

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560416

研究課題名(和文) 高密度微小管束を有する培養細胞を用いた有糸分裂阻害剤の新規スクリーニング法の開発

研究課題名(英文) A novel bioassay system for antimitotic agents using unicellular organisms

研究代表者

安藤 元紀 (Ando, Motonori)

岡山大学・教育学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20222789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗腫瘍活性を有する新規有糸分裂阻害剤のスクリーニングシステムとして、タイヨウチュウと呼ばれる単細胞生物の微小管束を内包する軸足の伸長収縮反応を指標とした新しい生物検定系の開発を行った。灌流型測定セルの試作を行い、細胞の接着性を検討したところ、基質の材質に依存することが分かった。抗腫瘍活性を有するエポチロンの効果を検討したところ、パクリタキセルに比べて低濃度でその効果があることが分かった。蛍光パクリタキセルを作用させ観察したところ、細胞が生きた状態で微小管束の蛍光イメージングが可能であった。本研究で開発した生物検定系は有糸分裂阻害剤の一次スクリーニングシステムとして有用であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The present study provides a novel bioassay system for antimitotic agents using unicellular organisms. Heliozoon cells have many stiff and radiating axopodia, each containing a bundle of axonemal microtubules as a cytoskeleton. A flow-through type chamber was developed in this study. Heliozoon cells were more adherent to the glass coverslip than the plastic one, indicating that the substrate material influences sensitivity of this bioassay system. The axonemal microtubules were more sensitive to epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a paclitaxel-like mechanism of action. In addition, the axonemal microtubules labeled with the fluorescent paclitaxel were detected in viable heliozoon cells. These results indicate that heliozoon cells can be used as an effective in-vivo tool to screen novel microtubule-affecting agents with anti-tumor activity.

研究分野：生理学

キーワード：微小管 有糸分裂阻害剤 単細胞培養系

## 1. 研究開始当初の背景

単細胞性の原生物であるタイヨウチュウは、その特徴として細胞体から軸足と呼ばれる仮足を伸ばしている。この軸足の伸長・収縮を調節し様々な細胞運動を行う。軸足内には細胞骨格として数百本の微小管束が二重螺旋を形成し存在している。餌虫の捕獲や物理的な刺激により、ビデオレート以下の急速な軸足収縮を行う場合もある (Enomoto et al, 2011)。タイヨウチュウは、チュープリンの重合脱重合を調節し様々な細胞運動能を発現している。

チュープリンを標的とした抗腫瘍活性を有する化合物の一つであるパクリタキセル (タキソール, Wani et al, 1971) は、悪性腫瘍に対する最終的な選択薬として現在も臨床で処方されている。強力な副作用を有することから、新規合成化合物や天然化合物の探索が世界中で行われている (de Fátima et al, 2014)。新規有糸分裂阻害剤は、チュープリンアッセイ試験や細胞株を用いた分裂抑制試験でその効果が判定される。しかし狂牛病の問題により安価なチュープリンタンパク質の入手が困難となったこと等、簡便で安価な生物検定系の開発が急務となっている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、原生物タイヨウチュウの微小管束を内包する軸足の収縮・伸長現象を指標とした新規有糸分裂阻害剤に対する新しい生物検定系の開発を行うことにある。タイヨウチュウは軸足と呼ばれる針状の仮足の中に微小管束を内包し、その伸長・収縮はそのまま細胞骨格としての微小管の重合・脱重合を反映している。抗腫瘍活性を有する新規有糸分裂阻害剤の効果についてはチュープリンアッセイと呼ばれる *in vitro* の実験系や細胞株の分裂抑制効果で評価されるが、狂牛病の問題のため安価なチュープリンの入手が困難なこと、正常細胞への影響が

評価できない、など克服すべき問題があった。本研究課題では、有糸分裂阻害剤の一次スクリーニングシステムとして、単細胞生物の軸足伸長収縮反応を指標とした新しい生物検定系を試作・開発する、ことを目的とした。

本研究の斬新性は、有糸分裂阻害剤の活性評価のために、原生物のユニークな細胞運動機構を利用する点にある。抗腫瘍活性を評価する一次スクリーニング用の生物検定系として、生きた細胞のまま、微小管の重合脱重合を通常の光学顕微鏡レベルで検出可能なシステムは、これまでに例が無く、新しい着想に基づいた革新的なバイオモニターシステムとなる。国内外にこのような着想に基づく生物検定系の開発に関する研究は見当たらない。研究期間内に、(1) 有糸分裂阻害剤の影響を評価する細胞動態計測システムの開発、(2) 既存、臨床試験中、および新規の有糸分裂阻害剤に対する細胞応答性の検討、(3) 検出システムの検討、(4) 蛍光イメージング法による新たな解析方法の検討、を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞動態計測システムの開発

試験液灌流システムの実験条件を規定するため、測定セルの形状および細胞の基質接着性について検討する。自由生活性の単細胞生物のため基質接着性はそれほど高くない。試験液の流速や基質の材質の影響を調べる。加えて、軸足長の変化の検出のためのアルゴリズムを検討する。測定用セルについては、顕微鏡下に設置可能で、試験液の廃液を少なくするためにできるだけ少量の体積とし、灌流時に乱流が起こらないようなセルの形状について検討する。また細胞の基質接着性については試験液の流速および基質の材質の検討を行う。

### (2) 有糸分裂阻害剤の検討

軸足は、微小管重合阻害剤により短縮し、

微小管脱重合阻害剤（微小管安定化剤）により安定化（伸長あるいは固定化）されると予想される。重合阻害と安定化に対して異なる検出方法を検討する。上記検出方法に従い、抗腫瘍活性が明らかとなっている既存の有糸分裂阻害剤（パクリタキセル、ビンブラスチン、コルヒチン、ポドフィロトキシン等）、および臨床試験も含めて現在その活性が評価中の阻害剤（エポチロン、コンプレタスタチン、ノスカピン等）、について本検定系を用いてその有用性を検証する。

微小管重合阻害剤については、試験液の滯流による軸足長の短縮を阻害活性の指標とする。微小管脱重合阻害剤（安定化剤）については、軸足の短縮が誘発されるのではなく、安定化剤の影響により短縮が抑制される度合いを定量化する必要がある。そこで、試験液滯流後、低温刺激による軸足の短縮現象を指標とすることとした（低温試験法）。通常培養液で低温刺激を与えた場合、微小管の脱重合が促進され軸足の短縮が誘発されることを利用し、その反応を基準として低温刺激に対する脱重合阻害剤による短縮抑制率を解析する。

### （３）検出システムの検討

本生物検定系の効率化を進めるために、画像解析の手順を半自動化する。顕微鏡システム自体の小型化を計画する。タイムラプス記録の画像から、軸足の先端と細胞体の中心位置を抽出し中心から軸足先端までを軸足長として、その変化を計測する。試験液滯流開始から実験終了までの軸足長の変化の記録の自動化、および計測結果のリアルタイム表示を行う。半導体カメラと対物レンズを組み合わせ測定装置全体の小型化を検討する。

### （４）蛍光イメージング法による解析

蛍光標識有糸分裂阻害剤により微小管を標識し、*in vivo* 蛍光イメージング法による微小管動態の解析法を開発する。蛍光標識した微小管脱重合阻害剤を細胞に作用させて、蛍光

顕微鏡で軸足内微小管が標識されるかどうかを検討する。低温刺激法により標識された微小管動態を解析する。蛍光チューブリンによる蛍光標識も検討する。

## ４．研究成果

### （１）流動型測定セルの開発

測定セルは薬剤注入・排出用のラインを有する流動型とし、形状の細工を用意するためスペーサーはシリコン板を用いた。圧電素子駆動型小型ポンプにより、装置全体の小型化を目指した（図１）。

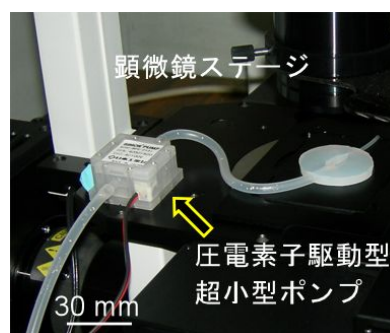


図１．流動型測定システム．超小型ポンプ部（左）と流入・流出経路を備えた流動型測定セル部（右）からなる．装置全体が倒立顕微鏡ステージに設置可能となっている．

流入口と流出口を楔形にすることで乱流を軽減できることが分かった。基質の材質を検討したところ、ガラスボトムの方が細胞の接着性が高いことがわかった。流速については、細胞接着性、セルの体積と試験液の交換時間との関係を考慮し決定した。軸足長の計測はビデオ記録により行った。二種類のタイヨウチュウ（*Actinophrys sol* , *Raphidiophrys contractilis*）を示す（図２）。

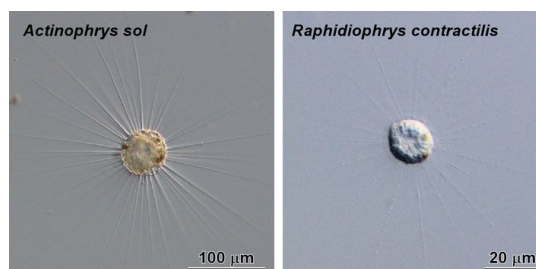


図２．研究に使用したタイヨウチュウ２種を示す．大型の *Actinophrys sol*（左）、小型の *Raphidiophrys contractilis*（右）．両種とも細

胞体より放射状に軸足を伸ばしている。

### (2-1) 微小管阻害剤と安定剤の効果

微小管重合阻害剤の一つであるコルヒチンの影響を調べた。濃度依存的に軸足長の短縮が誘発されることが分かった(図3)。チューブリンアッセイ等 *in vitro* のアッセイ系と比較して検出感度が低くなる傾向があるが、自由生活性単細胞生物の *in vivo* の反応系としては十分な感度を有すると考えられた。微小管脱重合阻害剤として古典的な化合物であるパクリタキセル (paclitaxel) について、低温試験法の検証を含めて実験を行った。低温刺激により培養液中 (control) では軸足の短縮が起こるが、パクリタキセルで前処理しておくとその濃度に依存して短縮率が抑制されることが分かった。低温試験法が有用であることが検証できた。

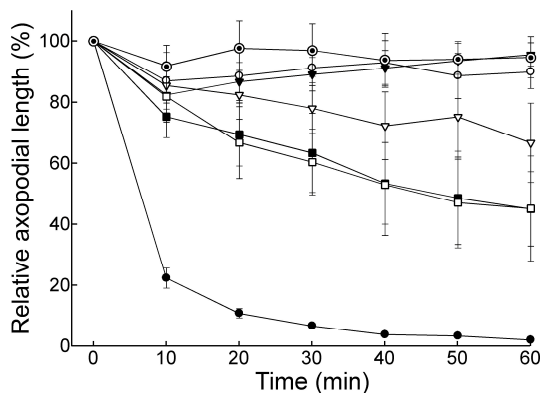


図3. コルヒチンによる軸足長の変化。濃度依存性が認められた。

### (2-2) 新規微小管安定剤の検討

抗腫瘍活性を有するエポチロン (EpoB) はパクリタキセルに比べて低濃度で微小管安定剤として機能すると報告されている。EpoBによる微小管脱重合阻害効果を検討したところ、パクリタキセルに比べて低濃度で微小管安定剤としての効果が認められた(図4,5)。EpoB 処理, DMSO 処理, コントロール (1/10 ASW) 間の viability の違いは認められなかった。EpoB 処理により軸足誘発率の有意な低

下が認められた。

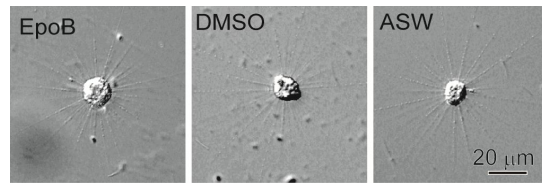


図4. Epothilone Bによる軸足収縮阻害効果。薬剤処理により機械刺激による軸足収縮の誘発効果が阻害された。

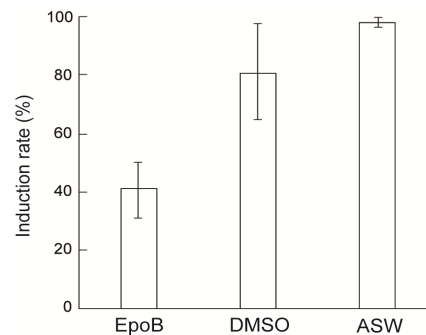


図5. Epothilone Bによる軸足収縮誘発率。薬剤処理により軸足誘発率の有意な低下が認められた。

### (3) 検出システムの検討

既存の CCD カメラによる顕微鏡画像解析により軸足長の変化を検出できることが分かった。ただし、オフラインでの解析となるため、実時間の解析に近づけるためには画像処理による検出アルゴリズムの開発が必要になる。また半導体カメラを利用した小型化については画像の分解能の問題を克服する必要がある。今後の検討課題となった。

### (4) *In-vivo* イメージング

蛍光プローブ結合型パクリタキセルを作用させ蛍光顕微鏡観察を行った。細胞が生きた状態で、細胞体の核から伸長している微小管束を観察可能であった(図6)。蛍光イメージング法が適用できれば、軸足長の変化を蛍光で検出可能となり、検出感度の向上や定量解析の信頼性が高まる。加えて、マルチプレートの使用による多サンプルの検出および自動化システムへの応用も可能となる。

今後は、遺伝子導入による蛍光チューブリン標識タイヨウチュウを作成し、チューブリ

ンの機能を保持しつつ *in-vivo* アッセイ系としての細胞培養系を確立する。抗腫瘍活性を有する新規薬剤の活性試験に利用可能な全く新しい原理に基づく生物検定系として、さらに開発を進めていく。



図 6 . 蛍光プローブ型パクリタキセルによる生細胞 *in-vivo* 蛍光イメージング .

#### < 引用文献 >

Enomoto et al. Re-elongation of axopodia after induction of rapid axopodial contraction in heliozoon *Raphidiophrys contractilis*. *Jpn J Protozool*, 2011, 44:58-59.

de Fátima et al. From nature to market: examples of natural products that became drugs. *Recent Pat Biotechnol*. 2014, 8:76-88.

Wani et al. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971, 93:2325-2327.

#### 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 )

##### [ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

Inoue R, Ando M. Microtubule dynamics during rapid axopodial contraction in heliozoon *Raphidiophrys contractilis*. 第 85 回日本動物学会大会, 2014 年 9 月 11 日, 予稿集 p.123, Sendai.

Inoue R, Ando M. A novel mechanism of rapid axopodial contraction in heliozoon *Raphidiophrys contractilis*. 第 47 回日本原生生物学会大会, 講演要旨集, 2014 年 11 月 1 日,

p.17, Sendai.

Inoue R, Ando M. Ultrastructural changes during axopodial contraction and re-elongation in heliozoon *Raphidiophrys contractilis*. 第 84 回日本動物学会大会, 2013 年 9 月 28 日, 予稿集 p.175, Okayama.

Inoue R, Ando M. Microtubule dynamics during rapid axopodial contraction in heliozoon *Raphidiophrys contractilis* revealed by immunoelectron microscopy. 第 47 回日本原生生物学会大会, 講演要旨集, 2013 年 11 月 9 日, p.19, Higashihirosima.

Hanahara K, Ando M. Real-time phenomenological analysis of dielectric behavior of *Euglena* cells during their cell-shape changes. 第 47 回日本原生生物学会大会, 講演要旨集, 2013 年 11 月 9 日, p.17, Higashihirosima.

##### [ 図書 ] ( 計 1 件 )

安藤元紀 他, 化学同人, 原生生物フロンティア, 2014, 165.

##### [ その他 ]

研究成果および学会発表の情報について, 自身のホームページを利用し, 随時更新・公表している。

[http://ed-www.ed.okayama-u.ac.jp/~rika/cell\\_physiology/index.html](http://ed-www.ed.okayama-u.ac.jp/~rika/cell_physiology/index.html)

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

安藤 元紀 ( ANDO, Motonori )

岡山大学・大学院教育学研究科・教授

研究者番号 : 20222789

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

石川 彰彦 ( ISHIKAWA, Teruhiko )

岡山大学・大学院教育学研究科・准教授  
研究者番号：10263617