

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21H03056  
研究課題名（和文）革新的イメージング技術と一細胞解析を駆使したOA線維化の病態解明と制御法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of OA fibrosis and establishment of therapeutic methods using innovative imaging technology and single-cell analysis

研究代表者  
今村 健志（Imamura, Takeshi）  
愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70264421  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、変形性関節症（OA）の慢性炎症に伴う組織線維化の病態解明と新規診断・治療法の発見に繋がる技術を開発することを目的に、高精細2光子励起蛍光顕微鏡と広視野・高速2光子励起ライトシート顕微鏡を開発し、マウスの線維芽細胞Coll陽性細胞、CAR細胞と悪玉線維芽細胞THY1陽性細胞の空間的な発現を解析した。SHGによる組織形態パターンの数値化・定量化システムとして、偏光方向イメージングを含めた解析システムを開発し、定量化に成功した。さらに機械学習を乳腺腫瘍の判別に応用した。安定的な靱帯切除OAモデルを樹立し、OA関節軟骨におけるCAR細胞とTHY1陽性細胞を調べたが、発現は確認できなかった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症（OA）は、関節軟骨の変性・変形によりQOLが大きく制限される疾患である。本邦における膝OAだけでも潜在的な患者数は約3000万人以上と推定されている。OAの原因は未だ不明でその根本的な治療法はない。本研究によって、OAの慢性炎症に伴う組織線維化の研究技術プラットフォームが開発されれば、新たな切り口でOAの原因に迫ることができ、その学術的意義は大きい。さらに、OAの慢性炎症に伴う線維化に関わる多様な細胞の新たなサブタイプが同定され、さらにその時空間制御に関わる細胞間ネットワークが明らかになれば、OAの新たな病態解明、さらに新規診断・治療法の開発に繋がり、その社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to develop new techniques to elucidate the pathogenesis of tissue fibrosis associated with chronic inflammation in osteoarthritis (OA) and to discover novel diagnostic and therapeutic methods, we developed a high-resolution two-photon excitation fluorescence microscope and a wide-field, high-speed two-photon excitation light sheet microscope, and analyzed the spatial expression of mouse Coll-positive fibroblasts, CAR cells, and THY1-positive fibroblasts. In addition, we developed an analysis system including polarization direction imaging as a system for quantification and quantification of tissue morphology patterns by SHG, and succeeded in quantifying them. Furthermore, machine learning was applied to discriminate mammary tumors. The ligamentectomy OA model were established, and CAR cells and THY1-positive fibroblasts in OA articular cartilage were examined, but expression was not confirmed.

研究分野：分子生物学

キーワード：イメージング技術 変形性関節症 線維化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、関節軟骨の変性・変形により日常生活の質 QOL が大きく制限される疾患である。全身のさまざまな関節で発症するが、中でも膝 OA の頻度は高く、厚生労働省の調査では、本邦での膝 OA 患者数は、自覚症状を有する患者数で約 1000 万人以上、X 線診断による潜在的な患者数は約 3000 万人以上と推定されている。これまで人工関節置換術の発達により、多くの OA 患者の QOL が改善されているが、いまだその病因は不明で、本質的な治療法はなく、iPS 細胞を含めた再生医療の研究が行われているが、その応用も遅れている。OA で損傷を受ける関節軟骨は、関節表面でクッションの役割を担うが、無血管・無神経なために修復能力が限られている。その結果、OA において損傷した関節表面の硝子軟骨は、機能的に硝子軟骨と大きく異なる脆弱な線維軟骨によって置換され、それが関節の再生医療において大きな問題となっている。

これまでの OA の研究においては、関節表面の軟骨の障害が注目され、軟骨代謝の研究が進んできた。一方、OA の慢性化や重症化において慢性炎症に伴う組織線維化(fibrosis)の関与も指摘されてきたが、その研究はほとんど進んでいない。従来は、OA に限らず、一般的に慢性炎症に伴う臓器線維化は、慢性的な臓器障害のなれの果てで、不可逆かつ予後不良の状態と考えられてきた。しかし、近年、膵移植による糖尿病性糸球体硬化病変の改善や間葉系幹細胞移植による肝硬変の改善など「Point of no return」を超えても一定の可逆性が存在する線維化疾患が次々に報告され、線維化はアンメット・メディカル・ニーズの極めて高い疾患として注目され、抗線維化薬の世界的な開発競争が始まっている。しかし、OA においては、線維軟骨形成を、慢性炎症のキープロセスである線維化の視点から俯瞰的に解析し、線維軟骨形成に関わる細胞のサブタイプを同定するような研究はなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、OA の慢性炎症に伴う組織線維化の病態解明と新規診断・治療法の発見に繋がる技術プラットフォームを開発し、OA 研究を推進することにある。具体的には、OA における関節軟骨の線維軟骨形成(線維化)に関わる線維芽細胞の起源として、CXCL12 を豊富に発現する CAR (CXCL12-abundant reticular) 細胞、線維化を増長する悪玉線維芽細胞として THY1 陽性細胞に着目し、それらの OA 病態への関与を明らかにするための革新的イメージング技術と遺伝子改変マウスを開発し、その応用展開をはかる。イメージング OA モデルを樹立して、*in vivo* および透明化サンプルでの細胞動態解析を可能にし、さらに一細胞解析を用いた遺伝子発現プロファイルの基盤技術を開発する。この結果、OA の慢性炎症に伴う線維化に関わる多様な細胞の新たなサブタイプが同定され、さらにその時空間制御に関わる細胞間ネットワークが明らかにできれば、OA の新たな病態解明、さらに新規診断・治療法の開発に繋がる。

### 3. 研究の方法

線維芽細胞前駆細胞 CAR 細胞の *in vivo* 細胞追跡イメージングマウスとして橙色蛍光タンパク質(Kusabira-Orange; KO)を CXCL12 locus にノックインしたマウス(CAR-Orange マウス)、線維芽細胞の *in vivo* 細胞追跡イメージングマウスとして I 型コラーゲンプロモーター支配下に緑色蛍光タンパク質(GFP)が発現するマウス(CoII-GFP マウス)、線維化を増長する悪玉線維芽細胞として THY1 陽性細胞の *in vivo* 細胞追跡イメージングマウスとして THY1 プロモーター支配下に黄色蛍光タンパク質(YFP)が発現するマウス(H-line マウス)を入手、繁殖し、まず、それぞれ骨・軟骨を含む全身での発現を、*in vitro* および *in vivo* で解析する。

さらに一部の臓器では組織透明化を行うための条件設定を行い、組織透明化サンプルで広視野・高精細イメージングを行うことで、線維芽細胞 CoII 陽性細胞、線維芽細胞前駆細胞 CAR 細胞と悪玉線維芽細胞 THY1 陽性細胞の空間的な発現を解析する。以上の解析には、独自に開発したイメージングシステムを用いる。

線維化自体の画像化と定量化に関しては、無染色・無標識コラーゲン可視化技術である SHG による OA 組織形態パターンの数値化・定量化システムを実現し、人工知能 AI による早期診断システムの構築を目指す。具体的には、通常の方法に加え、偏光方向イメージングを含めた新たな SHG 解析システムを開発し、さらに機械学習を応用した、病態判別システムを構築する。

一細胞解析については、靱帯切除 OA モデルを確立した後に、そのモデルを使って細胞追跡イメージングを行うとともに、一細胞解析のための細胞採取の条件検討を行い、正常関節軟骨と OA モデル関節軟骨で比較検討を行う。

### 4. 研究成果

イメージングマウスを用いた発現解析では、CoII 陽性細胞は皮膚および腸管の線維芽様細胞での発現、CAR 細胞は脳を含む血管周囲の細胞での発現、THY1 陽性細胞は神経細胞の一部と骨髄の細胞の一部、リンパ節の細胞の一部での発現を確認した。骨・軟骨組織においては、CoII の弱陽性発現細胞を認め、CAR 細胞と THY1 陽性細胞は認めなかった。

組織透明化については、まず胎児を使って骨・軟骨の透明化を試みたが、当初予定した LUCID 法では骨・軟骨の透明化の効果が弱かったので、CUBIC 法の条件設定を行い、CUBIC-L/R 法では十分な透明化効果があることを明らかにした。

イメージング技術開発については、2光子励起蛍光顕微鏡を用いた高精細 3D イメージングシステムに加え、広視野・高速イメージングを実現する 2光子励起ライトシート顕微鏡を開発し (Takanezawa et al., Nature Communications, 2021)、特に透明化サンプルのイメージングに応用した。

SHG による組織形態パターンの数値化・定量化システムと人工知能 AI 導入については、従来の SHG イメージングに加え、直線偏光方向イメージングや径偏光方向イメージングなどの偏光方向イメージングを含めた解析システムを開発し、定量化に成功した。さらに機械学習を乳腺腫瘍の判別に応用し、論文発表した (Kobayashi-Taguchi et al., Molecules, 2022)。

靭帯切除 OA 手術については、当初は再現性が困難であったが、問題点の改善を行い、靭帯切除に加え関節包切開などの工夫や条件検討によって安定的なモデルを樹立した。樹立したモデルを用いて、OA 関節軟骨における CAR 細胞と THY1 陽性細胞の出現は確認できなかった。

一方、人工知能 AI 導入については、機械学習を応用した病態判別システムを構築し、乳腺腫瘍の判別に応用し、ヒト乳腺組織検体を用いた自動診断に成功し、論文発表した (Kobayashi-Taguchi et al., Molecules, 2022)。

一細胞解析については、まず、正常関節軟骨と OA モデル関節軟骨で、細胞分離の比較を行い、前処置、コラゲナーゼ等酵素処理に工夫を加えることで、解析に必要な細胞数を得られることがわかった。

本研究により、イメージング技術と一細胞解析技術を駆使した、OA の慢性炎症に伴う組織線維化研究の技術プラットフォームを開発することができた。一方、靭帯切除 OA モデルマウスにおいては、OA 関節軟骨における CAR 細胞と THY1 陽性細胞の出現は確認できず、今後は、ヒト検体での検討、新たなモデルマウスとしてアジュバント関節炎 (adjuvant induced arthritis: AIA) マウスおよびコラーゲン誘導関節炎 (collagen type II-induced arthritis: CIA) マウス等での検討が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tazawa Hiroshi, Shigeyasu Kunitoshi, Noma Kazuhiro, Kagawa Shunsuke, Sakurai Fuminori, Mizuguchi Hiroyuki, Kobayashi Hisataka, Imamura Takeshi, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 113
2. 論文標題 Tumor targeted fluorescence labeling systems for cancer diagnosis and treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1919 ~ 1929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15369	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 Mori Wakako, Kawakami Ryosuke, Niko Yosuke, Haruta Tomohiro, Imamura Takeshi, Shiraki Kentaro, Zako Tamotsu	4. 巻 12
2. 論文標題 Differences in interaction lead to the formation of different types of insulin amyloid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12212-6	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 Kobayashi-Taguchi Kana, Saitou Takashi, Kamei Yoshiaki, Murakami Akari, Nishiyama Kanako, Aoki Reina, Kusakabe Erina, Noda Haruna, Yamashita Michiko, Kitazawa Riko, Imamura Takeshi, Takada Yasutsugu	4. 巻 27
2. 論文標題 Computer-Aided Detection of Quantitative Signatures for Breast Fibroepithelial Tumors Using Label-Free Multi-Photon Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3340 ~ 3340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27103340	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 Matsuura Hitomi, Kawakami Ryosuke, Isoe Maki, Hoshihara Masaharu, Minami Yuya, Yatsuzuka Kazuki, Tsuda Teruko, Murakami Masamoto, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, Imamura Takeshi, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke	4. 巻 14
2. 論文標題 NIR-II-Excitable Dye-Loaded Nanoemulsions for Two-Photon Microscopy Imaging of Capillary Blood Vessels in the Entire Hippocampal CA1 Region of Living Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 40481 ~ 40490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.2c03299	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 Inoue Kazuki, Kawakami Ryosuke, Murakami Masamoto, Nakayama Taku, Yamamoto Shinkuro, Inoue Keiji, Tsuda Teruko, Sayama Koji, Imamura Takeshi, Kaneno Daisuke, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Synthesis and photophysical properties of a new push/pull pyrene dye with green-to-far-red emission and its application to human cellular and skin tissue imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1641 ~ 1649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1tb02728j	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 Takanezawa Sota, Saitou Takashi, Imamura Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Wide field light-sheet microscopy with lens-axicon controlled two-photon Bessel beam illumination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23249-y	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 Sugihara Yoshiaki, Inai Naoto, Taki Masayasu, Baumgartner Thomas, Kawakami Ryosuke, Saitou Takashi, Imamura Takeshi, Yanai Takeshi, Yamaguchi Shigehiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Donor/acceptor/acceptor-type near-infrared fluorophores that contain dithienophosphole oxide and boryl groups: effect of the boryl group on the nonradiative decay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 6333 ~ 6341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1SC00827G	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 Murakami Masamoto, Kawakami Ryosuke, Niko Yosuke, Tsuda Teruko, Yatsuzuka Kazuki, Mori Hideki, Imamura Takeshi, Sayama Koji	4. 巻 102
2. 論文標題 New fluorescent three-dimensional and deep-imaging technique confirms a direct relationship between the acrosyringium and vesicles/pustules of palmoplantar pustulosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 130 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2021.03.004	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 Takezaki Minami, Kawakami Ryosuke, Onishi Shozo, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, Imamura Takeshi, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke	4. 巻 31
2. 論文標題 Integrated Fluorescent Nanoprobe Design for High Speed In Vivo Two Photon Microscopic Imaging of Deep Brain Vasculature in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2010698 ~ 2010698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adfm.202010698	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 革新的バイオイメージングが拓く次世代がん微小転移研究と診断・治療応用
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 革新的生体光イメージング求術の医学・生物学応用
3. 学会等名 第62回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村健志
2. 発表標題 蛍光イメージングの医学研究・医療応用とAIの導入
3. 学会等名 第73回西日本泌尿器科学会総会
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	川上 良介  (Kawakami ryosuke)  (40508818)	愛媛大学・医学系研究科・准教授   (16301)	
研究 分担者	齋藤 卓  (Saitou Takashi)  (60588705)	愛媛大学・医学系研究科・講師   (16301)	

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			
スウェーデン	ウプサラ大学			
その他の国・地域	Academia Sinica (Taipei)			