

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 promoter-EGFP transgenic mouse の頭頂骨の断面像（左）と、2光子励起顕微鏡による生体イメージング像（右）。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 $\mu$ m（左）、30 $\mu$ m（右）。

（筆者 HP <http://www.bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp> を参照）。

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、われわれ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 (Colony stimulating factor 1 receptor) (M-CSF/CSF-1の受容体) や CX<sub>2</sub>CR1 (Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1) (CX<sub>2</sub>CL1/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 細胞などにも見られる）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、元々その組織・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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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（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、破骨細胞を動かし得るかどうか *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* で刺激し得ることが分かった。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 [4-6]。

骨組織にある破骨細胞前駆細胞を含む単球系細胞 (CSF1R-EGFP<sup>+</sup>細胞、また CX<sub>3</sub>CR1-EGFP<sup>+</sup>細胞など) は、定常状態では骨組織および骨表面付近に留まり、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、著者の研究室のオリジナル HP <<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。

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 (Sphingosine-1-phosphate) 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 [7, 8]。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剤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。

## ● 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 リンパ球を始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

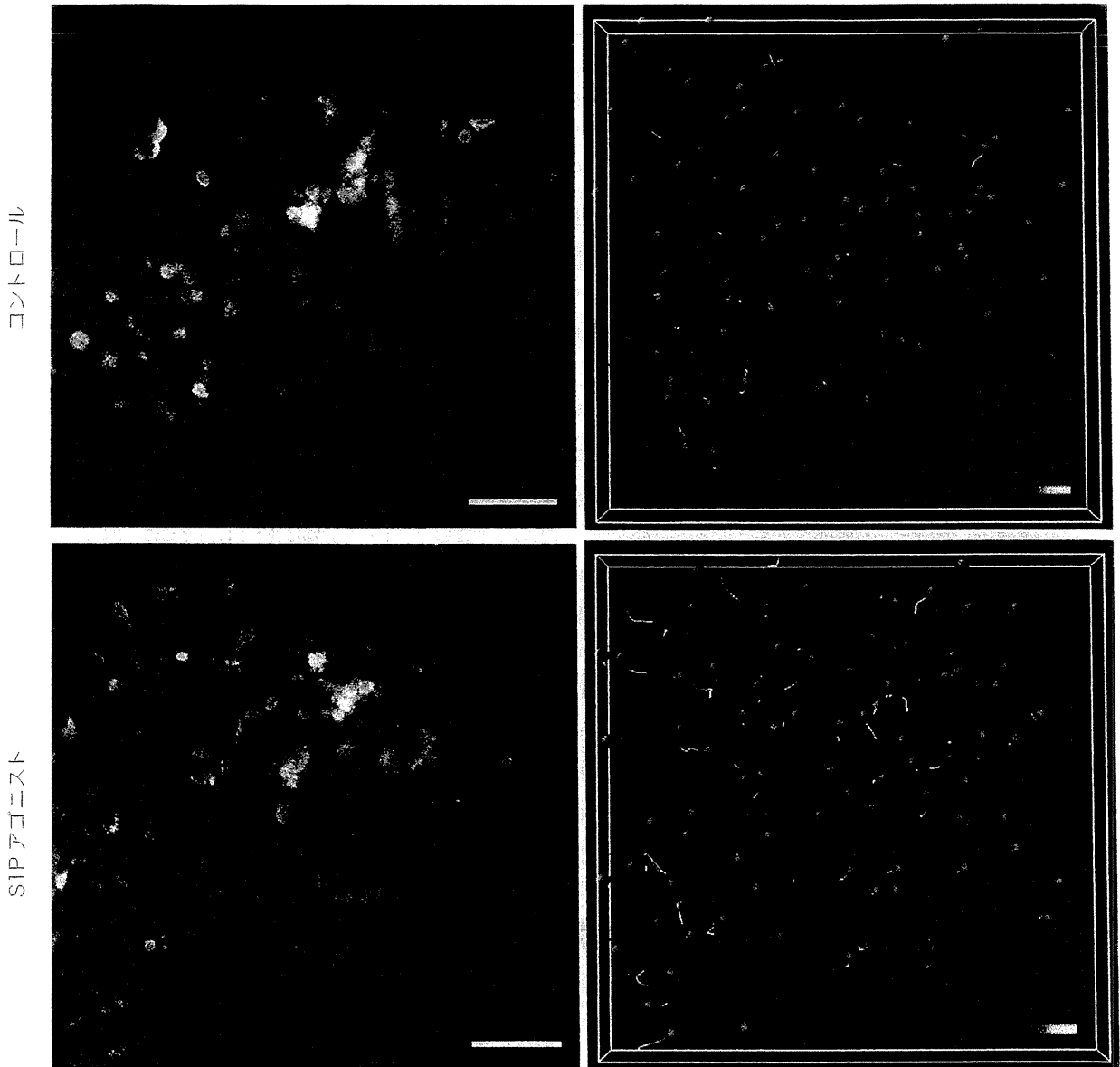


図3 骨組織内での破骨細胞およびその前駆細胞の生体2光子励起イメージング

破骨細胞を含む単球系細胞 (CX<sub>3</sub>CR1-EGFP<sup>+</sup>) 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)、SIP 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。

SIP : Sphingosine-1-phosphate

(Ishii M, et al. 2009 [4] より一部改変)

どにより保持される長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言える。一方では、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見つけて暮らしていることが分かる。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 [9, 10].

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り、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 (e.g. 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 : 1873-1876.
- 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 : 1869-1873.
- 3) Germain RN, Bajjnoff 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 : 163-181.
- 4) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009 ; 458 : 524-528.
- 5) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al. Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nature Protoc* 2009 ; 4 : 1305-1311.
- 6) Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, et al. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med* 2010 ; 207 : 2793-2798.
- 7) Kikuta J, Iwai K, Saeki Y, Ishii M. S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis. *Rheumatol. Int.* 2011 (in press).
- 8) Ishii T, Ishii M. Intravital two-photon imaging: a versatile tool for dissecting the immune system. *Ann Rheum Dis* 2011 ; 70 Suppl 1 : i113-i115.
- 9) Ishii T, Shimazu Y, Nishiyama I, et al. The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors : an application of intravital two-photon microscopy. *Mol Cells* 2011 ; 31 : 399-403.
- 10) Ishii T, Kawamura S, Nishiyama I, et al. Use of intravital microscopy and in vitro chemotaxis assays to study the roles of sphingosine-1-phosphate in bone homeostasis. *Methods Mol Biol.* 2011, in press.

## 【生体多光子励起イメージング】

In vivo imaging by using multi-photon microscopy

石井 優

Masaru Ishii

Key words

imaging, multi-photon excitation, microscopy

### 要 約

近年、ライフサイエンスの領域で、多光子励起顕微鏡など最新の顕微鏡技術を駆使した「生体イメージング」に対する関心が高まっている。従来の観察法では、「生体」はホルマリンなどで固定して、いわば「死体」にしてから、ナイフで薄く切って顕微鏡で観察していた。これでも様々な情報が得られるのではあるが、決定的に欠けている情報があった。それは、細胞や分子などの「動き」の情報である。動物の本質は「動くこと」であるが、これは生体のみが備え、死体にはない。最近、オワンクラゲの蛍光物質であるGFPの生命科学への応用や、顕微鏡技術の長足の進歩により、「生体」を「生きたまま」で観察できるようになった。この技術によって、特にそれまで見えなかった細胞や分子の「動き」を直接見ることができるようになり、生命科学の領域にパラダイムシフトがもたらされた。本稿では、多光子励起顕微鏡を用いた「生体イメージング」の方法論と今後の応用について、これを活用して行った筆者の研究を紹介しながら概説したい。

### はじめに～生物学とイメージングの歩み

「イメージング」とは、見えないものを見えるようにする作業である。『Seeing is believing (百聞は一見に如かず)』と言われるように、「見る」ことは人間の五感の中でも特別な位置を占めている。実際、研究の世界でも「見た」ことによって初めて「分かった」と感じ、新しいアイデアの湧出・画期的なコンセプトの発見へとつながった例は枚挙にいとまがない。逆に、いくら証拠を積み重ねても「見ない」限りは、『群盲象を撫でる』が如く、しっくりと理解できないような感じがしてしまう。自然科学・生物学における顕微鏡・イメージング技術の進歩の歴史は、まさに「見えないものを見えるようにしたい」という人間の飽くなき挑戦の歴史である。

17世紀後半、オランダの眼鏡職人であったレーウエンフックが顕微鏡を試作し、イギリスの学者ロバート・フックがこれを改良して生物のミクロの世界を初めて観察した。これは、生物の基本構成単位である「細胞」の発見をもたらし、近代生物学の幕開けへとつながった。

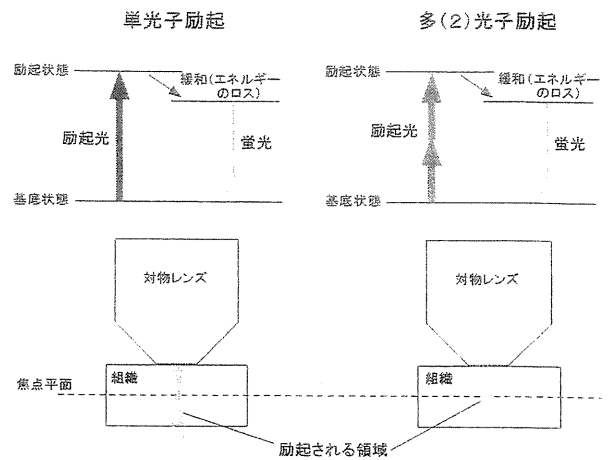


図 単光子励起と多光子励起

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(左図)、多(2)光子励起では複数(2個)の光子で励起する(右図)。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(下図)。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。

それ以降、イメージング技術の進歩は、生物学の進歩と常に歩調を合わせて進んできたと言える。19世紀後半には、現在の顕微鏡の原型はほぼ確立していたが、20世紀に入りイメージング技術は様々な方向へ大きな発展を遂げていく。その一つの方向性として、蛍光観察技術の進歩があり、この究極型の一つが「多光子励起顕微鏡」である。

### 1. 多光子励起顕微鏡の開発と応用

蛍光観察では、注目する細胞や分子などを蛍光分子で標識する。蛍光分子は一般に、エネルギー的に低い状態(基底状態)と高い状態(励起状態)があるが、普段は基底状態にある。このエネルギー差に相当する光(光子)を当てると、蛍光分子はこのエネルギーを吸収して励起状態になるが、自然にまた励起状態へと戻っていく(図)。この際、そのエネルギーに相当する光を放出し、これを

観察しているのが蛍光観察である。ところで、当てた光子(励起光)よりも、出てくる光子(蛍光)の方が常にエネルギーが低く(エネルギーは必ずロスされる)、このため、蛍光は励起光よりも波長が長い(ストークスシフトと呼ぶ)。この波長の差を利用して、半透鏡(ダイクロイックミラー)やフィルターを使って光路を分けて観察するのが蛍光顕微鏡である。

多光子励起顕微鏡の最大の特徴は、蛍光観察の際に、光子1個ではなく、複数(通常は2個)の光子を蛍光分子に同時に当てることにより励起させる点にある。光子1個対蛍光分子1個による1対1反応に比べて、複数の光子による励起(多光子励起)は極めて起こりにくい現象であるが、光子密度を非常に高くすれば非線形的に起こり得る、ということ、ドイツの物理学者Göppert-Mayerが初めて理論的に示した(1931年)。しかしながら、この希少な現象を実験物理学的に実証するまでには、さらに30年もの年月が費やされた(Abella, 1962年)。

ところで、この「多光子励起」の現象は、光子密度が異常に高い場所でのみ起こる。顕微鏡観察で言えば、光が一点に凝集される点、すなわち「焦点」のみで起こり得る現象である。これを利用して「焦点のみで励起が起こるような顕微鏡(=多光子励起顕微鏡)」を作ったのが、Cornell大学のDenkとWebbらであった(1990年)<sup>1)</sup>。

この型破りな顕微鏡は、以下のような様々な長所を備えている(図参照)。

## 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트가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780~1000 nm)。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)

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退色は極めて小さく抑えることができる。

(これら以外にも多光子励起イメージングには、光学的な様々な利点があるが本稿では誌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」するために極めて有用である。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(「物理的スライス」という)どんな場所でも観察できるが、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、多(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、観察することができる。

## 2. 生きた組織・個体の中での生きた細胞の機能を見る、多光子励起イメージングの実際

多光子励起イメージングの生物応用はDenkとWebbらのグループによって1990年に第1報がもたらされたが<sup>1)</sup>、引き続いてDenkらが1995年に報告した内耳有毛細胞のciliaでの微小カルシウム動態の論文<sup>2)</sup>は、研究者に大きな衝撃を与えた。これ以降、世界中で多光子励起観察が展開されることになる。

ところで、いわゆる「生体多光子励起イメージング」には大きく2種類ある。それは「tissue explants imaging」と「intravital imaging」である(両方とも適切な邦訳がない)。「tissue explants imaging」では、実験動物を屠殺して注目する組織・臓器を取り出して、酸素化した培養液中で生かしたまま観察する方法である。本邦でも2000年頃から、生理学研究所(現東京大学)の河西らによって、脳や内分泌腺のtissue-explant two-photon imagingが積極的になされてきた<sup>3)</sup>。

一方、「intravital imaging」では、実験動物を麻酔下で生かしたまま、観察したい組織・臓器を手術的に露出して観察する。方法論的には「tissue-explant」より困難であり、臓器・組織によってはアプローチがきわめて困難なことがあるが多くの利点があり、特に、動物を生かしているので循環血流が保たれる利点は非常に大きい。「tissue-explant」で取り出した組織にも血管はあるが、血流は流れていない。血流があることにより、観察している組織を完全に生理的な環境に保つことができ、また血管と組織間での細胞の流入を捉えることもできる。これは、特に免疫・血液系のように、生体内での血流を介した細胞の動態が重要なシステムの解析において威力を発揮する。2002年頃から、海外の複数のラボによって「intravital imaging」によるリンパ節内での免疫動態解析がなされるようになった<sup>4)</sup>。その後、方法論の改良により種々の組織・臓器の「intravital imaging」が試みられてきたが、筆者はintravital two-photon imaging

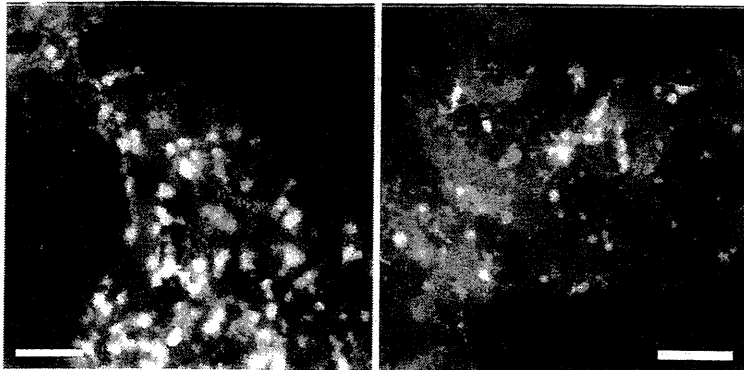


写真 骨組織（骨髄内）の  
生体多光子励起イメージング

顆粒球系（LysM+；左側）および単球系（CX3CR1+；右側）をそれぞれGFP標識したトランスジェニックマウスの骨髄腔の生体二光子励起イメージング。骨髄内の血管構造をTexas Redを結合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（Ishii *et al.*, Nature, 2009より改編。動画については筆者HP<<http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp>>を参照）。スケールバー：30 mm。

による、生きた骨組織・骨髄内の高解像度イメージング法を世界に先駆けて開発した<sup>1)</sup>。

### 3. 生体骨組織・骨髄内の多光子励起イメージング

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週間ほど漬けて込んで脱灰し、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」であった。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。さらに、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・流出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、「生きたままの個体内」の骨組織を観察する必要があった。

筆者は骨組織内で古い骨を破壊・吸収する、破骨細胞という特殊な細胞の動態に注目して研究を行っていたが、*in vitro*培養系や固定した骨組織解析ではなく、生きた骨の中で生きた破骨細胞の動態を解析したいという動機に駆られて、骨組織の2光子励起イメージングに挑戦した。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、二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かった。筆者は観察システムを改良し、骨基質が比較的薄い（骨表面から髄腔内まで約80～120 μm）マウス頭頂骨を用いて、生きた骨髄内を外部から非侵襲的に高解像度で観察できる実験系を確立した（写真）<sup>2)</sup>。これを用いて、破骨細胞の元となる前駆細胞が、血中から骨表面へ移動したり、逆に再還流する様子をリアルタイムで可視化し、この動態を制御するケモカイン・脂質メディエーターを同定した<sup>3)</sup>。骨髄は謎めいたブラックボックスである。雑多な血液系・間葉系細胞が、所狭しと詰め込まれている。多様な血液系細胞はそれぞれ決まった場所（ニッチ）に存在し、また互いに複雑な静的・動的ネットワークを形成

している。しかもそれは余程重要なもののように、硬くて頑丈な入れ物（骨皮質）で囲まれている。骨髄機能の生理・病理には、未だ不明な点が数多く残されているが、2光子励起顕微鏡による“非破壊検査”を用いた今後の解明が期待される。

### 4. 多光子励起イメージングの今後

注目する細胞を蛍光標識し、生かしたままの組織（可能であれば個体そのもの）内での動態（細胞の動き・相互作用）をイメージングすることは、多光子励起観察においてすでに可能となっている。さらには、最近の顕微鏡・レーザー技術の進歩により、生きた組織中での生きた細胞内での分子局在（膜か細胞質か、細胞の前か後か、など）を捉えることが可能となりつつある。今後は前述のSTED（Stimulated emission depletion）顕微鏡などの超高解像度イメージングと組み合わせることにより、生きた組織の生きた細胞内での1分子の挙動を追いかけることも現実味を帯びてくるかもしれない。筆者の予想では、これから5～10年くらいでバイオイメージング研究はさらに急速に進歩すると考える。1980年代の分子生物学、1990年代のジーンターゲット技術の発展など、新しい方法論は新しい概念を創出してきた。今後、バイオイメージング技術の進歩にキャッチアップできるかどうか、研究者としての帰趨を決すると同時に、それほどまでにイメージング技術が進歩した現在と未来、それらの豊富なツールを用いて何を見るのか、知識と力量が改めて問われる。

### 文 献

- 1) Denk W, Strickler JH, Webb WW. Science. 248: 73-76, 1990.
- 2) Denk W, Holt JR, Shepherd GM, Corey DP. Neuron 6. 1311-1321 1995.
- 3) Nemoto T, Kimura R, Ito K, Tachikawa A, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. Nature Cell Biol. 3: 253-258, 2001.
- 4) Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. Nature Neurosci. 4: 1086-1092, 2001.
- 5) Stoil S, Delon J, Brotz TM, Germain RN. Science. 296: 1873-1876, 2002.
- 6) Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Science. 296: 1869-1873, 2002.
- 7) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN. Nature. 458: 524-528, 2009.
- 8) Klauschen F, Ishii M, Qi H, Bajénoff M, Egen JG, Germain RN, Meier-Schellersheim M. Nature Protoc. 4: 1305-1311, 2009.
- 9) Kaplan JH, Ellis-Davies GC. Proc Natl Acad Sci U S A. 85: 6571-6575, 1988.
- 10) Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K. Nature 458: 1025-1029, 2009.



## 話題

# 破骨細胞のイメージング\*

菊田 順一<sup>\*\*\*</sup> 石井 優<sup>\*\*\*</sup>

**Key Words** : osteoclast, RANKL, multiphoton microscopy, intravital imaging

### はじめに

関節リウマチは、最も頻度の高い自己免疫疾患の1つであり、滑膜炎に伴う進行性の骨破壊を生じるため、患者の運動機能が著しく制限される。さらに、関節リウマチは、特に30～50歳代の女性での発症が多い疾患であるため、骨粗鬆症が重大な合併症として問題となっている。関節リウマチにおける骨破壊と骨粗鬆症における骨密度の低下は、いずれも「破骨細胞」の機能亢進が関与する病態である。そのため、関節リウマチを治療していく上で、この「破骨細胞」の機能をいかに制御するかが大変重要である。

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、「骨吸収」という特殊な機能を持つ細胞である。骨髄から採取した単球系細胞をM-CSF (macrophage colony stimulating factor) とRANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) の刺激下で *in vitro* で培養すると破骨細胞様の多核巨細胞が形成され、なかには100核以上の巨細胞も観察される。しかし、「このような多核巨細胞が *in vivo* でも本当に形成されるのか」、「生きた骨組織内で成熟破骨細胞はどのように骨吸収を行うのか」など、生体内での成熟破骨細胞の動態についてはこれまで明らかにされてこなかった。

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困難であったが、われわれ

は、組織深部の観察が可能な「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の細胞動態を観察するイメージング方法を確立した<sup>1)</sup>。この方法を用いて、われわれは最近、骨表面上での生きた成熟破骨細胞の動態を可視化することに成功し、成熟破骨細胞の骨吸収がRANKLによって動的に制御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、骨組織内の生体2光子励起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する。

### 骨組織内の 生体2光子励起イメージング

#### 1. 2光子励起顕微鏡のメリット

蛍光観察では、注目する細胞や分子などを蛍光分子で標識する。蛍光とは、蛍光分子の基底状態に適当な波長の光を外部から当てて励起状態を誘発し、これが基底状態に戻る際に放出されるエネルギーの一部が光となる現象である。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。2光子励起は、レンズで集約された光子が集まる1点の焦点面にしか起こらないため、

\* *In vivo* imaging of bone-resorptive functions of mature osteoclasts.

\*\* Junichi KIKUTA, M.D. & 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細胞動態学 [☎565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1]; Laboratory of Cellular Dynamics, Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

\*\*\* 科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業



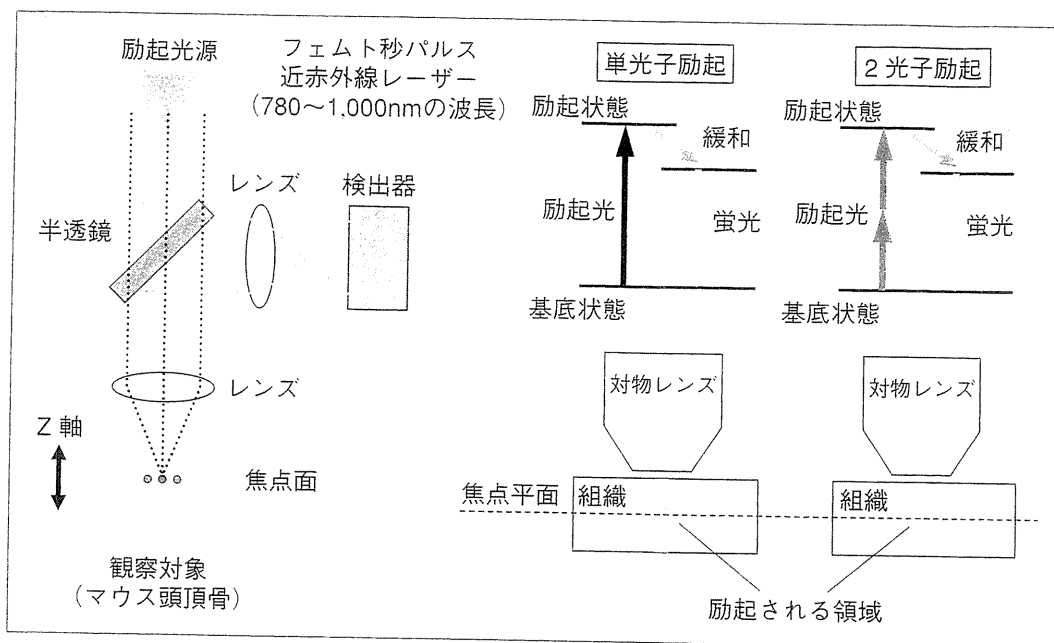


図1 2光子励起顕微鏡の原理

通常の蛍光観察(1光子励起)では、1個の蛍光分子を1個の光子で励起するが、2光子励起では2個の光子で励起する。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。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。

非常にクリアな画像が得られ(高い空間解像度)、観察対象となる組織・臓器への光毒性や蛍光の退色もきわめて小さく抑えることができる(低い組織侵襲性)。また、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(波長が780~1,000nm)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(高い組織透過性)。以上の特長から、2光子励起顕微鏡は、「組織・臓器を生かしたままで観察」するためにきわめて有用である<sup>2)3)</sup>(図1)。

## 2. 骨組織内の「生体(=intravital)」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800~1,000μmまで到達が可能であるが、骨組織の場合は、150~200μmが限界である。このため、われわれは、骨基質が薄くて骨表面から骨髓腔まで80~120μmで到達できるマウスの頭頂骨を用いて、骨組織内の生体イメージングに取り組んでいる<sup>1)4)~7)</sup>。実際には、麻酔したマウスの頭頂骨の皮膚を切

開し、露出させた後、顕微鏡用のステージにマウスを固定して観察する。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「生体2光子励起イメージング」を用いて、われわれはこれまで、破骨前駆細胞の骨吸収面への遊走・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(S1P)によって動的に制御されていることを解明した<sup>1)7)</sup>。しかしながら、「破骨前駆細胞が骨表面に到達して成熟破骨細胞に分化した後、骨吸収が生体内でどのように調節されているのか」という点についてはこれまで明らかにされていない。そこで、われわれは次に、「生体2光子励起イメージング」技術を駆使して、生体骨組織内での成熟破骨細胞の動態を可視化することに取り組んだ。

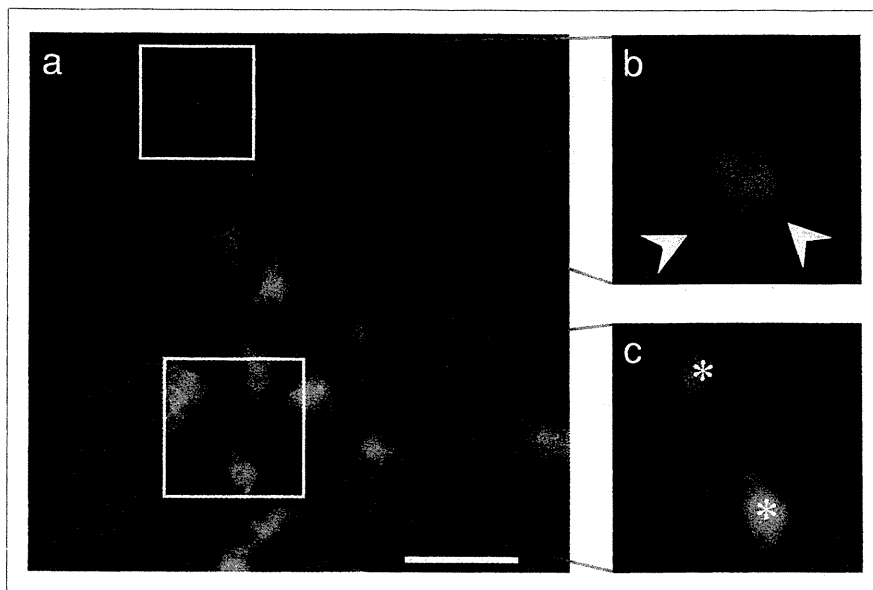


図2 骨組織内での成熟破骨細胞の生体2光子励起イメージング

成熟破骨細胞をGFPで標識したマウス(a3-GFPマウス)の骨髄腔の生体2光子励起イメージング(a). 骨髄腔内の血管構造は、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. 青色は骨組織を示す. 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. 骨表面で骨吸収を行っている成熟破骨細胞(緑色)には、「動きの乏しい細胞(b)」と、「アメーバー状によく動いている細胞(c)」の少なくとも2種類が存在する. 動きの乏しい細胞の方では、GFP(H<sup>+</sup>ポンプ)が膜に沿って発現しているように見える(b, 矢印). つまり、今まさに酸を出して骨吸収をしていると考えられる. 一方、アメーバー状によく動いている細胞の方では、GFP(H<sup>+</sup>ポンプ)が細胞質に存在し、膜上には発現していないように見える(c, アスタリスク). つまり、現時点で酸を出しておらず骨吸収にはかかわっていないと考えられる(スケールバー: 40μm).

(筆者作成)

## 生体イメージングによる 成熟破骨細胞の動態解明

### 1. 生きて成熟破骨細胞の動態の可視化

成熟破骨細胞を可視化するために、まずわれわれは、成熟破骨細胞に発現するH<sup>+</sup>ポンプに注目した. 成熟破骨細胞は骨基質に接着すると、骨吸収面がインテグリンによって強くシールされる. 破骨細胞の骨吸収面には、骨を吸収するためにH<sup>+</sup>を放出するためのH<sup>+</sup>ポンプ(V-type H<sup>+</sup> ATPase)が発現している. V-type H<sup>+</sup> ATPaseにはさまざまなサブユニットがあり、破骨細胞では特にa3 subunitが特異的に発現している<sup>8)9)</sup>. われわれは、V-type H<sup>+</sup> ATPase a3 subunitのlocusにa3 subunitとGFPの融合蛋白質(a3-GFP)をknock-inしたマウス(a3-GFPマウス)を用いて<sup>10)</sup>、この骨組織内を生体2光子励起顕微鏡で観察することにより、骨表面上での生きて成熟破骨細胞

の動態の可視化に成功した(図2-a). このマウスでは、GFP標識された成熟破骨細胞の動態だけでなく、H<sup>+</sup>ポンプの破骨細胞内局在も同時に観察することが可能である. その結果、骨表面で骨吸収を行っている成熟破骨細胞には、「①動きの乏しい細胞」と、「②アメーバー状によく動いている細胞」の少なくとも2種類が存在することが明らかとなった. 動きの乏しい細胞の方では、GFP(H<sup>+</sup>ポンプ)が膜に沿って発現しているように見える(図2-b, 矢印). つまり、今まさに酸を出して骨吸収をしていると考えられる. 一方、アメーバー状によく動いている細胞の方では、GFP(H<sup>+</sup>ポンプ)が細胞質に存在し、膜上には発現していないように見える(図2-c, アスタリスク). つまり、現時点で酸を出しておらず骨吸収にはかかわっていないと考えられる.

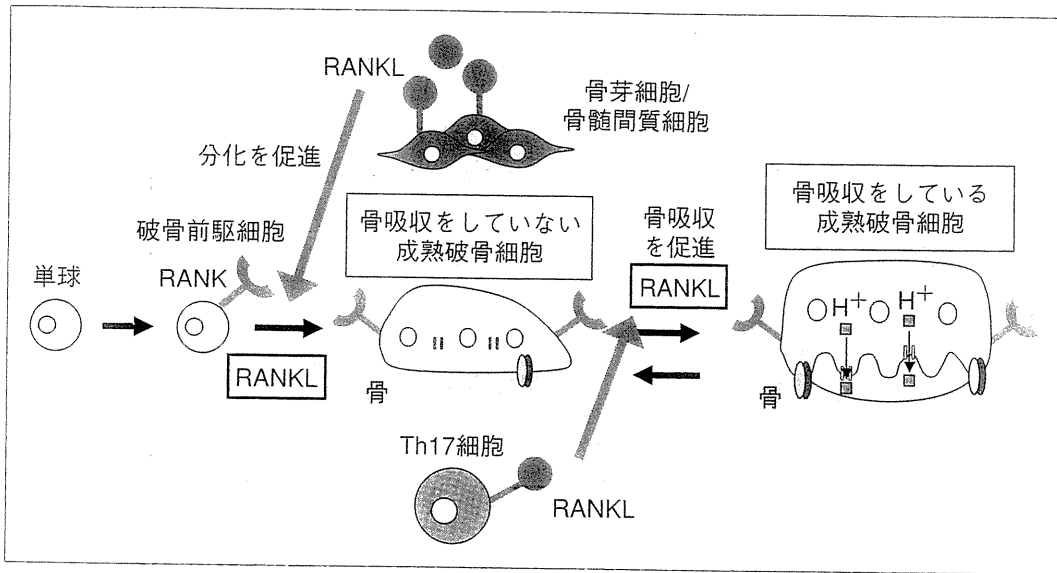


図3 生体内における成熟破骨細胞の骨吸収メカニズム

成熟破骨細胞には、「骨吸収をしていない状態の細胞」と、「今まさに骨吸収している状態の細胞」との2種類が存在する。また、RANKLは破骨細胞分化を促進するだけでなく、成熟した破骨細胞にも作用し、骨吸収を促進する役割も担っている。さらに、Th17細胞の膜上に発現するRANKLは、成熟破骨細胞の骨吸収を促進する作用を持つ。  
(筆者作成)

## 2. 骨吸収促進時および抑制時における成熟破骨細胞の動態変化

次に、われわれは、a3-GFPマウスに各種薬剤を投与して、成熟破骨細胞の動態の変化を検討した。まず、a3-GFPマウスにRANKLを腹腔内投与して破骨細胞の機能を亢進させ<sup>11)</sup>、投与2日後にマウスの骨組織内を生体2光子励起顕微鏡で観察した。その結果、骨表面上の成熟破骨細胞数が増加し、しかも、そのほとんどが「①動きがなく、今まさに骨吸収をしている状態の細胞」であった。一方、骨粗鬆症の治療薬であるビスフォスホネートを投与して破骨細胞の機能を抑制させると、骨表面での成熟破骨細胞数が減少し、しかも生き残った細胞の多くが、「②動いていて、骨吸収をしていない状態の細胞」であった。このように、生体2光子励起イメージングを用いることにより、成熟破骨細胞の絶対数のみならず、成熟破骨細胞の機能(骨吸収をしているのか、あるいは骨吸収をしていないのか)も同時に評価することができるようになった。

## 3. RANKLによる成熟破骨細胞の骨吸収制御機構の解明

次に、われわれは、a3-GFPマウスにRANKLを急速に静脈内投与し、RANKLの早期効果を検討した。その結果、投与後30分という比較的短い時

間に、成熟破骨細胞が「②骨吸収をしていない状態」から「①今まさに骨吸収をしている状態」へと変わっていく様子が観察された。従来、RANKLは破骨前駆細胞が成熟破骨細胞へ分化するための必須の因子であることが知られていた。今回われわれが行ったイメージングの結果により、RANKLは破骨細胞の分化を促進するだけでなく、成熟した破骨細胞にも作用し、骨吸収を促進する役割も担っていることが明らかとなった。

## 生体イメージングによるTh17細胞と破骨細胞の相互作用の機序解明

Th17細胞は、CD4陽性ヘルパーT細胞のサブセットの1つで、関節リウマチにおける骨破壊をはじめとして多くの自己免疫疾患の病態にかかわっていることが報告されている<sup>12)13)</sup>。さらに、Th17細胞は、他のThサブセットとは異なり、その膜上にRANKLを発現していることがわかっている<sup>14)</sup>。しかしながら、*in vitro*の実験系で、Th17細胞上のRANKL単独では破骨細胞分化を促進させることはできないことから、「Th17細胞の膜上に発現するRANKLが生体内でどのような働きをしているのか」という点についてはよくわかっていない。そこで、われわれは、Th17細胞と破骨細胞の生体内での作用機序を解明するため、a3-

GFPマウスに、蛍光標識したTh17細胞を投与して、マウスの骨組織内を生体2光子励起顕微鏡で観察した。その結果、Th17細胞が破骨細胞に直接作用することにより、破骨細胞が「②骨吸収をしていない状態」から「①今まさに骨吸収をしている状態」へと変わっていく様子が観察された。さらに、Th17細胞と破骨細胞の相互作用がRANKL中和抗体によって阻害されたことから、Th17細胞は、その膜上に発現するRANKLを介して成熟破骨細胞の骨吸収を促進することが明らかとなった(図3)(論文投稿中)。

### おわりに

関節リウマチにおける関節破壊の病態形成には、破骨細胞、マクロファージ、T細胞、樹状細胞など多種多様な細胞が複雑に関与していると考えられ、各細胞の挙動、細胞同士の相互作用を理解することが大変重要である。しかしながら、これまでの骨・関節の研究のほとんどは、固定した骨・関節組織を切り出して行われたものであったため、骨組織・関節腔内に存在する細胞の種類や機能がある程度解析することはできたが、個々の細胞の「動的な」情報を得ることは困難であった。今回われわれが確立した生体2光子励起イメージング系は、骨組織内のさまざまな細胞の動き・機能をリアルタイムで観察することができるため、今後、関節リウマチの病態解明や新規薬剤の開発においても強力な手段となり得ると考えられる。

### 文 献

- 1) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009 ; 458 : 524.
- 2) Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990 ; 248 : 73.
- 3) Denk W, Svoboda K. Photon upmanship : why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 1997 ; 18 : 351.
- 4) 島津 裕, 石井 優. 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. *実験医学* 2010 ; 28 : 2147.
- 5) 菊田順一, 久保厚子, 島津 裕, 石井 優. 免疫・血液系の2光子励起イメージング. *実験医学* 2011 ; 29 : 2602.
- 6) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al. Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nat Protocol* 2009 ; 4 : 1305.
- 7) Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, et al. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med* 2010 ; 207 : 2793.
- 8) Toyomura T, Oka T, Yamaguchi C, et al. Three subunit isoforms of mouse vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. Preferential expression of the  $\alpha 3$  isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 8760.
- 9) Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, et al. From lysosomes to the plasma membrane : localization of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase with the  $\alpha 3$  isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 22023.
- 10) Sun-Wada GH, Tabata H, Kawamura N, et al. Direct recruitment of H<sup>+</sup>-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci* 2009 ; 122 : 2504.
- 11) Tomimori Y, Mori K, Koide M, et al. Evaluation of pharmaceuticals with a novel 50-hour animal model of bone loss. *J Bone Miner Res* 2009 ; 24 : 1194.
- 12) Adamopoulos IE, Bowman EP. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res Ther* 2008 ; 10 : 225.
- 13) Peck A, Mellins ED. Breaking old paradigms : Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 2009 ; 132 : 295.
- 14) Sato K, Suematsu A, Okamoto K, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 2673.

