



解説

骨組織の 2光子励起ライブイメージング*

石井 優**

Key Words : two-photon microscopy, bone marrow, bone homeostasis, osteoclast, chemokine

「百聞は一見に如かず(seeing is believing)」というように、「みる」ことは人間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、特に、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で、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、特に筆者が最近立ち上げた、生きた個体での骨組織・骨髓内の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)を持ったレーザー光を、短いパルス状に放出したもの(超短パルスレーザー)を励起光源に用いる。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り、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(図1)。このため、2光子励起顕微鏡の特長として以下の点があげられる。

①高い空間(特にz軸)解像度

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(励起に必要なエネルギーに満たない光子が当たっているものの励起には至らない)ため、観察していない部分からの蛍光がない。非観察平面からの蛍光はレンズで結像しない(ピントが合っていない)ので、「ピンボケ」の原因となる。レンズの前に「ピンホール」を置いて、非観察平面からの蛍光シグナルを除去して、ボケのない画像を得るのが「共焦点レーザー顕微鏡(いわゆるコンフォーカル)」である。

②高い組織透過性(深部組織の観察に威力を発揮)

複数(通常は2個)の光子を同時に当てて蛍光分子を励起するため、当てる光子1個分のエネルギーは小さくて済む(2光子励起の光子エネルギーは、1光子励起のその約半分)。エネルギーが半分ということは、光子の波長が2倍になることであり、実際2光子励起で用いるレーザーは近赤外域にある(通常の使用域は波長が780~1,000nm)。波長の長い赤外光は、短い可視光や紫外光よりも浸透性が高く、より深い組織まで励起・観察することが可能となる(光は波長が長いほど障害物を越えて行きやすい。テレビの赤外線リモコンは障子やのれんを通過するが、紫外線は日傘で大部分がカットできる)。

③低い組織侵襲性(生体組織の観察に有利)

①と内容が重なるが、2光子励起観察では焦点平面でしか蛍光分子の励起がなされないため、観察対象となる組織・臓器への光毒性や蛍光の

* Intravital two-photon imaging of bone tissues.

** Masaru ISHII, M.D., Ph.D.: 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(☎565-0871 吹田市山田丘3-1); Laboratory of Biological Imaging, Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita 565-0871, JAPAN

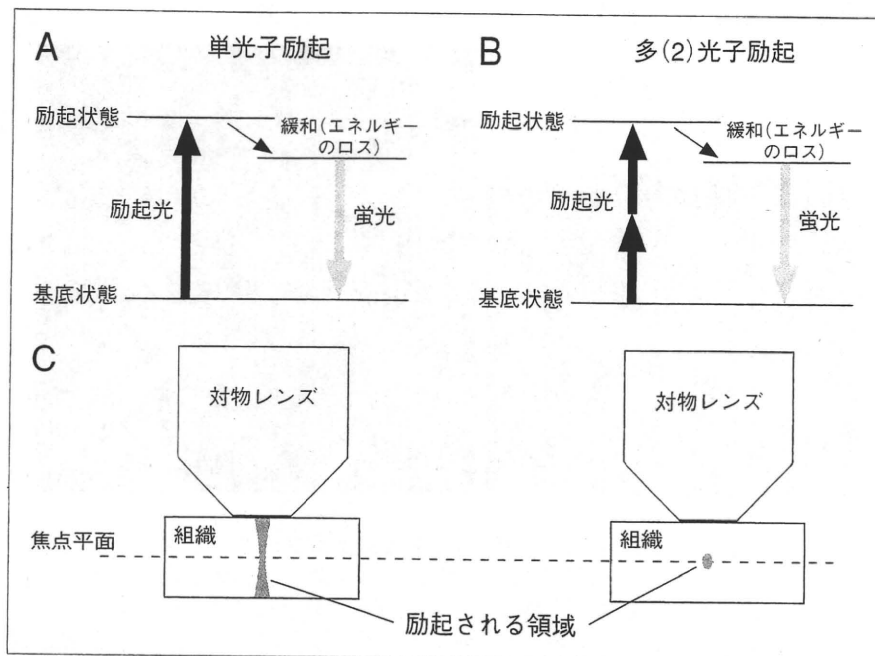


図1 単光子励起と多光子励起

通常の蛍光観察では、1個の蛍光分子を1個の光子で励起するが(A)、多(2)光子励起では複数(2個)の光子で励起する(B)。このような現象は非常に起こりにくく、光子密度が極大となる焦点平面のみで起こる(C)。このため、観察したい部位のみ蛍光することになるので高い空間解像度が得られ、非観察部位が励起されないため光毒性が低く退色が少ない。

退色はきわめて小さく抑えることができる(これら以外にも2光子励起イメージングには、光学的なさまざまな利点があるが本稿では紙面の都合上割愛する)。

上記①～③のいずれも、「組織・臓器を生かしたまま観察」するためにきわめて有用である。固定した(もはや生きていない)組織や臓器は、パラフィンやコンパウンドで包埋して薄切すればどんな場所でも観察できる(=物理的スライス)、生きた組織(特に生きた個体内)では、観察したい場所が、対物レンズでアプローチできる場所よりもかなり深いことがある。このような場合、2光子励起顕微鏡を用いると、組織の奥深くまで、高い3次元解像度で、しかも低侵襲で、断層画像を撮ることができる(=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、国内外で多用されてきた。たとえば、動物の脳や内分泌腺など臓器・組織を摘出して(=個体は殺して)、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と呼ぶ)。

「生体(=intravital)」 2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、互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で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年ごろから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

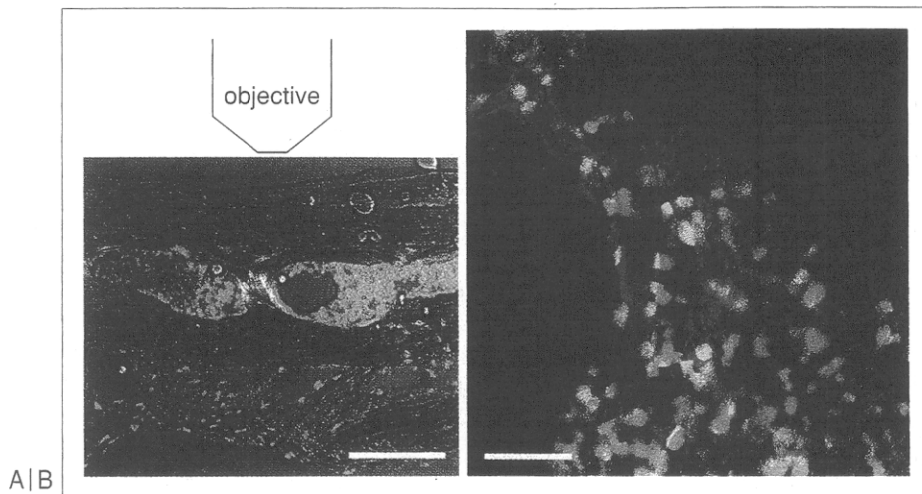


図2 骨組織(骨髄内)の2光子励起ライブイメージング
Lysozyme M プロモーター-EGFPトランスジェニックマウスの頭頂骨の断面像(A)と、2光子励起顕微鏡による生体イメージング像(B)。生体イメージングでは、骨髄内の血管構造を、Texas Redをconjugateした高分子デキストランを静脈注射で可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作製する。スケールバー：100 μ m(A)，30 μ m(B)。

(筆者ホームページ: <http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp/>を参照)

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、きわめて情報量が多い。

筆者は、特に骨組織・骨髄腔内の“intravital imaging”に取り組んだ³⁾⁴⁾。この方法では、骨髄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、血管から骨髄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、筆者は骨の 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・骨髄内の 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 μ mまで到達が可能であるが、骨組織の場合は、150~200 μ mが限界である。このため筆者らは、骨基質が薄く

て骨表面から骨髄腔まで80~120 μ m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2)。

また、骨組織・骨髄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、み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、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)]。このため筆者らは、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、colony stimulating factor 1 receptor [CSF1R [macrophage colony stimulating factor (M-CSF)/CSF-1の受容体]]やCX₃C chemokine fractalkine receptor 1 [CX₃CR1 (CX₃CL1/fractalkineの受容

体)]のプロモーター下でenhanced green fluorescent protein (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natural killer(NK)細胞などにもみられる]や、作製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やreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)からの刺激によって分化・成熟すること、RANKL刺激はNF- κ Bやnuclear factor of activated T-cells(NFAT)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(再び戻っていくことはあるのか)」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。

筆者はこれらの謎に迫るべく、まず初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、血中に豊富に存在する脂質メディエーター・スフィンゴシンーリン酸(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*で刺激しうることがわかった。しかしながら、この次の段階として、「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る。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3;参考文献⁴⁾のsupplementary videosや、筆者の研究室のオリジナルホームページ(<http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp>)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・骨髄腔には、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中心的な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期免疫記憶の座位である。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

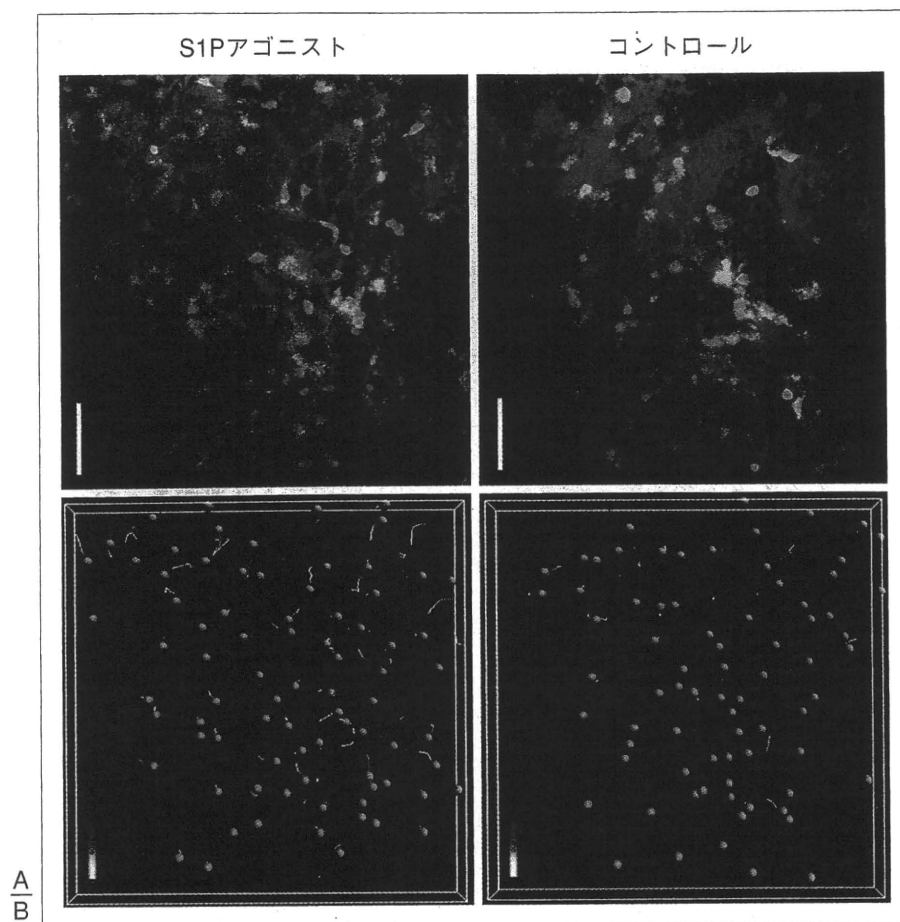


図3 骨組織内での破骨細胞およびその前駆細胞の生体2光子励起イメージング
破骨細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1-EGFP⁺)を緑色で標識し可視化している(A)。
また、各細胞を球体に置き換え、軌道を描いて速度を計算している(B)。定常状態では単球系細胞はほとんど静止しているのに対し(上部2パネル)、S1PアゴニストであるSEW2871を投与すると、急速に細胞の運動能が充進し、血中へ還流していく様子が観察される。(文献⁴⁾より引用、一部改変)

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、癌の骨転移では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おり、骨髓腔には内在・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、骨髓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。

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、骨代謝や骨髓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当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(マウスの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

- 1) Stoll S, Delon J, Brotz TM, et al. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 2002 ; 296 : 1873.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009 ; 458 : 524.
- 5) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al. Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nature Protoc* 2009 ; 4 : 1305.

* * *

骨組織の生体イメージングによる 骨吸収の新しい調節機構

菊田順一* 石井 優*

「百聞は一見にしかず (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。硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部は、従来、生きたままの観察がきわめて困難であると考えられていたが、われわれは最近、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可視化することに成功し、単球系の破骨細胞前駆細胞の遊走・接着が、脂質メディエーターの一種であるスフィンゴシン1リン酸 (sphingosine 1-phosphate : SIP) や種々のケモカインによって動的に制御されていることを解明した。本稿では、この研究成果に加え、われわれが開発した骨の生体イメージングの方法論や、その今後の応用と発展性について概説する。

はじめに：破骨細胞は「どこから来たのか、何者か、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はたらきにより新陳代謝がくり返されているが、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。

破骨細胞は単球系細胞から分化・成熟する多核巨細胞であるが、これまでの研究成果により、骨

〔キーワード〕

破骨細胞
ケモカイン
脂質メディエーター
2光子励起顕微鏡
生体イメージング

*KIKUTA Junichi, ISHII Masaru/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

髄間質細胞や骨芽細胞などによって産生される macrophage colony stimulating factor (M-CSF) や receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) が、破骨細胞の分化・成熟に必須であること、RANKL 刺激は NF- κ B や nuclear factor of activated T cells (NFAT) 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細胞前駆細胞はすべて最終分化するのか(再びもどっていくことはあるのか)」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。

われわれは、これらの謎に迫るべく、まず種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨細胞前駆細胞を動かさうかどうか *in vitro* の

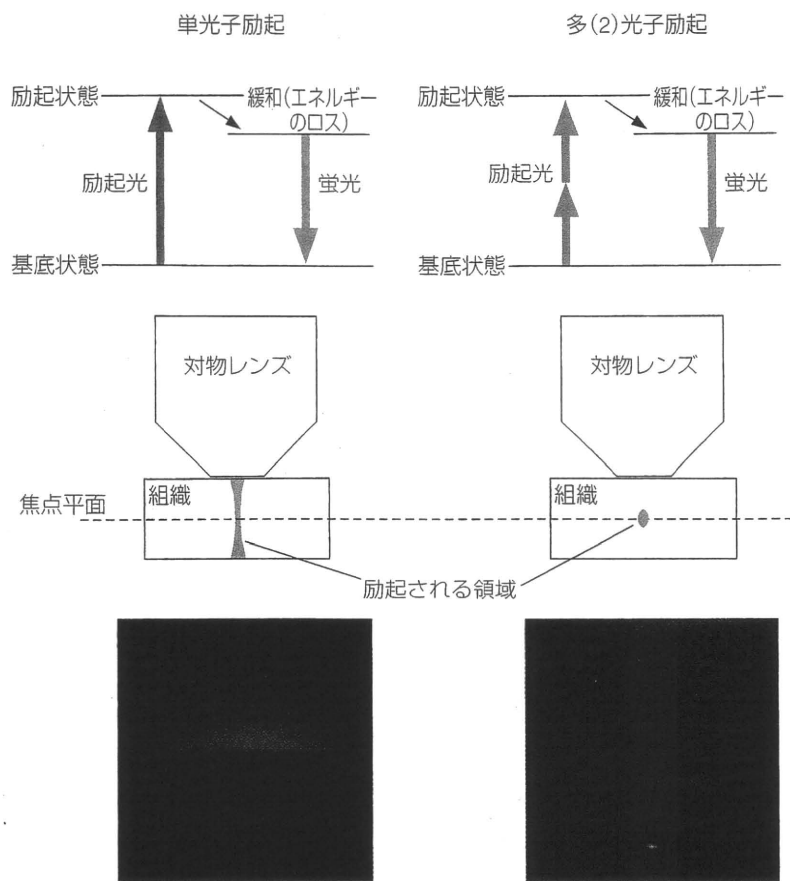


図 1. 単光子励起と多光子励起

通常の蛍光顕微鏡観察では、1個の蛍光分子を1個の光子で励起するが(左)、多(2)光子励起では複数(2個)の光子で励起する(右)。このような現象は非常に起こりにくく、光子密度が極大となる焦点平面のみで起こる(下)。このため、観察したい部位のみ蛍光することになるので高い空間解像度が得られ、非観察部位が励起されないため光毒性が低く退色が少ない。

実験系でスクリーニングをおこなった。その結果、スフィンゴシン 1 リン酸(sphingosine 1-phosphate: S1P)をはじめとした、いくつかの候補分子を得た。しかしながら、つぎの研究段階として、「これらの候補分子が実際に *in vivo* で破骨細胞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、2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。

1. 骨組織の生体 2 光子励起顕微鏡観察

1) 2 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？

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、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2光子励起 [=通常(単光子励起)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。このため、2光子励起顕微鏡観察の特長として、以下があげられる(図1)。

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780~1,000 nm）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。

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、2光子励起顕微鏡の有用性が国内外で示されてきた。たとえば、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2光子励起顕微鏡観察されてきた（tissue-explant two-photon imaging とよぶ）。

2) “生体(=intravital)” 2光子励起顕微鏡観察のメリット

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おこなうことにより、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。このsoft-wiredネットワークの解析のために、2光子励起顕微鏡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完全にインタクトに保たれた状態で観察できるため、きわめて情報量が多い。

骨組織内での破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決めを観察するために、われわれは骨内・骨髓腔の“intravital” imaging に取り組んだ^{3)~5)}。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（図2）。さらには、薬剤を尾静脈などから全身投与すると、血流を通してすみ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、われわれは骨の生体イメージングをおこなったが、そもそも骨のように血流が豊富な組織は、取り出して観察することはかなりむずかしい。

2. 生体2光子励起顕微鏡骨組織観察によって見えた、脂質メディエーターS1Pによる破骨細胞前駆細胞の遊走と位置決めへの制御

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、破骨細胞前駆細胞の遊走を刺激するいくつかの分子を得ていたが、なかでもわれわれが注目したのは、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S1Pである⁶⁾⁷⁾。S1Pはおもに赤血球や血小板によってつくられるため、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ubiquitousに発現しており、一般にS1Pは血中で高く、組織で低い濃度に保たれている。このため、S1P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。

われわれは、破骨細胞前駆細胞がS1Pに対する受容体(S1P₁)を発現しており、*in vitro*でS1Pに対して強いケモタキシスが惹起されることを見出した。このS1Pに対する細胞遊走が*in vivo*でもみられるかどうかを確認するために、2光子励起顕微鏡を用いて骨組織内部の生体観察をおこなった³⁾⁴⁾。骨組織に存在する破骨細胞前駆細胞を含

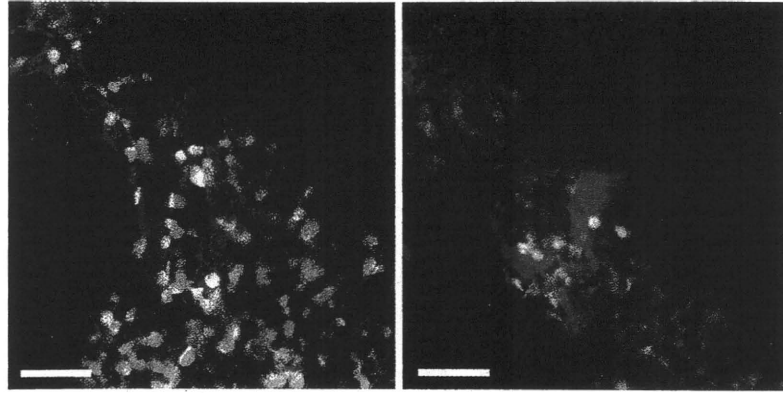


図 2. 骨組織(骨髓内)の生体多光子励起イメージング

顆粒球(LysM⁺:左)および単球(CX₃CR1⁺:右)をそれぞれ GFP 標識したトランスジェニックマウスの骨髓腔の生体 2 光子励起イメージング. 骨髓内の血管構造を, 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(動画についてはわれわれのホームページ <http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp> を参照). スケールバー: 30 μm

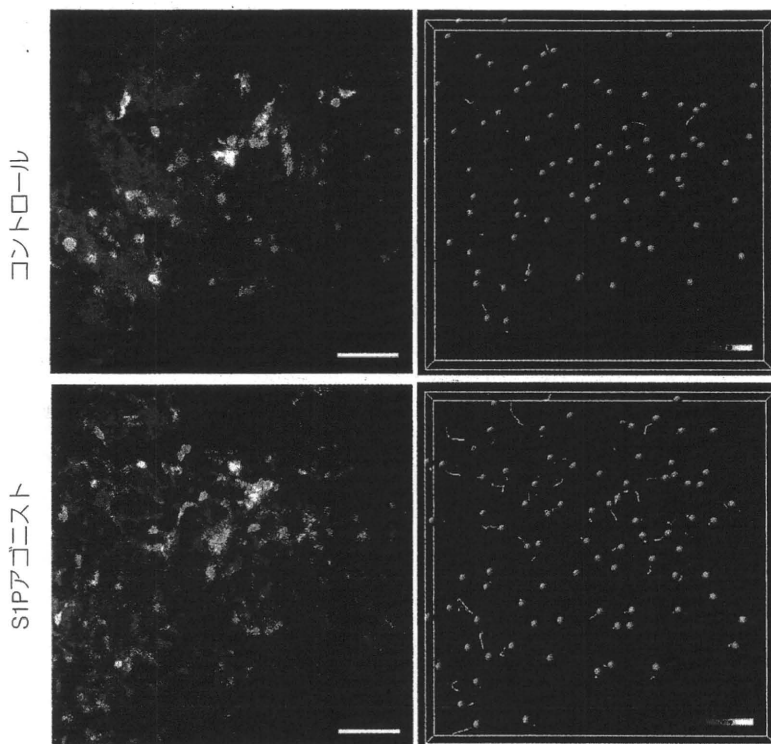


図 3. 骨組織内での破骨細胞およびその前駆細胞の生体 2 光子励起イメージング (Ishii M *et al*, 2009⁴⁾より改変引用)

破骨細胞前駆細胞を含む単球系細胞 (CX₃CR1-EGFP⁺) を緑色にラベルして, TexasRed を conjugate した高分子デキストラン (~70 kDa) を静脈注射して血管構造を赤色でラベルして, それぞれ可視可している(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(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.

む単球系細胞 (CSF1R-EGFP⁺ または CX₃CR1-EGFP⁺) は, 定常状態では骨組織および骨表面付近にとどまり, ほとんど動かなかったが, 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, 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 3, 文献 4) の supplementary videos や, われわれの研究室ホームページ <http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp> を参照]. これにより, *in vivo* の骨組織内でも, 破骨細胞は確かに S1P

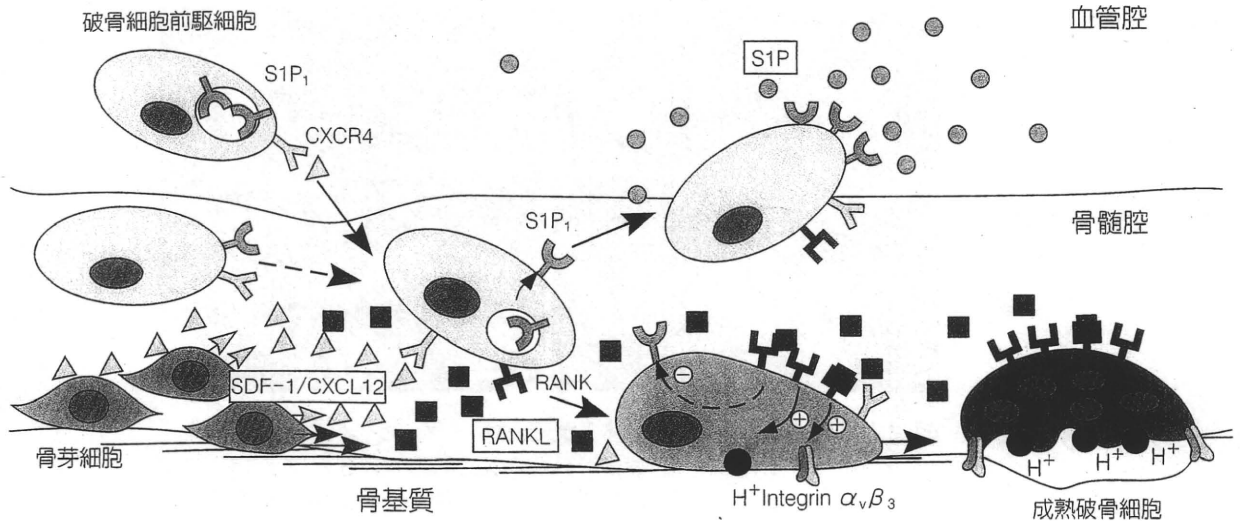


図 4. 破骨細胞前駆細胞の遊走と位置決め機構 (Ishii M *et al.*, 2009⁴⁾より改変引用)

単球系破骨細胞前駆細胞は、骨髄内にあるケモカイン SDF-1/CXCL12 によって骨質内へ引き寄せられ、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うえに骨表面に存在する破骨細胞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。

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。

さらにわれわれは、この「S1P に対する破骨細胞前駆細胞の遊走」の生理的意義を解明するために、破骨細胞前駆細胞を含む単球系細胞 (CD11b⁺) に特異的に S1P₁ を欠損させたマウスの解析をおこなった。S1P₁ を欠損した破骨細胞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わかった。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。

単球系の破骨細胞前駆細胞は、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。この流出入のバランスのうえに骨表面に存在する破骨細胞前駆細胞数が決められており、一定数が RANKL の刺激を受け成熟する (図 4)。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

骨細胞前駆細胞が最終分化を遂げる場所(骨)へと遊走・位置決めをおこなうシステムが、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。

おわりに：今後の展開

1) 破骨細胞前駆細胞の遊走・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きわめて魅力的である。われわれは骨粗鬆症の動物モデル(卵巣摘出マウス)を用いて、S1P 受容体に対する強力なアゴニストの投与が、破骨細胞前駆細胞を骨表面から引き剥がし血中へ再還流させ(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、S1P による破骨細胞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⁴⁾。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もっているため、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) 破骨細胞前駆細胞を骨表面に引き寄せる因子は何か?

われわれは、SIPが単球系破骨細胞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あげられており、たとえば、骨髄ストロマ細胞が発現するstromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12は*in vitro*で破骨細胞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⁸⁾。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。われわれは現在、骨の生体イメージング系を用いて、SDF-1/CXCL12やその他の候補のケモカインを中心に、生理的なbone-attractantの検索をおこなっている。

3) 骨組織の生体2光子励起顕微鏡観察の応用

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、さらには癌の骨転移のように、本来骨にいない細胞がいかにして骨に到達するのか(だれが手助けするのか)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。われわれが開発した2

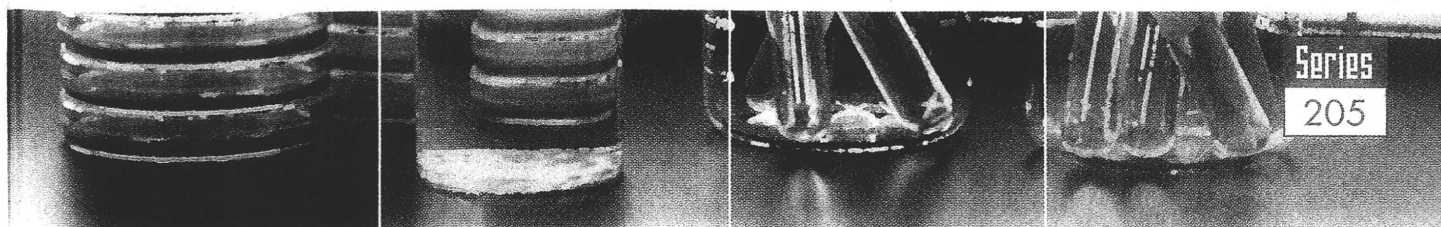
光子励起顕微鏡を用いた骨組織の生体2光子励起イメージングの方法論は、これら残された疑問を解決する強力な手段となると考える。

文献

- 1) Stoll S *et al* : Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296** : 1873-1876, 2002
- 2) Miller MJ *et al* : Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* **296** : 1869-1873, 2002
- 3) Germain RN *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 3D fluorescence microscopy data. *Nat Protoc* **4** : 1305-1311, 2009
- 6) Rosen H *et al* : Sphingosine 1-phosphate and its receptors : an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* **5** : 560-570, 2005
- 7) Cyster JG : Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* **23** : 127-159, 2005
- 8) Yu X *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* **18** : 1404-1418, 2003

生体2光子励起顕微鏡による 骨組織ライブイメージング

島津 裕, 石井 優



はじめに

これまで硬い骨皮質で囲まれた骨組織の内部を、生きたままの状態を観察することは、不可能であった。このため、骨研究においては、骨をパラホルムで固定し、摘出し、脱灰を経て、切片を作成することによって骨組織の観察を行ってきた。従来の方法により、骨組織内の細胞の状態や細胞同士の関係を客観的に観察することはできたが、固定した試料では、リアルタイムでの動きを捉えることは不可能であった。細胞の動きを見るためには、生きた細胞を生きた組織の中で観察する必要があり、特に骨髓のように、血流の豊富な組織では、血流を保ちつつ、移動する生きた細胞の動きを捉えるためには、「生きたままの個体中」の骨組織を観察しなければいけなかった。

しかし2光子励起顕微鏡の登場により、これまで不可能であった組織の観察が可能となった¹⁾²⁾。2光子励起顕微鏡は、共焦点レーザー走査顕微鏡と比較し、より深部の組織を、より低侵襲で長時間、観察することが可能である。この2光子励起顕微鏡の技術を応用し、われわれはマウスを生かしたまま骨組織内を観察

する方法を確立させた。この方法を用いることで、骨髓内の細胞の動きをリアルタイムで観察することができるようになった。本稿では、骨組織内の2光子励起ライブイメージングの実際について概説する。

原理

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をもったレーザー光を励起光源に用いる。2光子励起は焦点平面でのみ生ずるため、高いz軸分解能と長時間の観察が可能となる。また、通常の2倍の波長の近赤外光を用いることから、組織の深部まで励起光を到達させることができる。以上から2光子励起顕微鏡を用いることにより、骨組織を傷つけることなく、全身の血流や代謝が完全に保たれた状態で骨組織を観察することができる³⁾⁴⁾。

Intravital two-photon imaging of live bone tissues and bone marrow

Yutaka Shimazu/Masaru Ishii: Laboratory of Biological Imaging, WPI-Immunology Frontier Research Center, Osaka University (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) E-mail: mishii@ifrec.osaka-u.ac.jp

準備

骨組織のイメージングには、正立型と倒立型顕微鏡での2通りの観察法がある。本稿では正立型でのプロトコルを紹介する。

① 2光子励起顕微鏡セットアップ

現在、オリンパス社、ニコン社、ライカ社、カールツァイス社の4大顕微鏡メーカーより2光子励起顕微鏡セットアップが販売されている。当研究室では主に、このうちライカ社製の正立型2光子励起顕微鏡 (Leica TCS SP5 MP) を使用している。各製品によって長所・短所があり、特徴を踏まえたうえで活用する必要がある。例えばライカ社製は、通常のガルバノミラー^{*1}によるスキャンに加えて、レゾナンススキャナーによる高速スキャンが可能であるが、骨組織のイメージングでは微弱な蛍光シグナルを十分な時間をかけてスキャンする必要があり、レゾナンススキャナーを用いることはあまりない。

・対物レンズ

対物レンズは組織深部の観察が可能な、開口数 (NA) が大きく、作動距離 (WD) が長いものを使用する。われわれはライカ社製、赤外線透過水浸レンズ HCX APO (20×NA 1.0, WD 2.0 mm) を使用している^{*2}。

・顕微鏡ステージ

骨組織の生体イメージングのためには、麻酔下に生かしたマウスを顕微鏡ステージに設置するため、対物レンズとステージの間に (マウスを乗せるのに) 十分なスペースが必要である。このため、われわれの研究室では、通常の組織切片や摘出組織の観察のための顕微鏡ステージを取り外し、自作のステージを設置している (④マウスを固定する台、も参照)^{*3}。

・フェムト秒パルス近赤外線レーザー

2光子励起用のフェムト秒パルス近赤外線レーザー (Ti:Sapphire レーザー) としては、現在のところスペクトラ・フィジックス社製の Mai Tai[®] シリーズと、コヒレント社製の Chameleon[™] シリーズが市販されている。この2つの製品間には基本的に大きな差異はないが、それぞれに特長があるので、購入時には使用用途に応じて業者とよく相談して導入することを勧める (いずれも非常に高価なため)。

・2光子励起用検出器

2光子励起用検出器 (non descanned detector : NDD) に、通常2~4チャンネルが搭載されている。チャンネル数が多いほど、よりマルチカラーでのイメージングが可能となる。NDDが4チャンネルの場合でのマルチカラーイメージングの場合の例 (蛍光シグナルとバンドパスフィルターの種類) を表に記す。

*1 ガルバノミラーは、入力される駆動電圧に応じて回転することにより、走査用レーザーを任意の角度で偏向させることのできる反射鏡。ガルバノスキャナーによって必要な角度に回転され、高速・高精度な光走査が可能である。また、レゾナンススキャナーは、共振運動を制御することによって反射鏡を走査する方法で、より高速な光走査が可能となった。

*2 このレンズは口径が大きく、通常のレボルバーには接続できないため、専用のアダプターの購入が必要となる。

*3 さらには、個体を用いたイメージングの場合、透過像を取得する必要がないため、透過光のコンデンサをはずして十分なスペースを確保するようにしている。

表 蛍光シグナルとバンドパスフィルターのセット例
(例1) SHG-Blue/Green/Red/Far Red

チャンネル	蛍光シグナル	バンドパスフィルター
NDD1	二次高調波発生 (SHG) ^{*4} , DAPI, CMF ₂ HC など	430 ~ 480 nm
NDD2	FITC, GFP, CFSE など	500 ~ 550 nm
NDD3	Rhodamine, DsRed, CMTPX など	565 ~ 605 nm
NDD4	QDot-650, DDAO-SE など	625 ~ 675 nm

(例2) SHG/Cyan/Yellow/Red

チャンネル	蛍光シグナル	バンドパスフィルター
NDD1	二次高調波発生 (SHG) ^{*4}	430 ~ 450 nm
NDD2	CFP など	465 ~ 500 nm
NDD3	YFP など	520 ~ 550 nm
NDD4	Rhodamine, DsRed, CMTPX など	565 ~ 605 nm

④ マウス用麻酔器

マウスは麻酔下にて手術、撮影を行う。当研究室では麻酔の調節が容易な吸入麻酔薬のエスカイン[®] (イソフルラン) を使用している。気化器 (バクスター社製, SurgiVet[®] など^{*5}) にてイソフルランを気化させ、空気または酸素と混合してマウスに投与する。麻酔を投与する際には、マウス用のマスクが必要となる。当研究室ではまず、処置のためにマウスを寝かせるための麻酔箱と、マウス処置用のマスクを用意している。

⑤ マウスを固定する台

神経生理学実験などで使用されている頭部定位固定装置 (stereotactic holder) を参考に、自作したものを使用している。当研究室で使用している台は、前方をマウスの歯を利用して金具に掛け、両耳を金具で固定する3点固定の方法で、頭部の固定を図っている。マウスの大きさに応じて、適宜長さ、幅、高さを調節する必要があるため、固定具の微調整が可能である方がよい (図1, 2)。

⑥ シェーバー, 脱毛クリーム

毛が観察視野に混入すると、強い自家蛍光の原因となる。マウスを準備する際に、極力毛が混入しないように、頭皮の毛剃り・脱毛を行う。頭皮の毛剃りには動物用シェーバーを (一般用のバリカンも使用可)、その後の脱毛に市販の脱毛クリーム (一般の薬局等で販売しているもの) を使用する。

⑦ O-ring

頭蓋骨と2光子励起顕微鏡の対物レンズとの間には、対物レンズの作動距離程度の距離が必要である。O-ringとして当研究室では大きさ、高さ、強度を考慮して、1.5 mLのマイクロチューブを適当な厚さに切断してリングを作成し使用している。

*4 二次高調波発生 (SHG)

骨組織などコラーゲン線維を豊富に含む組織では、二次高調波発生 (SHG: second harmonic generation) とよばれる、一種の「自家蛍光」を発生する (非線形光学)。SHGのシグナルは、照射した「励起光」のちょうど半分の波長となるため、2光子励起のために近赤外線 (780 ~ 900 nm) を励起光源として用いる場合、SHGはちょうど青色域の可視光に含まれるため (390 ~ 450 nm)、適当なフィルターにおいて検出可能となる。骨組織の生体イメージングでは、骨梁や骨表面がSHGによってきれいに可視化できる。

*5 イソフルレン気化器

日本国内では、バイオマシナリー社製: 型番TK-7などが一般に販売されている。これはイソフルレン気化器と空気ポンプが一体となってセットされたもので使いやすいが、非常に高価である。イソフルレン気化器のみを米国から直接入手できれば安価であるが、機器の性質上、個人輸入が難しい。現在、さまざまな輸入業者があるので、reasonableな価格でイソフルレン気化器を輸入・販売している場合があり、よく調べて購入されることをお勧めする。

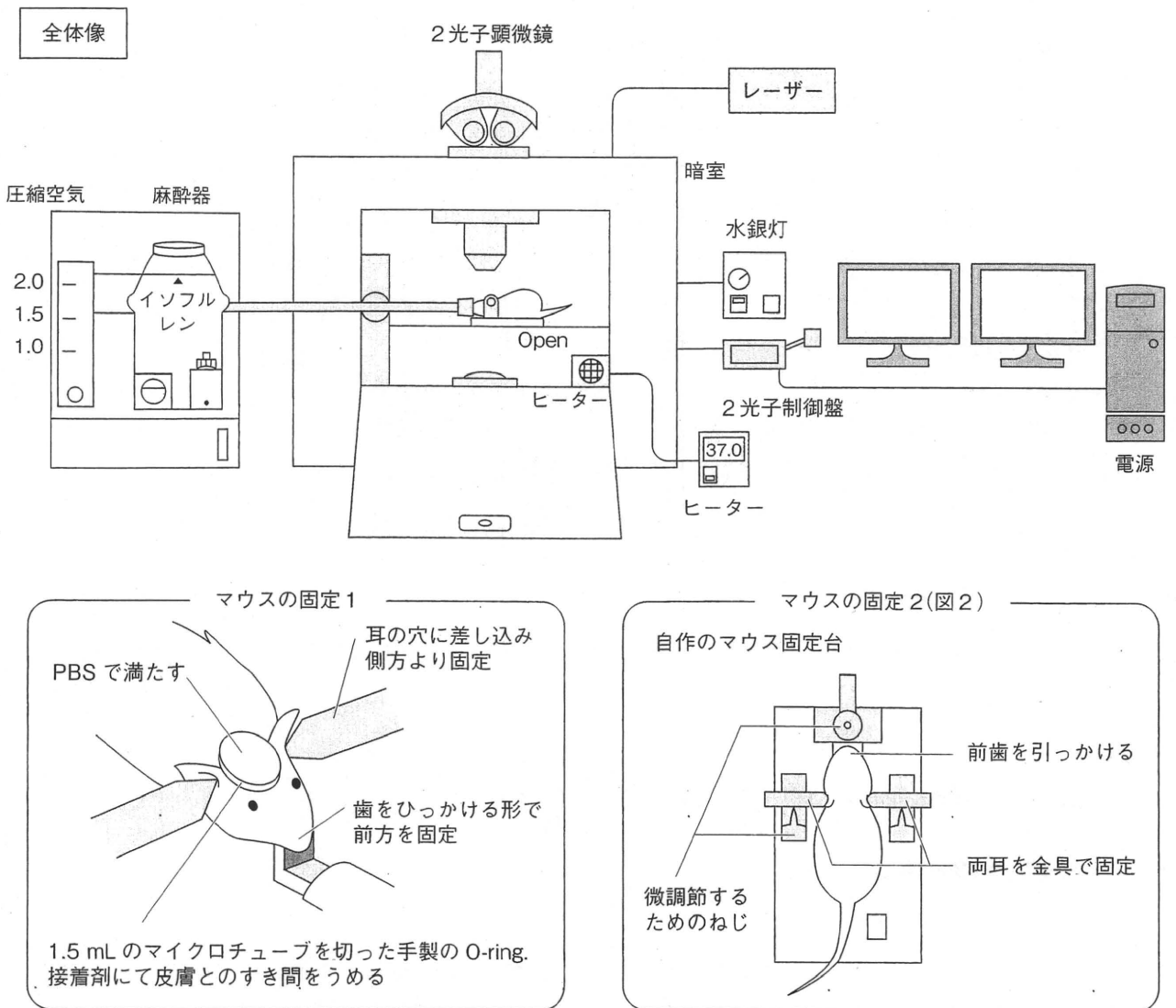


図1 2光子励起顕微鏡セットアップ

当研究室における2光子励起顕微鏡のセットアップの実際をお示する。処置後、マウスは麻酔下にてステージ上にセットする。暗室は外部からの光を遮断するのみならず、マウスの保温のためにも重要である。マウス固定台は自作であり、前方をマウスの歯を利用して金具に掛け、両耳を金具で固定する3点固定の方法をとっている

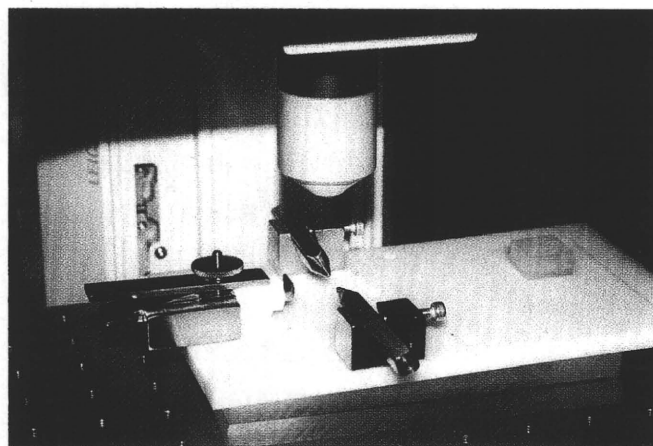


図2 自作のマウス固定台

実際に2光子励起顕微鏡のステージにマウス固定台を置いたところ

⑥ PBS

対物レンズは水深レンズのため、頭頂骨と対物レンズの間にPBS（あらかじめ加温しておく）を満たす。PBSは37℃程度に加温しておく。

⑦ 接着剤（アロンアルファ[®]など）、ワセリン

O-ringと頭皮のわずかな隙間からPBSが漏れていくのを防ぐため、市販の接着剤（アロンアルファ[®]など）で固定し、必要に応じてワセリンなどでコーティングを施す。接着剤も観察視野に混入すると強い自家蛍光の原因となるため、極力少量で固定するのがよい。

⑧ ヒーター

撮影中、動物の体温低下を防ぐため、ヒーターで36～37℃を保つように保温する必要がある。暗室全体を暖める方が効率的である。当研究室では暗室内にサーモスタット機能を備えた温風ヒーターを設置してある。

プロトコール

① 顕微鏡のセットアップ

レーザーパワーの安定に、しばらく時間を要することから、マウスの準備の前に、2光子励起顕微鏡のセットアップを行う。セットアップの詳細に関しては、機器付属のマニュアルを参照していただきたい。同時にヒーターをOnにしておく。

② 血管の蛍光標識

骨のイメージングでは、血管を蛍光色素にて染色することが多い。実験計画に応じて蛍光色素を決定するが、観察対象の細胞が緑色（GFPなど）で標識されている場合は、dextran conjugated-TexasRed [70,000 MW, lysine fixable, 10 mg（ライフテクノロジーズ社、カタログ番号：D1863）をPBSで2 mg/mLに溶解しマウス1匹あたり100 μLずつ使用]を選択する。観察対象が赤色の場合は、dextran conjugated-FITCを用いる。なお、Far Redを検出するdetectorを備えている場合であれば、Qdot-650などを血管標識に用いることが可能である。

投与は処置開始直前に静脈注射（眼静脈または尾静脈より）にて行う。色素は腎臓から自然に排出され、3～4時間が経過するとかなり退色する。

なお、骨髓腔内の血管壁は比較的大きく開窓しているため、分子量の小さいdextran conjugateを投与すると、骨髓腔全体が染まっ

てしまう。骨髓腔内の血管を標識するためには70,000 MW以上のものを使用する必要がある。

③ マウスの固定

イソフルランにてマウスを麻酔する。通常、2%程度のイソフルレン混合にて麻酔を開始する。処置中に疼痛の程度を確認し、イソフルレンの濃度を適宜増減する。麻酔下にては以後の処置を行う。

・O-ringの装着

頭頂骨の毛をシェーバーで剃り、その後脱毛クリームを付ける。脱毛クリームが十分に染みわたったところでキムワイプ[®]等で脱毛クリームを綺麗に拭き取る。エタノールで軽く頭皮を消毒し、切子で縦に小さな皮切を入れる。ピンセットを用いてO-ringを皮切より頭頂骨の上にすべり込ませて、接着剤を用いて固定する。O-ringの周囲に軽くワセリンを塗り、PBSでO-ringを満たす。

・固定台への固定

上記処置を終えたところで、マウスを自作のマウス固定台に移動させる。歯を金具に引っ掛けるように前方を固定し、次に両耳に金具を押し付けて、頭部をしっかりと固定する。固定が十分でないと、呼吸・心拍動によるドリフトが生じ画像の質が著しく低下するので、十分な注意を要する。マウスの固定が完了すれば、2光子励起顕微鏡にマウスを移動させる。

④ 観察

目的とする対象に応じて、励起波長を決定する。Ti:Sapphireレーザーでは780~800 nmを最高点にして、より長波長側では出力が減衰する。骨のイメージングでは、励起光を骨組織に通過させるために、最大出力の8割程度の出力を要するため、780~880 nmの波長を使用することが多い。

骨髓におけるGFP陽性細胞を観察する場合、水銀灯下でGFP陽性細胞を手がかりに、z軸フォーカスを合わせる。血管をDextran conjugated-Texas Redで描出している場合は、血管を手がかりにz軸を合わせてもよい。視野確保は熟練を要するステップである。視野が確保できれば、目的とする細胞が観察しやすいように、数倍程度に画像を拡大する。撮影するz軸の範囲、撮影間隔、撮影時間を設定し、撮影を開始する。

⑤ データ解析

イメージングデータ解析ソフトとして、一般に汎用されているものは、IMARIS (Bitplane社)とVolocity (パーキンエルマー社)の2つである。基本的な機能・操作は似ているが、それぞれに一長一短がある。本稿で記しているような、個体を生かしたままでのライブイメージングでは、少なからずドリフト(マウスの呼吸や心拍によって画像がぶれること)が生じるため、ドリフトを除去する必要があるが、この際IMARISの「drift collect」機能が有用である(現

在のところ、Velocityには同等の機能はない)。細胞の速度やコンタクト時間などを解析する点では、両ソフトとも大きな差異はない。

なお、当研究室では、最終的なプレゼン用動画を作成する際には、IMARISやVelocityで編集・処理した画像データを一旦TIFF seriesファイルに変換し、Adobe After Effects®という専用の動画編集ソフトを使用している(高画質での圧縮や保存ファイル形式の決定を自在にできるため)。

● 実験例

われわれは、単球系血液細胞がGFPで認識されているCX3CR1-EGFPマウスを用いて、骨組織内の生体2光子励起イメージングを行った³⁾。骨髄内の血管は前述の通り、dextran conjugated-TexasRed (70 kD)を静脈注射することで赤色に標識している。図3のように、骨髄内の比較的大きな血管が可視化されており、骨髄内から血管へ出ていく細胞や、逆に骨髄内へ入っていく細胞群を同定できる。また血管内にある単球系細胞は血流に乗って速く移動をしているが、骨髄腔内にある細胞は通常の状態ではほとんど動いていないことがわかる。このマウスにスフィンゴシン1リン酸(S1P)受容体に対するアゴニストを静脈内投与すると、骨髄腔内にある細胞が動き出し、一部は血管内へと流出していくことがわかった(図3右)。この結果、破骨前駆細胞を含む単球系細胞は、*in vivo*の骨組織内で、S1P刺激に反応して細胞遊走を行うことが明らかとなった。

実際の動画に関しては、当研究室のウェブサイトを見ていただきたい(<http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp>)。

● おわりに

2光子顕微鏡を用いた実験を成功させるためには、これ以外にも実験系に応じて必要な小道具を自作する必要がある。また細かいコツも必要であるが、初期の頃には気付かないことも多い。ある程度慣れてきたところで、熟練した実験者を訪ねることをお勧めする。

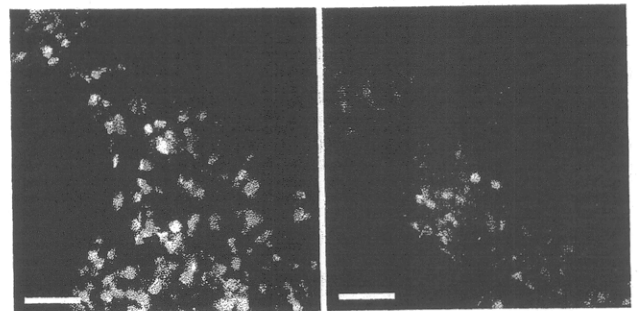


図3 骨組織内の生体2光子励起顕微鏡イメージング
生体2光子励起顕微鏡を用いた、CX3CR1-EGFPマウスの骨髄像。左はコントロール、右はS1PアゴニストSEW2871 (5 mg/kg)を投与している。CX3CR1-EGFP陽性細胞は緑色、血管は赤色に標識されている。画像は1分毎に10分間撮影を行った。スケールバー=50μm (文献3より転載)

文献

- 1) Denk, W. et al. : Science, 248 : 73-76, 1990
- 2) Cahalan, M. D. et al. : Nature Rev. Immunol., 2 : 872-880, 2002
- 3) Ishii, M. et al. : Nature, 458 : 524-528, 2009
- 4) Klauschen, F. et al. : Nature Protoc., 4 : 1305-1311, 2009

● 筆頭著者プロフィール ●

島津 裕 : 2003年、京都大学医学部医学科卒業。'09年、京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科、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特別研究学生所属。免疫系のイメージングに興味をもって、日々best shotを目指して2光子励起顕微鏡と格闘しています。

総 説

脂質メディエーター・ケモカインを標的とした 新しい骨吸収性疾患治療薬の開発 ～二光子励起顕微鏡を用いた生体骨イメージングより～

Key words: osteoclast,
chemokine,
lipid mediator,
osteoporosis,
imaging

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
石 井 優

要 旨

単球系の破骨細胞前駆細胞がいかんして骨表面に到達するか、その遊走がどう制御されているかは長い間不明であった。我々は最近、二光子励起顕微鏡を用いて生きたままのマウス骨組織内を可視化することに成功し、前駆細胞の遊走・接着が、脂質メディエーターの一種であるスフィンゴシン1リン酸や種々のケモカインによって動的に制御されていることを解明し、これらを標的とする薬剤が新規の骨吸収抑制剤として有望であることを示した。本稿ではこの研究成果に加え、我々が開発した骨のライブイメージングの方法論や応用についても概説する。

はじめに

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、どうしても生きた細胞を生きた組織の中で観察する必要がある。特に骨髄腔のように、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捉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、「生きたままの個体中」の骨組織を観察する必要がある。

我々は最近、二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方法を確立させた(図1)。この方法を用いると、骨組織のリモデリングに関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できる。我々は特に、骨を破壊・吸収する働きをも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。さらにはこれを標的とした新しい骨吸収抑

Novel therapeutics against bone-resorptive disorders targeting lipid mediator and chemokines: developed by using intravital two-photon microscopy of bones.

Masaru Ishii.

Laboratory of Biological Imaging, Immunology Frontier Research Center, Osaka University.