

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09806

研究課題名（和文）生体イメージングと特異的細胞除去による再生骨成熟過程の解明と体外成熟法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of the maturation process of regenerative bone and establishment of a method for ex vivo maturation of bone by intravital imaging and cell specific deletion

研究代表者

西條 英人（Saijo, Hideto）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80372390

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）：生体内における骨・軟骨成熟過程を観察可能なイメージング系の確立を行った。呼吸などによるマウスの体動を抑えることで、鮮明な画像が得られた。この系を用いた観察で、移植された細胞に対し、ホスト側の細胞が早期より接触し、組織再生に影響を与えていることを示唆する所見が得られた。また、体外にて軟骨ペレットとマクロファージの共培養を行い、マクロファージの状態によって軟骨組織再生に与える影響が大きく異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨、軟骨細胞移植時にホスト細胞が早期から移植細胞に直接接触していることを示し、細胞間相互作用がその後の組織再生に影響を与えていることが示唆された。また、マクロファージの性質により組織成熟が大きく左右されることが分かった。本研究で得られた知見は、軟骨をはじめとする硬組織の体外成熟法の確立に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：An imaging system was established to observe the maturation process of bone and cartilage in vivo. By the observation using this system, we found that host cells contact with the transplanted cells, probably affecting the tissue regeneration in the early phase. In addition, we performed co-culture of chondrocyte pellets and macrophages, and found that the effects of the macrophages on cartilage regeneration were largely different depending on the status of macrophages.

研究分野：再生医療

キーワード：イメージング 再生医療

1. 研究開始当初の背景

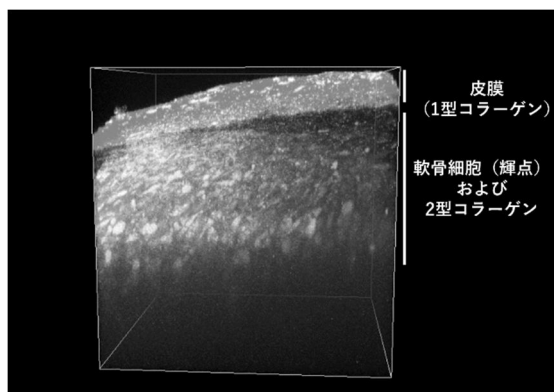
口腔外科領域において、歯槽骨の吸収や顎骨の欠損に対する再生・再建は日常診療で頻繁に目にする重要な課題である。これまで、炎症や外傷、腫瘍などで生じた骨欠損に対して自家骨移植や人工骨移植が行われてきたが、侵襲の大きさや組織置換性の欠如などの問題は依然未解決である。

近年、骨欠損、損傷、変性の再生医療による治療が盛んに試みられている。申請者の所属講座では、以前より骨再生医療について研究を行っており、骨形態を再現した CT-bone を下顎骨に移植する治験へと、研究開発が進展している。

骨再生医療の試みにおいては、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)などの細胞を足場素材に充填し、生体へと移植する方法がしばしば行われる(Suenaga H et al. J Mater Sci Mater Med. 2015)。これまでに種々の足場素材や細胞源を用いた報告がなされているが、特に再生組織が未熟な移植早期において、歯の移動や萌出、インプラント植立といった臨床のニーズに耐えうる十分な強度は依然得られていない。また、移植再生骨の生体内における成熟度の予測ができないため、治療効果が不安定となる。In vitro のみで生体の組織に資する成熟した再生骨を作製できれば上記の問題は解決するが、現在の技術では不可能である。これを実現するためには、生体内における再生骨成熟過程を理解する必要がある。

MSCs が骨芽細胞に分化する過程では、細胞周期の停止が生じることが報告されている(Funato N. et al. Mol Cell Biol. 2001)。MSCs を細胞源とした再生骨の成熟過程においても同様に、細胞増殖による細胞密度の増加、細胞周期の停止、増殖から分化フェーズへの移行といった過程が生じていると考えられる。また、再生骨インプラントの成熟には、移植した MSCs に加え、ホスト側の MSCs、マクロファージ、血管内皮細胞などの細胞やその他の因子が、組織移植後の様々な時期において、組織成熟に対して正にも負にも影響を与えている可能性が高い(Bartaula-Brevik S. et al. Stem Cell Res Ther. 2014)。これらの一連の現象を、時間軸に沿って、細胞レベルで詳細に明らかにすることは、in vitro における骨組織成熟の達成において、増殖刺激から分化刺激への移行の適切なタイミング、適切な添加因子および細胞種、などといった知見を得るために非常に重要である。

骨再生の基礎研究におけるこれまでの知見から、移植再生組織の成熟は一様ではなく、成熟部位に偏りが生じることが明らかになっている。骨成熟は週単位で進行する現象であり、細胞の増殖から分化への移行やホスト側細胞の出現といった現象から基質形成までは時間差があると考えられる。従って、空間的に偏りが見られ、時間差があるこれらの現象の関連を証明するためには、同一部位を複数の時点で観察することが必須である。しかし、従来の組織学的評価では、各時点で動物を安楽死させる必要があるため、そのような時空間的解析は不可能である。近年、2光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージングにより、生体内の現象を同一部位で経時的に、細胞レベルで観察することが可能となっている。また第二次高調波発生(SHG)を用いることでコラーゲンを無染色で検出可能である。この技術を骨再生研究に応用することで、生体内での骨成熟機構を解明しようとする試みもいくつか報告されている(Park D, J Vis Exp. 2014, Huang C et al. J Bone Miner Res. 2015)。



再生軟骨における、第二次高調波発生によるコラーゲンの無染色での検出

2. 研究の目的

本研究の目的および学術的独自性と創造性：本研究では生体内での骨再生過程における細胞分化のタイミングやホスト側細胞・因子の働きについて、2光子励起顕微鏡を用いて時空間的に解析し、in vitro における骨成熟を実現することを目的とする。

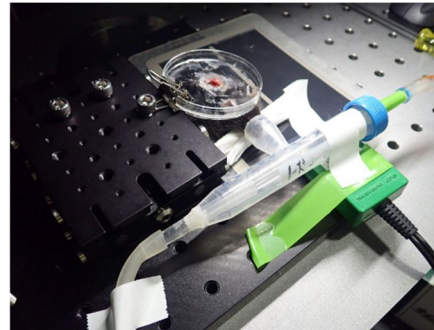
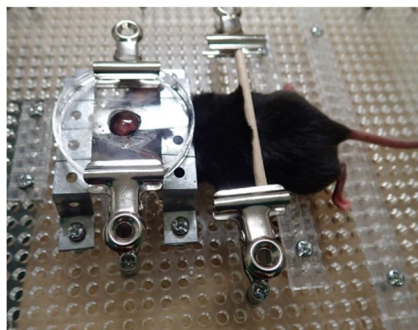
3. 研究の方法

：2光子励起顕微鏡と種々の蛍光プローブを用いた時空間的イメージングを行うことにより、マウス体内での再生骨成熟過程を細胞レベルで解明する。具体的には、細胞周期検出蛍光プローブ Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)を発現したマウスの MSCs を用いた再生骨インプラントを移植し、細胞増殖活性の時空間的变化と、骨基質形成の関連を明らかにする。また、MSCs、マクロファージ、T細胞、血管内皮細胞、破骨細胞といったホスト側の細胞を蛍光標識したマウスを使用し、ホスト側細胞の局在変化と基質形成の時空間的関連を明らかにする。さらに、インプラントに含まれる移植細胞およびホスト側細胞の遺伝子発現プロ

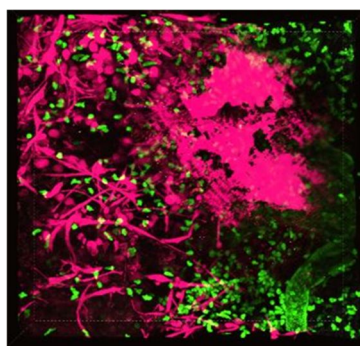
ファイルの解析、時期特異的なホスト側細胞の除去や分子の阻害により、組織成熟に影響を与えるホスト側の細胞・因子を検索する。これらの解析で得られた知見を基に、in vitro 再生骨培養において時空間的イメージングを行いつつ in vivo における再生組織成熟過程を再現し、in vitro 再生骨成熟プロトコル確立を目指す。

4. 研究成果

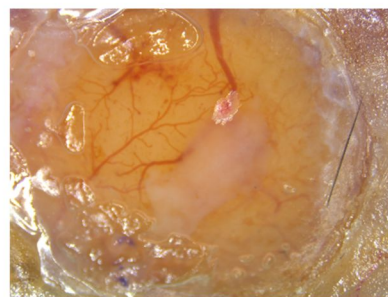
平成 30 年度は、イメージング系の確立を行った。全身で緑色蛍光タンパク (Green fluorescent protein : GFP) を発現する GFP マウスより骨芽細胞を採取、培養した。この骨芽細胞をカバーガラス上で培養し、C57BL/6J 野生型あるいは、Ai14(RCL-tdT)-D と RANK-Cre マウスと掛け合わせたマウス頭蓋骨に作製した骨孔に接着した。マウスを麻酔し、専用の固定具を装着後、2光子励起顕微鏡による観察を行った。結果として、呼吸などによる体動の影響を排した鮮明な画像を得ることができた。移植した細胞の GFP シグナル、骨基質のコラーゲンの第二次高調波発生 (Second harmonic generation: SHG) を検出することで、細胞形態や骨基質線維走行などの観察を行った。



マウスの固定、麻酔
頭部を固定することで体動の影響を最小限に抑えた。
また、浸水レンズでの観察のため水をためる工夫を加えた。



移植した軟骨ペレットの2光子観察(1日目)。軟骨細胞(赤)が一部ペレットから遊走している。ホスト細胞(緑)が軟骨細胞に接して多数存在している。



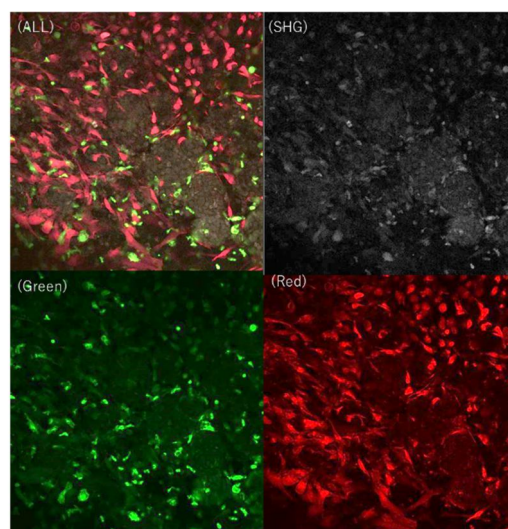
軟骨ペレットのマウスへの移植

令和元年度は、in vivo における再生組織成熟過程の解析を行った。マウス耳介軟骨由来軟骨細胞を赤色蛍光タンパクで標識し、カバーガラスに播種、あるいはペレット培養した。これを GFP マウスに移植し、経時的な観察を行った。その結果、移植後早期より、ホスト由来の GFP 陽性細胞が、移植した軟骨細胞の近傍に多数出現した。また、ホスト由来 GFP 陽性細胞は運動性が高く、移植した軟骨細胞に頻回に接触していた。さらに、移植した細胞の周囲に SHG で検出されるコラーゲン基質を認めた。

加えて、生体内の再生組織成熟過程を in vitro で再現する準備として、赤色蛍光タンパクで標識した軟骨細胞のペレット培養を行い、GFP 発現マクロファージを種々の異なる条件で培養した後、共存培養を行った。マクロファージの存在率は、培養条件により大きく異なっていた。また、ペレット培養による基質産生を SHG により検出可能であった。

令和2年度は、in vitro での体外成熟系の解析を進めた。結果として、加えるマクロファージの培養条件により、軟骨組織成熟が大きく異なる

ことを、2光子励起顕微鏡を用いたイメージングに加え、組織学的評価 (Hematoxylin & Eosin staining, Toluidine blue staining) 遺伝子発現評価などで確認した。これらの検討から、軟骨成熟を促進可能なマクロファージの培養条件、ポピュレーションについての知見を得た。本研究では、骨、軟骨細胞移植時にホスト細胞が早期から移植細胞に直接接触していることを示



移植した軟骨ペレットの2光子観察(5日目)。コラーゲン基質がSHGで検出されている。

し、細胞間相互作用がその後の組織再生に影響を与えていることが示唆された。また、マクロファージの性質により組織成熟が大きく左右されることが分かった。本研究で得られた知見は、軟骨をはじめとする硬組織の体外成熟法の確立に寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Umeyama R, Yamawaki T, Liu D, Kanazawa S, Takato T, Hoshi K H, Hikita A	4. 巻 -
2. 論文標題 Optimization of culture duration of bone marrow cells before transplantation with a - tricalcium phosphate/recombinant collagen peptide hybrid scaffold	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	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） 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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 疋田 温彦、坂本 朋昭、小口 修矢、星 和人
2. 発表標題 2 光子顕微鏡を用いた骨評価
3. 学会等名 第39回日本骨形態計測学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Umeyama, Takanori Yamawaki, Dan Liu, Tsuyoshi Takato, Kazuto Hoshi, Atsuhiko Hikita
2. 発表標題 Examination of optimal culture condition of bone marrow cells on -TCP / RCP hybrid scaffold
3. 学会等名 ASBMR Annual Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 疋田 温彦、坂本 朋昭、小口 修矢、星 和人
2. 発表標題 骨代謝細胞ネットワーク再現系を用いた薬効評価
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田 憲吾、浅輪 幸世、疋田 温彦、星 和人
2. 発表標題 In vivo での軟骨成熟に関わる細胞因子についての検討
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 疋田 温彦、山脇 孝徳、梅山 遼、星 和人
2. 発表標題 3次元プリンタを用いた再生骨足場の開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西條 英人
2. 発表標題 次世代に繋げる唇顎口蓋裂治療（シンポジウム1）
3. 学会等名 第31回日本小児口腔外科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西條 英人
2. 発表標題 唇顎口蓋裂に対するインプラント治療の適応と問題点（シンポジウム4）
3. 学会等名 アトリオン秋田総合生活文化会館，秋田（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西條 英人
2. 発表標題 顎裂部骨移植術と咬合管理
3. 学会等名 日本口腔外科学会/口腔四学会合同研修会（招待講演）
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	藤原 夕子 (Fujihara Yuko) (50466744)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	疋田 温彦 (Hikita Atsuhiko) (60443397)	東京大学・医学部附属病院・特任研究員 (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
---------	---------