

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 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591940

研究課題名（和文） タイムラプスイメージングによる破骨細胞の動態機能解析

研究課題名（英文） Morphological and functional analyses of osteoclast-like cells using time-lapse imaging by video-enhanced microscopy

研究代表者

星野 裕信（HOSHINO HIRONOBU）

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70293636

研究成果の概要（和文）：破骨細胞の骨吸収過程における細胞内形態の動的変化、酸分泌機構を可視化するために、安定したアクチン染色による蛍光条件の確立と空胞様構造における形態変化の画像解析を行った。骨吸収活性が高まるにつれて細胞内においてその空胞様構造の分布に変化が現れ、特に大きな細胞に偏心性に偏って分布することが確認できた。また骨吸収抑制剤であるエルカトニンの添加によりこの活性が変化することがわかった。この分布の変化は骨吸収活性の高まった破骨細胞に特有の変化であると思われる。

研究成果の概要（英文）：We established the stable fluorescent condition by actin stained osteoclast-like cells and analyzed morphological changes of vacuole structures to visualize the morphological changes of intracellular structure and acid secretion mechanism in bone resorption process by osteoclast. As the bone resorption activity was growing, it was visualized that the intracellular vacuole structures morphologically changed and were eccentrically distributed to the bigger cells. After adding elcatonin, bone resorption agent, this activity of osteoclast-like cells changed. This distribution seems to be characteristic changes in osteoclast-like cells growing the bone resorption activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：破骨細胞・骨吸収・ビデオマイクロスコープ・アクチン・顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

国内では近年原子間力顕微鏡、レーザー顕微

鏡等の技術により、培養破骨細胞の超微細形態が観察可能となっている。また国外では走査型トンネル顕微鏡を用いてより感度の高い画像が得られるようになり、破骨細胞の骨吸収過程における生理機能が明らかになってきている。しかしこれらの結果は、固定細胞の観察から得られたものであり、破骨細胞の動態機能および骨吸収能に関する研究はいまだ明らかでない部分も多い。我々はビデオ強化型微分干渉顕微鏡を用いて破骨細胞の超微小形態の変化をリアルタイムに評価する手法をすでに確立し、破骨細胞の運動機能および骨吸収能の定量化およびフィロポディアの機能の解明を行い、主として破骨細胞の運動機能からみた骨吸収活性の定量化を行ってきた (Nagafusa T, et al 2007)。今回はさらに細胞内形態および骨吸収に直接的な役割を果たすと思われる酸分泌機構を解明することにより、骨吸収に影響を及ぼすさまざまな薬剤、液性因子が破骨細胞の機能に及ぼす詳細な情報が明らかになるものと思われる。

2. 研究の目的

培養機能付き細胞タイムラプス装置 (BioStation IM) を用いて、破骨細胞の骨吸収過程においてみられる細胞骨格をなすアクチンリングおよび液胞の同定・可視化、および pH 依存性蛍光物質を用いることにより酸分泌を可視化し、骨吸収抑制剤であるカルシトニンが、これら細胞内形態および酸分泌機構にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞の採取 Akatsu らの方法に準じて ddy マウスの脛骨より骨髓細胞を得、頭

蓋骨より採取培養した骨芽細胞とコラーゲンゲル上で共存培養を 1 週間行い、破骨細胞様細胞を得る。

(2) 培養機能付き細胞タイムラプス装置による観察 破骨細胞はリン酸カルシウムコートカバースリップ上で培養を行う。培養顕微鏡 Nikon Biostation IM を用いる。Biostation IM は接眼レンズを有さない培養顕微鏡であり、視野の移動、焦点合わせはコントローラーで行い、画像の取得、機器のコントロールは PC 上の専用アプリケーションで行う。チャンバー内の培養環境は 37℃、二酸化炭素 5% 下とする。顕微鏡は位相差観察、蛍光観察が可能であり、複数の観察点で生細胞で位相差、蛍光の同時観察をおこなう。

(3) アクチン染色 アクチン染色による生きた細胞をそのまま染色する方法をおこなう。ナノモルレベルで F-actin を蛍光染色できる Alexa Fluor 488 Phalloidin を用いる。通常細胞では生きた細胞をそのまま染色する方法には適さないといわれるが、少数できたという報告がある。1 波長励起 (495nm)、一波長蛍光 (520nm) の条件を設定している。染色時間と染色濃度の設定を行い、蛍光観察にて可能な条件の確立を行う。

(4) 空泡様構造における形態変化の観察 骨吸収時に破骨細胞内で多数の空泡様構造が出現し、骨吸収活性が高まると細胞内分布に変化が現れるとされる。これをリアルタイムに解析を行う。

(5) 骨吸収抑制剤の投与による破骨細胞内の観察

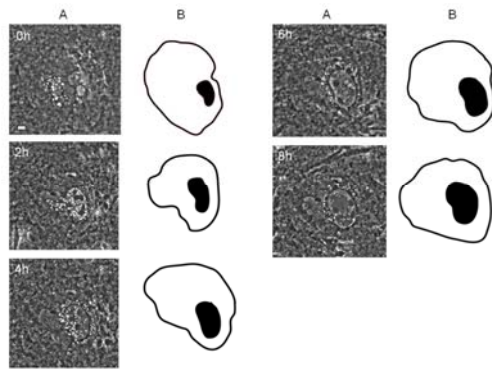
活性の高まっている状態の破骨細胞をターゲットとし、強力な骨吸収抑制剤であるカルシトニンの一種であるエルカトニンを投与し、破骨細胞内の形態的变化の様子を詳細に

解析を行う。

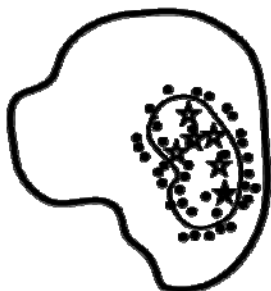
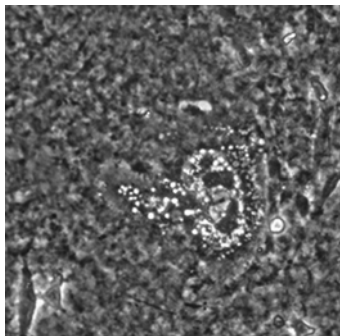
4. 研究成果

(1) 骨細胞様細胞とリン酸カルシウムコートフリーエリアの形態的観察

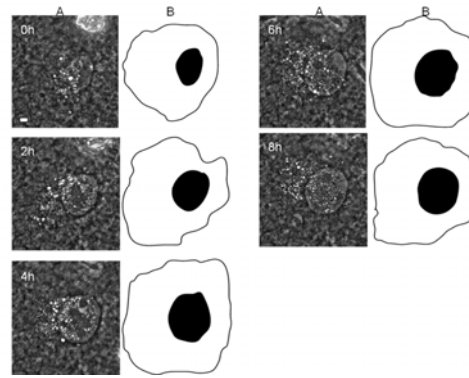
リン酸カルシウムコートフリーエリアは徐々に増大し、液胞は大きさや数を変えながらリン酸カルシウムコートフリーエリアの周辺を精力的に運動していた。液胞はリン酸カルシウムコートフリーエリアの周囲に存在し、核は集簇して極性を保っていた(図1)。またリン酸カルシウムコートフリーエリアはリン酸カルシウム基質よりも表面が平滑に観察された(図2)。



(図1)



(図2)

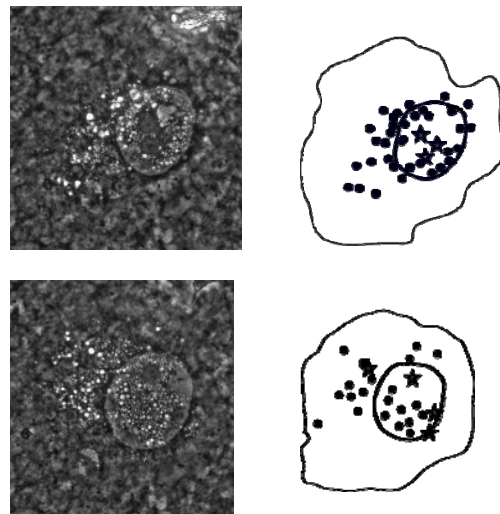


(図3)

(2) エルカトニンの骨細胞様細胞とリン酸カルシウムコートフリーエリアの形態への影響

エルカトニン添加までは単独群と差はなかった。4時間後にエルカトニンを添加すると、それ以降はリン酸カルシウムコートフリーエリアはほとんど増大しなかった(図3)。エルカトニン添加前は、核は集簇しており液胞はリン酸カルシウムコートフリーエリアの周辺に存在しているが、エルカトニン添加後は、核は離散(極性の解消)し、液胞も散在するようになった(図4)。

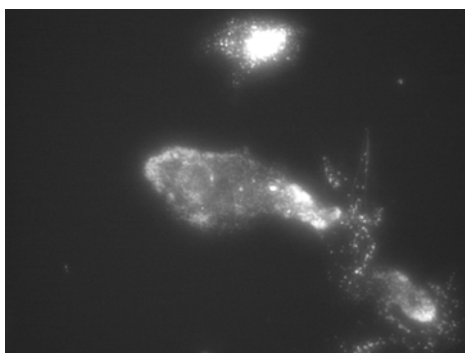
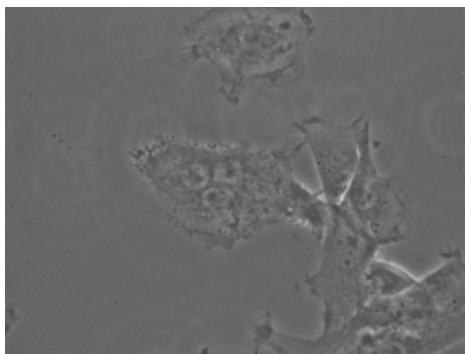
エルカトニンは骨吸収抑制剤であり、破骨細胞の機能を抑制することによってその効果を発揮するが、本結果から細胞内において核の離散と液胞の分布が変化することが破骨細胞の活性に関与していることが判明した。



(図4)

(3) 位相差顕微鏡による破骨細胞のアクチン染色の結果

位相差顕微鏡における破骨細胞の形態をそのままアレキサ 488 ファロイジン染色を行い、破骨細胞内のアクチンの局在の比較を行った。染色されたアクチンは核の周囲ではなく、細胞辺縁に局在する傾向にあった (図 5)。この形態の変化は破骨細胞の生理活性になんらかの影響を及ぼしている可能性があり、今後アクチンの形態変化と空砲様構造の局在が各種薬物に反応してどのように変化するかがわかれば、破骨細胞活性に細胞内の空砲やアクチンの局在がどのように関与しているのかをさらに詳細に解明することができる。



(図 5)

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 1 件)

Morimoto Y, Hoshino H, Sakurai T, Terakawa S, Nagano A: Quantitative evaluation of

bone resorption activity of osteoclast-like cells by measuring calcium phosphate resorbing area using incubator-facilitated and video-enhanced microscopy. *Microsc Res Tech* 72:317-22, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 裕信 (HOSHINO HIRONOBU)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70293636

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：