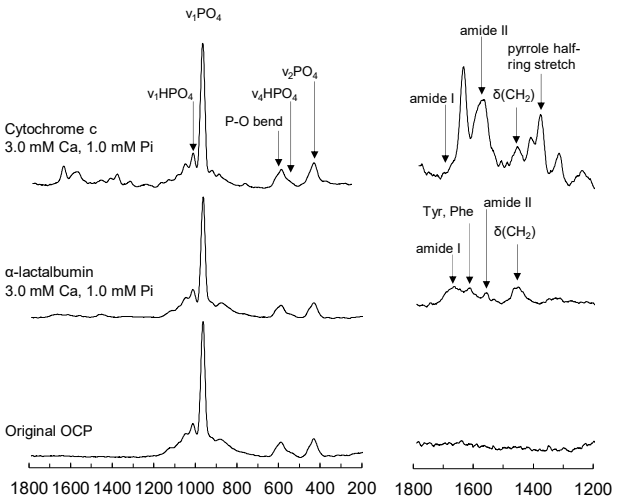
224　高活性骨誘導材の創出	鈴木　治

【目的】骨アパタイト結晶の前駆物質と見做されているリン酸八カルシウム（octacalcium phosphate、OCP：$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$）は、高い骨伝導性を示すことから骨欠損の治療が必要とされる医療分野で人工合成の骨補填材としての使用が期待されている材料である。OCP は、生体内で血清由来タンパク質に高い親和性を示すことから、特定の化学環境下で骨の形成に関わるタンパク質の集積を促進して、材料を活性化できるかどうかを調べることを目的として、モデルタンパク質を用いてその親和性を検討した。そのために、モデルタンパク質、カルシウムおよびリン酸のイオンを含む水溶液の過飽和度を調節して、酸性および塩基性のモデルタンパク質の吸着および徐放の特性を調べた。

【方法】α-ラクトアルブミン（α-lactalbumin、等電点 4.8）およびシトクロム c（cytochrome c：cytC、等電点 9.6）を吸着質とした。異なる濃度のカルシウムイオン（Ca^{2+}）および無機リン酸（inorganic phosphate、以下 Pi）のイオンを含み、OCP に関して飽和あるいは過飽和な組成を持つ pH7.4 のトリスヒドロキシメチルアミノメタン（Tris）-HCl 緩衝液にこれらのタンパク質を溶解した。過飽和度は溶液上清を分析して、それらのイオン活動度積（IP）を溶解度積（Ksp）で除することで算出した。OCP を湿式合成で調製して 53 μm 径に整粒した OCP を吸着媒とした。OCP を cytC あるいはα-lactalbumin を含む緩衝液に浸漬し、吸着平衡後に OCP を回収して凍結乾燥した後、OCP 上に吸着した状態のタンパク質をラマン分光法で同定した。

【結果】ラマン分光の分析から、OCP のリン酸基由来の振動や変角のモードが 400～600 cm^{-1}および 1,000 cm^{-1}前後に検出されるが、ラマンシフトが 1,300～1,700 cm^{-1}の範囲に cytC もしくはα-lactalbumin に固有の振動モードが検出され、塩基性タンパク質 cytC および酸性タンパク質α-lactalbumin が過飽和環境により吸着が促進されていると考えられた。タンパク質上清の分析から算出した吸着量の解析では、タンパク質の平衡濃度により吸着促進が生じることがわかった。この結果は先に報告した血清アルブミンの過飽和環境による吸着促進（Hamai R et al. Materials 12, 2019）を支持する結果となった。次に、cytC の OCP からの徐放挙動を分析した。過飽和環境下で cytC を吸着させた OCP を 37℃のリン酸緩衝液（PBS）に浸漬した後、上清を回収し、cytC 濃度を測定することで OCP から放出された cytC の積算量を算出した。過飽和環境下で吸着した cytC は、浸漬初期に急激な放出は生じず緩やかに PBS 中に放出される傾向にあった。本研究と同様の条件で血清アルブミンを用いて検討した過飽和環境下では OCP 上に新たな微細な結晶が添加的に形成されることで吸着が促進されることが示唆されている。今後は、本研究で得られたモデルタンパク質の吸着と徐放のメカニズムを生体由来タンパク質に適用し、OCP 骨補填材の活性化の可能性およびそのメカニズムについて生体材料学の観点で明らかにする。

Cytochrome c およびα-lactalbumin が吸着した OCP のラマン分光スペクトル



224. 高活性骨誘導材の創出

鈴木　治

東北大学 大学院歯学研究科 顎口腔機能創建学分野

Key words：リン酸八カルシウム，タンパク質集積，骨再生材料

緒　言

本研究ではリン酸カルシウム生体材料のひとつであるリン酸八カルシウム（OCP）を基盤材料として用い、OCP の高活性化の基盤技術開発に向け成長因子のモデルタンパク質の集積を検討した。OCP（octacalcium phosphate：$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$）は、ハイドロキシアパタイト（hydroxyapatite (HA): $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$）が水溶液中から析出する際に先立って形成される無機の材料であり、骨アパタイト結晶の前駆体と位置付けられる物質である［1］。私達は先に、合成の OCP が生体内で HA に転換する傾向があること、そのプロセスが高い骨伝導性を誘導することから骨補填材の素材の候補材料になる可能性があることを報告してきた［2，3］。一方、OCP は高い骨伝導性を示すが、成長因子が示すようなより高い活性を持つ機能の獲得が期待されている［4］。OCP は骨芽細胞による骨形成に先立って、生体由来の血清タンパク質と相互作用することが確認されている［2，5］。このように、OCP は生体由来のタンパク質分子に親和性を有することがわっているが、最近、私達は *in vitro* で、カルシウムおよびリン酸のイオンを含み、リン酸カルシウム塩に関して一定の過飽和度を有し、かつ酸性のタンパク質である牛血清アルブミンが共存する水溶液中に OCP を浸漬することで、OCP 上へ血清アルブミンの吸着が促進されることを見出した［6］。OCP は、生理的環境下では準安定相であるが、血清アルブミン吸着後においても OCP の結晶構造は維持された［6］。

これらの研究結果に基づき、本研究では骨補填材としての OCP に、OCP に関して過飽和な条件のカルシウムとリン酸を含有する水溶液中で骨の形成に関わるタンパク質が OCP 上に集積されるかどうかを確認するための第一段階の研究として、まずモデルタンパク質を用いて電荷の異なるタンパク質の吸着が促進されるかどうか調べた。吸着質としてα-ラクトアルブミン（α-lactalbumin）およびシトクロム c（cytochrome c：cytC）をそれぞれ酸性および塩基性のモデルタンパク質と考え、タンパク質含有および非含有のリン酸カルシウム水溶液の過飽和度の評価、またラマン分光法による吸着の同定を行った。さらに、生理的 pH 下における cytC の徐放特性についても評価を行い、骨の形成に関わるタンパク質との相互作用の可能性について考察した。

方法および結果

1. モデルタンパク質溶液の過飽和度の評価

モデルタンパク質は、市販のα-lactalbumin（牛乳由来、分子量 14,175、等電点 4.8）および cytC（ウマ心臓由来、分子量 11,701、等電点 9.6）を用いた。これらタンパク質を先の研究［6］を参考にして、カルシウム（Ca^{2+}）およびリン酸（inorganic phosphate、以下 Pi）のイオンを含む水溶液を HA に関して過飽和および OCP に関してほぼ飽和（0.5 mM Ca^{2+}、0.5 mM Pi）、また HA および OCP に関して過飽和（3.0 mM Ca^{2+}、1.0 mM Pi）な組成を持つ pH7.4 の Tris-HCl（150 mM）緩衝液に溶解した。過飽和度（degree of supersaturation：DS）はこれらタンパク質溶液の上清のカルシウムおよびリン酸の濃度の化学分析および pH を測定し、イオン活動度積（IP）を溶解度積（Ksp）で除することで算出した。表 1 に cytC の過飽和度計算例を示す。リン酸カルシウムの塩に関して、DS＝1 は飽和状態、DS＞1 は過飽和状態、DS＜1 は不飽和な水溶液の化学的な状態を意味する。0.5 mM Ca^{2+}および 0.5 mM Pi を含む水溶液は、1 mg/mL の cytC が含有されても OCP に関しほぼ DS 値が 1 に近く、飽和な状態であることがわかった。

一方、3.0 mM Ca^{2+}および1.0 mM Pi を含む水溶液ではOCP に関してDS 値が10^3を上回っており、過飽和な状態であることがわかった。1 mg/mL の cytC が含有されてもこの状態は維持された。以上の結果から、モデルタンパク質存在下でも OCP に関して過飽和な環境が安定して得られることがわかり、OCP 上へのタンパク質吸着の解析に使用可能な実験系であることが確認できた。

表 1. Ca^{2+}、Pi および cytC を含有する 150 mM Tris-HCl 緩衝液の化学組成、pH および DS 値

Solutions	Ca (mM)	Pi (mM)	pH	DS at 37℃		
				HA	OCP	DCPD
0.5 mM Ca, 0.5 mM Pi	0.48	0.50	7.4	8.15×10^{7}	9.25×10^{-1}	7.97×10^{-2}
1.0 mg/mL cytC, 0.5 mM Ca, 0.5 mM Pi	0.49	0.49	7.4	8.51×10^{7}	9.45×10^{-1}	7.97×10^{-2}
3.0 mM Ca, 1.0 mM Pi	2.91	1.01	7.4	3.82×10^{12}	7.31×10^{3}	8.77×10^{-1}
1.0 mg/mL cytC, 3.0 mM Ca, 1.0 mM Pi	2.89	1.00	7.4	3.60×10^{12}	6.93×10^{3}	8.64×10^{-1}

2. モデルタンパク質の吸着評価

OCP は、既報［2］に基づきカルシウム水溶液とリン酸水溶液から HA および OCP に関して過飽和な条件下で湿式合成した。OCP の結晶構造は粉末 X 線回折法により OCP の 2θ =4.8°の主ピークの確認と回折パターンから純粋な OCP 構造を持つことを確認した。また、フーリエ変換赤外分光法（FTIR）による分析から OCP に特有の 1,000 cm^{-1}付近のリン酸基由来の吸収ピークを確認し、XRD および FTIR から吸着実験に使用可能な OCP が合成できていることを確認した。OCP の合成後、水洗した沈殿物から顆粒径を 53 μm 径以下に整粒したものを吸着媒として実験に供した。1 項で述べた cytC あるいはα-lactalbumin を含む緩衝液 1 mL に対して OCP 5 mg を浸漬し、37℃の恒温槽中で 1 時間転倒撹拌した。OCP 表面へのタンパク質吸着は、従来より遠心分離により回収した上清中のタンパク質濃度から算出する方法を確立しているが［6］、本研究ではタンパク質吸着後の遠心分離で沈降した OCP を回収して凍結乾燥し、OCP 上に吸着した状態のタンパク質をラマン分光法により同定する物理的方法を検討した。

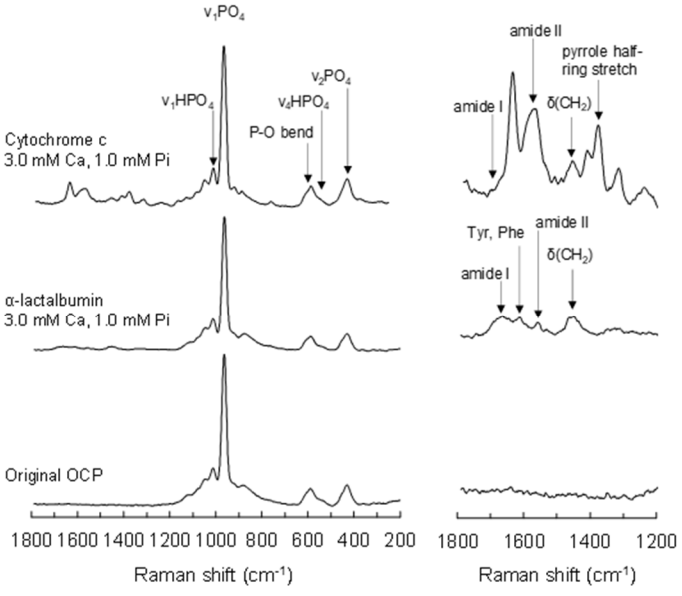


図 1. cytC およびα-lactalbumin が吸着した OCP のラマン分光スペクトル
下から OCP 単体（タンパク質未吸着、オリジナル試料）、α-lactalbumin 吸着 OCP、cytC 吸着 OCP。

OCP 表面に吸着したタンパク質は、ラマン分光システム（Model ApaRAMAN、LUCIR Inc.、Tsukuba、Japan）を　用いて同定した（図 1）。ラマン分光では OCP のリン酸基由来の振動や変角のモードが 400～600 cm^{-1}および 1,000 cm^{-1}前後の波長領域に明瞭に検出されるが、これら OCP 由来のピークとラマンシフト上重ならない 1,300～1,700 cm^{-1}の範囲で cytC および α-lactalbumin が十分に分離検出可能であることがわかった。図 1 から、塩基性タンパク質 cytC および酸性タンパク質 α-lactalbumin は、過飽和環境下で既報の血清アルブミン（酸性）と同様に［6］、吸着が促進されることが確認できた。従来のタンパク質上清から算出した吸着量の解析では、過飽和溶液における血清アルブミンの吸着促進と同様に、タンパク質の平衡濃度によりタンパク質吸着促進が生じていると考えられた。また、タンパク質上清の Ca^{2+}および Pi 濃度分析からこれらのイオン濃度の変化が観察された。

3. 吸着した cytC の生理的水溶液中における徐放特性

生体のタンパク質の徐放モデルとして吸着 cytC の OCP からの徐放挙動を分析した。過飽和環境下で cytC を吸着させた OCP 顆粒を 37℃のリン酸緩衝液（PBS）に浸漬し、所定の期間の転倒撹拌後に上清を回収した。その後、新たな PBS を加えて再び転倒撹拌した。この操作を延べ 48 時間繰り返し、得られた上清中の cytC 濃度を測定することで、OCP から放出された cytC の積算量を算出した。図 2 に cytC の徐放における時間依存性を示す。浸漬開始から 3 時間では、少量の cytC が放出されるのみであった。その後、浸漬期間の経過とともに、放出量は徐々に増加した。すなわち、過飽和環境下で吸着した cytC は、浸漬初期に急激な放出を生じることなく、緩やかに PBS 中に放出される傾向にあった。

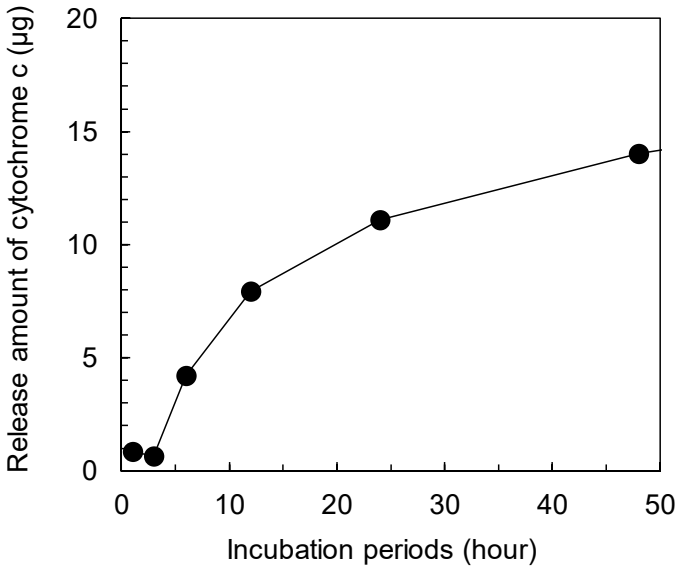


図 2. cytC の徐放における時間依存性
過飽和環境下で OCP に吸着した cytC は、PBS への浸漬初期に急激な放出を生じることなく緩慢に放出された。

考　察

本研究は骨伝導性を示すことを解明した OCP 骨補填材［2～4］の表面でタンパク質吸着を促進させるため、リン酸カルシウムに関して過飽和な環境下でモデルタンパク質である酸性の α-lactalbumin および塩基性の cytC が共存する条件の下、これらのタンパク質が OCP に吸着することを明らかにした。飽和環境下における血清アルブミンの吸着挙動は、OCP の加水分解の程度により HA への結晶構造変化の進展に依存して規定されることが報告されている［7］。本研究と同様の条件で検討した過飽和環境下では、OCP 上に同結晶相を有すると考えられる微細な結晶が新たに添加的に形成されることで吸着が進展することが示唆されており［6］、過飽和環境下におけるモデルタンパク質の吸着は飽

和環境下とは異なるメカニズムで生じると考えられた［6，8］。この吸着メカニズムの差異は、タンパク質が吸着したOCP がタンパク質の非存在下や低濃度下に置かれた際に生じると予想される吸着タンパク質の脱着ならびに徐放特性に影響を及ぼす可能性があると考えられた。実際に、本研究で PBS 中への浸漬により cytC の緩慢な徐放が生じることが確認されたことは、実際の生体のタンパク質が過飽和環境下で吸着が生じた場合、飽和環境下で吸着する場合と異なる脱着が生じることが示唆される。OCP はプロテオーム解析から、ラット血清由来のアポリポ E タンパク質（ApoE）や補体（C3）など細胞を活性化する因子として報告されているタンパク質を血清中から特異的に吸着することが確認されている［5］。今後は、本研究で得られたモデルタンパク質の吸着および脱着特性を参考に、生体由来のタンパク質の吸着および徐放特性を検討し、OCP 骨補填材の活性化の可能性およびそのメカニズムについて生体材料学の観点で明らかにしたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野の濱井瞭、塩飽由香利、土屋香織および東北大学大学院医学系研究科整形外科学分野の濱田壮志、森優である。

文　献

1） Brown WE. Crystal growth of bone mineral. Clin Orthop Relat Res. 1966 Jan-Feb 1966;44:205-20. PMID: 5910250 DOI: 10.1097/00003086-196600440-00021

2） Suzuki O, Nakamura M, Miyasaka Y, Kagayama M, Sakurai M. Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. Tohoku J Exp Med. 1991 May;164(1):37-50. PMID: 1926145 DOI: 10.1620/tjem.164.37

3） Suzuki O, Kamakura S, Katagiri T, Nakamura M, Zhao B, Honda Y, Kamijo R. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. Biomaterials. 2006 May;27(13):2671-81. Epub 2006 Jan 18. PMID: 16413054 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.12.004

4） Ozaki H, Hamai R, Shiwaku Y, Sakai S, Tsuchiya K, Suzuki O. Mutual chemical effect of autograft and octacalcium phosphate implantation on enhancing intramembranous bone regeneration. Sci Technol Adv Mater. 2021 May 28;22(1):345-362. Epub 2021 April 16. PMID:1916378 DOI: 10.1080/14686996.2021.1916378

5） Kaneko H, Kamiie J, Kawakami H, Anada T, Honda Y, Shiraishi N, Kamakura S, Terasaki T, Shimauchi H, Suzuki O. Proteome analysis of rat serum proteins adsorbed onto synthetic octacalcium phosphate crystals Anal Biochem. 2011 Nov 15;418(2):276-85. Epub 2011 Jul 26. PMID: 21839718 DOI: 10.1016/j.ab.2011.07.022

6） Hamai R, Tsuchiya K, Suzuki O. Adsorption of serum albumin onto octacalcium phosphate in supersaturated solutions regarding calcium phosphate phases. Materials. 2019 Jul 23;12(14):2333. PMID: 31340468 DOI: 10.3390/ma12142333

7） Suzuki O, Yagishita H, Yamazaki M, Aoba T. Adsorption of bovine serum albumin onto octacalcium phosphate and its hydrolyzates. Cells Mater. 1995; 5(1):45–54.

8） 濱井瞭，土屋香織，鈴木治．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．J. Jpn. Soc. Powder Powder Metallurgy, 67 (2020) 258-263. DOI: 10.2497/jjspm.67.258