The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨芽細胞分化過程の顕微ラマンイメージング解析
Author(s)	橋本, 彩
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61756
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　橋　本　　彩　　）	
論文題名	骨芽細胞分化過程の顕微ラマンイメージング解析

論文内容の要旨

ラマン分光法は、試料から得られるラマン散乱光を検出・解析し、物質の同定や定量を行う分析手法である。光学顕微鏡とラマン分光装置を組み合わせて行う顕微ラマン分光法は、生物学分野や医学分野においても広く応用されている。骨芽細胞は、骨形成を担う細胞で、骨形成は骨芽細胞による石灰化過程から始まる。間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化過程、そして骨芽細胞による石灰化過程の研究は長年なされており、その機構に多くの生体分子が関与していることが明らかにされてきた。しかしながら、従来の生化学的アッセイには、侵襲性が高く同一組織の経時的解析ができない、培養皿内の全細胞の平均の評価となるため任意の微小領域に着目することが困難である、といった問題があるため、骨芽細胞分化過程や石灰化過程の網羅的な解明には至っていない。

本研究では、骨芽細胞による石灰化過程を経時的かつ単一細胞レベルで解析するために、顕微ラマン分光法を利用した。顕微ラマン分光法は、①散乱光を利用するため低侵襲である、②顕微鏡と組み合わせているため高分解能である、③ラベルフリーで標的分子を検出可能である、といった利点を有しており、骨芽細胞分化過程・石灰化過程を経時的に解析することが原理的に可能である。さらに、骨の主成分であるハイドロキシアパタイト(HA)から得られるラマン散乱光は非常に強度が強いため、骨組織の特異的検出も可能である。したがって、同法は、骨芽細胞の経時的解析を実行するのに適している。本論文では、顕微ラマン分光法を用いて、生体組織中の HA の特異的可視化や、骨芽細胞分化・石灰化過程の経時的解析、HA－I 型コラーゲン間の相互作用解析などに取り組んだ。

第一章では、本研究の背景・目的を含めた概要のほか、本論文を読むにあたり必要となる基礎知識について、“ラマン分光法”と“骨・歯の生化学”等に焦点を絞り述べた。第二章では、マウス間葉系幹細胞株 KUSA-A1 を骨芽細胞へ分化誘導し、その石灰化過程を顕微ラマンイメージングにより解析した。試料組織から得られる HA のν_1モードに帰属するラマン散乱光の強度に基づきラマンイメージを構築することで、石灰化部位の特異的可視化が可能であること実証した。第三章では、KUSA-A1 を骨芽細胞へ分化誘導し、4 時間毎にラマンイメージングを行なうことで、その石灰化過程を経時的に解析した。骨の主成分の HA のほか、β-カロテンやシトクロム *c* といった複数の骨形成関連分子の局在変化の観察に成功した。また、初期石灰化部位にβ-カロテンが局在することが示唆された。第四章では、KUSA-A1 を骨芽細胞へ分化誘導し、得られた骨芽細胞に対してラマンイメージングと免疫蛍光染色を行ない、骨芽細胞組織における HA の局在と骨基質タンパクの主成分である Ⅰ 型コラーゲンの分布の相関性の解析を行なった。I 型コラーゲンの分布が異なる組織の比較から、I 型コラーゲン分布の緻密さが、HA 分布の拡大に重要であることが示唆された。第五章では、アミノ酸および I 型コラーゲンを吸着させた HA のラマン分光測定と、フラグメント分子軌道(FMO)法による HA－アミノ酸間の相互作用解析から、それら有機質が HA のラマンバンドに及ぼす影響について調査した。ラマン分光測定および FMO 解析の両結果より、生体内における HA ラマンバンドの低波数シフトは、HA の周囲に存在する I 型コラーゲン等の骨基質タンパク質から受ける引力相互作用に起因すると推察された。第六章では、顕微ラマン分光法による同一ヒト歯根膜細胞の経時的解析を実現するための実験系の確立とその試行を行なった。本章で開発したポジショニングプレートを用いた実験系を利用することで、顕微ラマン分光法による同一ヒト歯根膜細胞の経時的解析に成功した。経時解析の結果、HA やシトクロム *c* などの複数種の生体分子のモニタリングに成功した。第七章では、本論文の研究内容を総括するとともに、今後の展望を述べた。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（橋本　彩　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	民谷　栄一
	副 査	教授	小林　慶裕
	副 査	教授	井上　康志
	副 査	教授	竹内　俊文（神戸大学大学院工学研究科）

論文審査の結果の要旨

本論文では、顕微ラマンイメージング法を利用し、骨芽細胞の分化過程・石灰化過程を経時的に解析することを目的として、骨の主成分であるハイドロキシアパタイト(HA)や関連するバイオマーカー分子の可視化を検討した。また HA と I 型コラーゲンやアミノ酸との相互作用解析などを行い、以下に示す結果を得ている。

(1) マウス間葉系幹細胞株 KUSA-A1 を骨芽細胞へ分化誘導し、その石灰化過程を顕微ラマンイメージングにより解析した。試料組織から得られる HA 中のリン酸イオンの対称伸縮振動モードに帰属するラマン散乱光の強度に基づき、石灰化部位の特異的可視化が可能であることを明らかにした。

(2) KUSA-A1 細胞を骨芽細胞へ分化誘導し、経時的にラマンイメージングを行なうことで、その石灰化過程を解析した。特に、骨の主成分の HA のほか、β-カロテンやシトクロム c といった複数の骨形成関連分子の局在と時間変化をラマンイメージング解析により明らかにした。すなわち、石灰化が起きる前にβ-カロテンが発現し、その後、シトクロム c が一時的に増大後に減少し始め、HA が発現した。こうしたβ-カロテンやシトクロム c の時系列変化と HA の発現の相関を本法により初めて明らかにすることができた。

(3) 骨芽細胞に対してラマンイメージングと免疫蛍光染色を行ない、骨芽細胞組織における HA の局在と骨基質タンパクの主成分である I 型コラーゲンの分布の相関性の解析を行なった。I 型コラーゲンの分布が異なる組織の比較から、I 型コラーゲン分布の緻密さが、HA 分布の拡大に重要であることが示唆された。

(4) アミノ酸および I 型コラーゲンを吸着させた HA のラマン分光測定と、フラグメント分子軌道(FMO)法による HA－アミノ酸間の相互作用解析から、HA のラマンバンドに及ぼす影響について検討した。その結果、生体内における HA ラマンバンドの低波数シフトは、HA の周囲に存在する I 型コラーゲン等の骨基質タンパク質から受ける引力相互作用に起因すると推察された。

(5) 顕微ラマン分光法による同一ヒト歯根膜細胞の経時的解析を実現するための実験系の確立について検討した。特に、開発したポジショニングプレートを用いた実験系を利用することで、顕微ラマン分光法による同一ヒト歯根膜細胞の経時的解析に成功した。

以上のように、本論文では顕微ラマンイメージング法を利用し、骨芽細胞の分化過程・石灰化過程の経時的な解析を可能としたもので、標識剤を必要とせず、細胞が生きた状態で分化過程をイメージング解析できることを明らかにしており、細胞機能解析を志向する応用物理学研究にも貢献するものである。よって本論文は博士学位論文として価値あるものと認める。