

令和元年6月5日現在

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2015～2018  
 課題番号：15K11003  
 研究課題名(和文) 質量分析イメージング法を用いた骨と象牙質の石灰化を抑制する基質タンパクの同定  
  
 研究課題名(英文) Identification of ECM proteins that inhibit calcification in bone and dentin using matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry  
  
 研究代表者  
 笹野 泰之 (SASANO, YASUYUKI)  
  
 東北大学・歯学研究科・教授  
  
 研究者番号：30196191  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析イメージング法の硬組織への適用は研究報告が乏しいことから、試料作製について方法論を検討した結果、4%パラホルムアルデヒド固定後、必要に応じて10%EDTA脱灰を施して凍結包埋する方法を採用した。生後3日齢ラットの上下顎を対象として、質量顕微鏡で検討した。質量電荷比  $m/z$  706および732のシグナルが歯胚における歯乳頭、エナメル上皮等に局在し、これらの分子はデータベース検索から特定のphosphatidylcholinesと推定された。また、質量顕微鏡解析で得られた歯胚における脂質と同様な局在をSudan Black B染色で確認した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

質量分析イメージング法は、分子の位置情報を網羅的に解析できる画期的な研究手法である。しかし、骨や歯に対する応用例が少なく、試料作製についての情報も乏しい。石灰化組織では、化学固定と脱灰が重要となるが、質量顕微鏡解析でどのような方法が適用できるかは不明である。本研究では、試料作製方法の質量顕微鏡解析への影響を調べ、4%パラホルムアルデヒド固定と10%EDTA脱灰が有効であることを示した。さらに、歯胚において、phosphatidylcholinesの特徴的な分布を明らかとした。硬組織の質量顕微鏡試料作製の方法論を確立し、硬組織の脂質解析の新たな方向性を示した点で、意義ある研究である。

研究成果の概要(英文)：The study was designed to investigate matrix molecules characteristic for bone and dentin using matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (IMS). We examined methods to apply IMS for the calcified tissues and adopted 4% paraformaldehyde fixation - freeze with or without decalcification in 10% EDTA since information about the tissue preparation was not available. Developing rat teeth at 3 days were processed for IMS analysis. The data was acquired in the positive ion mode with 75  $\mu$ m and 10  $\mu$ m pitches and a mass range setting of 0 to 1000. Characteristic localization of signals in the tooth germs was shown at  $m/z$  706 and 732. The signals were localized in the area of dental papillae and enamel epithelia in the tooth germ. The data base search indicated that the corresponding molecules are phosphatidylcholines. Sudan Black B staining showed comparable localization of lipids in the tooth germ.

研究分野：口腔解剖学、口腔組織発生学

キーワード：石灰化 歯胚 質量顕微鏡 基質 細胞 脂質

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

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者等は骨と象牙質における石灰化過程を検討し、石灰化と基質タンパク分解が並行することを示してきた。骨については、ラット胎児の骨発生を検討し、類骨の石灰化過程で、骨芽細胞と骨細胞に基質タンパクの分解酵素である MMP (マトリックス・メタロプロテアーゼ) の遺伝子が発現し、骨基質に MMP の酵素活性が認められることを報告した。さらに、骨修復でも、修復骨の骨芽細胞と骨細胞が MMP の遺伝子を発現することを示している。また、象牙質については、ラット臼歯の象牙質形成を検討し、象牙芽細胞における MMP の遺伝子発現と象牙前質の MMP 酵素活性を報告して、石灰化に際し象牙芽細胞が象牙前質の基質タンパクを積極的に分解する可能性を示した。これらの研究から、骨や象牙質の形成過程では、本来は基質の造り手である骨芽細胞・骨細胞や象牙芽細胞が MMP 等の酵素を分泌し、類骨や象牙前質に含まれる基質タンパクを分解して石灰化を進行させる可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、ラットの形成過程の骨と象牙質を研究対象とし、質量分析イメージング法(質量顕微鏡法)を用いて石灰化前と石灰化後の基質のプロテオームを網羅的に解析し、石灰化に関与する基質タンパクを明らかとすることを当初の目的とした。質量分析イメージング法(質量顕微鏡法)の硬組織への適用は国内外で研究報告が乏しいことから、最初に質量顕微鏡要試料の作製について方法論を確立することとした。

## 3. 研究の方法

(1) 従来の研究報告で、歯や骨ではリン酸カルシウム結晶の存在が質量顕微鏡による解析の障害となる可能性が指摘されている。リン酸カルシウム結晶を除去する脱灰操作が必要だが、過去に質量顕微鏡で脱灰試料を検討した研究報告が乏しいことから、本研究では、下記の異なる方法でラット下顎骨の試料を作製して比較検討し、方法論を確立した。

未固定非脱灰凍結法(従来の質量顕微鏡用試料作製法): 生後3日齢のラットを深麻酔で安楽死させ頭部を摘出し、未固定で凍結包埋し、下顎第一臼歯の前頭断方向に連続切片を作製した。連続切片の一部は質量顕微鏡解析のため導電性を持たせ酸化インジウムスズがコーティングしてあるスライドガラスに載せた。

パラホルムアルデヒド化学固定法: 頭部を摘出し4%パラホルムアルデヒドで固定後、上記(1)のように凍結包埋して連続切片を作製した。

パラホルムアルデヒド化学固定-EDTA 脱灰法: 上記(2)のように頭部を固定した後、10%EDTA で脱灰し凍結包埋して連続切片を作製した。

(2) 作製した切片を利用して、組織の保持状態を形態学的に、生体分子の保存状態を質量顕微鏡で検討し、最適な試料作製方法を選択した後、改めて切片を質量顕微鏡(Ultraflex および Solarix XR, Bruker)を用いて解析した。質量範囲は m/z 0 から 1000 の陽イオンとし、測定ピッチは 75  $\mu\text{m}$  と 10  $\mu\text{m}$  とした。

(3) 胎生18日齢のラットの頭部を4%パラホルムアルデヒドで固定後、凍結包埋して連続切片を作製し、Sudan Black B 染色を施した。

#### 4. 研究成果

当初はタンパクを解析する計画であったが、質量顕微鏡の硬組織試料への応用の第一段階として、質量顕微鏡の方法論が確立している脂質を最初に解析することとした。組織形態の保持とシグナルの検出状態は、パラホルムアルデヒド化学固定法-EDTA 脱灰試料(Figs.1a, 2a)およびパラホルムアルデヒド化学固定法-非脱灰試料(Figs.1b, 2b)が未固定非脱灰凍結試料(Figs.3a, 3b)より良好だった。臼歯歯胚を中心とした関心領域のマスペクトルでは、質量電荷比  $m/z$  706, 732 および 734 にピークを示す分子が認められた。この内、 $m/z$  734 のシグナルは瀰漫性に分布していたが  $m/z$  706 (Fig.1) および 732 (Fig.2) のシグナルは歯胚における歯乳頭、エナメル上皮等に局在した。パラホルムアルデヒド化学固定法-EDTA 脱灰試料(Figs.1a, 2a)およびパラホルムアルデヒド化学固定法-非脱灰試料(Figs.1b, 2b)の両方で明瞭なシグナルが検出されたが、非脱灰試料でのシグナルの分布がより局限していた。これらのシグナルを示す分子はデータベース検索から特定の phosphatidylcholines と推定された。

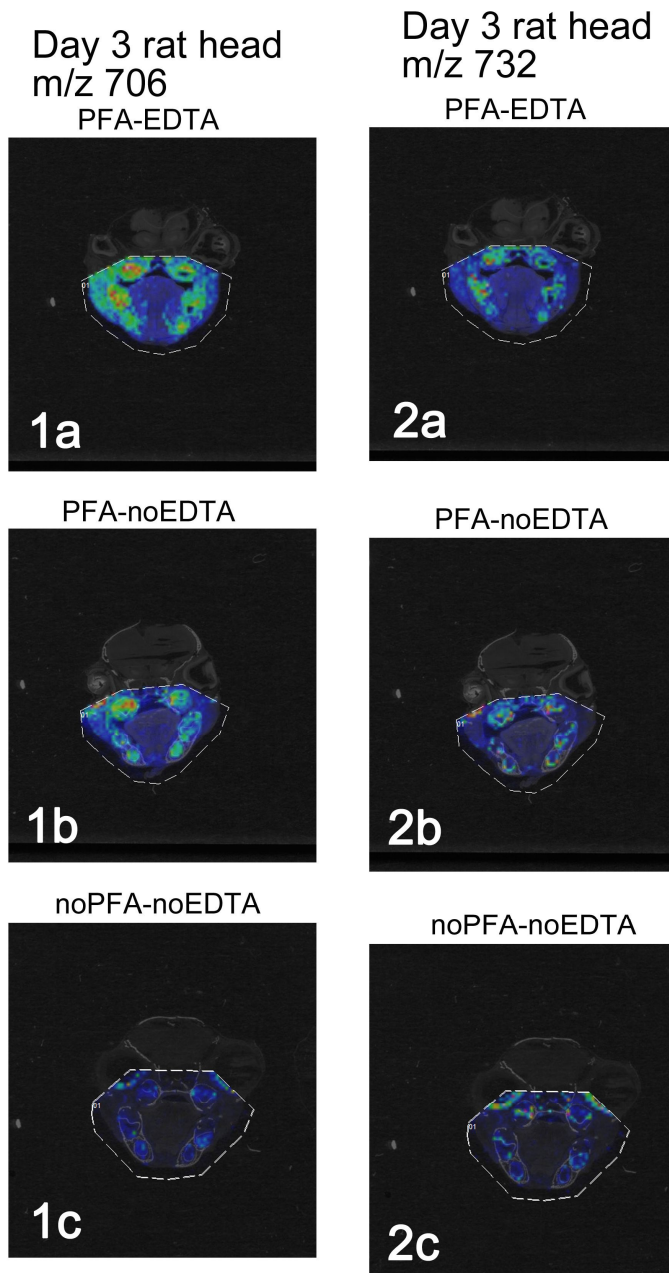


Fig.1 生後3日齢のラット頭部。質量顕微鏡解析 ( $m/z$  706)

a. パラホルムアルデヒド化学固定法-EDTA 脱灰試料

b. パラホルムアルデヒド化学固定法-非脱灰試料

c. 未固定非脱灰凍結試料

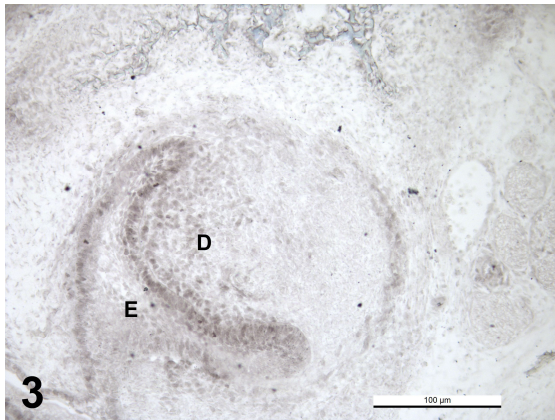
Fig.2 生後3日齢のラット頭部。質量顕微鏡解析 ( $m/z$  732)

a. パラホルムアルデヒド化学固定法-EDTA 脱灰試料

b. パラホルムアルデヒド化学固定法-非脱灰試料

c. 未固定非脱灰凍結試料

さらに、Fig.3 のように、Sudan Black B 染色では、脂質の分布がエナメル上皮や歯乳頭等に見られ、質量顕微鏡解析で得られた歯胚における phosphatidylcholines の局在と対応する局在が確認された。



\* Fig.3

胎生18日齢ラットの上顎白歯胚。  
Sudan Black B 染色。

E:エナメル器

D:歯乳頭

スケールバー:100 μm

本研究では、歯胚における特定の phosphatidylcholines の局在を示し、また、石灰化組織の質量顕微鏡用試料作製法として従来の未固定非脱灰と比較して、パラホルムアルデヒド固定非脱灰およびパラホルムアルデヒド固定 EDTA 脱灰が良好であることを示した。本研究は硬組織の質量顕微鏡試料作製の方法論を確立し、硬組織の脂質解析の新たな方向性を示した。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計5件)

猪狩洋平, 影山曜子, 萱場敦子, 真柳みゆき, 中村恵, 服部佳功, 笹野泰之  
(2019)加齢マウス脛骨における成長板軟骨の組織構造と皮質骨の石灰化に関する検討 東北歯誌 2019; 掲載決定済

Otake Y, Nakamura M, Henmi A, Takahashi T, Sasano Y. Experimental comparison of the performance of cutting bone and soft tissue between piezosurgery and conventional rotary instruments. Sci Rep. 2018;8(1):17154. doi:10.1038/s41598-018-35295-6.(査読有)

Henmi A, Okata H, Mikami Y, Sasano Y. Calcification in rat developing mandibular bone demonstrated by whole mount staining, micro-computed tomography and scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy. Biomed Res. 2017;38(5):277-284. doi:10.2220/biomedres.38.277.(査読有)

Maruyama K, Henmi A, Okata H, Sasano Y. Analysis of calcium, phosphorus, and carbon concentrations during developmental calcification of dentin and enamel in rat incisors using scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). J Oral Biosci. 2016;58:173-179.(査読有)

Henmi A, Okata H, Anada T, Yoshinari M, Mikami Y, Suzuki O, Sasano Y. Bone matrix calcification during embryonic and postembryonic rat calvarial development assessed by SEM-EDX, XRD and FTIR. J Bone Miner Metab. 2016;34(1):41-50. doi:10.1007/s00774-014-0647-x.(査読有)

[学会発表] (計 16 件)

中村恵, 笹野泰之. 凍結歯胚移植に伴う硬組織形成の形態学的解析. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「硬組織の細胞分化と再生におけるニューパラダイム:形態学的アプローチ」. 2019 年 3 月 27~29 日, 新潟.

笹野泰之, 逸見晶子, 大方広志, 中村恵, 鈴木治. 発生・修復に伴う硬組織石灰化の元素イメージング. 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」. 2018 年 9 月 29・30 日, 宮崎.

笹野泰之, 逸見晶子, 真柳みゆき. 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. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会 2018年9月5日~7日、福岡

笹野泰之. 硬組織の発生と修復におけるバイオミネラリゼーションのイメージング解析. 大学院歯学研究セミナー・第 420/421 回北海道歯学会例会. 2018 年 8 月 6 日, 札幌.

Liao Caiyu, Atsuko Kayaba, Miyuki Mayanagi, Megumi Nakamura, Yasuyuki Sasano. Three-dimensional visualization of embryonic bone development with serial-semithin- section SEM. 日本学術振興会 二国間交流事業 共同研究・セミナー「ミニモデリングにおける骨細胞ネットワークの新規調節機構」. 2018 年 8 月 5 日, 札幌.

Yasuyuki Sasano. Biomineralization imaging of bone development and healing by analytical electron microscopy. The 26th International Symposium on Morphological Sciences (ISMS2018). July 5-7, 2018. Prague, Czech Republic.

中村恵, 笹野泰之. 歯胚移植における凍結保存の実験的応用. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2017 年 10 月 20~22 日, 京都.

大竹義雄, 中村恵, 逸見晶子, 笹野泰之, 高橋哲. 骨と軟組織の切削におけるピエゾサージェリーと回転切削器具の実験的比較検討. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2017 年 10 月 20~22 日, 京都.

中村恵, 笹野泰之. 凍結保存歯胚を移植すると、歯根が伸長し歯が萌出する. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会. 2017 年 9 月 16~18 日, 松本.

大竹義雄, 中村恵, 逸見晶子, 高橋哲, 笹野泰之. 骨と軟組織に対するピエゾサージェリーの切削能に関する実験的検討. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会. 2017 年 9 月 16~18 日, 松本.

青山直樹, 中村恵, 笹野泰之. マウス下顎骨発生過程では破骨細胞は石灰化に先行して出現する. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会. 2017 年 9 月 16~18 日, 松本.

Yasuyuki Sasano. Calcification process of bone growth by analytical electron microscopy. The 25th International Symposium on Morphological Sciences (ISMS2017). July 26-30, 2017. Xi'an, China.

Li Xinghan, Megumi Nakamura, Yasuyuki Sasano. Transplantation of cryopreserved mouse tooth germ. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017 年 3 月 28~30 日, 長崎.

笹野泰之. 硬組織の発生成長と修復に伴う石灰化の成熟. 第 343 回松本歯科大学院セミナー. 2016 年 11 月 11 日, 松本.

笹野泰之. 硬組織に対する脱灰と免疫染色の基本. 第 41 回組織細胞化学会・講習会. 2016 年 8 月 3~5 日, 仙台.

笹野泰之, 逸見晶子, 大方広志, 中村恵, 鈴木治. 発生・修復に伴う硬組織石灰化の元素イメージング. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「石灰化研究の新展開」. 2016 年 3 月 28~30 日, 郡山.

(図書)(計1件)

笹野 泰之 「硬組織に対する脱灰と免疫染色の基本」  
組織細胞化学 2016 Page123-130 (2016.07), 学際企画

## 6 . 研究組織

研究分担者氏名:鈴木 治  
ローマ字氏名:Suzuki Osamu  
所属研究機関名:東北大学  
部局名:歯学研究科  
職名:教授  
研究者番号(8桁):60374948

研究分担者氏名:中村 恵  
ローマ字氏名:Nakamura Megumi  
所属研究機関名:東北大学  
部局名:歯学研究科  
職名:助教  
研究者番号(8桁):20431512

研究分担者氏名:逸見 晶子  
ローマ字氏名:Henmi Akiko  
所属研究機関名:東北大学  
部局名:歯学研究科  
職名:大学院非常勤講師  
研究者番号(8桁):40613055