

課題番号 103

SEM-アレイトモグラフィーを利用した *in vivo* 破骨細胞分化の 3次元構造解析

[1] 組織

代表者：笹野 泰之
(東北大学 大学院歯学研究科)
対応者：高井 俊行
(東北大学 加齢医学研究所)
分担者：
中村 恵 (東北大学 大学院歯学研究科)
真柳 みゆき (東北大学 大学院歯学研究科)

研究費：物件費 3 万円

[2] 研究経過

(目的・概要)

破骨細胞は多核の巨細胞であり、帯状に集積した focal contact で骨表面の一部を取り囲んで隔離し、隔離した骨基質を細胞突起である波状縁を利用し活発に吸収する。破骨細胞は *in vitro* の実験系で、単核のマクロファージから分化するが、*in vivo* の骨発生過程における分化に関する知見は乏しく、また、その複雑な立体構造の詳細も不明である。

SEM-アレイトモグラフィーは、固定し樹脂包埋した生物試料から作製した連続切片を走査電子顕微鏡 (SEM) で観察し、その連続断層画像を統合して三次元構造の情報を得る新規の顕微鏡技術である。本研究計画では、マウスの胎生期骨発生過程を対象に、*in vivo* における破骨細胞の三次元構造の分化過程を SEM-アレイトモグラフィーで検討することを目的とした。

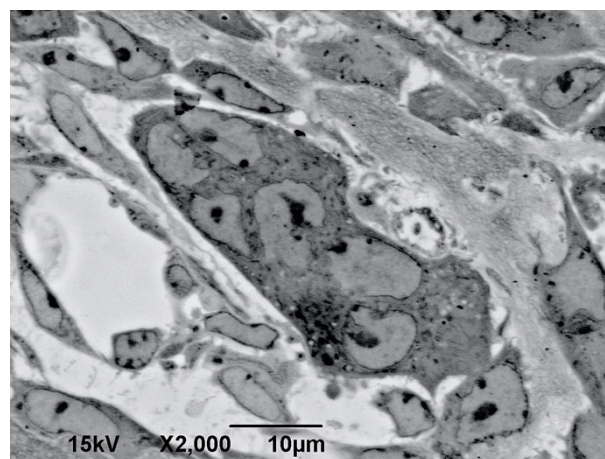
(方法)

妊娠 16 日の C57BL/6 マウスを深麻酔下に安楽死させ、マウス胎児の下顎骨を固定して樹脂包埋した。厚さ $1 \mu\text{m}$ の連続切片を作製して電子染色を施し、走査電子顕微鏡 (JSM-6390LA, JEOL) で観察し、写真を撮影し画像情報として保存した。保存した連続切片の画像情報を加齢医学研究所共通機器室が設置する AVIZO, Amira 3D 解析ソフト (Visualization Sciences Group) を用いて統合し、分化過程の破骨細胞の三次元形態を構築した。

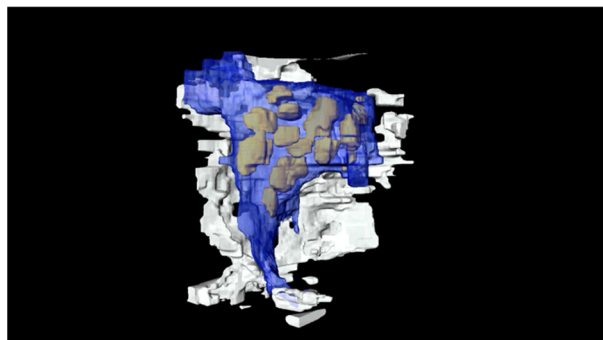
[3] 成果

(3-1) 研究成果

厚さ $1 \mu\text{m}$ の連続樹脂切片を作製することで、 $50\sim 100 \mu\text{m}$ の破骨細胞の端から端までの全体の形態と内部の構造を詳細に観察することが可能となった。この手法により、胎生期の骨発生過程における破骨細胞の3次元的な形態や集団としての破骨細胞の配置が明らかとなった。また、sealing zone 等の構造を三次元的に捉えることができた。本研究で、破骨細胞を対象とし、SEM-アレイトモグラフィーを利用した三次元構築技術を確立した。



(図1) 胎生 16 日齢マウス下顎骨発生過程の破骨細胞の走査電子顕微鏡反射電子像。



(図2) 胎生 16 日齢マウス下顎骨発生過程の破骨細胞の SEM-アレイトモグラフィーによる三次元像。
Blue: Osteoclast, Grey: Nuclei, White: Bone

加齢医学研究所（遺伝子導入研究分野）の高井教授とは、免疫系受容体分子群の破骨細胞分化における役割を解析することを目的として共同研究を実施中であり、本研究で確立された *in vivo* における破骨細胞の三次元構築技術を、免疫系受容体分子群変異における破骨細胞分化の形態解析法として活用することを目的とし、随時、メール等で研究打ち合わせを開催した。

（3-2）波及効果と発展性など

本研究で開発された三次元構築技術は、*in vivo* 破骨細胞の機能解析においても活用されることが期待される。

[4] 成果資料

Nakamura M, Aoyama N, Yamaguchi S, Sasano Y (2021) Expression of tartrate-resistant acid phosphatase and cathepsin K during osteoclast differentiation in developing mouse mandibles. *Biomedical Research-Tokyo* 42(1) 13-21, 2021

なお、本研究は、コロナ禍で研究活動が制限されたことにより進捗が遅れ、計画通りに研究成果を発表することはできなかった。