

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670883

研究課題名(和文) ラマン分光法による極微小石灰化フィールドの非侵襲性探索

研究課題名(英文) Raman imaging of osteoblastic mineralization

## 研究代表者

村上 伸也 (Murakami, Shinya)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70239490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、硬組織形成細胞の分化過程をラマン分光法を用いて非侵襲・経時的に解析した。マウス骨芽細胞KUSA-A1を分化誘導する過程でhydroxyapatite (HA)に帰属するラマンシグナルを経時的・特異的に検出する系を確立した。さらに、高い時間分解能で観察した結果から、HAの集積する部位には、その集積に先立ちベータカロテンに帰属するラマンシグナルが検出されることが明らかとなった。本研究結果により、多くの生体分子が関与する石灰化の過程を非侵襲・経時的にラマン分光イメージングによって検出が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we observed osteoblast differentiation utilizing time-lapse Raman imaging non-invasively. We established the methods to observe and visualize the hydroxyapatite (HA) on the differentiating mouse osteoblast cell line, KUSA-A1 by Raman imaging. This method demonstrated that Raman imaging visualized the HA spot more specifically than Alizarin red S staining. In addition, time-resolved Raman imaging analysis revealed that HA was triggered to generate in which beta-carotene had been detected. The osteoblastic differentiation in KUSA-A1 was tracked by Raman imaging non-invasively, thus these observations demonstrated for the first time by Raman imaging. And it was proven that Raman imaging was the powerful for non-invasive analysis of the molecules involved in the complicated process of osteoblast differentiation.

研究分野：歯周病学

キーワード：ラマン分光法 歯根膜細胞 極微小石灰化ノジュール 非侵襲性観察

1. 研究開始当初の背景

多様な亜集団により構成される歯根膜細胞は、セメント芽細胞や骨芽細胞への分化能を有する細胞群と考えられている。しかしながら、その分化過程の経時的な詳細を、single cell レベルで *in vitro* にて解析する術を、我々はこれまで持ち得なかった。

近年、水溶液中で測定が可能で、固体・液体などの試料を問わず、非侵襲・非接触で物質の評価を行えるラマン分光法に注目が集まっている。同法は物質にレーザーを照射し、散乱される光を分光器によって観測する分析法であり、得られたスペクトルより物質の評価を行うものである。骨芽細胞株 KUSA-A1 を用いて予備実験を繰り返したところ、ラマン分光法で用いられる石英基盤上で KUSA-A1 の分化誘導が可能であること、ラマンシフト  $960\text{cm}^{-1}$  で明瞭な石灰化ノジュールのラマンスペクトルの検出が可能であることが確認された。すなわち様々な極微量物質の分析が可能であるラマン分光法を用いることにより、歯根膜細胞の分化過程を single cell レベルで非侵襲・経時的に観察し、極微小環境における硬組織形成関連分子の発現・局在の変化を観察する方法を確立することが、理論上可能であると示唆されていた。

2. 研究の目的

非侵襲・非接触で微量物質の評価が行えるラマン分光法を培養細胞に適用し、硬組織形成細胞への分化過程を single cell レベルにて非侵襲・経時的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞分化誘導

マウス骨芽細胞株 KUSA-A1 細胞を 10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アスコルビン酸、10% FCS 含有  $\alpha$ -MEM にて培養し、3 日毎に培地交換を行った。

(2) ラマン分光法による生細胞観察

ラマン分光測定に用いる試料組織は、自家蛍光が少ない石英ガラスディッシュ上で培養した。培養培地からもラマン散乱や蛍光は生じるため、ラマン分光測定時には、培地を緩衝タイロード溶液(Tyrode's solution)に置換した。タイロード溶液は、脱イオン蒸留水に、NaCl 150 mM, glucose 10 mM, Hepes 10 mM, KCl 4.0 mM,  $\text{MgCl}_2$  1.0 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.0 mM, NaOH 4.0 mM を添加して調製した。ラマン分光測定の励起光には、532 nm レーザー光を使用した。励起レーザー光は、シリンドリカルレンズによってライン状に整形し、水浸対物レンズにより試料面に集光した。ライン状に発生したラマン散乱光は、同対物レンズにより取り込んだのち、532 nm よりも長波長光を透過するロングパスフィルターを通過後、分光器の入射スリット(幅 50  $\mu\text{m}$ )にて結像させ、その後、分光器の 600-grooves/mm 回折格子で分光し、2 次元

CCD カメラにより検出した。試料面におけるライン状レーザー光の走査は、ガルバノメーターミラーを用いて行った。

4. 研究成果

(1) ラマン分光法による骨芽細胞分化過程の経時的観察

KUSA-A1 細胞を石灰化誘導培地にて培養すると、培養 3 日後にはアリザリンレッド染色陽性像が観察されたため、誘導開始直後から 3 日後までを経時的にラマン分光法にて観察し、生細胞上に集積する HA の非侵襲的な検出を試みた。予備実験の結果から、波数  $958\text{cm}^{-1}$  にて HA を特異的に検出できることを発見したため(図 1)、生細胞における同ラマンスペクトルを経時的に解析すると、誘導開始直後から培養 1 日目まではシグナルが検出されなかったものの、培養 2 日目から培養 3 日目において  $958\text{cm}^{-1}$  にて増幅するシグナルを検出することができた。このことは、経時的かつ非侵襲的に骨芽細胞の石灰化過程を観察することに成功したことを示唆している(図 2)。

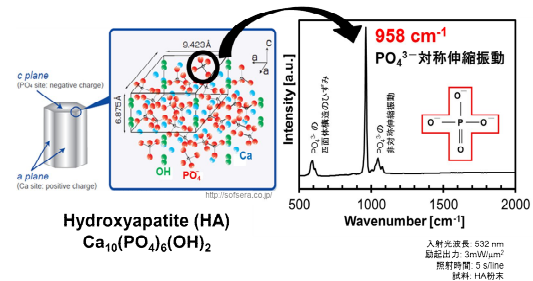


図 1. ラマンイメージングによる hydroxyapatite の可視化

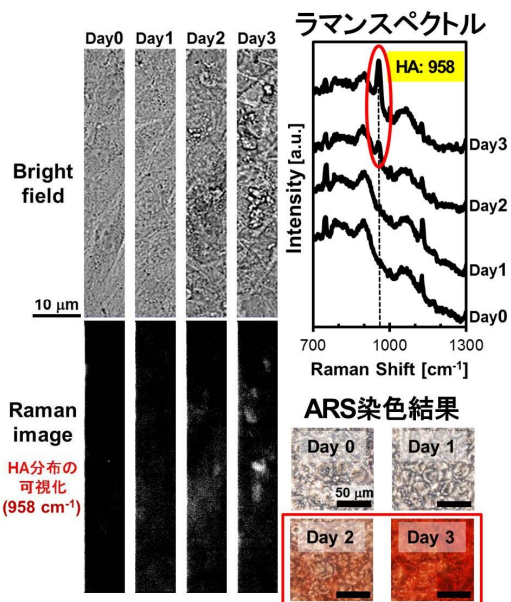


図 2. KUSA-A1 細胞の石灰化誘導過程における hydroxyapatite の観察

## (2) ラマン分光法による HA 像とアリザリンレッド染色の比較

培養細胞のラマン分光法にて検出された HA 像とアリザリンレッド染色にて得られた像の同一部位を画像解析すると、ラマン分光法によるイメージング部位はアリザリンレッド染色に比べ、より特異的に HA を検出していることが明らかとなった(図3)。

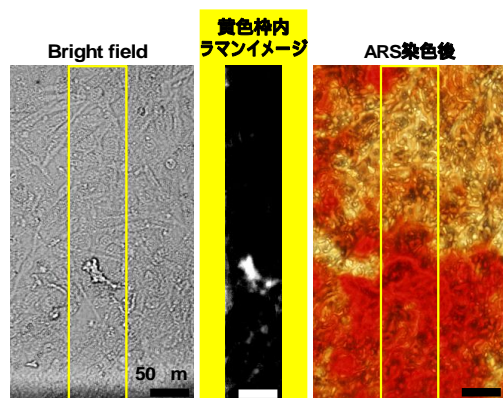


図 3. ラマンイメージングにおける hydroxyapatite とアリザリンレッド染色像との比較

## (3) 時間分解能向上への取り組み

(1)にて得られたラマン分光法の HA 像より、さらに高い時間分解能での KUSA-A1 細胞の硬組織形成細胞への分化過程解析を試みた。最初に、培養中の同一微小部位における数時間毎のラマン分光測定を可能にするような測定条件の検討を行なった。その結果、測定に用いるレーザー光の強度を  $1.5 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ 、照射時間を  $1.5 \text{ s/line}$  とすると、30 分毎に同一部位のラマン分光測定を行うことが出来、かつ細胞形態に異常がないことが判明した。また細胞形態に異常がないことは取得したラマンスペクトルに変化がないことでも確認された。すなわち、上記条件による数時間毎の非侵襲ラマン分光測定が可能であることが明らかとなった。

## (4) 骨芽細胞分化過程におけるラマン分光法によるベータカロテンの検出

KUSA-A1 細胞を石灰化誘導培地にて培養し、培養 5 日目から培養 6 日目において同一部位に対して 4 時間毎に(3)にて得られた観察条件にてラマン分光測定を行なった。その結果、初期には HA のシグナルが検出されなかったが、石灰化促進物質の 1 つとして知られるベータカロテンに帰属するラマンシグナルが波数  $1008$ 、 $1160$  および  $1526 \text{ cm}^{-1}$  において検出された。その後、カロテンのシグナルは消失したが、カロテンの局在した位置の周辺において HA が集積されていく様子が観察された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Aya Hashimoto, Liang-da Chiu, Keigo Sawada, Tomohiko Ikeuchi, Katsumasa Fujita, Masahide Takedachi, Yoshinori Yamaguchi, Satoshi Kawata, Shinya Murakami, Eiichi Tamiya: In situ raman imaging of osteoblastic mineralization. Journal of Raman Spectroscopy、査読有、45、2014、157-161

〔学会発表〕(計 7 件)

Aya Hashimoto, Liang-da Chiu, Chiaki Morimoto, Katsumasa Fujita, Masahide Takedachi, Yoshinori Yamaguchi, Satoshi Kawata, Shinya Murakami, Eiichi Tamiya: Time-lapse analysis of osteoblastic differentiation with Raman imaging、第 62 回国際歯科研究学会日本部会、2014 年 12 月 5 日、KKR ホテル大阪(大阪府 大阪市)

Aya Hashimoto, Liang-da Chiu, Tomohiko Ikeuchi, Katsumasa Fujita, Masahide Takedachi, Yoshinori Yamaguchi, Satoshi Kawata, Shinya Murakami, Eiichi Tamiya: Temporal observation of osteoblastic mineralization by Raman imaging、第 75 回応用物理学会秋季学術講演会 JSAP-OSA Joint Symposia、2014 年 9 月 18 日、北海道大学(北海道 札幌市)

橋本 彩, 邱 亮達, 森本 千晶, 池内 智彦, 藤田 克昌, 竹立 匡秀, 山口 佳則, 河田 聡, 村上 伸也, 民谷 栄一: ラマンイメージングによる骨芽細胞石灰化過程のリアルタイム解析、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 9 月 11 日、岡山大学(岡山 県岡山市)

橋本 彩, 邱 亮達, 沢田 啓吾, 池内 智彦, 藤田 克昌, 竹立 匡秀, 山口 佳則, 河田 聡, 村上 伸也, 民谷 栄一: ラマンイメージングによる石灰化過程の経時的観察、第 61 回応用物理学会春季学術講演会、2014 年 3 月 19 日、青山学院大学(神奈川県 相模原市)

Aya Hashimoto, Liang-da Chiu, Keigo Sawada, Tomohiko Ikeuchi, Katsumasa Fujita, Masahide Takedachi, Yoshinori Yamaguchi, Satoshi Kawata, Shinya Murakami, Eiichi Tamiya: Time-lapse Raman imaging of osteoblastic mineralization、Japan-Taiwan Bilateral Conference (Biomedical and Plasmonic Imaging)、2014 年 2 月 26 日、National University、Taipei (Taiwan)

Aya Hashimoto, Liang-da Chiu, Keigo Sawada, Tomohiko Ikeuchi, Katsumasa Fujita, Masahide Takedachi, Yoshinori Yamaguchi, Satoshi Kawata, Shinya Murakami, Eiichi Tamiya: Raman Imaging of Osteoblastic Mineralization 、 7<sup>th</sup> International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy、2013年8月26日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)(ポスター賞受賞)(査読あり)

Aya Hashimoto, Yoshinori Yamaguchi, Eiichi Tamiya: Raman imaging of hydroxyapatite in osteoblasts 、 AsiaStudent Photonics Conference 2013、2013年7月25日、大阪大学(大阪府吹田市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：70239490

### (2) 研究分担者

山口 佳則 (YAMAGUCHI YOSHINORI)  
大阪大学・大学院工学研究科・招聘教授  
研究者番号：20386634

北垣 次郎太 (KITAGAKI JIROUTA)  
大阪大学・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：90570292

竹立 匡秀 (TAKEDACHI MASAhide)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：60452447