

骨はマルチスケールレベルで組織化された階層 構造に基づき,力学機能をはじめとするさまざま な機能を有している.とりわけコラーゲン線維の 走行性とそれに基づくアパタイト結晶の c 軸配向 性は,骨密度(bone mineral density: BMD)以 外の骨強度を決定する骨質因子のひとつとして注 目されている.本稿では,運動をつかさどる骨の 微細構造に注目し,力学機能と深く関連するコ ラーゲン/アパタイト優先配向性の特徴と形成メ カニズム,さらには非侵襲的な診断法の原理につ いて解説する.骨基質中のコラーゲン/アパタイ ト c 軸配向性は,運動機能を評価するための重要 因子として期待される.

1. 運動を支える骨の階層的な構造

骨は,長管骨,扁平骨,不規則骨などさまざま な形状から成り,その大きさや形には個人差があ る^{1.2)}.成人の骨格系は,206 個程度の骨から成り, 新生児では 300 個を超えて構成されることが知ら れている.

こうした骨は、多様な役割を担い、体重の支持、 臓器の保護、運動の補助、血液の供給、生体に必 須なミネラルの貯蔵など、さまざまな機能を発揮 する³. すなわち、骨は臓器の一種ともいえる.

豊富な骨機能は、ナノからマクロにわたる階層 的な構造(図1)と密接にかかわっている.とり わけ運動を担う骨の力学機能は、図1に示すよう な、骨の階層的かつ各階層での異方的な構造に よって支配されると考えられる⁴. したがって, 臓器・組織レベルから,細胞・遺伝子レベル,さ らには分子・原子レベルでのナノ構造まで広く制 御されている. ナノ構造レベルでは,架橋された I型コラーゲンとミネラル成分であるアパタイト 結晶が,それぞれ骨の柔軟性と強度を与えてい る⁵⁾. アパタイトはセラミックスの一種であり, 図1に示すように六角柱骨格に原子が配列するよ うな異方性の高い構造を持ち,その *c* 軸方向がコ ラーゲン線維の走行方向とほぼ一致することか ら,骨はコラーゲン/アパタイトの優先配向方向 へと高強度を示し,ヒトの運動能力を高めること ができる.

しかしながら,運動時の力学機能発現を担うは ずのコラーゲンの走行とそれに基づく原子レベル でアパタイト結晶 c 軸の優先配列の存在,さらに はその重要性は,専門家の間でも意外と知られて いない.

2. 骨質指標としてのコラーゲン/ アパタイト配向性と力学機能

健常な骨は、図2に示すように、解剖学的部位 に応じたユニークなアパタイト c 軸配向性を示 す⁶. その特徴としては、(i)尺骨、下顎骨、椎 体骨は、それぞれ、骨長軸方向、近遠心方向、頭 尾軸方向に沿った1軸配向性を示し、(ii)頭蓋骨 は、骨面に沿った2次元配向性を有し、縫合線の 存在や骨成長にも影響を受け、(iii)咀嚼荷重の影



図1 骨のナノからマクロに至るまでの階層的かつ異方的な構造 こうした骨構造が力学機能を発揮し、運動を支えることになる.



図2 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 (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001[®]より改変) 健常な皮質骨では, *in vivo* 応力に依存して,異方性アパタイトの配向性が決定される.



図 3 ウサギ尺骨大欠損部 (20 mm) における rBMP-2 徐放による骨再生時の BMD とアパタイト c 軸配向性の変化 (Ishimoto et al., 2013¹¹⁾より改変)

アパタイト配向性は, BMD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. *p<0.05

響を受ける歯冠直下の下顎骨部での配向性は,咀 嚼に伴う局所応力分布を強く反映し,①と②の違 いに現れるように敏感に変化すること,などがあ げられる^{6.7)}. つまり正常な皮質骨や海綿骨では, *in vivo*(生体内での)応力に機能適応したコラー ゲン/アパタイト配向性を示し,力学機能の必要 性に応じた骨微細構造を構築する.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ため, コラーゲン/アパタイトの配向性は,応力成分の 影響を反映する骨質指標といえる.ここで骨質と は,骨強度を決定する BMD 以外の支配因子を意 味し,2000年にアメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health:NIH)が提唱した 指標である⁸⁾.

こうしたコラーゲン/アパタイト配向性の重要 性は,骨再生時の力学機能変化を理解する上で顕 著に現れる^{9~11}.図3に示すように¹¹,骨形成タン パク質のrBMP-2 (recombinant bone morphology protein-2)を徐放するような最先端の再生手 法による骨再生過程において,アパタイト配向性 を指標とすることで,①骨配向性は BMD の再生 に大きく遅れるため,BMD では代替することは できない,②骨力学機能は,BMD よりも,アパ タイト配向性との間で強い相関関係を示すことが 理解される.この場合,力学機能はおよそ7割が コラーゲン/アパタイトの配向性で決定されるた め,骨代謝回転の影響を強く受けない新生骨形成 過程では,アパタイト配向性の重要性はきわめて 大きいことがわかる.

この際,メカノセンサー細胞としてのオステオ サイト (osteocyte:OCY) は,骨配向化の制御に きわめて重要な役割を発揮する¹²⁾.ただし,骨再



図 4 コラーゲン/アパタイト配向性に影響を及ぼすさまざまな支配因子(中野ほか, 2020¹⁷⁾よ り改変)骨のコラーゲン/アパタイト配向性はひとつの骨質指標である.

生初期では周囲のコラーゲン/アパタイトが未熟 であることから、OCYにより3次元応力分布を正 確に感知できず、骨は正常な骨配向性を促すこと ができない、その結果、この段階での配向化は自 然治癒では不可能となり、正常な運動を支えるた めの力学機能を発揮しない.

さまざま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 性関節症では,軟骨消失部での関節面法線方向へ のコラーゲン/アパタイト配向性は下骨の直接接 触により有意に上昇する¹³⁾.骨粗鬆症では,原発 性骨粗鬆症と続発性骨粗鬆症(この場合,Ca欠乏 食)のラット椎体骨は,いずれもBMD低下を示 すものの,配向性の変動方向が真逆となり,力学 機能適応の状況が大きく異なる¹⁶⁾.

3. 骨力学機能を決定するコラーゲン/ アパタイト配向性の支配因子

アパタイト結晶の配向性は、コラーゲン線維の 走行方向に対応して¹⁸⁾,顕著な影響を受ける.図 4に示すように、疾患、骨再生、遺伝子変異等の さまざまな要因が、コラーゲン/アパタイト配向 性に影響を与えることが判明している^{9,13~16,19~21)}. コラーゲン/アパタイトの配向化は、荷重をはじ 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 (osteoblast:OB). 骨吸収 を担う破骨細胞 (osteoclast: OC). in vivo 応力 を感受する OCY の細胞レベルでの働きに強く支 配されることが解明され、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支配因子の解明へと研究が深 化している.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コ ラーゲン/アパタイト配向化制御機構が理解され つつある. 中でも, M-CSF (macrophage colonystimulating factor), OPG (osteoprotegerin), cfos, c-src などの OC の分化・機能化制御遺伝子 を欠損した骨を解析することで、骨配向化の決定 には、骨吸収を担う OC の役割がきわめて重要で あることが明らかとなった^{14,19)}. すなわち、OBに よる骨配向化には、活性化 OC 由来の特定のクラ ストカインの存在が必須となる.従来,破骨・骨 芽細胞の分化や活性化の調整因子であると認識さ れていた遺伝子・分子が、実際には骨配向化にも



al., 2020²⁰⁾より改変) OCN-KOではコラーゲン配向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し、骨力学機能が劣化する.

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・分子の未知の機能性が理解されつつ ある.こうした生物学的機序の解明は,コラーゲ ン/アパタイト配向性の制御による運動機能の健 全化,すなわち力学機能の発揮へとつながるもの と期待される.

コラーゲン配列へのアパタイト c 軸配向 方向の決定因子

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 配向方向との相対関係が注目されている^{15,20)}. 図 4 に示す各種因子は、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 I 型コラーゲンの 3 次元走行 方向を決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 組織化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5に示すように、石灰化のひとつ のマーカーとして知られる OCN (osteocalcin) に 注目した場合、OCN の KO により、コラーゲン線 維の走行度合いには変化が認められない一方で、 アパタイト結晶の c 軸配向性は大きく低下するこ とが発見された²⁰⁾. このことは、コラーゲンホー ルゾーン内もしくはコラーゲン線維自体とアパタ 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 の存在が必須である. 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、コラーゲン走行 にかかわらずアパタイト結晶の配向性が、骨の力



図 6 超音波を用いた非侵襲的な新しいコラーゲン/アパタイト配向性の解析手法(Ishimoto et al., 2019⁵⁵⁾より改変) 反射波で骨形状や軟部組織厚さを補正し、骨軸に沿った超音波 SOS により、コラーゲン/アパタイト配向性が弾性率を介して間接的に評価可能となる。

学機能を決定する最重要因子のひとつであること を示しており、運動を支える骨にとっての重要な タンパク質といえる²⁰⁾.

5. 骨力学機能を支配するコラーゲン/ アパタイト配向性の非侵襲的診断方法

コラーゲン/アパタイトの配向性は,BMD 以外 の骨力学機能や代謝とかかわる重要な骨質指標で 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 どの骨関連分野にて疾病診断や薬剤投与・インプ ラント埋入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.

筆者らの研究チームでは、コラーゲンの優先走 行方向と走行度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 μXRD法^{6,9,11)}により数10~100μm 領域にて精度 よく解析を行うことができることを示した.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はじめて解析可能にな る. 臨床現場でコラーゲン/アパタイト配向性を 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. コラーゲン/アパタイトの配向性 を非侵襲で直接的に解析することは困難であるた め、図6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(speed of sound: SOS) 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コラーゲン/アパタイ ト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、橈骨、 尺骨, 下顎骨といった種々の骨に対して適用可能 である. 超音波 SOS は弾性率/BMD 比の2分の1 乗に比例することから、たとえば1軸配向性の長 管骨においては、骨長軸方向に沿った超音波 SOS は配向性を, 垂直方向の超音波 SOS は BMD を反 映する. さらに、弾性率の異方化は、OCY を通じ てのコラーゲン/アパタイトの配向性の構築につ ながることから、骨長軸方向の超音波 SOS は弾性 率を介して、コラーゲン/アパタイト配向性を反 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⁾の影響を受けることから, 超 音波 SOS はコラーゲン/アパタイト配向性を反映 する間接的な骨質指標ではあるが, 図6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 析した骨長軸方向に沿った SOS は強い相関を示 す²⁵⁾. 結果として, 超音波 SOS により骨における *in vivo* 応力分布や骨代謝回転をも評価すること が可能となる²⁷⁾.

超音波 SOS を用いたコラーゲン/アパタイト配 向性診断は,BMD では説明できない骨強度や骨 代謝回転を反映したひとつの骨質指標の解析手段 として,今後の臨床現場での適用やスポーツ医学 への応用が期待される.つまり,運動を支える骨 の健全性を評価するための強力なツールにもなり 得る.

おわりに

骨は階層的かつ異方的な構造を持ち. 結果とし て運動を支えるための力学機能を発揮する. 骨の 力学機能の健全性は、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によって決ま るとともに、コラーゲン/アパタイト配向性が骨 質指標のひとつとして診断指標にもなる. こうし たコラーゲン/アパタイト配向性はさまざまな因 子によって支配さるが、たとえば OCN の欠乏状 態ではコラーゲン線維走行が正常であっても相対 的なアパタイト結晶配列の不完全化へとつなが り、結果として力学機能の低下をもたらす。加え て, in vivo 応力や骨代謝に敏感なコラーゲン/ア パタイトの配向性は、BMD や他の骨質指標に加 えて重要な指標となり、すでに臨床現場や運動機 能を解析するための超音波 SOS による非侵襲的 な解析手段も確立されつつある. こうした骨質指 標としてのコラーゲン/アパタイトの配向性を用 いることは、適切な運動のコントロールや健全な 骨形成・維持に対し、近い将来、応用されること が期待される.

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費基盤研究(S) (JP25220912, JP18H052540)をはじめとする研究費 支援により実施された.

[文 献]

- Standring S ed.: Gray's Anatomy, 39th Ed. Elsevier, 2004.
- Nakano T: Bone tissue and biomaterials design based on the anisotropic microstructure advances in metallic biomaterials, tissues, materials and biological reactions. In: Niinomi M et al. eds., Advances in Metallic Biomaterials, pp3– 30, Springer, 2015.
- Burr DB et al.: Basic and Applied Bone Biology. Academic Press, 2014.
- Rho JY et al.: Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. Med Eng Phys, 20: 92-102, 1998.
- Nakano T et al.: Texture and bone reinforcement. In: Buschow KHJ et al. eds., Encyclopedia of Materials: Science and Technology Updates, pp1-8, Elsevier, 2005.
- 6) Nakano T et al.: Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by microbeam X-ray diffractometer system. Bone, 31: 479–487, 2002.
- Shinno T et al.: Comprehensive analyses of how tubule occlusion and advanced glycation endproducts diminish strength of aged dentin. Sci Rep, 6: 19849, 2016.
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy: Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. J Am Med Assoc, 285: 785-795, 2001.
- 9) Nakano 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, 51: 741-747, 2012.
- 10) Lee JW et al.: Induction of biological apatite orientation as a bone quality parameter in bone regeneration using hydroxyapatite/poly ε-caprolactone composite scaffolds. Tissue Eng Part C Methods, 22: 856-863, 2016.
- Ishimoto T 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, 28: 1170-1179, 2013.
- 12) Ishimoto T et al.: Quantitative evaluation of osteocyte morphology and bone anisotropic

extracellular matrix in rat femur. Calcif Tissue Int, doi: 10.1007/s00223-021-00852-1, 2021.

- 13) Lee JW et al.: 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, 35: 308-314, 2017.
- 14) Ishimoto T et al.: Co-deteriorations of anisotropic extracellular matrix arrangement and intrinsic mechanical property in c-src deficient osteopetrotic mouse femur. Bone, 103: 216-223, 2017.
- 15) Sekita A et al.: Disruption of collagen/apatite alignment impairs bone mechanical function in osteoblastic metastasis induced by prostate cancer. Bone, 97: 83–93, 2017.
- 16) Ozasa R et al.: Osteoporosis changes collagen/ apatite orientation and Young's modulus in vertebral cortical bone of rat. Calcif Tissue Int, 104: 449-460, 2019.
- 17) 中野貴由ほか:骨質指標としての骨基質配向性 とその変化, BIO Clinica, 35:651-657, 2020.
- 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, 16: 533–544, 1995.
- 19) Lee JW 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, 48: 337-342, 2007.
- 20) Moriishi T et al.: Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. PLOS Genet, 16: e1008586, 2020.

- 21) Hirose K et al.: Overexpression of Fam20C in osteoblast *in vivo* leads to increased cortical bone formation and osteoclastic bone resorption. Bone, 138: 115414, 2020.
- 22) Matsugaki A et al.: Abnormal arrangement of a collagen/apatite extracellular matrix orthogonal to osteoblast alignment is constructed by a nanoscale periodic surface structure. Biomaterials, 37: 134-143, 2015.
- 23) Nakanishi Y et al.: Unique arrangement of bone matrix orthogonal to osteoblast alignment controlled by Tspan11-mediated focal adhesion assembly. Biomaterials, 209: 103-110, 2019.
- 24) Suetoshi R et al.: Analysis of the change in bone quality in the bone surrounding a femoral implant after human artificial hip joint replacement using ultrasound. Jpn J Clin Biomech, 34: 123–128, 2013.
- 25) Ishimoto 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, 127: 82-90, 2019.
- 26) Minonzio JG et al.: Bone cortical thickness and porosity assessment using ultrasound guided waves: an *ex vivo* validation study. Bone, 116: 111-119, 2018.
- 27) Kashii M et al.: Alendronate treatment promotes bone formation with a less anisotropic microstructure during intramembranous ossification in rats. J Bone Miner Metab, 26: 24–33, 2008.