

タンパク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

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

川下 将一, 横井 太史

Elucidation of Osteoconduction Mechanism of Hydroxyapatite by Focusing on Specific Adsorption of Proteins

Masakazu Kawashita, Taishi Yokoi

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

1. はじめに

アルミナ (Al_2O_3) 等の多くのセラミックスは、骨欠損部に埋入されると、その表面にコラーゲンからなる線維性皮膜が形成され、周囲の骨から隔離される。これは、生体組織を異物から守るための生体の正常な防御反応である。これに対し、水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: HAp) は、骨欠損部に埋入されると、周囲の骨と結合する（骨伝導性を示す）。この HAp の骨伝導性は 1970 年代後半に見出され^{1,2)}、現在、HAp は人工骨や、金属バイオマテリアルに骨伝導性を付与するコーティング材料などとして用いられている。

一方、1990 年代から、バイオマテリアルと骨との界面反応に関する研究が進められ^{3,4)}、図 1

に示すような、骨形成や骨リモデリングに関わる細胞の接着・増殖・分化といった、骨-バイオマテリアル界面の細胞レベルでの経時的な事象に関する知見は多く蓄積されてきた。しかし、分子レベルでの骨-バイオマテリアルの界面反応は十分には解明されていない。バイオマテリアルを生体に埋入すると、図 1 に示すように、初期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経時的な事象を制御している可能性がある。筆者らは、「骨伝導を示す HAp

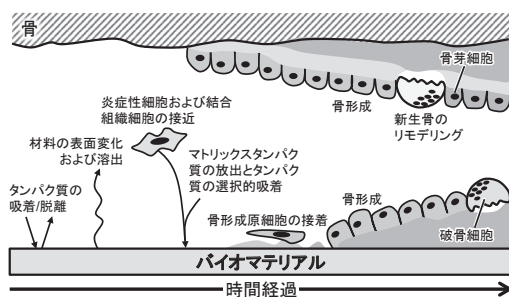


図 1 骨-バイオマテリアル界面で生じる事象

〒101-0062

東京都千代田区神田駿河台 2-3-10

TEL 03-5280-8016

FAX 03-5280-8125

E-mail: kawashita.bcr@tmd.ac.jp

と骨伝導性を示さない Al_2O_3 では吸着するタンパク質に違いがあり、HAp に特異的に吸着するタンパク質が骨伝導性発現に関与している」との仮説を立てて研究を進めている。本稿では、これまでの筆者らの試みを紹介する。

2. HAp および Al_2O_3 へのタンパク質の吸着挙動

2.1 アルブミン・オステオポンチン

アルブミンは血清中に最も豊富に含まれ、オステオポンチンは骨と人工材料との界面に豊富に存在するタンパク質である。そこで筆者らは、HAp および Al_2O_3 へのこれらのタンパク質の吸着挙動を調べた^{5,6)}。その結果、 Al_2O_3 は HAp よりも多量のアルブミンおよびオステオポンチンを吸着し、HAp は主に局所的な静電相互作用によって、 Al_2O_3 は主に全体的な静電相互作用によってアルブミンおよびオステオポンチンを吸着する可能性が見出された。これらの結果は、HAp へのアルブミンおよびオステオポンチンの吸着量だけでなく、それらの吸着様式も骨伝導性発現に関係している可能性を示唆している。また、オステオポンチンは HAp への特異的な吸着部位であるポリアスパラギン酸配列ならびに細胞との特異的な結合部位であるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列を有することから、HAp がオステオポンチンを特異的に吸着し、その RGD 配列を露出させることによって、骨伝導を発現している可能性もある。

2.2 フィブロネクチン・ラミニン

フィブロネクチンおよびラミニンは細胞接着に関係するタンパク質である。そこで筆者らは、HAp および Al_2O_3 へのこれらのタンパク質の吸着特性を調べた。その結果、図 2 に示すように、フィブロネクチンは HAp よりも Al_2O_3 に多く吸着するが、HAp に吸着するフィブロネクチンの構造は、HAp の帯電状態の異なる結晶面との局所的な静電相互作用によって、細胞接着

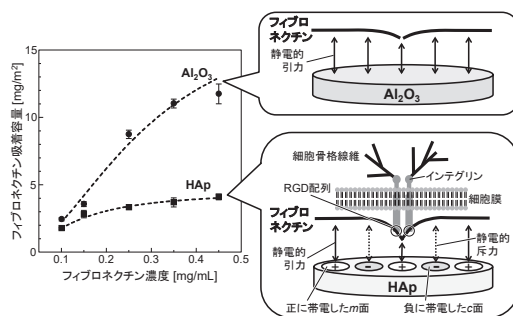


図2 HAp および Al_2O_3 へのフィブロネクチン吸着の模式図 (フィブロネクチンがコラーゲン結合ドメインを介して HAp に吸着すると仮定)⁷⁾

に有利な RGD 配列を露出するように制御される可能性が見出された⁷⁾。一方、ラミニンは Al_2O_3 よりも HAp にわずかに多く吸着し、HAp と Al_2O_3 に吸着するラミニンの構造に大きな違いは見られなかった⁸⁾。これらの結果は、タンパク質によって、HAp への吸着量だけでなく、吸着時の構造も異なり、それらが複雑に絡み合っ骨伝導性に関与していることを示唆している。最近では、HAp よりも優れた骨伝導性を示す炭酸含有水酸アパタイト ($\text{CO}_3\text{-HAp}$) のフィブロネクチン吸着特性が調べられ、 $\text{CO}_3\text{-HAp}$ の炭酸含有量がフィブロネクチンの吸着能に影響を及ぼし、 $\text{CO}_3\text{-HAp}$ へのフィブロネクチンの特異的な吸着が骨伝導性に関与している可能性も見出されている⁹⁾。

3. HAp および Al_2O_3 に吸着したタンパク質が細胞応答に及ぼす影響

3.1 アルブミン

材料表面に吸着したタンパク質が細胞応答に及ぼす影響を明らかにするために、アルブミンを吸着させた HAp あるいは Al_2O_3 上で MC3T3-E1 細胞 (骨芽細胞の前駆細胞) あるいは RAW264.7 細胞 (破骨細胞の前駆細胞) を培養し、これら細胞の応答を調べた¹⁰⁾。その結果、HAp と Al_2O_3 のいずれに対しても、アルブミンの吸着は MC3T3-E1 細胞の接着・伸展を阻害したが、図 3 に示すように、HAp に対しては、細胞接着を阻害するのに十分な量のアルブミンが

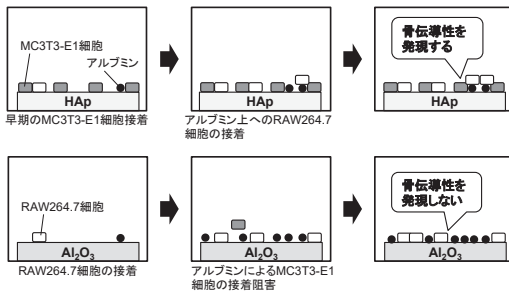


図3 HApおよびAl₂O₃へのアルブミンの吸着およびMC3T3-E1細胞・RAW264.7細胞の接着と、それらの骨伝導性との関係

吸着するよりも先にMC3T3-E1細胞が接着した。また、Al₂O₃に対してアルブミンの吸着はRAW264.7細胞の接着を阻害したが、HApに対してはアルブミンの吸着はRAW264.7細胞の接着に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、埋入後のタンパク質の吸着時期をも含めた吸着挙動が細胞の応答性、ひいては骨伝導性の発現に影響を与えることを示唆している。

3.2 フィブロネクチン・ラミニン

フィブロネクチンあるいはラミニンを吸着させたHApおよびAl₂O₃においてMC3T3-E1細胞の応答を調べた。その結果、図4に示すように、HApに吸着したフィブロネクチンはMC3T3-E1細胞の増殖・分化には影響を及ぼさなかったが、同細胞の接着・伸展を促進した¹¹⁾。また、HApに吸着したラミニンはMC3T3-E1細胞の増殖・分化には影響を及ぼさなかったが、フィブロネクチンと同様に、同細胞の接着・伸

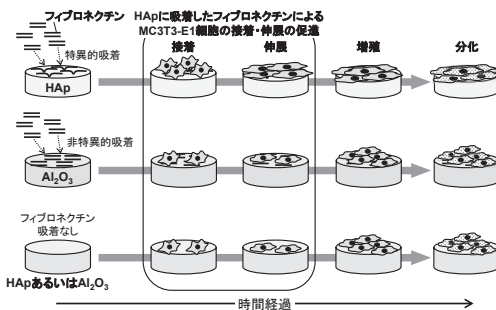


図4 フィブロネクチン吸着がHApおよびAl₂O₃のMC3T3-E1細胞の応答に及ぼす影響¹¹⁾

展を促進した⁸⁾。これらの結果は、フィブロネクチンあるいはラミニンのHApへの特異的な吸着が、骨芽細胞の接着・伸展を促進し、ひいてはHApの骨伝導性の発現に寄与している可能性を示唆している。

4. HApおよびAl₂O₃に吸着する血清タンパク質のプロテオーム解析

前章までの研究⁵⁻¹¹⁾では、特定のタンパク質に着目し、その吸着特性や細胞応答に及ぼす影響を明らかにしてきた。しかし、実際の血清中には多様なタンパク質が共存しており、HApとAl₂O₃とで吸着するタンパク質の種類や量に違いがあるかは明らかではない。そこで最近、筆者らは、HApとAl₂O₃に吸着するラット血清タンパク質のプロテオーム解析を行い、図5に示すような、以下の知見を得ている¹²⁾。

- (1) HApおよびAl₂O₃にはそれぞれ250種類および251種類のタンパク質が吸着し、そのうち182種類はHApとAl₂O₃の両方に吸着する。
- (2) 82種類(= HApにのみ吸着する68種類+Al₂O₃よりもHApに多く吸着する14種類)のタンパク質を、遺伝子オントロジー、PANTHER (Protein ANALYSIS THrough Evolutionary Relationships) 分類システム、および先行論文によって解析すると、

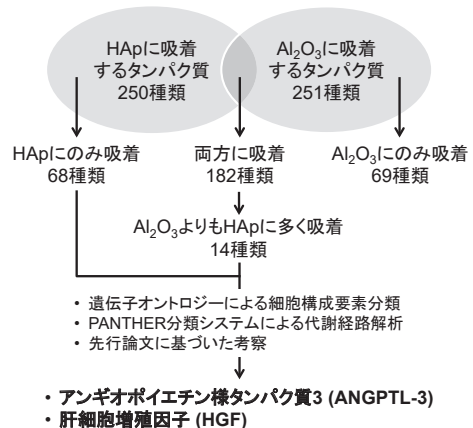


図5 HApおよびAl₂O₃に吸着する血清タンパク質のプロテオーム解析¹²⁾

HApの骨結合性発現に寄与するタンパク質の候補として、肝細胞増殖因子 (HGF) とアンジオポエチン様タンパク質-3 (ANGPTL3) が挙げられる。

- (3) ANGPTL3はMC3T3-E1細胞の増殖・分化には影響を及ぼさないが、同細胞の接着・伸展を促進する。

これらの知見は、HApに吸着したHGFとANGPTL3が骨伝導性発現に寄与する可能性を示唆している。今後は、HGFやANGPTL3を吸着させたHApや Al_2O_3 上での細胞応答などを調べる必要がある。

5. おわりに

本稿では、タンパク質の吸着からHApの骨伝導機構を解明しようとする、筆者らの取り組みを紹介した。前章に記したように、生体内においてHApには250種類ものタンパク質が吸着する。この中からHApの骨伝導性発現に関与するタンパク質を絞り込むのは容易ではないが、これまでの筆者らの知見は、そのようなタンパク質の存在を示唆している。もしHApの骨伝導性発現機構をタンパク質の特異的吸着によって説明できれば、HApの骨伝導機構の分子レベルでの解明に繋がるだけでなく、「特定のタンパク質を特異的に吸着して生命機能を発現するバイオマテリアル」の提案にも繋がると期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、内藤記念科学振興財団2015年度研究助成、国際・産学連携インヴェアスイノベーション材料創出プロジェクト、JSPS科研費21K19890によって行われたものである。

参考文献

- 1) H. Aoki, K. Kato and T. Tabata, Rep. Inst. Med. Dent. Eng. Jpn., **11** (1977) 33-35.
- 2) M. Jarcho, J. F. Kay, K. I. Gumaer, R. H. Doremus and H. P. Drobeck, J. Bioeng., **1** (1977) 79-92.
- 3) Z. Schwartz and B. D. Boyan, J. Cell. Biochem., **56** (1994) 340-347.
- 4) D. A. Puleo and A. Nanci, Biomaterials, **20** (1999) 2311-2321.
- 5) J. Hayashi, M. Kawashita, T. Miyazaki, M. Kamitakahara, K. Ioku and H. Kanetaka, Phosphorus Res. Bull., **26** (2012) 23-28.
- 6) M. Kawashita, J. Hayashi, Z. Li, T. Miyazaki, M. Hashimoto, H. Hihara and H. Kanetaka, J. Mater. Sci.: Mater. Med., **25** (2014) 453-459.
- 7) M. Hasegawa, T. Kudo, H. Kanetaka, T. Miyazaki, M. Hashimoto and M. Kawashita, Biomed. Mater., **11** (2016) 045006.
- 8) H. Fujita, T. Kudo, H. Kanetaka, T. Miyazaki, M. Hashimoto and M. Kawashita, ACS Biomater. Sci. Eng., **2** (2016) 1162-1168.
- 9) Y. Wang, K. Tsuru, K. Ishikawa, T. Yokoi and M. Kawashita, Ceram. Int., **47** (2021) 11769-11776.
- 10) M. Kawashita, J. Hayashi, T. Kudo, H. Kanetaka, Z. Li, T. Miyazaki and M. Hashimoto, J. Biomed. Mater. Res., **102A** (2014) 1880-1886.
- 11) M. Kawashita, M. Hasegawa, T. Kudo, H. Kanetaka, T. Miyazaki and M. Hashimoto, Mater. Sci. Eng. C, **69** (2016) 1268-1272.
- 12) Y. Wang, Y. Yoshida, J. Kamiie, Y. Shiawaku, O. Suzuki, M. Furuya, K. Yokota, H. Kanetaka, T. Yokoi and M. Kawashita, Dent. Mater. J., in press.