

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 10日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22689030

 研究課題名（和文）生体イメージングを駆使した破骨細胞の遊走・機能分化と
骨吸収疾患の病態生理の解明

 研究課題名（英文）Systematic analyses of modes of migration, differentiation and
function of bone-resorbing osteoclasts visualized by intravital
imaging

研究代表者

石井 優（ISHII MASARU）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授

研究者番号：10324758

研究成果の概要（和文）：

本研究では、研究代表者が世界に先駆けて立ち上げた骨組織内の多光子励起生体イメージング系を活用して、関節リウマチで骨破壊に関与する破骨細胞の遊走・分化・機能をライブで可視化することに成功し、破骨細胞の骨破壊動態を実体的かつ統合的に解明した。また生体骨イメージング系の改良により、高精度・高感度の可視化法を確立した。また、これらの研究成果を元に、新しい作用機序をもった次世代の骨破壊抑制薬の開発に取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：

The main subject of this study is to reveal the cellular dynamics in various kinds of tissues and organs in vivo, by using advanced imaging techniques, especially focusing on the dynamic phenomenon within bone marrow cavity. By improving the optical technology, we developed an intravital bone imaging system that enabled elucidation of control mechanisms for dynamic behaviors of bone-resorbing osteoclasts in vivo. We also developed novel anti-bone resorptive treatments based on our findings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ学，骨代謝，破骨細胞，イメージング

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチでは全身の関節に炎症が生じる頻度の高い自己免疫疾患であるが、その最も重篤な症状として、炎症関節の骨破壊が挙げられる。この骨破壊に関与する細胞が、破骨細胞と呼ばれる、単球系の前駆細胞から特殊に機能分化したマクロファージである。

これまでの国内外の多くの研究により、破骨細胞の分化誘導因子である M-CSF や RANKL の同定や、それらの刺激によって破骨細胞分化に至る細胞内シグナル伝達などについて、詳細な解析が行われてきた。その一方で、破骨細胞が生体内（骨組織内）でどのように遊走し、分化・機能するのかについては不明な

ままであった。特に、生体内で最も硬度の高い組織である骨関節組織の解析は、これまで固定して脱灰（キレート剤に浸しリン酸カルシウム結晶を溶出させる作業）した標本を薄切して解析するしかなく、生きた骨組織内で破骨細胞がいかんして形成され、骨吸収機能を発揮するかについては謎のままで残されていた。

本研究代表者は2光子励起顕微鏡を利用して、生きた個体内での骨組織内部をライブイメージングで可視化することに世界に先駆けて成功してきた。しかしながら、本研究開始前の時点では、可視化で解析できる現象は、細胞の大まかな動態や位置関係のみであり、破骨細胞の骨吸収機能や動態・分化の詳細を解析できるものではなかった。本研究では最新の光学イメージング技術をさらに活用させることにより、破骨細胞機能の解析する新たな方法論の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

破骨細胞は単球系の血液細胞から分化する、骨を融解・吸収する生体内で唯一の細胞種である。国内外の多くの研究により、破骨細胞の分化・機能に関与する多くの分子機構がこれまで明らかにされてきたが、実際の骨組織内での破骨細胞の動態については依然不明な点が数多く残されている。本研究では申請者が最近、世界に先駆けて立ち上げた、2光子励起顕微鏡を駆使した生体骨イメージングの方法論を活用して、破骨細胞の遊走・分化・機能を実体的かつ動的に解析する。さらに、イメージングにより得られた定量的データの数理解析により、破骨細胞の「*in vivo* 作用様式」をシステムとして理解し、骨ホメオスタシスの生理機序および炎症性骨破壊の病態形成メカニズムの詳細かつ統合的な解明を目指した。

特に本研究では、それまで本研究者が精力的に行ってきた骨組織内での破骨前駆細胞の遊走・位置決め制御機構についての全体像を明らかにするとともに、その統合的理解を目的とした。さらには、破骨細胞の骨表面での分化・機能についても生体イメージングを駆使した解明を目指し、特に①分化過程における骨芽細胞との細胞間相互作用や②機能分化に伴う遺伝子発現のイメージングを行い、生きた骨組織における破骨細胞分化・機能を、実体的かつ統合的に解明した。これらの成果は、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吸収疾患の病態生理を理解し、新規の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強く期待されるものとなった。

3. 研究の方法

本研究では、生体骨イメージングを用いて、

破骨細胞とその前駆細胞であるマクロファージの動態を制御する種々のケモカイン・脂質メディエーター、および受容体の機能について、生体骨イメージング系を用いて解析した。より具体的には本研究者がそれまでに破骨細胞動態を制御する重要な因子として同定してきた脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸（S1P）やその2つの受容体S1PR1やS1PR2に注目し、生体骨イメージング系を駆使して、ノックアウトマウスや各種の阻害剤を活用することで、S1Pによる破骨細胞前駆細胞の遊走制御機構について統合的に解明した。またこれを標的とする新規骨破壊抑制薬の開発も行った。また、個体レベルでの破骨前駆細胞の遊走動態を解析するために、光照射により色調を変換させることのできる蛍光タンパク質（Kaede）を活用し、破骨前駆細胞にKaedeを発現させたリポーターマウスを作成し、生体内での細胞トラッキング系を立ち上げた。

また、遊走・位置決めに加えて、破骨細胞の分化・機能を生きた骨髄内で生体2光子励起イメージングで可視化するために、破骨細胞の機能分化・骨吸収機能を可視化する蛍光レポーターマウスの作成を行った。具体的には、破骨細胞が骨吸収を行う際に用いる酸を放出するプロトンポンプ（V-type H⁺ ATPase）に注目し、これをGFPで標識させたりポーターマウスでイメージングを行った。この際、GFP標識されたプロトンポンプの破骨細胞内局在を可視化するために、蛍光生体骨イメージング系の高感度・高解像度化を行った。

また、本イメージング系を用いて新規の骨吸収抑制薬の検索システムを開発した。これを用いて、既存の薬剤の薬効評価を行うとともに、細胞動態を制御する種々の分子を標的とする阻害薬等についてスクリーニングを行った。

4. 研究成果

破骨細胞前駆細胞にはS1Pに対して遊走を起すS1PR1受容体に加えて、これを抑制するS1PR2受容体が同時に発現していることを発見していたが、本研究ではこの2つの受容体による動態制御機構について統合的な解明を行った。その結果、破骨細胞前駆細胞は正の作用をもつS1PR1と、相反する作用をもつS1PR2を巧妙に使い分けることにより、必要なタイミングで骨組織に出入りしていることが分かった。また、この負の受容体であるS1PR2を抑制して、結果としてS1PR1作用を強化することにより、骨吸収が抑制できないかについても解析した。現在、S1PR2受容体のアンタゴニストとしてJTE013が存在するが、本研究ではこれを卵巣摘出モデルマウスに投与する実験を行った。卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおいて、卵巣摘出と同時に

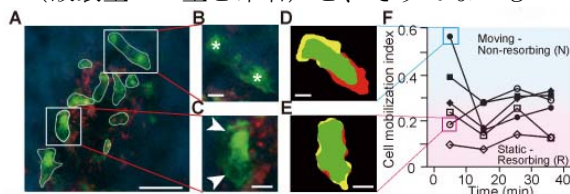
JTE013 を投与し、4 週間後に骨組織を解析した。この結果、JTE013 投与群では有意な骨吸収抑制効果が認められた (J Exp Med, 2010)。

さらに、破骨細胞前駆細胞の動態が生体内で S1P によって制御されていることを実証するために、同細胞に前述の Kaede を発現させ、この動態を追跡した。その結果、脾臓に存在する破骨前駆細胞が、生体内で確かに 2 日後に骨組織内で成熟破骨細胞へと分化・成熟することを証明し、これが血中の S1P によって動的に制御されていることを明らかにした (J Immunol, 2013)。

また、従来より骨吸収治療薬として用いられてきた活性型ビタミン D 製剤は、臨床的にも骨破壊を抑制することが示されていたが、その薬効作用については不明のままであった。本研究では、生体骨イメージング系を用いて評価することにより、活性型ビタミン D 製剤が、破骨細胞前駆細胞の動態を刺激して、骨組織内から血管内へ引き戻すことによって薬効を発揮していることを明らかにした (PNAS, 2013)。この研究成果は、本作用を利用した新規の骨吸収抑制薬の開発につながる重要な知見と考えられる。

一方、本研究では生体 2 光子励起イメージングを駆使して、骨組織内部を生きたままで観察する方法論の開発・改良に取り組んでいるが、特に、関節リウマチにおける病態形成において重要な骨破壊過程をリアルタイムで可視化する系の開発を行った。まずは骨吸収能を持つ成熟破骨細胞を蛍光標識した遺伝子改変マウスを作出したが、具体的には、骨破壊の際に吸収面に向かって大量の酸を分泌するために必要なプロトンポンプ (V-type H⁺ ATPase) に GFP を融合したタンパク質を発現させたノックインマウス (H⁺ pump-GFP マウス) や、成熟破骨細胞のマーカーである TRAP のプロモーター下に RFP を発現させたトランスジェニックマウス (TRAP-RFP マウス) をそれぞれ作成した。これらを用いて、生きた骨組織内での成熟破骨細胞による骨破壊をリアルタイムで可視化することに成功した (下図参照)。

この生体イメージングにより、成熟破骨細胞のうち、実際に骨破壊を行っているもの (破壊型: R 型と命名) と、そうでないもの



(非破壊型: N 型) を区別することが可能となり、ビスフォスフォネートなどの種々の薬剤の効果を実際の破骨細胞の活動を観察しながら評価することができた。その結果、RANKL などのより骨破壊を誘導すると、破骨

細胞の総数だけでなく、骨破壊を行う細胞数が大きく増加した。一方で、ビスフォスフォネートなどで骨破壊を抑制すると、総数の減少のみならず、残っている細胞も骨破壊には関与せず、骨破壊には破骨細胞の総数のみならず、個別の細胞での骨破壊機能も厳密に制御されていることが分かった (J Clin Invest, 2013)。

さらに本方論を用いて、関節リウマチでの骨破壊の際に、活性化した免疫細胞が破骨細胞を活性化させる過程を可視化することに成功した。この結果、活性化した T 細胞のうち Th17 細胞が、細胞膜上に RANKL を発現し、これが細胞間直接相互作用によって成熟破骨細胞を活性化させることが分かった。RANKL の中和抗体などはこの過程を阻害することにより、成熟破骨細胞の動態・骨破壊を抑制することが証明できた。本実験系は、生きた骨組織内で実際に働く破骨細胞の機能を解析することができ、種々の骨吸収抑制薬の効果を解析するために極めて強力なツールとなることが期待される。

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 2 2 件) 【すべて査読有】

- 1) Ohta K, Haraguchi N, Kano Y, Kagawa Y, Konno M, Nishikawa S, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Noguchi Y, Ozaki M, Kudo T, Sakai D, Satoh T, Fukami M, Ishii M, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ishii H. (2013) Depletion of Jarid1b induces cellular senescence in human colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 42(4):1212-8.
- 2) Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, Tamai K, Miyawaki A, Kanagawa O, Tomura M, Ishii M*. (2013) Systemic circulation and bone recruitment of osteoclast precursors tracked by using fluorescent imaging techniques. *J. Immunol.*, 190(2):605-12.
- 3) Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada G-H, Nishiyama I, Mizukami S, Maiya N, Yasuda H, Kumanogoh A, Kikuchi K, Germain RN, Ishii M*. (2013) Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J. Clin. Invest.*, 123(2): 866-873.
- 4) Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat. Neurosci.*,

16(5):543-51.

- 5) Wienert S, Heim D, Kotani M, Lindequist B, Stenzinger A, Ishii M, Hufnagl P, Beil M, Dietel M, Denkert C, Klauschen F (2013) CognitionMaster: An Object-Based Image Analysis Framework. *Diagn. Pathol.*, 8:34.
- 6) 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 antbone-resorptive action of active vitamin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(17): 7009-13.
- 7) Matsui S, Murota H, Takahashi A, Yang A, Lee J-B, Omiya K, Ohmi M, Kikuta J, Ishii M, Katayama I. (2013) Dynamic analysis of histamine-mediated attenuation of acetylcholine-induced sweating via GSK3beta activation. *J. Invest. Dermatol.*, in press.
- 8) Ishii M, Kikuta J. (2013) Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1831(1), 223-227.
- 9) Kikuta J, Ishii M. (2013) Osteoclast migration, differentiation, and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology*, 52(2):226-34.
- 10) Ishii M, Fujimori S, Kaneko T, Kikuta J. (2013) Dynamic live imaging of bone: opening a new era with 'bone histodynametry'. *J Bone Miner Metab*, ePub.
- 11) Kikuta J, Ishii M. (2012) Recent advances in intravital imaging of dynamic biological systems. *J. Pharmacol. Sci.*, 119(3):193-7.
- 12) Ishii M. (2012) How do contemporary imaging techniques contribute to basic and clinical rheumatology? *Ann. Rheum. Dis.*, 71 (Suppl 2): i67-9.
- 13) Ishii T, Kawamura S, Nishiyama I, Kikuta J, Ishii M. (2012) Use of intravital microscopy and in vitro chemotaxis assays to study the roles of sphingosine-1-phosphate in bone homeostasis. *Methods Mol. Biol.*, 2012; 874: 129-139.
- 14) Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M*, Mochizuki N* (2012) The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J. Clin. Invest.*, 122(4): 1416-1426.
- 15) Kayama H, Ueda Y, Sawa Y, Jeon SG, Ma JS, Okumura R, Kubo A, Ishii M, Okazaki T, Murakami M, Yamamoto M, Yagita H, Takeda K. (2012) Intestinal CX3C chemokine receptor 1high (CX3CR1high) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(13): 5010-5015.
- 16) Kowada T, Kikuta, J, Kubo A, Ishii M, Maeda H, Mizukami S, Kikuchi K. (2011) In vivo fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts. *J. Am. Chem. Soc.*, 33(44):17772-17776.
- 17) Ishii T, Shimazu Y, Nishiyama I, Kikuta J, Ishii M. (2011) The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors; an application of intravital two-photon microscopy. *Mol. Cells*, 31(5): 399-403.
- 18) Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath J, Uitto J, Kaneda Y. (2011) PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(16): 6609-6614.
- 19) Kikuta J, Iwai K, Saeki Y, Ishii M. (2011) S1P-targeted therapy for elderly rheumatoid arthritis patients with osteoporosis. *Rheumatol. Int.* 31: 967-969.
- 20) 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.
- 21) Ishii T, Kikuta J, Kubo A, Ishii M. (2010) Control of osteoclast precursor migration: A novel point of control for osteoclastogenesis and bone homeostasis. *IBMS BoneKey*, 7: 279-286.
- 22) Ishii T, Ishii M. (2010) Intravital two-photon imaging: A versatile tool for dissecting the immune system. *Ann. Rheum. Dis.*, 70 (Suppl 1): i113-115.

[学会発表] (計3件)

- 1) Ishii M, Roles of S1P in osteoclast regulation and bone physiology, 2012 Gordon Research Conference, 2012年4月24日, Il Ciocco, Italy
- 2) Ishii M, Roles of S1P in osteoclast regulation and bone remodeling, 2011 FASEB Summer Research Conference, 2011年8月18日, Il Ciocco, Italy
- 3) Ishii M, Chemokine-mediated migration

control of osteoclast precursors
visualized by live bone imaging. 3rd
International Conference of
Osteoimmunology, 2010年6月21日,
Santorini, Greece

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称：新規骨吸収抑制剤のスクリーニング方法

発明者：石井 優

権利者：国立大学法人大阪大学

番号：特願 2009-260655

出願年月日：2009年11月16日

国内外の別：国内

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

番号：特願 2011-232479

出願年月日：2011年10月24日

国内外の別：国内

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

番号：特願 2012-015982

出願年月日：2012年1月30日

国内外の別：国内・国外

PCT 出願番号：PCT/JP2013/51733

PCT 出願日：2013年1月28日

[その他]

ホームページ等

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

<http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 優 (ISHII MASARU)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授

研究者番号：10324758

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし