

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462968

研究課題名(和文) オッセオインテグレーションを形成するタンパク質の解析

研究課題名(英文) The analysis of the protein in osseointegration

研究代表者

土屋 周平 (Tsuchiya, Shuhei)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20569785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：チタン製インプラントがオッセオインテグレーションを獲得したとき、プロテオグリカンを含むアモルファスレイヤーと呼ばれる層が形成される。本研究では、この中に含まれているタンパク質を網羅的に解析することを目的とした。タンパク質はブタの下顎骨から抽出した。この抽出したタンパク質を二酸化チタンを担体としたクロマトグラフィー法を用いて、チタンに結合するタンパク質を分離した。タンパク質の同定には質量分析器を用いた。二酸化チタンと直接結合するタンパク質は約3000種あった。その中にはプロテオグリカン以外のタンパク質も認められた。今後は、これら同定できたタンパク質の機能解析を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：Osseointegration is the structural and functional connection between bone tissues and implants such as titanium dioxide (TiO₂). The bone-TiO₂ interface is thought to contain proteoglycans. However, exhaustive analysis of the proteins in this layer has not been performed. In this study, we evaluated the bone protein adhered on the surface of TiO₂ comprehensively. Pig bone protein was extracted by sequential elutions with guanidine, 0.1 M EDTA, and again with guanidine. The proteins obtained from these extractions were allowed to adhere to an HPLC column packed with TiO₂ and were eluted with 0.2 M NaOH. The eluted proteins were identified by LC/MS/MS and included not only proteoglycans but also other proteins such as extracellular matrix proteins, enzymes, and growth factors. Calcium depositions were observed on TiO₂ particles incubated with bone proteins, guanidine-extracted proteins adhered to TiO₂ displayed significantly high amounts of calcium depositions.

研究分野：インプラント

キーワード：オッセオインテグレーション タンパク質解析

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療は、歯科臨床において一般的な治療方法として普及しており、多くの患者の咀嚼機能再建に貢献している。その一方で、インプラントと顎骨の結合ができずに治療の失敗や経過観察中におけるインプラントの脱落などが認められるのも事実である。インプラント治療の失敗を未然に防ぐために術前検査がされているが、一般歯科診療所で普及している検査はレントゲンによる骨量、骨質の検査のみである。一部の医療機関で一般血液検査、金属アレルギー、骨代謝マーカーなどの検査を行なわれているが、これら検査の有用性は今後の臨床における経過観察で明らかにされていく予定であるのが現状である。また、インプラント治療失敗の原因は、不適切な咬合付与、清掃状態の不良、不適切な外科手技などと考えられているが、後向きに考察しているのみで、前向きな指標として確立しているものはない。

インプラント治療の成功の鍵となっているのは、オッセオインテグレーションと呼ばれる骨とチタンの結合である。この界面を電子顕微鏡で観察した際に、50-500nmの間隙が観察される。この間隙には糖鎖が存在し、チタン表面には骨に含まれるプロテオグリカンが結合していると考えられている。

定義が明らかにされていないということは、オッセオインテグレーションの成否を示すマーカーが存在しないということと同義である。これではインプラントに関する検査を行うことすらできない状況である。

本研究に関連する国内・国外の研究動向は、チタンと骨の界面を電子顕微鏡などによる組織形態学的な解析が主に行われてきた。近年、*in vivo*の実験では、チタンインプラント表面に付着した細胞の骨関連遺伝子発現を調べた報告がある。また、*in vitro*のタンパク質レベルでの実験では、カルシウムイオンを介して糖鎖や、アルブミンやフィブロネクチンが結合しているという報告が見られる。さらに、デコリンなどのプロテオグリカンを介してコラーゲンが付着していると予想する報告もある。一方で近年、生化学分野ではタンパク質を精製するために2酸化チタンを担体としたクロマトグラフィーが応用されている。これらの報告では2酸化チタンに酸性タンパク質やリン酸化タンパク質が選択的に付着するとの報告もあり、チタンと結合するプロテオグリカン以外のタンパク質が見つかる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

そこで、本研究の最終的な目的は、オッセオインテグレーションの定義を明確にし、臨床検査のマーカーを探索することである。

3. 研究の方法

ブタの下顎骨からタンパク質を段階的に抽出し、クロマトグラフィー法と質量分析法を

用いてチタンに結合可能なタンパク質の同定を行う。

チタンに結合したタンパク質の機能解析を行う。機能解析は石灰化能を調べる。方法は、走査型電子顕微鏡を用いて石灰化沈着の有無を確認する。

4. 研究成果

ブタの下顎骨を4M グアニジン塩酸塩 (G1S)、0.1MEDTA (E-Sup)、4M グアニジン塩酸塩 (G2S) の各溶液でタンパク質を抽出した。

(1) 2 酸化チタンに結合する骨由来タンパク質の同定

2 酸化チタン粉末を担体にしたクロマトグラフィーで2酸化チタンとタンパク質を結合させた。0.2MNaOHで2酸化チタンに結合したタンパク質を溶出し質量分析計で同定した (表1、2、3)。

G1S proteins immobilized on TiO ₂ , as detected by LC/MS/MS			
#	Accession no	Protein	emPAI
1	P02067	Hemoglobin subunit beta	30.17
2	P08835	Serum albumin	21.95
3	P089571	Serotransferrin	21.67
4	P01846	Ig lambda chain	14.46
5	O97788	Fatty acid-binding protein, adipocyte	5.55
6	P50828	Hemopexin	4.26
7	Q8SP57	Haptoglobin	4.21
8	P01965	Hemoglobin subunit alpha	4
9	Q2K157	Tetranectin	2.5
10	P18648	Apolipoprotein A-1	2.24
11	P50447	Alpha-1-antitrypsin	2.12
12	P19620	Annexin A2	1.76
13	Q49135	Galectin-1	1.53
14	P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1.44
15	P02080	Hemoglobin subunit beta-C(NA)	1.43
16	P18650	Apolipoprotein E	1.19
17	Q5E9F7	Cofilin-1	1.11
18	P52552	Peroxisomal oxidase	1.07
19	P01972	Hemoglobin subunit alpha-1/2	0.99
20	Q5E956	Triosephosphate isomerase	0.94
21	P35700	Peroxisomal oxidase	0.88
22	P08758	Annexin A5	0.82
23	P00795	Cathepsin D	0.77
24	Q61398	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	0.76
25	Q29549	Clusterin	0.32

表1. G1Sの分画で2酸化チタンに結合したタンパク質

E-Sup proteins immobilized on TiO ₂ , as detected by LC/MS/MS			
#	Accession no	Protein	emPAI
1	P20112	SPARC	9.43
2	P08493	Matrix Gla protein	4.17
3	O46390	Biglycan	4.08
4	Q19A28	Prothrombin	3.8
5	P0DMA9	Apolipoprotein A-1	3.1
6	P14460	Fibrinogen alpha chain (Fragment)	2.89
7	Q9GLP2	Vitamin K-dependent protein C	2.17
8	P48819	Vitronectin	2.15
9	P79281	Pleiotrophin	1.96
10	Q27972	Chondroadherin	1.83
11	Q3ZBN5	Asporin	1.76
12	P16293	Coagulation factor IX	1.72
13	P62935	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1.63
14	P45845	Protein-lysine 6-oxidase	1.62
15	Q2KJH6	Serpin H1	1.52
16	Q05717	Insulin-like growth factor-binding protein 5	1.21
17	P36955	Pigment epithelium-derived factor	1.01
18	Q62009	Periostin	0.93
19	Q863H1	Secreted frizzled-related protein 2	0.87
20	F1N152	Serine protease HTRA1	0.85
21	P32262	Antithrombin-III	0.85
22	P0C225	Osteocalcin	0.79
23	P78539	Sushi repeat-containing protein SRPX	0.51
24	P19879	Mimcan	0.51
25	O01305	Calcium vector protein	0.46

表2. E-Supの分画で2酸化チタンに結合したタンパク質

G2S proteins immobilized on TiO ₂ as detected by LC/MS/MS			
#	Accession no	Protein	emPAI
1	Q9XSD9	Decorin	7.52
2	Q71158	Secreted phosphoprotein 24	4.26
3	P29700	Alpha-2-HS-glycoprotein	3.32
4	P50609	Fibromodulin	1.69
5	P14287	Osteopontin	1.33
6	Q05443	Lumican	1.1
7	P12273	Prolactin-inducible protein	0.86
8	Q9X5J7	Collagen alpha-1(I) chain	0.82
9	P02465	Collagen alpha-2(I) chain	0.75
10	Q28178	Thrombospondin-1	0.59
11	Q9IT71	Metalloproteinase inhibitor 2	0.53
12	Q29116	Tenascin	0.5
13	P20908	Collagen alpha-1(V)	0.46
14	Q28944	Cathepsin L1	0.46

表 3 .G2S の分画で 2 酸化チタンに結合したタンパク質

これらの結果から、骨に含まれているタンパク質の中で G1S は 151 種類、E-Sup は 116 種類、G2S は 43 種類の 2 酸化チタンと結合する可能性があることが示唆された。今まで報告されてきた細胞外マトリックスのみではなく細胞膜タンパク、コラーゲン、サイトカイン、増殖因子など様々な種類や機能をもったタンパク質が結合することが明らかになった。また、アルブミンのように糖鎖構造をもたないプロテオグリカン以外のタンパク質も 2 酸化チタンに結合する可能性があることが示唆された。

また、クロマトグラフィーの結果から、G1S、G2S、E-Sup の溶出時間が異なっており、各タンパク質が 2 酸化チタンに結合力は異なっていることが示唆された。さらに、2 酸化チタンに結合するタンパク質量も異なる可能性が示唆された。

さらに、2 酸化チタンから溶出したタンパク質を SDS-PAGE で分子量を調べるとクロマトグラムで異なったピークでも同じ分子量のタンパク質が確認できた。このことから、2 酸化チタンに結合するタンパク質でも結合力や結合する部位が異なる可能性があることが示唆された (図 1)。

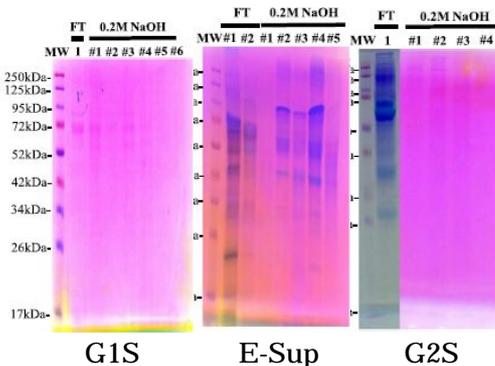


図 1 . 各段階で抽出した 2 酸化チタンに付着した強酸性タンパク質

ただし、本研究では各種タンパク質を混合した状態で解析をしているため、2 酸化チタンへの結合するアミノ酸配列を明らかにすることはできなかった。今後の課題になると考えられた。

(2) 各種タンパク質の 2 酸化チタン上での石灰化能

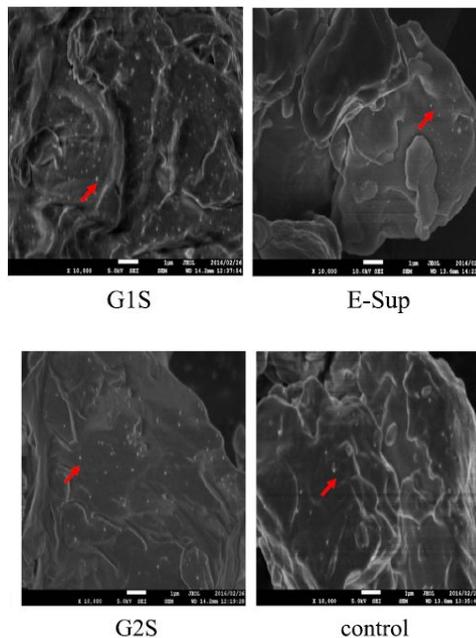


図 2 . 各段階抽出をしたタンパク質の 2 酸化チタン上における石灰化能

E-Sup は、カルシウム結合タンパク質を豊富に含んでおり、各段階抽出したタンパク質の中では最も高い石灰化能を有していると予想された。しかし、2 酸化チタン上における石灰化能は、定量化をすると、G1S が最も高く、E-Sup がもっとも低かった。この結果から、E-Sup に含まれるタンパク質の 2 酸化チタン上の機能は、石灰化以外にもある可能性が示唆された (図 2)。

以上の結果から、今後の課題として、2 酸化チタンの粉末以外の材料で解析をする必要があると考えられた。本研究では、2 酸化チタンに付着したタンパク質をできるだけ大きく回収するために、表面積の大きい粉末を用いた。しかし、今後の研究課題として、リン酸エッチングやサンドブラスト処理のような表面性状を変化させた条件でも同様なタンパク質の付着様式を示すのかを調べる必要があるため、板や円柱などの臨床に即した 2 酸化チタンの材料を選択することとする。

また、本研究結果で明らかになった 2 酸化チタンに結合するタンパク質がどのような結合様式をしているのかを明らかにする必要がある。今までの仮説では、プロテオグリカンの糖鎖を介して結合していることになっている。しかしながら、実際にそれを明らかにした研究結果は認められない。今後、タンパク質のアミノ酸のみではなく、付加された糖鎖の解析をする必要があると考えられた。

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6件)

Keisuke Sugimoto, Shuhei Tsuchiya, Kenji Hara, Yoshihiro Matsushita, Masahito Fujio, Hideharu Hibi, Osteoradionecrosis of the jaw caused by periapical periodontitis: a case report, Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology, 査読有り, in press, 2017年

藤尾正人, 西川雅也, 若山博隆, 原 憲史, 土屋周平, 日比英晴, 多剤耐性 *Enterobacter cloacae* による歯性上顎洞炎の1例, 日本口腔外科学会雑誌, 査読有, 62 巻, 2016 年, 525-528

Keisuke Sugimoto, Shuhei Tsuchiya, Masahiro Omori, Ryo Matsuda, Masahito Fujio, Kensuke Kuroda, Masazumi Okido, Hideharu Hibi, Proteomic analysis of bone proteins adsorbed onto the surface of titanium dioxide, Biochemistry and Biophysics Reports, 査読有り, 7, 316-322, 2016

Shuhei Tsuchiya, Sugimoto Keisuke, Fujio Masato, Kenji Hara, Yoshiyasu Matsushita, Hideharu Hibi, Mandibular osteomyelitis implicated in infliximab and periapical periodontitis, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有り, 28, 410-415, 2016

Masahiro Omori, Shuhei Tsuchiya, Kenji Hara, Kensuke Kuroda, Hideharu Hibi, Masazumi Okido and Minoru Ueda, A new application of cell-free bone regeneration: Immobilizing stem cells from human exfoliated deciduous teeth-conditioned medium onto titanium implants by using atmospheric pressure plasma treatment, Stem Cell Research & Therapy, 査読有り, 6, 100-109, 2015

Tsuchiya S, Omori M, Hara K, Fujio M, Ikeno M, Hibi H, Ueda M, An experimental study on guided bone regeneration by using a polylactide-co-glycolide membrane-immobilized conditioned medium, International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 査読有り, 30, 1175-1186, 2015

〔学会発表〕(計13件)

土屋周平, 松下嘉泰, 藤尾正人, 原 憲史, 市村典久, 新阜宏平, 日比英晴, 開窓術をした腺性歯原性のう胞の1例, 第61回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016年11月26日, 幕張メッセ国際会議場・国際展示場(千葉県・千葉市)

松下嘉泰, 山本憲幸, 西川雅也, 市村典久, 渡辺純奈, 土屋周平, 日比英晴,

歯性感染に起因した深頸部膿瘍, 降下性壊死性縦隔炎の1例, 第61回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016年11月26日, 幕張メッセ国際会議場・国際展示場(千葉県・千葉市)

藤尾正人, 西川雅也, 若山博隆, 原 憲史, 松下嘉泰, 杉本圭佑, 大森正裕, 土屋周平, 日比英晴, 第三世代セフェム系抗菌薬耐性腸内細菌科細菌の関与が認められた歯性上顎洞炎の1例, 第61回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016年11月26日, 幕張メッセ国際会議場・国際展示場(千葉県・千葉市)

藤 武智, 澤木佳弘, 重富俊雄, 泉本貴子, 山本憲幸, 土屋周平, 日比英晴, 常滑市民病院歯科口腔外科の常勤化から現在までの患者動向と今後の課題について, 第61回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016年11月26日, 幕張メッセ国際会議場・国際展示場(千葉県・千葉市)

大森正裕, 土屋周平, 日比英晴, チタン表面上で骨芽細胞様細胞は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体および細胞膜 $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ を発現する, 第46回日本口腔インプラント学会学術大会, 2016年9月17日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

松下嘉泰, 土屋周平, 原 憲史, 藤尾正人, 杉本圭佑, 松田 亮, 佐世 暁, 日比英晴, Kaempferol を用いた新規骨補填材料の開発, 日本補綴歯科学会第125回学術大会, 2016年7月9日, 石川県立音楽堂, ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県・金沢市)

杉本圭佑, 土屋周平, 原 憲史, 藤尾正人, 松下嘉泰, 松田 亮, 佐世 暁, 日比英晴, インプラント周囲の骨形成促進を目指したチタン表面へのケンフェロールの応用, 日本補綴歯科学会第125回学術大会, 2016年7月9日, 石川県立音楽堂, ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県・金沢市)

原 憲史, 片桐 渉, 土屋周平, 藤尾正人, 松下嘉泰, 杉本圭佑, 松田 亮, 佐世 暁, 日比英晴, 抜歯後出血をきたし巨大な血餅を形成した von Willebrand 病患者の1例, 第41回日本口腔外科学会中部支部学術集会, 2016年5月28日, 愛知学院大学名城公園キャンパス Castle Hall(愛知県・名古屋市)

杉本圭佑, 土屋周平, 大森正裕, 日比英晴, 上田 実, 2酸化チタンに付着する骨由来タンパク質の解析, 第35回日本口腔インプラント学会中部支部学術大会, 2014年12月7日, ウィンク愛知(愛知県・名古屋市)

大森正裕, 土屋周平, 黒田健介, 日比英晴, チタン表面上のラット骨芽細胞様細胞におけるナトリウム・カルシウム

イオン交換輸送体および細胞膜
Ca²⁺-ATPase の役割, 第 35 回日本口腔イ
ンプラント学会中部支部学術大会,
2014 年 12 月 7 日, ウィンク愛知(愛知
県・名古屋市)

大森正裕, 土屋周平, 原 憲史, 藤
尾正人, 西野雄大, 杉本圭佑, 日比英晴,
上田 実, 大気圧プラズマ処理したチタ
ンインプラントへのヒト脱落乳歯幹細
胞由来培養上清の応用, 第 59 回日本口
腔外科学会総会・学術大会, 2014 年 10
月 18 日, 幕張メッセ国際会議場・国際
展示場(千葉県・千葉市)

土屋周平, オッセオインテグレーシ
ョン: 骨 - インプラント間の構造, 2014
年 10 月 18 日, 幕張メッセ国際会議場・
国際展示場(千葉県・千葉市)

土屋周平, 日比英晴, 上田 実, オッ
セオインテグレーション早期獲得のた
めのインプラントへの細胞培養上清の
応用, 第 123 回日本歯科補綴学会, 2014
年 5 月 24 日, 仙台国際センター(宮城
県・仙台市)

[その他]

http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100001602_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 周平 (TSUCHIYA, Shuhei)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20569785

(2) 研究分担者

黒田 健介 (KURODA, Kensuke)
名古屋大学・未来材料・システム研究所・
准教授
研究者番号: 00283408