

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650272

研究課題名(和文) タンパク質吸着特性を考慮した新しい骨伝導能評価システム確立へ向けた医工学的検討

研究課題名(英文) Biomedical engineering approach to establish a new evaluation system for osteoconductivity by focusing on the protein adsorption properties to biomaterials

研究代表者

金高 弘恭 (KANETAKA, Hiroyasu)

東北大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50292222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体材料へのタンパク質吸着に着目し、その吸着特性を考慮した新しい骨伝導能評価システムを確立することを目的とした。まずは、ハイドロキシアパタイトなど骨伝導能を有する生体材料に対し、血清タンパクの吸着挙動について、吸着量だけでなく、材料表面でのタンパク質の立体コンフォメーション状態の違いを明らかにした。次に、タンパク吸着特性とマウス前骨芽細胞株MC3T3-E1の増殖能との相関を明らかにすることで、新しい骨伝導能評価システム確立の可能性を検討した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish a new evaluation system for osteoconductivity by focusing on the protein adsorption properties to biomaterials. First, we revealed the difference in the three-dimensional conformational status of the protein on the surface of such osteoconductive biomaterials as hydroxyapatite, as well as the amount of adsorption, concerning the adsorption behavior of serum proteins. Next, by revealing the correlation between the proliferative capacity of mouse pre-osteoblastic cell line MC3T3-E1 and protein adsorption properties on the material, the possibility of a new evaluation system for osteoconductivity was investigated.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオマテリアル 骨伝導能 医工学

1. 研究開始当初の背景

骨補填材や骨片固定用プレートに利用される生体材料では、骨組織との親和性が最も重要視されており、その評価は様々な方法が利用して行われてきた。なかでも、工学系の実験室でも比較的容易に行える実験として、細胞や動物等を利用した生物学的実験を実施する前に、擬似体液 (SBF) を利用した生体材料の骨伝導能評価法が広く普及している (Ohtsuki, et al: 1991, Kokubo et al.: 2006)。しかしながら、この SBF はタンパク質を欠いているため、材料の生体内での活性を十分評価できない可能性があった。

一方、我々の研究グループでは、生体材料への各種タンパク質吸着に着目し、水酸アパタイト (HA) および α -型アルミナ (生体での骨伝導能: HA > α -型アルミナ) へのウシ血清アルブミン (BSA) 吸着量を測定したところ、 α -型アルミナへの吸着量が多いことが確認され、実際の骨伝導能に相関しないことが示唆された。また、骨タンパク質の一種であるオステオカルシンを利用した実験においても同様の傾向が確認されている。

そこで本研究では、単に吸着量だけでなく、最新の医工学的解析手法を用いて、血清タンパク質やオステオカルシンなど骨タンパク質のコンフォメーション (立体配座) を踏まえた吸着特性を考慮することにより、生体材料の新しい骨伝導能評価システムを確立することを目的とした。

2. 研究の目的

生体材料の骨伝導能を評価するために、細胞や動物等を利用する生物学的実験を実施する前に、擬似体液 (SBF; Simulated Body Fluid) に浸漬し、アパタイト形成量を比較することにより材料の骨伝導能を評価する方法が広く普及している。しかしながら、この SBF を利用した方法では、アパタイト核形成の制御に重要な役割を担う「タンパク質」を欠いているため、材料の生体内での活性を十分評価できない可能性が問題視されていた。

そこで本研究では、生体材料へのタンパク質の吸着に着目し、その吸着特性を考慮した新しい骨伝導能評価システムを確立することを目的とする。これまでの予備研究では、タンパク質の吸着量自体が必ずしも材料の骨伝導能と相関しないことがわかっており、タンパク質のコンフォメーション (立体配座) を踏まえ、材料への吸着特性を医工学的な観点から解明することとする。

具体的には、まず、HA、アルミナなど骨伝導能を有する生体材料に対し、血清タンパク質やオステオカルシンなど骨タンパク質の吸着挙動について、それぞれの材料表面におけるタンパク質のコンフォメーションの違いを検討しつつ、明らかにする。さらに、HA、アルミナを利用し、マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 による培養試験を行い、血清

タンパク質や骨タンパク質の吸着特性と *in vitro* における骨伝導能との相関について明らかにすることで、新しい骨伝導能評価システムを確立することを目的とする。

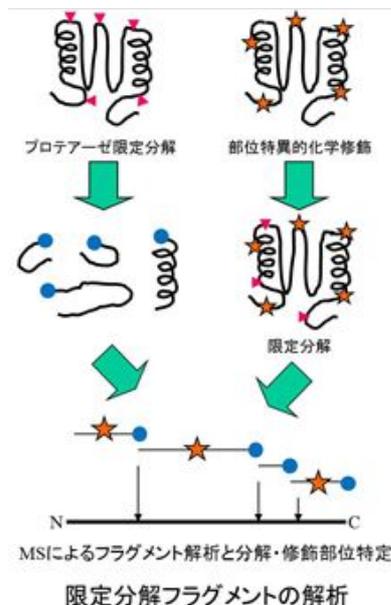
3. 研究の方法

(1) 吸着タンパク量の定量

塩酸および NaOH 水溶液で pH を 4.0、5.5 および 7.4 に調整した 10 mM の NaCl 水溶液 10 mL 中に HA、 α -型アルミナおよび β -型アルミナ粉末 50 mg を浸漬し、レーザーゼータ電位計を用いて試料のゼータ電位を測定する。続いて、上記と同様に pH を調整した BSA 含有 10 mM NaCl 水溶液に、表面積が約 0.17 m² とほぼ等しい HA、 α -型アルミナおよび β -型アルミナ粉末を 36.5 で 1 時間浸漬する。このときタンパク濃度を 0.4 mg/mL から 1.2 mg/mL まで変化させる。さらに溶液の pH の影響を調べるために、pH3.5 から pH7.5 まで変化させた。溶液の量はタンパク濃度の変化が同程度になる様に設定する。上清中の各種濃度をブラッドフォード法により測定し、血清タンパク吸着量を算出した。

(2) タンパク質吸着特性の解析

プロテアーゼを作用させると生体材料表面に結合した部分は保護され、反対にゆらいだ部分については速やかな分解が予想される。この際使用するプロテアーゼは非特異的断片を持つフラグメントの生成を避けるため、トリプシン、Asp-N、Lys-C といったアミノ酸選択性の高いものを使用する。分解の際、酵素の濃度、反応時間、温度といったパラメータをコントロールすれば、タンパク質中の特定の部位が切断されたフラグメントを生成するはずであり、かつそのようなフラグメントは生体材料表面での結合様式の違いを反映したものとなっていると考えられる。このフラグメントを質量分析で解析し、分解部位を特定する。



限定分解フラグメントの解析

(3) 細胞培養実験による骨伝導能評価

HA、 δ -型アルミナから製作されたディスク上にマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を培養し、骨形成能について細胞学および分子生物学的手法により評価する。なお、ウシ血清アルブミン(BSA)の影響を評価するため、あらかじめ材料表面に BSA を塗布したものも併せて検討を行った。

さらに、骨タンパク質の吸着特性と *in vitro* における骨伝導能との相関について明らかにすることで、新しい骨伝導能評価システム確立の可能性を検討した。

4. 研究成果

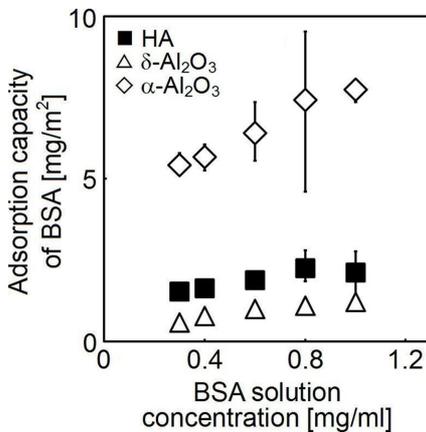
(1) 吸着タンパク量の定量

吸着等温線 (pH7.4)

HA、 δ -型アルミナおよび α -型アルミナ粉末への BSA 吸着等温線 (pH7.4) を下記に示す。

α -型アルミナへの吸着量が HA および δ -型アルミナより大きいことが確認された。

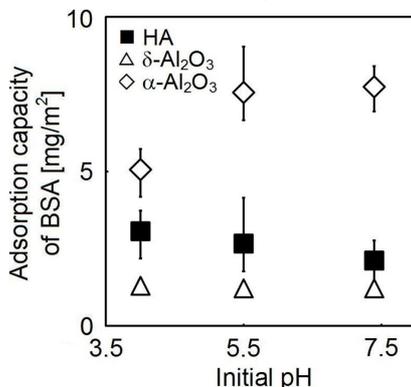
実際の骨伝導能は、 δ -型アルミナのほうが HA および α -型アルミナより小さいことから、材料表面への吸着タンパク量は実際の骨伝導能に相関しないことが示唆された。



化学吸着機構の解明

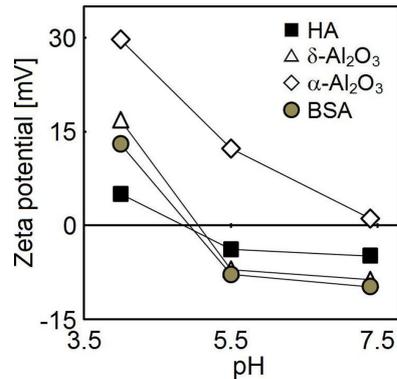
材料表面への吸着タンパク量は実際の骨伝導能に相関しないことが示唆されたため、各材料における吸着機構の差をより詳細に検討する必要性が生じ、材料表面への吸着タンパク量に対する pH の影響および各材料のゼータ電位の測定を行った。

pH の影響 (BSA 1.0 mg/ml) を調べるために、pH3.5 から pH7.5 まで変化させたところ、下記の結果が得られた。



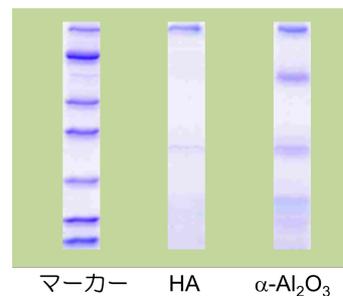
さらに pH を pH3.5 から pH7.5 まで変化させて、各材料のゼータ電位測定を行ったところ、下記の結果を得た。

このことから、各材料表面へのタンパク質の化学吸着のメカニズムとして、HA および δ -型アルミナは主としてイオン間相互作用により、 α -型アルミナは主として静電相互作用 (ゼータ電位) によりなされていることが示唆された。



(2) タンパク質吸着特性の解析

タンパク質の吸着特性を解析するために、材料に吸着したタンパク質を酵素で分解するプロテアーゼ限定分解を行った。分解の際、酵素の濃度、反応時間、温度といったパラメータをコントロールすれば、タンパク質中の特定の部位が切断されたフラグメントを生成し、かつそのようなフラグメントは生体材料表面での結合様式の違いを反映したものとなっている。下記の結果に示す通り、HA ならびに δ -型アルミナに対する BSA 吸着様式の違いが示唆された。



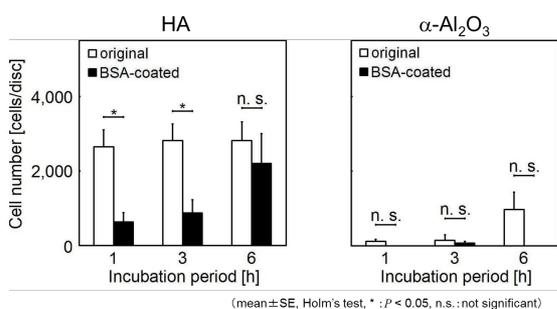
このようにプロテアーゼ限定分解により生成されたフラグメントを質量分析で解析することにより分解部位の特定を行った。

以上の結果より、血清タンパク質との特異的な吸着部位を有すること、もしくは血清タンパク吸着能が低いことが、材料の骨伝導を発現する条件のひとつであることが示唆された。

(3) 細胞培養実験による骨伝導能評価

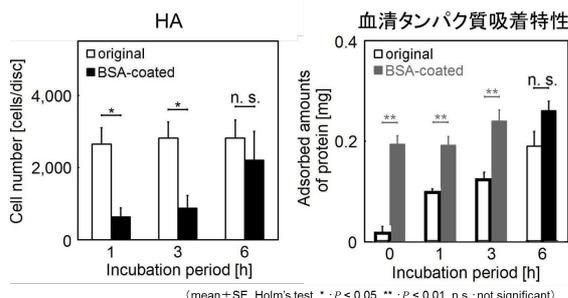
HA、 α -型アルミナから製作されたディスク上にマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を培養し、骨形成能について細胞学および分子生物学的手法により評価したところ、下記の結果を得た

初期の細胞接着において、HA のほうが型アルミナより接着する細胞数が多いことが確認された。また、ウシ血清アルブミン (BSA) の影響を評価するため、あらかじめ材料表面に BSA を塗布したところ、細胞培養初期において細胞接着を遅延させることが示唆された。



(mean \pm SE, Holm's test, * : $P < 0.05$, n.s.: not significant)

また、HA における初期の骨芽細胞接着とタンパク質吸着特性との関係を下記に示す。この結果から、あらかじめ材料表面に BSA を塗布したほうが、より早期に血清タンパクを吸着するものの、細胞培養初期の骨芽細胞との接着においては、阻害的に働くことが示唆された。



(mean \pm SE, Holm's test, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, n.s.: not significant)

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 3 件)

Kawashita M, Hayashi J, Kudo T, Kanetaka H, Li Z, Miyazaki T, Hashimoto M, MC3T3-E1 and RAW264.7 cell response to hydroxyapatite and alpha-type alumina adsorbed with bovine serum albumin. J. Biomed. Mater. Res. A, 2014, in press
DOI: 10.1002/jbm.a.34861

(査読有)

Kawashita M, Hayashi J, Li Z, Miyazaki T, Hashimoto M, Hihara H, Kanetaka H, Adsorption characteristics of bovine serum albumin onto alumina with a specific crystalline structure. J. Mater Sci: Mater. Med. 25: 453-459, 2014

(査読有)

Hayashi J, Kawashita M, Miyazaki T, Kudo T, Kanetaka H, Hashimoto M. MC3T3-E1 cell response to hydroxyapatite and alpha-type alumina adsorbed with bovine serum albumin. Key Engineering Materials 529-530: 365-369, 2013 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

Kawashita M, Hayashi J, Miyazaki T, Hashimoto M, Hihara H, Kanetaka H Zeta potentials and bovine serum albumin adsorption of α -alumina-based ceramic particles. The 25th European Conference on Biomaterials (ESB2013), September 8-12, 2013, Madrid, Spain.

川下将一, 林純平, 工藤忠明, 金高弘恭, 李志霞, 宮崎敏樹, 橋本雅美 アルブミンを吸着させた水酸アパタイトおよび α 型 Al₂O₃ に対する MC3T3-E1 および RAW264.7 細胞の応答 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム、2013.09.04-06, 長野

Kawashita M, Hayashi J, Li, Z Miyazaki T, Hashimoto M, Hihara H, Kanetaka H, Adsorption characteristics of bovine serum albumin on alumina particles with specific crystalline structure.

8th International Workshop on Biomaterials in Interface Science Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2013, August 29-30, 2013, Sansa-tei, Zao, Miyagi, Japan

林純平, 川下将一, 宮崎敏樹, 橋本雅美, 金高弘恭

δ 型アルミナのアルブミン吸着挙動 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012.11.26-27, 仙台

Hayashi J, Kawashita M, Miyazaki T, Kudo T,
Kanetaka H, Hashimoto M.

RAW264.7 cell response to hydroxyapatite and
alpha-type alumina adsorbed with bovine
serum albumin.

12th Asian BioCeramics (ABC2012)
Symposium. November 18-21, 2012, Tainan,
Taiwan

Hayashi J, Kawashita M, Miyazaki T, Kudo T,
Kanetaka H, Hashimoto M. MC3T3-E1 Cell
Response to Hydroxyapatite and Alpha-Type
Alumina Adsorbed with Bovine Serum
Albumin.

Bioceramics 24, October 21-24, 2012,
Fukuoka, Japan

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金高 弘恭 (KANETAKA, Hiroyasu)
東北大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号： 5 0 2 9 2 2 2 2

(2)研究分担者

佐々木 啓一 (SASAKI, Keiichi)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号： 3 0 1 7 8 6 4 4

清水 良央 (SHIMIZU, Yoshinaka)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号： 3 0 3 0 2 1 5 2

工藤 忠明 (KUDO, Tada-aki)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号： 5 0 4 3 1 6 0 6

川下 将一 (KAWASHITA, Masakazu)
東北大学・大学院医工学研究科・准教授
研究者番号： 7 0 3 1 4 2 3 4

(3)連携研究者

村山 和隆 (MURAYAMA, Kazutaka)
東北大学・大学院医工学研究科・准教授
研究者番号： 4 0 4 0 0 4 5 2