

## マイクロ CT 像と Light sheet 蛍光顕微鏡像の融合による 骨形成性毛細血管の 3D 可視化

### 3D Visualization of Osteogenic Capillaries in Mineralized Bone Tissue by Integrating Micro-CT with Light Sheet Fluorescence Microscopy Imaging

宮 彩子<sup>a</sup>, 黒田有希子<sup>b</sup>, 武田 佳彦<sup>c</sup>, 松尾 光一<sup>a, b</sup>  
Ayako Miya, Yukiko Kuroda, Yoshihiro Takeda and Koichi Matsuo

<sup>a</sup>慶應義塾大学医学部共同利用研究室 (中央機器管理部門)

<sup>b</sup>慶應義塾大学医学部細胞組織学研究室

<sup>c</sup>株式会社リガク X 線研究所 ナノ形状計測グループ

**要 旨** 高解像度で立体的に骨構造を捉える手段として、高分解能 X 線顕微鏡によるマイクロ・コンピュータ断層撮影 (CT) 法がある。一方、Light sheet 顕微鏡はマルチアングル蛍光顕微鏡であり、X 線マイクロ CT と同様に標本をホールマウントで観察し、非破壊的に 3 次元画像を取得できる。さらに X 線と蛍光の立体情報を融合させることにより、石灰化組織中の蛍光標識された分子の位置情報を視覚化できる。本研究では、「骨形成性毛細血管」と呼ばれる微小血管が豊富な耳小骨 (ツチ骨) に着目し、マイクロ CT 画像で得られる管腔構造と、トマト由来レクチンを用いた蛍光標識で得られる血管構造を 3 次元的に比較した。3 次元再構成原理の異なるふたつの手法で得られる画像の融合により、骨の軟部構造と石灰化構造を同時に 3 次元的に視覚化できることが示された。その具体的な手法と発展性について解説する。

キーワード：耳小骨, X 線顕微鏡, マイクロ CT, Light sheet, 血管

#### 1. はじめに：骨形成性毛細血管について

骨の内部には、毛細血管網が存在し、骨細胞などを栄養して骨代謝を支えている。それだけでなく、発生・成長過程で、血管は軟骨・骨の内部で重要な役割を果たす。すなわち多くの骨は、内軟骨性骨化によって、発生過程の軟骨が骨に置換されることで形成される。軟骨自体は無血管の組織であるが、終末分化を遂げた肥大軟骨細胞は血管侵入を受け、破軟骨細胞によって吸収され、骨芽細胞が分泌する骨基質で置き換えられる。近年、成長板の軟骨・骨移行部で、肥大軟骨に侵入する血管の機能・形態について理解が進んでいる<sup>1,2)</sup>。われわれは、成長せずに小さなサイズを保ったまま骨化する耳小骨 (ツチ骨, malleus) に着目し、内軟骨性骨化の過程を解析した<sup>3)</sup>。周囲に骨芽細胞が付着した、拡張した毛細血管が、生後 21 日目以降のマウスのツチ骨に存在することを見出し、毛細血管周囲に起こる骨形成が血管内腔を縮小させることで内軟骨性骨化を進行させることを発見した。この骨芽細胞を伴う毛細血管を骨形成性毛細血管 (osteogenic capillary) と呼ぶ<sup>3)</sup>。骨形成性毛細血管は、内軟骨性骨化の過程で軟骨に

侵入し、一旦拡張して、徐々に縮小していくダイナミックなものである。その経時的変化を立体的に記述することは、骨の発生・成長、さらに修復過程の理解に必要である。耳小骨内の毛細血管の解析は切片を主体としており、立体構築された血管走行の解析はほとんどなされていない。切片の情報では血管走行の全体を捉えることは困難である。加えて、X 線マイクロ CT で可視化される石灰化部位以外の「管腔構造」がそのまま血管腔ではないことに注意を要する。管腔構造の中には、血管以外にも破骨細胞、骨芽細胞、神経細胞など、X 線の吸収像に反映されにくいものが含まれるからである。

本研究では骨形成性毛細血管に富む、若いマウスのツチ骨に着目し、X 線により石灰化部位を、蛍光標識により毛細血管を可視化した。すなわち、X 線顕微鏡を用いたマイクロ CT 撮影により骨内の管腔構造を描出し、次に Light sheet 蛍光顕微鏡により、蛍光標識された毛細血管構造の 3 次元画像を取得し、これら 2 種類の画像を重ね合わせることが可能であることを示した。

#### 2. X 線マイクロ CT 撮影と X 線顕微鏡

骨の立体構造は、通常はマイクロ CT で観察されており、特に高い解像度の X 線顕微鏡は強力な解析手法である。標本を回転させることで X 線を多方向から照射し、対象物を透過した際の減衰率を多数の投影像から計算することによ

<sup>a</sup> 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35  
TEL: 03-5843-6203; FAX: 03-3353-0530  
E-mail: kmatsuo@keio.jp  
2016 年 4 月 21 日受付, 2016 年 5 月 16 日受理

り、積み重なった断面（スライス、輪切り）画像を再構成し、立体を構築する。骨などカルシウムを含む石灰化組織はX線を透過しにくいいため、画像上では白に近いグレースケールで表現され、X線を透過しやすい軟組織や空洞部分は黒に近いグレースケールで再構成される。通常の透過型のマイクロCT像では、石灰化領域以外の詳細が分からないため、他の手法による観察画像との併用が重要となる。解像度の高いX線顕微鏡は、SPring-8などの放射光施設で骨内構造の描出に用いられている<sup>4,5)</sup>。一方、近年、実験室レベルのX線顕微鏡も開発されており、本研究では、市販の高分解能X線顕微鏡で立体画像を取得した。

### 3. Light sheet 蛍光顕微鏡

Light sheet 蛍光顕微鏡は、マルチアングル蛍光顕微鏡とも呼ばれ、マイクロCTとは異なる手法で組織の3次元画像を取得できる顕微鏡である。従来用いられてきた蛍光観察法のひとつであるレーザー共焦点顕微鏡は、組織切片等のスライド標本を観察対象とし、ある1点にレーザーを照射してその点を走査させることで最終的に面の蛍光画像を生成する。ある1点の蛍光のみを励起するため、組織切片全体の蛍光画像を取得するためには、長いレーザー照射時間を必要とする。蛍光が弱い標本や退色しやすい標本の場合は、長時間のレーザー照射はダメージが大きい。また、標本の切片を作製しなければならず、元の形状を保ったまま観察することは困難であった。そこで、これらの問題を解決するために、Light sheet 蛍光顕微鏡という新しい手法の蛍光顕微鏡が開発された<sup>6)</sup>。

Light sheet 蛍光顕微鏡は、従来の蛍光顕微鏡と異なりレーザー照射位置と検出位置が垂直になっている（図1A）。また励起光が点ではなくシート状（平面）になっており、点でレーザーを照射するよりも標本への励起光の照射時間が短縮されている。シート状の励起光で焦点面の蛍光のみを励起することが出来るため、焦点面以外の蛍光を排除するようなピンホールによる調節も必要としない。このシート状の励起光の中で、標本を対物レンズに対して前後させることによって光学的にスライス画像を取得する。

標本は切片ではなくホールマウントで使用するため、標本の形状を壊すことなく観察でき、切片作製の手間が省け、観察後も処理方法を選ぶことで他の解析に供することが可能である。標本はゲルに包埋する他、シリンジに直接貼り付けてぶら下げる、溶媒を満たしたチューブ内に閉じ込めるなど、標本の形状・性質に適した方法を選択する。それらの標本はステージに固定するのではなく、水等の液体が満たされたチャンパーボックスにぶら下げ、標本を上下左右に移動させたり回転させたりすることで、あらゆる方向から観察できる（図1A）。溶媒として水だけでなく、培地や透明化試薬を満たしてもよい。数方向の角度から撮影することで、複雑な構造の立体標本で励起光が届かない部分があっても、他の角度から撮影することでその影部分を補うことができ画像の解像度が改善される。

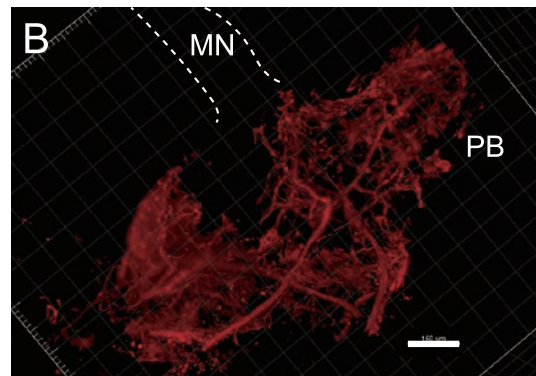
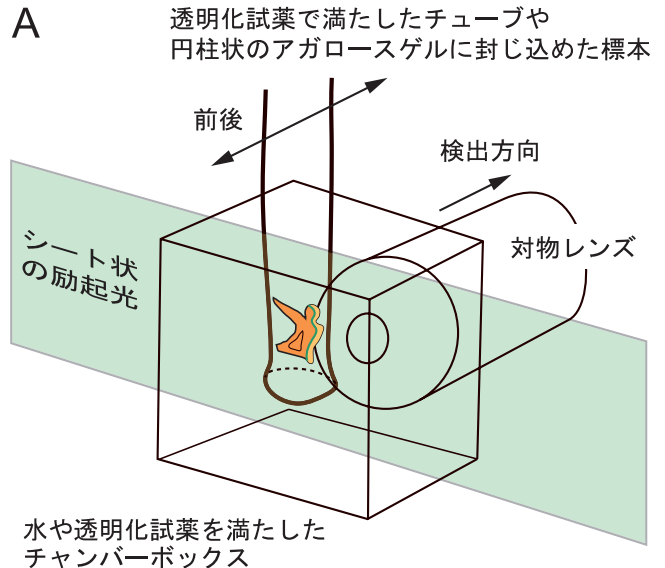


図1 Light sheet 蛍光顕微鏡の原理と骨内毛細血管

(A) Light sheet 蛍光顕微鏡の原理。液体を満たしたチャンパー内に観察したい標本（マウスのツチ骨）をゲルに包埋、もしくは直接つるし、対物レンズの正面にぶら下げる。対物レンズはドライのほか、チャンパーの窓をふさぐ形で水浸レンズも使用でき、励起光と垂直になる方向から検出する。シート状の励起光の中で標本を前後させることでZ-stack画像を取得する。標本はつるされているため、回転や上下させて自由な位置から観察できる。

(B) Light sheet 蛍光顕微鏡で観察した、マウスのツチ骨内の毛細血管（生後14日目）。DyLight 594色素でラベルされたトマト由来レクチンによる標識。

MN, manubrium ツチ骨柄（影になるので取り除いてあり、およその位置を破線で示した）。PB, processus brevis 短突起。スケールバー：150 μm。

多少厚みのある標本でも、Scale<sup>7)</sup>やCLARITY<sup>8)</sup>、CUBIC (clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis)<sup>9,10)</sup>といった透明化試薬に浸すことで内部構造を可視化できる。Scaleは様々な組織に適しており、屈折率を均一化し光の散乱を抑えることにより組織を透明化する、安価で手軽に活用できる尿素ベースの透明化試薬である。CLARITYは組織をハイドロゲルに置換することで組織を透明化し、特に脂質が多い組織、脳などを丸ごと透明化するの

に適している。しかし、脂質を除去するために電気泳動を必要としており、手間がかかることが難点である。CUBICは、血液中などの生体色素の脱色を促進する透明化試薬として開発され、生体色素を多く含む組織では効果的である。

しかし、透明化試薬は標本の縮みや歪みをもたらすことがあり注意が必要である<sup>11)</sup>。

#### 4. 実際の方法 (その 1) : Light sheet 蛍光顕微鏡を用いた毛細血管の観察

生後 14 日目の C57BL/6J マウスを用いた。セボフレン吸入麻酔下で、心臓右心耳を切開し、左心室から、流速 0.41 ml/分でリン酸緩衝塩類液 (PBS) を肝臓の赤味が薄くなるまで 5 分程度灌流した。1%パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS を 5 分間灌流し、1%ウシ血清アルブミン (BSA) /PBS を 2 分間流してブロッキングした後、赤色蛍光を発する DyLight 594 色素でラベルされたトマト由来レクチン (Vector Laboratories, カタログ番号 DL-1177) を 20  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で灌流し血管内壁を蛍光標識した<sup>12)</sup>。最後に 1% BSA/PBS で 2 分間灌流し洗浄した。その後、ツチ骨を摘出し、4% PFA で一晩浸漬固定した。

カルシウム成分を除去するために 10% EDTA/0.1 M Tris (約 pH 7) の EDTA 液中で一晩、脱灰を行った。脱灰後、PBS で洗浄し、市販の Scale である、SCALEVIEW-A2 (OLYMPUS) で一晩透明化した。SCALEVIEW-A2 を満たした fluorinated ethylene propylene (FEP) チューブに入れ、チューブごと水を満たしたチャンパー内につるした。Light sheet 蛍光顕微鏡 (Lightsheet Z.1, Carl Zeiss) を用いて 5 倍ドライレンズを用いて約 180 度ずつずらした 2 方向より、それぞれ手前から奥へ 6  $\mu\text{m}$  の厚さで 150 枚程度の画像を撮影した (0.934  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , 1920  $\times$  1920)。画像をソフトウェア ZEN (Carl Zeiss) で合成し 143 枚のスライス画像に統合した。さらに、画像解析ソフト IMARIS (BITPLANE) を用いてレンダリングした (図 1B)。細いもので直径 5  $\mu\text{m}$  程度、太いもので直径 15 ~ 20  $\mu\text{m}$  程度の毛細血管が可視化された (図 1B)。

#### 5. 実際の方法 (その 2) : マイクロ CT と Light sheet 蛍光顕微鏡の画像の重ね合わせ

##### 5.1 骨内管腔構造の可視化

生後 14 日目のマウスから、ツチ骨を「実際の方法 (その 1)」と同じ方法で摘出し、固定した。マイクロ CT 画像は、高分解能 X 線顕微鏡 CT (nano3DX, リガク) で撮影した。PBS で満たしたポリプロピレンチューブにツチ骨を入れ、1.06  $\mu\text{m}/\text{voxel}$  あるいは 2.13  $\mu\text{m}/\text{voxel}$  の条件で撮影した。高分解能 X 線マイクロ CT で取得したツチ骨のほぼ全体像では、ツチ骨柄 (MN, manubrium) の近くに、マウス特有の半球状の短突起 (PB, processus brevis) が認められた (図 2A)。短突起部分には、管腔構造や空洞部分が多数あることが分かった (図 2B)。それらの構造は多大な体積を占めており、生後 14 日目のマウスの耳小骨の石灰化がまだ進行途中で

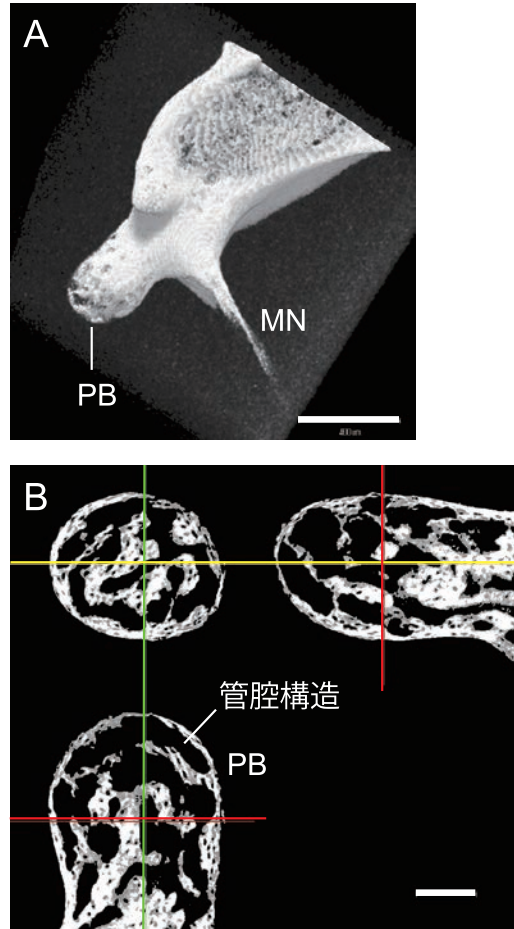


図 2 マイクロ CT によるツチ骨の断層画像

(A) 高分解能 X 線顕微鏡 CT で撮影した左ツチ骨全体のマイクロ CT 画像。内側面 (内耳側からみた面)。図の右方向が前 (マウスの吻側)。2.13  $\mu\text{m}/\text{voxel}$ 。

(B) ツチ骨短突起のマイクロ CT 像の XYZ 切断面 (緑色, 黄色, 赤色の断面) を示す。1.06  $\mu\text{m}/\text{voxel}$ 。石灰化組織 (高密度組織) は白に近いグレースケール, 管腔構造 (低密度組織) は黒に近いグレースケールで示されている。

MN, manubrium ツチ骨柄。PB, processus brevis 短突起。スケールバー : (A) 400  $\mu\text{m}$ , (B) 100  $\mu\text{m}$ 。

ることを示唆する。空洞として示された部分には、軟組織が含まれ血管のみならず骨芽細胞や破骨細胞などが存在しているため、血管の位置を特定するにはマイクロ CT 以外の情報が必要である。

##### 5.2 骨形成性毛細血管の構造の可視化

マイクロ CT 撮影後、実体蛍光顕微鏡 (Leica, M205FA) を用いて、明視野像と、DsRed フィルター (Excitation 545 nm/30, Emission 620 nm/60 BP) で蛍光像を撮影した (図 3AB)。蛍光が目立った退色は認められなかった (図 3B)。蛍光を確認したツチ骨を、10% EDTA/0.1 M Tris (約 pH 7) の EDTA 液中で一晩、脱灰した。1  $\mu\text{g/ml}$  の DAPI で一晩染色し PBS で洗浄した。1%低融点アガロースゲル (Lonza, カタログ番号 50101) に包埋したツチ骨を水中につるし、561 nm 励起で DyLight 594 の蛍光画像を、405 nm 励起で DAPI の蛍光画

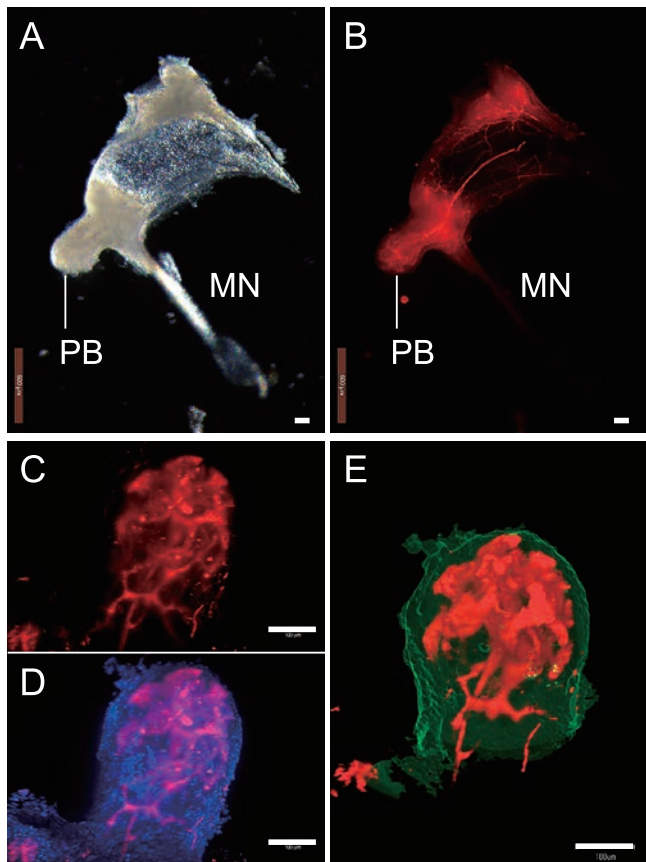


図3 ツチ骨内毛細血管の蛍光による可視化

(A) ツチ骨全体の明視野像。内側面（内耳側からみた面）。  
 (B) DyLight 594 でラベルされたトマト由来レクチンで標識された毛細血管の実体蛍光顕微鏡像。  
 (C) Light sheet 蛍光顕微鏡により撮影された短突起の毛細血管。解析ソフト ZEN の最大値投影法（Maximum Intensity Projection: MIP）で処理した画像。  
 (D) 毛細血管（C, 赤色）と核（青色, DAPI 染色）との重ね合わせ画像。  
 (E) Light sheet 蛍光顕微鏡によるスライス画像を解析ソフト TRI/3D-BON でレンダリングした画像。  
 赤, DyLight 594 色素でラベルされたトマト由来レクチンで標識した血管。緑, DAPI 画像をアウトライン化して作成した短突起の表層。MN, manubrium ツチ骨柄。PB, processus brevis 短突起。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。

像を Light sheet 蛍光顕微鏡を用いて取得した。20 倍の水浸レンズを用いて約 120 度ずつずらした 3 方向より、それぞれ手前から奥へ 2.13  $\mu\text{m}$  の厚さで 300 枚程度の画像を撮影した (0.23  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , 3198  $\times$  1920)。画像をソフトウェア ZEN (Carl Zeiss) で合成し 326 枚のスライス画像に統合した。

短突起部分には、蛍光標識された血管が赤色蛍光として観察された (図 3C)。核を染色した DAPI の画像との比較により、これらの血管が骨表層ではなく骨内部を走行していることが分かった (図 3DE)。ツチ骨短突起には太さの異なる血管が複雑に走行していること、太い毛細血管が多数存在していることが示された。

### 5.3 画像の重ね合わせ

マイクロ CT 像と Light sheet 蛍光顕微鏡像を重ね合わせるため、画像解析ソフト TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング) を用いて立体画像や XYZ 断面画像を作成し、Light sheet 画像とマイクロ CT 画像を 3  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  でそれぞれ表示して比較解析した。マイクロ CT 像と Light sheet 蛍光顕微鏡像の対応する断面を、同じ倍率で表示しながら XYZ 平面で重ね合わせた。DyLight 594 色素でラベルされたトマト由来レクチンで標識した構造 (赤) は、マイクロ CT により検出された管腔構造 (黒) の中にはほぼ納まった (図 4)。

## 6. 考 察

本研究では、マイクロ CT 撮影で構築された立体画像と、Light sheet 蛍光顕微鏡で得られた立体画像の重ね合わせが可能であることが示された。すなわち、骨内毛細血管が骨内管腔構造に含まれるという像が得られたことは、骨の中の様々な細胞や細胞外基質の立体構造をマイクロ CT と Light sheet 蛍光顕微鏡の両方を用いて解析できることを意味する。ひいては、骨の形態学的、発生学的解析力が高まることが期待される。

### 6.1 Light sheet 蛍光顕微鏡とマイクロ CT の融合

撮影で用いられる X 線は、直接的に蛍光分子を壊したり、蛍光分子の周囲にある水分子などをイオン化して生じた OH ラジカルなどが間接的に蛍光分子を損傷させたりする恐れがある。しかし、用いた条件では、マイクロ CT 撮影前後で、DyLight 594 色素の蛍光強度に目立った減弱はなく、まず生体で蛍光標識し、マイクロ CT 撮影後に脱灰して Light sheet 蛍光顕微鏡で蛍光観察することができた。

Light sheet 蛍光顕微鏡で得られた立体画像がマイクロ CT の立体画像と重ねられるかは、それぞれの方法で忠実な立体画像が得られるかどうか、また標本の処理の過程で標本が変形を起さないかどうかにかかっている。マイクロ CT 像に関しては、3 次元再構成の高い精度と再現性が確立されているものの、蛍光を用いる Light sheet 蛍光顕微鏡では、構造物が障害となり影が出たり、散乱によるボケや、蛍光が広がることの影響を大きく受けたりすることがある。そのため、1 方向からだけでなく、複数方向から観察したスライス画像の統合で、情報を補いながら 3 次元再構成を行う技術が用いられている。しかし、複数方向の画像を完全に一致させることができずボケを完全に除去することは難しい。

今回、少なくともマイクロ CT 撮影後に (透明化はせずに) 脱灰した標本を用いた場合には、マイクロ CT 画像と Light sheet 蛍光顕微鏡像との高い整合性が認められた (図 4)。同一標本を両手法で観察できることは大きな意義がある。今回行った立体画像の切り口の重ね合わせだけでなく、3 次元画像全体での重ね合わせを行うことが今後の課題である。

骨以外のイメージング、例えば蝸牛の微細構造<sup>13)</sup>、住血吸虫の幼生が脊髄内に感染している部位の可視化など<sup>14)</sup>、マイクロ CT と Light sheet 蛍光顕微鏡の両方を用いた解析が今

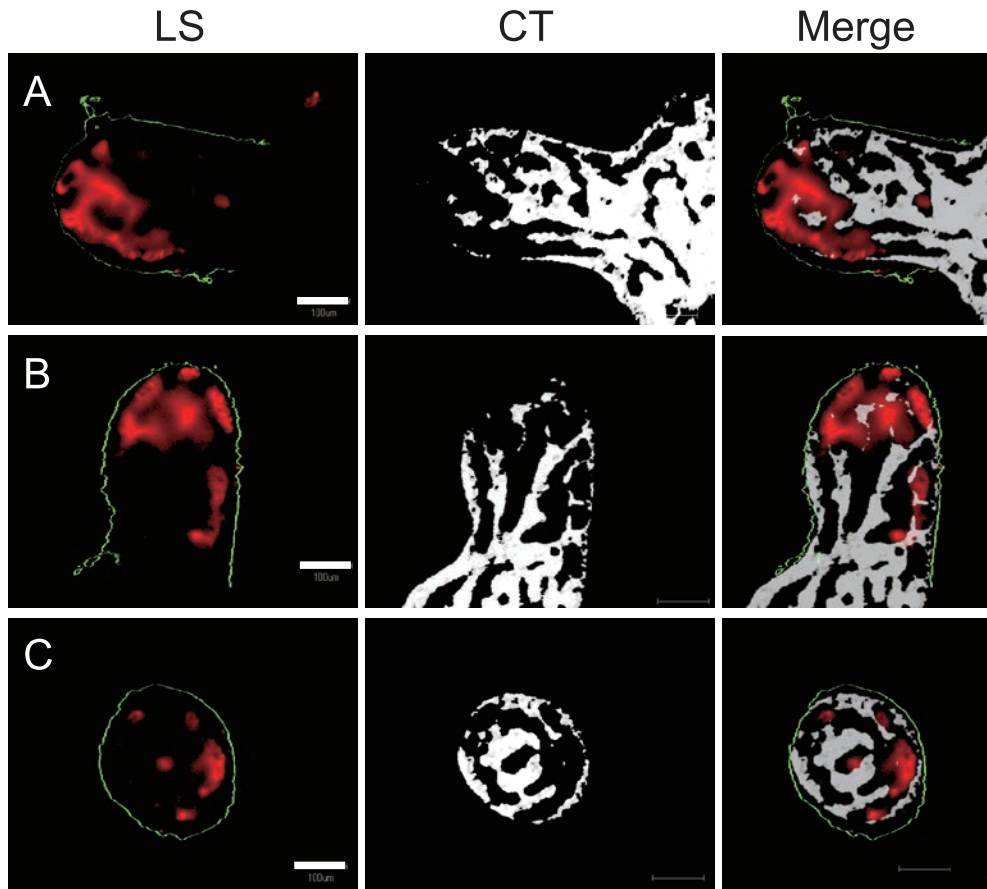


図4 Light sheet 蛍光顕微鏡画像とマイクロ CT 画像の重ね合わせ

(A, B) 短突起の直交する二つの縦断面。

(C) 短突起の横断面。

赤, DyLight 594 色素でラベルされたトマト由来レクチンで標識した血管. 緑, DAPI 画像をアウトライン化して作成した短突起の表層. LS, Light Sheet 画像. CT, マイクロ CT 画像. Merge, 重ね合わせ画像. スケールバー : 100  $\mu$ m.

後幅広い分野で進んでいくであろう。

## 6.2 透明化

代表的な透明化試薬は必ずしも骨までは透明化しないため、カルシウムを除去する脱灰操作との組み合わせが必要であると予測された<sup>15)</sup>。実際、脱灰に加えて SCALEVIEW-A2 を用いると Light sheet 蛍光顕微鏡により深部まで精細に観察できた (図 1B)。さらに、様々な脱灰方法と、透明化試薬の組み合わせを最適化する余地がある。ツチ骨はサイズが小さく、脱灰と透明化試薬の検討に好都合であり、本研究のようにマイクロ CT 像と比較することにより、変形や収縮などへの影響も評価できると思われる。

## 6.3 骨形成性毛細血管

生後 21 日目のマウスでは、ツチ骨短突起内の毛細血管は太く、生後 56 日目にかけて徐々に細くなっていく<sup>3)</sup>。今回用いた、生後 14 日目の標本では、生後 21 日目よりもさらに太い毛細血管が観察された。このことは、軟骨原基内に太い骨形成性毛細血管が形成され、その周囲に骨形成が起こるといふ知見<sup>3)</sup>と一致する。今後は、そのような経時的な変化も捉えていきたい。

## 6.4 今後の展望

ツチ骨全体の Light sheet 蛍光顕微鏡による解析から、血管の走行、とくに毛細血管の分枝の状況が描き出された。太い血管も存在するが、血流の方向性については不明である。骨内の非石灰化部分として認識される管腔構造の一部に毛細血管の位置が合致することが重ね合わせから確認された。骨基質と血管内皮細胞の間に、骨芽細胞や破骨細胞などの層があると考えられ、今後、血管に加えて、骨芽細胞や破骨細胞を蛍光標識できれば、同一標本で、血管だけでなく様々な細胞の空間的位置情報が Light sheet 蛍光顕微鏡で得られるはずである。実際、組織切片上では免疫蛍光染色により細胞レベルの識別は可能であり、また細胞特異的に tdTomato などの蛍光タンパク質を発現するマウスも作製され、ホールマウント免疫蛍光染色や蛍光レポーターマウスとの組み合わせにより、情報量は飛躍的に高まるものと考えられる。

マイクロ CT では管腔構造内の細胞層と毛細血管の区別が難しいが、さまざまな造影剤を活用し、あるいは Talbot 効果を利用した高感度 X 線顕微鏡を用いることで、軟らかい組織を細胞レベルで観察することも可能であろう。

## 謝 辞

本稿を校閲頂いた依田昌樹先生に感謝致します。

## 文 献

- 1) Kronenberg, H.M.: *Nature*, **423**, 332–336 (2003)
- 2) Kusumbe, A.P., Ramasamy, S.K. and Adams, R.H.: *Nature*, **507**, 323–328 (2014)
- 3) Matsuo, K., Kuroda, Y., Nango, N., *et al.*: *Development*, **142**, 3912–3920 (2015)
- 4) Nango, N., Kubota, S., Takeuchi, A., *et al.*: *Biomed. Opt. Express.*, **4**, 917–923 (2013)
- 5) Nango, N., Kubota, S., Hasegawa, T., *et al.*: *Bone*, **84**, 279–288 (2016)
- 6) Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., *et al.*: *Science*, **305**, 1007–1009 (2004)
- 7) Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., *et al.*: *Nat. Neurosci.*, **14**, 1481–1488 (2011)
- 8) Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., *et al.*: *Nature*, **497**, 332–337 (2013)
- 9) Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., *et al.*: *Cell*, **157**, 726–739 (2014)
- 10) Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., *et al.*: *Nat. Protoc.*, **10**, 1709–1727 (2015)
- 11) Buytaert, J., Goyens, J., De Greef, D., *et al.*: *Microsc. Microanal.*, **20**, 1208–1217 (2014)
- 12) McLean, J.W., Fox, E.A., Baluk, P., *et al.*: *Am. J. Physiol.*, **273**, H387–H404 (1997)
- 13) Buytaert, J.A., Johnson, S.B., Dierick, M., *et al.*: *J. Histochem. Cytochem.*, **61**, 382–395 (2013)
- 14) Bulantova, J., Machacek, T., Panska, L., *et al.*: *Micron.*, **83**, 62–71 (2016)
- 15) Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., *et al.*: *Cell*, **159**, 911–924 (2014)