

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293419

研究課題名(和文) コラーゲンNANOモデル解析による骨改造の新たな機序の探索

研究課題名(英文) Search for new mechanism of bone remodeling by the collagen nano-model analysis

研究代表者

上岡 寛 (KAMIOKA, HIROSHI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80253219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨は力学的な強度を保ちつつ、軽さも兼ね備えている。どのようにしてこうした構造を獲得したか検討するためには、骨組織の形成・改造を担っている細胞とそれらが形成した骨基質を同時に、かつ3次元的に観察することが必要となってくる。しかし、細胞はマイクロ単位の大きさであるのに対して、骨組織の微細構造を形成しているコラーゲン線維はナノ単位の大きさであることから、観察範囲と解像感との間にトレードオフの問題が生じていた。その問題を解決するために、近年開発された直交配置型FIB-SEMを用いて、骨系細胞のネットワークをマイクロレベルで観察し、さらにコラーゲン線維をナノレベルで3次元解析し両者の関係を解析した。

研究成果の概要(英文)：Osteocytes form the cellular network by their long processes and act as mechanosensory cells in bone. However, it is unknown how this cellular network is formed and what kind of factors influence the network formation. Focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM) has increasingly found use in biological research. The main application is in the acquisition of three-dimensional data by tomography. We therefore reconstructed three-dimensional images of the osteocyte network as well as the collagen fibrils during bone modeling. Based on the positional relationships of osteocytes and collagen fibrils, we analyzed the influence of the collagen bundle formation on the osteocyte network formation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：コラーゲン線維 骨 骨細胞 骨芽細胞 3次元解析

1. 研究開始当初の背景

骨は力学的な強度を保ちつつ、軽さも兼ね備えている。どのようにしてこうした構造を獲得したか検討するためには、骨組織の形成・改造を担っている細胞とそれらが形成した骨基質を同時に、かつ3次元的に観察することが必要となってくる。しかし、細胞はマイクロ単位大きさであるのに対して、骨組織の微細構造を形成しているコラーゲン線維はナノ単位大きさであることから、従来の方法では観察範囲と解像感との間にトレードオフの問題が生じていた。また、モデリング期の骨組織を詳細に観察した研究は多くなく、特に、モデリング期の骨組織中のコラーゲン線維の走向に関しては不明であった。一方、近年開発された直交配置型 FIB-SEM は FIB 装置と SEM 装置が直交して配置されていることで、高い分解能とコントラストをもった画像を獲得することができ、リアルセクションに適した装置であるといえる。また、一度の撮影で3次元情報をマルチスケールで捉えることが可能であり、生物系分野での応用が期待されている。

2. 研究の目的

モデリング期の骨組織中の細胞群および微細構造を同時に3次元的に観察する。生物系分野に応用されて間もない直交配置型 FIB-SEM を用いるため、染色方法の確立を行う必要がある。これまでの染色法では染色液を浸透させるため、骨組織を脱灰させることが多かったが、脱灰させると細胞群の観察が困難になる。したがって脱灰させずに染色を行うことが必要である。また、直交配置型 FIB-SEM は観察部位や方向がやや制限されてしまうため、サンプル作成の工夫が必要である。

また、骨組織中のコラーゲン線維の解析を行い、モデリング期におけるコラーゲン線維の走向や、細胞群、コラーゲン線維以外の微細

構造との関係に対して理解を深める。このとき、直交配置型 FIB-SEM で観察した画像からコラーゲン線維を抽出するためにはコントラストが十分ついていることが条件となる。

3. 研究の方法

17日齢ニワトリ胚から頭蓋骨を取り出し、固定、電子染色後、樹脂包埋した。直交配置型 FIB-SEM は観察部位や方向が制限されるため、サンプルの形状や方向を見ながら注意深く行う必要がある。成長方向を規定し、1辺25 μm の立方体領域を25nm/voxel の解像度で25nm ごとに撮影を行い、1000枚の連続画像を撮影した。その後 Amira ソフトウェアを用いて3次元立体構築を行った。さらに、ZIB actin フィラメントソフトウェアを用いて、撮影した骨組織からコラーゲン線維を自動抽出し、線維の走行本数や走行角度について解析を行った。解析は骨全体に対してだけでなく、骨表層の骨芽細胞層から骨芽細胞直下、骨中心部、深部に至るまで各層ごとに詳細に行った。

4. 研究成果

図1は直交配置型 FIB-SEM を用いて撮影したモデリング期骨組織である。(XY平面) 骨表層の骨芽細胞や骨細胞の突起、またコラーゲン線維や類骨を明瞭に観察することができた。

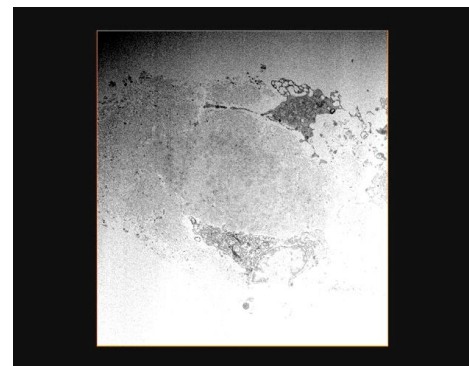


図1

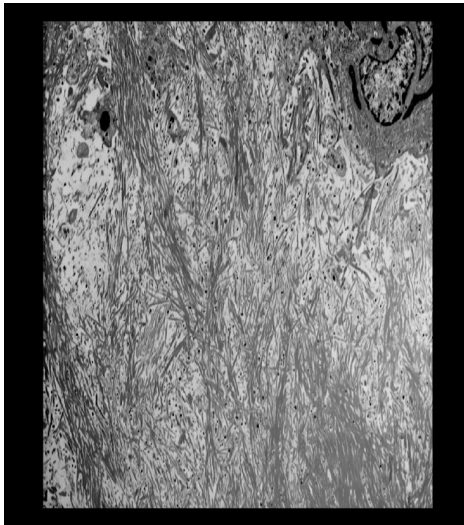


図 2

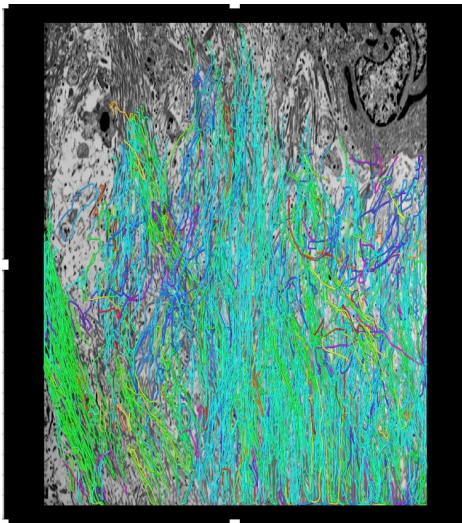


図 3

図 2 は直交配置型 FIB-SEM で撮影し 3 次元立体構築した領域の中央部の xz 平面を取り出したものである。図の右上は骨芽細胞であり、図中央には骨芽細胞から排出されたコラーゲン線維が多く認められる。図の長軸が骨の成長方向である。図 3 は図 2 の画像からコラーゲン線維を抽出し、走行角度によって色分けをしたものである。すべてのコラーゲン線維を抽出すると膨大な量になってしまうため、2000nm 以上の長さの線維のみをトレースしている。図の横軸を 0 度(180 度)と規定し、横方向に走行するコラーゲン線維は赤やピンク色で示している。したがって骨の成長方

向は 90 度と規定され、骨の成長方向に沿って走行するコラーゲン線維は青色～緑色で示している。すなわち、図 3 中央の青色で示されているコラーゲン線維は骨の成長方向に沿って走行しているということを示している。

図 4 は直交配置型 FIB-SEM で観察した領域のコラーゲン線維の走向の解析結果を表に示したものである。グラフの横軸はコラーゲン線維の走向角度を示し、縦軸は抽出したコラーゲン線維の本数を示している。解析結果から、モデリング期の骨組織においてコラーゲン線維は骨の成長方向に沿って多く走行していることがわかった。

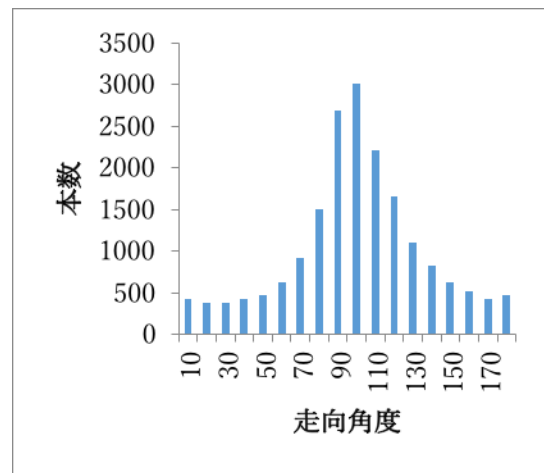


図 4

また、骨芽細胞層、骨芽細胞直下、骨中央部、骨深部とにわけてそれぞれコラーゲン線維走向の解析を行うと、骨芽細胞層ではコラーゲン線維の走向に規則性はあまりないものの、骨中央部に向かうにつれてコラーゲン線維が収束化し、さらに走向角度を変化させ、やがて骨の成長方向に沿って走行することがわかった。また、骨深部では規則性がやや乱れることもわかった。

このように直交配置型 FIB-SEM を用いることで、骨組織におけるコラーゲン線維の走向を解析することができた。今後は骨形成不全マ

ウスや骨粗鬆マウスなど、コラーゲン系の疾患をもつ動物の骨の解析を行うことで、疾患の病態や現状把握にも応用することが可能であるとする。

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 3 件)

Hosaki-Takamiya R, Hashimoto M, Imai Y, Nishida T, Yamada N, Mori H, Tanaka T, Kawanabe N, Yamashiro T, Kamioka H. Collagen production of osteoblasts revealed by ultra-high voltage electron microscopy. J Bone Miner Metab. 査読有 DOI 2015 年 10.1007/s00774-015-0692-0.

Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Naruse K, Yamashiro T. Oscillatory intracellular Ca²⁺ responses in living bone. Journal of Oral Biosciences 査読有 Vol.56 2014,49-53

[学会発表](計 9 件)

上岡 寛 超高压電子顕微鏡により明らかになった骨芽細胞のコラーゲン産生 大阪大学超高压電子顕微鏡センター医学・生物学系共同利用研究報告会招待講演 (大阪府 大阪市)、2016 年 3 月 24 日

上岡 寛 骨細胞のバイオイメージング 長崎骨粗鬆症研究会 招待講演 (長崎県 長崎市)、2016 年 1 月 27 日

橋本 真奈、長岡 紀幸、原 徹、上岡 寛 直交配置型 FIB-SEM を用いた骨組織の 3 次元的解析 第 57 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム 招待講演 (新潟県 新潟市)、2015 年 9 月 11-13 日

上岡 寛 歯が移動するために骨中で何が起きているのか? 第 58 回中四国

矯正歯科学会 教育講演 (香川県 高松市)、2015 年 7 月 12 日

上岡 寛 未脱灰骨組織超微観察の新たな目 FIB-SEM 第 3 回 SSSEM 研究会(招待講演) (山梨県 甲府市)、2015 年 3 月 24-25 日

上岡 寛 直交配置型 FIB-SEM による骨の 3 次元観察 第 56 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム(招待講演) (福岡県 福岡市)、2014 年 9 月 25 日

上岡 寛、橋本 真奈、保崎 留美子、長岡 紀幸、中村 晶子、張偉珠、原 徹 直交配置型 FIB-SEM による骨組織の観察 日本顕微鏡学会関西支部特別講演会(招待講演) (兵庫県 姫路市)、2014 年 8 月 30 日

石原 嘉人、山城 隆、上岡 寛 骨細胞のライブイメージング 第 32 回日本骨代謝学会学術大会(招待講演) (大阪府 大阪市)、2014 年 7 月 24-26 日

上岡 寛 骨芽細胞から形成されるコラーゲンの高詳細 3 次元イメージング 骨形態計測学会(招待講演) (北海道 札幌市)、2014 年 6 月 12-14 日

[図書](計 4 件)

石原 嘉人、上岡 寛、骨細胞の単離と生骨中骨細胞のバイオイメージングを用いた解析、メディカルレビュー社、骨・臓器ネットワークとオステオサイト 2016 年 2 月、22-28

上岡 寛 骨細胞、羊土社、骨ペディア 2015 年、101-104

菅原 康代、上岡 寛、歯科矯正治療における骨代謝、羊土社、骨ペディア 2015 年、264-5

上岡 寛 歯科および顎口腔疾患と骨カルシウム代謝-歯の移動と骨細胞の役

割 Clinical Calcium Vol. 25, 2015 年、
138-144.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上岡 寛 (KAMIOKA HIROSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：80253219

(2)研究分担者

亀尾 佳貴 (KAMEO YOSHITAKA)
京都大学・再生医科学研究所・
助教
研究者番号：60611431

住吉 久美 (SUMIYOSHI KUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：80625161

(3)連携研究者

原 徹 (HARA TORU)
国立研究開発法人・物質材料研究機構・
主幹研究員
研究者番号：70238161

安達 泰治 (ADACHI TAIJI)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：40243323