

氏名	高宮 留美子
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4930号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	骨芽細胞から形成されるコラーゲンの高詳細3次元解析
学位論文審査委員	山本 敏男 教授 松本 卓也 教授 上岡 寛 准教授

学位論文内容の要旨

骨組織は力学的負荷(メカニカルストレス)を強く受ける組織である。そのため、骨組織は様々なメカニカルストレスに適応できるように、硬くかつしなやかで、弾性に富んでいる必要があり、これらの機械的条件を満たすため、独自の複雑な層板構造をしている。骨組織の構造を解明する上で、これらを形作るコラーゲンの構造(コラーゲンネットワーク)や、コラーゲンの形成過程を知ることは非常に重要である。また、骨組織中では骨系細胞がマイクロサイズの細胞性ネットワークを形成しており、ナノサイズであるコラーゲンネットワークと互いに影響し合っていると考えられている。よって、これら両者を同時に観察することは非常に重要である。しかし、全く大きさの異なる細胞性ネットワークとコラーゲンネットワークを同時にかつ高詳細に観察することはこれまで技術的に困難であった。また、コラーゲン形成は骨芽細胞と骨基質の間という閉ざされた空間で行われていることや、骨芽細胞は常にコラーゲン形成を行っているわけではなく、ほとんど形成を行わない休止期骨芽細胞という面をもつことから、コラーゲンが骨芽細胞からどのように放出され、どのようにしてその走行方向が決められ、コラーゲンネットワークが形成されているかは未だに解明されていない。

そこで今回我々はまず最初に、骨組織中の細胞性ネットワーク及びコラーゲンネットワークを観察するため、近年新たに開発された直交型 FIB-SEM を用いた。直交配置型 FIB-SEM は FIB 装置による試料スライス断面の作製と SEM 装置による断面観察を繰り返すことで、数百枚もの SEM 像を連続的に撮影することができ、さらにコンピュータ上で加工することで立体的に再構築(シリアルミリング法)し、3次元的な構造解析を行うことが可能な装置である。また、一度の測定でマイクロサイズの撮影視野と、解像度の高いナノサイズの撮影視野を同時に得ることができる装置である。また、FIB 装置と SEM 装置が直交して配置されているため、従来の傾斜配置型 FIB-SEM に比較し、フォーカスやコントラストの良い SEM 像を得ることができる。今回、16 日齢ニワトリ胚頭蓋骨を試料とし、 $25 \times 25 \mu\text{m}$ の断面 SEM 像を 25nm ごとに連続して撮影し、コンピュータ上で加工し 3 次元再構築像を得た。これにより、骨組織中の細胞性ネットワークとコラーゲンネットワークを同時にかつ高詳細に観察できた。また、3 次元再構築像をコンピュータ上でさらに加工し、コラーゲン層をコラーゲンフィブリルとほぼ同等な 200nm 毎に z 軸方向に観察すると、各層においてコラーゲンの様相は全く異なり、その走行はランダムで秩序性に乏しいことが分かった。

次に、骨芽細胞のコラーゲン形成過程及びその走行方向を観察するため、超高圧電子顕微鏡及び電子トモグラフィ法を用いた。超高圧電子顕微鏡は、世界最高である常用 300 万ボルトの加速電圧を持つため、汎用 TEM の約 15 倍厚い試料を観察することができ、その解像度は数 nm と非常に高い。今回、16 日齢ニワトリ胚頭蓋骨を試料とし、 $0.7\mu\text{m}$ 及び $1.0\mu\text{m}$ 厚の超薄切片を作製し観察した。骨芽細胞は極性を持ちコラーゲン形成を行っていることを確認した。また、得られた連続断層像から、ソフトウェア Avizo を用いてコラーゲンを 1 本単位で輪郭抽出し 3 次元構築した。骨芽細胞から形成されたコラーゲンは細胞外形を沿うように骨基質側方向へ走行することが分かった。また、骨芽細胞内にコ

ラーゲン様構造物を認め、これらは筒状構造物に覆われていた。

今回、直交配置型 FIB-SEM を用いることで、骨の細胞を観察するに十分な広い領域と、コラーゲンを観察するに十分な解像度を備えたデータを取得し、3 次的に観察することができた。さらに、超高圧電子顕微鏡及び電子トモグラフィ法を用いることで、骨芽細胞のコラーゲン形成過程という従来観察が困難であった場面を高詳細に 3 次的に観察することができ、骨芽細胞のコラーゲン形成について新たな知見が得られた。

学位論文審査結果の要旨

骨組織は様々な力学的負荷(メカニカルストレス)に適応するため、独自の複雑な層板構造をしている。この構造を解明する上で、これらを形作るコラーゲン線維の構造(コラーゲンネットワーク)や、コラーゲン細線維の形成過程を知ることは重要である。また、骨組織中では骨系細胞がマイクロサイズの細胞性ネットワークを形成しており、またコラーゲンネットワークと互いに影響し合っているため、これら両者を同時に観察することは重要である。しかし、これまで技術的な問題からこれらの観察は困難で、コラーゲン分子が骨芽細胞からどのように放出され、その走行方向が決められ、コラーゲンネットワークが形成されるかについては明らかでない。

そこで本研究では、近年新たに開発された直交配置型 FIB-SEM を用い、16 日齢ニワトリ胚頭蓋骨を試料とし、骨組織中の細胞性ネットワークとコラーゲンネットワークを同時にかつ高詳細な 3 次元再構築像を得た。この方法によりコラーゲン層を z 軸方向に観察すると、各層においてコラーゲン細線維の様相は全く異なり、その走行はランダムで秩序性に乏しいことが分かった。

一方、超高圧電子顕微鏡及び電子トモグラフィ法を用い観察したところ、骨芽細胞内の細胞小器官の分布には極性があり、それに呼応してコラーゲン分子を放出する部位は、細胞小器官に富んだ部位であることが示された。さらに、得られた連続断層像を画像解析し、コラーゲン分子及びコラーゲン細線維 1 本単位で輪郭抽出し 3 次元構築したところ、これらは細胞外形を沿うように骨基質側方向へ走行することが分かった。また、骨芽細胞内の膜構造物中に線維状構造物が存在すること認められた。

以上の結果から、本研究において直交配置型 FIB-SEM を用いることで、骨構成細胞ならびにコラーゲン細線維を広範囲かつ高解像度を備えたデータを取得し、骨芽細胞とコラーゲン線維走行の関係を 3 次元的に明らかにすることができた。さらに、超高圧電子顕微鏡および電子トモグラフィ法を用いることで、骨芽細胞のコラーゲン細線維形成過程という従来観察が困難であった過程を高詳細かつ 3 次元的に観察することができ、骨芽細胞のコラーゲン細線維形成について新たな所見が得られた。これらの所見は骨形成機構を理解する上で重要と考えられる。

以上のことから、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。