

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H05568・20K20476

研究課題名（和文）生体硬組織形成の初期過程解明に向けたナノレベル多相的解析

研究課題名（英文）Nano-level multimodal analysis of matrix vesicle-mediated biomineralization

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） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：骨や歯などの硬組織が形成される初期過程においては、それらの形成細胞中に基質小胞と呼ばれる微粒子が形成・分泌されることが必須である。本研究では、細胞を生きのまま溶液中でナノレベル観察できる誘電率顕微鏡システムの改良を行い、元素分析やラマン顕微鏡観察を組み合わせた多相的な解析手法を開発するとともに、遺伝子ノックアウト細胞やノックイン細胞を作製・解析することにより、基質小胞の形成・分化の分子機構の理解を進展させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生体硬組織の形成・維持についての基本的なメカニズムの理解が進展したことにより、骨や歯を正常に保つ治療法や予防法の開発につながり、高齢者の健康とQuality of Life増進に寄与するものと期待できる。また、細胞内の微粒子の働きを生細胞のまま多相的にナノレベル観察する手法が確立され、同手法は微粒子を介した様々な生命現象の解明に広く応用可能と期待される。

研究成果の概要（英文）：In the initial process of hard tissue formation, such as bone and tooth, it is essential for hard tissue-forming cells to form and secrete matrix vesicles. This study has established a multimodal analysis that combines elemental analysis and Raman microscopy by improving a scanning electron-assisted dielectric microscopy system that enables nano-level observation of living cells in solution. We have also analyzed gene knockout and knock-in cells to advance our understanding of matrix vesicle-mediated biomineralization.

研究分野：歯周病学

キーワード：硬組織 基質小胞 誘電率顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた日本において、高齢者の健康と Quality of Life を維持・増進することは喫緊の課題である。さらに日常生活動作 (ADL: activities of daily living) を高く維持するためには、生体の硬組織の状態を正常に保つことが必須となる。こうした生体硬組織の形成と維持には、骨芽細胞や歯根膜細胞による細胞外マトリックスの生成とリン酸カルシウムの沈着・成長、さらには破骨細胞による古い骨の溶解と吸収のバランスが重要となる。とりわけ、骨に代表される生体硬組織が形成される初期過程においては、骨芽細胞からリン酸カルシウムを含む 30-300nm の微粒子である基質小胞が細胞外へと分泌されることが必須である。しかしながら、基質小胞に関するこれまでの解析は、化学固定した細胞や組織切片の電子顕微鏡による観察、あるいは超遠心法で分離した基質小胞の成分解析のみに依存してきた。そのため、1967年に初めて基質小胞が観察されて以来、詳細な解析は進展しておらず、硬組織形成の初期過程に関する記載は専門教科書においても古くからの仮説のレベルに留まっており、その理解は停滞したままの状態が続いていた。最近になって我々は蛍光超解像度顕微鏡観察に加えて、溶液中の生細胞を電子線損傷なく、非染色・非固定の状態での 10nm の解像度で観察できる技術である走査電子誘導率顕微鏡技術を用いることで、基質小胞が骨芽細胞内のミトコンドリア近傍に形成され、リソソームに集積し、細胞内を運搬され、分泌されることを明らかにした (Iwayama *et al.*, *Sci Adv*, 2019, 3;5(7):eaax0672.)。しかしながら、基質小胞がどのような分子機構で形成され、分泌されるかの詳細は未だ不明な点が多く残されている。基質小胞を介した石灰化初期過程の理解を進展させるためには現在の蛍光超解像度顕微鏡や走査電子誘導率顕微鏡で得られる画像情報を統合するのみならず、ラマン顕微鏡や元素分析法を同時に取得する、多相的な解析技術の確立が必要である。また走査電子誘導率顕微鏡技術についても、基質小胞や細胞外マトリックスの撮像においては、温度によるアーチファクト (温度ドリフト) といった各種パラメーターを最適化することにより、解像度の高い解析が可能となると考えられる。

2. 研究の目的

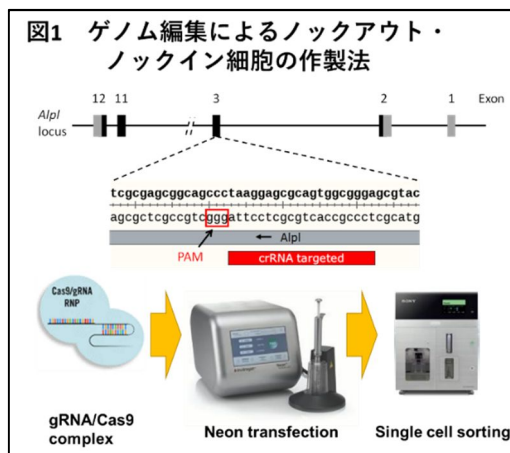
本研究では、基質小胞を介した生体硬組織の形成・維持のメカニズムをさらに解明するために、遺伝子レベルから細胞内外の構造、組成レベルに至る多相的で包括的な解析を推進し、石灰化の過程をナノレベルで解明することを目指す。我々がこれまで共同で開発を進めてきた、培養液中でナノレベルの分解能を発揮する走査電子誘導率顕微鏡をさらに改良し、骨芽細胞や歯根膜細胞における基質小胞や細胞外マトリックスの形成過程を直接観察する。

3. 研究の方法

大阪大学グループと産業技術総合研究所 (産総研) グループの 2 グループによる研究班を編成する。

骨芽細胞と歯根膜細胞を対象とした基質小胞の形成・放出分子機構の解析および人工タグ導入による走査型電子誘導率顕微鏡の高機能化 (大阪大学・村上グループ)

大阪大学・村上グループは産総研・小椋グループと連携し、走査型電子誘導率顕微鏡を用いて骨芽細胞および歯根膜細胞の非染色・非固定での観察に取り組み、骨芽細胞が基質小胞を形成・分泌する過程のナノレベル観察を実現する。この基質小胞形成・分泌メカニズムを遺伝子レベルで解析するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて *Apl1*, *Runx2*, *Sp7* といった硬組織関連遺伝子のノックアウト細胞クローンを作製し (図 1) その表現型について、*in vitro* 解析で得られる情報と走査型電子誘導率顕微鏡による基質小胞の形態情報を統合する。また、我々はこれまでに歯槽骨が急速に失われる侵襲性歯周炎患者のゲノムワイド関連解析を行い、GPR126, SMPD3, PON1 等の疾患感受性遺伝子を同定し、データベース化を推進してきた (NBDC Human Database : hum0027.v1)。このデータベースを活用し、これら疾患感受性遺伝子をノックアウトした細胞の作成し、走査型電子誘導率顕微鏡を用いた解析を行う。さらに、CRISPR/Cas9 シ



ステムを用いてオルガネラやコラーゲン等の細胞外基質におけるマーカー遺伝子座の特定元素によく結合する人工タグをレポーターとしてノックインした細胞クローンを作製し、その発現を走査型電子誘電率顕微鏡像へと重ね合わせることで、生細胞のマルチカラー走査型電子誘電率顕微鏡システムへと発展させる。以上の一連の解析により、基質小胞や細胞外基質の生成・放出に基づく骨基質の生成・維持機構を明らかにすることを旨とする。

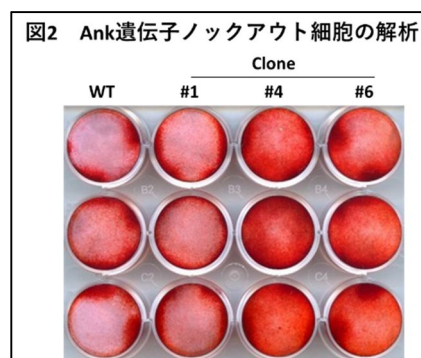
改良型走査型誘電率顕微鏡の構築（産総研・小椋グループ）

産総研・小椋グループでは、大阪大学村上グループと連携し、走査電子誘電率顕微鏡を用いて、骨芽細胞や歯根膜細胞を溶液中で生きたまま直接観察し、細胞外マトリックスの形成過程や基質小胞の放出・付着過程を詳細に解析する。さらに、本研究において温度制御ステージを導入することで、細胞を封入したホルダを 37 に維持し、より培養環境に近い状態で上記の放出過程をダイナミクスとして捉える。この改良により誘電率顕微鏡中の細胞は ± 0.2 の温度制御が可能となり、解像度の高い撮像における温度によるアーチファクト（温度ドリフト）を最小限に抑えることが可能となる。さらにより早い放出過程の変化を観察できるよう、撮像時間の高速化を進めることや、蛍光観察を同時に行えるよう誘電率顕微鏡内に光学顕微鏡を設置すること、等のさらなる改良を検討する。

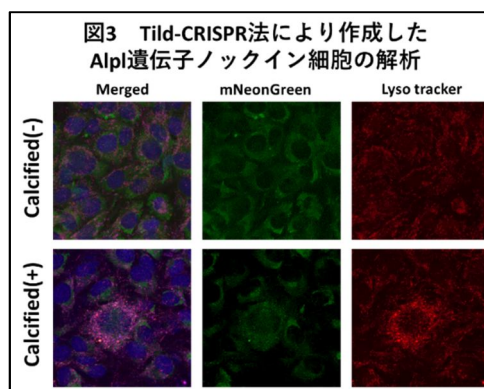
4. 研究成果

骨芽細胞と歯根膜細胞を対象とした基質小胞の形成・放出分子機構の解析および人工タグ導入による走査型電子誘電率顕微鏡の高機能化（大阪大学・村上グループ）

ゲノム編集技術を用いて基質小胞形成に関与する遺伝子群のノックアウト骨芽細胞クローンを作製した。このうち、3 遺伝子については、その相互作用を検討するために、ダブルノックアウト細胞を作製した。すべての細胞はシングルセルソーティングによりクローン化し、ストックを完了した。ゲノム編集部位近傍の PCR 産物のキャピラリー電気泳動によりノックアウト細胞のスクリーニングを行い、複数のクローンを樹立後、石灰化誘導培地中で培養、アリザリン染色により石灰化能を検討したところ、これまでの報告と一致して、*Alpl* ノックアウト細胞では石灰化物を全く形成しないことが確認された。一方で、基質小胞の形成に関与する *Ank* 遺伝子のようにノックアウト細胞の石灰化能は変化を認めない遺伝子（図 2）も多く同定され、基質小胞の形成は多因子により制御されていることが示唆された。本研究では、さらに侵襲性歯周炎の疾患感受性遺伝子のノックアウト細胞を樹立、解析するとともに、我々のこれまでの研究結果より、リソソームとミトコンドリアの関与が示唆されたことから、これらの分子の直接コンタクトに関与する遺伝子群をノックアウトした骨芽細胞クローンを作製した。同細胞の走査型電子誘電率顕微鏡観察の結果、リソソームとミトコンドリアの直接コンタクトが基質小胞の形成を制御していることが示唆された。



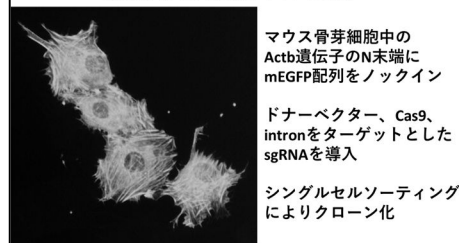
さらにオルガネラやコラーゲン等の細胞外基質に金属結合タンパク質を融合させたタンパク質を産生する細胞を作製するためのノックイン手法として、Tild-CRISPR 法を用いた。興味深いことに、*Alpl* 遺伝子に mNeonGreen 蛍光タンパク質を融合した細胞クローンにおいては、石灰化誘導培地で培養することで、*Alpl* 遺伝子がコードするアルカリフォスファターゼがリソソームに集積することが明らかとなった（図 3）。ノックアウト細胞の結果と合わせて、アルカリフォスファターゼの基質小胞形成における動態が明らかとなった。



ついで、成分分析法を応用した新規生細胞イメージング法の開発を目指し、ノックイン細胞の作製方法を改良し、ターゲット遺伝子ごとにドナーベクターの構築が必要な Tild-CRISPR 法に加えて、ユニバーサルなドナーベクターが利用可能であり、イントロンに人工タグや蛍光タンパク質を挿入する CRISPIE 法の骨芽細胞への応用を試みた（図 4）。ベータアクチンの N 末端に mEGFP タンパク質を融合させた骨芽細胞が予定通り作成され、トランスフェクション 2 日後の GFP 発現率が 2-10%であったことから、その組み換え効率は大変高いと考えられる。ドナーベ

クターは一度構築すると再作製が不要であり、標的イントロンに対するガイド RNA を作製するのみで新たなノックイン細胞の作製が可能となった。同手法を用いて、走査型誘電率顕微鏡用の人工タグを mEGFP と同時に発現させた細胞を樹立し、走査型電子誘電率顕微鏡による観察に供した。このように観察対象である細胞側の改良により、走査型電子誘電率顕微鏡の機能面からの改良が実現した。

図4 CRISPIE法によるオルガネラ標識骨芽細胞の作製例



改良型走査型誘電率顕微鏡の構築 (産総研・小椋グループ)

走査型電子誘電率顕微鏡自体の改良として、SEM 用ペルチェ加熱冷却ステージ Coolstage を温度制御ステージを導入し、至適撮影条件を検討した結果、解像度の高い撮像における温度によるアーチファクト (温度ドリフト) を最小限に抑えた上で、撮像時間を高速化したり、蛍光顕微鏡を組み合わせるなどの改良を実現した。さらに、走査型電子誘電率顕微鏡の観察結果について、蛍光顕微鏡やラマン共焦点顕微鏡と重ね合わせた改良型走査型電子誘電率顕微鏡を構築した。

これらの技術改良が実現したことにより、基質小胞以外の様々な微粒子の観察にも応用が可能となった。一例として、近年健康への影響が懸念される PM2.5 (微小粒子状物質) について、歯肉上皮細胞がどのように取り込み、細胞機能に影響を及ぼすかについて、検討した成果を論文発表した (Okada et al., *Sci Rep*, 2021, 8;11(1):228.)。歯肉上皮細胞培養中に北京の大気から採取した PM2.5 を添加し、同微粒子の細胞内動態について走査型電子誘電率顕微鏡観察を行った (図 5)。さらに PM2.5 の走査型電子誘電率顕微鏡観察像に、共焦点ラマンスペクトルを重ね合わせ、形態とラマンスペクトルの特徴とを合わせて解析することが可能となったばかりか、炭素 (C)、酸素 (O)、マグネシウム (Mg)、アルミニウム (Al)、シリコン (Si)、リン (P)、硫黄 (S)、塩化物 (Cl)、カルシウム (Ca) などの元素分析を組み合わせた多相的解析を応用することで、PM2.5 の細胞内挙動から元素レベルのマルチスケール分析を達成した。さらに、他の微粒子解析の例として、メラノサイト中のメラノソーム中に形成される微粒子であるメラニン色素についても同様の多相的な解析を行い、論文投稿準備中である。このように本研究結果により、細胞内の微粒子の働きを生細胞のまま多相的にナノレベル観察する手法が確立され、同手法は微粒子を介した様々な生命現象の解明に広く応用可能と期待される。

図5 歯肉上皮細胞中のPM2.5直接観察

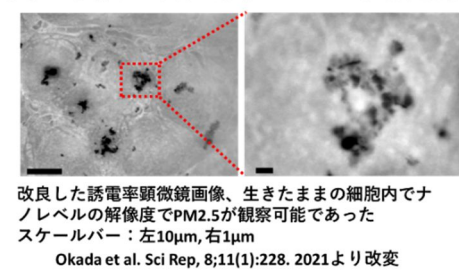
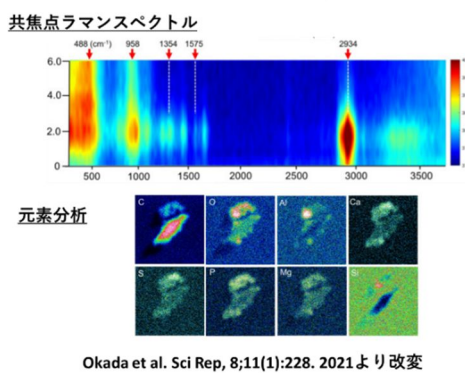
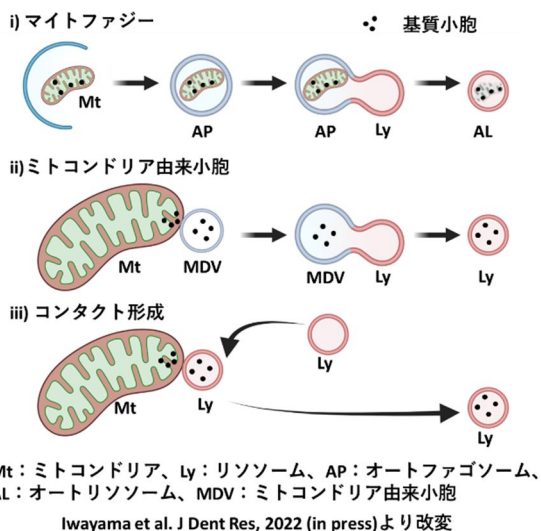


図6 歯肉上皮細胞中の多相的解析



また、基質小胞の形成過程については、残された課題を整理し、我々の研究を含む最新の研究結果から基質小胞の形成メカニズムについての仮説を提唱した総説論文を作成し、受理された。特にミトコンドリアとリソソームの相互作用による基質小胞形成においては、マイトファジー、ミトコンドリア由来小胞、直接コンタクト形成の3つの可能性が上げられ、本研究によりこのようなオルガネラ動態を解析するための技術開発が達成された (図 7)。

図7 基質小胞形成メカニズム (仮説)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okada Tomoko, Iwayama Tomoaki, Murakami Shinya, Torimura Masaki, Ogura Toshihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Nanoscale observation of PM2.5 incorporated into mammalian cells using scanning electron-assisted dielectric microscope	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80546-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iwayama Tomoaki, Sakashita Hiromi, Takedachi Masahide, Murakami Shinya	4. 巻 -
2. 論文標題 Matrix vesicle-mediated mineralization and potential application	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 T. Iwayama
2. 発表標題 Role of osteoblastic lysosome in mineralization
3. 学会等名 Japan Bone Academy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Iwayama T, Murakami S
2. 発表標題 Analyzing matrix vesicles in mineral-forming cells
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩山 智明 (Iwayama Tomoaki) (80757865)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	小椋 俊彦 (Ogura Toshihiko) (70371028)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員 (82626)	
研究分担者	柏木 陽一郎 (Kashiwagi Yoichiro) (20598396)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	山下 元三 (Yamashita Motozo) (90524984)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------