

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
上岡 寛 印	研究計画に関わる全般的な指導
松本 卓也 印	研究内容、学位論文作製の指導
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 歯科矯正学分野	身分 大学院生	氏名 国富 陽介
論文題名 マウス頭蓋骨初期石灰化機構の検討		
<p>【緒言】</p> <p>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。</p> <p>【方法】</p> <p>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。</p> <p>【結果】</p> <p>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。この石灰化領域で見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</p>		

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($3.0 \mu\text{m}/\text{day}$)と水平方向($1200 \mu\text{m}/\text{day}$)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。