

TOPICS
クリニカルトピックス

中野 貴由

1992年大阪大学大学院工学研究科博士
前期課程修了
1992年大阪大学助手
1996年博士(工学)(大阪大学)
1999年大阪大学講師
2001年大阪大学助教授
2003年フランス ONERA 研究所研究員
2008年大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻教授(現職)
2017年大阪大学栄誉教授
同年大阪府立大学獣医学専攻客員教授

骨質指標としての骨基質配向性とその変化

なかの たかよし いしもと たくや まつがき おざさりょうすけ
■ 中野 貴由・石本 卓也・松垣 あいら・小笹 良輔

大阪大学大学院工学研究科

Key words : アパタイト結晶, コラーゲン線維, 骨質 (Bone Quality), 配向性, OCN (Osteocalcin)

Abstract

骨基質はコラーゲンとアパタイトを主たる成分とし、従来診断に利用するアパタイトの密度である骨密度 (BMD: Bone Mineral Density) 値に加え、コラーゲン線維の走行性とアパタイト結晶のc軸配向性である骨基質配向性が一つの骨質指標として注目されている。こうした基質配向は、*in vivo* 応力、骨代謝回転、骨系細胞挙動に敏感であり、骨解剖学的部位に応じた配向度合いを示す。その結果、骨基質配向性を指標とすることで、骨組織の再生や疾患形成過程の解明、疾患診断、創薬支援などに幅広く応用できる。近年では基礎研究で用いる微小領域 X 線回折 (μ XRD: microbeam X-ray Diffraction) 法に加えて、非侵襲な解析手段として超音波表面伝搬速度の解析が臨床上、期待されている。

はじめに

2000年に米国国立衛生研究所 (NIH: National Institutes of Health) により、骨強度予測には従来から用いられている骨密度 (アパタイト密度) だけ

では不十分であり、それ以外の骨強度を表す指標としての「骨質 (Bone Quality)」パラメータの模索が重要であることが指摘された¹⁾。それ以来、骨質指標として、骨梁構造^{2,3)}、コラーゲン架橋⁴⁾、細胞活性⁵⁾、マイクロクラック⁶⁾をはじめ様々な指標⁷⁾が提案されてきた。筆者らは材料科学的観点から、骨基質としてのコラーゲン線維/アパタイト結晶の配向性に注目し、その優先配向方向や配向度合いが骨質指標の一つとして極めて重要であることを示してきた⁸⁾。つまり疾患骨や再生骨の機能・強度診断のためには、従来から用いられている骨密度の評価だけでは不十分であり、骨内のアパタイト結晶が異方性の強い六方晶系をベースとする結晶構造を持つことに基づけば、骨基質中のアパタイト結晶のc軸配向性とそれに平行するテンプレートとしてのタイプIコラーゲンの走行性が、骨組織の力学機能に代表される諸特性を支配する骨質指標となりうる^{8,9)}。

本稿では、骨基質配向性の変化とその形成機構、さらには配向化制御法と臨床にて応用可能な超音波を用いた非侵襲な配向性解析手法を含む、骨基質異方性の重要性に関する筆者らの最新の知見について紹介する。

Orientation degree of bone matrix as a bone quality parameter and its variation
Takayoshi Nakano, Takuya Ishimoto, Aira Matsugaki, Ryosuke Ozasa, Graduate School of Engineering, Osaka University

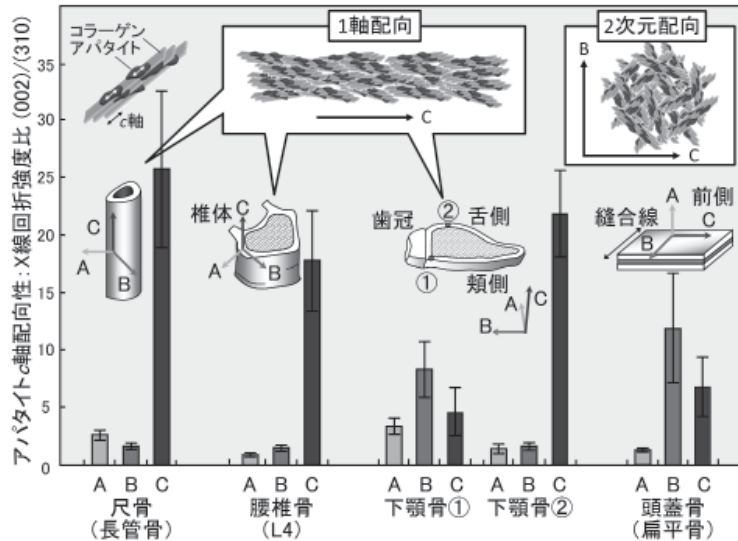


図1 皮質骨におけるユニークなアパタイト結晶c軸配向性の解剖学的部位依存性
 正常な皮質骨では、*in vivo* 応力に依存して異方性アパタイトの骨基質内での配向性が決定される。
 (文献8から改変引用)

1. 骨質指標としてのアパタイト配向性

正常な生体骨は、図1に示すように、部位に応じたユニークなアパタイトc軸配向性を示す⁸⁾。その特徴としては、(1)尺骨、下顎骨、腰椎骨は、それぞれ、骨長軸方向、近遠心方向、頭尾軸方向に沿った1軸配向性を示す、(2)頭蓋骨は、骨面に沿った2次元配向性を示し、縫合線や骨成長にも影響を受ける、(3)咀嚼荷重の影響を受ける歯冠直下の下顎骨部での配向性は、咀嚼にともなう局所応力分布を反映し変化する、(4)海綿骨は、骨代謝回転に応じて骨梁に沿ったパケット構造に従ってc軸配向化が形成される、などが挙げられる⁸⁾。つまり正常な皮質骨や海綿骨は、*in vivo* 応力に適応したアパタイト/コラーゲン優先配向性を示し、力学機能の必要性に応じた骨微細構造を構築する。特に、最大主応力ベクトル分布がその3次元配向化を支配す

ることから、正常骨の配向性は応力成分の影響を強く反映する骨質指標である。

こうしたアパタイト配向性は、再生骨の機能評価法としても極めて有効な手段となる⁹⁻¹¹⁾。図2に示すように¹¹⁾、骨形成タンパク rBMP-2 (recombinant Bone Morphogenetic Protein-2) を徐放した最先端の再生医療による長管骨の大欠損部再生過程において、アパタイト配向性を指標とすることで初めて、(1)骨配向性指標は骨密度の再生に大きく遅れるため、骨密度指標では代替することはできない、(2)骨力学機能は、骨密度よりも、骨基質配向性との間で強い相関を示す、などが理解可能となる。この場合、力学機能はおよそ7割がアパタイト配向性で決定されることから、骨代謝速度の影響を強く受けない新生骨形成過程にて、アパタイト配向性の重要性は特に大きい。

この際、メカノセンサー細胞としてのオステオサイト (OCY: Osteocyte)が、骨配向化の制御に極めて重要な役割を發揮する¹²⁾。ただし骨再

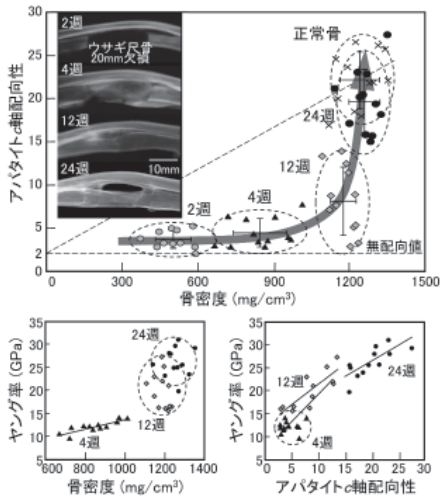


図2 ウサギ尺骨大欠損部 (20 mm) における rBMP-2 徐放による再生時の骨密度とアパタイト c 軸配向性の変化。アパタイト配向性は骨密度の再生に遅れて回復し、骨力学機能 (ヤング率) はアパタイト c 軸配向性に強く支配される。(文献 11 から改変引用)

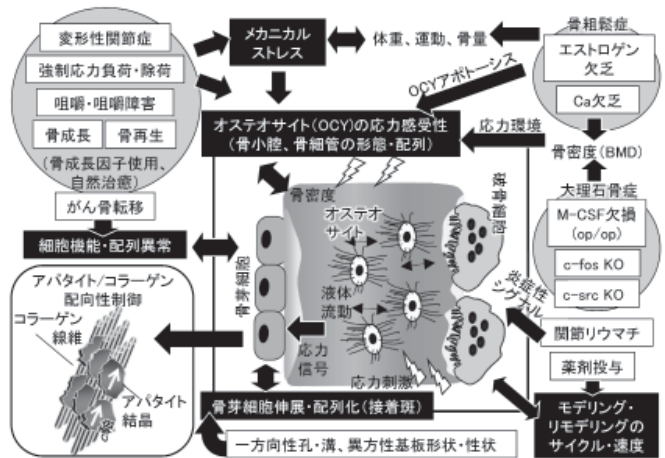


図3 骨基質中のアパタイト配向性に影響を及ぼす様々な因子。アパタイトを含む骨基質の配向性は一つの骨質指標として考えられる。

生初期では周囲の骨基質が未熟であり、OCYにより3次元 *in vivo* 応力分布を正確に感知できないことから、正常な骨配向性を促すことができず、この段階での配向化は自然治癒では不可能である。

様々な疾患骨においても、アパタイト配向性が変化することが解明されつつある¹³⁻¹⁶⁾。変形性膝関節症では、軟骨消失部での関節面法線方向への骨基質配向性は有意に上昇する¹³⁾。骨粗鬆症では、原発性骨粗鬆症と続発性骨粗鬆症 (Ca 欠乏食) のラット椎骨は同様に骨密度低下を示すものの、配向性の正常値からの変動方向が異なる¹⁶⁾。こうした知見は、骨粗鬆症治療薬などの薬剤評価にも有効であり、薬剤投与後の骨質改善効果の検証が可能である¹⁷⁾。

2. アパタイト配向性に影響を及ぼす諸因子

異方性六方晶系構造を持つアパタイトの配向

性はコラーゲン線維の走行方向に対応しつつ¹⁸⁾、敏感に影響する。図3に示すように、疾患、骨再生、遺伝子変異などの様々な要因が、骨基質配向性に影響することが判明してきた^{9,13-16,19-21)}。基質配向化は、応力をはじめとする外部環境や生体内環境と密接に関係し、骨形成を担う骨芽細胞 (OB: Osteoblast)、骨吸収を担う破骨細胞 (OC: Osteoclast)、*in vivo* 応力を感じる OCY の細胞レベルの働きに強く支配されることが明らかになり、現在では情報伝達をつかさどる分子レベル、遺伝子レベルからの配向化機序の解析や配向化の支配因子の解明へと研究が進んでいる。とりわけ遺伝子機能を変異させたノックアウト (KO)、トランスジェニック (Tg) 動物などを用いることで、骨系細胞レベルでの骨基質配向化制御機構の解明が可能となる。KO や Tg 動物の作製によって各骨系細胞の挙動や機能発現を制御し、配向化に影響を及ぼす遺伝子や骨系細胞の役割の一端がすでに理解されている。中でも、M-CSF (Macrophage Colony-

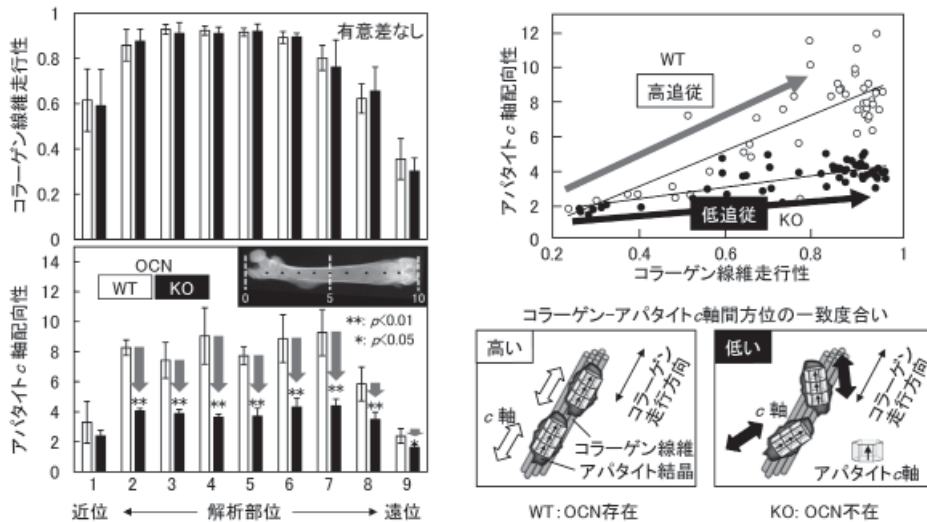


図4 OCN (Osteocalcin) KO マウスにおける大腿骨のコラーゲン線維の走行性とアパタイト結晶 c 軸の配向性。OCN-KO ではコラーゲン線維走行性が正常にもかかわらず、アパタイト c 軸配向性は相対的に低下する。(文献 20 から改変引用)

Stimulating Factor), OPG (Osteoprotegerin), c-Fos, c-Src などの OC の分化・機能化制御遺伝子を KO した骨の解析により、骨配向化には、骨吸収を担う OC の役割が極めて重要であることが明らかとなった^{14,19)}。すなわち、骨芽細胞による骨配向化には、活性化破骨細胞由来の特定のクラストカインの存在が必須である。さらに、従来、OC・OB の分化や活性化の調整因子として認識されていた遺伝子・分子が、実際には骨配向化にも深く関与することが明らかとなり、骨配向化を通して遺伝子・分子の未知の機能が理解されつつある。こうした生物学的機序の解明は、骨基質異方性の制御による骨健全化にもつながるものと期待している。

近年は骨基質のうちテンプレートとしてのコラーゲン線維の走行方向とアパタイト結晶の c 軸配向方向との関係が注目されている^{15,20)}。図 3 に示す諸因子は、ほとんどの場合、OB の異方的な配列とその接着斑の分布^{22,23)}、さらにはそれに基づき産生されるタイプ I コラーゲンの 3 次元走行方向を規定することでアパタイト配

向性に影響を及ぼす。配列化 OB はインテグリンを介した基質との接着機構に基づき緻密にコラーゲン産生プロセスを統制しており、OB 配列の異方性に応じた配向化コラーゲン基質を構築する。その結果、コラーゲン線維の走行方向が石灰化球を通じて自己組織的に形成されるアパタイト結晶の c 軸配向性を決定する。

ところが、図 4 に示すように、石灰化の一つの指標として知られる OCN (Osteocalcin) に注目した場合、OCN の KO により、コラーゲン線維の走行性には変化が見られない一方で、アパタイト結晶の c 軸配向性は大きく低下する²⁰⁾。このことはコラーゲンホールゾーンもしくはコラーゲン線維そのものとアパタイト結晶の c 軸との方位関係を OCN が決定していることを意味する。つまりコラーゲン線維上へのアパタイト結晶の核形成には非コラーゲン性タンパク質である OCN の存在が不可欠である。同時にコラーゲン優先走行方向に沿った弾性率は OCN-KO で低下することから、アパタイト結晶の配向性が骨の力学強度を決定する最重要因子の一

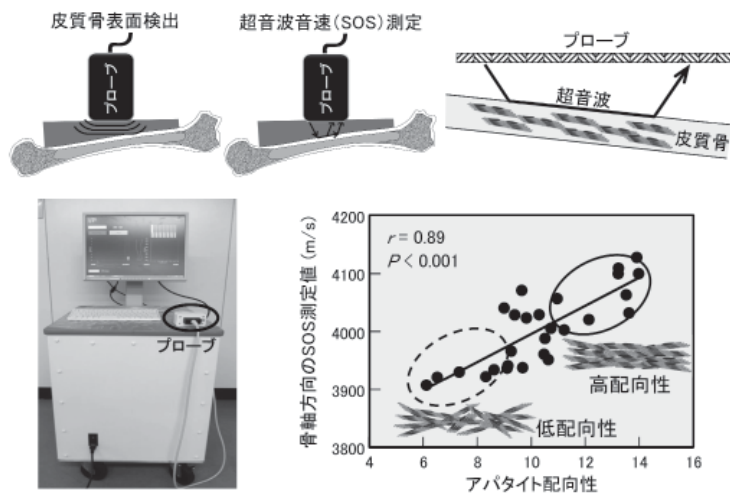


図5 超音波を用いた非侵襲的な新しい骨基質配向性の解析手法。反射波で骨形状や軟部組織厚さを補正し、骨軸に沿ったSOS (Speed of Sound) により骨基質配向性が弾性率を介して間接的に評価可能となる。(文献 25 から改変引用)

つであることを示している²⁰⁾。

3. 骨基質配向性診断の非侵襲化へ

骨基質の配向性は骨密度以外に骨の力学特性や代謝と関わる重要な因子である。したがって、非侵襲的な方法により臨床的に解析が可能となれば整形外科領域、歯科領域などの骨関連分野での疾病の診断や薬剤・インプラントの有効性をより正確にモニタリングできるものと期待される²⁴⁾。ここまでで示した筆者らの研究では、コラーゲンの優先走行方向と走行度合い、すなわち走行性の定量化には複屈折顕微鏡法やラマン分光法^{14-16,20)}を用い、アパタイト配向性は μ XRD法⁸⁾により数10～100 μ m領域にて精度よく解析を行うことができる。一方で、こうした手法は侵襲的な手法であり、骨組織を摘出することによって解析する。臨床現場で骨基質配向性を評価するためには、低侵襲もしくは非侵襲な手法が必須となる。骨基質の配向性を直接非侵襲に解析することは原理的に困難であるこ

とから、図5に示すように、超音波の反射波ならびに長管骨骨軸に沿った表面伝達速度 (SOS: Speed of Sound) を解析することで、骨の表面形状と軟部組織の厚さを補正した上での骨基質配向性を間接的に解析する手法を考案し、試作解析装置を作製した²⁵⁾。本装置は、脛骨、橈・尺骨、下顎骨といった種々の骨に対して適用可能である。SOSは弾性率/骨密度比の1/2乗に比例することから、例えば1軸配向性の長管骨においては、骨長軸方向のSOSは配向性を、垂直方向のSOSは骨密度を反映する。さらに弾性率の異方性化は、OCYを通じての骨基質の配向性の構築につながることから、骨長軸方向のSOSは弾性率を介して、骨基質配向性を反映することになる。もちろん、SOSは骨内部の空隙やクラックなど²⁶⁾の影響も受けるため、SOSは骨基質配向性を反映する間接的な骨質指標ではあるものの、図5に示すようにアパタイト配向性と非侵襲的にヒト脛骨を解析した骨長軸方向のSOSは強い相関を示す²⁵⁾。その結果、SOSは正常な骨への*in vivo* 応力分布や骨代謝回

転の速度をも予想することを可能とする²⁷⁾。超音波は、骨粗鬆症の診断には使用することはできないが²⁸⁾、超音波 SOS を用いた骨基質配向性解析は骨密度で説明できない骨強度や骨代謝回転を反映した骨質評価方法の一つとして今後の臨床現場での応用が期待される。

おわりに

骨基質の健全性は、コラーゲン線維走行とそれに関連するアパタイト結晶の配向性を骨質指標の一つとして診断することが可能である。さらには OCN の欠乏状態ではコラーゲン線維走行に対する相対的なアパタイト結晶配列の不完全化にもつながる。*in vivo* 応力や骨代謝に敏感な骨基質の配向性は、骨密度や他の骨質指標に加えて重要な指標となり、既に臨床現場での非侵襲的な解析手段も確立されつつある。さらに、骨健全性の診断にとどまらず、骨配向性の促進・最適化を目的とした骨インプラントの開発も進められており^{29,30)}、近い将来、骨密度・骨量をベースにしたスカラー医療から、骨基質配向性に根差したベクトル医療へと変革する可能性をも秘めている。

文献

- 1) NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *J Am Med Assoc*, 2001; 285: 785-95. DOI: 10.1001/jama.285.6.785.
- 2) Ito M, Ikeda K, Nishiguchi M, *et al.* Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for evaluation of fracture risk. *J Bone Miner Res*, 2005; 20: 1828-36. DOI: 10.1359/JBMR.050610.
- 3) Yamada S, Chiba K, Okazaki N, *et al.* Correlation between vertebral bone microstructure and estimated strength in elderly women: An ex-vivo HR-pQCT study of cadaveric spine. *Bone*, 2019; 120: 459-64. DOI: 10.1016/j.bone.2018.12.005.
- 4) Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: A possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteopor Int*, 2010; 21: 195-214. DOI: 10.1007/s00198-009-1066-z.
- 5) Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, *et al.* Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Develop Biol*, 1996; 175: 166-76. DOI: 10.1006/dbio.1996.0104.
- 6) Komatsubara S, Mori S, Mashiba T, *et al.* Long-term treatment of incadronate disodium accumulates microdamage but improves the trabecular bone microarchitecture in dog vertebra. *J Bone Miner Res*, 2003; 18: 512-20. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.3.512.
- 7) Donnelly E. Methods for assessing bone quality: A review. *Clin Orthop Rel Res*, 2011; 469: 2128-38. DOI: 10.1007/s11999-010-1702-0.
- 8) 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: 479-87. DOI: 10.1016/s8756-3282(02)00850-5.
- 9) Nakano T, Kaibara K, Ishimoto T, *et al.* Biological apatite (BAp) crystallographic orientation and texture as a new index for assessing the microstructure and function of bone regenerated by tissue engineering. *Bone*, 2012; 51: 741-7. DOI: 10.1016/j.bone.2012.07.003.
- 10) Lee JW, Yun HS, Nakano T. Induction of biological apatite orientation as a bone quality parameter in bone regeneration using hydroxyapatite/poly ϵ -caprolactone composite scaffolds. *Tissue Eng C*, 2016; 22: 856-63. DOI: 10.1089/ten.TEC.2016.0133.
- 11) Ishimoto T, Nakano T, Yamamoto M, *et al.* Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using recombinant bone morphogenetic protein-2. *J Bone Miner Res*, 2013; 28: 1170-9. DOI: 10.1002/jbmr.1825.
- 12) Nakano T, Ishimoto T, Ikeo N, *et al.* Advanced analysis and control of bone microstructure based on a materials scientific study including microbeam X-ray diffraction. Progress in Advanced Structural and Functional Materials Design (Ed. T. Kakeshita), Springer, Tokyo, 2012. DOI: 10.1007/978-4-431-54064-9_13.
- 13) Lee JW, Kobayashi A, Nakano T. Crystallographic orientation of the c-axis of biological apatite as a new index of the quality of subchondral bone in knee joint osteoarthritis. *J Bone Miner Metab*, 2017; 35: 308-14. DOI: 10.1007/s00774-016-0754-y.
- 14) Ishimoto T, Lee JW, Nakano T, *et al.* Co-deteriorations of anisotropic extracellular matrix arrangement and intrinsic mechanical property in c-src deficient osteopetrotic mouse femur. *Bone*, 2017; 103: 216-23. DOI: 10.1016/j.bone.2017.06.023.
- 15) Sekita A, Matsugaki A, Nakano T. Disruption of collagen/

- apatite alignment impairs bone mechanical function in osteoblastic metastasis induced by prostate cancer. *Bone*, 2017; 97: 83-93. DOI: 10.1016/j.bone.2017.01.004.
- 16) Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, *et al.* Osteoporosis changes collagen/apatite orientation and Young's modulus in vertebral cortical bone of rat. *Calcif Tissue Int*, 2019; 104: 449-60. DOI: 10.1007/s00223-018-0508-z.
- 17) Shiraishi A, Miyabe S, Nakano T, *et al.* The combination therapy with alfacalcidol and risedronate improves the mechanical property in lumbar spine by affecting the material properties in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *BMC Musculoskelet Disord*, 2009; 10: paper #66. DOI: 10.1186/1471-2474-10-66.
- 18) Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone*, 1995; 16: 533-44. DOI: 10.1016/8756-3282(95)00076-p.
- 19) Lee JW, Nakano T, Toyosawa S, *et al.* Areal distribution of preferential alignment of biological apatite (BAp) crystallite on cross-section of center of femoral diaphysis in osteopetrotic (op/op) mouse. *Mater Trans*, 2008; 48: 337-42. DOI: 10.2320/jinstmet.72.85.
- 20) Moriishi T, Ozasa R, Nakano T, *et al.* Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genetics*, 2020; 16: e1008586. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008586.
- 21) Hirose K, Ishimoto T, Toyosawa S, *et al.* Overexpression of Fam20C in osteoblast *in vivo* leads to increased cortical bone formation and osteoclastic bone resorption. *Bone*, 2020; on line. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115414.
- 22) Matsugaki A, Aramoto G, Nakano T. Abnormal arrangement of a collagen/apatite extracellular matrix orthogonal to osteoblast alignment is constructed by a nanoscale periodic surface structure. *Biomaterials*, 2015; 37: 134-43. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.025.
- 23) Nakanishi Y, Matsugaki A, Nakano T. Unique arrangement of bone matrix orthogonal to osteoblast alignment controlled by Tspan11-mediated focal adhesion assembly. *Biomaterials*, 2019; 209: 103-10. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.04.016.
- 24) Suetoshi R, Cretin D, Nakano T. Analysis of the change in bone quality in the bone surrounding the femoral implant after the introduction of human artificial hip joint using ultrasound. *Jpn J Clin Biomech*, 2013; 34: 123-8.
- 25) Ishimoto T, Suetoshi R, Nakano T, *et al.* Quantitative ultrasound (QUS) axial transmission method reflects anisotropy in micro-arrangement of apatite crystallites in human long bones: A study with 3-MHz-frequency ultrasound. *Bone*, 2019; 127: 82-90. DOI: 10.1016/j.bone.2019.05.034.
- 26) Minonzio JG, Bochud N, Vallet Q, *et al.* Bone cortical thickness and porosity assessment using ultrasound guided waves: an *ex vivo* validation study. *Bone*, 2018; 116: 111-9. DOI: 10.1016/j.bone.2018.07.018.
- 27) Kashii M, Hashimoto J, Nakano T, *et al.* Alendronate treatment promotes bone formation with a less anisotropic microstructure during intramembranous ossification in rats. *J Bone Miner Metab*, 2008; 26: 24-33. DOI: 10.1007/s00774-007-0782-8.
- 28) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015年版, 2015.
- 29) Noyama Y, Nakano T, Ishimoto T, *et al.* Design and optimization of the oriented groove on the hip implant surface to promote bone microstructure integrity. *Bone*, 2013; 52: 659-67. DOI: 10.1016/j.bone.2012.11.005.
- 30) Kuroshima S, Nakano T, Ishimoto T, *et al.* Optimally oriented grooves on dental implants improves bone quality around implants under repetitive mechanical loading. *Acta Biomater*, 2017; 48: 433-44. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.021.

謝 辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(S)(JP25220912, JP18H052540)、基盤研究(A)(JP19H00827, JP20H00308)をはじめとする研究費支援により実施された。

