

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390417

研究課題名(和文) 3次元蛍光イメージングによる骨細胞機能ダイナミズムの可視化と骨の生理・病態解析

研究課題名(英文) Visualization of functional dynamics in bone cells by three dimensional fluorescence imaging toward understanding of bone physiopathology

研究代表者

飯村 忠浩 (Iimura, Tadahiro)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授(特定教員)

研究者番号：20282775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、3次元蛍光イメージングによる観察と定量解析から、骨代謝における新規のメカニズムを探索することを目的とする。3次元蛍光イメージングは、蛍光3次元画像を取得し、コンピューターによる3次元構築を行い、蛍光シグナルの3次元的な広がりや輝度値を定量手法である。その結果、荷重に応じた骨細胞ネットワークの違いを計測することに成功した。また、骨細胞が分泌する骨代謝調節因子であるSclerostinが、生後骨発達過程で動的に変化することを明らかにした。また、骨細胞は、血中リン濃度の調節ホルモンを産生するが、この調節にはDMP1が関与すること明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to unveil novel mechanisms of bone pathophysiology by exploiting three-dimensional (3D) fluorescence morphometry. After acquisition of fluorescence optical sections, 3D images were reconstructed in silico, by which, detailed distribution pattern and signal intensity of molecule of interest can be quantitatively analyzed. We successfully measured and compared osteocyte-network pattern in bones loaded by distinct physiological tensions. Spatio-temporal dynamics of Sclerostin production by osteocytes during postnatal bone development was described. Furthermore, we uncovered unique regulatory mechanism of FGF23 by DMP1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：イメージング 骨代謝 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は、骨組織中で最も多い細胞集団であり、骨基質中で互いに細胞突起を伸ばしギャップ結合を介して細胞間ネットワークを構築している。また、骨表面へもその細胞突起は伸張し、骨芽細胞や破骨細胞との細胞間コミュニケーションを行っていると考えられる。機能的には、骨への物理的刺激の受容細胞(メカノセンサー)として応答し、骨芽細胞や破骨細胞の機能を調節しながら骨代謝を調節している。また、FGF23を分泌し腎臓でのリンの再吸収を制御することで血中リン濃度の調節にも関わっている。

このように骨細胞はお互いが細胞間ネットワークを形成し、また周辺の細胞や組織との細胞間相互作用により機能を発揮しているため、骨細胞の機能をより詳細に解析するには、骨組織をそのままに *in vivo* あるいは *in situ* での定量的な解析が望まれる。

そこで、本研究代表者は、細胞や分子の機能を蛍光の変化としてとらえ、細胞をありのままにより定量的なアッセイを可能にする“*in situ* 蛍光イメージング”を骨組織に応用し、発展させてきた。“*in situ* 蛍光イメージング”は培養細胞において用いられ、細胞をそのままに蛍光3次元画像を取得し、コンピューターによる3次元構築を行う。蛍光の3次元的な広がりや輝度値を定量することで、細胞の形態変化や、分子の発現量・分布パターンの変化を捉える手法である。

このような手法を10-20 μ mの厚さの骨組織切片に応用することで骨組織上での分子発現量の相対的比較をすることが可能になった。これによって、同じ分子の細胞種間での発現量の違いや、個々の細胞での発現量の定量も可能になった。さらに、コンピューターでの3次元シュミレーションと計測により、細胞や細胞内小器官、細胞間ネットワークを計測・定量し、その微細な変化を捉えることが可能になった。

2. 研究の目的

骨細胞は骨組織中に最も多量に存在し、骨への物理的刺激の受容細胞として応答し、骨芽細胞や破骨細胞の機能を調節しながら骨代謝を調節している。また、FGF23を分泌し血中リン濃度の調節にも関わっている。しかしながら、骨細胞は石灰化した骨基質中に囲まれているため、その機能変化を定量的に解析するのは困難である。本研究では、骨組織そのものを3次元蛍光イメージング法にて観察(3次元 *in situ* 蛍光イメージング)し、骨細胞の機能変化を定量的に解析する方法を発展させる。骨細胞・細胞突起・細胞内小器官の大きさや数の変化、および機能分子の発現・分布パターンの変化を網羅的イメージングと微細計測による定量を行い、骨細胞を中心とした新たな調節機構を解明し、骨の生

理・病態解析の新規基盤を確立する。

3. 研究の方法

骨細胞および骨小腔ネットワークの計測、骨種による相違

骨細胞の形態と機能の差異を全身の骨の比較し、各々の骨の機能調節の差異を探ることを目的とする。

3次元画像より、個々の骨細胞の形や大きさ(容積)細胞内器官の大きさや細胞内での広がりを数値化し、統計処理をする。ネットワークは、細胞突起の数や太さ、方向性、方向性の変化の度合い、枝別れの程度、連結性などを計測する。このような、3次元 *in situ* 蛍光イメージングと計測を、胎児骨、新生児骨、成長期骨、成熟期の各段階で、頭蓋骨、長管骨、脊椎骨、顎骨を対象に網羅的に行う。さらに、骨細胞の機能分子である、FGF23, Sclerostin, Dmp1 の *in situ* での定量解析を行い、全身の骨の形態と機能の相違とその成長・発達段階での遷移を類型化する。

病的モデルでの骨細胞の3次元 *in situ* 蛍光イメージングと病態メカニズムの統合的解析

骨細胞への3次元 *in situ* 蛍光イメージングを、病的モデル動物(卵巣除去、尾部懸垂、遺伝子改変マウス)に応用し、骨細胞の機能的変化を経時間的・空間的に解析し、骨芽細胞や破骨細胞の機能変化との相関、各種骨代謝マーカーの変遷との相関を比較し、統合的な病態解析を行う。

4. 研究成果

骨細胞および骨細胞ネットワークの計測と荷重付加との関係

(英文原著論文 11 にて発表)

骨格系は機械的負荷に対応して発達し、骨の恒常性維持にも機械的負荷は重要なファクターである。個々の骨に加わる荷重の大きさは異なり、体を直接支えるヒトの下肢の長管骨と、頭蓋内圧や咀嚼力が加わる頭蓋冠の扁平骨では、2-10倍の差があることが報告されている。したがって、長管骨と扁平骨では、機械的負荷受容細胞である骨細胞の形態や機能に差異がみられると考えられる。そこで、本研究グループでは、蛍光3次元画像上で、骨細胞間の距離、細胞径、細胞の体積、細胞の表面積および核の体積、さらに骨細胞突起の体積や表面積、太さおよび分枝数を計測した。その結果、骨細胞の細胞体積/核体積の比は、頭頂骨で2.1、脛骨で3.05であり、頭頂骨の骨細胞よりも脛骨の骨細胞の方が細胞質の体積が約50%大きかった。一般に、分泌や吸収を活発に行っている細胞は、比較的大きな細胞質を有していることが知られている。扁平骨と長管骨の骨細胞の細胞質に由来する体積の違いは、それぞれの骨細胞の

機能的な差異を示唆しているものと考えられた。

つぎに、骨細胞ネットワークの計測を行った。本研究グループでは、細胞体を基始点として細胞突起の走行を追跡する解析法を用い、骨細胞突起の体積や表面積、太さ（直径）を3次元的に定量した。その結果、脛骨の骨細胞から放射される細胞突起の数および分枝数は頭頂骨の骨細胞より有意に多く、ネットワークはより網羅的であることが明らかとなった（図1）。また、直径、体積および表面積は、脛骨の骨細胞突起のほうが有意に小さい値を示した。ずり応力（ t ）は、 $t=T/S$ （ T は平面方向へかかる応力、 S は応力を受ける面積）で与えられる。したがって、外部からの応力は、面積が小さいほどより大きなずり応力として伝えられる。このことから、脛骨の骨細胞突起は、頭頂骨のものとは比べて、同じ荷重に対してより大きなずり応力を生じる構造となっていると考えられた。また、ネットワークの網羅性の高さは、さらに機械的負荷への感受性を高める構造を与えていると考えられた。骨細胞の配列やネットワークの構築に荷重負荷の程度が関与することが明らかになってきた。このような骨細胞・骨細胞ネットワークの形態学的な違いが、物理的な荷重負荷をどのように細胞に伝えるのか、ずり応力モデルに加えたトポロジカルなモデルの検討が今後の課題の一つであると考えられた。また、このような骨細胞ネットワークの違いが、個々の骨細胞の機能とどのように相関するのか、ひいては、骨代謝機能との相関の把握も大切な課題であるとおもわれた。

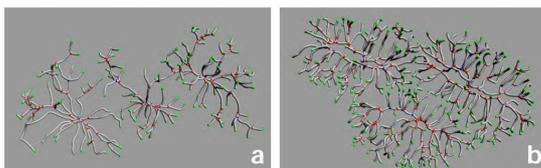


図1 マウス頭頂骨(a)と脛骨(b)の骨細胞ネットワークの比較計測（英文原著論文 11より）：樹状モデルによるシミュレーションと計測
脛骨骨細胞の方が細く・網羅的なネットワーク構造をしていた。

生後骨の機能発達と骨細胞における Sclerostin の発現変化 （英文原著論文 9 にて発表）

さらに、本研究グループは、上記の蛍光3次元形態計測法を用いて、生後骨発達における Sclerostin の産生分布を計測した。その結果、Sclerostin は海綿骨ではなく骨幹部の骨細胞で主に産生され、成熟に伴って骨小腔内の分布領域を拡大することを観察した（図2）。周囲の骨芽細胞における beta-Catenin や Osterix 発現との相関や、in vitro での

探索から、Sclerostin の発現分布の拡大が、この部位での新たな骨芽細胞分化の抑制と骨膜上の骨芽細胞の成熟に関与していることが考えられた。また、これらの観察は Sclerostin による骨代謝調節はおもに成熟骨において行われることを示しており、Sclerostin 機能低下変異の表現系がおもに成熟後の骨代謝動態に影響を与えることと一致していた。

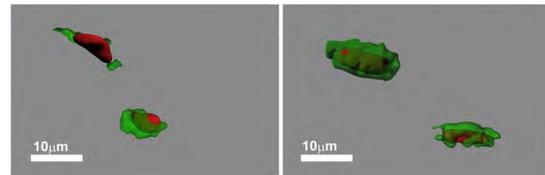


図2 ラット大腿骨・皮質骨 2週齢（右）と4週齢（左）の骨細胞における Sclerostin 発現の比較（英文原著論文 9より）
4週齢では、2週齢と比べて、骨細胞周囲の Sclerostin の発現（緑色のシグナル）がより広く分布していた。

骨細胞における FGF23 産生能における機能的なヘテロジェニティと細胞外基質 DMP1 による FGF23 産生の抑制メカニズムの解明

骨基質タンパクである DMP1 は主に骨細胞で産生され、DMP1-null マウスは血中 FGF23 レベルが亢進し低リン酸血症骨軟化症を呈する。このことから、遺伝学的には、DMP1 は FGF23 産生の抑制因子であると考えられるが、その細胞分子レベルでのメカニズムは不明な点が多かった。そこで、我々は、DMP1 による FGF23 産生調節メカニズムの解明を目的とし、蛍光イメージングによる詳細な観察と計測を行いさらに様々な解析を行った。その結果、DMP1 は FAK-MAPK カスケードを利用して FGF23 産生を抑制していることが明らかとなった（図3）。さらに、FGF23 の産生機能の点から、骨細胞には機能的なヘテロジェニティ（異種混交性）があることが明らかとなった。

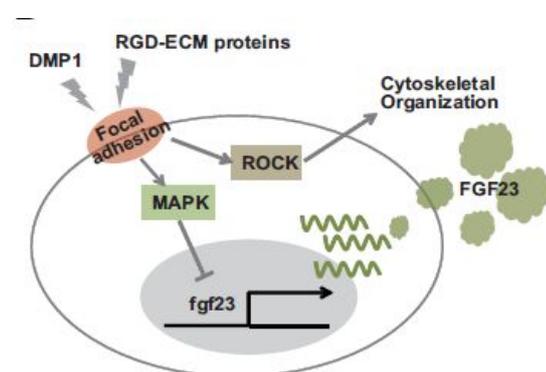


図3 細胞外基質 DMP1 による FGF23 産生の抑制メカニズム（英文原著論文 1より）
DMP1 は FAK-MAPK カスケードを利用して FGF23 産生を抑制している

歯の矯正移動と歯槽骨における Sclerostin の時空間的な発現ダイナミズム (投稿中データ)

さらなる成果として、歯の矯正移動時における歯槽骨リモデリング過程において、歯槽骨骨細胞の Sclerostin 発現が動的に変化することを、新規の蛍光イメージングと計測法によって明らかにした。その結果として、矯正移動時の Sclerostin の空間的な発現分布の変化が、その後の歯槽骨のリモデリングに重要なメカニズムとなっていることが考えられた。

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 21 件)

Lee JW, Yamaguchi A, Limura T. (2014) Functional heterogeneity of osteocytes in FGF23 production: The possible involvement of DMP1 as a direct negative regulator BoneKey Reports, 査読有、In Press

飯村忠浩 (2014) 骨細胞の形態と機能ダイナミズムの可視化・定量化. 実験医学増刊 査読なし 2014 年 Vol.32 (7) p93 - 98

Shimozono S, Limura T. Kitaguchi T. Higashijima S. Miyawaki A. (2013) Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development. Nature. 査読有、Apr 18;496(7445):363-6 doi: 10.1038/nature12037. Epub 2013 Apr 7. Makino Y. Kaneko K. Yamaguchi A, Limura T. (2013) Developmental biology and etiology of axialskeleton: Lessons from a mouse model of spondylocostal dysostosis and spondylothoracic dysostosis. Journal of Oral Biosciences. 査読有、(55): 175 -9. doi: 10.1007/s00774-011-0295-3. Epub 2011 Jul 16.

Sato K, Lee JW, Sakamoto K, Limura T. Kayamori K. Yasuda H. Shindoh M. Ito M. Omura K. Yamaguchi A. (2013) RANKL synthesized by both stromal cells and cancer cells plays a crucial role in osteoclastic bone resorption induced by oral cancer. Am J Pathol. 査読有、182(5):1890-9. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.038. Epub 2013 Mar 15.

Matsumoto T, Limura T. Ogura K. Moriyama K. Yamaguchi A. (2013) The role of osteocytes in bone resorption during orthodontic tooth movement. J

Dent Res. 査読有、92(4):340-5. doi: 10.1177/0022034513476037. Epub 2013 Jan 28.

Hoshino A. Ueha S. Hanada S. Imai T. Ito M. Yamamoto K. Matsushima K. Yamaguchi A, Limura T. (2013) Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts. J Cell Sci. 査読有、15;126(Pt 4):1032-45. doi: 10.1242/jcs.113910. Epub 2012 Dec 21.

Makino Y. Takahashi Y. Tanabe R. Tamamura Y. Watanabe T. Haraikawa M. Hamagaki M. Hata K. Kanno J. Yoneda T. Saga Y. Goseki-Sone M, Kaneko K. Yamaguchi A, Limura T. (2013) Spatiotemporal disorder in the axial skeleton development of the Mesp2-null mouse: a model of spondylocostal dysostosis and spondylothoracic dysostosis. Bone. 査読有、53(1):248-58. doi: 10.1016/j.bone.2012.11.033. Epub 2012 Dec 11.

Tanabe R. Haraikawa M. Sogabe N. Sugimoto A. Kawamura Y. Takasugi S. Nagata M. Nakane A. Yamaguchi A, Limura T. Goseki-Sone M. (2013) Retention of bone strength by feeding of milk and dairy products in ovariectomized rats: involvement of changes in serum levels of 1alpha, 25(OH)2D3 and FGF23. J Nutr Biochem. 査読有、24(6):1000-7. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.07.004. Epub 2012 Sep 17.

今村健志、疋田温彦、大嶋佑介、飯村忠浩 (2013) 骨・軟骨組織の生体光イメージング CLINICAL CALCIUM 査読なし 2013 年 12 月号 (Vol.23 No.12) doi: CliCa131217671773.

3. 飯村忠浩 (2013) 骨細胞ネットワークのイメージング, THE BONE 査読なし 2013 年秋号 (Vol.27 No.3) メディカルレビュー社 pp31-37

渡辺高 原田清 山口朗 飯村忠浩 (2013) 生後骨発達における Sclerostin 発現分布の時空間的变化-蛍光イメージングによる骨組織のグローバルな観察. THE BONE 査読なし 2013 年春号 (Vol.27 No.1) メディカルレビュー社 pp5-10 Limura T. Nakane A. Sugiyama M. Sato H. Makino Y. Watanabe T. Takagi Y. Numano R. Yamaguchi A. (2012) A fluorescence spotlight on the clockwork development and metabolism of bone. J Bone Miner Metab. 査読有、30(3):254-69. doi:

10.1007/s00774-011-0295-3. Epub 2011 Jul 16.

Oue E. Lee JW. Sakamoto K. Limura T. Aoki K. Kayamori K. Michi Y. Yamashiro M. Harada K. Amagasa T. Yamaguchi A. (2012) CXCL2 synthesized by oral squamous cell carcinoma is involved in cancer-associated bone destruction. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有、424(3):456-61. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.132. Epub 2012 Jul 4.

Watanabe T. Tamamura Y. Hoshino A. Makino Y. Kamioka H. Amagasa T. Yamaguchi A. Limura T. (2012) Increasing participation of sclerostin in postnatal bone development, revealed by three-dimensional immunofluorescence morphometry. *Bone.* 査読有、51(3):447-58. doi: 10.1016/j.bone.2012.06.019. Epub 2012 Jul 3.

Umehara K. Limura T. Sakamoto K. Lin Z. Kasugai S. Igarashi Y. Yamaguchi A. (2012) Canine Oral Mucosal Fibroblasts Differentiate into Osteoblastic Cells in Response to BMP-2. *Anat Rec (Hoboken).* 査読有、295(8):1327-35. doi: 10.1002/ar.22510. Epub 2012 Jun 7.

Himeno-Ando A. Izumi Y. Yamaguchi A. Limura T. (2012) Structural differences in the osteocyte network between the calvaria and long bone revealed by three-dimensional fluorescence morphometry, possibly reflecting distinct mechano-adaptations and sensitivities *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有、417(2):765-70. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.031. Epub 2011 Dec 16.

Aizawa R. Yamada A. Suzuki D. Limura T. Kassai H. Harada T. Tsukasaki M. Yamamoto G. Tachikawa T. Nakao K. Yamamoto M. Yamaguchi A. Aiba A. Kamijo R. (2012) Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development. *Mech Dev.* 査読有、129(1-4):38-50. doi: 10.1016/j.mod.2012.02.002. Epub 2012 Feb 25.

Cao L. Moriishi T. Miyazaki T. Limura T. Hamagaki M. Nakane A. Tamamura Y. Komori T. Yamaguchi A. (2011) Comparative morphology of the osteocyte lacunocanalicular system in various vertebrates *J Bone Miner Metab.*

査読有、29(6):662-70. doi: 10.1007/s00774-011-0268-6. Epub 2011 Apr 19.

中根綾子, 沼野利桂, 佐藤博紀, 高木祐三, 山口朗, 飯村忠浩 (2011) 骨の成長と代謝における概日リズムの働き 蛍光イメージングによるアプローチと展望. *日本骨形態計測学会雑誌.* 査読有 2011, 21:41-50

② 飯村忠浩, 中根綾子, 姫野彰子, 杉山真由, 山口朗 (2011) 骨の形態的解析法の進歩 骨の in vivo 蛍光イメージングの現状と展望. *日本骨形態計測学会雑誌.* 査読有、2011, 21:17-24

〔学会発表〕(計6件)

飯村忠浩「蛍光3次元計測で見る骨細胞のヘテロジェニティ」第7回骨・軟骨フロンティア(BCF)ベルサール八重洲、東京 2013年11月30日

飯村忠浩「3次元蛍光イメージングによるスクレロスタチンの時空間分布の変遷」日本歯科骨粗鬆症研究会 第11回学術総会・年会 平成25(2013)年3月2日 東京医科歯科大学歯学部特別講堂

飯村忠浩「異骨症モデルを用いた骨格発生と病態の時空間的解析」第54回歯科基礎医学会学術集会 サテライトシンポジウム6 2012年9月14日 奥羽大学

飯村忠浩、山口朗「3次元蛍光イメージングと計測で見る骨格の発生異常と骨の発達メカニズム」第30回日本骨代謝学会学術集会 若手シンポジウム基礎 2012年7月20日 京王プラザホテル

飯村忠浩「3次元蛍光イメージング法による骨発達の分子メカニズムの探索」第66回日本口腔科学会学術集会 教育研修会 2012年5月16日 リーガロイヤルホテル広島

飯村忠浩「3次元蛍光イメージングによる骨の発達メカニズムと骨代謝研究」第68回日本顕微鏡学会学術講演会 硬組織シンポジウム 2012年5月14日 つくば国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

愛媛大学プロテオサイエンスセンター
<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯村 忠浩 (Iimura Tadahiro)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
准教授 (特定教員)
研究者番号: 20282775

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし