

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19390490
 研究課題名 (和文) 結晶配向調節により成長因子群の吸着を再構成し得る生体活性 OCP 骨再生材料の開発
 研究課題名 (英文) Analysis of proteins accumulated onto octacalcium phosphate and the related calcium phosphate crystals
 研究代表者
 鈴木 治 (OSAMU SUZUKI)
 東北大学・大学院歯学研究科・教授
 研究者番号：60374948

研究成果の概要 (和文)：

合成のリン酸オクタカルシウム (OCP) は、骨の欠損部で骨再生を促進し、また、骨再生に先だって血清由来タンパク質を吸着する。本研究ではプロテオミクス的手法により、*in vitro* においてラット血清から OCP 結晶に吸着するタンパク質の種類を LC-MS/MS で分析した。細胞成分と細胞外成分の 100 種類を超えるタンパク質が同定され、Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships 分類法により、細胞外成分に関し分子機能、生物学的プロセス、細胞内構成要素の 3 つに分類できた。

研究成果の概要 (英文)：

Synthetic octacalcium phosphate (OCP) enhances bone formation and accumulates circulating serum proteins on its surface if implanted in bone defect. The rat serum proteins accumulated on OCP *in vitro* preparation were analyzed by proteomic approaches using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Over 100 proteins were detected from OCP surface as cellular and extracellular components. The extracellular components were categorized into molecular function, biological process and intracellular elements based on Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships classification system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学，歯科材料・歯科理工学

キーワード：生体材料，リン酸オクタカルシウム(OCP)，骨再生，結晶配向，成長因子

1. 研究開始当初の背景

リン酸オクタカルシウム (octacalcium

phosphate, OCP) は、骨や歯のヒドロキシアパタイト (HA) の前駆体と位置付けられ

る物質であり、これまでの本研究グループによる研究から、その合成物に高い骨再生能、生体内吸収性が認められることが分かっていた (Suzuki O et al., Tohoku J Exp Med 164:37-50, 1991 他). 一方、生体内に埋入された OCP には α HS 糖タンパク質などの血清由来タンパク質が吸着し、骨再生促進に関係する可能性が示唆されていた (Suzuki O et al., Bone Miner 20:151-66, 1993). しかしながら、これらタンパク質がどのような種類であるかその詳細は不明であった.

2. 研究の目的

OCP が骨再生を促進するメカニズムのひとつとして OCP に吸着してくるタンパク質の寄与が挙げられる. そこで結晶に吸着するタンパク質の種類を同定し、その上で、骨再生材として臨床応用されているリン酸カルシウムバイオセラミックスと比較し、吸着タンパク質の骨再生における機能を推定することを目的とした.

3. 研究の方法

(1) 材料

①OCP

OCP は既報 (Suzuki O et al., Tohoku J Exp Med 1991) に基づき湿式法にて合成した.

②結晶成長調節 OCP

OCP の湿式合成条件を改変し、結晶成長を調節してサイズの異なる OCP 結晶を得た.

③HA セラミックス

HA は市販の医療用骨補填用セラミックス (焼結顆粒) を用いた.

④キャラクタリゼーション

OCP のキャラクタリゼーションを、X 線回折法およびフーリエ変換赤外分光法 (FTIR 法) にて行った. また、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて結晶の形態およびサイズを観察した.

(2) 吸着媒

OCP と HA を 32-48 メッシュのふるいにて整粒した顆粒を吸着媒とした.

(3) 吸着質

12 週齢 Wistar 系雄性ラット由来血清を吸着質とした.

(4) 吸着

比表面積 (OCP: $16\text{m}^2/\text{g}$, 結晶成長調節 OCP: $4\text{m}^2/\text{g}$, および HA: $2.5\text{m}^2/\text{g}$) から見積もって表面積が一定となるように評量した吸着媒を血清に 37°C の条件下で浸漬することでタンパク質を吸着させた.

(5) タンパク質の抽出

Fisher らの方法 (Fisher LW et al., Methods Enzymol 1987) にてグアニジン-塩酸-EDTA で遊離してくるミネラル結合性タンパク質を抽出し、脱塩後にアルブミン等の血清主要タンパク質を減少させ、さらにトリプシン処理した.

(6) 質量分析、タンパク質の同定およびデータベースに基づく同定タンパク質の分類

Applied Biosystems 社製 LC/MS/MS システム (4000 Q TRAP) を用いて分析した後、IPI Database を用いてタンパク質を同定した. また、Gene Ontology を用いて細胞成分の分類、さらに Protein ANalysis Through Evolutionary Relationships 分類法を用いて、分子機能、生物プロセスについて分類を行った.

(7) OCP の骨再生能の検討

9-10 週齢 ICR マウスの頭蓋冠に 4.2mm ϕ の臨界骨欠損を作成し、OCP および結晶成長調節 OCP の顆粒 ($300\text{-}500\ \mu\text{m}$ ϕ) を埋入し、経時的な骨再生能を組織形態計測学的に調べた.

4. 研究成果

(1) OCP および結晶成長調節 OCP のキャラクタリゼーション

OCP および結晶成長調節 OCP とともに OCP に帰属される X 線回折像および FTIR パターンが得られた. 一方、SEM 観察によると長軸方向の長さが異なり、OCP は $4.0\ \mu\text{m}$, 結晶成長調節 OCP は $26.6\ \mu\text{m}$ であった.

(2) OCP および結晶成長調節 OCP の骨再生能

骨欠損部の OCP 顆粒埋入による骨再生は、OCP では約 30% であるのに対し、結晶成長調節 OCP では 5% を下回った.

(3) 吸着タンパク質

OCP, 結晶成長調節 OCP および HA のいずれの吸着媒においても 100 種類程度のタンパク質が同定された. 過去の研究で組織化学的に検出されていた α HS 糖タンパク質 (Suzuki O et al., Bone Miner 20:151-66, 1993) など、いずれの結晶においても共通に見出されるタンパク質が多く存在した.

(4) OCP および HA に吸着したタンパク質の分類

吸着タンパク質の細胞内構成要素による分類では、OCP および HA 共に細胞成分が 40% 弱を占める最多成分であった.

細胞外吸着成分に限定した分子機能によ

る分類では、OCP および HA とともに免疫関連タンパク質が 20%弱を占める最多成分であった。また、同様成分の生物学的プロセスによる分類では、やはり免疫関連タンパク質が 30%弱を占める最多成分であった。

結論として、ラット血清から OCP, 結晶成長調節 OCP, HA 間において細胞成分を含めると 100 種類前後のタンパク質が同定された。骨形成能の異なる OCP および結晶成長調節 OCP においても共通タンパク質に加え、非共通タンパク質が見出されたことから、本研究の成果に基づいて、血清から吸着してくるタンパク質が OCP の骨再生に寄与するかどうかを明確にするために、同定されたタンパク質分子群からさらに絞り込んでいく必要性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- 1) Kikawa T, Suzuki O et al. Intramembranous bone tissue response to biodegradable octacalcium phosphate implant. *Acta Biomater* 5(5): 1756-1766, 2009, 査読有.
- 2) 川井忠, 穴田貴久, 鎌倉慎治, 鈴木治 他. 市販 β -TCP 焼結体と比較した合成リン酸オクタカルシウム (OCP) の骨芽細胞の分化能. *日本口腔外科学会雑誌*. 56(1): 2-8, 2009, 査読有.
- 3) Honda Y, Anada T, Kamakura S, Suzuki O et al. The effect of microstructure of octacalcium phosphate on the bone regenerative property. *Tissue Eng Part A* 15(8): 1965-1973, 2009, 査読有.
- 4) Kawai T, Anada T, Kamakura S, Suzuki O et al. Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. *Tissue Eng Part A* 15(1): 23-32, 2009, 査読有.
- 5) Nakajima D, Kamakura S, Suzuki O, Sasano Y et al. Analysis of appositional bone formation using a novel rat experimental model. *Oral Dis* 14(4): 308-313, 2008, 査読有.
- 6) Miyazaki T, Anada T, Suzuki O et al. Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 217(3): 769-777, 2008, 査読有.
- 7) Anada T, Kamakura S, Shimauchi H, Suzuki O et al. Dose-dependent

osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 14(6): 965-978, 2008, 査読有.

- 8) Kamakura S, Anada T, Suzuki O et al. Stability of regenerated bone by octacalcium phosphate (OCP) combined with collagen. *Key Eng Mater* 330-332: 1315-1318, 2007, 査読有.
- 9) Kamakura S, Anada T, Suzuki O et al. The primacy of octacalcium phosphate (OCP) collagen composites in bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 83(3): 725-733, 2007, 査読有.
- 10) Kamakura S, Anada T, Suzuki O et al. Dehydrothermal treatment of collagen influences on bone regeneration by octacalcium phosphate (OCP) collagen composites. *J Tissue Eng Regen Med* 1(6): 450-456, 2007, 査読有.
- 11) Hatakeyama J, Suzuki O, Sasano Y et al. Proliferation and adhesion of periodontal ligament cells on synthetic biomaterials. *Oral Dis* 13(5): 500-506, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 13 件)

- 1) 穴田貴久, 鈴木治 ほか. 高分子リンカーを有するリン酸カルシウム結合性. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会. 平成 21 年 11 月 16 日~17 日, 京都.
- 2) 本田義知, 穴田貴久, 鈴木治. OCP 顆粒インプラントの微細構造が骨形成に及ぼす影響. 第 19 回無機リン化学討論会. 平成 21 年 10 月 8 日~9 日, 東京.
- 3) 金子裕史, 上家潤一, 穴田貴久, 鎌倉慎治, 島内英俊, 鈴木治 ほか. リン酸オクタカルシウム (OCP) に集積するラット血清由来タンパク質のプロテオーム解析. 第 54 回日本歯科理工学会学術講演会, 平成 21 年 10 月 1 日~2 日, 鹿児島.
- 4) 鈴木治. リン酸カルシウム骨補填材による骨再生と骨置換促進のメカニズム. 第 424 回東北大学整形外科談話会. 特別講演. 平成 21 年 12 月 5 日, 仙台.
- 5) Suzuki O. Osteoconductive and biodegradable characteristics of octacalcium phosphate (OCP). Asia Core Program: Interdisciplinary Science of Nanomaterials: Session B "Nanobio & Carbon Nanotube Materials" Sep 25, 2009, Sendai.
- 6) 鈴木治. 合成リン酸オクタカルシウムの物理化学的性質と骨再生促進作用. 東北大学大学院工学研究科・機能高分子化学セミナー, 2008 年 5 月 2 日, 仙台.
- 7) Honda Y, Suzuki O et al. Effect of

- topography of the octacalcium phosphate granule surfaces on its bone regenerative property. Forsyth-Tohoku Symposium 2009. Mar 10, 2009, Boston MA, USA.
- 8) Suzuki O, Kamakura S et al. Intramembranous bone reaction to synthetic OCP during hydroxyapatite deposition onto the OCP template. 8th World Biomaterials Congress (WBC2008). May 30, 2008, Amsterdam, Netherland.
 - 9) Kumagai T, Anada T, Shimauchi H, Suzuki O et al. Release of β -Lactoglobulin adsorbed on octacalcium phosphate and its hydrolyzates. International Dental Materials Congress 2007. Nov 21-24, 2007, Bangkok, Thailand.
 - 10) Suzuki Y, Kamakura S, Anada T, Suzuki O et al. Biological response of octacalcium phosphate combined with collagen implanted in subperiosteal region. International Dental Materials Congress 2007. Nov 21-24, 2007, Bangkok, Thailand.
 - 11) Anada T, Kamakura S, Suzuki O et al. Effect of octacalcium phosphate ionic dissolution products on osteoblastic cell differentiation. Bioceramics 20. Oct 24-26, 2007. Nantes, France.
 - 12) Kamakura S, Anada T, Echigo S, Suzuki O et al. Differences of bone regeneration by various calcium phosphate/collagen composites. Bioceramics 20. Oct 24-26, 2007. Nantes, France.
 - 13) 鈴木治. ヒドロキシアパタイト形成および骨形成における骨塩ミネラルの役割—アパタイト前駆体OCPが示す骨再生促進作用からの考察—。第50回歯科基礎医学会総会・学術大会, シンポジウム3, 平成20年9月25日, 東京。

[図書] (計 6件)

- 1) Fuji T, Anada T, Suzuki O et al. Springer, Tokyo. Alginate/octacalcium phosphate composites enhance bone formation in critical-sized mouse calvaria. In: Sasano T, Suzuki O, editors. Interface Oral Health Science 2009. 2009, pp. 308-310.
- 2) Suzuki O. Springer, Tokyo. Chemical and physical factors affecting osteoconductivity of octacalcium phosphate bone substitute material. In: Sasano T, Suzuki O, editors. Interface Oral Health Science 2009.

2009, pp.100-107.

- 3) 鈴木治, 鎌倉慎治, 穴田貴久, 本田義知. デイカルレビュー社, 再生医療, 日本再生医療学会雑誌「生体模倣材料による生理的骨再生へのアプローチ」 7(2), 2008, pp.131-136.
- 4) 鈴木治, 鎌倉慎治, 穴田貴久. 日本医学館, バイオマテリアル-生体材料-骨置換性材料「リン酸オクタカルシウム」 26(3), 2008, pp.199-205.
- 5) 鈴木治. 日本セラミックス協会 「リン酸オクタカルシウムの骨再生能と生体内吸収性」セラミックス 43(4), 2008, pp. 286-289,
- 6) Orii Y, Suzuki O et al. Springer, Tokyo. Induction of octacalcium phosphate by surface modification of TiO₂ film prepared by electron cyclotron resonance plasma oxidation: In Interface Oral Health Science 2007. M. Watanabe, O. Okuno, editors 2007, pp. 317-322.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: 骨再生材料およびその製造方法

発明者: 鈴木治, 他

権利者: 東北大学

種類: 特願

番号: 2008-106640

出願年月日: 2008年4月16日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www-kiso.dent.tohoku.ac.jp/cfe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 治 (OSAMU SUZUKI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 60374948

(2) 研究分担者

鎌倉 慎治 (SHINJI KAMAKURA)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号: 80224640

上家 潤一 (JUNICHI KAMIIE)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号: 10400269

穴田 貴久 (TAKAHISA ANADA)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 30398466