

マウス頭蓋骨初期石灰化機構の検討

国富 陽介

緒言

近年、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（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^{1, 2)}。歯や骨といった硬組織においてもその試みは進められており、骨組織に関する生体模倣としては骨芽細胞やコラーゲン、アパタイトの複合体やそれらの制御技術などが挙げられる^{3, 4)}。例えば、骨組織の構成を模倣した材料としてかねてからコラーゲン・アパタイト複合体は種々製作、検討されている⁵⁾。最近では長管骨における基質配列の模倣を目指し、アパタイトやコラーゲンなどの基質配列を制御した材料の開発もされている⁶⁾。さらには三次元的な細胞構築を再現した骨組織を作るといった組織工学的な生体模倣も進められている⁷⁾。

これらの模倣は成熟した骨組織を参考にしており、特にその理解のしやすさから長管骨などを模倣する研究がほとんどである^{8, 9)}。しかし、実際の骨組織は頭蓋骨のような扁平形状、腸骨のように特異形状を示す骨組織なども多く、その生体模倣は限られているのが現状である。また、これまでの骨組織における生体模倣では肉眼から光学顕微鏡でみえるサイズスケールでの模倣が多かったが、有機・無機基質を超微形態学的レベルで模倣することを目指した研究は少ないのが現状である^{10, 11)}。これらの理由として長管骨以外の骨組織において生体模倣の観点から骨組織形成メカニズムを検討する研究がこれまであまり進んでいなかったことが挙げられる。また、骨組織形成メカニズムの検討は形態

学、分子生物学、生化学、物理学、結晶学などの様々な領域において独自に進められてきているが^{12, 13)}、より高度な生体模倣を達成するには様々な分野を統合し理解していくことが必要である。

そこで本研究では頭蓋骨を研究ターゲットとして設定した。骨化の様式には膜性骨化と、軟骨内骨化の二種類の骨化様式が存在し^{14, 15)}、頭蓋骨の骨化は膜性骨化に分類される¹⁶⁾。この骨形成において、未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞が骨有機基質ならびに基質小胞を産生し、基質小胞性石灰化が起こる^{17, 18)}。また、血管の分布に従って網目状の骨梁が形成され骨組織が成長するとされている¹⁹⁾。しかし、この石灰化がどの部位から生じ、どのように初期石灰化核形成が生じ、初期結晶成長が進んでいくのか、あるいはどのように石灰化領域が拡大し成長していくのか、なぜ薄膜様の骨形態を示すのかなど不明な点が多い。本研究では、これら疑問の解決、ならびにそれらを基にした生体模倣の情報を獲得するため、骨細胞生物学、無機材料科学を融合し、頭蓋骨初期石灰化メカニズムの理解を進めた。

材料ならびに方法

1. 動物

胎生 13.5 日から 15.5 日までの胎生 ICR マウスをそれぞれ 30 匹、生後 7 日と 6 週齢の ICR マウス (Charles River Laboratories Japan, Kanagawa, Japan) をそれぞれ 3 匹用いた。骨形成部位を特定するため、カルセイン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 0.1 ml 安楽死半日前までに妊娠マウス腹部へ注入した。ジエチルエーテル (Sigma-Aldrich) を吸入麻酔薬として安楽死させ、妊娠マウスから胎児を取り出し、頭蓋骨を回収し実験に使用した。なお、この実験は岡山大学動物実験管理委員会の指針に従い、承認を得たうえで行った (承認番号: OKU-2016184、OKU-2015539、OKU-2014462)。

2. 組織学的観察

組織学的観察を行うため各種染色を行った。取り出した頭蓋骨を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (PFA) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) で 24 時間固定し、3 分間アリザリンレッド S (Sigma-Aldrich) により染色を行った。染色後、蒸留水で洗浄し、顕微鏡 (Biozero BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) 下で石灰化領域について観察を行った。石灰化領域について、ImageJ ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて定量を行った。

さらに、カルセイン染色による石灰化領域の観察のため、安楽死後胎児の頭部を回収し、蛍光実体顕微鏡 (SZX-12, Olympus, Tokyo, Japan) 下で検鏡を行った。

免疫組織学的観察では、頭蓋骨を PFA で固定した後、5%ヤギ血清 (Nacalai

Tesque, Kyoto, Japan)でブロッキングを行った。一次抗体は4°Cの条件下で一晩、二次抗体は室温で一晩反応させた。一次抗体には anti-Connexin 43 rabbit antibody(Abcam, Cambridge, UK)、anti-Type I collagen rabbit antibody (Abcam)を用い、ネガティブコントロールとして Rabbit IgG(Abcam)を一次抗体の代わりとして使用した。二次抗体には、Alexa Fluor 488 または 568 で標識された goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いた。核染色は Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate (Life Technologies)で行った。染色後の標本に対し、包埋剤(Super Cryoembedding Medium, Section-Lab Co. Ltd, Hiroshima, Japan)にて凍結包埋し、厚さ10 μ mの切片を作製し、蛍光顕微鏡(ZEISS Confocal Laser Scanning Microscope Model LSM780, ZEISS, Carl Zeiss Microscopy Co. Ltd, Tokyo, Japan)下で観察を行った。

3. エックス線マイクロコンピュータ断層撮影(micro-CT)

頭蓋骨の石灰化部位を観察するため、マイクロCT(SkyScan 1174 compact micro-CT, SkyScan, Aartselaar, Belgium)を用いたエックス線撮影を6.4 μ mの解像度で行った。撮影後、Nrecon and CTVol SkyScanソフトウェアを用いて三次元構築を行った。

4. 走査型電子顕微鏡観察

頭蓋骨を2%グルタルアルデヒド/2%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で24時間固定し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した。その後、3%フェロシアン化カリウム(Sigma-Aldrich)と4%四酸化オスミウム(TAAB Laboratories Equipment Ltd, Berkshire, UK)を混合した溶液を添加し1時間氷上で反応さ

せた。蒸留水で標本を洗浄した後、1%チオカルボヒドラジド水溶液(Sigma-Aldrich)を添加し室温で20分反応させた。さらに蒸留水で標本を洗浄した後、1%四酸化オスミウム水溶液(TAAB Laboratories Equipment Ltd)を室温で30分反応させた。標本をエタノールで脱水し、アセトン置換後、EPON812レジン(TAAB Laboratories Equipment Ltd)に包埋した。レジン包埋した標本をアルゴンイオンエッチング(SM-090101 Cross Section Polisher, JEOL, Tokyo, Japan)により初期石灰化領域相当部における冠状面に対して研磨を行い、オスミウムコーティングを実施した。加速電圧5 kVの条件下で走査型電子顕微鏡(FE-SEM: JSM-6701F, JEOL, Tokyo, Japan)にて観察を行った。

石灰化領域における結晶構造物の観察では、頭蓋骨を5分間6%次亜塩素酸ナトリウム(Commercial Kitchen Wide Haiter, Kao Professional Service Co. Ltd, Tokyo, Japan)に反応させ有機物の融解を行った。処理した標本をエタノールにより脱水し、オスミウムコーティングを実施し加速電圧5 kVの条件下で走査型電子顕微鏡にて観察を行った。

走査型電子顕微鏡観察により観察された石灰化領域や結晶構造物の大きさについてはImageJソフトウェア(NIH)を用いて定量を行った。

5. 透過型電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡観察の際使用したレジンブロックをさらにダイヤモンドナイフにより厚さ80 nmに薄切し、透過型電子顕微鏡(TEM: JEM-2100, JEOL)にて観察を行った。

電子線回折は、頭蓋骨回収後に5分間6%次亜塩素酸ナトリウム(Commercial Kitchen Wide Haiter, Kao Professional Service Co. Ltd)に反応させ有機物を融解し、残存無機物を粉碎した状態としたうえで透過型電子顕微鏡を用

いて行った。

6. 統計解析

各条件に対して試料の数値を測定し、得られた定量結果の二群間比較については Student' s t-test を用いた。なお p 値 0.05 以下を統計的有意差有りとして扱った。

結果

1. マウス頭蓋骨初期石灰化時期および部位の同定

マウス頭蓋骨初期石灰化時期および部位同定のため、胎生マウスから頭蓋骨のみを回収し、アリザリンレッド S 染色およびマイクロ CT 撮影を行った(図 1A に観察部位の模式図を示す)。アリザリンレッド S 染色の結果、胎生 13.5 日では頭蓋骨における石灰化は認められなかったが、胎生 14.5 日においては前頭骨および頭頂骨相当部において初期石灰化が確認され、さらに胎生 15.5 日では頭頂部へ向かう石灰化の進行を確認することができた(図 1B)。また、マイクロ CT 所見からも胎生 13.5 日から 14.5 日にかけて石灰化の開始を確認することができた(図 1C)。これらのことから、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明らかとなった。

2. 初期石灰化メカニズムの検討

初期石灰化部位における石灰化物と細胞および基質との関係性を精査するため、胎生 14.0 日のマウス頭蓋骨初期石灰化部位の冠状面について走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、初期石灰化部位では線維状構造物が存在する領域、線維状構造物と基質小胞様構造物が混在する領域、これらの構造物の混在部にさらにコントラストが明瞭な小球状構造物が存在する領域が存在することが明らかとなった(図 2A)。

走査型電子顕微鏡観察を通じて、細胞外領域で小胞様構造物が確認された(図 2B)。この小胞の面積について定量を行った結果、平均サイズは $0.013 \mu\text{m}^2$ であることが分かった(図 2C)。この石灰化領域でみられる小胞に対して透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った結果、二重膜を持つ構造物であることがわかった

(図 2D)。また、頭蓋骨を 6%次亜塩素酸ナトリウムに反応させ有機物の融解を行い、走査型電子顕微鏡を用いて石灰化領域を観察した結果、アパタイト様結晶構造物が確認された。さらにこの結晶構造物に対して電子線回折を実施し、電子線回折パターンを解析したところ、これまでに報告されているヒドロキシアパタイトの電子線回折パターンに帰属することが明らかとなり²⁰⁾、観察された結晶構造物はヒドロキシアパタイトであることが分かった(図 2E)。

3. 結晶構造物の経時的変化の検討

有機物を融解した頭蓋骨サンプルで確認された結晶構造物に対して定量および定性評価を行うことで、結晶構造物の経時的変化について検討した。胎生 14.5 日、15.5 日、生後 7 日および 6 週齢の頭蓋骨に対して、次亜塩素酸処理により有機物を融解し残存した無機物について走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。観察の結果、各ステージの石灰化領域においてアパタイト様構造物が確認でき、電子線回折の結果からヒドロキシアパタイトを同定することができた(図 3A)。さらにこの結晶構造物の平均サイズの定量比較を行った結果から、平均サイズは胎生 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、石灰化の進行に伴う結晶の成長を確認することができた(図 3B)。

4. 初期石灰化進行過程の検討

石灰化部の拡大に着目し、石灰化物の成長方向を頭蓋骨の広がりに関与する石灰化起始点から矢状縫合へ向かう方向(Horizontal)と、頭蓋骨の厚みに関与する石灰化起始点から髄膜および皮膚へ向かう方向(Vertical)に分け(図 4A)、成長距離と成長速度の定量を行った(図 4B、C)。定量の結果、胎生 14.5 日から

15.5 日にかけての石灰化起始点から矢状縫合へ向かう方向の平均成長速度は約 1200 $\mu\text{m}/\text{日}$ であったのに対し、石灰化起始点から髄膜および皮膚へ向かう方向では約 3.0 $\mu\text{m}/\text{日}$ であった。これらのことから、頭蓋骨の成長速度は石灰化起始点から矢状縫合へ向かう方向の方が石灰化起始点から髄膜および皮膚へ向かう方向と比較して有意に大きく、約 400 倍速いことが明らかとなった。

5. 免疫組織化学的検討

石灰化領域における骨芽細胞同士の関係を理解するため採取した頭蓋骨組織に対して蛍光免疫染色を行った。ここでは特に細胞間接着の指標の一つとして Connexin 43 ならびに石灰化領域周囲の基質の存在の確認のため I 型コラーゲンの免疫活性の局在を検出した。非石灰化領域では細胞間で Connexin 43 の局在が認められていたが、石灰化領域と細胞が接する部位における Connexin 43 の局在は消失しており (図 4D)、代わりに石灰化領域周囲の I 型コラーゲンの局在、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を認めた (図 4E)。

考察

マウス頭蓋骨初期石灰化については、これまで各領域において様々なアプローチが行われている。例えば、ラマン分光法を用いた初期石灰化時期の同定においては、胎生 15.5 日から石灰化が開始することが報告されている¹²⁾。一方で、詳細な石灰化開始部位については不明瞭な点が多い。そこで、マウス頭蓋骨初期石灰化メカニズムの理解を目的とした本研究では、まず頭蓋骨初期石灰化時期ならびに部位の特定を行った。その結果、初期石灰化は胎生 14 日頃開始することが分かり、さらに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分かった。本研究結果より、これまで報告されていた初期石灰化開始時期と比較し、早期に石灰化が開始することが明らかとなり、さらに前頭骨と頭頂骨という 2 か所に石灰化起始点が存在するという新しい知見を示すことができた。胎生 13.5 日において初期石灰化は認められなかったが、予備実験において前頭骨ならびに頭頂骨に相当する部位において高いアルカリフォスファターゼ活性 (ALP 活性) を確認している。ALP 活性と石灰化への関与について、ピロリン酸の分解によるリン酸供給が石灰化形成促進に働いており、ALP 活性はそのピロリン酸の加水分解を引き起こすことがこれまでの研究で報告されている^{21,22)}。そのため、頭蓋骨初期石灰化が前頭骨、頭頂骨の特定領域から開始する要因として、この特定部位における高い ALP 活性が関与している可能性が示唆された。一方で前頭骨および頭頂骨の二点において他の部位に先行して ALP 活性が認められる機序については明らかに出来ておらず、今後の研究を通じてこれらの解明に努めたい。

次に走査型電子顕微鏡により初期石灰化部位の詳細な観察を行った。観察の結果から、初期石灰化領域では線維状構造物が確認された。これまでに石灰化領

域においてコラーゲン線維が観察されることが報告されていることから²³⁾、今回の観察を通じて確認された線維状構造物はコラーゲン線維であることが示唆された。

また頭蓋骨初期石灰化領域においては、コラーゲン線維が存在する領域、コラーゲン線維周囲に基質小胞様構造物が存在する領域、さらにその基質小胞が石灰化し石灰化小球として存在する領域があることがわかった。これまでに、骨芽細胞とコラーゲン線維産生に関する検討において、初期石灰化部の骨芽細胞からコラーゲン線維が放出されることが観察されている²⁴⁾。本研究においても蛍光免疫染色結果から、石灰化領域周囲に存在する骨芽細胞の存在や、細胞間の間隙においてコラーゲン線維の存在する領域を確認できた。

また細胞膜付近を観察した走査型電子顕微鏡像から、細胞周囲に多数の小胞が分布する所見が得られた。これまでに石灰化に先立ち骨芽細胞から小胞が出芽されることが報告されていることから²⁵⁾、今回石灰化領域で認められた小胞も細胞から出芽されたものと考えられる。また、これら小胞の平均サイズはこれまで報告されている基質小胞の大きさと近似している^{26, 27)}。さらに基質小胞は二重膜を持つことから^{28, 29)}、透過型電子顕微鏡像において二重膜構造が観察されたこの細胞間空隙の小胞は、基質小胞であることが示唆された。透過型電子顕微鏡による石灰化領域の観察から結晶構造物の存在が確認されており、走査型電子顕微鏡像ならびに電子線回折からハイドロキシアパタイトの同定に成功した。なお、石灰化領域で確認された結晶は経時的に成長することも今回の定量比較で明らかとなった。以上のことから、頭蓋骨初期石灰化では、まず細胞からコラーゲン線維の放出が起こり、細胞から小胞が出芽され、基質小胞を元にした結晶成長が起こることで進行することが確認された。

初期石灰化進行過程について検討したところ、石灰化起始点から矢状縫合へ

向かう方向が石灰化起始点から髄膜および皮膚へ向かう方向と比較して約 400 倍成長速度が速いことがわかった。頭蓋骨の特徴的な形態である扁平形状はこの成長速度の差が生じることで形成される可能性がある。これを検証するため蛍光免疫染色を実施し、石灰化物とコラーゲン、細胞、各々の相互作用について検討した。その結果、初期石灰化開始時において、まず細胞間でのコネキシンの発現が消失し、細胞間が基質で満たされること、これは骨芽細胞からのコラーゲン産生に依存していることが考えられた。また、この細胞からの基質の分泌は細胞同士が互いに面している方向に向かってなされ、その結果細胞が離れることにより細胞間に扁平状のスペースが形成され、このスペースを埋める形で石灰化が進むことで最終的に扁平な形状の骨が形成されることが示唆された。細胞と細胞外基質の接着は、骨芽細胞の分化や増殖に関与するシグナル伝達など骨形成において中心的な役割を果たすことがこれまでに報告されており^{30,31)}、頭蓋骨膜性骨化においてもそれは重要な役割を果たすと考えられる。

様々な生体模倣 (バイオミメティクス) 技術を構築し骨組織形成を制御することは、これまでにない新しい硬組織治療技術の開発や、発生や形態形成を理解するためのツール開発などにおいて重要である。今回の研究を通じて、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を詳細に理解することができた。これらのことより本研究成果を基とすることで、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可能性が示唆された。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。

結論

マウス頭蓋骨初期石灰化は胎生 14 日頃に、前頭骨および頭頂骨の最下部、眼窩上縁付近から開始する。この初期石灰化は、細胞からのコラーゲン線維放出、この部位への細胞からの基質小胞放出、基質小胞を元にした結晶成長という 3 段階により進行する。この初期石灰化は細胞同士が互いに面している方向に向かい基質を分泌し、その結果生じる細胞の離開に伴い細胞間に扁平状のスペースが形成され、このスペースを埋める形で石灰化が進行することで最終的に扁平な形状の骨が形成されることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導と御校閲を受け賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野上岡寛教授、生体材料学分野松本卓也教授、ハラ・エミリオ・サトシ助教に謹んで感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、多くのご援助、ご協力を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野、生体材料学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Pati F., Ha DH., Jang J., Han HH., Rhie JW., Cho DW.: Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration., *Biomaterials.*, **62**, 164-75, 2015.
2. Hwang J., Jeong Y., Park JM., Lee KH., Hong JW., Choi J.: Biomimetics: forecasting the future of science, engineering, and medicine., *Int J Nanomedicine.*, **10**, 5701-5713, 2015.
3. Fernandez-Yague MA., Abbah SA., McNamara L., Zeugolis DI., Pandit A., Biggs MJ.: Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomachanical strategies., *Adv Drug Deliv Rev.*, **84**, 1-29, 2015.
4. Kang Y., Ren L., Yang Y.: Engineering vascularized bone grafts by integrating a biomimetic periosteum and β -TCP scaffold., *ACS Appl Mater Interfaces.*, **6**, 9622–9633, 2014.
5. Tsai SW., Hsu FY., Chen PL.: Beads of collagen-nanohydroxyapatite composites prepared by a biomimetic process and the effects of their surface texture on cellular behavior in MG63 osteoblast-like cells., *Acta Biomater.*, **4**, 1332-1341, 2008.
6. Matsumoto T., Sasaki J., Alsberg E., Egusa H., Yatani H., Sohmura T.: Three-Dimensional Cell and Tissue Patterning in a Strained Fibrin Gel System., *PLoS ONE.*, **2**, e1211, 2007.
7. Sasaki J., Matsumoto T., Egusa H., Nakano T., Ishimoto T., Sohmura T., and Yatani H.: In vitro engineering of transitional tissue by patterning and functional control of cells in fibrin gel., *Soft Matter.*, **6**, 1662-1667, 2010.
8. Saunders MM., Simmerman LA., Reed GL., Sharkey NA., Taylor AF.:

- Biomimetic bone mechanotransduction modeling in neonatal rat femur organ cultures: structural verification of proof of concept., *Biomech Model Mechanobiol.*, **9**, 539-50 ,2010.
9. Sathi GA., Kenmizaki K., Yamaguchi S., Nagatsuka H., Yoshida Y., Matsugaki A., Ishimoto T., Imazato S., Nakano T., Matsumoto T.: Early initiation of endochondral ossification of mouse femur cultured in hydrogel with different mechanical stiffness., *Tissue Eng Part C Methods.*, **21**, 567-75, 2015.
 10. Bao X., Zhu L., Huang X., Tang D., He D., Shi J., Xu G.: 3D biomimetic artificial bone scaffolds with dual-cytokines spatiotemporal delivery for large weight-bearing bone defect repair., *Sci Rep.*, **7**, 7814, 2017.
 11. Figliuzzi MM., De Fazio R., Tiano R., De Franceschi S., Pacifico D., Mangano F., Fortunato L.: Histological evaluation of a biomimetic material in bone regeneration after one year from graft., *Ann Stomatol (Roma).*, **5**, 103-7, 2014.
 12. Tarnowski CP., Ignelzi MA Jr., Morris MD.: Mineralization of developing mouse calvaria as revealed by Raman microspectroscopy., *J Bone Miner Res.*, **17**, 1118-26, 2002.
 13. Park SS., Kim KA., Lee SY., Lim SS., Jeon YM., Lee JC.: X-ray radiation at low doses stimulates differentiation and mineralization of mouse calvarial osteoblasts., *BMB Rep.*, **45**, 571-6, 2012.
 14. Berendsen AD., Olsen BR.: Bone development., *Bone.*, **80**, 14-18, 2015.
 15. Hoshi K., Kemmotsu S., Takeuchi Y., Amizuka N., Ozawa H.: The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen

- fibrils., *J Bone Miner Res.*, **14**, 273-80, 1999.
16. Takarada T., Nakazato R., Tsuchikane A., Fujikawa K., Iezaki T., Yoneda Y., Hinoi E.: Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification., *Development.*, **143**, 211-8, 2016.
 17. Schmidt JR., Kliemt S., Preissler C., Moeller S., von Bergen M., Hempel U., Kalkhof S.: Osteoblast-released Matrix Vesicles, Regulation of Activity and Composition by Sulfated and Non-sulfated Glycosaminoglycans., *Mol Cell Proteomics.*, **15**, 558-72, 2015.
 18. Golub EE.: Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology., *Semin Immunopathol.*, **33**, 409-17, 2011.
 19. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明編著: 新骨の科学, 第2版, 医歯薬出版, 東京, 2016, 66-67 頁.
 20. Sudo H., Kodama HA., Amagai Y., Yamamoto S., Kasai S.: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria., *J Cell Biol.*, **96**, 191-8, 1983.
 21. Orriss IR., Arnett TR., Russell RG.: Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation., *Curr Opin Pharmacol.*, **28**, 57-68, 2016.
 22. Orimo H.: The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease., *J Nippon Med Sch.*, **77**, 4-12, 2010.
 23. Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E., Hongo H., Tsuboi K., Kudo A., Abe M., Yoshida T., Nagai T., Khadiza N., Yokoyama A., Oda K., Ozawa H., de Freitas PHL., Li M., Amizuka N.: Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization., *Jpn Dent Sci Rev.*, **53**, 34-45, 2017.

24. Hosaki-Takamiya R., Hashimoto M., Imai Y., Nishida T., Yamada N., Mori H., Tanaka T., Kawanabe N., Yamashiro T., Kamioka H.: Collagen production of osteoblasts revealed by ultra-high voltage electron microscopy., *J Bone Miner Metab.*, **34**, 491-9, 2016.
25. Shapiro IM., Landis WJ., Risbud MV.: Matrix vesicles: Are they anchored exosomes?., *Bone.*, **79**, 29-36, 2015.
26. Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E., Hongo H., Tsuboi K., Kudo A., Abe M., Yoshida T., Nagai T., Khadiza N., Yokoyama A., Oda K., Ozawa H., de Freitas PHL., Li M., Amizuka N.: Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization., *Jpn Dent Sci Rev.*, **53**, 34-45, 2017.
27. Golub EE.: Role of matrix vesicles in biomineralization., *Biochim Biophys Acta.*, **1790**, 1592-8, 2009.
28. Anderson HC.: Matrix vesicles and calcification., *Curr Rheumatol Rep.*, **5**, 222-6, 2003.
29. Wuthier RE., Lipscomb GF.: Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification., *Front Biosci (Landmark Ed).*, **16**, 2812-902, 2011.
30. Hidalgo-Bastida LA., Cartmell SH.: Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering., *Tissue Eng Part B Rev.*, **16**, 405-12, 2010.
31. García AJ., Keselowsky BG.: Biomimetic surfaces for control of cell adhesion to facilitate bone formation., *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, **12**, 151-

62.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯科矯正学分野

(指導：上岡 寛教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体材料学分野

(委託：松本 卓也教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 37 回日本炎症・再生医学会 (2016 年 6 月、京都)

第 5 回日本バイオマテリアル学会中四国ブロックシンポジウム (2017 年 1 月、徳島)

第 16 回日本再生医療学会総会 (2017 年 3 月、宮城)

図の説明

図 1. マウス頭蓋骨初期石灰化時期、部位の同定

- (A) マウス頭蓋骨の模式図を示す。点線で囲まれた領域は頭蓋骨相当部を示す。斜線部はそれぞれ頭蓋骨における前頭骨および頭頂骨に相当する部位を示す。
- (B) 頭蓋骨のアリザリンレッド S 染色所見を示す(* : 前頭骨における石灰化領域、☆ : 頭頂骨における石灰化領域、スケールバー : 500 μm)。
- (C) 頭蓋骨のマイクロ CT 像を示す (観察方向は図 1B と同様)。

図 2. 初期石灰化メカニズムの検討

- (A) 頭蓋骨初期石灰化部位冠状面の走査型電子顕微鏡像を示す。
- (a) 線維状構造物が存在する領域を示す(点線 : 細胞と細胞外領域の境界、* : 細胞外領域、スケールバー : 1 μm)。
- (b) 線維状構造物と小胞様構造物が混在する領域を示す(点線 : 細胞と細胞外領域の境界、* : 細胞外領域、スケールバー : 1 μm)。
- (c) コントラストが明瞭な小球状構造物が存在する領域を示す(点線 : 細胞と細胞外領域の境界、* : 細胞外領域、スケールバー : 1 μm)。
- (B) 頭蓋骨初期石灰化部位冠状面の走査型電子顕微鏡像を示す(点線 : 細胞と細胞外領域の境界、矢印 : 細胞外領域にみられる小胞様構造物、スケールバー : 1 μm)。

- (C) 細胞外領域にみられる小胞様構造物面積の定量結果をグラフに示す。
- (D) 細胞外領域にみられる小胞様構造物の透過型電子顕微鏡像を示す(スケールバー : 50 nm)。
- (E) 次亜塩素酸ナトリウム処理により頭蓋骨の有機物を融解し、残存した無機物に対して走査型電子顕微鏡観察および定性評価を行った。
- (a) 走査型電子顕微鏡像を示す(スケールバー : 1 μm)。
- (b) 電子線回折所見を示す。

図 3. 結晶構造物の定量、定性解析

- (A) 胎生マウスから 6 週齢のマウスにおいて、次亜塩素酸ナトリウム処理後の頭蓋骨に対する走査型電子顕微鏡観察および定性評価を行った。
- (a、d) 走査型電子顕微鏡像を示す(スケールバー : 2 μm)。
- (b) (a) 白枠の拡大像を示す(白枠内の面積を計測することで定量評価を行った、スケールバー : 1 μm)。
- (e) (d) 白枠の拡大像を示す(白枠内の面積を計測することで定量評価を行った、スケールバー : 1 μm)。
- (c、f) 電子線回折所見を示す。
- (B) 走査型電子顕微鏡観察で確認された結晶構造物面積の定量結果をグラフに示す。

図 4. 経時的な石灰化進行過程および初期石灰化領域における細胞生物学的検討

(A) 前頭骨部の石灰化領域について石灰化起始点から髄膜および皮膚へ向かう方向 (V) と石灰化起始点から矢状縫合へ向かう方向 (H) に分類し、各方向における石灰化進行過程を観察した (矢印：成長方向)。

(a、c) アリザリンレッド S 染色像を示す (図 1B から転載、スケールバー：500 μm)。

(b、d) 走査型電子顕微鏡像を示す (スケールバー：5 μm)。

(B) 各方向における成長距離の定量結果をグラフに示す。

(C) 各方向における成長速度の定量結果をグラフに示す (Student' s t-test : ** : $p < 0.01$ $n=10$) 。

(D) 初期石灰化冠状断面における Connexin43 の蛍光免疫染色像を示す (* : 石灰化領域周辺の Connexin43 発現消失部位、☆ : 非石灰化領域における Connexin43 発現部位、スケールバー：10 μm)。

(緑) : Calcein、(青) : DAPI、(赤) : Connexin 43

(E) 初期石灰化冠状断面における Type I Collagen の蛍光免疫染色像を示す (* : 石灰化領域周辺の Type I Collagen 発現部位、スケールバー：10 μm)。

(緑) : Calcein、(青) : DAPI、(赤) : Type I Collagen