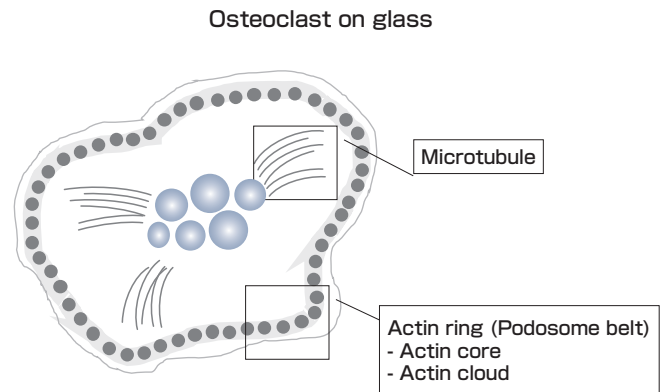


破骨細胞のポドソームの広視野・高解像共焦点イメージング ～マクロとミクロの両立～

北海道大学大学院 歯学研究院 薬理学教室の飯村忠浩先生と李智媛先生らは、骨格系の発生・発達・恒常性維持・老化・薬理学の観点から、ライフスパンでの骨・関節の研究をされている。破骨細胞の骨との接着面には、「アクチンリング」と呼ばれる環状構造があり、その構成要素である「ポドソーム」の微細構造を観察するためには、これまで電子顕微鏡の分解能が必要であった。本アプリケーションノートでは、新世代共焦点レーザー顕微鏡システムAXを使った破骨細胞のマクロ観察と、ポドソームのミクロ観察およびその定量解析の例を紹介する。

研究の背景

アクチンリングは、アクチン線維束を軸にした仮足(ポドソーム)が集積した、リング様の構造をしている(右図)。飯村先生と李先生は、これまでの研究で超解像顕微鏡を駆使し、光学顕微鏡の分解能でポドソームを定量観察できることを示した。さらに、骨を破壊・吸収する破骨細胞にケモカイン受容体のCCR5が存在し、破骨細胞の機能調節を行っていることを明らかにした。CCR5欠損マウスの破骨細胞や、CCR5阻害薬であるマラヴィロック処理を行ったヒト骨細胞では、破骨細胞の骨への接着や移動に重要なアクチンリングの形成が阻害され、細胞の骨吸収機能が低下する(参考文献)。



8Kの超高画素により、低倍率レンズでのミクロ観察を実現

従来、ミクロ観察には高倍率レンズが必須であり、低倍率レンズでは解像力(光学分解能と画素数)を満たせなかった。8K画素により、画素数の課題をクリアするとともに低倍率レンズでも個々のポドソームが解像できるようになり、定量評価も可能となった(図1)。

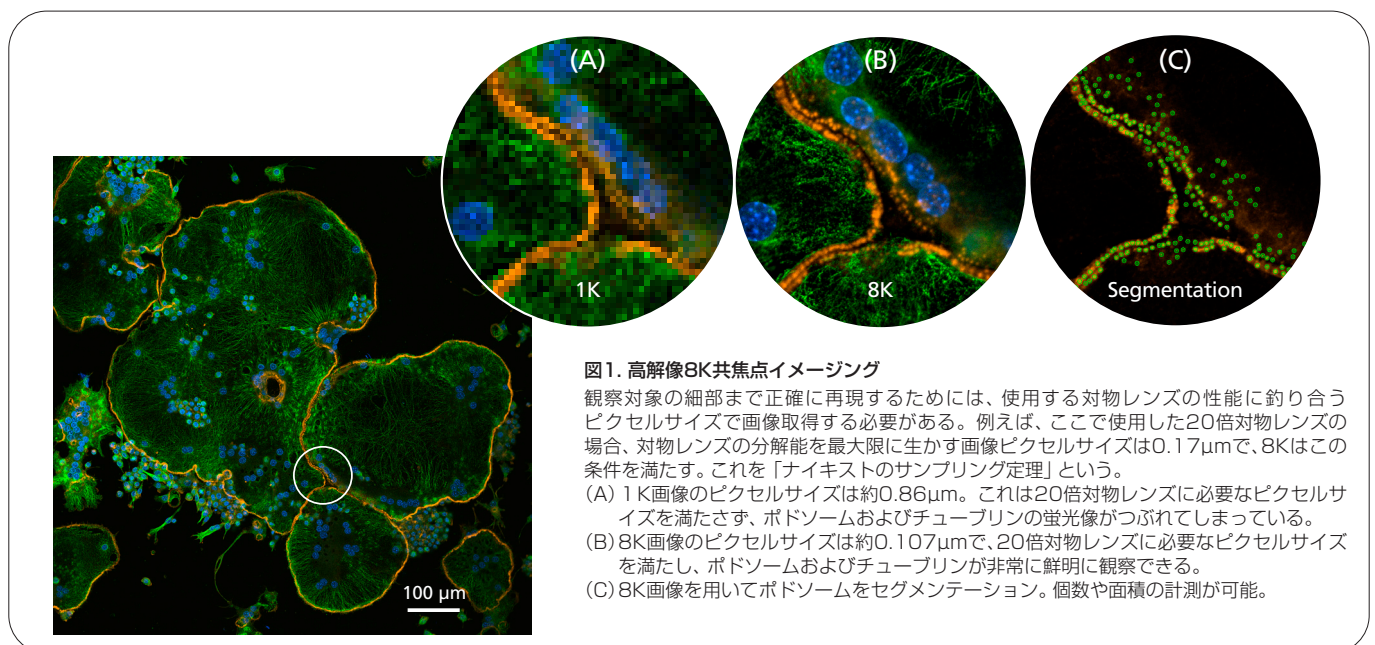


図1. 高解像8K共焦点イメージング

観察対象の細部まで正確に再現するためには、使用する対物レンズの性能に釣り合うピクセルサイズで画像取得する必要がある。例えば、ここで使用した20倍対物レンズの場合、対物レンズの分解能を最大限に生かす画像ピクセルサイズは0.17μmで、8Kはこの条件を満たす。これを「ナイキストのサンプリング定理」という。

(A) 1K画像のピクセルサイズは約0.86μm。これは20倍対物レンズに必要なピクセルサイズを満たさず、ポドソームおよびチューブリンの蛍光像がつぶれてしまっている。

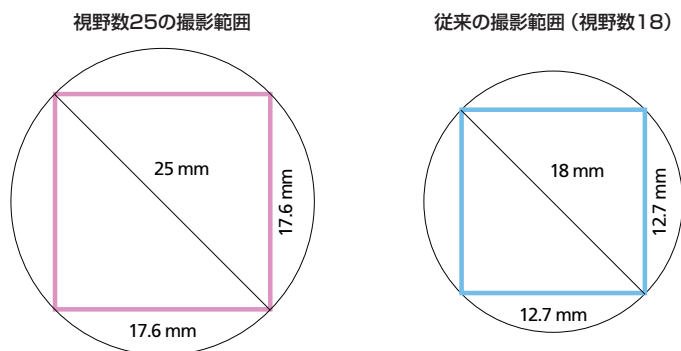
(B) 8K画像のピクセルサイズは約0.107μmで、20倍対物レンズに必要なピクセルサイズを満たし、ポドソームおよびチューブリンが非常に鮮明に観察できる。

(C) 8K画像を用いてポドソームをセグメンテーション。個数や面積の計測が可能。

巨大な破骨細胞をワンショットでとらえる

低倍率レンズは観察視野が広く、さらに共焦点レーザー顕微鏡システムAXの広視野（視野数25）と組み合わせることで、数百ミクロンもの巨大な破骨細胞のマクロ観察が可能である（図2A、図2B）。高倍率レンズは高解像度である一方、観察視野が狭く、破骨細胞の一部分を切り取った観察となってしまう（図2C）。

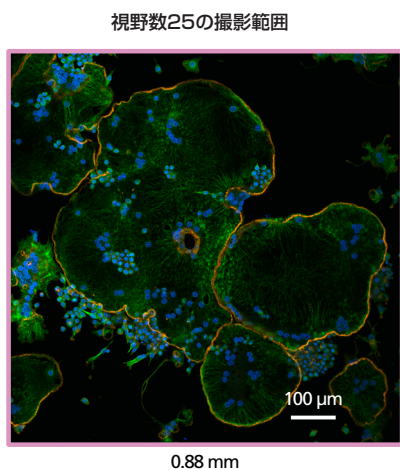
(A) 1倍対物レンズを使用した場合



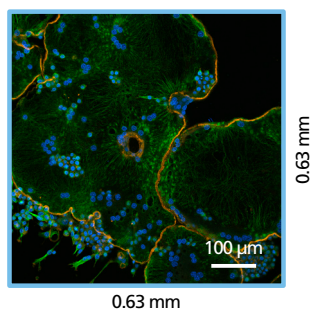
視野数とは？

視野数は、視野の広さを示す数値である。実際の撮影範囲（直径）を実視野といい、「視野数÷対物レンズ倍率÷ズーム倍率」で求める。例えば視野数25で、1倍の対物レンズを用い、ズーム1倍で撮影する場合は、「 $25 \div 1 \div 1 = 25$ 」のため、直径25 mm（17.6 mm四方）が実視野である（左図）。

(B) 20倍対物レンズを使用した場合



従来の撮影範囲（視野数18）



(C) 100倍対物レンズを使用した場合

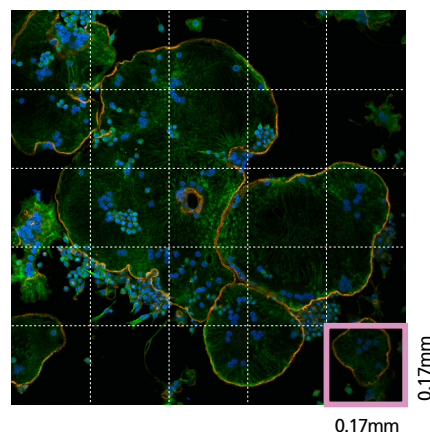


図2. 視野数25による広視野観察

- (A) 新世代共焦点レーザー顕微鏡システムAXは、対角25mmの観察視野をもち、視野数18の製品の約2倍の広さが観察可能。
- (B) 20倍対物レンズで観察した例を示す。視野数25の場合は、大きな破骨細胞を一回の撮影でとらえることができる。一方、視野数18の場合は破骨細胞の全体像が観察視野内におさまりきれない。
- (C) 100倍対物レンズを使用した場合、高分解能の観察が可能である一方、一度に観察できる視野は狭い。破骨細胞の全体像をとらえるためには、タイリング撮影が必要である。

結果とまとめ

高解像度と広視野はトレードオフの関係にあり、ミクロ観察とマクロ観察の両立はこれまで困難であった。本研究では、視野数25の広視野と8Kの超高画素をもつ新世代共焦点レーザー顕微鏡システムAXを用いることにより、低倍率レンズを使用して破骨細胞の全体像をとらえつつ、破骨細胞の仮足（ポドソーム）形成を網羅的に定量評価することができた。破骨細胞は、骨粗鬆症をはじめとする運動・骨格器の病気の治療薬の標的細胞である。共焦点レーザー顕微鏡の技術革新により、病態メカニズムの解析や薬理作用の評価へのさらなる貢献が期待される。

参考文献

The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function. *Nature Communications* 2017, DOI: 10.1038/s41467-017-02368-5

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

従来機比4倍の8192 x 8192画素の高解像度画像を実現。対角25mmの広視野でサンプルの広範囲を一度に取得できます。自動シェーディング補正機能は、ムラのない画像取得を可能にします。

