

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22113007

研究課題名(和文)骨の生体イメージングによる骨髄細胞・骨転移癌の遊走・分化やニッチ環境の可視化

研究課題名(英文) Intravital imaging of bone cell physiology and bone-resident cancers

研究代表者

石井 優 (Ishii, Masaru)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10324758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 84,500,000円

研究成果の概要(和文)：動物の本質は「動き」にある。生体内においても、様々な細胞が適切な場所に適切なタイミングで移動・遊走している。近年、低侵襲で深部組織の観察に適した2光子励起顕微鏡を用いて、生体をそのまま観察することで、細胞動態を高解像度で解析することが可能となってきた。本研究者は特に、従来困難であるとされていた、生きた骨組織・骨髄腔の内部を高い時空間分解能で観察することに世界に先駆けて成功し、古い骨を吸収して骨代謝を調節する破骨細胞のin vivoでの活性制御機構を解明してきた。本研究では、これら生体イメージング技術を生かした骨・免疫動態に加えて、同じく“動く”システムであるがん細胞の動態学研究を遂行した。

研究成果の概要(英文)：During the last decade, multi-photon fluorescent microscopy has launched a new era. By using this advanced imaging technique in this study we have established a new system for visualizing in situ behavior of a diversity of living cells within intact tissues and organs. Among them, we succeeded in visualizing the various dynamic phenomena within bones, a mysterious organ where various kinds of hematopoietic and immune cells are produced and functioning although poorly analyzed by conventional methodology such as histological analyses with decalcified bones. Especially we have focused on the behavior of osteoclast, a kind of specialized macrophage contributing to physiological bone remodeling as well as to bone destruction in cancer metastasis. In this study we have revealed novel mechanisms controlling migration and function of different bone cells in situ and also propose the further applications of this novel methodology in bone and cancer biology.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞動態 骨髄 破骨細胞 がん細胞 イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄腔で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による骨代謝の制御点であるばかりでなく、多様な血液系細胞の発生・機能分化の主要な場であり、血液幹細胞が多分化能を維持して存在する場である。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)の実体的解析は、現在の生命科学において大きな研究課題と言える。また癌の骨転移では本来存在しえないはずの細胞(癌細胞)が骨組織に到達し、巧妙に彼らのニッチへ移動し抗癌剤の攻撃から逃れて再発の機会を窺う。このように、骨髄腔には内在・外来に関わらず、多種多様な細胞がそれぞれの居場所を見つけて生息していることが分かる。しかしながら、硬質の骨組織に囲まれた骨髄腔は、生きたままでの観察が極めて困難であり、これまで主には固定骨組織標本を用いた静的な解析が主であり、実際の生きた骨髄内でこれらの細胞がいかにして位置決めを行うか、またそこでどのような分化・機能制御の指令を受けるのか、については解明されるべき課題が数多く残されていた。本代表研究者は近年、2光子励起顕微鏡を駆使して実験動物を生かしたままの状態の、完全な *in vivo* の状態で骨組織をイメージングすることに成功し、これを用いて生体骨内での破骨細胞動態・機能の解析に世界で初めて成功した(Ishii et al., Nature, 2009)。本研究ではこの独自の方法論を活かして、単球や破骨細胞などの骨髄細胞の機能・分化とそのニッチ環境と、癌の骨転移メカニズム・癌細胞ニッチの各動態について、実体的かつ統合的な解析を行うことを目的としていた。

### 2. 研究の目的

(1) 単球や破骨細胞などの骨髄細胞の機能・分化とそのニッチ環境: 骨髄内で分化・成熟する単球・マクロファージ、およびその特殊分化形である破骨細胞の遊走(ニッチへの位置決め)・その場での分化・機能の *in vivo* での制御、について、生体骨イメージング系を用いて解明した。

(2) 癌の骨転移メカニズム・癌細胞ニッチの各動態: 高転移性がん細胞株や血液系悪性腫瘍を蛍光標識し、これらの骨髄内ニッチ環境、およびその場での周囲環境とのクロストークについて実体的に解析した。

### 3. 研究の方法

(1) 単球や破骨細胞などの骨髄細胞の機能・分化とそのニッチ環境の解析

単球(前駆細胞)と成熟破骨細胞を異なった蛍光色素で標識し、骨髄内での *in vivo* での分化過程の可視化する。そのため骨芽細胞を青色で可視化する Col1-EGFP マウスの作成する。また本研究者はすでに前駆細胞・破骨細胞を緑色と赤色(CX<sub>3</sub>CR1-EGFP または

CSF1R-EGFP・TRAP-tdTomato)で可視化するリポーターマウスを作成しており、これらリポーターを活用し、破骨・骨芽による骨リモデリング過程における各細胞の動態について総合的に明らかにした。

(2) 癌の骨転移メカニズム・癌細胞ニッチの各動態解析

蛍光標識した bcr-abl 発症白血病細胞を骨髄腔に定着させる、もしくは白血病細胞株を蛍光標識し移植する系を用いて白血病細胞の骨髄内動態可視化系を確立した。さらに癌細胞のニッチの解析を行った。具体的には、骨芽細胞のリポーターマウス(Col1-EGFP)や、骨髄ストロマ細胞のリポーターマウス(CXCL12-EGFP: 京都大学再生研・長澤教授との共同研究)を用いることで、腫瘍細胞と骨芽・ストロマとの相互作用について解析する。さらに、腫瘍細胞に特定抗原(OVA ペプチド)を発現させた株を作成し、これと OVA 特異的 T 細胞受容体をもった OT-I CD8 細胞を用いて、ニッチ内での抗腫瘍免疫について解析を行う。ニッチ内では免疫を逃れる immune privilege と呼ばれる状態にあると言われるが、本解析によってこの実体を明らかにしてきた。

### 4. 研究成果

(1) 2光子励起顕微鏡を用いた骨組織・骨髄腔の内部観察法を改変・発展させ、古い骨を吸収して骨代謝を調節する破骨細胞の *in vivo* での動態制御機構について統合的な解析を行った。結果、破骨前駆細胞は S1P に対して相反する作用を示す2つの受容体を発現し、これらをアクセルとブレーキとしてうまく使い分けることにより、巧妙に骨組織と血管内を行き来していることを明らかにした(J Exp Med, 2010)。さらに血管内を S1P 濃度が高い状態に保つための S1P トランスポーター spns2 の機能を解明し、この欠損により種々の免疫細胞の遊走が大きく変化することを明らかにした。

(2) 本イメージング法をさらに改良し、骨の表面部位を特異的に可視化する系を確立し、古い骨を吸収して骨代謝を調節する破骨細胞の *in vivo* での活性制御機構をリアルタイムで解析することに成功した。この解析により、骨表面で実際に骨を溶かす破骨細胞の機能を観察することが可能となり、これまでの細胞遊走や細胞間相互作用に加えて、骨イメージングでの解析できる現象が大きく広がった。さらに共同研究により、骨表面の局所での微小な骨破壊(酸分泌)を可視化する化学蛍光プローブを開発し、これにより機能状態によって破骨細胞を分類することが可能になった。また破骨細胞と骨芽細胞の相互作用の可視化も可能となり、骨リモデリングにおける破骨細胞・骨芽細胞の機能解析を可能とした。

(3) 破骨細胞の網羅的なメタボローム解析を行い、破骨細胞分化に伴ってメチオニンの代

謝産物である S-アデノシルメチオニン(SAM)が上昇することを見出した。さらに破骨細胞の好氣的代謝を介して、SAM の産生が高まることが明らかとなった。続いて SAM の標的分子の同定を試み、Dnmt3a を同定した。Dnmt3a コンディショナルノックアウトマウスでは骨細胞の数と骨吸収が減少し、骨量が著しく増加することが分かった。詳細な解析を進めた結果、Dnmt3a は破骨細胞分化の抑制にかかわる転写因子 Irf8 の発現を抑制することで、破骨細胞の分化促進にかかわること、Irf8 の発現抑制にかかわる DNA メチル化制御には Dnmt3a と SAM による協調的作用が重要であることが明らかとなった。

(4) 蛍光標識した bcr-abl 発症白血病細胞を骨髓腔に生着させイメージングにより観察することに成功した。また白血病細胞株を移植することでも観察に成功した。白血病細胞株は骨髓内血管周囲を運動しており、化学療法を施行すると細胞運動に変化が現れ骨髓内の分布も変化することが確認された。また OVA ペプチドを過剰発現した白血病細胞が OT-I CD8+ T 細胞により攻撃されアポトーシスを起こす様子を SCAT3.1 プロンプを用いて可視化し、抗腫瘍免疫の可視化系も樹立できた。

(5) 免疫不全マウスへのがん細胞移植 (ゼノグラフト) 系を用いて、蛍光標識したヒトがん細胞の動態解析を行った。Fucci を用い、ヒト高浸潤性大腸がん細胞株 HCT116 の浸潤・転移の生体多光子励起イメージング解析を進めた。その結果、同一のがん細胞であっても、分裂期 (S/G2/M) にある細胞の方が高浸潤性であることが分かり、これを利用して浸潤性の高い細胞のみを色分けして分取することに成功した。さらに microarray を用いて浸潤性のがん細胞に高く発現する分子を同定し、これが細胞周期依存性に細胞の動態・浸潤を制御していることを発見した。この新規分子がヒトの浸潤性上皮がんで一般に上昇していることを明らかにし、がんの進行を防ぐ新たな治療の可能性について明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 32 件)

Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. (2010) Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 207: 2793-2798. doi: 10.1084/jem.20101474. 査読あり

Kowada T, Kikuta J, Kubo A, Ishii M, Maeda H, Mizukami S, Kikuchi K. In vivo fluorescence imaging of

bone-resorbing osteoclasts. *J Am Chem Soc*, 33(44):17772-17776, 2011. doi: 10.1021/ja2064582. 査読あり

Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada GH, Nishiyama I, Mizukami S, Maiya N, Yasuda H, Kumanogoh A, Kikuchi K, Germain RN, Ishii M. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J Clin Invest*, 123(2):866-73, 2013. doi: 10.1172/JCI65054. 査読あり

Kikuta J, Kawamura S, Okiji F, Shirazaki M, Sakai S, Saito H, Ishii M (2013) S1P-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antibone-resorptive action of active vitamin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(17): 7009-13. (doi: 10.1073/pnas.121879911) 査読あり

Kagawa Y, Matsumoto S, Kamioka Y, Mimori M, Naito Y, Ishii T, Okuzaki D, Nishida N, Maeda S, Naito A, Kikuta J, Nishikawa K, Nishimura J, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Ishii H, Doki Y, Matsuda M, Kikuchi A, Mori M, Ishii M. (2013) Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion *in vivo*. *PLoS One*, 8(12): e83629. (doi: 10.1371/journal.pone.0083629) 査読あり

Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H, Ishii M. Dnmt3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosyl methionine-producing metabolic pathway. *Nat Med*, 21(3):281-7, 2015 (doi: 10.1038/nm.3774) 査読あり

[学会発表](計 209 件)

Masaru Ishii, Chemokine-mediated migration control of osteoclast precursors visualized by live bone imaging., 3rd International Conference of Osteoimmunology, Invited lecture, June 21st, 2010, Santorini/Greece.

Masaru Ishii, Dynamic live imaging of bone marrow cells by using intravital 2-photon microscopy., The 14th International Congress of Immunology, Lunchtime lecture, August 25th, 2010, Kobe/Osaka.

Masaru Ishii, Visualization of bone marrow cavity by using intravital

two-photon microscopy, 22nd Annual Meeting of the Korean Society of Molecular and Cellular Biology, Symposium, October 7th, 2010, Seoul/Korea.

Masaru Ishii, Imaging the Mechanisms of Osteoclast Migration, Differentiation and Function. 2010 Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Meet-the-Professor session, October 17th, 2010, Toronto/Canada.

Masaru Ishii, Roles of S1P in osteoclast regulation and bone remodeling, 2011 FASEB Summer Research Conference "Lysophospholipid Mediators in Health & Disease, August 18th, 2011, Il Ciocco, Barga (Lucca), Italy.

Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging of bone cell biology, immunology and more. CSB Science Talk, MGH Center for Systems Biology, November 3rd, 2011, Boston, MA, USA

Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging of bone cell dynamics, immune systems and cancers. Special Lecture, Harvard School of Dental Medicine, November 4th, 2011, Boston, MA, USA

Masaru Ishii, Roles of S1P in osteoclast regulation and bone physiology. Gordon Research Conferences "Glycolipid & Sphingolipid Biology", April 24, 2012, Il Ciocco (Barga), Italy

Masaru Ishii, From cartoon to real biology: intravital multiphoton imaging of cellular dynamics in bone resorption, inflammation and cancers., The second POSTECH International Symposium on Bioimaging, Pohang/Korea, November 1st 2012.

Masaru Ishii, Intravital Multiphoton Fluorescent Imaging Revealing Cellular Dynamics in Bone Remodeling, Inflammation and Cancer Invasion. Plenary Lecture, 10th Annual Scientific Meeting of Korean Society of Molecular Imaging, Seoul/Korea, November 10th, 2012.

Masaru Ishii, From cartoon to real immunology: intravital multiphoton imaging dissecting cellular dynamics in vivo. 10th Anniversary Symposium of the Hwason Optical Imaging Workshop & Symposium. Gwangju/Korea, May 28th, 2013.

Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging dissecting cellular dynamics in live animals. Cold Spring Harbor

Conference Asia, NEW ADVANCES IN OPTICAL IMAGING OF LIVE CELLS & ORGANISMS, Suzhou/China, August 20-23, 2013.

Masaru Ishii, S1P-mediated control of bone cell dynamics visualized by intra-vital microscopy, Gordon Research Conference "Glycolipid and Sphingolipid Biology", Ventura, CA (USA). January 12-17, 2014

Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging revealing immune cell dynamics in inflammation and bone destruction in vivo. University of Southern California, Molecular and Computational Biology, Special Seminar, Los Angeles, CA (USA), January 17, 2014

Masaru Ishii, Dynamic bone system visualized by intravital multiphoton microscopy. The Annual Meeting of Korean Society of Osteoporosis, Asan Medical Center (Seoul), Korea, April 4, 2014.

Masaru Ishii, Intravital multiphoton imaging revealing immune cell dynamics in bone destruction in vivo. 2014 CSHA Conference on Bone and Cartilage: from Development to Human Diseases, Suzhou (China), November 4-7, 2014

〔図書〕(計45件)

石井 優 編 実験医学別冊 *in vivo* イメージング実験プロトコール 2013

石井 優 編 実験医学 29(16), 2011

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計3件)

名称: 画像処理装置および方法、並びにプログラム

発明者: : 石井 優, 菊田順一, 米谷信男

権利者: 国立大学法人大阪大学・ニコン株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2011-232479

出願年月日: 2011/10/24

名称: 新規抗腫瘍剤及びそのスクリーニング方法

発明者: 石井 優, 賀川義規, 森 正樹, 石井秀始

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-015982

出願年月日: 2013/1/28

PCT 出願番号: PCT/JP2013/51733

PCT 出願日: 2013年1月28日

名称：新規慢性炎症のトリガー分子 S100A8  
を標的とした新規生活習慣病制御法  
発明者：石井 優、下村 伊一郎、船橋 徹、  
前田 法一  
権利者：国立大学法人大阪大学  
種類：特許  
番号：特願 2014-123617  
出願年月日：2014/6/16  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.icb.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

石井 優 (ISHII Masaru)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10324758