

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19883

研究課題名（和文）組織リモデリングの理解に基づく骨再生法の開発

研究課題名（英文）Development of bone regeneration methods based on understanding of tissue remodeling

研究代表者

鄭 雄一（Tei, Yuichi）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：30345053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨格系前駆細胞に着目し、細胞系譜実験と一細胞RNA-seq解析により、骨修復部位における前駆細胞の振る舞いと、骨の修復に寄与する骨芽細胞への細胞運命決定機構について解析を行った。その結果、骨修復部位で活性化するGli1陽性細胞が、骨修復と線維化に寄与することを確認し、骨芽細胞への運命決定に関するシグナル因子候補を得た。また薬剤担持能を有する新規ハイドロゲルを開発し、骨再生への寄与を細胞実験および動物モデルで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、骨の修復過程におけるGli1陽性の骨格系前駆細胞の振る舞いと、骨修復・線維化における制御機構の一端が明らかになった。一細胞解析により、骨再生への関与が推定される候補因子群が見つかった。さらに、新規ハイドロゲルの開発を通して、成長因子を保持・遊離可能な機構を有する足場材料の開発に成功した。今後、これらの因子・材料を組み合わせることで、安全で効率的な骨再生医療の実現に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, by focusing on skeletal progenitors, we performed the lineage tracing analysis and single cell RNA-seq (scRNA-seq) analysis to understand behavior of the progenitors and the mechanism of cell fate determination to osteoblasts at bone repair sites. As a result, we confirmed that Gli1-positive cells were activated at bone repair sites and contributed to bone repair and fibrosis. scRNA-seq analysis provided candidate signaling factors involved in the fate determination to osteoblasts. We also developed a new hydrogel with drug-loading ability and demonstrated its contribution to bone regeneration in cell experiments and animal models.

研究分野：骨再生

キーワード：組織リモデリング バイオマテリアル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織リモデリングは、組織損傷局所における炎症・免疫反応をトリガーとする不可逆的な線維化による機能不全に向かう反応と、生体が有する体性幹細胞を中心とした自己修復反応の、連続的・拮抗的なバランスにより制御される。安全で効率的な再生医療の実現には、組織リモデリングの制御が必須であるものの、この相反する反応を自由にコントロールする術は確立していない。

骨組織は一定の自己修復能を有し、小規模な骨折・骨欠損に対しては特別な治療をせずとも治る。一方、大規模な骨欠損、環境因子もしくは基礎疾患を有する場合は、骨修復機構と拮抗して線維化が優位となり偽関節が生じることがある。偽関節は、骨折患者の5-10% (年間10-20万人) で起こり、不可逆的な骨機能不全に陥る難治性骨喪失性疾患の一つとして知られている。偽関節が起こる作用機序として、骨損傷部位における巨核球細胞が Cxcl4 分泌を介して、Gli1 陽性の骨格系前駆細胞の筋線維芽細胞への分化を誘導する可能性が報告されている (1)。一方、Gli1 陽性の骨格系前駆細胞は骨折の治癒過程において骨芽細胞へ分化し骨修復に寄与するとの報告もある (2)。以上の結果は、Gli1 陽性前駆細胞が骨損傷環境に応じて異なる細胞に分化する可能性を示唆している。しかし、その詳細な運命決定機構はほとんど分かっていない。そこで本研究では、組織損傷部位における Gli1 陽性細胞の振る舞いを細胞系譜実験と一細胞解析により明らかにすることを着想した。線維化と骨修復のトリガー因子をそれぞれ明らかにし、その活性を自由に操作することが可能になれば、副作用のない効率的な骨再生法の確立に寄与するのではと考えた。

本研究グループは、これまでの研究で、非膨潤性で nm- μ m 単位の網目構造を有する新規ハイドロゲルの開発に成功した (3)。本ハイドロゲルの物性を最適化し、薬剤担持性機能を付加することが可能となれば、線維化・骨修復トリガー因子を搭載した骨再生性足場材料が創製できるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、骨組織損傷部位におけるシグナルネットワークの制御と、バイオマテリアルによる物理的な制御を統合することで、組織リモデリングから組織修復への指向性を有する機能的足場材料の創製を目指した。次に挙げるサブプロジェクトを行った：① 組織リモデリング制御因子の同定、② 組織リモデリング制御に向けたバイオマテリアルの開発、③ 組織リモデリング制御の *in vivo* 検討。

3. 研究の方法

①組織リモデリング制御因子の同定

マウス橈骨長管骨を用いた骨欠損モデルを用いた。細胞系譜実験のため、Gli1-CreERT2;R26RtdTomato マウスを作出し、実験に用いた。骨芽細胞マーカー Osterix と筋線維芽細胞マーカー α SMA に対する特異的な抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。1細胞 RNA-seq (single cell RNA-seq; scRNA-seq) 解析のため、10x Genomics 社の Chromium を用いて scRNA-seq ライブラリーを作製後、Nova-seq によりシークエンスを行った。得られたシークエンスリードは、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータ SHIROKANE を用いて解析を行った。

②組織リモデリング制御に向けたハイドロゲルの開発

本研究グループがこれまで研究してきた4分岐型ポリエチレングリコール骨格のゲル(PEG gel)を用いた。ゲルの濃度、組成と turbidity の関連を、様々な条件で検討し、相分離を観察した。またシグナル因子担持性を検討するため、FITC-BSA を含有したハイドロゲルを作成し、経時的に遊離型 FITC を検出した。さらに、骨形成性ペプチドを担持したハイドロゲルとマウス骨芽細胞株 MC3T3E1 の共培養系において、一定期間培養後の細胞における遺伝子発現を RT-qPCR 法で解析することで、骨芽細胞分化を評価した。

③組織リモデリング制御の *in vivo* 検討

頭蓋骨骨欠損モデルを用いて、骨形成性ペプチドを搭載したハイドロゲルの骨再生に与える影響を解析した。骨欠損作成後、薬剤担持性ハイドロゲルを欠損部に静置した。*In vivo* マイクロCTによる経時的な骨再生、組織学的解析、および骨芽細胞マーカー Runx2 に対する特異的な抗体を免疫組織学的解析により、骨再生を評価した。

4. 研究成果

①組織リモデリング制御因子の同定

マウス橈骨を用いて異なるサイズの骨欠損を作製し、経時的な骨修復をマイクロCTで観察した(図1)。その結果、1 mm 骨欠損は、4週後に骨の癒合が認められるのに対して、3 mm 骨欠損では、12週後も骨の癒合は認められなかった。

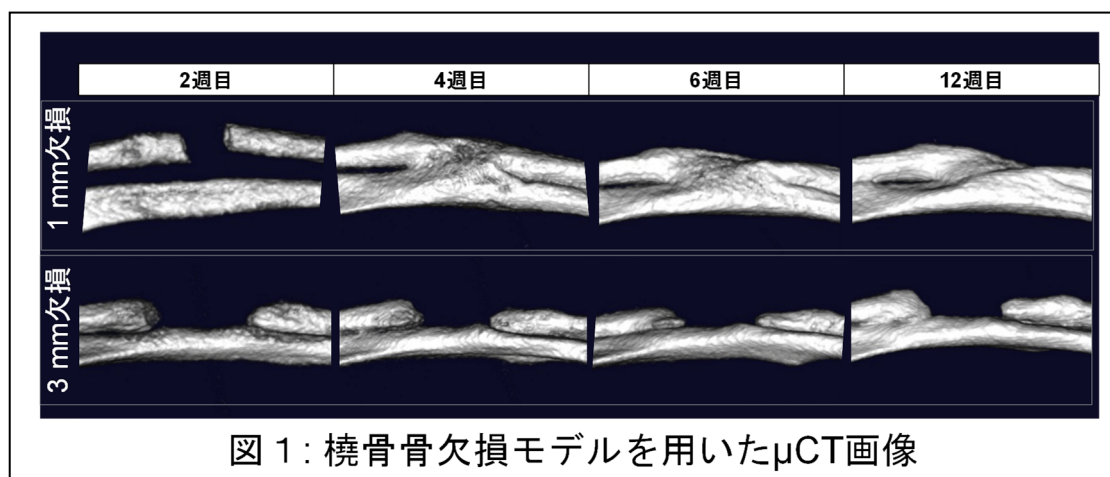


図1：橈骨骨欠損モデルを用いたμCT画像

次に、骨欠損部位での Gli1 細胞系譜を明らかにするため、レポーターマウス Gli1CreERT2;Rosa26tdTomato を用いた。本マウスでは、タモキシフェン投与依存的に、tdTomato が発現し、Gli1 細胞系譜を標識することが可能である。骨欠損モデルの作成前後4日にわたってタモキシフェンを投与することで、骨欠損部位において Gli1 細胞系譜を観察した。その結果、骨欠損作成2週後では、いずれのモデルにおいても、tdTomato 陽性の Gli1 細胞系譜が骨欠損部位に集積していた。さらに、骨欠損作成4週後では、1 mm 骨修復モデルでは、Gli1 細胞系譜の一部が骨芽細胞マーカー Osterix 陽性 αSMA 陰性の細胞であった。一方、3 mm 骨欠損モデルでは、αSMA 陽性 Osterix 陰性の細胞が偽関節様の間隙部分に多く認められた。以上より、骨欠損部位において Gli1 細胞系譜が誘導され、その一部が骨格系前駆細胞に分化すること。さらに、骨欠損サイズの違いにより、Osterix 陽性の骨芽細胞もしくは αSMA 陽性の筋線維芽細胞に分化することが示唆された。

次に、骨修復初期のシグナルネットワークを明らかにするため、骨欠損2週後の骨欠損部位に集積した細胞集団に対して、一細胞 RNA-seq 解析を行った。得られた組織の酵素処理法を最適化することで、解析に必要な細胞集団を得ることが可能になった。回収した細胞は、10x Genomics 社の Chromium 解析プラットフォームを用いて scRNA-seq 解析を行った。Cell Ranger ソフトウェアを用いて、マウスリファレンスゲノム mm10 へマッピングした後、Seurat を用いてさらなる解析を行った。正規化、クラスタリングおよび細胞アノテーションを行い、骨修復部位に集積した細胞集団を同定した。さらにリガンド-受容体解析を行い、骨修復部位における細胞間シグナル相互作用解析を行い、骨再生への関与が推定されるシグナル因子の候補を得た。

②組織リモデリング制御に向けたハイドロゲルの開発

異なる物性、濃度、調整法の PEG ゲルを用いた解析の結果、相分離機構により、マイクロメートル単位の編み目構造を有するハイドロゲル (Oligo gel) の作成に成功した。蛍光粒子を用いた疎水性解析の結果、Oligo gel は、通常の4分岐型 PEG ハイドロゲル (Tetra gel) と比較して有意に疎水度が高かった。次に FITC-BSA を含有した PEG gel および Oligo gel を作成し、薬剤遊離能を検討した。その結果、PEG gel はおよそ1週間ですべての担持 FITC-BSA を遊離したのに対して、Oligo gel では FITC-BSA の遊離が2週間以上続いた。次に、骨形成性ペプチド BMP2 を担持したハイドロゲルと骨芽細胞共培養系を用いて、BMP2 の遊離能と骨芽細胞分化誘導能を検討した。その結果、BMP2 を担持した Oligo gel は、BMP2 を担持した Tetra gel と比較して、有意に骨芽細胞分化誘導能が持続した。

③組織リモデリング制御の in vivo 検討

頭蓋骨臨海骨欠損モデルを用いて、BMP2 担持型 Oligo gel の骨再生効果を検討した。その結果、BMP2 担持型 Tetra gel は、骨再生が限定的であったのに対し、BMP2 担持型 Oligo gel では骨欠損後2週間後から顕著な骨再生効果が認められた。一方、BMP2 単独投与では、ほとんど骨再生は認められなかった。これは、足場材料が含まれていないため、BMP2 が骨欠損部にとどまっていなかったことが原因と考えられた。免疫組織学的解析の結果、BMP2 担持型 Oligo gel では、骨欠損部で RUNX2 陽性の骨芽細胞前駆細胞の集積が認められた。

現在、長管骨欠損モデルでも同様の実験を計画中である。また、①で解析中の線維化・骨修復トリガー因子を搭載した Oligo gel についても実験を計画中である。

<引用文献>

1. Schneider RK, Mullally A, Dugourd A, Peisker F, Hoogenboezem R, Van Strien PMH, Bindels EM, Heckl D, Büsche G, Fleck D, Müller-Newen G, Wongboonsin J, Ventura Ferreira M, Puelles VG, Saez-Rodriguez J, Ebert BL, Humphreys BD, Kramann R. Gli1+ Mesenchymal Stromal Cells Are a Key Driver of Bone Marrow Fibrosis and an Important Cellular Therapeutic Target. *Cell Stem Cell*. 20(6):785, 2017
2. Shi Y, He G, Lee WC, McKenzie JA, Silva MJ, Long F. Gli1 identifies osteogenic progenitors for bone formation and fracture repair. *Nat Commun*. 8(1):2043, 2017
3. Hayashi K, Okamoto F, Hoshi S, Katashima T, Zujur D, Li X, Shibayama M, Gilbert EP, Chung UI, Ohba S, Oshika T, Sakai T. Fast-forming hydrogel with ultralow polymeric content as an artificial vitreous body. *Nat Biomed Eng* 1:44, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Doi Tomomitsu, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Obayashi Kunie, Endo Motoyoshi, Ishizaki Toshimasa, Katoh Akira, Kouji Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Involvement of activator protein-1 family members in -catenin and p300 association on the genome of PANC-1 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08890 ~ e08890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e08890	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 Wang JS, Kamath T, Mazur CM, Mirzamohammadi F, Rotter D, Hojo H, Castro CD, Tokavanich N, Patel R, Govea N, Enishi T, Wu Y, da Silva Martins J, Bruce M, Brooks DJ, Bouxsein ML, Tokarz D, Lin CP, Abdul A, Macosko EZ, Fiscaletti M, Munns CF, Ryder P, Kost-Alimova M, Byrne P, Cimini B, Fujiwara M, Kronenberg HM, Wein MN.	4. 巻 12
2. 論文標題 Control of osteocyte dendrite formation by Sp7 and its target gene osteocrin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26571-7	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 該当する
1. 著者名 Lui Julian C., Raimann Adalbert, Hojo Hironori, Dong Lijin, Roschger Paul, Kikani Bijal, Wintergerst Uwe, Fratzl-Zelman Nadja, Jee Youn Hee, Haeusler Gabriele, Baron Jeffrey	4. 巻 13
2. 論文標題 A neomorphic variant in SP7 alters sequence specificity and causes a high-turnover bone disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28318-4	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 該当する
1. 著者名 Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Takao Tomoka, Takihira Shota, Yoshida Aki, Kawai Shunsuke, Miura Akihiro, Ming Lu, Yoshitomi Hiroyuki, Gozu Mai, Okamoto Kumi, Hojo Hironori, Kusaka Naoyuki, Iwai Ryosuke, Nakata Eiji, Ozaki Toshifumi, Toguchida Junya, Takarada Takeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Induction and expansion of human PRRX1+ limb-bud-like mesenchymal cells from pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 926 ~ 940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-021-00778-x	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 Kanazawa Sanshiro, Okada Hiroyuki, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Iwata Junichi, Komura Makoto, Hikita Atsuhiko, Hoshi Kazuto	4. 巻 11
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells in the bone marrow niche consist of multi-populations with distinct transcriptional and epigenetic properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94186-5	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 Ohira Masashi, Katashima Takuya, Naito Mitsuru, Aoki Daisuke, Yoshikawa Yusuke, Iwase Hiroki, Takata Shin-ichi, Miyata Kanjiro, Chung Ung-il, Sakai Takamasa, Shibayama Mitsuhiro, Li Xiang	4. 巻 34
2. 論文標題 Star Polymer-DNA Gels Showing Highly Predictable and Tunable Mechanical Responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 2108818 ~ 2108818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adma.202108818	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 Nakayama Mika, Okada Hiroyuki, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Chung Ung-il, Ohba Shinsuke, Hojo Hironori	4. 巻 21
2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing unravels heterogeneity of skeletal progenitors and cell-cell interactions underlying the bone repair process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 9 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.05.001	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 Hojo Hironori, Saito Taku, He Xinjun, Guo Qiuyu, Onodera Shoko, Azuma Toshifumi, Koebis Michinori, Nakao Kazuki, Aiba Atsu, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Okada Hiroyuki, Tanaka Sakae, Chung Ung-il, McMahon Andrew P., Ohba Shinsuke	4. 巻 40
2. 論文標題 Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111315 ~ 111315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111315	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shoichiro Tani, Hiroyuki Okada, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Ung-il Chung, Hironori Hojo and Shinsuke Ohba
2. 発表標題 EXPLORING HUMAN SKELETAL DEVELOPMENT USING AN INDUCED HUMAN BONE TISSUE DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS
3. 学会等名 ISSCR 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mika Nakayama, Hiroyuki Okada, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Ung-il Chung, Shinsuke Ohba, Hironori Hojo
2. 発表標題 Understanding a Mechanism Underlying Bone Repair Process by Combinational Analysis of Lineage Tracing and Single-Cell RNA Sequencing
3. 学会等名 ISSCR 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hironori Hojo
2. 発表標題 Understanding a mechanism underlying bone repair process and application for bone regeneration
3. 学会等名 SICEM 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究分担者	岡田 寛之 (Okada Hiroyuki) (10883481)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	大庭 伸介 (Ohba Shinsuke) (20466733)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	酒井 崇匡 (Sakai Takamasa) (70456151)	東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授 (12601)	
研究分担者	北條 宏徳 (Hojo Hironori) (80788422)	東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・准教授 (12601)	

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		
	米国	マサチューセッツ総合病院	米国衛生研究所