

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05554

研究課題名(和文)リン酸化したキチン糖鎖を利用したチタン結合性骨形成蛋白の創製

研究課題名(英文)Preparation of Ti-binding osteogenic protein by using phosphorylated chitin

研究代表者

久保木 芳徳 (KUBOKI, Yoshinori)

北海道大学・地球環境科学研究所・名誉教授

研究者番号：00014001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：チタンは、生きた骨と強く結合する故に、人工歯根や人工関節に用いられているが、その結合の詳細な機構は未解明であり、結合には月単位の長時間を要する欠点があった。私たちは骨中に存在するチタン結合性骨誘導蛋白(骨形成誘導蛋白) (TiBP) を発見し、骨とチタンの結合メカニズムを明らかにした。そこで、TiBPの代替品を追究した結果、リン酸化したキチンが、チタンに結合することがわかった。そこで、リン酸化キチンをチタンインプラントにコートして、ラットの頭蓋骨に埋植したところ、TiBPと同様に骨形成量が顕著に増大することが分かった。リン酸化したキチンは、TiBPの代替品として臨床的にきわめて応用価値が高いと結論した。

研究成果の概要(英文)：In 2014, we discovered that bone phosphoproteins, which are collectively called SIBLING proteins family, possessed the titanium-binding ability. Furthermore, the titanium implant devices which were coated with these titanium binding proteins (TiBP) induced more than 100 times higher amount of bone than the non-coated control. Inspired by this discovery, we chemically phosphorylated chitin to see whether the same effect can occur in the phosphorylated chitin (P-chitin). The result was that P-chitin definitely bound with titanium, and P-chitin coated titanium implant induced several times higher amount of bone, when implanted into rat calvaria. We attributed the unique property of P-chitin to the regular arrangement of phosphorylated groups of N-acetyl glucosamine corresponding with regular crystal units of TiO₂. Usefulness of the new findings are self-evident for dental and orthopedic implants.

研究分野：骨と歯の生化学

キーワード：リン蛋白質 チタン 人工骨 人工歯根 キチン リン酸化キチン チタン結合性蛋白質 チタンと骨の結合

1. 研究開始当初の背景

金属であるチタンが生きた骨と強固に結合するという驚くべき現象が 60 年前にスウェーデンのブレノマルク博士によって発見された。その結果、チタンは現在、殆どすべての人工歯根（歯科インプラント）と人工骨、人工関節に用いられている。しかしながら、チタンと生きた骨の結合の生化学的メカニズムは 60 年間の謎として未解明であった。さらにチタンと骨との結合に月単位の長時間を要するという欠点があった。私たちは、この問題の解決を目指して、各種蛋白質とチタンと結合を系統的に研究した結果、骨中に存在するチタン結合性骨誘導蛋白質 (TiBP) (通称インプラント蛋白質) を発見し、これによって生きた骨とチタンの結合メカニズムを明らかにした。TiBP は複数のリン酸化セリンを含み、そのリン酸基を介してチタン結合し、骨芽細胞を呼び寄せてチタンの表面に、骨を誘導する。実際、TiBP をコートしたチタンインプラントは、非コート対称群に比べて、1 週目の骨形成量が 100 倍以上多いことを実証できた。

そこで、これらの成果を臨床に役立てるため TiBP を供給するには、つぎの 2 つの手段が考えられた。一つは、TiBP を動物の骨組織から大量、かつ一定の条件で抽出・精製か、または遺伝子技術によって TiBP を供給する。もう一つの方向は、TiBP の機能を理解したうえで、TiBP の代替品を創製する手段である。これら二つの手段によって TiBP の供給を検討する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、次の 2 点を追究することにした。

第一には、骨組織から TiBP の調製する方法を詳しく検討して、より効率的な TiBP の調製方法を開発する。

第 2 には、リン酸化高分子を創製して TiBP の代替物を調製する。

理論的に、リン酸化したキチン、コラーゲンなどの高分子も、チタンに結合する可能性が予想されるので、実験によって、キチンを化学的にリン酸化し、できたリン酸化キチンがチタンに結合し、さらに骨形成を増加するかどうかを確認する。

以上の 2 点の追求を本研究の目的と定めた。

3. 研究の方法

(1) 牛骨からの TiBP の抽出にあたって、従来見逃していた pH 2 の塩酸脱灰液にも、TiBP が存在するかを検討する。

(2) キチンをリン酸化するために、各種のプロトン系溶媒、すなわち、リン酸緩衝液、並びに非プロトン溶媒、すなわち DMSO などを用いて、5 酸化リンによって、化学的にリン酸化した。得られたリン酸化キチンを、既報(後述の[雑誌論文])に従ってチタン・デバイス(Zellez, H-Lex 社, 兵庫県)にコートして、ラットの頭蓋骨に埋植した場合にチタンの骨誘導能が高まるか否かを検討する。

(3) リン酸化キチンに、さらに細胞接着アミノ酸配列(Arg-Gly-Asp)含むペプチドを縮合させた合成高分子を作製し、チタンデバイスにコートし、ラットの頭蓋骨に埋植した場合に、骨誘導能が高まるか否かを検討する。

4. 研究成果

(1) 従来、廃棄していたウシ骨の塩酸脱灰液を透析し、チタンカラムにかけたところ、有意量のチタンに結合するピークが確認され、Stains-all 染色電気泳動によっても、Western block によっても、DMP1 などの TiBP が存在することが明らかになった。さらに、その酸抽出 TiBP を既報に従ってチタンデバイスである Zellez にコートして、ラットの頭蓋骨に埋植したところ、従来の 2M 尿素抽出液から得られた TiBP と同様に骨誘導が亢進するのみならず、一部に軟骨の形成が確認された。これによって、より簡便かつ効率的な TiBP の抽出方法が確立された。

(2) リン酸化キチンを既報に従ってチタンデバイスである Zellez にコートして、ラットの頭蓋骨に埋植したところ、顕著な骨形成の増加が認められた。すなわち、リン酸化キチンがチタンに結合するのみならず、Zellez などのチタンデバイスにコートした場合、骨増生能を持つという、驚くべき結果を確認した。今後、骨の再生医療におけるリン酸化チタンの意義は極めて大きいといえよう。[論文作成中]

一方、リン酸化したキチンに、さらに接着ペプチドを縮合して、複合体として埋植実験を行ったところ、この複合体は、予想に反し、かえって骨誘導能が、リン酸化キチン自体よりも低いという結果を得た。したがって、TiBP の代替品としては、より複雑な接着ペプチド+リン酸化キチン複合体を求めるよりも、比較的合成が容易なリン酸化キチンをチタンにコートして、臨床化の道を開くことが得策であると結論した。

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 8 件)

1. Y.Dai, K.Zhang, J.Li, Y.Jiang, Y.Chen and S.Tanaka, adsorption of copper and zinc onto carbon material in an aqueous solution oxidized by ammonium peroxydisulphate, *Separation and Purification Technology*, 186, 255-263 (2017). (査読あり)
2. A.Yamashita and S.Tanaka, Electrochemical synthesis and immobilization of a beadwork-like Prussian Blue on carbon fiber and the removal of cesium, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 2912-2920 (2017). (査読あり)
3. Yoshinori KUBOKI, Kimitoshi YAGAMI, Michiko TERADA-NAKAISHI, Toshitake FURUSAWA, Yasuko NAKAOKI, and Masaaki KURASAKI: Biochemical Mechanism of Titanium Fixation into Living Bone: Acid Soluble Phosphoproteins in Bone Binds with Titanium and Induced Endochondral Ossification *in vivo*, *J. Oral Tissue Engineering*, 15: (3), 109-118 (2017) (査読あり)
doi: <https://doi.org/10.11223/jarde.15.109>
4. Yoshinori Kuboki, Kimitoshi Yagami and Toshitake Furusawa: New principles of regenerative medicine: special reference to mechano-dynamic factors, *J. Oral Tissue Engineering*, 14 (3), 128-152 (2017) (査読あり) doi: <https://doi.org/10.11223.jarde.14.128>
5. Kimitoshi Yagami, Sunao Sadaoka, Hiroshi Nakamura, Saho Komatsu, Jun Onodera, Masahiko Suzuki and Yoshinori Kuboki: Atelocollagen Enhanced Osteogenesis in a Geometric Structured Beta-TCP Scaffold by VEGF Induction, *J Tissue Sci Eng*7: 162. (2016) doi:10.4172/2157-7552.1000162 (査読あり)
6. Yoshinori Kuboki, Kimitoshi Yagami, Seiichi Tokura, Masaaki Kurasaki, Shingo Ogawa, Hiroko Takita, Rachel Sammons: Development of anti-gravity apparatus for studying gravity effects on cell culture, *J. Oromaxillofacial Biomechanics*, 21: (1) 9-17, 2016 (査読あり)
7. 久保木芳徳: 再生医療におけるナノファイバー応用の原理: 人工細胞外マトリックスの幾何学, *Nanofiber*, 7: (1) 26-34, 2016 (査読あり)
8. Kimitoshi Yagami, Sunao Sadaoka, Hiroshi Nakamura, Saho Komatsu, Jun Onodera, Masahiko Suzuki and Yoshinori Kuboki: Atelocollagen Enhanced Osteogenesis in a Geometric Structured Beta-TCP Scaffold by VEGF Induction, *J Tissue Sci Eng*7: 162. (2016) doi:10.4172/2157-7552.1000162 (査読あり)

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 戸倉清一、Parvin Begum、久保木芳徳、藏崎正明、田中俊逸: 溶媒和キチンのナノサイズ化と医療・代用臓器への応用の可能性について、第 30 回代用臓器・再生医学研究会、2018 年 2 月 24 日、北海道大学歯学部講堂
2. 久保木芳徳、Parvin Begum、Myeenuddin Chowdhury、戸倉清一、藏崎正明: バングラデッシュ飲料水のヒ素除染を目指した新型多孔性粒状アパタイト体の開発、第 30 回代用臓器・再生医学研究会、2018 年 2 月 24 日、北海道大学歯学部講堂
3. 久保木芳徳、Parvin Begum、藏崎正明、戸倉清一、松本太郎: 反重力培養装置は DFAT 細胞の増殖を促進する、第 30 回代用臓器・再生医学研究会、2018 年 2 月 24 日、北海道大学、歯学部講堂
4. Hai-Yan Zhou, Yoshinori Kuboki: Identification of Hydroxyapatite-Interacting Proteins in Bone, The 6th International Conference of Biomedical Engineering and Biotechnology, 2017-10-17 ~ 20, Hotel Canton, (Guangzhou), China (招待講演)
5. Y. Kuboki, S. Tokura, T. Furusawa, and K. Yagami: Phosphorylation of the biomolecules enabled to acquire titanium-binding and bone-enhancing ability when coated on the surface of titanium implants, The 6th International Conference of Biomedical Engineering and Biotechnology, 2017-10-17 ~ 20, Hotel Canton, 広州 (Guangzhou), China (招待講演)
6. 久保木芳徳、八上公利、古沢利武、戸倉清一、生体高分子の化学リン酸化によるチタン結合性の獲得 (Acquisition of titanium-binding ability by chemical phosphorylation of bio-molecules) 歯科基礎医学会、2017 年 9 月 17 日、長野県塩尻市松本歯科大学
7. 久保木芳徳、八上公利、古沢利武、Parvin Begum、藏崎正明、戸倉清一、Mostafizur Rahman: リン酸化キチンは、チタンに結合し骨を誘導する、シンポジウム: 次世代のマトリックスは再生医療の新しい扉を開く、第 16 回日本再生医療学会、2017 年 3 月 9 日 仙台市青葉区 仙台国際センター
8. 戸倉清一、久保木芳徳: キチンとキトサンはキチンと分けて考えよう、シンポジウム

ム：次世代のマトリックスは再生医療の新しい扉を開く、第16回日本再生医療学会、2017年3月9日 仙台市青葉区 仙台国際センター

9. 久保木芳徳、戸倉清一、藏崎正明、Parvin Begum、坂入信夫：生体高分子の化学リン酸化の意義：臓器再建と環境浄化の基礎素材としての機能、第29回代用臓器・再生医学研究会、2017年2月27日、札幌市北区北2西7 道民活動センタービル

10. Yoshinori Kuboki: Principle of Regenerative Medicine: Geometry of the Artificial Extracellular Matrix 2016-11-18 海南医学院, 中国市 (招待講演)

11. Yoshinori Kuboki: New concepts for regenerative medicine and environmental purification, 2016-11-17 海南医学院, 中国、海口市 (招待講演)

12. 久保木芳徳、八上公利、古澤利武: チタンの骨内定着の生化学メカニズム解明・インプラント蛋白の意義と応用、シンポジウム 21世紀の歯科インプラントは基礎と臨床の融合から、第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年8月24日、札幌市コンベンションセンター

13. 久保木芳徳、戸倉清一、Mostafizur Rahman、藏崎正明、坂入信夫、滝田裕子、古澤利武、八上公利、中石典子、高久田和夫: 生体高分子の新規リン酸化技術による再生医療・環境浄化新素材の開発、第25回硬組織再生生物学会学術大会、2016年8月20日、東京都千代田区神田駿河台・日本大学歯学部1号館4階大講堂

14. 久保木芳徳、戸倉清一、藏崎正明、八上公利、古澤利武、滝田裕子、Rachel Sammons: チタンと、コラーゲンならびにキチンとの反応、第48回日本結合組織学会、2016年6月24~25日、長崎大学医学部・良順会館

15. 久保木芳徳、戸倉清一、藏崎正明: コラーゲンとチタンの結合：クロマトグラフィおよび形態的観察による実証 2016年2月27日(土) 第28回代用臓器・再生医学研究会、北海道大学工学部フロンティア応用科学研究棟 鈴木章ホール

16. 久保木芳徳、八上公利、古澤利武、村田勝: チタンに結合しインプラントを促進する蛋白の生化学的同定、Isolation and immunochemical identification of “the implant proteins” (titanium-binding and bone-increasing

proteins)、日本口腔インプラント学会第35回東北北海道支部学術大会 2015年11月21日、宮城県仙台市、国際センター

17. 久保木芳徳、古澤利武、八上公利: 生化学的立場から、なぜチタンは骨に付くのか: 「生きた骨と金属チタンとの強固な結合」の解明、日本口腔インプラント学会第35回東北北海道支部学術大会 2015年11月22日宮城県仙台市、国際センター【招待講演】

18. Yoshinori Kuboki, Seiichi Tokura and Masaaki Kurasaki: Principle of Nanofiber Application in Regenerative Medicine: Geometry of the Artificial Extracellular Matrix, International Congress of Nanofibers, (国際ナノファイバー学会)、東京工業大学・大岡山キャンパス、2015年10月15~16日【招待講演】

19. 久保木芳徳、古澤利武、八上公利、藏崎正明、戸倉清一: インプラント蛋白(チタンに結合して骨を造成する蛋白)の意義とその後の展開、第24回・硬組織再生生物学会・大阪歯科大学・天満宮キャンパス・2015年8月21~22日

20. 久保木芳徳、国井沙織、森本康一、古澤利武、八上公利: チタンとコラーゲンの反応について: インプラント蛋白発見に基づく展開 第33回日本骨代謝学会、2015-7-25、京王プラザホテル(東京・新宿)

21. 久保木芳徳: 硬組織再建におけるナノファイバー応用の原理: 人工細胞外マトリックスの幾何学、ナノファイバー学会第5回年次大会、2015年7月6日(月) 東京大学 弥生講堂 一条ホール

【図書】(計0件)

【産業財産権】

○出願状況(計0件)

○取得状況(計2件)

1. 名称: チタン-タンパク質複合体の製造方法
発明者: 久保木芳徳、古澤利武
権利者: 久保木芳徳、古澤利武
種類: 特許
番号: 6148487
取得年月日: 2017年5月26日
国内外の別: 国内

2. 培養基盤固定治具及びこれを用いた反重力培養方法

発明者：久保木芳徳、菊池敦紀、西村浩之
権利者：久保木芳徳、株式会社イノアック技
術研究所
種類：特許
番号：6117508
取得年月日：2017年3月31日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保木 芳徳 (KUBOKI, Yoshinori)
北海道大学・地球環境科学研究院・名誉教授
研究者番号：00014001

(2)研究分担者

戸倉 清一(TOKURA, Seiichi)
北海道大学・地球環境科学研究院・名誉教授
研究者番号：40000806

田中 俊逸 (TANAKA, Syunitsu)
北海道大学・地球環境科学研究院・特任教授
研究者番号：30142194

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者