

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18H05938・19K21104
 研究課題名(和文)骨形成因子結合多糖の空間分布が異なるリン酸八カルシウム表面での骨形成挙動解明

 研究課題名(英文)Elucidation of bone formation behavior on the surface of octacalcium phosphate with different spatial distribution of bone forming factor/polysaccharide complex

 研究代表者
 濱井 瞭 (Hamai, Ryo)

 東北大学・歯学研究科・助教

 研究者番号：00824004
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リン酸八カルシウム(OCP)表面からの骨形成タンパク質/グリコサミノグリカン(GAG)複合体の空間分布と細胞による骨形成挙動の関係を系統的に解明するためのモデルの構築条件を検討した。GAGにはコンドロイチン硫酸、BMPにはモデルタンパク質を用いて研究を実施した。その結果、OCPに修飾したアミノ基とコンドロイチン硫酸間の結合強度を制御することで、表面からのモデルタンパク質/GAGの溶出挙動を調節できることが示唆された。得られた知見を基に確立したモデルにより、骨組織のGAGを介したBMP保持や未分化細胞の活性化機構を模倣し、高い骨再生能を示す骨修復材料の創成に寄与できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨組織に含まれる多糖類であるグリコサミノグリカンと骨形成に寄与するタンパク質(BMP)の親和性に着目し、それらの複合体とリン酸八カルシウム(OCP)表面との化学結合の強さが異なる表面モデルを構築する条件を見出した。OCPは、骨補填材(人工骨)として応用されている材料である。本モデルを用いることで、骨修復材料の表面から周囲にかけてのBMPと複合化したグリコサミノグリカンの存在量の密度が骨組織を形成する細胞の活性化に及ぼす影響の解明に寄与できると考えられる。これにより、骨再生能の向上に最適な方法でBMPのみならず、関連組織の再生を促すタンパク質を担持した骨補填材開発への応用を拓くものである。

研究成果の概要(英文)：Present study examined that the conditions for construction of models to examine the relation between spatial distribution of bone morphological protein (BMP) /glycosaminoglycan (GAG) complex from the surface of octacalcium phosphate (OCP) and bone formation induced by osteoblastic cells. Chondroitin sulfate was selected as GAG. Model protein of BMP was applied in this study. The results suggest that the release behavior of model protein/GAG complex from the surface of OCP was regulated through the control of the binding strength between the chondroitin sulfate and amino groups modified on OCP. It is expected that the surface model established based on the finding of this study could contribute to the fabrication of bone substitute showing higher bone regeneration ability by mimicking storage of BMP in the bone tissue and stimulation mechanism of undifferentiated mesenchymal stem cells by BMP via GAG.

研究分野：生体材料工学

キーワード：人工骨補填材 表面化学修飾 リン酸八カルシウム グリコサミノグリカン タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

事故や疾病等により骨が重大な欠損を負った場合、これまでは、その治療法として自家骨移植が一般的であった。しかし、同治療法は、患者への侵襲性や供給量に限りがあるという問題がある。これを解決するため、ハイドロキシアパタイト ($\text{HA} : \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) を基材とした人工骨補填材が臨床応用されている。特に HA は、その表面に新生骨を形成し、周囲の骨組織と直接結合できる骨伝導性を発現する。また、HA の前駆体の 1 つであるリン酸八カルシウム ($\text{OCP} : \text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) は、優れた骨形成能を示すことが明らかにされている [1, 2]。生理的環境下で熱力学的に準安定な OCP は、より安定な HA に相変態する過程で、加水分解反応により、周囲のイオン濃度や pH を調節し、骨基質を産生する骨芽細胞の分化を促進することが報告されている [3]。骨組織は、無機成分であるアパタイトのみならずコラーゲンといった有機分子を含む、一種の有機-無機複合体である。また、コラーゲン以外にも、スルホ基やカルボキシル基に富む糖鎖であるグリコサミノグリカン (GAG) も有機成分として骨組織中に存在する [4, 5]。それら糖鎖の 1 つであるコンドロイチン硫酸は、骨形成タンパク質 (BMP) との親和性の高さにより、MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化およびその後の細胞増殖を亢進することが明らかとなっている [6]。すなわち、BMP が結合した GAG (BMP/GAG 複合体) を骨形成能に優れた OCP の表面に修飾することで、早期に骨欠損を治癒可能な有機無機複合型の骨修復材料を創成できると期待される。

2. 研究の目的

生体内の GAG は、BMP のみならず、アパタイトに対する親和性が高いことが報告されている [7]。また、GAG との複合化により、BMP のコンフォメーションが変化することが示唆されている [8]。このことから、GAG は、骨組織中のアパタイトに BMP を保持するとともに、細胞の活性化に適した BMP のキャリアとして機能すると考えられる。しかし、BMP/GAG 複合体のうち、骨組織表面に固定化されたままの状態、または表面から遊離した状態のどちらが骨芽細胞の機能調節に有効であるかは明らかとなっていない。この点を解明することで、材料界面設計の観点から骨形成のさらなる促進に有効な OCP の機能化に展開可能であると考えられる。そこで、本研究では、異なる強度の化学結合形成を OCP と GAG の間で実現し、系統的に GAG/BMP 複合体の空間分布と骨形成挙動の関係解明を可能とする表面モデルの確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) OCP 表面へのアミノ基修飾方法の検討

本研究では、表面にアミノ基を固定化することで、OCP 表面への GAG/BMP 修飾の起点とするものとした。OCP は、既報 [1] に従い、湿式法で合成したものを実験に供した。一級アミノ基を有する修飾分子としてアルコキシシラン誘導体もしくは、ホスホン酸誘導体を選択し、OCP 表面に安定してアミノ基を固定化できる修飾条件を検討した。作製した試料は、Raman 分光光度計、X 線光電子分光分析装置、X 線回折装置を用いて分析した。

(2) 異なる強度の結合を介した OCP 表面へのコンドロイチン硫酸の修飾

修飾したアミノ基とコンドロイチン硫酸の極性基の化学的活性化の有無により、異なる結合強度で OCP にコンドロイチン硫酸を修飾させることを試みた。特に、修飾方法および OCP 表面のアミノ基量が、その後のコンドロイチン硫酸の修飾量、および生理的環境下における修飾したコンドロイチン硫酸の残存量に及ぼす影響を検討した。コンドロイチン硫酸を修飾した試料の表面状態および、修飾量や残存量の分析には、Raman 分光光度計および熱重量示差熱量計を用いた。

(3) BMP モデルタンパク質/コンドロイチン硫酸の修飾およびタンパク質放出特性の評価

BMP のモデルとなる塩基性タンパク質を分子量や等電点の観点から選択し、実験に供した。異なる結合状態を介して OCP 表面に存在するコンドロイチン硫酸に対し、塩基性タンパク質を吸着させることで、BMP モデルタンパク質/GAG 複合体の OCP への複合化を試みた。また、OCP へのコンドロイチン硫酸の複合化条件が、塩基性モデルタンパク質の担持量および生理的環境下における溶出挙動に及ぼす影響を検討した。溶出挙動は、試料を浸漬した緩衝液中のタンパク質濃度を経時的に測定することで評価した。

4. 研究成果

(1) OCP 表面へのアミノ基修飾方法の検討

ホスホン酸誘導体もしくは、アルコキシシラン誘導体を溶解した有機溶媒で処理した試料を X 線光電子分光法やラマン分光分析法により分析した結果、OCP 表面にそれぞれのアミノ基含有分子が修飾されたことが確認された。しかし、アルコキシシラン誘導体は、生理的環境下での安定性に乏しく OCP 表面での残存量が低い傾向にあった。

さらに、修飾したアミノ基含有分子と OCP の結合安定性を向上させるため、ホスホン酸誘導体での処理後に加熱処理を施し、OCP の結晶構造を維持したまま安定してアミノ基を修飾可能な条件を見出した。また、修飾したアミノ基含有分子の安定性とコンドロイチン硫酸との化学結合形成の両立が可能な溶液環境の最適化を試みた。その結果、溶液の OCP に関する過飽和度によって表面に残存するアミノ基の割合をさらに調節できることが示唆された。

(2) 異なる強度の結合を介した OCP 表面へのコンドロイチン硫酸の修飾

上記で見出した条件を基に、化学的に活性化させたコンドロイチン硫酸の極性基と OCP 表面に修飾したアミノ基を反応させた。得られた試料の Raman スペクトルから、活性化処理の有無によらず OCP 表面にコンドロイチン硫酸が修飾されたことが確認された。さらに、コンドロイチン硫酸の修飾量は、OCP の表面に修飾したアミノ基量によっても変化した。生理的環境を模した緩衝液中では、活性化処理の有無によって、OCP 表面に残存するコンドロイチン硫酸の割合が異なる傾向にあった。これらの結果から、異なる結合強度の化学結合を介して OCP 表面にコンドロイチン硫酸が修飾されたことが示唆された。

(3) BMP モデルタンパク質/コンドロイチン硫酸の修飾およびタンパク質放出特性の評価

アミノ基を介してコンドロイチン硫酸を修飾した OCP と未修復のものとは、BMP モデルタンパク質の吸着量が異なる傾向にあった。また、コンドロイチン硫酸とアミノ基間の結合状態のみならず、OCP 表面に修飾したアミノ基量もモデルタンパク質の吸着量の調節に寄与した。また、試料浸漬後の生体環境を模倣した緩衝液中のタンパク質濃度変化の比較により、コンドロイチン硫酸とアミノ基間の結合状態がモデルタンパク質の放出挙動に影響を及ぼすことが推測された。

以上の結果から、本研究では、異なる強度の化学結合を形成させることで、GAG の溶出挙動を介して表面からの BMP/GAG の空間分布を制御可能なモデルを確立できる可能性を見出した。今後は、同モデルを基に、実際の骨形成因子を担持した場合にて、OCP 表面のアミノ基とコンドロイチン硫酸間の結合状態が未分化な間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を *in vitro* で検討することを計画している。本研究の成果を基に確立したモデルによって、骨組織の GAG を介した BMP 保持や BMP による細胞の活性化機構を模倣し、より高い骨組織修復機能を示す骨修復材料の創成に寄与できると期待される。

参考文献

- [1] O Suzuki, M Nakamura, Y Miyasaka, M Kagayama, M Sakurai. Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite, *Tohoku J Exp Med* 164:37-50 (1991).
- [2] T Sato, T Anada, R Hamai, Y Shiwaku, K Tsuchiya, S Sakai, K Baba, K Sasaki, O Suzuki. Culture of hybrid spheroids composed of calcium phosphate materials and mesenchymal stem cells on an oxygen-permeable culture device to predict *in vivo* bone forming capability. *Acta Biomater* 88:477-490 (2019).
- [3] O Suzuki, S Kamakura, T Katagiri, M Nakamura, B Zhao, Y Honda, R Kamijo. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* 27:2671-2681 (2006).
- [4] ER Wise, S Maltsev, ME Davies, MJ Duer, C Jaeger, N Loveridge, RC Murray DG Reid. The organic-mineral interface in Bone is predominantly polysaccharide. *Chem Mater* 19:5055-5057 (2007).
- [5] M Wojtas, AJ Lausch, D Sone. Glycosaminoglycans accelerate biomimetic collagen mineralization in a tissue-based *in vitro* model. *Proc Natl Acad Sci USA* 117:12636-12642 (2020).
- [6] T Miyazaki, S Miyauchi, A Tawada, T Anada, S Matsuzaka, O Suzuki. Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation, *J Cell Physiol* 217: 769-777 (2008).
- [7] SG Rees, WD Hughes, G Embery. Interaction of glucuronic acid and iduronic acid-rich glycosaminoglycans and their modified forms with hydroxyapatite. *Biomaterials* 23:481-289 (2002).
- [8] V Hintze, SA Samsonov, M Anselmi, S Moeller, J Becher, M Schnabelrauch, D Scharnweber, MT Pisabarro. Sulfated glycosaminoglycans exploit the conformational plasticity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and alter the interaction profile with its receptor. *Biomacromolecules* 15:3083-3092 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryo Hamai, Kaori Tsuchiya, Osamu Suzuki	4. 巻 67
2. 論文標題 Effect of Surrounding Chemical Environment on Adsorption and Accumulation of Serum Protein onto Octacalcium Phosphate Crystals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Society of Powder and Powder Metallurgy	6. 最初と最後の頁 258 ~ 263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2497/jjspm.67.258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryo Hamai, Kaori Tsuchiya, Susumu Sakai, Osamu Suzuki
2. 発表標題 Comparative study of capacity of protein adsorption onto octacalcium phosphate prepared by different synthesis conditions
3. 学会等名 The 15th International Workshop on Biomaterials in Interface Science, The 11th Symposium on Innovative Dental-Engineering Alliance (IDEA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱井 瞭, 土屋香織, 酒井 進, 鈴木 治
2. 発表標題 タンパク質吸着能の変化がリン酸八カルシウムの溶解性に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 日本セラミック協会第33回秋季シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋 香織, 濱井 瞭, 酒井 進, 鈴木 治
2. 発表標題 天然高分子との共沈により調節されるリン酸八カルシウム結晶の溶解性とタンパク質吸着挙動
3. 学会等名 日本セラミック協会2020年年会（誌上发表）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Hamai, Kaori Tsuchiya, Osamu Suzuki
2. 発表標題 Dual Effect of Serum Protein Adsorption on Additional Crystal Formation on Octacalcium Phosphate in Supersaturated Condition
3. 学会等名 The 19th Asian Bioceramics Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱井 瞭, 土屋 香織, 鈴木 治
2. 発表標題 過飽和溶液中で血清タンパク質が吸着したリン酸八カルシウム表面での新生結晶形成挙動
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱井 瞭, 土屋 香織, 鈴木 治
2. 発表標題 リン酸八カルシウム結晶周囲の化学環境が血清タンパク質吸着と集積に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2019 年度秋季大会 (第124 回講演大会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 鈴木 治, 濱井 瞭	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 12
3. 書名 無機/有機材料の表面処理・改質による生体適合性付与 第6章 リン酸オクタカルシウム(OCP)の骨再生などへの応用	

1. 著者名 鈴木 治, 濱井 瞭	4. 発行年 2019年
2. 出版社 情報技術協会	5. 総ページ数 420
3. 書名 再生医療の開発戦略と最新研究事例集	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------