

# 3. 磁性パクリタキセルの 細胞周期停止

※使用細胞: MDA-MB-453 (ヒト由来トリプルネガティブ乳がん細胞), MDA-MB-231 (ヒト由来トリプルネガティブ乳がん細胞), MCF7 (ヒト由来エストロゲン受容体陽性乳がん細胞)

## <背景>

市販のパクリタキセルは G2/M 期で細胞分裂を停止させることが分かっている。また、乳がん細胞 MCF7、MDA-MB-453、MDA-MB-231 において、磁性パクリタキセルが市販のパクリタキセルと同様に、G2/M 期に細胞を集積させることが示唆されている。

## <目的>

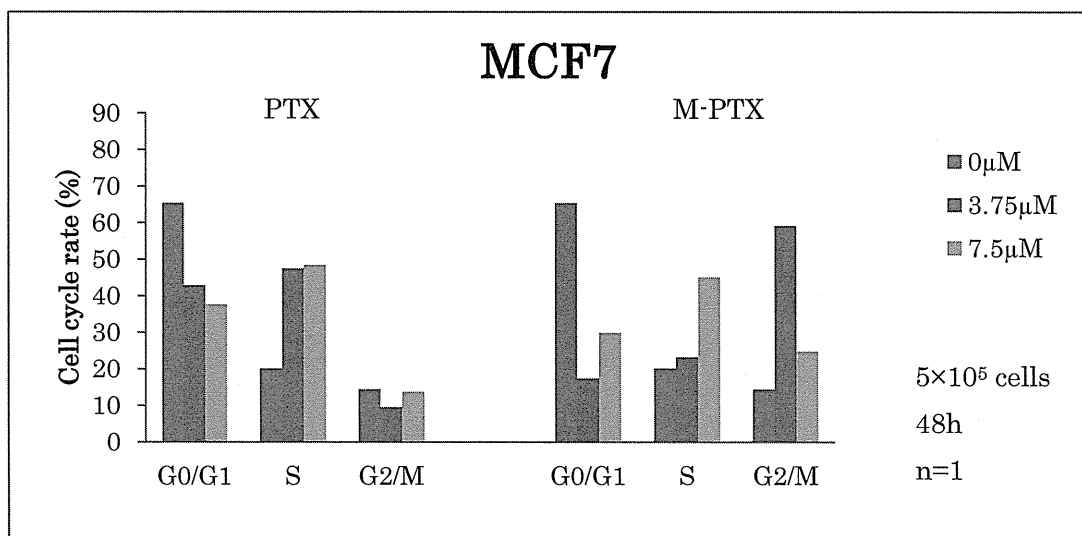
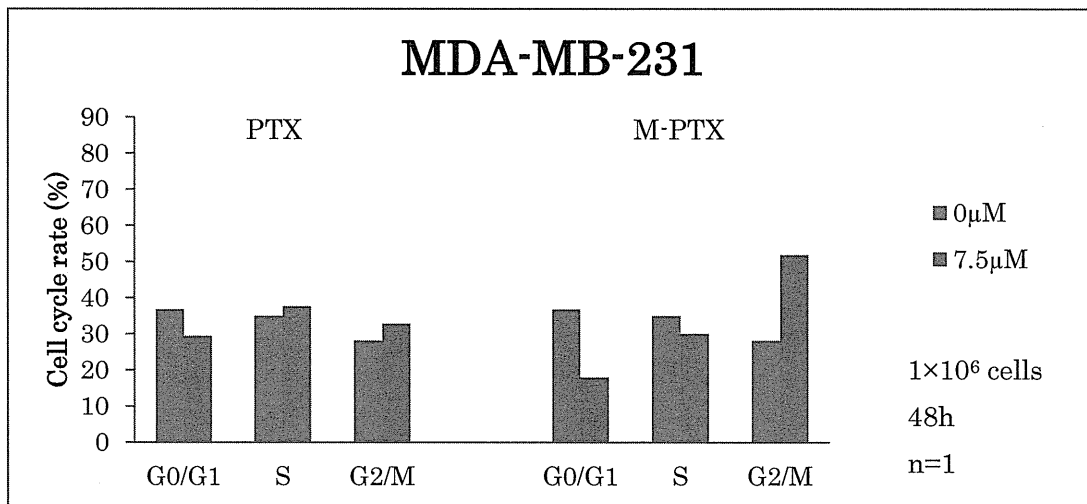
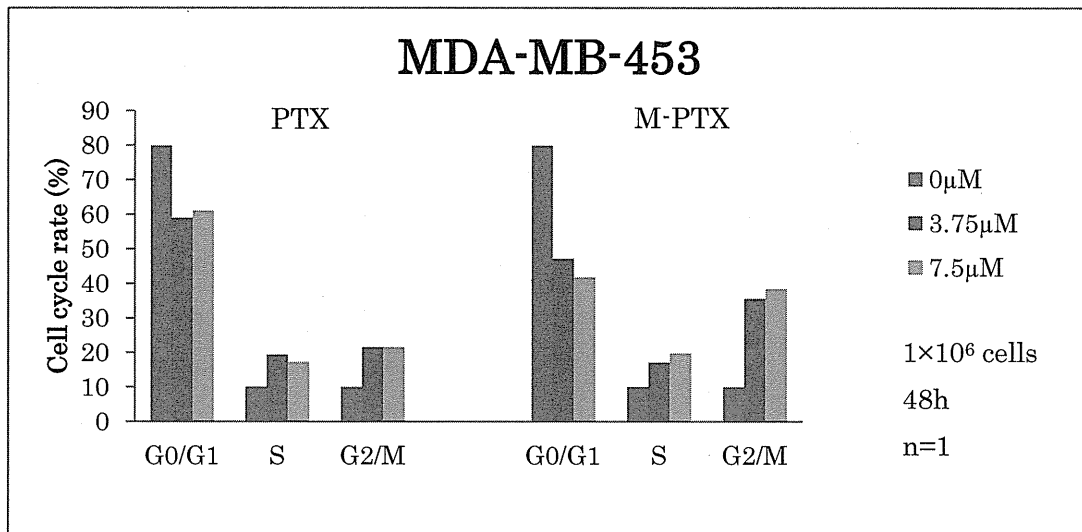
乳がん細胞 MCF7、MDA-MB-453、MDA-MB-231 において、磁性パクリタキセルが市販のパクリタキセルと同様、細胞を G2/M 期に集積させるか、再現性をとる。

## <方法>

乳がん細胞を T-フラスコまたは 6cm dish に撒いた。翌日、磁性パクリタキセルと比較対象の市販のパクリタキセルを細胞に投与した。その 24 時間後、それぞれの細胞を回収し、Buffer (BD 社 Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kit) で洗い、Solution A~C を加え、フィルタリングして FACS で解析した。

## <結果・考察>

どの細胞においても、コントロールに比べて、G0/G1 期は減り、G2/M 期が増えた。磁性パクリタキセルがパクリタキセルと似たように、G2/M 期に集積させる傾向にある。(磁性化してもパクリタキセルの性質を保持できている)



# 4. 磁性パクリタキセルの 微小管脱重合阻害 (チューブリンの蛍光染色)

※使用細胞: MCF7 (ヒト由来エストロゲン受容体陽性乳がん細胞)

## <背景>

市販のパクリタキセルは、細胞の有糸分裂の際、微小管を安定化させ、結果としてG2/M期で脱重合を阻害し、細胞増殖を抑えるという作用機序であることがわかっている。細胞周期を図る実験では、磁性パクリタキセルによるG2/M期での乳がん細胞の集積がみられた。つまり、磁性パクリタキセルは磁性化してもパクリタキセルの性質を保持していることが示唆されている。また、(今回、ネガティブコントロールとして用いた)ビンブラスチンは重合阻害剤であることが知られている。

## <目的>

MCF7において、磁性パクリタキセルが市販パクリタキセルの作用と同様に、微小管の脱重合を阻害することを検証する。(蛍光標識されたチューブリンが見える細胞が多ければ、脱重合が阻害されてG2/M期で細胞が停止していることが言える。)また、磁性パクリタキセルと市販のパクリタキセルで微小管の脱重合阻害を定量化し、比較する。

## <方法①>

MCF7の細胞を4well chamberに撒いた。翌日、磁性パクリタキセルとパクリタキセルを細胞に投与した。24時間後、細胞に固定・透過・ブロッキングの処理を施し、一次抗体(anti- $\alpha$  tubulin)を乗せた。翌日、GFP(緑色)かTRITC(赤色)標識の二次抗体を乗せ、DAPI(核を青く染める)でも染めて、封入した。その後、スライドを蛍光顕微鏡で観察した。

## 〈方法②〉

MCF7 の細胞を 4well chamber に撒いた。翌日、磁性パクリタキセルと比較対象のパクリタキセル、ネガティブコントロールのビンブラスチンを細胞に投与した。24 時間後、細胞に固定・透過・ブロッキングの処理を施した。そして、一次抗体 (anti- $\alpha$  tubulin) を乗せて 1 時間静置した。TRITC (赤色) 標識の二次抗体を 1 時間乗せた後、DAPI (核を青く染める) でも染めて、封入した。その後、スライドを蛍光顕微鏡で観察した。

## 〈定量方法〉

計 4 回分のサンプルを各試薬・各濃度 10 視野ずつ写真撮影し、全体の細胞数とチューブリンが見える細胞数を目視でカウントした。染色率 (阻害率) を算出して、グラフにした。

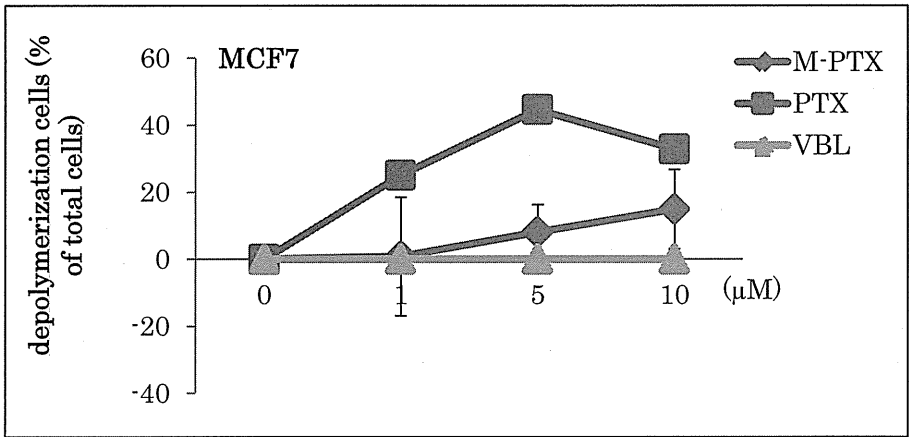
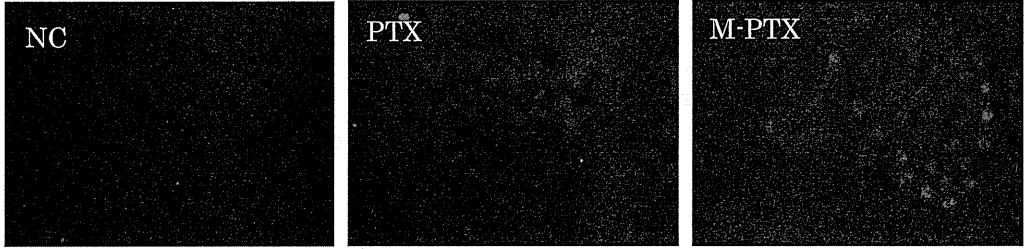
## 〈結果〉

	$2 \times 10^4$ cells	$4 \times 10^4$ cells	$8 \times 10^4$ cells	$1 \times 10^5$ cells	$1.5 \times 10^5$ cells	$1 \times 10^5$ cells	$1 \times 10^5$ cells
Test (一次抗体 無し)	×	×	×	×	-	-	-
NC (0 $\mu$ M)	×	×	△	△	△	△	△
PTX (PC)	○	○	○	○	○	○	○
M-PTX	×	×	△	△	○	○	○

○・・・染色 (tubulin) が見られた    ×・・・染色 (tubulin) 見られず

△・・・一部、染色 (tubulin) が見られた    -・・・行っていない

磁性パクリタキセルもパクリタキセルと同様 (且つビンブラスチンとは異なって)、微小管の脱重合を阻害している。つまり、磁性化してもパクリタキセルの性質を保持できていることが示唆された。しかし、その効果は市販のパクリタキセルに劣り、パクリタキセルとしての性質を完璧に保持できているとは言い難い。



# 5. 磁性パクリタキセルの 微小管脱重合阻害 (チューブリンアッセイ)

## <背景>

市販のパクリタキセルは、細胞の有糸分裂の際、微小管を安定化させ、結果としてG2/M期で脱重合を阻害し、細胞増殖を抑えるという作用機序であることがわかっている。細胞周期を図る実験では、磁性パクリタキセルによるG2/M期での乳がん細胞の集積がみられた。つまり、磁性パクリタキセルは磁性化してもパクリタキセルの性質を保持していることが示唆されている。チューブリンの蛍光染色では、乳がん細胞に磁性パクリタキセルを投与すると、チューブリンの脱重合が阻害されていることが示唆された。

## <目的>

磁性パクリタキセルが市販パクリタキセルの作用と同様に、微小管の脱重合を阻害することを定量化して示す。

## <方法>

★Tubulin polymerization assay kit を用いて、記載プロトコールに従って実験した。  
プレートリーダーを以下の条件で設定しておいた。

[37°C カイネティック 波長 340nm 1回/1min ×60min]

予め、試薬も調製しておいた。(Tubulin Buffer, tubulin, Paclitaxel(Sigma), PTX(kit内PC), Magnetized paclitaxel(M-PTX), Vinblastine(VBL) )

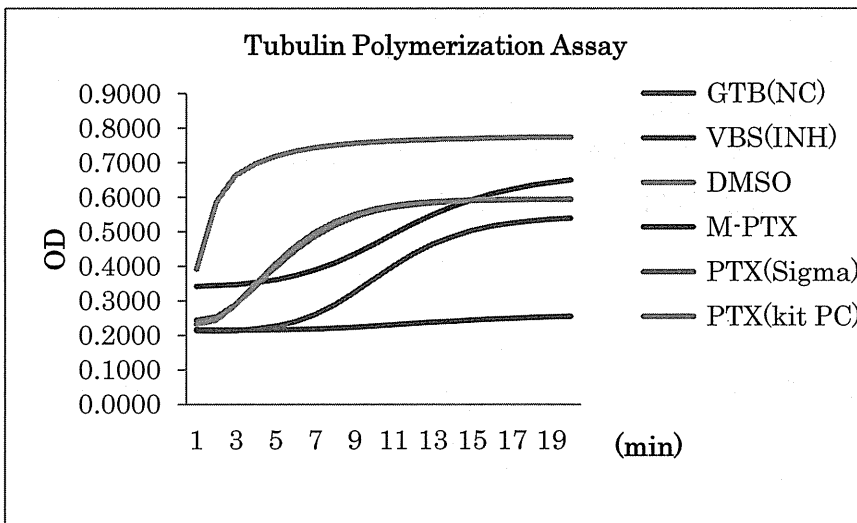
調製した PTX(PC), M-PTX, VBL(NC2), DMSO(NC1), G-PEM(BK)を 96well plate に加えた。そこに Tubulin を加え、速攻でプレートリーダーに入れ、測定開始した。

～各測定試薬の説明～

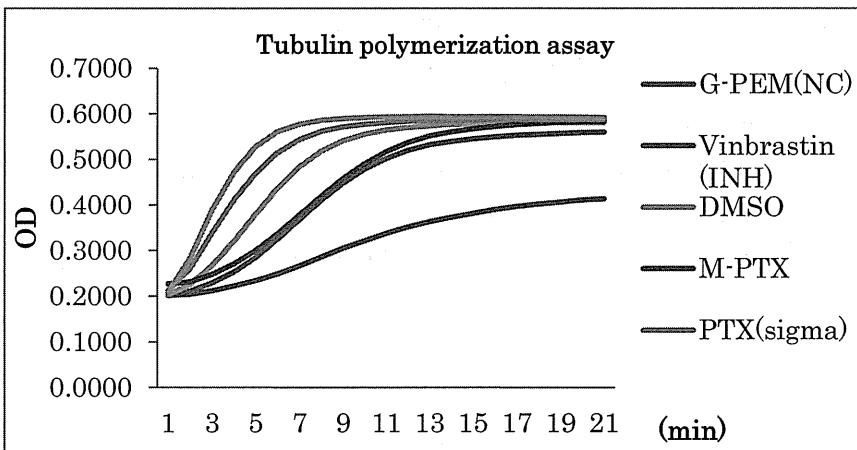
1. G-PEM . . . Negative Control (GTP 入りバッファー)
2. Vinblastine 3 $\mu$ M . . . 重合阻害 (Negative Control 2)
3. DMSO 1/10 希釈 . . . 試薬の溶媒 (Negative Control 3)
4. Magnetized paclitaxel 1 $\mu$ M . . . 脱重合阻害？
5. Paclitaxel(Sigma) 1 $\mu$ M . . . 脱重合阻害 (普段使用しているものが、kit の Paclitaxel と同じかどうか判定するため)
6. Paclitaxel(kit 内 PC) 1 $\mu$ M . . . 脱重合阻害 (Positive Control)

## <結果>

1<sup>st</sup> try



2<sup>nd</sup> try



## 〈考察〉

磁性パクリタキセルもパクリタキセルと同様に微小管の脱重合を阻害しているとは言えない。つまり、磁性化したことによってパクリタキセルの性質が多少衰えていることが示唆された。また、ネガティブコントロールとして用いた DMSO の希釈が他の試薬と異なって濃かったため、ポジティブコントロールのパクリタキセルも薬そのものの性質を示しているか、DMSO のせいかわからなかった。



# 6. 磁性パクリタキセルの 磁石集積 In Vivo

※使用細胞: MDA-MB-453 (ヒト由来トリプルネガティブ乳がん細胞), MDA-MB-231 (ヒト由来トリプルネガティブ乳がん細胞), MCF7 (ヒト由来エストロゲン受容体陽性乳がん細胞)

## <背景>

乳がん細胞 (MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-453) で磁性パクリタキセルの抗腫瘍効果が検証できた。そして、磁性パクリタキセルが in Vitro では磁石に集まることが分かっており、in Vivo でも集まることが示唆された。また、乳がんモデルに磁性パクリタキセルを投与し、組織を鉄染色したところ、磁石をつけたものが青く染まっていたのを複数箇所確認できた。  
(3種の細胞で確認済)

## <目的>

マウスで乳がんモデルをつくり、腫瘍に磁石を充て、磁性パクリタキセルが集まるか検証する。

## <方法>

乳がん細胞をマトリゲルで調整した。ヌードマウスの右肩部分に移植した。腫瘍が直径 5mm 程になるまで観察。

5mm に達したら、1 群目には磁石付きジャケットを装着し、磁性パクリタキセル (M-PTX) を尾静脈に注射、2 群目には磁性パクリタキセルの尾静脈注射だけ、3 群目は生理食塩水を尾静脈投与し、コントロールとした。(下に群の説明参照)

腫瘍部分 (磁石を付けていた部分) を切り取り、ホルマリンで固定した。(組織が丸まらないようにホッチキス留めにした。) 24 時間後、エタノールで脱水し、キシレンで置換して、パラフィンブロックを作製した。切片にスライスし、スライドを作製。スライドを脱パラフィンし、特殊染色または HE 染色をし、封入した。組織の染色を顕微鏡で観察した。

①

A, MDA-MB-231 control (m-PTX 0mg/Kg)	F, MDA-MB-231 control (m-PTX 0mg/Kg)
B, MDA-MB-231 iv のみ (m-PTX 40mg/Kg)	G, MDA-MB-231 iv のみ (m-PTX 40mg/Kg)
C, MDA-MB-231 iv のみ (m-PTX 60mg/Kg)	H, MDA-MB-231 iv のみ (m-PTX 60mg/Kg)
D, MDA-MB-231 iv (m-PTX 40mg/Kg)+磁石	I, MDA-MB-231 iv (m-PTX 40mg/Kg)+磁石
E, MDA-MB-231 iv (m-PTX 60mg/Kg)+磁石	J, MDA-MB-231 iv (m-PTX 60mg/Kg)+磁石

Sample 群の説明

②トリプルネガティブ乳がん細胞 MDA-MB-453 の腫瘍モデル切片を鉄染色 3h 行った。

- ・フェロシアン化カリウム 2g - 3h
- ・フェロシアン化カリウム 4g - 3h

A, MDA-MB-231 control (m-PTX 0mg/Kg)	F, MDA-MB-231 control (m-PTX 0mg/Kg)
B, MDA-MB-231 iv のみ (m-PTX 40mg/Kg)	G, MDA-MB-231 iv のみ (m-PTX 40mg/Kg)
C, MDA-MB-231 iv のみ (m-PTX 60mg/Kg)	H, MDA-MB-231 iv のみ (m-PTX 60mg/Kg)
D, MDA-MB-231 iv (m-PTX 40mg/Kg)+磁石	I, MDA-MB-231 iv (m-PTX 40mg/Kg)+磁石
E, MDA-MB-231 iv (m-PTX 60mg/Kg)+磁石	J, MDA-MB-231 iv (m-PTX 60mg/Kg)+磁石

③

A, control (m-PTX 0mg/Kg)	B, control (m-PTX 0mg/Kg)
C, iv のみ (m-PTX 40mg/Kg)	D, iv のみ (m-PTX 40mg/Kg)
E, iv のみ (m-PTX 40mg/Kg)	F, iv (m-PTX 40mg/Kg)+磁石 1 個
G, iv (m-PTX 40mg/Kg)+磁石 1 個	H, iv (m-PTX 40mg/Kg)+磁石 2 個

## <結果・考察①>

腫瘍はどちらの細胞も接着していて、MDA-MB-453の方が接着がよさそうだった。(腫瘍の大きさから) 磁石付きのサンプルを見ると、染まっていたが、染まっている箇所は少なかった。

先行実験と異なる条件で、劣る要因となりそうなところは、磁石で集める箇所が尻尾より遠くに離れたこと、尾静注してから早々に組織をとってしまったことが挙げられる。加えて、手技の問題で切片を切り進め過ぎて、磁性パクリタキセルが集まっていたかもしれないところを見逃した可能性もある。

## <結果・考察②>

HE染色では腫瘍らしき部位が確認できた。しかし、タキソール磁性体が存在する部位（鉄染色で青く染まっている部位）は腫瘍部位ではないことも判った。腫瘍と皮膚の間に多かった。

鉄染色では、染色時間を3倍にしても、あまり劇的な変化がない上、コントロールの染色が目立ってしまっていた。染まり過ぎを危惧してフェロシアン化カリウムの量を半分にしたものも変わらなかった。

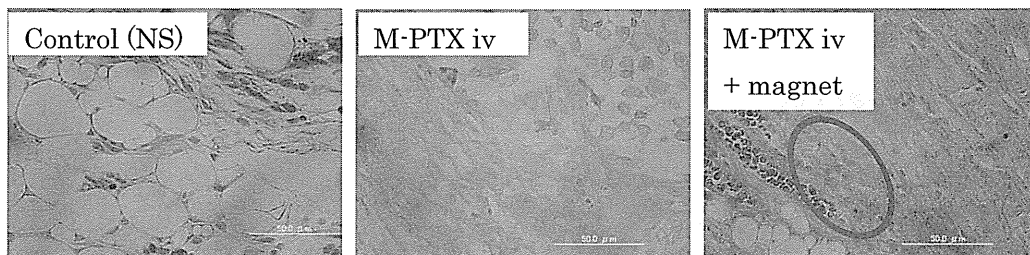
HE染色と①の鉄染色から、タキソール磁性体が注射されてから腫瘍に辿り着く前に組織をとってしまったことが窺える。そのため、腫瘍の中は青く染まっていなかったと考えられる。

今回の鉄染色（3 h）から、染色時間は時間が長くても大差は生まれず、1hが良さそうである。

## <結果・考察③>

青く染まっていた箇所が多くみられた。しかし、磁石を付けず、静注しただけのものの方が多く染まっていて、タキソール磁性体が磁石に集まったことの証明にはならなかった。何もしていないコントロール（タキソール磁性体の代わりに生食を静注）群は染まっているところが明らかに少なかったため、タキソール磁性体投与群で青く染まっているのはタキソール磁性体自身だと考えられる。

結果例（MDA-MB-231）



## <サマリー (2014, 4~2015, 2)>

今年度、磁性パクリタキセルを用いた実験は大きく分けて、以下4種類である。

①磁性パクリタキセルの抗腫瘍効果の検討

②パクリタキセルの性質保持の検討

③磁性パクリタキセルの溶媒検討

④動物を用いた磁石集積の検討

細胞はヒト由来乳がん細胞の MDA-MB-453(トリプルネガティブ)と MDA-MB-231(トリプルネガティブ)、MCF7 (エストロゲン受容体陽性)、また扁平上皮癌細胞の OSC-19 の4種類を実験に用いた。

抗腫瘍効果は、XTT assay とフローサイトメトリー(FACS)によるアポトーシス測定によって検討した。XTT assay において、乳がん細胞3種に対して、磁性パクリタキセルは市販のパクリタキセルとほぼ同等の抗腫瘍効果を示した(有意差なし)。アッセイの条件を検討した結果、【(96well plate を用いる場合) 5000 cells/well になるように細胞を撒き、0/N で接着させ、磁性パクリタキセル及びパクリタキセルを 0, 3.75, 7.5, 15 $\mu$ M で投与し、24 時間に XTT 試薬を加え、2 時間後に吸光度を測定する】という条件が今の時点で最良となった。また、扁平上皮癌 OSC-19 細胞においては、磁性パクリタキセルの抗腫瘍効果は確認できたが、上記の条件では市販のパクリタキセルと顕著な差が生じた。

アポトーシス誘導を測ってみると、乳がん細胞3種において、磁性パクリタキセルのアポトーシス誘導の傾向がみられたが、市販のパクリタキセルとの効果の差は顕著であった。アポトーシス誘導の測定条件は未だ定まっておらず、MCF7 と MDA-MB-231 ではまだ再現性がとれていない。

脱重合阻害剤であるパクリタキセルの性質保持の確認には、細胞周期の FACS 解析と、チューブリンの蛍光染色にて行った。細胞周期の測定において、乳がん細胞を磁性パクリタキセルで刺激すると、市販のパクリタキセルと同様、G2/M 期に細胞を集積させた。チューブリンの蛍光染色において、MCF7 細胞を磁性パクリタキセルで刺激したところ、市販のパクリタキセルと同様、チューブリンが脱重合手前で停止している細胞を多数確認できた。しかし、薬剤を低濃度で投与すると、その効果は市販のパクリタキセルと顕著な差を示した(定量)。また、重合阻害剤であるビンブラスチンをネガティブコントロールとして用いたところ、磁性パクリタキセルと市販のパクリタキセルとは違うチューブリンの形を確認し、磁性パクリタキセルが市販のパクリタキセルの性質を保持できていることが示唆された。

また、脱重合阻害の定量化実験として、tubulin polymerization assay をキットのプロトコールに則って行った。この結果、磁性パクリタキセルの脱重合阻害は市販のパクリタキセルに劣ることが明らかであった。

溶媒の検討では、市販のパクリタキセルの溶媒となっている【ヒマシ油+無水エタノール】を使って磁性パクリタキセルを溶かそうと試みたが、完全には溶けなかった。また、【ヒマシ油ニューコール+無水エタノール】でも同じ具合だった。6h のソニケーションを行うことで、見た目上の溶解度は上がった。

動物を用いた磁石への集積検討では、乳がん（3種）モデルをつくり、腫瘍に磁石をつけ、尾静脈投与した磁性パクリタキセルが磁石によって腫瘍に集まるか組織学的に検討した。実験群は以下の3群であった。

a) コントロール1（生理食塩水）

b) コントロール2（磁性パクリタキセル投与）

c) 磁性パクリタキセル投与+磁石

腫瘍部分をパラフィン切片にし、HE染色と特殊染色を行った。HE染色において、毎回全てのマウスに腫瘍が接着したことが示され、特殊染色において、毎回c)群だけが染色箇所を多数確認できた。このことより、磁性パクリタキセルが体外からの磁石によって腫瘍に集められることが示唆された。

