

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K17081

研究課題名（和文）プロテオームとミネラルームを統合した石灰化解析イメージング法の開発

研究課題名（英文）Development of the imaging analysis method for calcification with the combination of proteome and mineralome.

研究代表者

逸見 晶子 (Henmi, Akiko)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：40613055

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：組織切片を用いて、組織を構成するタンパク質の分布とミネラルの分布を同時に可視化する研究手法は知られていない。ラット脛骨の成長板軟骨を対象に、エネルギー分散型X線分析でカルシウム、リンおよび炭素の分布と濃度を分析した切片を用いて、タンパク質であるII型コラーゲンに対する抗体による蛍光抗体免疫染色を施し、カルシウム、リンおよび炭素とII型コラーゲンの分布を可視化する実験の方法と条件を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨、石灰化軟骨、歯などの組織はタンパク質の他に、カルシウムやリンなどのミネラルが大切な構成成分となる。今まで、組織切片でタンパク質を可視化する研究手法とミネラルを可視化する研究手法はそれぞれ利用されてきたが、この研究では、今まで不可能であったタンパク質とミネラルの分布を同時に可視化できる研究手法を初めて開発した。生体内におけるタンパク質とミネラルの相互作用の研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The present study was designed to develop the imaging analysis method for calcification with the combination of proteome and mineralome. In preparation for the development of the analysis method, we determined whether the combination of scanning electron microscopy (SEM) with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and immunostaining would visualize the mineral and protein distribution in the same histological sections. Paraffin sections of fixed rat hindlimbs were processed for SEM-EDX and subsequently for immunofluorescence staining. The localization of calcium, phosphorus, and carbon with type II collagen could be visualized in the same region of calcified growth plate cartilage on the same section. The combination of SEM-EDX and immunostaining is effective for visualizing mineral and protein distribution in the same histological sections. The outcome of the research was reported in Journal of Oral Biosciences 64(4):461-464.

研究分野：口腔組織発生学

キーワード：石灰化 SEM-EDX 骨 軟骨 II型コラーゲン 免疫染色 質量顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者のこれまでの研究は、硬組織の発生成長や修復の過程で、基質を構成するタンパクがミネラルと相互作用し、石灰化を進行させる可能性を示してきた。基質の多様なタンパク構成(プロテオーム)とミネラル構成(ミネラローム)が同時に可視化できれば、両者の相互作用と石灰化の理解は深まるが、その研究技術は現在まで得られていない。

2. 研究の目的

本研究計画は、タンパク-ミネラル相互作用を解析する研究基盤として、プロテオームを可視化する質量分析イメージング法とミネラロームを可視化するエネルギー分散型 X 線分析 (SEM-EDX) イメージング法を統合し、両者を同時に可視化する石灰化解析イメージング法を開発することを目的とした。プロテオーム解析によるタンパク構成の可視化の前段階として、ラットの下肢骨成長板軟骨を検討の対象とし、軟骨基質のタンパクの分布については蛍光抗体法による免疫染色を利用し、SEM-EDX で可視化した下肢骨の成長板軟骨におけるカルシウムとリンおよび炭素の元素分布データと蛍光抗体法で可視化した II 型コラーゲンの分布データを統合する技術を開発することとした。

3. 研究の方法

生後 2 週齢ラットを 4%パラホルムアルデヒドで大動脈から灌流固定し、下肢を摘出して非脱灰でパラフィン包埋し試料とした。実験動物の取り扱いについては、東北大学における動物実験に関する指針に則った。厚さ 5 μm のパラフィン切片をミネラルの構成元素であるカルシウムとリンおよび有機質の構成元素である炭素の軟骨基質における分布と濃度について SEM-EDX (走査電子顕微鏡によるエネルギー分散型 X 線分析) を利用して解析した。また、軟骨基質のタンパクの分布については、SEM-EDX 解析した切片を用いて、抗 II 型コラーゲン抗体の FITC 標識二次抗体を利用した蛍光抗体法による免疫染色を施し、II 型コラーゲンの分布を可視化した。SEM-EDX で可視化した下肢骨の成長板軟骨におけるカルシウムとリンおよび炭素の元素分布データと蛍光抗体法で可視化した II 型コラーゲンの分布データを統合し、検討した。

4. 研究成果

SEM-EDX で可視化した下肢骨の成長板軟骨におけるカルシウム (Ca) とリン (P) および炭素 (C) の元素分布データと蛍光抗体法で可視化した II 型コラーゲンの分布データを統合する技術を開発した。II 型コラーゲンが高濃度に分布する領域に炭素濃度が高く、低濃度の領域でカルシウムとリンの濃度が高い傾向が認められた。研究成果を論文としてまとめ、Journal of Oral Biosciences 64(4):461-464 に発表した。結果の画像を下記に示す。

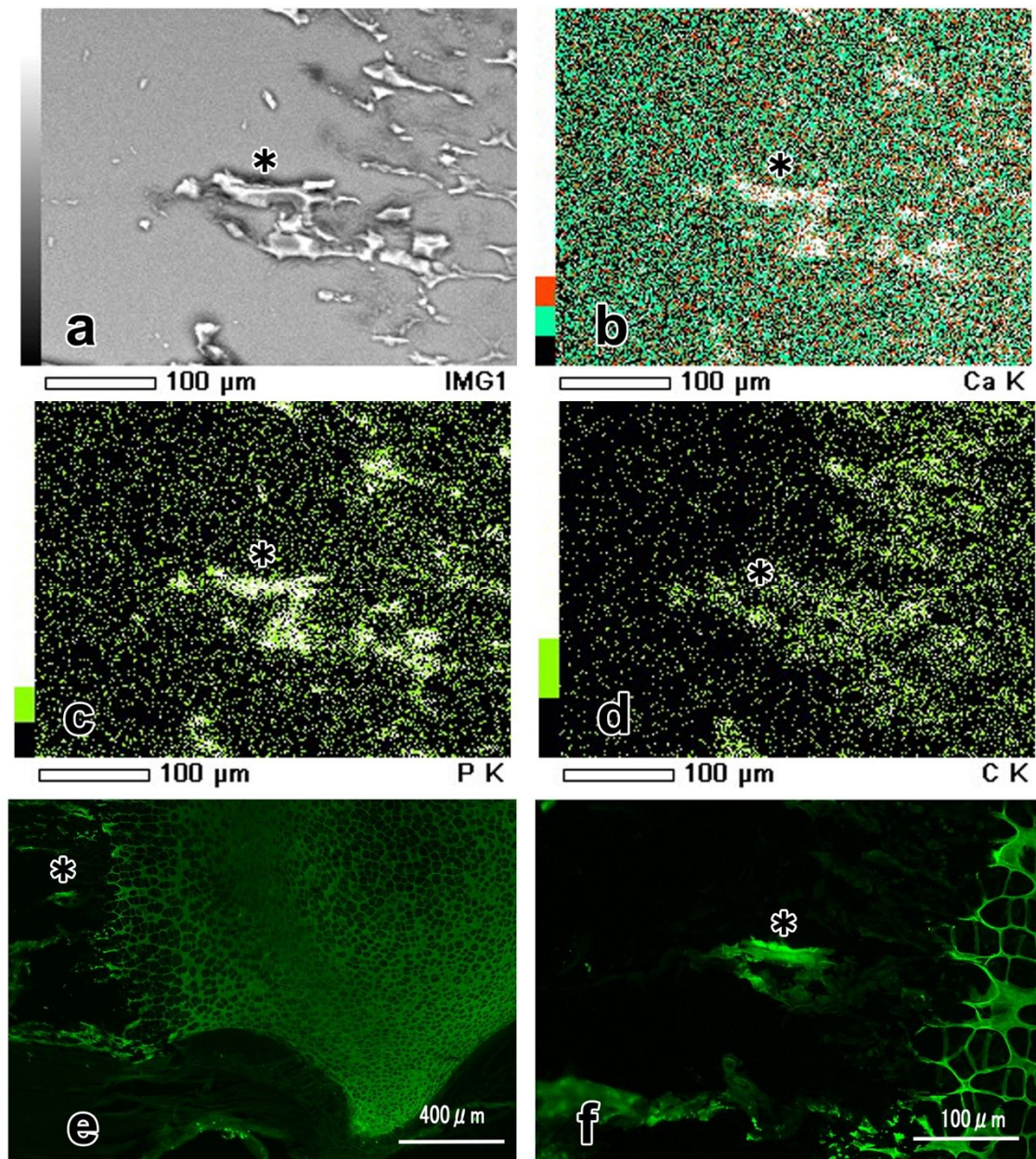


図1) 走査電子顕微鏡(SEM)反射電子像(a)で示すラット脛骨成長板のSEM-EDXによる元素マッピングで、カルシウム(b)とリン(c)が軟骨に集積し、石灰化が認められた。炭素(d)の集積する範囲はカルシウムとリンに比べるとより広く、軟骨全体に分布することが認められた。II型コラーゲンは、成長板を含む軟骨全体に見られた(e)。カルシウム(b)とリン(c)が集積していた軟骨(*)にもII型コラーゲンの免疫反応が見られた。

Mayanagi M, Nakamura M, Henmi A, Sasano Y (2022) The visualization of the mineral and protein distribution in the same histological sections of rat calcified growth plate cartilage. *Journal of Oral Biosciences* 64(4):461-464. doi:10.1016/j.job.より転載。

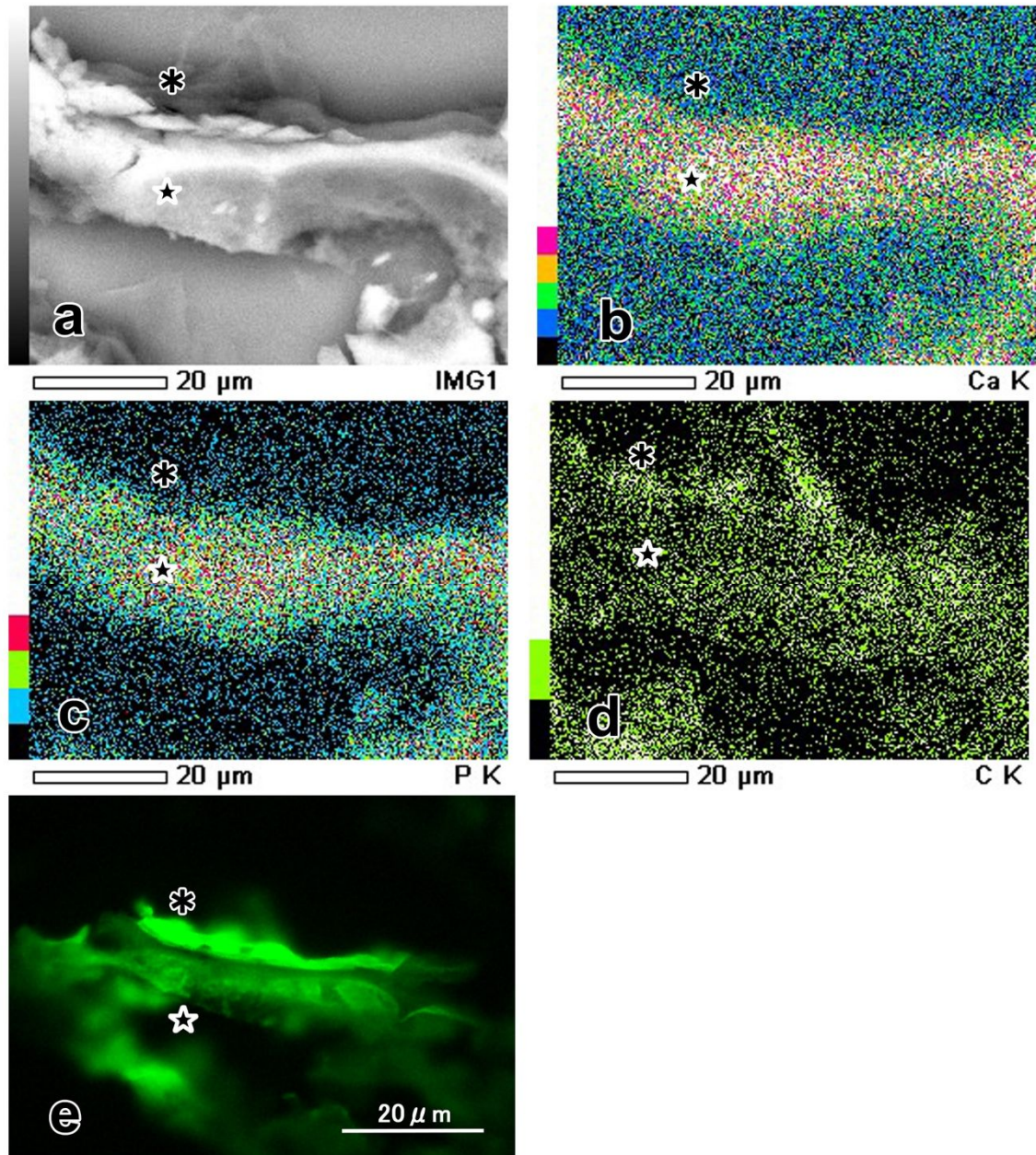


図2) 図1(a)で*で示した成長板軟骨のSEM 反射電子像の強拡大(a)。カルシウム(b)とリン(c)の元素は均一の濃さで同様に集積されていたが、炭素(d)は広い範囲に、不均一に分布していた(e)。炭素の元素集積が豊富な領域は、II型コラーゲンの免疫染色性の高い領域に一致していた(e)。

*と ☆ はそれぞれ、同一切片の同一部位を示す。

Mayanagi M, Nakamura M, Henmi A, Sasano Y (2022) The visualization of the mineral and protein distribution in the same histological sections of rat calcified growth plate cartilage. *Journal of Oral Biosciences* 64(4):461-464. doi:10.1016/j.job.より転載。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 1件）

1. 著者名 Mayanagi Miyuki, Nakamura Megumi, Henmi Akiko, Sasano Yasuyuki	4. 巻 64
2. 論文標題 The visualization of the mineral and protein distribution in the same histological sections of rat calcified growth plate cartilage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 461 ~ 464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.08.005	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 笹野泰之、中村 恵、逸見晶子、大方広志、真柳みゆき	4. 巻 54
2. 論文標題 分析走査電子顕微鏡を用いた硬組織の石灰化の進行と成熟過程の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 144-148
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 -
1. 著者名 Sasano Yasuyuki, Nakamura Megumi, Henmi Akiko, Okata Hiroshi, Suzuki Osamu, Kayaba Atsuko, Mayanagi Miyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Degradation of extracellular matrices propagates calcification during development and healing in bones and teeth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 149 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2019.07.004	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 Otake Yoshio, Nakamura Megumi, Henmi Akiko, Takahashi Tetsu, Sasano Yasuyuki	4. 巻 Nov 21 8(1)
2. 論文標題 Experimental Comparison of the Performance of Cutting Bone and Soft Tissue between Piezosurgery and Conventional Rotary Instruments	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35295-6	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笹野泰之、中村恵、逸見晶子、大方広志、鈴木治、真柳みゆき
2. 発表標題 硬組織石灰化進行過程の分析走査電子顕微鏡による元素イメージング解析。
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学会総会・学術集会 シンポジウム 「分子組織細胞化学の最前線と未来への展望」Web開催（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹野泰之、逸見晶子、大方広志、中村恵、鈴木治
2. 発表標題 発生・修復に伴う硬組織石灰化の元素イメージン
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会 ワークショップ「組織化学イメージングで探る硬組織の細胞機能」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹野泰之、逸見晶子、真柳みゆき
2. 発表標題 質量分析イメージングにおける硬組織試料作製法の検討と歯胚に局在する脂質分子の探索
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------