

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350493

研究課題名(和文) コラーゲン分子の非接触ナノ力学特性解析による骨質劣化の定量評価

研究課題名(英文) Quantification of bone material properties-degradation by non-contacting, nano-mechanical properties analysis

研究代表者

佐々木 直樹 (Sasaki, Naoki)

北海道大学・先端生命科学研究院・名誉教授

研究者番号：40142202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢骨のモデル物質として、糖化处理骨の力学特性・構造研究を行った。糖化处理は成形したウシ大腿緻密骨試料を、グルコースを含むリンゲル液中で3日から28日間インキュベートした。最終糖化産物の目安として、骨コラーゲンに含まれるペントシジン(PS)量を定量した。PS量は14日目くらいで急激な増加をみせ、28日目では飽和に近づき、微増となった。PS量の増加に伴い、コラーゲン線維中のコラーゲン分子のパッキングに変化は見られていないが、骨コラーゲンヘリックス中のポリペプチド鎖のパッキングに大きな乱れが生じているのが見いだされた。これが骨の巨視的力学特性を劣化させていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Mechanical properties and structural analysis of glycated bone specimens was performed, as a model system of aged bones. Rectangular shaped bovine femoral cortical bone specimens were treated with Ringer's solution containing glucose for periods from 3 to 28 days. Amount of pentosidine (PS) was quantified as a function of the treated periods. The increase in PS was remarkable at 14 days of incubation, but after 28 days it changed gradual, indicating the production of PS seemed saturated there. With the increase in PS, packing of alpha-polypeptide chains in a tropo-collagen was found disordered. Such a structural change in bone collagen at the molecular level was considered to affect the macroscopic material properties of bone tissues.

研究分野：総合領域

キーワード：生体力学 X線回折 最終糖化産物 ペントシジン コラーゲン分子

1. 研究当初の背景

結合組織中でコラーゲン分子は生理的架橋反応を受け、コラーゲン線維の強靱化をみる。一方、結合組織中のコラーゲンの糖化も一種の架橋反応である。そこで産生される物質(終末糖化産物, AGEs)はコラーゲンの力学特性を始めとするマクロな物性を変え、組織の老化をもたらすことが知られている。特に骨組織の場合、加齢による AGEs の蓄積で、力学特性をはじめマクロな物性を変化させ、骨粗鬆症の引き金となっていることが指摘されている。

骨粗鬆症は従来「骨密度が低下し、骨の微細構造に異常が生じた結果、骨がもろくなり骨折しやすくなった状態」とされていた。これを受けわが国では、骨密度の定量が広く行われてきた。しかし、高骨密度だが骨折リスクの高い症例が多く現れるようになり、2000年 NIH コンセンサス会議で骨粗鬆症は再定義され「骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる骨格疾患」というように骨密度に代わり骨強度という概念が重視された。そこでは骨強度は骨密度と「骨質(骨密度以外の骨強度因子)」で決定される物性とされた。骨質という概念は骨を形成する材料特性とそれらが形成する構造の力学特性を総合したものと考えられる。加齢に伴う骨質変化は、AGEs 蓄積による組織の硬(脆)化と靱性の減少とされる。AGEs 蓄積による骨質変化は、骨コラーゲンの構造変化が引き金であると考えられる。

2. 研究の目的

AGEs 蓄積による骨質変化は、測定条件・方法によっては相殺効果が表れるなど検出が難しく信頼できる定量的データは多くはない。特に、マクロな測定では、骨の場合はミネラルの存在で、腱組織の場合はコラーゲン分子がつくる高次構造の存在で、AGEs によるコラーゲンの物性変化が顕著に現れないことが原因である。先に、我々はミネラル存在下のコラーゲン分子の弾性率をコラーゲンヘリックスに特徴的な X 線回折線の Debye-Waller 因子を測定することで決定した¹⁾。この測定は、試料に力を加えることなく、対象物質の力学特性を非接触・非破壊・成

分選択的(例えば骨中のコラーゲンだけ)に行うことが可能である。AGEs による骨質の微かな変化をこの方法で測定できるのではないかと考えた。以上を踏まえ、本研究の目的は、AGEs 蓄積による骨質の変化を、骨組織の力学特性および構造から特徴づけ、そのうえで「骨質」の定義をより明確にすることである。本研究の結果、骨質に関する理解が深まることで、骨老化の機序や骨粗鬆症の新たな診断・治療への道筋が明らかになることが期待された。

3. 研究の方法

(1)骨試料の糖化处理

骨試料としては、28ヶ月ウシ大腿骨骨幹部緻密骨を用いた。非生理的架橋過程による AGEs の蓄積は、*in vitro* で再現できることが知られている。グルコースを含む HBSS 液中で、矩形に成形したウシ大腿緻密骨を3日から28日間 37°C でインキュベートし、加齢骨のモデルとしての糖化处理骨を作成した。糖化处理骨は、リンゲル液で洗浄後、4°C で保存した。蓄積 AGEs としては、代表的な AGE であるペントシジン(PS)量を測定した。この定量分析は A-kit 社に依頼した。

AGEs の蓄積で、上述のように、試料の脆化や靱性変化が期待されることから、糖化处理骨の力学特性測定には、3点撓み法による応力緩和実験を行った。AGEs 蓄積がコラーゲン分子の架橋反応であることから、分子レベルでの構造変化および力学特性

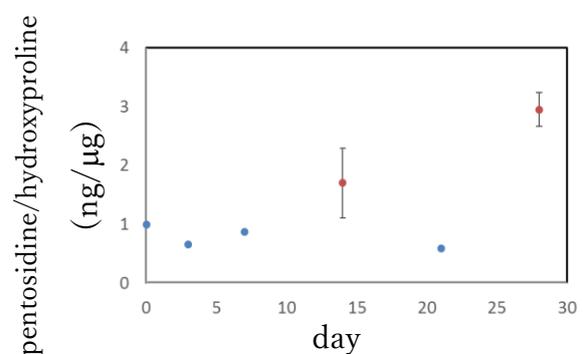


Fig. 1. Pentosidine as a function of treating period.

変化を調べた。構造変化は、X線回折法によりコラーゲン分子配列の膨潤度を、力学特性変化ではコラーゲン分子の Debye-Waller 因子の温度依存から、ヘリックスの伸縮振動のバネ定数変化の測定をやはり X線回折法により試みた。

4. 研究成果

(1) ペントシジン量の定量

高速液体クロマトグラフを用い、特有の蛍光を測定することにより、コラーゲン分子当たりのペントシジン量を定量した。図 1 に(コラーゲン)アミノ残基当たりのペントシジン(PS)量の処理日数依存を示す。コントロールでも PS が確認されたが、28 ヶ月までの成長で蓄積されたものと考えられる。1 週間程度までの糖化処理ではほとんどコントロールとの差が観測されないが、4 週間の処理試料ではコントロールの 3 倍にもなる有意な PS の増加がみられた。増加のプロファイルは弱いシグモイドといえるかもしれない。Vashishth 等の処理時間と PS 量の検量曲線は上に凸の形と報告されている²。こうした検量曲線の形の違いは、試料の形状や大きさに依存することが考えられる。

(2) 応力緩和測定

骨の応力緩和は一般に次の実験式で記述することができる³、

$$E(t) = E_0 [A \exp[-(t/\tau_1)^\beta] + (1-A) \exp[-(t/\tau_2)^\gamma]]$$

ここで E_0 は初期弾性率、 A は緩和全体に対する第 1 項目の割合、 τ_1 , τ_2 は緩和時間、 β , γ はその分布を表し、

$$0 < A, \beta, \gamma \leq 1$$

である。このうち第一項目は、骨中のコラーゲン小線維レベルの速い緩和、第二項目はオステオンなど骨の高次組織の関わる遅い緩和を表す($\tau_1 \ll \tau_2$)。今回測定したすべての応力緩和は、実験式で表すことができた。これから、実験式中のパラメータがペントシジン量の増加に伴い、どのような変化を示すかを見ることで、骨質変化の傾向を把握する。これらのパラメータのうち、コントロールと有意に異なった(増加した)のは遅い緩和の緩和時間 τ_2 である。一般に緩和

時間は、緩和にかかわる物質の弾性率と逆数関係にある。この結果は、骨の高次組織の弾性率が減少していることを示唆している。

(3) 糖化による構造変化

当初計画していた Debye-Waller 因子の計測は、コラーゲンヘリックスのヘリックス軸方向の伸縮振動を計測するものである。PS によって形成される架橋は主として、コラーゲン分子間や α ペプチド鎖間に形成される。架橋によって、変化する分子構造でもたらされるものは、ヘリックス軸とは垂直方向の自由度の減少と考えられる。架橋が物性を左右する物質としてゲルが知られており、架橋量を定量するために膨潤度が測定される。ここでも、コラーゲン線維の膨潤を調べた。コラーゲン線維の膨潤はヘリックス軸に垂直な方向の規則性を表す赤道線回折ピークを用いて調べた。コラーゲン分子の配列は、PS 量が増加しても変化がなかったが、分子内のポリペプチド (α) 鎖間の距離に対応するピークが広角側へシフトし、著しくブロードになることが見いだされた (Figure 2)。この結果は、PS による架橋の増加で分子内の配列に大きな乱れが発生したことを示唆する。PS 増加で引き起こされた分子レベルでの乱れが、巨視的な力学特性の変化を与えているものと考えられる。

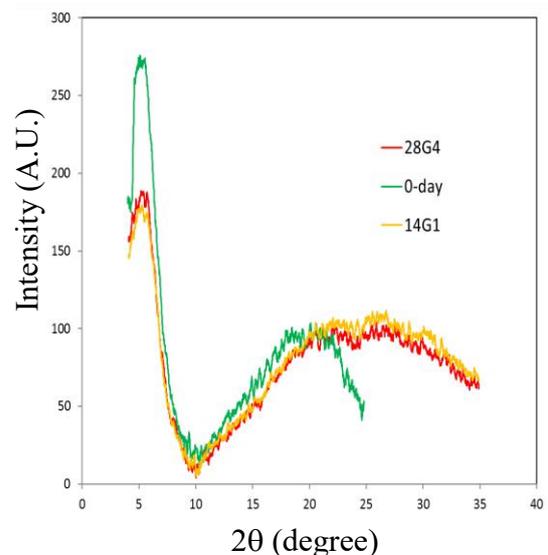


Fig. 2. Equatorial diffraction profiles for glycosylated and intact specimens.

[参考文献]

- 1) N. Sasaki, et al. Elastic properties of collagen in bone determined by measuring the Debye-Waller factor
Journal of Biomechanics 46, 2824–2830 (2013).
- 2) D. Vashishth, et al. Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. Bone, 28, 195–201 (2001)
- 3) T. Iyo, et al. Mathematical description of stress relaxation of bovine femoral cortical bone. Biorheology, 43, 117–132 (2006)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Determination of the elastic modulus of b-lactoglobulin amyloid fibrils by measuring the Debye-Waller factor.
Naoki Sasaki, Yuna Saitoh, Rajesh Kumar Sharma, Kazuya Furusawa, International Journal of Biological Macromolecules, 92, 240–245 (2016).[査読有]
- ② Development of the evaluation system for barrier functions of engineered epithelial lumens.
Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Naoki Sasaki, Regenerative Therapy, 3, 82–89 (2016). [査読有]
- ③ Morphology and properties of globular polymeric materials in the solid state: A composite material of DNA with a cationic surfactant.
Emmanuel C. Ossai, Yuka Tomimori, Shota Ohki, Koki Okada, Takeshi Yonekura, Kazuya Furusawa, Naoki Sasaki, Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics, 54, 730–738 (2016). [査読有]
- ④ Application of multichannel collagen gels in construction of epithelial lumen-like engineered tissues.
Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Hiromi Machino, Saki Yahata, Akimasa Fukui, Naoki

Sasaki

ACS Biomaterials Science and Engineering, 1, 539–548 (2015). [査読有]

- ⑤ Effects of a flow field on amyloid fibrillogenesis in a b-lactoglobulin solution. Rajesh Kumar Sharma, Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, International Journal of Biological Macromolecules, 70, 490–497 (2014). [査読有]
- ⑥ Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration.
Kazuhisa Yamada, Hideki Sudo, Koji Iwasaki, Naoki Sasaki, Hideaki Higashi, Yusuke Kameda, Manabu Ito, Masahiko Takahata, Kuniyoshi Abumi, Akio Minami, Norimasa Iwasaki, American Journal of Pathology, 184, 753–764 (2014). [査読有]

[学会発表] (計 21 件)

- ① 熱処理による DNA-CTA グロビュラー固体の構造変化
佐々木直樹、古澤和也(北大先端生命)、米倉岳志(北大生命科学学院)
第 64 回レオロジー討論会、10 月 29 日 2016 年 大阪大学、(大阪府・豊中市)
- ② Morphology and properties of globular DNA-cationic surfactant complex materials in the solid state.
Naoki Sasaki, The XVth International Congress on Rheology, 12th August, 2016, Kyoto Terra (京都府・京都市) [Keynote lecture, invited]
- ③ 複合材料の成分選択的力学定数計測
佐々木直樹、第 30 回高分子学会北海道支部研究発表会
2016 年 1 月 21 日、北海道大学(北海道・札幌市) [招待講演]
- ④ グロビュラー高分子フィルム の物性に及ぼす熱処理の効果

- 米倉岳志、古澤和也、佐々木直樹、第 63 回
レオロジー討論会
2015 年 9 月 24 日、神戸大学(兵庫県・神戸市)
- ⑤ 応力緩和実験によって引き起こされる骨の構造・力学特性の不可逆変化
佐々木直樹、原口和也、古澤和也、第 63 回
レオロジー討論会
2015 年 9 月 24 日、神戸大学(兵庫県・神戸市)
- ⑥ マルチチャンネルコラーゲンをを用いた三次元再生組織の構築
古澤和也、福井彰雅、佐々木直樹、土田雅之、
第 63 回レオロジー討論会
2015 年 9 月 24 日、神戸大学(兵庫県・神戸市)
- ⑦ A novel method for determining elastic constants of biological materials: The Debye-Waller factor measurements. Naoki Sasaki, Hideki Shirakawa, Tsutomu Nozoe, Yuna Saitoh, Kazuya Furusawa
The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 18th September, 2016, Hokkaido University (北海道・札幌市)
- ⑧ 線形領域の歪負荷による骨の構造・力学特性変化 佐々木直樹、原口和也、古澤和也
第 38 回日本バイオレオロジー学会年会、2015 年 6 月 6 日、学術総合センター(東京都・千代田区)
- ⑨ マルチチャンネルコラーゲンの形態形成機構に関する研究 古澤和也、杉山晃一、福井彰雅、佐々木直樹、第 38 回日本バイオレオロジー学会年会、2015 年 6 月 6 日、学術総合センター(東京都・千代田区)
- ⑩ グロビュラー高分子フィルムのも性に及ぼすアニリングの効果
米倉岳志、古澤和也、佐々木直樹 第 64 回
高分子学会年会、2015 年 5 月 28 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- ⑪ Role of collagen in bone mechanical integrity. Naoki Sasaki, 15th International Congress of Biorheology, 24th May, 2015, Korean University, (Seoul, Korea) [invited]
- ⑫ 骨組織の構造、骨形成に及ぼす物理刺激効果
佐々木直樹、第 3 回日本 MRS 講演会: 関節軟骨損傷に対する再生・再建医療技術の現状と課題 2014 年 12 月 12 日、横浜市開港記念会館(神奈川県・横浜市)[招待講演]
- ⑬ 海綿骨の粘弾性特性:材料特性と構造特性
上田和貴、古澤和也、佐々木直樹、
第 62 回レオロジー討論会、2014 年 10 月 16 日、
福井市地域交流プラザ(福井県・福井市)
- ⑭ 異方性 DNA ゲルの薬剤徐放挙動について
安井 憲、佐々木直樹、古澤和也
第 62 回レオロジー討論会、2014 年 10 月 16 日、
福井市地域交流プラザ(福井県・福井市)
- ⑮ DNA-CTA グロビュラー高分子固体の応力緩和特性に及ぼす吸着水の効果 岡田昂樹、Ossai, Emmanuel, C., 古澤和也、福井彰雅、佐々木直樹、第 62 回レオロジー討論会、2014 年 10 月 16 日、福井市地域交流プラザ(福井県・福井市)
- ⑯ DNA-陽イオン界面活性剤相互作用に及ぼす塩濃度の効果 大木翔太、佐々木直樹、古澤和也 第 62 回レオロジー討論会、2014 年 10 月 16 日、福井市地域交流プラザ(福井県・福井市)
- ⑰ マルチチャンネルコラーゲンをを用いた再生肝組織の構築と細胞の浸潤
古澤和也、福井彰雅、佐々木直樹 第 62 回レオロジー討論会、2014 年 10 月 16 日、福井市地域交流プラザ(福井県・福井市)
- ⑱ How is structural hierarchy in bone tissue reflected on its mechanical properties? Naoki Sasaki
7th World Congress of Biomechanics, 7th July, 2014, John B. Hynes Veterans Memorial Convention center, (Boston, USA) [invited]
- ⑲ マルチチャンネルコラーゲンをを用いた上皮管腔組織の構築
古澤和也、町野ひろみ、福井彰雅、佐々木直樹 第 37 回日本バイオレオロジー学会年会、2014 年 6 月 6 日、大宮ソニックシティ、(埼玉

県・さいたま市)

- ⑳ Beta-lactoglobulin アミロイド・ナノ粒子とゲル化
佐々木直樹、山下聡一、古澤和也
第 37 回日本バイオレオロジー学会年会、
2014 年 6 月 6 日、大宮ソニックシティ、
(埼玉県・さいたま市)
- ㉑ 異方性 DNA ゲルの形成動力学と構造制御
古澤和也、福井彰雅、佐々木直樹 第 37 回
日本バイオレオロジー学会年会、
2014 年 6 月 6 日、大宮ソニックシティ、(埼玉県・
さいたま市)

[図書] (計 1 件)

Elongational flow birefringence investigation of
dynamics of DNA molecules. Page 43 –76.
Naoki Sasaki, In “Nano/Micro Science and
Technology in Biorheology” Edited by Rio Kita and
Toshiaki Dobashi Springer, Tokyo, 2016.

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木直樹 (SASAKI Naoki)

北海道大学・先端生命科学研究院・名誉教授

研究者番号:40142202

(2)研究分担者

なし