

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11005

研究課題名(和文) BMP誘導異所性骨化過程の生体内イメージング手法の確立

研究課題名(英文) In vivo imaging of BMP-induced ectopic bone formation

研究代表者

海渡 貴司 (Kaito, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70623982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Bone morphogenetic protein(BMP)-2は強力な骨誘導活性を有し骨組織再生技術において中心的役割を担っている。しかし生体内におけるBMP-2誘導骨形成の過程は十分に理解されていなかった。我々は二光子励起顕微鏡を用いて、BMP-2による異所性骨形成が行われる過程をマウス生体内で「可視化」する系を確立し、骨形成の過程で骨芽細胞・破骨細胞の誘導数や運動・形態およびコラーゲン形成における変化を定量的に示した。また、骨代謝作動薬であるPTH1-34投与がBMP誘導骨形成に与える影響を骨芽細胞・破骨細胞への時間空間的な影響の観点から観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷や腫瘍に伴う広範囲骨欠損の治療や脊椎固定術においては骨組織を早期に形成し骨癒合を獲得することが求められる。強力な骨形成能を有する骨形成因子(BMP)は欧米では広く臨床使用されるが、骨形成誘導過程に伴う炎症反応に関連した有害事象が多く報告されている。我々が確立したイメージング手法によりBMP-2誘導骨形成の最適化が可能となれば、BMP-2使用に関連する有害事象を低減しながら効率的な骨再生や骨癒合獲得期間を短縮できることが期待され、超高齢社会のなか骨癒合の獲得が一層容易ではなくなっている現在において、社会や医療経済的負担を低減することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic protein (BMP)-2 plays a central role in bone-tissue engineering because of its potent bone-induction ability. However, the process of BMP-induced bone formation in vivo remains poorly elucidated. In this study, we established a method for intravital imaging of the entire process of BMP-2-induced ectopic bone formation. Using multicolor intravital imaging in transgenic mice, we visualized the spatiotemporal process of bone induction, including appearance and motility of osteoblasts and osteoclasts, angiogenesis, collagen-fiber formation, and bone-mineral deposition. Furthermore, we investigated how PTH1-34 affects BMP-2-induced bone formation, which revealed that PTH1-34 administration accelerated differentiation and increased the motility of osteoblasts, whereas it decreased morphological changes in osteoclasts. This is the first report on visualization of the entire process of BMP-2-induced bone formation using intravital imaging techniques.

研究分野：整形外科、骨組織再生

キーワード：骨組織再生 BMP-2 生体内イメージング 異所性骨化

1. 研究開始当初の背景

外傷や腫瘍に伴う広範囲骨欠損や脊椎固定術においては骨組織の早期誘導による骨癒合の獲得が求められる。骨形成能を有するサイトカイン BMP (bone morphogenetic protein) は強力な骨誘導能を有するが骨誘導過程に伴う炎症反応に起因する副作用が幅広い臨床使用の妨げとなっている。効率的に骨を誘導し、炎症反応に関連した副作用を低減するため我々は骨組織工学の3つの手法、(1)細胞治療: MSC を骨形成細胞に分化させ移植, (2)遺伝子治療: BMP 遺伝子を骨修復部位へ導入, (3)サイトカイン治療: BMP と担体を組み合わせて移植, を用いた研究を行ってきた。BMP 誘導異所性骨化の過程を生体内で「可視化」することができれば、これらアプローチによる骨形成を最適化できると考えた。

2. 研究の目的

我々の研究を含め BMP を用いた骨組織工学手法により効率的な骨形成や誘導骨量を増加させる報告が数多く存在するが、必要 BMP 量の低減や誘導新生骨量の増加が示されるのみで、実際に生体内での異所性骨化過程で骨芽細胞や破骨細胞の動態や骨形成・骨吸収に各種介入がどのような影響を与えるのかを直接観察した報告はない。本研究では 2 光子励起顕微鏡を用いて生体元来の骨ではなく BMP 誘導異所性骨化の骨化過程を生体内で観察することにより、1) 生体内異所性骨化イメージング手法を確立すること、および 2) 各種骨代謝作動薬が骨代謝関連細胞の動態や形成骨量に与える影響を解明し病態に応じた薬剤介入法の最適化を行うこと、とした。

3. 研究の方法

1) 骨芽細胞および破骨細胞蛍光標識マウスの作成

Col2.3-ECFP / TRAP-tdTomato mouse

成熟骨芽細胞に発現する I 型コラーゲン (Col1a1) promoter 下流にシアン蛍光タンパク (enhanced cyan fluorescent protein: ECFP) を発現させ、成熟骨芽細胞をシアン色で蛍光標識したマウス (Col2.3-ECFP) と成熟破骨細胞に発現する TRAP の promoter 下に赤色蛍光タンパク質 (tdTomato) を発現させ、成熟破骨細胞を赤色で標識したマウス (TRAP-tdTomato) を交配することにより成熟破骨細胞と成熟細胞を多重蛍光標識したマウスを作成

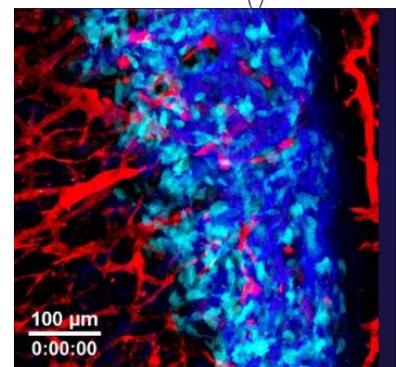
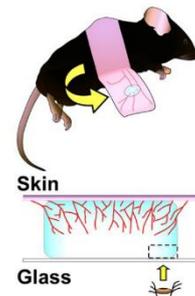
2) マウス BMP 異所性骨化の生体内イメージング手法の確立

12 週齢雄 C57Bl/6N 由来標識マウスを用いて背部皮下に BMP-2 を含浸したコラーゲンスポンジを移植する。観察: 術後 7 日・10 日・14 日・21 日で移植部皮膚を翻転し同部を 2 光子励起顕微鏡にて連続 4-6 時間動画撮影した。(右上図) タイムポイントは Col2.3-ECFP のみを導入し骨芽をシアン標識したマウスを用いた予備実験により決定した。(右下図: 術後 14 日の BMP 誘導新生骨観察画像 中央に濃青のコラーゲン内にシアン色の骨芽細胞を認め両側に新生血管 [Rhodamin 標識: 赤] を認める。) コラーゲン線維: Second harmonic generation (SHG) によりコラーゲン線維を描出

カルシウム沈着: Alizarin にてカルシウム塩を染色した。

3) 骨芽細胞・破骨細胞の動的評価

細胞数: 撮像視野内の骨芽細胞および破骨細胞数を各術後時期で画像解析ソフトにより semiautomatic にカウントし、骨芽細胞と破骨細胞の誘導時期の違い・薬剤投与 (PTH1-34) による変化を評価し、細胞運動はトラッキングの技術を用いて動画撮影期間中の骨芽細胞の移動速度を定量化し、破骨細胞は形態を Cell Deformation Index (CDI) を用いて定量評価を行った。



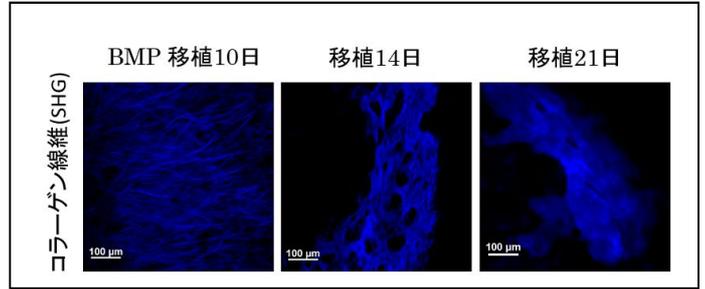
4) コラーゲン線維配向性変化

コラーゲンの配向性変化をフーリエ変換行いパワースペクトルとして定量化した。

5) 骨形成定性・定量評価：HE 染色により骨梁構造形成の経時的進行を確認し、micro CT を用いて bone volume を定量化した。

6) 骨芽細胞運動と遺伝子発現の関連分析

骨芽細胞がダイナミックに誘導される BMP 含浸コラーゲン移植後早期の骨芽細胞を sorting して抽出し、RNAseq により細胞運動と遺伝子発現の相関を検討した。

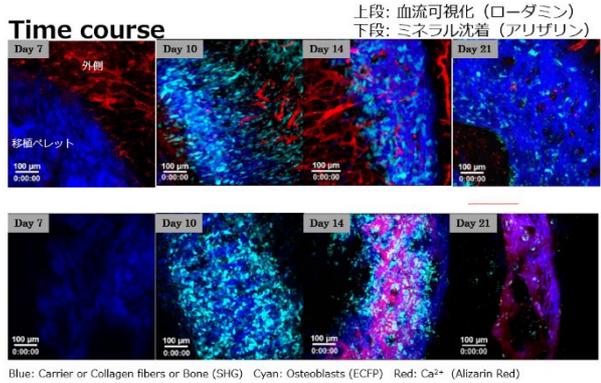


4. 研究成果

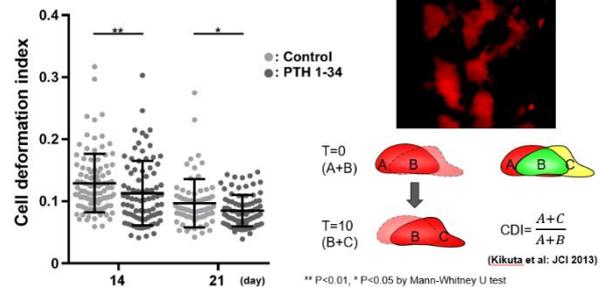
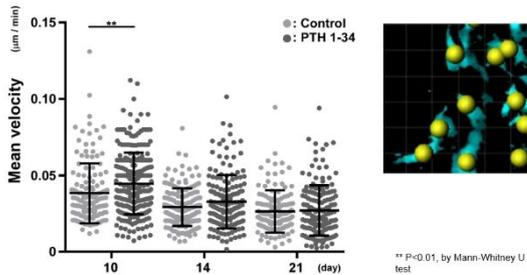
BMP による異所性骨化過程を世界で初めて可視化することに成功した。また経時的に異所性骨化が血管誘導、骨芽細胞遊走、コラーゲン形成、ミネラル沈着と進む過程含めて生体内で観察・可視化した。(右図)

骨芽細胞運動は移植後 10 日で出現後に徐々に減少し、運動減少に伴い骨形成が増加した。また、細胞形態は紡錘形から四角形へと変化した。骨芽細胞の遺伝子発現では、細胞遊走時から骨芽細胞分化は既に認めており、細胞骨格に関連する遺伝子発現は術後 14 日で上昇を認めた。PTH1-34 投与は、骨芽細胞の遊走時期を早め、細胞数の増加を維持した(下左図)。一方、PTH1-34 投与は破骨細胞の出現時期には影響を与えなかったが、経時的に破骨細胞数を増加させた(下右図)。

本研究成果は、BMP-2 による異所性骨化の全過程を生体内で可視化した最初の報告であり、異所性骨化過程の理解や、骨代謝作用薬併用の治療効果最適化、そして新しい新規薬剤の効果検証方法となることが期待される。



Blue: Carrier or Collagen fibers or Bone (SHG) Cyan: Osteoblasts (ECFP) Red: Ca²⁺ (Alizarin Red)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Furuya M, Kikuta J, Fujimori S, Seno S, Maeda H, Shirazaki M, Uenaka M, Mizuno H, Iwamoto Y, Ito T, Isogai Y, Kashii M, Kaito T, Ohba S, Shung UI, Lichtler AC, Kikuchi K, Matsuda H, Yoshikawa H, Ishii M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Dynamic modes of communication between mature osteoblasts and osteoclasts in vivo.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 e9631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-02541-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto K, Kaito T, Furuya M, Seno S, Okuzaki D, Kikuta J, Tsukazaki H, Matsuda H, Yoshikawa H, Ishii M.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 In Vivo Dynamic Analysis of BMP-2-induced Ectopic Bone Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61825-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Bal Z, Kushioka J, Kodama J, Kaito T, Yoshikawa H, Korkusuz P, Korkusuz F.	4. 巻 in press
2. 論文標題 BMP and TGFb signaling; Use and Release in Bone Regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Turkish Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3906/sag-2003-127	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ukon Y, Makino T, Kodama J, Tsukazaki H, Tateiwa D, Yoshikawa H, Kaito T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Molecular-Based Treatment Strategies for Osteoporosis: A Literature Review.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E2557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20102557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitaguchi K, Kashii M, Ebina K, Kaito T, Okada R, Makino T, Etani Y, Ishimoto T, Nakano T, Yoshikawa H.	4. 巻 130
2. 論文標題 The combined effects of teriparatide and anti-RANKL monoclonal antibody on bone defect regeneration in ovariectomized mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada R, Kaito T, Ishiguro H, Kushioka J, Otsuru S, Kanayama S, Bal Z, Kitaguchi K, Hashimoto K, Makino T, Takenaka S, Sakai Y, Yoshikawa H.	4. 巻 20(5)
2. 論文標題 Assessment of effects of rhBMP-2 on interbody fusion with a novel rat model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Spine Journal	6. 最初と最後の頁 821-829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.spinee.2019.12.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 海渡 貴司
2. 発表標題 最新の画像解析研究による運動器（脊髄・骨）の痛みの可視化
3. 学会等名 第12回運動器疼痛学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海渡 貴司
2. 発表標題 脊椎インストゥルメンテーションの進歩が矯正固定術に果たす役割とbiologics 併用による将来の展望.
3. 学会等名 第28回日本脊椎インストゥルメンテーション学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海渡 貴司
2. 発表標題 脊椎を生まれ変わらせる - 脊柱機能再建と再生に向けた最新のアプローチ -
3. 学会等名 第92回日本整形外科学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎 裕之, 海渡 貴司, 橋本 国彦, 吉川 秀樹, 石井 優.
2. 発表標題 閉経後骨粗鬆症マウスにおける異所性骨化のin vivoイメージング
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 国彦, 海渡 貴司, 塚崎 裕之, 瀬尾 茂人, 松田 秀雄, 吉川 秀樹, 石井 優.
2. 発表標題 PTH1-34投与頻度がBMP-2誘導異所性骨形成へ与える影響 生体内イメージング解析
3. 学会等名 第48回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Kaito
2. 発表標題 How to manage bone union and bone grafts in LIF
3. 学会等名 SOLAS Japan 2nd Regional Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 海渡 貴司
2. 発表標題 脊椎で骨をつくる -Bench to bedside to bench-
3. 学会等名 第29回北陸脊椎脊髄研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 海渡 貴司
2. 発表標題 脊椎に骨は自在に作れるか？
3. 学会等名 第33回UTSGセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 海渡 貴司
2. 発表標題 脊柱再建を目指した脊椎固定と椎間板再生の現状と展望
3. 学会等名 浜名湖アルプススパインセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 海渡 貴司
2. 発表標題 椎体間固定に求められるもの -歴史に学び未来に進むために-
3. 学会等名 北大脊椎脊髄外科セミナー2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hashimoto K, Kaito T, Furuya M, Seno S, Tsukazaki H, Yoshikawa H, Ishii M.
2. 発表標題 In vivo dynamic visualization of bone tissue regeneration in BMP2-induced ectopic ossification.
3. 学会等名 12th International BMP Conference. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hashimoto K, Furuya M, Seno S, Matsuda H, Yoshikawa H, Ishii M, Kaito T.
2. 発表標題 In vivo dynamic visualization of bone tissue regeneration in BMP2-induced ectopic ossification.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 国彦, 古家 雅之, 瀬尾 茂人, 松田 秀雄, 吉川 秀樹, 石井 優, 海渡 貴司
2. 発表標題 BMP-2誘導異所性骨化モデルを用いた骨組織再生の生体イメージング
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 国彦, 古家 雅之, 瀬尾 茂人, 松田 秀雄, 吉川 秀樹, 石井 優, 海渡 貴司
2. 発表標題 BMP-2誘導異所性骨形成モデルによる骨組織再生の生体内イメージング
3. 学会等名 第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古家 雅之, 菊田 順一, 瀬尾 茂人, 前田 拓樹, 柏井 史文, 海渡 貴司, 菊地 和也, 松田 秀雄, 吉川 秀樹, 石井 優
2. 発表標題 二光子励起生体イメージングを用いた破骨細胞・骨芽細胞コミュニケーションの解明
3. 学会等名 第90回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 国彦, 古家 雅之, 瀬尾 茂人, 松田 秀雄, 吉川 秀樹, 石井 優, 海渡 貴司
2. 発表標題 BMP-2誘導異所性骨化モデルを用いた骨形成の生体内イメージング
3. 学会等名 第18回運動器科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 国彦, 海渡 貴司, 菊田 順一, 吉川 秀樹, 石井 優
2. 発表標題 骨組織再生の可視化 - BMP-2による異所性骨形成の生体内イメージング -
3. 学会等名 第38回日本炎症・再生医療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kunihiko Hashimoto, Masayuki Furuya, Hideki Yoshikawa, Masaru Ishii, Takashi Kaito
2. 発表標題 In vivo Dynamic visualization of bone tissue regeneration in BMP2-Induced ectopic ossification
3. 学会等名 第35回日本骨代謝学会学術集会.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 国彦, 古家 雅之, 瀬尾 茂人, 松田 秀雄, 吉川 秀樹, 石井 優, 海渡 貴司
2. 発表標題 生体二光子励起イメージングを用いたPTH1-34併用・非併用条件下でのBMP-2誘導異所性骨化の可視化.
3. 学会等名 第90回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 国彦, 古家 雅之, 吉川 秀樹, 石井 優, 海渡 貴司
2. 発表標題 BMP-2誘導異所性骨形成過程の生体内イメージング
3. 学会等名 第32回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kunihiko Hashimoto, Masayuki Furuya, Shigeto Seno, Hideo Matsuda, Hideki Yoshikawa, Masaru Ishii, Takashi Kaito
2. 発表標題 In vivo dynamic visualization of bone tissue regeneration in BMP2-induced ectopic ossification
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	橋本 国彦 (Hashimoto Kunihiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	古家 雅之 (Furuya Masayuki)		
研究協力者	塚崎 裕之 (Tsukazaki Hiroyuki)		
連携研究者	石井 優 (Ishii Masaru) (10324758)	大阪大学・生命機能研究科・教授 (14401)	