

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基礎研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591713
 研究課題名（和文）骨再生能を示す次世代型骨補填材料 リン酸オクタカルシウムの抗腫瘍効果研究
 研究課題名（英文）Antineoplastic effect of octacalcium phosphate with osteoconductive characteristics
 研究代表者
 羽鳥 正仁 (HATORI MASAHITO)
 東北大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：70208552

研究成果の概要（和文）：

本研究は、骨再生用担体材料(リン酸オクタカルシウム;OCP)の抗腫瘍効果の検討を目的とした。OCP と OCP を加水分解して微細構造を変化させたアパタイト (HL:Hydrolyzate)をコーティングしたプレートを作製し、プレート上で我々が樹立した Ewing 肉腫細胞株 (EES1) の培養を行った。コントロール(人工骨非コーティングプレート)と比べ、OCP と HL をコーティングしたプレートで EES1 の増殖は抑制されていた。またマウス筋芽細胞 C2C12 も同様に OCP と HL コーティングプレートで増殖が抑制されていた。今後、異なる結晶性状を持つ OCP を開発することにより、整形外科領域の骨軟部腫瘍の増殖を抑制する可能性が出てきた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to evaluate antineoplastic effect of octacalcium phosphate(OCP) with osteoconductive characteristics. EES1, newly-established cell line of Ewing's sarcoma were cultured and evaluated for its growth potential on OCP-coated and hydrolyzate (HL)-coated plates and control. As compared with the control, EES1 growth was suppressed on both OCP-coated and HL-coated plates. C2C12, mouse myoblast cell line was also suppressed on OCP-coated and HL-coated plates. The present study suggests potential application of OCP with various kinds of crystallinity as a bone substitute for the treatment of bone and soft tissue tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科学

キーワード：骨・軟部腫瘍学、人工骨

1. 研究開始当初の背景
 成分を合成によって調整し焼成した HA セ | ラミックスや、類似の成分を持ち生体内で吸収されるβ型-第3リン酸カルシウム(TCP)

セラミックスが臨床に用いられてきた。しかしながら自家骨と同等あるいはそれ以上の骨再生能を示す人工生体材料であるとは言いがたく腫瘍に対する効果の検討も全くなされてない。分担研究者の Suzuki らは、人工合成した生物学的アパタイトの前駆物質であるリン酸オクタカルシウム (OCP) を実験的に生体内へ埋入し合成 OCP は HA よりも骨再生能を格段に促進し、吸収材料である β -TCP よりも短期に骨と置換する素材であることを解明してきた。さらに一連の実験の中で、OCP が培養初期において骨芽細胞の前駆細胞に対して増殖抑制に働き後期には対象と同等となり骨芽細胞への分化が促進されることを解明した。

2. 研究の目的

我々は、優れた骨再生能を有する OCP が、培養初期において細胞増殖抑制効果を有するという点に着眼した。本研究の目的は、OCP の骨腫瘍に対する抗腫瘍効果を調べ臨床応用への可能性を検討することである。

3. 研究の方法

OCP 結晶、ハイドロキシアパタイト (HA) 結晶、OCP に加水分解を行って作製したアパタイト結晶 (HL : Hydrolyzate) の腫瘍細胞および筋芽細胞の増殖抑制効果について *in vitro* 細胞培養系において評価を行った。

OCP および HL を作製し、培養プレートの底面にコーティングを行った。比較のため市販 HA を用いて同様にプレートへコーティングした。我々の樹立した Ewing 肉腫細胞 (EES1) *およびマウス筋芽細胞 (C2C12) を各プレートに播種し、細胞培養が可能であることを確認した。これらをコントロール (人工骨非コーティングプレート) と比較し、各々のプレートの一定面積内の細胞数をカウントすることで細胞の増殖抑制効果の有無を評価した。

(*Hatori M et al. Establishment and Characterization of a Clonal Human Extraskelatal Ewing's Sarcoma Cell Line, EES1. Tohoku J Exp Med 210: 221-230, 2006)

4. 研究成果

(1) OCP、HL、HA コーティングプレートの作製

OCP の作製は共同研究者である Suzuki らが開発した高温下連続合成法 (特 3115642) を用いて作製した。合成 OCP は加水分解によってアパタイトに転換する。この加水分解最終産物であるアパタイト (HL) は Ca が一部欠損した HA であり、人工的に直接合成された HA とは異なる。今回、合成した OCP に 48 時間の加水分解を行い HL を作製した。図 1 に合

成した OCP と HL の走査型電子顕微鏡所見を示す。OCP は幅 $0.5\text{-}1\mu\text{m}$ 、長さ $5\mu\text{m}$ の板状の結晶粒子形態であった。HL も同様の板状結晶形態であった。

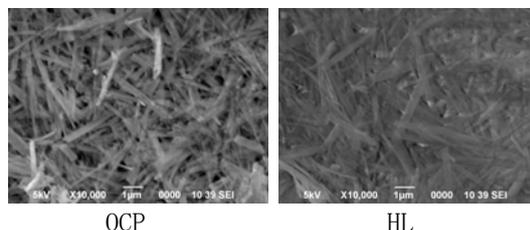


図 1. OCP、HL の走査型電子顕微鏡写真。

各人工骨の化学組成とマイクロ構造を解析した。OCP の Ca/P モル比は 1.28、HL は 1.48 であった。気孔径 (μm) は OCP0.393、HL0.278 であった。気孔率 (%) は OCP90.2、HL87.2 であった。比表面積 (m^2/g) は OCP43.1、HL46.6 であった。測定の結果、OCP と HL は微細結晶構造が類似していることが分かった。

作製した OCP、HL および合成・未焼成 HA (Ca/P 比 ≈ 1.67 , Suzuki O et al. Tohoku J Exp Med 164:37-50, 1991) を純水に溶解し、得られたスラリーを培養プレート底面に滴下した後、 60°C で乾燥させることでプレートへコーティングが可能であった。プレートに紫外線照射を行い滅菌した後、培養に使用した。各々のコーティングプレートに細胞を播種し、 α -MEM (Sigma) +10%FBS 培地を用いて培養を行い、細胞接着、増殖に関するデータを検討した。

(2) Ewing 肉腫細胞 (EES1) の *in vitro* 培養系の評価

培養に用いた EES1 細胞は研究代表者が樹立した細胞株である。先に作製した OCP、HL を 48 ウェル培養プレートにコーティングし EES1 細胞を播種後、培養を開始した。培養 3 日目に Cell counting kit-8 (同仁化学) を使用し、コントロール群と共に細胞数を計測した。

図 2 に結果を示す。

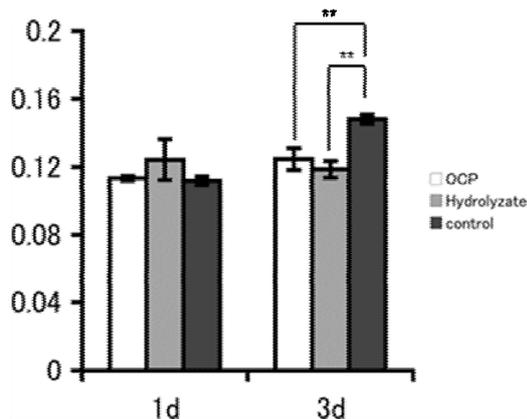


図 2. OCP、HL コーティングプレート、非コーティングプレート上に播種した EES1 の細胞数。Sheffe's F test** p<0.01

培養 3 日目において、コントロールに対して OCP、HL コーティングプレート上で細胞増殖が抑制されており、Sheffe's F test で検定したところ有意差を認めた(p<0.01)。しかし OCP、HL 間の細胞数に明らかな有意差は見られなかった。OCP と HL の肉腫に対する殺細胞効果は明らかではなかったが、EES1 細胞の培養初期から細胞増殖抑制効果を発揮していると考えられた。

(3) 筋芽細胞(C2C12)の in vitro 培養系の評価

先に作製した OCP、HL に加えて HA をコーティングした 6 ウェル培養プレートを用いて C2C12 の培養を行った。培養開始から 7 日目までのプレート単位面積あたり ($1 \times 10^{-1} \text{mm}^2$) の細胞数をカウントした。

図 3 に結果を示す。

Culture Day	1day	7days
Control	54	222.5
OCP	26	91
HL	22.5	141.5
HA	75	234

図 3. OCP、HL、HA コーティングプレート上に播種した C2C12 の細胞数($1 \times 10^{-1} \text{mm}^2$)。

コントロールと HA コーティングプレート上の培養で細胞増殖の程度はほぼ同等であった。OCP と HL コーティングプレートにおいて、培養 7 日目の細胞数は他のプレートに比べて少なく増殖が抑制されたと考えられた。また OCP コーティングプレートは HL に比べ培養 7 日目の細胞数が少なく、より抑制効果が強い可能性があると考えられた。

最近、OCP 結晶の微細構造(寸法、結晶性など)の違いが骨芽細胞の増殖および骨形成能に影響を及ぼすことが明らかになった。OCP

と HL は板状結晶であり、HA は球状結晶である。本実験における C2C12 の増殖抑制効果は人工骨の微細構造および、OCP が持つ特有の化学的性質によるものと考えられ、特に OCP と HL は HA に比べ細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。

以上より、今後、結晶性状や微細構造の異なる OCP を開発、使用することにより整形外科領域の骨軟部腫瘍細胞の増殖を抑制する可能性が出てきた。

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 3 件)

- (1) Honda Y, Suzuki O et al. The effect of microstructure of octacalcium phosphate on the bone regenerative property. *Tissue Eng Part A* 15. 1965-1973, 2009. 査読有り
- (2) Miyatake N, Suzuki O et al. Effect of partial hydrolysis of octacalcium phosphate on its osteoconductive characteristics. *Biomaterials* 30. 1005-1014, 2009. 査読有り
- (3) Dohi O, Ohtani H, Hatori M, Hosaka M et al. Histogenesis-specific expression of fibroblast activation protein and dipeptidylpeptidase-IV in human bone and soft tissue tumours. *Histopathology* 55. 432-440, 2009. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 宮武尚央, 岸本光司, 今泉秀樹, 井樋栄二, 鈴木治, ほか, リン酸オクタカルシウム(OCP)の化学量論性とその骨形成能に及ぼす影響について, 第53回日本歯科理工学会学術講演会, 2009年4月12日, 東京
- (2) 保坂正美, 羽鳥正仁, 綿貫宗則, 山田則一, 田中正彦, ほか, 骨盤に発生した動脈瘤様骨嚢腫に対する治療経験, 第42回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 2009年7月17日, 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ortho.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽鳥 正仁 (HATORI MASAHITO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70208552

(2)研究分担者

2007

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60374948

2007

井樋 栄二 (ITOI EIJI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80193465

2007

保坂 正美 (HOSAKA MASAMI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90302124

(3)連携研究者

2008-2009

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60374948

2008-2009

井樋 栄二 (ITOI EIJI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80193465

2008-2009

保坂 正美 (HOSAKA MASAMI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90302124