

## 187. 結晶成長学的見地からの破骨細胞の骨溶解機構の解明

吉川 洋史

大阪大学 大学院工学研究科 物理学系専攻 吉川研究室

Key words : ハイドロキシアパタイト, コラーゲン, フェムト秒レーザー, 結晶構造, 酸溶解

### 緒言

骨は常に新しく生まれ変わるダイナミックな臓器である。骨は生涯を通じて幾度も造り替えられ、成人の場合は常に全骨格の3~5%が活発にリモデリングされており、約5年で新しい骨に置き換わると考えられている[1]。一方、何らかの理由で骨のリモデリングが破綻すると、骨粗鬆症などの骨が壊れる病気が生じる。日本全体で1,200万人以上（先進国全体では6,000万人以上）の患者が存在するとされている骨粗鬆症は、高齢化が進む我が国の大きな社会問題であり、骨リモデリングのメカニズムの理解が強く求められている。

骨のリモデリングは、破骨細胞が酸や酵素を放出し、“古い”骨を溶かすことから開始される。その後、骨芽細胞は溶かされた領域に新しい骨を形成し、自ら産生した骨基質に埋まって骨細胞へと分化して、骨リモデリングのサイクルが進行する。しかし、そもそも破骨細胞が溶かすべき「古い骨」とはどんな構造なのか、骨リモデリングのファーストステップの詳細が未だ謎に包まれている。そこで本研究では、破骨細胞が溶かすべき骨の組成的・構造的起源を結晶工学的な観点から明らかにする手法論を開拓することを目指した。実は骨基質の主成分であるハイドロキシアパタイト（リン酸カルシウム）は、多様な結晶構造を示す物質であり、溶けやすさ（溶解度）や硬さ（機械的強度）に大きな幅がある。また、骨はこれらリン酸カルシウムとコラーゲンから成る複合組織でもあり、コラーゲンも骨の溶解性などに影響を与える主成分の一つである。よって、“古い”骨の起源を解明するには、これらリン酸カルシウムとコラーゲンの組成・構造を詳細に分析・制御する技術が必要である。

そこで本研究では、本仮説の検証に向けて、破骨細胞が溶かすべき「古い骨」の構造を結晶成長学的見地な観点から解明するための新しい分析・制御アプローチの開拓に取り組んだ。具体的には、酸溶液中での骨の組成や構造をラマン分光や原子間力顕微鏡（AFM）などを用いて系統的に調べるための分析プロトコルを構築した。またこれまで研究代表者の吉川らは、高強度パルスレーザーの物理刺激（熱・応力など）により分子間引力を制御することで、従来法では得られない特異な構造・形状・サイズの結晶を得る手法論の開発に成功してきた[2~4]。本研究ではこの独自のレーザー結晶化制御技術も基盤とし、骨の組成や構造を空間手選択的に制御するための新しいレーザー技術の検証にも取り組んだ。

### 方法

#### 1. 実験試料

本研究では、共同研究パートナーである大阪大学医学系研究科生命機能研究科免疫細胞生物学教室の石井研究室で採取されたマウス由来の頭頂骨および長管骨（大腿骨、脛骨）を使用した。本研究で用いた頭頂骨は、薄く光透過性が高いことから、石井研究室ではマウスが生きた状態での破骨細胞や骨芽細胞のイメージングの対象として用いている[5, 6]。また、海綿骨は長管骨の内腔部分に存在するため、マウスから採取した大腿骨・脛骨をメスで割り、内部を繰り出すようにして海綿骨の採取を行った。すべての動物実験は、大阪大学動物実験委員会のガイドラインに従って実施した。

## 2. ラマン分光・AFMによる骨の組成・構造の分析

ラマン分光分析は、様々な測定試料に対して非接触かつ非破壊で測定を行うことができる組成分析に効果的な手法である。しかし、骨などの蛍光を発する生体物質の測定では、ラマン散乱光の信号が埋もれ、正確な分析の支障となることがしばしば起こる。そのため本研究では、主に蛍光を軽減するために長波長（785 nm）の励起レーザーを用いて測定を行った。本研究では特に、無機結晶成分のピークが強く検出される波数帯（400~1,100  $\text{cm}^{-1}$ ）および有機成分に起因するバンドを多く含む波数帯（1,100~1,800  $\text{cm}^{-1}$ ）について中心に解析を行った。

また本研究では、倒立型光学顕微鏡に搭載可能な AFM（NanoWizard3、JPK）を用いて、骨表面の形状をナノレベルで計測した。カンチレバーは MikroMasch 社の CSC37/NO AL type B を用いて、主にコンタクトモードを用いて表面形状の計測を行った。AFM で取得した表面形状像は専用ソフトウェア（JPK DP、JPK Instruments）を用いて分析した。

## 3. 光学顕微鏡による骨の観察およびレーザー照射

骨試料は、主に倒立型の多光子励起顕微鏡（A1MP+、Nikon）を用いて観察した。本顕微鏡には、モードロックフェムト秒チタンサファイアレーザー（Chameleon Vision II、Coherent；繰返し周波数 70 MHz、最大出力~3 W、パルス時間幅~100 fs）が組み込まれており、多光子励起による蛍光や第二高調波（SHG）により骨試料をイメージングすることができる。また同レーザーは、イメージング時よりも出力を上げることで、骨組織を改変するためにも用いた（波長:840 nm）。レーザーは主に水浸用の 20 倍対物レンズ（NA=0.95、Apochromat LWD Lambda S、Nikon）を用いて集光した。画像取得とレーザー照射は専用ソフトウェア NIS-Elements（Nikon）を用いた。またより高パルスエネルギーのレーザー照射の影響を評価する際には、再生増幅したフェムト秒レーザーシステム（Legend Elite、Coherent；波長 800 nm、繰返し周波数 1 kHz、最大出力~5 W、パルス時間幅~100 fs）を光源として用いた。

## 結果および考察

### 1. ラマン分光・AFMによる骨の組成・構造の分析プロトコルの構築

図 1 と表 1 に本研究で取得した代表的な骨のラマンスペクトルと特徴的な主なピークの帰属を示す。まず本スペクトルで特徴的なのは、骨の基質成分であるハイドロキシアパタイト中  $\text{PO}_4$  由来の  $960 \text{ cm}^{-1}$  付近に見られるピークである。本ピークの鋭敏さは、Hap の結晶性や欠陥などの構造情報を含むことが知られており、一般にピークの半値全幅（FWHM）が小さいほど結晶性が高いことを示している [7]。また主に高波数側では有機物の成分に由来するピーク群が存在する。例えば、 $1,250 \text{ cm}^{-1}$  付近のブロードなピークは、コラーゲン二次構造中の  $\alpha$ -ヘリックス（ $1,236 \text{ cm}^{-1}$ ）およびランダムコイル（ $1,270 \text{ cm}^{-1}$ ）に起因する。また、 $1,446 \text{ cm}^{-1}$  は  $\text{CH}_2$  の変角振動に起因し、一般に有機物量の標示として使用することができる。また後述するが、高波数側には光化学反応による有機物の結合開裂や酸化などを反映するピークも存在する。詳細は公開前であるため割愛するが、本研究では以上の様々なピークの位置、半値幅、面積比などの定量指標化するプロトコルを構築し（特に重要なピークを表 1 中の赤点線で表示）、現在も骨の種類や場所、マウスの月齢・疾病などに対して骨の組成・構造がどのように変化するかを系統的に調べている。

また本研究では、酸性溶液への暴露に対する骨の構造変化を AFM によりナノメートルスケールで評価する分析プロトコルを構築することにも成功した。具体的には、骨の表面を AFM 計測することで、ナノメートルスケールの繊維構造を検出することができることを見出した（data not shown）。また興味深いことに、本骨試料を酸性溶液に浸漬したところ、より細く、均一な太さの繊維状構造が明確に検出された。ここで骨の主要な構造は、コラーゲン繊維の周りにハイドロキシアパタイトのナノ結晶が付着した複合体であることが知られている。よって我々の AFM 計測で見出された骨の構造変化は、ハイドロキシアパタイトのナノ結晶が酸性溶液中で溶解

し、残されたコラーゲン繊維が露出したことが要因だと考えられる。本研究では、この酸性溶液中のナノメートルスケールの骨の構造変化に着目し、後述するレーザー照射が骨に与える影響を評価するためにも用いた。

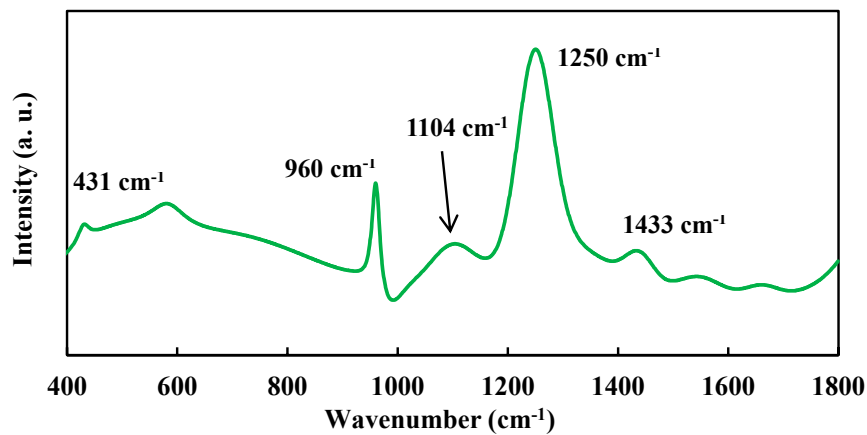


図 1. 本研究で得られた代表的な骨のラマンスペクトル  
 アパタイトなどの無機成分やタンパク質などの有機成分由来のピークが検出されている  
 (詳細は表 1 参照)。

表 1. 代表的なラマンピークの帰属のまとめ

Vibrational mode	Peak position (cm <sup>-1</sup> )
v <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	410-460
v <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	604
v <sub>1</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	960
Phenylalanine	1003
Proteoglycan	1060
v <sub>1</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	1050-1100
Amide III	1215-1300
CH <sub>2</sub>	1446
Amide I	1620-1700

図 1 で得られたラマンスペクトルピークで帰属したものをまとめている。その中でも特に本研究にて骨の構造・組成評価で重要視したものを赤点線でマークした。

## 2. レーザー照射が骨の組成・構造に与える影響の評価

本項ではフェムト秒レーザー照射が骨の組成・構造制御に与える影響を調べた結果について述べる。フェムト秒レーザーは、多光子励起により生体内深部からの光学シグナルを取得することが可能であり、共同研究パートナーである大阪大学石井研究室では、生体骨中での骨芽細胞や破骨細胞のライブイメージングの光源として広く用いている。一方、フェムト秒レーザーは、ヒトの角膜矯正手術 (LASIK) にも用いられているように、生体組織の精密な 3 次元加工特性も有している。研究代表者らはこのフェムト秒レーザーの加工特性を駆使して、結晶化を時空間制御する技術群の開発にも成功してきた [2~4]。この背景から筆者らは、フェムト秒レーザーの

分析・加工特性を活用することで、生体骨の組成・構造制御とライブイメージングが同時に行えるユニークな実験システムを構築できるのではないかと考えに至った。そこで本項では、その第一歩として、様々な条件でフェムト秒レーザーを照射した骨の組成・構造の分析や、酸溶解性挙動を調べた。

まず我々は高パルスエネルギーのフェムト秒レーザー骨表面に集光照射したところ、照射領域に黒いコントラストの領域が形成した (data not shown)。これはレーザーアブレーションにより骨表面が損傷し、エッチングされたことを示している。ここで興味深いことに、このレーザー照射した骨を酸性溶液に浸漬したところ、レーザー照射領域の黒いコントラストがより明確になった。このようなコントラストの変化を光学顕微計測により詳細に調べたところ、骨表面のエッチングが進行・拡大したことが明らかとなった。つまり本結果は、レーザー照射により骨の酸溶解性が増加したことを示している。またこのような骨の溶解性の促進現象は、骨表面のエッチングが生じないようなより低エネルギーのフェムト秒レーザーパルス照射でも起こることがわかった。

そこでこのような骨の溶解性促進現象をより詳細に調べるために、レーザー照射した領域を AFM、SHG イメージング、およびラマン分光を用いて分析した (data not shown)。まず AFM では、レーザー照射とレーザー未照射領域の界面において、繊維状の構造が明瞭に切断されていることがわかった。また通常の骨において検出されるコラーゲン由来の SHG シグナルが、レーザー照射領域では大きく減少していることがわかった。以上の結果は、骨の主成分の一つであるコラーゲンが、レーザー照射により損傷したことを示唆している。そこでラマン分光によりコラーゲンなどの有機物由来のピークを重点的に調べたところ、レーザー照射領域において有機物の光反応生成物 ( $1,601\text{ cm}^{-1}$ ) のシグナルが増大することがわかった。この  $1,601\text{ cm}^{-1}$  のシグナルは、タンパク質を構成するチロシンとフェニルアラニンの環振動に由来し、コラーゲン中のアミノ酸残基 (特にチロシン、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン) が光酸化されたときに生成する光生成物によるものと考えられる。また他にもコラーゲンの加水分解を示唆するシグナルの上昇も認められた。これらの結果は、レーザー照射によりコラーゲンが酸化や結合切断したことを示している。

以上の結果から、フェムト秒レーザーを用いることでコラーゲンに空間選択的に損傷を与えることが可能であり、酸に対する骨の溶解性を高めることができることが明らかとなった。本レーザー損傷手法をライブイメージングと組み合わせることで、酸溶解性の異なる領域を破骨細胞がどのように認識するのかを調べることが可能になる。現在この考えに基づき、さらなる技術開発とイメージング研究を進めており、今後その成果を紹介することができれば幸いである。

## 共同研究者・謝辞

本研究は、大阪大学大学院医学系研究科生命機能研究科免疫細胞生物学教室石井研究室の石井優教授、菊田順一准教授 (現神戸大学教授)、山下英里華研究員、大阪大学大学院工学研究科の森勇介教授、丸山美帆子教授、松崎賢寿助教、小西杏奈様 (当時博士前期課程学生) などの共同研究者のご協力のもと推進した。この場を借りて深く御礼申し上げる。

## 文 献

- 1) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明, 田中栄, 中村浩彰, 森諭史, 高橋直之, 網塚憲生, 遠藤直人, 竹澤保政, “新 骨の科学 第2版”, 医歯薬出版株式会社, 東京 (2016).
- 2) Tominaga Y, Maruyama M, Yoshimura M, Koizumi H, Tachibana M, Sugiyama S, Adachi H, Tsukamoto K, Matsumura H, Takano K, Murakami S, Inoue T, Yoshikawa HY, Mori Y. Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation. Nature Photonics. 2016 Oct 24;10:723-726. PMID: DOI: 10.1038/nphoton.2016.202

- 3) Yoshikawa HY, Murai R, Adachi H, Sugiyama S, Maruyama M, Takahashi Y, Takano K, Matsumura H, Inoue T, Murakami S, Masuhara H, Mori Y. Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding. *Chemical Society Reviews*. 2014 Apr 7;43(7):2147-58. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24252936 DOI: 10.1039/c3cs60226e
- 4) Suzuki D, Nakabayashi S, Yoshikawa HY. Control of Organic Crystal Shape by Femtosecond Laser Ablation. *Crystal Growth & Design*. 2018 Sep;18(9): 4829-4833. Epub 2018 Aug 6. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00697>
- 5) Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada G, Nishiyama I, Mizukami S, Maiya N, Yasuda H, Kumanogoh A, Kikuchi K, Germain RN, Ishii M. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *Journal of Clinical Investigation*. 2013 Feb;123(2):866-73. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23321670 DOI: 10.1172/JCI65054
- 6) Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada G, Nishiyama I, Mizukami S, Maiya N, Yasuda H, Kumanogoh A, Kikuchi K, Germain RN, Ishii M. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *Journal of Clinical Investigation*. 2013 Feb;123(2):866-73. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23321670 DOI: 10.1172/JCI65054
- 7) Taylor EA, Donnelly E, Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties. *Bone*. 2020 Oct;139:115490. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32569874 DOI: 10.1016/j.bone.2020.115490