

令和元年9月25日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19740

研究課題名(和文)有機-無機共沈法で免疫関連タンパク質を集積する硬組織再生材料の開発

研究課題名(英文)A study of bioactive materials used for bone filling

研究代表者

鈴木 治 (Suzuki, Osamu)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：60374948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸カルシウム材料の表面にタンパク質を集積させるため牛血清アルブミンをモデルとして、カルシウムおよびリン酸の水溶液からタンパク質とリン酸カルシウムが共析する溶液条件を検討した。イオン環境の調節によりアルブミンの吸着量が異なって来ること、またリン酸カルシウムの共析出も生じることが示唆された。以上の結果からタンパク質共析の材料設計指針が得られたため、今後に活性のあるタンパク質について検討し組織再生への応用可能性の拡大を図る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により骨伝導を有する無機系の生体材料に組織再生を活性化する機能を付与するための材料設計指針が得られた。本成果は口腔外科あるいは整形外科領域など骨再生を必要とする分野への応用可能性を検討するための技術基盤になると考えられる。本研究におけるモデルタンパク質での検討結果は各種活性因子への活用が想定される。次の段階として既に臨床応用されている活性因子への適用を検討することで実用化へ向けた技術確立へつなげることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to investigate about how chemical environment around calcium phosphate crystals affects proteins accumulation onto the crystals. Co-precipitation of bovine serum albumin as a model protein for active molecules, such as proteins in immunomodulation, was controlled by the solution calcium and phosphate ions environment under physiological conditions. The results suggest that the design concept to accumulate the proteins on the materials. The concept of the materials accumulating active molecules obtained in the present study could be used for the tissue regeneration.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：生体材料 タンパク質 無機材料

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

疾病や事故で失われた骨の欠損の修復では組織工学的手法が研究されてきた。組織工学的手法では欠損部へ充填する活性の高い埋入物を作製する手法として、1) 足場材料に各種細胞の活性化に効果のある成長因子を添加する、2) 足場材料に骨芽細胞に分化する未分化間葉系細胞を播種する、3) 足場材料に成長因子と細胞の双方を添加・播種する方法が鋭意検討されてきた。これら足場材料は一般に生体親和性が高い性質を有する素材が選択され、細胞の接着や増殖あるいは分化といった機能を持ち、細胞の維持・活性化に有利な性質に期待して用いられるが、材料として有機ではコラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、アルギン酸といった生体由来高分子やポリ乳酸、ポリカプロラクトンといった合成高分子など、無機ではリン酸カルシウム系材料であるハイドロキシアパタイト (HA)、 $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) などを焼結したセラミックス材料などが用いられてきた。足場材料の開発では化学的性質やと三次元的構造といった物理的性質の両面から高機能化が試みられてきた (Collignon AM et al. *Front Physiol* 14, 2017 ほか)。私達は足場材料の化学的性質に着目して人工合成で得たリン酸八(オクタ)カルシウム (OCP) が HA や  $\beta$ -TCP に比肩し得る高い骨伝導性を有していることを見出して以来 (Suzuki et al. *Tohoku J Exp Med* 164, 1991; Suzuki et al. *Biomaterials* 27, 2006)、歯科や整形外科における骨再生医療への応用を目指した検討や、*in vitro* における細胞の親和性や活性について検討を行ってきた。一連の研究取り組みの中で OCP は酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性陽性の破骨細胞様細胞による材料の直接吸収に基づく生体内吸収性を示すことがわかったが (Imaizumi H et al. *Calcif Tissue Int* 78, 2006)、破骨細胞の前駆細胞であり免疫担当細胞である骨髄由来のマクロファージ系細胞が遊走され (Hirayama B et al. *RSC Adv* 6, 2016)、その上で *in vitro* で証明した破骨細胞形成促進 (Takami M et al. *Tissue Eng Part A* 15, 2009) が生じると考えられた。しかしながら免疫担当細胞による OCP 吸収は材料周囲において部位限定的であり材料のさらなる活性化が必要と考えられた。

本研究ではこれら研究代表者らの独自研究に基づく生体材料学的な情報に基づき、リン酸カルシウムのタンパク質集積能に着目し、OCP に免疫関連の因子が集積できる足場材料の設計論の確立を計画した。

### 2. 研究の目的

タンパク質集積を考える上でリン酸カルシウムへのタンパク質吸着に関するこれまでの研究として、1) 牛血清アルブミン (BSA) の OCP とその加水分解産物であるアパタイト様物質への吸着測定を行い、両方の吸着媒ともにラングミュア型で吸着すること (Suzuki O et al. *Cells Mater* 5, 1995)、2) OCP をフッ素存在下で加水分解して得られたアパタイト様物質への BSA 吸着は加水分解のプロセスが異なると吸着親和性が異なること (Shiwaku Y et al. *Acta Biomater* 8, 2012)、3) OCP とその加水分解によるアパタイト様物質への吸着はタンパク質の電荷により影響を受けること (Shiwaku Y et al. *J Ceram Soc Japan* 118, 2010)、4) コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸等の分子共存下でリン酸カルシウムが共沈し得ること (Honda Y et al. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 80B, 2007; Handa T et al. *Acta Biomater* 8, 2012; Fuji T et al. *Tissue Eng Part A* 15, 2009) 等の所見が得られている。また、OCP は埋入形態の様式である顆粒を構成する個々の板状結晶の集合体の結晶粒子間隙に *in vivo* で MPA レクチンで標識される糖タンパク質を含む血清由来タンパク質を集積し (Suzuki O et al. *Bone Miner* 20, 1993) また同時に *in vivo* でナノ結晶を析出する (Suzuki et al. *Curr Med Chem* 15, 2008)。これらの独自研究の所見に基づいてタンパク質集積法を研究することを目的とした。本研究では免疫関連の因子が集積できる足場材料の設計論を確立するためモデルタンパク質を用いて検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 吸着質

モデルタンパク質として市販の牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) およびヒト血清アルブミン (human serum albumin, HSA) を吸着質として用いた。

#### (2) 吸着媒の調製

吸着媒として市販の HA (HAP-200, 大平化学産業)、市販のフッ素含有アパタイト (FA, 大平化学産業) 実験室で調製した OCP およびフッ素共存下で種々のフッ素濃度を持つ OCP 合成条件の溶液から調製したフッ素化 HA (F-HA) を用いた (Tsutsui S et al. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 106B, 2018)。フッ素濃度範囲は 25-500ppm とした。また、OCP の合成は  $\text{Ca}^{2+}$  とリン酸のイオン濃度として HA および OCP に関して過飽和の条件となるように、 $\text{Ca}^{2+}$  およびリン酸濃度、pH を一定にして温水中で調製した。溶液濃度の設定は 25 における OCP に関する過飽和度が  $1 \times 10^{18} \sim 4 \times 10^{11}$  となる範囲内で調節した (Suzuki et al. *Tohoku J Exp Med* 164, 1991; Honda Y et al. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 80B, 2007)。吸着ではこれら材料の粉体試料を用いた。

#### (3) 吸着媒の溶解性の評価

吸着媒の溶解性評価として生理的環境下、溶解度平衡での上清のイオン組成から過飽和度

を見積もった (Suzuki O et al. J Biomed Mater Res B: Appl Biomater 77, 2006; Tsutsui S et al. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 106B, 2018). イオン組成は化学分析により定量した. 過飽和度 (DS) は溶解度積定数とイオン活動度積の比から HA, OCP, リン酸水素カルシウム 2 水塩 (DCPD), また FA に関して計算して求めた. 生理的環境を持つ溶液として培養に用いる MEM 培地, あるいはトリス-塩酸緩衝液に  $\text{Ca}^{2+}$  およびリン酸を種々の濃度であらかじめ含有させた溶液を用いた. これらの溶液に吸着媒を浸漬して 37 恒温槽内で一定期間振盪維持した後上清を回収して化学分析に供した.

#### (4) 吸着媒のキャラクタリゼーション

実験に用いたリン酸カルシウム吸着媒は, X 線回折を測定してデータベースと照合して結晶相の同定を行った. また, フーリエ変換赤外分光 (FTIR) 分析を行い, リン酸イオンの存在状態について比較観察した. また, 合成・乾燥後の結晶は走査型電子顕微鏡 (SEM) あるいは透過型電子顕微鏡 (TEM) によりその形態を観察した. さらにそれぞれの吸着媒を酸で溶解して Ca, P, F の化学分析を行い, Ca/P モル比を決定した.

#### (5) モデルタンパク質の吸着媒への集積能の評価

HSA の吸着能は既報 (Suzuki O et al. Cells Mater 5, 1995) を参考にして以下のように測定した. HA, F-HA (100ppm F 含有下で調製した F-HA) および FA それぞれ 20mg を 150mM トリス-塩酸緩衝液中に 200 ~ 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度範囲の HSA を含む吸着質溶液 1.5mL に分散し, 37 で 1.5 時間振盪した. 振盪後に遠心沈降した後, 上清の HSA 濃度を比色法により定量し, 対照との比較で吸着質溶液中の HSA 濃度を測定して吸着質へ集積する濃度を決定した. 吸着質の比表面積から単位面積あたりの吸着量を見積り, 吸着質間の HSA 集積能を評価した.

BSA の吸着についても上記既報論文を参考にした. 150mM トリス-塩酸緩衝液中にあらかじめ  $\text{Ca}^{2+}$  およびリン酸イオンを含有させておき, 生理的濃度を含む一定のイオン組成を持つ緩衝液を調製した. BSA を同様に 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  まで含有させた溶液を吸着質として OCP を吸着媒として用いて分散し, 37 で 1 時間振盪した. 振盪後に HSA 同様の方法にて OCP の比表面積から単位面積あたりの吸着量を見積り, 異なるイオン環境下における BSA 集積能を評価した. また, ラマン (Raman) 分光分析を行い, 比色法による BSA 吸着と機器分析による吸着を比較検討した.

### 4. 研究成果

#### (1) 吸着媒の材料学的性質

F-HA および OCP はそれぞれ過去に報告された X 線回折および FTIR のパターン (Shiwaku Y et al. Acta Biomater 8, 2012; Kobayashi K et al. ACS Appl Mater Interfaces 2014) と一致した. HA および FA は X 線回折において結晶性の良いアパタイト構造を呈した. F-HA の FTIR の解析では F 濃度の高い溶液で調製した F-HA になるほど OCP 特有のリン酸の吸収パターンからアパタイトのそれに近づくことが観察された. 化学組成として, HA, F-HA, FA においてそれぞれ, Ca は 37.2wt%, 38.1wt%, 38.7wt%, P は 17.2wt%, 18.0wt%, 18.2wt% であった. また, F-HA, FA において F は 3.9wt%, 3.1wt% であった. HA, F-HA, FA の Ca/P モル比は, それぞれ 1.67, 1.63, 1.64 となり, F-HA および FA は Ca 欠損性のフッ素化アパタイトであった (Tsutsui S et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 106B, 2018). SEM 観察による結晶形態は F-HA および OCP は既報に一致して数  $\mu\text{m}$  長の板状であった (Suzuki O et al. Cells Mater 5, 1995; Shiwaku Y et al. Acta Biomater 8, 2012). HA および FA は F-HA よりも若干薄いロッド状あるいは板状であった. TEM 観察では OCP はスムーズなエッジを持つアスペクト比の大きい板状を呈していた.

#### (2) 吸着媒の化学的性質

HA, F-HA, FA の MEM 中における溶解度平衡を過飽和度 (degree of supersaturation, DS) として計算した. MEM 自身は HA に関して若干過飽和 ( $1.52 \times 10^1$ ) であったが OCP に関してほぼ飽和 ( $2.76 \times 10^0$ ), また DCPD に関して不飽和 ( $8.15 \times 10^{-1}$ ) であった. HA, F-HA, FA および OCP を MEM へ 3 日間浸漬後の DS は, HA, FA および OCP はいずれも HA に関して幾分過飽和度が低下して  $7.58 \sim 8.82 \times 10^0$  の範囲であったが, OCP に関してほぼ飽和状態が維持され ( $1.46 \sim 1.71 \times 10^0$ ), また DCPD に関しては不飽和のままであった ( $4.22 \sim 5.11 \times 10^{-1}$ ). また FA に関する過飽和度も計算してみると, FA は  $1.46 \times 10^0$  となり飽和状態に平衡することがわかった. OCP に関してほぼ飽和状態が維持された結果は生体内環境に関する血清のイオン濃度から考察された過去の報告と矛盾しない結果であった (Eidelman N et al. Calcif Tissue Int 40, 1987). 一方, 異なるフッ素濃度 (25ppm ~ 500ppm) で調製した F-HA では高濃度フッ素調整製では異なる溶解度平衡の挙動を呈し, 500ppm で調製した F-HA では OCP に関する DS は  $8.95 \times 10^{-1}$  となり OCP に関して不飽和, また FA に関して  $1.97 \times 10^1$  となり若干飽和で平衡に達した. 500ppm フッ素で調製した F-HA は培地内で 1.99mM の低濃度フッ素が検出され, F-HA の溶解が生じたことによるものと考えられた (Tsutsui S et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 106B, 2018).

トリス-塩酸緩衝液を用いて過飽和な環境下 ( $\text{Ca}^{2+}$ : ~3mM) における OCP の溶解度平衡を計算した. 過飽和溶液では OCP 浸漬前のオリジナル溶液は HA に関して過飽和であるだけでなく OCP に関して一定以上の高い過飽和度を示した (OCP に関する DS 値として  $10^2 \sim 10^3$  の範囲). し

かしながら DCPD ではなお不飽和であった。この環境下に OCP を浸漬すると HA に関する DS は低下するものの高い過飽和状態に維持され、また OCP に関する DS は飽和あるいは若干過飽和に維持されることがわかった (濱井 瞭, 鈴木 治ほか, 日本セラミックス協会 2019 年年会, 2019 年 3 月; Hamai R, Suzuki O et al. Submitted 2019)。

### (3) モデルタンパク質の集積に及ぼす結晶相の影響

HSA を吸着質として吸着媒 HA, F-HA, FA でのトリス-塩酸緩衝液における 37 °C における吸着を測定したところ、いずれの吸着媒においても吸着量が平衡濃度の低濃度で急速に立ち上がり、以降は緩やかに吸着量が増大する様式のラングミュア型の吸着等温線が得られた。一方、ラングミュア式を用いて吸着を解析してみると、吸着量は  $F-HA > FA > HA$  の順となり、F-HA により多くの HSA が吸着した。一方、吸着平衡定数は  $FA > HA > F-HA$  の順となり、F-HA は HSA と最も弱く相互作用するものと見積もられた。これらの結果はいずれの吸着媒もアパタイト構造を有するが吸着媒の化学的性質によってタンパク質の集積が調節されることを示唆した (Tsutsui S et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 106B, 2018)。

### (4) モデルタンパク質の集積に及ぼす溶液環境の影響

トリス-塩酸緩衝液を用い、BSA を吸着質、吸着媒 OCP として 37 °C における吸着を測定した。吸着量は平衡濃度の低濃度で急速に立ち上がるが、平衡濃度に対して一旦吸着量は減り、以降は吸着量が一定となる極大値を有するラングミュア型の吸着とは異なる吸着等温線が得られた。Raman 分光分析により吸着量と BSA によるアミド基由来の Raman 強度に関連性があるか解析したところ、等温線測定による吸着量増大の BSA 平衡濃度域では Raman 分光においても強度に変化が観察され相関性が確認された。吸着前後の X 線回折では結晶相に特段の変化は認められなかった。これらの結果から OCP 結晶周囲のイオン環境がタンパク質吸着に影響を及ぼすことが明らかとなった (濱井 瞭, 鈴木 治ほか, 日本セラミックス協会 2019 年年会, 2019 年 3 月; Hamai R, Suzuki O et al. Submitted 2019)。

以上、モデルタンパク質を用いた吸着媒の種類および吸着媒周囲の化学環境の検討からタンパク質集積に影響を及ぼす因子を明らかにした。結晶相や溶解性など材料の性状および材料周囲の化学環境がタンパク質集積を調節する因子と成り得ることから、免疫関連の因子集積のモデルおよび足場材料の設計論が得られた。今後免疫関連因子も含めた各種タンパク質の集積への応用と生体への適用へ展開していくことを考えている。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tsutsui S, Anada T, Shiwaku Y, Tsuchiya K, Yamazaki H, Suzuki O. Surface reactivity of octacalcium phosphate-derived fluoride-containing apatite in the presence of polyols and fluoride. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 106B:2235-2244, 2018. 査読有。  
DOI: 10.1002/jbm.b.34026

Tsutsui S, Anada T, Shiwaku Y, Yamagishi A, Suzuki O. Effect of Polyols on Phosphorus-Containing Calcium Fluoride Deposition on Hydroxyapatite. J Hard Tissue Biol 27:34-38, 2018. 査読有。  
DOI: doi.org/10.2485/jhtb.27.34

### 〔学会発表〕(計 5 件)

濱井 瞭, 土屋香織, 鈴木 治. 周囲のイオン濃度がリン酸八カルシウムのアルブミン吸着に及ぼす影響. 日本セラミックス協会 2019 年年会. 2019 年 3 月 25 日, 東京

鈴木 治, 穴田貴久, 塩飽由香利, 濱井 瞭. セラミックスバイオマテリアルの生体内表面応答について. 東北大学歯学研究科 - 東京工業大学未来産業技術研究所連携事業 第 6 回 IDEA(招待講演). 2018 年 4 月 27 日, 東京工業大学

酒井 進, 塩飽由香利, 穴田貴久, 鈴木 治. 合成方法の異なる OCP/ゼラチン複合体を用いたラット頭蓋骨形成能の評価. 日本セラミックス協会 2018 年年会. 2018 年 3 月 15 日, 仙台市

塩飽由香利, リンハオ・シャオ, 鈴木 治. リン酸オクタカルシウムの転換挙動が破骨細胞-骨芽細胞間クロストークに与える効果. 日本セラミックス協会 2018 年年会. 2018 年 3 月 15 日, 仙台市

酒井 進, 塩飽由香利, 穴田貴久, 鈴木 治. 様々な混和比で作製した OCP/ゼラチン複合体のラット頭蓋骨での骨形成能の評価. 日本歯科理工学会第 70 回 秋期学術講演会. 2017 年 10

年 15 日，新潟市

〔図書〕(計 2 件)

鈴木治，濱井瞭．再生医療の開発戦略と最新研究事例集 第 3 章 第 1 節 リン酸八カルシウム足場材料の開発とその応用．技術情報協会．pp.141-160，2019.

Suzuki O, Anada T. Biomineralization. Part V Biomineralization in Medical and Dental Sciences. 20 Enhancement of bone tissue repair by octacalcium phosphate crystallizing into hydroxyapatite in situ. Edits: K Kondo, K Kogure, H Nagasawa. Springer Open. 189-197, 2019. 査読有.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

江草 宏

EGUSA, HIROSHI

東北大学

大学院歯学研究科

教授

研究者番号：30379078

穴田 貴久

ANADA, TAKAHISA

九州大学

先導物質化学研究所

准教授

研究者番号：30398466

上家 潤一

KAMIIE, JUNICHI

麻布大学

獣医学部

准教授

研究者番号：10400269

松井 有恒

MATSUI, ARITSUNE

東北大学・歯学研究科

大学院歯学研究科

大学院非常勤講師

研究者番号：60547264

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。