

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890303

研究課題名（和文）

多光子顕微鏡法による破骨細胞の膜ダイナミクスと骨破壊機能の分子基盤の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of membrane dynamics and molecular mechanism of bone resorption in osteoclast by using multi-photon microscopy

研究代表者

日比 輝正 (HIBI TERUMASA)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：50554292

研究成果の概要（和文）：

骨は骨形成と骨破壊のバランスにより維持されている。生体内の骨破壊において主要な役割を果たしているのが破骨細胞である。本研究では、骨破壊機能の分子機構を明らかにするために、破骨細胞内の小胞の動きについて解析した。4次元イメージングを行なうことにより、生きた破骨細胞内の骨吸収に関係すると考えられる小胞の動きを、xy方向のみでなくz方向にも解析することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：

Bone is maintained by a balance between bone formation and resorption. The osteoclast is the cell that plays a major role in bone resorption in our body. In this study, to elucidate the molecular mechanism of bone resorption, vesicular trafficking in osteoclast was analyzed. By carrying out 4D-imaging, it becomes possible to analyze dynamics of acidic vesicles, probably involved in bone resorption, in living osteoclast not only horizontally but also vertically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究代表者の専門分野：分子細胞生物学、生物物理学

科研費の分科・細目：医歯薬学・物理系薬学

キーワード：骨代謝、小胞輸送、バイオイメージング、多光子顕微鏡、蛍光蛋白質

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨は、カルシウム沈着を促す骨芽細胞と、反対に骨吸収・骨破壊を行なう破骨細胞とにより、絶えず造り替えられながら、形成と破

壊のバランスによって全体の骨量が維持されている。このバランスが崩れ過剰に骨吸収が起こった病態が骨粗鬆症である。また、関節リウマチや癌の骨転移においては、炎症性

の環境により、関節等において病的な骨破壊が惹き起こされることも知られている。これらの病態は、骨折による運動機能低下や激しい痛み等によって、著しいQOLの低下を招くため、画期的な骨破壊機能阻害薬の開発が待ち望まれている。

(2) 生体内の骨代謝における骨破壊機能を担っているのが破骨細胞である。破骨細胞は、単球/マクロファージ系の前駆細胞から分化した特殊な巨大多核細胞であり、破骨細胞内にはリソソーム様の酸性小胞が多数存在することが知られている。これらの酸性小胞には骨分解酵素やプロトンポンプが含まれており、酸性小胞が骨表面側の形質膜と融合し、骨分解酵素やプロトンポンプが骨表面に輸送・放出されることによって、骨破壊が行なわれていると考えられている。

(3) 破骨細胞における酸性小胞の輸送及び膜融合を制御する分子は、これまでのところ不明なままである。その原因の一つには、この過程が固定組織の形態や分子の局在から推察されたモデルであり、実際に骨破壊を行なう破骨細胞の膜動態の詳細が明らかにされていないことが挙げられる。

(4) 破骨細胞における膜動態を明らかにするには、破骨細胞を生きたまま3次元のかつ経時的に観察することで、破骨細胞内の小胞の局在変化を追跡し、膜融合を可視化するための高度な研究手法が必要となる。しかしながら、研究開始当初にはその方法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞の骨破壊機能評価系を構築し、骨破壊機能の分子基盤を明らかにするための新たな研究手法を確立する事を第一の目的とした。骨破壊機能は、破骨細胞における、酸性小胞の骨表面方向への輸送、小胞膜-形質膜間の融合、分解物のエンドサイトーシスという一連の膜動態により規定されていると考えることができる。このことから、本研究においては、破骨細胞の膜ダイナミクスを明らかにすることを中心に据えて解析を行なった。更に、確立した評価系と分子生物学的手法とを組み合わせることで、骨破壊機能の分子基盤の解明に繋げることを見据え、研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 細胞への傷害性を抑えた3次元解析手法として多光子顕微鏡法を適用した。多光子顕微鏡は、近赤外光を用いるため細胞へのダメージが極めて少ない、焦点面のみで蛍光

物質を励起するために褪色が起こりにくい、等の特長を有している。

(2) 本研究では、破骨前駆細胞としてマクロファージ系細胞株 RAW264.7 細胞を用い、RANKL を含有する培地で数日間培養することにより破骨細胞を得て実験に使用した。破骨細胞に分化していることは、破骨細胞を特異的に染色する TRAP 染色法を用いて確認した。

(3) 破骨細胞内酸性小胞を可視化するために、酸性小胞を染色する Lyso-ID Green を用いた。また、細胞の多核化と細胞内小胞の位置を明確にするために、核を Hoechst33342 を用いて染色した。

(4) リソソーム様の小胞のマーカーとして、SNARE 蛋白質に属する VAMP7 に群青色蛍光蛋白質シリウスを融合させた蛋白質を利用した。多くの蛍光蛋白質は酸性環境下で不安定だが、永井健治教授（北海道大学）らが開発したシリウスは、酸性環境下でも安定に蛍光を発する。遺伝子工学的手法により、マウス由来 VAMP7 をサブクローニングし、シリウスとの融合蛋白質を発現するプラスミド DNA を構築した。作製したプラスミド DNA をリポフェクション試薬を用いて前駆細胞に導入してから分化誘導を行なうことで、目的の蛋白質を発現する破骨細胞を得る計画とし、効率よく外来遺伝子を発現する破骨細胞を得る方法を検討した上で解析に用いた。

4. 研究成果

(1) まず、外来遺伝子を発現する破骨細胞を得るための条件検討を行なった。最初に RAW264.7 細胞を破骨細胞に誘導する条件について、誘導因子である RANKL のメーカーと濃度を検討した。分化誘導に成功した破骨細胞の写真を図 1 に示した。

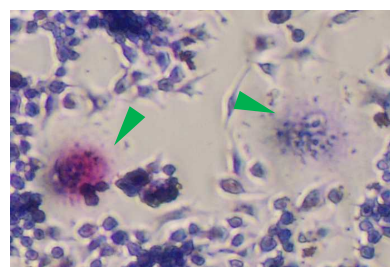


図 1 RAW264.7 細胞から RANKL 含有培地により分化させた破骨細胞 (緑矢頭)。

また、各種遺伝子導入試薬を試し、RAW264.7 細胞において導入効率が良く、分化誘導を阻害しない試薬と実験条件についての検討を行なった。当初計画では遺伝子導入後に蛋白

質が発現し始めてから分化誘導を開始する計画であったが、この方法では破骨細胞を得るまでの8日間で蛋白質の発現量が減少してしまうことが判明したため、実験手法の再検討を行なった。検討の結果、播種する際の細胞数を最適化した上で、分化誘導途中に遺伝子導入を行なうことで効率よく外来遺伝子を発現した破骨細胞を得ることに成功した。この方法は、本研究に限らず、破骨細胞研究の全般に幅広く使用できる研究手法として有用である。

(2) 次に、分化させた破骨細胞を酸性小胞を染色する Lyso-ID Green を用いて染色し、ステージトップインキュベーターを用いてライブイメージングを行なった。図2に、酸性小胞と核を同時に可視化した破骨細胞を示した。Hoechst33342 による核染色により、破骨細胞の多核化が明確に示されると共に、Lyso-ID Green による染色により、破骨細胞では分化前の状態と比較して非常に多くの酸性小胞を含有していることが確認された。

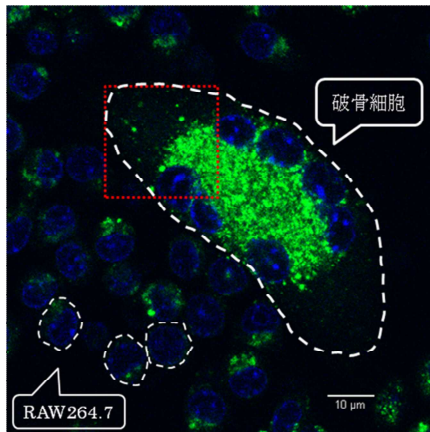


図2 Lyso-ID Green によって可視化した、破骨細胞内の酸性小胞（緑）。Hoechst33342 によって核も同時に可視化した（青）。赤枠部分の経時変化を図3に示した。

この細胞の細胞辺縁部について、タイムラプス観察を行なうことによって、酸性小胞の動態を解析した。タイムラプス観察の結果を図3に示した。細胞の中心部に近い所に位置する小胞は、一定の場所でほとんど動かないのに対し、細胞の辺縁部には、同程度の大きさでありながら激しく動き回る小胞がいくつも確認された。この観察結果から、細胞内酸性小胞には複数の種類が存在する可能性や小胞の動態を制御し一定の場所に繫留しておくメカニズムを破骨細胞が備えている可能性が示唆された。

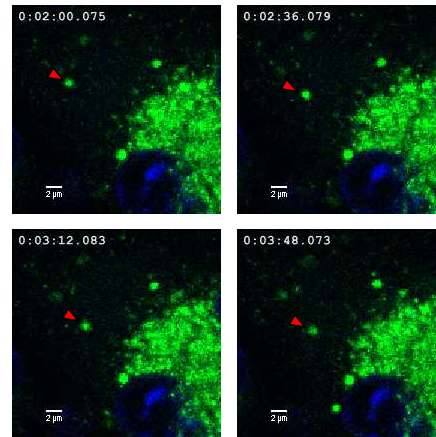


図3 図2の赤枠で示した領域のタイムラプス観察像。激しく動き回る小胞の1つを赤矢頭で示した。

(3) 前述の遺伝子導入法を用い、SNARE 蛋白質の中でリソソーム様小胞に局在する事が知られている VAMP7 と群青色蛍光蛋白質シリウスとの融合蛋白質を発現させた破骨細胞を得て、破骨細胞内の VAMP7 の局在について3次的に解析を行なった。結果の1例を図4に示した。解析の結果、破骨細胞内には少なくとも、非酸性で VAMP7 陽性の直径 $1 \mu\text{m}$ 程度の小胞、酸性で VAMP7 陽性の $3 \mu\text{m}$ 程度の小胞、酸性で VAMP7 陰性の $4 \mu\text{m}$ 以上のクラスターを形成していると思われるオルガネラ、の3種類が存在することが判明した。これらについては、それぞれが異なる局在と動態を示す観察結果も得られており、今後より詳細な分析が必要であるものの、破骨細胞における膜輸送分子メカニズムを解明するための重要な知見であると考えられる。

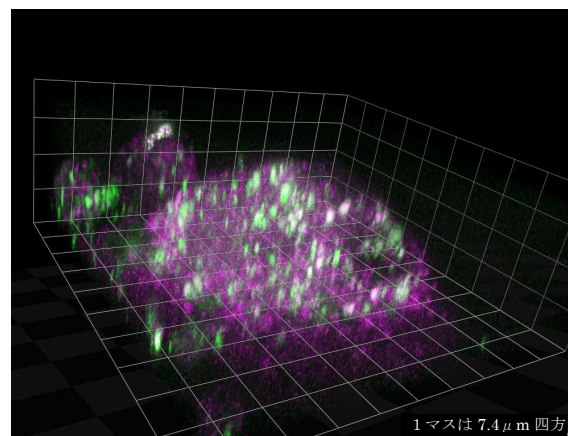


図4 破骨細胞内の酸性小胞の局在（緑）と VAMP7 の局在（マゼンタ）を3次的に示した。両者が共局在している場所は白く表示されている。

(4) 破骨細胞内の酸性小胞の動態を更に詳細に追究するために、4次元イメージングを試みた。これまでと同様に Lyso-ID Green により酸性小胞を染色し、種々の画像取得パラメータについての最適化を行なった。その結果、破骨細胞内の酸性小胞の動きを xy 方向のみでなく z 方向にも追跡することが可能となり、骨破壊機能を小胞輸送という新たな観点から評価できるようになった。図5に示した4次元イメージングによる解析の例では、小胞が接着面付近で消失しており、膜融合を捉えることができている。xy 平面上のみの解析では、小胞が焦点面から移動して観察できなくなった場合との区別ができないため、このような結果は、4次元イメージングによって初めて解析可能となる例だと言える。

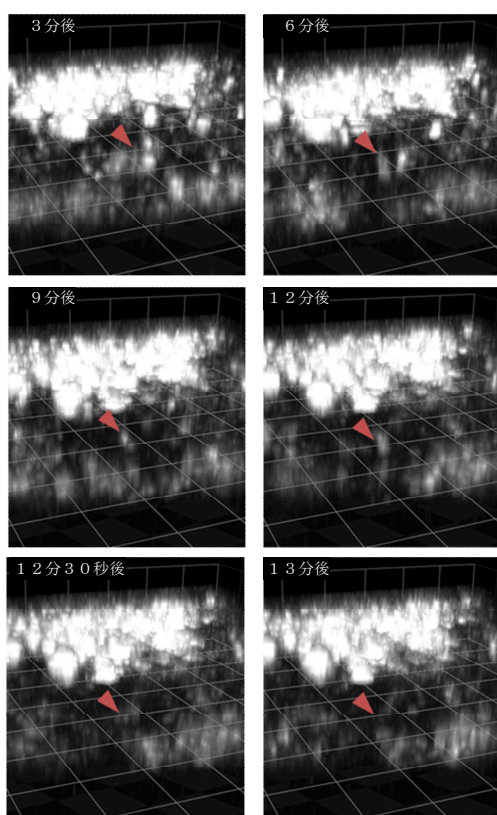


図5 破骨細胞内の酸性小胞の動態を4次元イメージングにより解析した。赤矢頭で示した小胞は観察開始から12分30秒後（下段左）に消失しており、小胞の膜融合を捉えたと考えられる。

(5) 研究を進める中で、リン酸カルシウム薄膜上での培養とプラスチックディッシュ上での培養についても比較を行なった。その結果、プラスチックディッシュ上での培養に比べ、リン酸カルシウム薄膜上での培養においては、破骨細胞の分化状態及び形態が異なり、

細胞内小胞の位置や動態も異なっていることが示唆された。このことは、接着面のリン酸カルシウムや細胞外基質からの何らかのシグナルを破骨細胞が感知して、細胞内小胞の局在や動態、あるいは構成成分などを変化させていることを推察させる結果であり、様々な培養条件で解析を進めていくことが今後の課題となった。

(6) 本研究においては、骨破壊機能の分子基盤を完全に解明するには至らなかったものの、新規の研究手法を開発・提示することに成功した。本研究の中では VAMP7 を過剰発現する破骨細胞を誘導しており、この細胞では膜動態が異常になっている可能性があり、骨代謝に寄与する可能性のある分子の候補として、現在更に詳細な解析を進めている。本研究成果は、今後の骨代謝研究において、既存の方法とは全く異なるアプローチを可能にし、骨代謝分子基盤の全貌の解明や骨代謝不全に対する治療薬開発への大きな一歩となった。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.es.hokudai.ac.jp/labo/mcb/>

アウトリーチ活動

2010年6月5日に、北海道大学電子科学研究所の一般公開が行なわれたため、その機会を利用し、来場した一般の方に蛍光蛋白質を用いたイメージング技術に関して解説を行ない、実際に蛍光蛋白質を発現する試料を蛍光顕微鏡により観察して頂くことも実施した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比 輝正 (HIBI TERUMASA)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：50554292

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし