

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 23 年 5 月 21 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21592350

研究課題名（和文）破骨細胞に出現する接着構造の分子解剖

研究課題名（英文）Ultra and molecular structures of the adhesive apparatus occurred in the osteoclasts

研究代表者 明坂 年隆 (AKISAKA TOSHITAKA)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：70116523

研究成果の概要（和文）：骨組織のリモデリングを担う破骨細胞の機能・形態的極性を決定する接着側細胞膜面の裏打ち構造について、細胞剥離法を用い三次元可視化による形態解析を行った。細胞-細胞外基質間接着（cell-to-matrix adhesion）の場では、アクチン細胞骨格を主体としたポドゾームが膜の裏打ち構造と一体となって空間的ネットワークを構築していた。ポドゾームの配列は翻訳後修飾を受ける微小管のアセチル/チロシン化より制御され、細胞と強固な基質との接着にはアセチル化されたチューブリンからなる微小管が分布していた。また膜面に出現する特異なクラスリン被覆シートはタイトな細胞接着と関連して、クラスリン被覆膜がもつ本来のクラスリン依存性エンドサイトーシス以外の機能的役割を示すと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Osteoclasts are specialized in cells that play a central role in bone remodeling. Polarized osteoclasts are equipped with specialized structures called podosomes, dynamic actin rich adhesions, which distribute over the entire ventral membrane. To explore their cytoplasmic and membrane cytoskeletal organizations, we used a three-dimensional (3D) ultrastructural approach to visualize employed a method of “unroofing”. Podosomal cytoskeletons are incorporated into a dense network of actin cytoskeletal organization in the lamellipodium. Detyrosinated or acetylated tubulin was detectable in the peripheral cytoplasm of the matured osteoclasts. Posttranslational modifications of microtubules may correlate with characteristic changes in podosome dynamics. On the ventral adherent membranes, an extensive flat clathrin lattice has been shown. Although clathrin-dependent endocytosis is the major pathway for the uptake of nutrients in eukaryotic cells, recent evidence shows that some flat clathrin plaques are apparently restricted to the adherent membrane which may reflect cell adhesion to the substrate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1400000	420000	1820000
2010年度	1200000	360000	1560000
2011年度	800000	240000	1040000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：基盤研究C

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞、ポドゾーム、接着構造、細胞膜面、細胞剥離、三次元可視化

1. 研究開始当初の背景

生体における骨組織は一見すると変化の乏しい静的な組織と思われるが、骨芽細胞と破骨細胞に代表される骨組織の構成細胞群によって骨形成と吸収が一定のサイクルで常時進行するリモデリングが絶えず繰り返されているダイナミックに変動する組織で間葉系幹細胞に由来する骨芽細胞に対して破骨細胞は単球-マクロファージ系の血液幹細胞に由来する多核、巨細胞で、その機能としての骨基質吸収により血清中のカルシウムレベルを上昇させてカルシウムホメオスタシスを保つことにある。この骨吸収機能は骨芽細胞をはじめとする骨髄に存在する細胞群とともにさまざまな局所・全身的因子によって制御されており、一連の骨吸収過程では破骨細胞が骨表面に接着して骨面との間に微小閉鎖環境を成立させることが必須条件となる。この細胞接着については細胞間 (cell-to-cell) の関係で成立するデスモゾーム、タイト、ギャップの結合などの接着構造が広く知られているが、細胞-細胞外基質 (cell-to-matrix) 間の接着についてはその構造・機能について不明な点が数多く残されている。細胞-細胞外基質間に成立するフォーカルアドヒージョン (focal adhesion) ではよく発達した束状アクチン線維からなるストレスファイバーと膜面との関連で成立

しているが、破骨細胞にはそれらが欠如し代わりに、同様にアクチン線維の豊富なポドゾーム (podosome) とよばれる特有な接着構造が出現してくる。ポドゾームはフォーカルアドヒージョンの一変形であると考えられているが、その分子構成や分単位で変動する動的構造を制御するシステムには相違点も多い。

2. 研究の目的

破骨細胞に特徴的なポドゾーム構造は接着側細胞膜に付随して出現し細胞質に面した基質側細胞膜面に形成される細胞骨格と密接に関係する。またこの領域の細胞膜は細胞内外の双方向の物質の流れ、シグナル伝達など細胞極性を際立たせる場を提供している。このような領域で細胞膜の細胞質表面に密着して存在し、細胞骨格や種々のタンパク質からなる膜の裏打ち構造の空間的広がりを持った構造を超微構造レベルで観察するには従来の超薄切片法、フリーズフラクチャーやディープエッチングなどの電子顕微鏡法では狭い断面、脂質二重層の内面又は極限られた領域でのみ膜面が露出されるだけで広範囲な細胞質に面した膜表面の観察には不向きであり新たなアプローチが必要になる。そこで膜の裏打ち構造を広範囲に観察する手法として細胞膜剥離法 (shearing open,

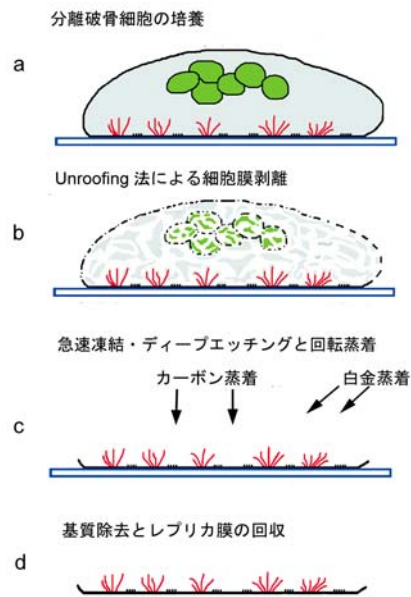
lysis-squirting あるいは unroofing と呼ばれている) が開発され、これまで様々な種類の細胞で報告がなされているが、この手法は培養条件下の細胞でのみ有効である制約がある。機能的、構造的にも極性をもった *in vivo* での典型的な破骨細胞とガラスやアパタイト上で培養する *in vitro* 条件下でもともに接着構造に関しては共通の事象として再現できる。

本研究ではこれまで技術的な制約で困難であった分離、培養した破骨細胞の接着側細胞膜の細胞質面の裏打ち構造について、その空間的解析を主として細胞膜剥離法と急速凍結・ディープエッチングレプリカ法を用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞を剥離して接着側の細胞膜面を観察しようとする最初の試みは 1975 年に Mazia らのグループによって報告されている。いずれも接着性を高めた人工基質面に細胞を接着させ、低張緩衝液の水流によって細胞膜面を露出させる手法を用いている。その後、改良が加えられ緩衝液のジェット水流や超音波によるマイクロキャビテーション効果によって細胞膜面を露出させ、急速凍結・ディープエッチングレプリカ法を組み合わせることで大幅に分解能を向上させて解析することが可能となった。検索対象となる細胞はウサギ骨髄から分離、カバーガラス又は Biocoat (合成リン酸カルシウムアパタイトでカバーガラスをコートした上で 1~2 日間培養したもの) を用いた。通常細胞膜剥離法を用いるとき、基質面に試料となる細胞をアルシアンブルーや poly-L-lysine を用いて基質面に結合させる処置が必要になることがあるが、破骨細胞は本来基質面に強く結合する性質があるのでこの処理は不必要となる。培養細胞は培

養液から人工細胞質緩衝液中に移し、20 ml プラスチックシリンジを用いて基質上の細胞にジェット水流を吹き付けるか、または超音波細胞破碎装置に取り付けたホーン型マイクロチップによる低出力超音波マイクロキャビテーション効果によって背側細胞膜、細胞質の大部分を吹き飛ばし、細胞膜の試料を調製した。このような細胞膜剥離処理にかかる時間は 10 数秒で終わらせることができる。その後のディープエッチングまたはフリーズドライ時の緩衝液の塩の析出を防ぐため、蒸留水による短時間の洗浄後に液体窒素温度に冷却した純銅ブロックに圧着させる急速凍結固定を行った。



免疫標識を行う場合には、剥離後 0.1% glutaraldehyde による短時間の化学固定が必要となり、抗体と金コロイド標識をすれば金コロイドが白金レプリカ上でも高コントラストを示しその局在が明らかにできる。ディープエッチングまたはフリーズドライ処理の後白金を 2 nm 厚になるよう蒸着源から試料面に 10~20 度の角度で回転蒸着し、カーボン蒸着でレプリカを補強した。レプリカ膜はガラス面に培養させた細胞では比較的

容易に剥がれるが、アパタイト上で培養した細胞ではアパタイトを無機酸 (0.1M 塩酸) または EDTA で溶解させるステップが必須となり、続いて次亜塩素酸による有機物の除去処理を行い蒸留水による洗浄後、フォルムバル支持膜を張った 75 メッシュのグリッドに回収して透過型電子顕微鏡で観察した。観察時にはゴニオメーター装置を用いて ±10～20 度の傾斜をつけてステレオペア撮影を行った。三次元可視化にはステレオペア、アナグリフ、電子線トモグラフィーの手段が利用されるが、2 枚のステレオ写真から Alicona 社製「Mex ver. 5」のソフトを用いてコンピュータ上で簡易的に三次元構築を行った。

4. 研究成果

(1) 接着膜面の細胞質側表面の膜の裏打ち構造とポドゾーム

接着構造としてのポドゾームは破骨細胞のみならずマクロファージ、樹状細胞、oncogene で形質転換させた線維芽細胞、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞など多様な細胞に出現してくることが知られている。アクチン染色で見たポドゾームの蛍光像は、単独のものではドット状を呈しクラスターからリング、ベルト状へと細胞機能に応じて変化し、これらの変化は細胞の分化・成熟と骨吸収活動を反映したものとなっている。ポドゾームの形成は全く新規にアクチンの重合から de novo 形成されるほか、既存のものから分裂して形成される 2 つの経路がある。ポドゾームの half-life は分単位のダイナミックに変貌する構造である。ポドゾームはアクチン線維を主体とした構造でその中心 (コア) 部と周辺 (リング) 部の 2 つの異なったアクチン細胞骨格の配列を伴うサブドメインから構成されている。ポドゾームコアでは密に集中し

た分岐アクチン線維から成るが、そのリング部 (アクチンクラウドとも呼ばれる) では密度も疎で比較的長いケーブル状のアクチン線維が分布している。典型的なフォーカルアドヒージョンの構成アクチン関連蛋白は 50 種類以上のものが報告されているが、ポドゾームにおいてもコアとその周辺リング部とは明らかに異なりコア部には WASP, Arp 2/3, dynamin 2, cortactin, vimentin, fimbrin, Pyk 2 等が、またリング部には paxillin, talin, vinculin, myosin 等が局在することが明らかになっている。そのうちリング部に存在する G-actin がポドゾームのアクチンネットワーク形成のための供給源となっている。中間径フィラメントや微小管はポドゾーム本体構造の構成要素とはならずポドゾーム形成後に近傍に位置して相互にポドゾームの離散・集合に影響を与えられている。F-アクチン染色蛍光像では大小サイズの混在したポドゾームの一つ一つがドット状を呈するが、アクチン関連蛋白との二重染色ではポドゾームは円錐形の底辺を細胞膜面に向けた形状を示し底辺のサイズはおおよそ直径 0.5～3 μm 、高さも同等な二重構造が識別できる。細胞膜剥離後の電子顕微鏡観察からはポドゾームのアクチン細胞骨格は膜の裏打ち構造としてのアクチン線維と連結しそれぞれの線維は膜面顆粒を介して膜面に繋ぎ止めらフォーカルアドヒージョンの膜面とのコンタクト部で観察されるのと同様であった。通常の細胞膜面に密着する裏打ち構造としてのアクチン線維はトモグラフィーによる解析から膜面との間隔が 1～2 nm であると報告されている。ジェット水流または超音波マイクロキャビテーションによる細胞膜剥離法ではポドゾームコア部やポドゾームが集合してシーリングベルトを構成するアクチン線維に結合するいろいろな

関連蛋白質を取り除くことが困難で、クリアな線維構造として殆ど見られない。逆に強固に結合している成分がポドゾーム構造と一体となって重要な役割を演じていると考えられる。このことは triton X-100 などの界面活性剤処理で取り除くことができることから明らかである。それに対して周辺の裏打ち骨格では G-アクチンからなるおおよそ 5 nm 周期の明瞭な線維構造を呈した。またポドゾームを構成する細胞骨格は膜の裏打ち構造とともに剥離によるシアストレスに抵抗し、強固に膜面に結合していることを示している。または剥離の程度を強くすると殆ど膜面構造は消失するが、弱いと細胞質の構造が多く残り接着側細胞膜が露出されないなど現在の技術では定量的に調節することは不可能である。私たちのこれまでの検索ではアクチン線維の極性はコア部では膜面に重合端のプラスエンドが向くが、クラウド部では中心に向かっていて。このことはアクトミオシン系のもとでポドゾーム領域の膜面ではトレッドミル機構が働いて機械的な力が膜面に伝達されることになる。その結果、効率的にポドゾーム領域膜に存在する膜貫通性のインテグリンを介した接着メカニズムが働くことが考えられる。

通常培養条件を 2 次元ではなく 3 次元的に培養基質と接触するようにすると細胞形態に大きな変化が現れることが判っている。2 次元培養ではラメリポダイウムを伴い基質上で広く伸展する線維芽細胞が 3 次元培養ではラメリポダイウムを欠如し、発達の悪いストレスファイバーをもつ細長い紡錘型の本来の in vivo にある形に近い細胞形態へと変化する。また破骨細胞と同様なポドゾームを形成するマクロファージは 3 次元培養下では単独のポドゾームではなく細胞の突出部にクラスター状に現れる特徴があると

いう。しかし破骨細胞では接着する相手となる骨基質とは in vivo においても 2 次元 in vitro で再現される状態と同様に、cell-to-matrix の関係が成立するので 2 次元培養でもより in vivo 状態に近い環境で解析できる利点をもっている。

細胞膜剥離により表される破骨細胞の接着側細胞膜には 2 つのタイプのクラスリン被覆、ピットとシート、が出現してくる。接着側膜面にはカベオラは観察されなかった。破骨細胞をカバーガラスまたはアパタイト上で培養しても同様に広範囲にクラスリン被覆シートが出現したがクラスリンピットはポドゾーム近傍の限られた場所に出現するのみであった。ポドゾーム領域に出現するクラスリン被覆ピットはポドゾーム膜に存在するインテグリンのリサイクリングに関わるのか、またシグナル伝達の一環であるのか想像の域を出ない。大部分のクラスリン被覆がピットや小胞形成に至らずシート状になったままの”frustrated endocytosis”の状態にあり、強固に基質に接着した細胞膜ではクラスリン依存性エンドサイトーシスのプロセスが抑制されることを示している。アクチンベルトで囲まれた吸収窩領域では分解産物取り込みのためにクラスリン被覆介在エンドサイトーシスの頻度が高まることなく、アパタイトにクラスリン被覆シートが残存していた。アパタイト表面と密着するクラスリン被覆部ではアパタイト表面の分解が及ばず、その結果平滑面を呈したままの無傷のアパタイトが保存されていた。このことは吸収窩内でもクラスリン依存性エンドサイトーシスによって分解された細胞外基質を細胞内に取り込むメカニズムが働いていないことを示している。また破骨細胞で観察されるようにクラスリン被覆シートの存在は細胞骨格の関与しない基質面との接着機能

が働いていることを示しており、同様な報告が培養上皮細胞における cell-to-matrix adhesion でなされている。クラスリン依存性エンドサイトーシスに必須の AP-2 を欠如させてクラスリン被覆シートを形成させなくすると細胞運動が活発化するとの報告もありクラスリン被覆シートの出現は基質間との接着の強固さと結びついているといえる。少なくとも細胞内に取り込みピット形成が起こるポドゾーム領域にはクラスリン、ダイナミン、アクチン、ARP2/3 の局在が示されているが、クラスリン被覆シートが出現する領域にはそれらの裏づけが欠けている。これらのクラスリン被覆シートは破骨細胞に特異的に出現するわけでも無く他の細胞でも報告されている。しかし破骨細胞はもとより一般的にクラスリン被覆ピット・小胞を作らないシートの機能的役割については解明すべき点が数多く残されている。

(2) 破骨細胞の接着構造研究の現状と今後の研究展開

ポドゾームの機能的役割について破骨細胞ではまず骨吸収が考えられるがそれ以外の細胞については血管内皮細胞による血管新生、血管平滑筋細胞におけるアテローム性動脈硬化、がん細胞での組織浸潤・転移に関与することが解明されつつある。破骨細胞では骨面への接着構造として注目されるようになったポドゾーム研究が端緒となり Rous sarcoma virus (RSV) 形質転換した線維芽細胞、単球性白血病細胞、悪性リンパ腫におけるB型リンパ球に類似な接着構造インベドポディア (invadopodia、浸潤突起) として区別され、細胞の遊走・転移に接着構造が密接な関係があることが想定されるようになった。

ポドゾームは接着構造としての機能のみならずそれらの膜にMT 1 (membrane-type

1)-MMPや MMP-9 などのmetalloproteinaseの局在が証明されるに至り、細胞外基質の分解にもかかわることが判ってきた^{22, 23)}。アクチンが豊富に局在する接着構造のうち破骨細胞をはじめ単球-マクロファージや樹状細胞由来の細胞に見出されるものをポドゾームと、蛋白分解性活性を有する浸潤性がん細胞やがん遺伝子で形質転換した細胞を基質上で増殖させたときに細胞外基質に突出したポドゾームに類似した構造をインベドポディアと呼び区別される。当初、RSV形質転換線維芽細胞で見られた接着構造をポドゾームと見なしたが今となってはインベドポディアとすべきであったかもしれない。しかしポドゾームがインベドポディアの前駆体であるのかどうかはまだ明確ではなく、ポドゾームとインベドポディアは構造・機能上も共通性も多く2つを明確に区別することは困難な状況となっている。元来、細胞はこの2つの類似したポドゾーム/インベドポディア両方を形成する能力が備わっており、周囲の環境からのシグナル伝達の違いによってどちらを形成するのか作り分けているのかもしれない。ガラス面上で培養した破骨細胞のポドゾームと、アパタイトなどの石灰化基質上で培養したときに出現してくるシーリングゾーンとの互換性がこのことを示唆している。

破骨細胞が血液幹細胞に由来する前駆破骨細胞として血管から脱け出て組織中を移動し骨表面に到達するまでの経路をたどり、成熟破骨細胞となって骨の分解・吸収に携わる過程とがん細胞の組織浸潤・転移の間で起こる cell-to-matrix の相互作用に共通性を見出すことができる。別の側面からがんの増殖は血管新生に依存することから血管内皮細胞に形成されるポドゾームを抗体療法のターゲットとしてピンポイントで働かなく

して、内皮細胞の遊走能を喪失させ血管新生を妨げることが *in vitro* で明らかにされている。また逆に、X染色体連鎖性劣性原発性免疫不全症と知られる Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は WAS 遺伝子の突然変異で、その結果コードされる WAS 蛋白によってマクロファージや樹状細胞のポドゾーム形成が障害されることに原因がある。事実マクロファージや破骨細胞のポドゾームにも局在が証明されており、細胞が持つポドゾームの役割には功罪両面を併せもっている。

破骨細胞の接着側細胞膜の裏打ち構造を unroofing 法によって超微構造レベルで空間構造解析することが可能となった。アクチン細胞骨格を主体とするポドゾーム構造と膜の裏打ち構造との関連を明らかにすることができた。また膜面にはクラスリン被覆領域がピット形成するものとシート状に残るものが出現した。クラスリンピット・小胞の存在はすべての真核細胞に備わったクラスリン依存性エンドサイトーシスのプロセスで細胞外からの物質の取り込み、細胞表面の受容体の取り込みによるダウンレギュレーションなどさまざまな細胞機能の発現の場となっている。しかし接着側膜面に出現する”frustrated endocytosis”状態にあるクラスリン被覆シートが何らかの形で細胞接着にかかわり細胞運動を妨げる働きが考えられるが、その正確な機能と回収メカニズムについては不明である。

単に生理学的現象としての破骨細胞に出現するポドゾーム/インベドポディアがもつ接着、基質分解能メカニズム解明のための研究が予想を越えた拡がりで見展開されてきた。さらにそれらが持つ cell-type-specific variation によって新たなカテゴリーの拡大が予想される。細胞と細胞外マトリックスとの生物学的現象の理解は生理的側面のみな

らず病理的側面も併せ持ち、ポドゾーム/インベドポディアをモデルにアクチン細胞骨格のダイナミズムを解き明かす一手段として高い空間・時間分解能を持つ顕微鏡的手法で更なる解析を目指したい。

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)

- ①明坂年隆 (単著) 細胞膜剥離法で明らかになる培養破骨細胞の接着側細胞膜面の裏打ち構造 顕微鏡、査読有、2012、47 巻、pp. 38-43
- ②Akisaka T 他 2 名、Differential distribution of posttranslationally modified microtubules in osteoclasts. J Histochem Cytochem 査読有、2011、Vol. 59、pp. 630-638
- ③明坂年隆 (単著) 培養破骨細胞における接着側細胞膜面の三次元可視化、The Bone、査読無し、2011、25 巻、pp. 183-187

[学会発表] (計 8 件)

- ① 明坂年隆、破骨細胞に現れる non-centrosomal 微小管、第 51 回日本歯科基礎医学会、2009、9. 1、新潟コンベンションセンター (新潟)
- ②明坂年隆、HMM 修飾による培養破骨細胞におけるアクチン線維の構成と極性についての凍結レプリカ超微構造解析、第 52 回日本歯科基礎医学会、2010、9. 21、タワーホール船橋 (東京)
- ③明坂年隆、アパタイトペレット面に吸収窩を形成する培養破骨細胞のポドゾームにおけるアクチン線維の構造とその極性、第 70 回日本解剖学会中部支部学術集会、2010、10. 16、じゅうろくプラザ (岐阜)
- ④明坂年隆、培養破骨細胞に出現するフリー微小管、第 115 回日本解剖学会、2010、3. 28、岩手県民会館 (盛岡)
- ⑤Akisaka T, The polarity of actin filaments within the podosome as osteoclast adhesion structures. 第 88 回日本生理学会・第 116 回日本解剖学会合同大会、2011、3. 30、パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑥明坂年隆、細胞剥離法を用いた凍結技法と電顕細胞化学、第 52 回日本組織細胞化学会、2011、9. 24、金沢大学 (金沢)
- ⑦明坂年隆、アパタイトペレット面に吸収窩を形成する培養破骨細胞の膜面構造、第 71

回日本解剖学会中部支部学術集会、
2011, 10. 15、名古屋大学（名古屋）

- ⑧明坂年隆、アパタイトペレット面に吸収窩
を形成する培養破骨細胞の膜面の裏打ち
構造、第 117 回日本解剖日本学会、2012,
3. 28、山梨大学（甲府）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明坂 年隆 (Akisaka Toshitaka)
朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：70116523