

蛍光イメージングによる骨解析

Analysis of Bone Tissues by Using Fluorescent Imaging

菊田順一, 川村俊輔, 石井 優

Junichi Kikuta, Shunsuke Kawamura, Masaru Ishii

近年、新しい蛍光タンパク質や蛍光プローブの開発、顕微鏡・レーザー技術の飛躍的向上などにより、蛍光イメージング技術が急速に進歩している。筆者らは最近、二光子励起顕微鏡を駆使して、マウスを生かしたままで骨組織内を可視化することに成功し、破骨前駆細胞の遊走・位置決め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)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明らかにした。本稿では、この研究成果に加え、筆者らが開発した骨の生体イメージングの方法論やその応用について概説する。



key words

破骨細胞, ケモカイン, 二光子励起顕微鏡

はじめに

下村 脩博士が緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein ; GFP) を発見して以来、様々な蛍光タンパク質や蛍光色素の開発が進み、特定の分子に蛍光タンパク質を付けて、その特定分子の挙動を可視化して解析する“蛍光イメージング”研究が急速に発展してきている。さらに近年、顕微鏡・レーザー技術が飛躍的に向上し、特に、組織深部の観察が可能な“二光子励起顕微鏡”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。

硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部はこれまで生きたままでの観察がきわめて困難であると考えられていたが、筆者らは最近、二光子励起顕微鏡を駆使してマウスを生かしたままで骨組織内を観察するイメージング方法を確立した。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。特に、筆者らは骨を破壊・吸収する働きを持つ破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、破骨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 (sphingosine-1-phosphate ; S1P)〕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、これらの研究成果の解説に加えて、骨組織内の生体二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。

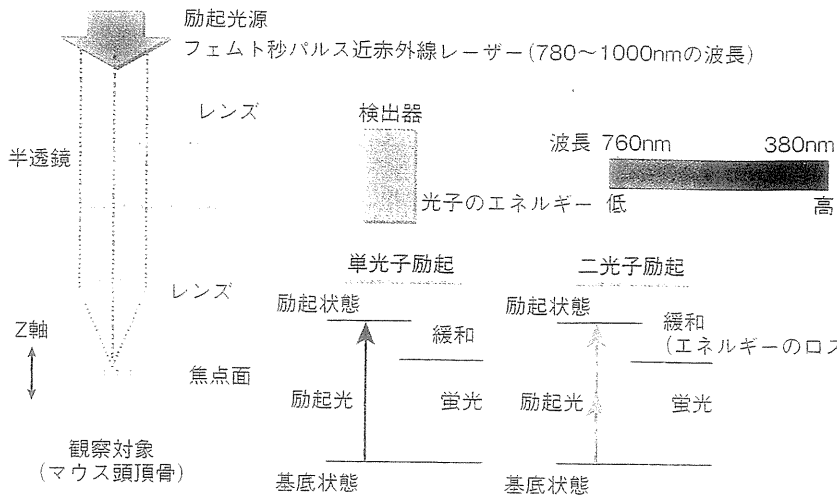
I 骨組織の生体二光子励起顕微鏡観察

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？

“蛍光”とは、蛍光分子の基底状態に適切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。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 (図1)。二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、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褪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780~1000nm) 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、二光子励起顕微鏡は“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^{1), 2)}。

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、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い。現在の近赤外線



■ 図1 二光子励起顕微鏡の原理

通常の蛍光観察（一光子励起）では、1個の蛍光分子を1個の光子で励起するが、二光子励起では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を得られ、非観察部位が励起されないため光毒性が低く褪色が少ない。

レーザーでは、軟部組織であれば表面から800~1000 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。このため筆者らは、骨基質が薄くて骨表面から骨髓腔まで80~120 μm ま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^{3)~7)}。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、血流を通してすみやかに観察部位に到達させることができる。

観察対象に関しては、可視化したい細胞に特異的に蛍光分子を発現させたマウスを用いて実験を行っている。例えば、破骨前駆細胞を含む単球系細胞のイメージングには、単球系細胞において比較的優勢に発現するCX₃CR1 (CX₃C chemokine receptor 1; CX₃CL1/フラクタルカインの受容体)のプロモーターの下流に緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein: EGFP) 遺伝子を組み入れたCX₃CR1-EGFP⁺マウスを用いている。

II 生体イメージングによる破骨前駆細胞の動態解明

1. 破骨前駆細胞遊走因子S1Pの発見

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。これまでの研究成果により、破骨前駆細胞から成熟破骨細胞への分化の過程に関与する分子やシグナルは多数解

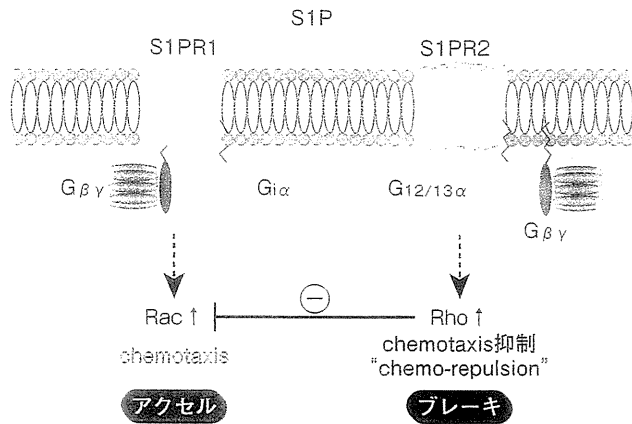
明されているが、「破骨細胞（およびその前駆細胞）はどのようにして血中から骨表面へ到達するのか」、「どのような分子機構が破骨細胞の遊走・位置決めを調節しているのか」、「いったん骨表面に達した破骨前駆細胞はすべて最終分化するのか（再び戻っていくことはあるのか）」など、破骨細胞およびその前駆細胞の生きた骨組織内での動態についてはまったく明らかにされてこなかった。

筆者らは、これらの謎を解明するために、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遊走させるかどうか*in vitro*の実験系でスクリーニングを行った。その結果、破骨前駆細胞の遊走を刺激するいくつかの候補分子を得たが、中でも筆者らが注目したものはS1Pである。

2. 生体内におけるS1Pの役割

S1Pは脂質メディエーターの一種で、免疫系ではT細胞など多様な細胞を遊走させることが知られている^{8), 9)}。S1Pは主に血中の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、組織中にはS1Pを分解する酵素 (S1Pリアーゼ、S1Pホスファターゼなど) が広く発現しており、組織に入ったS1Pはすぐに分解されるため、組織中でのS1P濃度は低い。このため、S1Pに対する走化性は、基本的には細胞が組織から血中へ移出する際に作用すると考えられており、実際、骨髓腔のS1P濃度も血管のそれより低くなっている¹⁰⁾。

S1P受容体にはS1PR1~S1PR5の5種類が知られており、いずれも三量体Gタンパク質共役型受容体である。興味深いことに、S1Pは結合する受容体によってまったく異なる作用を発現することが知られている。例えば、S1PR1にS1Pが結合すると、Giタンパク質の活性化を介するシグナルが開始



■図2 破骨前駆細胞に発現する2種類のS1P受容体
S1PR1にS1Pが結合すると走化性(chemotaxis)が誘導される。一方、S1PR2へS1Pが結合すると、S1PR1とは異なるカスケードを介して、chemotaxisとは逆の“chemo-repulsion”をもたらす。
Ishii M, et al: J Exp Med (2010) 207: 2793-2798より改変。

され、最終的にはsmall Gタンパク質Racの活性化からアクチンフィラメントの再構築が起こり、走化性(chemotaxis)が誘導される。一方、S1PR2にS1Pが結合すると、三量体Gタンパク質のG_{12/13}αが活性化されRhoを活性化して、最終的にRac活性が低下し、chemotaxisとは逆の“chemo-repulsion”をもたらす(図2)。

次に筆者らは、破骨前駆細胞がS1PR1とS1PR2を発現していること、*in vitro*でS1Pに対して強いchemotaxisが惹起されることを見いだした。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イメージングを行った⁶⁾。

3. S1Pによる破骨前駆細胞の遊走と位置決め制御

CX₃CR1-EGFP⁺マウスの骨髓腔を生体二光子励起顕微鏡で観察すると、骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1-EGFP⁺細胞)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かなかつたが、S1PR1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、多くの細胞が骨髓腔から血管へと移行していく様子が観察された(図3、文献6のsupplementary videosを参照)。これにより、*in vivo*の骨組織内でも、破骨前駆細胞はたしかにS1PR1刺激に反応して遊走能が亢進することが証明された。

さらに筆者らは、この“S1P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

細胞特異的にS1PR1を欠損させたマウスの解析を行った。その結果、S1PR1を欠損した破骨前駆細胞は骨組織に留まりやすくなり、骨表面に接着する成熟破骨細胞の数が増加し、骨吸収が亢進して骨密度が低下することがわかった。以上のことから、S1PR1は破骨細胞が骨組織から離れる際に重要な働きをし、血中の高濃度S1Pに対するchemotaxisを媒介することで、破骨前駆細胞を骨組織から血中へと引き戻す働きを持つと推測された。

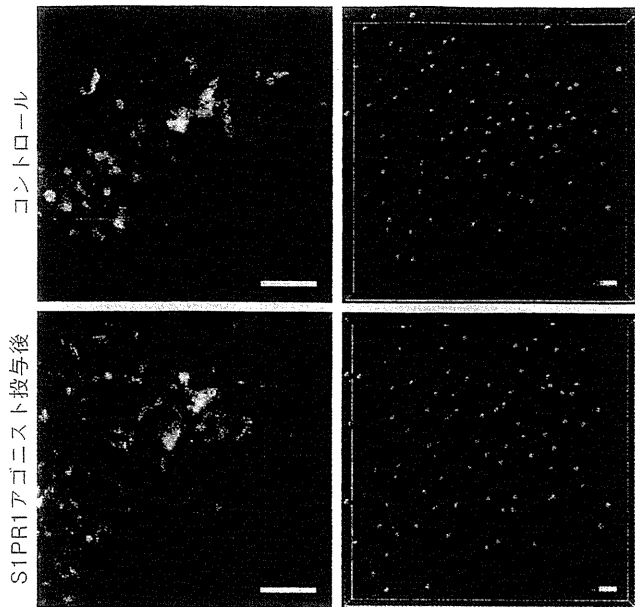
4. S1PR2による破骨前駆細胞のchemo-repulsion

実際の破骨前駆細胞の遊走現象はそれほど単純ではない。前述のように、破骨前駆細胞には、S1Pに対して強いchemotaxisを示すS1PR1のみならず、S1PR1とは逆の作用を示すS1PR2も発現している。そのため、破骨前駆細胞のS1Pに対するchemotaxisは単純な濃度依存的反応ではない。この相反する働きを持つ受容体が破骨前駆細胞に存在する意義について解明するために、*in vitro*での実験系にて、破骨前駆細胞のS1Pに対するchemotaxisを検討した⁷⁾。すると、S1Pが低濃度の場合には破骨前駆細胞の移動距離は濃度依存的に延長したが、中程度の濃度では初めは活発に移動するものの、途中で止まって戻るchemo-repulsionの現象を示した。なお、S1P高濃度下ではほとんど細胞の動きは見られなかった。

このような中程度の濃度における二相性の反応には、S1PR2が関与しているものと推測された。そこで、siRNA(small interfering RNA)を用いてS1PR2をノックダウンしたところ、破骨前駆細胞は高濃度S1P存在下でもchemotaxisを示すようになったことから、この反応にはS1PR2のchemo-repulsionが関与することが明らかとなった。また、生体二光子励起顕微鏡を用いた検討でも、S1PR2アンタゴニスト(JTE013)を投与すると、投与前と比較して単球系細胞の動きが大きくなり、血中に戻る細胞が増加する様子が観察された(図4、文献7のsupplementary videosを参照)。さらに、S1PR2ノックアウトマウスでは大腿骨の骨密度が増加する現象も確認された。

5. S1P受容体を介した破骨前駆細胞の遊走制御モデル

これらの結果から、破骨前駆細胞は相反する機能を示すS1PR1とS1PR2を有し、それらを介してその遊走が制御されていると考えられた。こうした現象の正確な機序は未解明



■図3 骨組織内の破骨前駆細胞の生体二光子励起イメージング

破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CX₃CR1-EGFP⁺) を緑色にラベルしたマウス骨髄腔の生体二光子励起イメージング。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 (左)。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。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)、S1PR1アゴニストを投与すると、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 (下部2パネル)。スケールバーは50 μm。
Ishii M, et al: Nature (2009) 458: 524-528より改変。

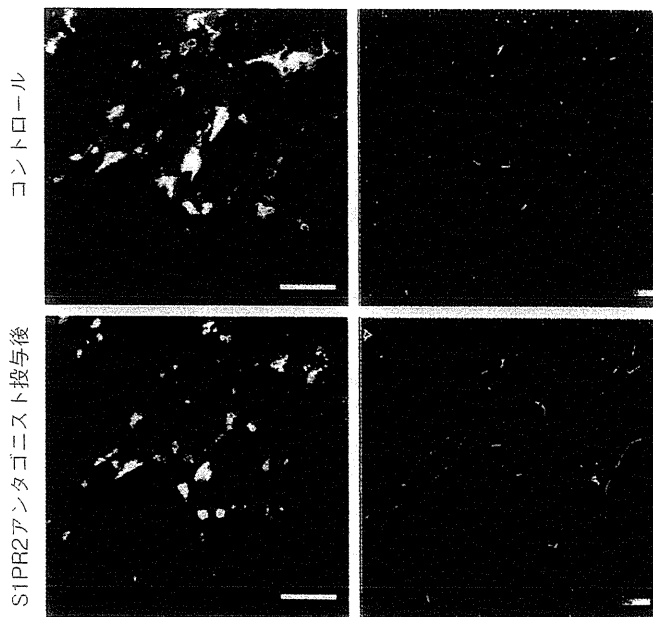
であるが、次のようなモデルが考えられる。すなわち、血中の破骨前駆細胞は何らかの機序でS1PR1の発現が抑制されてS1PR2が優勢になり、血中の高濃度S1Pに対するchemo-repulsionを起こして骨組織へと移行していく。そして、いったん骨組織に入り、周辺環境のS1P濃度が低下すると、S1PR1の発現が活性化して、血液中の高濃度S1Pにchemotaxisを示して一部の細胞が再び血管内へと戻る。この流出入のバランスの上に骨表面に存在する前駆細胞数が決められており、一定数がRANKL (receptor activator of NF-κB ligand) の刺激を受け、成熟破骨細胞へと分化する (図5)。

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。

III 今後の展開

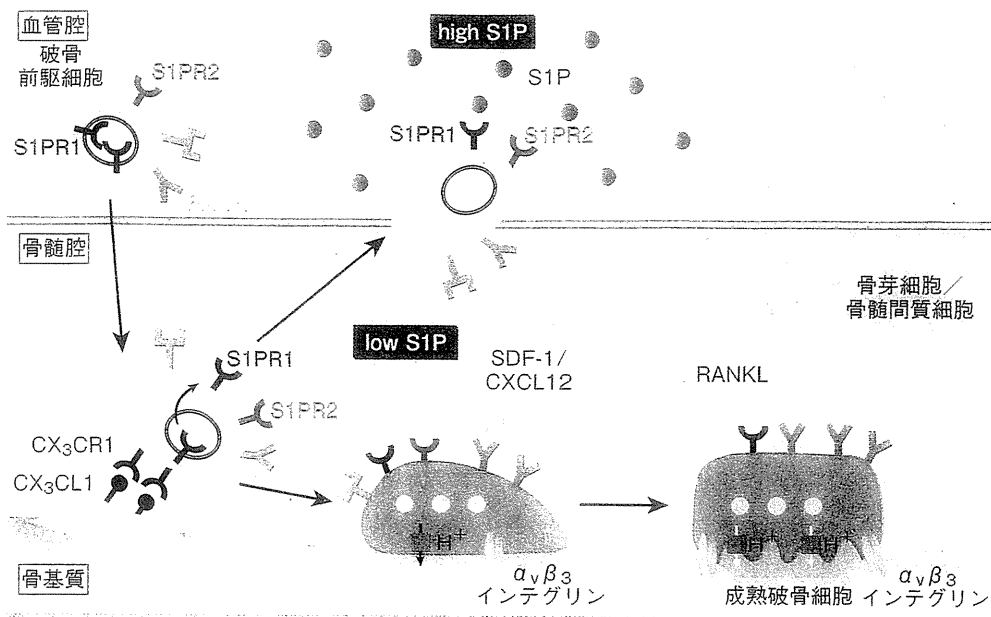
1. 破骨前駆細胞の遊走・位置決めを標的とした新しい創薬

骨代謝におけるこの新しい調節点は、骨吸収性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。そこで筆者らは、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスを用いて、S1P受容体アゴニストFTY720 (fingolimod; 現在、多発性硬化症の治療に有用な免疫抑制剤) の作用を検討した。その結果、S1PR1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⁶⁾。さらに、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスへのS1PR2アンタゴニストの投与でも、卵巣摘出による骨密度の減少を抑制することができた⁷⁾。これらの結果は、S1Pによる破骨前駆細胞の遊走制御が骨粗鬆症の治療標的としても有望なものであることを示している。破骨前駆細胞におけるS1P受容体を標的とした治療薬は、ビスホスホネート製剤など成熟



■図4 S1PR2による破骨前駆細胞のchemo-repulsion

破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CX₃CR1-EGFP⁺) を緑色にラベルしたマウス骨髄腔の生体二光子励起イメージング。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 (左)。また、各細胞の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)、S1PR2アンタゴニストを投与すると、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 (下部2パネル)。スケールバーは50 μm。
Ishii M, et al: J Exp Med (2010) 207: 2793-2798より改変。



■図5 S1P受容体を介した破骨前駆細胞の遊走制御モデル

単球系破骨前駆細胞の遊走と位置決めは、血中に存在するS1Pと細胞自身に発現するS1P受容体の相互作用によって調節されており、血管から骨内部に流入した破骨前駆細胞の一部は、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。この流出入のバランスの上で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破骨細胞へと分化する。

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おり、今後の臨床応用が期待される。

2. 生体二光子励起骨組織イメージングによる成熟破骨細胞の可視化の挑戦

破骨前駆細胞が血中から骨表面に移動してくる過程を可視化できるようになったが、筆者らは次に、破骨前駆細胞が骨表面に到達し、成熟した後の骨吸収の過程も観察できるようになってきている。従来の研究では、組織を切り出して骨表面の破骨細胞数を評価するしかなかったが、今後は、生体内で成熟破骨細胞を可視化することにより、骨表面での骨吸収のメカニズムを動的に解明できるのではないかと考えている。

おわりに

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。筆者らが開発した二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の生体二光子励起イメージングの方法論は、骨組

織内の様々な細胞の生きた動きをリアルタイムで観察することができるため、免疫学・生命科学において強力な手段となることが強く期待される。

PROFILE 菊田 順一

- 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 : j-kikuta@ifrec.osaka-u.ac.jp
- 趣味：野球観戦

2006年大阪大学医学部医学科卒業、国立病院機構大阪南医療センターにて初期研修、リウマチ科後期研修を経て、2009年より大阪大学大学院医学系研究科博士課程在籍。

PROFILE 川村 俊輔

- 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 大学院生
- E-mail : gosby@ifrec.osaka-u.ac.jp

PROFILE 石井 優

- 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 准教授
- E-mail : mishii@ifrec.osaka-u.ac.jp

文献

- 1) Denk W, et al: Science (1990) 248: 73-76
- 2) Denk W, et al: Neuron (1997) 18: 351-357
- 3) 島津 裕ら: 実験医学 (2010) 28: 2147-2153
- 4) Germain RN, et al: Immunol Rev (2008) 221: 163-181
- 5) Klauschen F, et al: Nat Protoc (2009) 4: 1305-1311
- 6) Ishii M, et al: Nature (2009) 458: 524-528
- 7) Ishii M, et al: J Exp Med (2010) 207: 2793-2798
- 8) Rosen H, et al: Nat Rev Immunol (2005) 5: 560-570
- 9) Cyster JG: Annu Rev Immunol (2005) 23: 127-159
- 10) Maeda Y, et al: Int Immunol (2010) 22: 515-525

骨組織の *in vivo* イメージングによる 破骨細胞動態の解析

菊田 順一^{*1)} 川村 俊輔^{*2)} 石井 優^{*3)}

破骨細胞は、通常の骨の代謝維持（リモデリング）のみならず、骨粗鬆症や関節リウマチ、癌の骨転移などの骨吸収性疾患においても重要な役割を担っている。しかし、絶えず変化する骨内部環境において、単球系の破骨前駆細胞がいかにか骨表面に到達するか、その遊走がどのように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駆使することで、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、破骨前駆細胞の遊走・位置決めが、脂質メディエーターの一種であるS1P（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明らかにした。

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その応用について概説する。

Encounter of cancer cells with bone.

In vivo imaging of osteoclasts and their precursors in intact bone tissues.

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

Junichi Kikuta, Shunsuke Kawamura, Masaru Ishii

Osteoclasts play critical roles not only in normal bone homeostasis ('remodeling'), but also in the pathogenesis of bone destructive disorders such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, and bone metastasis. However, it has not been known how osteoclast precursor monocytes migrate into the bone surface and what controls their migratory behaviors. To reveal these systems, we have recently established a new system for visualizing intact bone tissues and bone marrow cavities in live animals by using an advanced imaging technique with intravital two-photon microscopy. By means of the system we have revealed that sphingosine-1-phosphate (S1P), a lipid mediator, dynamically regulates migration and localization of osteoclasts and their precursors *in vivo*. Here we show the latest data and the detailed methodology of intravital imaging of bone tissues, and also discuss its further application.

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

¹⁾ (きくた・じゅんいち) ²⁾ (かわむら・しゅんすけ) ³⁾ (いしい・まさる)

はじめに

近年、癌の骨転移の研究が急速に発展し、骨転移巣における癌細胞と骨髄細胞の相互作用が明らかになりつつある。しかし、骨組織は硬い石灰質に囲まれているため、これまでなされた研究の多くは固定骨組織を用いた静的な解析であった。

我々は最近、組織深部の観察が可能な「二光子励起顕微鏡」を駆使し、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方法を確立することに成功した。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造血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、破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、破骨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 [S1P]）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する。

骨組織の生体二光子励起イメージング

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

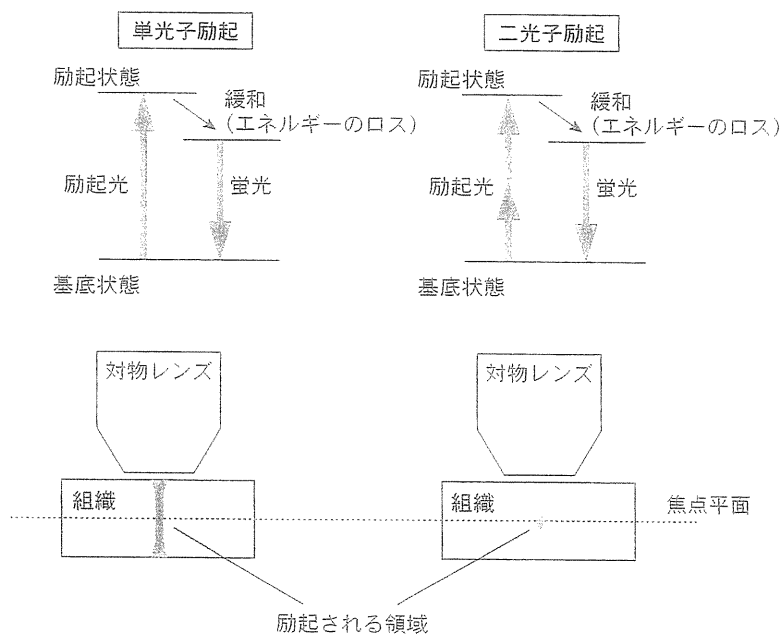


図1 二光子励起顕微鏡の原理

通常の蛍光観察（一光子励起）では、1個の蛍光分子を1個の光子で励起するが、二光子励起では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。（筆者作成）

S1P : sphingosine-1-phosphate (スフィンゴシン-1-リン酸)

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、焦点平面のみでしか二光子励起が起こらない。(図1)。このため、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はきわめて小さく抑えることが出来る。(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(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。(高い組織透過性)。

以上の特長から、「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^{11,12)}。

生組織を用いた二光子励起イメージングには、臓器や組織を摘出して、培養液中で生かしたまま観察する手法(tissue-explants two-photon imaging)と、個体を生かしたまま臓器や組織を露出させて観察する手法(intravital two-photon imaging)の2種類がある。後者は、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することができるため、極めて情報量が多い。

我々は特に、骨組織内のintravital two-photon imagingに取り組んだ³¹⁻³⁷⁾。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、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。

破骨前駆細胞遊走因子としてのS1P

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。これまで、破骨前駆細胞から成熟破骨細胞への分化の過程に関与する多数の分子やシグナルは多数解明されているが、血中から骨表面への破骨前駆細胞の遊走・位置決めメカニズム、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、全く明らかにされてこなかった。我々は、これらの謎を解明するために、まず、種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨前駆細胞を遊走させるかどうか、*in vitro*の実験系でスクリーニングを行った。その結果、破骨前駆細胞の遊走を刺激するいくつかの候補分子を得ていたが、中でも我々が注目したのは、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スフィンゴシン1リン酸(S1P)である^{31,39)}。

S1Pは主に血中の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、組織中にはS1Pを分解する酵素(S1Pリアーゼ、S1Pホスファターゼなど)が広く発現しており、組織に入ったS1Pはすぐに分解されるため、組織中でのS1P濃度は低い。このため、S1Pに対する走化性は、基本的には細胞が組織から血中へ移出する際に作用すると考えられている。また、S1P受容体にはS1PR1~S1PR5までいずれも三量体G蛋白質共役型の5種類の受容体が存在するが、興味深いことに、S1Pは結合する受容体によって、全く異なる作用を発現することが知られている。例えば、S1PR1にS1Pが結合すると、chemotaxis(走化性)が誘導されるが、S1PR2にS1Pが結合すると、chemotaxisとは逆のchemorepulsion(反発)をもたらす。

生体二光子励起イメージングによる破骨前駆細胞の動態解明

次に我々は、破骨前駆細胞がS1PR1とS1PR2

を発現していること、*in vitro* で SIP に対して強い chemotaxis が惹起されることを見出した。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⁶⁾。

CX₃CR1-EGFP⁺マウスの骨髓腔を生体二光子励起顕微鏡で観察すると、骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CX₃CR1-EGFP⁺細胞) 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、SIPR1 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、多くの細胞が骨髓腔から血管へと移行していく様子が観察された。(図2; 文献5の supplementary videos を参照)。これにより、*in vivo* の骨組織内でも、破骨前駆細胞は確かに SIPR1 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、破骨前駆細胞を含む単球系細胞に特異的に SIPR1 を欠損させたマウスの解析を行った。その結果、SIPR1 を欠損した破骨前駆細胞は骨組織に留まりやすくなり、骨表面に接着する成熟破骨細胞の数が増加し、骨吸収が亢進して骨密度が低下することが分かった。

以上のことから、SIPR1 は破骨細胞が骨組織から離れる際に重要な働きをし、血中の高濃度 SIP に対する chemotaxis を媒介することで、破骨前駆細胞を骨組織から血中へと引き戻す働きを持つと推測された。

SIPR2 による破骨前駆細胞の chemorepulsion

破骨前駆細胞には、SIP に対して強い chemotaxis を示す SIPR1 のみならず、SIPR1 とは逆の作用を示す SIPR2 も発現している。この相反する働きをもつ受容体が破骨前駆細胞に存在する生理的意義について解明するために、*in vitro* の実験系にて、破骨前駆細胞の SIP に対する chemotaxis を検討した⁷⁾。すると、SIP が低濃度の場合には破骨前駆細胞の移動距離は濃度依存的に延長したが、中程度の濃度では初めは活発に移動するものの、途中で止まって戻る chemorepulsion の現象を示した。なお、SIP 高濃度下では、ほとんど細胞の動きは見られなかった。

このような中程度の濃度における二相性の反応には、SIPR2 が関与しているものと推測された。そこで、si RNA (small interfering RNA) を用い

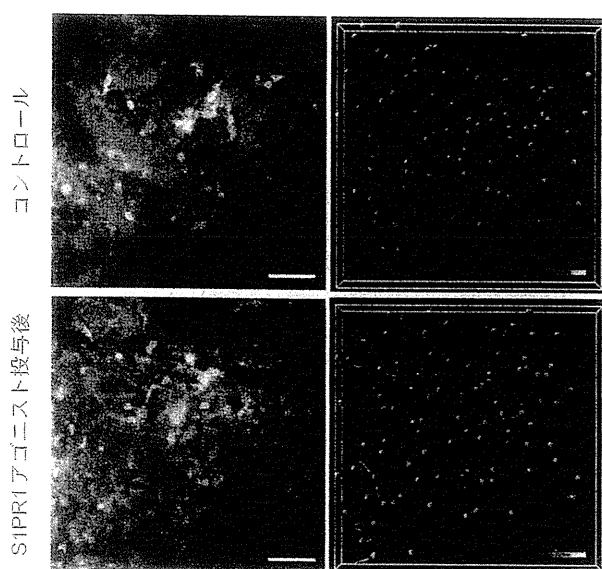


図2 骨組織内での破骨前駆細胞の生体二光子励起イメージング

破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CX₃CR1-EGFP⁺) を緑色にラベルしたマウスの骨髓腔の生体二光子励起イメージング。骨髓腔内の血管構造は、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 (左)。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。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)、SIPR1 アゴニストを投与すると、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。(下部2パネル) スケールバー: 50 μm (カラーグラフィック3頁参照)

(文献5より一部改変)。

てS1PR2をノックダウンしたところ、破骨前駆細胞は高濃度S1P存在下でもchemotaxisを示すようになったことから、この反応にはS1PR2のchemorepulsionが関与することが明らかとなっ

た。また、生体二光子励起顕微鏡を用いた検討でも、S1PR2アンタゴニスト(JTE013)を投与すると、投与前に比較して単球系細胞の動きが大きくなり、血中に戻る細胞が増加する様子が観察さ

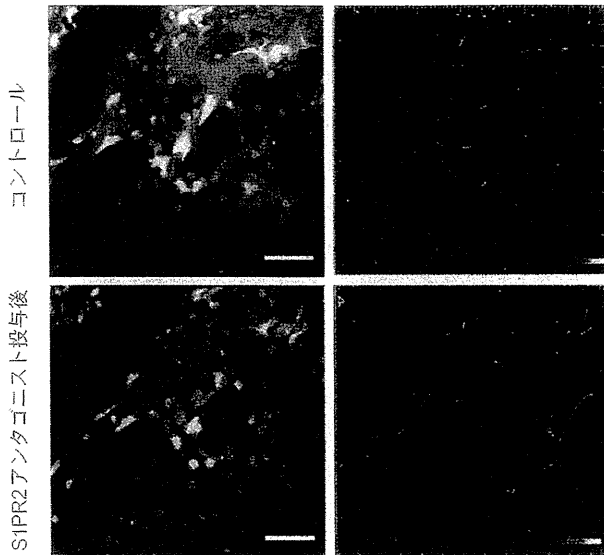


図3 S1PR2による破骨前駆細胞のchemorepulsion

破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1-EGFP⁺)を緑色にラベルしたマウスの骨髓腔の生体二光子励起イメージング。骨髓腔内の血管構造は、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(左)。また、各細胞の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)、S1PR2アンタゴニストを投与すると、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。(下部2パネル)
スケールバー：50μm
(カラーグラフィック3頁参照)

(文献7より一部改変)

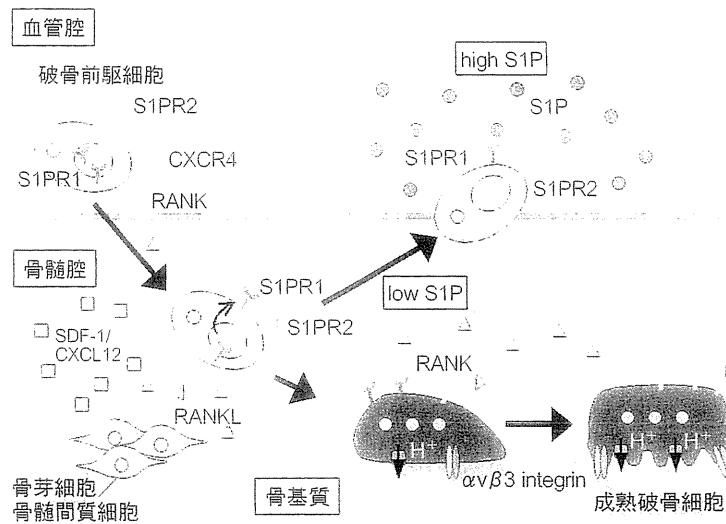


図4 S1P受容体を介した破骨前駆細胞の遊走制御モデル

単球系破骨前駆細胞の遊走と位置決めは、血中に存在するS1P(スフィンゴシン1リン酸)と、細胞自身に発現するS1P受容体の相互作用によって調節されており、血管から骨内部に流入した破骨前駆細胞の一部は、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。この流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、成熟破骨細胞へと分化する。
(文献5より改変)

れた (図3; 文献7の supplementary videos を参照)。さらに S1PR2 ノックアウトマウスでは、大腿骨の骨密度が増加することが確認された。

S1P 受容体を介した破骨前駆細胞の遊走制御モデル

以上の結果より、破骨前駆細胞の遊走制御機構として以下のようなモデルが提唱される。すなわち、血中にある破骨前駆細胞は何らかの機序で S1PR2 の機能が S1PR1 のそれよりも優勢になり、血液中の高濃度 S1P に対する chemorepulsion を起こして骨組織へと移行していく。そして、いったん骨組織に入り、周辺環境の S1P 濃度が低下すると、S1PR1 の機能が S1PR2 のそれよりも優勢になり、血液中の高濃度 S1P に chemotaxis を示して一部の細胞が再び血管内へと戻る。この流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 の刺激を受け成熟破骨細胞へと分化する。(図4)⁵⁾。

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、我々の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。

破骨前駆細胞の遊走・位置決めを標的とした新しい創薬

骨代謝におけるこの新しい調節点は、骨吸収性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。そこで我々は、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスを用いて、S1P 受容体アゴニスト FTY720 (fingolimod: 免疫抑制剤) の作用を検

討した。その結果、S1PR1 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⁶⁾。

さらに、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスへの S1PR2 アンタゴニストの投与でも、卵巣摘出による骨密度の減少を抑制することができた⁷⁾。これらの結果は、S1P による破骨前駆細胞の遊走制御が、骨粗鬆症の治療標的としても有望なものであることを示している。現在、骨粗鬆症や癌の骨転移の治療薬として、成熟破骨細胞の機能障害およびアポトーシスを誘導することで破骨細胞を減少させ、骨吸収を抑制するビスホスホネート製剤が挙げられるが、破骨前駆細胞における S1P 受容体を標的とした治療薬は、ビスホスホネート製剤とは異なった作用機序を持っており、今後の臨床応用が期待される。

おわりに

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、リンパ球を始めとして顆粒球・単球など多種多様な血液細胞の発生・機能分化にとって重要な部位であり、さらには骨転移性腫瘍のように、本来存在し得ない細胞が迷入して潜伏する場でもある。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メカニズム・癌幹細胞ニッチの各動態など、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組織の生体二光子励起イメージングの方法論は、骨組織内のさまざまな細胞の生きた動きをリアルタイムで観察することができるため、骨髄細胞や骨転移癌の動態や

RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

それらのニッチ環境の解明において強力な手段となることが強く期待される。

文 献

- 1) Denk W, Strickler JH, Webb WW : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science 248 (4951) : 73-76, 1990.
- 2) Denk W, Svoboda K : Photon upmanship : why multiphoton imaging is more than a gimmick. Neuron 18 (3) : 351-357, 1997.
- 3) 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 28 (13) : 2147-2153, 2010.
- 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 221 (1) : 163-181, 2008.
- 5) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al : Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. Nature 458 (7237) : 524-528, 2009.
- 6) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al : Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. Nat Protocol 4 (9) : 1305-1312, 2009.
- 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 207 (13) : 2793-2798, 2010.
- 8) Rosen H, Goetzl EJ : Sphingosine 1-phosphate and its receptors : an autocrine and paracrine network. Nat Rev Immunol 5 (7) : 560-570, 2005.
- 9) Cyster JG : Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. Annu Rev Immunol 23 : 127-159, 2005.



続発性骨粗鬆症

～ステロイド性骨粗鬆症と 関節リウマチに伴う骨粗鬆症～

東海大学医学部内科学系リウマチ内科学教授 鈴木 康夫 編

A5判 108頁 定価 3,360円 (本体 3,200円+税5%) 送料実費
ISBN978-4-7532-2337-4 C3047

- ◎年齢、性別を問わず、特定の原因により発症する続発性骨粗鬆症。それによる骨折は、大きな社会問題となっている。
- ◎本書では、その疫学や病態・予防治療に関して、特に新しい知見の多いステロイド性骨粗鬆症と関節リウマチに伴う骨粗鬆症の最新情報をまとめた。
- ◎有効な薬剤が開発されつつある現在、疾患に対する理解と治療にぜひ役立てていただきたい一冊。

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号) 00910-1-33353
〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索, ご注文などはインターネットホームページから便利です。



話 題

破骨細胞遊走の制御機構*

菊 田 順 一** 小 谷 真 奈 斗** 石 井 優**

Key Words : osteoclast, chemokine, lipid mediator, two-photon microscopy, biological imaging

はじめに

抗IL-6受容体抗体や抗TNF- α 阻害剤などの生物学的製剤の登場により、関節リウマチの治療は、痛み・腫れ・こわばりを軽減させる治療から、関節破壊を抑制し治癒を目指した治療へと大きく変わりつつある。しかし、リウマチの病因は、現在でも、完全には解明されておらず、骨破壊にかかわる破骨細胞の機能もまだ不明な点が多い。

硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部は、従来、生きたままでの観察がきわめて困難であると考えられていたが、われわれは最近、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可視化することに成功した。この方法を用いると、骨組織のリモデリングにかかわる破骨細胞や骨芽細胞、骨髄内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きた動きをリアルタイムで観察することができる。われわれは特に、破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、破骨細胞前駆細胞の遊走・接着が、脂質メディエーターの1種であるスフィンゴシン1リン酸(S1P)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について、実際の画像を紹介しながら概説する。

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。このため、二光子励起顕微鏡観察の特長として、以下があげられる¹⁾²⁾。

(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780~1,000nm)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。

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

* Mechanism of migration and localization of osteoclasts and their precursors.

** Junichi KIKUTA, M.D., Manato KOTANI & 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(☎565-0871 吹田市山田丘3-1); Laboratory of Biological Imaging, Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita 565-0871, JAPAN

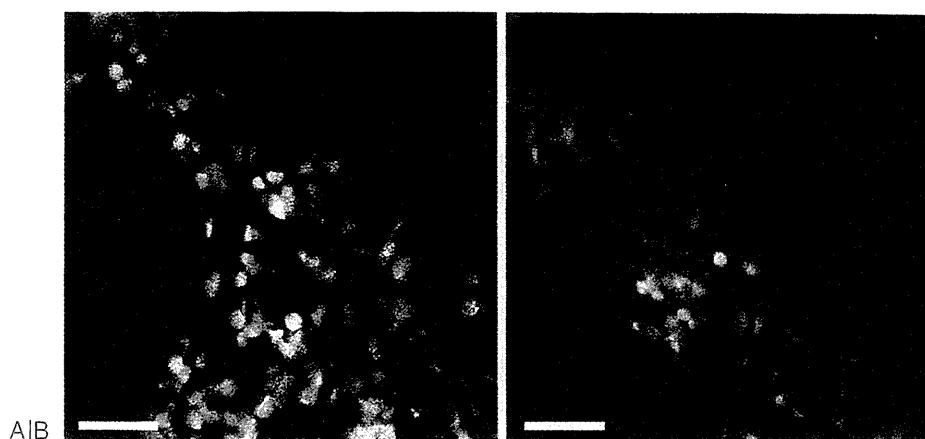


図1 骨組織(骨髄内)の生体二光子励起イメージング

顆粒球(LysM⁺; A)および単球(CX₃CR1⁺; B)にそれぞれGFPを発現させたマウスの骨髄腔内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研究室のHP<<http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp>>を参照)。スケールバー：30μm。

て、深部組織でz軸平面を変えて観察することができる(光学的スライス)。

2. “生体(=intravital)”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³⁾。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、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^{4)~7)}。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。

われわれは特に骨髄腔内の“intravital” imagingに取り組んだ^{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(図1)。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、われわれは骨の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。

生体二光子骨組織イメージング によって明らかとなった、 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

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。これまでの研究成果により、破骨前駆細胞は、血管内から骨表面へと遊走し、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-κB ligand)の刺激によって互いに融合・多核化し、成熟破骨細胞となって骨吸収を行うということは広く知られている。しかし、「破骨細胞(およびその前駆細胞)はどのようにして骨表面へ到達するのか」、「どのような分子機構が破骨細胞の遊走・位置決めを調節しているのか」、「いったん骨表面に達した破骨

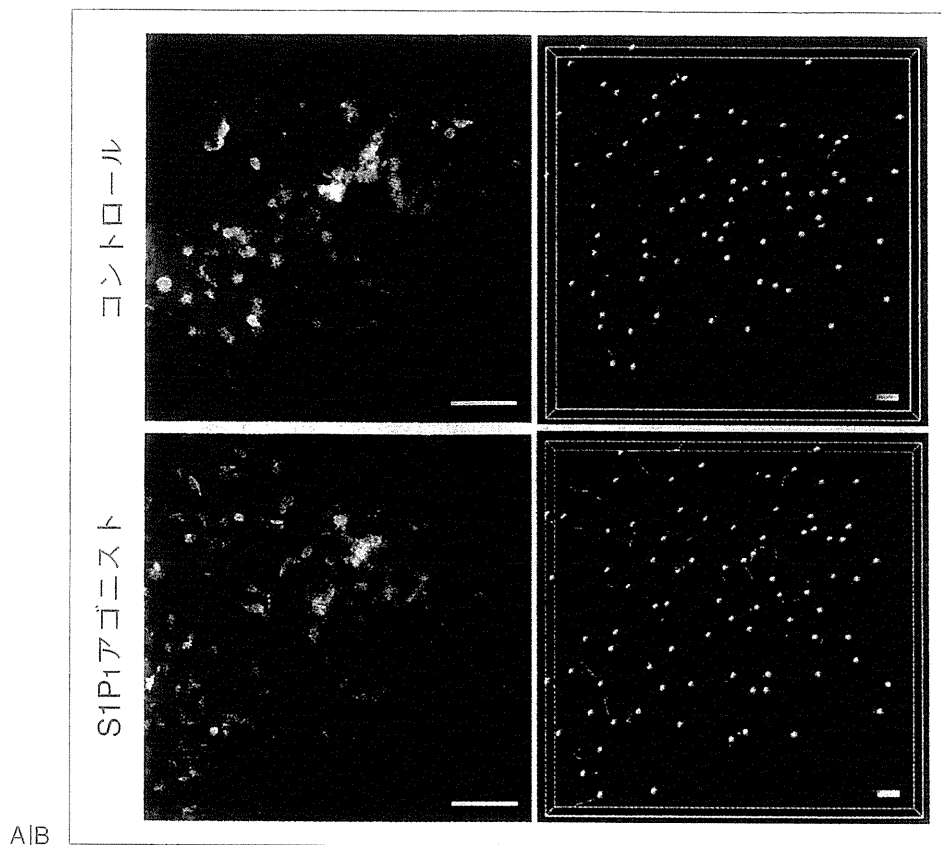


図2 骨組織内での破骨細胞およびその前駆細胞の生体二光子励起イメージング
破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1-EGFP⁺)を緑色にラベルして、Texas Red
をconjugateした高分子デキストランを静脈注射して血管構造を赤色でラベルして、
それぞれ可視可している(A)。また、各細胞を球体に置き換え、軌道を描いて速
度を計算している(B)。定常状態では、単球系細胞はほとんど静止しているの
に対し(上部2パネル)、S1P₁アゴニストであるSEW2871を投与すると、急速に細胞
の運動能が亢進し、血中へ還流していく様子が観察される(下部2パネル)。スケ
ールバー：50 μ m
(文献¹⁰⁾より引用、一部改変)

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。

われわれは、これらの謎を解明するために、
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、破骨前駆細胞の遊走を刺激するいくつ
かの候補分子を得ていたが、なかでもわれわれ
が目にしたのは、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¹³⁾¹⁴⁾。
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。

次に、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でもみられるかどう
かを確認するために、二光子励起顕微鏡を用い
て、生きた骨組織内部の生体観察を行った⁹⁾¹⁰⁾。

骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系
細胞(CX₃CR1-EGFP⁺細胞)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
ななかったが、S1P₁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2;参考文献¹⁰⁾の

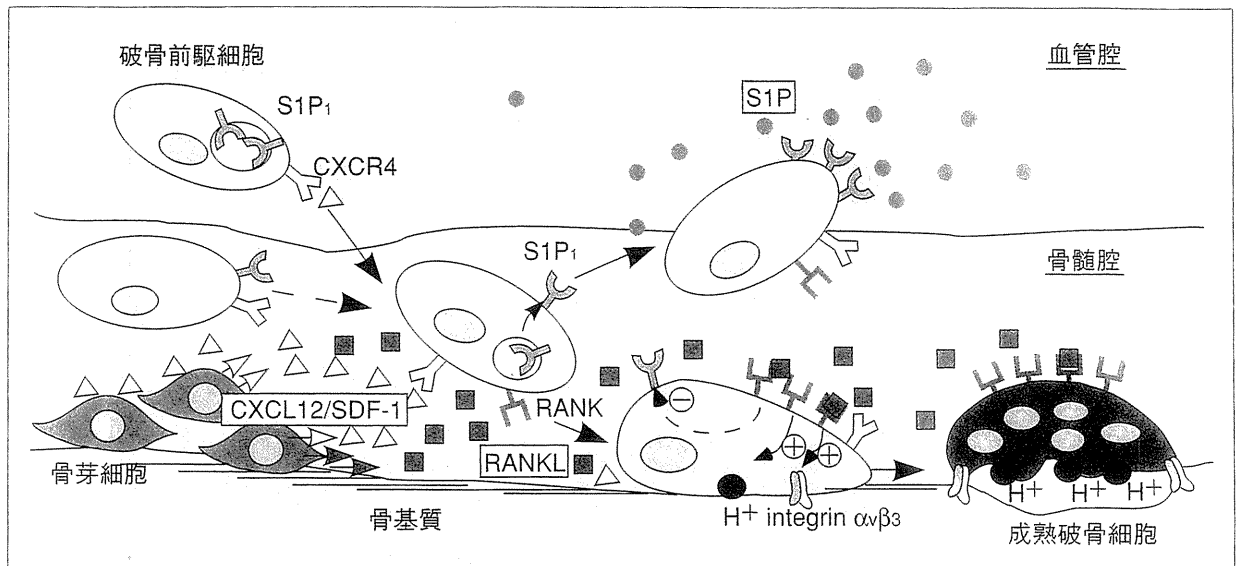


図3 破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構

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の刺激を受けて成熟破骨細胞へと分化する。

supplementary videos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S1P₁刺激に反応して遊走能が充進することが証明された。

「S1Pに対する破骨前駆細胞の遊走」の生理的意義の解明

さらにわれわれは、破骨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。

破骨前駆細胞の遊走・位置決めを標的とした新しいリウマチの治療薬

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、骨粗鬆症と関節炎を発症させたマウスを用いて、S1P受容体に対するアゴニストFTY720(免疫抑制剤)の効果を検討した¹⁵⁾(図4)。

骨粗鬆症のモデルマウス(卵巣摘出マウス)にタイプIIコラーゲン型の抗体カクテルとリポ多糖(LPS)を注入し、コラーゲン抗体誘導関節炎を発症させた¹⁶⁾。これらのマウスに、プレドニゾン(PSL)(0.5mg/kg/day)、FTY720(1 mg/kg/day)、vehicle(コントロール群)をそれぞれ投与した。コントロール群では、関節炎の改善がみられなかったが、FTY720投与群は、PSL投与群と同程度、関節炎の炎症が抑制された。さらに、マウスの骨密度を解析したところ、PSL投与群は、コントロール群同様に卵巣摘出による骨密度の低下を認めたが、FTY720投与群では、骨密度の減少が有意に抑えられた。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

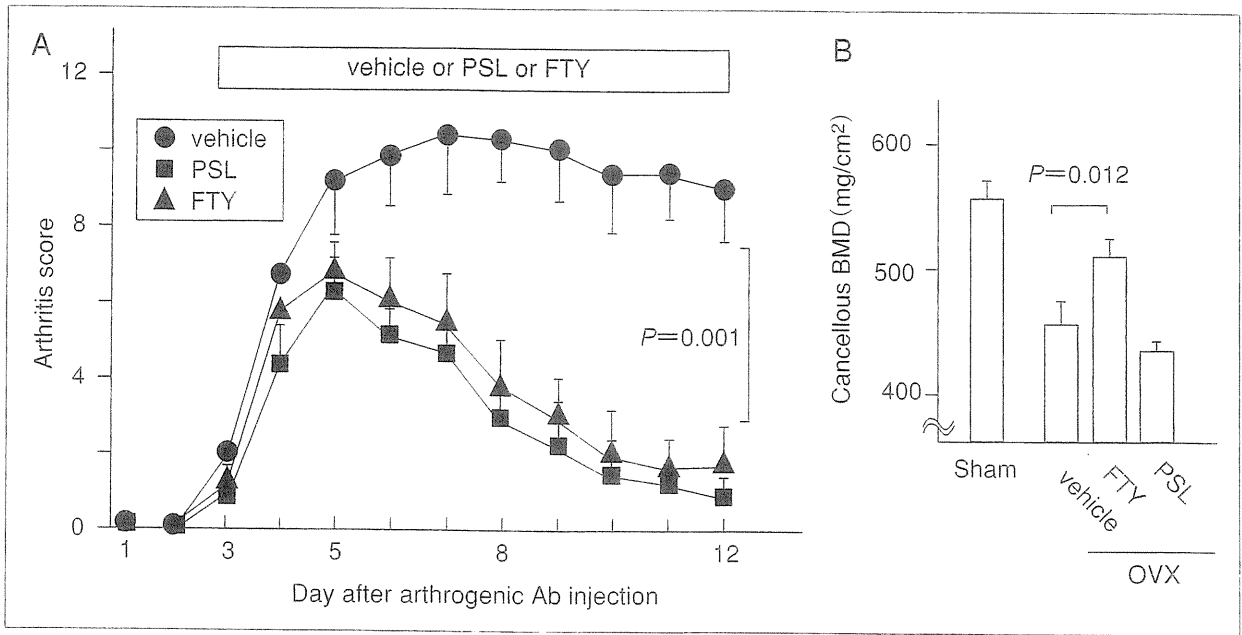


図4 関節炎と骨粗鬆症に対するFTY720の治療効果の検討

卵巣摘出したマウスに、タイプII型コラーゲンの抗体カクテルとリポ多糖(LPS)を投与し、関節炎を発症させた。3日後より、プレドニゾロン(0.5mg/kg/day)、FTY720(1 mg/kg/day)、vehicleを毎日投与した。関節炎の程度をスコア化し、経過を示す(A)。14日後、マウス大腿骨の骨密度をμCTにおいて解析した(B)。

(文献¹²⁾より引用)

面からひ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。

以上の結果は、S1Pによる破骨前駆細胞の遊走制御が、骨粗鬆症と関節炎の治療標的として有望なものであることを示している。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り、重大な合併症の一つとして骨粗鬆症があげられる。S1P受容体をターゲットにした治療薬は、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おり、さらには骨粗鬆症と関節リウマチの双方を同時に治療できる可能性もあわせ持つため、今後の臨床応用が期待される。

最後に

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。一方、関節リウマチの病態には、T細胞、樹状細胞など多くの免疫系細胞が関与していることが報告されている。

そのため、骨組織・骨髄腔内での各細胞の挙動・位置決めとその分化制御を理解することは、大変重要である。われわれが開発した二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の生体二光子励起イメージングの方法論は、骨組織内のさまざまな細胞の生きた動きをリアルタイムで観察することができるため、破骨細胞の機能解明や関節リウマチの病態解明を大きく前進させるだけでなく、免疫学・生命科学において強力な手段となることが強く期待される。

文 献

- 1) Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science 1990 ; 248 : 73.
- 2) Denk W, Svoboda K. Photon upmanship : why multiphoton imaging is more than a gimmick. Neuron 1997 ; 18 : 351.
- 3) Huang AY, Qi H, Germain RN. Illuminating the landscape of in vivo immunity : insights from dynamic in situ imaging of secondary lymphoid tissues. Immunity 2004 ; 21 : 331.
- 4) Stoll S, Delon J, Brotz TM, et al. Dynamic imaging

- of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 2002 ; 296 : 1873.
- 5) 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.
- 6) Bousso P, Bhakta NR, Lewis RS, et al. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 2002 ; 296 : 18676.
- 7) von Andrian UH. Immunology. T cell activation in six dimensions. *Science* 2002 ; 296 : 1815.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009 ; 458 : 524.
- 11) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al. Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nat Protocol* 2009 ; 4 : 1305.
- 12) Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, et al. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med* In press 2011.
- 13) Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors : an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 2005 ; 5 : 560.
- 14) Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005 ; 23 : 127.
- 15) Kikuta J, Iwai K, Saeki Y, et al. S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis. *Rheumatol Int.* In press 2011.
- 16) Terato K, Hasty KA, Reife RA, et al. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol* 1992 ; 148 : 2103.

* * *

5. 二光子励起顕微鏡による骨髄・骨転移性癌の生体イメージング

*In vivo imaging of bone marrow and bone metastasis
by using intravital two-photon microscopy*

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

小谷真奈斗・菊田 順一・大畑 絵美・石井 優

Manato Kotani

Junichi Kikuta

Emi Ohata

Masaru Ishii

(招へい研究者)

(主任研究者)

Summary

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。われわれは最近、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ライブイメージングの方法論や応用について概説する。

Key Words

破骨細胞、ケモカイン、脂質メディエーター、ケモタキシス(走化性)、イメージング

はじめに

近年の二光子励起顕微鏡技術の進歩、画像解析ソフトの改良、画期的なラベリング方法の発達により、サンプルをより深部まで観察することができるようになった。さらに、生体内の三次元環境に時間軸を入れることで、細胞や組織の挙動を知ることにもできるようになった。これらの定量的な生体イメージングから得られる結果は有用な情報を数多くもたらしている。

われわれは最近、二光子励起顕微鏡を駆使してマウスを生かしたままで骨組織内を観察するイメージング方法を確立させた¹⁾。この方法を用いると、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、そのほか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。われわれは特に、骨を破壊・吸収する働きを持つ破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、

◆メモランダム◆

二光子励起顕微鏡 (two-photon microscopy)

二光子励起顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡観察で用いる励起光の半分のエネギー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が起こり得る(高いz軸分解能)。また、通常の2倍の波長の近赤外光を用いるため、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)。このため、二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。