

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H02125

研究課題名(和文)骨機械感受性を調節する骨細胞ネットワークとその神経性調節

研究課題名(英文) Role of innervation and mechanosensitive osteocyte network in the control of bone remodeling

研究代表者

山本 智章 (YAMAMOTO, Noriaki)

新潟医療福祉大学・その他部局等・ロコモティブ症候群予防研究センター副センター長

研究者番号：30445902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織内で機械的刺激の感受機能を担っている主たる候補である骨細胞がネットワークを形成している。また骨組織内に神経支配があり骨形成や骨吸収を調節している。若齢期及び高齢期の骨組織への機械的刺激に対する効果について神経支配及び骨細胞ネットワークの役割について検討した。その結果、除神経や感覚神経の選択的阻害による骨強度、骨量の低下は、機械的刺激により軽減した。高齢期では骨細胞密度が低下し、空洞化した骨小腔が増大した。骨細胞密度と骨量とは相関関係がみられた。骨組織に対する機械的刺激効果は、加齢、神経支配、骨細胞密度に影響されることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨の量や強度に感覚神経がポジティブに働いていることを示し、運動刺激効果が骨の場所やタイプ、機械的刺激を感知する細胞の密度、加齢の影響を受けるという結果を得ることができた。加齢で運動効果が現れにくくなる状況を神経系や骨細胞のネットワーク保持をターゲットにした薬剤の開発や運動処方プログラムの開発に寄与する可能性がある。特に高齢期の運動刺激感受性低下の改善に意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Osteocytes are the most mechanosensitive cells in bone and form a dense network throughout the entire bone material. Sensory nerves innervate bone tissue, and the nervous system controls bone remodeling by regulating bone formation and resorption. We investigated the role of innervation and osteocyte networks on the effects of mechanical stimulation on bone volume and strength in young and aged rats. Selective sensory denervation and sciatic neurectomy-induced decreases in bone volume and strength were reduced by mechanical stimulation in young rats. The middle diaphysis of aged rats showed a lower osteocyte density and a higher empty lacuna ratio, and there was a significant correlation between bone volume and osteocyte density. The results suggest that the effects of mechanical stimulation on bone tissue are affected by aging, innervation, and osteocyte density.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 神経 機械的刺激

1. 研究開始当初の背景

運動刺激は骨梁の改善に有効であるが、従来運動刺激による骨代謝調節因子の主役は、メカニカルストレスによる力学的因子とホルモン等による液性因子であり、骨芽細胞や破骨細胞の骨形成や骨吸収の働きを検証するといった切り口から研究がなされてきた。一方近年、骨細胞や神経性因子の骨代謝への役割が注目されるようになってきた。

骨細胞は骨の中では約 90%を占めるほど多く存在する細胞である。形態的には多数の細胞突起を伸ばしており、ギャップ結合を介して骨細胞同士だけでなく、骨芽細胞や破骨細胞とも結合することが報告され[1]、骨基質全体に骨細胞ネットワークを構築していることが明らかにされてきた。細胞生物学的検証を経て、近年では骨芽細胞や破骨細胞が行う骨代謝を制御する司令塔の役割を持つ多機能細胞であることが国際的に認識されてきている。多機能性の中でもこのネットワーク構造の特性から、機械的刺激の感受性を高める機能の想定が注目されており、実際、骨細胞を特異的に除去させると骨の力学応答が低下すること[2]、細胞突起に機械的刺激で伸展する仕組みなどが備わっていることが報告されている[3]。

一方、神経科学領域において、骨内部に交感神経線維や感覚神経線維が直接侵入している所見や、骨芽細胞や破骨細胞にノルアドレナリン作動性受容体(受容体)や感覚神経遊離物質の受容体の存在が次々と報告され[4]、臨床的には、神経ペプチドやカテコラミンなどの神経伝達物質が骨折治癒・骨再生・骨量維持に重要な役割を果たすこと[5]なども示唆されており、従来の概念からやや離れた因子(神経性因子)が骨代謝調節に関与していることが明らかになってきている。

2. 研究の目的

運動は骨の量的質的および構造的な改善に有効である。その運動刺激効果は、メカニカルストレスによる力学的因子や液性因子、神経性因子等の関連が考えられている。また、その運動刺激効果の現れ方が加齢とともに減弱する傾向にあり、高齢期での機械的刺激に対する骨組織の感受性・反応性についても関連があると考えられている。

本研究課題では、骨組織への運動刺激効果が高齢期で減弱する問題について、機械的刺激の感受増幅機能を担っている主たる候補である骨細胞のネットワークと神経性因子の関連について検討することを目的とする。骨細胞ネットワークおよび骨内神経支配の構造的変化について高齢期において調べ、また加齢や機械的負荷の増減の筋骨格系組織の構造変化と骨細胞ネットワーク構造に関して検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物及び対象組織：

実験動物として、若齢期及び高齢期ラットを対象動物とした。このうち、坐骨神経の denervation による下肢不動モデル、カプサイシン投与による感覚神経の選択的遮断モデルを作成し、実験に供した。各々、実験終了時にイソフルラン麻酔下で、脛骨並びに前脛骨筋、ヒラメ筋を採取して各測定及び分析を行った。本研究は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、2006)を遵守して、新潟医療福祉大学及び鹿屋体育大学動物実験委員会の倫理審査の承認を得て実施された。

(2) 処置：

下肢不動モデルラットの作成について、坐骨神経の除神経処置を行い下肢不動を実現した。イソフルラン麻酔下で皮膚を切開し、大腿部にある坐骨神経を切除した後切開部を縫合糸で縫合した。除神経手術後に歩行時の下腿の dragging を確認し、また実験終了時には denervation した神経遠位部より直接電気刺激を電気刺激装置を用いて行い、下腿部の筋活動が誘発されないことを確認した。

薬理的神経遮断モデルラットの作成について、カプサイシン感受性神経を薬理的に遮断することを目的にカプサイシンの高容量反復投与を 3 回行った。カプサイシンは vehicle (生理食塩水、エタノール、Tween80 混合液)に溶解した。

電気刺激誘発性筋収縮について、前脛骨筋直上に双極電極を設置して経皮的電気刺激を行い、筋収縮を誘発した。刺激強度は単収縮張力が最大となる電流強度で、刺激周波数は 10Hz、刺激時間は 2 秒間刺激-8 秒間休息のサイクルを 30 分間実施した。

組織採取について、実験終了時にイソフルラン麻酔下で脛骨を採取し、採取した脛骨はマイクロ CT 撮影、破断強度試験、及び組織染色用サンプル作成に供した。また、前脛骨筋及びヒラメ筋を採取し筋湿重量の測定に供した。

(3) 測定項目：

骨破断強度試験装置を用いて脛骨骨幹中央部の 3 点支持破断強度試験を行い、脛骨の機械的特性を調べた。採取した脛骨を支持ステージ上に支点間距離 20mm で設置し、その中点部を上方からロードセルと連結した金属刃で破断するまで荷重した。その時の荷重信号を PC で記録し、専用ソフトウェアで Load-displacement 曲線を得て、最大点荷重(Maximal Load, N)、

剛性(Stiffness, N/mm)等を計測した。

3次元マイクロCTスキャナーを用いて採取した脛骨の骨幹端近位部のX線撮影を行い、3次元骨梁構造を解析した。連続撮影画像から3次元立体構築ソフト及び骨梁構造解析ソフトを用いて骨量(Trabecular bone volume fraction, BV/TV)、骨梁幅(Trabecular thickness, Tb.Th.)、骨梁数(Trabecular number, Tb.N.)、骨梁間距離(Trabecular separation, Tb.Sp.)、骨梁連結密度(Connection density, Conn.Dn.)、Structure model index (SMI)、bone surface/bone volume ratio (BS/BV)等を計測した。

採取した組織の処理について、凍結ブロック作成は採取組織を液体窒素冷却イソペンタンで急速冷凍して分析まで-80℃で保存した。クリオスタットで凍結薄切切片を作成し、乾燥後に各種染色に供した。パラフィンブロック作成は採取した脛骨の近位部を正中断して固定した後、EDTAで脱灰してパラフィン包埋した。滑走マイクロトームを用いて薄切切片を作成し各種染色に供した。

染色及び組織画像解析について、薄切した骨及び筋組織は風乾後染色され顕微鏡観察及び形態計測に供した。類骨を識別するためにヘマトキシリン-エオシン染色(吉木法)を用いた。また神経線維、骨細胞、筋線維の識別のため各種免疫染色(DMP1, GAP43, NF200, Laminin, myosin heavy chain等)を行った。CCDカメラを設置した蛍光顕微鏡を用いて蛍光標識された組織切片を観察、撮影した。画像解析ソフトを用いて骨及び筋組織の組織形態計測を実施し形状や数量、光学密度等を計測した。

筋機能の測定として筋収縮張力を測定した。イソフルラン麻酔下で前脛骨筋遠位腱を切断してフォーストランスデューサーに結合し、電気刺激誘発性筋収縮処置と同様の装置、手法を用いて、前脛骨筋の電気刺激誘発性筋収縮張力をフォーストランスデューサーを用いて測定した。強縮時の刺激条件は、50V、150Hz以上、パルス幅0.5msで実施した。

4. 研究成果

(1) 除神経や電気刺激誘発性筋収縮力による機械的刺激の骨組織のバイオメカニカルな特性への影響について検討した。坐骨神経のdenervationにより下肢不動とした前脛骨筋に経皮的直接電気刺激を与える処方を実施した。処方終了後に採取した脛骨の破断強度試験を実施し(図1)、機械的特性に関する項目について測定評価した結果、無処置の対照群と比較してdenervationを行った下肢の骨においては、Stiffnessは有意に低下したが、Maximal load、Elastic modulusは有意な変化がなかった。またdenervation群と比較して、電気刺激誘発性筋収縮を行った群の各パラメータは高い傾向にあったが有意な差はなかった。除神経の期間、筋萎縮量、年齢、組織部位等により影響が異なる可能性が示され、除神経初期における電気刺激誘発性筋収縮処方は、若齢期脛骨の海綿骨及び皮質骨の微細構造や強度に関連する機能的特性並びに高齢期海綿骨の骨量維持にポジティブな影響がみられたが、高齢期の皮質骨骨幹部における機械的特性には影響が少ない可能性が示唆された。

(2) 次に各種神経の骨組織に対する影響をしらべるため、若齢期の実験動物(ラット)を用いて坐骨神経のdenervationを実施した。さらに、感覚神経の薬理的遮断のためにカプサイシンを高容量連続投与し、Ad神経線維やC神経線維の骨組織に対する影響を検討した。4週間の処方終了後に脛骨を採取して3次元マイクロCT撮影を実施して、骨梁微細構造の分析を行った。また骨破断試験装置を用いて脛骨3点支持により脛骨骨幹部の破断試験を実施し、骨破断強度、stiffnessを測定した。Denervation処置を行った群の脛骨海綿骨の骨量(trabecular bone volume: BV/TV)は無処置群と比較して有意に低下し(図2)、骨梁数、骨梁幅、骨梁連結密度等の骨梁微細構造のパラメータも有意に低下した。次に、感覚神経遮断薬を投与した群では、age-matched control群と比較して、bone surface/bone volume ratio (BS/BV)等の各構造パラメータは有意に低値を示し、一方Structure model index (SMI)は有意に低下したが、処方開始時点のbasal control群とはこれらは差はなかった。また破断強度やstiffnessは低下傾向にあったが有意な影響はなかった。これらのことから、感覚神経の選択的遮断により成長期の骨量増加が妨げられ、骨梁構造も疎になる方向に作用し、骨吸収が促進されたことによる骨梁構造のロッド状化が示され、感覚神経は海綿骨の骨量や骨梁構造維持にポジティブに機能している可能性が示唆された。

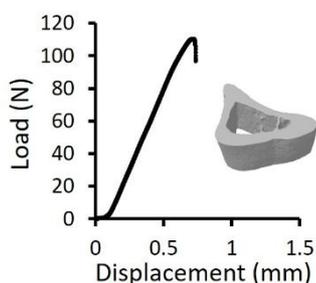


図1. 3点支持破断強度試験時の脛骨の機械的特性(Load-displacement 曲線)。

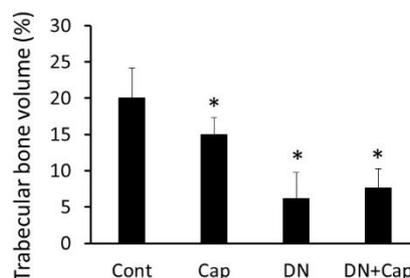


図2. 坐骨神経及び感覚神経のdenervationによる脛骨骨幹部骨梁の骨量変化.*P<0.05, vs Cont.

(3) 加齢による影響をしらべるため、高齢期の除神経による下肢不動モデルラットを作成し、denervationによる骨組織への構造的、機能的影響を調べた。そして下肢不動にした高齢ラットの脛骨に strain rate 10,000 μ /s 以上となるよう電気刺激誘発性筋収縮 (ESMCF) による機械的負荷を処方し、介入後に脛骨を採取し、以下の計測を行った。三次元マイクロ CT 撮影装置で脛骨骨幹端及び骨幹部を撮影して立体構築し、皮質骨並びに骨梁微細構造の分析を行った。また骨破断試験装置を用いて脛骨骨幹部の3点支持破断試験を実施した。その結果、Denervationにより高齢ラット脛骨海綿骨の骨量 (trabecular bone volume : BV/TV) は非処置群と比較して低値を示し、骨梁幅、骨梁数、骨梁連結密度等の骨梁微細構造のパラメータも有意に低値を示した。ESMCF 介入により骨量、骨量幅、骨量数は低下しなかった。また皮質骨の各パラメータ (cortical bone volume, bone fraction, porosity, bone mineral density) は介入前後で非処置群と差はなかった。脛骨骨幹部のバイオメカニカルな特性に関して、最大骨強度、stiffness、elastic modulus は denervation により定値を示したが、ESMCF 介入により非介入群と有意な差がないレベルを示した。さらに骨組織観察で、骨細胞密度、empty lacunar ratio の高齢期の特徴を調べた結果、若齢期よりも高齢期で有意に低値を示した。また ESMCF 介入で骨細胞数の減少は軽減されなかった。高齢期の denervation による骨の量的機能的低下を機械的ストレスで軽減可能であることが示唆された。

(4) 骨組織に対する機械的荷重処方の骨量及び骨微細構造に及ぼす影響について調べ、サイクリックな機械的荷重の強度、介入期間と頻度について検討した。また高齢期における骨細胞ネットワークと骨強度について調べた。約4ヶ月齢のラット脛骨を対象に、2秒荷重-8秒休止のサイクリックな骨ひずみが生じるよう機械的荷重を平均 strain rate 7,000 (microstrain/sec) 以上の速さで荷重装置を用いて処方した。介入期間は4週間で、介入頻度を4週間隔、2週間隔、1週間隔、介入なしとした。介入後に脛骨を採取し、三次元 micro CT 撮影装置で脛骨骨幹端及び骨幹部を撮影して画像解析ソフトを用いて立体構築した後、骨量 (BV/TV) 並びに骨梁微細構造 (骨梁幅: Tb.Th., 骨梁数: Tb.N., 骨梁間距離: Tb.Sp., 骨梁連結密度: Conn.Dn) を計測した。介入を行わなかった群と比較して、1週間隔で4週間実施した群では有意に脛骨海綿骨の骨量 (BV/TV) は高値を示した。また、骨梁微細構造に対する影響について、Tb.Th., Tb.N. は1週間隔の介入で有意に高いレベルを示した。一方、Tb.Sp., Conn.Dn については有意な差はなく、構造的パラメータ特にネットワーク構造には変化は現れなかった。次に、高齢期の脛骨骨幹部の観察で、骨細胞密度や骨細胞がない骨小腔率と BV/TV との関係性を調べた結果、有意な相関関係が観察された。若齢期において週1回の介入頻度で4週間処方した一定以上の strain rate となる機械的荷重により、マイクロ CT で評価した脛骨骨幹端の骨量を高め、骨梁構造を改善する効果が示唆された。また高齢期において骨量と骨細胞密度とは関連があることが示唆された。

< 引用文献 >

- [1] L.F. Bonewald, The amazing osteocyte, *J Bone Miner Res* 26(2) (2011) 229-38.
- [2] S. Tatsumi, K. Ishii, N. Amizuka, M. Li, T. Kobayashi, K. Kohno, M. Ito, S. Takeshita, K. Ikeda, Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction, *Cell Metab* 5(6) (2007) 464-75.
- [3] Y. Han, S.C. Cowin, M.B. Schaffler, S. Weinbaum, Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(47) (2004) 16689-94.
- [4] G. Castaneda-Corral, J.M. Jimenez-Andrade, A.P. Bloom, R.N. Taylor, W.G. Mantyh, M.J. Kaczmarek, J.R. Ghilardi, P.W. Mantyh, The majority of myelinated and unmyelinated sensory nerve fibers that innervate bone express the tropomyosin receptor kinase A, *Neuroscience* 178 (2011) 196-207.
- [5] J.K. Elmquist, G.J. Strewler, Physiology: do neural signals remodel bone?, *Nature* 434(7032) (2005) 447-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamaki H, Yotani K, Ogita F, Hayao K, Kirimto H, Onishi H, Kasuga N, Yamamoto N	4. 巻 16
2. 論文標題 Low-frequency electrical stimulation of denervated skeletal muscle retards muscle and trabecular bone loss in aged rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Med Sci	6. 最初と最後の頁 822-830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/ijms.32590	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hayao K, Tamaki H, Nakagawa K, Tamakoshi K, Takahashi H, Yotani K, Ogita F, Yamamoto N, Onishi H.	4. 巻 301(6)
2. 論文標題 Effects of streptomycin administration on increases in skeletal muscle fiber permeability and size following eccentric muscle contractions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anat Rec	6. 最初と最後の頁 1096-1102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ar.23770.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本智章	4. 巻 27
2. 論文標題 骨リモデリングの基礎知識	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Calcium	6. 最初と最後の頁 1683-1688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20837/4201712009	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hayao K, Tamaki H, Nakagawa K, Yotani K, Ogita F, Tamakoshi K, Takahashi H, Onishi H, Yamamoto N,
2. 発表標題 Repeated bout effect on myofiber permeability and muscle function that is dependent on the intervals between initial and second bouts of eccentric contractions in rat skeletal muscle.
3. 学会等名 24th Annual Congress of European College of Sport Science, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田巻弘之, 與谷謙吾, 荻田 太
2. 発表標題 低頻度電気刺激誘発性筋収縮による骨ひずみと不動性脛骨骨量低下の軽減に及ぼす影響.
3. 学会等名 第27回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早尾啓志, 田巻弘之, 玉越啓悟, 高橋英明, 大西秀明
2. 発表標題 伸張性収縮誘発性筋損傷後の筋線維横断面積の経時的変化.
3. 学会等名 第 37 回東北理学療法学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 智章
2. 発表標題 骨形態計測学への回帰 臨床に役立つ骨組織の世界を知る
3. 学会等名 日本整形外科学会雑誌
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田巻弘之, 與谷謙吾, 荻田 太, 早尾啓志, 桐本 光, 大西秀明, 山本智章, 春日規克,
2. 発表標題 刺激強度及び距離の異なる磁場刺激による骨内磁場強度の変化特性.
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本智章
2. 発表標題 骨粗鬆症診療に役立つ骨形態計測の知識
3. 学会等名 第19回日本骨粗鬆症学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本智章
2. 発表標題 脆弱性骨折のベストプラクティスへの挑戦と課題
3. 学会等名 第59回日本老年医学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tamaki H, Takahashi H, Tamakoshi K, Yotani K, Ogita F
2. 発表標題 Effects of electrical stimulation-induced muscle force on the mechanical properties of tibiae in denervated old rat
3. 学会等名 第25回日本運動生理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	與谷 謙吾 (Yotani Kengo) (10581142)	鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・准教授 (17702)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田巻 弘之 (Tamaki Hiroyuki) (40253926)	鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・教授 (17702)	
研究分担者	桐本 光 (Kirimoto Hikari) (40406260)	広島大学・医系科学研究科(保)・教授 (15401)	
研究分担者	石道 峰典 (Ishido Minenori) (80737536)	大阪工業大学・工学部・講師 (34406)	
研究分担者	大西 秀明 (Onishi Hideaki) (90339953)	新潟医療福祉大学・リハビリテーション学部・教授 (33111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関