

タイヨウチュウ *Actinophrys sol* を利用した抗腫瘍活性を有する
微小管阻害剤の *in-vivo* アッセイ系の検討

榎本 淑恵¹, 石川 彰彦², 洲崎 敏伸³, 安藤 元紀¹ (¹岡山大・院教育・細胞生理, ²岡山大・院教育・有機合成, ³神戸大・院理・生物)

Evaluation of an *in-vivo* bioassay system for microtubule inhibitors with antitumor activity using the heliozoon *Actinophrys sol*

Toshie ENOMOTO¹, Teruhiko ISHIKAWA², Toshinobu SUZAKI³ and Motonori ANDO¹ (¹Lab. Cell Physiol., Grad. Sch. Edu., Okayama Univ. ²Lab. Organic chem., Grad. Sch. Edu., Okayama Univ. ³Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

Screening of microtubule-affecting drugs with anti-tumor activity usually employs the purified tubulin and its polymerization-depolymerization assay *in vitro*. Results presented herein show that the heliozoon *Actinophrys sol*, having long and thin tentacles called axopodia including bundles of microtubules, is applicable to an *in-vivo* bioassay system to monitor the effects of microtubule inhibitors. In the presence of colchicine as a microtubule depolymerizing agent, the axopodial length of the heliozoon was shortened in a concentration-dependent manner. Pre-treatment of *A. sol* with paclitaxel (Taxol[®]) as a microtubule-stabilizing agent prevented axopodial degradation induced by cold treatment. These observations indicate that *A. sol* is useful as an effective *in-vivo* tool to monitor the effects of microtubule-

affecting agents with anti-tumor activity. Additional studies must be undertaken to examine the response of *A. sol* to various synthetic compounds targeting tubulin/microtubule systems.

【目的】現代の創薬科学研究において、優れたバイオアッセイシステムを有することは新薬開発の成功につながる最も重要な研究ステップとなっている。特に微小管関連タンパク質に関係する新薬の開発はその標的が悪性腫瘍であり、製薬会社は莫大な予算を投入し抗腫瘍活性を有する新薬の開発に鎬を削っている。アクチノフリソ目の一種であるタイヨウチュウ (*Actinophrys sol*) は軸足内に数百本の微小管の束を内包しその微小管束の重合あるいは脱重合を調節することにより軸足の長さを自在に変化させ、細胞の移動や捕食行動を行っている。*A. sol* の軸足の長さの変化を計測することは、即ち「生きたままの細胞の微小管の重合・脱重合作用を定量化する」ことと同等となる。抗腫瘍活性を有する新薬の開発はこれまで主に *in vitro* の実験系である微小管重合アッセイ法により行われてきたが、この系では *in vivo* での生体反応の知見は得られない。本研究では、軸足内に数百本の微小管束を内包する *A. sol* が、抗腫瘍活性を有する微小管阻害剤の *in-vivo* バイオアッセイ系として利用可能かどうか検討した。既知の微小管安定剤や微小管脱重合促進剤が軸足長に影響を与えることがわかった。新規の抗がん剤感受性試験に応用可能かどうか検討を開始した。

【材料と方法】*Chlorogonium euchlorum* を餌として室温で無菌二者培養した *A. sol* 細胞を 10% 海水（汽水）で洗浄後、観察用セルに 40 μ l 滴下し、ビペッティングの影響から回復するまで 2 時間静置した。薬剤処理前の細胞を倒立顕微鏡下で撮影した後、微小管脱重合促進剤であるコルヒチン¹⁾（最終濃度：0.01~7.5 mM）、およびポドフィロトキシン²⁾（最終濃度：1~100 μ M）を 40 μ l 加えて、1 時間後の細胞の変化を記録した。また、微小管安定剤であるパクリタキセル（タキソール[®]）³⁾ については微小管の脱重合阻害作用の影響を検討するため、以下の条件で実

験を行った。タキソール（最終濃度：1~10 μ M）を加えて 10 分静置し細胞を撮影した後、低温処理（4°C）を行い1時間後の細胞の変化を記録した。撮影した画像をコンピュータに取り込み、軸足の長さを測定した。1 個体につき長いものから5本を測定し、平均値をその個体の軸足の長さとした。

【結果と考察】微小管脱重合促進剤の影響を検討した結果、コルヒチン濃度が高くなるほど軸足長は短くなり、薬剤処理 1 時間後には 1 mM 以上のすべての濃度で有意差が認められた。また、3~5 mM の濃度では軸足長が 50% 以下の長さに短縮し、7.5 mM ではほぼすべての軸足が消失した。濃度に依存した影響が認められた。ポドフィロトキシンについてはその濃度が 1~100 μ M の範囲内では軸足長への影響は認められなかった。一方、微小管安定剤の影響を検討した結果、タキソールで前処理した場合、低温処理により誘発される軸足の短縮が抑制されることが判明した。

タイヨウチュウ *A. sol* の軸足長の変化をモニターすることにより、微小管安定剤や微小管脱重合促進剤の影響を検出可能であった。*A. sol* が抗腫瘍活性を有する微小管阻害剤の *in-vivo* バイオアッセイ系として利用可能であると考えられた。今後は、新規合成化合物で抗腫瘍活性を有する微小管阻害剤による影響を調べ、抗がん剤感受性試験に応用可能かどうか検討していく予定である。

【文献】

- 1) Kraus, E. et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 78, 4156.
- 2) Hartwell, J.L. and Schrecker, A.W. (1951) J. Am. Chem. Soc. 73, 2909.
- 3) Higashide, E. et al. (1977) Nature. 270, 721.