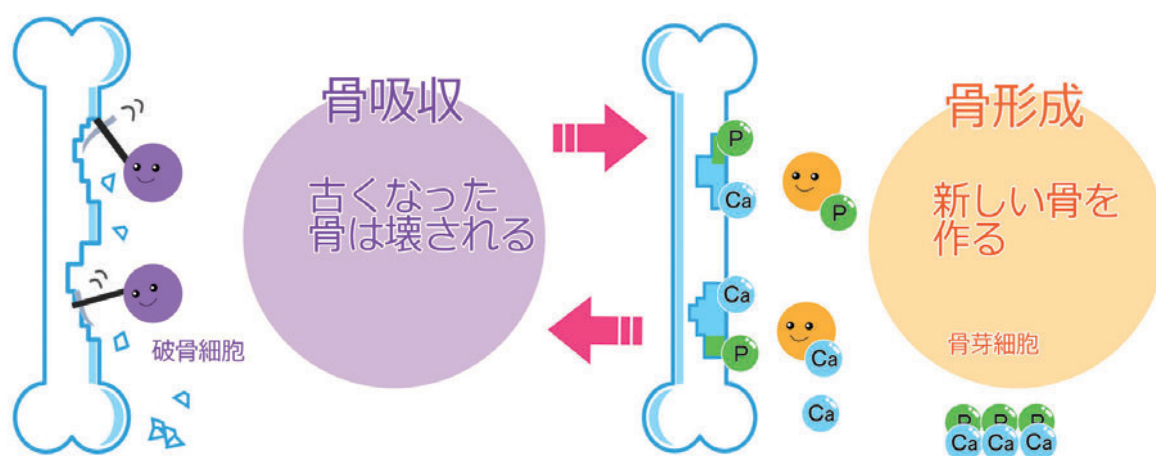


FIB-SEMおよびCLEM法を用いた 破骨細胞の骨吸収機構の解明

細沼 雅弘

昭和大学 臨床薬理研究所 臨床免疫腫瘍学部門 助教
昭和大学 薬理学講座 医科薬理学部門 兼任講師
昭和大学 医学部内科学講座 腫瘍内科学部門 兼任助教

骨を健康に維持するために必要な骨代謝



骨を溶かす唯一の細胞(=破骨細胞)

破骨細胞の機能亢進による病態

骨粗鬆症と腰椎圧迫骨折



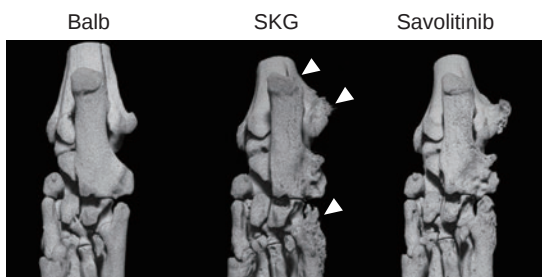
関節リウマチによる炎症性骨破壊



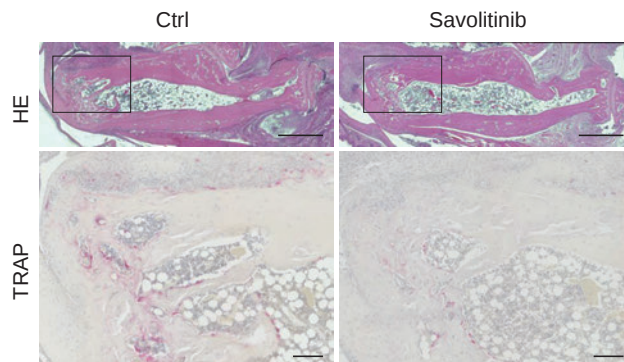
3

関節炎モデルマウスと破骨細胞

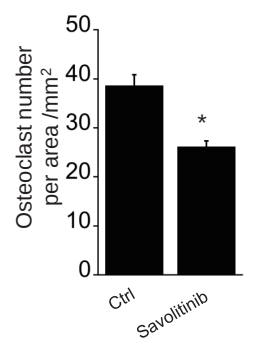
足底 μ CT 像



踵骨組織切片 TRAP 染色



破骨細胞数



Hosonuma M, et al. Rheumatology (Oxford). 2021;60:408-419.

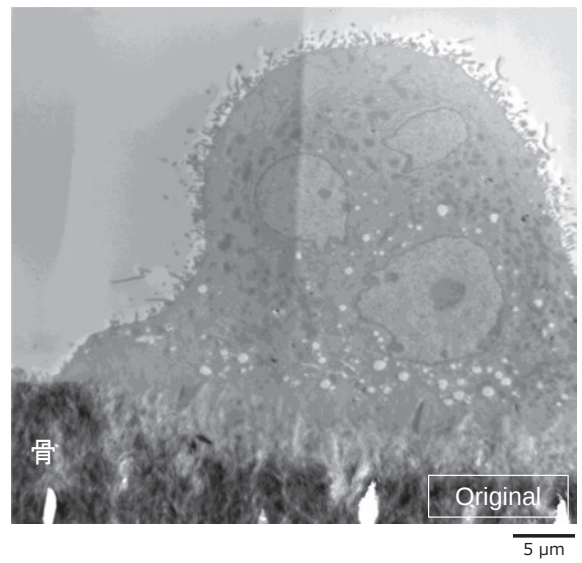
4

破骨細胞の電子顕微鏡像

走査型電子顕微鏡像 (SEM)



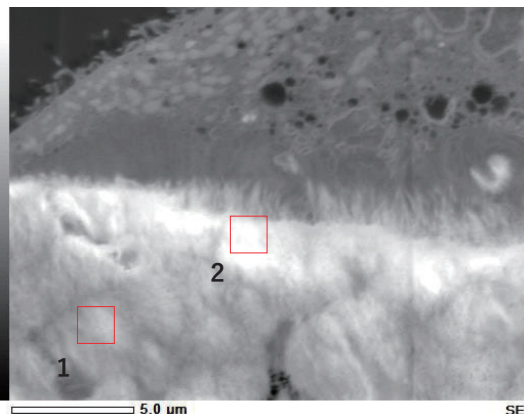
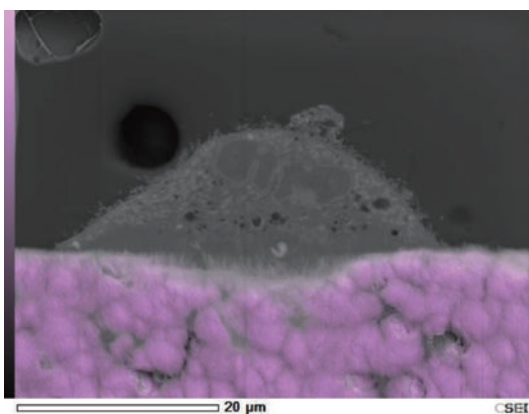
透過型電子顕微鏡像 (TEM)



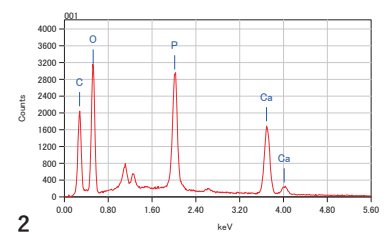
骨切片上で破骨細胞を培養すると骨吸収を行うことが確認できる

5

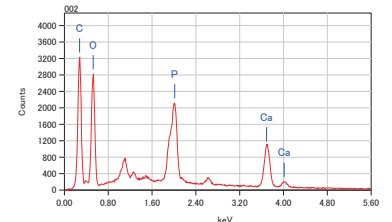
EDS（エネルギー分散型X線分析装置）での解析



1



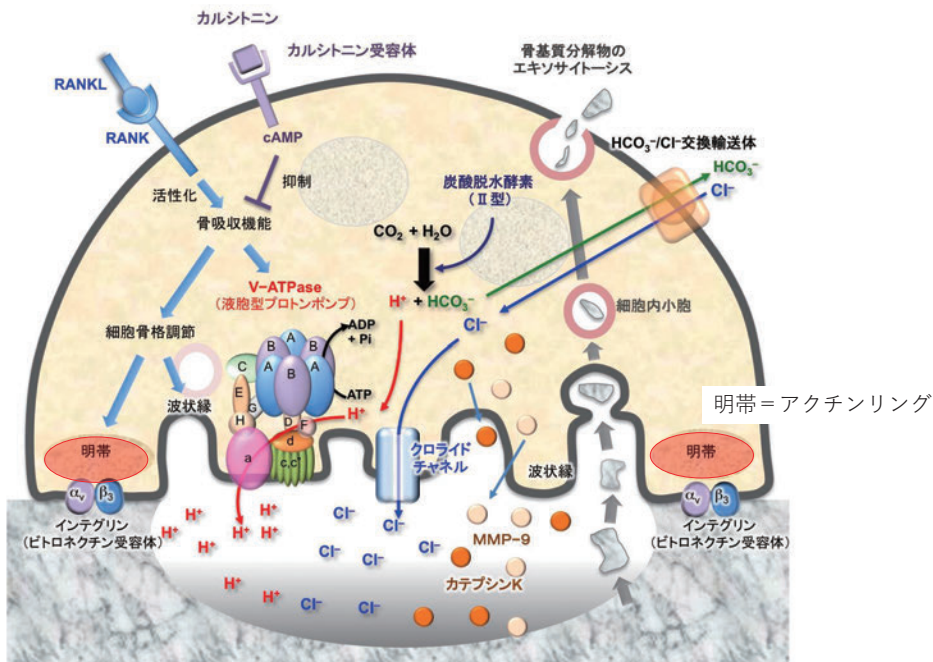
2



骨切片上で破骨細胞を培養すると骨吸収を行うことが確認できる

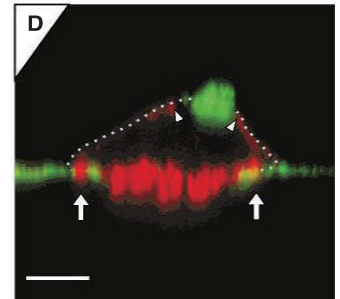
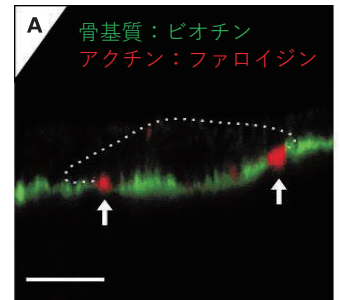
6

破骨細胞の骨吸収機構



高見 正道. 日本臨床.2011;69:1170-73.

骨基質分解物のエンドサイトーシス



J. Salo. Science.1997; 276: 270-273.

骨吸収機構の三次元の位置関係・構造の解明

①FIB-SEM観察 (集束イオンビーム走査電子顕微鏡)
硬組織である骨と軟組織である細胞を同時に切削し、破骨細胞の細胞全体と骨吸収構造を三次元で解析した

②CLEM観察 (光-電子相関顕微鏡)
共焦点レーザー顕微鏡で観察した標的タンパク(アクチン、プロトンポンプ)とSEMで観察した骨吸収窩の位置関係を解析した

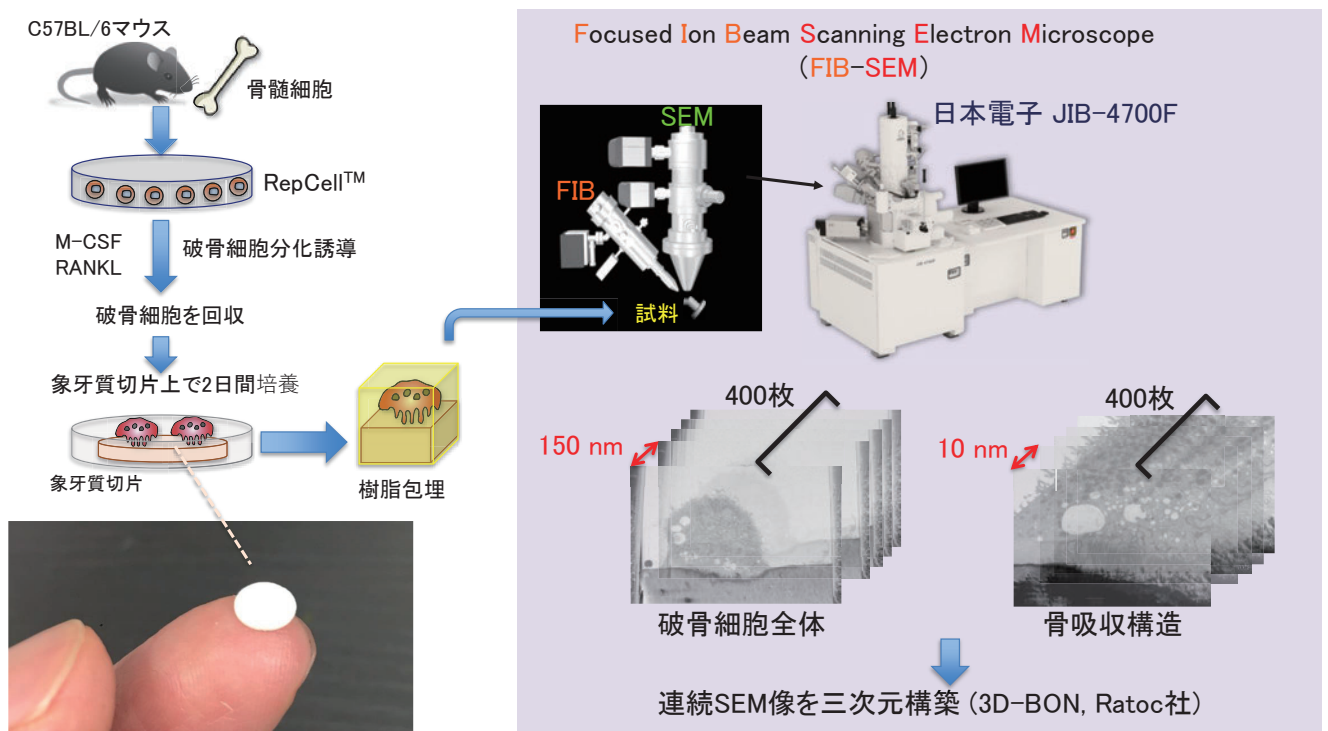
走査型電子顕微鏡を用いた骨吸収機構の解明

①FIB-SEM観察 (集束イオンビーム走査電子顕微鏡)
硬組織である骨と軟組織である細胞を同時に切削し、
破骨細胞の細胞全体と骨吸収構造を三次元で解析した

②CLEM観察 (光-電子相関顕微鏡)
共焦点レーザー顕微鏡で観察した標的タンパク(アクチン、プロ
トンポンプ)と骨吸収窩の位置関係を解析した

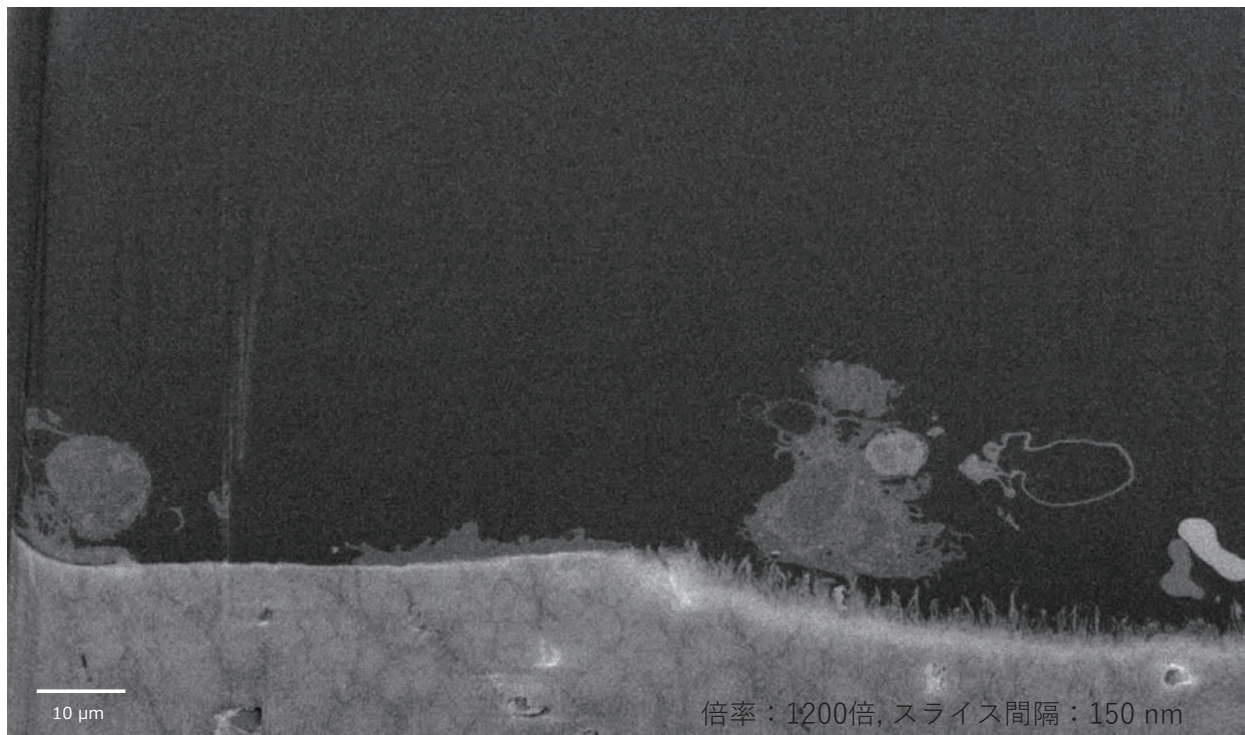
9

FIB-SEMによる破骨細胞の三次元構造の観察

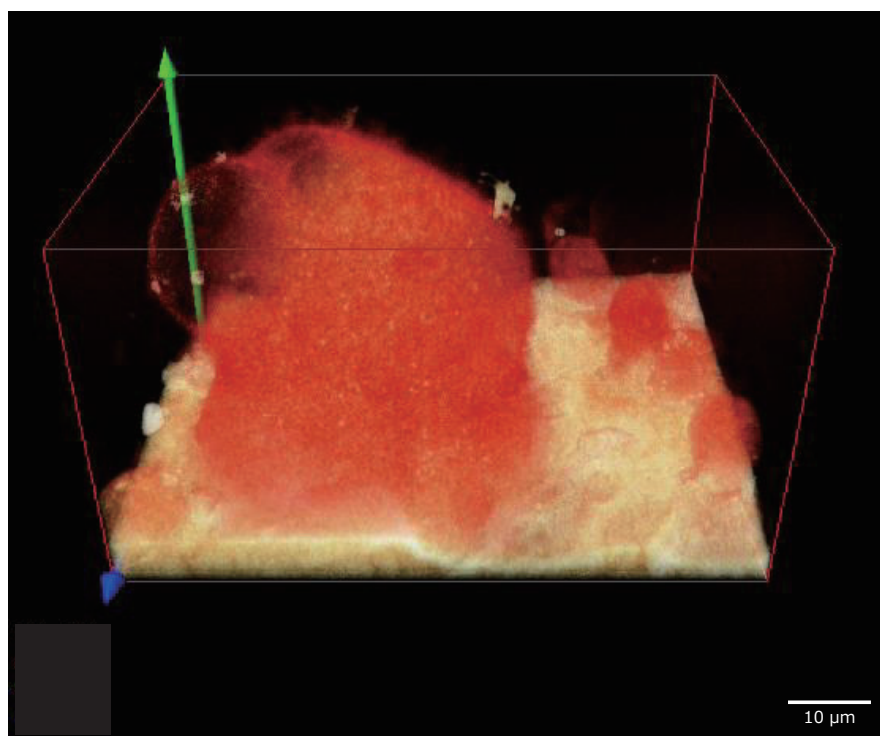


10

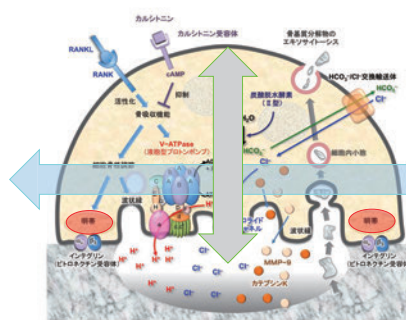
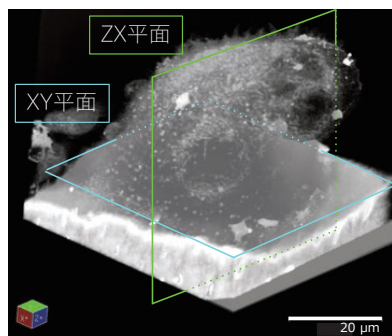
FIB-SEMによる破骨細胞全体の連続SEM像



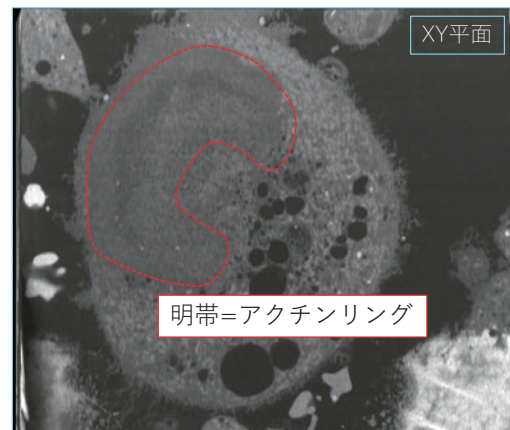
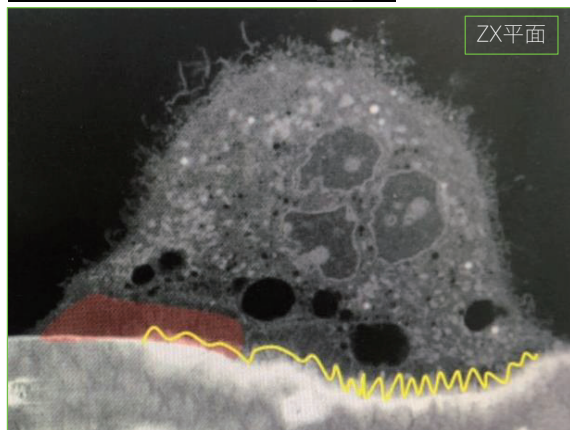
破骨細胞の三次元像



破骨細胞の細胞極性



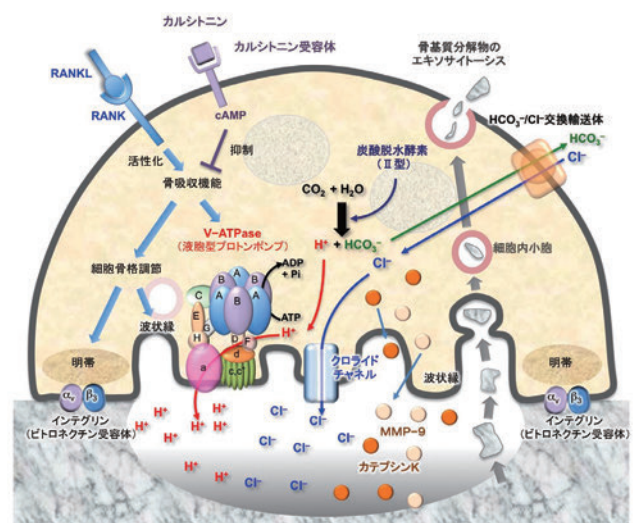
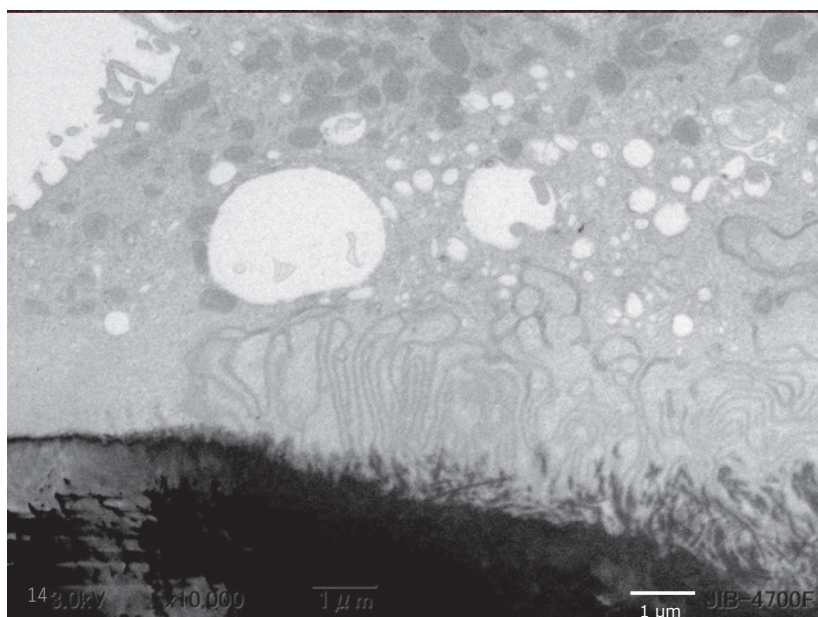
XY方向にも極性？



明帯=アクチンリング

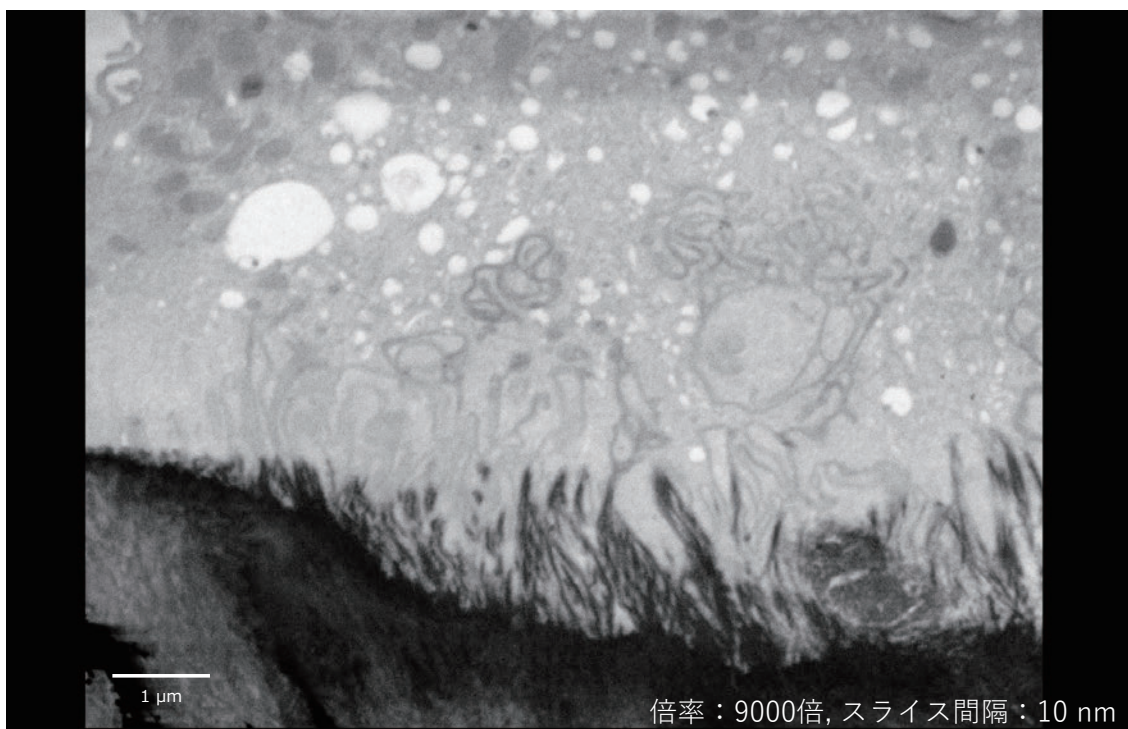
13

FIB-SEMによる骨吸収構造の連続SEM像



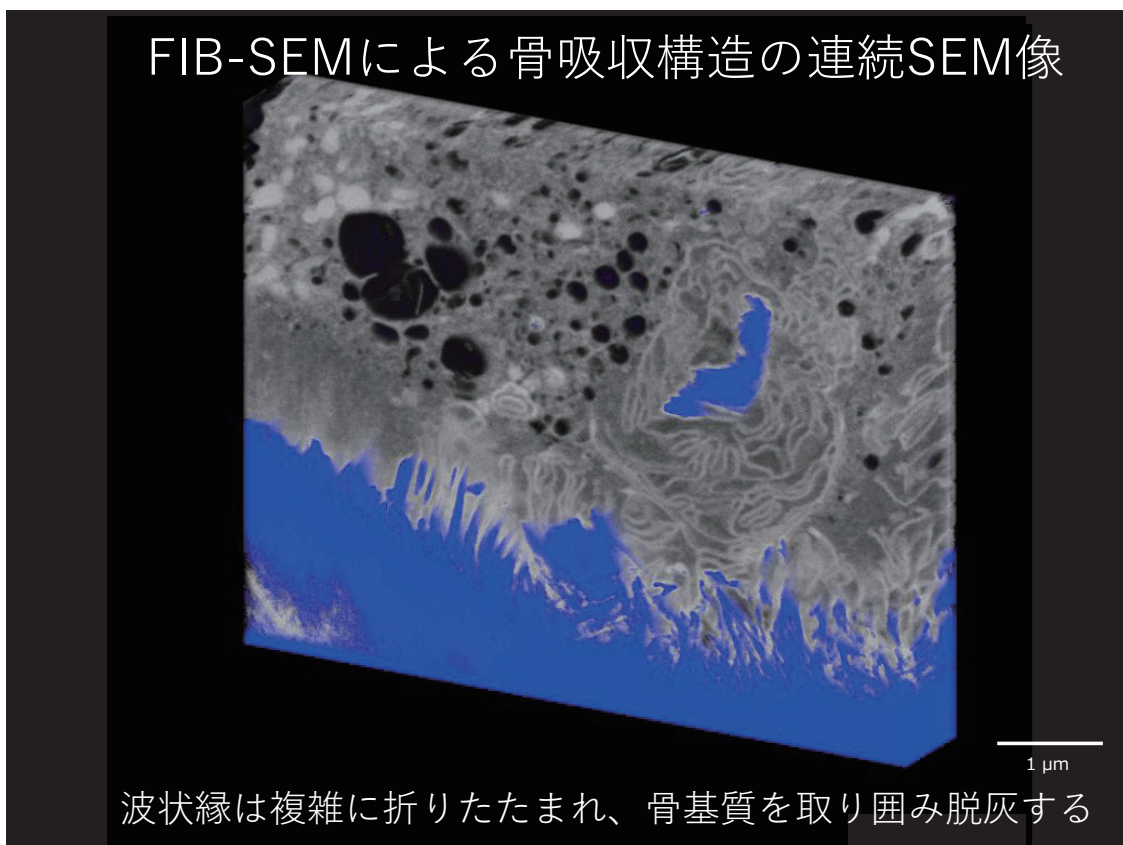
高見 正道. 日本臨床. 2011;69:1170-73.

FIB-SEMによる骨吸収構造の連続SEM像



15

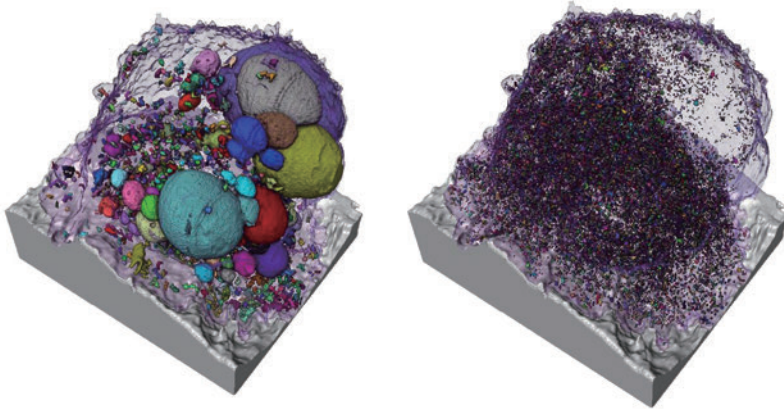
FIB-SEMによる骨吸収構造の連続SEM像



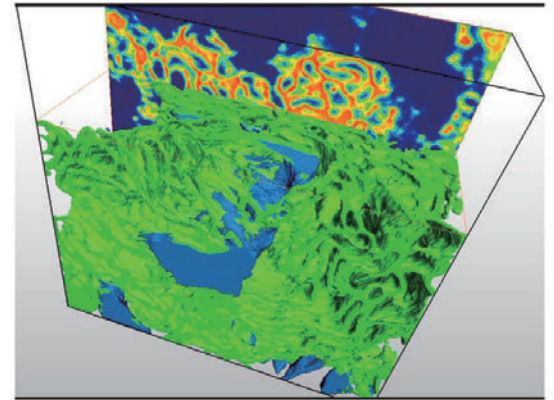
16

三次元画像解析ソフトウェアAmiraを用いた画像解析

サイズによる空胞の局在解析



機械学習を用いた膜構造抽出



17

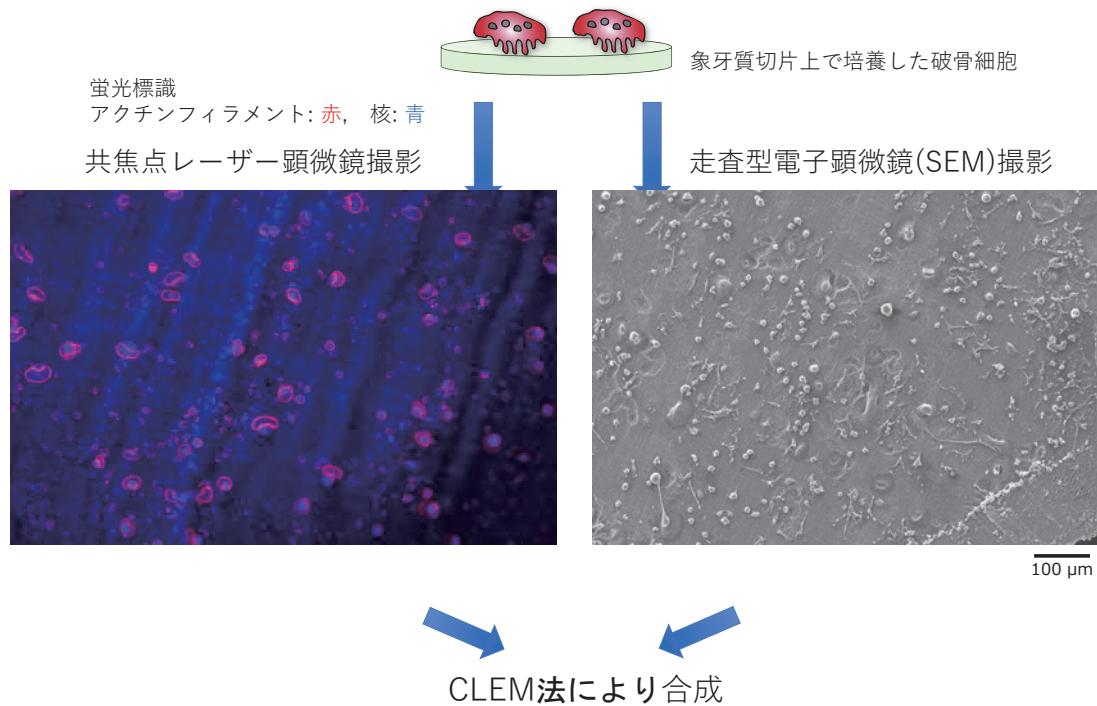
走査型電子顕微鏡を用いた骨吸収機構の解明

①FIB-SEM観察 (集束イオンビーム走査電子顕微鏡)
硬組織である骨と軟組織である細胞を同時に切削し、
破骨細胞の細胞全体と骨吸収構造を三次元で解析した

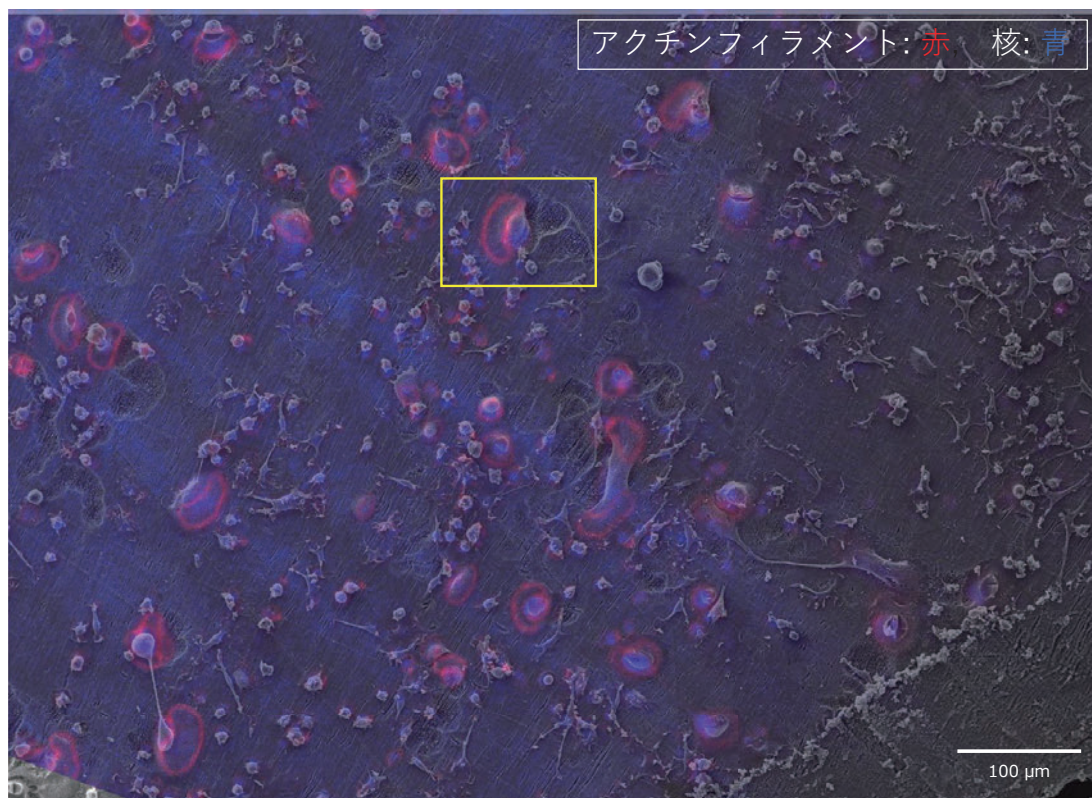
②CLEM観察 (光-電子相関顕微鏡)
共焦点レーザー顕微鏡で観察した骨吸収機構に関連したタンパク
(アクチン、プロトンポンプ)と、SEM像による骨吸収窩の位置関
係を解析した

18

光-電子相関顕微鏡法 (CLEM)法による 破骨細胞のアクチンリングと骨吸収窩の観察

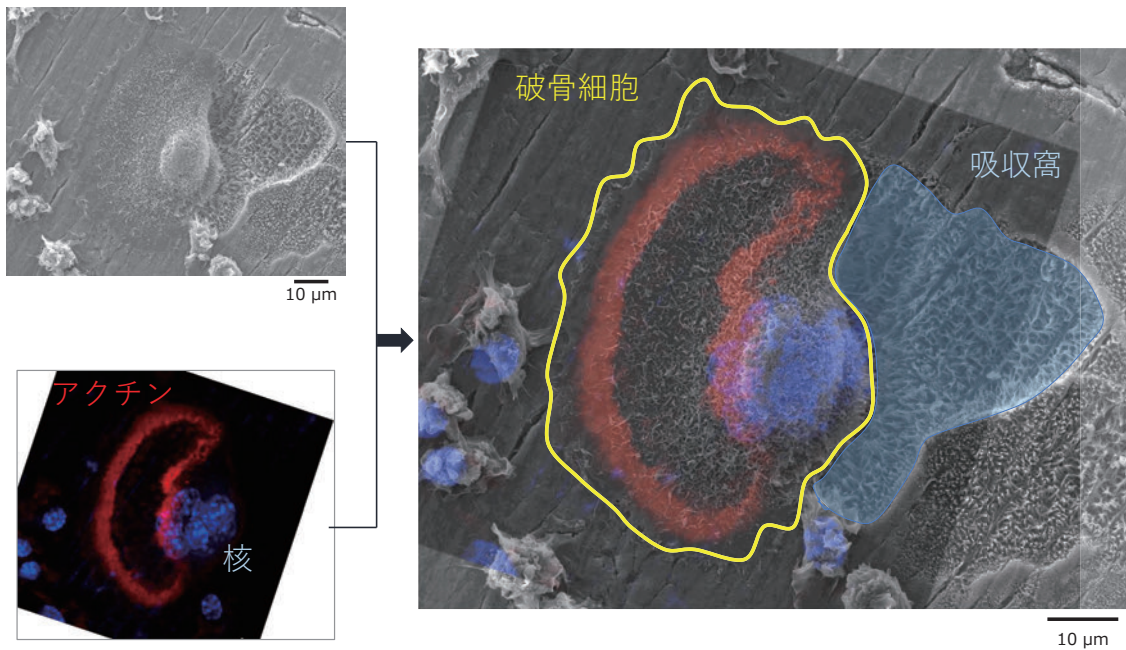


19



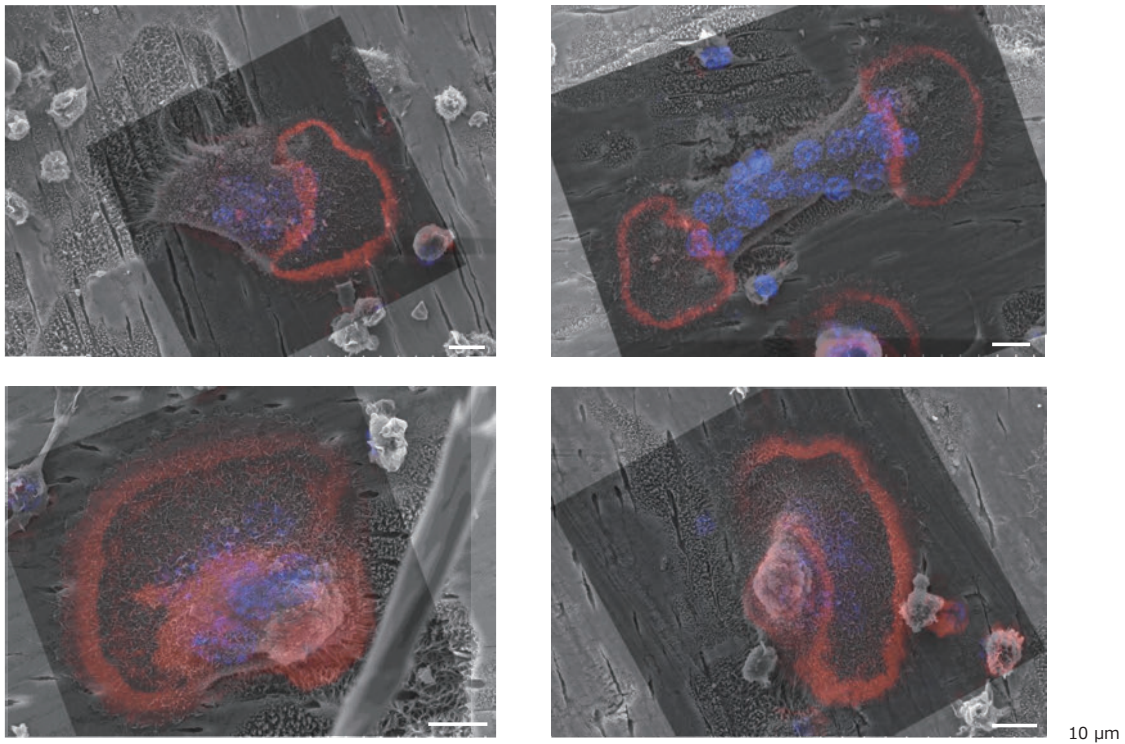
20

アクチンリングは細胞の片側に局在する



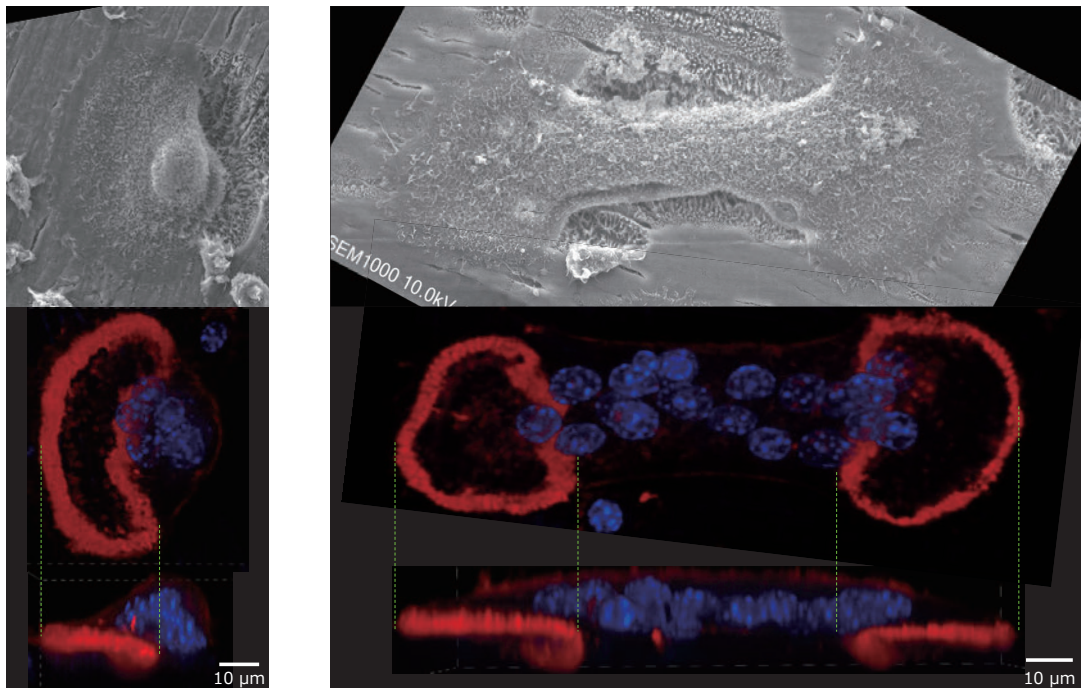
21

アクチンリングは細胞の片側に局在する



22

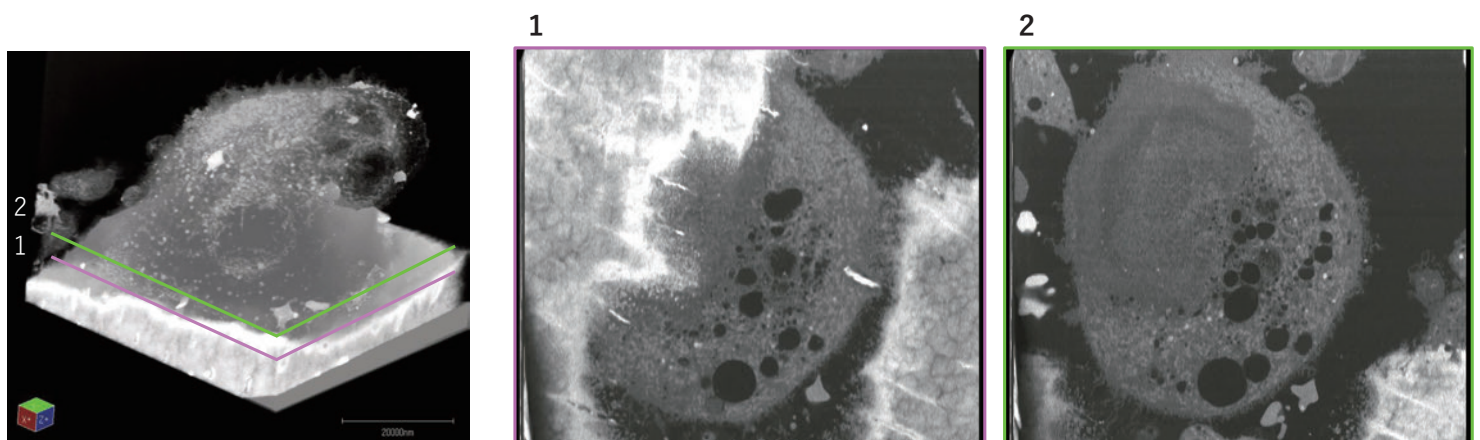
アクチンリングの三次元構造



23

アクチンリングの細胞辺縁側は平坦で、内側の部分が吸収窩に沈み込んでいる

アクチンリングと骨吸収の最前線

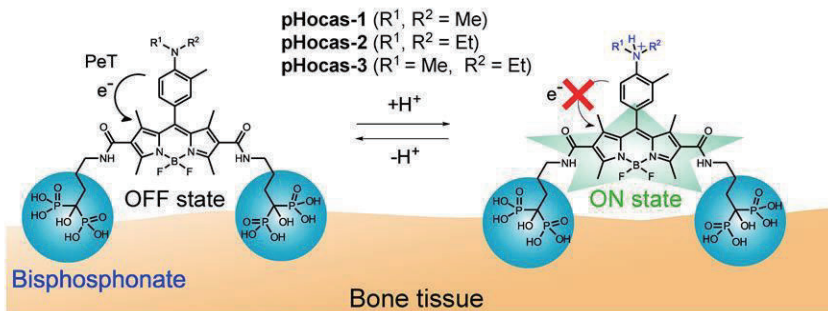


24

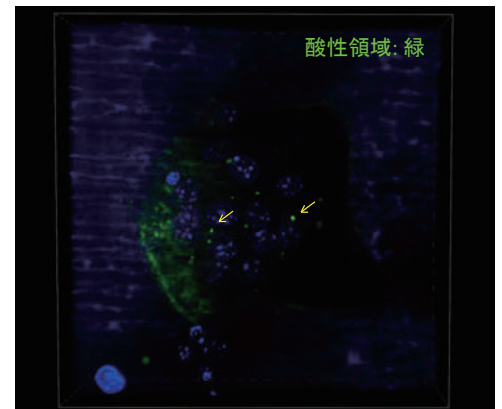
アクチンリングの内側にそった形状で骨吸収が進行している

破骨細胞の酸性化部位の可視化

ビスホスホネート骨格に結合させたpH感受性プローブ



Maeda H, et al. Nat Chem Biol. 2016;12:579-85.



<Z方向>



未吸収の象牙質

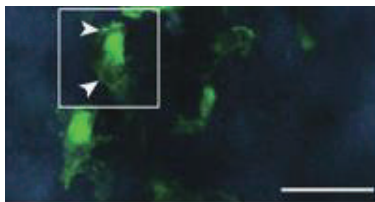
25

pH感受性プローブによる酸性化領域は吸収窩の斜面でありアクチンリングの内側に一致していた。

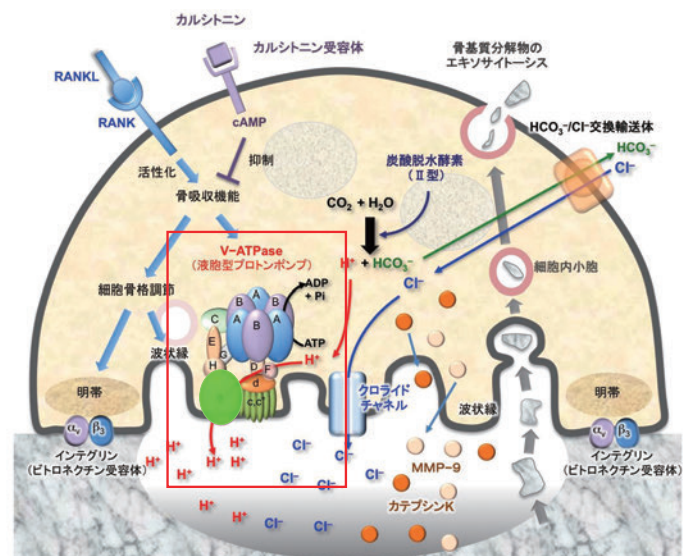
液胞型プロトンポンプを蛍光標識した破骨細胞の観察

V-type H^+ ATPase α_3 subunit-GFP fusion knock in mice : 液胞型プロトンポンプの α_3 がGFPで標識されたマウス

α_3 -GFPマウスの破骨細胞



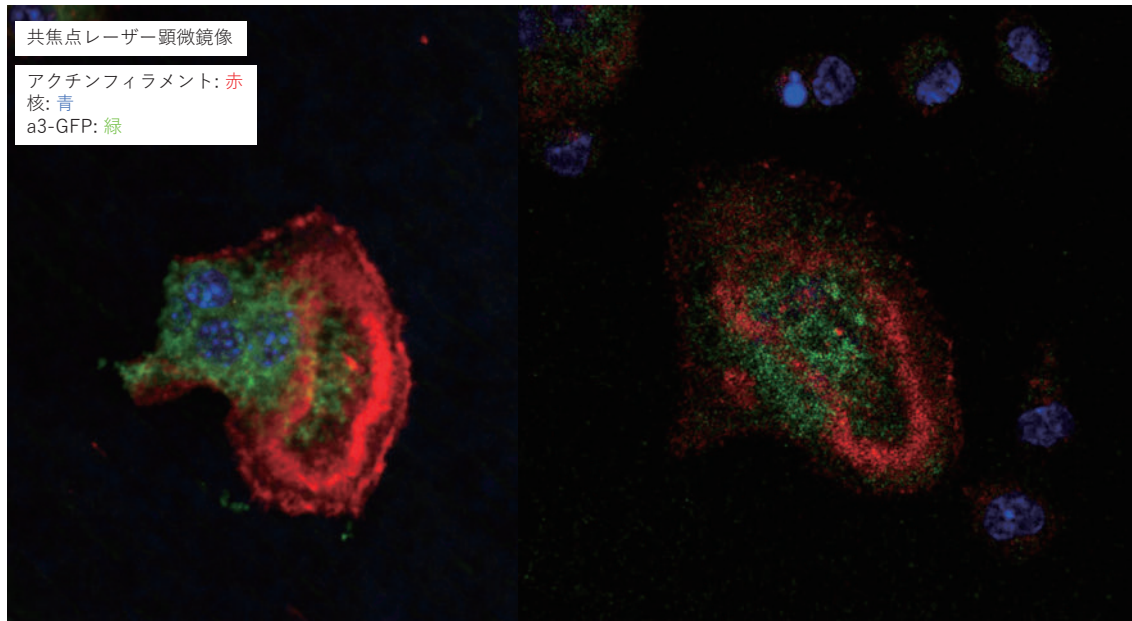
大阪大学免疫細胞生物学区研究室
 石井 優 教授との共同研究



高見 正道. 日本臨床. 2011;69:1170-73.

26

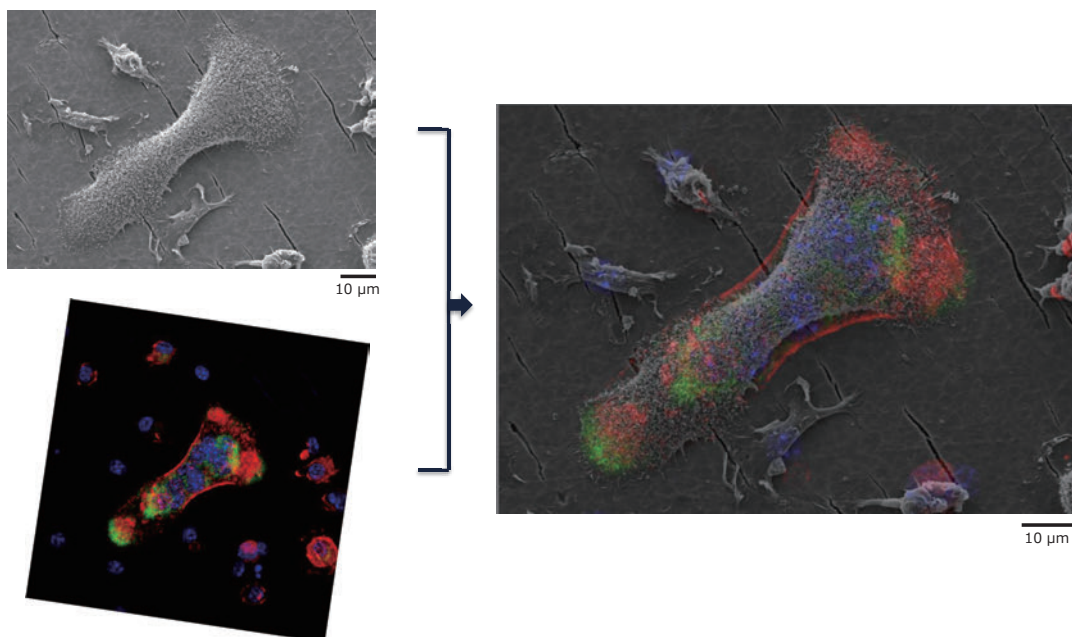
液胞型プロトンポンプを蛍光標識した破骨細胞の観察



27

アクチンリングレベルでのa3の発現はアクチンリングの外にも存在し、酸性化領域と一致しない。

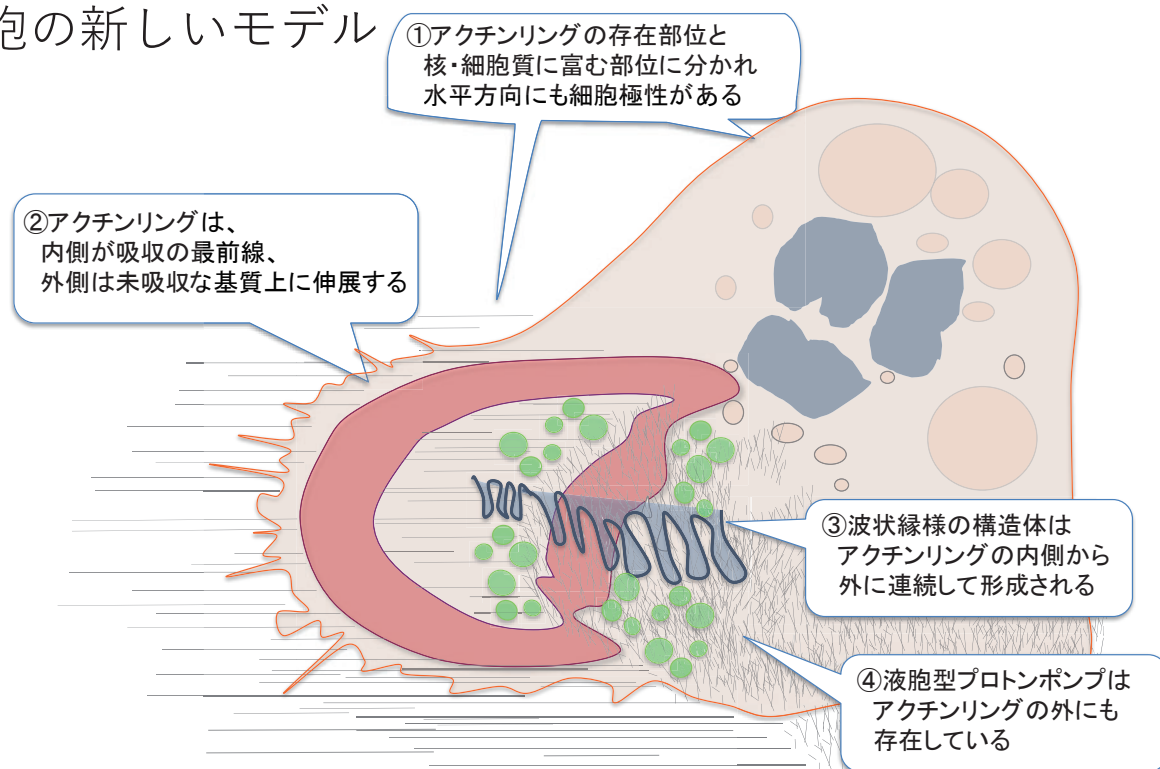
創薬モデルへの応用



28

カルシトニン処理したa3GFPマウス破骨細胞ではアクチンリングが形成されず骨吸収が阻害された

破骨細胞の新しいモデル



破骨細胞のアクチンリング・波状縁・プロトンポンプと吸収窩の三次元的位置関係が明らかになった

29

謝辞 (敬称略)

以下の企業・研究機関(順不同)の皆様方には本研究の遂行に多大なるご指導・ご協力を頂きました。この場をお借りして改めて深く御礼申し上げます。

昭和大学歯学部歯科薬理学講座
高見 正道, 坂井 信裕

昭和大学医学部医科薬理学講座
木内 祐二

昭和大学電子顕微鏡室
高木 孝士

大阪大学大学院医学系研究科免疫細胞生物学講座
石井 優, 菊田 順一

日本電子株式会社
松島 英輝

株式会社ニコンインステック
武部 明

30