

非コラーゲン性 タンパク質から見た 骨基質配向化機構

Non-Collagenous Protein-Mediated Formation Mechanisms of Bone Matrix Orientation

Key-words : Collagen/Apatite orientation, Osteoporosis, Osteocalcin, Mechanical property, Bone tissue

小笹 良輔・中野 貴由

Ryosuke OZASA and Takayoshi NAKANO
(The University of Osaka)

1. はじめに

生体骨は造血・ミネラル貯蔵などの生理機能を有しつつも、力学的支持を担う器官である。そのため、骨折や骨疾患などの治療や骨機能の回復を目的としたバイオマテリアルの開発には、生体骨がもつ力学的特性とそれらの発現機構を理解することが重要となる。

これまでに筆者らは、骨密度だけではなく、コラーゲン線維と六方晶系の構造をもつアパタイト結晶からなる骨基質の三次元的な配向性（配列方向とその度合い）が、生体骨の力学特性を規定する重要な骨質指標であることを提案してきた^{1),2)}。さらに、種々の遺伝子欠損・疾患動物モデルにおいて、骨基質配向性が敏感に変化することを解明してきた^{3)~7)}。こうした知見に基づき、筆者らは、生体内における骨基質配向性の形成・変化機構およびその制御因子を解明することが、骨機能を本質的に回復・再建するためのバイオマテリアル設計において重要であると考えている。

本稿では、骨基質を構成する生体分子のうち、非コラーゲン性タンパク質（Non-collagenous proteins: NCPs）が骨基質配向性に及ぼす影響について、筆者らの研究成果をもとに解説する。

2. 非コラーゲン性タンパク質と骨石灰化

骨基質の約 90 wt.% は I 型コラーゲンとアパタイト結晶から構成される。数 wt.% を占める NCPs は含有量こそ少ないものの、骨形成や石灰化過程を制御する重要な役割を担うことが知られている。例えば、Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein (SIBLING) ファミリーは、主に骨芽細胞やオステオサイトより産生され、石灰化組織で特異的に発現する

NCPs 群である。このファミリーに属する Dentin matrix protein 1 (DMP1), Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE), Osteopontin (OPN), Bone Sialoprotein (BSP) は、共通して、Integrin 結合配列 (RGD 配列) をもつため細胞挙動の制御に関わり、多数のリン酸化部位をもつため Ca イオンとの結合を介して骨の石灰化制御に関与することが報告されている⁸⁾。特に DMP1 と MEPE は骨代謝を司る重要因子であり、その欠損は低リン血症や石灰化異常を引き起こす^{9),10)}。Boskey らは、OPN はアパタイトの結晶化度を調整することを報告¹¹⁾している。一方で、Decorin や Biglycan などのプロテオグリカンもコラーゲン線維形成に関与する^{12),13)}。さらに、Osteonectin (SPARC) と Osteocalcin (OCN) はともにコラーゲンとアパタイト双方との結合能をもつため、骨石灰化挙動に影響を及ぼす^{14),15)}ものと考えられている。このように、NCPs は骨基質形成と密接に関わるものの、骨基質配向性との関係性については理解されていない。以降では、NCPs の中でも、特に DMP1, MEPE, OCN が骨基質配向性に及ぼす影響について、骨粗鬆症モデルおよび遺伝子欠損動物の研究事例をもとに紹介する。

3. 骨粗鬆症における骨基質配向性の変化

骨粗鬆症は骨量減少を特徴とする代表的な骨疾患である。その発症要因は多様であり、例えば、エストロゲン欠乏、カルシウム代謝異常、加齢、生活習慣などが関与するが、臨床的にはいずれも骨量・骨密度低下という共通の病態として認識されている。こうした中、卵巣摘出 (OVX) による原発性骨粗鬆症ラット、低カルシウム・低リン食 (LCaP) による続発性骨粗鬆症ラット、および擬手術ラット (Sham) を作製し、第 5 腰椎 (L5) の皮質骨における骨基質配向性を比較した。

この際、コラーゲン配向性の測定には正立顕微鏡搭載の定量的複屈折測定システムを用いた。本手法は、単一波長光を同一物質内にて複数の屈折率をもつ材料（複屈折体）に照射することで、照射光が試料の偏光状態に応じて屈折し、異なる 2 種類の位相をもつ透過光が生じる現象を利用する。具体的には、入射波の進行方向 (x 軸) に対して垂直な 2 次元断面内において、y 軸と z 軸方向にそれぞれ振動する位相差 90° の光（円偏光）を試料に照射することで、透過光において、直交する光の間に生じる位相差（リターダンス）と振動方向を検出し演算することで、試料がもつ偏光特性（分子配列の配向状態）の測定が可能となる（図 1）。アパタイト結晶配向性の測定には微小域 X 線回折法を

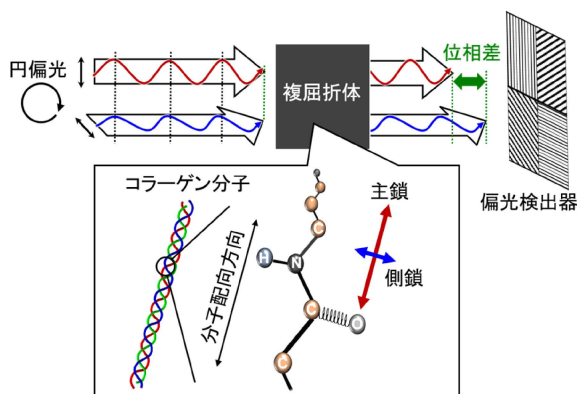


図1 複屈折法によるコラーゲン配向性測定原理の模式図。

用い、回折強度比 I_{002}/I_{310} により定量評価した。測定・解析方法に関する詳細は、過去の報告¹⁾を参照されたい。

筆者らは、骨粗鬆症は発症要因によらず骨量・骨密度を低下する一方で、骨基質配向性が最適値から正反対に変動することを明らかにした(図2)。具体的には、OVX 群は骨密度を低下するが、頭尾軸方向(主応力方向)への骨基質配向性は上昇し、それともない高ヤング率となる。つまり、OVX 群は、骨量減少を補填するためにコラーゲン/アパタイトを過度に高配向化させ、骨は主応力方向へと力学機能適応するものの、他方向からの突発的な変動荷重に対しては脆弱性を示すことが理解される。対照的に、LCaP 群は頭尾軸に沿った配向性とヤング率を異常低下し、主応力方向からの荷重に対してさえも抵抗力を失う。

こうした配向性の正常値からの変動は、応力感受細胞であるオステオサイトの機能化状態を用いて説明できる。いずれの骨粗鬆症モデルにおいても、骨量減少にともない骨への負荷応力は増大する。正常なオステオサイトが存在する OVX 群は機能適応により配向性を上昇する一方で、LCaP 群では異常状態のオステオサイトが増加することで、機能適応機構が破綻した。つまり、これはオステオサイトが *in vivo* 応力分布に応じて、骨基質の配向性決定に関与することを示唆している。

この際、オステオサイトの代謝産物である DMP1 と MEPE は、OVX 群にて正常に発現するものの、LCaP 群では発現が認められない(図3(a))。ここで、DMP1・MEPE の発現状態と骨基質配向との関係性に注目すると、両タンパク質の発現状態に応じて骨基質配向性が変化するものの、高い相関性 ($R^2=0.66$) から理解されるように、コラーゲン線維方向とアパタイト結晶 *c* 軸方向の対応関係は維持される(図3(b))。

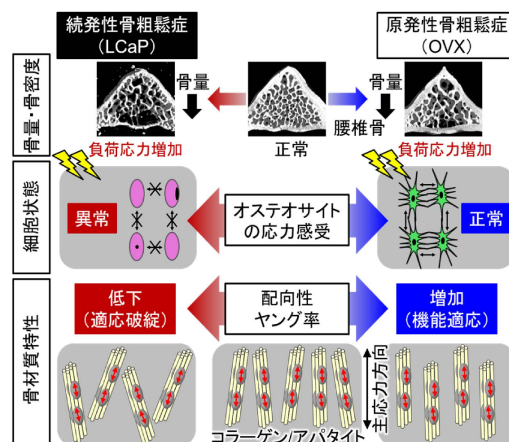


図2 骨粗鬆症の発症要因に応じた正反対の骨基質配向性変化。

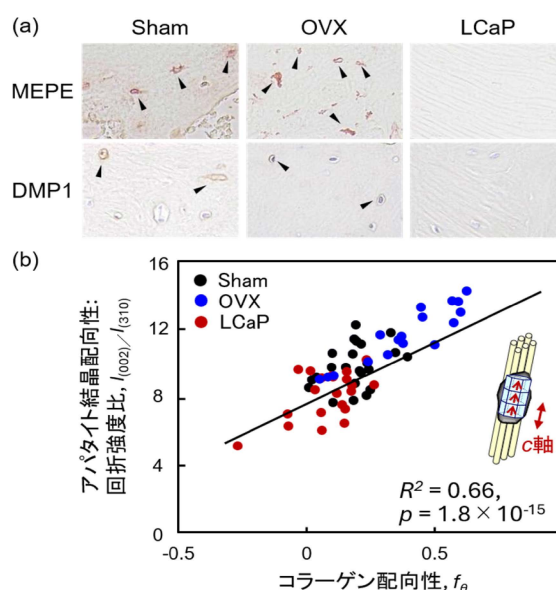


図3 (a)各モデルにおける MEPE と DMP1 の発現状態。(b) 骨粗鬆症におけるコラーゲン配向とアパタイト配向の相関関係。

このことは、DMP1・MEPE が、コラーゲンとアパタイト結晶間方位の制御には関与しないことを示唆している。つまり、両骨粗鬆症モデルでは、アパタイト配向性は、コラーゲン配向性の変化を起点として変化することを明らかにした。同様に、骨粗鬆症への薬剤予防投与モデル^{5),6)}や骨欠損後における再生初期の骨¹⁶⁾においてもコラーゲンとアパタイト結晶間の配向方位関係は維持された。

4. OCN 遺伝子欠損マウスにおけるアパタイト配向性の異常

OCN は、骨芽細胞が産生する最も豊富な非コラーゲン性タンパク質であり、そのグルタミン酸残基がカルボキシル化されることで Ca^{2+} への高い親和性をもつ。

さらに、OCNは低分子量（5.6 kDa）であるため、アパタイト核生成の発生源として有力なコラーゲンホールゾーンやアパタイト結晶成長の足場となるコラーゲンフィブリル間隙に進入できることが報告¹⁷⁾されている。こうした化学的性質から、OCNは石灰化への関与が示唆されてきたものの、その正確な機能や役割については長らく議論が続いてきた。

そこで、Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein (Bglap) 遺伝子およびBglap2遺伝子を共欠損させたOCN遺伝子欠損（OCN KO）マウスを作製し、骨材質パラメータを野生型（WT）と比較した⁵⁾。その結果、OCN欠損は大腿骨の骨密度および骨形成速度に対しては影響しないことを明らかにした。さらに、ラマン分光分析により、OCNは石灰化度（ $\nu_1\text{PO}_4^{3-}/\text{Amide}$ ）、結晶性（ $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ ピーク（958 cm^{-1} ）の半値幅）、コラーゲン架橋率（1660/1690 cm^{-1} ）などの化学的パラメータにも影響を及ぼさないことが示された。

複屈折法によりコラーゲン配向性を解析した結果、コラーゲン自体の走行方向および配向度はWT群とKO群との間に差異は認められず、両群ともに、骨端部では低配向性、骨幹部付近では高配向性を示す

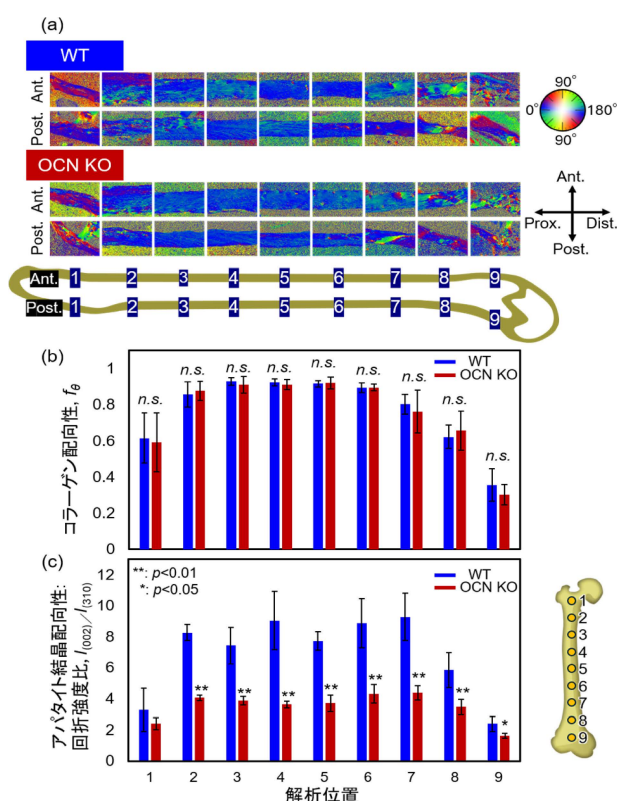


図4 OCN KO マウスの大腿骨におけるコラーゲン走行性とアパタイト配向性. (a) コラーゲン走行方向分布. 骨長手方向に沿った (b) コラーゲン配向性と (c) アパタイト配向性の部位依存性.

(図4(a, b)). しかしながら、アパタイト配向性はコラーゲン配向性とは異なり、KO群にて著しく低下する(図4(c)). この際、OCNが存在するWT群では骨端部から骨幹部におけるコラーゲン配向性の変化に従い、アパタイト配向性が敏感に変化するのに対し、この追従性がOCN不在のKO群では低くなる(図5). この際、OCN発現の有無にかかわらず、アパタイト結晶子のサイズは変化しない. これらの結果は、OCNは、アパタイト結晶がコラーゲン線維に対してエピタクシアルな結晶方位を核生成時に形成するために必須の因子であることを示している. このように、本研究は、これまでLandis¹⁷⁾により提唱されてきた「コラーゲン走行//アパタイト結晶c軸の方位関係」は必ずしも成立せず、OCNの欠損状態では「コラーゲン走行-アパタイト結晶c軸方向の不一致¹⁸⁾」により、アパタイト配向性が低下することを明らかにした.

これらの知見を踏まえると、コラーゲン配向性とアパタイト配向性の関係に基づき、骨基質の配向状態は以下の3つのカテゴリに分類できる(図6): (i) 健全骨のように、コラーゲン配向性とアパタイト配向性がともに健全配向を示す状態. (ii) 続発性骨粗鬆症のように、コラーゲン配向性変化に従ってアパタイト配向性が協調的に低下する「コラーゲン依存型の低アパタイト配向化」. (iii) OCN欠損状態のように、コラー

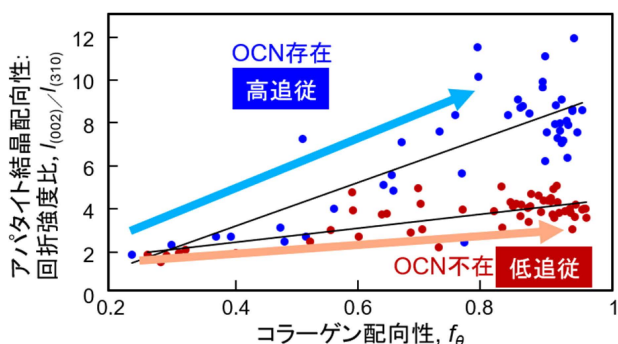


図5 コラーゲン配向性とアパタイト結晶配向性の関係性にOCNが及ぼす影響.

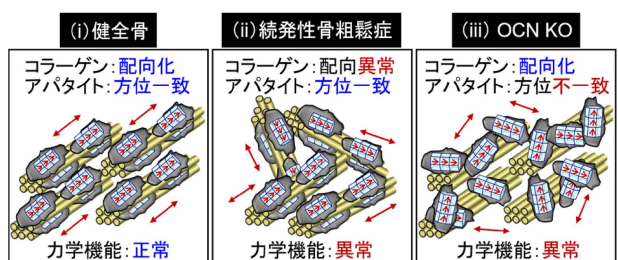


図6 コラーゲンとアパタイトの配向状態に基づく骨基質配向状態のカテゴリ分類.

ゲン走行は正常であるが、両者の方位関係破綻を起点にアパタイト配向性が低下する「方位関係破綻型の低アパタイト配向化」。ここで、(ii) と (iii) のアパタイト配向状態は一見同じに見えるが、コラーゲン配向の解析を加えることで、配向状態の違いが初めて区別可能となる。したがって、骨基質配向化状態を正確に理解するには、コラーゲンとアパタイト結晶それぞれに対する配向性ととも透過電子顕微鏡の明視野観察と電子回折法によるコラーゲン／アパタイト方位関係の理解¹⁶⁾が重要であるといえる。

5. おわりに

本稿では、NCPsの中でも、特にOCNがコラーゲン－アパタイト結晶間の方位を規定する重要な因子であることについて概説した。さらに、骨基質の健全性は、コラーゲンとアパタイト結晶の配向状態に応じてカテゴリ分類できることを紹介した。これらの知見は、骨基質配向性が骨の力学特性を反映する骨質指標であるだけでなく、生体内で骨基質が形成される機序の解明に資する重要な指標であることを示している。一方で、OCNが両者の配向関係構築をもたらす機序については、依然として不明な点が多い。今後、OCNを基軸にした骨基質配向化機構を分子レベルから解明することで、生体骨の形成・恒常性維持機序の理解がさらに深まるとともに、骨健全性を積極的に誘導するための新たなバイオマテリアル設計への応用が期待される。

謝 辞 本稿で紹介した研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金(23H00235, 26H02200)ならびに、JST-CREST革新的力学機能材料の創出に向けたナノスケール動的挙動と力学特性機構の解明(ナノ力学)(JPMJCR2194)(研究総括:伊藤耕三先生)の支援を受けて実施された。

文 献

- 1) T. Nakano, K. Kaibara, Y. Tabata et al., *Bone*, **31**, 479 (2002).
- 2) T. Ishimoto, T. Nakano, Y. Umakoshi et al., *J. Bone Miner. Res.*, **28**, 1170 (2013).
- 3) R. Ozasa, T. Ishimoto, S. Miyabe et al., *Calcif. Tissue Int.*,

- 104, 449 (2019).
- 4) T. Moriishi, R. Ozasa, T. Nakano et al., *PLoS Genet.*, **16**, e1008586 (2020).
- 5) R. Ozasa, M. Saito, T. Nakano et al., *Bone*, **157**, 116309 (2022).
- 6) T. Ishimoto, R. Ozasa, T. Nakano et al., *Calcif. Tissue Int.*, **110**, 736 (2022).
- 7) R. Ozasa, A. Matsugaki, T. Nakano et al., *Bone*, **155**, 116261 (2022).
- 8) C. Qin, R. D'Souza and J. Q. Feng, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **15**, 126 (2004).
- 9) J. Q. Feng, L. M. Ward, S. Liu et al., *Nat. Genet.*, **38**, 1310 (2006).
- 10) L. C. Gowen, D. N. Petersen, A. L. Mansolf et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 1998 (2003).
- 11) D. I. Boskey, L. Spevak, E. Paschalis et al., *Calcif. Tissue Int.*, **71**, 145 (2002).
- 12) G. Zhang, Y. Ezura, I. Chervoneva et al., *J. Cell. Biochem.*, **98**, 1436 (2006).
- 13) L. Ameye, D. Aria, K. Jepsen et al., *FASEB J.*, **16**, 673 (2002).
- 14) E. M. Rosset and A. D. Bradshaw, *Matrix Biol.*, **52–54**, 78 (2016).
- 15) Q. Q. Hoang, F. Sicheri, A. J. Howard et al., *Nature*, **425**, 977 (2003).
- 16) R. Ozasa, M. Nakatsu, T. Nakano et al., *Mater. Trans.*, **61**, 381, (2020).
- 17) L. Chen, R. Jacquet, E. Lowder et al., *Bone*, **71**, 7 (2015).
- 18) W. J. Landis, *Bone*, **16**, 533 (1995).

筆 者 紹 介



小笹 良輔 (おざさ りょうすけ)

2019年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了、博士(工学)。2019年大阪大学大学院工学研究科助教、2025年同講師。〔専門〕生体材料学、3Dプリンタ金属学、計算科学。
〔連絡先〕〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1 R2-713 大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻
E-mail: ozasa@mat.eng.osaka-u.ac.jp



中野 貴由 (なかの たかよし)

1992年大阪大学大学院工学研究科博士前期課程修了、1996年博士(工学)。1992年大阪大学大学院工学研究科助手、2008年同教授。2023年より日本学術会議第三部会員。〔専門〕結晶塑性学、生体材料学、3Dプリンタ金属学。
〔連絡先〕〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1 R2-711 大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻
E-mail: nakano@mat.eng.osaka-u.ac.jp