

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09479

研究課題名（和文）内軟骨性骨化過程の解明に向けた生体内イメージング手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of intravital imaging for enchondral ossification

研究代表者

海渡 貴司（Kaito, Takashi）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：70623982

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨折治癒や骨再生において、骨形成過程を観察することは治療効果を最大化するうえで意義が大きい。我々は、過去に骨芽細胞、血管および新生骨を生体内で可視化し経時的に観察することでBMP誘導異所性骨化過程の生体内イメージング方法を確立した。しかし、大部分の骨形成プロセスである内軟骨骨化過程を解明するには、軟骨を可視化することが必要と考えた。そこで、我々はX型コラーゲンを赤、I型コラーゲンを緑で蛍光標識した2重標識トランジェニックマウスを作成し、生体内で軟骨細胞と骨芽細胞を同時に観察することに成功した。この研究成果により、軟骨形成と骨形成の両者を最適化することで、効率的な骨再生が可能になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広範囲骨欠損の治療や脊椎固定術において、骨癒合の獲得は患者QOLの向上に欠かせない。骨芽細胞による骨形成が起こる前段階として軟骨細胞による軟骨形成が生じ、その軟骨を足場として骨形成が行われる。我々は軟骨による足場形成を合わせた評価系として、骨形成過程における軟骨細胞と骨芽細胞の両者を同時に生体内で可視化する遺伝子改変動物モデルを作製した。骨癒合・骨再生過程において、両者を可視化する系が確立されたことは、骨形成の最適化を可能とし、今後の研究の進展により難治性広範囲骨欠損の治療法や、脊椎固定における早期骨癒合獲得法の開発につながる点で意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：In the healing and regeneration of bones, observing the process of bone formation is of great significance for maximizing therapeutic effects. Previously, we established a method for in vivo imaging of BMP-induced ectopic ossification process by visualizing osteoblasts, blood vessels, and newly formed bone over time. However, to elucidate the process of enchondral ossification, which is a major part of bone formation, visualization of cartilage was deemed necessary. Therefore, we created double-labeled transgenic mice with typeX collagen labeled in red and type I collagen labeled in green, and successfully observed chondrocytes and osteoblasts simultaneously in vivo. This research outcome suggests that by optimizing both cartilage formation and bone formation, efficient bone regeneration can be achieved.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨再生 骨芽細胞 軟骨細胞 生体内イメージング

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成長軟骨帯で軟骨からの骨形成や、骨折修復時の内軟骨性骨化過程、肥大軟骨細胞が骨に置換される。しかしこの肥大軟骨細胞が骨に置換される過程は、肥大軟骨細胞のアポトーシスと続く血流を介した骨芽細胞の進入により骨に置換される説や肥大軟骨細胞が骨芽細胞に分化する (transdifferentiation:TD) するという説が長らく議論されてきた。近年の研究結果から、少なくとも肥大軟骨細胞の一部は骨芽細胞に TD し骨組織の一部として生存・機能することが明らかとなった。しかし以下の学術的な問いは未解明のまま残されている。

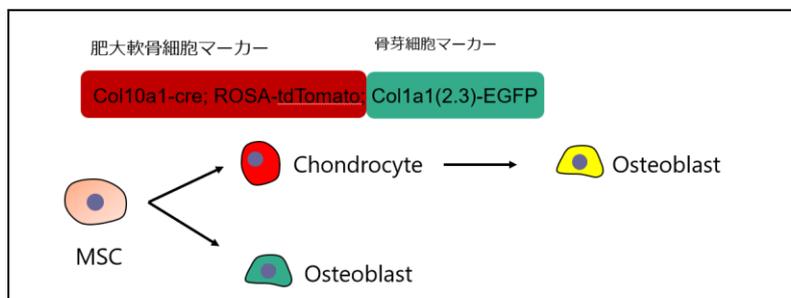
2. 研究の目的

我々は骨折モデルおよび BMP 骨組織工学研究により様々な病態における効率的な骨再生に向けた研究を行い、各種骨代謝作動薬や効率的な DDS を併用することによる効果を多数報告してきた。また近年我々は、二光子励起顕微鏡を用いて、骨芽細胞および破骨細胞を蛍光標識することにより生体内で正常骨 (頭蓋) および BMP 誘導異所性骨化における骨代謝関連細胞の動態・コラーゲン線維の形成過程の可視化手法および細胞動態の定量評価方法を確立した。本研究は骨芽細胞に加えて肥大軟骨細胞を蛍光標識し内軟骨性骨化過程の全過程を可視化することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 二重蛍光標識マウスの作成

蛍光標識マウス: 10 型コラーゲンおよび 1 型コラーゲンをそれぞれ RFP, GFP で蛍光標識したマウス (Col10-RFP/Col1-2.3-GFP) を作成し、肥大軟骨細胞・骨芽細胞・肥大軟骨細胞を経由した骨芽細胞をそれぞれ赤・緑・黄色で蛍光標識されること (下図) を確認する。



2) 生理的骨 (成長軟骨部) での軟骨細胞および骨芽細胞の生体内イメージング

生理的な軟骨細胞と骨芽細胞の分布および軟骨細胞が骨芽細胞に再分化する transdifferentiation を成長軟骨部を用いて観察する。

3) 疾患モデル (骨折モデル) を用いた軟骨細胞および骨芽細胞の生体内イメージング

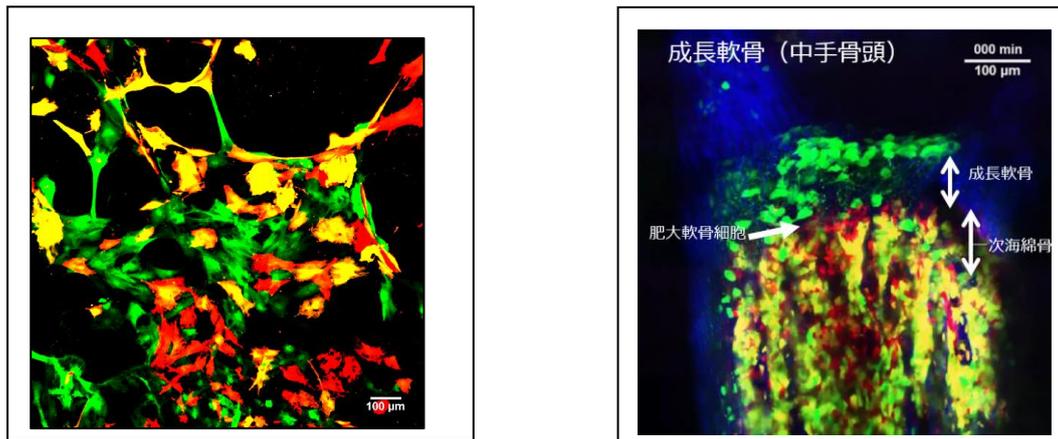
4) 骨再生モデル (BMP 異所性骨化モデル) を用いた軟骨細胞および骨芽細胞の生体内イメージング

4. 研究成果

1) 二重蛍光標識マウスの作成

軟骨細胞 (Col10-RFP)・骨芽細胞 (Col1-2.3-GFP) を蛍光標識した二重標識マウスを作成した

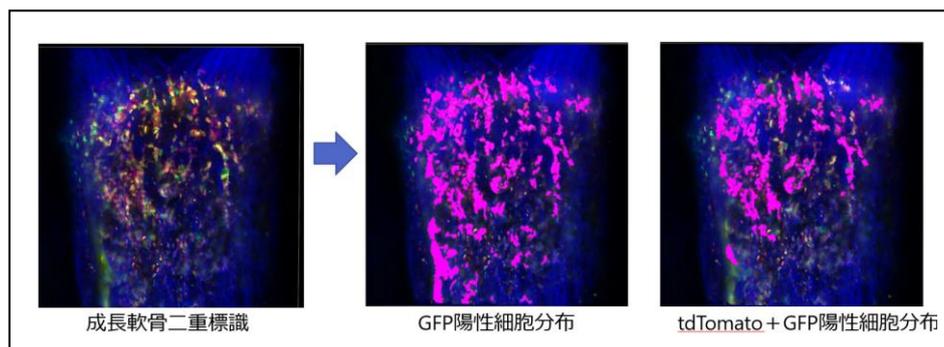
同マウスの長管骨より骨髓細胞を採取、軟骨分化培地 (day7-14) 骨分化培地 (day14-21) で培養することで、軟骨細胞 (赤)、骨芽細胞 (軟骨細胞経由なし: 緑)、骨芽細胞 (軟骨細胞経由: 黄色) が染色されることを確認した (下図左)。



2) 生理的骨 (成長軟骨部) での軟骨細胞および骨芽細胞の生体内イメージング

成長軟骨が残存する 2-3 週齢二重標識マウスの中足骨頭を展開、固定し観察を行った (検証は、中手骨頭、大腿骨、脛骨で実施し、イメージングが安定することから中手骨を採用した。骨の固定方法を長時間の観察に耐えうるよう、固定材料 (セメント、接着剤等) 等の検証を複数実施した)。結果、成長軟骨の最深部に存在する肥大軟骨細胞部で軟骨細胞が赤く標識されることが確認された。加えて、骨幹端部の一次海綿骨稜は大部分が黄色に標識されており、一次海綿骨稜を構成する骨芽細胞は、大部分が軟骨細胞から細分化した骨芽細胞で構成されることが示された。軟骨細胞由来の骨芽細胞の比率は骨幹部に進むに従い減少した (上右図および下図)。

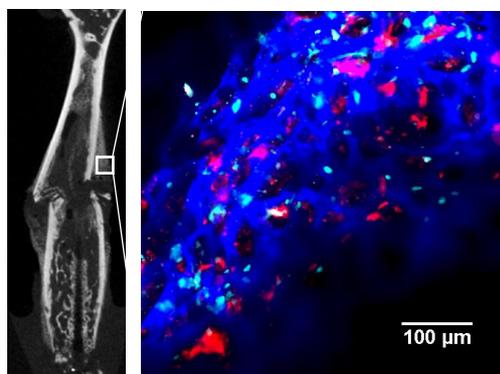
このことは、軟骨細胞を経由した骨芽細胞が、骨幹端部の海綿骨を形成する上で重要な役割を果たしていることを示唆する。



3) 疾患モデル (骨折モデル) を用いた軟骨細胞および骨芽細胞の生体内イメージング

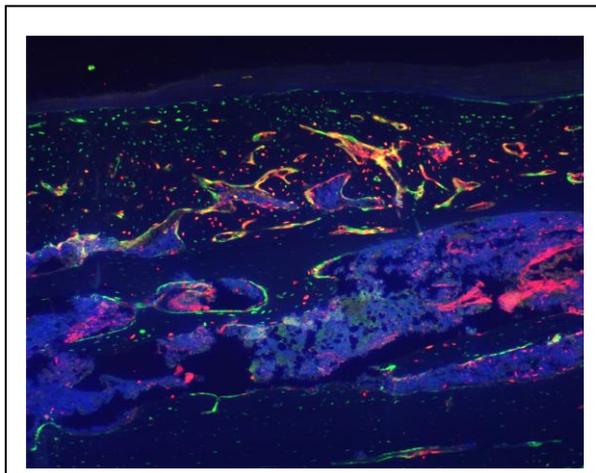
大腿骨および脛骨を用いた骨折モデルを作成し、イメージングを実施した。大腿骨骨折モデルでは、仮骨形成から骨形成を行う骨折治癒過程の再現は可能であったが、生体内イメージングを行うことは困難であった。脛骨骨折モデルでの検証は、予備検討として実施した骨芽細胞および破骨細胞を二重標識したマウスで生体内イメージングは可能であったが、安定したイメージング方法の確立は困難であったため、組織を用いた評価を実施した。

右図) 脛骨 CT 画像 (左) の□部分の生体内イメージング画像では、海綿骨、骨芽細胞、破骨細胞が観察されている。



組織評価では、骨折部仮骨表層は、緑で標識される骨芽細胞で構成される一方、深部の仮骨は黄色の骨芽細胞が大部分を占め、骨折の治癒過程においても、軟骨細胞から分化した骨芽細胞が重要な役割を果たしていることが示された。

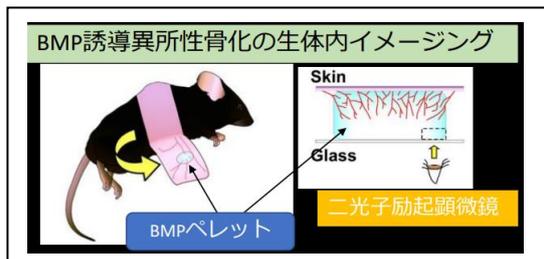
右図) 上方が仮骨、下方は皮質骨および海綿骨を示す。仮骨内部の表層(上方)は緑で蛍光される軟骨細胞を介さない骨芽細胞で構成されるが、深部の仮骨は、黄色で標識される軟骨細胞を経由した骨芽細胞が大部分を占める。



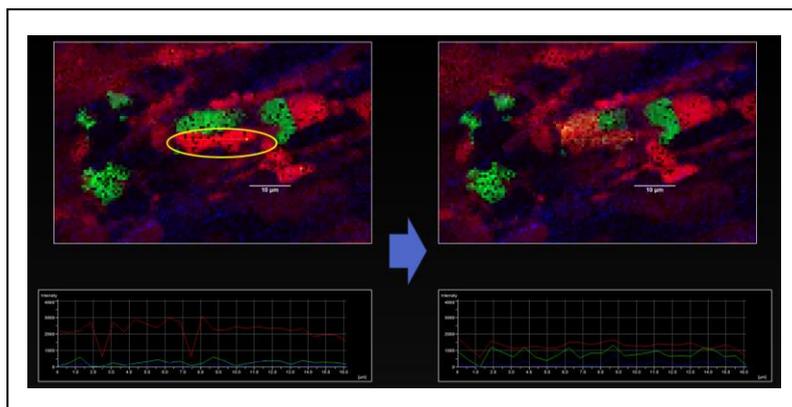
4) 骨再生モデル (BMP 異所性骨化モデル) を用いた軟骨細胞および骨芽細胞の生体内イメージング

我々は報告した BMP を用いた異所性骨形成の生体内イメージングの系を用いて観察を行った(移植後 7 日、14 日、21 日)(右下図、*Sci Rep* 2020)。

継続的生体内動画の撮影および評価から、軟骨細胞から骨芽細胞への再分化が生じている部分を抽出し、蛍光強度の変化を解析している。右図) 左画像で黄色で囲まれた軟骨細胞(赤)が、右画像では緑蛍光が加わり黄色の蛍光となる。下段は蛍光別の定量評価を示す。



今後は、画像の定量化および蛍光色素別で細胞を sorting し遺伝子解析を行う予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 海渡貴司	4. 巻 35
2. 論文標題 【PLIF・TLIF-手術手技の原点とエキスパートの工夫】自家骨を超える骨移植材料 近未来の脊椎固定術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 脊椎脊髄ジャーナル	6. 最初と最後の頁 503 - 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.5002201885	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 -

1. 著者名 Tateiwa D, Kaito T	4. 巻 13
2. 論文標題 Advances in bone regeneration with growth factors for spinal fusion: A literature review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 N Am Spine Soc J	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xnsj.2022.100193	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 Nakagawa S, Okada R, Kushioka J, Kodama J, Tsukazaki H, Bal Z, Tateiwa D, Ukon Y, Hirai H, Makino T, Takenaka S, Okada S, Kaito T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of rhBMP-2-loaded hydroxyapatite granules/beta-tricalcium phosphate hydrogel (HA-b-TCP/hydrogel) composite on a rat model of caudal intervertebral fusion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12082-y.	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 Tsukazaki Hiroyuki, Kikuta Junichi, Ao Tomoka, Morimoto Akito, Fukuda Chie, Tsuda Eisuke, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya, Kaito Takashi, Ishii Masaru	4. 巻 152
2. 論文標題 Anti-Siglec-15 antibody suppresses bone resorption by inhibiting osteoclast multinucleation without attenuating bone formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116095 ~ 116095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116095	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 塚崎 裕之, 石井 優, 海渡 貴司	4. 巻 278(1)
2. 論文標題 痛みの機序 骨由来の痛みを引き起こす病態の可視化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 21 - 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hashimoto Kunihiko, Kaito Takashi, Furuya Masayuki, Seno Shigeto, Okuzaki Daisuke, Kikuta Junichi, Tsukazaki Hiroyuki, Matsuda Hideo, Yoshikawa Hideki, Ishii Masaru	4. 巻 10
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 4651
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 Hashimoto Kunihiko, Kaito Takashi, Kikuta Junichi, Ishii Masaru	4. 巻 40
2. 論文標題 Intravital imaging of orthotopic and ectopic bone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00135-6	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 -

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 10件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 海渡貴司
2. 発表標題 脊椎外科領域での骨組織再生の現状と近未来の展望
3. 学会等名 第51回日本脊椎脊髄病学会(招待講演)
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 海渡貴司
2. 発表標題 脊椎で骨をつくる-科学に基づく手術手技と生物学的骨癒合促進剤が変える近未来の固定術-
3. 学会等名 第7回 四国脊椎外科研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Takashi Kaito, Daisuke Tateiwa, Satoru Otsuru, Masahiro Iwamoto
2. 発表標題 Selective Retinoic Acid Receptor Antagonists enhances BMP-induced Endochondral Bone Formation
3. 学会等名 ABJS annual meeting
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Takashi Kaito
2. 発表標題 Effects of a novel BMP-2 sustained release biomaterial (NOVOSIS Putty) for spinal fusion
3. 学会等名 A0Spine Asia Pacific East Asia Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Takashi Kaito
2. 発表標題 BMP signaling pathway and its implication on bone regeneration
3. 学会等名 The 13th ASIA SPINE, A Joint Meeting with the 36th Annual Meeting of the KSNS Neurospine Session（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 塚崎 裕之, 海渡 貴司, 橋本 国彦, 石井 優
2. 発表標題 閉経後骨粗鬆症がBMP誘導骨形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第50回日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海渡貴司
2. 発表標題 次世代の骨組織工学 -骨軟骨の形成促進・抑制による疾患治療-
3. 学会等名 第4回御茶ノ水脊椎研究会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海渡貴司
2. 発表標題 骨組織再生への情熱 -1ヵ月での脊椎骨癒合を目指して-
3. 学会等名 第37回ちば脊椎カンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海渡貴司
2. 発表標題 新規徐放性BMP-2製剤の開発 -脊椎固定術における本邦承認を目指して-
3. 学会等名 第36回日本整形外科基礎学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Kaito
2. 発表標題 Biological enhancement of Spinal fusion
3. 学会等名 Eurasian Orthopedic Forum (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海渡貴司
2. 発表標題 骨形成biologics時代の到来にどう備えるか?
3. 学会等名 第49回日本脊椎脊髄病学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海渡貴司
2. 発表標題 脊柱機能再建におけるtreat-to-target 脊柱バランスと生体機能バランス
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Kaito
2. 発表標題 How to manage bone union in spine fusion surgery
3. 学会等名 European Orthopaedic Research Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------