

図 2. 骨組織(骨髄内)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髄腔の生体 2 光子励起イメージング。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

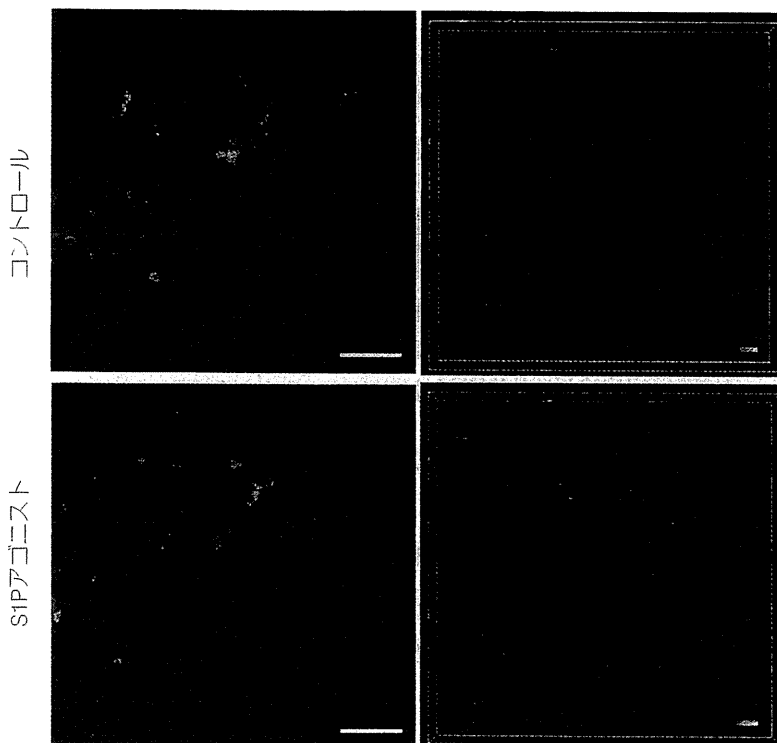


図 3. 骨組織内での破骨細胞およびその前駆細胞の生体 2 光子励起イメージング (Ishii M *et al.* 2009⁴⁾より改変引用)

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, ほとんど動かなかつたが, 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

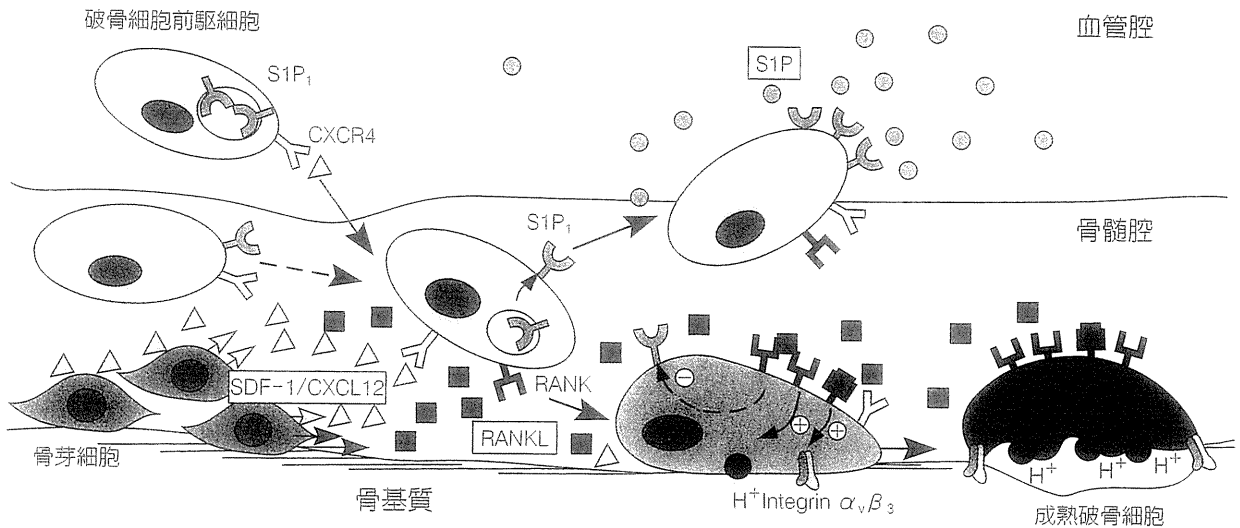


図 4. 破骨細胞前駆細胞の遊走と位置決め機構 (Ishii M *et al.* 2009¹⁾より改変引用)

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

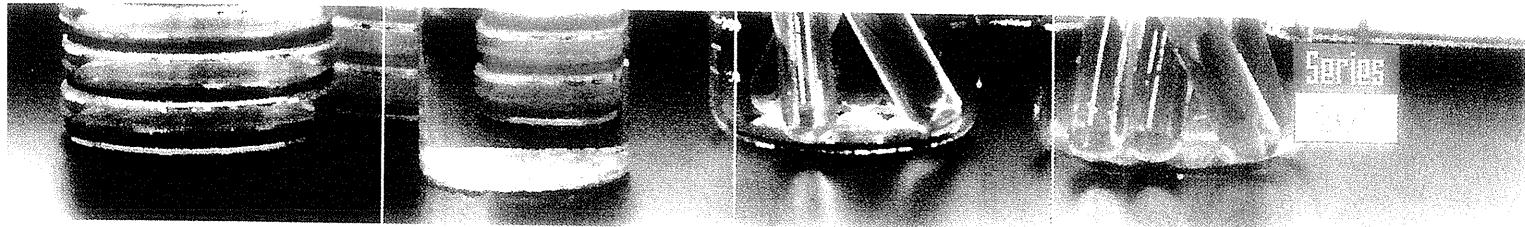
光子励起顕微鏡を用いた骨組織の生体2光子励起イメージングの方法論は、これら残された疑問を解決する強力な手段となると考える。

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 (②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) ^{*)} , 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) ^{*)}	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

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。

☞ 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^{*)}) 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。

☞ 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)。

☞ 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。

☞ 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。

*) 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。

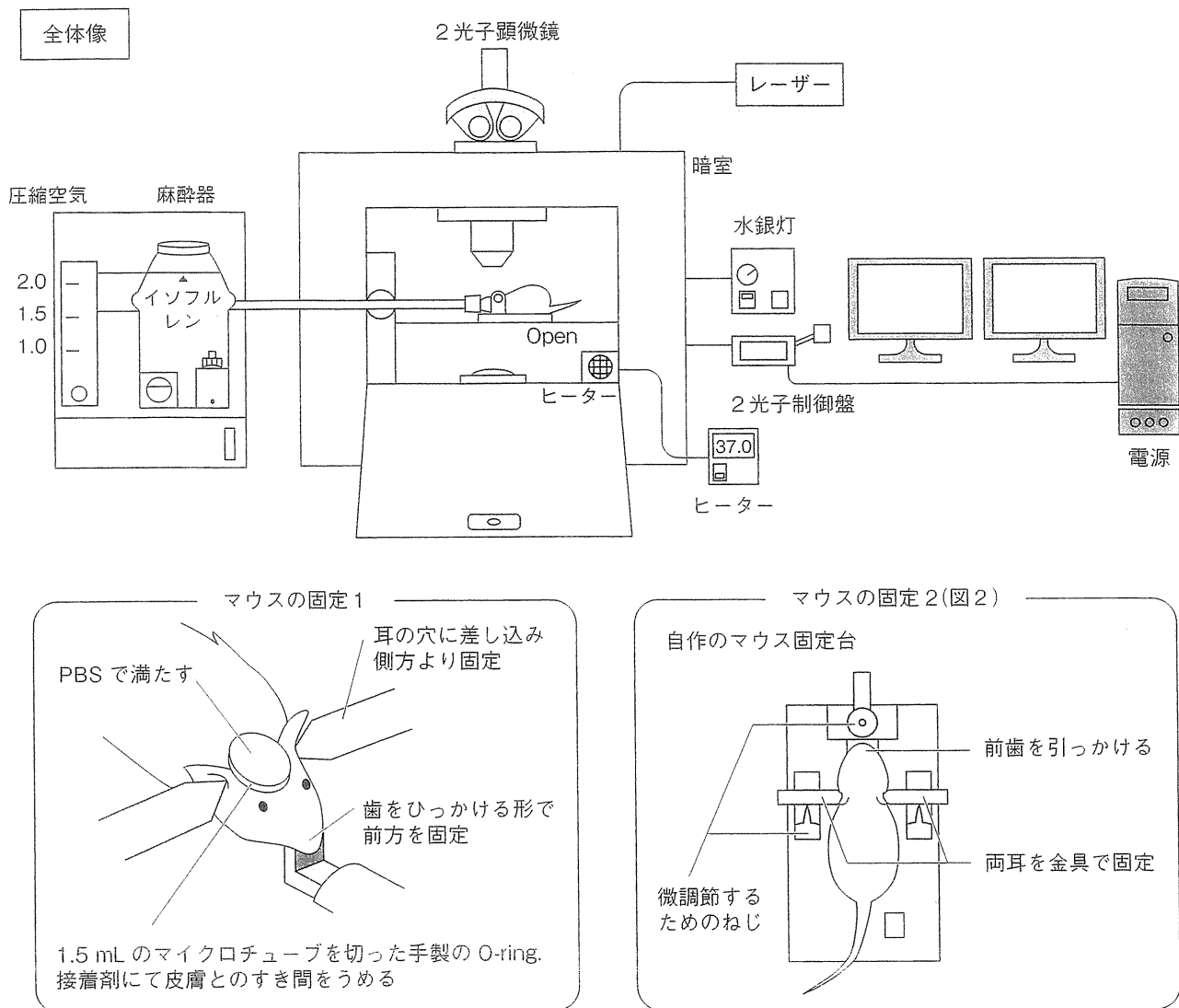


図1 2光子励起顕微鏡セットアップ

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

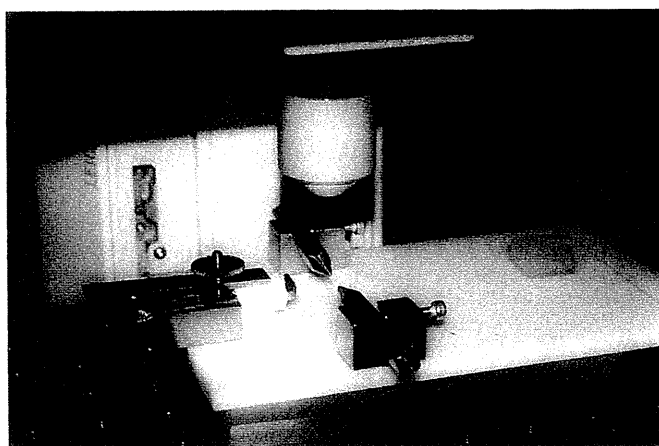


図2 自作のマウス固定台

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

● 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。

● 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。

● 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

● 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。

● 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 μ L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。

🌀 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ブ[®]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。

🌀 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。

🌀 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 Velocity (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おれること)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。

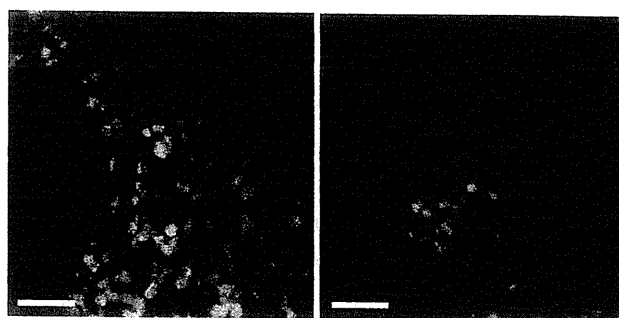


図3 骨組織内の生体2光子励起顕微鏡イメージング
生体2光子励起顕微鏡を用いた、CX3CR1-EGFPマウスの骨髄像。左はコントロール、右はS1PアゴニストSEW2871 (5 mg/kg)を投与している。CX3CR1-EGFP陽性細胞は緑色、血管は赤色に標識されている。画像は1分毎に10分間撮影を行った。スケールバー=50 μ m (文献3より転載)

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

◎ 読者啓蒙コラム(一) ◎

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に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.

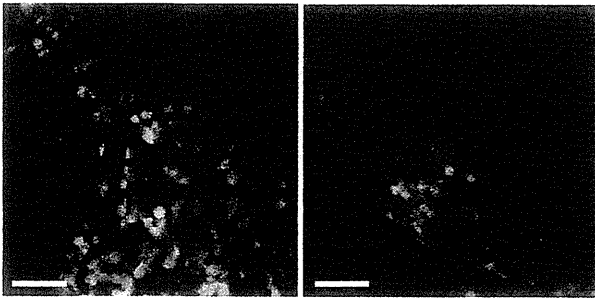


図1 骨組織（骨髄内）のライブイメージング

LysM-EGFP transgenic mouse (左側) または CSF1R-EGFP transgenic mouse (右側) 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(筆者 HP などを参照)。スケールバー: 30 μm 。

制治療薬の開発の可能性を示した。

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働きにより新陳代謝が繰り返されているが、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¹⁸⁾¹⁹⁾。

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るが、これまでの研究成果により、骨髄間質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) 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 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、などの知見が確立している¹⁰⁾¹⁷⁾。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(及びその前駆細胞)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」「一旦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、ほとんど明らかにされてこなかった。

我々は、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 *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 リン酸を始めとした、いく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⁵⁾。このため、二光子励起顕微鏡観察の特長として、以下が挙げられる²³⁾。

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780~1000 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

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)⁶⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。

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⁷⁾。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¹⁾¹³⁾¹⁴⁾²⁰⁾。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・骨髄腔の“intravital”imagingに取り組んだ⁴⁾⁸⁾¹²⁾。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、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、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⁹⁾¹¹⁾。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。

我々は、破骨前駆細胞が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⁴⁾⁸⁾。骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CSF1R-EGFP⁺またはCX₃CR1-EGFP⁺)は、定常状態ではほとんど動かなかったが、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(参考文献17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、破骨細胞は確かに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

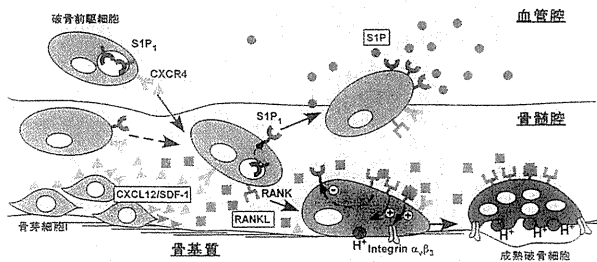


図2 破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構

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。

解析を行った。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。この流出入のバランスの上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。

脂質メディエーター S1P を標的とした新しい骨吸収性疾患治療薬の可能性

今回明らかにし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極めて魅力的である。我々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る。

近年、S1P アゴニストが新規の免疫抑制剤として注目されている。S1P がリンパ球上の受容体に作用してその遊走機能を制御することが知られているが¹²⁾、S1P アゴニストの投与により、リンパ球を2次リンパ組織(リンパ節や脾臓など)に留めることにより循環するリンパ球数を減少させ免疫抑制作用を示す¹¹⁾。実際、現在複数の製薬企業が S1P を標的とした免疫抑制剤を開発しており、欧米では多発性硬化症などの自己免疫疾患の治療に対し臨床試験中である⁹⁾。既述の通り、著者らは S1P アゴニストが骨吸収抑制剤として有効であることを示したが、これらの結果を総合的に考察すると、S1P アゴニストは骨粗鬆症と関節リウマチを併発するような、例えば高齢女性の関節リウマチ患者の病態等に対して、まさに「一石二鳥」となる可能性がある。実際、著者らは、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスに、抗コラーゲン抗体誘導関節炎(collagen antibody-induced arthritis : CAIA)を発症させたモデル系において、両方の病態治療にとって有効であることを示している(現在論文投稿中)。華々しい生物学的製剤の登場の影で、高齢の関節リウマチ患者は、リスクや合併症のためにその恩恵を受けることができないことが多い。このため、依然としてステロイドホルモンによる対症的療法を受けて、圧迫骨折に悩まされるケースが少なくない。脂質メディエーター S1P を標的とした新しい治療法の開発は、彼らに対する福音となることが強く期待される。

文 献

- 1) Bousso, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S., et al.: Dynamics of thymocyte-stromal

- cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science*, 296 : 1876-1880, 2002.
- 2) Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W. : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248 : 73-76, 1990.
 - 3) Denk, W., Svoboda, K. : Photon upmanship : why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*, 18 : 351-357, 1997.
 - 4) Germain, R.N., 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.*, 221 : 163-181, 2008.
 - 5) Goeppert-Mayer, M. : Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.*, 9 : 273-295, 1931.
 - 6) Helmchen, F., Denk, W. : Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods*, 2 : 932-940, 2005.
 - 7) Huang, A.Y., Qi, H., Germain, R.N. : Illuminating the landscape of in vivo immunity : insights from dynamic in situ imaging of secondary lymphoid tissues. *Immunity*, 21 : 331-339, 2004.
 - 8) Ishii, M., Egen, J.G., Klauschen, F., et al. : Sphingosine - 1 - phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 458 : 524-528, 2009.
 - 9) Kappos, L., Antel, J., Comi, G., et al. : on behalf of the FTY720 D2201 Study Group. : Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 355 : 1124-1140, 2006.
 - 10) Lorenzo, J., Horowitz, M., Choi, Y. : Osteoimmunology : interactions of the bone and immune system. *Endocr. Rev.*, 29 : 403-440, 2008.
 - 11) Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., et al. : Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*, 296 : 346-349, 2002.
 - 12) Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., et al. : Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, 427 : 355-360, 2004.
 - 13) Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I., et al. : Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science*, 296 : 1869-1873, 2002.
 - 14) Stoll, S., Delon, J., Brotz, T.M., et al. : Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science*, 296 : 1873-1876, 2002.
 - 15) Takahashi, N., Kasai, H. : Exocytic process analyzed with two-photon excitation imaging in endocrine pancreas. *Endocr. J.*, 54 : 337-346, 2007.
 - 16) Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T., et al. : Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science*, 297 : 1349-1352, 2002.
 - 17) Takayanagi, H. : Osteoimmunology : shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.*, 7 : 292-304, 2007.
 - 18) Teitelbaum, S.L. : Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289 : 1504-1508, 2000.
 - 19) Teitelbaum, S.L., Ross, F.P. : Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.*, 4 : 638-649, 2003.
 - 20) von Andrian, U.H. : Immunology. T cell activation in six dimensions. *Science*, 296 : 1815-1817, 2002.

生体イメージングによる骨代謝機能の解明

Analysis of the Mechanisms of Bone Metabolism Using Intravital Imaging

藤森さゆ美^{*1} 石井 優^{*2}

近年筆者らは、二光子励起顕微鏡を用い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た。これにより、破骨前駆細胞の遊走・接着がスフィンゴシン1リン酸(S1P)により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、骨のライブイメージングの骨代謝性疾患治療への応用と将来性について概説する。

1. はじめに

私たちが日常の生活をする上で、骨や関節は動きを制御する非常に重要な運動器である。骨や関節は加齢や疾病による影響を受けやすく、生活の質に深く結びつくことから、骨関節疾患の発症予防や治療を目指して、疾患発症のメカニズムや骨関節機能の解明が求められる。

骨組織は主に骨を壊して吸収する破骨細胞と、骨を新たに作る骨芽細胞の機能的なバランスにより保たれているが、これらのバランスが崩れることより、種々の骨代謝性疾患が発症する。加齢や炎症により破骨細胞の機能が亢進すると、この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、関節炎発症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。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。

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めに必須の分子であるRANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) は主に骨芽細胞が発現している^{1,2)}。RANKLは骨組織以外の組織にも発現が認められるが、破骨細胞はその他の組織では認められない。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recombinantのRANKLを投与すると破骨細胞分化が見られる。興味深いことに、このとき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

^{*1}Sayumi Fujimori 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 博士
研究員

^{*2}Masaru Ishii 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 生体イメージング研究室 主任研究
者 准教授

が存在することを強く示唆している。

筆者らは、破骨前駆細胞がいかにして骨表面に到達するのか、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、二光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織で破骨前駆細胞の「動き」を観察することに挑戦した。本稿では、この研究成果に加え、二光子励起生体イメージングを用いた骨組織の解析、および骨代謝性疾患の治療への応用と将来性について概説する。

2. 二光子励起顕微鏡による骨組織のイメージング

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。実際にこれまでの骨や骨髄に関する研究では、固定して摘出した骨を脱灰し、組織切片を作成して、骨組織内の細胞の形態や遺伝子・タンパク質発現を解析する方法が用いられてきた。このような従来の方法では、ある瞬間の細胞の位置は捉えられても、実際の生体内における細胞の動きを捉えることは不可能である。細胞の動きをみるためには、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、そこで流出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。我々は二光子励起顕微鏡を用いて、生きた骨組織の内部を観察することに挑戦した。

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を含む）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パルス状に放出させ一点に収束させるため、焦点平面でのみ励起が起こり、高い軸分解能で解析が可能である。また励起光として通常の半分のエネルギーの近赤外光を用いるため、組織の深部まで観察することができる。

筆者らは、麻酔下で処置したマウスを二光子励起顕微鏡で観察することにより、初めて骨髄内の

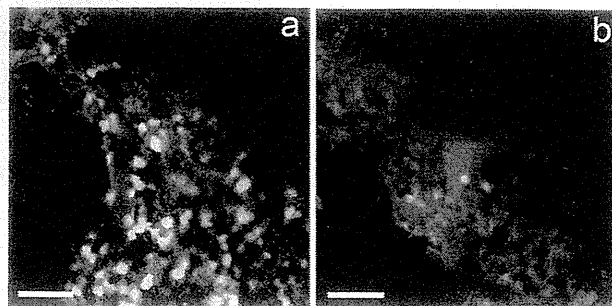


図1 二光子励起顕微鏡を用いた骨組織内のライブイメージング

好中球(a)または単球(b)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。スケールバー:30 μ m(筆者HPなどを参照)

細胞の動きを捉えることに成功した(図1)。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、血管から骨髄内への細胞の流入や、血中への還流の様子を観察することができる。また、細胞の速度や他の細胞との接触時間も併せて解析することが可能である。さらに、通常状態での骨髄内の細胞の動きだけではなく、尾静脈投与などにより血流を通して速やかに薬剤を観察部位に到達させることで、薬剤に対する細胞の反応を観察することも可能になる。

3. 骨組織における破骨前駆細胞の遊走と位置決め

筆者らは現在、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、破骨細胞および破骨前駆細胞の骨髄腔における骨への遊走や位置決めを制御する因子について解析を進めている。破骨細胞は、骨髄内において血液系細胞の単球マクロファージから分化、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、骨髄間質細胞や骨芽細胞によって産生されるM-CSF(macrophage colony stimulating factor)や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^{1,2)}。

一方で、「破骨細胞（およびその破骨前駆細胞）はどうやって骨表面に到達するのか」、すなわち「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」、「一旦骨表面に到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）」についてはほとんど明らかにされてこなかった。そこで、破骨前駆細胞の遊走や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、種々のケモカインや脂質メディエーターについて *in vitro* での細胞走化性実験を試みたところ、破骨前駆細胞の遊走を制御し得るいくつかの候補因子を得た。その中で注目したものは、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脂質メディエーターの一つ、スフィンゴシン1リン酸（SIP）である^{3,4)}。SIPは主に赤血球や血小板により産生され、血液中に高い濃度で存在する一方で、組織においてはSIPを分解するSIPリアーゼの存在により低い濃度に保たれている。このため、SIP受容体（SIP₁）を発現する破骨前駆細胞は、SIPに対する遊走作用により組織から血中へ還流する可能性が考えられた。このSIPに対する細胞遊走が *in vivo* でも認められるかどうかを確認するため、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。その結果、定常状態ではほとんど動きを見せない破骨前駆細胞を含む単球系細胞（CSF1R-EGFP⁺やCX₃CR1-EGFP⁺で標識）が、SIP₁に対する強力なアゴニストであるSEW2871の静脈投与によって活発に動くようになり、また血中へ移行していく様子が観察された（図2および文献5のSupplementary videos参照）。これにより、*in vivo* の骨組織内でも、破骨細胞は確かにSIP受容体刺激にตอบสนองして遊走能が亢進することが示された。

さらに、筆者らは、SIPに対する破骨前駆細胞の遊走の生理的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骨髄を解析した。

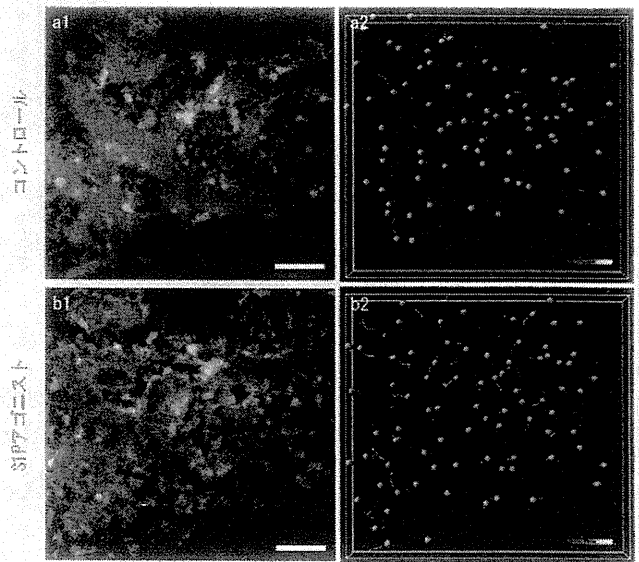


図2 ライブイメージングによる破骨前駆細胞の動態解析

破骨前駆細胞を含む単球系細胞（CX₃CR1-EGFP⁺）を緑色でラベルし、Texas Redを結合させた高分子デキストランを静脈注射して血管構造を赤色でラベルして、それぞれ可視化している（a1, b1）。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（a2, b2）。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（a1, a2）、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。（文献5より一部改変）

SIP₁を欠損した破骨前駆細胞は骨組織内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が増加し、骨リモデリングのバランスが骨吸収側に傾き、骨密度が減少した。SIPの濃度が血中で高く、SIPに対する遊走が一般に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上に骨表面に存在する破骨前駆細胞数が決められており、一定数がRANKLなどの影響を受けて成熟する（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骨表面へ遊走・位置決めを行うシステムが、破骨細胞分化や骨代謝の新たな制御点で

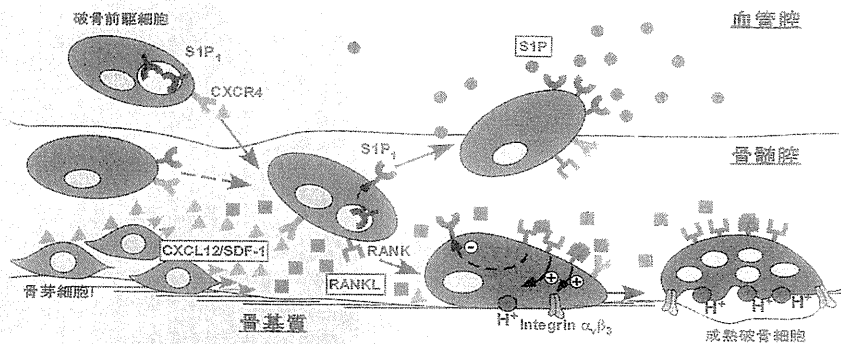


図3 破骨前駆細胞の遊走と位置決め制御機構

単球系破骨前駆細胞は、骨髓内にあるケモカイン 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。

あるという新概念を提唱するものである。

4. 骨組織イメージング法の骨代謝性疾患治療への応用

このように生体二光子顕微鏡を用いて、骨組織内に存在する破骨前駆細胞の動きを観察することにより、これまで着目されていなかった破骨前駆細胞の血中への再還流や骨表面への遊走が、骨の恒常性維持に極めて重要な役目を果たすことが明らかとなり、このシステムが新たな創薬ターゲットとなる可能性が示された。SIP 受容体を介する骨代謝制御機構については、骨粗鬆症モデルマウス（卵巣摘出マウス）を用いた解析から、SIP 受容体の強力なアゴニストである FTY720 の投与によって、OVX 群で認められる骨表面での破骨細胞の増加が抑制されること、また OVX 群で引き起こされる骨密度の低下が抑制されることが明らかになった⁵¹（図4）。この結果は、SIP による破骨細胞の遊走制御が骨粗鬆症の治療ターゲットとしても有望なものであることを示しており、ビスフォスフォネート（BP）製剤など成熟破骨細胞を標的とした従来の骨吸収剤とは異なった作用機序を持つことから、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。

今回筆者らは、SIP 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”であることを突き止めたが、逆に破

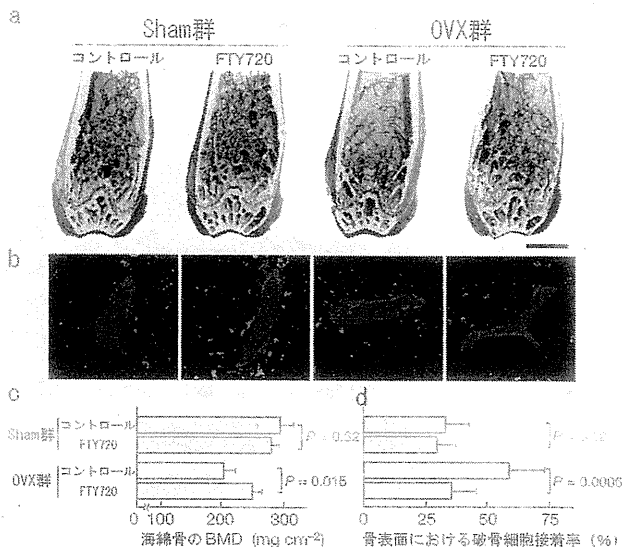


図4 骨粗鬆症モデルマウスに対する S1P 受容体アゴニスト FTY720 投与の効果

卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウス（OVX 群）では偽手術群（Sham 群）と比べて海綿骨の骨密度（BMD）が減少するが、SIP 受容体のアゴニストである FTY720 を投与した群では、OVX 群で認められる骨密度の減少が抑制される（a, c）。また、OVX 群で増加する骨表面を占める破骨細胞の割合が、FTY720 の投与により定常状態まで減少する（b, d）。（文献5より一部改変）

骨前駆細胞を骨へ引き寄せる因子“bone-attractant”についても現在解析を進めている。in vitro の解析では骨髓ストローマ細胞が発現する CXCL12 が、破骨前駆細胞のケモタキシスを誘導することが報告されているが⁶⁷、実際に in vivo で遊走作用を示すかどうかについては不明である。今後は、この骨の生体イメージング法を用い

て、CXCL12をはじめいくつか候補に挙がっているその他のケモカインを中心に、bone-attractantとして機能し得るかどうかについて検討し、破骨前駆細胞および破骨細胞の遊走・位置決めにおける“circulation-attractant”と“bone-attractant”の相互バランスを明確にし、骨吸収の抑制に最も効果的な創薬ターゲットの解明を行う予定である。

二光子励起顕微鏡により、全身の血流や代謝を保ったまま、骨組織内の破骨前駆細胞の動きを、時間軸を含めた4次元(4D)で観察することが可能となった。骨組織は、骨代謝に関与する破骨細胞や骨芽細胞だけでなく、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系幹細胞などが存在し、これらの細胞の機能維持や機能分化にとっても重要な部位である。骨組織イメージング法を用いることで、骨髄中に存在するこれらの細胞の動きも同時に観察することが可能になり、今後、破骨前駆細胞と周囲の細胞との相互作用を調べることで、今回のように骨代謝の新たな制御点が見出されることが期待される。

また、生きた個体を用いた骨組織のイメージングでは、薬物を尾静脈などから全身投与することにより、骨組織における薬物の効果をリアルタイムで評価することが可能である。この生体イメージングによる薬物評価法が今後の骨代謝性疾患の治療に果たす役割は非常に大きいと考えられ、薬物のスクリーニングに応用できるのみならず、薬剤が実際に骨量に影響を及ぼす前に、骨組織内の細胞の動きの変化を捉えることが可能になる。これにより、骨粗鬆症をはじめとする骨代謝性疾患の発症機序の解明が進み、これら疾患発症のより早い段階での治療戦略が可能になると期待される。

5. おわりに

最新の生体イメージング法を用いて骨組織を観

察することにより、破骨前駆細胞の遊走・位置決めシステムに、脂質メディエーターであるSIPがcirculation-attractantとして機能的な役割を果たすことが明らかになり、骨代謝の新たな制御点として注目されるようになった。これらの時空間的な情報は、これまでの静的な骨の標本を用いた解析からは決して得られなかった情報であり、実際に生きた骨組織を用いて細胞の動きを可視化することにより、初めて明らかにされたものである。このように、骨組織の生体イメージング法を用いることで、これまでとは異なる観点から骨代謝の制御因子を見出すことが可能となり、生理的な骨代謝調節のみならず、関節リウマチや骨粗鬆症など骨代謝性疾患の病態生理の理解とともに、新規骨吸収抑制薬の創薬や薬効評価システムの開発へとつながることが期待される。

生体二光子顕微鏡を用いた骨組織の生体イメージングの実験系はいまだ煩雑ではあるものの、今後生体イメージング法の簡便化・汎用化が進むことにより創薬や薬効評価システムとして広く普及し、今後の骨代謝治療に大きく貢献することが望まれる。

文 献

- 1) J. Lorenzo, M. Horowitz, Y. Choi, *Endocr. Rev.*, 29, 403 (2008)
- 2) H. Takayanagi, *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 292 (2007)
- 3) J. G. Cyster, *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 127 (2005)
- 4) H. Rosen, E. J. Goetzl, *Nat. Rev. Immunol.*, 5, 560 (2005)
- 5) M. Ishii *et al.*, *Nature*, 458, 524 (2009)
- 6) O. Kollet *et al.*, *Nat. Med.*, 12, 657 (2006)
- 7) X. Yu, Y. Huang, P. Collin-Osdoby, P. Osdoby, *J. Bone Miner Res.*, 18, 1404 (2003)