

令和 6 年 9 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03876

研究課題名（和文）移植骨の骨細胞ネットワーク再構築と骨質に着目した自家骨移植の至適条件探索

研究課題名（英文）Searching for optimal conditions for autogenous bone grafting focusing on bone cell network reconstruction and bone quality in grafted bone

研究代表者

魚島 勝美（Uoshima, Katsumi）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50213400

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

研究成果の概要（和文）：試行錯誤によって骨組織に対する透明化（Cubic法）の最適なプロトコルを見出した。また、骨移植後の移植骨における骨細管ネットワークを観察する方法として、二光子顕微鏡による観察と鍍銀染色を用いたところ、移植2週間には移植骨と母骨との間に骨形成が観察され、1週間後には観察されなかった骨細管の再生が観察された。今後は長期の実験期間を設定し、移植骨全体の骨細管ネットワークの寸断と再生および移植骨周囲からの骨吸収との関連を観察することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに報告されていない骨組織の透明化によって、切片ではない骨標本の骨細管を立体的に観察できるようになった。また、骨移植に伴う骨細管ネットワークの寸断と再生に関する観察を行うことができ、今後の長期実験期間の設定によって、当初の目的である移植骨の吸収と骨細管ネットワークの再生の関係性が見出せる端緒となった。

研究成果の概要（英文）：Through trial and error, we found the optimal protocol for bone tissue transparency (Cubic method). In addition, we used two-photon microscopy and silver staining to observe the bone canalicular network in the grafted bone after bone grafting. Two weeks after grafting, bone formation was observed between the grafted bone and the parent bone, and regeneration of bone canals, which was not observed one week later, was observed. In the future, we will set up a long-term experimental period and be able to observe the relationship between the disruption and regeneration of the bone canalicular network in the entire grafted bone and bone resorption from around the grafted bone.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：骨移植 骨細管 骨吸収 ネットワーク

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

デンタルインプラント適用部位の骨量が不足する場合、インプラント埋入に先立って骨増生を行うことが多い。本邦の現状では自家骨移植が一般的であるが、移植した骨は経年的に吸収されて体積が減少することが知られている。この割合は移植する骨の性状や形態にもよるが、Meta-Analysisの結果報告によれば、一般的に10年経過後に30%程度だと言われている。臨床的にも自家骨移植により増生した部位の骨が吸収され、インプラント体上部が骨縁上に露出し、場合によってはインプラントの除去を余儀なくされる症例もある。このような背景から、移植時の骨の体積は、必要とされる体積より大きくすることが求められるが、患者側の侵襲が大きいことからその採取量には限界がある。これに対する対策として、人工生体材料や生物由来骨も使用されるが、その吸収と骨組織への置換という点で問題を抱える材料も多く、理想的な生体材料は未だに見出されていない。

代表研究者らは、最小限の自家骨によってより効果的な骨増生を行うことを目的として、自家培養骨膜を用いた骨移植を臨床応用し、良好な結果を得ている。しかし、それでも経年的な骨量の減少は避けられていない。

一方、2000年のNIHコンセンサスステートメントでは、骨質は骨基質のコラーゲン、骨代謝回転、微小骨折、石灰化度によって規定されるとされ、研究代表者らはこれまでに骨基質中のコラーゲンに着目して、これが骨代謝に与える影響を検索してきた。その結果、コラーゲンクロスリンクが*in vitro*においても*in vivo*においても骨代謝に影響を与えることが見出されている。

また、骨基質内には骨細胞が埋設されているが、これら細胞の突起が細管を通してネットワークを形成し、骨代謝のコントロールセンターとして機能していることが分かっている。研究代表者のこれまでの実験結果によれば、一旦個体から切り出された骨片を異なる部位に移植した場合にも、その骨片中の骨細胞は一定期間(ラットで少なくとも4週間)生存している。しかしながら、これら移植骨の骨細胞のネットワークは骨断端で切断されていることが明確であり、コントロールセンターとしての機能は失われ、周辺の骨代謝に影響を及ぼしている可能性が高い。

以上のことから、外科的な手技以外に自家骨移植の予後に影響する因子として、移植骨の骨質(コラーゲンクロスリンク)とこれに対応して形成される新生骨の骨質、骨細胞ネットワークの再構築などが、移植骨の生着と長期予後に影響を与える可能性は高いと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、自家骨移植後に起こる移植骨および周辺組織の変化を、移植骨の骨質と構造、骨細胞のネットワーク再構築および新生骨の骨質の観点から詳細に検索することである。これにより、骨質の回復を早め、移植骨の吸収を最小限に抑える条件を見出して、自家骨移植の長期予後を改善することを最終的な目標とする。

### 3. 研究の方法

(1) マウスを用いて以下の骨移植実験を行う。実験期間は3日、1週、2週、4週、8週とする。

骨移植条件：

マウス頭蓋骨をマウス頭蓋骨へ マウス大腿骨骨頭付近の海綿骨をブロックでマウス頭蓋骨

へ マウス大腿骨緻密骨をブロックでマウス頭蓋骨へ

評価：

脱灰組織薄切標本を作製して H-E 染色を施し、光学顕微鏡下に観察する。骨細胞マーカー( Dmp1、Sost、Fgf23、Phex ) に対する免疫染色を行い、組織学的に観察する。同時に移植部位の組織を採取し、骨細胞マーカーの発現を RT/PCR によって解析する。各移植骨および移植骨周囲に形成された新生骨のコラーゲンクロスリンクの局在を顕微ラマン分光法により解析する。また、一部試料のコラーゲン分析を専門家である山内博士に依頼する。

〔移植骨周辺の血管再生〕

上記各実験条件の一部個体に対して標本採取の直前に Sulforhodamine101(8mM)を投与して血漿成分を蛍光標識し、二光子顕微鏡(本学脳研究所に設置)によって毛細血管の再生を立体的に可視化して追跡する。この結果と移植骨周囲骨形成との関連を検索する。

(2)〔移植骨の骨細胞ネットワーク再構築とその影響〕

骨移植条件：

マウス大腿骨緻密骨をブロックで反対側の同部位の骨欠損部へ マウス大腿骨骨頭付近の海綿骨をブロックで他個体の大腿骨骨欠損部へ(大腿骨骨頭採取後は生存できないため)

実験期間は3日、1週、2週、4週、8週とする。

評価：採取した組織には透明化处理(CUBIC法)を施し、骨細胞ネットワークをPhalloidinにて染色した後に、二光子顕微鏡により移植骨を取り巻く骨細胞ネットワークの3次元解析を行う。より詳細な微細形態の解析には集束イオンビーム走査電子顕微鏡(focused ion beam-scanning electron microscopy; FIB-SEM)による観察(本学に設置されていないため、業者に外注予定)を行い、経時的な骨細胞突起の連続性の変化を追跡する。これと、表面を含む移植骨周囲の骨形成、骨代謝との関連を検索する。本実験結果により、観察条件が整った後、移植骨細管再構築の長期追跡を行う。

さらに、上記、の条件では、移植後の骨細胞の機能を検索するために、移植骨の骨細胞を凍結処理によって死滅させ、骨細胞が生存した状態で移植する場合と比較する実験、ジフテリア毒素によって全身の骨細胞が死滅する Dmp1-HBEGF マウスを移植される側として、骨細胞が生存する移植骨をこれに移植する実験も行う。

〔移植骨の違いが周囲骨形成に与える影響〕

骨移植条件：前年度の条件に以下を加える。

マウス大腿骨を骨髄と共に粉碎して頭蓋骨へ マウス大腿骨骨頭付近の海綿骨を粉碎してマウス頭蓋骨へ ラット頭蓋骨をラット頭蓋骨へ ラット大腿骨骨頭付近の海綿骨をブロックでラット頭蓋骨へ ラット大腿骨緻密骨をブロックでラット頭蓋骨へ

マウス・ラットの実験期間は3日、1週、2週、4週、8週、16週とする。移植される側のマウスについては移植後の評価対象部位に存在する細胞の増殖分化状態を把握するために、細胞周期に応じて異なる蛍光を発現する遺伝子改変マウス(Fucci)を用いる。一部のラットは遺伝子改変によってすべての体細胞が蛍光標識されるグリーンラットを用い、移植後の細胞動態を蛍光により追跡する。また、移植される側の骨髄を放射線照射により除去する免疫不全ラットを作製し、これに正常ラットから骨を移植すると同時に、大腿骨骨髄にグリーンラットの骨髄を移植して、移植骨周囲に動員される細胞を追跡する。

評価：

条件ごとに骨移植部に動員される細胞の同定と解析をし、比較する。

条件ごとに移植骨周囲に形成される新生骨形成とコラーゲンクロスリンクを解析・比較する。  
 遺伝子改変マウスにおける、骨移植部位の各種細胞の増殖分化状況を追跡する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 移植骨の基質コラーゲンの解析について

米国ノースカロライナ大学の山内博士に分析を依頼する予定であったが、コロナ禍の影響で打ち合わせのための渡米ができず、断念することとなった。しかしながらラットを使った骨移植実験は多数行っており、資料は手元にあるので今後は骨細胞ネットワークの解析を進めるのと並行して、コラーゲンの解析を進める予定である。

##### (2) 移植骨周辺の欠陥再生について

残念ながら以下(3)に記載する理由で血管再生を観察するに至らなかった。

##### (3) 移植骨の骨細胞ネットワーク再構築について

当初の予定では移植骨およびその周囲組織に対して透明化处理( CUBIC 法 )を行って、一定の厚みを持った骨細胞ネットワークを観察する予定であった。しかしながら、現時点で発表されている本方法は軟組織を対象としたものであって、同じプロトコルを骨組織に適用したところ、その透明化に苦慮した。1 標本につき約 40 日を要する作業であるため、この試行錯誤に相当の時間を要したが、現状で得られた最適なプロトコルを右に示す( 図 1 )。

No.	Procedure	Amount	Time	Temp.	Note	
1.	Fixation (4% PFA)	∅	1 day	4°C	∅	
2.	PBS	∅	3hrx3	RT	∅	
3.	Delipidation (CUBIC-L)	10 ml	7 days	37°C	Gentle shaking (all steps)	
4.	PBS	∅	1 day	RT	∅	
5.	Decalcification (CUBIC-B)	10 ml	7 days	37°C	∅	
6.	PBS	∅	1 day	RT	∅	
7.	Delipidation (CUBIC-L)	10 ml	4 days	37°C	∅	
8.	PBS	∅	1 day	RT	∅	
9.	Nuclear staining (SYTOX)	SYTOX-G 1.6 µl + Staining Buffer 4000 µl	5 days	37°C	Protect from light	
10.	Wash (CUBIC nuclear kit)	For 50ml = Wash buffer 0.5ml + DDW 49.5ml	2hrx3	RT	15mlx1- (1:100) Protect	
				α-SMA	Phalloidin	
11.	Exchanging the immersion media	15 ml	1.5 hr	32°C	4°C	Protect
12.	3D immunostaining	∅	10 days	32°C	4°C	Protect, Wrap paraffin(lid)
13.	Wash (1xHV™ 3D immunostaining wash buffer)	15 ml	30 minx2	32°C	4°C	Protect
14.	Precooled 1st post-stain fixation (1% Formaldehyde)	8 ml, Diluted down from 37% FA with PBS	1 day	∅	4°C	Protect
15.	2nd post-stain fixation (1% Formaldehyde)	8 ml	1 hr	∅	37°C	Protect
16.	PBS	15 ml	2 hr	∅	RT	Protect
17.	RI-1 (50%)	15 ml, 1:1 mixture of water and CUBIC-R+	1 day	∅	RT	Protect
18.	RI-2 (100%)	15 ml	2 days	∅	RT	Protect
19.	Observation	∅	∅	∅	∅	Protect

図 1

また、当初は二光子顕微鏡および集束イオンビーム走査電子顕微鏡 ( focused ion beam-scanning electron microscopy ; FIB-SEM ) により移植骨を取り巻く骨細胞ネットワークの 3 次元解析を行う予定であったが、本学に設置された二光子顕微鏡の使用に時間的制限があったこと、集束イオンビーム走査電子顕微鏡による解析の外注に相当の費用を要することから、本学歯学部設置されているオールインワン顕微鏡による観察が可能である可能性に鑑み、専用のフィルター等を購入して透明化处理を施した骨組織の観察を行った。しかしながら、条件設定に関するかなりの時間と労力を費やしても、下に示すクオリティーの観察しかできず、骨細管の詳細な観察ができないことが判明した( 図 2 )。

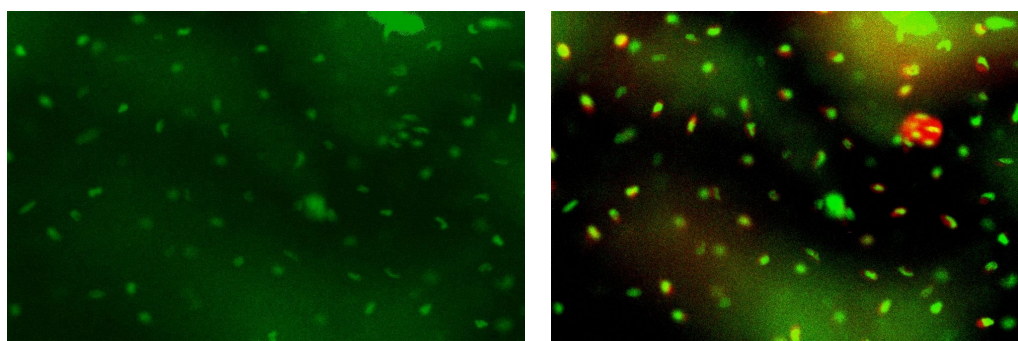


図 2 骨組織透明化後のオールインワン顕微鏡による観察像

異なる蛍光染色(抗体)とフィルターによる高倍率の観察によっても骨細胞から伸びているはずの骨細管は観察できなかった。

そこで、止むを得ず時間的な制限を前提の上で本学に設置された二光子顕微鏡を用いて観察を開始するとともに、薄切切片に対する鍍銀染色（図3・4）を並行して行い、現状では移植骨およびその周辺組織における骨細管ネットワークの詳細な観察が可能となったと考えている。

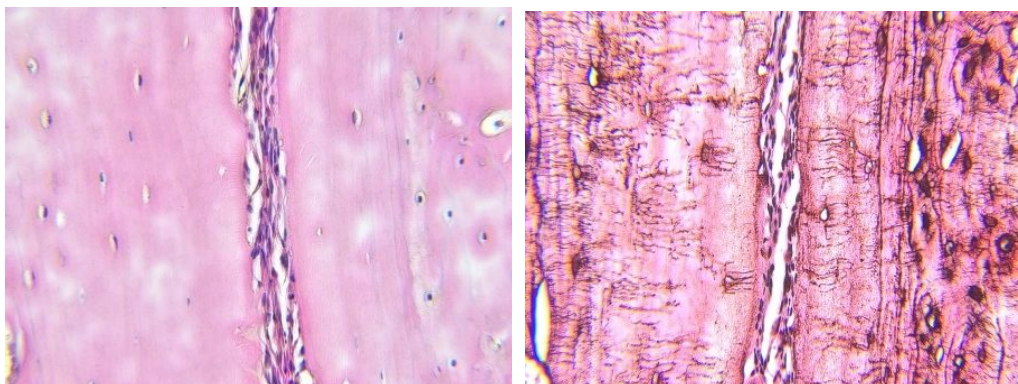


図3 骨移植1週間後の組織像

左がH-E染色、右が鍍銀染色

いずれも移植骨が左側である。移植後1週間で既に移植骨の骨細胞ネットワークは寸断されており、母骨との間に未だ骨は形成されていない。

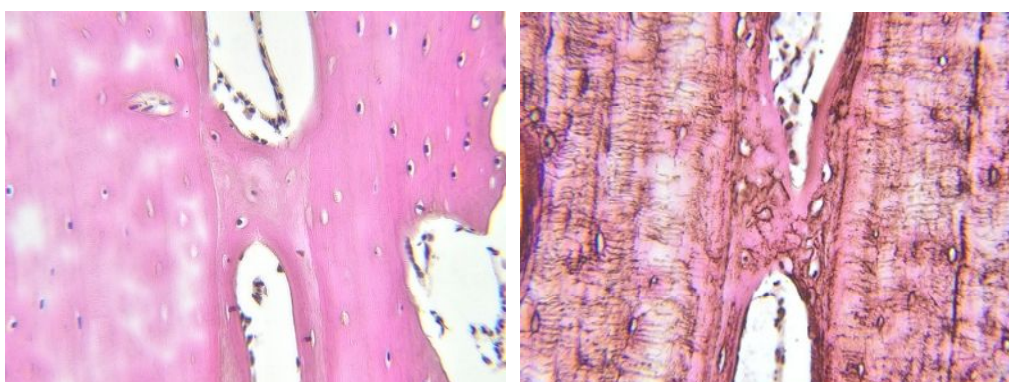


図4 骨移植2週間後の組織像

左がH-E染色、右が鍍銀染色

いずれも移植骨が左側である。移植後2週間で既に母骨との間に未だ骨が形成されている。移植骨側の骨細胞ネットワークは1週間後と比較して、やや回復傾向が見られる。

本研究課題においては、当初の計画通りに実験および観察が行えなかった点は問題であるが、得られた結果は今後の研究継続によって数年以内に当初の目的が果たせる端緒となったことは間違いない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 悠, 長澤麻沙子, 張 桐桐, 魚島勝美
2. 発表標題 骨増成におけるコラーゲンクロスリンク阻害の影響に関する組織学的観察.
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会関越支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 悠, 長澤麻沙子, 張 桐桐, 魚島勝美
2. 発表標題 骨移植におけるコラーゲンクロスリンクの影響
3. 学会等名 第132回公益社団法人日本補綴歯科学会学術大会
4. 発表年 2023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	加来 賢  (Kaku Masaru)  (30547542)	新潟大学・医歯学系・准教授    (13101)	
研究分担者	長澤 麻沙子  (Nagasawa Masako)  (40612239)	新潟大学・医歯学系・助教    (13101)	

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	秋葉 陽介  (Akiba Yousuke)  (70547512)	新潟大学・医歯学総合病院・講師    (13101)	

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