

氏名	橋本 真奈
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5496号
学位授与の日付	平成29年3月24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 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	直交配置型 FIB-SEM を用いたコラーゲン細線維の三次元形態計測
論文審査委員	久保田 聡 教授      寺山 隆司 准教授      上岡 寛 教授

### 学位論文内容の要旨

コラーゲンネットワークは石灰化の足場として使われると同時にその立体的な配置が骨の強度に関与していることがいわれている。したがってコラーゲンネットワークを詳細に三次元的に観察することは重要であるが、従来の方法では困難であった。

そこで今回我々は、直交配置型 Focused Ion Beam ( FIB ) – Scanning Electron Microscope ( SEM ) を使用して、コラーゲンネットワークを三次元的に観察することとした。FIB-SEM 断層撮影法とは収束イオンビーム(FIB)による試料表層の切削と、その切削面の SEM 観察を繰り返すことで、電子顕微鏡レベルの高い分解能をもつ細胞や組織の三次元再構築を行うものである。この場合の SEM 観察とは表面の凹凸を見る形態観察ではなく、FIB によって切削した平面内の内部組織のコントラストを二次電子あるいは反射電子で観察するものである。本研究では FIB にガリウムイオンビームを用いた。加速され直径数 nm に収束されたガリウムイオンビームは未脱灰骨のような固い組織を数 nm の精度で任意の形状に切削・加工することが可能である。したがってナノサイズのコラーゲン細線維の 1 本 1 本から、マイクロサイズの骨系細胞までを広範囲に観察することが可能となった。

直交配置型 FIB-SEM を用いて、ニワトリ胚頭蓋骨の  $25 \times 25 \mu\text{m}$  の領域を  $25 \text{ nm/pixel}$  の高解像度で観察することができ、初期の石灰化像、骨芽細胞や骨細胞といった骨系細胞、およびその細胞内小器官、そしてコラーゲン細線維といった骨組織内部の詳細な観察が可能となった。

直交配置型 FIB-SEM で撮影した連続 SEM 像、はソフトウェア Amira を用いて三次元構築を行うことで、上記構造物の三次元的な観察が可能となった。

次に、ソフトウェア XTracing 拡張機能を用いて骨組織におけるコラーゲン細線維の自動抽出を行い、三次元的形態計測を行った。今回は骨梁の長軸方向を 90 度と規定し、コラーゲン細線維の走行角度により線維の色分けを行うことで、コラーゲン細線維の走向を視覚的にとらえることが可能となった。抽出したすべてのコラーゲン細線維の走行角度を計測し、骨梁の長軸方向と平行に走行するコラーゲン細線維の本数と有意差をもつコラーゲン細線維の走行角度を調べた結果、0 度～50 度、140 度～180 度方向に走行しているコラーゲン細線維が有意差をもつことがわかった。すなわち骨組織では多くのコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向と平行に走行していることがわかった。

さらに骨芽細胞層、骨芽細胞直下層、およびその深層にわけてそれぞれのコラーゲン細線維の三次元的形態計測を行うことで、骨の部位におけるコラーゲン細線維の詳細な走向解析を行うことが可能とな

った。その結果、骨芽細胞層では他の層と比較してコラーゲン細線維の走向の規則性は弱く、骨芽細胞直下層では骨梁の長軸方向にその走向の規則性が生じ始め、深層では規則性が非常に強く、そして骨梁の長軸方向と平行にほとんどのコラーゲン細線維が走行することがわかった。すなわち、コラーゲン細線維は骨芽細胞から放出された直後は走向の規則性が弱いものの、深層に向かうにつれて徐々に骨梁の長軸方向に集束して走行することが示唆された。

一方、骨細胞周囲の領域を限定して解析を行うことで、骨細胞周囲のコラーゲン細線維の走向を観察することができた。骨細胞周囲のコラーゲン細線維は部分的に束状に集束して走行しており、コラーゲン細線維の走行が疎な部位に細胞突起が伸びている様子が観察できたことから、コラーゲン細線維の走行は細胞突起には影響されないという可能性が示唆された。

今後は骨形成不全症や骨粗しょう症といったコラーゲン線維に関連する疾患をもつモデルマウスの骨組織の解析を行うことで、疾患による影響を骨組織内部の構造やコラーゲン細線維の走行といった骨基質の観点から探ることが可能になると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

これまで、骨組織におけるコラーゲン線維の重要性から、コラーゲン線維に関する多くの研究が行われてきた。しかしながら、従来の顕微鏡では解像度と観察範囲との間でトレードオフの問題が生じていたため、コラーゲンネットワークの詳細な三次元的解析は行われておらず、またコラーゲン線維と骨系細胞との関係に関する知見もほとんど得られていない。

そこで本研究では、高解像度に広範囲に骨組織の観察を行うことのできる、直交配置型 FIB-SEM を使用し、骨梁の長軸方向を規定することのできる、ニワトリ胚の頭蓋骨を解析している。

その結果、ニワトリ胚頭蓋骨の  $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$  の領域を  $25 \text{nm/pixel}$  の高解像度で観察することに成功し、骨芽細胞や骨細胞といった骨系細胞、コラーゲン細線維が集束化し束状構造をなした構造物、コラーゲン細線維 1 本 1 本、基質小胞、そして細胞内小器官といった骨組織内部の詳細な観察が初めて行われた。

直交配置型 FIB-SEM で撮影した連続 SEM 像は、Amira ソフトウェアを用いて三次元構築を行うことで、骨系細胞やコラーゲン細線維といった骨組織中の微細な構造物の三次元的観察を行うことが可能となり、そうした構造物の三次元的な位置関係を把握することができた。また、三次元再構築を行うことで、取得した断層面とは別の任意の断層面を観察することが可能となり、コラーゲン細線維の連続性を観察することもできた。

さらに XTracing 拡張機能ソフトを用いて骨組織におけるコラーゲン細線維の自動抽出を行い、コラーゲン細線維の三次元的形態計測を行っている。今回は骨梁の長軸方向を  $90$  度と規定し、コラーゲン細線維の走行角度により線維の色分けを行うことで、コラーゲン細線維の走向を視覚的にとらえることに成功している。その結果、骨組織ではコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向に多く走行していることが明らかになった。さらに、コラーゲン細線維は骨芽細胞から放出された直後や骨系細胞が周囲に多く存在する部位では走向の規則性が弱いものの、骨系細胞の少ない骨中心部に向かうにつれて徐々に骨梁の長軸方向に集束して走行することが示された。また、骨細胞周囲の領域に限定して解析を行うことで、骨細胞周囲のコラーゲン細線維は部分的に束状に集束して走行しており、コラーゲン細線維の走行が疎な部位に細胞突起が伸びている様子が観察されている。

今後はコラーゲン線維に関連する疾患をもつモデルマウスの解析を行うことで、疾患による影響を骨基質の観点から探ることが可能となり、新しい発見がもたらされることが期待される。

本論文は直交配置型 FIB-SEM を用いた新しいイメージング技術により従来では困難とされていた骨組織におけるコラーゲン細線維の三次元的観察、形態計測に成功している。したがって得られた所見は、骨の微細構造に関する新情報として貴重である。また、この新しい技術を応用することで、今後は様々な骨系疾患を骨基質の観点から明らかにすることが期待される。

よって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。