

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15765

研究課題名（和文）歯根膜細胞分化機構の次世代フォトニクスイメージング

研究課題名（英文）Photonics imaging of cytodifferentiation of 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） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、フォトニクス技術を駆使し、歯根膜細胞の分化過程における硬組織関連分子の発現を解析した。ラマン分光測定の結果、ヒト歯根膜細胞の硬組織形成過程において、シトクロムcやハイドロキシアパタイトを含む合計4種類の生物分子のモニタリングに成功した。一方で、マウス骨芽細胞を用いた解析から、共焦点レーザー顕微鏡によるI型コラーゲンの局在解析とラマンイメージングの融合によるイメージングに成功した。本研究成果により、多くの生体分子が関与する硬組織形成細胞の分化過程の解析に、ラマンイメージングなどのフォトニクス技術が活用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 examined the expression of hard tissue-related molecules during the process of cytodifferentiation of periodontal ligament cells (PDLs) by photonics technology. We successfully detected four molecules such as cytochrome c and hydroxyapatite, which were closely related to the early phase of cytodifferentiation of PDLs, in a non-invasive manner by time-resolved Raman imaging. In addition, we successfully obtained type I collagen immunostaining image by confocal microscopy and the hydroxyapatite Raman image from the same fields-of-view of differentiating mouse osteoblasts. These results demonstrated that photonics technology such as Raman imaging could be the powerful tool to analyze the molecules involved in the complicated process of hard tissue formation.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜 硬組織形成 フォトニクス 分化

### 1. 研究開始当初の背景

光子は荷電粒子の電子と異なり、生体内を自由に伝搬することが出来るヒトに優しいプローブであり、この光子を使った最先端技術は 21 世紀の科学や産業を担う次世代技術の一つとして脚光を浴びている。しかしながら、この最先端技術は歯周病学研究に未だ十分に活かされているとは言えない。我々の研究室では、フォトニクスと歯周病学の融合研究の創出の重要性を認識し、大阪大学フォトニクスセンターとの連携を開始した。これまでのパイロット研究の成果として、骨芽細胞株を *in vitro* にて分化誘導した際に、培養 3 日目にハイドロキシアパタイト (HA) に帰属されるラマン散乱波長  $958\text{ cm}^{-1}$  を用いたラマン画像を取得し、培養骨芽細胞における HA の分布のイメージングに成功している。ラマンイメージングの方法は非侵襲であり、さらに分子振動の検出による特定分子の多種類同時測定が可能であるので、複数の分子を同時に (理想的にはその濃度分布までも) 非侵襲でイメージング (マッピング) することができる。つまり、HA シグナルをラマン分光法にて定量的に検出することで、経時的かつ非侵襲的に骨芽細胞 lineage の極初期石灰化過程の検出に成功したことを意味している。一方、生体における硬組織形成の過程は周囲環境からの石灰化関連分子による経時的制御を受けながら進行しているものと想定される。

### 2. 研究の目的

本研究では、21 世紀を担う科学技術の一つとして脚光を浴びているフォトニクス技術を駆使し、硬組織関連分子を非侵襲・非接触的に解析することにより、歯根膜細胞が硬組織を形成する成熟過程の詳細を stepwise に明らかにすることを目標とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 硬組織形成細胞への分化誘導

ヒト歯根膜細胞あるいはマウス骨芽細胞株 KUSA-A1 細胞を石灰化誘導培地 (10mM  $\beta$ -グリセロリン酸、50ug/mL アスコルビン酸、10%FCS 含有  $\alpha$ -MEM 培地) 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、培地を緩衝タイロッド溶液 (Tyrode's solution) に置換した。タイロッド溶液は、脱イオン蒸留水に、NaCl 150 mM, glucose 10 mM, Hepes 10 mM, KCl 4.0 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM, CaCl<sub>2</sub> 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

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。

#### (3) I 型コラーゲン免疫蛍光染色

細胞を PBS にて 2 回洗浄した後、4%PFA にて固定 (室温 15 分) した。精製水にて 2 回洗浄後、抗 I 型コラーゲン抗体、Alexa Fluor594 標識二次抗体を順次反応させた。

### 4. 研究成果

#### (1) 石英ガラス基板上におけるヒト歯根膜細胞の培養

我々はこれまでに、マウス骨芽細胞 KUSA-A1 の分化過程における HA の集積をラマンイメージングにて経時的に観察する手法を確立した。同手法における培養は自家蛍光の少ない石英ガラス基板上で行う必要がある。そこで、ヒト歯根膜細胞を石英ガラス基板上で培養したところ、10 日前後で細胞が剥離し、分化過程を観察するための長期の培養が困難であることが明らかとなった。この問題に対し、石英ガラス基板を 25ug/mL フィブロネクチン溶液にて前処理することにより、細胞培養を 19 日間程度まで延長することに成功するとともに、石灰化誘導培地を用いた分化誘導 15 日目にはアリザリンレッド染色陽性の石灰化ノジュールが観察された (図 1)。なお、フィブロネクチンコートはラマンスペクトラムに大きな影響を及ぼさないことを確認した (図 2)。

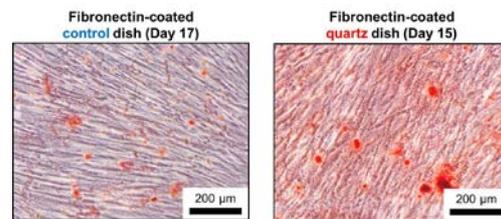


図 1 フィブロネクチンコート石英ガラス基板上におけるヒト歯根膜細胞のアリザリン染色像

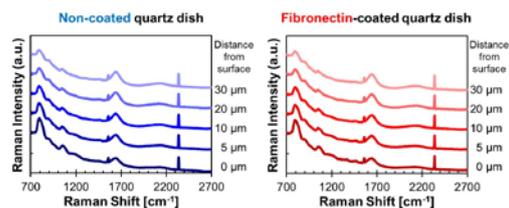


図 2 フィブロネクチンコートがラマンスペクトルに及ぼす影響

(2) ラマン分光法によるヒト歯根膜細胞の経時的定点観察

ラマン分光法によるヒト歯根膜細胞の経時的解析を実現するため、同一細胞を長期的にモニタリング可能な実験系の確立を行なった。本研究では、試料細胞を培養したディッシュの X-Y 平面における回転を制御するため自作のポジショニングプレートを、X/Y 座標を制御するためにグリッド付ガラスディッシュのグリッドを利用した (図 3)。

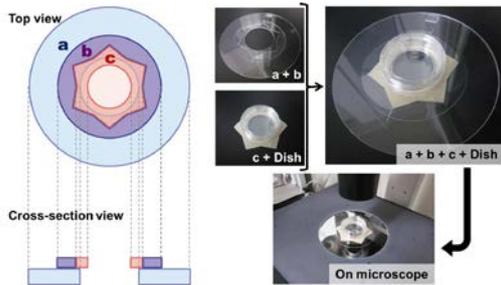


図 3 自作のポジショニングプレート

本手法による定点観察の精度を調査したところ、本手法を用いれば、誤差  $1 \mu\text{m}$  未満の精度で定点を観測することが可能であった。ヒト歯根膜細胞の大きさが  $10\sim 20 \mu\text{m}$  程度であること、本研究におけるラマン分光測定 of X/Y 方向の分解能が  $\sim 500 \text{ nm}$  であることをから考えて、本手法を用いれば、十分な精度で培養ディッシュを定点にポジショニングが可能であると判断した。

(3) ラマン分光法によるヒト歯根膜細胞分化過程の経時的解析

(2) で構築したポジショニングプレートおよびグリッド付ガラスディッシュを利用し、ラマン分光法によるヒト歯根膜細胞の経時的解析を実施した。同一のヒト歯根膜細胞に対し、分化誘導前、分化誘導開始後 3、6、9、14 日にラマン分光測定を行なった。長期的な定点観察をするために使用したグリッド付ガラスディッシュによる蛍光が強く、鮮明なラマンイメージを得ることができなかったが、シトクロム *c* や HA など、帰属を調査中のものを含めれば、合計 4 種の生体分子のモニタリングに成功した (図 4)。

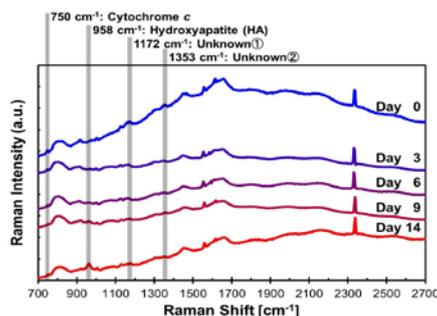


図 4 ラマン分光法によるヒト歯根膜細胞分

化過程の経時的変化

HA は、分化誘導開始後 3 日目まではピークが観測されなかったが、分化誘導開始後 6 日以降は、そのピーク強度が次第に増加していくのが観測された。一方、シトクロム *c* や帰属調査中の 2 物質のラマンピークの強度は日毎に減少傾向を示した (図 5)。しかし、その減少の仕方は三者三様であり、これらの物質がそれぞれ異なる種類であることが推察された。中でも、帰属調査中のうちの 1 つのラマン散乱光強度の減少開始時期と HA のラマン散乱光強度の増加開始時期がほぼ一致しており、本物質が石灰化過程の開始前後に深く関与している可能性が示唆された。

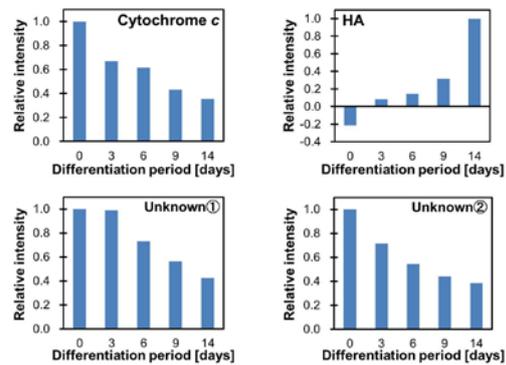


図 5 ヒト歯根膜細胞分化過程で検出された 4 つのラマンバンドの強度変化

(4) HA 集積と I 型コラーゲン分子の局在に関する解析

HA の局在と I 型コラーゲン分布を可視化するため、HA のラマンイメージと I 型コラーゲンの蛍光免疫染色法の組み合わせにより検討を行った。すなわち、マウス骨芽細胞 KUSA-A1 を石灰化誘導培地を用いて培養し、ラマンイメージにて HA を観察後、同部位における I 型コラーゲンの局在を蛍光免疫染色法にて可視化し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した (図 6)。その結果、多くの HA が観察された部位のコラーゲン線維は均等かつ網目状に分布していたが、HA の少ない部位ではコラーゲン線維が少なく不均一であった。

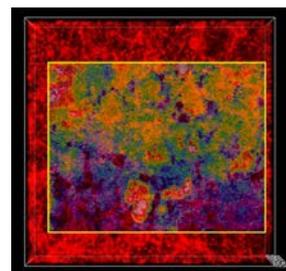


図 6 KUSA-A1 細胞分化誘導 4 日目の I 型コラーゲン蛍光イメージと HA ラマンイメージの

## 統合画像

### 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)

[学会発表] (計 8 件)

①橋本 彩、森本 千晶、竹立 匡秀、山口 佳則、加藤 幸一郎、福澤 薫、村上 伸也、民谷 栄一 “ラマン分光法およびフラグメント分子軌道法によるヒドロキシアパタイト-アミノ酸相互作用の解析”、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 18 日、神奈川県、横浜市

②A. Hashimoto, C. Morimoto, M. Takedachi, Y. Yamaguchi, K. Kato, K. Fukuzawa, S. Murakami, E. Tamiya “Analysis of hydroxyapatite formed by osteoblasts with Raman spectroscopy and fragment molecular orbital method”, International Conference on Single Cell Research 2016, November 16 2016, Tokyo, Japan

③橋本 彩、森本 千晶、竹立 匡秀、山口 佳則、加藤 幸一郎、福澤 薫、村上 伸也、民谷 栄一 “ラマン分光法および構造シミュレーションによる骨芽細胞ハイドロキシアパタイトの解析”、第 77 回応用物理学会秋季学術講演会、2016 年 9 月 14 日、新潟県、新潟市

④橋本 彩、森本 千晶、竹立 匡秀、山口 佳則、加藤 幸一郎、福澤 薫、村上 伸也、民谷 栄一 “ラマン分光法およびフラグメント分子軌道法を用いた骨芽細胞ハイドロキシアパタイトの解析”、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム 2016、2016 年 9 月 7 日、石川県、金沢市

⑤橋本 彩、森本 千晶、竹立 匡秀、山口 佳則、村上 伸也、民谷 栄一 “ラマン分光法による骨芽細胞組織中の石灰化物の解析”、応用物理学会関西支部平成 28 年度第 1 回講演会、2016 年 6 月 17 日、大阪府 池田市

⑥橋本 彩、森本 千晶、竹立 匡秀、山口 佳則、村上 伸也、民谷 栄一 “ラマン分光法による骨芽細胞石灰化過程の解析”、日本化学会第 96 回春季年会、2016 年 3 月 24 日、京都府、京田辺市

⑦橋本 彩、森本 千晶、藤田 克昌、竹立 匡秀、山口 佳則、河田 聡、村上 伸也、民谷 栄一 “Raman and immunofluorescence imaging analysis of mineralization process in mouse osteoblasts”、第 76 回応用物理学会秋季学術講演会、2015 年 9 月 14 日、愛知県、名古屋市

⑧橋本 彩、森本 千晶、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および免疫蛍光染色法による骨芽細胞石灰化過程の解析”、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム 2015、2015 年 9 月 10 日、熊本県、熊本市

### 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

野崎 剛徳 (NOZAKI TAKENORI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：30263304

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