

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19890

研究課題名（和文）結晶配向性を制御した水酸アパタイトに吸着する血清タンパク質のプロテオーム解析

研究課題名（英文）Proteome analysis of serum proteins adsorbed on hydroxyapatite with controlled crystal orientation

研究代表者

川下 将一（Kawashita, Masakazu）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：70314234

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）：m面を多く露出した水酸アパタイト粉末（m-HAp）、c面を多く露出した水酸アパタイト粉末（c-HAp）および配向性を制御していない水酸アパタイト粉末（i-HAp）には、それぞれ38種類、33種類、24種類の血清タンパク質が吸着した。また、ビタミンD結合タンパク質、トランスサイレチン、リアノジン受容体2、アポリポタンパク質E、ケラチンの5種類のタンパク質が骨伝導性に関与する可能性が見出された。さらに、PANTHERによる代謝経路解析やGene Ontologyによる細胞構成要素分類においても、m-HAp、c-HApおよびi-HApの間には違いがあることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水酸アパタイトの骨結合性発現機構に関する従来研究の多くは細胞レベルでの検討・議論であり、本研究のように原子（結晶構造）・分子（タンパク質）レベルから水酸アパタイトの骨結合機構の解明に挑む研究はほぼ皆無である。今後検討すべき課題は数多いが、水酸アパタイトの骨結合性発現に関与するタンパク質候補として5種類のタンパク質が見出された点において、本研究を遂行した学術的・社会的意義は十分にある。また、本研究の成果は、生体-バイオマテリアルの界面科学に重要な知見を与え、生体材料学・プロテオミクス・医歯学の異分野融合型学問領域の創出に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We found that 38, 33, and 24 serum proteins adsorbed on Hydroxyapatite powders orientated to the c-axis (m-HAp), those orientated to the a(b)-axis (c-HAp), and commercially available hydroxyapatite powders without crystal orientation control (i-HAp), respectively. Among them, the proteins that did not adsorb on i-HAp but adsorbed on m-HAp or c-HAp were selected, and their biological functions were investigated through a literature search. As a result, five kinds of proteins (vitamin D binding protein, transthyretin, ryanodine receptor 2, apolipoprotein E, and keratin) were selected as candidate proteins that are related with osteoconductivity of hydroxyapatite. In addition, it was found that there are some differences among m-HAp, c-HAp and i-HAp in metabolic pathway analysis by PANTHER and cell component classification by Gene Ontology.

研究分野：生体材料学

キーワード：水酸アパタイト 血清タンパク質 プロテオーム解析 結晶配向性 吸着

### 1. 研究開始当初の背景

水酸アパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) は骨欠損部に埋入されると周囲の骨と結合する。この水酸アパタイトの骨結合性は 1970 年代後半に見出されたが、水酸アパタイトの分子レベルでの骨結合性発現機構は未だに不明であり、生体材料学の成書では「水酸アパタイトは、骨の無機成分であるため、その表面で骨芽細胞が骨を形成し、その結果、骨と結合する」といった、現象論的記載に留まっている。また、バイオマテリアルと骨との界面反応に関する研究報告は数多くあるが、骨形成や骨リモデリングに関する細胞の接着・増殖・分化といった、細胞レベルでの検討・議論が多い[1]。すなわち、水酸アパタイトの骨結合性発現機構の分子レベルでの理解は、未だにほとんど進んでいない。

### 2. 研究の目的

バイオマテリアルを体内に埋入すると、最初にバイオマテリアル表面にタンパク質が吸着する。従って、このタンパク質の初期吸着が、その後の細胞レベルのイベントを制御している可能性が高い。水酸アパタイトは、図 1 に示すような結晶構造を取り、その *m* 面には  $\text{Ca}^{2+}$  が多く存在するため、*m* 面は正に帯電し、*c* 面には  $\text{PO}_4^{3-}$  や  $\text{OH}^-$  が多く存在するため、*c* 面は負に帯電すると考えられている[2]。一方、骨結合性を示さないセラミックスの一つであるアルミナ ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) は、水酸アパタイトのような結晶面による帯電の違いはない。

そこで応募者は、水酸アパタイトの骨結合性発現機構に関する 2 つの仮説

- 仮説(1) 水酸アパタイトとアルミナの間で吸着タンパク質の種類・量・機能に違いがあり、それが骨結合性の発現を左右する。
- 仮説(2) 水酸アパタイトの *a* 面と *c* 面の間で吸着タンパク質の種類・量・機能に違いがあり、それが水酸アパタイトの骨結合性の発現に寄与する。

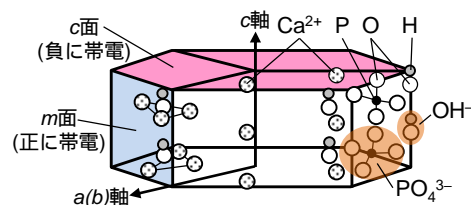


図 1 水酸アパタイトの結晶構造

を立てて研究を進めてきた。

これまでに応募者は、水酸アパタイトとアルミナに吸着した血清タンパク質のプロテーム解析および細胞を用いた評価を行い、82 種類の血清タンパク質が水酸アパタイトに選択的あるいは優先的に吸着する、その中では肝細胞増殖因子およびアンジオポエチン様タンパク質-3 (ANGPTL3) が骨結合性発現に寄与している可能性がある、ANGPTL3 が骨芽細胞様細胞の接着・増殖を促進するといった、仮説(1)の一部を裏付ける知見を得た[3]。そこで本研究では、仮説(2)の吸着タンパク質の種類・量・機能の違いをプロテオーム解析によって明らかにし、最終的には水酸アパタイトの骨結合性発現機構をその結晶構造とタンパク質吸着の観点から解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

尿素を用いた均一沈殿法あるいは尿素とウレアーゼとの酵素反応により、結晶配向性を制御した水酸アパタイトを作製し、*m* 面を多く露出させた水酸アパタイトを *m*-HAp、*c* 面を多く露出させた水酸アパタイトを *c*-HAp とした。また、参照試料として、結晶配向性を制御していない、市販の水酸アパタイト粉末 (HAP-200、太平化学産業、大阪) を準備し、これを *i*-HAp とした。

これら 3 種類のサンプルを 36.5°C のラット血清に 24 時間浸漬し、その後、タンパク質分解酵素抑制剤添加塩酸グアニジン - トリス溶液に攪拌下、浸漬した。これを遠心分離し、傾斜法により上澄みを取り除いた後、塩酸グアニジン - EDTA 溶液を加え、攪拌浸漬した。このようにして得られた試料を脱塩・バッファー交換用遠心分離型カラムに充填し、吸着タンパク質を回収した。

このようにして得られた吸着タンパク質をポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) に付すことにより、吸着タンパク質の分子量分布を調べた。次に、SDS-PAGE で得られたゲルを液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析 (LC/MS/MS) に付すことにより、吸着タンパク質の同定・半定量を行った。LC/MS/MS 分析により判明した吸着タンパク質について、遺伝子オントロジーによって機能を解析し、さらに PANTHER 分類システムによって代謝経路を解析した。

### 4. 研究成果

図 2 にサンプルの走査型顕微鏡 (SEM) 写真、図 3 にサンプルの粉末 X 線回折 (XRD) パターンを示す。SEM 写真 (図 2) によれば、*c*-HAp は板状粒子、*m*-HAp は柱状粒子、*i*-HAp は微細な柱状粒子の凝集体からなっていた。また、XRD パターン (図 3) から、Lotgering 法により各試料の *m* 面 Lotgering 係数あるいは *c* 面 Lotgering 係数を求めると、表 1 のようになった。これらの結果より、*c*-HAp、*m*-HAp および *i*-HAp は、結晶配向性の異なる水酸アパタイトからなっていることが確認できた。

SDS-PAGE の結果の例を図 4 に示す。これより、サンプルに吸着した血清タンパク質の分子量

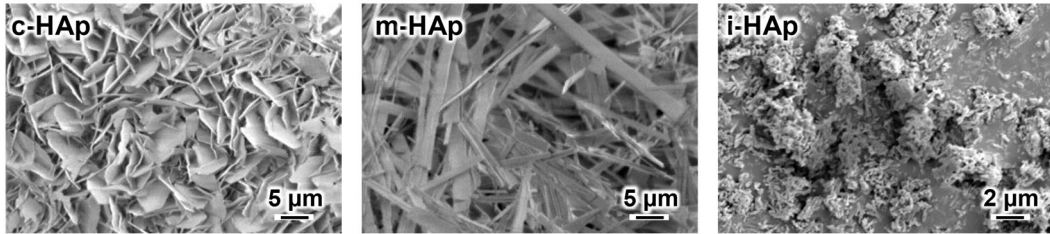


図2 試料のSEM写真

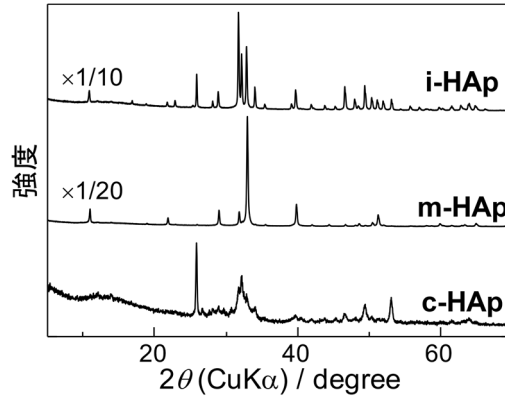


図3 試料のXRDパターン

表1 試料の配向度

試料	各結晶面の割合 / %			m面Lotgering係数 / %	c面Lotgering係数 / %
	m面	c面	その他の面		
i-HAp	15.3	8.9	75.8	0	0
m-HAp	53.8	1.5	44.7	45.4	—
c-HAp	3.6	22.9	73.5	—	15.3

は概ね 10,000 ~ 250,000 の範囲にあることが分かった。

m-HAp、c-HAp および i-HAp には、それぞれ 38 種類、33 種類、24 種類の血清タンパク質が吸着することが明らかとなった(図5)。この中から、i-HAp には吸着しないが c-HAp には吸着するタンパク質(13 種類)と、i-HAp には吸着しないが m-HAp には吸着するタンパク質(17 種類)について文献等によって機能を検討したところ、ビタミン D 結合タンパク質、トランスサイレチン、リアノジン受容体 2、アポリポタンパク質 E、セラチンの 5 種類のタンパク質が水酸アパタイトの骨結合性に関する可能性が見出された。また、PANTHER による代謝経路解析や Gene Ontology による細胞構成要素分類においても、m-HAp、c-HAp および i-HAp の間には

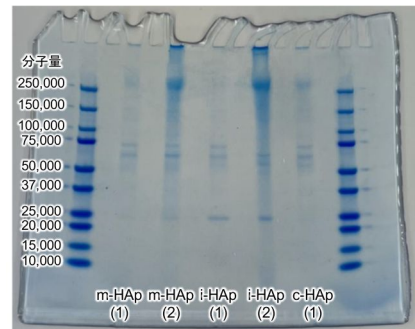


図4 SDS-PAGEの結果(例)

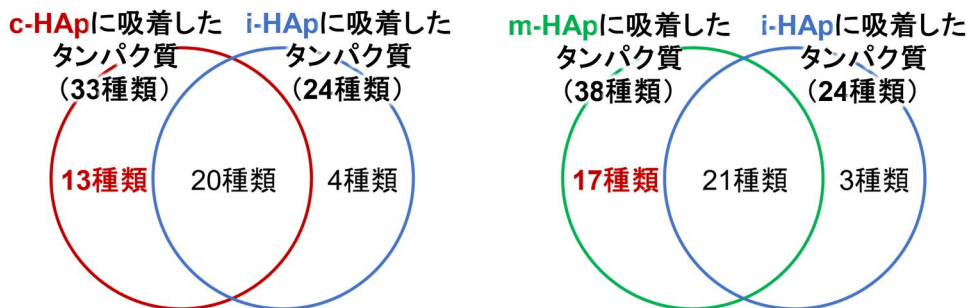


図5 サンプルに吸着した血清タンパク質の種類の数

違いがあることが分かった。以上より、結晶配向性の異なる水酸アパタイトに吸着し、その骨結合性に関する可能性のある、5種類のタンパク質を見出すことができた。

今後、これら5種類のタンパク質を吸着させた水酸アパタイト上で培養した骨芽細胞や破骨細胞の接着・伸展・増殖・分化等を調べることにより、これらタンパク質が骨系細胞に及ぼす影響が明らかになると期待される。また、水酸アパタイトの結晶配向性の違いがその骨結合性に及ぼす影響も明らかにする必要がある。

< 引用文献 >

- [1] D. A. Puleo and A. Nanci, Understanding and controlling the bone-implant interface, *Biomaterials*, 20, 1999, 2311-2321.
- [2] T. Kawasaki, Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing, *J. Chromatogr. A*, 544, 1991, 147-184.
- [3] M. Kawashita, Y. Wang, Y. Yoshida, J. Kamiie, Y. Shiwaku and O. Suzuki, Proteome analysis of serum proteins adsorbed on hydroxyapatite and alumina for identification of proteins to trigger osteoconductivity, The 31st Symposium & Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 31), November 17, 2019, Crowne Plaza, New Orleans Airport, New Orleans, USA.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Wang Yunting, Tsuru Kanji, Ishikawa Kunio, Yokoi Taishi, Kawashita Masakazu	4. 巻 47
2. 論文標題 Fibronectin adsorption on carbonate-containing hydroxyapatite	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ceramics International	6. 最初と最後の頁 11769 ~ 11776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceramint.2021.01.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 WANG Yunting, YOSHIDA Yutaka, KAMIIE Junichi, SHIWAKU Yukari, SUZUKI Osamu, FURUYA Maiko, YOKOTA Kotone, KANETAKA Hiroyasu, YOKOI Taishi, KAWASHITA Masakazu	4. 巻 40
2. 論文標題 Proteomic identification of serum proteins to induce osteoconductivity of hydroxyapatite	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 1428 ~ 1436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-120	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 -

1. 著者名 川下 将一、横井 太史	4. 巻 36
2. 論文標題 たんぱく質の特異的吸着に着目した水酸アパタイトの骨伝導機構の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Glass	6. 最初と最後の頁 11 ~ 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川下 将一
2. 発表標題 タンパク質吸着に基づくアパタイトの骨伝導機構解明への挑戦
3. 学会等名 日本歯科理工学会令和3年度関東地方会夏期セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川下 将一
2. 発表標題 セラミックスを基盤とした歯科用マテリアルに関する研究
3. 学会等名 日本歯科理工学会第78回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容 / 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 無機生体材料学分野（川下研究室）  
<https://www.tmd.ac.jp/bcr/research.html>

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
研究分担者	横井 太史  (Yokoi Taishi)  (00706781)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授   (12602)	

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
---------	---------