

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700500

研究課題名（和文） 抗腫瘍効果を保持した高機能骨修復セメントの作製とその生物学的評価

研究課題名（英文） Fabrication of artificial bone cements with anti-tumor effects and evaluation of their biological properties

研究代表者

本田 みちよ (HONDA MICHIO)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・次世代バイオセラミックスプロジェクト・研究員

研究者番号：20384175

研究成果の概要（和文）：イノシトールリン酸(IP6)のキレート作用により硬化する新規の骨修復セメントを開発した。その際、IP6の有する抗腫瘍作用を利用し、IP6がセメント内部から徐々にリリースされる材料設計を行った。その結果、本セメントは腫瘍細胞特異的にアポトーシスを誘導し、細胞増殖を抑制することで抗腫瘍効果を発現させることが可能となった。また、本セメントは優れた生体適合性を有することから、臨床への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we have fabricated “chelate-setting apatite cements (IP6-HAp cements)” using HAp particles surface-modified with inositol hexaphosphate (IP6) and evaluated their anti-tumor effect. Osteosarcoma cultured on IP6-HAp cements (over 3000 ppm IP6) resulted in inhibition of cell growth, although normal cells grew well on those cements. These results led us to consider that locally high concentration of IP6 which was released from cement acts on the cells directly as anti-tumor agent and induces the apoptosis. Consequently, IP6-HAp cement might gain the anti-tumor effect and act as a carrier for local drug delivery system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学・抗腫瘍効果・骨セメント・バイオマテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

「骨修復セメント」に関する研究は国内外を問わず競争の激しい分野の一つと言える。特に、他の先進国よりも急速に超高齢社会に突入する我が国においては、骨粗鬆症などの疾患に対する高度先進医療を実現することが急務な課題であることから競争は激化している。また、日本人の死因の第一位が悪性腫瘍で、すべての悪性腫瘍に骨転移の可能性が

あり病的骨折を起こす症例も多いため、需要は拡大している。治療の際には、早期の離床を目指すため、近年、低侵襲性の骨セメント注入療法などが注目されており、医療現場からのニーズは高まる一方で熾烈な競争を生んだ要因の一つと考えられる。現在までに水酸アパタイト( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp)などのバイオセラミックスを利用した骨充填剤が整

形外科などの領域で臨床応用されている。水酸アパタイトの材料形状には緻密体・多孔体・顆粒・セメント(ペースト状人工骨)などがあるが、任意の形状に成型可能なセメントはよりニーズの高い材料であり、その開発にも期待が高まっている。これまでに報告された「ペースト状人工骨(骨修復アパタイトセメント)」は、主に酸性物質のリン酸水素カルシウム( $\text{CaHPO}_4$ )と塩基性物質のリン酸四カルシウム( $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ )との酸-塩基反応を經由し、その反応過程で硬化する性質を利用している。しかし、この場合、セメントの硬化にかなりの時間を要する上に、硬化時に pH の変動を伴うため、周辺組織、細胞で起こる諸反応に影響を与えていることが予想される。また、硬化時に血液が介在すると硬化時間がさらに遅れたり、硬化しなくなったりするという報告もある。一方、ポリメチルメタクリレート(PMMA)骨セメントは、MMA のラジカル重合により数分で硬化し、過酷な生体力学負荷に長期にわたって十分耐えることが示されている。しかし、従来から骨との結合性(生体適合性)の点で長期の使用に問題があることが指摘されてきた。このように臨床応用されている現行製品でさえニーズを十分に満たしていない。

そこで、本研究では、「イノシトールリン酸(IP6)」のキレート作用による従来のセメントの硬化システムとは異なったメカニズムを利用した「キレート型ペースト状セメント」を作製する。これは神奈川科学技術アカデミー相澤プロジェクトリーダー(明治大学理工学部・教授)が考案した「新しい硬化メカニズムを持つ骨修復セメント」が基盤技術となる。IP6 は多くの動植物の細胞内に存在し、EDTA に匹敵するほどの強力なキレート作用を持ち、細胞増殖、分化等極めて重要な細胞機能を制御する役割を担っている。特に抗腫瘍効果・抗酸化効果を有し、安全性が高いことからガン治療への応用も期待されている。このセメントの硬化メカニズムは IP6 のキレート作用により、アパタイト粒子の Ca 同士が結合することにより、短時間で硬化することが可能である。従来の骨修復セメントを用いた「骨の強度を高め、疼痛を緩和させる治療」に使用するだけでなく、「転移したガンの増殖抑制やガンの予防等」を付加し、単なる骨セメントとしてではなく、その用途を拡充させた高機能セメントの作出を狙いとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、IP6 の持つ二つの利点(強いキレート作用・抗腫瘍効果)を応用し、従来の骨修復セメントを用いた「骨の強度を高め、疼痛を緩和させる治療」に使用するだけでなく、「転移したガンの増殖抑制やガンの予防

等」を付加し、単なる骨セメントとしてではなく、その用途を拡充させた高機能セメントを作製し、生物学的に評価する。

### (1) IP6 の抗腫瘍メカニズムの解明

IP6 の抗腫瘍効果は *in vitro* における種々の細胞株において確認されているが、その作用メカニズムは未だ明らかではない。そこで、本研究では、IP6 をセメントに修飾せず、単体で培養細胞へ曝露することにより、どのような影響が見られるかを生物学的に評価する。

### (2) IP6 を用いたキレート型骨修復セメントの作製

生体適合性(初期接着率・細胞増殖・細胞形態等により評価)を有するセメントを作製し、その表面の構造や特性を調べ、材料と細胞との関係を明確にする。

### (3) キレート型骨修復セメントの抗腫瘍効果の検証

作製したセメント上で骨肉腫細胞を培養し、その増殖が抑制されるか否かで抗腫瘍効果を検討する。またその際、IP6 がどのようなメカニズムで細胞増殖や形態を制御するのかを明らかにする。

### (4) *in vivo* におけるキレート型骨修復セメントの生体適合性

ウサギなどの動物に作製したセメントをインプラントし、骨組織との適合性を明らかにする。

### (5) キレート硬化型骨修復セメント上での成長因子を介した抗腫瘍効果の検証

破骨細胞と IP6 もしくは、破骨細胞と IP6-HAp セメントとの関係を明確にする。

## 3. 研究の方法

### (1) IP6 の抗腫瘍メカニズムの解明

IP6 溶液単独での腫瘍細胞に対する影響を調べるために、種々の濃度の IP6 溶液(0-1 mM)を調製し、これをヒト骨肉腫細胞(human osteosarcoma; HOS)へ一定時間処理した。細胞増殖性については、生細胞数をカウントすることで、また、遺伝子発現変動については、各細胞より合成した cDNA を用いて DNA マイクロアレイにより解析した。

### (2) セメント原料粉体の調製とセメント作製

セメント原料粉体には、湿式法により合成した水酸アパタイト(wHAp)を用い、その粉体を 1000, 2000, 3000, 5000 ppm に調製した IP6 溶液中で 5 h 表面修飾した。その後、吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾 wHAp 粉体(IP6-wHAp)を得た。また各種評価を行うため

に、固液比が 1/0.3 [g/cm<sup>3</sup>] となるように、IP6-wHAp 粉体と水を混練し、一軸加圧成形することにより、セメントを作製した。なお、各セメントの表面粗さはほぼ一定となるよう作製した。生体適合性の評価には、作製したセメント上へマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を播種し、一定期間培養後、種々の項目(初期接着率・細胞増殖・細胞形態等)を評価した。

### (3) キレート型骨修復セメントの抗腫瘍効果の検証

各セメント試料片における細胞の増殖性を調べるために、HOS 細胞をセメント(φ22 mm)上へ $6 \times 10^4$  cells となるように播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で一定期間培養した後、細胞数をカウントすることにより増殖曲線を作成した。また、その際の細胞形態について調べるために、細胞骨格タンパク質であるアクチンをファロイジンによりを染色し、落斜型蛍光顕微鏡で観察した。さらに、細胞増殖性に最も違いが認められた 5000IP6-wHAp セメントと wHAp および 1000IP6-wHAp セメントにおける HOS 細胞の遺伝子発現変動について、DNA マイクロアレイを用いて解析した。

### (4) *in vivo* におけるキレート型骨修復セメントの生体適合性

セメント試料片の生体適合性を調査するために、セメントをウサギの両足脛骨骨端部へ一定期間埋入した。その後、周囲の骨組織と共に試料片を取り出し、組織標本(凍結薄切片および非脱灰研磨標本)を作製した。

### (5) キレート硬化型骨修復セメント上での成長因子を介した抗腫瘍効果の検証

破骨細胞と IP6 もしくは、破骨細胞と IP6-HAp セメントとの関係を調べるために、種々の濃度の IP6 溶液(0-1 mM)を調製し、これを破骨細胞へ一定時間処理した。細胞増殖性は Alamar blue 試薬を利用して評価した。また、各セメント試料片における細胞の増殖性を調べるために、破骨細胞をセメント(φ22 mm)上へ $6 \times 10^4$  cells となるように播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で一定期間培養した後、形態を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) IP6 の抗腫瘍メカニズムの解明

HOS 細胞へ種々の濃度の IP6 溶液を処理した結果、濃度依存的に細胞増殖性が抑制されることが明らかになった(図 1)。特に、1 mM 以上の IP6 を処理した場合には、細胞がほとんど生存できないことが分かった。この結果は、他の腫瘍細胞(ヒト子宮頸ガン由来 HeLa 細胞)においても確認されたことから、IP6 は様々な腫瘍細胞に対し、増殖を抑制する効果

があることが示された。一方、正常細胞(MC3T3-E1, CHO-K1 など)に対しては、

1 mM の IP6 は増殖性に影響を与えなかった。このことから、IP6 は腫瘍細胞選択的に抗腫瘍性を示すことが明らかになった。次に、どのようなメカニズムで IP6 が細胞に対して影響を及ぼすのかを調べるために、DNA マイクロアレイを用いて、IP6 処理に伴う遺伝子発現の変動を調査した。HOS 細胞へ細胞増殖抑制が認められた IP6 (1 mM)溶液を 24 時間処理し、未処理群との違いを調べた。その結果、変動が認められた遺伝子群は、1) 細胞間シグナル伝達・細胞増殖や分化・形態形成など生物学的に重要な工程に関わる遺伝子や 2) 細胞内や細胞外・細胞外マトリックスを含む細胞構成成分に関わる遺伝子、また 3) アポトーシス調節・様々な分子との結合・細胞接着分子・転写因子など分子機能に関わる遺伝子と多岐にわたった。なかでも、IP6 の処理に伴い細胞死が誘導されたことから、今回はアポトーシスに関連する遺伝子に注目し、その変動を解析した。その結果、アポトーシスを促進する遺伝子の発現は亢進し、アポトーシスを抑制する遺伝子の発現は低下することが明らかになった。すなわち、IP6 を腫瘍細胞へ処理することで、アポトーシスが誘導され、結果として腫瘍細胞の増殖が抑制されることがわかった。

### (2) IP6 を用いたキレート型骨修復セメントの作製

XRD パターンより、表面修飾に用いた IP6 溶液の濃度に関わらず、得られた粉体はいずれも HAp 単一相であり、IP6 による表面修飾は粉体の結晶性に影響を与えないことを確認した。さらに、wHAp 粉体に対する IP6 の吸着量について調べたところ、IP6 は wHAp 粉体に対しても典型的な Langmuir 型の単分子層吸着し、3000 ppm 以上で飽和に達することが示された。さらに、得られた粉体の表面電位を測定した結果、IP6 の吸着に伴い負電荷へシフトし、吸着量と同様に 3000 ppm 程度で一定に達した。また、それらの粉体を用いて作製した IP6-HAp セメントは HAp セメントに比べ、高い力学的強度を示した。IP6 の吸着量が増加したことにより、キレート部位が増加し、強度の向上につながったと考え

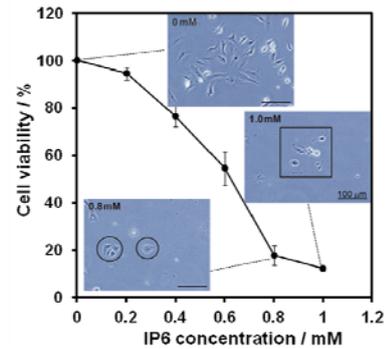


図 1. IP6 による細胞増殖抑制

られる。強度の向上は、臨床応用を踏まえると非常に有効である。作製したセメントに MC3T3-E1 細胞を播種し、培養した結果、いずれのセメントにおいても良好な増殖性を示した。この結果は、IP6-HAp セメントが優れた生体適合性を有していることを示している。

### (3) キレート型骨修復セメントの抗腫瘍効果の検証

セメント試料片における HOS 細胞の増殖性を調べた結果、1000 ppm IP6 溶液で表面修飾した粉体(1000IP6-wHAp)を用いて作製したセメント上で培養した HOS 細胞は表面修飾をしていない wHAp セメント上で培養した細胞と同程度の増殖性を示した(図 2)。これに対し、3000IP6-wHAp セメントにおいては、5 日目以降増殖性が低減し、培養 7 日目における生細胞数は wHAp に対し、57.06%にまで低下した。一方、5000IP6-wHAp セメントでは、培養 3 日目より著しくその増殖性が低下し、

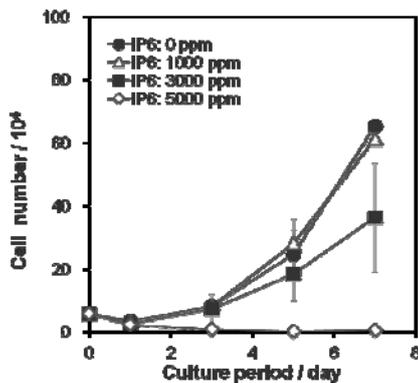


図 2. IP6-HAp セメント上での HOS 細胞の増殖性

wHAp に対し 3 日目では 11.06%、5 日目は 1.42%、7 日目は 1.12%にまで細胞増殖が抑制されていた。次に、この時の細胞形態について細胞骨格タンパク質であるアクチンをファロイジンにより染色し、落斜型蛍光顕微鏡で観察した。その結果、培養 3 日目以降 3000 ppm 以上の IP6 で表面修飾したセメント上では細胞数が著しく減少していたのが分かる。さらにそれらの形態を詳細に観察したところ、細胞膜が崩壊したものや楕円形や紡錘形に変形した細胞が多く認められ、形態に異常が見られる細胞が多数存在することが明らかになった。また、播種 1 日後に関しても 3000、5000IP6-wHAp セメント上で培養した場合は細胞増殖が抑制された(data not shown)。しかし、その増殖抑制率は 3 日目以降に比べると小さかった。これらの結果より、セメント上での細胞増殖性に関しては、初期の培養環境に加え、培養過程における環境の変化が大きく影響することが考えられた。

続いて、DNA マイクロアレイにより、各セメント上での遺伝子発現変動について解析

した結果、IP6 溶液のみを処理した場合と同様に様々な遺伝子発現に変動が確認された。中でも、高濃度の IP6-wHAp セメント上で細胞死が誘導されたことから、今回はアポトーシスに関連する遺伝子に注目し、その変動を解析した(図 3)。

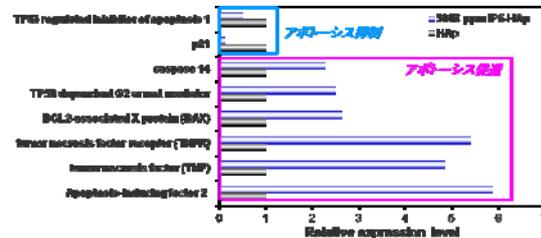


図 3. IP6-HAp セメント上での遺伝子発現変動 (アポトーシス関連)

アポトーシスが誘導されるには多くの経路が存在する。TNF (tumor necrosis factor) と呼ばれるサイトカインは炎症性サイトカインであると同時にアポトーシス誘導因子 (= デス因子) としても知られる[4]。今回、この TNF は 5000IP6-wHAp セメント上で培養した細胞において、コントロール(wHAp)と比較し、発現レベルが約 5 倍に増加した。また、それに伴い TNF 受容体の発現レベルも増加した。これらの現象は 1000IP6-wHAp セメントにおいては確認されていないことから、高濃度の IP6 で表面修飾した際にアポトーシス誘導因子である TNF の発現が亢進するということが示された。次に、アポトーシスを促進する遺伝子(Bax)及び抑制する遺伝子(BCL-2)に注目した。マイクロアレイの解析による結果、5000 IP6-wHAp セメント上で培養した HOS 細胞において、Bax はコントロールに対し 2.63 倍、BCL-2 は 0.226 倍の発現レベルであった。つまり、5000 ppm IP6 溶液で表面修飾したセメントで HOS 細胞を培養することにより、アポトーシスが促進されたことが分かる。また他のアポトーシス誘導因子も複数発現レベルの向上が認められた。しかしながら、アポトーシスの検出によく使用される caspase 群の遺伝子発現に関しては、caspase14 のみ増加が認められたが、他は増加せず、むしろ減少していた。高濃度の IP6 で wHAp 粉体を表面修飾した場合、アポトーシスが誘導されることは確かであるが、24 時間の培養時間ではカスケードの最終ポイントまで達していない可能性もある。調べる遺伝子を絞り込み、時系列を追って遺伝子発現を定量することにより詳細を解明することが重要であると考えられる。

3000 ppm 以上の IP6 溶液で表面修飾した粉

体を用いて作製した IP6-wHAp セメント上で HOS 細胞を培養すると、細胞形態の異常、細胞増殖の抑制が生じ、アポトーシスに関連する種々の遺伝子発現に変動が認められることが分かった。そこで、セメント上で確認されたアポトーシスを介した抗腫瘍性という機能がどのように発現されているのかということについて検証するために、作製した IP6-wHAp セメント(1000, 3000, 5000 ppm)を水中に一定時間浸漬させ、溶出する IP6 量について調べた(図 4)。

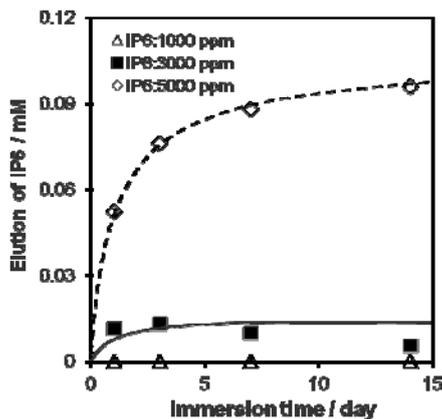


図 4. IP6-HAp セメントからの IP6 の溶出

その結果、1000IP6-wHAp セメントからは IP6 の溶出が認められなかったが、3000IP6-wHAp セメントからは 0.01mM 程度の IP6 が溶出することが分かった。また、5000IP6-wHAp セメントからは約 0.1 mM の IP6 が溶出することが確認された。検出された IP6 は一度 wHAp へ吸着した IP6 が脱着後に溶出したというより、粉体を表面修飾する際に用いた IP6 のうち wHAp 粉体へ未吸着であったものが徐々に溶出したと推測できる。ここで、IP6 溶液単独で HOS 細胞の増殖性に影響を及ぼす濃度が 1 mM 以上であるのに対し、増殖抑制が認められた 5000IP6-wHAp セメントから溶出した IP6 の濃度は最大でも 0.1 mM 程度であり、両者に大きな違いが生じた。この違いは、セメント表面上では溶出された IP6 が局所的に高濃度となり、その IP6 を細胞が取り込んだことで、細胞死が引き起こされたと推測することができる。すなわち、IP6-wHAp セメントにおけるアポトーシスを介した細胞増殖抑制は 1) IP6 の表面修飾によるセメント材料表面の構造変化に対する応答、2) 溶出された局所的に高濃度となった IP6 を細胞が取り込んだことに対する応答により引き起こされたと考えられる。つまりこの時、セメントは薬剤を担持した DDS (drug delivery system) キャリアの様に機能し

ていると思われる(図 5)。

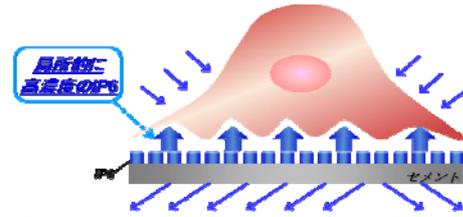


図 5. セメントからの IP6 の溶出と細胞への作用

#### (4) *in vivo* におけるキレート型骨修復セメントの生体適合性

セメント試料片(wHAp, 1000IP6-wHAp セメント)をウサギへ埋入し 4, 24 週後にトルイジンブルー(TB)染色による組織学的観察を行った。その結果、IP6 の有無に関わらずセメントは骨と直接結合していることが確認された。さらに、埋入期間が長くなるにつれ、成熟した骨が観察されたことから、HAp および IP6-HAp セメントの周辺においては早期から骨形成が行われていることが明らかになった。また、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色および酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色の結果から、これらのセメント周囲での骨芽細胞および破骨細胞の存在が認められたことから、IP6-HAp セメントは良好な生体適合性と高い生体活性を有する材料としても期待できる。

#### (5) キレート硬化型骨修復セメント上での成長因子を介した抗腫瘍効果の検証

破骨細胞へ種々の濃度の IP6 溶液を処理した結果、1 mM までの濃度域では破骨細胞の増殖に影響を与えないことが分かった。したがって破骨細胞自身の増殖を抑制するためにはさらに高濃度の IP6 が必要である。一方、破骨細胞培養環境下を模倣した溶解性試験において、IP6-HAp セメントは、その溶解性が低かったことから、IP6 のリリース量も低いことが分かった、リリースした IP6 により抗腫瘍性を発現させるためには、セメント原料粉体を溶解性の高いリン酸三カルシウムに変更する必要があることがわかった。

#### 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 1 件)

- ① Michiyo Honda, Toshiisa Konishi, Minoru Mizumoto, Mamoru Aizawa, "In Vitro Biological Evaluation of Anti-Tumor Effect of the Chelate-Setting Hydroxyapatite Cement", *Key. Eng. Mater.*, 査読有, 529-530, 173-177 (2013). DOI: 10.4028

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Michiyo Honda, Toshiisa Konishi, Minori Mizumoto, Mamoru Aizawa, “*In Vitro* Biological Evaluation of Anti-Tumor Effect of the Chelate-Setting Hydroxyapatite Cement”, *Bioceramics* 24 (2012.10.21-24), Fukuoka.
- ② 本田みちよ、小西敏功、水本みのり、相澤守、“キレート硬化型骨アパタイトセメントにおける骨肉腫細胞の生化学的評価”、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22)、京都.
- ③ 本田みちよ、小西敏功、水本みのり、相澤守、“キレート硬化型骨アパタイトセメントの抗腫瘍性評価”、無機マテリアル学会第 121 回学術講演会(2010.11.04-05)、仙台.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本田 みちよ (HONDA MICHIO)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・次世代バイオセラミックスプロジェクト・研究員

研究者番号：20384175