

on the survival of patients with CRPC or metastatic prostate cancer.<sup>4,5</sup> Docetaxel (DTX), a semisynthetic taxoid produced from the needles of the European yew tree, is the first chemotherapy agent to improve survival in CRPC, and the US Food and Drug Administration has recommended a 3-week DTX-prednisone regimen as a first-line treatment option for CRPC patients.<sup>6–8</sup> Although DTX-based chemotherapy may provide some benefits, most CRPC patients do not realize them, and the average survival remains relatively brief. Moreover, the current regimen requires the administration of high doses of DTX, which causes toxic reactions and thereby precludes the use of DTX as a monotherapy.<sup>9</sup> To reduce toxicity and to improve the survival and quality of life of CRPC patients, novel therapeutic strategies targeting the molecular basis of androgen- and chemo-resistance of prostate cancer using a reduced but equieffective dose of DTX should be developed.

Cancer nanotechnology offers great potential for cancer diagnosis, targeted treatment, and monitoring.<sup>10</sup> Researchers are exploring the use of nanoparticles (NPs) ranging in length from 1 nm to 100 nm in two or three dimensions to detect, image, monitor, and treat cancers. Among the rapidly evolving types of NPs, magnetic NPs (MgNPs) – biocompatible and superparamagnetic nanomaterials with chemical stability and low toxicity – are especially promising.<sup>11</sup> The combination of MgNPs with anticancer agents has been applied to leukemia, lung, and pancreatic cancer cells *in vitro* and to xenograft-injected nude mice.<sup>12–15</sup> MgNPs composed of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) are being widely investigated for use as targeted drug carriers. The aim of this study was to evaluate the effect of treatment with MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  or MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  combined with DTX on prostate cancer cell growth *in vitro*. We also explored the mechanism underlying MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -induced cell death, focusing on the effect of MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  treatment on the production of reactive oxygen species (ROS).

## Materials and methods

### Physical characterization of MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$

MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  were obtained from the Toda Kogyo Corporation (Otake, Hiroshima, Japan) and had the following characteristics: spherical shape; an average particle size of 10 nm in powder and 8–10 nm as measured by transmission electron microscopy (TEM); a size of 60–100 nm as measured by dynamic light scattering (DLS); a zeta potential of –30 to –40 mV at a pH of 10; and a surface area in powder of 100–120 m<sup>2</sup>/g.

### Preparation of MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$

After ultraviolet sterilization of the particles, MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  stocks were prepared by suspending particles in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 with supplements to yield final concentrations of 1 µg/mL, 10 µg/mL, or 100 µg/mL, followed by sonication at 30 W for 10 minutes with an Ultrasonic Homogenizer VP-050 (TAITEC, Koshigaya, Saitama, Japan).

### Docetaxel

DTX was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; stock solution). Stock solutions were aliquoted and stored at –20°C to avoid repetitive freeze–thaw cycles. Stock solutions were serially diluted using culture medium to prepare working solutions.

### Cell lines

LNCaP, DU145, and PC-3 human prostate cancer cell lines were purchased from American Tissue Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were cultured in RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/mL penicillin–streptomycin in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The human normal prostate stromal cell (PrSC) line was obtained from BioWhittaker® (Lonza Walkersville, Inc, Walkersville, MD, USA) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS, 100 U/mL of penicillin G, 100 µg/mL of streptomycin, ITH (5 µg/mL insulin, 5 µg/mL transferrin, and 1.4 µmol/L hydrocortisone), and 5 ng/mL of bFGF in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### Characterization of MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ suspension

MgNP- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  suspensions and their cellular localization were characterized using the following methods.

#### Dynamic light scattering (DLS)

The average hydrodynamic size and size distribution of MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  in media were determined by DLS using a Fiber-Optics Particle Analyzer FPAR-1000 (Otsuka Electronics Co, Ltd, Hirakata, Osaka, Japan). DU145 cells were incubated with MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (1 µg/mL, 10 µg/mL, or 100 µg/mL).

#### Transmission electron microscopy (TEM)

DU145 cells were incubated with MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (10 µg/mL). After incubation for 24 hours, cells were collected, washed three times with phosphate buffered saline (PBS), and fixed

with 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) at 4°C for 4 hours. The resulting samples were postfixed with 2% osmium tetroxide at 4°C for 2 hours, dehydrated, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections (80 nm) were then stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed by TEM.

### Measurement of intracellular reactive oxygen species

ROS were measured using the CM-H2DCFDA assay (Life Technologies Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. DU145 cells ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) were incubated with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (1 µg/mL, 10 µg/mL, or 100 µg/mL) for 24 hours in the absence or presence of N-acetylcysteine (NAC; 10 mM) (Sigma-Aldrich Co); NAC was added 3 hours before treatment with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. A stock solution of CM-H2DCFDA (5 mM) was freshly prepared in DMSO and diluted to a final concentration of 1 µM in PBS. Cells were washed with PBS followed by incubation with 50 µL of working solution of fluorochrome marker CM-H2 DCFDA for 30 minutes. Fluorescent imaging was recorded using an IX2 N-FL-1 microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), and analyzed using imaging software (Adobe Photoshop Elements 8; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA). As a positive control, cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) for 24 hours.

### Analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA

The MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (1 µg/mL, 10 µg/mL, or 100 µg/mL) were added to wells containing DU145, PC-3, or LNCap cells ( $5.0 \times 10^6$  cells), and incubated for 72 hours at 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Nuclear deoxyribonucleic acid (DNA) of the cells was isolated by the sodium iodide method. Analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) was performed as previously described.<sup>16</sup> The 8-OH-dG levels were measured by high performance liquid chromatography electrochemical detection. The amount of 8-OH-dG in the DNA was determined through comparisons with the authentic standards, and expressed as the number of 8-OH-dG per 10<sup>6</sup> deoxyguanosine (dG).

### AlamarBlue® assay

Cell viability was determined using the AlamarBlue® assay (Alamar Biosciences, Inc, Sacramento, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 24-well plates ( $1.0 \times 10^4$  cells/well); cells were treated with DTX (0.1 µM, 1 µM, 10 µM, or 100 µM) or DTX

(1 nM) plus MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (1 µg/mL, 10 µg/mL, or 100 µg/mL) for 48 hours at 37°C (5% CO<sub>2</sub>). AlamarBlue® was added to each well at 10% volume and was incubated for 200 minutes. Metabolically active cells reduced the dye into a fluorescent form; fluorescence intensity was measured using a plate reader (excitation/emission: 570 nm/600 nm; Viento XS, DS Pharma Biomedical Co, Ltd, Suita, Osaka, Japan). Fluorescence intensity was used to estimate cell viability by linear interpolation between the emission from cells treated with 0.1% saponin (0% viability) and that from untreated cells (100% viability).

### Flow cytometry (FCM) analysis for cell apoptosis

The apoptotic peak (sub-G1) of cells was measured using FCM. DU145 cells ( $1.0 \times 10^6$  cells) were seeded in 100 mm culture dishes; cells were either untreated (control), or treated with DTX (1 nM) or MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 µg/mL or 100 µg/mL) in the absence or presence of DTX (1 nM). Aspirated medium was collected to determine the amount of floating cells and cell debris as indicators of cell death. Cells were collected and fixed in ice-cold 70% ethanol and stored at -20°C before use. In preparation for use, cells were washed with PBS and resuspended in PBS before incubation with ribonuclease (0.5 mg/mL) at room temperature for 30 minutes. After the addition of 1 mg/mL of propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich), the cells were passed through a 40 mm nylon mesh for analysis using an LSRII flow cytometer (BD Bioscience Franklin Lakes, NJ, USA). The fluorescence intensities of PI were measured by FCM, and the number of cells in the sub-G1 peak was determined. Quantification of the fraction was performed with ModFit LT for Mac 3.0 (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

Annexin-V assay was used to detect the early phases of apoptosis. Apoptosis was assessed by monitoring the expression of phosphatidylserine on the outer leaflet – an early marker of apoptotic cell death. Phosphatidylserine was stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled Annexin V. Loss of membrane integrity as a consequence of necrosis was detected using PI staining of DNA. Briefly, DU145 cells ( $1.0 \times 10^6$ ) were either untreated (control) or treated with DTX (1 nM), or with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 µg/mL or 100 µg/mL) for 24 hours in the absence or presence of DTX (1 nM). After incubation, cells were harvested, gently washed twice in ice-cold PBS, collected by centrifugation, and then stained using an Annexin V-FITC Kit (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were then stained with Annexin V and PI

for analysis by FCM within 1 hour of staining using the FL1 (FITC) and FL3 (PI) lines.

## Western blot analysis

Cells were lysed in Radioimmunoprecipitation assay buffer (Sigma-Aldrich) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich). Total protein concentration was determined by Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Equal amounts of lysates were resolved on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked with a blocking reagent (NOF Corporation, Tokyo, Japan) for 1 hour at room temperature, and incubated overnight at 4°C with the respective primary antibodies in Tris-buffered saline and Tween 20 (TBST). The membranes were washed with TBST three times and incubated with diluted horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:3000 for nuclear factor  $\kappa$ B [NF $\kappa$ B]; 1:10,000 for  $\beta$ -actin) for 1 hour at room temperature. After three additional washes, membranes were detected using an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, UK). Antibodies against NF $\kappa$ B and  $\beta$ -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA) and Sigma-Aldrich, respectively; antirabbit and antimouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from GE Healthcare (GE Healthcare UK Ltd).

## Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. Data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed using an unpaired Student's *t*-test with or without Welch's correction and ANOVA. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> characterization in cell culture medium

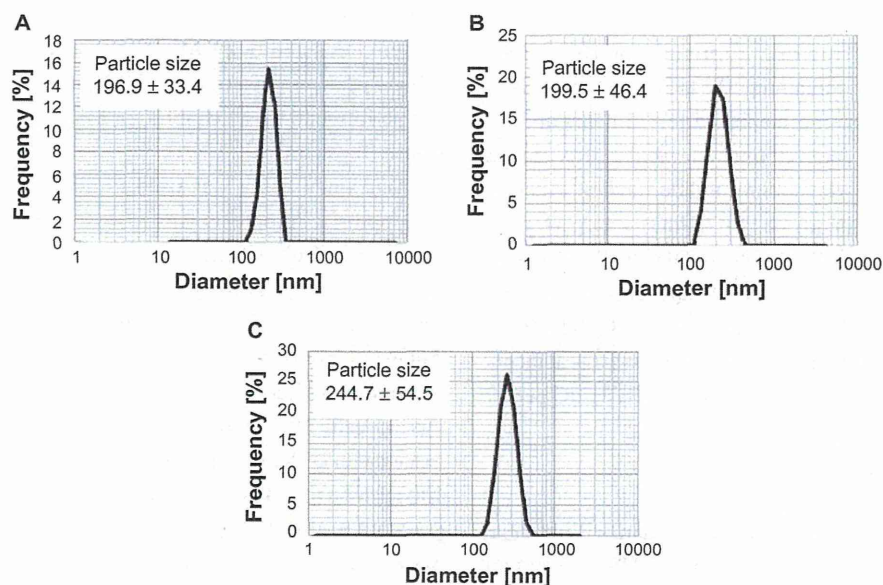
Figure 1 shows the mean hydrodynamic diameter of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> in medium with supplements as measured by DLS. The mean hydrodynamic diameter of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> increased with increasing concentration, suggesting that aggregation is enhanced at higher concentrations.

### Cellular uptake

Cellular uptake of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> was evident from TEM microphotographs (Figure 2). MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> were localized within intracellular vesicles.

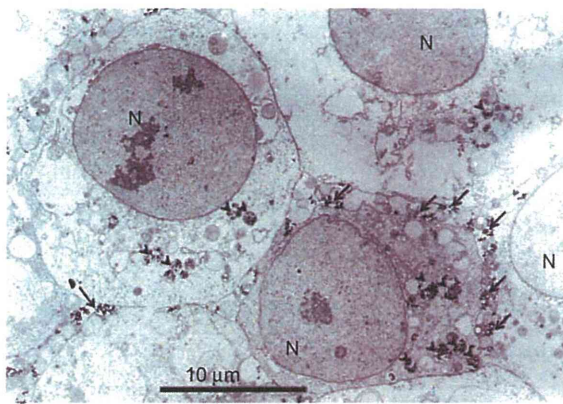
### ROS production

MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> caused dose-dependent increases of ROS production in DU145 and PC-3 cells; a significant increase in LNCaP cells was evident only at the highest dose. Treatment with 100  $\mu$ g/mL of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> elicited a



**Figure 1** Measurement of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> size by dynamic light scattering. DU145 cells were incubated with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: (A) 1  $\mu$ g/mL, (B) 10  $\mu$ g/mL, and (C) 100  $\mu$ g/mL.

**Abbreviation:** MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles.

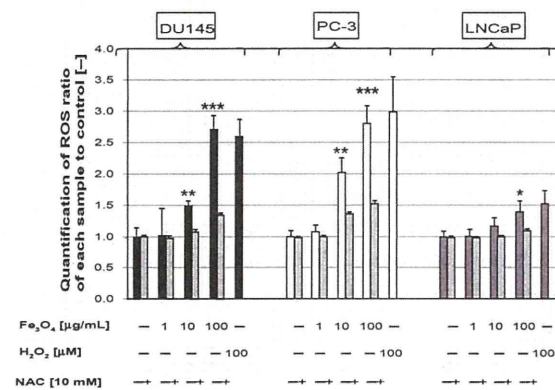


**Figure 2** Transmission electron microscopy imaging of DU145 cells treated with 10 µg/mL of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles.  
**Notes:** Arrow: extracellular magnetic nanoparticles; arrow head: intracellular magnetic nanoparticles.  
**Abbreviation:** N, nucleus.

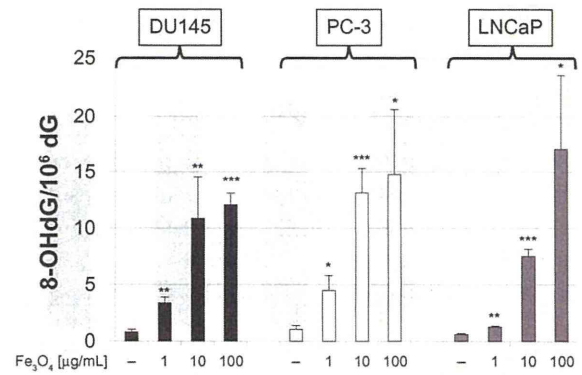
response comparable to that evoked by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 3). Among the three cell lines, ROS levels in the DU145 and PC-3 lines were higher than that in the LNCaP line. Pretreatment with NAC attenuated the MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-induced rise in ROS in all three prostate cancer cell lines (Figure 3).

### 8-OH-dG levels in DNA

The 8-OH-dG levels in the DNA in all three prostate cancer cell lines increased in a dose-dependent manner (Figure 4). The 8-OH-dG levels of DU145 and PC-3 cells exposed to 10 µg/mL of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> were 13-fold to 14-fold greater than that of the untreated control cells.



**Figure 3** Production of intracellular ROS in DU145, PC-3, and LNCaP cells after treatment with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for 24 hours in the absence or presence of NAC.  
**Notes:** Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments. \*Significantly different from the untreated control at *P* < 0.05; \*\*significantly different from the control at *P* < 0.01; \*\*\*significantly different from the untreated control at *P* < 0.001.  
**Abbreviations:** ROS, reactive oxygen species; MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles; NAC, N-acetylcysteine; SD, standard deviation.



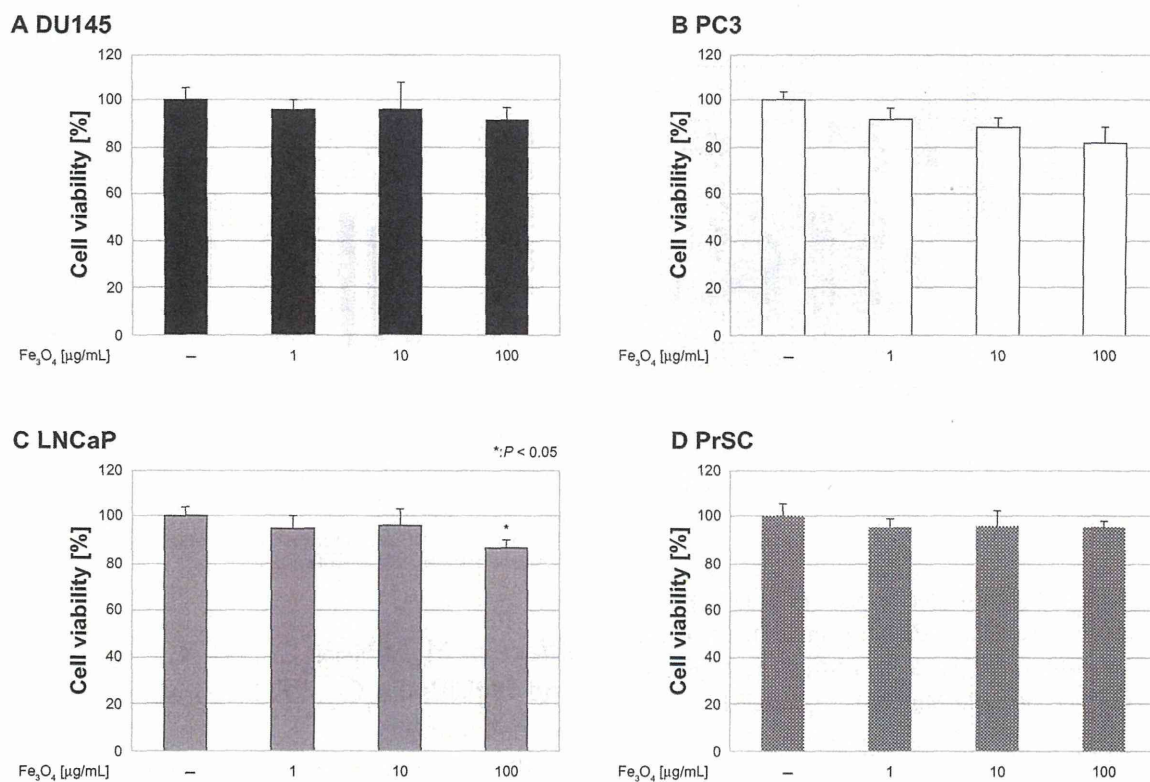
**Figure 4** 8-OH-dG levels in DU145, PC-3, and LNCaP cells after 72 hours of treatment with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.  
**Notes:** Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments. \*Significantly different from the untreated control at *P* < 0.05; \*\*significantly different from the control at *P* < 0.01; \*\*\*significantly different from the untreated control at *P* < 0.001.  
**Abbreviations:** 8-OH-dG, 8-hydroxydeoxyguanosine; MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles; SD, standard deviation.

### Effect of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, DTX, and MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DTX combinations on cell viability

MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> alone slightly, but significantly, reduced the viability of LNCaP cells, but had little or no effect on the viability of DU145, PC-3 and PrSC cells (Figure 5). These results suggest that the cytotoxicity of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> may be dependent on the cell type of the prostate cancer cell line. DTX alone decreased cell viability in a dose-dependent manner in all three cancer cell lines (Figure 6). Combined treatment with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and DTX enhanced the inhibitory effect of DTX; in PC-3 cells, 100 µg/mL of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> plus 1 nM of DTX reduced cell viability so it was similar to that caused by 10 nM DTX alone. These data suggest that MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> may be beneficial in reducing the DTX dose it may and thereby overcome the safety limitations of DTX.

### Effect of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, DTX, and MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DTX combinations on cell death

An apoptotic fraction of cells containing subdiploid amounts of DNA was detected as a sub-G1 peak (Figure 7). MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> caused a dose-dependent increase in the percentage of DU145 cells in the sub-G1 fraction; similarly, DTX alone elicited a rise in the percentage of cells in the sub-G1 fraction. Combined treatment with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> plus DTX augmented the effect compared to either treatment alone; this enhancement was dose-dependent.



**Figure 5** Effect of MgNP- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  exposure on cell line viability. Effect of MgNP- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  exposure on the viability of (A) DU145, (B) PC-3, (C) LNCaP, and (D) PrSC cell lines.

**Notes:** Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

**Abbreviations:** MgNP- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetic nanoparticles; SD, standard deviation.

Neither MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nor DTX alone increased Annexin V/PI staining (Figure 8). Conversely, a significant increase in the percentage of apoptotic cells was observed during the combined treatment with MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and DTX compared to the untreated, the treatment with MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  alone, or DTX alone ( $P < 0.05$ ).

### Effect of MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ and MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DTX combinations on NF $\kappa$ B expression in DU145 cells

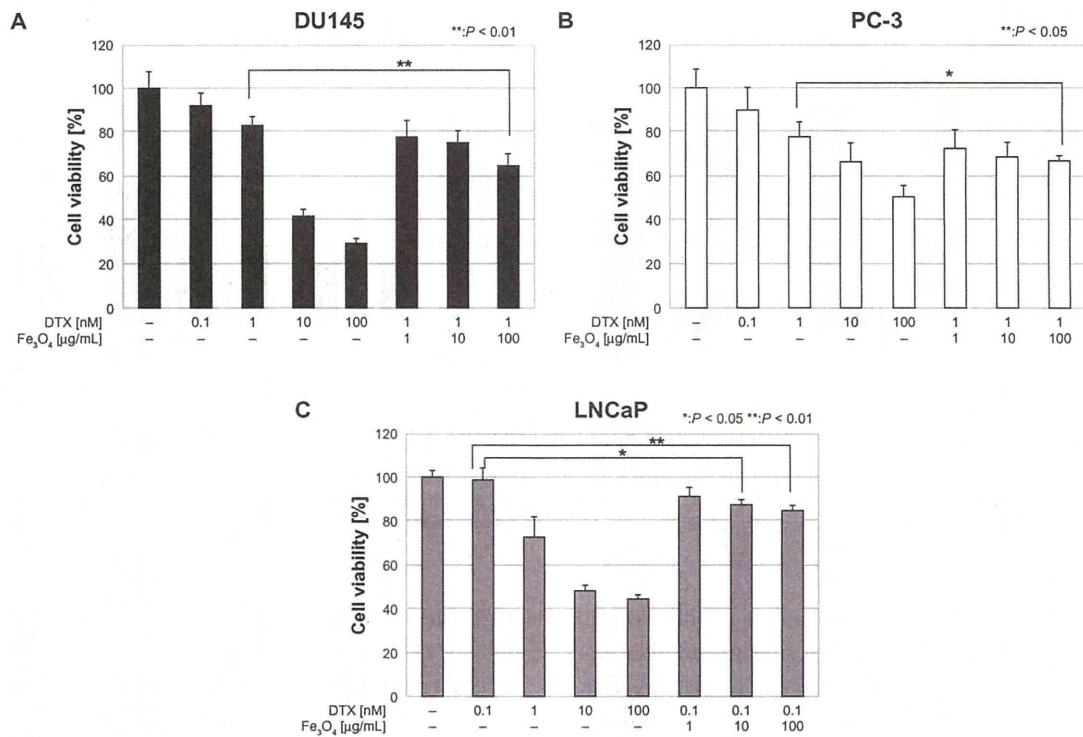
Treatment with MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  alone did not lower NF $\kappa$ B expression in DU145 cells; conversely, treatment with MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DTX combinations inhibited NF $\kappa$ B expression in a dose-dependent manner (Figure 9).

## Discussion

DTX remains the cornerstone of chemotherapy for treating prostate cancer when castration resistance is documented and secondary hormone therapy is ineffective. However, to be effective, DTX must be administered at such high doses that can induce significant toxicity.<sup>9,17</sup> To overcome this drawback,

combination therapies have been developed; DTX combined with tyrosine kinase or bcl-2 inhibitors are currently in Phase II studies for treating CRPC.<sup>17</sup> Drug-delivery assemblies consisting of a nanocarrier, a targeting agent, and DTX have also been developed. For example, NC-6301 – a polymeric micelle with DTX – shows less toxicity than native DTX in vivo; NC-6301 is a nanoscale drug delivery system approximately 100 nm in a diameter.<sup>18</sup> In the present study, we found that DTX alone has a strong anticancer effect, and the cytotoxic effect of a low concentration (1 nM) is augmented by MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Many studies have focused on the use of NPs, especially MgNPs, in theranostics.<sup>10,11</sup> Due to their biocompatibility and stability, iron oxide MgNPs, particularly magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and its oxidized and more stable form, maghemite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , are superior for biomedical applications compared to other metal oxide NPs. Moreover, iron oxide NPs may have additional utility as a contrast agent in magnetic resonance imaging or as a carrier for drug delivery.<sup>11–15</sup> In the present study, we focused on MgNPs- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  because of their potential to treat CRPC. This stems from the intrinsic properties of the magnetic core combined with the drug



**Figure 6** Effect of DTX alone or in combination with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on cell line viability. Effect of DTX alone or in combination with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on the viability of (A) DU145, (B) PC-3, and (C) LNCaP cell lines.

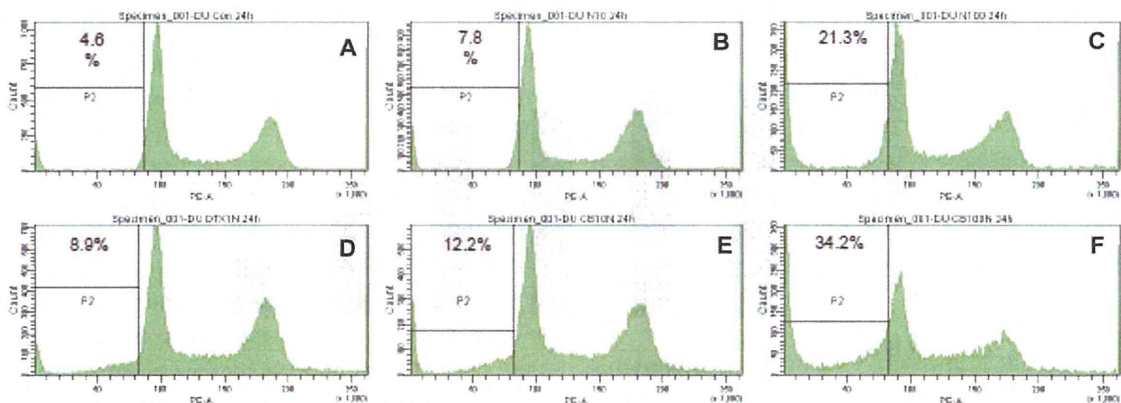
**Notes:** Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments. \*Significantly different from the control at  $P < 0.05$ ; \*\*significantly different from the control at  $P < 0.01$ .

**Abbreviations:** DTX, docetaxel; MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles; SD, standard deviation.

loading capability and the biomedical properties of MgNPs conferred by different surface coatings. Iron oxide MgNPs have also effectively been used in combination with chemotherapy and hyperthermia to overcome drug resistance in a leukemia xenograft model,<sup>19</sup> and with doxorubicin under

a static magnetic field to enhance the doxorubicin-mediated cytotoxicity of MCF-7 cells.<sup>20</sup>

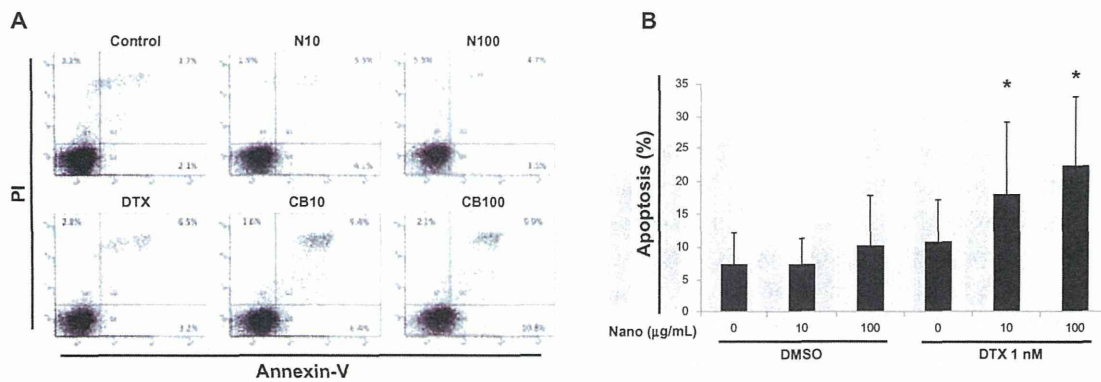
Results from several studies suggest that the cytotoxic effects of MgNPs are dependent on the metal and target cell type.<sup>21,22</sup> CuO, ZnO, and CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, but not Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or



**Figure 7** Flow cytometry analysis of apoptosis of DU145 cells. Panels represent the following treatments: (A) untreated (control); (B) MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 μg/mL); (C) MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (100 μg/mL); (D) DTX (1 nM); (E) DTX (1 nM) + MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 μg/mL); and (F) DTX (1 nM) + MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (100 μg/mL).

**Notes:** Cells were incubated with each condition for 24 hours. The percentage of cells in the sub-G1 phase was quantified for each plot.

**Abbreviations:** MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles; DTX, docetaxel.

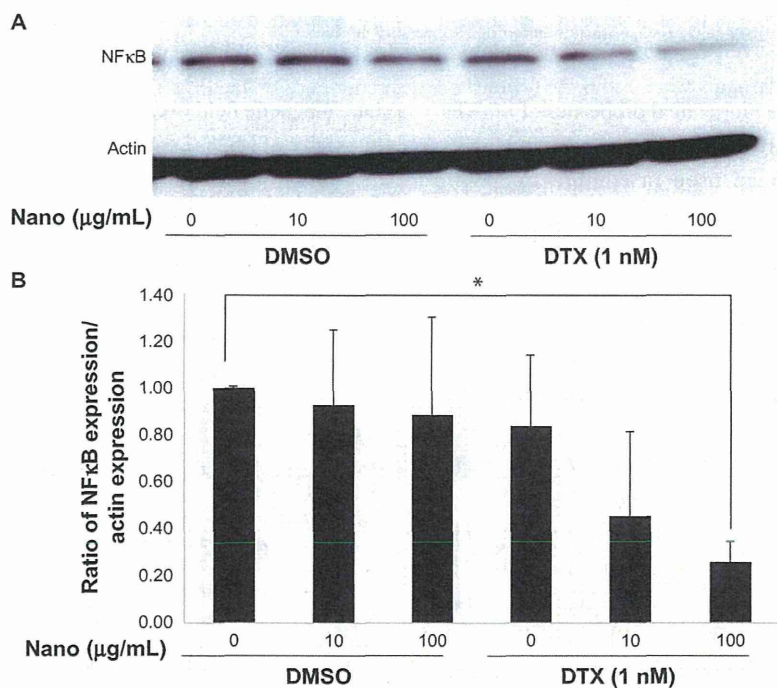


**Figure 8** Effects of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and docetaxel (DTX) alone or in combination on apoptosis in DU145 cells. **(A)** Representative FCM using Annexin V/PI staining of one set of triplicate experiments. N10: MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 µg/mL); N100: MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (100 µg/mL); DTX: DTX (1 nM); CB10: DTX (1 nM) + MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 µg/mL); and CB100: DTX (1 nM) + MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (100 µg/mL). **(B)** Percentages of apoptotic cells from FCM analysis. **Notes:** Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments. Results show that the combination of 10 mg/mL or 100 mg/mL of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> with 1 nM of DTX induced significant apoptosis in DU145 cells compared to untreated cells, cells treated with 10 mg/mL or 100 mg/mL of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> alone, or 1 nM of DTX alone (\*P < 0.05). **Abbreviations:** MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles; DTX, docetaxel; PI, propidium iodide; DMSO, dimethyl sulfoxide; FCM, flow cytometry analysis; SD, standard deviation.

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, were highly toxic to the human lung epithelial cell line A549; CuO NPs were especially effective in inducing a significant increase in ROS production.<sup>21</sup> In BRL 3A liver cells, only silver MgNPs were highly toxic; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, tungsten, aluminum, and MnO<sub>2</sub> exhibited little or no toxicity.<sup>23</sup> Conversely, iron oxide MgNPs caused hepatic and renal

damage when administered to mice,<sup>22</sup> and the reduced viability of J774 macrophages in vitro.<sup>24</sup>

ROS act as a second messenger in cell signaling and are involved in various biological processes, such as growth and survival in normal cells. Oxidative stress reflects a redox imbalance within the cells and usually results from



**Figure 9** Effects of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> in the absence or presence of DTX on NFκB expression in DU145 cells. **(A)** Western blot analysis. **(B)** Densitometric analysis of NFκB/actin expression ratio. **Notes:** Cells were treated for 48 hours. The ratio of NFκB expression/actin expression represents the mean ± SD of three independent experiments. Results show that NFκB expression decreased in DU145 cells treated with 100 mg/mL of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> with 1 nM of DTX compared to untreated cells (\*P < 0.05). **Abbreviations:** MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles; DTX, docetaxel; NFκB, nuclear factor κB; SD, standard deviation.

the net accumulation of intracellular ROS, which are not detoxified by cellular antioxidative agents.<sup>25</sup> In cancer cells, the production of ROS is typically increased; since they play important roles in initiation, progression, and metastasis, ROS are considered oncogenic. However, ROS are also implicated in triggering cell death, including that of cancer cells; thus, their production is desirable in chemotherapy, radiotherapy, and photodynamic therapy. This dual role of ROS has led to the development of two paradoxical ROS-manipulation strategies in cancer treatment.<sup>25</sup> One strategy is to treat tumor cells with antioxidants, such as through the dietary administration of red wine and green tea polyphenols to prevent cancer. The other strategy is to provide pro-oxidant therapy, which consists of generating ROS directly and inhibiting antioxidative enzyme systems in tumor cells. In the present study, MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> exhibited cytotoxicity toward PC-3 and LNCaP, but not toward DU145 and PrSC cells. The LNCaP and PC-3 cell lines have previously been reported to have unique redox state properties, including the production of different levels of oxidative damage products and antioxidant proteins; these differences may provide new insights into the possible uses and dangers of using pro-oxidants or antioxidants as cancer therapeutic agents.<sup>26–28</sup> We found that the MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-induced increase in ROS was most robust in the DU145 and PC-3 cell lines; however, the levels of 8-OH-dG, an index of oxidative DNA damage, were comparably elevated in all three cell lines.

The transcription of antiapoptotic genes is activated by the NFκB signaling pathway, resulting in cell survival. The NFκB signaling pathway also plays a critical role in cancer development and progression, and in the development of tumor resistance to chemotherapy and radiation therapy,<sup>29</sup> particularly in the transition toward CRPC.<sup>30</sup> Previous studies demonstrating a relationship between elevated NFκB and a worse prognosis support this notion.<sup>31,32</sup> Thus, the NFκB pathway has become an important target in the development of novel anticancer treatments. The combination of magnetic NPs with either adriamycin or daunorubicin has been reported to increase p53 levels and decrease NFκB protein levels, leading to increased apoptosis in Raji lymphoma cells.<sup>33</sup> In the present study, treatment with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> or DTX alone had no effect on the expression of NFκB in DU145 cells; however, treatment with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DTX combinations decreased expression in a dose-dependent manner. This result is unique because many NPs have been reported to activate the NFκB pathway via activation of mitogen-activated protein kinase cascades by an oxidative stress response.<sup>34</sup> Thus, our

results suggest that the decrease in NFκB expression resulting from treatment with MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DTX combinations may be uncoupled from ROS generation. Although the chemical components involved in NFκB inhibition and ROS production have been identified, the contribution of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> exposure to the mechanisms of induction and action remains unclear. Further studies such as those measuring NFκB DNA-binding activity are needed.

## Conclusion

We found that MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> significantly increased ROS production in prostate cancer cell lines and induced oxidative DNA damage; the cytotoxic effects of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> alone were modest. Treatment with a combination of MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and a low dose of DTX enhanced the inhibitory effect of DTX alone on prostate cancer cell growth in vitro, and also suppressed NFκB expression. These findings offer the possibility that MgNPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> may allow the dose of DTX to be reduced without decreasing its antitumor activity.

## Acknowledgments

We thank Dr T Yabana for TEM analysis, and Dr M Yoneda for his pathological preparation. This research was supported in part by a Grant-in-Aid for the Global COE Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, a Grant-in-Aid for Research on Risk of Chemical Substances from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and a Research Grant-in-Aid from Magnetic Health Science Foundation.

## Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work. The authors have no financial interests in or financial conflict with the subject matter discussed in this manuscript.

## References

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277–300.
2. Tabata N, Ohno Y, Matsui R, et al. Partial cancer prevalence in Japan up to 2020: estimates based on incidence and survival data from population-based cancer registries. *Jpn J Clin Oncol*. 2008;38(2):146–157.
3. So A, Gleave M, Hurtado-Col A, Nelson C. Mechanisms of the development of androgen independence in prostate cancer. *World J Urol*. 2005;23(1):1–9.
4. Diaz M, Patterson SG. Management of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Control*. 2004;11(6):364–373.
5. Lassi K, Dawson NA. Update on castrate-resistant prostate cancer: 2010. *Curr Opin Oncol*. 2010;22(3):263–267.
6. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, et al; for TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(15):1502–1512.



7. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(15):1513–1520.
8. Niraula S, Tannock IF. Broadening horizons in medical management of prostate cancer. *Acta Oncol*. 2011;50 Suppl 1:141–147.
9. Lee SY, Cho JS, Yuk DY, et al. Obovatol enhances docetaxel-induced prostate and colon cancer cell death through inactivation of nuclear transcription factor-kappaB. *J Pharmacol Sci*. 2009;111(2):124–136.
10. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2010;15(19–20):842–850.
11. Shubayev VI, Pisanic TR 2nd, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(6):467–477.
12. Cheng J, Wu W, Chen BA, et al. Effect of magnetic nanoparticles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and 5-bromotetrandrine on reversal of multidrug resistance in K562/A02 leukemic cells. *Int J Nanomedicine*. 2009;4:209–216.
13. Wang C, Zhang H, Chen B, Yin H, Wang W. Study of the enhanced anticancer efficacy of gambogic acid on Capan-1 pancreatic cancer cells when mediated via magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1929–1935.
14. Zhang G, Ding L, Renegar R, et al. Hydroxycamptothecin-loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles induce human lung cancer cell apoptosis through caspase-8 pathway activation and disrupt tight junctions. *Cancer Sci*. 2011;102(6):1216–1222.
15. Sato A, Tamura Y, Sato N, et al. Melanoma-targeted chemothermo-immuno (CTI)-therapy using N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. *Cancer Sci*. 2010;101(9):1939–1946.
16. Kawai K, Li YS, Kasai H. Accurate measurement of 8-OH-dG and 8-OH-Gua in mouse DNA, urine and serum: effects of X-ray irradiation. *Genes and Environment*. 2007;29(3):107–114.
17. Galsky MD, Vogelzang NJ. Docetaxel-based combination therapy for castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol*. 2010;21(11):2135–2144.
18. Harada M, Iwata C, Saito H, et al. NC-6301, a polymeric micelle rationally optimized for effective release of docetaxel, is potent but is less toxic than native docetaxel in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2713–2727.
19. Ren Y, Zhang H, Chen B, et al. Multifunctional magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles combined with chemotherapy and hyperthermia to overcome multidrug resistance. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2261–2269.
20. Aljarrah K, Mhaidat NM, Al-Akhras MA, et al. Magnetic nanoparticles sensitize MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *World J Surg Oncol*. 2012;10:62.
21. Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(9):1726–1732.
22. Ma P, Luo Q, Chen J, et al. Intraperitoneal injection of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in mice. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4809–4818.
23. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*. 2005;19(7):975–983.
24. Naqvi S, Samim M, Abdin M, et al. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:983–989.
25. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(12):1875–1884.
26. Chen Y, Wang J, Fraig MM, et al. Defects of DNA mismatch repair in human prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61(10):4112–4121.
27. Trzeciak AR, Nyaga SG, Jaruga P, Lohani A, Dizdaroglu M, Evans MK. Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis*. 2004;25(8):1359–1370.
28. Chaiswing L, Bourdeau-Heller JM, Zhong W, Oberley TD. Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(2):202–215.
29. Gasparian AV, Guryanova OA, Chebotaev DV, Shishkin AA, Yemelyanov AY, Budunova IV. Targeting transcription factor NF-kappaB: comparative analysis of proteasome and IKK inhibitors. *Cell Cycle*. 2009;8(10):1559–1566.
30. Jain G, Cronauer MV, Schrader M, Möller P, Marienfeld RB. NF-kB signaling in prostate cancer: a promising therapeutic target? *World J Urol*. 2012;30(3):303–310.
31. Koumakpayi IH, Le Page C, Mes-Masson AM, Saad F. Hierarchical clustering of immunohistochemical analysis of the activated ErbB/PI3K/Akt/NF-kappaB signalling pathway and prognostic significance in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(7):1163–1173.
32. MacKenzie L, McCall P, Hatzieremia S, et al. Nuclear factor kB predicts poor outcome in patients with hormone-naive prostate cancer with high nuclear androgen receptor. *Hum Pathol*. 2012;43(9):1491–1500.
33. Jing H, Wang J, Yang P, Ke X, Xia G, Chen B. Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and chemotherapy agents interact synergistically to induce apoptosis in lymphoma cells. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:999–1004.
34. Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S. Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol*. 2011;85(7):733–741.

## International Journal of Nanomedicine

### Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

## Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

## 前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果

Effects of magnetic nanoparticles on prostate cancer chemotherapy

渡邊昌俊、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大樹、栗岡大輔

Masatoshi Watanabe<sup>1</sup>, Akiko Sato<sup>2</sup>, Ayumi Iwasaki<sup>3</sup>, Emi Fukai<sup>3</sup>, Daiki Okamoto<sup>3</sup> and Daisuke Kurioka<sup>2</sup>

横浜国立大学大学院工学研究院、同大学院工学府、同大学工学部

<sup>1</sup>Faculty of Engineering, <sup>2</sup>Graduate School of Engineering, and <sup>3</sup>School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan.

### Abstract

Prostate cancer is one of the most prevalent cancers in men in many countries, including Japan. Several management options are available when prostate cancer at an early stage is diagnosed, including surgery, cryosurgery, radiation therapy, hormonal therapy or watchful waiting. For advanced prostate cancer, the surgical or medical ablation of androgens is regarded as optimal first-line treatment, however unfortunately androgen ablative therapy is palliative. For castration-resistant prostate cancer, chemotherapy is used, however needs to be improved because of limitations by lack of specificity and systemic toxicity. Nanotechnology, especially, magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) have potential applications in drug delivery, cancer diagnosis and therapy. In this, we attempt to provide up-to-date information regarding prostate cancer and show our data about effects of magnetic nanoparticles on prostate cancer chemotherapy.

### 1. はじめに

がんは日本人の3大死亡原因疾患の一つである。本邦における前立腺がんは、生活、特に食生活の欧米化、高齢化及び Prostate Specific Antigen (PSA)による診断方法の普及により増加しており、その罹患率の年次推移は、1975 年以降増加している。2020 年には、本邦男性の罹患率の第2位となると予想されている<sup>(1)</sup>。死亡率の年次推移は、1950 年代後半から 90 年代後半まで増加し、その後横ばい状態である。2009 年では罹患率の第4位で、死亡率は第6位である<sup>(2)</sup>。日本人の罹患率は、欧米諸国およびアメリカの日系移民より低く、欧米諸国の中ではアメリカ黒人の罹患率が最も高い傾向があり、人種に関わる特徴を有する<sup>(3)</sup>。前立腺がんの治療法には、特別な治療をせず、経過観察する待機療法、手術療法、放射線治療、内分泌療法がある。前立腺がんの治療は病期、悪性度 (Gleason score) 等を参考に治療法が決定される。原発巣が T3 (被膜を越えて浸潤するがん)、T4 (精嚢以外の隣接臓器に浸潤するがん) に対して、内分泌両方単独あるいは他の治療法を併用して用いられる。内分泌療法は前立腺がん細胞の血液中の男性ホルモン (アンドロゲン、androgen) 依存性に増殖する性質を利用したものであり、両側の精巣摘除手術や Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) 製剤がアンドロゲン除去療法がある。しかし、男性ホルモンは副腎からもわずかに分泌されているため、副腎から分泌される男性ホルモンの働きは、抗アンドロゲン剤によりブロックすることができるため、アンドロゲン除去療法と抗アンドロゲン剤を併用することもある (複合アンドロゲン阻害療法、combined androgen brockade: CAB もしくは最大アンドロゲン阻害療法、maximum androgen brockade:MAB)。治療開始当初は 80%以上の患者で効果を認めるも、多くの場合数年で徐々に治療の効果がなくなり、病状が再び悪化 (再燃) する。このような状態の前立腺がんを再燃前立腺がんまたは内分泌治療抵抗性前立腺がんと呼ぶ。内分泌治療が有効でない症例や、内分泌治療の効果がなくなった時に主に化学療

法が行われる。他剤との併用で、ドセタキセルは再燃前立腺がん患者の PSA 値を高い確率で低下させ、生存期間も延長させることが報告され<sup>(4)</sup>、再燃前立腺がんに対する有効な化学療法として、ドセタキセル (docetaxel: DTX) が化学療法の first line として使用されるようになった。DTX は微小管タンパクの重合を促進する事により微小管の安定化、過剰形成を促し、紡錘体の機能を障害する事により細胞分裂を阻害して抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。しかし、DTX は骨髄抑制などの副作用を伴い、治療を重ねるにつれて徐々に副作用が強くなる等により治療可能な期間が限定される。加えて、治療中に、腫瘍は DTX 抵抗性を獲得する。したがって、DTX は、他の薬剤との併用や、投与量の減量等が重要と考えられる。DTX 投与後の再燃前立腺がんに対して、タキサン系抗がん剤の Cabazitaxel の臨床試験が行われ、死亡リスクを 30%低減させたと報告されている。このように新しい抗がん剤の開発、その投与方法等いろいろな工夫が行われている。

## 2. 前立腺がんにおける抗がん剤抵抗性について

前立腺がんの抗がん剤抵抗性獲得は、いろいろな経路が関与する(Fig.1)<sup>(5)</sup>。例えば、ATP-binding cassette transport proteins の過剰発現がある。

これらの transport proteins はがん細胞内から抗がん剤を排出し、細胞内濃度を低減させる。transporter proteins を調節する事は、抗がん剤抵抗性を克服する事が出来る。また、signalling intermediaries の一つとして、Phosphoinositide 3'-kinase (PI3K) / Akt / mammalian target of rapamycin pathway (mTOR)がある。PI3K/Akt/mTOR は細胞の生存、細胞周期、悪性化に関与している。この経路を抑制するタンパク質が PTEN である。前立腺がんの約 80%

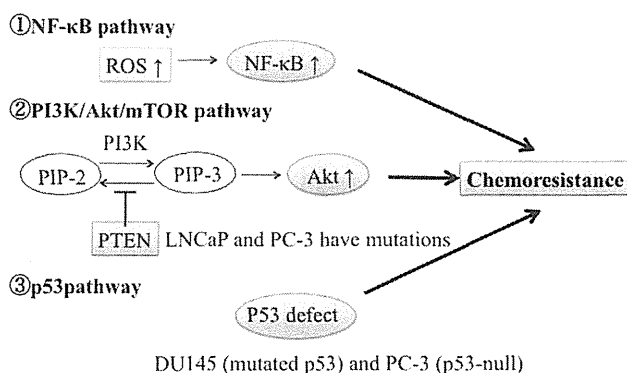


Fig.1 Pathways of chemotherapy resistance in prostate cancer

が同タンパクの機能喪失が報告されている。Akt は apoptosis を抑制し、PI3K は multidrug resistance protein 1 (MRP1) の発現を上昇させる等して抗がん剤抵抗性を獲得する。PI3K と Akt は mTOR を活性化し、さまざまながん遺伝子や増殖因子を過剰発現させる。その他には、apoptosis、inflammation、angiogenesis 等にかかわる経路が関与する。

## 3. 前立腺がん細胞におけるナノ粒子、磁性体ナノ粒子の影響について

当研究室では、各種ナノ粒子等 (マグネタイト  $Fe_3O_4$ 、二酸化チタン  $TiO_2$ 、フラーレン  $C_{60}$ 、カーボンブラック Carbon black、カオリン Kaolin 等) のヒト細胞株 (肺癌細胞株 A549、前立腺がん細胞株 LNCaP、DU145、PC-3、前立腺上皮細胞株 RWPE-1 等) への細胞毒性および遺伝毒性の評価を行ってきた<sup>(6)(7)</sup>。その中で、マグネタイトナノ粒子曝露による前立腺がん細胞株に濃度依存的な cell viability の低下および 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) の有意な増加を認めた。この結果より、少なくともマグネタイトナノ粒子が細胞特異的に、前立腺がん細胞株に対して細胞毒性および遺伝毒性を生じさせると考えられた。その後、マグネタイトナノ粒子は前立腺がん細胞株に活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)の増加させる事が示された。臨床がんや前立腺がん細胞株は、塩基除去修復遺伝子発現の欠損や抗酸化酵素の発現が変化し、redox state に大きな特徴がある事が報告されている。これらの事実より、同じマグネタイトナノ粒子に曝露された細胞間で、前立腺がん細胞のように ROS と抗酸化システムのバラ

ンスが崩れやすい細胞に対して、ROS 産生が上昇し、細胞毒性や遺伝毒性が生じると考えられた。マグネタイトナノ粒子は所謂 Fenton 反応( $H_2O_2+Fe^{2+}\rightarrow Fe^{3+}+HO\cdot+HO^*$ )を介するも、その他の経路による ROS 産生も報告され、酸化ストレスが生じると報告されている<sup>(7)</sup>。

#### 4.ROS を利用したがん治療法へ

ROS 自体は second messenger として正常細胞のシグナリングで重要な役割を果たしている。一般に、がん細胞では ROS 産生が上昇して、浸潤・転移等のがん細胞の挙動に大きく関わっている。一方、化学療法、放射線療法および光線力学的治療法において ROS の産生が細胞死をもたらす重要な役割を果たしている。これらの事から、

抗酸化がん治療法

(Anti-oxidant Cancer Therapy) と酸化促進がん療法

(Pro-oxidant therapy)の二つの治療法が考えられている

<sup>(8)</sup>。抗酸化療法は、Vitamins C&E 等の抗酸化物質の取り込み、glutathione peroxidase や catalase 等の ROS scavenger enzyme

overexpression 等が該当する。

一方、酸化促進がん療法は、Arsenic や Imexon 等による

ROS 産生、Glutathione(GSH)

の消耗等が該当する。本研究室は、ROS 産生による酸化促進がん療法に注目した。ROS 産生を操作する事により、容易に細胞死をもたらす状況を作り、各種抗がん剤との併用で、その容量を減らして、同様の効果を得る事と副作用を軽減する事、すなわち、DTX とマグネタイトナノ粒子の併用療法により、DTX の容量を減らして、同程度の効果及び他剤との併用を可能にすることを旨とした。同時にマグネタイトナノ粒子は核磁気共鳴画像法のコントラスト造影剤として利用され、あるいはがんの温熱療法への応用の可能性もあることより、マグネタイトナノ粒子の theranostic application が考えられる<sup>(9)</sup>。

#### 4.抗がん剤にマグネタイトナノ粒子を併用した時の前立腺がん細胞への効果

当研究室では、前立腺がん細胞株に first line で使用される DTX とマグネタイトナノ粒子を併用曝露し、DTX の使用量を減らし、その効果が維持できる事を報告している(Fig.2)<sup>(10)</sup>。これはマグネタイトナノ粒子が細胞内に取り込まれ、細胞内で ROS 産生が確認され、所謂 ROS 療法となっていると考えられた。同時に inflammatory response factor や

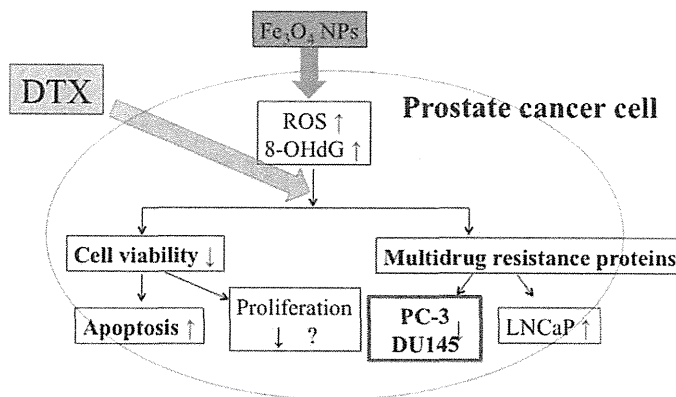


Fig.2 Effects of  $Fe_3O_4$  NPs and DTX on prostate cancer cell

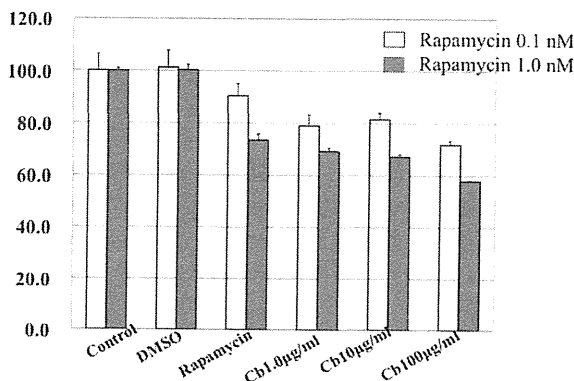


Fig.3 Effect of the combination treatment of  $Fe_3O_4$  NPs and Rapamycin on the cell viability in prostate cancer cells

multidrug resistance protein 発現への影響も確認された。このようにマグネタイトナノ粒子と DTX の併用は、細胞内で色々な細胞反応を呈すると考えられた。また、前立腺がんにおいて PI3K/Akt/mTOR シグナリング系は重要な働きをする事が知られている。現在これらを標的にした多くの分子標的薬の開発が進められている。特に、PI3K、mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果が報告されている<sup>(11)</sup>。mTOR は mTOR complex1 (mTORC1) と mTOR complex2 (mTORC2) からなる複合体で、マクロライド系抗生剤である

rapamycin によりこの mTORC1 は特異的に阻害される。しかし、PI3K/Akt/mTOR シグナリング系は PTEN により制御されているので、PTEN の有無により rapamycin の効果が異なる。ここで、二つの前立腺がん細胞株 DU145 および PC-3 に対して、rapamycin とマグネタイトナノ粒子を併用曝露し、その効果について評価を行った。DU145 細胞は PTEN 陽性細胞であり、mTORC1 を介した系が活性化していないため、その阻害効果が低く、PC-3 は PTEN 欠損細胞であり、mTORC1 を介した系が恒常的に活性化しているため、阻害効果はあると考えられている。通常使用される rapamycin の 1/10~1/100 量で使用する場合、マグネタイトナノ粒子濃度依存的に cell viability の低下を認めた(Fig.3)。しかしながら、DU145 と PC-3 の細胞間に差は認められなかった。プラチナ製剤で、second line の使用が有望視されている carboplatin についても同様の評価を行った。その主たる作用機序はアルキル化作用で、DNA 二重らせんの架橋形成により、DNA 合成障害をもたらす<sup>(12)</sup>。特にこの second line は DTX に対して抵抗性を持つようになった前立腺がんの治療に重要な位置を占める。carboplatin 10 μM で、マグネタイトナノ粒子と併用したが、マグネタイトナノ粒子濃度依存的に cell viability の低下を認めた。興味深い事に、カルボキシル基修飾したマグネタイトナノ粒子と非修飾ナノ粒子との間で、carboplatin の効果が異なる事が認められた(Fig.4)。今後、DTX と同様に rapamycin あるいは carboplatin とマグネタイトナノ粒子を組み合わせた時の細胞内のシグナリング等の解析が必要と考える。

## 5.まとめ

抗がん剤とマグネタイトナノ粒子の併用曝露による前立腺がん細胞の細胞生物学的な評価を主体に報告した。現在までに、ナノ粒子の大きさ、表面修飾等が細胞への取り込み、細胞毒性等に重要な影響を与える事が報告されている。一方、ナノ粒子を取り込んだ後に細胞におこる細胞内の各種反応は、細胞の特性、特にがん細胞の特性に基づくと考えられる。比較的単純なマグネタイトナノ粒子であっても、細胞毎にその反応は異なり、また用いる抗がん剤により、その効果は異なる。ナノ粒子の特性と細胞における反応との関係について分子生物学的レベルで解析する事が必要と考える。

## 6.文献

[1] N. Tabata, Y. Ohno, R. Matsui, H. Sugiyama, Y. Ito, H. Tsukuma and A. Oshima, Jpn. J. Clin. Oncol., 38, 146-157 (2008).

[2] 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター：がん情報サービス  
<http://ganjoho.jp/public/statistics/pub/statistics01.html>

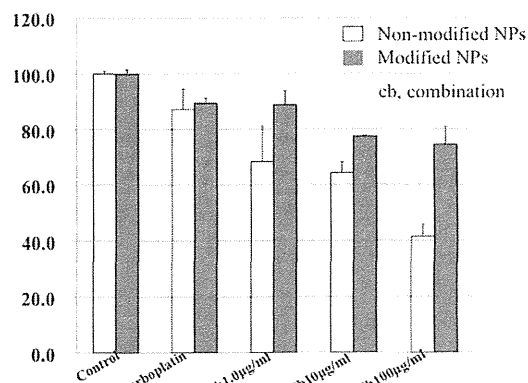


Fig.4 Effect of the combination treatment of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs and Carboplatin on the cell viability in prostate cancer cells

- [3] M. Watanabe, T. Nakayama, T. Shiraishi, G.N. Stemmermann and R. Yatani, *Urol. Pncol.*, 5, 274-283 (2000).
- [4] A. Felici, M.S. Pino and P. Carlini, *Front. Endocrinol.*, 3, 1-8 (2012)
- [5] K.L. Mahon, S.M. Henshall, R.L. Sutherland and L.G. Horvath, *Endocri Related Cancer*, 18, R103-R123 (2011)
- [6] Y. Totsuka, T. Higuchi, T. Imai, A. Nishikawa, T. Nohmi, T. Kato, S. Masuda, N. Kinae, K. Hiyoshi, S. Ogo, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, N. Fukumori, M. Watanabe, T. Sugimura, K. Wakabayashi, *Part. Fibre. Toxicol.*, 6, 23 (2009)
- [7] 一町直樹、栗岡大輔、河合一明、葛西宏、松本幹治、渡邊昌俊、粉体工学会誌、48、145-151 (2011) .
- [8] J. Wang and J. Yi, *Cancer Biol. Ther.*, 7, 1875-1884 (2008)
- [9] N. Ahmed, H. Fessi and A. Elaissari, *Drug Discovery Today*, 17, 928-934 (2012).
- [10] A. Sato, A. Morohashi, A. Iwasaki, A. Ishiguro, H. Uemura, Y. Kubota, N. Kobayashi and M. Watanabe, *Proceeding of The 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association*, 122 (2012).
- [11] G. L. Gravina, F. Marampon, F. Petini, L. Biordi, D. Sherris, E. A. Jannini, V. Tombolini and C. Festuccia, *Endocri Related Cancer*, 18, 385-400 (2011).
- [12] G. Colloca, A. Venturino and F. Checcaglini, *Med. Oncol.*, 29, 776-785 (2012).

20102年10月14日受理

# 前立腺がん化学療法への 磁性体ナノ粒子の応用

栗岡大輔<sup>\*1</sup>・佐藤明子<sup>\*2</sup>・岩崎有由美<sup>\*3</sup>  
深井瑛美<sup>\*4</sup>・岡本大樹<sup>\*5</sup>・渡邊昌俊<sup>\*6</sup>

## 1. はじめに

がんは、日本人の3大死亡原因疾患の一つとして幅広く認知されている。本邦における前立腺がんは、食生活の欧米化や高齢化に伴って増加傾向にある。また、従来の直腸指診では困難であった早期発見が Prostate Specific Antigen (PSA) による診断法の普及によって可能となったことも増加要因の一つと考えられる。前立腺がん罹患率の年次推移は、1975年以降増加しており、2020年には、本邦男性罹患率の第2位となることが予想されている<sup>1)</sup>。前立腺がんにおける死亡率の年次推移は、1950年代後半から90年代まで増加傾向にあるが、その後横ばい状態となる。日本人の罹患率は、欧米諸国およびアメリカの日系移民より低く、欧米諸国の中ではアメリカ黒人の罹患率が最も高い傾向にあり、人種と深く関与している<sup>2)</sup>。

前立腺がんの治療法には、手術療法、放射線療法、内分泌療法、さらには特別な治療を実施せず、経過観察をする待機療法があり、病期、悪性度 (Gleason score) 等を参考にして治療法が決定される。前立腺がん細胞は、血液中の男性ホルモン (アンドロゲン, androgen) の刺激により増殖する。そこで、両側の精巣摘除や薬剤を用いて精巣から分泌される血液中の男性ホルモン値を低下させる

方法が内分泌療法 (アンドロゲン除去療法) と呼ばれ、転移性進行前立腺がんでは第一に選択される。しかし、男性ホルモンは副腎からもわずかに分泌されているため、副腎から分泌される男性ホルモンの働きを遮断することができる抗アンドロゲン剤を併用する複合アンドロゲン療法 (Combined androgen blockage : CAB) を行うこともある。これら内分泌療法は、治療開始当初は80%以上の患者で効果を認めるも、多くの場合数年で徐々に治療の効果がなくなり、病状が再び悪化 (再燃) する。このような状態の前立腺がんを再燃前立腺がんまたは転移性去勢抵抗性前立腺がんと呼ぶ。

内分泌治療が有効でない症例や、内分泌治療の効果がなくなった時に、主に化学療法が行われる。ドセタキセル (docetaxel : DTX) は、フェーズIIIの患者に対する臨床試験で再燃前立腺がん患者の PSA 値を高い確率で低下させ、生存期間の延長も認められたことから、2004年、米国食品医薬品局 (US Food and Drug Administration : FDA) によって、再燃前立腺がんに対する化学療法の First line として使用することが定められた<sup>3~5)</sup>。しかしながら、DTX 療法は、骨髄抑制などの副作用を伴い、長期間使用すると徐々に副作用が強くなることや、腫瘍が抗がん剤抵抗性を獲得することが報告されている。そこで、他の薬剤などを併用することで DTX の投与量を減量する治療法や、DTX に代わる新しい抗がん剤を探索する必要がある、幅広く研究されている。

## 2. 抗がん剤抵抗性の分子機構

前立腺がんにおける抗がん剤抵抗性の獲得には、

<sup>\*1</sup> Daisuke Kurioka 横浜国立大学大学院工学府

<sup>\*2</sup> Akiko Sato 横浜国立大学工学部物質工学科バイオコース

<sup>\*3</sup> Ayumi Iwasaki 同上

<sup>\*4</sup> Emi Fukai 同上

<sup>\*5</sup> Daiki Okamoto 同上

<sup>\*6</sup> Masatoshi Watanabe 横浜国立大学工学研究院 教授  
博士 (医学)

Application of Magnetic Nanoparticles to Chemotherapy for Prostate cancer

さまざまなシグナル経路が関与している。DTXを含む多くの抗がん剤に対する多剤耐性の分子機構として、adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporters の過剰発現がある。ABC transporters は、イオンやタンパク質といった多様な物質の輸送に関連する膜タンパク質の一群で、多くの組織や細胞に存在し有害物質の排出ポンプとして機能している。ヒトにおいては約 50 種類の ABC transporters が確認され、4 つのサブファミリーに分類される。ABC transporters の一つである P-glycoprotein (P-gp) は、見かけ上 130~180 kDa の分子量で、ATP を介して毒性物質を細胞外へ排出する。P-gp は、正常な前立腺組織において発現が低い一方で、前立腺腫瘍上皮で発現が高いことが認められ、前立腺がん細胞において、P-gp の発現量が薬剤抵抗性と相関することも報告されている<sup>6)</sup>。また、同じく ABC transporters の BCRP/ABCG2 は、serine/threonine kinase の一つである Pim-1 にリン酸化されることで、前立腺がん細胞株において DTX 抵抗性を示すことが認められた<sup>7)</sup>。

抗がん剤抵抗性には、Nuclear factor for  $\kappa$ -kinase gene in B cells (NF- $\kappa$ B) シグナル経路も関与している。NF- $\kappa$ B は、ストレスやサイトカイン等の刺激によって活性化され、細胞増殖や apoptosis などの細胞死に関与する重要な転写因子である。NF- $\kappa$ B の活性制御不良が、関節リウマチなどの炎症性疾患や癌、敗血症性ショックなどの原因となる。多くのがんにおいて、NF- $\kappa$ B の恒常的活性化が認められることから、NF- $\kappa$ B を阻害することによる抗がん剤感受性の増大が期待される。前立腺がん細胞においては、アンドロゲン依存性の LNCaP や LAPC-4 細胞は NF- $\kappa$ B の活性が低い一方で、アンドロゲン非依存性の DU-145 や PC-3 細胞は、恒常的に活性化していることから、前立腺がんの悪性化に NF- $\kappa$ B が関与していることが示唆される<sup>8)</sup>。さらに、臨床検体および細胞株を用いた実験により、DTX 投与が NF- $\kappa$ B の活性化を誘導することや、NF- $\kappa$ B 遺伝子の発現抑制下で、DTX を投与すると抗腫瘍効果の増大が認められたため、NF- $\kappa$ B の活性化が DTX 抵抗性を促進していることが示唆された。このとき、DTX 投与によって、炎症性サイトカ

インの一つである Interleukin-6 (IL-6) の発現量に変化は認められなかったが、IL-6 遺伝子を RNA 干渉によって抑制すると、DTX の抗腫瘍効果が増大した<sup>9)</sup>。この結果から、IL-6 は前立腺がんの薬剤耐性マーカーとなりうると考えられるが、その機能や下流については、更なる解析が必要である。

近年では、DU145 や PC-3 において、主に細胞増殖の調節、分化に関与する TGF- $\beta$  superfamily の一つである TGF  $\beta$ 1 が、DTX 抵抗性を生じる機能を有することが *in vitro* 実験系で示唆された<sup>10)</sup>。さらに、DTX 抵抗性前立腺がん細胞の生存が、Notch/hedgehog pathway に依存し、これら経路の阻害剤と DTX を併用することで抗腫瘍効果が増大することが *in vitro* および *in vivo* の実験系で報告されている<sup>11)</sup>。これらさまざまなシグナル経路が関与することで、がん細胞は抗がん剤抵抗性を獲得していると考えられる。

### 3. PI3K/Akt/mTOR signaling

抗がん剤抵抗性に関与するシグナル経路の一つとして、Phosphoinositide-3kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) が注目されている。PI3K は上皮細胞増殖因子 (Epidermal growth factor : EGF) などの増殖因子によって活性化され、下流に細胞の増殖や細胞分裂に関与する遺伝子群が存在する。mTOR は 289 kDa の serine/threonine kinase で、PI3K の触媒ドメインと非常に良く似た構造を持つことから、PI3K related kinase (PIKK) family の一つとされ、この構造は酵母からラット、マウス、そしてヒトに至るまで幅広く保存されている。mTOR は PI3K の下流に存在し、ribosomal p70S6K (S6K1) あるいは、eukaryotic initiation factor binding proteins (4E-BP) を直接活性化することで、細胞分裂を促進する。この経路は、さまざまな増殖因子によって PI3K が活性化することにより、PIP3 を生成する。PIP3 はこの経路の重要なセカンドメッセンジャーである Akt に直接結合し、その後別の kinase により Akt が活性化状態となる。この活性化 Akt が tuberous sclerosis complex 1 (TSC1)/TSC2 複合体を抑制することで、mTOR が活性化される。また、TSC1/TSC2 複合体を介さずに、Akt は



直接 mTOR をリン酸化し活性化状態にする経路も存在する。哺乳類の mTOR は、mTORC1 と mTORC2 と呼ばれる機能的に異なる二つの複合体を形成する。mTORC1 は、Regulatory associated protein of mTOR (RAPTOR) という三つのタンパク質から構成され、栄養物にตอบสนองして翻訳や細胞成長を幅広く調節する。mTORC2 は、mTOR, mLST8, Rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR), SAPK-interacting protein (SIN1), Protein-observed with RICTOR-1 (Protor-1) から成る複合体を形成し、アクチン細胞骨格ダイナミクスを調節する。mTORC1, mTORC2 どちらの複合体も Akt によって直接活性化される。Akt が、このような複合体を始めとするさまざまな生存促進や成長促進を行うための標的分子をリン酸化することで、生体内では造腫瘍効果を持つことが示唆されている(図1)<sup>12, 13)</sup>。

この経路を負に制御するがん抑制遺伝子が、染色体上の 10q23.3 に位置している Phosphatase and tensin homolog (PTEN) である。PTEN は PIP3 を脱リン酸化することにより、下流の Akt や mTOR を抑制している。しかし、多くのがんで、PTEN 遺伝子は片アレル欠損やメチル化などのエピジェネティック修飾による、PTEN タンパク質の機能欠損が報告され、予後との相関も認められている<sup>14)</sup>。前立腺がんにおいては、約 80% に同タンパク質の機能損失が認められ、PTEN 欠損マウスモデルによって前立腺がんが進行することも認められ<sup>15)</sup>、前立腺がんの治療において、PI3K/Akt/mTOR signaling 経路は非常に密接に関与していると考えられる。

#### 4. 前立腺がんに対して使用される抗がん剤の作用機序

##### 4.1 ドセタキセル

ドセタキセル (DTX) は、微小管タンパクの脱重合を阻害することにより微小管の安定化、過剰形成を促進し、細胞分裂を阻害することや、Bcl-2 のリン酸化および Caspase-3 の活性化を誘導することで、抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。当研究室では、再燃前立腺がんに対する化学療法 First line として使用される DTX と、磁性体ナノ粒子の一つであるマグネタイト (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) を前立腺がん細胞株に併用曝露することで、より少ない DTX の量で、効果が維持できることを以前報告した。

##### 4.2 Rapamycin

Rapamycin は、南太平洋の島である Rapa Nui の土壌サンプルから分離された、マクロライド系天然抗生物質である。Rapamycin は FK506 と呼ばれる免疫抑制剤と構造が似ていて、mTOR を標的としている。近年、ヒトのがんだけでなく、2 型糖尿病のような代謝不全や、造腫瘍症候群において mTOR に制御異常が認められたことから、非常に注目されている抗腫瘍薬の一つである。Rapamycin は狭心症におけるステント治療後の冠動脈再狭窄を抑制するための薬として使用されるが、中性脂肪の増加や、血小板の減少といった副作用も生じる。Rapamycin は、細胞内レセプターの FK506 binding protein (FKBP12) と複合体を形成し、この複合体が mTOR の kinase 活性を阻害する。mTOR が Rapamycin によって阻害された結

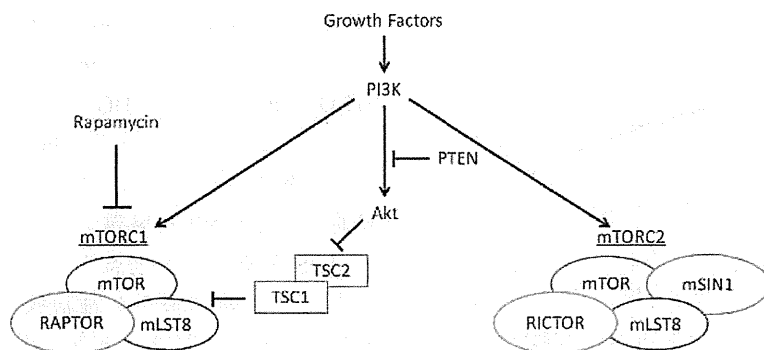


図1 PI3K/Akt/mTOR signaling 経路

果、細胞周期のG1期で増殖停止され、G0期と同様にタンパク質合成も停止する。Rapamycinと良く似たmTOR阻害剤として、temsirolimus, everolimus, ridaforolimusやdeforolimus由来の物質が、さまざまながんに対応する抗がん剤として開発されている。

#### 4.3 カルボプラチン(Carboplatin)

現在、がん化学療法の中心的な役割を担う抗がん剤がプラチナ製剤で、精巣腫瘍や卵巣がんを始めとする、数多くのがん種に対して有効性が認められている。プラチナ製剤は、DNAに直接作用する抗がん剤で、体内で活性体に変換後、がん細胞内のDNAやタンパク質に結合することにより、DNAの複製および転写を阻害し、死滅させる。代表的なプラチナ製剤はシスプラチンで、高い抗腫瘍効果を有するが、腎障害や骨髄抑制といった激しい副作用が生じ易い。そこで、シスプラチンの抗腫瘍効果を弱めることなく、かつ腎毒性などの副作用を軽減することを目的に開発されたプラチナ製剤が、カルボプラチンである。当研究室では、前立腺がん細胞株DU145にカルボプラチンを投与後、48、72時間後に細胞生存率をAlamar blue assayによって測定した結果、濃度依存的に細胞生存率が減少することが観察された(図2)。また、本邦で前立腺がん治療に良く用いられたエストラムスチン(EMP)とDTX、カルボプラチンを併用投与すると、前立腺がん患者のPSA値が30%以上低下する臨床試験結果も報告されている<sup>16)</sup>。従って、今後、カルボプラチンは、前立腺がんに対するSecond lineとして有望視されている。

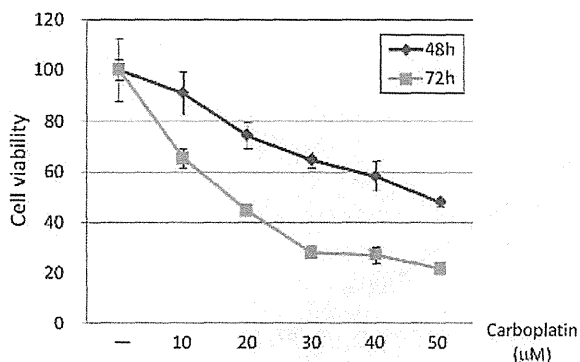


図2 Carboplatin投与時におけるDU145の細胞生存率

#### 5. 前立腺がん細胞における磁性体ナノ粒子の影響

近年、ナノテクノロジーは、がんを始めとする医療分野への応用が注目されている。ナノ粒子は、難溶性の薬剤の輸送や、標的組織あるいは器官への薬物輸送、診断薬や薬剤との併用による効果増強などが期待できる。そのためには、ナノ粒子の特徴を理解した上で、従来の治療法を改善していく必要がある。超常磁性体酸化金属ナノ粒子(Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: SPION)は、機能性材料として注目され、その特徴を活かして、磁気共鳴装置(Magnetic resonance imaging: MRI)の造影剤、薬剤や遺伝子を目的の臓器へ輸送するシステム(Drug delivery system: DDS)、温熱療法(Hyperthermia)、キレート療法などに応用されている<sup>17, 18)</sup>。

SPIONの一つであるマグネタイトナノ粒子( $Fe_3O_4$ -NP)は、他のナノ粒子と比べて高い生体適合性を有し、細胞内に浸透しやすいことから<sup>19)</sup>、医療分野、特にがんに対する治療法や診断法の応用に向けて、盛んに研究されている。当研究室では、以前 $Fe_3O_4$ -NPのヒト細胞株(肺がん細胞株A549、前立腺がん細胞株LNCaP, DU145, PC-3, 前立腺上皮細胞RWPE-1など)への細胞毒性および遺伝毒性の評価を行ってきた。その結果、 $Fe_3O_4$ -NP曝露による前立腺がん細胞株に濃度依存的な細胞生存率の低下、および酸化ストレスの指標となる8-hydroxydeoxyguanosine(8-OH-dG)の有意な増加が認められた。このことから、 $Fe_3O_4$ -NPは、前立腺がん細胞株に対して、細胞毒性および遺伝毒性を生じさせると考えられた。その後、 $Fe_3O_4$ -NPは、前立腺がん細胞株に活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)を増加させるという結果が得られた。 $Fe_3O_4$ -NPは、Fenton反応( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^*$ )により生成するフリーラジカルによって、酸化ストレスが生じることが報告されている。マウスのマクロファージ細胞に $Fe_3O_4$ -NPを曝露すると、ROSが生じ、そのROSが細胞死を誘導することが報告されているため<sup>20)</sup>、前立腺がん細胞株に対しても、ROS産生が上昇することにより、細胞毒性や遺伝毒性が生じると考えられた。

ROS 自体は second messenger として正常細胞のシグナリングで重要な役割を果たしている。化学療法、放射線療法および光線力学的治療法において ROS の産生が細胞死をもたらす重要な役割を果たしている。そこで、ROS を産生することで、抗腫瘍効果を誘発する酸化促進がん療法 (Pro-oxidant therapy) が考えられている。一般的に、酸化促進がん療法は、Arsenic や Imexon 等による ROS 産生、Glutathione (GSH) の消耗などが該当する。本研究室は、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP によって生じる ROS 産生を酸化促進がん療法として応用可能であると考へた。つまり、各種抗がん剤と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP をがん細胞に併用曝露することで、抗がん剤の抗腫瘍効果を弱めることなく、抗がん剤の使用量を減少

させ、副作用を軽減することが可能となると考えられる。

## 6. Rapamycin と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP の併用効果

当研究室では、前立腺がん細胞株に first line で使用される DTX と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP を併用曝露し、DTX の使用量を減らし、その効果が維持できることを報告している<sup>21)</sup>。また、前立腺がんにおいて PI3K/Akt/mTOR signaling 経路は重要な働きをすることが知られている。そこで、現在 PI3K や mTOR を標的にした多くの分子標的治療薬の開発が進められており、それらの抗腫瘍効果が報告されている (表 1)。mTOR は mTOR complex 1 (mTORC1) と、mTOR complex 2 (mTORC2) から

表 1 PI3K/Akt/mTOR 経路標的薬剤の臨床試験<sup>12)</sup>

Drug category	Drug or agent name	Company	Phase of clinical trials	Cancer type
Pan-PI3K inhibitors	GSK1059615	GlaxoSmithKline	Phase I terminated	Solid tumors; metastatic breast cancer; endometrial cancer and lymphoma
	ZSTK474	Zenyaku Kogyo Co, Ltd	Phase I	Advanced solid malignancies
	CH5132799	Chugai Pharma Europe Ltd	Phase I	Advanced solid malignancies
Selective PI3K inhibitors	BKM120 XL147	Novartis Exelixis	Phase I - II Phase I - II	Solid tumors Lymphoma; breast cancer; endometrial cancer; NSCLC; ovarian cancer; glioblastoma; astrocytoma
	GDC0941	Genentech	Phase I	Advanced solid tumors; non-Hodgkin's lymphoma; locally recurrent breast cancer; metastatic breast cancer; NSCLC
	PX866	Oncothyreon, Inc.	Phase I - II	Incurable metastatic colorectal carcinoma; incurable progressive, recurrent, or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck; advanced solid tumor; prostate cancer; glioblastoma
PI3K (α isoform)	BYL719	Novartis	Phase I	Advanced solid tumors with a mutation of the PIK3CA gene
PI3K (δ isoform)	CAL-101	Calistoga	Phase I - II	Non-Hodgkin's lymphoma; chronic lymphocytic leukemia; small lymphocytic lymphoma; acute myeloid leukemia; multiple myeloma; allergic rhinitis
Akt Inhibitors	Perifosine	Keryx	Phase I - III	NSCLC; solid tumors; metastatic breast cancer; sarcoma; childhood solid tumors; malignant gliomas; lymphomas; colon cancer; multiple myeloma; solid tumors
	MK-2206	Merck	Phase I - II	Advanced solid tumors; breast cancer; lymphoma; colorectal neoplasms; leukemia; ovarian cancer; fallopian tube cancer
	GSK690693	GlaxoSmithKline	Phase I (terminated)	Relapsed or refractory hematologic malignancies; solid tumors; lymphoma
mTOR Kinase Inhibitors	AZD8055	AstraZeneca	Phase I - II	Advanced solid malignancies; glioblastoma multiforme; anaplastic astrocytoma; anaplastic oligodendroglioma; malignant glioma; brainstem glioma; advanced hepatocellular carcinoma
	OSI027	OSI Pharmaceuticals	Phase I	Solid tumors; lymphoma
	INK-128	Intellikine	Phase I	Breast cancer; advanced solid malignancies; non-Hodgkin's Lymphoma; relapsed or refractory multiple myeloma
Rapamycin and Rapamycin Analogues (Rapalogues)	Rapamycin	Wyeth/Pfizer	Phase I - II	Glioma; renal cell carcinoma; advanced solid cancers; bladder cancer; head and neck cancer; renal cell carcinoma
	Temsirolimus	Wyeth/Pfizer	Phase I - III	Metastatic cancers; advanced solid tumors; breast cancer; glioma; NSCLC; renal cell carcinoma; head and neck cancer; bladder cancer; colorectal cancer; thyroid cancer; squamous cell cancer; prostate cancer; non-Hodgkin's lymphoma; multiple myeloma; malignant melanoma; endometrial cancer; ovarian cancer; glioblastoma multiforme; sarcoma
	Everolimus	Novartis	Phase I - III	Bladder cancer; advanced solid tumor; head and neck cancer; gliomas; renal cell carcinoma; lymphoma; kidney cancer; endometrial cancer;

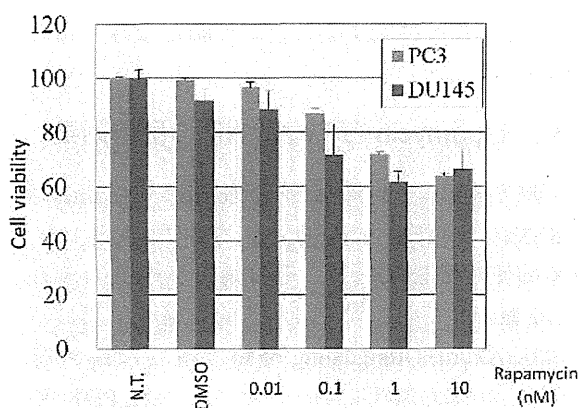


図3 Rapamycin 投与から 72 時間後の細胞生存率

なる複合体を形成する。そして、マクロライド系抗生剤であり、前立腺がん治療の Second line として有望視されている Rapamycin により mTORC1 が特異的に阻害される。しかし、PI3K/Akt/mTOR シグナル経路は、PTEN により制御されているので、PTEN の有無により Rapamycin の効果が異なると考えられるため、二つの前立腺がん細胞株 DU145 (PTEN 陽性) および PC-3 (PTEN 欠損) に対して、Rapamycin を曝露し、72 時間後の細胞生存率を測定した。その結果、DU145、PC-3 細胞株共に濃度依存的に細胞生存率が減少した(図 3)。Rapamycin は、がん抑制遺伝子である PTEN や TP53 遺伝子が機能損失しているがん細胞に対して有効性が認められている<sup>14)</sup>。DU145 細胞株は、PTEN 陽性であるが、TP53 に変異を有する細胞株であるため、この細胞株において Rapamycin が細胞生存率に影響を与えたことが考えられる。実際、別の PI3K/Akt/mTOR シグナル経路阻害剤 BEZ235 を DU145、PC-3 両細胞株に曝露しても、両細胞株共に細胞生存率の低下が認められている<sup>22)</sup>。次に、両細胞株に対して、Rapamycin と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP の併用曝露を行った結果、通常使用される Rapamycin の 1/100 量(0.1 nM)を使用したにもかかわらず、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP 濃度依存的に細胞生存率の低下が認められた。さらに、Rapamycin(0.1 nM)と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP 100 µg/ml 曝露条件下において、Rapamycin(0.1 nM)単剤よりも統計学的に有意に細胞生存率が減少する結果が得られた(図 4)。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP を用いた併用療法に対する研究は数多く存在し、作用機序もさまざまである。例えば、

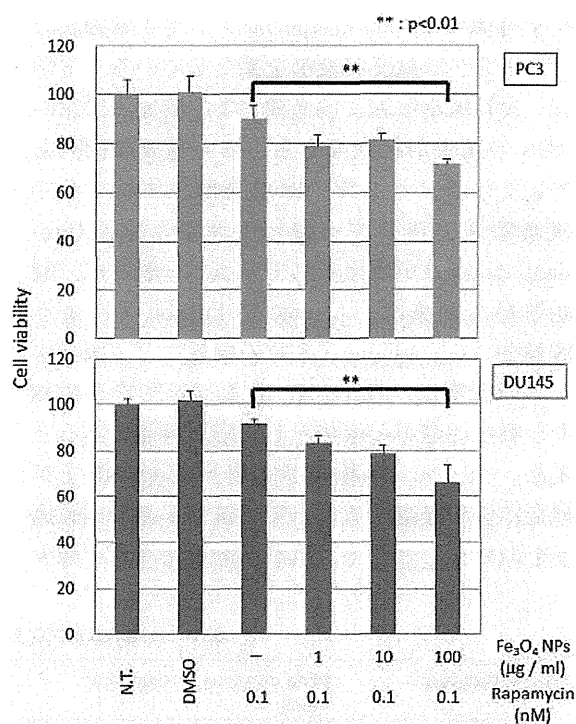


図4 Rapamycin と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP 併用曝露後の細胞生存率

大腸がん細胞株 LOVO に対しては、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP と Gambogic acid を併用曝露すると、PI3K/Akt/Bad シグナル経路を介して、細胞増殖を抑制する<sup>23)</sup>。また、白血病マウスモデルにおいては、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP と抗がん剤の Daunoru-bicin、5-bromotetrandrine を併用投与すると、apoptosis 経路が活性化して細胞死を誘導することが報告されている<sup>24)</sup>。当研究室で DTX と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP を併用曝露した際、ROS の産生が向上し、apoptosis の割合が増加したことから、Rapamycin と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP の併用曝露においても酸化ストレスが向上している可能性がある。そこで、Rapamycin と Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP の併用によって生じる細胞死は、さまざまな経路が関与していることが考えられるので、今後、さらに詳細な生物学的機構の解析が必要となる。

## 7. まとめ

前立腺がんの治療に対する FDA 承認薬は、2004 年の DTX 以降現在に至るまで、Cabazitaxel、Abiraterone、Sipuleucel-T の 3 つがある。さらに、第 3 相臨床試験の最新の結果によれば、MDV 3100 と Alpharadin という試験薬が、前立腺がん男性の全生存期間を改善することが報告され、さ