

令和元年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19750

研究課題名(和文) 歯根膜細胞の分化過程におけるナノレベル元素分析と局在構造解析

研究課題名(英文) Nano-scale observation of differentiating periodontal ligament cells

研究代表者

村上 伸也(Murakami, Shinya)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：70239490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：生きたままの骨芽細胞(骨を作る細胞)が、骨の素となる小胞(基質小胞)を細胞内で形成・分泌する過程を、走査電子誘電率顕微鏡という新しい顕微鏡技術を用いて生細胞のままナノレベルで観察することに成功し、細胞内で形成された基質小胞が、細胞内の不要物を分解するリソソームを使って運搬され、細胞外に分泌されることを世界で初めて明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、骨や歯といった硬組織形成の基本的なメカニズムに関する理解が深まり、骨粗鬆症や歯周病等の硬組織疾患の病態解明や治療法の開発につながることを期待されます。さらに、今回観察に用いた誘電率顕微鏡は培養細胞のみならず、様々な微小物質を溶液中で直接観察することが可能であり、今後も様々な分野での応用が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Mineralization is predominantly mediated by osteoblasts, which secrete mineral precursors, most likely through matrix vesicles (MVs). Here, we utilize field emission-scanning electron microscopy-based scanning electron-assisted microscopy for assessing live osteoblasts in mineralizing conditions at a nano-level resolution. We found that the calcium-containing vesicles were multivesicular bodies containing MVs. They were transported via lysosome and secreted by exocytosis.

研究分野：歯周病学

キーワード：骨芽細胞 基質小胞 走査電子誘電率顕微鏡 ナノレベル リソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯周組織の恒常性維持機構を理解し、予知性の高い歯周組織再生療法を開発するためには、歯根膜中の歯根膜細胞が骨芽細胞へと分化し、骨芽細胞が石灰化物を分泌する過程の詳細を明らかにすることが必要である。

我々は、ラマン分光イメージング法を導入した培養歯根膜細胞解析にいち早く挑み、歯根膜細胞による極微小石灰化フィールドの検出に成功し、従来法では観察が出来なかった硬組織形成の初期過程観察の基盤技術を開発することが出来、フォトリソ研究と歯周病研究の融合に貢献した (Hashimoto *et al.*, *Sci Rep*, 2015, Hashimoto *et al.*, *J Raman Spectrosc*, 2014)。しかしながら、生細胞を対象とするこの方法のみでは、数十マイクロオーダーでの相互作用評価が限界であり、ナノレベルでの微細な構造解析は達成不可能である。そのため、本分野での新たな探索的技術開発が期待されていた。

一方、近年の顕微鏡技術の革新は著しく、溶液中のナノ材料、生物試料をそのまま溶液中で観察する走査型電子顕微鏡技術として、新規誘電率顕微鏡が開発されてきた (Okada and Ogura, *Sci Rep*, 2016)。本手法は大気圧観察ホルダーを用い、溶液中の生体試料を高圧の窒化シリコン極薄膜セルに封入することで高真空状態でも溶液状態を維持することが可能であり、かつセル上部に重金属であるタングステン薄膜層を形成することで入射電子を吸収させ、そこから生じる2次的な物理線特性、つまり電子線により生じる水と生体試料の比誘電率の電位変動を利用することで電子線損傷なく、高コントラストかつナノレベルで対象物の実像観察を可能にすると期待されている。そこで我々は、誘電率顕微鏡を用いて従来は不可能と考えられてきた培養細胞の生きたままの状態でのナノレベル観察を行い、石灰化初期過程の詳細を明らかにする挑戦的研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、溶液中に存在する生体試料を、常温常圧下においてナノレベルで観察することができる高分解能誘電率顕微鏡を用いて、石灰化初期過程の詳細を可視化し、その全容を理解することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 走査型誘電率顕微鏡による培養骨芽細胞の形状構造観察

骨芽細胞株 KUSA-A1 (Umezawa *et al.*, *J Cell Physiol*, 1992) および申請者の研究室にて樹立した硬組織形成能を有する歯根膜細胞株 MPDL22 (Yamada *et al.*, *J Biol Chem*, 2007) が窒化シリコン極薄膜上で石灰化誘導用培地 (グリセロリン酸およびアスコルビン酸含有-MEM) を用いて培養可能かどうかについて、窒化シリコン極薄膜窓を持つ培養ディッシュを用いて検討を行った。ついで、同条件にて培養細胞を窒化シリコン極薄膜上で培養し、接着した細胞を測定セルに培養液とともに封入し、走査型誘電率顕微鏡に設置し、溶液状態を維持したままナノスケール観察を行った。

### (2) 走査型誘電率顕微鏡による石灰化初期培養骨芽細胞の経時的観察

(1)にて設定した条件にて骨芽細胞の分化過程における細胞内微粒子の形状を詳細に観察し、その粒径について画像解析するとともに、同粒子の形成過程を観察した。

### (3) 骨芽細胞分化過程における微細元素分析並びにラマンイメージング

(1)にて設定した条件にて骨芽細胞の分化過程を形状観察し、かつ微細元素分析法を用いて分化過程での石灰化ノジュール形成を極初期～未成熟～成熟過程でのカルシウム、リン等の元素の同定を試みた。すなわち、走査型誘電率顕微鏡による石灰化過程の観察評価に加え、エネルギー分散型X線分光法により電子線照射で発生する元素特有の特定X線をエネルギーで分光することで得られる構成元素情報を組み合わせ、歯根膜細胞が分化する過程での石灰化構成元素をナノレベルで解析した。さらに溶液中の有機物の評価に有用であるラマンイメージング法を駆使することで、歯根膜細胞中に存在するタンパク質及び脂質の相互作用状態を詳細に評価した。

### (4) 基質小胞の分泌過程におけるリソソームの役割の検討

リソソーム中のATPase阻害剤であるBafilomycinA1を用いて、骨芽細胞内の基質小胞形成・分泌過程にリソソームが担う機能について検討した。評価は誘電率顕微鏡を用いた観察および溶液中でのアリザリンレッドS染色を行った。

## 4. 研究成果

(1) マウス骨髄間質細胞である KUSA-A1 細胞を用いて、同細胞が高分解能誘電率顕微鏡観察に必要な窒化シリコン極薄膜上で培養可能であること、石灰化誘導用培地を用いた骨芽細胞への分化誘導が可能であることを確認した (図1)。さらに誘電率顕微鏡観察を行い、細胞内小器官の高コントラスト撮影を実現した (図2)。ついで、4-10日目に高分解能誘電率顕微鏡観察を行ったところ、誘導群においてのみ、粒子の形成が観察された (図3)。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

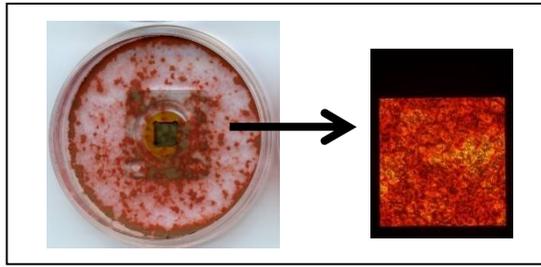


図 1：シリコン薄膜上で分化誘導した骨芽細胞のアリザリンレッド S 染色像

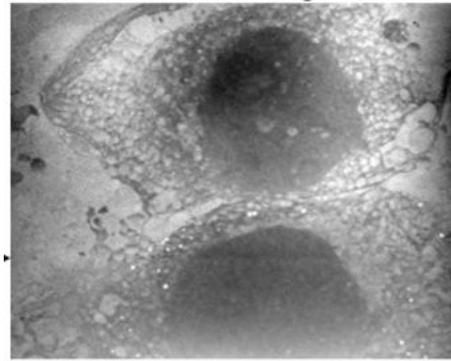


図 2：培養骨芽細胞の誘電率顕微鏡観察像

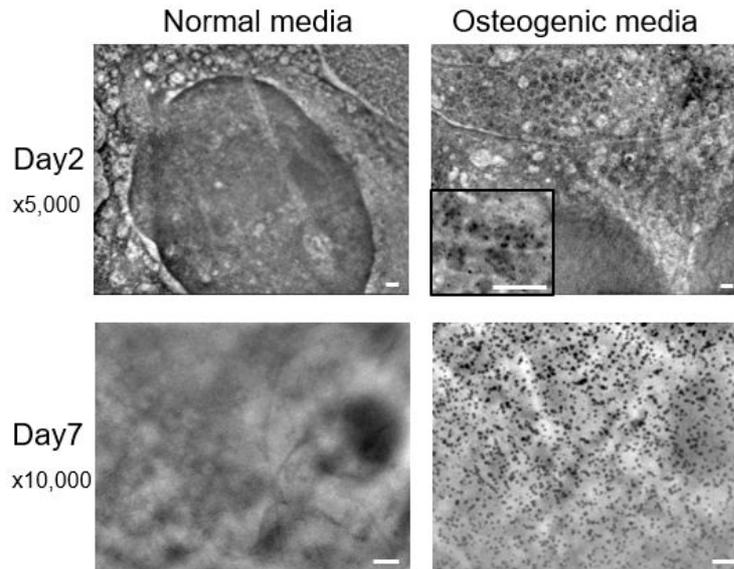


図 3：通常培地（左側）および石灰化誘導培地（右側）で培養した骨芽細胞の誘電率顕微鏡観察像、2 日目（上段）および 7 日目（下段）

- (2) 同顆粒の詳細な解析により、誘導群にみられる粒子は 4-320nm（中央値 90nm）であり、その大きさは経時的に増加していた（図 4）。これは石灰化過程において中心的な役割を果たす基質小胞の大きさについての報告と一致しており、観察された粒子が基質小胞であることが示唆された。観察された粒子が細胞内においてどのように形成されるかについて検討するために、KUSA-A1 細胞を分化誘導培地に交換後、7 時間において高分解能誘電率顕微鏡観察を行ったところ、多数の粒子が白い膜状構造物中に形成されることが明らかとなった（図 5）。同構造物の詳細な解析により、同粒子は Multivesicularbody 中に形成されることが示唆された（図 6）。

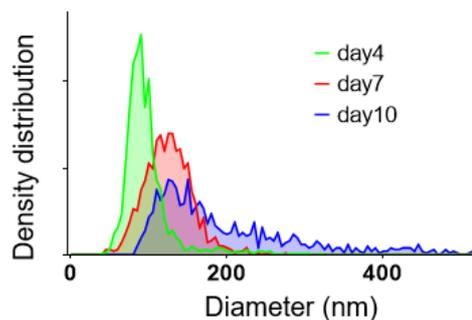


図 4：誘電率顕微鏡で観察された顆粒径の経時的な解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

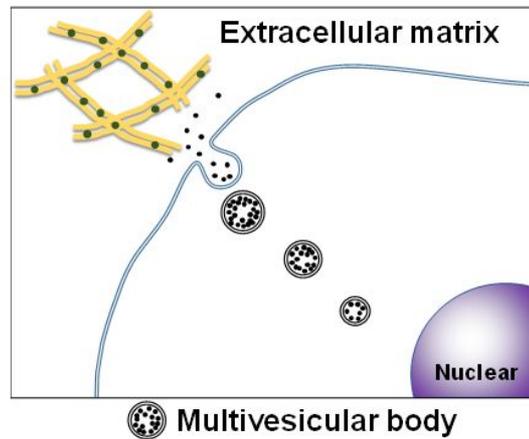
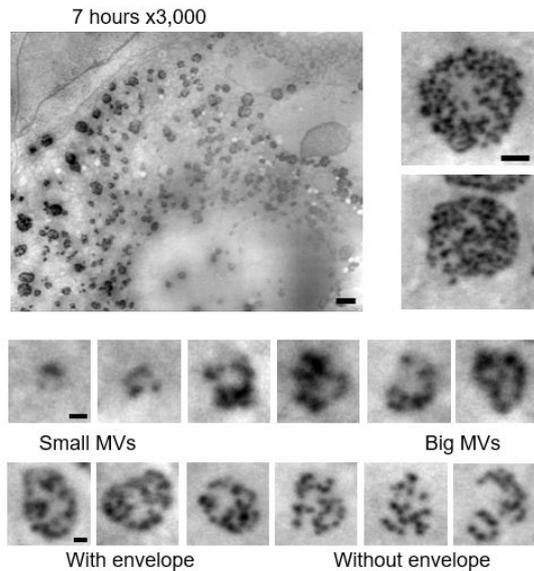


図 6 : 骨芽細胞の基質小胞分泌モデル

図 5 : 石灰化誘導 7 時間における培養骨芽細胞の誘電率顕微鏡観像 (左上) 同条件での様々な形態の顆粒 (その他)

- (3) 微細元素分析およびラマン分光イメージングにより、この粒子を詳細に解析したところ、リン酸とカルシウムを多く含み (図 7) ハイドロキシアパタイトに特有な  $960\text{cm}^{-1}$  のラマンシフトを有することが明らかとなり (図 8)、この粒子は石灰化過程において中心的な役割を果たす基質小胞であると考えられた。

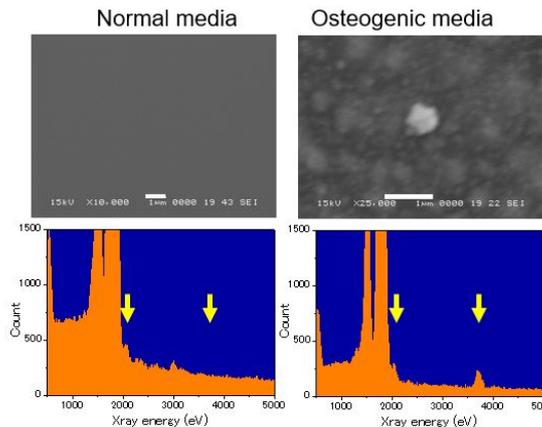


図 7 : 通常培地 (左側) および石灰化誘導培地 (右側) で培養した骨芽細胞の電子顕微鏡観像 (上段) およびエネルギー分散型 X 線分光による元素解析 (下段、リン酸およびカルシウムのピークを黄色矢印で示す)

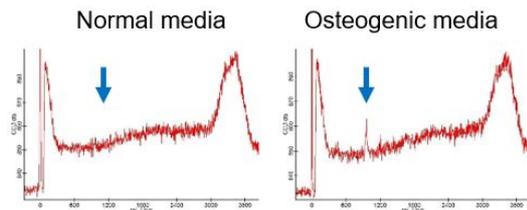


図 8 : 通常培地 (左側) および石灰化誘導培地 (右側) で培養した骨芽細胞のラマンスペクトル ( $960\text{cm}^{-1}$  のピークを青色矢印で示す)

- (4) 石灰化過程で細胞内に形成される粒子がリソソーム経路で分泌されているかどうかを検討するために、リソソーム中の ATPase 阻害剤である BafilomycinA1 を骨芽細胞分化誘導培地中に添加して同様の観察を行ったところ、BafilomycinA1 処理群では粒子が観察されず (図 9)、アリザリンレッド S 染色陽性の石灰化ノジュール形成が見られなかった (図 10)。このことから、骨芽細胞内に形成される同粒子はリソソーム経路で分泌されることが示唆された。

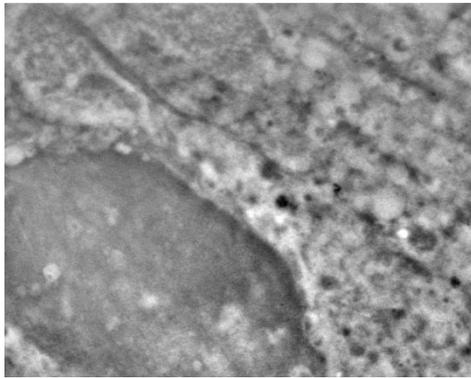


図 9 : 50nM BafilomycinA1 含有石灰化誘導培地で培養した骨芽細胞の誘電率顕微鏡観察像

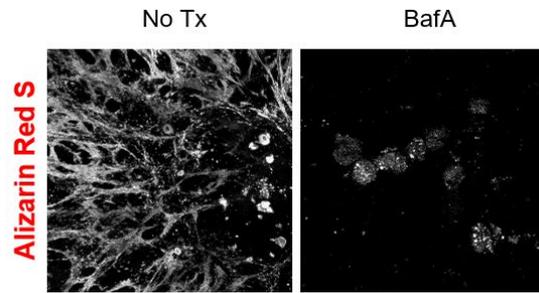


図 10 : 50nM BafilomycinA1 含有 (右側) もしくは非含有 (左側) 石灰化誘導培地で培養した骨芽細胞のアリザリンレッド S 染色像 (非固定・溶液中・共焦点レーザー顕微鏡像)

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) T. Iwayama, T. Okada, T. Ueda, K. Tomita, S. Matsumoto, M. Takedachi, S. Wakisaka, T. Noda, T. Ogura, T. Okano, P. Fratzl, T. Ogura, S. Murakami, Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization, **Science Advances** (2019) in press. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 岩山 智明、竹立 匡秀、村上 伸也 ; 非侵襲的イメージング法による骨芽細胞の石灰化機構解明、第 3 回口腔医科学フロンティア研究会、2018 年 3 月 5 日、徳島
- (2) 岩山 智明、上田 亜美、富田 貴和子、松本 修治、竹立 匡秀、村上 伸也 ; 走査電子誘電率顕微鏡による基質小胞を介した石灰化過程の解明、第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会、大阪、2018 年 10 月 27 日、大阪

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

竹立 匡秀 (TAKEDACHI, Masahide)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号 : 60452447

岩山 智明 (IWAYAMA, Tomoaki)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号 : 80757865

### (2) 研究協力者

小椋 俊彦 (OGURA, Toshihiko)

岡田 知子 (OKADA, Tomoko)

小倉 卓 (OGURA, Taku)

Peter Fratzl

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。