

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791969

研究課題名（和文）組織工学的手法によって再生した骨に含まれる骨シアロタンパクの糖鎖構造と機能解析

研究課題名（英文）

The analysis of bone sialoprotein of function and sugar chain in tissue engineered bone.

研究代表者

土屋 周平 (Shuhei Tsuchiya)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20569785

研究成果の概要（和文）：組織工学的手法によって再生した骨と自然発生した骨に含まれている骨シアロタンパクの発現を確認し、その分子量が異なっていることが明らかにされた。そして、再生骨より単離した骨シアロタンパクを含んでいるタンパク質がハイドロキシアパタイトと結合する能力が、自然発生した骨よりも劣っていることが明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：Bone sialoprotein (BSP) in tissue engineered bone has high molecular weight compared with nature protein. Eluted protein from tissue engineered bone bond low affinity against hydroxyapatite compared with that of nature bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物系

科研費の分科・細目：医歯薬学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：組織工学、骨再生、骨シアロタンパク

## 1. 研究開始当初の背景

骨欠損に対する既存の治療法を改善するために細胞、担体、成長因子の3つの因子を組み合わせた組織工学的手法による細胞移植治療が検討されてきた(図1)。今までの治療方法と異なり、この手法による骨の再生医療は、患者自身の細胞を用いるため、免疫原性がなく安全、細胞採取にあたり患者への侵襲が少ない等の長所がある。これらの利点から数多くの研究結果が報告され、すでに臨床応用においても良好な治療成績をおさめている医療機関もある。当研究機関でも、骨髄間質細胞、 $\beta$ -リン酸三カルシ

ウム(b-TCP)、成長因子として多血小板血漿(PRP)を用いた組織工学的手法により骨再生の可能性を示唆し、顎骨再生におけるトランスレーショナルリサーチにおいても良好な結果を報告してきた。しかしながら、この再生した骨の評価は組織学的評価と一部の骨関連タンパク質の発現量の比較に限られており、生物学的な解析は動物実験においてですら不十分である。特に、再生した骨に含まれているタンパク質の構造や機能に関しては明らかにされていない部分が多い。この点に関しては他の組織工学的手法によって再生された骨におい

でも同様である。

骨形成は、コラーゲンを主体とする有機基質へのカルシウム沈着が特徴的であり、多くの非コラーゲン性タンパク質により微妙に調節されているものと考えられている。非コラーゲン性タンパク質のなかで最も豊富に骨に存在しているものはBSPである。BSPは酸性のリン酸化タンパクであり、I型コラーゲンと高い親和性を有し、結合することによって石灰化を促進することが知られている。また、細胞接着に関与するRGD配列が存在することも明らかにされている。さらに、BSPタンパク質は、その機能に大きな影響を与える翻訳後修飾を引き起こすことが知られており、骨形成に多くの機能を有していると考えられる。この翻訳後修飾は、アミノ酸配列の側鎖に多くの有機物を付加することであり、タンパク質はこれらの付加があることによってはじめて機能を持つようになる。しかしながら、翻訳後に付加される糖鎖構造は細胞の環境や状態によって大きく変化することが知られており、特に培養細胞では構造が大きく異なる。組織工学的手法による骨組織再生は、移植する細胞を増殖させる過程が必須であるため、再生した骨における糖鎖構造が自然発生した骨とは大きく異なり、その機能も変化すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨組織に最も豊富に含まれている非コラーゲン性タンパク質である骨シアロタンパクに着目し、再生した骨におけるその糖鎖構造と機能解析を行うことである。

## 3. 研究の方法

(1)自然発生したラット大腿骨から、4M グアニジン塩酸塩にてタンパク質を抽出した後に、0.6N 塩酸を用いてBSPを含むカルシウム結合タンパク質を抽出した。抽出したのちに透析を行い、脱塩したのちに凍結乾燥を行った。

(2)ラットの骨髄間質細胞を使って組織工学的手法を用いた再生骨を作製した。担体には $\beta$ -TCPを用いて背部皮下に移植を行った。そして組織学的評価を行い、骨が再生されていることを確認したのちに、自然発生した骨と同様にBSPを含むカルシウム結合タンパク質を抽出した。

(3)再生した骨と自然発生した骨より抽出したカルシウム結合タンパク質をSDS-PAGEにて分離し、クマシーブリリアントブルー染色とステインズオール染色を行うことにより抽出したタンパク質の分離を行った。

(4)再生した骨と自然発生した骨のタンパク質サンプルをBSP抗体にてウェスタンブロットを行い、その分子量を同定した。

(5)再生骨に含まれている細胞からRNAの抽出を行い、BSPのRT-PCRを行った。さらに、ダイターミネーター法を用いて、塩基配列の確認を行った。

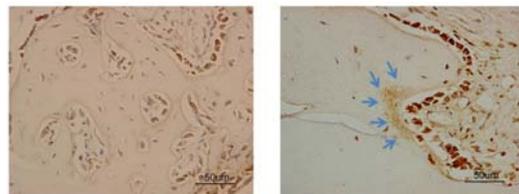
(6)HPLCとハイドロキシアパタイトカラムを用いて、再生骨と天然骨のカルシウム結合タンパクがハイドロキシアパタイトと結合する能力を比較した。

## 4. 研究成果

(1)過去の報告にしたがってラット大腿骨からタンパク質を抽出した。抽出した質量を計測したところ、過去の報告と大きな差は認められなかった。

(2)ラット大腿骨から骨髄間質細胞を単離し、通法に従い培養を行った。3継代目まで細胞を培養したのちに $\beta$ -TCPとフィブリンノーゲンを加えたのちにラット背部皮下に移植を行った。4週後に再生した骨を取り出し、大腿骨と同様にタンパク質抽出した。また、再生した骨組織を組織学的に観察し、骨が再生されていることを確認し、BSPの発現が認められることを確認した。また、組織学的に再生した骨と天然骨に大きな違いはなかった。

### BSP免疫組織化学染色

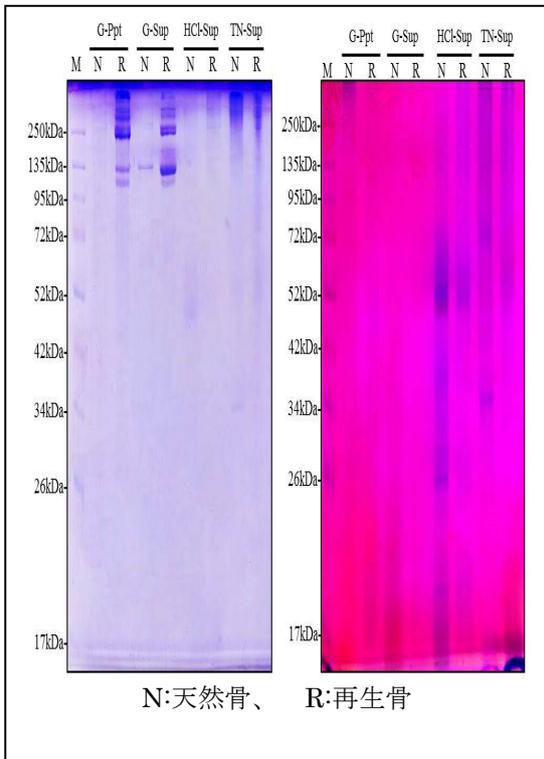


天然骨

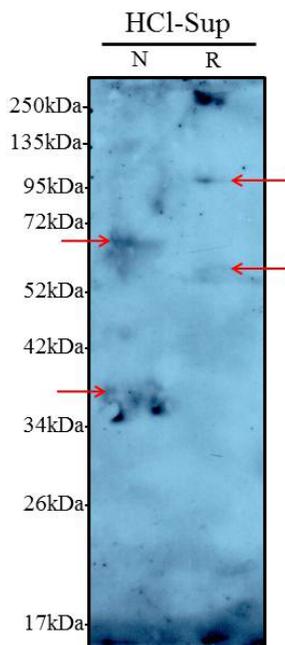
再生骨

(3)天然骨(N)と再生骨(R)の各抽出画(G-Ppt; 4M グアニジン沈殿物, G-Sup; 4M グアニジン上清, HCl-Sup; 0.6N 塩酸, TN-Sup; 20mM トリス-2M 塩化ナトリウム)を電気泳動にて分離し、CBB染色とStains All染色を行ったところ、NとRでは明らかに異なる発現が認められた。特に、グアニジン抽出分画では、再生骨に100kDa以上のタンパク質の発現が明らかに多く含まれており、Ca結合タンパク以外のタンパク質が多く含まれていることが明らかになった。また、HCl分画では、Stains-All染色では40kDa以下のタンパク質

が天然骨に多く含まれていることが明らかとなった。  
 これらのことから、再生骨と天然骨を構成しているタンパク質の成分が異なっていることが明らかとなった。

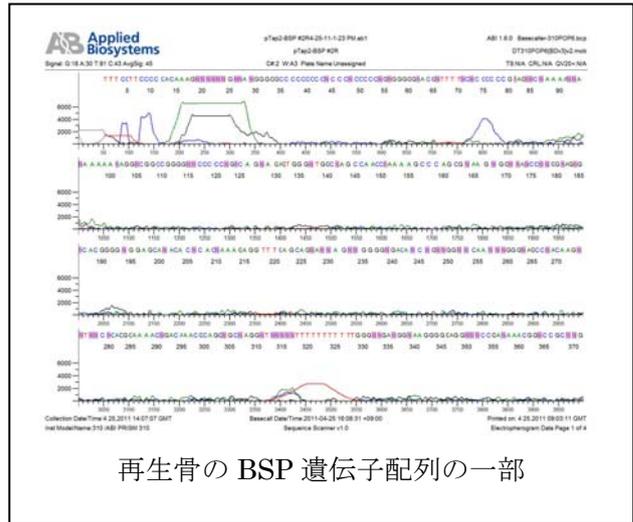


(4)天然骨と再生骨に含まれる BSP タンパク質の分子量の同定を行なったところ、天然骨に含まれている BSP は 67kDa と 32kDa に認められ、再生した骨に含まれる BSP は 110kDa と 55kDa 付近に認められた (矢印)。これらの分子量の違いは、糖鎖構造の違いによるものであると考えられた。



N:天然骨、 R:再生骨

(5)天然骨より抽出した RNA と再生骨より抽出した RNA を cDNA に置換した後、BSP の全長の RT-PCR を行なったところ、塩基対のおおきさに違いは認められなかった。さらに、ダイターミネーター法によって塩基配列を確認したところ、天然骨の塩基配列と違いは認められなかった (既知の塩基配列)。これらのことから、BSP タンパク質の質量の違いは、BSP 遺伝子の転写からの問題ではなく、アミノ酸に翻訳された後の翻訳後修飾によるものであることが示唆された。



(6)ハイドロキシアパタイトカラムと HPLC を用いて、再生骨に含まれているタンパク質と天然骨に含まれているタンパク質の HCl 分画から抽出したタンパク質とのハイドロキシアパタイトの結合能力を評価したところ、塩を含むバッファーにて溶出した際に、保持時間が、再生骨に含まれる HCl 分画の方が短いことが明らかとなった。再生骨から抽出したタンパク質が結合する能力が低いことが示唆された。

以上の結果から組織工学的手法を用いて再生した骨は天然骨と比較して分子量が異なっており、ハイドロキシアパタイトと結合する能力が低いことが明らかになり、再生骨は天然骨と比較して高度が落ちていることが明らかになった。  
 しかしながら機能解析は行われたものの、糖鎖構造の決定までには至らなかったため、今後のさらなる詳細な解析が必要となる。

今後の研究計画としては、再生骨から抽出したタンパク質の網羅的解析 (プロテオミクス解析) をおこない、再生した骨のタンパク質のプロファイリングを行う。この研究を行うことによってさらに、再生した骨の機能が明らかになると思われる。さらに、BSP タンパク質の糖鎖構造を決定することにより、BSP

に修飾されている糖鎖の機能が明らかになると考えられる。機能解析に関しては、今回はタンパク質のカルシウム結合能の解析のみであったが、培養細胞への影響、他のタンパク質との相互作用の検討など、今後解析することは多岐にわたる。これら機能を解析することにより、再生した骨に含まれているBSP タンパク質のカルシウム結合能を向上させ、より物理的強度の高い再生骨を作製する可能性が示唆される。

研究者番号：

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (Dspp) to generate dentin phosphoprotein (Dpp). Tsuchiya S, Simmer JP, Hu JC, Richardson AS, Yamakoshi F, Yamakoshi Y. J Bone Miner Res. 査読あり 2011 Jan;26(1):220-228.

(2) Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. Honda MJ, Imaizumi M, Suzuki H, Ohshima S, Tsuchiya S, Satomura K. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 査読あり 2011 Jun;111(6):700-708.

(3) An experimental study of bone healing around the titanium screw implants in ovariectomized rats: enhancement of bone healing by bone marrow stromal cells transplantation. Okamoto Y, Tateishi H, Kinoshita K, Tsuchiya S, Hibi H, Ueda M. Implant Dent. 査読あり 2011 Jun;20(3):236-245.

〔学会発表〕(計1件)

土屋 周平, Improvement of Implant Stability with CM, 第41回日本口腔インプラント学会総会, 2011年9月17日, 名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 周平 (Shuhei Tsuchiya)

研究者番号：20569785

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし  
( )