

骨細胞メカノセンサーネットワークの形態的特徴を考慮した 骨梁リモデリングシミュレーション

安達 泰治^{*}, 佐藤 成道, 田中 基嗣[†], 北條 正樹[#]

京都大学大学院 工学研究科 機械理工学専攻
京都市左京区吉田本町

^{*} e-mail: adachi@me.kyoto-u.ac.jp

[†] mototsugu@mech.kyoto-u.ac.jp

[#] hojo_cm@mech.kyoto-u.ac.jp

Abstract: As the mechanosensor cells, osteocytes are embedded in bone matrix, making a three-dimentional network system, and are considered to play important roles in the regulatory mechanism of adaptive bone remodeling. They are connected each other via cell processes in the canaliculi, and are believed to sense the mechanical stimulus due to the interstitial fluid flow in the lacuno-canalicular system. This study aimed to clarify the relationship between morphological characteristics of the lacuno-canalicular system and the mechanical condition at the cellular process level in the trabecular remodeling. First, three-dimensional structure of the lacuno-canalicular system in trabeculae was fluorescently visualized and observed using a confocal laser scanning microscope. Relationship between the canalicular orientation determined by fitting the fabric ellipse and the normal vector field derived from the distance from trabecular surface were quantitatively evaluated. As a result, it was found that the canalicular orientation was approximately coincided with the direction of normal vector field that corresponded to the vertical direction to the trabecular surface. Second, a rate equation of trabecular remodeling was proposed considering the morphological characteristics of the osocyte network system. Remodeling simulation conducted for a single trabecula under uniaxial compressive loading revealed that the anisotropy of the system was one of the important factors that affects the trabecular remodeling.

1. 緒 言

骨基質中に存在する骨細胞は、力学刺激の感知センサーとして働き、その情報を周囲の細胞に伝達することで、リモデリング活動を調整していると考えられている。骨基質内部に三次元的に分布する骨細胞は、骨細管を通して細胞突起を互いに結合し、複雑なネットワーク構造を形成している⁽¹⁾。骨のリモデリングによる機能的適応の過程において、この骨細胞は、基質に負荷される力学刺激を感じし、その情報を細胞間ネットワークを介して相互に伝達することで、骨形成・骨吸収活動の調整に寄与していると考えられている⁽²⁾。骨細胞は、このようなメカノセンサーとしての機能を発揮する際、骨に生じる応力やひずみの勾配により生じた骨細管-骨小腔系内の間質液の流れを感じしているという考え方が提案されている^(3, 4)。

著者ら⁽⁵⁾は、骨基質に荷重が作用した際に生じる骨細管内の間質液の流れ、骨細胞によるせん断応力の感知、刺激情報の周囲への伝達等から、破骨細胞・骨芽細胞による骨吸収・形成に至る一連の過程を表現する骨梁リモデリングの数理モデルを提案した。また、骨細胞が骨基質内において骨細管中に伸びる細胞突起の配向が異方性を有することから、骨基質の変形に伴う間質液の流れは、骨細管の配向性や形状に強く依存する可能性を指摘した⁽⁶⁾。

本研究では、骨細胞が形成する細胞間ネットワークに関連したメカノトランスダクション過程に着目し、骨小腔一骨細管系の構造と細胞レベルでの力学状態との関連性を明らかにすることを目的とした。まず、実際の海綿骨の骨梁内部における骨小腔一骨細管ネットワーク構造の観察を行い、その形態的特徴について検討する。次に、これまで構築した数理モデル⁽⁵⁻⁸⁾において、特に骨細管の配向性に着目し、単純な骨梁モデルを対象としたリモデリングシミュレーションにより、骨細管一骨小腔系構造形態の配向性が骨リモデリング現象にもたらす影響について考察する。

2. 骨細胞ネットワークの観察手法

2.1 骨細管・骨小腔の蛍光観察

試料として、豚（生後 8 カ月）の脛骨近位部より、Fig.1 に示す $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ の角柱状の骨組織片を切り出した。まず、骨髓を除去し、70%エタノールに 2 日間浸漬し、さらに、暗所にて $50 \mu\text{M}$ の RH414（膜電位感受性色素）に 4 日間浸漬した。その後、角柱状骨組織片の表面に位置する骨梁の中から、脛骨長軸方向（荷重方向：Fig.1 の矢印方向）から見て、円形となる骨梁断面($r-\theta$ 断面)，および、それに垂直な骨梁断面($z-r$ 断面)の 2 箇所を任意に選び出した。蛍光観察には共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡（Zeiss, LSM-510）を用い、骨細管および骨小腔の蛍光画像を 8 bit の輝度データとして PC に記録した。

2.2 蛍光観察画像から骨小腔・骨細管形状の抽出手法

前節の手順により得られる蛍光観察画像は、骨細管内部と骨小腔内部が共に高い輝度を持つ。骨小腔の直径は、数 $10 \mu\text{m}$ 程度であるのに対して、骨細管の直径は、数 100 nm 程度と小さい。そこで、本研究では、Fig.2 に示す以下の手法により、蛍光観察画像の輝度データから、骨細管および骨小腔それぞれの 3 次元形状を抽出する。

まず、骨梁断面の蛍光観察画像から得られた任意の座標 x における輝度値を $L(x)$ とし、閾値 L_t を用いて、 $L(x) > L_t$ で定義される閉領域 D_1 を求める。このとき、 D_1 には、骨小腔部と骨細管の両方が含まれている (Fig.2(a))。次に、細胞突起の半径よりも大きな値 $\delta (>0)$ を用いて、 D_1 表面から距離 δ だけ内側の領域 D_2 を導出する (Fig.2(b))。さらに、 D_2 から距離 δ 外側の領域 D_3 を導出する (Fig.2(c))。これら一連の作業により導出された領域 D_3 は、骨細管のような細い突出部を含まない領域として定義される。本研究では、この領域 D_3 を骨小腔部と定義し、領域 D_1 が領域 D_3 により切り取られる領域 D_4 を骨細管部とする (Fig.2(d))。なお、領域 D_2 、領域 D_3 を導出する際、境界面の形態を厚み δ 分変化させる手法として、Level Set 法⁽⁹⁾を用いる。

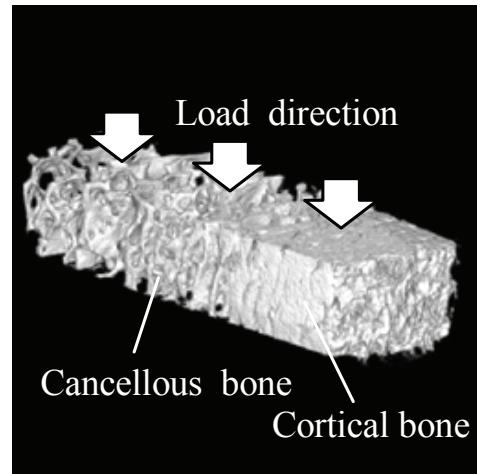


Fig. 1: Cancellous bone specimen excised from swine proximal tibia

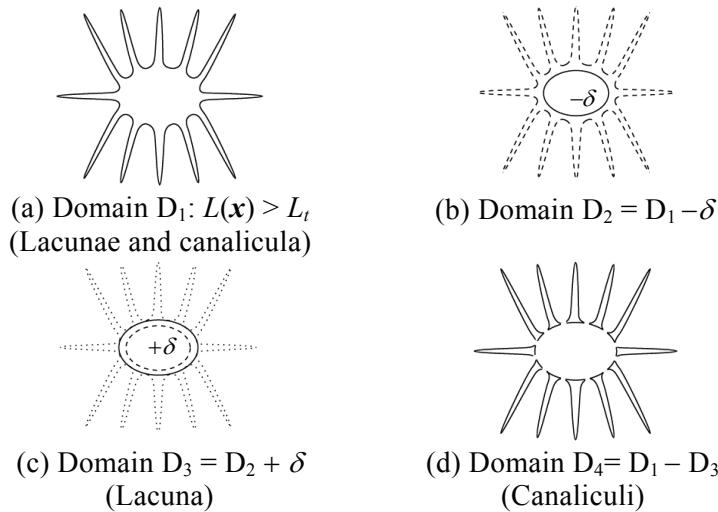


Fig.2: Extraction of lacunae and canaliculi from fluorescent image

2.3 法線ベクトル場 $n(x)$

本研究では、骨細管の配向性と骨梁の形態的特徴とを関連付けるための指標として、法線ベクトル場 $n(x)$ を用いる。まず、対象領域内の任意の点 x から骨梁表面までの最短距離を $d_0(x)$ としたとき、符号付距離関数 $d(x)$ を

$$d(x) = \begin{cases} -d_0(x) & (\text{骨梁内部}) \\ 0 & (\text{骨梁表面}) \\ d_0(x) & (\text{骨梁外部}) \end{cases} \quad (1)$$

のように定義する。さらに、 $d(x)$ の単位勾配ベクトル

$$\mathbf{n}(x) = \frac{\nabla d(x)}{|\nabla d(x)|} \quad (2)$$

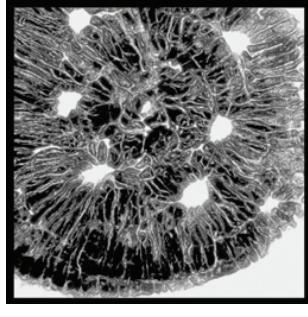
により、法線ベクトル場 $n(x)$ を定義する。このようにして定義された $n(x)$ は、骨梁表面からの符号付距離関数 $d(x)$ の等値面に対して、常に垂直な単位ベクトルとなる。

3. 骨細胞ネットワークの観察結果と考察

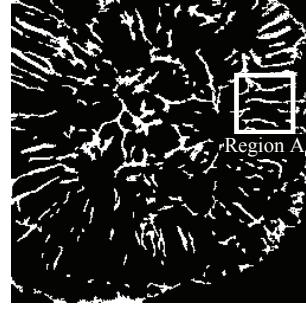
骨梁の蛍光観察画像の輝度値から、骨梁内の骨細管—骨小腔ネットワークの3次元イメージベーストモデルを構築した。その r - θ 断面、および z - r 断面を Fig.3(a),(b) に示す。なお、Fig.3(a)における右上隅部、右下隅部、左下隅部、ならびに Fig.3(b) における右上隅部において高い輝度値を持つ領域が見られるが、これらの領域は、骨梁の外部である。Fig.3 に示すように、骨梁の r - θ 断面では、骨細管は、骨梁中心から放射状に伸展しており、また、 z - r 断面では、骨梁表面に対して、垂直な方向に平行に並んでいる様子が観察された。

次に、第 2.2 節の手順により抽出された骨細管形状および第 2.3 節において定義した法線ベクトル場 $n(x)$ を Fig.4、および Fig.5 にそれぞれ示す。また、Fig.4 の各断面において、骨梁表面から約 $40 \mu\text{m}$ 内側の点を任意に選び、それぞれ $\mathbf{x}_{r-\theta}$, \mathbf{x}_{z-r} とし、それらの点を中心とする $15.5 \mu\text{m} \times 15.5 \mu\text{m}$ の正方形領域をそれぞれ Region A, Region B とする。さらに、 $\mathbf{x}_{r-\theta}$, \mathbf{x}_{z-r} の各点における法線ベクトル $\mathbf{n}(\mathbf{x}_{r-\theta})$, $\mathbf{n}(\mathbf{x}_{z-r})$, お

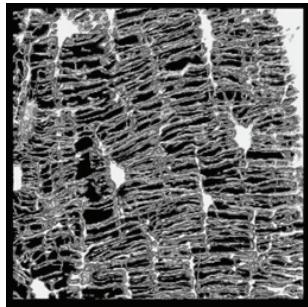
より、各領域内の骨細管をファブリック楕円体を用いて近似的に表現したものを Fig.6 に示す。Fig.4 と Fig.5 を比較すると、 r - θ および z - r の両断面で、骨細管の配向方向と法線ベクトル $\mathbf{n}(\mathbf{x})$ がほぼ一致していることがわかる。さらに、Fig.6において、法線ベクトル $\mathbf{n}(\mathbf{x})$ とファブリック楕円体の長軸とのなす角を θ_{NF} としたとき、Fig.6(a),(b)における θ_{NF} は、それぞれ、1.51, 4.83 deg と小さな値を示した。ファブリック楕円の長軸方向は、骨細管の配向方向を示すことから、骨細管の配向方向は、法線ベクトル $\mathbf{n}(\mathbf{x})$ に一致する傾向があると考えられる。



(a) r - θ section

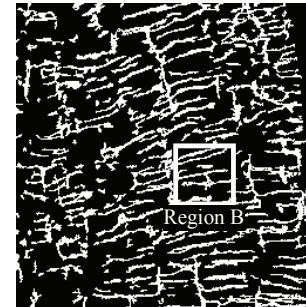


(a) r - θ section



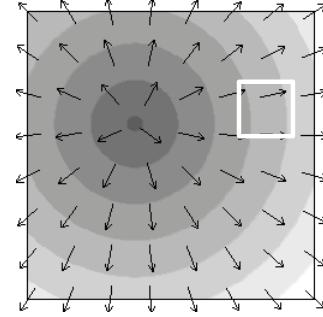
(b) z - r section

Fig. 3: 3D reconstruction of lacuno-canalicular system in trabeculae

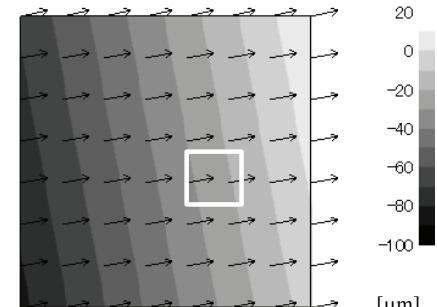


(b) z - r section

Fig. 4: Extraction of canaliculi morphology from fluorescent image

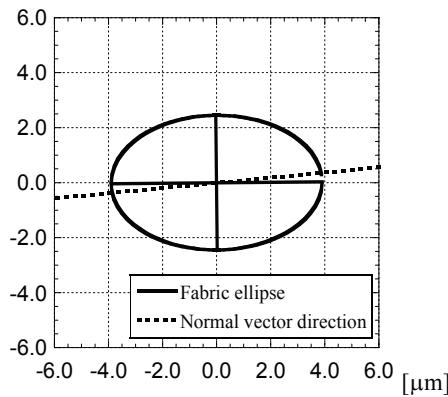


(a) r - θ section

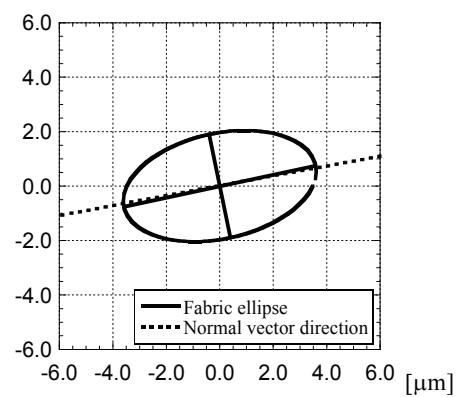


(b) z - r section

Fig. 5: Normal vector field $\mathbf{n}(\mathbf{r})$ and the signed distance function $d(\mathbf{r})$



(a) Region A



(b) Region B

Fig. 6: Normal vector and fabric ellipse of canaliculi

4. メカノセンサネットワークの数理モデル

4.1 骨細胞ネットワークを考慮した骨形成・骨吸収則

骨細胞間ネットワークによるメカノセンシングを考慮した骨リモデリングメカニズムの一つとして、前報⁽¹⁰⁾において提案したモデルの概略は、次の通りである。

まず、骨に力学的負荷が作用すると、骨基質に変形が生じ、骨細管および骨小腔の内部を満たす間質液に圧力勾配が生じる。これにより、骨細管内で間質液が流れ、骨細胞の突起表面にせん断応力が作用する。骨細胞は、これを力学刺激として感知し、その情報を、細胞間ネットワークを介して骨表面の骨形成・骨吸収の役割を担う骨芽細胞や破骨細胞へと伝達する。

前報⁽¹⁰⁾では、均質化された骨組織にマクロスケールに与えられた力学的境界条件から、ミクロスケールにおいて間質液流れにより細胞突起上に作用するせん断応力を求め、さらに再びマクロスケールに戻って骨細胞による刺激感知・情報伝達から骨梁表面移動を考える骨リモデリング現象の数理モデルの枠組みを構築した。本報では、この数理モデルに対して、骨細管の配向を考慮し、その特性を抽出するため、数理モデルを単純化した。

4.2 数理モデルの単純化

まず、骨細胞が感知する力学刺激量を定義する。骨梁内の任意の点 x_b において、単位体積中に N 本細胞突起が存在するとき、 i 番目の細胞突起の伸長方向単位ベクトル \mathbf{n}_{pi} に対して、骨細胞が感知する力学刺激 S_{oc} を定義した。

$$S_{oc}(x_b) = \sum_N |\nabla P \cdot \mathbf{n}_{pi}| \quad (3)$$

この力学刺激を細胞間ネットワークを介して骨表面に存在する細胞に伝達する際、細胞間のコミュニケーション能力はその伝達距離に応じて低下するものとする。ここで、骨梁表面の任意の点 x_c までの情報伝達距離を $l = |x_c - x_b|$ とし、情報伝達可能な領域 Ω の領域半径を l_L としたとき、 $l < l_L$ であれば $w(l) = 3(1 - l/l_L)/\pi l_L^3$ 、また $l \geq l_L$ であれば $w(l) = 0$ となる単調減少の重み関数 $w(l)$ を用いて、点 x_c における力学情報量 S_{sf} を

$$S_{sf}(x_c) = \int_{\Omega} w(l) S_{oc}(x_b) d\Omega \quad (4)$$

のように定義する。本来、骨細管の形態異方性を考慮すれば、細胞間ネットワークの情報伝達能力も異方性を有すると考えられるが、本稿では、骨細胞は等方的に情報を伝達するものと仮定した。

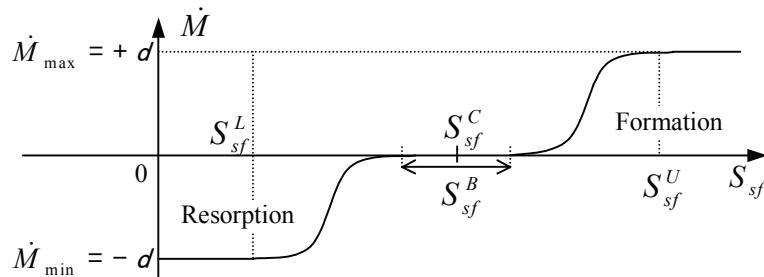


Fig.7: Relationship between mechanical signal S_{sf} and trabecular surface remodeling rate M

以上のように決定された力学刺激量 $S_{sf}(x_c)$ をリモデリングの駆動力とし、この値が大きければ骨形成、小さければ骨吸収が行われるものとし、骨梁表面移動速度 $\dot{M}(x_c)$ と力学刺激量 $S_{sf}(x_c)$ との関係をFig.7に示すような正弦曲線で関連付けた。

5. 骨リモデリングシミュレーション

5.1 シミュレーションモデル

本報では、骨細胞の力学刺激感知機構と考えられている、細胞突起（骨細管）の異方性に着目し、等方的に骨細管が分布しているモデル（Case A）と異方的に分布しているモデル（Case B）の比較を行った。シミュレーションモデルは、Fig.8に示す単純な二次元骨梁モデルを採用した。

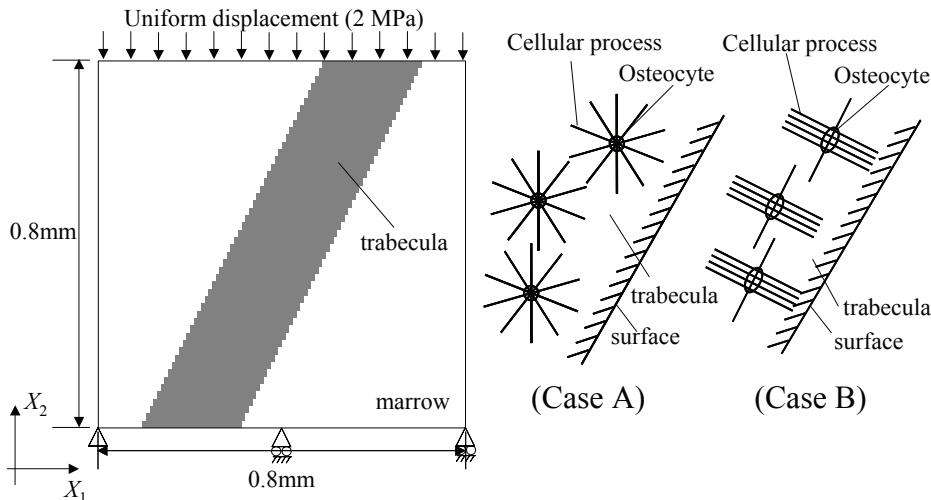


Fig.8: Single trabecular model, boundary condition, and cellular process morphology

解析領域は $0.8 \text{ mm} \times 0.8 \text{ mm}$ の長方形空間とし、この空間を一辺 $8 \mu\text{m}$ の立方体 Voxel 要素で 100×100 に規則的に分割した。また直径 $160 \mu\text{m}$ の骨梁を荷重軸に対して斜めに配置し、空隙部は骨髄で満たされているものとした。骨梁要素、および骨髄要素は等方線形弾性体と仮定し、材料定数は、それぞれ、 $E_b = 20 \text{ GPa}$, $\nu_b = 0.3$, $E_m = 20 \text{ MPa}$, $\nu_m = 0.49$ とした。また、Case Aでは、単位Voxelあたり10本の骨細管が等方的に分布しているものとし、Case Bでは、10本中2本が骨梁表面に平行に、残りの8本は骨梁とは垂直な方向に分布していると仮定した。また、骨形成・骨吸収の役割を担う細胞が周囲の力学状態を感知する領域半径 l_t は、 $240 \mu\text{m}$ とした。境界条件として、下面の面外方向変位を拘束し、上面には 2 MPa の圧縮に相当する一様な変位を与えた。また、骨梁の形態変化を表現する手法として、Level Set法⁹⁾を導入した。

5.2 シミュレーション結果および考察

リモデリングシミュレーションの結果得られた骨梁形態と圧力分布、圧力勾配方向の時間変化をFig.9に、見かけの剛性ならびに体積分率の時間変化をFig.10に示す。Case A, Case Bいずれの場合においても、リモデリング初期段階において、骨梁の鋭角部付近の圧力が局所的に高くなり、また曲げの影響を受けて、鈍角部付近の圧力が局所的に低くなるため、この付近の圧力勾配が大きくなり、骨形成が優勢となっ

た結果、骨梁全体的に太さを増した(10th step). その後、 X_1 方向中央部の骨梁が荷重支持の役割を担い、圧力が高くなる一方で、前述の鈍角部付近の圧力は低下し、それに伴い圧力勾配も低下したため、骨吸収が優勢となった(20th step). その結果、骨梁は最終的に荷重方向に配向した形態へと変化した.

Fig.10に示すように、最終的な骨梁形態は、初期形態に比べ、骨梁の体積分率はほとんど変化していないか、あるいは減少しているのに対して、見かけの剛性は向上している。これは、骨梁形態の配向方向の変化により、荷重支持機能が向上されたことを表しており、本研究で提案した骨リモデリングシミュレーション手法は、実際に観察される骨の機能的適応現象を良く表現しているものと考えられる。また、Fig.10に示すように、一連のリモデリング活動を通して、骨梁内の大部分で圧力勾配ベクトルは骨梁の配向方向に対して垂直な成分が大きい。その結果、Case A に比べ、Case B のほうが、骨細胞は力学刺激をより多く感知しており、見かけの剛性や骨梁の体積分率においても、高い値を示している。これにより、骨細管の配向は、骨のリモデリング活動に大きく影響を与えるパラメータの一つであると示唆される。

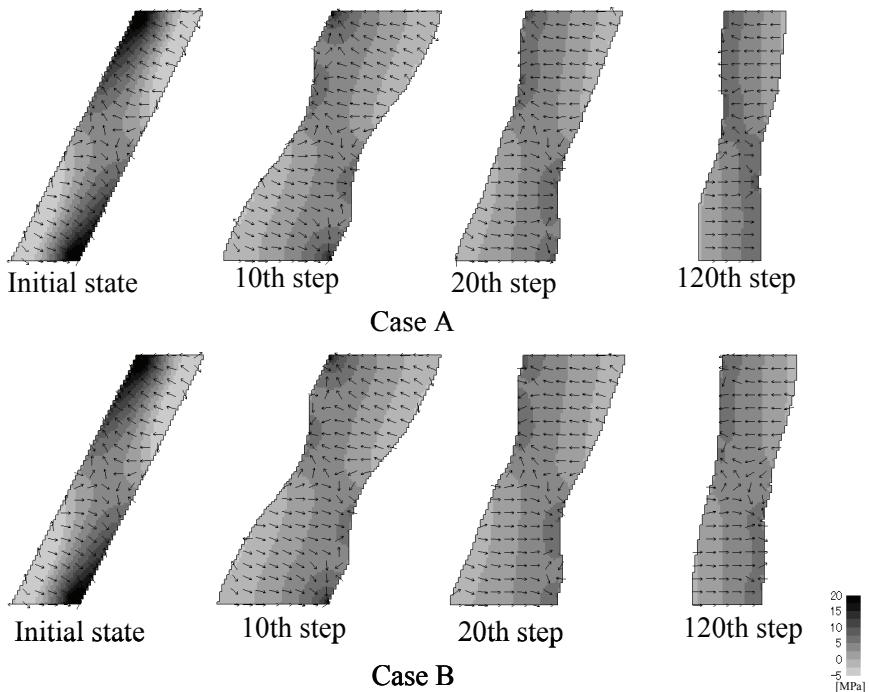


Fig. 9: Change in morphology, pressure and its gradient vector

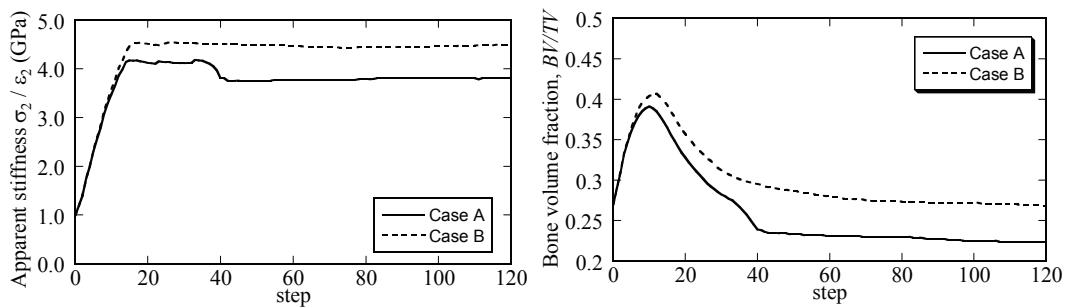


Fig. 10: Apparent stiffness and bone volume fraction

6. 結 言

本研究では、骨小腔一骨細管系の構造と細胞レベルでの力学状態との関連性を明らかにすることを目的とした。まず、骨梁内の骨小腔・骨細管ネットワークの蛍光観察を行い、その形態的特徴について検討した。その結果、骨細胞間のネットワークは、骨梁表面に対して、垂直に形成されている様子が観察された。また、骨細管の形態をファブリック柱円体を用いて定量的に評価した結果、ファブリック柱円体の主軸と骨梁表面に対する法線ベクトル報告がほぼ一致していたことから、骨細管の配向方向は、骨梁表面の法線方向に一致する傾向があることが示された。次に、骨細胞間のメカノセンサーネットワークの配向に着目し、ネットワークの形態的特長を考慮した骨梁リモデリングの数理モデル化を行った。さらに、単純な二次元モデルを用いた骨梁リモデリングシミュレーションを通じて、骨細管の配向が、骨リモデリング現象に与える影響について考察した。その結果、骨細管を異方的に配置した骨梁モデルは、等方的なモデルに比べて、骨細胞が力学刺激をより多く感知しており、骨細胞ネットワークの異方性が、骨のリモデリング活動に大きく影響を与える因子の一つであると示唆された。

参考文献

- (1) Sugawara, Y., Kamioka, H., Honjo, T., Tezuka, K., and Takano-Yamamoto, T., Three-dimensional reconstruction of chick calvarial osteocytes and their cell processes using confocal microscopy, *Bone*, **36**, (2005), 877–883.
- (2) Knothe Tate, M. L., Adamson, J. R., Tami, A. E., and Bauer, T. W., The osteocyte, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **36-1**, (2004), 1-8.
- (3) Parfitt, A. M., The Cellular basis of bone turnover and bone loss: A rebuttal of the osteocytic resorption: Bone flow theory, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **127**, (1977), 236-247.
- (4) Cowin, S. C., Moss-Salentijn, L., and Moss, M. L., Candidates for the mechanosensory system in bone, *Journal of Biomechanical Engineering*, **113-2**, (1991), 191-197.
- (5) 尾迫佑樹, 安達泰治, 田中基嗣, 北條正樹, 骨細胞によるメカノセンシングを考慮したリモデリングシミュレーション, 日本機械学会第 17 回バイオエンジニアリング講演会, 講演論文集, **04-48**, (2005), 387-388.
- (6) 佐藤成道, 安達泰治, 田中基嗣, 北條正樹, 骨細胞ネットワークの形態的特徴を考慮した骨梁リモデリング, 日本機械学会 2005 年度年次大会, **05-1-6**, (2005), 13-14.
- (7) Adachi, T., Tsubota, K., Tomita, Y., and Hollister, S. J., Trabecular surface remodeling simulation for cancellous bone using microstructural voxel finite element models, *Journal of Biomechanical Engineering*, **123-5**, (2001), 403-409.
- (8) Tsubota, K., Adachi, T., and Tomita, Y., Functional adaptation of cancellous bone in human proximal femur predicted by trabecular surface remodeling simulation toward uniform stress state, *Journal of Biomechanics*, **35-12**, (2002), 1541-1551.
- (9) Osher, S. and Sethian, J. A., “Fronts Propagating with Curvature- Dependent Speed: Algorithms Based on Hamilton-Jacobi Formulation”, *Journal of Computational Physics*, **79**, (1988), 12-49.
- (10) 安達泰治, 尾迫佑樹, 田中基嗣, 北條正樹, 骨細胞によるメカノセンシングを考慮した骨梁リモデリングの数理モデルとシミュレーション, 理研シンポジウム, 「生体力学シミュレーション研究」, (2005), 69-80.