

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03859

研究課題名（和文）生体ボリウムイメージ解析を用いた骨細胞のメカノセンサー機能獲得過程の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanosensor function acquisition process of osteocytes using 3D-volumetric image data

研究代表者

上岡 寛 (Kamioka, Hiroshi)

岡山大学・医歯薬学域・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、骨を基質構造と細胞構造の連続体として捉え、その両者の構築が骨細胞をメカノセンサーとして成熟させるのではないかと考えた。そこで本研究により、骨細胞がメカノセンサーとして機能するためには、骨細胞突起が周囲骨細管と一定の構造を形成することが重要であり、その間にテザリングエレメントが形成されることが鍵になってくることが示唆された。さらに、今後疾患別の骨細管形成とその形態のメカニカルストレス応答への影響を検討していくためには、細胞突起および骨細管の自動抽出は必須となるが、大量の連続画像を有するFIB-SEMデータの解析には、機械学習が応用でき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

これまで、どのような力が骨細胞を刺激して、メカニカルストレス応答を生じているか明かでなかったが、骨細管内の構造解析から得られた流体-構造連成解析を進めて流体応力が骨細胞突起の膜表面を局所的に大きく変形させることがメカノセンサーとしてのトリガーになっている可能性を示せた。

また、大量の連続画像を有する生体ボリウムイメージ解析に機械学習を取り入れることによって、境界のはっきりしない電子顕微鏡画像からも目的的部位を自動抽出できることが明らかになった。これにより、今後、より多くのデータを扱うことが可能となり、生体ボリウムイメージ解析が幅広く行われることになったことは社会的意義も高いと思われる。

研究成果の概要（英文）：We considered bone as a continuum of matrix structure and cell structure, and thought that the construction of the two would allow osteocytes to mature as mechanosensors. In this study, we found that it is important for osteocyte processes to form a certain structure with the surrounding osteocyte processes in order for osteocytes to function as mechanosensors, and the key is the formation of a tethering element between them. Furthermore, in the future, in order to examine the effects of osteocyte canaliculi formation on mechanical stress response for bone disease, automatic extraction of cell processes and bone tubules will be essential. It became clear that machine learning can be applied to the analysis of FIB-SEM data.

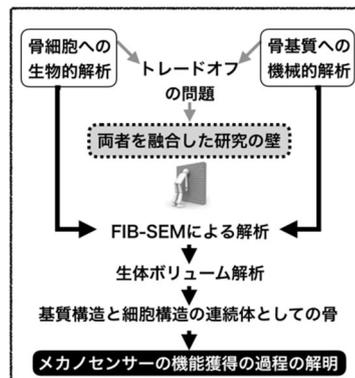
研究分野：骨組織学

キーワード：生体ボリウムイメージ解析 骨細胞 メカノセンサー 骨細管

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療で臨床に応用される機械的負荷による骨の改造の機序はいまだに解明されていない。骨細胞がメカノセンサーとして骨改造を統括していると考えられているが骨基質に囲まれているためその解析は困難を極めていた。そこで我々は骨細胞単独に焦点を当てるのではなく、骨を基質構造と細胞構造の連続体として捉え、その両者の構築が骨細胞をメカノセンサーとして成熟させるのではないかと考えるようになった。そして「骨細胞は骨形成期において如何にメカノセンサーとしての機能を獲得していくのか？」という学術的問いに至った。

全体を俯瞰すると細部がみえず、細部に着目すると全体が俯瞰できない。これをトレードオフの問題といい組織観察の壁となっていた(右図)。そのため骨組織での細胞群、そして細胞と周囲基質など、大きさの異なる一連の構造連携の解析は不可能であった。よって、骨細胞の生物学的解析と骨基質の機械的解析は別々に行わざるを得なかった。しかしながら、骨は基質構造と細胞構造の連続体であり、この両者の関係を汲み出した解析をすることによって骨の機能は解明されると考えられる。一方、近年開発された FIB-



SEM(Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy)などの電子顕微鏡による連続断面観察は、先に述べたトレードオフの問題を解決することの可能な顕微鏡として期待される。この顕微鏡は集束されたナノ直径のアルゴンイオンビームで試料の表面を削合し、続いてその表面を SEM で撮影する、これを繰り返し詳細な立体構築データを得るものである。ここで得られたビックデータを用いた解析を生体ボリュームイメージ解析という。我々は研究分担者の原らが開発した新規顕微鏡(直交配置型 FIB-SEM)を用いることにより、骨形成の主要基質である骨コラーゲンを立体構築することに成功し、骨細胞と基質の構造連携を解析することが可能となった。そこで骨細胞のメカノセンサーとしての機能を解析するために、骨細胞と骨基質の両者を捉えることにより、骨細胞と基質の関係、特に骨細胞のもつ細胞突起とその周囲を囲む骨細管をナノレベル形態解析することで、その場に生じているメカニカル応答のメカニズムをコンピュータシミュレーションにて解析することとした。

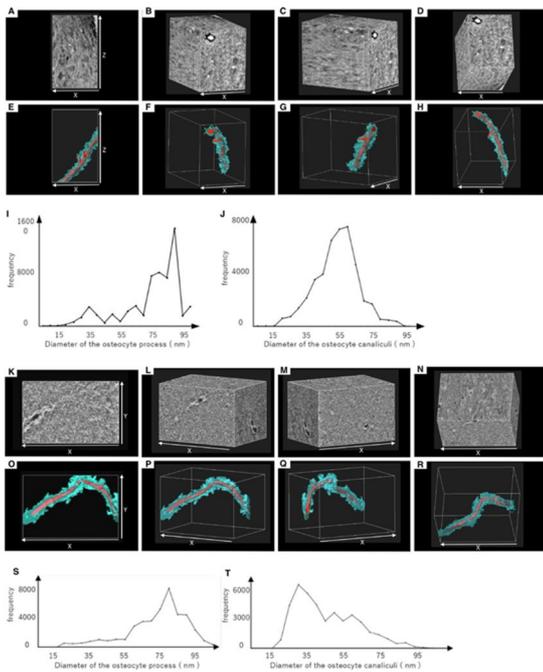
2. 研究の目的

上記の直交配置型 FIB-SEM を用いて、骨細胞ネットワークを形成している細胞突起とその周囲の骨細管の立体構築を行う。得られる連続画像は、1000 枚以上になることから、輪郭抽出を容易にするために、骨細胞突起、骨細管壁、周囲基質を機械学習により認識できるシステムを構築する。さらに、当教室で以前に得られた骨細胞突起と骨細管の 3 次元再構築画像から、先行的に流体シミュレーションならびに細胞突起表面の変形シミュレーションをおこない骨細胞突起のメカノセンサーとしての機能を検討する。また、研究協力者の EDWIN JAGER 先生とは通電することで膨張する特殊樹脂を用いた骨内機械的刺激負荷装置の開発をおこない将来的な生骨内部でのメカニカル応答を観察できる *ex vivo* での実験を構築していく。

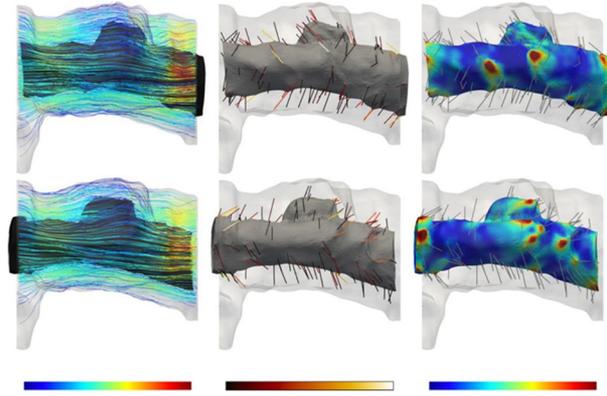
3. 研究の方法

- (1) 骨細胞がメカノセンサーとしての機能するとき、細胞突起と骨細管の間にある体液の流れが細胞突起に応力を引き起こす要因となる。そのために直交配置型 FIB-SEM を用いて、マウス長管骨の骨細胞から骨細胞突起を機械学習により輪郭抽出し、3次元再構築を行う。
- (2) 上記の研究に先行して、2012年に超高压電子顕微鏡で撮影された骨細管の3次元再構築画像を元に、研究分担者亀尾先生のご協力のもとで、骨細管内を流れる体液の移動と細胞突起の変形をシミュレーションにより求める。今回の研究では、細胞突起周囲に存在するテザリングエレメント(多糖類の長鎖)も組み入れることによって、より詳細に細胞膜の変形を解析する。
- (3) 通電することで膨張する特殊樹脂を用いた骨内機械的刺激負荷装置の実用化を行い、実際にニードルの先で変形が生じているのか確認する。

4. 研究成果

- (1) FIB-SEMを用いて生体ボリュームイメージ解析を行った。対象領域を1辺4マイクロメートル、解像度2ナノメートル/voxelの解像度で2000枚の連続断層画像を取得した。しかしながら、この2000枚の連続断層画像から輪郭線を抽出することは、手作業で行える範囲を超えているので、機械学習による輪郭抽出をFiji Image Jの機械学習を用いて、教師データに基づくルールで自動抽出を行い、2値化データを作成した。その後、Amiraソフトウェアを用いた立体構築とDragonflyソフトウェアから骨細管と細胞突起の形態計測を行い、得られた3次元立体構築像の精度の検証を行うことにした。DSC(dice similarity coefficient)は、83%となり、人が手動で抽出する同等の程度まで精度を上げることができた。また、形態観測および形態計測から、骨細管と細胞突起はお互い接することなく、その間隔は最小16ナノメートル、最大88.4ナノメートルを示し、平均値は 51.2 ± 12.9 ナノメートルであった。これらにより、機械学習を用いた今後の生体ボリュームイメージ解析が可能と考えられ、これまで本研究のボトルネックとなっていた輪郭抽出の時間を大幅に縮小できることが確認した。本研究成果を国際誌Journal of Bone and Mineral Metabolismに報告した。右図は3次元再構築された骨細胞突起とその形態計測データをしめす。

- (2) 骨細管内の構造解析から得られた流体-構造連成解析を進めて流体応力が骨細胞の表面にどのように変形を与えているかを、研究分担者である亀尾佳貴先生を中心としたグループとで国際誌Biomechanics and Modeling in Mechanobiologyに発表した。右図は左から流体シミュレーション、メッシュ配置、細胞突起表面の変形をしめす。本研究では、骨細管壁と骨細胞突起を結ぶメッシュ要素が骨細管内を流れる体液の移動で引っ張られ、細胞突起に付着する膜部位で10%を超える細胞膜変形を生じることが確認できた。この変形はメカニカルストレスにより細胞内カルシウム上昇などを生じるには十分な細胞膜変形量であることから、これら細胞突起周辺の微細構造が骨細胞の細胞突起をメカノセンサーとして重要な役割を果たしていることが示唆された。よって、本研究が着目している細胞突起と基質の複合的な要素が骨細胞をメカノセンサーとして機能するように働きかけていることが示唆された。



- (3) 今後の骨組織内での機械的刺激負荷のために研究協力者のEDWIN JAGER先生に依頼して各種厚さの違う樹脂コーティングが施されたタングステンニードルを作成した。骨に穿刺して使用する前に、先端での樹脂変化量を顕微鏡下で確認した。右写真は作成した各種タングステンニードルをしめす。



まとめとして、本課題では、骨細胞がメカノセンサーとして機能するためには、骨細胞突起が周囲骨細管と一定の構造を形成することが大切であり、その間にメッシュ要素が形成されることが重要になってくることがわかった。さらに、今後疾患別の骨細管形成とその形態のメカニカルストレス応答への影響を検討していくためには、細胞突起および骨細管の自動抽出は必須となるが、大量の連続画像を有するFIB-SEMデータの解析には、機械学習が応用できることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tabata Kaori, Hashimoto Mana, Takahashi Haruka, Wang Ziyi, Nagaoka Noriyuki, Hara Toru, Kamioka Hiroshi	4. 巻 40
2. 論文標題 A morphometric analysis of the osteocyte canaliculus using applied automatic semantic segmentation by machine learning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 571 ~ 580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-022-01321-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 Yokoyama Yuka, Kameo Yoshitaka, Kamioka Hiroshi, Adachi Taiji	4. 巻 20
2. 論文標題 High-resolution image-based simulation reveals membrane strain concentration on osteocyte processes caused by tethering elements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomechanics and Modeling in Mechanobiology	6. 最初と最後の頁 2353 ~ 2360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10237-021-01511-y	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 Yoshikawa Yuri, Izawa Takashi, Hamada Yusaku, Takenaga Hiroko, Wang Ziyi, Ishimaru Naozumi, Kamioka Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Roles for B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via the AhR/Cyp1a1 signaling axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-94470-4	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 -
1. 著者名 Weng Yao, Wang Ziyi, Fukuhara Yoko, Tanai Airi, Ikegame Mika, Yamada Daisuke, Takarada Takeshi, Izawa Takashi, Hayano Satoru, Yoshida Kaya, Kamioka Hiroshi, Okamura Hirohiko	4. 巻 47
2. 論文標題 O GlcNAcylation drives calcium signaling toward osteoblast differentiation: A bioinformatics oriented study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioFactors	6. 最初と最後の頁 992 ~ 1015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biof.1774	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 Ishimoto Takuya, Kawahara Keita, Matsugaki Aira, Kamioka Hiroshi, Nakano Takayoshi	4. 巻 109
2. 論文標題 Quantitative Evaluation of Osteocyte Morphology and Bone Anisotropic Extracellular Matrix in Rat Femur	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 434 ~ 444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-021-00852-1	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 Osumi Ryuta, Wang Ziyi, Ishihara Yoshihito, Odagaki Naoya, Imura Tadahiro, Kamioka Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Changes in the intra- and peri-cellular sclerostin distribution in lacuno-canalicular system induced by mechanical unloading	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 148 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01135-9	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 Osumi Ryuta, Wang Ziyi, Ishihara Yoshihito, Odagaki Naoya, Imura Tadahiro, Kamioka Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Changes in the intra- and peri-cellular sclerostin distribution in lacuno-canalicular system induced by mechanical unloading	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 148 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01135-9	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 Wang Ziyi, Weng Yao, Ishihara Yoshihito, Odagaki Naoya, Ei Hsu Hlaing Ei, Izawa Takashi, Okamura Hirohiko, Kamioka Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Loading history changes the morphology and compressive force-induced expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin in MLO-Y4 osteocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e10244 ~ e10244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.10244	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 Ei Hsu Hlaing Ei, Ishihara Yoshihito, Odagaki Naoya, Wang Ziyi, Ikegame Mika, Kamioka Hiroshi	4. 巻 158
2. 論文標題 The expression and regulation of Wnt1 in tooth movement?initiated mechanotransduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics	6. 最初と最後の頁 e151 ~ e160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajodo.2020.08.006	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 Ziyi, Ishihara Yoshihito, Kamioka Hiroshi	4. 巻 2346
2. 論文標題 The Analysis of Gap Junctional Intercellular Communication Among Osteocytes in Chick Calvariae by Fluorescence Recovery After Photobleaching	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 215 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2020_322	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 Hlaing Ei Ei Hsu, Ishihara Yoshihito, Wang Ziyi, Odagaki Naoya, Kamioka Hiroshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Role of intracellular Ca ²⁺ -based mechanotransduction of human periodontal ligament fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 10409 ~ 10424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900484R	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 Sumitani Yusuke, Uchibe Kenta, Yoshida Kaya, Weng Yao, Guo Jiajie, Yuan Haoze, Ikegame Mika, Kamioka Hiroshi, Okamura Hirohiko	4. 巻 95
2. 論文標題 Inhibitory effect of retinoic acid receptor agoinsnts on in vitro chondrogenic differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 202-208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-019-00512-3	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7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 上岡 寛
2. 発表標題 歯を取り囲む細胞性ネットワークのメカニカルストレス応答における時空間的役割を探索
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 日本学術会議歯学委員会臨床系歯学分科会主催公開シンポジウム「進化・発生・メカニカルストレスから探る顎顔面形成・維持機構最先端」（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上岡 寛、田畑 香織、橋本 真奈、長岡 紀幸、原 徹
2. 発表標題 生体ポリウム解析への機械学習の応用—FIB-SEM像からの骨細管の抽出—
3. 学会等名 第41回日本骨形態計測学会 特別企画3 医用画像から新しい骨形態計測への橋渡しを担うAI（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田畑香織、橋本真奈、長岡紀幸、原徹、上岡寛
2. 発表標題 骨細胞突起と骨細管の三次元的形態観察
3. 学会等名 第40回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王紫儀、翁瑤、石原嘉人、小田垣直也、Ei Ei Hsu Hlaing、井澤俊、岡村裕彦、上岡寛
2. 発表標題 Loading history changed morphology and compressive force-induced expression of RANKL/OPG osteocytes in vitro
3. 学会等名 第40回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi KAMIOKA
2. 発表標題 Bioimaging of bone
3. 学会等名 9th International Orthodontic Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田畑香織、橋本真奈、長岡紀幸、原徹、上岡寛
2. 発表標題 機械学習による骨細胞突起と骨細管の抽出
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ei Hsu Hlaing E, Ishihara Yoshihito, Wang Ziyi, Odagaki Naoya, Kamioka Hiroshi
2. 発表標題 Periodontal ligament mechanotransduction: intercellular Ca ²⁺ signaling in tooth movement-initiated alveolar bone remodeling
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>日本骨代謝学会 2022骨サミット 骨密度以外の骨強度因子「骨質New Era」 http://www.jsbmr.jp/summit/ 日本学術振興会 研究成果トピックス https://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/37_topics/index.html</p>
--

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	植田 紘貴 (UEDA HIROTAKA) (10583445)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	早野 暁 (HAYANO SATORU) (20633712)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	亀尾 佳貴 (KAMEO YOSHITAKA) (60611431)	京都大学・医生物学研究所・助教 (14301)	
研究分担者	原 徹 (HARA TORU) (70238161)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・技術開発・共用部門・ステーション長 (82108)	

	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
研究協力者	ジャガー エドウィン (Jager Edwin)		

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