

図1 骨組織内での破骨前駆細胞のライブイメージング

破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1-EGFP⁺)を緑色でラベルして、TexasRedをconjugateした高分子デキストラン(~70kDa)を静注して血管構造を赤色でラベルして、それぞれ可視化している(左)。また、各細胞を球体に置き換え、軌道を書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(上部2パネル)、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(文献5より一部改変)。

動かなかつたが、S1P₁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、血管へと移行していく様子が観察された(図1;参考文献5の supplementary videosや、著者の研究室HP参照)。これにより、*in vivo*の骨組織内でも確かにS1P受容体刺激に反応して遊走能が亢進することが証明された。

さらに我々は、この「S1Pに対する破骨前駆細胞の遊走」の生理意義を解明するために、破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CD11b⁺)に特異的にS1P受容体(S1P₁)を欠損させたマウスの解析を行った(図2)。S1P₁を欠損した破骨前駆細胞は骨組織に留まりやすくなり、その結果として骨表面に接着する成熟破骨細胞の数が増加し、骨吸収側へと傾くこ

とが分かった。S1Pの濃度が血中で高く、S1Pに対する遊走が一般に組織から血中への還流に寄与していることを考慮すると、以下の結論を得ることができる。

単球系の破骨前駆細胞は、血管から骨内部に流入するだけでなく、血中のS1Pに対して遊走することにより血中へ再還流するシステムが存在する。この流入のバランスの上に骨表面に存在する破骨前駆細胞の数が決められており、一定数がRANKLの刺激を受け成熟破骨細胞へと分化する(図3)。これまで、RANKLなどの分化誘導因子や、その下流にある転写制御が³、破骨細胞研究の主要な課題であったが、我々の研究は、その前の段階すなわち破骨前駆細胞が最終分化を遂げる場所(骨)へと遊

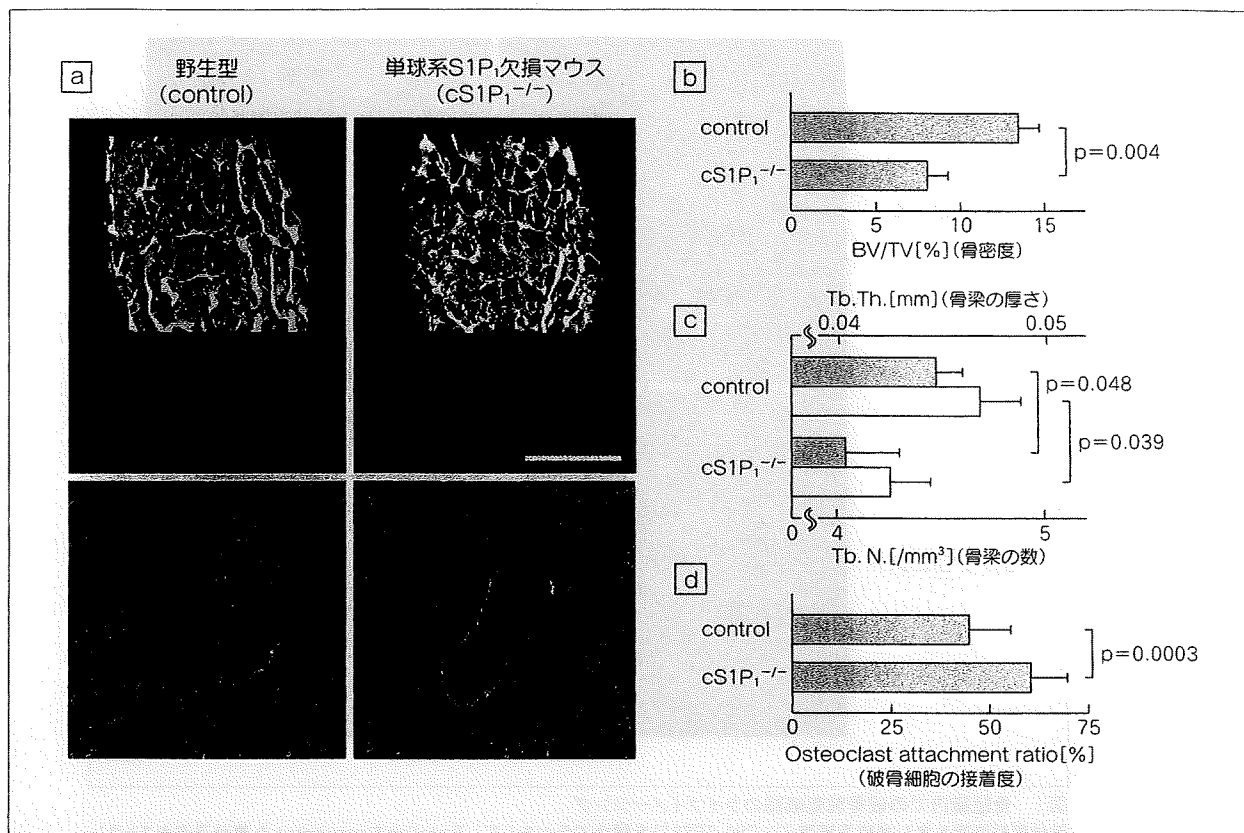


図2 単球・破骨細胞特異的S1P受容体(S1P₁)欠損マウスの骨組織の解析
 (a)破骨細胞を含む単球系細胞(CD11b⁺)のみS1P受容体(S1P₁)を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスの骨組織の解析。マイクロCT画像(上段)と、骨表面への破骨細胞接着度の自動計算画像(下段)。(b)BV/TV(=bone volume/total volume:骨密度)。(c)Tb.Th.(=trabecular thickness:骨梁の厚さの平均)。(d)Tb.N.(=trabecular number per volume:単位体積当たりの骨梁の数)。(e)破骨細胞の接着度(文献5より一部改変)。

走・位置決めを行うシステムが、破骨細胞分化・骨代謝の新たな制御点であるという新しい概念を提唱するものである。

今後の展開 I：破骨前駆細胞を骨表面に引き寄せる因子は何か？

我々は、S1Pが単球系破骨前駆細胞を骨表面から血中へ再還流させる因子“circulation-attractant”であることを明らかにした。それでは逆に、血中にある前駆細胞を骨へと引き寄せる因子“bone-attractant”は何であろうか？すでに過去に候補は挙げられており、例えば、骨髄ストロマ細胞が発現するCXCL12/SDF-1は*in vitro*で破骨前駆細胞の

ケモタキシスを刺激することが示されている⁶⁾。しかしながら、*in vivo*でこれらが実際に機能しているかどうかについては不明である。我々は現在、骨の生体イメージング系を用いて、CXCL12やその他の候補のケモカインを中心に、生理的なbone-attractantの検索を精力的に行っている。

今後の展開 II：骨組織の生体二光子励起観察の応用

骨組織は、破骨細胞や骨芽細胞による骨代謝制御の場であるばかりでなく、Bリンパ球を始めとして種々の血液系細胞の発生・機能分化にとって重要な部位である。骨髄腔内での各細胞の挙動・位置

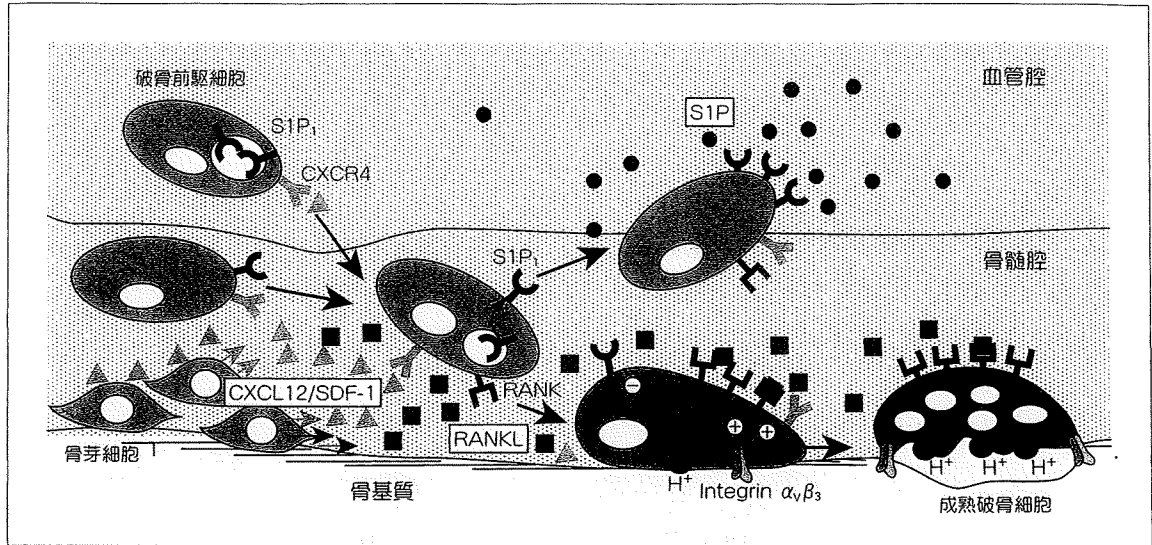


図3 破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構

単球系破骨前駆細胞は、骨髄内にあるケモカインSDF-1/CXCL12によって骨髄内へ引き寄せられ、逆に血中のS1Pによって血管内へと再還流する。この流出入のバランスの上に骨表面に存在する破骨前駆細胞の数が決められており、一定数がRANKLの刺激を受け成熟破骨細胞へと分化する。

決めとその分化制御や、血液系幹細胞が多能性を維持する特殊な環境(ニッチ)の同定、さらには癌の骨転移のように、本来骨にいない細胞が如何にして骨に到達するのか(誰が手助けするのか)など、骨組織・骨髄腔に関しては解明されるべき基本的課題が数多く存在する。我々が開発した二光子励起顕微鏡を用いた骨の生体イメージングの方法論は、これらの残された謎を解決する強力な手段となると考えている。

参 考 文 献

- 1) Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, *et al.* Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* 2002; 297: 1349-52.
- 2) Stoll S, Delon J, Brotz TM, *et al.* Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 2002; 296: 1873-6.
- 3) Miller MJ, Wei SH, Parker I, *et al.* Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 2002; 296: 1869-73.
- 4) Germain RN, Bajénoff M, Castellino F, *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.* 2008; 221: 163-81.
- 5) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, *et al.* Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009; 458: 524-8.
- 6) Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1404-18.

最新医学・第64巻・第12号 (2009年12月号 別刷)

トピックス

骨組織のライブイメージングにより明らかとなった
破骨細胞の遊走と位置決めへの制御

石井 優

最新医学社

トピックス

骨組織のライブイメージングにより明らかとなった
破骨細胞の遊走と位置決めへの制御

石井 優*

はじめに

硬い石灰質に囲まれた骨の中は、これまで生きてきたままの観察が極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週間ほど漬けてカルシウムを取り除き(脱灰し)、切片にして観察していた。この従来法でも、骨組織内の細胞の「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。細胞の動きを見るためには、どうしても生きて細胞を生きて組織の中で観察する必要がある。特に骨髓腔のように、豊富な血管床による血流を保ったまま、そこで流入する細胞の動きをとらえることが重要な場所では、「摘出して生かした」骨組織ではなく、「生きてきたままの個体中」での骨組織を観察する必要がある。

筆者は最近、「二光子励起顕微鏡」という、組織の奥深くまで観察できる顕微鏡を駆使して、マウスを生かしたままの状態でも骨組織内を観察するイメージング法を世界に先駆けて開発した(図1)。この方法を用いると、骨のリモデリングにかかわる破骨細胞や骨芽細胞、骨髓内で分化・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て動きを、リアルタイムで観察することができる。我々は特に、骨を破壊・吸収する動きを持つ破

骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、この前駆細胞の骨への遊走・位置決めが、種々のケモカインや脂質メディエーター(スフィンゴシン1リン酸)によって動的に調節されていることを明らかにした。本稿では、これらの研究成果の解説に加えて、骨組織内の二光子励起ライブイメージングの方法論やその今後の応用と将来性について、実際の画像を紹介しながら概説したい。

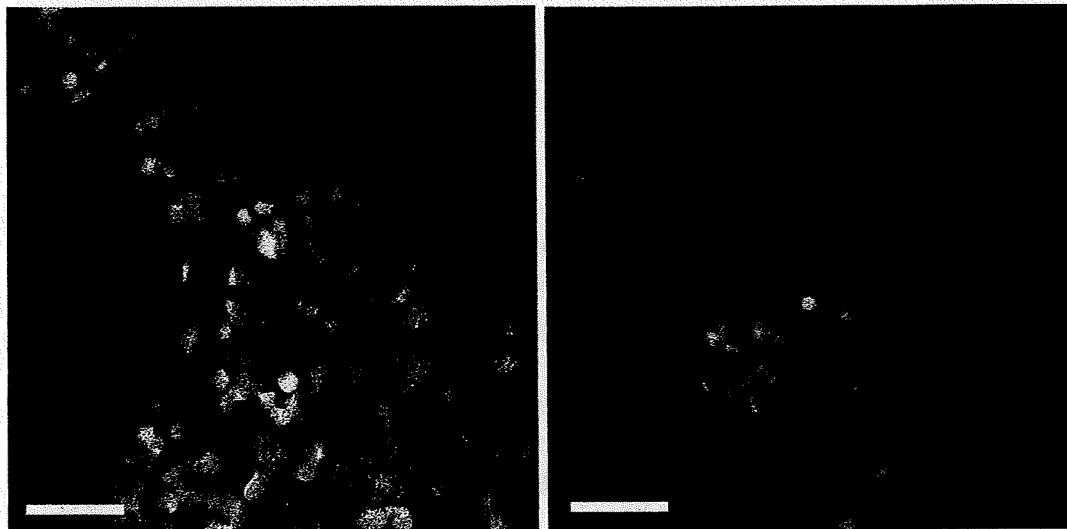
破骨細胞は「どこから来て、何者で、どこへ行くのか？」

骨組織は、古い骨を壊して吸収する「破骨細胞」と、骨を新生する「骨芽細胞」のバランスの取れた働きにより新陳代謝が繰り返されている。骨は、硬そうで一度できたら変わらない組織に見えるが、厳密に言えば昨日の骨と今日の骨は少し違うのである。加齢や炎症などによって破骨細胞の働きが異常に活性化し、破骨細胞と骨芽細胞の働きのバランスが崩れ骨吸収側に傾くと、骨粗鬆症や関節リウマチなどいわゆる骨吸収性疾患の発症へとつながる。特に関節リウマチでは、関節炎局所に活性化した破骨細胞が多数誘導され、骨破壊に関与している¹⁾²⁾。

骨芽細胞は骨内に恒常的に存在する間葉系由来の細胞であるが、破骨細胞は血液(単球)系の前駆細胞が骨表面に遊走してきて、その場所で最終分化を遂げて、骨吸収能を持つ成熟破骨細胞となる。興味深いことに、破骨細胞と骨芽細胞は単純なライバル関係ではなく、その働きは相互に緊密に関連している。例えば、骨表面で破骨前駆細胞が成熟破骨細胞へと分化するた

* 大阪大学免疫学フロンティア研究センター
生体イメージング研究室 主任研究者(准教授)

図1 骨組織（骨髄内）のライブイメージング



好中球（左）または単球（右）がそれぞれ緑色蛍光（GFP）を発現している遺伝子改変マウスの骨髄腔の生体二光子励起顕微鏡による観察像。骨髄内の血管構造は、赤色蛍光（Texas Red）を結合させた高分子デキストランを静脈注射して可視化している。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（筆者 HP <http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp/> を参照）。スケールバー：30 μ m

めに必須の因子である receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) は、主に骨芽細胞が発現している³⁴⁾。この RANKL の発見をはじめとして、これまで国内外での精力的な研究の結果、破骨細胞の分化・成熟にかかわる機構について、多くの事実が解明されてきた。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。

RANKL は骨組織以外の組織にも発現が見られるが、その他の組織では破骨細胞は見られない。また、RANKL を欠損したマウスでは成熟破骨細胞の形成が完全に阻害されているが、このマウスにリコンビナントの RANKL を静脈注射すると破骨細胞への分化が回復する。このとき興味深いことに、成熟破骨細胞は骨表面にしかできない。これは、骨表面には（骨芽細胞による）RANKL の発現以外に、破骨前駆細胞を引き寄せて成熟させるのに適した特別な環境（破骨細胞ニッチとも呼ぶべき）が存在するこ

とを強く示唆している。

筆者は、破骨前駆細胞がいかにして骨表面へ到達するのか、またその遊走・位置決めがどのように制御されているのかについて解明するために、まず種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨前駆細胞を動かし得るかどうかが *in vitro* の実験系でスクリーニングを行った。その結果、スフィンゴシン1リン酸をはじめとした幾つかの候補分子を得た。しかしながら次の研究段階として、「これらの候補分子が実際に *in vivo* で破骨前駆細胞を動かすのかどうか」を解決する必要がある。このため、二光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織内部を観察することに挑戦した。

骨組織の生体二光子励起顕微鏡観察

1. 二光子励起顕微鏡はなぜ生きた組織の観察に適しているか？

二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

持ったレーザー光を、細かいパルス状に放出したものを励起光源に用いる。パルス状の光子はフォーカスで一点に集められ密度が高い状態となるため、焦点平面でのみ二光子励起 [= 通常 (一光子励起) 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⁹⁾。このため、二光子励起顕微鏡の特長として以下が挙げられる¹⁰⁾。

(1) 高い z 軸分解能：焦点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 780~1,050nm) を用いるため、組織の深部まで励起光を到達させることができる [※テレビのリモコン (赤外線) は障子を通すが、紫外線は紙一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、二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有用である (光学的スライス)。このため、生組織の観察手段として、二光子励起顕微鏡の有用性が国内外で示されてきた。例えば、動物の脳や内分泌腺など臓器・組織を摘出して、培養液中で生かしながら二光子励起観察されてきた (tissue-explant two-photon imaging)⁸⁻¹⁰⁾。

2. 「生体」二光子励起観察のメリット

免疫系は、特に細胞の動きが重要なシステムである。好中球やリンパ球が全身をくまなく遊走し、免疫組織内の微小環境で会合し互いに相互作用を行うことにより、適切な機能が維持されている。この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。このような免疫系における統率さ

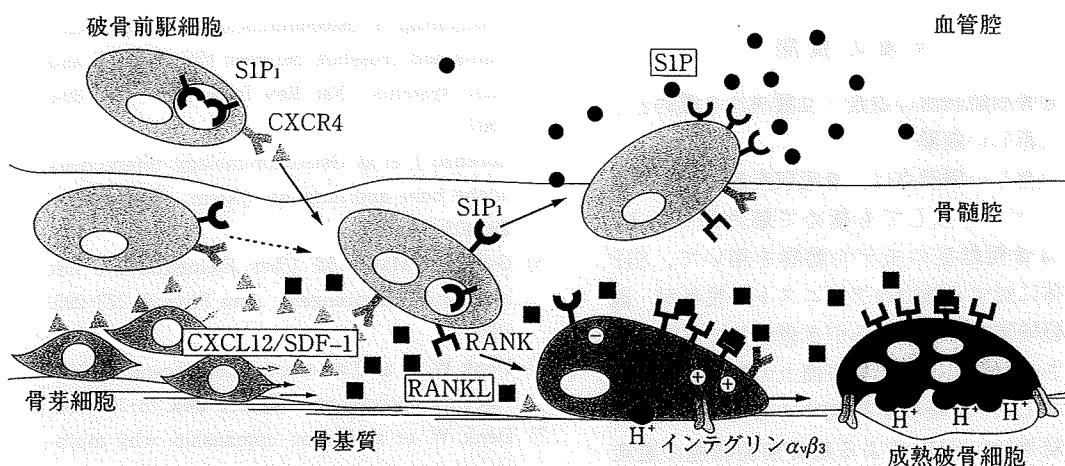
れた細胞遊走システムは、神経系での固定した軸索システム (“hard-wired”) と比較して、“soft-wired” と形容される¹¹⁾。この soft-wired ネットワークの解析のために、二光子励起観察をさらに一歩進めて、実験動物を生かしたままで顕微鏡に乗せて、注目する組織を観察する “intravital two-photon microscopy (生体二光子励起顕微鏡観察)” の手法が、2002 年頃より海外の複数の研究者によって開発された¹²⁻¹⁵⁾。この方法論では、注目する組織のみならず個体自体が生きており、全身の血流や代謝が完全にインタクトに保たれた状態で観察できるため、極めて情報量が多い。

骨組織内での破骨前駆細胞の遊走・位置決めを観察するために、我々は骨内・骨髓腔の “intravital” imaging に取り組んだ¹⁶⁻¹⁸⁾。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、逆に血中へ還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、我々は骨の intravital imaging を行ったが、そもそも骨のように血流が豊富な組織は、取り出して生かしたまま観察することはかなり難しい。

生体二光子骨組織観察によって見えた、脂質メディエーター S1P による破骨前駆細胞の遊走と位置決めの制御

種々のケモカイン、脂質メディエーターを *in vitro* でスクリーニングした結果、破骨前駆細胞の遊走を刺激する幾つかの分子を得ていたが、中でも我々が注目したものは、現在リンパ球の遊走制御について重要な知見が得られているスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) である¹⁹⁾²⁰⁾。S1P は主に赤血球や血小板によって作られるため、血中に豊富に存在する。一方、組織には S1P を分解する S1P リアーゼがユビキタスに

図2 破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構



単球系破骨前駆細胞は、骨髓内にあるケモカイン CXCL12/SDF-1 によって骨質内へ引き寄せられ、逆に血中の SIP によって血管内へと再還流する。この流出入のバランスのうえに、骨表面に存在する破骨前駆細胞の数が決められており、一定数が RANKL の刺激を受けて成熟破骨細胞へと分化する。

略語：巻末の「今月の略語」参照

発現しており、一般に SIP は血中で高く、組織で低い濃度に保たれている。このため、SIP に対するケモタキシスは、基本的には細胞が組織から血中へ還流する際に作用すると考えられている。

我々は、破骨前駆細胞が SIP に対する受容体 (SIP₁) を発現しており、*in vitro* で SIP に対して強いケモタキシスが惹起されることを見いだした。この SIP に対する細胞遊走が *in vivo* でも見られるかどうかを確認するために、二光子励起顕微鏡を用いて骨組織内部の生体観察を行った¹⁶⁾¹⁷⁾。骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CX₃CR1-EGFP⁺) は定常状態ではほとんど動かなかったが、SIP₁ に対する強力なアゴニストである SEW 2871 を経静脈的に投与すると、急速に動きが大きくなり、血管へと移行していく様子が観察された (筆者の HP: <http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp/> に動画が紹介されている)。これにより、*in vivo* の骨組織内でも、破骨細胞は確かに SIP₁ 刺激に反応して遊走能が亢進することが証明された。

さらに我々は、この「SIP に対する破骨前駆細胞の遊走」の生理意義を解明するために、破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CD11b⁺) に特異的に SIP₁ を欠損させたマウスの解析を行った。SIP₁ を欠損した破骨前駆細胞は骨組織にとどまりやすくなり、その結果として骨表面に接着する成熟破骨細胞の数が増加し、骨吸収側へと傾くことが分かった。SIP の濃度が血中で高く、SIP に対する遊走が一般に組織から血中への還流に寄与していることを考慮すると、以下の結論を得ることができる。

単球系の破骨前駆細胞は、血管から骨内部に流入するだけでなく、血中の SIP に対して遊走することにより血中へ再還流するシステムが存在する。この流出入のバランスのうえに骨表面に存在する前駆細胞数が決められており、一定数が RANKL の刺激を受けて成熟する (図 2)。これまで、RANKL などの分化誘導因子やその下流にある転写制御が破骨細胞研究の主要な課題であったが、この研究はその前の段階すなわち破骨前駆細胞が最終分化を遂げる場所 (骨) へと遊走・位置決めを行うシステムが、

破骨細胞分化・骨代謝の新たな制御点であるという新概念を提唱するものである。

今後の展開

1. 破骨前駆細胞の遊走・位置決めを標的とした新しい創薬

この新しい調節点は、骨吸収疾患に対する創薬ターゲットとしても極めて魅力的である。我々は骨粗鬆症のモデル動物を用いて、SIP受容体に対する強力なアゴニストの投与が、破骨前駆細胞を骨表面から引き剥がして血中へ再還流させ（結果として骨表面上の破骨細胞の数を減らし）、骨吸収を抑制することを示した。この結果は、SIPによる破骨前駆細胞の遊走制御が治療標的としても有望なものであることを示している¹⁷⁾。これは、ビスホスホネート製剤など成熟破骨細胞を標的とした従来の骨吸収抑制薬とは異なった作用機序を持っているので、併用による相乗効果も期待でき、今後の臨床応用が期待される。

2. 骨組織の生体二光子励起観察の応用

骨組織は破骨細胞や骨芽細胞による骨代謝制御の場であるばかりでなく、B細胞をはじめとして種々の血液系細胞の発生・機能分化にとって重要な部位である。骨髄腔内での各細胞の挙動・位置決めとその分化制御や、血液系幹細胞が多能性を維持する特殊な環境（ニッチ）の同定、さらにはがんの骨転移のように本来骨にいない細胞がいかんして骨に到達するのか（誰が手助けするのか）など、骨組織・骨髄腔に関しては解明されるべき課題が数多くある。我々が開発した二光子励起顕微鏡を用いた骨の生体イメージングの方法論は、これら残された疑問を解決する強力な手段となると考える。

文 献

- 1) Teitelbaum SL: Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508, 2000.
- 2) Teitelbaum SL, et al: Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649, 2003.
- 3) Takayanagi H: Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7: 292-304, 2007.
- 4) Lorenzo J, et al: Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 29: 403-440, 2008.
- 5) Goepfert-Mayer M: Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* 9: 273-295, 1931.
- 6) Denk W, et al: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248: 73-76, 1990.
- 7) Denk W, et al: Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18: 351-357, 1997.
- 8) Helmchen F, et al: Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2: 932-940, 2005.
- 9) Takahashi N, et al: Exocytic process analyzed with two-photon excitation imaging in endocrine pancreas. *Endocr J* 54: 337-346, 2007.
- 10) Takahashi N, et al: Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* 297: 1349-1352, 2002.
- 11) Huang A Y, et al: Illuminating the landscape of *in vivo* immunity: insights from dynamic *in situ* imaging of secondary lymphoid tissues. *Immunity* 21: 331-339, 2004.
- 12) Stoll S, et al: Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296: 1873-1876, 2002.
- 13) Miller M J, et al: Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296: 1869-1873, 2002.
- 14) Bousso P, et al: Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296: 1876-1880, 2002.
- 15) von Andrian U H: Immunology. T cell activation in six dimensions. *Science* 296: 1815-1817, 2002.
- 16) Germain R N, et al: Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune sys-

-
- tem get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol Rev* 221: 163-181, 2008.
- 17) Ishii M, et al: Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458: 524-528, 2009.
- 18) Klauschen F, et al: Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nat Methods* 4: 1305-1311, 2009.
- 19) Rosen H, et al: Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5: 560-570, 2005.
- 20) Cyster JG: Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23: 127-159, 2005.
-

Migration and Localization of Osteoclast Precursors Visualized by
Living Bone Imaging Using Intravital Two-photon Microscopy

Masaru Ishii

Laboratory of Biological Imaging, WPI-Immunology Frontier Research Center,
Osaka University



てくペーストでトE 読者手光SOの内職書、製法書
読者のへ読者手光SO - 読者手光SO

表 題

著 者 名

週刊
医学のあゆみ 別 刷

第 卷・第 号： 年 月 日号

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、生きて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週間ほど漬けて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、生きて細胞を生きて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で、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、“生きて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で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て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。

Key word 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、生きて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で、生きて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、生きて

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(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で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、

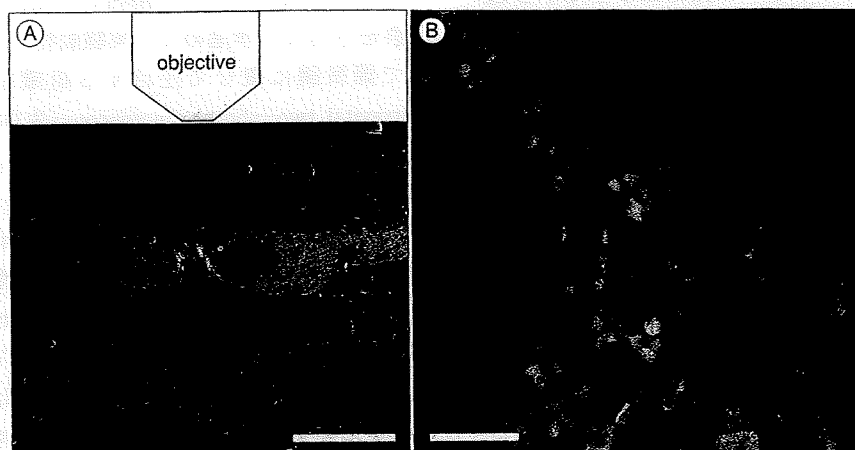


図 1 骨組織(骨髄内)の2光子励起ライブイメージング⁶⁾

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-κB ligand) からの刺激によって分化・成熟にすること、RANKL 刺激は NF-κB 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)はどのように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

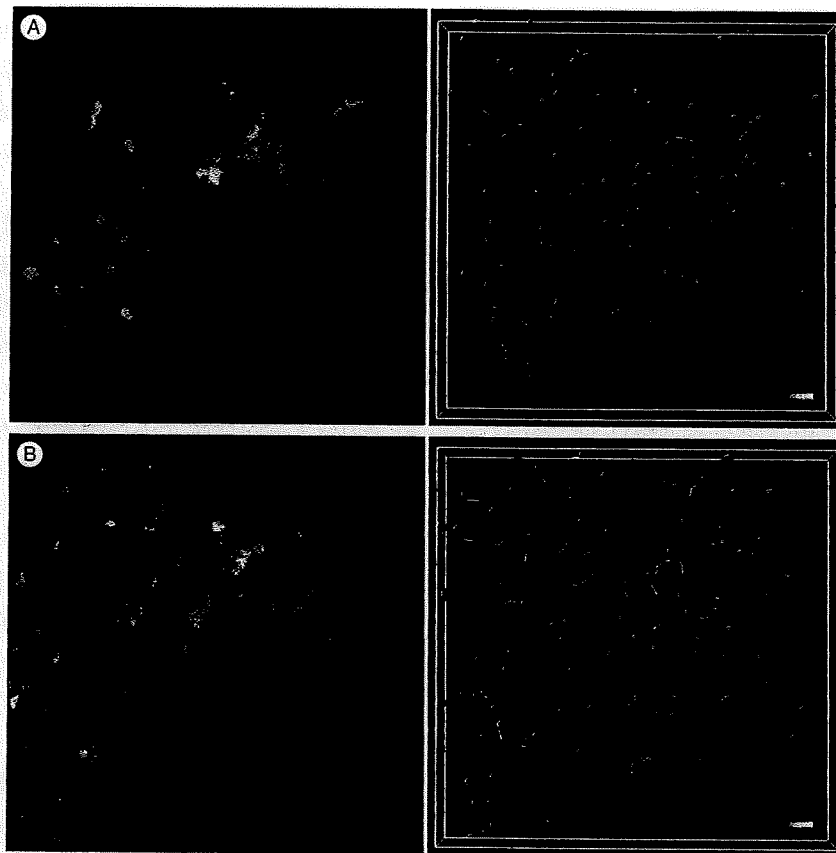


図 2 骨組織内での破骨細胞およびその前駆細胞の生体2光子励起イメージング⁴⁾
A: 定常状態, B: S1P アゴニスト.

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さうかどうか, *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* で刺激することがわかった. 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充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・骨髄腔では多種多様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あ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/>

* * *

