

氏名	国富 陽介		
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5705号		
学位授与の日付	平成30年3月23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	マウス頭蓋骨初期石灰化機構の検討		
論文審査委員	久保田 聡 教授	池亀 美華 准教授	中野 敬介 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年、生体機能や生体特性を模倣し工学や医療へ応用するバイオミメティクス(生体模倣)が注目されており、これに関連した新規材料や技術の開発が進んでいる。歯や骨など硬組織関連技術においても研究が進んでおり、骨組織の構成を模倣した材料の開発などが進められている。しかし、骨組織では模倣対象として長管骨など一軸配向を目指したものがほとんどであり、例えば頭蓋骨のように特異な扁平形状を示す骨を模倣したような材料は少ない。また、成熟した骨を模倣対象とすることがほとんどであり、初期石灰化を模倣した骨誘導材料は未だ開発されていない。これは初期石灰化をモノづくりの観点で理解する試みがあまりなされていないことがその要因の一つと考えられる。そこで本研究ではマウス頭蓋骨の初期石灰化について注目し、材料学的、形態学的、結晶学的手法と分子生物学的手法とを融合し、頭蓋骨初期石灰化メカニズムの理解を進めた。

【方法】

胎生13.5日から15.5日および出生後のICRマウス頭蓋骨を採取し、マイクロCT、組織学的染色、走査型電子顕微鏡(SEM)観察により初期石灰化開始時期ならびに部位の同定を行った。SEM観察により確認された初期石灰化領域における小胞様構造物に対して定量を行い、透過型電子顕微鏡(TEM)観察により詳細な構造を確認した。SEM観察により確認された石灰化領域の石灰化小球に対して定量を行うことで経時的な大きさの変化を評価し、さらに電子線回折により定性評価を行った。頭蓋骨の成長方向を垂直方向と水平方向に分類し、各方向における成長距離および成長速度を比較した。蛍光免疫染色により、初期石灰化領域における細胞と基質との関係性を精査した。

【結果】

マイクロCT、組織学的染色の結果から、頭蓋骨の骨発生は胎生14日頃にかけて開始し、初期石灰化は前頭骨および頭頂骨の最下部、眼窩上縁に相当する部位から頭頂部へ向かって進行することがわかった。SEM観察を通じて初期石灰化領域を特定することができ、初期石灰化部位ではコラーゲン線維のみ存在する領域、コラーゲン線維部に基質小胞様構造物が混在する領域、このコラーゲン線維、基質小胞様構造物の混在部にコントラストが明瞭な石灰化小球が存在する領域の3種類の領域が存在することが明らかとなった。確認された基質小胞様構造物の大きさを定量した結果、平均サイズは $0.013 \mu\text{m}^2$ であることがわかった。この石灰化領域でみられる小胞様構造物に対してTEM観察を行った結果、脂質二重膜様

構造物であることがわかった。また、初期石灰化部位で確認された石灰化小球に対して電子線回折を行った結果、ハイドロキシアパタイトであることがわかった。平均石灰化小球面積の定量比較を行った結果から、石灰化の進行に伴う石灰化小球の成長を確認することができた。石灰化小球の大きさは胎生14.5日において $0.10 \mu\text{m}^2$ から生後7日で $0.30 \mu\text{m}^2$ 、生後6週で $1.15 \mu\text{m}^2$ を示した。頭蓋骨の成長方向を垂直方向と水平方向に分類し、石灰化進行距離の定量を行った結果から、石灰化の進行速度は、垂直方向($3.0 \mu\text{m/day}$)と水平方向($1200 \mu\text{m/day}$)において顕著な差がみられることがわかった。採取した頭蓋骨組織に対して蛍光免疫染色を行った結果から、非石灰化領域ではconnexin 43を介した細胞間接着が認められていたが、石灰化領域では、connexin 43の発現が消失し、代わりに石灰化領域周囲のI型コラーゲンの沈着、さらにI型コラーゲンと細胞とが近くに存在していることがわかった。

【考察】

本研究を通じたマウス頭蓋骨初期石灰化の生物学的、材料学的な検討により、頭蓋骨初期石灰化部位および石灰化時期の同定に成功した。また、石灰化の開始にともなう経時的な石灰化小球の成長ならびに定性的変化を確認できた。頭蓋骨初期石灰化部位における骨芽細胞層間スペースの形成やこのスペースにおける石灰化過程の詳細な観察から、頭蓋骨における特異的な扁平形状の形成メカニズムとして細胞-細胞間ならびに細胞-基質間の相互作用変化が重要であることが示唆された。これらの理解を通じて、骨芽細胞とコラーゲンとの相互作用を制御することで初期石灰化起点を作り出す可能性や、扁平状の石灰化物を人工的に形成し拡大させるといった新しい骨再生方法の確立が期待できる。今後の研究としてこれらの可能性の実現を目指す予定である。

論文審査結果の要旨

現在、生体機能や特性を模倣し工学や医療へ応用するバイオミメティクスという技術が注目されており、これに関連した新規材料や技術の開発が進んでいる。歯や骨など硬組織においても応用が進んでおり、骨組織におけるバイオミメティクスとして骨組織の構成を模倣した材料の開発が進められている。しかし、頭蓋骨に特異的な扁平形状を示す材料や初期石灰化を模倣した骨誘導材料は未だ開発されていない。そこで本研究ではマウス頭蓋骨における石灰化開始部位を同定し、膜性骨化における初期石灰化メカニズムを詳細に解明するために微細構造学的、細胞生物学的検討を行った。

その結果、頭蓋骨の石灰化は胎生 14 日頃、前頭骨および頭頂骨の最下部、眼窩上縁に相当する部位において開始し、その後、頭頂部へ向かって進行することが示された。また、初期石灰化部位では細胞間スペースに、コラーゲン線維のみ存在する領域、コラーゲン線維部に基質小胞様構造物が混在する領域、コラーゲン線維、基質小胞用構造物の混在部に石灰化小球が存在する領域が観察された。初期石灰化部位で確認された石灰化小球に対して電子線回折を行った結果、ハイドロキシアパタイトと考えられる結晶構造の存在が示唆された。頭蓋骨石灰化の進行速度については、眼窩上縁の石灰化起始点から矢状縫合へ向かう進行速度が、同部位から髄膜および皮膚へ向かう、すなわち厚みを増す方向への進行速度に比較し、約 400 倍速いことがわかった。また、蛍光免疫染色により、非石灰化領域では connexin 43 の局在が認められたが、石灰化領域では認められなかった。さらに石灰化領域周囲において、I 型コラーゲンが細胞に近接して局在することが示された。これらの所見は、骨芽細胞相互のコネクソンによる細胞接着の解除が、I 型コラーゲン産生に先行することを示している。

本論文で示された結果は、コラーゲン線維と基質小胞で特徴づけられる初期石灰化領域が、骨芽細胞間において、主として矢状縫合方向へと拡大し、その結果、頭蓋骨のような扁平骨が形成されることを示している。それぞれの成長方向における石灰化進行速度が異なることは、骨芽細胞が膜状に配列することから考えて一見当然の現象のように見える。しかし、視点を変えて、なぜ頭蓋冠では骨芽細胞が膜状に層をなして配列するのかについて探究を深めることにより、骨の形態形成に関する根本的なメカニズムの解明に迫ることができる可能性があると考えられる。さらに、生体材料学的に本研究成果を基とし、コラーゲンと基質小胞との相互作用制御による初期石灰化起点部の創出や、扁平状石灰化物の人工形成など様々な新しい骨再生方法の開発も期待されうる。

以上から、本論文はマウス頭蓋骨初期石灰化機構の解明および初期石灰化起点の同定により、それら知見を応用した新規骨再生材料開発を行う上で重要な基礎となると考えられ、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。