

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 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：23390368

研究課題名(和文) 骨リモデリング機構解明のための革新的蛍光イメージングシステムの開発

研究課題名(英文) Development of advanced fluorescent imaging systems for the study of bone remodeling

研究代表者

今村 健志 (Imamura, Takeshi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70264421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：骨リモデリングにおける骨吸収から骨形成へのカップリングの分子メカニズムを明らかにする目的で、生きているマウスの中で、骨芽細胞と破骨細胞の細胞動態、細胞分化とアポトーシスを可視化できる蛍光イメージングシステムの開発した。骨髄内細胞間相互作用を蛍光観察可能なシステムを構築し、必要なトランスジェニックマウスを作製・準備し、*in vitro*と*in vivo*で骨芽細胞と破骨細胞の蛍光観察を試みた。破骨細胞に関しては、破骨細胞活性を赤色蛍光で可視化するトランスジェニックマウスから採取した細胞および*in vivo*で脛骨骨髄の蛍光インビロイメージングをおこない、破骨細胞の蛍光シグナルを検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular mechanisms of coupling between bone formation and resorption during bone remodeling, we tried to establish intravital fluorescent imaging system by which cell behavior, cell differentiation and apoptosis of osteoblasts and osteoclasts can be examined *in vivo*. In the present study, we established *in vivo* fluorescent imaging modality and generated several transgenic mice for imaging of osteoblasts and osteoclasts. Using CatK-tdTomato-Tg mouse, we could visualize osteoclast *in vitro* and *in vivo*.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：バイオテクノロジー シグナル伝達 遺伝子 タンパク質 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって、成長し、維持される。骨吸収から骨形成への移行過程をリモデリングといい、吸収から形成は共役(カップリング)しているために骨量は一定に保たれており、そこに関わるシグナルとして Eph-ephrin 両方向性シグナルなど一部の分子の存在が明らかにされつつあるが、その全体像はよくわかっていない。一方、この骨芽細胞と破骨細胞の微妙なバランスは、細胞分化と細胞死(アポトーシス)によっても厳密に制御され、特に、骨リモデリングにおいては、破骨細胞のアポトーシスに引き続き、骨芽細胞の分化がおこり、骨形成が進行すると考えられているが、そのメカニズムの詳細は不明である。

in vivo 蛍光イメージングは最近注目されている技術で、生体内で起こる様々な生命現象を非侵襲的に外部から細胞または分子レベルで捉えて画像化して解析する手法であり、生命現象を統合的に理解するために必須のテクノロジーである。特に、近年、新しい蛍光蛋白質の発見や近赤外蛍光プローブ作製技術の進歩、さらにレーザーや蛍光顕微鏡などの機器の性能の向上により、様々な生命現象を可視化できるようになり、その有用性が期待されている。研究代表者は、すでに生きているマウスにおいてがん細胞や血管新生(*Cancer Sci*, 2009)を可視化し(図 1)、さらに細胞周期(*Cell*, 2008)(図 2)やシグナル伝達(*Oncogene*, 2008)を可視化することに成功している。

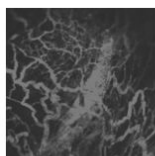


図 1 がんの血管新生の生体蛍光イメージング

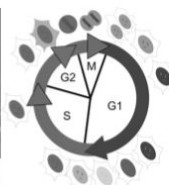


図 2 細胞周期を可視化する Fucci システム (G1期は赤でS/G2/M期は緑)

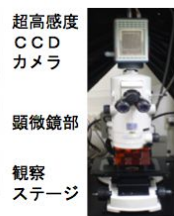


図 3 新規 *in vivo* 蛍光実体顕微鏡

2. 研究の目的

本研究計画において、研究代表者は、骨リモデリング機構の解明には、最先端の *in vivo* 蛍光イメージング技術を駆使して動物が

生きてまま、骨芽細胞と破骨細胞のカップリングにおける細胞分化とアポトーシスの時空間的相互作用を明らかにすることが必要と考えた。骨は高度に石灰化した硬組織であり、蛍光イメージングには不向きな組織であるが、研究代表者が独自に開発した新規 *in vivo* 蛍光実体顕微鏡(図 3)を駆使し、イメージングマウスに導入した各種骨リモデリングモデルを用いて、骨芽細胞と破骨細胞の細胞分化とアポトーシスのダイナミクスを全身でイメージングし、カップリングを司る細胞・分子間の緊密なコミュニケーションを統合的に解析する。

3. 研究の方法

本研究課題では、骨吸収から骨形成へのカップリングの分子メカニズムを明らかにする目的で、革新的蛍光イメージングシステムを開発し、1) Col1-red トランスジェニックマウス、CatK-red トランスジェニックマウスの作製、2) SCAT3.1 トランスジェニックマウスから得られた骨芽細胞と破骨細胞を用いた、*in vitro* アポトーシスイメージング、3) 骨芽細胞と破骨細胞の細胞分化とアポトーシスの *in vitro* タイムラプスイメージング、4) 細胞分化イメージングマウスと SCAT3.1 トランスジェニックマウスを掛け合わせたマウスを用いた骨折モデル、骨粗鬆症モデル、骨転移モデルおよび BMP による骨再生モデルにおける破骨細胞の分化とアポトーシスの経時的イメージング、5) 4D イメージング、イメージング画像の定量化と遺伝子導入や各種薬剤投与の効果の検討、の具体的な 5 点に焦点を絞って研究を進めた。

4. 研究成果

本研究課題では、骨リモデリングにおける骨吸収から骨形成へのカップリングの分子メカニズムを明らかにする目的で、生きているマウスの中で、骨芽細胞と破骨細胞の細胞動態、細胞分化とアポトーシスを可視化できる蛍光イメージングシステムを開発することを主体に研究を進めた。

「Col1-red トランスジェニックマウス、

CatK-red トランスジェニックマウスの作製」については、まず、骨芽細胞特異的 I 型コラーゲン (Col1) プロモーターの下流で Cre を発現するトランスジェニックマウスと Cre によって mCherry の発現が誘導される flox マウスを掛け合わせて、骨芽細胞分化を赤色で可視化するトランスジェニックマウス (Col1-red Tg mouse) を作製したところ、骨芽細胞分化に伴う mCherry の蛍光強度が弱く、*in vivo* での蛍光検出が困難であることがわかった。そこで mCherry 以外の赤色蛍光タンパク質を検討したところ、tdTomato がより明るいことがわかったので、Cre によって tdTomato の発現が誘導される flox マウスを上記掛け合わせに利用した Col1-tdTomato-Tg mouse を作製し、その *in vivo* での蛍光検出と有用性を確認した。さらに、破骨細胞活性を可視化するために、破骨細胞特異的カテプシン K (CatK) プロモーターの下流で Cre を発現するトランスジェニックマウスと Cre によって tdTomato の発現が誘導される flox マウスを掛け合わせて、破骨細胞分化を赤色領域の蛍光で可視化するトランスジェニックマウス (CatK-tdTomato-Tg mouse) を作製した。

「SCAT3.1 トランスジェニックマウスから得られた骨芽細胞と破骨細胞を用いた、*in vitro* アポトーシスイメージング」については、破骨細胞特異的カテプシン K (CatK) プロモーターの下流で Cre を発現するトランスジェニックマウスと Cre によって SCAT3.1 の発現が誘導される flox マウスを掛け合わせて、破骨細胞特異的に SCAT3.1 を発現するトランスジェニックマウス (CatK-SCAT3.1-Tg mouse) を作製した。さらに、マウスから初代培養骨芽細胞を採取して骨芽細胞分化培地および BMP 添加による *in vitro* 骨芽細胞分化実験とマウスから骨髄細胞を採取して M-CSF と RANKL 添加による *in vitro* 破骨細胞分化実験の至適条件を検討した。

「骨芽細胞と破骨細胞の細胞分化とアポトーシスの *in vitro* タイムラプスイメージング」については、前述の骨芽細胞を可視化する Col1-tdTomato-Tg mouse マウスから初代培養骨芽細胞を分離し、*in vitro* で骨芽細胞を可視化することに成功した。また、破骨

細胞については、破骨細胞活性を可視化する CatK-tdTomato-Tg mouse マウスから骨髄細胞を採取し、M-CSF と RANKL 添加による *in vitro* 破骨細胞分化実験をおこなったところ、破骨細胞分化に伴う tdTomato の蛍光シグナルを確認した。さらに、*in vivo* において、CatK-tdTomato-Tg mouse 産仔の脛骨骨髄の蛍光インビボイメージングをおこない、内骨膜付近に tdTomato の蛍光シグナルを発する破骨細胞様細胞を確認した。

「細胞分化イメージングマウスと SCAT3.1 トランスジェニックマウスを掛け合わせたマウスを用いた骨折モデル、骨粗鬆症モデル、骨転移モデルおよび BMP による骨再生モデルにおける破骨細胞の分化とアポトーシスの経時的イメージング」については、頭蓋骨への RANKL 投与実験、OVX による骨粗鬆症モデルおよびヒト乳がん骨転移モデルの条件検討をおこない、病理組織学的検討をおこなった。

「4D イメージング、イメージング画像の定量化と遺伝子導入や各種薬剤投与の効果の検討」については、まず、生きているマウスの中で、骨芽細胞と破骨細胞の細胞動態、細胞分化とアポトーシスを可視化するために生体蛍光イメージング機器の構築は完了した。具体的には、蛍光ズーム顕微鏡を基本とした macro-scale の生体蛍光イメージングシステム、および共焦点レーザー顕微鏡または 2 光子励起顕微鏡を基本とした micro-scale 生体蛍光イメージングシステムと両者の融合タイプの機器を整備した。さらに、2 光子励起顕微鏡を用いて、3D 構築画像の経時観察、リアルタイム観察をおこなったが、3D 画像を構築する過程において、組織の膨張や作製時間の問題用のために、視野のズレが起こることが明らかになり、マウスの固定装置を含めたステージ周辺機材、麻酔維持管理に改良を加えた。

以上、骨髄内細胞間相互作用を蛍光観察可能なシステムを構築し、必要なトランスジェニックマウスを作製・準備し、*in vitro* および *in vivo* で骨芽細胞および破骨細胞の蛍光観察を試みた。特に破骨細胞に関しては、破骨細胞活性を赤色蛍光で可視

化するトランスジェニックマウスから採取した細胞および *in vivo* で脛骨骨髄の蛍光インビボイメージングをおこない、破骨細胞の蛍光シグナルを検出することに成功した。

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1件)

1. Toki F, Honkura N, Shirakata Y, Imamura T, Higashiyama S, Nanba D: Second Harmonic Generation Reveals Collagen Fibril Remodeling in Fibroblast-populated Collagen Gels. *Cell Struct Funct* 38: 227-236, 2013 (査読有り)

〔学会発表〕(計1件)

1. 今村健志: 生体蛍光イメージング技術が拓く次世代骨研究戦略、第55回歯科基礎医学学会学術大会・総会、2013年9月21日、岡山コンベンションセンター、岡山市

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 健志 (Imamura Takeshi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70264421

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし