

主論文の要旨

**Proteomic analysis of bone proteins adsorbed
onto the surface of titanium dioxide**

〔 二酸化チタンに付着する骨由来タンパク質の解析 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

杉本 圭佑

【緒言】

オッセオインテグレーションとは、骨と二酸化チタンが線維組織を介在せずに直接結合していることである。その結合の界面にはプロテオグリカンを主成分とする層が透過型電子顕微鏡で観察されるが、その構成は明らかではない。本研究の目的は、二酸化チタンに付着する骨由来タンパク質を網羅的に探索することにより、この層の構成解明の一助とすることである。

【材料と方法】

ブタ頭蓋骨を液体窒素にて凍結後、粉砕機にて粉末にした。その粉末 50g を 4M Guanidine / 50mM Tris-HCl、0.5M Ethylenediaminetetraacetic acid / 50mM Tris-HCl、4M Guanidine / 50mM Tris-HCl の順に 4℃、48 時間浸漬して段階抽出した。次いで、各抽出液の上清を回収し、透析チューブで脱塩した。その後、凍結乾燥し、段階抽出順に G1S、E-Sup、G2S とした。それぞれのタンパク質分離には、高速液体クロマトグラフィー (Agilent 1220 Infinity HPLC system) を用いた。Bio-Scale MT10 カラム (12×88mm) に直径 45µm の二酸化チタン粉末を充填し、リン酸緩衝液(-)にて平衡化し、50mg / 5ml の濃度に溶解した各タンパク質をカラムに注入した。その後、0.2M 水酸化ナトリウム水溶液にて分離した。分離したタンパク質を電気泳動法にて確認し、質量分析法 (LTQ Orbitrap XL mass spectrometry system) で同定した。また、二酸化チタン粉末に付着したタンパク質に対するカルシウム沈着物を走査型電子顕微鏡 (JEOL-JSM7610F) にて観察し、Alizarin Red S Staining Quantification assay により沈着物のカルシウムを定量した。

【結果】

G1S、E-Sup および G2S について的高速液体クロマトグラフィーの結果を Figure 1A-F に示す。カラムに注入したタンパク質のほとんどが二酸化チタンに付着しない通過画分であった (Figure 1A、C、E)。しかし、0.2M 水酸化ナトリウム水溶液で溶出すると、複数の波形が検出された (Figure 1B、D、F)。G1S では通過画分 (Figure 1A) の波形数は 1 であったが、溶出画分では 6 であった (Figure 1B)。E-sup では、通過画分で 2、溶出画分で 5 であった (Figure 1C、D)。G2S では通過画分で 1、溶出画分で 4 であった (Figure 1E、F)。高速液体クロマトグラフィーによって得られたタンパク質の SDS-PAGE プロファイル Figure 2A~F に示す。CBB および Stains-All 染色によって、G1S、E-Sup および G2S のそれぞれで分子量が異なるタンパク質が検出された。

LC/MS/MS を用いて、二酸化チタンに付着した各タンパク質を特定した。G1S に 151、E-Sup に 116、および G2S に 43 のタンパク質が同定された。Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) の順に代表的なタンパク質を Table 1 に示す。

二酸化チタンに付着したタンパク質に対するカルシウム沈着量を Figure 3 に示す。

カルシウム沈着量は、無処理の二酸化チタンよりも G1S および G2S で処理したもので有意に多かったが、E-Sup で処理したものでは有意差はなかった (Figure 3B)。

【考察】

二酸化チタンに付着する骨由来タンパク質には細胞外マトリックス、酵素、増殖因子などの機能をもつタンパク質が存在し、これらのタンパク質はカルシウム沈着に関与することが示された。

二酸化チタンに付着したタンパク質は高速液体クロマトグラフィーで評価した。0.2M 水酸化ナトリウム水溶液にて溶出したとき、複数の波形が検出されたことから、溶出されたタンパク質の保持時間が異なることが示された。このことから骨タンパク質は二酸化チタンに対してそれぞれ異なる親和性をもつことが示唆された。

SDS-PAGE および LC/MS/MS によって、二酸化チタンに付着する様々なタンパク質が同定された。G1S において最も多く付着したものは、血清タンパク質であるアルブミンだった。しかし、今までの報告では二酸化チタンに最も多く付着する血清タンパク質はフィブロネクチンであるとされている。この相違は、タンパク質がカラムを通過するときに Vroman 効果と呼ばれる置換プロセスによって、低分子量のアルブミンが高分子量のフィブロネクチンなどに置換されたと考えられた。

G2S の分画の結果よりプロテオグリカンであるデコリンが同定された。デコリンは二酸化チタンに付着する可能性が報告されているが、これは *in vitro* の遺伝子発現解析によるものであり、二酸化チタンに付着するという実際の結果ではない。本研究の結果からデコリンが二酸化チタンに直接付着していることが明らかになった。

プロテオグリカンが二価の陽イオンであるカルシウムイオンやマグネシウムイオンを介して二酸化チタンに結合することは過去に示されていた。しかしながら、本研究で使用した溶媒にはこれらの二価の陽イオンは含まれておらず、プロテオグリカンが二酸化チタンへ直接付着する可能性が示唆された。今後はプロテオグリカンが二酸化チタンに結合するメカニズムを明らかにする。

E-Sup の分画では、オステオカルシン、ペリオスチン、およびマトリックス Gla タンパク質が二酸化チタンに付着することが明らかになった。これらのタンパク質は石灰化の役割を担い、糖鎖をもたない。今回の結果から、プロテオグリカンを除き、このようなタンパク質が二酸化チタンと骨の界面に付着する可能性があることが示された。

二酸化チタンに付着したタンパク質に対するカルシウム沈着量は G1S が最も多かった。G1S において最も多く確認されたタンパク質はアルブミンであった。しかし、今までの報告ではアルブミンが存在することにより二酸化チタン表面のカルシウム沈着量は減少するとされている。G1S にはアルブミンのみならず他のタンパク質も含まれており、アルブミン以外の他のタンパク質がカルシウム沈着物形成に関与したことが示唆された。しかし、G1S における石灰化に関連するタンパク質は不明であり、今後の研究によってカルシウム沈着の促進に寄与する因子を明らかにする必要がある。

これまでオッセオインテグレーションについての解析は、インプラント体を除去するに必要なトルクや押し出すのに必要な力を比較して研究されてきた。このような実験的方法は臨床的には適切でない。本実験での生化学的解析手法によってオッセオインテグレーションを構成する因子が同定されれば、その因子を評価指標とする臨床応用が考えられる。

【結語】

骨と二酸化チタンの結合に関与するタンパク質として細胞外マトリックス、増殖因子、酵素などの複数の機能をもつものが同定された。今後は、今回同定されたプロテオグリカンと二酸化チタンとの詳細な結合様式についての解析が必要と考える。