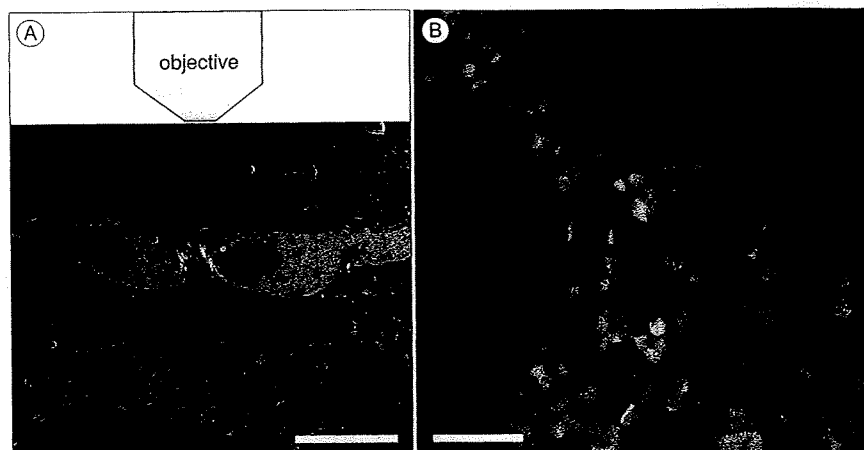


図1 骨組織(骨髄内)の2光子励起ライブイメージング⁶⁾

Lysozyme M promoter-EGFP transgenic mouse の頭頂骨の断面像(A)と、2光子励起顕微鏡による生体イメージング像(B)。生体イメージングでは骨髄内の血管構造を、Texas red を conjugate した高分子デキストランを静脈注射にて可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する。スケールバー=100 μm (A), 30 μm (B)。

同様の手法は骨髄系の細胞に関してはうまくいかないことが多い[理由としては、細胞に起因するもの(体外へ出すと脱分化しやすい、など)や、骨髄腔に関連したもの(骨髄腔は細胞が詰まっており、移入した細胞が入る余分なスペースがない、など)]。

このため著者らは、可視化したい細胞に特異的に蛍光分子を発現させたトランスジェニックマウスを用いて実験を行った。たとえば、単球系細胞のイメージングには CSF1R (M-CSF/CSF-1 の受容体) や CX₃CR1 (CX₃CL1/fractalkine の受容体) のプロモーター下に EGFP を発現するマウス、顆粒球系のイメージングには、Lysozyme M プロモーター下 EGFP 発現トランスジェニックマウスなどを用いている。これらの問題点としては、蛍光分子の発現が完全に細胞系統特異的とはなっていないこと(たとえば Lysozyme M-EGFP transgenic であれば、EGFP の発現は顆粒球以外にも一部マクロファージや NK 細胞などにもみられる)や、作成にコストと時間がかかることである。一方で長所としては、adoptive transfer とは違って、もともとその組織・臓器にいた状態(*in situ*)での細胞を観察できるので、よりインタクトな細胞現象を観察できる点である。

生体骨組織イメージングによる 破骨細胞やその前駆細胞の動態解析

破骨細胞は単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞であり、古い骨を壊して吸収する特殊な能力を有する。破骨細胞は骨を新生する骨芽細胞と協調して機能し、骨組織のホメオスタシスを維持しているが、加齢や炎症により破骨細胞の機能が亢進するとバランスが骨吸収側に傾き、骨粗鬆症の発症につながる。また、関節リウマチでは関節炎局所に活性化破骨細胞が多数誘導され、骨破壊に関与していることが知られている。

これまでの研究成果により、破骨細胞は骨髄ストロマ細胞や骨芽細胞などによって産生される M-CSF (macrophage colony stimulating factor) や RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) からの刺激によって分化・成熟にすること、RANKL 刺激は NF- κ B や NF-AT などの転写因子群を介して破骨細胞の分化を誘導すること、などの重要な知見が確立している。その一方で、長らく解決されていなかった重要な謎があった。それは「破骨細胞(およびその前駆細胞)はどうやって骨表面に到達するのか」である。——「どのような分子機構が破骨細胞の遊走を調節しているのか」「いったん骨表面に達した破骨前駆細胞はすべて最終分化するのか(ふたたび戻っていくことはあるのか)」

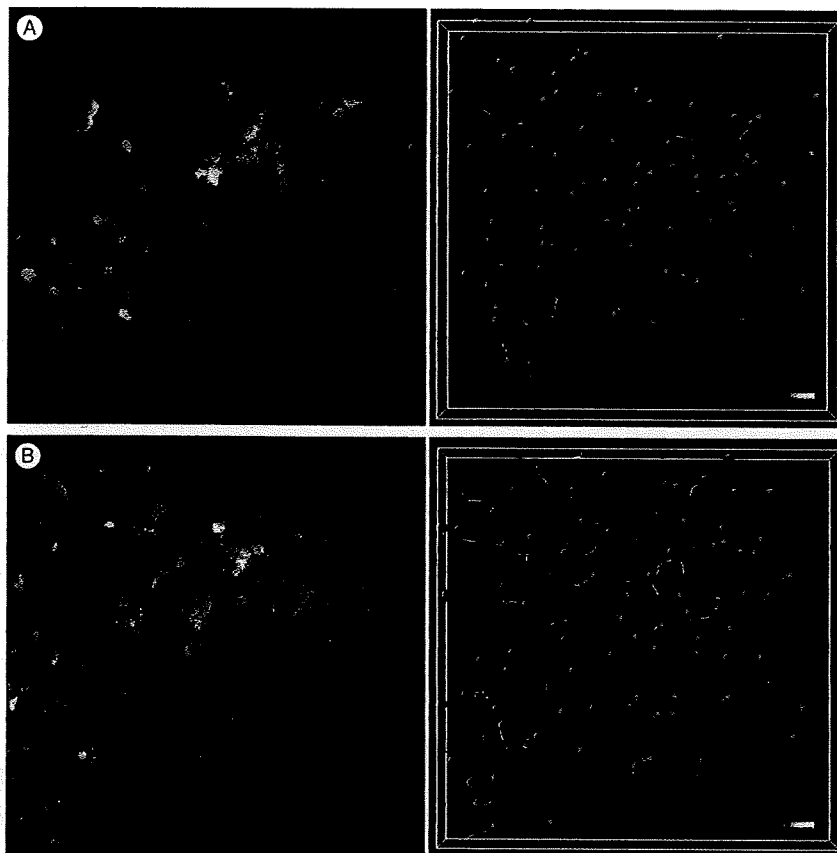


図 2 骨組織内での破骨細胞およびその前駆細胞の生体2光子励起イメージング⁴⁾

A: 定常状態, B: S1P アゴニスト.

破骨細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1-EGFP⁺)を緑色で標識し可視化している(左). また, 各細胞を球体に置き換え, 軌道を描いて速度を計算している(右). 定常状態では, 単球系細胞はほとんど静止しているのに対し(A), S1P アゴニストである SEW2871 を投与すると, 急速に細胞の運動能が亢進し, 血中へ還流していく様子が観察される(B).

か)」など, 破骨細胞およびその前駆細胞の生きた骨組織内での動態についてはまったく明らかにされてこなかった.

著者はこれらの謎に迫るべく, まずはじめに種々のケモカインや脂質メディエーターについて破骨細胞を動かしうるかどうか, *in vitro* の実験系でスクリーニングを行った. その結果, 血中に豊富に存在する脂質メディエーター, スフィンゴシン 1 リン酸(S1P)などのいくつか興味深い分子が, 破骨細胞前駆細胞の遊走能を *in vitro* で刺激しうるということがわかった. しかしこのつぎの段階として, 「これらの候補分子が実際に *in vivo* で破骨細胞やその前駆細胞を動かすのかどうか」を解決する必要があった. このため 2 光子励起顕微鏡を用

いて, 生きた骨組織内部での破骨細胞およびその前駆細胞の動態を解析し, この観察系において S1P 刺激を加えて, その効果について検討した^{4,5)}.

骨組織にある破骨細胞前駆細胞を含む単球系細胞(CSF1R-EGFP⁺細胞, また CX₃CR1-EGFP⁺細胞など)は定常状態では骨組織および骨表面付近にとどまり, ほとんど動きが認められなかったが, S1P 受容体に対する強力なアゴニストである SEW2871 を経静脈的に投与すると, 急速に動きが大きくなり(約 30 分ほどで動きが最大になる), 多くの細胞が血管へと移行していく様子が観察された(図 2; 文献⁴⁾の supplementary videos や, 著者の研究室のオリジナル HP⁶⁾を参照). これにより, *in vivo* の骨組織内でも破骨細胞前駆細胞は確か

に S1P 受容体刺激に反応して遊走能が亢進することが実証された。

骨組織の生体2光子励起イメージングの今後の応用と課題

骨組織・骨髄腔では多種多彩な種類の細胞現象が営まれている。破骨細胞や骨芽細胞・骨細胞による骨代謝制御の場であるばかりでなく、Bリンパ球をはじめとして種々の血液系細胞の発生・機能分化にとってきわめて重要な部位である。また、メモリー B/T リンパ球などにより保持される長

サイド メモ

骨のなかにある細胞・ 営まれている生命現象

骨組織・骨髄内にはさまざまな細胞種が所狭しとひしめきあって存在しており、以下に示すそれぞれ固有の機能を担っている。これらのいずれもが今後、2光子励起ライブイメージングを駆使した研究の対象となる。

- ① 骨代謝：古い骨を吸収する破骨細胞(血液単球系)、新しい骨を形成する骨芽細胞、およびこれが終末分化した骨細胞(いずれも間葉系起源)によって、骨代謝(コラーゲンやカルシウムなど)の恒常性が保たれている。
- ② 造血・血液生成：血液系幹細胞から顆粒球系やリンパ球系の多種多様な血液系細胞が生成される。これらに対しては骨髄間葉細胞(ストロマ細胞)により、種々の細胞の生存・分化にとって最適な環境(ニッチ)が提供されている。
- ③ 免疫現象：胸腺で特殊な教育を受ける T 細胞とは異なり、B 細胞の分化・成熟は骨髄内で行われる。また、長期免疫記憶をつかさどる(中枢)メモリー B/T 細胞・形質細胞の一部は骨髄内にあるとされている。
- ④ 癌細胞：白血病や骨髄腫のようにもともと骨髄内にいる細胞の癌化のみならず、乳癌をはじめとして骨組織に親和性をもって転移する癌がある。
- ⑤ 間葉系細胞の分化・移動：骨髄内には多くの間葉系細胞が存在する。現時点では十分に分類ができていないが、細胞によって種々のサイトカイン・ケモカインを産生し、固有の機能を担っていると考えられている。また、末梢組織の修復などの際に、骨髄のプールより未分化間葉系細胞が動員されるとの知見がある。

期免疫記憶の座所である。骨髄腔内での各種細胞の挙動・位置決めとその分化制御がなされる特殊な環境(ニッチ)の同定・解析は現在、免疫学のみならず生命科学全般においてきわめて大きな研究課題といえる。一方では癌の骨転移で、本来存在しないはずの細胞(癌細胞)が骨組織に到達し、しかもきわめて巧妙に彼らにとっての“特別な場所”を見出して生き延びていることから、骨髄腔には内在・外来性にかかわらず、多種多様な細胞がそれぞれのニッチをみつけて暮らしていることがわかる。こういった骨髄腔内での各細胞の挙動・位置決めとその分化制御がなされる特殊な環境の同定・機能解析のためには、骨組織の生体2光子励起イメージングはきわめて強力な研究ツールとなることが強く期待される(「サイドメモ」参照)。

その一方で、本方法論に関して今後のさらなる技術革新が望まれるものとして、以下の点があげられる。

① 頭頂骨以外の骨組織のイメージング：現時点では十分な解像度で可視化できる骨組織は、骨梁が薄くレーザー光を透過させやすい頭頂骨に限られている。基本的にはどこの部分の骨であっても骨代謝や骨髄細胞の動態などには変化がないと考えられるが、それらを実証するためにはやはり長管骨など一般に広く研究に用いられている骨組織をライブイメージングにより解析する必要がある。今後の技術改良が望まれる。

② 長時間のライブイメージング系の開発：ガス麻酔下でマウスを生かしたままで、骨組織を手術的に露出してイメージングにあたっている現法では、連続した観察時間は4~5時間程度が限界である。細胞の動きや細胞間の接触時間などをイメージングするのであれば、この観察時間で十分であるが、それより長い時間のかかる現象(たとえば細胞の分化など)をイメージングするためには、別の測定系を構築する必要がある(マウスを長期間にわたり麻酔管理するか、手術野を閉じて経日的観察を可能にする、など)。このような技術革新も今後進められていくことが期待される。

文献/URL

- 1) Stoll, S. et al.: Dynamic imaging of T cell-den-

- dritic cell interactions in lymph nodes. *Science*, **296** : 1873-1876, 2002.
- 2) Miller, M. J. et al. : Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science*, **296** : 1869-1873, 2002.
 - 3) Germain, R. N. et al. : Making friends in out-of-the-way places : how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol. Rev.*, **221** : 163-181, 2008.
 - 4) Ishii, M. et al. : Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, **458** : 524-528, 2009.
 - 5) Klauschen, F. et al. : Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nat. Protoc.*, **4** : 1305-1311, 2009.
 - 6) <http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp/>

* * *

