

オステオサイトの応力感受を起点とした骨配向化機構の解明

大阪大学大学院工学研究科
 マテリアル生産科学専攻 中野研究室 松坂 匡晃

1. 緒言

超高齢社会における寝たきりや宇宙滞在での無重力環境といった応力環境の異常は深刻な骨の脆弱化を呈する。そのため、こういった応力異常に伴う骨疾患の予防・治療法の確立は人類の発展にとって喫緊の課題である。骨は極めて強い結晶学的異方性を有する機能・構造材料である。これは骨の主成分であるコラーゲン/アパタイト結晶の規則的な配列化構造に由来しており、筆者らは材料学的観点から骨の結晶学的異方性（アパタイト配向性）が骨機能発揮に極めて重要であることを示してきた¹。アパタイト配向性は特に骨の力学機能を反映する強力な骨質決定因子の一つであるものの、その配向化発現機構については未だ明らかになっていない部分が多い。私は材料工学と生物科学の融合のもとに、応力環境下においてどのようにしてアパタイト配向性が形成されるのかに着目し、細胞・分子レベルからの機序を解明すべく研究を行っている。本稿では当研究室で既に明かされてきた骨配向性の概念を交えつつ、修士論文研究で解明した骨の応力環境に対するアパタイト配向性制御メカニズムの一端について述べる。

2. 骨力学機能を支配する配向化微細構造

図1に微小領域X線回折法により解析した、解剖学的部位に依存した正常成熟皮質骨の3方向の配向性分布を示す¹。六方晶系のアパタイト結晶の配向性はc軸配向性により定義され、アパタイト結晶の回折ピークのうち、c軸方向と一致する(002)とそれに垂直な(310)の二つのピークの回折強度比より解析した。尺骨や腰椎骨では荷重方向に基づいた一軸的応力負荷に応じて、骨長軸・頭尾軸に沿った優先配向性を示す。一方、下顎骨は咀嚼荷重に応じた3次元配向性分布を示し、*in vivo* 応力分布と骨配向性の密接な関係性を示唆している。さらには、ラット尺骨への人為的負荷モデルを用いることで、従来のレントゲンやCTによって評価される「骨の量」に基づいた「骨量・骨密度」以上に「アパタイト配向性」により骨ひずみに対する機能適応が支配されていることを示している(図2)²。

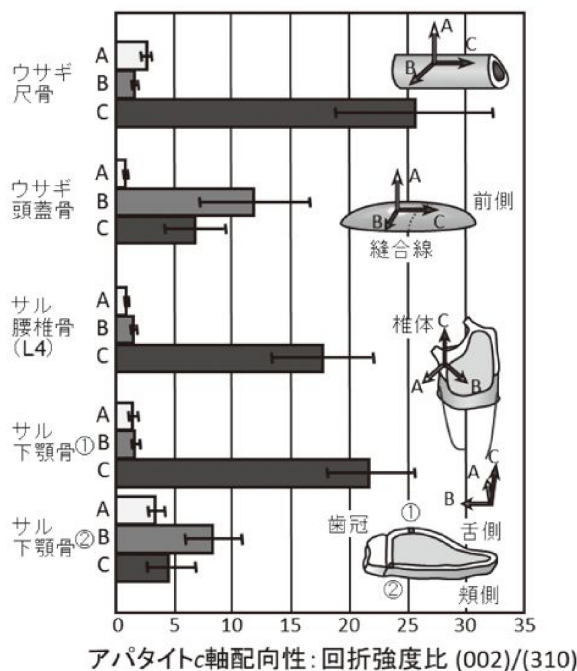


図1 皮質骨における特異的なアパタイト結晶c軸の解剖学的部位依存性 (文献1から改変引用)。

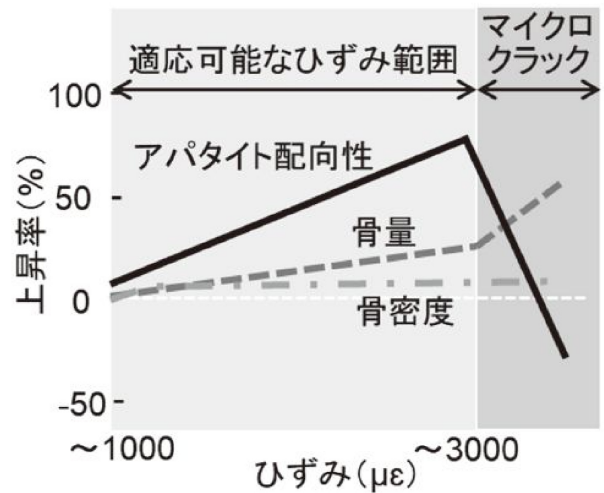


図2 ラット尺骨への人為的負荷モデル (文献2から改変引用)。

こうした骨の応力環境に応じた配向化制御に基づく適応性が明らかとなり、骨中の応力感受細胞であるオステオサイトの配向性制御に対する新たな役割が注目されている。オステオサイトは細胞間ネットワークを形成し、可溶性タンパク質を介して他のオステオサイトや骨芽細胞と情報伝達を行う。身体活動中に生じる応力刺激により骨基質にひずみが発生し、このひずみ勾配は骨細管内を通る間質液の流動を生じさせる。骨小腔中のオステオ

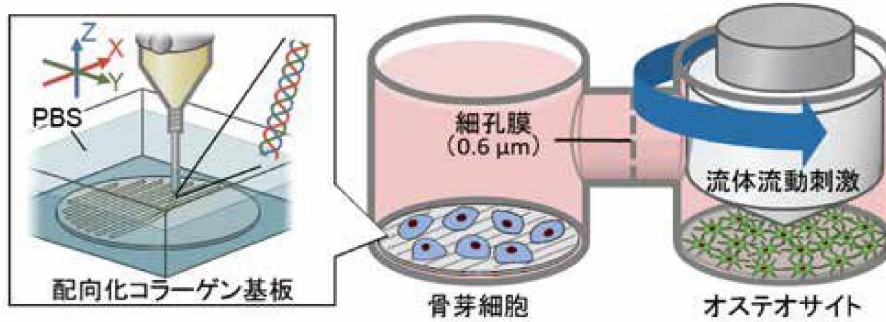


図3 本研究により開発した応力骨模倣システム。

サイトは細胞表面に発生するせん断刺激として流体流動を感知し、生化学的信号へと変換、骨芽細胞および破骨細胞と相互作用することで、骨の機能適応を調節する。特に当研究室では骨基質産生を担う骨芽細胞の配列化は、組織レベルでのアパタイト配向性を制御することを明らかとしており³、応力負荷⇄オステオサイト-骨芽細胞間相互作用⇄骨配向化の関係性の解明が求められる。

3. 応力負荷骨模倣システムの構築

オステオサイト-骨芽細胞間相互作用による複雑な骨配向化メカニズムの解明には、力学刺激をコントロールし、細胞制御とその応答を解析可能な *in vitro* 共培養モデルが有用である。そこで配向化コラーゲン基板を用いた骨芽細胞への異方性環境の付与、およびオステオサイトへの特異的な流体流動刺激の負荷を独立的に制御可能であり、細胞間での可溶性因子を介した情報伝達に注目可能な新規の応力負荷骨模倣システムの構築を行った(図3)。オステオサイトへの流動刺激はコーン回転により以下の式(1)に基づき骨細管内での流動刺激を再現した。

$$\tau = \frac{\mu r \omega}{h} = \frac{\mu \omega}{\tan \theta} \quad (1)$$

各パラメータは τ ;せん断応力(Pa=N/m²)、 μ ;粘度(N/m²)、 r ;回転半径(cm)、 h ;メンブレンからの高さ(μ m)、 θ ;コーンの先端角度(deg)である。オステオサイトと骨芽細胞はタンパク質が通過可能なポア径0.6 μ mのメンブレンを隔てて共培養することで、可溶性因子を介した細胞応答を模倣した。概要図(図3)に示すとおり、骨芽細胞・オステオサイトをそれぞれ独立に制御しつつ、細胞間相互作用を模倣可能な共培養モデルの作製に成功した。

4. オステオサイトの応力感受に基づく骨配向化制御因子の同定

本システムを用いて、静的・動的荷重を模したオステオサイトへの応力負荷により、骨は応力場に応じた興味深い配向化を示すことが見出された。オステオサイトには無負荷状態をControlとし、一定流速刺激と正転と逆転を繰り返す振動流刺激を負荷した。骨芽細胞を免疫染色

法により可視化、細胞形態を楕円近似した後に、長軸方向を以下の式(2)(3)に基づき定量的に解析することで配向度を比較した。

$$R = 2 \left(\langle \cos^2 \theta \rangle - \frac{1}{2} \right) \quad (2)$$

$$\langle \cos^2 \theta \rangle = \left(\sum_1^n \cos^2 \theta \right) / n \quad (3)$$

オステオサイトへのせん断刺激負荷が無い状態では、骨芽細胞は基板コラーゲン方向に沿って比較的低い優先配列を示し、一定流刺激ではその配向度に変化は見られなかった。一方で、振動流刺激では骨芽細胞の配向度は顕著に上昇することが示された(図4(A))。これは姿勢変化などのゆっくりとした動きに対応する一定流ではなく、歩行や運動で生じる加速度を有した振動流を感受することで、骨芽細胞への指令伝達により骨配向化を亢進することを意味している。

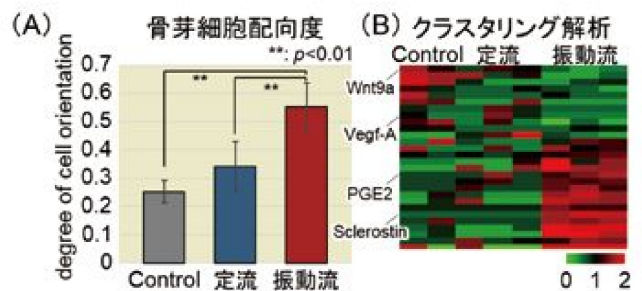


図4 (A) オステオサイトへの流体刺激に応じた骨芽細胞配向度。(B) オステオサイトの網羅的遺伝子発現解析(変動率2倍以上かつ $p < 0.05$)。

そこで、こういった骨芽細胞の高配列化をもたらす生物学的伝達因子は何なのかを明らかにするために、オステオサイトの遺伝子発現を網羅的に解析することで、骨配向化を決定する分子としてPGE2(プロスタグランジンE2)を同定するに至った(図4(B))。PGE2は炎症や発熱に関わる代表的な生理活性脂質であるが、配向化への関与は明らかとなっていない。骨芽細胞が有するPGE2受容体であるEP2/EP4に対して特異的なアンタゴニストを

用いて阻害することで、骨芽細胞配列は著しく破綻し（図5）、形成されるアパタイト結晶も大きく乱れることが示され、配向化により骨を強化するという PGE2 の新たな機能を解明した⁴。

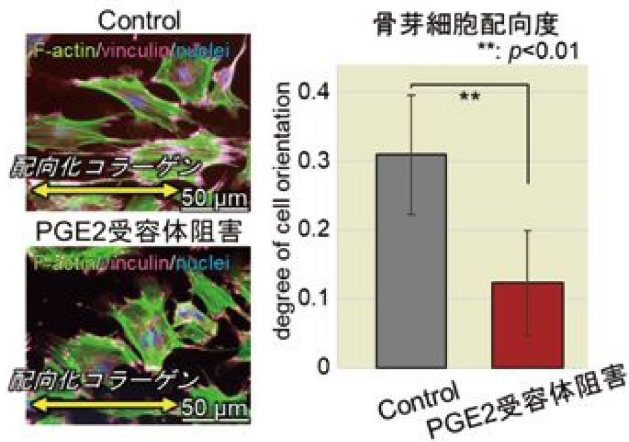


図5 PGE2による骨芽細胞配向度制御。

5. まとめ

本研究成果はこれまで骨密度のみをターゲットとしていた骨医療から、骨配向性治療への変革の一助となるだろう。現状では失われた骨配向性を回復させることは困難であるが、PGE2を起点とした分子機序を制御することで、早期に健全な配向化骨再生を可能とするような再生医療の展開、さらには骨難治疾患の創薬ターゲット創出にもつながることが期待される。

参考文献

1. Nakano T, Kaibara K, Tabata Y, et al. Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by microbeam X-ray diffractometer system. *Bone*. 2002;31(4):479–487.
2. 松垣あいら, 中野貴由. 応力による骨のリモデリング～骨の配向性と骨再生を促す表面形態, *現代化学* 2019;7:56–59.
3. Matsugaki A, Aramoto G, Nakano T. The alignment of MC3T3-E1 osteoblasts on steps of slip traces introduced by dislocation motion. *Biomaterials*. 2012;33(30):7327–7335.
4. Matsuzaka T, Matsugaki A, Nakano T. Control of osteoblast arrangement by osteocyte mechanoresponse through prosta glandin E2 signaling under oscillatory fluid flow stimuli. *Biomaterials*. 2021; 279, 121203: 1-10.



大阪大学大学院工学研究科
 マテリアル生産科学専攻
 博士後期課程1年

この度は大阪大学工業会賞を授与していただき誠にありがとうございます。大変光栄に思うと同時に、身の引き締まる思いです。なにより直接ご指導いただいた先生方、共に学ぶ研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。今後とも工学の視点から医学の発展を目指し日々研究に邁進してまいります。