

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22060

研究課題名（和文）骨機能を本質的に回復する材料科学に基づいた新たな骨再建法

研究課題名（英文）Establishment of a new bone regeneration method that enables rapid recovery of bone mechanical function

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：骨の再生過程において、骨の強度の回復は、骨密度のみならず骨を形成するアパタイト結晶の配向性（向きと度合）によって支配される。本研究では、生体の修復能力のみに頼らず、人為的な手法によってアパタイト配向性を早期に高める方法を検討し、それに成功した。特に、再生部への強制的な応力負荷は、骨の中に存在する応力センサーである骨細胞の働きを介して再生骨のアパタイト配向性を、主応力方向へと高めることが明らかになり、新たな、材料工学的観点からの骨再建手法の提案につながる知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨の再生においては、骨密度のみならずアパタイトの配向性（向きと度合）を正常化することが不可欠である。それを達成する方法を、これまでに当研究グループで明らかにしてきたメカニズムに則って学術的な観点から確立した本研究の意義は大きい。骨密度を急速に上昇させることが可能な再生医療と合わせて、本研究で提案した手法を適用することで、骨折部のより早期の機能回復が期待され、患者のQOL向上に資する。ヒトで実施するための手法の検討が、今後の課題として挙げられる。

研究成果の概要（英文）：In bone regeneration process, the restoration of bone mechanical function is governed not only by bone mineral density but also by the crystallographic orientation of the apatite crystals that is a main inorganic component of bone. In this study, we investigated a method to enhance apatite orientation even at an early stage by an artificial method without relying only on the self-repairing ability of the living body, and succeeded in it. In particular, it was clarified that the artificially induced stress on the regenerating part enhanced the apatite orientation in the regenerating bone in the direction of the principal stress through the function of osteocyte, which plays a role as a stress sensor in the bone. We obtained fruitful findings that can lead to the proposal of new bone reconstruction methods from the viewpoint of materials engineering.

研究分野：生体材料学

キーワード：骨再生 骨材料 応力 細胞配列 骨力学機能

### 1. 研究開始当初の背景

骨は生体内の「構造材料」であり、骨折等によってその機能が失われた際には、急速に力学的機能回復を図る必要がある。骨の力学機能は骨を形成する基質（アパタイト結晶とコラーゲン）の優先配向性に強く支配される<sup>[1,2]</sup>ことから、配向性の構築が再生骨の早期機能回復には必須であり、それを明確に念頭に置いた骨再建が不可欠である。

ところが、最先端の骨再生医療を駆使しても配向性の構築と、結果としての強度特性の早期回復は達成できないことが、材料科学的観点からの研究によって明らかになった<sup>[2,3]</sup>。再生医療を駆使した場合でも、骨密度は急速に上昇するものの、配向性の構築には長時間を要した<sup>[2,3]</sup>。すなわち、骨機能回復のためには材料科学的観点から骨アパタイトの配向性の形成を目指した手法の確立が急務であった。

### 2. 研究の目的

骨機能を本質的に回復するための、骨基質配向性回復に向けた新たな骨再建法を、これまでに当研究グループで明らかになった配向化制御因子である「応力負荷<sup>[2]</sup>」と「骨形成細胞の配列化<sup>[3,4]</sup>」のいずれかを骨再生中において人為的にコントロールすることで確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ラットを用い、長管骨に骨欠損を導入した。においては、疲労試験機を駆使しての *in vivo* (生体内)人為的応力負荷モデル<sup>[4]</sup>を用い、再生部に対して応力負荷を施した(図1)。

においては、再生部に骨形成細胞である骨芽細胞を配列化させるための足場を導入し、骨再生を図った。一定期間の経過後骨を摘出し、再生部の骨形態をレントゲンならびに X 線マイクロ CT にて、骨密度を pQCT にて測定するとともに、微小領域 X 線回折法によりアパタイト *c* 軸配向性を定量解析した。骨強度指標としては、ヤング率をナノインデントレーション法にて解析した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、骨中の骨細胞を可視化し、形状の幾何学的な解析を行った。統計学的処理には Student の *t* 検定を用い、 $P < 0.05$  を統計的有意と判定した。なお、本動物実験は、大阪大学大学院工学研究科動物実験倫理委員会の承認に基づき実施した。

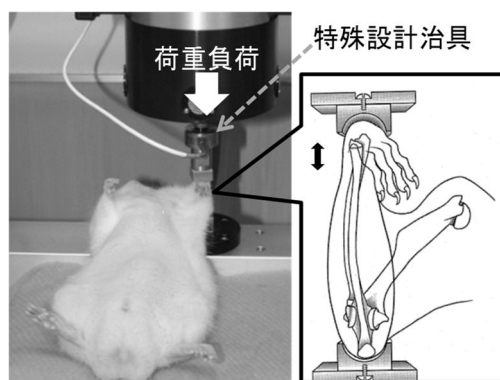


図1 *in vivo* (生体内)人為的応力負荷法。

### 4. 研究成果

*in vivo* CT にて欠損部の骨再生状況を観察すると、骨欠損導入後 4 週から 6 週の間欠損部は再生骨によって連結した(図2)。したがって、石灰化した(アパタイトが沈着し硬化した)再生骨に応力負荷可能な骨欠損導入後 6 週より人為的応力負荷を行った(負荷群)。負荷の大きさは、予備試験により測定した負荷開始時点での骨のヤング率に基づき、負荷の頻度(周波数)はラット歩行時を再現し、設定した。負荷時間は正常骨にて効果が示された 10 分間/日とした。人為的応力負荷しない群を作製し、対照群とした。再生部での骨密度は、負荷群と対照群では差異は認められなかった。

一方、アパタイト配向性には両群間で有意差が認められた。アパタイト配向性は骨長軸に対して X 線を垂直に照射し、X 線と垂直な二次元面内での解析を行い、(002)、(310)からの回折強度 ( $I(\beta)$ ) を  $\beta$  の 1 度ごとに積分し、以下の modified elliptic polynomial function にて最小二乗近似した<sup>[5]</sup>。

$$I(\beta) = \left\{ \frac{\cos^2(\beta - \mu)}{a^2} - \frac{\sin^2(\beta - \mu)}{b^2} \right\}^{\frac{1}{2}} - c$$

$a, b, c, \mu$  はフィッティングパラメータであり、 $\mu$  は強度が最大となる角度を示す。最終的に、(002)と(310)の回折強度比 ( $I(002)/I(310)$ ) を 1 度ごとに算出した。これにより、アパタイト *c* 軸

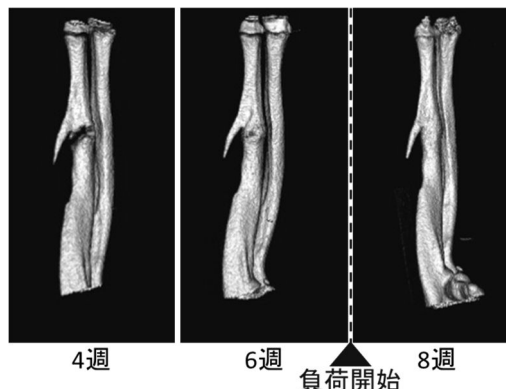


図2 骨再生過程の *in vivo* CT 像。

の優先配向方向と配向度を定量解析可能である。人為的応力を負荷していない対照群では優先配向方向は個体に依存して顕著な偏差を示し、特定方向への優先配向を形成していないことを意味した。一方で、負荷群ではいずれの個体においても応力方向へと優先配向化した結果、配向方向の標準偏差は小さかった。さらに、再生部でのアパタイト配向度は負荷群で有意に高値を示した(図3)。

さらに、骨基質配向化に対する、骨内にて応力感受を担う骨細胞の寄与を考察するため、骨細胞を可視化した(図4)。写真の白い部分が骨細胞の存在する骨中の孔を反映するが、大変興味深いことに、人為的応力負荷していない対照群(図4中央)では骨細胞の細胞体はほとんど伸展しておらず特定の配列方向を示さない一方で、負荷群(図4右)

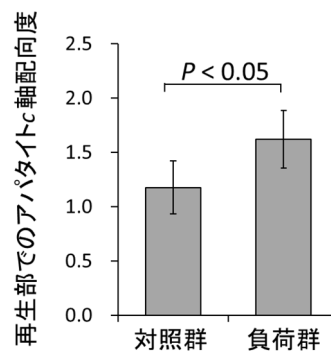


図3 再生部でのアパタイト配

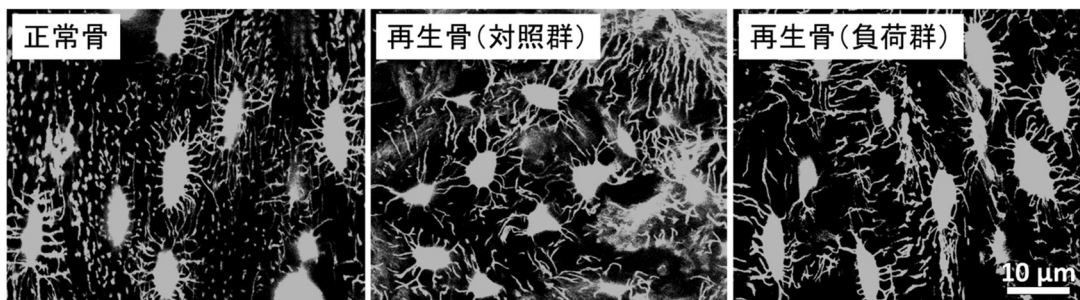


図4 再生部での骨細胞形態

では伸展し同一方向へと優先配列化した。これは、正常骨(図4左)での骨細胞形態と非常に良く類似していた。骨細胞は主応力方向へと細胞体を伸展させることで、図5に模式的に示すように、結果として細胞突起(細胞体から放射状に伸びる細い構造体)を細胞体と垂直に伸ばしていることになる。すなわち、主応力に対して垂直に細胞突起が優先的に存在し、これは、骨に負荷する応力(ひずみ)を感知しやすくするための適応的变化であると我々は考察している<sup>[6]</sup>。

以上のように、石灰化後の再生骨への人為的応力負荷によって、骨の配向化を促進することが可能であることが示された。さらに本研究では、石灰化前の再生骨への牽引力の負荷が軟組織の線維配向によって早期の高配向化骨形成に寄与することをも見出だした。

これは、配向化した線維上での骨形成細胞の配列化によるものと推察している。こうした機序による骨基質配向化は、生体外(*in vitro*)における細胞実験では実証されていたが、生体内(*in vivo*)でも実現できることを、本研究で示すことができた。生物の能力のみに依存した骨配向化には長時間を有するが、本研究での知見により、生物の能力を使いながらもそれを人為的にサポートすることで、再生骨の配向性、そして、力学機能を早期に回復することが可能となり、新たな、材料工学的観点からの骨再建手法の提案につながる知見を得た。

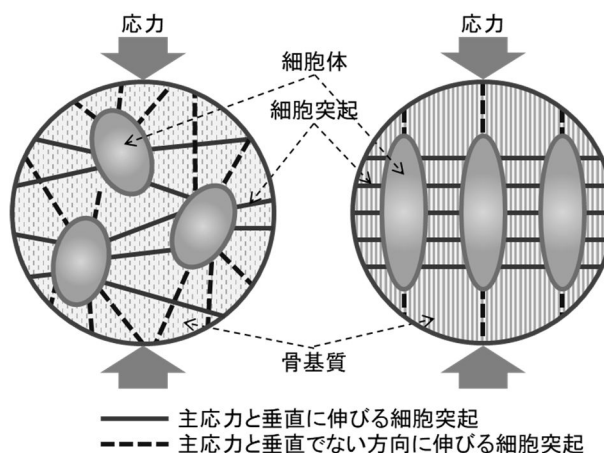


図5 再生部での骨細胞形態と主応力方向との関係。左図：対照群、右図：負荷群の模式図。

#### 引用文献

- [1] T. Nakano et al: Bone 39 (2002) 479-487.
- [2] T. Ishimoto et al: J Bone Miner Res 28 (2013) 1170-1179.
- [3] T. Nakano et al: Bone 51 (2012) 741-747.
- [4] J. Wang et al: Mater Trans 54 (2013) 1257-1261.
- [5] Y. Noyama et al: Bone 52 (2013) 659-667.
- [6] T. Ishimoto et al. Calcif Tissue Int (2021) in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Takuya Ishimoto, Keita Kawahara, Aira Matsugaki, Hiroshi Kamioka, Takayoshi Nakano                      | 4. 巻<br>in press       |
| 2. 論文標題<br>Quantitative evaluation of osteocyte morphology and bone anisotropic extracellular matrix in rat femur | 5. 発行年<br>2021年        |
| 3. 雑誌名<br>Calcified Tissue International  | 6. 最初と最後の頁<br>in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s00223-021-00852-1   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名<br>奥田菜月、石本卓也、中野貴由      |
| 2. 発表標題<br>骨断面異方性を用いた異方性骨再建の提案 |
| 3. 学会等名<br>日本金属学会2019年秋期講演大会   |
| 4. 発表年<br>2019年                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石本卓也、川原啓太、松垣あいら、上岡寛、中野貴由         |
| 2. 発表標題<br>長管骨におけるアパタイト配向化とオステオサイト形態異方性の相関性 |
| 3. 学会等名<br>第40回日本骨形態計測学会                    |
| 4. 発表年<br>2020年                             |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>石本卓也、中野貴由                |
| 2. 発表標題<br>骨欠損部への配向化再生骨の誘導          |
| 3. 学会等名<br>日本金属学会2020年秋期講演（第167回）大会 |
| 4. 発表年<br>2020年                     |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-----------|---|----------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 中野 貴由<br><br>(Nakano Takayoshi)<br><br>(30243182) | 大阪大学・工学研究科・教授<br><br><br>(14401) |    |

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-----------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究<br>協力者 | 松垣 あいら<br><br>(Matsugaki Aira) |                       |    |
| 研究<br>協力者 | 奥田 菜月<br><br>(Okuda Natsuki)   |                       |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|