

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06990

研究課題名(和文) 二次骨化中心初期石灰化の生命科学、材料学、双方向からの解析と理解

研究課題名(英文) Analysis of the initial mineralization in secondary ossification center by the Life Science and Material Science viewpoints

研究代表者

ハラ エミリオ・サトシ (Hara, Emilio Satoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40779443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス大腿骨二次石灰化現象について、軟骨内骨化の初期石灰化部位とタイミングを同定し、その部位における石灰化について、生命科学的・工学的に検討を行い、それぞれを時間空間的に比較することで、軟骨内骨化の多面的な理解を目的とした。実験の結果から、初期石灰化は生後6日目から開始することがわかった。開始点を電子顕微鏡で観察・解析した結果、細胞膜の断片(リン脂質)が石灰化の核になることがわかった。この結果から、リン脂質を基盤とした新しい無機有機ハイブリッド材料の開発に繋がる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the initial stages of endochondral ossification during secondary ossification of mouse femur epiphysis from the Life Science and Material Science viewpoints. We found that the very initial starting point of mineral formation in the epiphysis occurs at post-natal day 6 (P6).

Electron microscopy-based ultrastructural analysis showed that cell-secreted matrix vesicles were absent in the early steps of osteoblast-independent endochondral ossification. Instead, chondrocyte membrane fragments were found in the fibrous matrix surrounding the hypertrophic chondrocytes. EDS analysis and electron diffraction study indicated that cell membrane fragments acted as nuclei for newly formed calcospherites which initially showed an amorphous calcium phosphate phase, and then transformed into apatite crystal phase. These findings would be valuable to develop novel organic-inorganic hybrid materials for manipulation of biomineralization.

研究分野：生体材料学分野

キーワード：石灰化 骨形成 初期石灰化 二次骨化 内軟骨骨化

1. 研究開始当初の背景

骨組織は約 70%の無機材料できており、支持作用、器官保護作用、造血作用など重要な役割を果たす。近年、組織工学によって実験室 (in vitro) で生体組織を作る試みが盛んであり、新規無機有機ハイブリッド材料の研究開発が進められている。しかし、骨形成に関して多分野的統合研究があまりされておらず、骨形成機構について未だ不明な点が多く残っている。生体内における石灰化を生命科学・材料学の双方向の視点からの検討は、より生体内骨アパタイトに近いハイブリッド材料のデザイン・合成につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではマウス大腿骨二次石灰化現象について、軟骨内骨化の最初期石灰化部位とタイミングを同定し、その部位における石灰化について、生命科学的・工学的に検討を行い、それぞれを時間空間的に比較することで、内軟骨骨化の多面的な理解を目的とした。

3. 研究の方法

マウス大腿骨骨端部の組織学的評価と初期石灰化の同定

生後 5 日目 (P5) ~ P7 の ICR 新生児マウスから大腿骨骨端部を摘出し、パラホルムアルデヒドで固定し、X 線マイクロ CT (SkyScan 1174 compact microCT, Bruker, Aartselaar, Belgium) を用い、6.4 μm の分解能で撮影後、3 次元構築し、石灰化領域を同定した。

また、大腿骨骨端部の凍結切片 (CM3050S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を作製した後、アリザリンレッド染色による初期石灰化領域の同定とその周囲の組織変化を組織学的に解析した。

免疫組織染色について、血管内皮細胞 (CD31) 及び骨芽細胞 (Runx2) の局在を検討した。

マウス大腿骨骨端部における初期石灰化の定量・定性解析

骨ミネラルの定量・定性解析について、大腿骨骨端部をオスミウム処理、脱水とレジン包埋の手順を行い、走査型電子顕微鏡 (FE-SEM, JSM-6701F, JEOL) または透過型電子顕微鏡 (TEM, JEM-2100, JEOL) にて観察を行った。

タイムラプスイメージングによる軟骨細胞バーストの観察と解析

P6 大腿骨骨端部を採取し、厚さ約 100 μm の軟骨切片を 35mm ガラスボトムディッシュに付着させ、顕微鏡下 (Nikon Eclipse Ti,

Tokyo, Japan) にて撮影を行った。撮影した画像を ImageJ ソフトウェアを用いて画像処理・解析及び動画の構築を行った。

軟骨細胞破裂およびミネラル形成に及ぼす浸透圧の影響

軟骨細胞破裂に浸透圧の影響を検討するために、10 倍 DMEM 培地 (Sigma) の希釈から低張培地 (0.5x)、等張培地 (1x) 及び高張培地 (2x) を用意し、ディッシュに固定した大腿骨骨端部をそれぞれの培地でインキュベートし、軟骨細胞の破裂を観察した。撮影した画像を ImageJ ソフトウェアを用いて画像処理・解析及び動画の構築を行った。

ミネラル形成に及ぼす浸透圧の影響を検討するために、採取した P6 大腿骨骨端部を異なる浸透圧 (高張液、等張液又は低張液) の PBS 溶液中に 24 時間インキュベートし、その後 -glycerophosphate・DMEM/F12 培地に 2 日間インキュベートした。その後、P6 大腿骨骨端部を 4%PFA で固定し、microCT による骨量解析を行った。

軟骨細胞破裂およびミネラル形成に及ぼす外部機械的圧力の影響

P6 大腿骨骨端部を採取し、厚さ約 100 μm の軟骨切片を 2% アガロースゲル (SeaPlaque GTG アガロース, Lonza, Basel, Switzerland) に包埋し、マイクロマニピュレーター (Narishige, Tokyo, Japan) を用いて、機械的圧力を応用し軟骨細胞の破裂観察を行った。撮影した画像を ImageJ ソフトウェアを用いて画像処理・解析及び動画の構築を行った。

ミネラル形成に及ぼす機械的圧力の影響を検討するために、採取した P6 大腿骨骨端部をアガロースゲル包埋し、異なる機械的圧力 (0, 2.6kPa 又は 4.6kPa) を 3 時間応用した。その後、P6 大腿骨骨端部を 4%PFA で固定し、microCT による骨量解析を行った。

細胞培養および in vitro 石灰化アッセイ

軟骨細胞様細胞株 (ATDC5) を DMEM/F12 (Sigma) 通常培養法で増殖させた後、トリプシン処理によって細胞を回収した。その後、超音波処理 (VP-5S, Taitec, Saitama, Japan) により細胞を破碎し、遠心分離を行い、細胞断片を獲得した。電子顕微鏡を用いて細胞断片の微細構造について観察を行った。細胞断片の石灰化能について、通常培地に -glycerophosphate を添加し、37°C/5%CO₂ でインキュベーションした。3 日、5 日、7 日後に石灰化の有無をアリザリンレッド染色にて確認した。その後、石灰化物の形態を電子顕微鏡で観察し、電子回折によって定性解析を行った。得られた画像を ImageJ (NIH) 画像処理ソフトウェアを用いて解析を行った。

4. 研究成果

マウス大腿骨骨端部では生後6日目(P6)、近心側寄りに石灰化が開始することがわかった(図1)。免疫染色の結果から、P6までは軟骨組織内に血管内皮細胞と骨芽細胞の存在は確認できなかった。つまり、二次骨化における初期石灰化は軟骨細胞のみの活性によるものであると明らかになった。

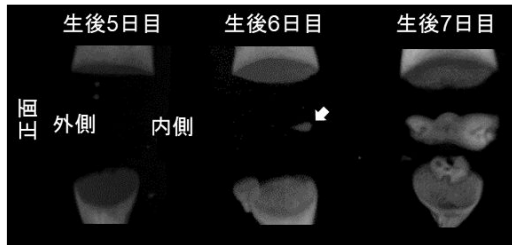


図1. 二次骨化における初期石灰化は生後6日目から開始することがわかった。

FE-SEM観察の結果から、スペースに基質小胞が認められず、平均100nmの断片が存在していることを見出した。さらに、元素マッピングの結果は、カルシウムはほとんど検出されず、リンの高い存在を示した。その後、石灰化小球をSEM又はTEMによる詳細な観察の結果、石灰化小球の中心部位にこの細胞膜断片が局在していることを確認した。これらの結果から、軟骨細胞膜由来細胞断片が初期石灰化の核となることが明らかとなった。石灰化小球の面積について、初期石灰化小球は平均的に約150nm²を示し、その後1200nm²まで成長することがわかった。

石灰化物の定性解析について、電子回折による定性解析を行った結果、初期石灰化球はアモルファスリン酸カルシウムであり、その後ハイドロキシアパタイトの混在を認めた。

次に、細胞膜断片の生成機構について検討を行った。興味深いことに軟骨細胞が破裂することを見出した。軟骨細胞破裂により細胞膜が断片するが、もともと細胞外基質と結合していたため、基質小胞のように球状の形態にならないと考えられた。また、ex vivo実験で、オリジナルデバイスやプロトコルを設立し、これらを用いて外部刺激(浸透圧・機械的圧力)が軟骨細胞に及ぼす影響を検討した。その結果、軟骨細胞は浸透圧と機械的圧力により破裂することを明らかにした(図2)。

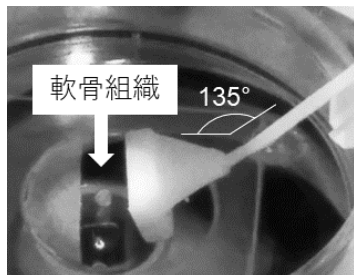


図2. オリジナルデバイスを作製し、軟骨組織に機械的圧力を与え、軟骨細胞破裂を圧力依存性に起こした。

これらの結果により、生体内における初期石灰化過程を観察し、模倣することで、新ハイドリッド骨誘導材料の開発につながる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計2件)

1. Hara ES, Okada M, Nagaoka N, Hattori T, Kuboki T, Nakano T, Matsumoto T. Bioinspired mineralization using chondrocyte membrane nanofragments. *ACS Biomater Sci Eng*, 4:617-625, 2018. 査読あり。

2. Hara ES, Okada M, Nagaoka N, Hattori T, Iida LM, Kuboki T, Nakano T, Matsumoto T. Chondrocyte burst promotes space for mineral expansion. *Integr Biol (Camb)*, 10:57-66, 2018. 査読あり。

〔学会発表〕(計10件)

1. Iida LM, Hara ES, 岡田正弘, 松本卓也. External stimulation-induced chondrocyte burst to accelerate endochondral ossification. 第37回日本骨形態計測学会. 大阪. 発表日2017年6月24日。

2. Hara ES, 国富陽介, 長岡紀幸, 岡田正弘, 上岡寛, 松本卓也. 骨形成様式による初期ミネラル形成の比較解析. 第38回岡山歯学会総会・学術集会. 岡山. 発表日2017年10月1日。

3. Hara ES, Okada M, Matsumoto T. Chondrocyte membrane fragment-based mineralization in the early stages of secondary ossification. 14th International Symposium on Biomineralization. Tsukuba. 発表日2017年10月9日。

4. Hara ES, 岡田正弘, 長岡紀幸, 松本卓也. 骨形成様式による骨アパタイト形成の違いに関する検討. 第70回日本歯科理工学会学術講演会. 新潟. 発表日2017年10月15日。

5. Hara ES, Okada M, Matsumoto T. Secondary ossification as a model for designing new mineral formation methods mimicking bone formation in vivo. 第65回国際歯科学研究学会日本部会総会・学術大会. 東京. 発表日2017年10月19日。

6. Hara ES, 長岡紀幸, 岡田正弘, 松本卓也. 生体内初期石灰化過程を模倣したミネラル形成に関する考察. 第39回日本バイオマテリアル学会大会. 東京. 発表日2017年10月20日。

7. Matsumoto T, Hara ES. Analysis of initial bone mineralization in different ossification modes. 17th Asian BioCeramics Symposium. 岡山. 発表日 2017年 11月 30日.

8. Hara ES. Cell membrane nanofragments are nucleation site for mineral formation. Bioceramics in Dentistry-Taiwan-Japan workshop. 岡山. 発表日 2017年 12月 4日.

9. Hara ES. Bioengineering approaches for in vitro synthesis of cartilage and bone tissues. International Workshop on Bioengineering in Okayama. 岡山. 発表日 2018年 1月 26日.

10. Hara ES, 岡田正弘, 松本卓也. 脂質成分を用いた in vitro ミネラル形成能の検討. 第 17 回日本再生医療学会総会. 横浜. 発表日 2018年 3月 21日.

【図書】(計 0 件)

該当なし.

【産業財産権】

出願状況 (計 0 件)

該当なし.

取得状況 (計 0 件)

該当なし.

【その他】

記者発表:

朝日新聞:

<https://www.asahi.com/articles/ASL1L53D BL1LUBQU00P.html>

Phys.org

<https://phys.org/news/2018-02-cell-membrane-material-bone-formation.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

ハラエミリオサトシ (Hara Emilio Satoshi)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

助教

研究者番号 : 40779443

(2) 研究分担者

該当なし.

(3) 連携研究者

該当なし.

(4) 研究協力者

松本卓也 (Matsumoto Takuya)

岡田正弘 (Okada Masahiro)

窪木拓男 (Kuboki Takuo)

長岡紀幸 (Nagaoka Noriyuki)

服部高子 (Hattori Takako)