



骨・運動器領域のトップランナーが一堂に会し、国内外の動向、次の展望についてグローバルレベルに議論！

BONE
SUMMIT
今、そして次へ！



メンバー

骨密度以外の骨強度因子 「骨質 New Era」

伊豆 弥生

岡山理科大学獣医学部獣医学科実験動物学講座
講座長/准教授

上岡 寛

岡山大学学術研究院医歯薬学域歯科矯正学分野
教授

斎藤 充(司会)

東京慈恵会医科大学整形外科講座 教授

中野 貴由

大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学
専攻生体材料学領域 教授

(五十音順)



斎藤 充 先生(司会)



中野 貴由 先生



上岡 寛 先生



伊豆 弥生 先生

はじめに

斎藤(司会) 今回の座談会では、その骨質の制御についてミクロのレベルでどこまで解明されているか論じていただきました

と思います。そこで、骨基質や骨の細胞のご研究などで第一線でご活躍の先生方にご参集いただきました。まず私から

オーバービューをさせていただきますので、それを掘り下げていただけたらと思います。

オーバービュー

斎藤 スライドを共有します(図1)。骨強度は骨密度と骨質によって決まり、骨質は骨の材質特性と、その素材をもとに作り上げられた構造特性(微細構造)により規定されます。性ホルモンの欠乏や加齢によって骨吸収が亢進し、微細構造学的な質の破綻と石灰化度の低下によって骨密度低下が起きます。一方では、性ホルモンの欠乏や加齢や生活習慣病があるとコラーゲンの分子間架橋などに異常が起き、コラーゲンの配列異常が生じ、骨

強度に対して悪影響をもたらします。中野貴由先生との共同研究により、アパタイト配向性も異常をきたすことがわかっています。

構造学的な骨質因子については、X線を使ったDEXAを行い、Trabecular Bone Score (TBS) とかHip Structure Analysis (HAS) で解析したり、HR-pQCTでより精細な構造学的な特性を知ることができます。コラーゲンそのものの、その代表選手であるI型コラーゲ

ン(type I collagen)の異常については、X線を用いた測定装置で解析することはできません。しかし、コラーゲン老化産物の代表マーカーである終末糖化産物であるAGEsは、骨のペントシジン量と尿のペントシジン量が相関しますので、コラーゲン劣化型の骨折リスクを予測するマーカーになります。そのキットが保険適用に向けて数社から出て、エビデンスも重ねられ、A-TOPの試験でも有用性が見出されましたので、「骨粗鬆診療に

おける骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン」に盛り込まれました。

コラーゲンを研究される先生ならご存知のかたが多い「コラーゲン実験法」(講談社1985)とか「コラーゲン代謝と疾患」(講談社1982)といった書で示されたように、コラーゲンが生合成されていく過程では、コラーゲンに翻訳後修飾の分子間架橋ができる前に、架橋前駆体のアミノ酸に水酸化が導入されるなど複雑な修飾がほどこされます。コラーゲン架橋には、骨芽細胞の能動的な石灰化過程を誘導し、かつ骨コラーゲンを弾力に富む組織にする善玉架橋と、骨芽細胞のアポトーシスを誘導し骨コラーゲンを過剰にむすびつけ硬くて脆くする悪玉の架橋にわけることができます。

今日は、コラーゲン架橋ができて石灰化が起きる過程の中で、I型コラーゲンが細胞から分泌されてから、配列し、機

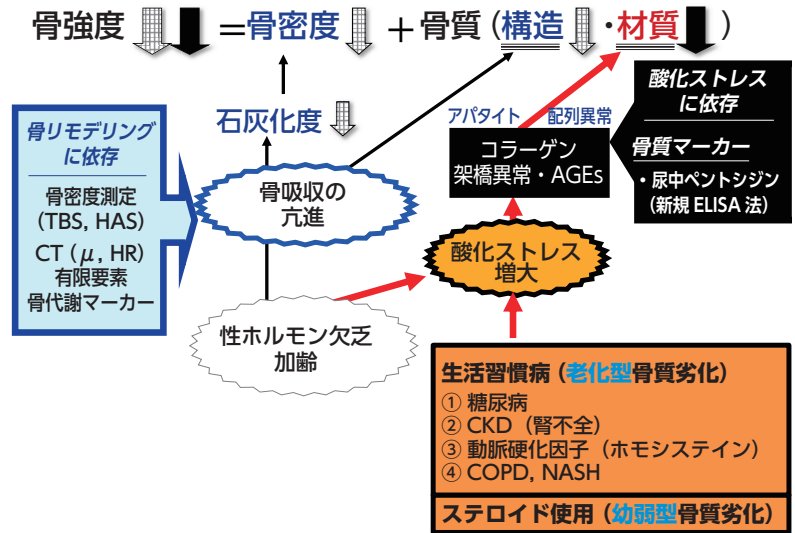


図1 骨脆弱化の機序 (引用文献以下)
(Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2010 Feb; 21(2): 195-214. doi: 10.1007/s00198-009-1066-z)

能を発揮する過程で生じるミクロのレベルでの骨質の制御について、中野先生、

上岡先生、伊豆先生にお話ししたいと思っています。

1. 生理的な成長と老化に伴う変化

斎藤 まず、コラーゲン分子の並びの重要性について、生理的なところでどういことが起こっているかということや病

的なことについて、先生方が研究で明らかにされたことをご紹介いただきたいと思っています。中野先生、マクロの部分では、

細胞外に分泌されたコラーゲン分子とアパタイトの配列についてご紹介いただけますでしょうか。

骨のアパタイト／コラーゲン配向性の評価法の進化と骨質因子としての骨質配向性

中野 私は工学研究科の所属、さらにはもともと金属材料の研究をしていたこともあり、原子レベル、ならびに原子配列の異方性という観点から、医歯薬系の先生方のお知恵を借りながら骨の研究を展開しています。

例えば、日本が誇る鉄鋼材料である電磁鋼板の研究においては、電磁鋼板自体の磁性特性を引き出すために、原子・結晶の方向を特定に配列させます。また、高速に回転する航空機のタービンブレードのような高温・高強度に耐えられるような材料では、遠心力の方向に特に強い強度を実現できるように、その方向に原子を優先的に配列させます。こうした工学的観点からすると、骨の密度以外の指標ということで真っ先に思いつくのは、

原子がどのように配列しているかということです。特にアパタイトに関して言えば、六方晶系の結晶構造が数十ナノオーダーで微細な結晶として、I型コラーゲン (type I collagen) の周りに沈着し、走行したコラーゲン線維をテンプレートにしてアパタイトがc軸方向に平行に配列しています。そのc軸が高強度を発揮する方向になることから、三次元的にどの方向に優先的にアパタイトが配列、つまり配向するかということが一番のポイントになり、最終的に強度と密接に関わりやすいはずだということで、本日出席しておられる全先生方と共同研究をさせていただいています。

スライドを共有させていただきます (図2&図3)。図2に示した六角柱の模

式図がアパタイトの原子配列の最小ユニットで、原子配列はオングストロームレベルです¹⁾。これがある固まりとして、小さな単結晶の宝石のように結晶子として同じ方向を向き、I型コラーゲンの走行方向に対してc軸が平行に並ぶというのがベースになると思います。七面鳥の石灰化腱はきれいに一軸に配向していますが、その状態と似ており、石灰化腱の方が一軸方向に強く配向していますが、骨では長管骨であってもそれほど配向度は強くありませんが一軸配向性を示します。長管骨の場合は、荷重骨であっても非荷重骨であっても一軸に優先配向するのは、筋力などの存在と関連深いためであると思います。骨が配向性を持つ一番重要な駆動力は、外部からの力にどれだ

け耐えられるかということだと考えられます。そのため、骨長手方向にコラーゲンとアパタイトが優先的に一軸に配列するような状況になるということです。頭蓋骨では二次元的に配列し、顎骨では咀嚼の影響を受ける部位では咀嚼方向に沿って局所的に強く配向し、少し離れたと近遠心方向の顎骨を支える方向に配向性が変化することになります¹⁾。

骨は階層的にサイズオーダーに応じて様々な変化が見られますが、基本的に一番明確に骨微細構造の変化が認められるのは骨再生過程です。骨欠損部での骨再生が進む場合には、上岡先生が研究されている、オステオサイトの応力感受機能がとても重要です。オステオサイトはメカノセンサーとして必ずしも骨密度を決めるだけではなく、コラーゲン／アパタイトの配向性までも三次元的に決めていきます。上岡先生からお話があると思いますが、三次元ネットワークを組む骨細管内の液体流動によってそれが決まっています。外力に基づく液体流動と、それにレスポンスするインテグリンへの働きかけということになるのだと思います。

図3に老化架橋がないようなフレッシュな状態のラビットの尺骨を20mm欠損したモデルで再生した例を示します。rBMP-2を徐放しているので比較的ターンオーバーしやすい状況になっていますが、グラフに示したように24週になってやっとアパタイトの配向性も長手方向に揃います³⁾。再生初期では、単純な言い方をしますと軟弱な骨、つまり石灰化が十分なされていないような幼弱な骨ができますので、その状態では外部から一軸方向に力が負荷されても、実際にはその中に存在する、いわゆるメカノセンサーとしてオステオサイトが骨細管を通じての正常な応力を感じることができないので、最初は非常に低い配向性になってしまいます。かなり石灰化が進んで12週ぐらになると再生骨はモデリングしながら、荷重がかかってきますので、本来の破骨細胞による骨溶解が発生し、配向性がどんどん整っていきます。その配向化

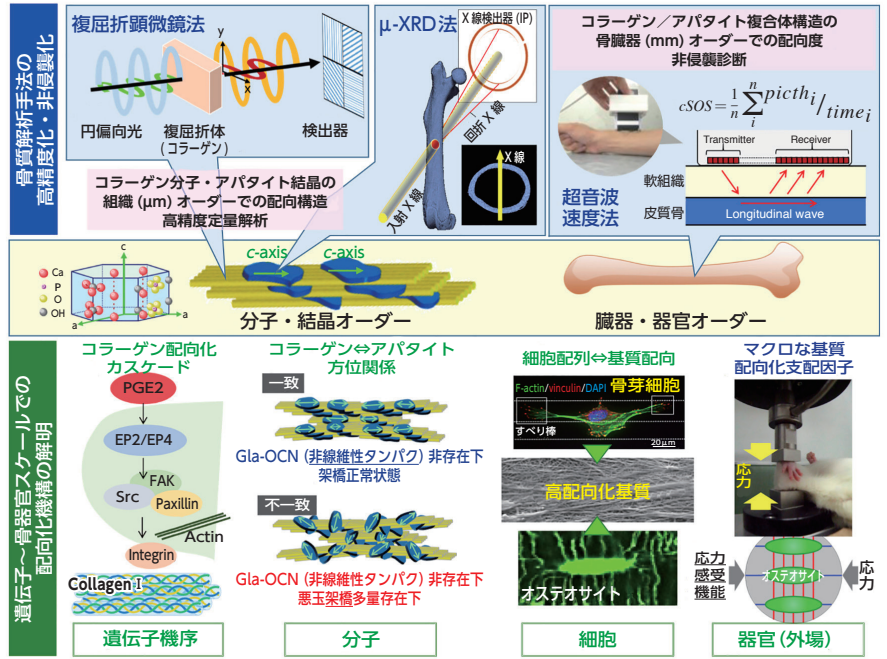


図2 骨質解析手法の高精度化・非侵襲化／遺伝子～骨器官スケールでの配向化機構の解明 (文献1と2から改変引用)

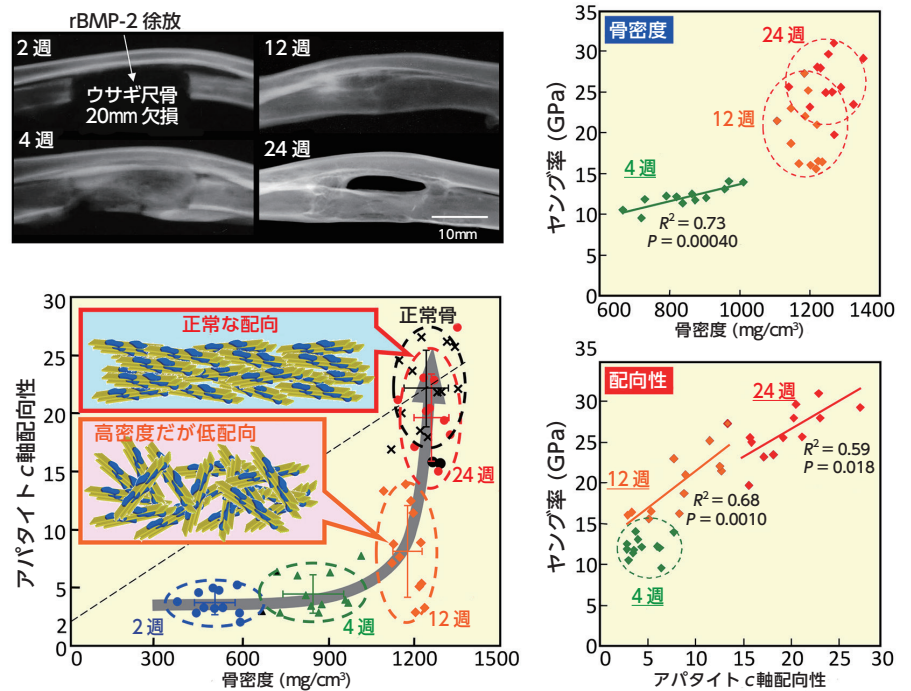


図3 骨基質配向性は重要な骨密度支配因子の1つであり骨再生時に顕著に表れる (文献3から引用)

の過程で再生骨の力学的な特性が変化しなければ、配向性を整えることに何ら意味がないことになります。ここで骨密度はアパタイトの量ですし、配向性はアパタイトのc軸が三次元の特定方向、この場合、骨長手方向に配列している度合

です。配向性は密度が高くならなくても、この場合には相対的に長手方向にどれだけ向いているかというもので、鉛筆が100本ある状態と10本ある状態でも、それぞれ同じ方向に80本向いている場合と同じ方向に8本向いている場合では

配向性は同じということになり、密度とは関係ありません。したがって、もちろん両者間での相互作用はありますが、骨密度と配向性は独立な指標として分離して考えることができます。

骨再生の場合はほとんど老化架橋がないことが予想されますので、非常にシンプルな例だと思います。初期の4週だけ骨密度が配向性を支配し、ばね定数である力学特性の代表例であるヤング率に対しては正の相関関係を示します。しかし、それ以降は骨密度とはほとんど関係がなくなり、12週、24週のヤング率と配向性の関係は配向性のほうが力学特性を強く支配するようになります。これを重回帰分析すると週齢によって程度は違いますが、4週から24週の週齢では約7割が配向性によって力学特性を支配し、骨密度の役割は約3割に留まります。骨再生過程では、骨配向性が力学特性に対し非常に敏感に効てきます。これが生理的な状態ではないかと考えますし、部位によっても異なるということになります。

また、1日10分ほど荷重をかけて配向性と骨密度と骨量の変化を見たところ、正常な状態から周波数を変えて荷重をかけて歪みを変えていくと、一番センシティブに配向性に反映しました⁴⁾。お

骨細胞の機能と骨質制御

斎藤 ありがとうございます。中野先生のお話は上岡先生のご研究とも重なります。細胞配列から基質が生まれる過程での基質合成機序についてイメージも使って多くのことが明らかにされましたが、特にどのような制御を受けているのか、上岡先生にお教えいただけると幸いです。

上岡 コラーゲンの配向性とアパタイトのc軸の件、ちょうど自分が準備していた内容と重なり、非常に興味深く聞きました。スライド(図4~6)を共有させていただきます。皆さんご存じのように、コラーゲンはきれいな配向性を示しているとともに積層化しています。図4で示したようなベニヤ板状積層がマイクロ単

そらく、非常に短い時間で機能適応しようとするときに、配向性は骨基質方向性を変化させるだけなので骨密度や骨体積に比べ、早期に対応できる状態なのだろうと考えられます。この際、オステオサイトの応力感受がやはり重要になりますので、オステオサイトの大家である上岡先生と共同研究を続け、昨年、先生と一緒に原著論文を発表させていただきました⁵⁾。

オステオサイトのラクナの形態は長く伸びるほど細管の多くをその垂直方向に伸ばしています。オステオサイトラクナが荷重方向に対して平行に、しかも長い形状で配列していればしているほど、細管に対する荷重が効率的に負荷され、垂直荷重を最も効率的に受けることができます。ですから、三次元方向にばらばらに細管を伸ばしていた場合、液体流動が発生した場所で、液体流動をストップさせるように周囲の配向性を変化させるといったメカニズムが起こる、つまり外部の異方的な荷重が内部では等方的な荷重へと変換されているということの意味しているのだと理解しています。それをさらに、効率的に検知できるようなセンサーとしての形態を持っているということ、上岡先生と証明いたしました⁵⁾。

位できれいな層になって骨ができています⁷⁾。おそらくこれが基質のメカニカルストレスと非常に関係しているのだろうと私も思っています。同じような配向性

オステオサイトの周囲にはほぼ垂直に伸展している骨細管と垂直になるように、コラーゲンがきれいに配列します。一方で、骨芽細胞からコラーゲンの産生を見ると、骨芽細胞が伸展した先端部の接着班内でインテグリンにコラーゲン線維がトラップされてコラーゲンの優先配列を作ります。これは人工的にも可能となりますし、生体内でも同様のことが起こっているのだと考えています。要するに、骨基質を配向させたい方向に骨芽細胞の優先配列を決めて、細胞伸展方向に配向性が構築されるようなメカニズムがあり、自己組織化的な石灰化を含めてI型コラーゲンに対してアパタイトのc軸が平行配列していくのではないかと考えます。ですから、骨再生でお見せしたものは、実際にはオステオサイトの命令に基づきます。例えば、オステオサイトから分泌されることが良く知られている生理活性脂質PGE2をアンタゴニストで抑制すると、コラーゲンの配列が乱れてしまいます。ですから、オステオサイトが応力を感じてシグナルを出すときに極性をどうやって決めるかは難しいところですが、少なくともPGE2はコラーゲンの配向化に関与する1つの重要な因子であることは間違いなさそうです⁶⁾。

で並べると一定の方向からの力には弱くなるけれど、こういうふうには異方的な感じで積層していることが、硬いと言いますか、柔軟性のある骨を作るポイントに

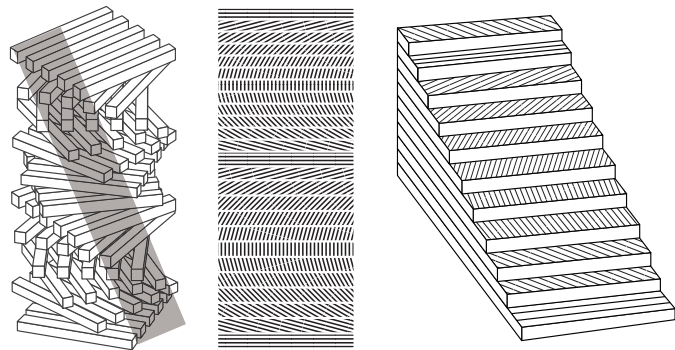


図4 コラーゲン細線維は積層構造をもち各層は一定の角度をもって重なっている (Giraud-Guille MM. Twisted Plywood-like architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif Tissue Int*: 1988より改変引用)

なっているのではないかと思います。

では、これにどうやってアパタイトの結晶化が関与してくるのかについて、後で中野先生に教えていただきたいのですが、その前に、実際に見られるコラーゲンの積層という現象を示します(図5)。骨芽細胞がコラーゲンを出すわけであって、勝手にコラーゲンが伸張するわけではないので、必ずこうして骨芽細胞が移動しているはず。普通に考えて、動かなければ不規則に堆積するだけであって、きれいな配向性の形成は、できた骨の内部で起きるといふより、骨の表面で先に起きていると考えるのが自然です。そうすると、この構造物ができるためには、一律に同じ方向に同周期で骨芽細胞が動き、またあるときに同じ方向に同じ周期で動くことを繰り返すことが必要になって来ます。このように(図4)、縞様に見えるのは、おそらく角度はそれほど大きく変わらなくても骨芽細胞の同調性があるからだと思えます。

このようにしてコラーゲンの構造物ができるわけですが、実際にコラーゲンが出ているところを見たくて超高圧電子顕微鏡で観察したところ、コラーゲンを産生している骨芽細胞は、下部の基質に全然くっついていない場所(図5①)と、非常に何かを出して骨基質との境界が不鮮明なほどくっついて見えるような場所(図5②)が必ずあります⁸⁾。この部位は沢山のミトコンドリアも見られて、何かが発能にできていることをエネルギー的にサポートしているように見えます。骨芽細胞から出ている1本のコラーゲン細線維をずっと追っていくと細胞からかなり離れたところまで追えるのです。産生されたコラーゲン細線維が勝手に伸びていくことは考えにくいので、骨芽細胞が一方方向性に動いていて、コラーゲン細線維を出していることが分かりました。

先ほど斎藤先生は、出来たてのコラーゲンは軟弱だと言われましたが、そのコラーゲンはどこまでできるかと言いますと、骨芽細胞の膜表面の鞘の中で生合成されたプロコラーゲンがペプチターゼ

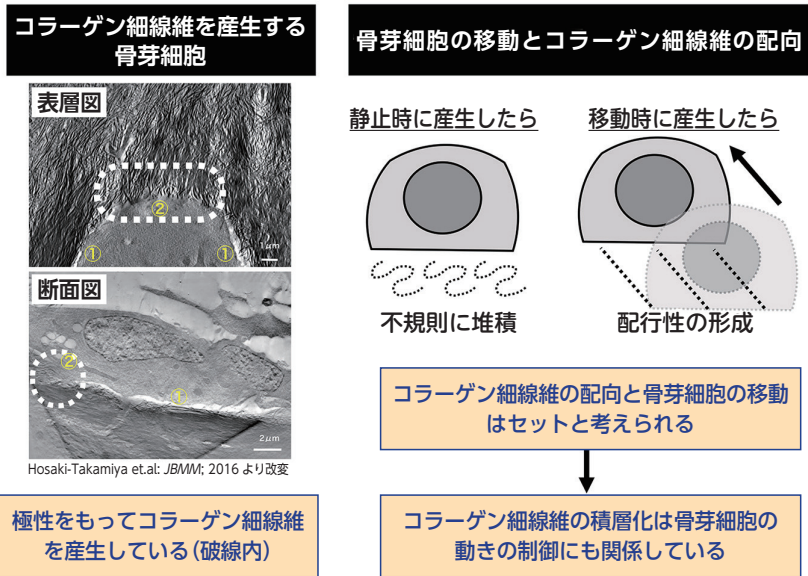
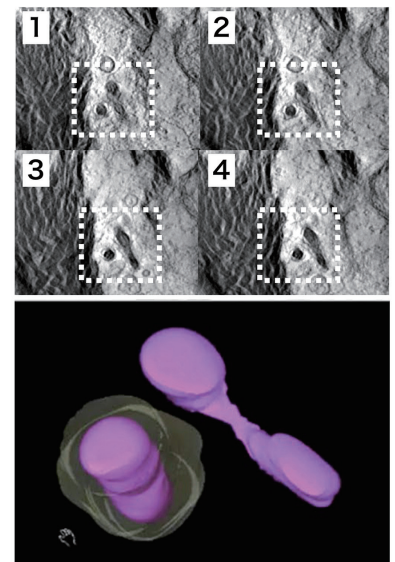


図5 骨芽細胞の移動およびコラーゲン細線維の産生・配向

によりコラーゲン分子となり線状化します。これがまさに鞘の中にあるコラーゲンの細線維です(図6)。ここからコラーゲン細線維はでて、お互い架橋されて強くなっていきます。このようにして産生されたコラーゲン細線維は骨芽細胞が同調して積層されていくところが非常に大きなポイントであり、そうした積層が骨基質の硬さ、柔軟性を作るための基盤になり、その基盤ができた段階で次にアパタイトが結晶化していくというふうになっています。

ただし、少し疑問もあります。骨芽細胞が移動するのであればどうやって骨細胞ネットワークは形成されているのか? 蛍光標識した骨細胞のネットワークを観察した場合には、骨細胞は骨表面から深部にわたって細胞突起で繋がっています。しかし、細胞同士が繋がったままでは骨芽細胞は移動できないですし、骨芽細胞が動くとネットワークは切れるはずですから、どうして骨は細胞性ネットワークを維持しながら積層構造を持つのか分かりません。積層構造がベニヤ板状に形成されるたびに、どこかで一定数の骨芽細胞は取り残されて骨細胞になります。しかし、それがどういうふうな機序で取り残されるかというのが分からないのです。確率的に、表面に6つの骨芽



Hosaki-Takamiya et.al: JBMM; 2016 より改変

下の図は1から4までの連続断層像を立体構築したコラーゲン細線維を産生する鞘状構造物

図6 骨芽細胞の細胞質に形成されているコラーゲン産生のための鞘状構造

細胞があったら、その下に1つの骨細胞が埋まっています⁹⁾。どうしてそのような選択が行われるのかが、この謎を解く一つのポイントになってくるのではないかと考えています。

斎藤 ありがとうございます。骨質に関して一般的にコラーゲンのことで分かっていることに加えて、上岡先生に大事なことをお示しいただきました。骨の

コラーゲンは必ず積層構造になっていて、それぞれ90度まではいけませんけれどもかなり違う角度できれいに層板状に並んでいます。同じI型コラーゲンでも、伊豆先生も研究されたような腱は必ず一方向に並んでいます。アキレス腱を電顕で見るとほとんどの面は同じ一方向に向いていくわけです。骨の場合には、モデリングでもリモデリングの過程でも必ず違う角度でそれが達成できています。

応力によって一定方向のc軸方向にし

か配列しないのであれば、積層構造にはならぬので、骨においては応力のみならず、他の何らかの因子によって、腱のI型コラーゲンは違う配向性が制御されていると考えられますね。興味深いことに、非荷重骨も同じように積層化します。非荷重骨はIGという重力と骨周囲の筋収縮から得られるメカニカルストレスのみで荷重骨と同等の強度であり続けます。さらに同様の積層構造をとると考えられます。荷重骨はベッドレストした

だけで骨密度が下がっていきませんが非荷重骨は維持されます。私は、メカニカルストレスを研究している先生によく質問するのですが、非荷重骨には荷重ストレスがなくてもIGというもののだけで荷重骨と同じだけのものを作りなさいというスイッチがあり、荷重骨は逆に荷重がなくなったらもう駄目ですよというスイッチを組み込まれているのではないかと。これは荷重骨、非荷重骨を考える上で非常に重要ではないかと考えています。

2. 骨質の制御因子は骨リモデリングだけなのか？

斎藤 コラーゲン産生細胞は、主たるI型コラーゲンのみならず、その周囲に

様々なタイプのコラーゲンを産生します。伊豆先生はXII型コラーゲンとVI型コラー

ゲンを研究されています。これらの機能についてご説明いただけますか。

骨運動器の非線維性コラーゲン (XII型, VI型) の機能と骨質

伊豆 骨の主なコラーゲンはI型コラーゲンですが、そのほかのコラーゲンも骨形成に関与していることがわかってきました。これまでに脊椎動物では28種類のコラーゲンが報告され、I型コラーゲンのように線維を形成するタイプはI型、II型、III型、V型、XI型、XXIV型、XXVIII型の7種類が知られています。一方で、線維を形成しない、非線維性コラーゲンと呼ばれているタイプがあり、その中でもVI型コラーゲンとXII型コラーゲんに私は着目しています。

画面を共有させていただきます(図7~9)。XII型コラーゲンはファシット(FACIT)コラーゲンというタイプであり、I型コラーゲンのそばにあってI型コラーゲン同士を架橋するという分子架橋のような役割を果たすことでI型コラーゲン線維の太さとか線維間の距離を制御していると言われています(図7)。VI型コラーゲンはビーズ状(Beaded filament)タイプと呼ばれているもので、マイクロフィラメントのネットワークを作ります(図7)。VI型コラーゲンはいろいろなところに発現しているのですが、XII型コラーゲンは骨や腱などメカニカルストレスがかか

りやすい部位に高発現するという特徴があります。XII型とVI型コラーゲンは遺伝子欠損により、骨や筋肉、腱が脆弱するといった類似した病態になります¹⁰⁾。

まず初めに、I型コラーゲンの生理学的な状態での成長のときに起こる線維形成について細かく機序が分かかってきたので、それを少しお示しします。

I型コラーゲンが細胞の表面に分泌されてくることは知られていますが、その後ミオシンIIという分子により細胞内にI型コラーゲンが引き込まれ、それによって、先ほど上岡先生がお示されたように袋の中に閉じ込められ

ます。腱ではこれはフィブリポジター(fibripositor)と呼ばれています。これがメカニカルストレスのかかる方向に伸びていくことによって線維の方向性が決まっていることが分かかってきました¹¹⁾。ただ、この制御を骨で確かめることはとても難しく、骨ではどの方向に伸びていくかなど、詳細はまだそこまで分かっていないです。

先程、斎藤先生からもお話がありました。腱ではI型コラーゲン線維は一方向に平行に走行しています。一方、角膜ではある程度同じ方向に走行した後に垂直に90度曲がって走行します。骨の積

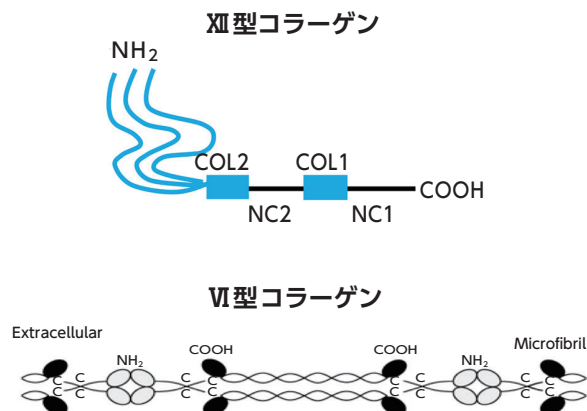


図7 XII型およびVI型コラーゲン構造

(Lampliet al. *J Med Genet.* 2005; Mienaltowski et al. *Adv Exp Med Biol.* 2014 より改変引用)

層構造と同様に、この制御についてもあまりよく分かっていませんが、このような臓器を使って方向性のスイッチング制御が分かれば骨の積層構造の解明にも応用できるのではないかと考えています。

XII型コラーゲンとVI型コラーゲンは、細胞表面に多く局在していることから、これらが細胞と細胞外環境を制御することで、I型コラーゲン線維形成制御に関係しているのではないかと考えて研究を進めています。細胞表面上でVI型コラーゲンとかXII型コラーゲンがなくなるとどのように見えるか、腱のデータをお示します(図8)。これは、野生型(WT)とノックアウト(Col12a1KO)の腱の横断像です。1個1個がI型コラーゲン細線維ですが、ノックアウトでは細線維間のスペースが拡大しているのがわかります。このため、XII型コラーゲンがコラーゲン線維間の距離を制御していると考えられます¹²⁾。骨ではこういう線維間の空いたところにアパタイトとか他のタンパク質が入って関与してくるのではないかと考えていますが、先生方に教えていただきたいと思っています。

腱細胞を電顕レベルで見ますと、生後4日の野生型では腱細胞が突起を伸ばしネットワーク構造を作っています。一方、ノックアウトでは明瞭な細胞突起が見られず、ネットワーク構造が壊れてしまい、細胞突起で囲まれるFiber domain (F, 線維)も形成できなくなります。30日齢でも腱細胞ネットワーク構造は認められません。この時、腱のStiffnessは増加し、硬くなり、切れやすくなってしまいます。腱も筋肉と同じで階層構造により伸縮性を獲得しているため、線維の区画化を形成する細胞間ネットワーク形成制御が力学的特性の獲得に重要だと考えられます。

すなわち、XII型コラーゲンは細胞外では線維間のスペーシングの場所を制御しているのではないかと、また、VI型コラーゲン欠損でもI型コラーゲン線維形成に障害が見られるので、細胞外周囲でこれを制御しているのではないかと、それ

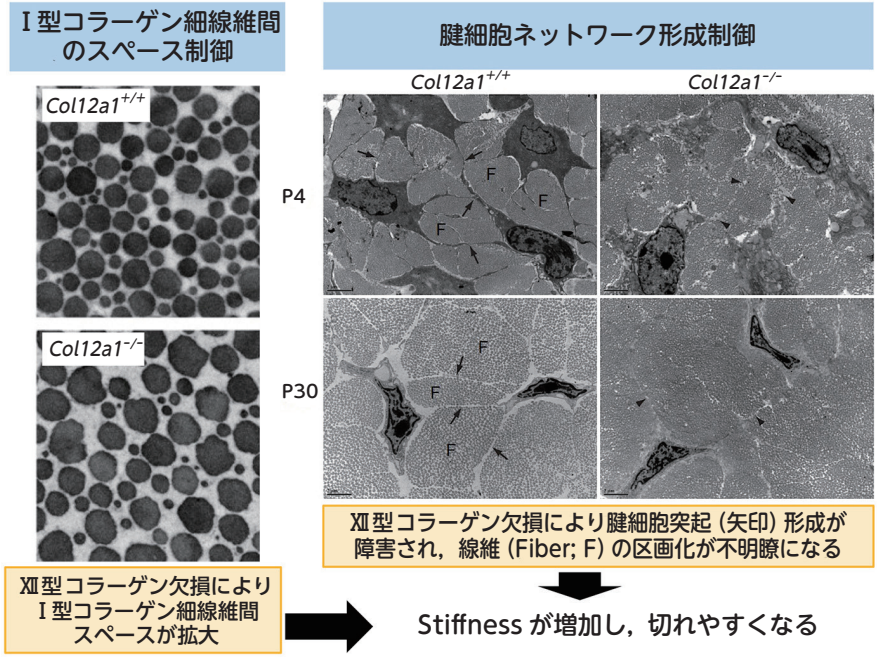


図8 XII型コラーゲンによる腱のコラーゲン線維形成と細胞制御 (Izu et al. Matrix Biol. 2020)

と同時に、XII型とVI型コラーゲンは腱細胞同士を繋ぐことによって区画化、線維の構造を制御し、それによって組織強度に関与しているのではないかと考えています^{12,13)}。実際、VI型とXII型コラーゲンは細胞同士を物理的に結合させることも見出しています¹²⁾。

XII型コラーゲンは、骨では骨細胞には発現せず、骨芽細胞だけに発現します¹⁴⁾。図9で示した免疫染色では、皮質骨には発現しておらず、骨膜や骨芽細胞に局在しているのがわかります。XII型コラーゲンをノックアウトすると骨量が少なくなると骨強度も落ち、コラーゲン線維の配向性がおかしくなることが偏光顕微鏡所見でわかりました。また、ノックアウトではI型コラーゲンの量自体はあまり変わりませんが、骨基質タンパク、オステオカルシン、オステオポンチンは低下します。また、ファロイジン染色では、ノックアウトすると骨芽細胞の極性化や配列が乱れると同時に、骨細胞のネットワーク構造が全然取れなくなってしまいます(図9)。骨細胞数も増えます。VI型コラーゲンも同様な表現型を示します¹⁵⁾。このときコミュニケーションは保たれているかどうか、コネキシンと

かギャップジャンクションの機能を調べたところ、やはり落ちてしまっていますので、これにより骨におけるI型コラーゲンの配向性にも影響が出ているのではないかと考えています。こちらについては上岡先生も研究され先ほど指摘された細胞の同調性があることによってもたらされ、実はそこに、細胞外にいるマイナーなコラーゲンに関わることによって細胞間距離も制御され、それによって、中野先生がおっしゃっていた細胞の大きさとか、コラーゲンの配向性が決まってくるのではないかと考えています。

斎藤 ありがとうございます。大分繋がってきました。腱のデータに関して1つ確認したいのですが、XII型コラーゲンはI型コラーゲンの1分子にそれぞれ1個ずつ付いているのですか。

伊豆 分子というよりはI型コラーゲン線維についているようですが、その数についてはまだ分かっていません。

斎藤 分子1個1個にXII型コラーゲンが付いて架橋し、分子1個と1個の間のXII型がそのコラーゲン分子の配列を乱すのであれば、腱のノックアウトでコラーゲン線維の太さは成長していたと思うのです。

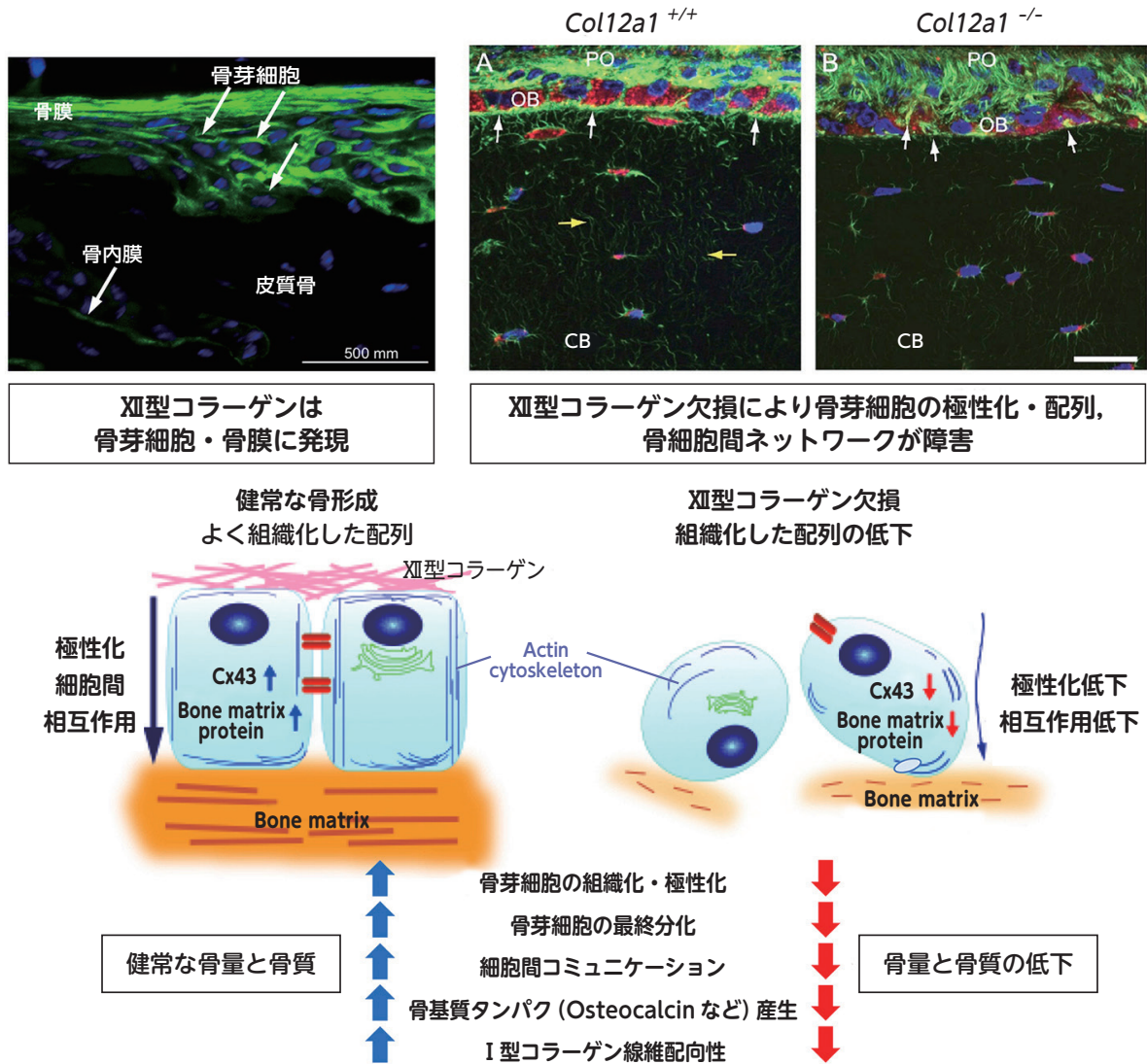


図9 XII型コラーゲンの細胞間コミュニケーション制御を介した骨量と骨質制御 (Izu et al. J Cell Biol. 2011)

伊豆 そうですね。コラーゲン線維の太さ自体にはあまり変化は見られなかったです。

斎藤 ステロイド投与したラットの腱を見ると、生理的な酵素依存性の善玉架橋がリジロキシダーゼという誘導因子となる酵素の分泌が低下し、コラーゲン線維が太く成熟できないことが分かりました。伊豆先生のデータではある程度、コラーゲンの線維径は太くなっていますが、線維と線維の間の空隙が結構多く、まさに線維と線維の間の距離を決めているというイメージだったのですが、そのような理解でよろしいですか。

伊豆 そうですね。コラーゲン線維の断面が正円ではなく、少し凹凸がある部分がありますので、コラーゲン線維の重合

や融合障害もありますが、主にはスペーシングという線維間の距離を制御していると考えています。VI型コラーゲンについては、細胞周囲と細胞から遠い部分でも違いがありますので、もう少し詳細な研究が必要かと思います。

斎藤 わかりました。さらに細胞と細胞をきれいに並べていく。細胞が並ぶこと自体がその先にあるコラーゲンの合成、配向性に直接関係してくると思われませんか。例えばメカニカルストレスに応じて細胞は形も変わりますし動くとも言われているので、それが上岡先生のおっしゃるように細胞が動いた方向にコラーゲン線維が配向することは興味深いですね。われわれ臨床家は細胞が動くという、破骨細胞の動画で戦車みたいに動く

ようなイメージを抱きますけれども、骨芽細胞はある程度動きながら積層化を誘導している可能性がありますね。その際にXII型コラーゲンはシャペロンのような働きをすると感じました。

コラーゲン分子の線維化を制御する因子として、小型のプロテオグリカンであるデコリンやバイグリカンといった、ロイシンリッチリピートプロテイン (Leucine-rich repeat protein) が知られています。

上岡先生にうかがいますが、XII型コラーゲンと細胞の配列と骨芽細胞に入っていくまでの過程を結び付けるような考察はございますか。

上岡 非線維性のコラーゲンが細胞間コミュニケーションに影響を与えるという

お話にはアツと思いました。私はずっと骨細胞のコミュニケーションを研究する中で、そこに影響を与えるファクターとして、骨リモデリングでは骨細胞周囲のpHが変わることや、カルシウム濃度が変わることが1つの要素であることを見てきました¹⁶⁾。これは破骨細胞が近くにきたような状態なので、カルシウム濃度が上がってpHが下がったときには、細胞間コミュニケーションが著しく低下するのです。逆に骨形成に働くPTHの

濃度が上がると今度は上昇するのです。そういうデータがあったので、伊豆先生がおっしゃったように基質そのものが直接細胞間コミュニケーションをコントロールしているということになると、そういうものが同調性と方向性をスイッチオン・オフする転機になるのではないかとということで非常に面白く聞かせていただきました。

また、先の図(図5①)でお示したように細胞から出たばかりのコラーゲン細

線維は結構カーブしていますが離れれば離れるほど真つすぐになっていることや、お互いがくっつき合っているのが観察されたので、何らかのメカニカルストレスでコラーゲン細線維が引っ張られていたからそうなのかと考えていました。そこにもう1つのファクター(Ⅱ型コラーゲン)が入って配向性をきちんと形作っているという報告を知ったのは非常によかったです。私にとっては、新発見です。
伊豆 ありがとうございます。

アパタイトの成長過程に影響を及ぼすものについて

斎藤 腱では、メカニカルストレスをベースにしながら細胞が動いた方向にコラーゲン線維の配向性は規定されますが、骨の場合には積層構造をとらせるため細胞の挙動のみでは説明出来ない何らかの要素が必要になりますね。

中野先生にうかがいたいと思います。モデリングの場合、骨形成、骨欠損のモデルの場合には腱の再生と同じように、ある程度同じような感じでコラーゲンが配向していくと思いますが、リモデリングの過程でも、コラーゲンは積層しているけれどもアパタイトの配向性は測定上では一方向に配向性が整うようなことはあり得るのですか。必ずコラーゲンと平行なのですか。そのパラメーター、検証についてはいかがでしょうか。

中野 コラーゲンに対するアパタイトの配向は基本的に正常な状態では平行だと思っていましたが、2020年に長崎大学の小守壽文先生と一緒にオステオカルシンノックアウトによる研究を行って考えが変わりました²⁾。

I型コラーゲンではコラーゲンホールゾーンにて核形成するといわれています。しかし、非常にサイズが大きい場所なので、そこに何らかの分子が存在しなければそれは難しいだろうと考えていました。実は金属材料でも似たような考え方をします。そこでオステオカルシンノックアウトマウスを検索したのですが、コラーゲンの配向に対しては全く影響がありません。長管骨ではきれいに骨

長手方向に配向しています。ところが、オステオカルシンをノックアウトしたマウスではアパタイトの配向性は完全に乱れていて、アパタイトc軸とコラーゲン配列は全く一致していないのです。伊豆先生のⅡ型コラーゲンのデータでも著明なオステオカルシンの濃度変化が示されていまして、コラーゲンだけではなく、コラーゲンに対する相対的なアパタイトのc軸の方向性付与も何らかの影響を受けるのではと思いつつ興味深く聞かせていただきました。

力学特性に及ぼす影響として、言い方は適切ではないですがアパタイトは最後に残る残骸みたいなものですが、それが強度を決めています。それで、斎藤先生と一緒に研究させていただいたときのよう、老化架橋ができればその配向性がきれいに乱れます¹⁷⁾。その相関がとてもきれいに出てきます。老化架橋と配向化形成の詳細なメカニズムについてはまだ分かっていませんが、老化架橋が配向性を乱す要因になっていますので、それが骨力学特性に影響を及ぼし、おそらくそこにオステオカルシンが絡んでいると現状では考えています。

斎藤 ありがとうございます。今のお話を少しまとめてみたいと思います。コラーゲンが細胞から出て配向します。そして、ホールゾーンに石灰化が起きるわけですが、コラーゲン線維がきれいに並ぶためにはメカニカルストレスが必要であるということになります。Ⅱ型

コラーゲンが細胞と細胞の並びを整えるという制御が、その上流にあると言えると思います。I型コラーゲンが配列していく過程でホールゾーンに石灰化するという考え方は、第一次ミネラル化ということになります。第二次ミネラル化へと発展していく際には、第一次ミネラル化で生じたアパタイトの配向性を継承し素直に配向するとは限らないように思えます。例えばアパタイトに結合するようなビスホスホネートなどのキレート剤、もしくはコラーゲン結合タンパクが結合すれば、アパタイトの配向性は変化すると思いますが、いかがでしょうか。

中野 核形成では確かに方向性を決めるのにオステオカルシンが効いていますが、成長速度を見ると結晶のサイズが違うというデータもあります¹⁸⁾。我々のデータでは実は成長に対して効いていないのです。成長に関してはおそらく違うものが効いているのではないかと。以前、上岡先生ともディスカッションしたことがあるのですが、例えばエナメル質の配向を決めるアメロジニンが骨にあるので、そういった別のタンパクが効いているのかなど。そう思いつつまだ深く調べられていません。成長の段階については私の現在までの研究からはなんとも言えない状況です。

斎藤 分かりました。お話に出たAGEsについて言いますと、コラーゲンを構成するアミノ酸であるリジンやアルギニンにAGEsが誘導されますと、アパタイト

の配向性が悪くなる一つの理由として、本来の生理的な善玉架橋が誘導されずに、コラーゲン自体の配列が乱れます。

ミネラル化が起こるにしてもコラーゲンという足場の配列の乱れにより、アパタイトの配向も乱れると考えられますね。

こうした事象を説明するには、さらに上流で制御している細胞同士の繋がりを考える必要があります。

3. 骨質制御因子から見た治療の可能性とは

斎藤 少し話は変わりますが、病態・病気によって、こうすれば制御・治療できるかもしれないというサジェスションがありましたらうかがいたいと思います。上岡先生、何かございますか。

上岡 先のように、骨芽細胞の動きが骨を形作っていくことが治療の対象になってくるかもしれません。その動きを制御することで骨質のコントロールすることができるかもしれません。

斎藤 細胞が動いていくということでは、培養でも細胞が動きながらその方向に細胞を分泌しますか？

上岡 それが見えるのかと思って観察しましたが、カルチャーディッシュ上ではほとんど動かないですね。カルチャーディッシュでは骨のような積層構造は作らないので、やはりメカニカルストレスが関与しているのだと思います。

斎藤 骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞を培養しますと、コンフルエントに達した後にコラーゲンを多層化させることが知られています。しかし、培養では、コラーゲン線維の配向性は組織とは異なり綺麗な積層化はいたしません。私も、以前、MC3T3-E1細胞を培養しコラーゲン分析を行いました。細胞にメカニカルストレスとして重力負荷をかけたり低出力超音波パルス刺激を与えますと、コラーゲン架橋の形成が正常化して石灰化が促進されることを確認しています。総合して考えますと、骨芽細胞は、メカニカルストレスを感じて動きながらコラーゲンの配向を決めることは確かですね。

部位はどこであっても、その部位の要求に応じたコラーゲンの配向性を得るためにはメカニカルストレスが常にかかっていないといけない。これは腱でも同じだということでもよろしいですか、伊豆先生。

伊豆 はい。いいと思います。

斎藤 中野先生のところでは、治療に関してお考えになっていることはありますか？

中野 分子、遺伝子でもある程度配向性に関わるものはありますので、遺伝子注入による治療もありえるかもしれませんが、それは大変な大仕事だと思います。他の機序もありますのでそれは置いておくとして、やはり応力応答が、上岡先生がおっしゃった通り一番重要だと思っています。配向性ができる方向は基本的には、最大主応力ベクトルと言われる剪断応力ではなく、軸応力が最大になる方向になりますので、荷重がかかりやすいようなところで軸応力をかけるような方向に配向させていくという方法が臨床的で使われています。

1例としては、2018年に京セラから出たデンタルインプラント製品FINESIAがあります。普通は溝を切るときにきれいに対称形になりますが、この製品ではホストボーンに対して主応力ベクトルが伝達されるように斜め方向に溝を切ります。そうすると初期から溝に沿って最大主応力がかかることで、予後は、配向性も含めて非常に良いというデータがあります。

また、去年4月にPMDAで承認され

た椎間スパーサー（UNIOS PL）があります。これは応力がかからない場合でも骨芽細胞を一方に配列させることができます。つまり一方に骨芽細胞を移動させることができます。そのためには配向溝を形成する、要するに骨芽細胞が検知して形状伸展や移動を決定する溝を作ってやることで、荷重がかかっていなくても自ずと必要な方向にコラーゲンを配列させます。脊椎は非常に複雑な配向をしているのですが、基本的には頭尾軸方向への一軸配向なので、椎間スパーサーにハニカムツリーインストラクチャー（200ミクロンの周期構造を持った配向溝）を導入すると、荷重がかかっていなくても初期の段階で頭尾軸に沿って骨芽細胞が配列しながら入っていきます。ヒンジのスタディでは通常はスパーサー内に自家骨を設置し、次にその自家骨が吸収され、さらにリモデリングされ、そこから配向化が始まるという3段階を取ります。新規のスパーサーは自家骨を吸収させずに、初期から高配向な新生骨を作ってしまうという戦略で、8週で3倍から4倍の引抜強度が発揮され、まさに爪楊枝が刺さってそれが高強度化するような骨基質を導入することができました。こうした、骨芽細胞の配列を基板の形状で制御しようということを金属3Dプリンターで造形することができます。

斎藤 ありがとうございます。治療への可能性に関しましては更に研究が進むことを願います。

4. 今後の研究の抱負・展望

斎藤 今日は、細胞の制御のところから

基質になっていくメカニズムが見え、総

説の図などでお目にかかるような骨から

細胞までの一連の話が繋がって見えてきました。ミクロからマクロまで論じた今回の座談会は、いわば骨質オーバービューといったものとなり、私は改めて認識を新たにしました。これをきっかけに、骨質につながるような研究が盛んになればと思います。

そこで最後に、今後の研究の展望、夢、あるいは抱負ですとか、若い先生に向けたアドヴァイスなりを教えてくださいませんか。

まず、上岡先生、いかがでしょうか。

上岡 少しお話しましたが、骨がきちんとした微細構造物を作ることとネットワークを維持することは何か相反するような感じがしますが、そこにきちんとした骨が作られる一つのヒントがあるのではないかと思っています。やはり骨細胞が骨の中に生き残らなければ生きた骨とならないので、それをきちんと把握したいと思っています。

また、中野先生がおっしゃったメカニカルセンサーとしての骨細胞のことで、骨細管が非常に注目されています。細管内を流れる体液の移動が機械的刺激のトリガーとして考えられています。ただ、今日、結晶化というお話を聞いて、結晶化にはやはり水が抜けないといけないうのだらうなと思いました。骨基質の主成分であるコラーゲンの間に存在する水分が抜けなければ骨が硬くならない。そうした水路のような役割が、骨細管が維持される理由の一つではないかと思っています。きちんと水路ができなければ硬い骨ができないのではないかと考えてみればこのことも骨質の重要なポイントではないかなと感じました。こうしたことを含め、絶えずシンプルな疑問を持ちながら研究を続けていくことが大事なのだろうと思っています。

斎藤 ありがとうございます。コラーゲンとアパタイトの間に入る水分には結合水とフリー水があり、フリー水はコラーゲンの配向性を乱す悪玉の水と言えます。コラーゲンとアパタイトに結合する水分は必須であり、それがあ

によってコラーゲンはしっかり配向し、AGEsなどの秩序を乱す翻訳後修飾が誘導されないことが示されています。またそれはMRIで見ることができます。骨細管に繋がるような大きな空隙を作る水の流れの水分と、細胞から出てきた基質同士、有機物、無機物を繋げるような意味のある水分があるのです。水はなかなか研究が難しいので放置されがちですけども、今後非常に大切になってくるだろうと感じました。ありがとうございます。

伊豆先生、いかがでしょうか。

伊豆 今日は本当にいろいろな面白いお話が聞けて良い経験ができました。私の研究の展望を申しますと、一つは、骨の中にもI型コラーゲン以外の様々な非線維性コラーゲンがあり、そこで細胞周囲のマトリックス環境を整えることによって細胞自体もうまく働けるし、コミュニケーションも活性化して、その後の骨形成がうまくいくのではないかなと思いますので、掘り下げたいと思っています。また一つには、Ⅻ型コラーゲンは実はメカノセンサーとして働くとも言われたりしていて、その意味でもメカニカルストレスを最初に受容するのはマトリックス成分ではないかなとも思いますので、骨芽細胞周囲、骨細胞周囲のECM環境をもう少し掘り下げてメカニズムが分かってくると、本当の意味で骨全体のメカニズムが分かることになるのではないかと考えています。

斎藤 ありがとうございます。確かにメカノセンシングという意味では、例えば地震で家が揺れて中にいる人、細胞がいろいろ動きますが、地面の振動を受ける基質がどういう反応をするかによって中に入っている細胞たちの挙動も変わってくると思います。我々は単に、細胞がメカニカルストレスを受けてこうなりましたと言いがちですが、最初の部分のブラックボックスが何も解かれていませんので、ぜひその解明をお願いできればと思います。ありがとうございます。

中野先生、いかがでしょうか。

中野 いつも先生方のお話をうかがうと大変勉強になります。今日も非常に興味深くうかがいました。ありがとうございます。私の場合は、出来上がったものを解析することがメインで、なかなかメカニズムというところまでいかないことが多いのですが、若い人に対し一言申し上げるとすれば、ネットワークの重要さです。私は工学から飛び込んで先生方とお会いし、医歯薬工連携と言いますか、それぞれのエキスパートの先生方と直接的にご一緒させていただく中で、分からない部分を教えていただき、一緒に解釈までしていくということの繰り返しでした。そういう意味で、オステオサイトネットワークではないですけど、一番重要なのはネットワークだと思っています。私自身まだ分かっていないことばかりですが、一番知りたいところは異方性が構築される根源です。極性、方向性といったことを決めるのは、電子の移動方向、ベクトル性、濃度の勾配といった様々なことが関連すると思っていますが、私の中では今まだ繋がっていないので今後も研究を進めたいと思っています。極性に非常に興味があります。

それから私は今、骨芽細胞と破骨細胞とオステオサイトの相互間の関係性、伊豆先生のお話にもあったコネキシン43を介しての連結とか配向性も非常に効いているようですので、解明できればと思っています。例えば破骨細胞から骨芽細胞への命令は大理石骨病の場合にその配向性に非常に効いているようなので、破骨細胞がいなくて単独培養で骨芽細胞をするとあまり配向が整わないといったことも含めて細胞間ネットワークを工学的に解き明かし、先生方に解釈を加えていただいたり、サジェスションをいただいたり、共同研究をさせていただいたりできたらと思っています。私は今までそういう環境に恵まれましたが、これからも今まで以上に積極的にネットワークを広げ深めていくと未来が広がるかなと思っています。ありがとうございます。

斎藤 ありがとうございます。今日は

先生方のご研究をもとにディスカッションをしていただいたことにより、細胞から基質の制御までの話が繋がり、骨質研究の新しい展望が見えました。こうした機会が日本の若手研究者を盛り上げる一つの糧になればと思います。また機会があれば先生方のご意見をいただきたいと思えます。どうぞよろしく願いいたします。(丁)

参考文献

- Nakano T*, Kaibara K, Tabata Y, Nagata N, Enomoto S, Marukawa E, Umakoshi Y. Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by micro-beam X-ray diffractometer system. *Bone*. 2002; 31(4): 479-487.
- Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, Liu W, Fukuyama R, Wang Y, Komori H, Qin X, Amizuka N, Komori T*. Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genetics*. 2020; 16 (5), e1008586.
- Ishimoto T, Nakano T*, Umakoshi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using recombinant bone morphogenetic protein-2. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2013; 28 (5): 1170-1179.
- Nakano T*. Bone Tissue and Biomaterial Design Based on the Anisotropic Microstructure, In book: *Advances in Metallic Biomaterials* (Ed. M. Niinomi et al.). Springer. 2015; Vol.3: 3-30. DOI: 10.1007/978-3-662-46836-4_1
- Ishimoto T, Kawahara K, Matsugaki A, Kamioka H, Nakano T*. Quantitative Evaluation of Osteocyte Morphology and Bone Anisotropic Extracellular Matrix in Rat Femur. *Calcified Tissue International*. 2021; 109 (4): 434-444.
- Matsuzaka T, Matsugaki A, Nakano T*. Control of osteoblast arrangement by osteocyte mechanoreponse through prostaglandin E2 signaling under oscillatory fluid flow stimuli. *Biomaterials*. 2021; 279: 121203.
- Giraud-Guille MM. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif Tissue Int*. 1988; 42: 167-180. doi: 10.1007/BF02556330.
- Hosaki-Takamiya R, Hashimoto M, Imai Y, Nishida T, Yamada N, Mori H, Tanaka T, Kawanabe N, Yamashiro T, Kamioka H*. Collagen production of osteoblasts revealed by ultra-high voltage electron microscopy. *J Bone Miner Metab*. 2016 Sep; 34 (5): 491-9. doi: 10.1007/s00774-015-0692-0.
- Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T*. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone*. 2001 Feb; 28 (2): 145-9. doi: 10.1016/s8756-3282(00)00421-x.
- Zou Y, Zwolanek D, Izu Y, Gandhi S, Schreiber G, Brockmann K, Devoto M, Tian Z, Hu Y, Veit G, Meier M, Stetefeld J, Hicks D, Straub V, Voermans NC, Birk DE, Barton ER, Koch M, Bönnemann CG*. Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Hum. Mol. Genet*. 2014; 23 (9): 2339-2352.
- Kalson NS, Starborg T, Lu Y, Mironov A, Humphries S. M., Holmes DF, Kadler KE. Nonmuscle myosin II powered transport of newly formed collagen fibrils at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 3; 110 (49): E4743-E4752.
- Izu Y*, Adams SM, Connizzo BK, Beason DP, Soslowsky LJ, Koch M, Birk DB. Collagen XII mediated cellular and extracellular mechanisms regulate establishment of tendon structure and function. *Matrix Biol*. 2020; 95: 52-67.
- Izu Y, Ansoerge HL, Zhang G, Soslowsky LJ, Bonaldo P, Chu ML, Birk DE*. Dysfunctional tendon collagen fibrillogenesis in collagen VI null mice. *Matrix Biol*. 2011; 30 (1): 53-61.
- Izu Y, Sun M, Zwolanek D, Veit G, Williams V, Cha B, Jepsen KJ, Koch M, Birk DE*. Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *J. Cell Biol*. 2011; 193 (6): 1115-1130.
- Izu Y, Ezura Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Nakamoto T, Nakashima K, Hayata T, Hemmi H, Bonaldo P, Noda M*. Type VI collagen deficiency induces osteopenia with distortion of osteoblastic cell morphology. *Tissue Cell*. 2012; 44 (1): 1-6.
- Ishihara Y, Kamioka H*, Honjo T, Ueda H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Hormonal, pH, and calcium regulation of connexin 43-mediated dye transfer in osteocytes in chick calvaria. *J Bone Miner Res*. 2008 Mar; 23 (3): 350-60. doi: 10.1359/jbmr.071102.
- Shinno Y, Ishimoto T, Saito M, Uemura R, Arino M, Marumo K, Nakano T, Hayashi M. Comprehensive analyses of how tubule occlusion and advanced glycation end-products diminish strength of aged dentin. *Scientific Reports*. 2016; srep19849. doi:10.1038/srep19849.
- Poundarik AA, Boskey Atharva A, Caren Gundberg C, Vashishth D. Biomolecular regulation, composition and nanoarchitecture of bone mineral. *Scientific Reports*. 2018; 8: 1191.

骨・軟骨・筋科学 Update 2022年春号 (第2号)

発行日：2022年3月31日

発行：JSBMR 一般社団法人日本骨代謝学会 The Japanese Society for Bone and Mineral Research

制作：国際医学出版株式会社