

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04517

研究課題名(和文) オステオサイト細胞に注目した骨の「強度自己調整機能」解明

研究課題名(英文) Clarification of self-adjusting capacity of strength in bone focusing on osteocytes

研究代表者

石本 卓也 (Ishimoto, Takuya)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：50508835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨は、その構成成分であるコラーゲンとアパタイトの優先配向性によって力学的負荷の方向に力学的機能を発揮するが、力学的負荷と配向性の関係性、さらにはメカノセンサーとしてのオステオサイト細胞の関与等、未知の事象が多い。本研究では、in vivo負荷ひずみ-オステオサイト細胞形態-アパタイト配向性の関連性を定量的に示し、オステオサイトによるひずみ感受がアパタイト配向性の形成とひずみ方向への力学的強化に寄与している可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、骨がもつ、外部の力学的環境に合わせて自らの構造を改変し、強度を最適化する、「自己調整能力」の本質について、従来の負荷の大きさと骨密度の観点ではなく、負荷の方向性とそれに対応した骨微細構造の方向性(配向性)の観点から明らかとしたものである。さらに、骨内のセンサー細胞によるひずみの感受についても、その方向性を考慮することの重要性を示し、骨の自己調整能力のこれまでの理解を大幅に広げる知見となったと自負する。発展的には、例えば、骨の量のターゲットとして行われている骨治療やその薬剤の開発に関して、骨の配向性の観点を加えていく必要性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Bone expresses an anisotropic mechanical function in the direction of mechanical stimuli due to the formation of preferential orientation of collagen and apatite. However, the relationship among mechanical stimuli, collagen/apatite orientation, and osteocytes as a mechanosensor remains un-elucidated. In this study, the quantitative relationship among in vivo strain - osteocyte morphology - apatite orientation was shown, suggesting that strain sensitivity by osteocyte contributes to the formation of apatite orientation and mechanical strengthening in the direction of applied strain.

研究分野：生体材料学

キーワード：機能適応 骨 配向性 力学機能 ひずみ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨は、アパタイトとコラーゲンからなる異方的な配向化微細構造をもった生体内構造部材である<sup>1)</sup>。骨は、外部の力学的環境に合わせて自らの構造を改変し、強度を最適化する、「自己調整能力」とも呼ぶべき機能を有する、材料学的に極めて興味深い生体器官である。この能力は、骨医学の領域では、「力学的機能適応能力」と呼ばれる。これまでの骨研究において、この自己調整は、骨量・骨密度の変化に基づいてなされる、すなわち、*in vivo* (生体内)での力学的負荷の増大に対して、骨の量を増加させることで対応する、というのが常識であり、力学的負荷と骨量との関連に関して古くから多くの研究が行われてきた<sup>2)</sup>。ところが、骨の強度、とりわけ骨材質特性(ヤング率等、最大応力、靱性)を制御するのは骨密度ではなく、骨中アパタイト結晶の優先配向性であることを我々は材料学的観点から証明し<sup>3,4)</sup>、「骨機能の自己調整は実際にはアパタイト配向性の改変によってなされているのではないか?」との着想に至った。さらに、こうした力学的機能適応は骨中に存在するオステオサイト(Osteocyte; 以降OCY)細胞のひずみセンサーとしての機能に司られていると従来議論されてきたが<sup>5)</sup>、こうした議論には、骨に負荷するひずみ場が異方性であること、さらには構築される骨組織が異方性(配向性)を有することは考慮されてはいない。こうした背景から、本研究では、異方的ひずみ場の負荷からアパタイト配向化をつなぐ、OCYを中心とした生体内機序の一端を明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究の目的

異方的ひずみ場の負荷からアパタイト配向化をつなぐ、OCYを中心とした生体内機序の一端を明らかにするため、以下の具体的取り組みを実施した。

- (1) *in vivo* 負荷ひずみ - OCY 形態 - アパタイト配向性の関連性の定量解明: 種々の正常骨ならびに人為的応力負荷骨を用いて収集する。
- (2) OCY による異方的ひずみ場の感受機構の検討: OCY による異方的ひずみ場の感受の有無を、ひずみ場と OCY 形態における幾何学的観点から検討する。

### 3. 研究の方法

*in vivo* 負荷ひずみは金属疲労試験機を活用し、ラットに対し前腕に特殊治具を介して繰り返し圧縮荷重を定量的に負荷するとともにひずみを解析した。OCY 形態は、共焦点レーザ顕微鏡もしくはナノ X 線 CT で観察し、細胞体の形状ならびに細管の方向を定量化した。アパタイト配向性は微小領域 X 線回折法を用いて定量解析した。なお、本研究課題に関連する動物実験は、大阪大学動物実験委員会の承認の下で実施した。

### 4. 研究成果

*in vivo* 負荷ひずみ - OCY 形態 - アパタイト配向性の関連性を明らかにするため、正常骨、ならびに人為的応力負荷骨を用いて解析した。それぞれ、得られた成果を概説する。

#### 【正常骨を用いた解析】

正常な長管骨では、長軸方向への軸荷重と曲げ荷重が重畳して負荷しており、曲げモーメントは軸応力に変換されるため、一般に、骨幹中央部にて骨長軸方向への主ひずみが大きく、骨端側に向かうにつれ小さくなる。こうした正常な長管骨においては、骨幹中央部ではアパタイト配向性、OCY 形態の異方性ともに高値を示した。つまり、負荷ひずみ - OCY 形態 - アパタイト配向性が、異方性の観点から互いに関連していることが明らかになった。本知見は、骨が異方的ひずみ場の大きさに基づいてアパタイト配向性の度を制御することで力学的機能適応しており、それを OCY が仲介しているという仮説を支持するものであるといえる。

#### 【人為的応力負荷骨を用いた解析】

仮説の正当性のさらなる検証のため、人為的に主ひずみ方向を変化させるモデルを考案した。特殊な処置により、長管骨長軸に対して斜め方向に、正常部よりもヤング率の低い骨組織部を導入することで、繰り返し圧縮荷重負荷(図 1(a))時において主ひずみ方向を骨長軸に対して傾斜させることに成功した(図 1(b))。一定期間の負荷後に骨を解析した結果、

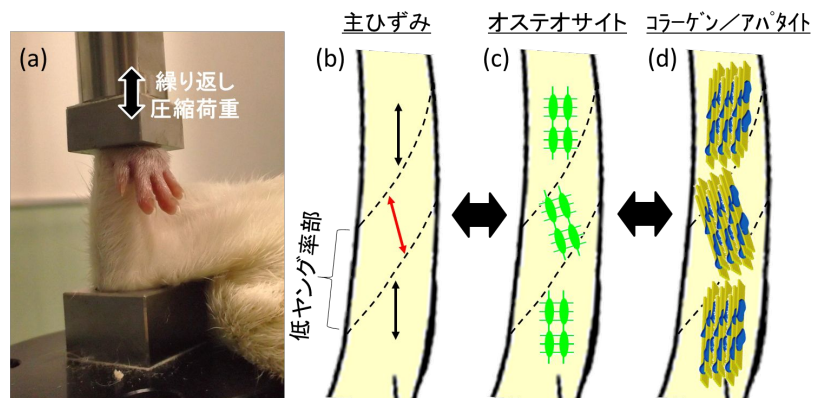


図 1 繰り返し圧縮荷重負荷試験の様子と、骨幹部に低ヤング率部を設けた際の主ひずみ、OCY 異方性、アパタイト配向性の優先方向の変化を示す模式図。

OCY ならびにアパタイトはいずれも主ひずみ方向の傾斜に対応してそれらの優先配向方向が傾斜した(図1(c, d))。

正常骨における解析結果と合わせて考えると、主ひずみの向きと大きさに対応してアパタイト配向性の向きと度合が変化し、それと同期してOCYの異方性が変化したことから、OCYが、アパタイト配向化による機能適応現象を支配することが強く示唆された。

【OCYによる異方的ひずみ場の感受機構の幾何学的考察】

OCYが主ひずみ方向に対して配列化する意義について、幾何学的観点から考察した。OCYは、細胞本体から放射状に伸びる微小な細管構造にてひずみ感受すると考えら

れている。従来の議論では、細管内の流体が骨基質のひずみ(勾配)を受けて流動し、ひずみの大きさとともない流動量が大きくなることで骨形成を促進、骨量を増し、その結果ひずみが定常状態の大きさに戻れば細管内での流体流動も定常値に戻り、適応的变化は収束する<sup>6)</sup>。これは、ひずみの大きさのみで議論されているが、実際にはひずみは異方的であり、さらにひずみセンサーとしてのOCYは主ひずみに合わせた異方性を形成する。

これを踏まえ、我々は、OCY細胞体の向き・形状と細管の方位関係について調査した。すると、異方的な形態を示すOCYから伸びる細管は、細胞体と直角に近い方位分布を示すことが明らかになった(図2)。つまり、主ひずみに対して細管を垂直に分布させることでひずみ感受性を高めている可能性が示された。一方で、ひずみ負荷が低減した環境下では、OCYは等方化し、細管の方位分布も均一になる<sup>7)</sup>。

以上より、本研究にて、従来考慮されてこなかった、異方性の観点から骨の「自己調整能力」の存在を明らかにすることができた。

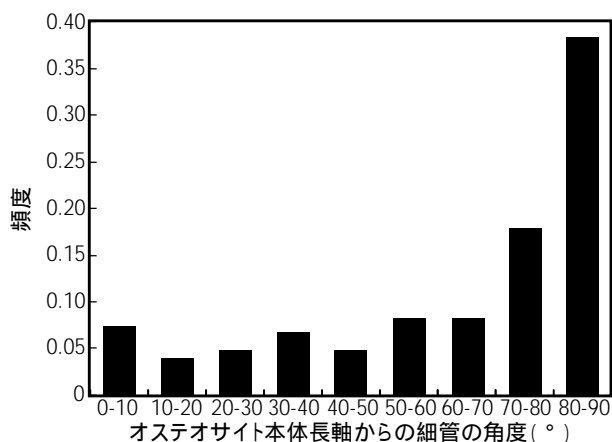


図2 OCY細胞体から伸びる細管の、細胞体長軸からの角度に対する頻度分布。

#### <引用文献>

- 1) T. Nakano et al: Bone 31, 479-487, 2002.
- 2) K.C.L. Lee et al: Bone 31, 407-412, 2002.
- 3) T. Ishimoto et al: J Bone Miner Res 28, 1170-1179, 2013.
- 4) Y. Shinno et al: Sci Rep 6, srep19849, 2016.
- 5) L.F. Bonewald: J Bone Miner Res 26, 229-238, 2011.
- 6) E.H. Burger et al: FASEB J 13, S101-112, 1999.
- 7) J. Wang et al: Calcif Tissue Int, 100, 87-94, 2017.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- [1] R. Ozasa, T. Ishimoto, S. Miyabe, J. Hashimoto, M. Hirao, H. Yoshikawa, T. Nakano: Osteoporosis changes collagen/apatite orientation and Young's modulus in vertebral cortical bone of rat, Calcified Tissue International, 104[4] (2019) pp. 449-460, 査読有, DOI:10.1007/s00223-018-0508-z.
- [2] T. Ishimoto, K. Yamada, H. Takahashi, M. Takahata, M. Ito, T. Hanawa, T. Nakano: Trabecular health of vertebrae based on anisotropy in trabecular architecture and collagen/apatite micro-arrangement after implantation of intervertebral fusion cages in the sheep spine, Bone, 108 (2018) pp. 25-33, 査読有, DOI: 10.1016/j.bone.2017.12.012.
- [3] T. Ishimoto, B. Sato, J.W. Lee, T. Nakano: Co-deteriorations of anisotropic extracellular matrix arrangement and intrinsic mechanical property in c-src deficient osteopetrotic mouse femur, Bone, Vol. 103 (2017) pp. 216-223, 査読有, DOI: 10.1016/j.bone.2017.06.023.
- [4] J. Wang, T. Ishimoto, T. Nakano: Unloading-induced degradation of the anisotropic arrangement of collagen/apatite in rat femurs, Calcified Tissue International, Vol. 100[1] (2017) pp. 87-94, 査読有, DOI:10.1007/s00223-016-0200-0.
- [5] A. Sekita, A. Matsugaki, T. Ishimoto, T. Nakano: Synchronous disruption of anisotropic arrangement of the osteocyte network and collagen/apatite in melanoma bone metastasis, Journal of Structural Biology, 197[3] (2016) pp. 260-270, 査読有, DOI: 10.1016/j.jsb.2016.12.003.
- [6] 石本卓也, 中野貴由: アパタイト配向性と骨のメカノバイオロジー, バイオマテリアル, Vol. 34[2] (2016) pp. 2-7, 査読有.

〔学会発表〕(計 9 件)

- [1] 石本卓也, 中野貴由: メカニカルストレスに適応した骨アパタイト配向化とヤング率の上昇, 第 36 回日本骨代謝学会学術集会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2018 年 7 月 26-28 日.
- [2] 中野貴由, 石本卓也, 松垣あいら: 骨細胞と骨基質アパタイト配向性, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 松本歯科大学キャンパス, 塩尻, 2017 年 9 月 16-18 日.
- [3] 門田耕平, 石本卓也, 中野貴由: 骨の機能適応変化に対する強制負荷ひずみ速度の影響, 日本金属学会 2017 年春期(第 160 回)大会, 首都大学東京南大沢キャンパス, 八王子, 2017 年 3 月 15-17 日.
- [4] 石本卓也, 秀平忠司, 松垣あいら, 中野貴由: 卵巣摘出ならびに応力負荷の複合環境下における骨配向化, 日本金属学会 2017 年春期(第 160 回)大会, 首都大学東京南大沢キャンパス, 八王子, 2017 年 3 月 15-17 日.
- [5] 門田耕平, 石本卓也, 中野貴由: 強制的負荷に基づく骨配向化過程の解析, 日本金属学会 2016 年秋期(第 159 回)大会, 大阪大学豊中キャンパス, 豊中, 2016 年 9 月 21-23 日.
- [6] T. Ishimoto, A. Murakami, T. Nakano: Change in preferential alignment of bone apatite in response to artificially altered principal strain in regenerated rat ulna, 9th Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM9), Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, August 1-5, 2016.
- [7] 石本卓也, 中野貴由: 応力応答性に骨質を支配するアパタイト結晶配向性, 日本補綴歯科学会第 125 回学術大会, 石川県立音楽堂, 金沢, 2016 年 7 月 8-10 日.
- [8] 石本卓也, 門田耕平, 中野貴由: 骨への強制的荷重負荷が骨形態・配向化に与える影響, 第 36 回日本骨形態計測学会, 朱鷺メッセ, 新潟, 2016 年 6 月 23-25 日.
- [9] T. Ishimoto, J. Wang, K. Kadota, T.W. Kim, T. Nakano: Apatite orientation and material property of bone are enhanced by artificially elevated load, International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials (THERMEC'2016), Graz Convention Center, Graz, Austria, May 29-June 3, 2016 (invited).

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 中野 貴由

ローマ字氏名: Takayoshi Nakano

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 工学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 30243182

研究分担者氏名: 松垣 あいら

ローマ字氏名: Aira Matsugaki

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 工学研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 10592529

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 関田 愛子

ローマ字氏名: Aiko Sekita

研究協力者氏名: 門田 耕平

ローマ字氏名: Kohei Kadota

研究協力者氏名: 稲垣 雄平

ローマ字氏名: Yuhei Inagaki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。