

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670667

研究課題名(和文)骨代謝細胞ネットワークのインビトロにおける再構成と蛍光技術を駆使した時空間的解析

研究課題名(英文) In vitro reconstruction and spatiotemporal analysis of the cellular network in bone metabolism using fluorescence technology

研究代表者

疋田 温彦 (Hikita, Atsuhiko)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60443397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨の恒常性を制御している細胞間の相互作用を解明するために、これらの細胞と基質から成る生体内の環境を生体外で再構築し、2光子励起顕微鏡を用いた解析が可能な新規の系を確立した。骨を形成する骨芽細胞を長期分化培養し、同一部位を経時的に観察することで、基質の増加、骨代謝を調節する骨細胞の出現、骨基質上の骨芽細胞の形態変化と言った骨モデリング過程で生じる現象を再現し、定量的に証明した。さらに、長期培養骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞との共存培養において、破骨細胞による基質吸収、成熟骨芽細胞の吸収窩における出現、吸収窩の再充填といった、骨リモデリング過程における現象を細胞レベルで捉え、定量化した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the interaction of cells which controls bone homeostasis, the environment in living body is reconstructed outside of the body, and a novel system was established to analyze it using 2-photon microscopy. By culturing osteoblasts which form bones for long-term, and by observing same regions temporary, phenomena occurring during bone modeling such as increase of matrix, appearance of osteocytes which control bone metabolism, and changes in morphologies of osteoblasts on the matrix were reproduced and proved quantitatively. In addition, in co-culture of long-term-cultured osteoblasts and osteoclasts which resorb bones, phenomena in bone remodeling such as matrix resorption by osteoclasts, appearance of mature osteoblasts in the resorption pits and replenishment of resorption pits could be captured at cellular level and quantified.

研究分野：骨代謝、再生医療

キーワード：骨リモデリング カップリング 骨モデリング イメージング in vitro 骨芽細胞 破骨細胞 骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞、破骨細胞、骨基質中に存在する骨細胞といった骨代謝関連細胞間の複雑な相互作用の解析には、蛍光 *in vivo* イメージングがふさわしいと考えられるが、動物の麻酔維持や観察部の状態変化などの問題、遺伝子改変動物間の煩雑かつ非効率な掛け合わせなどの障壁がある。

一方、長期観察および遺伝子操作や薬剤刺激が容易である *in vitro* において、骨細胞ネットワークを再現する試みが散見されるが、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞の3者の関係を再構築した系は見当たらない。

申請者は、骨芽細胞培養を行う過程で、cuboidal な成熟骨芽細胞や、基質内に存在する、数多くの突起を持った骨細胞、骨基質表面に存在する bone lining cell が培養期間に応じて出現すること、また、骨芽細胞長期培養系に骨髄マクロファージを加えた共存培養において、基質表面あるいは内部に進入した破骨細胞が観察されることを見いだした。申請者はこの知見を基に、*in vitro* において生体内における細胞間ネットワークを再現可能な系を確立することを考えた。

## 2. 研究の目的

骨の恒常性を制御している破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞の細胞間相互作用を解明するために、これらの細胞と骨基質から形成される生体内の骨代謝細胞ネットワークを *in vitro* において再構築し、2光子励起顕微鏡や第2次高調波発生(second harmonic generation: SHG)といった非線形光学技術を駆使した解析が可能な系を確立する。この系を用いて、骨芽細胞の骨細胞への分化、骨芽細胞あるいは骨細胞による破骨細胞の分化促進、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のカップリングといった事象を経時的かつ直接的に観察する。

## 3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞から骨細胞への分化の経時的観察：生後 0~1 日のマウス頭蓋骨をコラゲナーゼおよびトリプシン/EDTA で酵素処理し、outgrowth してくる骨芽細胞を採取する。Venus 発現レンチウイルスの感染と 60 mm ディッシュへのまき直しを同時に行い、コンフルエントになった時点からアスコルビン酸、 $\beta$ -glycerophosphate、bone morphogenetic protein-2 を加えて分化させる。分化開始 1 週間後に観察される、円形の細胞の凝集や石灰化結節の存在部位の底面をサインペンでマーキングし、1 週毎に 2 光子励起顕微鏡で同一部位を観察する。骨芽細胞系の細胞は Venus の蛍光で、形成される基質は SHG のシグナルで検出する。本研究では細胞の形態変化の定量化を試みる。また、3 週間の長期

培養により基質中に出現する細胞が骨芽細胞であることを、骨細胞を蛍光標識可能である DMP1-Cre/flox-tdTomato 由来の細胞を用いた培養を行うことで確認する。

(2) 破骨細胞分化との共存培養：CathepsinK プロモーター活性依存性に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと、LoxP 配列に挟まれた Stop 配列の下流に赤色蛍光蛋白質 tdTomato の配列を持つマウスを掛け合わせる。双方の遺伝子を持つマウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下で一晩培養した後に、非接着細胞を採取する。この細胞を骨芽細胞分化培養 4 週目の培養系に添加し、活性型ビタミン D およびプロスタグランジン E2 存在下で共存培養する。この共存培養にて、破骨細胞が出現する部位(基質および各形態の骨芽細胞との関連)について解析し、破骨細胞支持細胞について検討する。

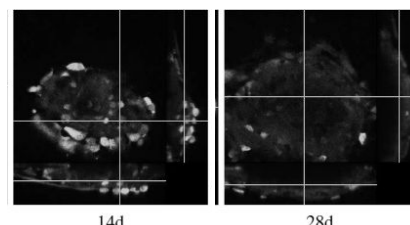
(3) 破骨細胞による骨吸収後の骨芽細胞 recruitment の検討：共存培養系において同一部位を 1 日あるいは 1 週ごとに観察し、骨吸収後の骨芽細胞の recruitment が生じていることを証明する。さらに 3 週培養後に再び骨芽細胞分化培養を行い、吸収窩における各細胞及び基質の変化について検討、定量化する。

## 4. 研究成果

骨の恒常性を制御している破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞の細胞間相互作用を解明するために、これらの細胞と骨基質から形成される生体内の骨代謝細胞ネットワークを *in vitro* において再構築し、2光子励起顕微鏡や第2次高調波発生といった非線形光学技術を駆使した解析が可能な系の確立を試みた。

(1) 骨芽細胞から骨細胞への分化の経時的観察：マウスより採取した骨芽細胞分化培養系において、3 週間の長期培養により基質中に出現する細胞が骨細胞であることを、骨細胞マーカーに対する免疫染色で再確認すると共に、骨細胞を蛍光標識可能である DMP1-Cre/flox-tdTomato 由来の骨芽細胞を培養し、2光子励起顕微鏡で観察した。結果として、基質内の細胞の大部分が tdTomato の蛍光を発することから、これらは DMP1 プロモーター活性上昇を経験した細胞、すなわち後期骨芽細胞~骨細胞である事を確認した。この骨芽細胞培養系において、同一部位を経時的に 2 光子励起顕微鏡で観察した。基質の増加、骨細胞の出現とともに骨基質上の骨芽細胞の形態が立方形から扁平状へと変化することを確認した(図1)。さらに、画像解析ソ

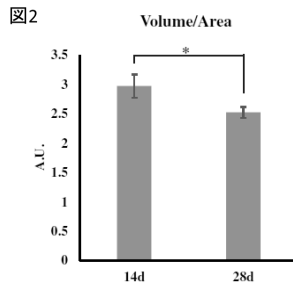
図1



14d

28d

フト IMARIS を用いて基質上の Venus 陽性領域の表面積と体積を計算し、体積を表面積で割った値が2週から4週にかけて減少することを示し、形態の変化を定量的に証明した(図2)。



(2) 破骨細胞との共存培養：骨芽細胞長期培養4週の時点において、破骨細胞を特異的に蛍光標識可能な CatKp-Cre/flox-tdTomato マウス由来の骨髄マクロファージと共存培養した。破骨細胞の殆どは、形成された石灰化結節上に認められた。このことは、骨細胞が破骨細胞形成に重要であるとする近年の報告と矛盾しない所見である。また、共存培養を開始する骨芽細胞培養4週目においては骨芽細胞の多くは扁平な形態となっているが、立方体の骨芽細胞が集積している部分も一部認められる。共存培養開始1週後の観察においては、この立方体の骨芽細胞が残っていた部位を避けるように破骨細胞が存在する傾向があった。さらに共存培養が進むにつれ、破骨細胞の領域が増加し、基質の破壊が進む様子が観察された。また、吸収窩に骨芽細胞が侵入している様子も観察された。

(3) 破骨細胞による骨吸収後の骨芽細胞 recruitment の検討：共存培養3週後に骨芽細胞分化培地に戻したところ、破骨細胞が徐々に消失すると共に、基質吸収部において骨芽細胞が扁平状から立方形へと変化し、その後新しく合成された基質によって吸収窩が再充填される様子を捉えることができた。すなわち、骨リモデリングサイクルにおける破骨細胞と骨芽細胞のカップリング現象を細胞レベルでとらえることに成功した。カップリングの生じる頻度、カップリングにより十分な基質再充填が生じる頻度について定量化を行った。カップリングが生じない割合は7.3%であり、先行文献における *in vivo* の解析により推定された割合と同等の値であった(図3)。また、基質吸収部の再充填を、基質体積を解析することで定量的に表すことが出来た(図4)。

図3

Percentage of types of bone remodeling cycles

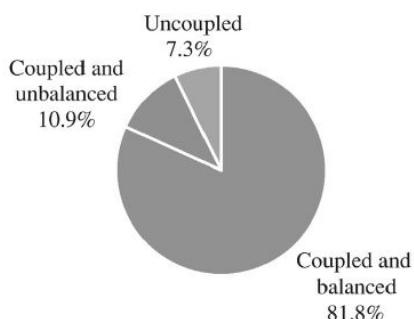
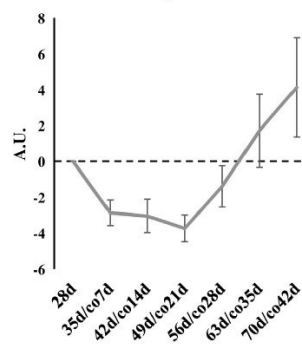


図4

Mean change in volume: Area-adjusted



さらに、骨芽細胞が自ら産生した基質に埋まっていく様子も観察できた。

吸収窩に集積した骨芽細胞の分化度を確認するために免疫染色を行ったところ、殆どの集積細胞において Alkaline phosphatase は陰性であったが、undercarboxylated osteocalcin は陽性であった。すなわち、分化の後期にあたる骨芽細胞が吸収窩の再充填を行っている可能性が示唆された。

吸収窩に動員される骨芽細胞の侵入経路としては、基質の上に2層のシートを形成する骨芽細胞のうち深層の細胞が吸収窩に侵入しているような像が観察されたことから、少なくともこの系においては吸収窩に bone lining cell が動員されていることが示唆された。

さらに、培養期間をさらに延長した際の、休止していた破骨細胞前駆細胞の分化によると思われる破骨細胞形成、基質吸収および吸収窩の再充填を観察することが可能であった。

このように、本研究においては、骨芽細胞の吸収窩への動員のみならず、吸収窩が特異的に再充填される現象、いわゆるカップリングを細胞レベルで観察する事が可能であった。また、画像解析により細胞及び基質に生じた現象を定量的に示す事が可能であった。本研究は、複数の細胞が関連する生体現象である骨モデリング、リモデリングを、介入や観察の容易な *in vitro* で再現した画期的な研究であり、骨恒常性維持メカニズムの解明や、これらの過程に影響を与える薬剤の研究に広く応用することで、骨代謝研究や骨粗鬆症治療の可能性を大きく広げるものであると考えられた。

<引用文献>

Hikita A, Iimura T, Oshima Y, Saitou T, Yamamoto S, Imamura T. Analyses of bone modeling and remodeling using *in vitro* reconstitution system with two-photon microscopy. Bone. 2015 Jul;76:5-17. (図1~4は全てこの論文より引用、一部改変)

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. Hikita A, Iimura T, Oshima Y, Saitou T, Yamamoto S, Imamura T.  
Analyses of bone modeling and remodeling using in vitro reconstitution system with two-photon microscopy.  
Bone. 2015 Jul;76:5-17. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.030. Epub 2015 Mar 12. (査読有り)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 正田 温彦  
イメージングを用いた骨代謝研究  
第 13 回 Osteoimmunology forum  
平成 28 年 2 月 20 日  
ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)

2. 正田 温彦  
2 光子顕微鏡を用いた骨代謝細胞の in vitro 長期動態解析  
第 18 回癌と骨病変研究会  
平成 27 年 11 月 13 日  
千代田放送会館(東京都千代田区)

3. 正田 温彦  
骨・軟骨研究における 2 光子励起顕微鏡の応用  
第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会  
シンポジウム「運動器疾患の先進イメージング」  
平成 27 年 10 月 22 日  
富山国際会議場(富山県富山市)

4. Atsuhiko Hikita, Tadahiro Iimura, Yusuke Oshima, Shin Yamamoto, Takeshi Imamura  
Analysis of an in Vitro Reconstitution System of Bone Cell Network by Two-Photon Microscopy  
ASBMR 2015 Annual Meeting  
平成 27 年 10 月 9 日、10 日  
Seattle, USA

5. 正田 温彦、飯村 忠浩、大嶋 佑介、今村 健志  
骨関連細胞ネットワーク in vitro 再構築系の 2 光子励起顕微鏡による解析  
第 33 回日本骨代謝学会学術集会  
平成 27 年 7 月 23 日  
京王プラザホテル(東京都新宿区)

6. 正田 温彦  
骨代謝細胞ネットワーク in vitro 再構成系の 2 光子励起顕微鏡による解析  
第 1 回日本骨免疫学会  
シンポジウム 1 破骨細胞  
平成 27 年 7 月 1 日

ホテルブリーズベイマリーナ(沖縄県宮古島市)

7. 正田 温彦、飯村 忠浩、大嶋 佑介、齋藤 卓、山本 真、今村 健志  
骨代謝関連細胞ネットワーク in vitro 再構築系の 2 光子イメージング  
第 35 回日本骨形態計測学会学術集会  
平成 27 年 6 月 5 日  
倉敷市芸文館(岡山県倉敷市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
正田 温彦 (HIKITA, Atsuhiko)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 60443397

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: