

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：17702

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03324

研究課題名(和文)骨細胞による骨組織への機械的刺激の広めやすさと神経系の役割

研究課題名(英文)The role of the sensory nervous system and osteocytes in the propagation of mechanical stimulation in bone tissue

研究代表者

田巻 弘之(TAMAKI, Hiroyuki)

鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・教授

研究者番号：40253926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨への機械的刺激に対する感受性・反応性に影響する骨細胞ネットワークは運動刺激などによるメカニカルストレスを感受して、骨形成を促進する上で重要な構造的因子である。骨内支配する感覚神経のこれらとの関連、また骨量及び骨梁構造変化との関連をマイクロCT撮影、骨破断強度試験、顕微鏡観察等を用いて検討した。その結果、感覚神経の薬理的阻害は骨細胞ネットワーク、骨量、骨梁構造にネガティブな影響を示した。また、加齢により骨細胞は疎となり、骨幹部のスティフネスは高く、骨ひずみは小さく、骨量も低下した。骨内感覚神経は骨細胞ネットワークに影響し、これらは骨組織の量や構造を調整する役割がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨内を支配する感覚神経が骨細胞ネットワークと関連し、骨量や骨梁微細構造変化、骨組織の機械的特性にも影響することを示唆する結果を得た。骨への機械的刺激を広める骨細胞ネットワークは運動刺激効果の感受性・反応性に影響する因子のひとつとして理解され、新たな観点として運動処方プログラムの開発等に貢献する可能性がある。特に加齢に伴う骨組織の特性変化、骨のひずみやさ、骨細胞ネットワークや骨内神経支配の粗密等については機械的刺激に対する感受・反応性に関与し、高齢期の高スティフネスの骨組織への運動効果改善策に意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The osteocyte network, which influences the sensitivity and responsiveness to mechanical stimuli to bone, is an important structural factor in sensing mechanical stresses caused by exercise and other stimuli, and in promoting bone formation. We investigated the relationship between the sensory nerves in bone and osteocyte network, as well as bone mass and structural changes in rat trabecular bone using micro-CT imaging, bone strength tests, and microscopic observations. Pharmacologic sensory denervation negatively affected the osteocyte network, bone volume, and microstructure in trabecular bone. Aging also resulted in decreased osteocytes, higher stiffness, smaller bone strain, and lower bone volume in cortical bone. The results suggest that sensory nerves may have a role in influencing the osteocyte network and regulating bone tissue volume and structure.

研究分野：体力科学

キーワード：骨組織 ひずみ マイクロCT

## 1. 研究開始当初の背景

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(骨形成)や破骨細胞(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。骨への機械的ストレス(力学的因子)は、ホルモンなどの液性因子とともに骨量改善に有用な因子である。それゆえ、これまで国内外でどのような処方、どの程度行うかという外的(処方)な至適条件の探索が詳細に行われてきた。しかしながら、骨への機械的ストレスはできるだけハイ・インパクトな条件において効果的であり、低体力者や高齢者など骨折リスクの高いケースでは扱いにくい運動条件となり、ジレンマが生じていた。そこで、高齢期でも、低強度でも効果を引き出す方法の検証が国内外で進められ、1)筋電気刺激による骨への機械的刺激処方や、2)骨ひずみの速度(strain rate)を調整する処方などが検証され、その効果が報告されてきた(Rubin, Nature, 2001, Qin, JMNI, 2010, Tamaki, JMNI, 2014, 2015, Calcif Tissue Int, 2017, IJMS, 2019)。しかしながらそれは一定の条件下で有効であり、かつ処方期間の延長に伴い効果が減弱してくることが問題点であった。一方、神経科学領域では、骨組織内に神経線維(Ad, C 線維)が直接侵入している所見や、骨形成や吸収を担う骨芽細胞や破骨細胞に感覚神経遊離物質の受容体の存在が報告されはじめ(Castaneda-Corrall, Neuroscience, 2011, Jimenez-Andrade, Bone, 2010)、神経性因子が骨代謝調節に関与していることが国際的に認知されるようになってきた。これにより、この新たな調節因子(神経性因子)を駆使して運動効果を高める試みは、新たな処方を構想する上で重要な研究背景となっており、骨量改善への貢献度も注目されるようになってきた。

これらの背景を鑑み、高強度の運動刺激を処方しにくい対象に対して従来とは異なる観点からアプローチすることが望まれている。ひとつのアプローチとして、従来の至適刺激条件を検索するのではなく、機械的刺激に対する骨組織側(受け手)の感受・反応性を高めることの重要性や手法の有無について検証することが考えられる。力学的刺激を感知するメカノセンサーは骨細胞 osteocyte が候補として挙げられており、その感受性・反応性の促進が骨量維持にも重要であることや(Sugiyama, 2012)、骨細胞に存在する機械伸張活性化イオンチャネルの薬理的障害で、機械的刺激効果の大部分がキャンセルされてしまう(Tamaki, 2015)報告等は、同じ機械的刺激を与えても骨組織側の「機械的感受性・反応性」の大小により効果の現れ方が異なる可能性を示唆しており、神経系を駆使した骨細胞のメカノセンシティブリティを調節する取組み、特に、感受した刺激を骨組織全体に拡散しやすくする骨細胞ネットワークの構築についての検証は期待されてきている。

## 2. 研究の目的

運動刺激を構成するひとつのメカニカルストレスは骨量の維持に重要な因子であり、比較的弱い機械的刺激でも骨量維持に有効である。低強度の刺激でも有効性を発揮するためには、骨組織の機械的刺激に対する感受性・反応性が重要であるが、そのメカノセンサーのひとつが骨細胞であり、機械的刺激(骨ひずみ)を感知する機能が注目されており、実際、骨細胞を特異的に死滅させると骨の力学応答が低下すること(Tatsumi, 2007)が報告されている(Han, PNAS, 2004, 2007)。また骨細胞は多機能性で、骨芽細胞や破骨細胞による骨代謝を制御する司令塔の役割を持つことが認識されてきている。骨組織中では約90%を占めるほど多く存在する細胞で、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(Bonewald, JBMR, 2011)、骨基質全体に骨細胞ネットワークを構築しており機械的刺激を感受して広く拡散する構造的ベースになっていると考えられる。一方、神経科学領域において、骨内部に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( $\beta$ 受容体)や感覚神経遊離物質の受容体の存在が報告されている(Castaneda-Corrall, Neuroscience, 2011)。これら神経系と骨組織の機械的感受性・反応性の関連については十分理解されていない。本研究では、若齢期から高齢期の実験動物を用いて、機械的刺激のメカノセンサーの役割を担う骨細胞ネットワークと神経性因子との関連について検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験対象：動物及び組織

若齢期及び中高齢期ラットを対象に、神経系の骨組織への影響を検討するために、坐骨神経の denervation、薬理的感覚神経遮断モデルを作成し、実験に供した。また、機械的刺激の影響について骨ひずみ強度を測定してひずみ荷重処方による骨組織への影響を検討した。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、ヒラメ筋等を採取して各測定及び分析を行った。本研究課題は、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学会会議)を遵守して実施した。

### (2) 処置と採取

坐骨神経 denervation と感覚神経の選択的遮断について、まず、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、坐骨神経 denervation とした。また、感覚神経（主として A $\delta$  線維、C 線維）を対象に、TRPV1 チャネルや TRPA 1 チャネルを有する神経線維を遮断するために Capsaicin の高用量反復投与ならびに HC-030031 (TRPA1 antagonist) の反復投与を行った。Control 群には vehicle (生理食塩水+DMSO) を同様に反復投与した。

### (3) 測定項目

・骨ひずみ測定：*in vivo* 並びに *ex vivo* での脛骨骨ひずみの実測を行った。*in vivo* では麻酔下で、*ex vivo* では採取したラット脛骨を用いて、脛骨内側骨幹部に超小型箔ストレンゲージを貼付し、小型フォースプレート上で鉛直方向に種々の強度で荷重し、ひずみ信号をひずみアンプ、A/D 変換器を介して PC にて記録した。得られた骨ひずみ及び床反力曲線から、各ピーク値、最大・最小 strain rate ( $\mu\epsilon/\text{sec}$ ) を専用ソフトにて計測した。

・骨量および骨梁微細構造の計測：3次元マイクロCTスキャナーを用いてそれぞれ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。

・骨機械的特性の測定：骨破断強度試験装置を用いて脛骨骨幹中央部に3点支持破断強度試験を行い、骨の機械的特性を計測した。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)、Elastic modulus, Second moment of area 等を計測した (図 1)。

・採取組織の解析：採取した組織の処理に関して、パラフィン包埋切片については、採取した脛骨の近位部を正中断して固定後 EDTA で脱灰し、パラフィン浸漬してブロックを作成した。滑走マイクロームを用いて、縦断薄切試料を作成し組織染色した後、分析に供した。採取組織を液体窒素冷却イソペンタンで急速凍結して凍結ブロックを作成し、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、乾燥後に各種免疫染色等に供した。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各種染色され顕微鏡観察及び形態計測に用いた。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, Dystrophin 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、その形状や数量、配置等を計測した。

・筋機能の測定：*in vivo* での前脛骨筋の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、約 22V、125-143Hz、パルス幅 0.5ms で実施した。

## 4. 研究成果

(1) 若齢期ラットの脛骨を対象に3次元マイクロCT撮影を行い、骨量、骨構造を計測し、3次元骨梁微細構造解析により、骨量幅、骨梁長、骨梁連結密度、皮質骨幅などを計測した。また採取した骨組織から顕微鏡観察用の試料を作成し、骨組織内支配神経を各種神経マーカーで免疫組織化学染色を行ったところ、anti-GAP43 抗体や anti-NF200 抗体で蛍光観察可能で骨内神経のイメージングが可能であった。さらに骨細胞ネットワークを同定可能か検証するために、骨細胞マーカーで免疫染色を行ったところ、anti-DMP1 抗体で皮質骨及び海綿骨とも骨細胞及び細胞突起が観察可能であり、骨細胞のイメージングも可能であった (図 2)。

(2) 次に、骨内感覚神経の骨組織に対する影響を調べるため、TRPV1 受容体を有する感覚神経 (主として A $\delta$  線維、C 線維) を選択的に遮断し、まず骨量及び骨梁微細構造に対する影響を調べたところ、感覚神経遮断群では骨量、骨梁幅、骨梁連結密度が有意に低下し、Structure model index が有意に増大した。若齢期ラットの感覚神経は、骨量の量的、構造的維持にポジティブに機能している可能性が考えられた。さらに、TRPA1 阻害剤を1週間間隔で4週間投与して骨量等を評価した。若齢期においては vehicle 群に比べて阻害剤 (CH-030031) 投与群は骨量が低レベルにあり (図 3)、骨梁幅、骨梁数、骨梁連結密度も低値を示した。感覚神経の薬理的阻害により正常な骨量増加や骨梁構造維持に負に作用することが示された。一方、高齢期では骨量は vehicle 群と阻害剤投与群とも低いレベルにあり、有意な差はみられなかった (図 3)。また骨格筋湿重量は TA も Sol も阻害剤投与群と vehicle 群とに有意な差はなく、阻害剤投与の影響はみられなかった。また、TA 筋線維の横断面積も群間に有意差はみられなかった。これらの感覚神経は若齢期の骨代謝にポジティブに関連している可能性が示唆された。

(3) 骨細胞密度、機械的刺激に対する骨ひずみ特性の加齢変化について検討した。まず若齢期及び中高齢期ラットの脛骨を対象に荷重によって生じる骨ひずみ特性を調べた。各年齢のラット脛骨内側骨幹部に小型箔ストレンゲージを貼付し、卓上小型フォースプレート上で鉛直方向に種々の強度で荷重し、その時の骨ひずみ及び床反力信号を記録し、最大ひずみ、最大床反力、

最大・最小 strain rate (microstrain/sec)を計測した。いずれの年齢期においても荷重が大きくなるのに従い最大骨ひずみ値は指数関数的に大きくなった(図4)。若齢期は中高齢期に比較してより大きくひずみやすい傾向を示した。また、荷重時最大 strain rate 及び荷重リリース時の最小 strain rate は骨ひずみピーク値と相関関係にあり、若齢期の方が中高齢期よりも大きかった。また骨破断強度検査時に記録した骨 stiffness は高年齢期の方が大きく、骨ひずみは若齢期の方が大きかった。さらに、若齢期及び中高齢期ラットの脛骨を対象に3次元マイクロCT撮影を行い、骨量を計測し、3次元骨梁構造解析により、海綿骨においては骨梁幅、骨梁長、骨梁数、骨梁連結密度等を、また皮質骨では皮質骨幅や断面積、total porosity 等を評価した。総じて、若齢期よりも高年齢期では海綿骨量は低いレベルにあるが、皮質骨は硬くひずみにくい特性を有することが理解された。さらに、高年齢期では骨細胞数が減少して empty lacuna が増大し、骨細胞密度が低下し、皮質骨の porosity は増大することが示唆された。

(4) 骨ひずみ刺激の程度や頻度等の違いにより、骨量維持増加効果の現れ方に影響するか骨ひずみ処方介入の影響を調べた。まず、若齢期ラットの脛骨を対象に、電気刺激誘発性の筋収縮力処方をを行った時の骨ひずみ特性を生体で調べた。骨ひずみの大きさは収縮様式の違いにより異なり、伸張性収縮時が等尺性収縮時や短縮性収縮時よりも大きかった。また、最大骨ひずみ率(strain rate)も同様であった。この骨ひずみ特性を骨への機械的刺激処方に適用し、骨ひずみ処方を若齢期ラット脛骨に、4週間に0,1,2,3,5,9回の頻度で介入した。3次元マイクロCT撮影による骨量評価では、4週間に5回及び9回の介入頻度で無処置群よりも骨量が有意に高い値を示し(図5)海綿骨骨梁幅、骨梁長、骨梁数も高値であった。伸張性収縮時の骨ひずみを介入する場合、少なくとも若齢期では週1回の頻度で骨量増加効果が示唆された。

以上のことから、加齢とともに骨細胞ネットワークは疎となり、骨組織はスティフネスが増大して硬くなりひずみにくい性質を呈して、骨量は低値を示すことが示唆された。骨内支配感覚神経(主としてAδ線維、C線維)は若齢期においては選択的遮断による骨量低下等がみられたことから骨量や骨梁構造維持にポジティブな役割を担っていることが推察されたが、骨細胞ネットワークが疎である高年齢期においてはその貢献度が小さい可能性が考えられた。

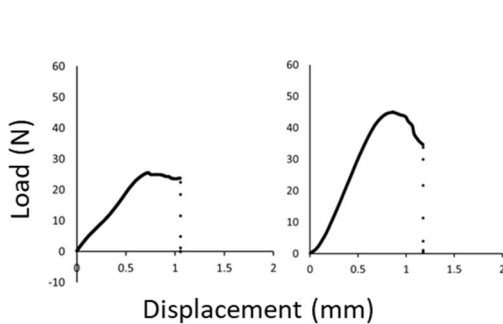


図1. 骨破断強度試験時の Displacement-Load 関係

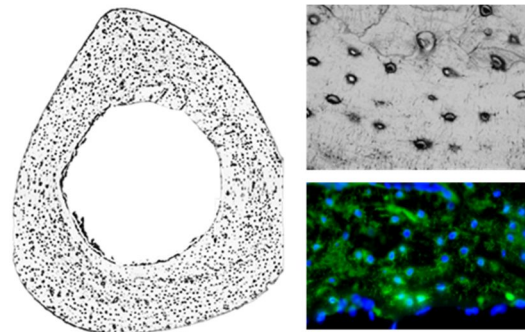


図2. 皮質骨骨細胞のイメージング(抗 DMP1 抗体)

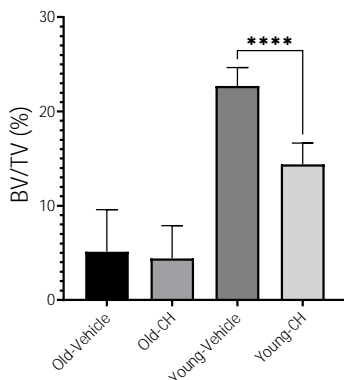


図3. 高年齢期及び若齢期における選択的感覚神経阻害の骨量への影響

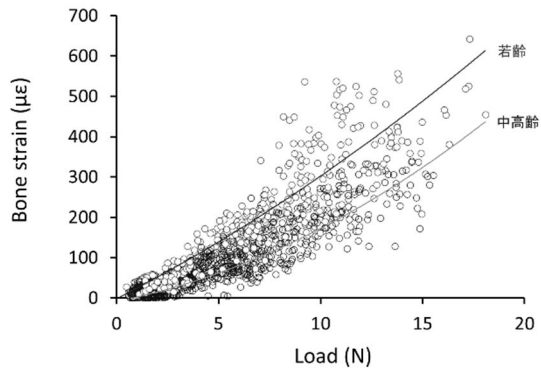


図 4. 若齢期及び中高齢期における荷重-骨ひずみ関係

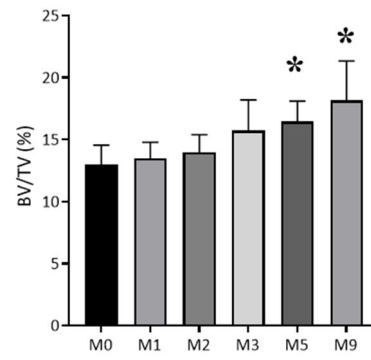


図 5. 骨ひずみ処方による骨量への影響

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）

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tamaki H, Yotani K, Ogita F,
2. 発表標題 Effects of hypobaric swimming training on trabecular bone volume and structure in old type 2 diabetic rats.
3. 学会等名 49th Annual Meeting of European Calcified Tissue Society Congress - ECTS 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田巻弘之, 中川弘毅, 大賀亮也, 吉塚有紀子, 西山 輝, 横田幹太, 與谷謙吾,
2. 発表標題 若齢及び中高齢期ラット脛骨の荷重による骨ひずみ特性.
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会,
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tamaki H, Yotani K, Ogita F
2. 発表標題 In vivo bone strain environment of rat tibia during eccentric, concentric and isometric contractions induced by electrical stimulation.
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田巻弘之, 與谷謙吾, 萩田 太
2. 発表標題 坐骨神経及びカプサイシン感受性神経のdenervationがラット脛骨骨梁構造に及ぼす影響.
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakagawa K, Oga R, Yotani K, Ogita F, Tamaki H,
2. 発表標題 Effects of sciatic nerve and capsaicin-induced sensory denervation on trabecular bone in young rats.
3. 学会等名 28th Annual Congress of European College of Sport Science (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Oga R, Nakagawa K, Hayao K, Tamaki H,
2. 発表標題 Muscle force profiles in the rat tibialis anterior as a function of different frequencies of eccentric muscle contraction.
3. 学会等名 28th Annual Congress of European College of Sport Science (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田巻弘之, 大賀亮也, 中川弘毅, 古見飛博,
2. 発表標題 TRPA1拮抗薬の投与がラット脛骨骨梁構造に及ぼす影響.
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 古見飛博, 大賀亮也, 中川弘毅, 陳 怡禎, 藤井康成, 田巻弘之,
2. 発表標題 TRPA1拮抗薬の投与がラット骨格筋及び筋紡錘内筋線維に及ぼす影響.
3. 学会等名 第79回日本体力医学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Oga R, Nakagawa K, Chen YC, Nita Y, Tamaki H,
2. 発表標題 Effects of eccentric muscle contraction intervention not inducing muscle damage on muscle fiber hypertrophy, myofibrosis, and force production in rat skeletal muscle.
3. 学会等名 29th Annual Congress of European College of Sport Science, (国際学会)
4. 発表年 2024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	荻田 太  (OGITA Futoshi)  (50224134)	鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・教授    (17702)	削除：2021年9月9日

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
---------	---------