特集：慢性炎症と自己免疫疾患

総説

生体イメージングで捉える免疫炎症・骨破壊の動的な実体

菊田 順一^{*1,2}, 石井 優^{*1,2}

Dynamic analysis of immune inflammation and bone destruction by intravital imaging

Junichi KIKUTA^{*1,2} and Masaru ISHII^{*1,2}^{*1}Department of Immunology and Cell Biology, Graduate School of Medicine and Frontier Biosciences, Osaka University^{*2}AMED-CREST, AMED

(Accepted March 3, 2016)

summary

Rapid development of fluorescent imaging techniques enables us to understand cellular dynamics *in vivo*. We have originally established an advanced imaging system for visualizing living bone tissues with intravital two-photon microscopy. By means of the system, we have recently succeeded in visualization of the *in vivo* behavior of living mature osteoclasts on the bone surface, and identified different functional subsets of osteoclasts in terms of their motility and function, i.e., ‘static – bone resorptive’ and ‘moving – non resorptive’. Pathological conditions changed the composition of these populations as well as the total number of mature osteoclasts. We also found that RANKL-bearing Th17 cells could control bone resorption of mature osteoclasts, demonstrating novel actions of Th17. Furthermore, we have also developed the imaging system to visualize bone destruction by osteoclasts in arthritic joints using intravital two-photon microscopy. In this review, we summarize the latest data of intravital imaging of osteoclast dynamics, and also discuss its further application.

Key words——intravital imaging; two-photon microscopy; osteoclast; bone resorption; Th17 cell

抄 録

“百聞は一見に如かず”というように、“見る”ことはヒトの五感のなかでも特別な存在感を示しており、視覚に訴える“ライブイメージング”研究の成果には強い説得力がある。石灰質に囲まれた骨組織は、生体で最も“硬い”組織であるため、従来生きたままでの観察が極めて困難であると考えられていたが、著者らは組織深部の観察が可能な“二光子励起顕微鏡”を駆使して、生体骨・関節組織内の生きた細胞動態をリアルタイムで解析するライブイメージング系を確立した。本技術を用いて、骨表面上での“生きた”破骨細胞による骨破壊過程を観察することに成功し、破骨細胞が骨吸収期と休止期を繰り返すこと、骨粗鬆症や炎症性骨破壊では骨吸収期の破骨細胞が増加すること、さらには関節リウマチの病因に関わる Th17 細胞が破骨細胞の骨吸収を制御し得ることを明らかにした。さらに最近、関節組織の生体イメージング系を確立し、関節炎における破骨細胞の動態解析にも取り組んでいる。本稿では、これらの研究成果の解説に加えて、著者らが開発した骨組織の生体イメージングの方法論とその応用について概説する。

はじめに

関節リウマチは、全身の関節に慢性炎症を来す難治性の自己免疫疾患である。関節内の滑膜組織が増生し、進行性に軟骨と骨が破壊される。また、関節リウマチ患者の多くは、炎症、加齢、閉経、ステロイド薬など様々な原因で骨粗鬆症を合併する。関節

リウマチにおける骨破壊と骨粗鬆症における骨密度の低下は、いずれも“破骨細胞”の機能亢進が関与する病態である。そのため、関節リウマチを治療するうえで、“破骨細胞”の機能をいかに制御するかということが大変重要となる。

これまでの骨吸収性疾患の研究のほとんどは、固定した骨・関節組織を切り出して顕微鏡で観察していた。この方法でも、骨が壊されている部位に多数の破骨細胞が集まっている様子は観察されたが、生きた破骨細胞の動きを観察することはできなかった。そのため、生体骨組織内で破骨細胞が実際にどのよ

^{*1} 大阪大学大学院医学系研究科／生命機能研究科・免疫細胞生物学

^{*2} 国立研究開発法人日本医療研究開発機構, AMED-CREST

うにして硬い骨を壊しているのかについては明らかになっていなかった。細胞の挙動を見るためには、“生きた”組織の中で“生きた”細胞を観察する必要がある。

近年、低侵襲で深部組織の観察に適した“二光子励起顕微鏡”の登場により、生体を“生きたまま”で観察することで、*in vivo*での免疫・炎症細胞の動態をリアルタイムで解析することが可能となってきた^{1,2)}。著者らは特に、生体イメージング系を独自に改良することで、マウスが生きたままの状態での骨破壊が起きている骨の表面部分を詳細に可視化する系を開発し、骨表面上での“生きた”破骨細胞による骨破壊過程をリアルタイムで観察することに成功した。

本稿では、これらの研究成果の解説に加えて、骨組織の生体イメージングの方法論とその応用について、実際の画像を紹介しながら概説する。

1. 骨の生体イメージング技術の確立

1) 二光子励起顕微鏡のメリット

生体イメージングで使用する二光子励起顕微鏡は、蛍光顕微鏡の一種である。蛍光とは、蛍光分子の基底状態に適当な波長の光を外部から当てて励起状態を誘発し、これが基底状態に戻る際に放出されるエネルギーの一部が光となる現象である（図1）。蛍光観察では、注目する細胞や分子などを蛍光分子で標識する。二光子励起顕微鏡は、通常の蛍光顕微鏡観察（共焦点レーザー顕微鏡も含む）で用いる励起光の半分のエネルギー（2倍の波長）をもったレーザー光を、細かいパルス状に放出したものを励起光源に用いる。二光子励起は、レンズで集約された光子が集まる1点の焦点面にしか起こらないため、非常にクリアな画像が得られ（高い空間解像度）、観察対象となる組織・臓器への光毒性や蛍光の退色もきわめて小さく抑えることが出来る（低い組織侵襲性）。また、励起光として通常の半分のエネルギー（2倍の波長）の近赤外光（波長が780~1000 nm）を用いるため、組織の深部まで励起光を到達させることができる（高い組織透過性）。

以上の特長から、二光子励起顕微鏡は、生体を“生きたまま”で観察するためにきわめて有用である。固定した組織や臓器は、パラフィンやコンパウンドで包埋して薄切すればどんな場所でも観察できるが、生きた個体内では、観察したい場所が対物レンズでアプローチできる場所よりもかなり深いことがある。

図1 二光子励起顕微鏡の原理

通常の蛍光観察（一光子励起）では、1個の蛍光分子を1個の光子で励起するが、二光子励起では2個の光子で励起する。このような現象は非常に起こりにくく、光子密度が極大となる焦点平面のみで起こる。このため、観察したい部位のみ蛍光することになるので高い空間解像度が得られ、非観察部位が励起されないため光毒性が低く退色が少ない。

このような場合、二光子励起顕微鏡を用いる事で、組織の奥深くまで、高い3次元解像度で、しかも低侵襲で観察することが可能となる^{3,4)}。

2) 骨組織の生体イメージング

骨基質に含まれるリン酸カルシウム結晶は励起光を容易に散乱させるため、二光子励起に用いる近赤外線レーザーを用いても深部まで到達させることは難しい。現在の近赤外線レーザーでは、軟部組織であれば表面から800~1000 μmまで到達が可能であるが、骨組織の場合は、150~200 μmが限界である。このため、著者らは、骨基質が薄くて骨表面から骨髓腔まで80~120 μmで到達できるマウスの頭頂骨を用いて、生体骨組織内の生きた細胞動態をリアルタイムで観察する*in vivo*イメージング系を確立した⁵⁻⁸⁾。

具体的には、可視化したい細胞に特異的に蛍光分子を発現させたマウスを用いて実験を行う。麻酔後、マウスの頭頂骨の皮膚を切開し、露出させた後、顕微鏡用のステージにマウスを固定して観察する。実験中、循環動態を把握するために心電図を設置し、心拍数（400拍/分以上）を維持しながら、麻酔量を適宜調節する。

この方法では、骨髓腔内を流れる豊富な血流が保たれているため、骨髓腔内に存在する生きた細胞の動きが観察できるだけでなく、薬剤を尾静脈などから全身投与すると血流を通して速やかに骨髓腔内に到達させることができるので、薬剤が細胞に及ぼす効果をリアルタイムで観察することも可能である。

2. 破骨細胞の生体イメージング

1) 破骨細胞の可視化と RANKL による骨吸収制御

著者らは、生体内で破骨細胞がどのようにして硬い骨を壊しているのかを明らかにするために、生体イメージング技術を用いて、破骨細胞による骨破壊の現場の可視化に取り組んだ。まず、破骨細胞に特異的に発現する H^+ ポンプの遺伝子座に、 H^+ ポンプ

と GFP の融合蛋白質を組み込んだ遺伝子改変マウス (a3-GFP マウス) を作製し、破骨細胞を GFP で蛍光標識した⁹⁾。このマウスの骨組織内部を生体二光子励起顕微鏡で観察することにより、骨表面上での生きた破骨細胞の動態を可視化することに成功した。その結果、骨表面上には、動きの小さい骨吸収期の破骨細胞 (Resorbing osteoclast: R 型と命名) と、動きの大きい休止期の破骨細胞 (Non-resorbing osteoclast: N 型と命名) の少なくとも 2 種類が存在し、R 型と N 型を短い時間で遷移していることが明らかとなった⁷⁾ (図 2 A)。

次に、病態における破骨細胞の動態変化を評価した。RANKL 誘導骨粗鬆症モデルを作成した結果、骨表面上の破骨細胞数が増加し、しかも、そのほと

図 2 生体イメージングによる破骨細胞の動態解析

- (A) 破骨細胞を GFP で標識したマウスの骨髓腔を生体多光子励起顕微鏡で観察した (a)。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する。骨表面上の破骨細胞 (緑色) には、「骨表面で止まっていて骨吸収をしている細胞 (R 型: c)」と「骨表面を移動していて骨吸収を行っていない細胞 (N 型: b)」の少なくとも 2 種類が存在する。「骨表面で止まっている細胞」の方では、 H^+ ポンプ (GFP) が膜に沿って発現しているように見える (c, 矢頭)。つまり、今まさに酸を出して骨吸収をしていると考えられる。一方、「骨表面を移動している」細胞の方では、 H^+ ポンプ (GFP) が細胞質に存在し、膜上には発現していないように見える (b, アステリスク)。つまり、現時点で酸を出しておらず骨吸収には関わっていないと考えられる。青色は骨組織を示す。
- (B) 骨粗鬆症モデルでは、骨表面上の破骨細胞数が増加し、しかも、そのほとんどが骨吸収期の細胞 (矢頭) であった。
- (C) 骨粗鬆症モデルマウスにリセドロネートを投与した結果、骨表面上での破骨細胞数が減少し、しかも生き残った細胞の多くが、休止期の細胞 (アステリスク) であった。
- (スケールバー: A-a, B, C; 40 μ m, A-b, c; 10 μ m) (文献 7 より引用改変)

んどが骨吸収期の細胞（R型）であった（図2B）。一方、RANKL誘導骨粗鬆症モデルマウスに、骨粗鬆症の治療薬であるビスホスホネート製剤（リセドロネート）を投与して破骨細胞の機能を抑制させた結果、骨表面上での破骨細胞数が減少し、しかも生き残った細胞の多くが、休止期の細胞（N型）であった（図2C）。このように、生体イメージング技術を用いることにより、破骨細胞の絶対数のみならず、破骨細胞の骨吸収機能も同時に評価することができるようになった⁷⁾。

さらに著者らは、RANKLの短期的効果を検討するため、a3-GFPマウスにRANKLを急速に静脈内投与して、骨組織内を生体多光子励起顕微鏡で観察した。その結果、RANKL投与直後より、成熟破骨細胞が休止期から骨吸収期へと速やかに変化していく様子が観察された。従来、RANKLは破骨細胞の分化誘導因子であることが知られていたが、今回著者らが行ったイメージングの結果により、RANKLは破骨細胞の分化を誘導するだけでなく、成熟した破骨細胞にも作用し、骨吸収を促進する役割も担っていることが明らかとなった⁷⁾。

2) 新たな骨吸収性疾患治療薬の開発

これまで様々な骨吸収性疾患治療薬が開発されてきたが、ビスホスホネート製剤を始めとして、行き過ぎた破骨細胞の働きを抑えるために、「破骨細胞を殺す（＝数を減らす）」薬剤が主に使用されてきた。しかし一方では、破骨細胞は、骨を壊すだけではなく、骨を修復する骨芽細胞を活性化して、その分化・機能（骨再生）を促すことが知られており、骨疾患治療の際には、破骨細胞の数を減らしすぎると結果的に骨芽細胞が抑制され、骨の修復ができなくなり、逆に骨が脆くなってしまう問題点がある。

破骨細胞のライブイメージングによって、破骨細胞の中に、実際に骨を壊しているもの（R型）とそうでないもの（N型）が存在することが明らかになった。R型を減らしてN型を増やすことで、破骨細胞の総数を減らすこと無く骨破壊を抑制する事が可能となれば、骨再生も維持できる可能性があり、今後理想的な骨吸収性疾患治療薬となりうる。既存の治療薬、および現在開発中の薬剤をこの新しいイメージング系で評価することにより、「破骨細胞の総数は減らさないが、R型を減らしてN型を増やす」という治療薬を探索中である。

3. Th17細胞による破骨細胞の骨吸収制御

近年、CD4陽性ヘルパーT細胞のサブセットの一つであるTh17細胞が、関節リウマチにおける骨破壊に深く関与していると報告されている¹⁰⁻¹¹⁾。また、Th17細胞は、他のThサブセットとは異なり、その膜上にRANKL（receptor activator of NF- κ B ligand）を発現していることが分かっている¹²⁾。しかしながら、*in vitro*の実験系で、Th17細胞上のRANKL単独では破骨細胞分化を促進させることはできないことから、「Th17細胞の膜上に発現するRANKLが生体内でどのような働きをしているのか」という点についてはよく分かっていない。そこで、著者らは、生体イメージング技術を用いて、生体内におけるTh17細胞と破骨細胞の相互作用について動態解析を行った。

マウス脾臓から採取したリンパ球を*in vitro*で培養し、Th17細胞へと分化させた後、赤色の蛍光色素（CellTracker™ Red CMTPX）で染色を行った。蛍光標識したTh17細胞をa3-GFPマウスに静脈内投与し、約2時間後に、骨組織内を生体二光子励起顕微鏡で観察した。その結果、Th17細胞が破骨細胞に直接作用している様子を観察することができた（図3）。さらに、Th17細胞が休止期の破骨細胞に直接作用して、骨吸収期へと移行させることにより、骨吸収を誘導する様子が観察された。また、Th17細胞と破骨細胞の相互作用がRANKL中和抗体によって阻害されたことから、Th17細胞は、その膜上に発現するRANKLを介して成熟破骨細胞の骨吸収を促進するということが示唆された⁷⁾。

このように、生体イメージング技術を用いて、成熟破骨細胞と免疫細胞の相互作用を可視化することにより、Th17細胞による骨破壊機序の本質が明らかとなった。

4. 骨の生体イメージング～up to date～

1) 破骨細胞の“機能”の可視化

破骨細胞は、H⁺ポンプを介して酸を出し、骨表面を酸性化することによって骨吸収を行っている。著者らは、破骨細胞が生体内で“実際に”骨吸収を行っている過程を可視化するために、pHの低下に応答して蛍光がONになる「pH応答性蛍光プローブ」の開発に取り組んだ。このプローブは、pH感受性蛍光色素と、骨組織中のハイドロキシアパタイトに結合するビスホスホネート基から構成され、マ

図3 生体イメージングによって明らかとなった破骨細胞の骨吸収制御

- (A) 破骨細胞を GFP で標識したマウスに、赤色で蛍光標識した Th17 細胞を投与して、マウスの骨髓腔を生体二光子励起顕微鏡で観察した。Th17 細胞が破骨細胞と直接相互作用している様子が分かる。(スケールバー：25 μm)
- (B) 骨表面上の破骨細胞には、動きの小さい骨吸収期の細胞と、動きの大きい休止期の細胞の少なくとも 2 種類が存在する。破骨細胞の分化誘導因子である RANKL は、成熟した破骨細胞にも作用し、骨吸収を促進する役割も担っている。さらに、これまで関節リウマチにおける骨破壊に深く関与していると示唆されてきた Th17 細胞は、その細胞膜上に発現する RANKL を介して破骨細胞の骨吸収を促進する。

ウスに投与すると骨基質に強く接着する。また、この pH プローブは、中性条件下では蛍光を発しないが、破骨細胞が、骨吸収のために H^+ ポンプを介して酸を出し、骨表面を酸性化する（低 pH 環境を形成する）と、この pH の低下に应答して蛍光が ON になる¹³⁾。

著者らは、破骨細胞を蛍光標識したマウスに、pH 応答性蛍光プローブを投与することにより、破骨細胞が生体内で“実際に”骨吸収を行っている様子を可視化することに成功した。これまでのライブイメージング研究の多くは、生体内での細胞の動き（速度）や細胞間相互作用（細胞同士の接触）を観察するにすぎなかったが、pH 応答性蛍光プローブという新たなツールを組み合わせることにより、生体内での破骨細胞の“機能”をイメージングすることができるようになった。

2) 破骨細胞と骨芽細胞のクロストークの可視化

骨のリモデリングは、破骨細胞と骨芽細胞の相互作用により厳密に制御されているが、その実態に関しては未だに不明な点が多い。著者らは、骨のリモデリングの制御機構を *in vivo* で明らかにするために、同一個体内で破骨細胞と骨芽細胞を同時に可視化するイメージング系の開発に取り組んだ。まず、I 型コラーゲン (Colla1) のプロモーター下にシアン色蛍光タンパク質 (ECFP) を発現させ、骨芽細胞をシアン色で蛍光標識したマウス (Colla1-ECFP マウス) と、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ

図4 破骨細胞と骨芽細胞のクロストークの生体イメージング

骨芽細胞をシアン色、破骨細胞を赤色で標識したマウスの骨髓腔を生体二光子励起顕微鏡で観察した。破骨細胞と骨芽細胞はそれぞれ数十細胞単位で小集団を形成しており、両者の境界部分では細胞間相互作用が観察される。青色は骨組織を示す。(スケールバー：50 μm)

(TRAP) のプロモーター下に赤色蛍光タンパク質 (tdTomato) を発現させ、破骨細胞を赤色で蛍光標識したマウス (TRAP-tdTomato マウス)⁷⁾ を作製した。さらに、これらのマウスを掛け合わせることで、各々の細胞を異なる色で標識した多重蛍光標識マウスを作製した。このマウスの骨髓腔を生体二光子励起顕微鏡で観察することにより、骨組織内で破骨細胞と骨芽細胞が実際に相互作用する過程を可視化することに成功した (図4)。

骨芽細胞はおよそ 20~30 μm の大きさで、破骨

細胞と比較すると非常にゆっくりとした動きであった。また、破骨細胞と骨芽細胞はそれぞれ数十細胞単位で小集団を形成しており、両者の境界部分の一部において細胞間接触が認められた。また、この細胞間接触の多くは、破骨細胞の突起が神経シナプス様に骨芽細胞に伸びた構造を呈しており、時間経過とともに形態変化していく様子が観察された。現在、破骨細胞と骨芽細胞のクロストークの生理学的な意義や分子メカニズムについて詳細に解析中である。

3) 関節組織の生体イメージング

関節リウマチの病態形成には、破骨細胞、マクロファージ、T細胞など多種多様な細胞が複雑に関与すると考えられているが、「それぞれの細胞が、いつどのようにして関節内に遊走してきて、関節炎が発症するのか」という関節破壊に関わる細胞の遊走制御や動態については、これまでほとんど解明されていない。著者らは最近、関節炎・関節破壊の現場を *in vivo* で可視化するべく技術開発を行い、骨組織の *in vivo* イメージング系を独自に改良することで、マウスを生かしたままで足関節内部を観察するイメージング系を確立した¹⁴⁾。その結果、関節炎を誘導したマウスの炎症関節内部において、生きた破骨細胞の挙動を経時的に観察することに成功した。今後、関節炎において関節破壊に関わる多彩な炎症細胞の遊走動態を解析し、関節リウマチのさらなる病態解明に役立てたいと考えている。

おわりに

これまでの免疫研究では、免疫染色による組織学的解析やフローサイトメトリーによる解析等をもとに、免疫細胞の分化・機能の分子調節機構の多くが明らかになってきた。一方で、著者らの開発した骨・関節組織の生体二光子励起イメージング技術を用いることで、従来の手法では明らかにされなかった、免疫細胞の動的制御機構が明らかとなった。

炎症の病態形成には、T細胞、マクロファージ、樹状細胞など多種多様な免疫細胞が複雑に関与していると考えられ、各細胞の挙動、細胞同士の相互作用を理解することが大変重要である。生体二光子励起イメージング技術は、生きた組織内の様々な免疫細胞の動き・相互作用・機能をリアルタイムで観察することができるため、今後、関節リウマチをはじめ自己免疫疾患の病態解明や新規治療薬の開発において強力な手段となり得ると考えられる。

文 献

- 1) Stoll, S., et al.: Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science*. **296**: 1873–1876, 2002.
- 2) Miller, M.J., et al.: Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science*. **296**: 1869–1873, 2002.
- 3) Denk, W., et al.: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. **248**: 73–76, 1990.
- 4) Denk, W., Svoboda, K.: Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*. **18**: 351–357, 1997.
- 5) Ishii, M., et al.: Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*. **458**: 524–528, 2009.
- 6) Ishii, M., et al.: Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med*. **207**: 2793–2798, 2010.
- 7) Kikuta, J., et al.: Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J Clin Invest*. **123**: 866–873, 2013.
- 8) Kikuta, J., et al.: Sphingosine-1-phosphate-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antbone-resorptive action of active vitamin D. *Proc Natl Acad Sci USA*. **110**: 7009–7013, 2013.
- 9) Sun-Wada, G.H., et al.: Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci*. **122**: 2504–2513, 2009.
- 10) Kong, Y.Y., et al.: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. **402**: 304–309, 1999.
- 11) Takayanagi, H., et al.: T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. **408**: 600–605, 2000.
- 12) Sato, K., et al.: Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*. **203**: 2673–2682, 2006.
- 13) Kowada, T., et al.: In Vivo Fluorescence Imaging of Bone-Resorbing Osteoclasts. *J Am Chem Soc*. **133**: 17772–17776, 2011.
- 14) Kikuta, J., Ishii, M.: Intravital multiphoton microscopy for dissecting cellular dynamics in arthritic inflammation and bone destruction. *Methods Mol Biol*. **1142**: 1–10, 2014.