

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：	若手研究 (B)
研究期間：	2008～2009 年度
課題番号：	20790708
研究課題名 (和文)	動的イメージングによる破骨細胞機能の生理的制御機構の解明と新規骨疾患治療法の開発
研究課題名 (英文)	Dynamic in vivo imaging of osteoclast functions for development of novel therapeutics against bone-resorptive disorders
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 特任准教授
研究者番号：	10324758

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、生体内で骨を融解・吸収する特殊な能力をもつ破骨細胞の分化・成熟・機能に残された多くの謎を解決するために、動的イメージング技術を駆使し統合的な解明を行うと同時に、それに基づいて破骨細胞を標的とする新たな作用機序の薬物開発を行った。この結果、特に血中脂質メダイエーター-SIPが破骨細胞の遊走を制御していることを明らかにし、SIP受容体アゴニストが骨吸収を抑制することを動的イメージングにより明らかにした。本研究により、破骨細胞分化の生理的・病理的調節に関する基礎的成果に留まらず、新たな骨疾患治療薬開発に道を拓く成果がもたらされた。

研究成果の概要 (英文)：

Osteoclasts are the only somatic cells with bone-resorbing capacity, and they play a critical role not only in normal bone homeostasis but also in the pathogenesis of bone destructive disorders such as rheumatoid arthritis and osteoporosis. To reveal the process of recruitment of osteoclast precursors to bone surface, I have exploited a new experimental method using intravital two-photon microscopy for bone tissues that have been originally developed. One of the specific subjects was the migration and positioning of osteoclast precursors by a combination of lipid mediator such as SIP and bone marrow chemokines. I believe this study provided a new concept in a variety of research field, and, beyond it basic implication, the findings led to insights into human diseases and the therapeutics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：リウマチ膠原病学・骨代謝学・生理学・薬理学

科研究費の分科・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：①細胞・組織、②シグナル伝達、③医療・福祉、④薬理学、⑤トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、古い骨を壊して吸収する「破骨細胞」と、骨を新生する「骨芽細胞」のバランスの取れた働きにより新陳代謝が繰り返されているが、加齢・ホルモン異常などにより破骨細胞の機能が亢進するとパランスが骨吸収側に傾き、骨粗鬆症の発症につながる。また関節リウマチでは、関節炎局所に活性化破骨細胞が多数誘導され、骨破壊に関与している。このように、破骨細胞は骨粗鬆症をはじめとする骨吸収性疾患で主要な役割を果たしており、現在、ビスホスホネート(BP)製剤など破骨細胞を標的とした骨吸収抑制剤が多数開発・臨床応用されていた。

破骨細胞は単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞であるが、これまでの国内外での研究により、骨髄ストロマ細胞や骨芽細胞によって産生されるM-CSFやRANKLなどのサイトカインが、破骨細胞の分化・成熟に必須であること、これらサイトカインはNF- κ BやNF-ATなどの転写因子群を介して破骨細胞の分化を誘導すること、などの知見がすでに確立していた。

一方でこれまでの骨組織の研究は、硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部には、従来、生き残ったままでの観察が極めて困難であると考えられていた。実際にこれまで骨や骨髄の研究では、固定して摘出した骨を、カルシウムキレート剤に1週間ほど漬けて込んで脱灰し、切片にして観察していた。この従来法でも、骨組織内の細胞の「形態」や「分子発現」(免疫染色による)を解析することはできたが、決定的な情報が欠落していた。それは細胞の「動き」である。細胞の動きを見るためには、どうしても生きてきた細胞を生きた組織の中で観察する必要がある。特に骨髓腔のように、豊富な血管床による血流を保ったまま、そこで流入する細胞の動きを捉えることが重要な場所では、「摘出して生かした」骨組織ではなく、「生きたままの個体中」の骨組織を観察する必要があった。

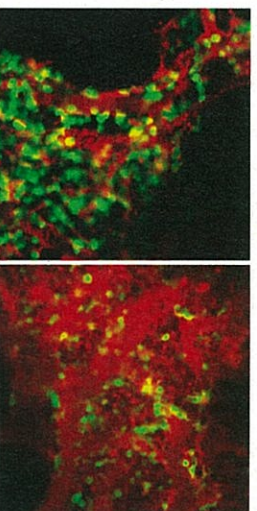
2. 研究の目的

破骨細胞分化制御において、長らく解決されていなかった重要な謎があった。それは「なぜ破骨細胞は骨表面にしかできないのか」ということであった。RANKL 遺伝子を欠損させたマウスでは、破骨細胞が見られず骨大理石病となるが、このマウスにRANKLを全身に投与すると成熟した破骨細胞ができる。このとき、破骨細胞の形成は基本的に骨表面でのみ見られ、異所性の分化は認められない。これは、骨表面には破骨細胞分化のため

の特別な環境が存在し、破骨前駆細胞のこの場所への遊走を適切に制御する機構が存在することを物語っていた。本研究代表者は2005年頃より、破骨前駆細胞の遊走・位置決め制御メカニズムを解明するために、細胞遊走を制御するケモカインや脂質メダイエーターに注目して研究を開始した。またこれらが実際の骨組織内での骨代謝回転をどのように制御しているのか、それらを標的とした新しい治療の可能性も含めて検討を行った。

3. 研究の方法

ケモカインや、細胞遊走を誘導する脂質メダイエーターは現在約50種類ほど知られている。申請者はこのうち単球系破骨前駆細胞に作用しうる30種類ほどを中心に *in vitro* でのスクリーニングアッセイを行い、破骨前駆細胞の遊走・位置決めを制御し得るいくつかの候補分子を絞り込んだ。さらに、これらの候補分子が実際の骨組織内でのどのように破骨前駆細胞の遊走を制御しているのかわかを明らかにするために、個体を生かしたままの状態、血流が保たれ、組織内でのケモカインや細胞接着因子などの微小環境が保存された状態での細胞の挙動を観察するため、研究代表者は、深部組織の観察が可能な2光子励起顕微鏡を用いて実験動物を生かしたま



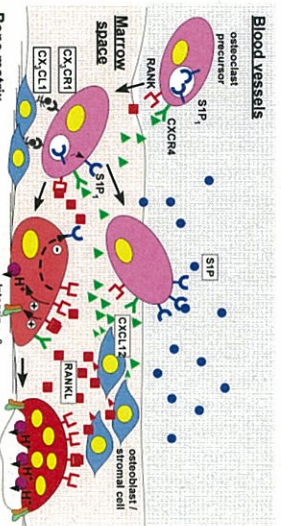
【図1】二光子励起顕微鏡を用いた生きた骨組織内のイメージングの例。血管を赤で、顆粒球(左)や破骨前駆細胞(右)を緑で、それぞれ蛍光標識している。左の状態は組織を観察する「intravital two-photon microscopy」の技術を利用して、生きた骨組織内のイメージングシステムで確立に取り組んだ【図1】。

4. 研究成果

この方法論を用いて研究代表者は、単球系破骨前駆細胞の遊走が、血中に存在する脂質メダイエーターであるスフィンゴシリン1リシ酸(SIP)によって動的に制御されていることを明らかにした(Ishii et al., Nature 2009)。さらに、SIP受容体アゴニストを血管内に投与して、破骨前駆細胞を骨表面から引き剥がし、積極的に血中への再還流を促すことにより、骨表面上の破骨細胞の数を減らし、

骨吸収を抑制することができた。これら一連の研究により、SIP などによる破骨前駆細胞の遊走・位置決めは、これまで知られていなかった破骨細胞分化・骨代謝の全く新しい調節作用点であり、かつ今後の創薬標的としても極めて有望なものであることを実証した。

この研究により、研究代表者はSIPが破骨前駆細胞の血中への「再還流因子」であることを示してきたが、その一方で、破骨前駆細胞を骨組織内へ引き寄せる「骨誘導因子」については未だ十分な解明がなされてこなかった。破骨細胞の骨誘導因子は、生理的な骨代謝のみならず、関節リウマチなどの炎症性骨破壊の際の、局所への破骨細胞の動員のメカニズムを理解するためにも極めて重要で



【図2】破骨前駆細胞の遊走を位置決めする骨誘導因子の制御機構。成熟系前駆細胞の遊走は血中のSIP、骨組織内のCXCL12・骨芽細胞が発現するCXCL12などのケモカイン・シグナルにより、巧別二調節されている(Ishii et al., *Nature*, 2009より一部改変)。

ある。研究代表者はさらに in vitro スクリーニングが破骨前駆細胞の遊走を制御し得ることを予備的に発見しており、本研究ではこれら候補分子についても in vivo での機能解析に関する予備的研究成果を得た【図2】。

本研究業績の一部は、2009年2月にNature オンライン版にて公表されて以来、国内外において大きな反響を呼んでおり、新しい骨吸収性疾患の治療への期待から、朝日・毎日・読売・産経・日経の主要新聞各誌や、Yahoo! JAPAN を始めとするインターネット上のニュースサイト、NHK 全国ニュース、海外メディアにて大々的に報道された。また Developmental Cell などの一流誌によって研究内容が紹介されている。さらには、骨のライオンライメージングを用いた新しい研究トピックについては、NHK 教育の科学番組「サイエンスZERO」で詳細に紹介されることとなった(2009年5月9日)。これらに加えて、国内外の学会・研究会において招待講演の依頼が相次いでいる他、研究成果を元にした創薬の共同開発提案も多数寄せられ、新技術を用いて新概念を明らかにした候補者の独創的な研究成果は、専門家・一般人を問わず幅広く社会に大きなインパクトを与える結果となった。

今後はこれらの成果を元に、破骨細胞(前駆細胞)の遊走を制御する新しい骨吸収抑制剤の開発を目指す。さらに、骨組織・骨髄腔は、破骨細胞以外にも、B リンパ球を始めと

する多くの免疫・血液細胞の分化機能にとつて重要な場であり、また血液幹細胞が多能性を維持する特殊な場所(ニッチ)が骨髄腔内には存在する。このため、候補者が確立した骨組織のライオンライメージングの方法論は、今後多くの医学・生物学系研究分野で強力なツールとなることが強く期待される。ライオンライメージングにより得られる新知見は、これまでの3D情報に加えて、高分解能の時間軸が加わった新次元(4D)情報であり、生命科学上の全く新しい概念の創出、および次世代の医療技術の開発に今後大きく寄与するものと確信している。

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3件：すべて査読あり)
- 1) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN. (2009) Spingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 458 (7237) : 524-528.
 - 2) Klauschen F, Ishii M, Qi H, Bajenoff M, Egen JG, Germain RN, Meier-Schellersheim M. (2009) Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nature Protoc.*, 4 (9) : 1305-1311.
 - 3) Mazzucchelli R, Warming S, Lawrence SM, Ishii M, Abshari M, Feigenbaum L, Washington AV, Warner AC, Sims DJ, Li WQ, Hixon JA, Gray DHD, Rich BE, Morrow M, Anver MR, Cherry J, Naf D, Sternberg LR, McVicar DW, Farr AG, Germain RN, Rogers K, Copeland N, Durum SK. (2009) Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice. *PLoS One*, 4(11) : e7637.

【学会発表】(計14件)

- 1) Masaru Ishii, "Dynamics of osteoclast precursor migration visualized by in vivo bone imaging: A novel point of control for bone homeostasis." The 14th International Conferences on Endocrinology 2010 (ICE2010)・サテライトシンポジウム・招待講演 (2010年3月31日・大阪)
- 2) Masaru Ishii, "Chemokine-mediated migration control of osteoclast precursors visualized by intravital bone imaging: A novel point of regulation for bone homeostasis." The 14th International Conferences on Endocrinology 2010 (ICE2010)シンポジウム講演 (2010年3月26日・京都)

- 3) 石井 優, Chemokine-mediated migration control of osteoclast precursors visualized by dynamic in vivo bone imaging: A novel point of regulation for bone homeostasis. 第 83 日本薬理学会年会・シンポジウム講演 (2010 年 3 月 16 日・大阪)
- 4) Masaru Ishii, "Chemokine and lipid mediator-mediated control of osteoclast migration visualized by in vivo bone imaging: A novel point of regulation for bone homeostasis." International Bone and Mineral Society (IBMS), Davos Workshops, 招待講演 (2010 年 3 月 14 日・ダヴォス (スイス))
- 5) 石井 優, 二光子励起顕微鏡を駆使した骨組織内のインビボ光イメージング～破骨細胞分化・骨吸収の新しい調節作用点の発見～, 第 31 日本分子生物学会大会・ワークショップ講演 (2009 年 12 月 12 日・横浜)
- 6) 石井 優, Dynamic in vivo visualization of osteoclast precursor migration in living bones elucidating a novel regulatory point for 'osteimmunology'. 第 39 日本免疫学会大会・シンポジウム講演 (2009 年 12 月 3 日・大阪)
- 7) 石井 優, スライネンゴシン1リン酸による破骨前駆細胞の遊走・位置決め制御機構～生体多光子励起顕微鏡を用いた骨組織内の in vivo イメージングより～, 第 82 回・日本生化学会大会・シンポジウム講演 (2009 年 10 月 23 日・神戸)
- 8) Masaru Ishii, Chemokine-mediated migration control of osteoclast precursors visualized by in vivo bone imaging: A novel point of control for bone homeostasis. 6th Bone Biology Forum・招待講演 (2008 年 8 月 21 日・静岡県裾野市)
- 9) 石井 優, 骨組織のライグアイメージング～その方法論と今後の応用～, 第 27 回・日本骨代謝学会・Meet-the-Expert 講演 (2009 年 7 月 24 日・大阪)
- 10) 石井 優, "Seeing is believing" ～見てみて分かった破骨細胞の遊走と位置決め制御機構～骨組織の生体二光子励起顕微鏡イメージングより, 免疫サマースクール 2009・招待講演 (2009 年 7 月 16 日・淡路)
- 11) Masaru Ishii, "Dynamics of osteoclast precursor migration visualized by in vivo bone imaging: A novel point of control for osteoimmunology." 第 3 回・GCOE 国際シンポジウム・招待講演 (2009 年 6 月 11 日・東京医科歯科大学)
- 12) Masaru Ishii, "SIP-mediated migration control of osteoclast precursors visualized by in vivo bone imaging: A novel point of regulation for bone metabolism."

PLM2009 (国際学会)・シンポジウム講演 (2009 年 5 月 27 日・東京)

13) Masaru Ishii, "Chemokine-mediated migration control of osteoclast precursors visualized by in vivo bone imaging: A novel point of regulation for osteoimmunology" 第 2 回・IFReC 国際シンポジウム・招待講演 (2009 年 2 月 11 日・大阪)

14) 石井 優, 脂質メダイエーターやケモカインによる破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決め制御～生体多光子励起顕微鏡を用いた骨組織の in vivo イメージングより～, BMB2008 (生化学・分子生物学会合同大会)・シンポジウム講演 (2008 年 12 月 10 日・神戸)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 1 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
種類：特許権
番号：特願 2009-260655
出願年月日：2009 年 11 月 16 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
石井 優 (大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授)
研究者番号：1 0 3 2 4 7 5 8

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし