

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790248

研究課題名（和文）生体イメージングによる骨代謝制御のダイナミクス解析法の開発

研究課題名（英文）In vivo imaging of the dynamics of the regulation of bone metabolism

研究代表者

藤森 さゆ美 (FUJIMORI SAYUMI)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員（常勤）

研究者番号：20589717

研究成果の概要（和文）：

実際の骨組織における骨芽細胞と破骨細胞の細胞動態については、これまでほとんど分かっていない。本研究では、生きたマウス骨組織で破骨細胞・骨芽細胞により執り行われる骨リモデリングを動的に可視化することにより、骨の恒常性維持および骨疾患発症メカニズムを時空間的な細胞動態解析から解明することを目的とし、二光子励起顕微鏡を用いて、生理的条件下および病的条件下における破骨細胞と骨芽細胞の時空間的動態変化について解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Little is known about the cellular behavior of osteoblasts and osteoclasts in bone tissue in vivo. To elucidate the mechanisms of the maintenance of bone homeostasis and the pathogenesis of bone diseases by visualization of the dynamics of bone remodeling in live bone tissues, we performed intravital two-photon imaging of osteoblasts and osteoclasts in the mouse calvarial bones in the physiological and pathological conditions such as osteoporosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：

骨芽細胞・破骨細胞・骨リモデリング・細胞間相互作用・イメージング

1. 研究開始当初の背景

正常な骨量を保つには、これら破骨細胞と骨芽細胞の機能的なバランスの維持が不可欠であり、このバランスが破綻すると、骨粗鬆症をはじめとする様々な骨代謝性疾患が発症する。それ故、これまで骨組織の解析は、破骨細胞と骨芽細胞の両面から試みられ、これら細胞の生体内における機能的な役割については、固定した骨組織を用いた組織学的解析や、骨髄などから単離した各細胞培養系を用いた解析結果、また、特定の遺伝子を導入または欠損させた遺伝子改変マウスを用いた各種解析結果を基に、多くの疑問点が少

しずつ解明されている。しかしながら、実際の骨組織における破骨細胞と骨芽細胞の機能は、これらの静的な解析結果を統合した結果推察されるものであり、実際の生きた骨組織内におけるこれら細胞の時空間的な相互作用についてはいまだ不明な点が多い。生体内で執り行われる破骨細胞と骨芽細胞による骨恒常性維持メカニズムの解明には、実際に骨組織の中で行われている現象を理解することが不可欠であると考えられるので、当初確立されていた、二光子励起顕微鏡を用いた骨髄内イメージング法 (Lo Celso et al, Nature 2009; Xie et al, Nature 2009; Ishii

et al, Nature 2009) を発展させ、生体骨組織において骨芽細胞と破骨細胞の空間分布をリアルタイムで解析することにより、これら細胞の時空間的動態変化から生体内での骨代謝回転のダイナミクスを動的に解析し、骨関連疾患治療に役立つような骨リモデリング評価法の開発を目指した。

2. 研究の目的

最新の骨組織イメージング法により、破骨細胞・骨芽細胞により執り行われる骨代謝制御を動的に可視化し、これら細胞の骨組織の特定環境下への遊走、および細胞間相互作用を時空間的な動態解析により分析することにより、これまでの血中や尿中の骨代謝マーカーを利用する方法と比べ、細胞レベルでの高い分解能で経時的かつより短期間に骨リモデリングを評価することを目的とする。静的な骨組織解析では捉えられなかった生きた細胞間の時空間的な相互作用の仕組みを明らかにし、骨の恒常性維持システムや骨・軟骨関連疾患の病態をこれまでと異なる観点から理解するとともに、薬物評価への応用に努めることにより、骨関連疾患治療に対する新規アプローチ法を提案することを最終目標とする。

3. 研究の方法

実際の骨組織において、骨芽細胞と破骨細胞により執り行われる骨リモデリングを可視化するために、骨組織イメージングに使用する(1)骨芽細胞蛍光標識マウスの作出、および、骨芽細胞と破骨細胞の同時イメージングが可能な骨リモデリング可視化用蛍光標識マウスの作出を行った。続いて、二光子励起顕微鏡を使用して(2)骨リモデリング可視化用蛍光標識マウスを用いたマウス頭蓋骨髄内の細胞動態解析を行い、骨リモデリングの可視化に最適な蛍光標識マウスの選定を行うとともに、骨髄内における骨芽細胞と破骨細胞の時空間的分布や細胞動態について解析を行った。

また、骨粗鬆症などの(3)病態モデルマウスを用いた骨髄内の細胞動態解析を行い、生理的条件下における骨芽細胞および破骨細胞と、病的条件下におけるこれら細胞の分布および細胞動態変化を比較検討し、骨疾患発症時における各細胞の動態変化を明確にすることにより、新規創薬ターゲットや治療薬物の投与時期の提案につながるかどうかについて検討した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞蛍光標識マウスの作出
まず始めに、骨芽細胞系譜の細胞標識に最適なレポーターの選定を行うとともに、本研究遂行のために必要な骨芽細胞蛍光標識マウス

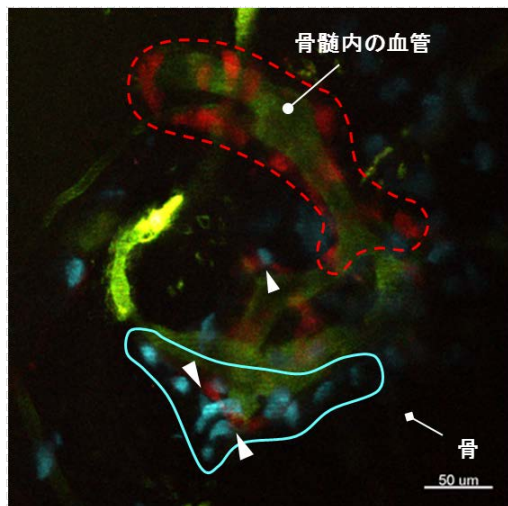
の作出を行った。これまでの報告から、国内外で既に作出されている骨芽細胞系譜の各細胞のレポーターマウス (Osterix-GFP::Cre, Col2.3-GFP など)のうち、骨形成に関与する分化後期の骨芽細胞の生体内イメージングには、Col2.3-GFP トランスジェニックマウスが適切だと考えられたため入手しようとしたが、国内では入手不可能だった。そこで、Col2.3-GFP マウスの作出に使用されたものと同じ、ラット 2.3kb I 型 コラーゲンプロモーター下に、青色の蛍光分子 (ECFP) を発現するように設計したベクター (Dr. Lichtler より供与) を用いて、骨芽細胞を ECFP で標識した蛍光標識マウスを作出した。選定したトランスジェニックラインのうち、繁殖可能であり、組織化学染色や、二光子励起顕微鏡下での観察で強いシグナルを発するマウスラインを、その後の解析に用いた。この骨芽細胞蛍光標識マウスにおいて、ECFP で標識される骨芽細胞は、頭蓋骨の骨内膜や、長管骨の海綿骨および皮質骨表面に分布が認められ、主に、骨標識剤 (蛍光 Ca キレート剤) であるカルセインにより染色される領域に分布することから、骨形成に関与する分化後期の成熟骨芽細胞であると考えられた。

(2) 骨リモデリング可視化用蛍光標識マウスを用いたマウス頭蓋骨髄内の細胞動態解析

所属研究機関では、単球系細胞を緑色の蛍光物質 (GFP) で標識したマウス (CSF1R-EGFP、CX₃CR1-EGFP など)、また成熟破骨細胞を赤色の蛍光分子 (tdTomato) で標識したマウス (TRAP-tdTomato) を既に作出または保持している。今回作出した骨芽細胞蛍光標識マウスと、これらの破骨前駆細胞または破骨細胞蛍光標識マウスを掛け合わせて、骨芽細胞と破骨細胞の同時イメージングが可能な骨リモデリング可視化用蛍光標識マウス (Col1a1*2.3-ECFP/+;CX₃CR1-EGFP/+, Col1a1*2.3-ECFP/+;TRAP-tdTomato/+ など) を作出した。各骨リモデリング可視化用蛍光標識マウスを用いて、二光子励起顕微鏡により骨髄内イメージングを行った結果、前者のレポーターマウス (Col1a1*2.3-ECFP/+;CX₃CR1-EGFP/+) については、ECFP と EGFP の蛍光スペクトルが一部オーバーラップするため、現在 EGFP の検出に用いている蛍光フィルター (BP520-550nm) ではそれぞれのシグナルを明確に分離することが出来なかった。一方で、後者のレポーターマウス (Col1a1*2.3-ECFP/+;TRAP-tdTomato/+) については、ECFP と tdTomato の蛍光シグナルを明確に分離することが可能であり、骨芽細胞と破骨細胞の骨髄内分布をはっきり検出することが出来た。破骨細胞蛍光標識マウス

に関しては、破骨細胞前駆細胞に特異的な Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK)-Cre マウスや、破骨細胞特異的な Cathepsin K (Ctsk)-Cre マウスを赤色蛍光レポーターマウス (Rosa-LSL-TdTomato) と掛け合わせることで、異なる破骨細胞蛍光標識マウスを作製したが、これらのレポーターマウスラインでは、骨髓内の多くの細胞が標識されるため、個々の破骨前駆細胞または破骨細胞を明確に分けて標識することが出来なかった。TRAP-tdTomato マウスを用いた解析から、tdTomato で標識される破骨細胞群が分布する領域では、低 pH 感受性プローブの蛍光シグナルが観察され、tdTomato で標識される破骨細胞は骨吸収に関与する成熟破骨細胞であることが報告されている。よって、骨リモデリングの評価には、骨形成や骨吸収にそれぞれ直接関与する、成熟骨芽細胞および成熟破骨細胞を標識する *Coll1a1*2.3-ECFP/+;TRAP-tdTomato/+* マウスが適していると考えられ、以後、この骨リモデリング可視化用蛍光標識マウスを用いて解析を行った。

8 週齢の骨リモデリング可視化用蛍光標識マウスを麻酔下で処置し、二光子励起顕微鏡を用いて頭蓋骨髓内のイメージング解析を行ったところ、マウス頭蓋骨髓内では、*Coll1a1*2.3-ECFP* で標識される骨芽細胞の集団は、そのほとんどが、TRAP-tdTomato で標識される破骨細胞の集団と離れた場所に分布している様子が観察され、近接して相互作用しているとみられる骨芽細胞および破骨細胞の数は限られていた (図 1)。近接する骨芽細胞および破骨細胞は、それぞれ $20\mu\text{m}$ の範囲内に存在していたことから、 $20\mu\text{m}$ の範囲内に分布する骨芽細胞および破骨細胞に



- 骨芽細胞 (*Coll1a1*2.3-ECFP+*) の集団
- 破骨細胞 (*TRAP-tdTomato+*) の集団
- ▴ 近接して分布する骨芽細胞と破骨細胞

図1 二光子励起顕微鏡を用いた骨髓内の破骨細胞と骨芽細胞の同時イメージング

ついて、骨髓腔全体の細胞数に対する割合を調べてみたところ、近接して相互作用している骨芽細胞および破骨細胞数は全体の約 20% 以下であった。

骨芽細胞および破骨細胞の骨髓内分布は、数時間のイメージング解析では劇的な変化を示さなかったものの、両細胞について 6 時間ごとに最大 24 時間まで経時的に観察を行った結果、観察開始時に破骨細胞の集団が観察された領域において、骨芽細胞数が経時的に増加し、その一方で破骨細胞数が減少する様子が高い頻度で観察された。また、この過程において、骨芽細胞数の増加に伴い、近接する骨芽細胞と破骨細胞の数の増加が認められた。前述したように、*Coll1a1*2.3-ECFP* で標識される骨芽細胞と、TRAP-tdTomato で標識される破骨細胞は、生体内においてそれぞれ骨形成および骨吸収に関与していると考えられるため、今回観察された現象は、骨リモデリングの骨吸収相から骨形成相への移行期に相当すると考えられ、この移行期には、骨芽細胞が破骨細胞の近傍に遊走され、直接的または間接的な相互作用を介してその領域における骨吸収型破骨細胞の減少を促し、骨形成を促進する可能性が示唆された (図 2)。生体骨組織内における骨リモデリングの全容を解明するためには、24 時間以上の、日単位あるいは週単位の観察期間で骨芽細胞と破骨細胞の分布を追跡する必要があると考えられるが、現時点においては、研究施設のルール等により、日単位あるいは週単位の長期間にわたるイメージング解析が困難であるため、今後の課題としたい。

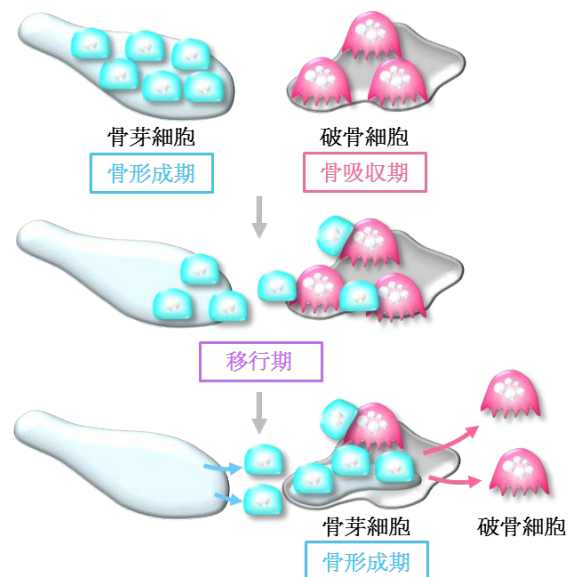


図2 骨リモデリングにおける骨吸収相から骨形成相への移行期

(3) 病態モデルマウスを用いた骨髄内の細胞動態解析

続いて、骨髄内イメージング解析によりこれまでに確認された生きた骨組織内における骨芽細胞と破骨細胞の細胞動態が、病的条件下においてどのような変化を示すかについて検討した。骨病変モデルマウスは、50時間以内に骨減少を誘導可能な soluble Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (sRANKL) 投与による実験的骨粗鬆症モデルを用いて作製した。8週齢の骨リモデリング可視化用蛍光標識マウスに、1 mg/kg の sRANKL を腹腔内に単回投与したのち、一定時間経過後に二光子励起顕微鏡により頭蓋骨髄内のイメージングを行い、骨芽細胞および破骨細胞の動態変化について解析を行った。本解析に使用可能な骨リモデリング可視化用蛍光標識マウスの数が限られていたため、初期段階の結果ではあるが、sRANKL 投与7時間以内に、骨芽細胞に近接していた破骨細胞が、骨芽細胞から離れて移動する様子が高い頻度で観察され、近接する骨芽細胞と破骨細胞の数が減少する傾向が認められた。この現象は、sRANKL 投与で誘導される破骨細胞数の増加や破骨細胞活性の上昇よりも早い時期に認められるため、sRANKL 投与により破骨細胞の分化および骨吸収能が活性化される際には、破骨細胞は、sRANKL の刺激に応じて骨芽細胞から離れた位置に移動する可能性が示唆された。

骨リモデリング可視化用蛍光標識マウスを用いた、生きた骨組織における骨芽細胞および破骨細胞の同時イメージング解析により、今回初めて実際の骨組織における骨芽細胞と破骨細胞の時空間的動態が明らかになった。本同時イメージング法により、個々の細胞の動態のみならず、これまで組織学的解析等で評価されていた骨芽細胞および破骨細胞の細胞集団の分布についても経時的に観察することが可能になり、骨リモデリングの骨吸収相から骨形成相への移行期に相当する場面を動的にとらえることに成功した。その際に、近接する骨芽細胞と破骨細胞の数が増加することが本イメージング解析により明らかになり、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用が骨吸収相から骨形成相への移行において決定的な役割を果たしている可能性が示された。また、近接する骨芽細胞と破骨細胞数の変化が、sRANKL 誘導性骨粗鬆症の発症に先立って認められたことから、骨リモデリングの種々の場面における骨芽細胞と破骨細胞の相互作用は、その後引き続いて起こる各細胞の機能発現に重要な役割を果たすと考えられ、今後、それぞれの場面における骨芽細胞と破骨細胞の相互作用関連分子を特定していくことにより、新たな骨関連疾患治

療薬の開発につながることを期待される。

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1件)

- ① Ishii, M., Fujimori, S., Kaneko, T., and Kikuta, J. 2013. Dynamic live imaging of bone: opening a new era with 'bone histodynametry'. J Bone Miner Metab in press. (査読無)

[学会発表] (計3件)

- ① Sayumi Fujimori, Masaru Ishii. *In vivo* imaging of bone remodeling in bone tissue of the osteoblast-osteoclast dual labeled mice. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 29 May 2013, Kobe.
- ② 藤森 さゆ美, 石井 優 生体マウス骨組織における骨リモデリングの *in vivo* イメージング. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月12日, 福岡.
- ③ 藤森 さゆ美 生体イメージングによる骨代謝制御のダイナミクス解析. 第9回 Skeletal Research Meeting, 2012年11月10日, 京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤森 さゆ美 (FUJIMORI SAYUMI)
大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任研究員 (常勤)
研究者番号: 20589717

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし