

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12807

研究課題名(和文) 骨芽細胞動態解析による軟骨原基を起点とした骨形成過程の解明と応用

研究課題名(英文) Applicational study of bone formation mechanism based on calcified cartilage

研究代表者

河合 克宏 (KAWAII, Katsuhiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00553653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：内軟骨性骨化組織における組織学的な解析から、石灰化軟骨が骨形成の優れた足場となる可能性を見出した。そこで、石灰化軟骨の構成成分と形状という2つの側面に着目し、石灰化軟骨由来の骨形成促進因子の探索および、石灰化軟骨の特徴的な形状に着目したマイクロパターニングの開発を行った。また、細胞動態解析によるインプラント材料の新たな評価法の開発も行った。それらを組み合わせることで、骨芽細胞分化および骨形成を促す骨芽細胞の生着性の高い新たなインプラント表面の形状、およびコート素材開発が実現できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の進行と治療技術の発展により、世界的にインプラント製品の需要が大幅に拡大している。インプラントは、長期間生体に埋入して使用されるため、高い生体親和性と、安定的な強度が求められる。特に、インプラント材料と骨組織の接合性が重要である。本研究は、生体内における内軟骨性骨化の組織学的解析から得られた知見を元にインプラント表面形状とコート剤という2つの特性を合わせることで、生体適合性の高いインプラント開発に、新たな可能性を示した。また、本研究で同定した骨芽細胞分化と骨形成を促す因子は新たな骨芽細胞による骨形成メカニズムの解明につながる可能性があり、学術的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Based on the histological analysis of endochondral ossification, we found that calcified cartilage function as a superior scaffold for bone formation by osteoblasts. So, we performed screening of molecules enhance bone formation from components of calcified cartilage and applied to coating. We identified several candidate molecules and these coating on culture dish significantly enhanced in vitro bone formation by osteoblasts. In addition, we designed a surface micropattern inspired by characteristic structures of calcified cartilage. We also developed assay methods to evaluate the surface properties by using kinetics of osteoblast migration. The micropattern changed in vitro bone formation rate and cell migration speed of osteoblasts. From these examinations, we suggest that the combination of novel coating and surface micropatterns provide effective surface properties for implants to achieve high biological compatibility and secure engraftment.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨芽細胞 石灰化 インプラント 細胞動態解析 マイクロパターニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は体の支持、保護、運動制御といった生体機能の基盤となる重要な器官であり、その障害は神経痛や歩行障害などの姿勢制御不全に直結するため、生体機能のみならず、QOLを保つ上でも重要な組織である。骨は、軟骨を骨で置換する「内軟骨性骨化」のプロセス、あるいは軟骨を経ずに直接骨形成を行う「膜性骨化」のいずれかのプロセスにより形成される。全身の多くの骨は内軟骨性骨化により形成され、頭蓋骨や鎖骨といった一部の骨が膜性骨化により形成される。骨は恒常的に破骨細胞による吸収と骨芽細胞による形成のバランスで維持されており(骨リモデリング)、このバランスが崩れると、骨粗鬆症などの骨疾患を引き起こすと考えられている。よって、骨リモデリングは骨の強度維持や血液中のカルシウム・リン等の調節に重要である。しかしながら、骨芽細胞がどのようにして骨形成が必要な状況を検知し、適切な部位へ増殖・移動・分化し、骨形成を行うのかについては不明な点が多い。

また、高齢化社会の進行と治療技術の発展により、世界的にインプラント製品の需要が大幅に拡大している。多くのインプラントは、長期間生体に埋入して使用されるため、使用される材料には高い生体親和性と、安定的な強度が求められる。特に、インプラント材料と生体組織の接合は、細菌侵入防止およびインプラントの固定にとって重要であり、接合強化のため様々な材料の表面処理や表面形態の開発が進められている。より生体適合性の高い材料開発において重要となるのが、用いる評価法であり、これまで、インプラント材料開発における評価法は、(1)無細胞系における擬似体液(SBF)による骨様アパタイト形成試験、(2)インプラント材料上での骨芽細胞培養試験、(3)実験動物へのインプラント移植試験により行われてきた。しかしながら、SBFテストと生体組織における骨結合性の相関性については議論の余地があり、培養骨芽細胞についても、生体内では数時間ほどで骨形成が見られるのに比べて、培養細胞では増殖・分化・骨形成能が著しく低く、石灰化に2週間から1ヶ月ほど要する。また、生体内に埋め込まれたインプラントは隣接する骨組織からの細胞の増殖、移動、分化を経て、骨・インプラント接合部での生着が行われると考えられるが、既存の *in vitro* 評価試験においては、細胞移動といった動的な挙動への効果検証は十分になされていない。一方、マウス個体へのインプラント移植実験は、移植後の適応期間および、標本組織の作製、評価に非常に時間がかかり、また生命倫理の観点からも、種々の条件の材料開発には適応が難しい。よって、より生体に近い条件で、短時間にインプラント材料の生体適合性を評価する新たな評価法を開発することが必要である。

2. 研究の目的

我々は、内軟骨性骨化組織を詳細に解析した結果、**石灰化軟骨が骨形成の優れた足場となる可能性**を見出した。また、骨芽細胞に緑色蛍光蛋白質 GFP を安定発現した細胞の樹立と、長期間のタイムラプスイメージング系の確立により、骨形成過程における骨芽細胞の増殖、移動速度といった動的指標を計測することが可能となった。そこで、石灰化軟骨を出発材料として、骨形成促進能を指標に骨形成の優れた足場となる分子を探索する。また、石灰化軟骨が有する特徴的な形態を元に、表面形状をデザインし、骨形成および、細胞動態解析から骨形成に適した表面形状を開発する。また、得られた分子をコート剤としてインプラントモデル材料上での骨芽細胞動態を解析することにより、骨芽細胞の移動速度といった動的指標を用いた全く新しい評価法を確立し、軟骨内骨化組織解析の知見から、骨芽細胞分化および骨形成を促す**骨芽細胞の生着性の高い新たなインプラント表面の形状、およびコート素材開発**を目指した。

3. 研究の方法

細胞培養

MC3T3 - E1 細胞 (CRL-2593) は ATCC から購入し、アスコルビン酸不含有の MEM (Gibco, A1049001) に 10%FBS と 1%ペニシリン-ストレプトマイシン混合液(ナカライテスク, 26253-84) を添加した培地中で培養した。培地交換および継代は3-4日に一度行った。GFP-MC3T3 - E1細胞は、MC3T3-E1細胞に pcDNA3-EGFP(kindly gifted from Dr. Gary Bokoch, The Scripps Research Institute) を Lipofectamin LTX (ThermoFisher) で導入し、高発現細胞をフローサイトメトリーにより単離し樹立した。C57BL/6 マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞前駆細胞の単離と培養は既報の方法(Nishiwaki T et al, 2006 Journal of bone and mineral research)に従い実施した。

In vitro 骨形成アッセイおよび骨芽細胞分化アッセイ

MC3T3 - E1 細胞またはマウス頭蓋冠由来骨芽細胞前駆細胞を 6.5×10^4 cells/cm² で培養し、50ug/mL L-アスコルビン酸マグネシウムおよび 10mM β-グリセロリン酸二ナトリウムを培地中に添加することで、骨芽細胞分化を誘導した。3 - 4日おきに培地交換を行い、20-30日後に形成された石灰化ノジュールは0.5%アリザリンレッド S 染色により可視化した。骨芽細胞分化アッセイは分化誘導5日後に早期の骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性染色(85L1-1KT, シグマアルドリッチ)により実施した。染色像の撮影は Thunder Imaging Systems(Leica)を用いて行い、定量化には ImageJ(NIH)を用いた。

免疫染色

GST または候補分子の GST 融合タンパク質とゼラチンの混合液でコートした 8well チャンバー スライド上に頭蓋冠由来骨芽細胞前駆細胞を培養し、分化誘導培地で 5 時間培養後に 4%PFA/PBS で 10 分固定し、0.1% TritonX100/PBS で 5 分間透過処理した。5% normal donkey serum と 10ug/mL normal donkey IgG、1% BSA/PBS の混合液で 1 時間ブロッキングしたのち、一次抗体(phospho-p44/42 MAPK 抗体 4ug/mL, #9106, Cell signaling または phospho-SAPK/JNK 抗体 4ug/mL, #9255, Cell signaling) を 4 で一晩染色した。PBS で 5 分間 3 回洗浄後、二次抗体(Alexa fluor plus 647 で標識した donkey anti-mouse IgG 1/1000 希釈, Thermofisher) を常温で 1 時間染色した。PBS で 5 分間 3 回洗浄後、ProLong glass (Thermofisher) で封入し、Thunder Imaging Systems で撮影した。定量化には ImageJ(NIH) を用いた。

石灰化軟骨由来の骨形成促進因子の探索

6 ヶ月齢の豚大腿骨(東京芝浦臓器)から成長盤を多く含む骨端部を 2cm 角に切断し、クールミル(トッケン)を用いて破碎した。得られた粉末を 10mg/mL の(A)PBS、(B)0.01N 塩酸、または (C)30mg/mL pepsin/0.01N 塩酸中に溶解し、48 時間常温でローテーションにより抽出を行った。次に、1000g で 20 分遠心分離し可溶性の粗抽出画分を得た。(B)(C)については 10xPBS と NaOH を加え中和した。粗抽出画分は分注し -80 で保存した。次に骨形成促進能の見られた粗抽出画分(C)を出発材料として多段階(100g 1000g 3500g 21900g)の遠心分離により、6 つ(S1P, S2P, S3P, S4, P1S, P1P)のフラクションを得た。次に骨形成を促進した S4 フラクションをゲル濾過カラム(Hiprep. 16/60, Thermofisher, Running buffer:50mM phosphate buffer + 150mM NaCl) と液体クロマトグラフィー(AKTA prime, Cytiva)を用いて分画し、合計 185 のフラクションを得た。得られたフラクションを SpeedVac(Thermofisher)を用いて濃縮した。骨形成促進能が見られた 9 フラクションをプールし、さらに濃縮後、電気泳動、銀染色(銀染色 MS キット、富士フィルム和光純薬)後、バンドを切り出し質量分析により蛋白質の同定を行った。質量分析に関しては神戸大学の波多野直哉先生のご協力により実施した。

プラスミド作成とタンパク質精製

同定した候補分子のマウスにおける相同遺伝子の配列を元にプライマーを設計し、マウス大腿骨、骨髄、皮膚由来の cDNA を調整し PCR により目的配列を増幅した。得られた PCR 産物は制限酵素を用いて GST 融合タンパク質発現ベクター pGEX-4T-1(Cytiva)のマルチクローニングサイトに導入した。シークエンスにより配列を確認後、大腸菌 BL21(DE3)に形質転換した。IPTG を用いて発現誘導し、GST 融合タンパク質はグルタチオンセファロース 4B(Cytiva)を担体として精製した。

マイクロパターンニング

PDMS を用いたマイクロパターン作成は東京都立産業技術研究センターの電気技術グループのご協力により、実施した。石灰化軟骨の形状を元に設計したマイクロパターンのフォトリソグラフィ用ガラスマスクを東京都立産業技術研究センターに依頼し、マスクレス露光機装置(ナノシステムソリューションズ)を用いて受託製造した。このガラスマスクと紫外線露光装置 両面マスクアライナ(ユニオン光学)を用いて SU-8(日本化薬)をスピコートしたシリコン基板上に露光し、SU-8 developer(日本化薬)で現像後、アセトンとイソプロピルアルコールで洗浄した。作成した SU-8 の鋳型を離型剤であるフロロサーフ(FG-5084SH-0-1、フロロテクノロジー)でコートし、PDMS(Sylgard-184, DOW chemical company, 10:1 混合)を用いて転写した。PDMS パターンチップは、水洗後、親水化処理装置(PIB-10、真空デバイス)で処理後、0.05%の一型アテロコラーゲン(IPC-30、高研)でコートした。

タイムラプスイメージングによる細胞動態解析

3.5cm ディッシュ中に設置した頭蓋冠由来の骨片、フィルムまたは PDMS マイクロパターン上に GFP-MC3T3-E1 細胞を培養、24hr 後にフェノールレット不含有の骨芽細胞分化培地に交換し、正立型共焦点レーザー顕微鏡システム(Nikon C2)に設置したステージトップインキュベータ(東海ヒット)中で、タイムラプスイメージングを行った(1 時間間隔、50 時間)。得られたデータは画像解析ソフト IMARIS を用いて、GFP の蛍光値を指標に細胞を抽出しトラッキング解析により細胞の移動速度、移動速度のばらつきを算出した。

統計解析

二群間の比較解析は Student's t-test を用いて行った。他の多群解析は SPSS statics ver27(IBM Corp.)または IgorPro 9.0software(HULINKS)を用いて行った。

4. 研究成果

(1) タイムラプスイメージングによる細胞動態解析手法の確立

骨形成過程における骨芽細胞動態解析を行うため、当初の計画においては、*Col1a1* プロモーター下で GFP を発現するマウス由来の骨芽細胞を用いる予定であったが、長期間 *in vitro* でイメージングを行う際に、GFP の蛍光が減衰することがわかった。そこで、GFP を安定発現する培養骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いることとし、遺伝子導入、セルソーターによる細胞分離により安定に GFP を発現細胞株の樹立に成功した。これにより、50 時間以上のライブセルイメージングが実施可能となった。そこで、細胞動態解析としてまず、マウス頭蓋骨由来の骨片上での細胞動態とインプラントを模したポリエチレンフィルム上での細胞動態を比較検討した。骨片およびフィルム上に GFP 安定発現 MC3T3-E1 細胞を培養し、正立共焦点レーザー顕微鏡上のステージトップインキュベータ中で 50 時間のイメージングを行い、得られたデータを画像解析ソフト IMARIS により細胞トラッキング解析を行った。その結果、骨片上での細胞の平均移動速度は、フィルム上での平均移動速度に比べて有意に遅いことがわかった(図 1)。さらに、各細胞の移動速度の変動分布を比較したところ、骨片上の移動速度の変動はフィルム上に比べて、有意に大きいことがわかった。このことは、フィルム上では細胞が比較的速い一定速度で移動するのに対し、骨片上では移動、停止を繰り返す様な、比較的遅い不均一な移動を示している。よって、骨片の様な比較的骨形成に適した表面と考えられる“場”においては、足場表面と骨芽細胞との相互作用により、骨芽細胞の移動速度を低下させるメカニズムが存在し、これにより骨形成が促されている可能性がある。

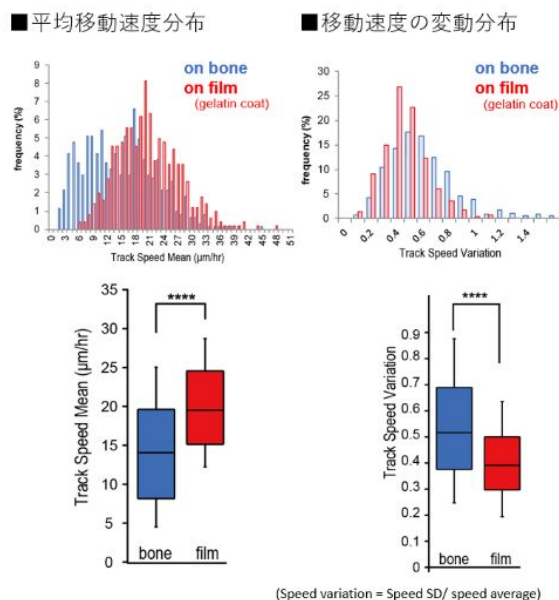


図 1 骨・フィルム上での細胞移動速度

(2) 石灰化軟骨由来の石灰化促進因子の同定

石灰化軟骨中に骨形成の優れた足場となる物質が存在するという作業仮説に基づき、石灰化軟骨を多く含む豚大腿骨成長板から、酸とペプシンによる処理により粗抽出画分を得た。この粗抽出画分を培養容器底面にコートし、骨形成試験を実施した結果、骨形成を有意に促進することを発見した(図 2)。そこで、粗抽出画分を遠心分離により、分画し *in vitro* 骨形成アッセイにおける骨形成促進活性を指標に有効分画を選定した。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた分画を行い、得られたフラクションを *in vitro* 骨形成アッセイで評価した。その結果複数の骨形成促進画分を得た。それら画分中に含まれるタンパク質分子を電気泳動、銀染色により分



図 2 粗抽出画分による石灰化

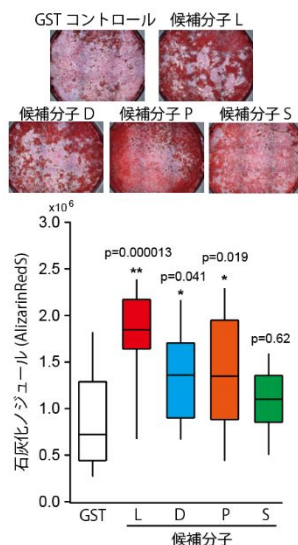


図 3 *in vitro* 骨形成試

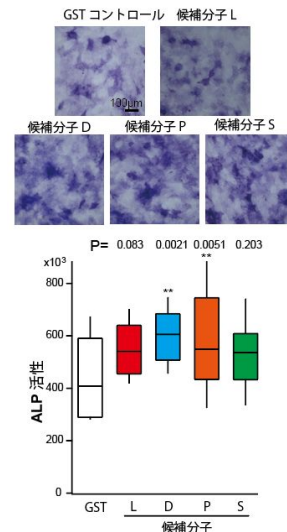
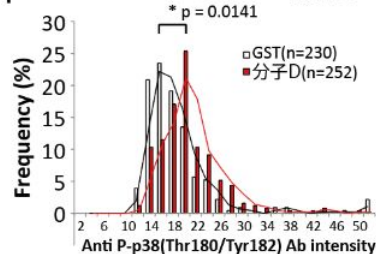


図 4 骨芽細胞分化試験

離し、マスマスペクトロメトリーによる質量分析により候補分子を同定した。マスマスペクトロメトリーによる質量分析については、神戸大学、波多野直哉先生の協力のもと実施した。その結果、4つの候補分子を同定した。骨形成促進能を有する可能性のある4つの候補分子について、GST融合タンパク質を作成するための発現ベクターを構築し、大腸菌を用いて、蛋白精製条件の検討を実施した。諸条件を最適化し、得られたGST融合タンパク質を用いて培養容器表面をコートし、骨形成試験を実施した結果、4候補分子のうち3候補分子が骨形成を有意に促進することが分かった(図3)。

次に、4候補分子が骨芽細胞分化へ及ぼす効果を検証するため、候補分子でコートした培養容器上で、骨芽細胞前駆細胞を培養し、分化誘導後の初期分化過程のマーカーとして知られている、アルカリフォスファターゼの活性染色により検討した。その結果、2つの候補分子について骨芽細胞分化を促進することが分かった(図4)。さらに、骨芽細胞分化を促進していた候補分子Dについては、細胞内シグナル伝達について、同条件で解析を行った結果、p38MAPKおよびJNKのリン酸化を亢進させることが分かった。(図5)

p38 MAPK のリン酸化



JNK のリン酸化

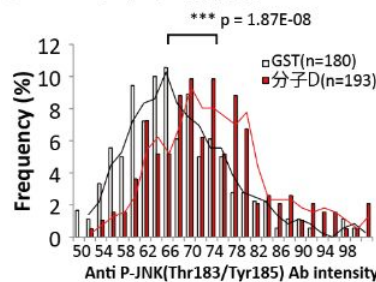


図5 MAPK・JNKのリン酸化

(3)石灰化軟骨に着想した石灰化に適した表面形状の開発

石灰化軟骨の特徴的な形状に着想した、表面パターンを独自に設計し(図6)、12のパターンを組み合わせた表面形状テストチップを作成した。PDMSによるテストチップの開発に関しては、都立産業技術研究センターの電気電子グループの協力により作成した。当初はレジストフィルムを用いて鋳型を作成し、PDMSによる転写を試みたが、フィルムレジストは離型時の強度不足により、作製が困難だった。そこで、強度に優れたSU-8を基盤材料として、鋳型を作成し、PDMSによるテストチップの作成に成功した(図7)。12種のパターンを配置したテストチップにおいて、骨形成試験および細胞動態のライブセルイメージングによる解析を実施した結果、特定の

パターンにおいて、細胞の移動速度に変化が生じることが分かった(図8)。今後はマイクロパターン上でのin vitro石灰化試験の評価を進め、石灰化亢進と細胞の移動速度低下の相関関係および、石灰化促進パターンの選定を行う。また、(2)

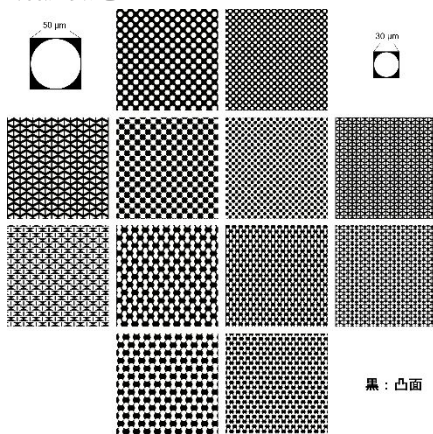


図6 マイクロパターンの設計

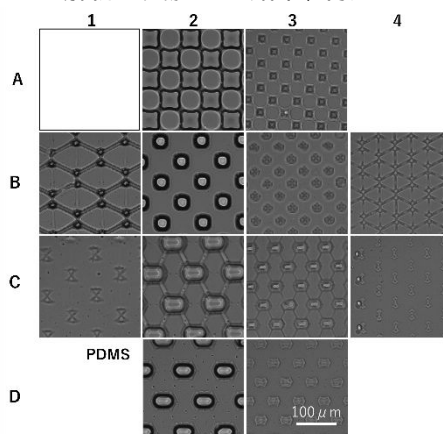


図7 PDMSパターンチップ

で同定した候補分子によるコーティング剤と組み合わせることで、骨芽細胞の生着性の高い新たなインプラント表面の形状、およびコート素材開発を実現する。

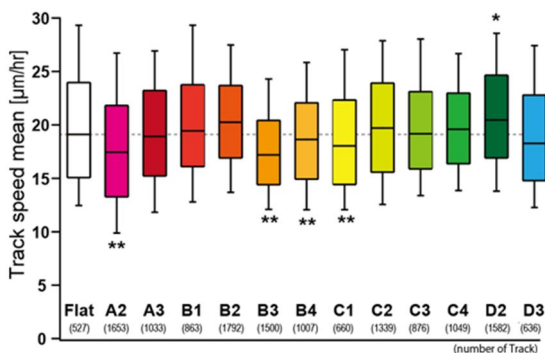


図8 パターンチップ上での細胞移動速度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryo Itoh, Naoya Hatano, Momoko Murakami, Kosuke Mitsumori, Satoko Kawasaki, Tomoka Wakagi, Yoshino Kanzaki, Hiroyuki Kojima, Katsuhiko Kawaai, Katsuhiko Mikoshiba, Koichi Hamada, Akihiro Mizutani	4. 巻 11
2. 論文標題 Both IRBIT and long-IRBIT bind to and coordinately regulate Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ exchanger AE2 activity through modulating the lysosomal degradation of AE2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85499-6	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 Tominaga-Yoshino K, Urakubo T, Ueno Y, Kawaai K, Saito S, Tashiro T, Ogura A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Transient appearance of Ca(2+) -permeable AMPA receptors is crucial for the production of repetitive LTP-induced synaptic enhancement (RISE) in cultured hippocampal slices.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hippocampus.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hipo.23206.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黒田 有希子、河合 克宏、松尾 光一
2. 発表標題 超石灰化骨芽細胞によって形成された骨は II 型コラーゲンを含み骨密度が高くなる
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 姫 しゅうてい、黒田 有希子、河合 克宏、百生 敦、松尾 光一
2. 発表標題 内軟骨性骨化で形成される耳小骨は軟骨原基より小さい
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi Matsuo, Masaki Yoda, Yukiko Kuroda, Katsuhiko Kawaai, Yanlin Wu, Hidekazu Takano, Atsushi Momose
2. 発表標題 Osteoclast-Osteoblast "Trans-pairing" across Cortical Bone Shapes Developing Long Bones
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾 光一、姫 しゅうてい、黒田 有希子、河合 克宏、呉 彦霖、高野 秀和、百生 敦
2. 発表標題 内軟骨性骨化における軟骨原基と骨の関係 - タルボX線位相トモグラフィー顕微鏡による形態解析 -
3. 学会等名 第19回東北大学多元物質科学研究所研究発表会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------