

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791423

研究課題名（和文） 骨細胞ネットワークの健全性に着目した骨リモデリング開始機序の解明

研究課題名（英文） Initiating mechanism of bone remodeling influenced by the integrity of osteocytic cellular network

研究代表者

藏田 耕作（KURATA KOSAKU）

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：00368870

研究成果の概要（和文）：

骨細胞ネットワークの健全性に着目して骨リモデリング機序を調査することを目的とし、局所的なひずみや破断を与えながら骨細胞を培養できる実験系およびマウス脛骨に疲労亀裂を付与できる動物モデルを開発して実験を行った。その結果、骨基質に生じる大ひずみにより骨細胞ネットワークが損傷を受け、その周囲でアポトーシス細胞が誘導されることが分かった。これがシグナルとなり、損傷部位をターゲットとした骨リモデリングが開始されたり、骨強度低下を補償する骨形成が生じたりすることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to investigate the mechanism of bone remodeling while focusing on the integrity of osteocyte network. Both an in vitro experimental system that could apply local mechanical damage to the cultured osteocytes and an animal model that could give a fatigue microcrack to a mouse tibia were developed. A large deformation of the culture substrate or bone matrix damaged the osteocyte network, and apoptotic cells were derived around the necrotic osteocytes. This apoptotic cell induction would be a key response for initiating bone remodeling, by which a damaged bone matrix could be repaired locally and appositional bone formation would be occurred to compensate the drop of bone strength.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生体工学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨細胞，ネットワーク，疲労亀裂，骨リモデリング，細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は骨基質の中で三次元的な細胞ネットワークを形成しており、骨に働く力学的負荷を感知するメカノセンサーとしての機能が注目されている。たとえば、Klein-Nulend（オランダ）や Noble（イギリス）の研究グ

ループは、骨細胞の力学応答について細胞実験に基づいた多くのデータを発表している。しかしながら、これらは力学的刺激に対する骨細胞そのものの機能や活性の変化を報告するものばかりであり、骨細胞が骨リモデリングの中で重要な働きを担っていると示唆

しながらも具体的なものではなかった。一方、形態学的観察をもとにして、骨基質に見られる微小な亀裂と破骨細胞による骨吸収との関連性を指摘する報告が散見される

(Verborgt et al., 2000; Burr, 2002 など)。しかしながら、骨リモデリングの開始、すなわち破骨細胞による骨吸収開始のメカニズムについては骨細胞の関連を推察するにとどまっていた。

このような中、本研究代表者は、生体骨で生じる疲労亀裂を模擬した *in vitro* 培養系において、骨細胞の細胞死が破骨細胞様細胞の分化誘導と関連があることを証明した

(Kurata et al., 2006)。具体的には、コラーゲンゲル中に骨細胞を分散して三次元的に培養し、形成された細胞ネットワークを物理的な引っ掻きによって破壊する、さらに未分化骨髄細胞をコラーゲンゲル表面に播種して分化を確認する、というものである。

さらに、平成 19~20 年度に実施した「骨細胞の三次元培養実験系を用いた骨リモデリング開始メカニズムの解明」(科学研究費補助金, 若手 B, 課題番号: 19791049) では、

(1) ゲル内で三次元培養した骨細胞に段階的な伸張刺激を与えると 9000 μe 以上のひずみによって有意な細胞死の増加を示すこと

(2) その際、培養液中に分泌される M-CSF および RANKL 産生量が増加すること

(3) マイクロマニピュレーションによって骨細胞ネットワークを切断すると細胞はネクロシスを起こすが、その近隣でアポトーシスの誘導を受ける骨細胞が増加すること

(4) このアポトーシスの誘導はギャップジャンクションの阻害によってさらに広範囲に拡大すること

を示した。すなわち、「繰り返し荷重等の力学刺激によって骨に生じる疲労亀裂が骨細胞ネットワークを破断する。これが引き金となって骨細胞が M-CSF や RANKL などの液性因子を分泌し、局所的な破骨細胞の分化誘導を促す。さらに骨細胞ネットワークの健全性がこの機序のコントロールに関与している」という、疲労亀裂をターゲットにした骨リモデリングの開始メカニズムが存在することを示唆するとともに、骨細胞ネットワークの重要性を明らかにした。

このように骨に発生する疲労亀裂、骨細胞の細胞死、破骨細胞の分化誘導、骨リモデリングの開始との関連の中で、骨細胞ネットワークの重要性が明らかになりつつある。しかしながら、実際の疲労亀裂では多くの骨細胞が高い繰り返し伸張刺激に曝され、疲労限界に達した部分が破断する。上記研究で用いた機械的破断させる実験モデルではこのような力学的環境を再現できておらず、骨細胞の応答を知る上では不十分である。さらに、骨細胞ネットワークの機能と疲労亀裂の関係

や骨代謝の制御メカニズムについては、*in vitro* 実験だけでなく *in vivo* レベルで調査することが不可欠といえる。

2. 研究の目的

そこで本実験では、骨細胞ネットワークの健全性に着目して骨リモデリング機序を調査することを目的とした。具体的には、下記の研究計画 (1) ~ (3) を遂行した。

(1) 切り欠き板上における骨細胞培養システムの確立

切り欠きを有する基質上で骨細胞を培養し、これに伸張負荷を与えるという *in vitro* 実験系を開発した。これは、切り欠き底の骨細胞は応力集中によって非常に高いひずみに曝され、さらに疲労亀裂が進展して骨細胞ネットワークが破断されるという実験モデルである。

(2) 切り欠き板の応力・ひずみ分布と細胞の応答の関係

切り欠き板表面の応力・ひずみ分布について破壊力学的に計算し、これと骨細胞死の分布とを比較した。

(3) マウス下肢疲労亀裂モデルにおける骨細胞ネットワークの健全性

マウス脛骨両端を把持して繰り返し圧縮荷重を与える疲労亀裂モデルを作製し、疲労亀裂が骨リモデリングへ与える影響を評価した。

3. 研究の方法

(1) 切り欠きを有する細胞培養基質と繰り返し伸張刺激負荷装置の開発

骨細胞は骨小腔内に存在し、骨細管を通して隣接する細胞へ細胞突起を伸ばすことにより骨内で三次元的なネットワークを形成している。骨に負荷が加わると骨小腔近傍では応力集中が起こり、骨細胞は局所的な応力やひずみに曝されることになる。骨細胞の応答を正しく評価するためには、このような骨内の力学的環境を模した実験系が必要となる。

そこで本研究では、切り欠きを有する細胞培養基質 (図 1, 14×18 mm, 厚さ 1.2 mm, 以下、切り欠き板と呼ぶ) に繰り返し引張り荷重を与えることで、骨小腔周囲の分布を有するひずみを培養骨細胞へ与えることとした。切り欠き板は細胞培養ディッシュ ($\phi 100$ mm, Falcon) から三次元 CAM を用いて切り出した。切り欠き板に繰り返し引張り荷重を与える装置 (以下、伸張刺激負荷装置) を図 2 に示す。この装置は、片持ち梁式ロードセル、ステップモータとその駆動装置、Arduino マイコンによって構成されている。切り欠き板に設けた 2 つの穴に、伸張刺激負荷装置のアーミング先端のピンを挿入して把持し、引張り荷重を負荷できるようにした。負荷荷重をロー

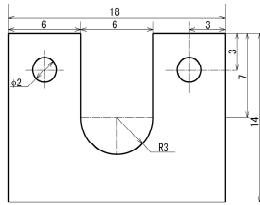


図 1 切り欠きを有する細胞培養基質 (切欠き板)

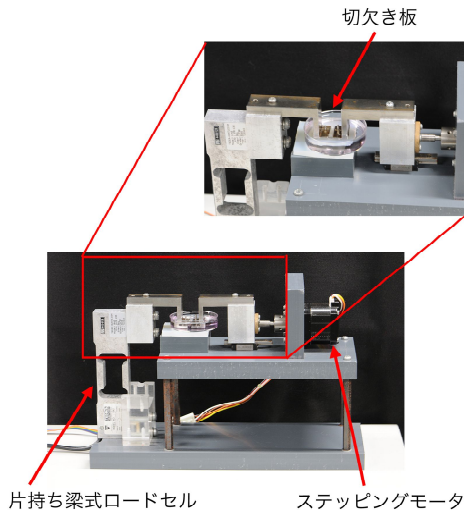


図 2 切欠き板に繰り返し伸張刺激を与える実験装置

ドセルでモニターしながらステッピングモータの動作をフィードバック制御することで、切欠き板に任意の最大荷重、周期、回数の伸張刺激を与えることができる。また、Arduino マイコンを除く装置全体を CO₂ インキュベータ内に設置できるよう設計・製作した。

(2) 切欠き板表面に生じるひずみの有限要素解析

切欠き板の有限要素モデルを作成し、表面に生じるひずみ分布を計算した。汎用有限要素法解析プログラム MSC.Marc/Mentat を用いて、切欠き板の厚さ方向の応力・ひずみを考えない二次元弾塑性解析を行った。切欠き板の材料物性は、あらかじめ細胞培養ディッシュを JIS 試験片 1BA 型に切り出して引張り試験を行って求めた。ヤング率 3.22 GPa, 降伏応力 40.0 MPa, ポアソン比 0.3 とした。

(3) 繰り返し伸張刺激に対する骨細胞の応答

本実験ではマウス長管骨由来骨細胞樹立株 MLO-Y4 細胞を使用した。切欠き板をラット尾腱由来 I 型コラーゲン (0.15 mg/ml in 0.02 M 酢酸, BD Biosciences) にてコーティングして細胞を播種した (初期密度 160 cells/mm²)。培養には、2.5% 牛胎児血清, 2.5% 鉄添加牛血清, 1% 抗生物質を添加した α -MEM 培地を用いた。2~3 日間の培養を行って細胞間ネットワークを形成させた後、表 1 に示す条件で切欠き板に繰り返し伸張刺激を与えた。

表 1 切欠き板への伸張刺激条件

群名	刺激条件
Load	2N の引張り荷重を周期 1Hz で 3 時間負荷
Load + Fracture	2N の引張り荷重を周期 1Hz で 3 時間負荷。その後、切欠き板を大荷重で引張り破断させた。
Fracture	切欠き板を大荷重で引張り破断。
Control	無負荷

切欠き板表面のひずみに対する骨細胞の応答は、細胞のネクロシスおよびアポトーシスを評価することによって行った。骨細胞のネクロシスは、切欠き板破断前後の細胞を PI (Propidium iodide) で染色して観察することによって評価した。切欠き板の破断によって細胞膜が損傷を受けると、PI 試薬が細胞内に入り、赤色蛍光を発する核が観察できる。一方、細胞のアポトーシスは、カチオン色素 JC-1 系の蛍光試薬 MitoPT を用いた。健康細胞では、MitoPT はミトコンドリアに凝集して赤色蛍光を発する。ところが、アポトーシス初期段階でミトコンドリア膜電位が低下すると、MitoPT は細胞質内にモノマーとなって分散して緑色蛍光を呈するようになる。先述の条件で伸張刺激後、3 時間静置培養を行ってから染色し、アポトーシス細胞の分布を倒立型蛍光顕微鏡およびデジタルマイクروسコープにて観察・撮像した。

(4) 繰り返し伸張刺激に曝された骨細胞を介した破骨細胞の分化誘導

切欠き板上で繰り返し伸張刺激に曝された骨細胞とマクロファージを共培養し、破骨細胞の分化誘導に与える影響を調査した。マクロファージは、マウス長管骨より採取した骨髓細胞を 20 ng/ml M-CSF 存在下で 2 日間培養して得た。先述の条件で伸張刺激を与えた骨細胞上に、このマクロファージを播種して 3 日間の共培養を行った。その後、細胞を固定し、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ

(TRAP) 染色を行って破骨細胞の分布を観察した。

(5) マウス下肢疲労亀裂モデルの開発

マウス下肢に対して疲労亀裂を与えるた

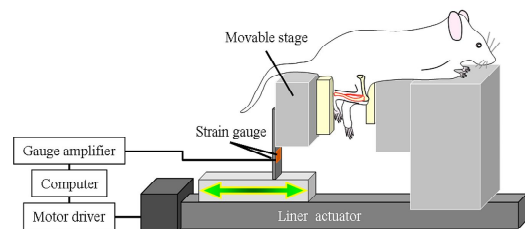


図 3 マウス脛骨に疲労亀裂を与えるための圧縮荷重負荷装置

めに新たに開発した繰り返し圧縮荷重負荷装置を図3に示す。負荷装置は、一軸リニアアクチュエータ、ひずみゲージ、ゲージアンプ、モータドライバ、パーソナルコンピュータで構成されており、マウスの脛骨部に繰り返し圧縮荷重を与えて疲労亀裂を誘導する。自作プログラムによって負荷荷重、周期、回数を任意に設定し、フィードバック制御を行うことが可能である。

(6) 疲労亀裂の付与と骨形態計測

対象には、30週齢雌マウスを用いた。実験に先立ち、脛骨皮質骨表面にひずみゲージを貼付して圧縮荷重を付与し、骨表面に生じるひずみを計測した。

麻酔下のマウス左側脛骨に4, 8, 12Nの繰り返し圧縮荷重を、周期2Hzで1日6000回付与した。24時間間隔で7日間繰り返した後、脛骨の非脱灰研磨標本を作製して骨形態計測に供した。さらに、骨ブロックをフクシン染色して疲労亀裂の同定を行った。一方、連続して作製した研磨標本の撮影画像より三次元有限要素モデルを生成し、応力解析を行った。解析には応力解析ソフトVOXELCONを用いた。約5000万要素からなるモデルの脛骨遠位端の断面を全固定し、近位端の断面に12Nの荷重を一様分布圧縮荷重として負荷したとき、von Mises 応力の計算を行った。

4. 研究成果

(1) 切欠き板表面に生じるひずみの有限要素解析

切欠き板に2Nの引張り荷重を与えたとき、表面に生じるひずみ分布(荷重負荷方向)を図4に示す。切欠き底には集中的な引張りひずみが生じているが、遠ざかるにつれてひずみが減少していた。骨内部の骨小腔周辺で生じる応力ひずみの集中を模擬しているものと思われる。切欠き板底では0.25%の最大引張りひずみが生じており、これは日常生活において骨に生じるひずみの範囲内にある。なお、ひずみは弾性変形域にあった。

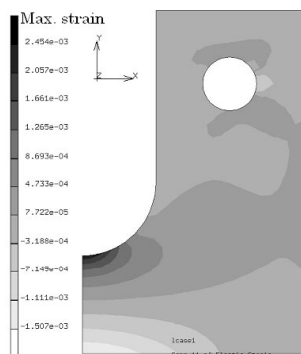
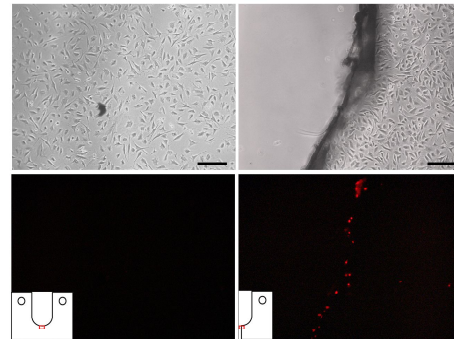


図4 2Nの引張り荷重を与えたとき切欠き板表面に発生するx方向ひずみ分布

(2) 繰り返し伸張刺激に対する骨細胞の応答

PI染色によって骨細胞のネクローシスを

観察した結果の例を図5に示す。切欠き板を破断させる前にはPI陽性細胞は見当たらないが、破断付与後には破断面に沿ってPI陽性のネクローシス細胞が観察できた。ネクローシス細胞の誘導は破断面のごく近傍に局在しており、破断によるメカニカルダメージが細胞ネクローシスの原因であることが分かる。



(a) Before fractured (b) After fractured

図5 切欠き板破断前後のPI陽性ネクローシス細胞の分布 (Bar: 0.2mm)

切欠き板上を $1 \times 1\text{mm}$ のROI (region of interest)に分割し、それぞれの領域でアポトーシス細胞の割合を求めた結果を図7~10に示す。まず、Control群(図6)ではアポトーシス細胞の割合は切欠き板全面でほぼ同様であり、10~20%であった。次に、Load群(図7)では、ひずみが大きい切欠き底周辺においてアポトーシス細胞の割合がControl群と同様、もしくは少し低値であった。これは繰り返し荷重を付与することによって細胞間ネットワークの結びつきが強固となり、細胞アポトーシスの発生が抑制されたのではないかと考えられる。一方、切欠きから遠い、ひずみが小さい領域ではアポトーシス細胞の割合がやや高くなっていた。ひとつの原因として、引張りを付与するときに切欠き板周辺部では変位が大きく、培養液による流体せん断が発生して細胞にダメージを与えていることが考えられる。

Fracture群(図8)では、切欠き板破断面においてアポトーシス細胞の誘導が非常に多く認められ、その割合は30~40%にまで達していた。破断面に沿って発生したネクローシス細胞がその周りでアポトーシス細胞を誘導したのではないかと考えられる。Load + Fracture群(図9)でも同様に、切欠き板破断面においてアポトーシス細胞の割合が高くなった。Fracture群、Load + Fracture群のいずれも破断面の近くで局所的なアポトーシス細胞の誘導が認められた。しかしながら、その割合は後者の方が低値であった。これは、Load群で認められたように、あらかじめ生理的範囲内のひずみを骨細胞に付与することにより細胞間ネットワークの結びつきが

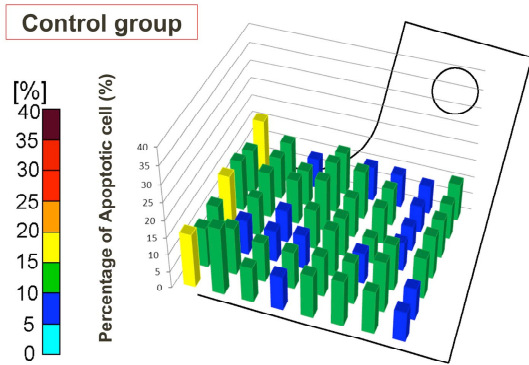


図 6 アポトーシス細胞割合の分布 (Control 群)

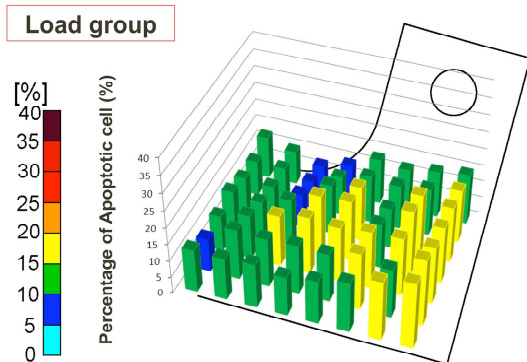


図 7 アポトーシス細胞割合の分布 (Load 群)

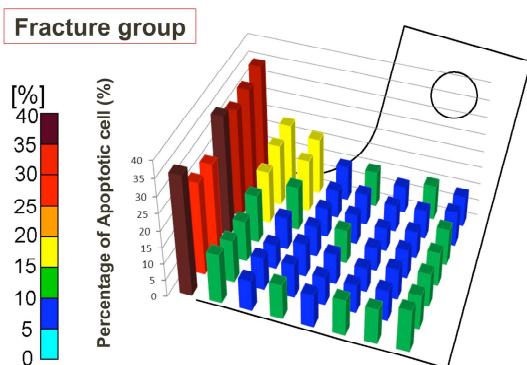


図 8 アポトーシス細胞割合の分布 (Fracture 群)

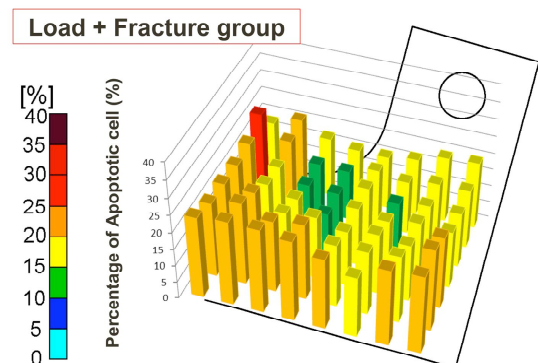


図 9 アポトーシス細胞割合の分布 (Load+Fracture 群)

強固になり、アポトーシスに抗するような応答を示したのではないかと推察される。

(3) 繰り返し伸張刺激に曝された骨細胞を介した破骨細胞の分化誘導

切欠き板上で繰り返し伸張刺激に曝された骨細胞とマクロファージを共培養したが、TRAP 陽性の破骨細胞様細胞の分化は認められなかった。メカニカルダメージによって骨細胞が RANKL 発現することは確認出来ているが、骨細胞と直接接する本共培養系では分化誘導に至らなかったと思われる。

(4) マウス下肢疲労亀裂モデルにおける骨形態計測

実験に先立ち、圧縮負荷によって 30 週齢マウス脛骨表面に生じるひずみを計測した。脛骨近位端より骨長 30 ~ 40% 付近の anterior-medial 面にひずみゲージを貼付し、0 ~ 25N の範囲で圧縮負荷を与えた。その結果、発生するひずみは荷重とともにほぼ線形に 0 ~ 0.11% まで増加することが分かった。

マウス下肢に対して疲労亀裂を与え、脛骨ブロックをフクシン染色し、脛骨全長に対して近位 25% および 50% の横断面を観察した。その結果、繰り返し負荷荷重 4, 8N 群では疲労亀裂の発生は認められなかった。負荷荷重 12N 群では、近位 25% 横断面の posterior 領域、50% 横断面の lateral 領域の皮質骨内部に疲労亀裂の発生が認められた。例として、図 10 に近位 25% 横断面蛍光顕微鏡観察像を示す。この疲労亀裂発生領域は、有限要素モデルで計算した von Mises 応力が高い領域と一致していた。さらにこの 12N 群では、骨内膜側および骨膜側のいずれにおいても lateral および posterior 領域で有意な骨形成増加が見られた。例として、脛骨近位 25% 横断面における新生骨面積の比較を図 11 に示す。また、圧縮負荷に対して断面二次極モーメントの強化 (図 12)、および脛骨が曲げられる方向における断面二次モーメントの強化が図られていた。

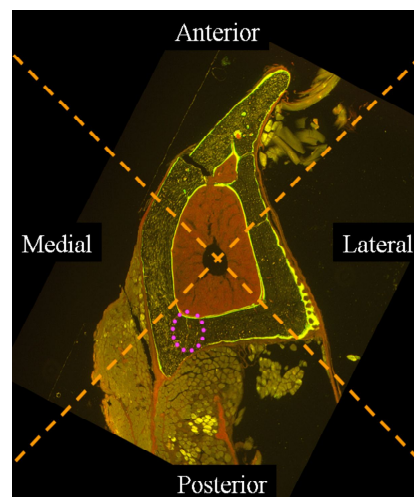


図 10 脛骨近位 25% 横断面において観察された疲労亀裂 (紫色の囲い内)

(図 13). 以上の実験により, 疲労亀裂による骨の材料力学的強度の低下が, 骨膜や骨内膜表面での旺盛な骨形成によって短期間に補償されることが推察された.

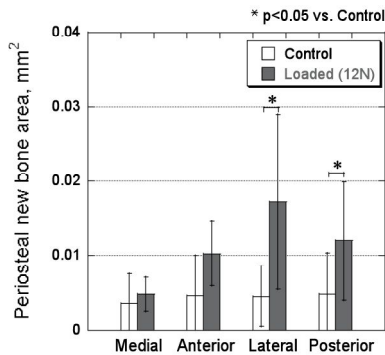


図 11 負荷荷重 12N 群の脛骨近位 25% 横断面における新生骨面積の比較

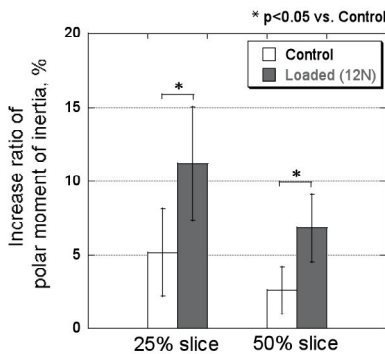


図 12 負荷荷重 12N 群の断面二次極モーメントの比較

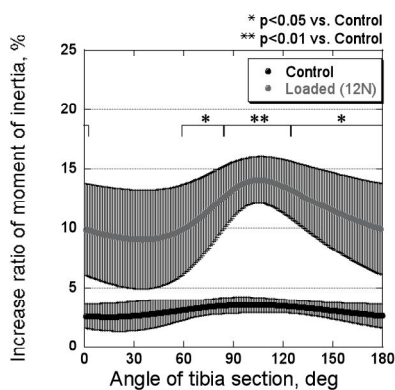


図 13 負荷荷重 12N 群の脛骨近位 25% 横断面における断面二次モーメントの比較

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①. S. Imai, T.J. Heino, A. Hienola, K. Kurata,

K. Büki, Y. Matsusue, H.K. Väänänen and H. Rauvala, Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading, Bone, 44(5): 785-794, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

- ①. 藏田耕作, 疲労亀裂を起因とした骨リモデリング開始メカニズム, 第 43 回九大生体材料・力学研究会, 福岡, 平成 21 年 4 月 10 日.
- ②. K. Kurata, Role of osteocytic cellular network in remodeling microdamaged bone matrix, Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2009 (SJB2009), Engelberg, 平成 21 年 9 月 4 日.
- ③. 藏田耕作, 切欠き周囲に発生するひずみ分布にさらされた骨細胞 ネットワークの力学応答, 第 22 回バイオエンジニアリング講演会, 岡山, 平成 22 年 1 月 10 日.
- ④. 堀川直斗, 疲労亀裂を模擬したメカニカルダメージに対する骨細胞の応答, 平成 21 年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 福岡, 平成 22 年 3 月 6 日.
- ⑤. 藏田耕作, マイクロダメージに起因した骨リモデリング開始における骨細胞の役割, 第 30 回バイオトライボロジシンポジウム, 福岡, 平成 22 年 3 月 13 日.
- ⑥. 藏田耕作, Responses of osteocytic cellular network to mechanical damage mimicking bone fatigue microcrack, 第 49 回日本生体医工学会大会, 大阪, 平成 22 年 6 月 26 日.
- ⑦. 藏田耕作, 骨細胞の力学応答と骨リモデリング調節における役割, 第 22 回日本運動器リハビリテーション学会, 仙台, 平成 22 年 7 月 10 日.
- ⑧. 藏田耕作, 微視的構造の観察に基づいた骨の機能的適応現象に関する研究, 第 23 回九州電子顕微鏡技術研究会, 福岡, 平成 22 年 9 月 4 日.
- ⑨. 藏田耕作, 骨細胞によるリモデリング制御のバイオメカニクス, 第 37 回日本臨床バイオメカニクス学会, 京都, 平成 22 年 11 月 2 日.
- ⑩. 堀川直斗, 培養基質のひずみやメカニカルダメージが骨細胞のアポトーシス誘導に及ぼす影響, 第 21 回バイオフロンティア講演会, 金沢, 平成 22 年 11 月 13 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藏田 耕作 (KURATA KOSAKU)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 00368870