

令和元年6月26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：17K19752

研究課題名(和文) in totoイメージングによる歯根膜-骨髄複合体の解析

研究課題名(英文) in toto imaging of periodontal ligament-bone marrow complex

研究代表者

岩山 智明(Iwayama, Tomoaki)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80757865

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)：様々な蛍光レポーターマウスや蛍光タグを用いた細胞ラベリング技術と各種組織透明化技術を併用することで、マウス上顎骨が0.5-1.0 mmの深度でsee-throughできることが明らかとなった。同手法を用いることで、歯根膜中のコラーゲン非産生間葉系細胞の局在が同定された。また、ナノレベルの解像度を持つCTを用いることで、組織透明化なしに1細胞以上の解像度でin totoイメージングが可能であることが示唆された。さらに、超解像顕微鏡技術を用いることで、石灰化過程の詳細が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体組織の機能を詳細に理解するためには、脈管・神経のネットワークに代表されるような組織内の細胞どうしの連携や相互作用を連続性を持って観察することが求められる。本研究成果は、歯周組織全体を俯瞰して理解するための基礎研究であり、組織透明化技術と細胞ラベリング技術を応用することにより、マウス歯周組織内の様々な細胞群の網羅的かつ迅速な検出を実現した。一連の解析手法はヒトや他臓器にも応用可能であり、基礎医学分野への技術移転も期待される。

研究成果の概要(英文)：We utilized a variety of fluorescent reporter mice and fluorescent tags with tissue clearing techniques to visualize murine periodontal tissue. Maxilla tissue was successfully cleared and observed into the depth of up to 1 mm. in toto imaging revealed that non-collagen producing mesenchymal cells in periodontal ligament was located adjacent to capillaries. As an alternative, nano-CT could be used for in toto imaging without tissue clearing. We also found the basic mechanism of mineralization using super-resolution microscopy.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜 組織透明化 ライトシート顕微鏡 ナノCT 超解像顕微鏡

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌バイオフィームにより歯周組織が慢性炎症的に破壊される疾患である。原因の除去だけでは失われた歯周組織の再生は困難であり、歯周病の病態解明や、歯周組織再生療法の開発が求められている。これまでに培養細胞を用いた *in vitro* 解析により多くの知見が得られているが、生体内での細胞機能や異なる細胞間の連携を理解するには *in vivo* 解析が必須であり、中でも遺伝子改変マウスを用いることが一般的となってきた。しかしながら、その解析は従来の切片作製による組織学的手法が一般的で、時間と労力を要するにもかかわらず、得られる画像は組織のごく一部分を強拡大したものであり、組織全体を俯瞰できていないといえ、二次元画像情報の汎用性は低いのが現状である。

一般に、生体組織の機能を詳細に理解するためには、脈管・神経のネットワークに代表されるような組織内の細胞どうしの連携や相互作用を連続性を持って観察することが強く求められる。現在このようなニーズに答える観察手法として、*in toto* (*in total*、全体の) イメージングが開発されており、線虫やゼブラフィッシュの幼虫といった無色透明なモデル動物の観察にのみ適用されてきた。最近になってさまざまな組織透明化の手法が開発され、マウス全脳の透明化とイメージングにより神経回路接続の理解が飛躍的に進んでいる。

歯周組織も毛細血管に富んだ組織であり、歯根膜と骨髄が毛細血管網で密に交通しており、硬組織と軟組織を含む歯周組織全体を解析する新手法の開発が課題であった。そこで上述のとおり神経科学の分野で近年急速に発展を遂げた組織透明化技術とおよび歯周組織の細胞ラベリング技術を併用し、遺伝学的・組織学的にラベリングした透明化マウス歯周組織にシート状の励起光を照射することにより高速で光学切片を得ることのできる Light-sheet 顕微鏡を用いて観察する。そして歯周組織内の様々な細胞群の網羅的かつ迅速な検出に挑戦し、細胞どうしの連携を連続的に可視化する。

一方、*in toto* イメージングにおける課題として、得られるテラバイトサイズの大容量データをどのようにデータ処理し、各画像間・各個体間の定量的な比較を行うかが挙げられる。本研究では自動運転技術等で用いられている最先端画像認識技術を応用することにより多数の個体から得られた歯周組織の三次元画像の位置合わせを行い、個体差を帰納的に標準化し、三次元形状解析データベースを確立する。

このように細胞ラベリング技術に加えて、組織透明化技術と、Light-sheet 顕微鏡によるイメージング、さらには情報科学処理を組み合わせることで、上記課題を解決できるものと考え、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

組織透明化技術と細胞ラベリング技術を応用することにより、新しい歯周組織イメージング法を開発し、超高速に高解像度で歯周組織を観察する。同組織内の様々な細胞群の網羅的かつ迅速な検出により、細胞どうしの連携を連続的に可視化し、歯周組織を構成する細胞群の詳細な理解につなげる。

### 3. 研究の方法

(1) マウス上顎を採取し、固定脱灰後、SeeDB2 法、CUBIC 法、Scale 法、ECi 法のそれぞれを用いて透明化処理を行い、その透明化度を比較検討した。脱灰法について、各種脱灰液が透明化に与える影響を検討した。脱灰度の評価法として、歯科用ポータブル X 線装置およびマイクロ CT を用いた。

(2) レポーターマウスを用いた細胞の蛍光標識、蛍光タグ用いた核・血管染色について、その蛍光シグナルが透明化処理および脱灰処理後に保持されるかどうか検討した。

蛍光レポーターマウスは間葉系細胞が赤色標識される Twist2-Cre; R26tdTomato マウス、コラーゲン産生細胞が緑色標識される Col-GFP、間葉系細胞のすべての核が緑色標識される Twist2Cre;R26tTA; TRE-H2BGFP、Nestin 陽性細胞が緑色標識される Nestin-GFP マウスを用いた。

蛍光タグは DAPI、Propidium Iodide、Hoechst 33342、AlexaFluor647 標識 GS-IB4、AlexaFluor647 標識抗 CD31 抗体を用いた。

顕微鏡は高速で光学切片を得ることのできる Zeiss 社 Lightsheet Z.1 顕微鏡、多点共焦点方式で素早い撮像が可能で、超解像撮影も可能な Andor 社 Dragonfly、共焦点顕微鏡 Leica 社 TCS SP8 および Zeiss 社 LSM880 with Airyscan を用いて 3 次元画像を取得した。

撮影した 3 次元画像のセグメンテーションを含む解析は FEI 社 Amira ソフトウェアを用いて行った。

(3) 透明化イメージングにより得られる三次元データをさらに活用するために、他の手法を用いた歯周組織三次元データの集積の可能性を探索した。中でも、nm オーダーの解像度を持つマイクロ CT である Bruker 社 SkyScan1272 を用いて、歯周組織中の硬組織の詳細な描出を行った。

- (4) AlexaFluor647 標識抗 CD31 抗体を Twist2-Cre; R26tdTomato; Col-GFP マウスの尾静脈に注入し、歯根膜のイメージングを行うことで、Twist2-Cre 系譜細胞のうちコラーゲン非産生細胞について、その局在とその特徴づけを行った。
- (5) 蛍光タグを用いて染色した培養骨芽細胞を超解像顕微鏡 (Nikon 社 N-SIM) を用いて観察し、同細胞の石灰化過程の詳細な検討を行った。骨芽細胞株 KUSA-A1 (Umezawa *et al.*, *J Cell Physiol*, 1992) を Calcein 存在下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) で培養後、Hoechst 33342、Lysotracker Red DND-99、MitoTracker Deep Red FM にて染色し、タイムラプスイメージングを行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 固定した上顎骨に各種透明化技術を応用したところ、ECi 法を用いた場合に最も高い透明度を得られた。ついで CUBIC 法を用いた場合の透明度が高かった。ECi 法による組織透明化では、骨組織は脱灰なしでも非常に高い透明度が得られるものの、エナメル質輪郭のみが残ることが明らかとなった (図 1)。さらに脱灰処理の種類や有無が透明度に及ぼす影響を検討したところ、Morse 液は多くの蛍光色素を保持しつつ、迅速な脱灰が可能であることが明らかとなった。

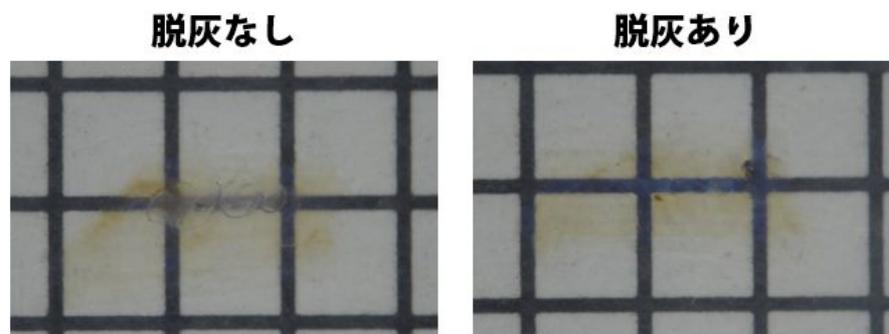


図 1 : 脱灰の有無がマウス上顎骨の ECi を用いた組織透明化に与える影響

- (2) 組織透明化かつ蛍光ラベリングされたマウス上顎骨を、様々な顕微鏡を用いて撮影を行ったところ、1 歯の歯周組織の撮像においては、いずれの顕微鏡においても、撮影方法や組織のトリミングなどの前処置を工夫することで、歯根膜をそのままイメージングすることが可能であった。特に、Zeiss 社 Lightsheet Z.1 顕微鏡および LSM880 with Airyscan を用いた場合には、1 細胞の解像度を維持したまま、500-1000 $\mu$ m の深度で see-through できることが明らかとなった (図 2)。取得した画像のセグメンテーションを FEI 社 Amira ソフトウェアを用いて行うとともに、多検体から得られた情報を統計的に解析し、個体差の帰納的な標準化を試みた。

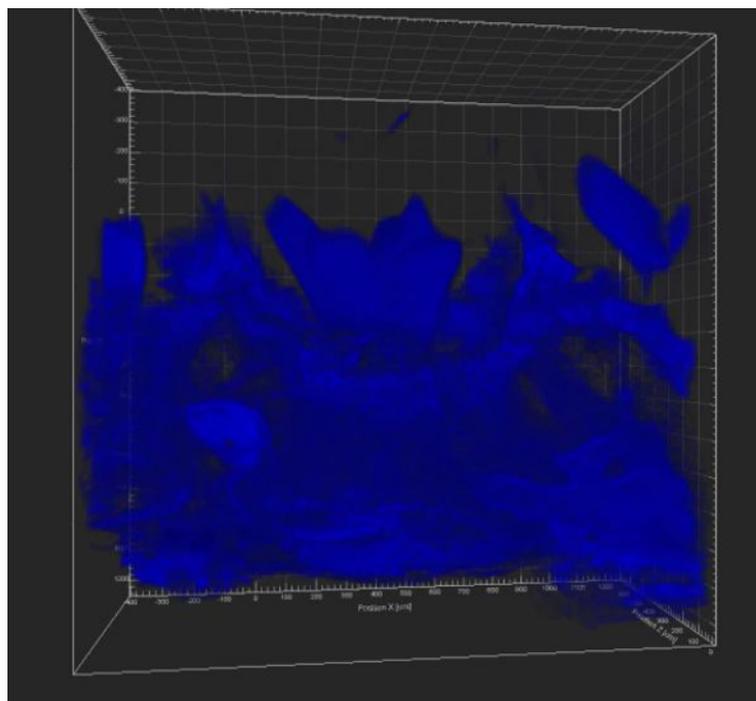


図 2 : SeeDB2S 法にて透明化し、DAPI にて核染色を行ったマウス上顎第二臼歯の歯周組織イメージング像 (LSM880 with Airyscan にて撮像)

- (3) Bruker 社 SkyScan1272 を用いてマウス上顎骨の CT 撮影を行ったところ、エナメル質・象牙質・歯槽骨のみならず、歯根表面の一層のセメント質が歯根象牙質と分離して描出された（図 3）。血管造影剤を用いた毛細血管の描出や、軟組織の描出を併用することで、組織透明化を用いることなく、1 細胞以上の解像度で *in toto* イメージングが可能であることが示唆された。

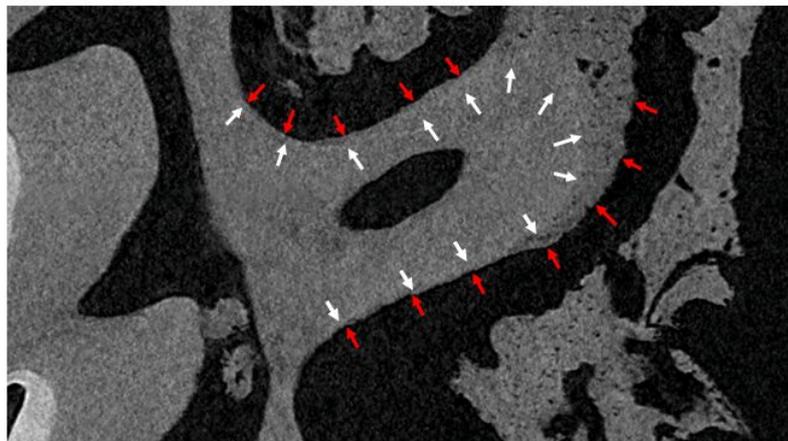


図 3：マウス上顎第二臼歯の CT イメージング像（白矢印が象牙質とセメント質の境界、赤矢印がセメント質と歯根膜の境界を示す）

- (4) AlexaFluor647 標識抗 CD31 抗体を Twist2-Cre; R26tdTomato; Col-GFP マウスの尾静脈に注入し、歯根膜のイメージングを行ったところ、Twist2-Cre 系譜間葉系細胞のうち、Col-GFP 陰性のコラーゲン非産生細胞が、CD31 陽性の血管内皮細胞の直近に位置するペリサイト（周皮細胞）であることが示唆された。

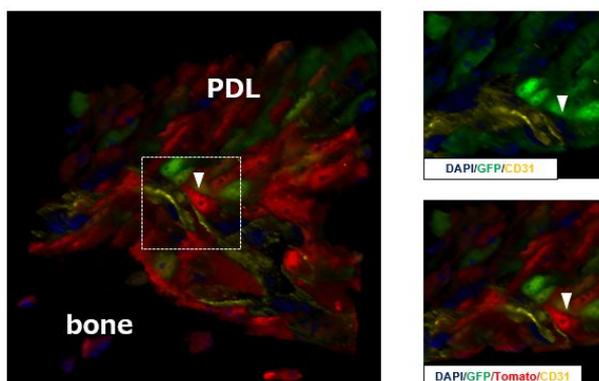


図 4：Twist2-Cre; R26tdTomato; Col-GFP マウスの組織イメージング像（青色が DAPI による核染色、黄色が AlexaFluor647 標識抗 CD31 抗体による血管染色、白矢頭で示す Col-GFP 陰性のコラーゲン非産生間葉系細胞は血管周囲に存在する）

- (5) 超解像蛍光顕微鏡を用いて骨芽細胞の石灰化過程を観察したところ、細胞内でカルセイン陽性の小胞がミトコンドリア近傍から細胞外へと向けて、リソソームを用いて運搬されていることが明らかとなった（図 5）。

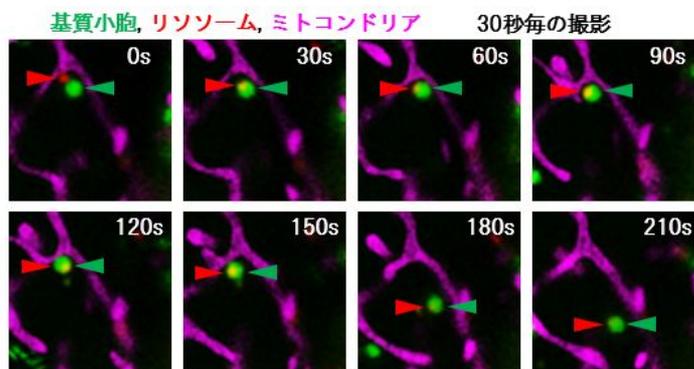


図 5：骨芽細胞の超解像タイムラプスイメージング像（緑色がカルセイン、赤色がリソソーム、紫色がミトコンドリアを示す）

## 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5件)

- (1) 富田 貴和子、岩山 智明、上田 亜美、松本 修治、村上 伸也；標識保持細胞の追跡による歯根膜間葉系幹細胞の同定、第62回春季日本歯周病学会学術大会、2019年5月24日、神奈川
- (2) 岩山 智明；前骨芽細胞コミットメント調節因子の探索、第3回 Skeletal Science Retreat、2018年11月17日、神奈川
- (3) 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、2018年10月27日、大阪
- (4) T. Ueda, T. Iwayama, K. Tomita, A. Hirai, M. Takedachi, S. Murakami ; Clonal analysis of primary murine periodontal ligament-derived cells、2018 IADR GENERAL SESSION 2018年7月26日、London

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

野崎 一徳 (NOZAKI, Kazunori)  
大阪大学・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：40379110  
村上 伸也 (MURAKAMI, Shinya)  
大阪大学・歯学研究科・教授  
研究者番号：70239490

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。