

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05549

研究課題名(和文)骨モデリング時の形態形成を担うコラーゲンネットワークの新たな役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the new role of a collagen network for the morphogenesis during the bone modeling

研究代表者

上岡 寛 (KAMIOKA, HIROSHI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80253219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、FIB-SEMを用いることにより、骨形成期にあるコラーゲン線維の立体構築を行うことができた。さらにこの解析は1辺25マイクロメートルの立方領域に及ぶことから、同時に複数の骨細胞を含む細胞性ネットワークも捉えることができた。これらの観察から、骨細胞ネットワークの初期形成に重要な骨芽細胞から基質側へ伸びる細胞は、集束されたコラーゲン線維を避けるように一定の規則性をもった。さらに、コラーゲン線維の集束化を阻害するBAPNで前処置した骨では、骨芽細胞から伸びる細胞突起は特異な方向性を持たなかった。よって、骨基質の性質を変化させることで骨細胞ネットワーク形成に影響を与えることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨は外界の力によってその形を変化させる。その変化には細胞が主導となって関与しているのか細胞から産生された基質が力によって再配列を引き起こし変化しているのかは明確な答えはなかった。今回我々は、骨基質のコラーゲン線維の立体構築と骨内でネットワーク形成をなしている骨細胞を同時にとらえることができ、この両者の関係をみることもできた。そして、集束したコラーゲン線維が細胞ネットワークの方向性を変化させていることを突き止めた。よって、骨梁の微細構造を形成する細胞性ネットワークの初期過程には細胞による形態形成のみならず、基質が自ら変化することも影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed three-dimensional construction of collagen fibers in the osteogenic phase by using FIB-SEM. Furthermore, since this analysis extends to a cubic region of 25 micrometers per side, it was possible to capture a cellular network containing multiple osteocytes simultaneously. From these observations, processes extending from the osteoblasts to the matrix side have a certain regularity so as to avoid bundled collagen fibers. Furthermore, the bones pretreated with BAPN, which inhibits collagen fiber aggregation, cell processes extending from osteoblasts have no specific orientation. Thus, it has been revealed that changing the nature of bone matrix affects osteocyte network formation.

研究分野：歯科矯正学

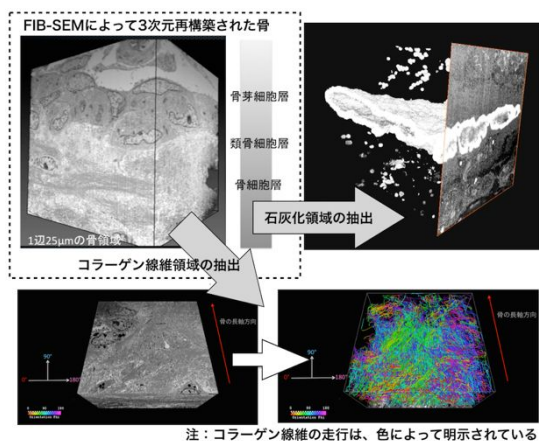
キーワード：骨 メカニカルストレス コラーゲン線維 FIB-SEM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨形成初期の骨モデリングにおいて、機械的刺激が細胞に働き、骨形態変化が行われていることは知られているが、細胞を取り囲む基質の影響は分かっていない。我々矯正歯科医の行う骨整形的な治療は、軟骨や骨の初期の形成過程に働きかけるので、集束して強度を増すコラーゲン線維の機械的特性も重要な要素となり、骨疾患患者の治療においては考慮すべき対象と考えられる。しかし、骨芽細胞によって営まれるコラーゲン形成は、骨基質と骨芽細胞に挟まれた閉ざされた空間で行われるため、その形成過程を観察することは困難であった。一方、骨中に最も多く含まれるⅠ型コラーゲンは、骨中にネットワークを形成し、その細線維の直径は、数十～百数十 nm と非常に微細な構造物であることから、形成されるコラーゲン線維の三次元構造を解析することは不可能であった。

これまで我々は、研究分担者の原らの開発した直交配置型 FIB (Focused Ion Beam)-SEM (Scanning Electron Microscopy) ならびに我々が独自に開発したコラーゲン線維自動抽出ソフトウェアを用いて、骨形成過程におけるコラーゲン線維の三次元形態計測にはじめて成功した(右図)。一方、スウェーデンの E. Jagger 博士は、通電により体積を変えることのできる特殊ポリマーを用いて、数マイクロ単位の非常に小さな領域に機械的刺激を与え



る装置を開発している。直交配置型 FIB-SEM による観察は、数十マイクロ立方という限られた領域であるが、骨芽細胞および骨細胞のネットワークをすべて含んだ十分な観察領域をもつ。この限られた領域に新規の特殊ポリマーを用いてマイクロ単位の可変領域を作製し、局所的な機械的刺激を加えることが可能であると考えられた。これら新規骨形態観察法と骨微小領域への機械的刺激負荷装置を用いることによって、骨形成過程を細胞の側面ならびに基質であるコラーゲンネットワークの側面から同時に観察することが可能となると考えられた。よって、機械的刺激負荷時の、細胞によるモデリングの役割、コラーゲン線維ネットワークによるモデリングの役割を同時に解析することが可能と考えた。そして、骨基質の構築が骨細胞ネットワーク形成にどのように影響を与えるのかを基質的観点を主として解析することとした。

2. 研究の目的

上記の直交配置型 FIB-SEM を用いて、骨細胞の形態とコラーゲン線維の三次元的構造を解析し、形態計測値を求める。そして、コラーゲンネットワーク形成と骨細胞ネットワークの形成の関連性について検討する。また、局所に定量計測可能な機械的刺激負荷装置を開発して、コラーゲン線維ネットワークに変形を加え、その機械的刺激が骨形成にどのような影響を与えられているのかを解析する。さらに ex vivo での機械的刺激に対して、骨中の骨細胞が応答しているのかを三次元でのカルシウム応答を観察する。

3. 研究の方法

通電可変ポリマーを用いた骨内機械的刺激負荷装置の開発を行う。この開発には、スウェーデンリンショーピン大学の Edwin Jager 先生のご協力を頂く。

FIB-SEM を用いたコラーゲン線維ネットワークの高詳細三次元構築を行う。そのためには、物質・材料研究機構 原徹先生のご協力を頂く。

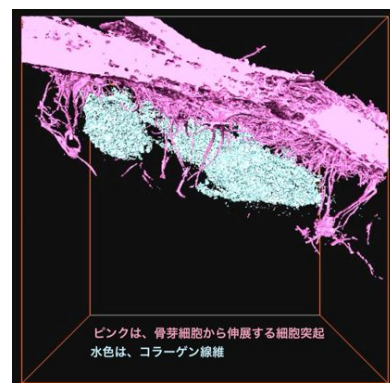
ニワトリ胚頭蓋骨でのコラーゲン線維形成を人為的に調整する。そのために、コラーゲン線維の架橋阻害剤である BAPN で処理する。コラーゲン線維の形成の変化は BAPN 処理群とコントロール群を比較する。そのためには、多光子励起レーザー顕微鏡の SHG(Second Harmonic Generation)による生骨コラーゲンの観察を行う。

上記 3 で観察された頭蓋骨の骨細胞ネットワークに関して形態計測的な解析を行いコラーゲン線維の形成が細胞ネットワーク形成に与える影響を検討する。

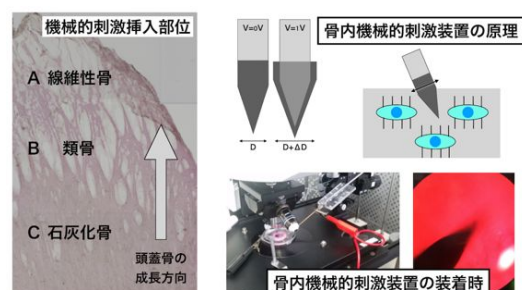
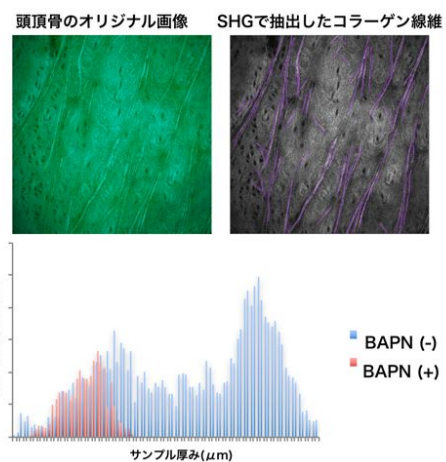
機械的刺激を加えたときの細胞内カルシウム応答を骨組織内で直接観察するシステムを構築する。そのために、連携研究者の安達泰治先生の協力を得て、多光子励起レーザー顕微鏡にて観察する。

4. 研究成果

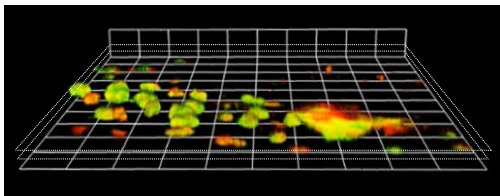
本研究課題では、骨形成期におけるコラーゲン線維の立体再構築を行うことを主として研究を始めた。その過程で Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM)を用いて、骨中のコラーゲン細線維を1本単位で観察し、その方向性についても情報を得ることができた。さらに、コラーゲン細線維が集束してできる数マイクロ径のコラーゲン線維と骨基質中の骨細胞も同時に観察することに成功した。そして、集束したコラーゲン線維が骨細胞突起の方向性を規定しているような所見(細胞突起がコラーゲン線維を避けて伸長している)が数々観察された(右図：未発表データ)。



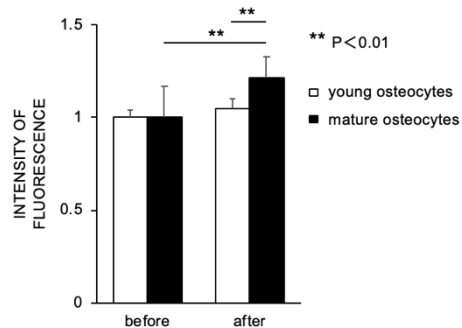
そこで、コラーゲン線維の架橋阻害剤であるBAPNで前処置したニワトリ胚頭蓋骨のコラーゲン線維形成を阻害したときに観察される骨細胞ネットワークの形態の変化を観察することとした。まず、Second Harmonic Generation(SHG)にて生骨でのコラーゲン線維形成を観察し、その後、コラーゲン線維形成を定量化した。その結果、BAPNがコラーゲン線維形成を阻害していることが観察された(右図：未発表データ)。同時にファロイジンで蛍光標識された骨細胞ネットワークを観察すると、方向性を欠いた未成熟な細胞性ネットワークを示していた。これらのことからコラーゲン線維形成を操作することで二次的に骨細胞ネットワーク形成を改編することができる新たな知見を得た。現在、これらの知見をまとめた論文を投稿準備中である。さらに、E. Jager博士と共同研究で開発している骨内機械的刺激装置の取付まで現段階で行うことができた。通電することで3~5パーセントの膨張を得ることができる特殊ポリマーを用いた本装置は、その装置自体の微妙な振動も機械的刺激として骨内に伝わることから、その微小振動に対応すべく機器の設定、生サンプル刺激の条件設定を調整している。右図に現在の装置の設定状況を示す。本研究により、研究課題である「骨リモデリング時の形態形成をコラーゲン線維がどのような関与をしているか?」という問いかけに対しては、骨細胞ネットワーク形成に間接的にはあるが関与していることがわかった。



また、ex vivo での骨細胞のカルシウム応答を観察するシステムを多光子励起レーザー顕微鏡を用いた観察することができた。下図左は、ニワトリ胚頭蓋骨中での骨細胞のカルシウム応答を観察しているときのイメージをしめす。今回機械的刺激は、流体剪断応力を用いた。その結果、幼弱骨細胞に比べて、成熟骨細胞では機械的応答により敏感に反応することがわかった。(下図右) これらに解析により、現在開発途中の骨内機械的刺激負荷装置を装着したときの解析の準備は整ってきた。



骨細胞のカルシウム応答観察時のイメージ



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Wang Z, Ishihara Y, Ishikawa T, Hoshijima M, Odagaki N, Ei Hsu Hlaing E, Kamioka H. Screening of key candidate genes and pathways for osteocytes involved in the differential response to different types of mechanical stimulation using a bioinformatics analysis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2018 Nov 9. DOI: 10.1007/s00774-018-0963-7. 査読有

Tanaka T, Hoshijima M, Sunaga J, Nishida T, Hashimoto M, Odagaki N, Osumi R, Aadachi T, Kamioka H. Analysis of Ca²⁺ response of osteocyte network by three-dimensional time-lapse imaging in living bone. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 36, 519-528, 2018. DOI: 10.1007/s00774-017-0868-x. 査読有

Odagaki N, Ishihara Y, Wang Z, Ei Hsu Hlaing E, Nakamura M, Hoshijima M, Hayano S, Kawanabe N, Kamioka H. Role of Osteocyte-PDL Crosstalk in Tooth Movement via SOST/Sclerostin. *Journal of Dental Research*, 97, 1374-1382, 2018. DOI: 10.1177/0022034518771331. 査読有

Wang Z, Kamioka H. The temporospatial pattern of energy metabolism coordinates the interactions between the bones and other organ systems. *Journal of Oral Biosciences*, 60,8-14, 2018. DOI: 10.1016/j.job.2017.11.001. 査読有

Hashimoto M, Nagaoka N, Tabata T, Tanaka T, Osumi R, Odagaki N, Hara T, Kamioka H. Three-dimensional morphometry of collagen fibrils in membranous bone. *Integrative Biology*, 9, 868-875, 2017. DOI: 10.1039/c7ib00073a. 査読有

Wang Z, Odagaki N, Tanaka T, Hashimoto M, Nakamura M, Hayano S, Ishihara Y, Kawanabe N, Kamioka H. Alternation in the gap-junction intercellular communication capacity during the maturation of osteocytes in the embryonic chick calvaria. *Bone*, 91, 20-29, 2016. DOI:10.1016/j.bone.2016.06.016. 査読有

〔学会発表〕(計19件)

上网 寛. 骨の微細形態からみた細胞機能の解析. 第31回バイオエンジニアリング講演会特別講演(招待講演)2018

- Kamioka H.** Bioimaging of osteocytes and their surrounding bone matrix. 第 15 回 Bone Biology Forum (招待講演) (国際学会) 2018
- Wang Z, Ishihara Y, Odagaki N, Ei Hsu Hlaing E, **Kamioka H.** Bioinformatics analysis shows candidate genes for osteocytes differentially response to different types of mechanical stimuli. 第 77 回日本矯正歯科学会学術大会 第 7 回日韓ジョイントミーティング (国際学会) 2018
- Ei Hsu Hlaing E, Ishihara Y, Wang Z, Odagaki N, **Kamioka H.** Role of intracellular Ca²⁺ in mechano-transduction system of human periodontal ligament fibroblasts. 第 77 回日本矯正歯科学会学術大会 第 7 回日韓ジョイントミーティング (国際学会) 2018
- Ei Hsu Hlaing E, Ishihara Y, Wang Z, Odagaki N, **Kamioka H.** Mechanical Stress-induced Intracellular Ca²⁺ Oscillations in Human Periodontal Ligament Fibroblasts. American Society of Bone and Mineral Research 2018 (国際学会) 2018
- 上网 寛.** 骨組織におけるコラーゲン細線維の三次元形態計測. 日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会 (招待講演) 2017
- 橋本 真奈, 長岡 紀幸, 大嶋 佑介, 飯村 忠浩, 原 徹, **上网 寛.** 直交配置型 FIB-SEM でみる、骨細胞ネットワーク形成とコラーゲン細線維構築の関与. 第 37 回日本骨代謝学会学術大会 (招待講演) 2017
- Wang Z, Ishihara Y, Odagaki N, Nakamura M, Hlaing Ei Ei Hsu, **Kamioka H.** Fast fourier transform analysis showed morphological changes of bone structure and change of periodicity of sclerostin expression during orthodontic tooth movement. America Society of Bone and Mineral Research 2017 (国際学会) 2017
- Odagaki N, Ishihara Y, Wang Z, Nakamura M, Hlaing Ei Ei Hsu, **Kamioka H.** Spation-temporal regulation of sclerostin expression and dynamics in alveolar bone during orthodontic tooth movement. America Society of Bone and Mineral Research 2017 (国際学会) 2017
- 上网 寛,** 橋本 真奈, 長岡 紀幸, 大嶋 佑介, 飯村 忠浩, 原 徹. 骨細胞ネットワーク形成に与えるコラーゲン線維構築の関与. 第 59 回歯科基礎学会 (招待講演) 2017
- 上网 寛,** 橋本 真奈, 長岡 紀幸, 飯村 忠浩, 大嶋 佑介, 原 徹. FIB-SEM で探る骨形成ーコラーゲン細線維の集束化と骨細胞ネットワーク形成の関連についてー. 第 44 回日本臨床バイオメカニクス学会 (招待講演) 2017
- 上网 寛,** 橋本 真奈, 長岡 紀幸, 飯村 忠浩, 大嶋 佑介, 原 徹. FIB-SEM で探るコラーゲン細線維の集束化と骨細胞ネットワーク形成の関連について 第 122 回日本解剖学会 (招待講演) 2017
- Tanaka T, Hoshijima M, Sunaga J, Nishida T, Adachi T, **Kamioka H.** Analysis of intercellular Ca²⁺ mobilization by 3D time-lapse imaging in bone. America Society of Bone and Mineral Research 2016 (国際学会) 2016
- Wang Z, Odagaki N, Tanaka T, Hashimoto M, **Kamioka H.** Alternation in gap-junctional intercellular communication capacity during the Ex Vivo transformation of osteocytes in the embryonic chick calvaria. America Society of Bone and Mineral Research 2016 (国際学会) 2016.

Hashimoto M, Nagaoka N, Iimura T, Hara T, Kamioka H. Osteocyte network formation is influenced by the thick collagen bundles formation during bone modeling. America Society of Bone and Mineral Research 2016 (国際学会) 2016.

橋本 真奈、小田垣 直哉、上网 寛. モデリング期骨組織におけるコラーゲン線維の三次元的形態計測. 第 36 回日本骨代謝学会学術大会 2016

橋本 真奈、長岡 紀幸、飯村 忠浩、大嶋 佑介、原 徹、上网 寛. 骨細胞ネットワーク形成に与えるコラーゲン線維集束化の関与 第 58 回歯科基礎医学会(招待講演) 2016

上网 寛、橋本 真奈、長岡 紀幸、飯村 忠浩、大嶋 佑介、原 徹. FIB-SEM で探る骨形成 -コラーゲン細線維の集束化と骨細胞ネットワーク形成の関連について- 第 43 回日本臨床バイオメカニクス学会 2016

橋本 真奈、長岡 紀幸、原 徹、上网 寛. モデリング期骨組織における骨細胞ネットワークとコラーゲン線維集束化の関与 第 75 回日本矯正歯科学会大会 2016

〔図書〕(計 1 件)

橋本 真奈、上网 寛: 総説: 骨組織の 3 次元解析. 顕微鏡, 53(3)1-4, 2018.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 加来 賢

ローマ字氏名: (KAKU Masaru)

所属研究機関名: 新潟大学

部局名: 医歯学系

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 30547542

研究分担者氏名: 原 徹

ローマ字氏名: (HARA Toru)

所属研究機関名: 国立研究開発法人 物質・材料研究機構

部局名: 構造材料研究拠点

職名: プラットフォーム長

研究者番号(8桁): 70238161

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 安達 泰治

ローマ字氏名: (ADACHI Taiji)

研究協力者氏名: エドウィン ジャガー

ローマ字氏名: (JAGER Edwin)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。